

(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2005-517427

(P2005-517427A)

(43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int.C1.<sup>7</sup>

F 1

テーマコード(参考)

**C12N 15/09**  
**A61K 31/7105**  
**A61K 48/00**  
**A61P 1/16**  
**A61P 31/14**

C 12 N 15/00 Z N A A  
A 61 K 31/7105  
A 61 K 48/00  
A 61 P 1/16  
A 61 P 31/14

4 B 02 4  
4 C 08 4  
4 C 08 6

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 136 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-569657 (P2003-569657)	(71) 出願人	500203684 サーナ・セラピューティクス・インコーポ レイテッド S i r n a T h e r a p e u t i c s , l n c .
(86) (22) 出願日	平成15年2月20日 (2003.2.20)		
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月17日 (2004.5.17)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/005043		
(87) 國際公開番号	W02003/070750		
(87) 國際公開日	平成15年8月28日 (2003.8.28)		
(31) 優先権主張番号	60/358,580	(74) 代理人	230104019 弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成14年2月20日 (2002.2.20)	(74) 代理人	100106840 弁理士 森田 耕司
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	100105991 弁理士 田中 玲子
(31) 優先権主張番号	60/363,124		
(32) 優先日	平成14年3月11日 (2002.3.11)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	PCT/US02/09187		
(32) 優先日	平成14年3月26日 (2002.3.26)		
(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C型肝炎ウイルス(H C V)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、C型肝炎ウイルス(H C V)の遺伝子発現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、C型肝炎ウイルス(H C V)の遺伝子の発現および/または活性に対するRNA干渉(R N A i)を媒介しうる小核酸分子、例えば、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。小核酸分子は、H C V感染、肝不全、肝細胞癌、肝硬変、およびH C Vの発現または活性の調節に応答する他の任意の疾病または病気の治療において有用である。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

C型肝炎ウイルス(HCV)の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸(siNA)分子であって、前記二本鎖siNA分子の一方の鎖はHCV 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むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、前記二本鎖siNA分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分は糖修飾を含むことを特徴とするsiNA分子。

**【請求項 2】**

HCV RNAがHCVマイナス鎖RNAを含む、請求項1記載のsiNA分子。 10

**【請求項 3】**

HCV RNAがHCVプラス鎖RNAを含む、請求項1記載のsiNA分子。

**【請求項 4】**

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 5】**

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 6】**

siNA分子中のすべてのピリミジンヌクレオチドが糖修飾を含む、請求項1記載のsiNA分子。

**【請求項 7】**

修飾されたピリミジンヌクレオチドが、2'-デオキシ-ピリミジン、2'-O-アルキルピリミジン、2'-C-アルキルピリミジン、2'-デオキシ-2'-フルオロ-ピリミジン、2'-アミノピリミジン、2'-メトキシ-エトキシピリミジン、および2'-O、4'-C-メチレンピリミジンヌクレオチドの単独または任意の組み合わせから選択される、請求項6記載のsiNA分子。 20

**【請求項 8】**

2'-O-アルキルピリミジンヌクレオチドが2'-O-メチルまたは2'-O-アリルである、請求項7記載のsiNA分子。

**【請求項 9】**

二本鎖siNA分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列が、HCV蛋白質またはそのフラグメントをコードするRNAに相補的である、請求項1記載のsiNA分子。 30

**【請求項 10】**

siNA分子の各鎖が約19-約29ヌクレオチドを含み、各鎖が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1記載のsiNA分子。

**【請求項 11】**

前記siNA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siNA分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列を含み、第2のフラグメントはsiNA分子のセンス鎖のヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のsiNA分子。 40

**【請求項 12】**

センス鎖がリンカー分子を介してアンチセンス鎖と連結されている、請求項1記載のsiNA分子。

**【請求項 13】**

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12記載のsiNA分子。

**【請求項 14】**

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12記載のsiNA分子。

**【請求項 15】**

センス鎖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であり、センス領域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である、請求項1記載のsiNA分子。 50

**【請求項 16】**

センス鎖が3'末端および5'末端を含み，前記センス鎖の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が存在する，請求項1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】**

アンチセンス鎖が，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1記載のs i N A分子。  
10

**【請求項 19】**

アンチセンス鎖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であり，アンチセンス鎖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である，請求項1記載のs i N A分子。

**【請求項 20】**

アンチセンス鎖が前記アンチセンス鎖の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1記載のs i N A分子。

**【請求項 21】**

アンチセンス鎖が前記アンチセンス鎖の3'末端にグリセリル修飾を含む，請求項1記載のs i N A分子。  
20

**【請求項 22】**

s i N A分子の各鎖が2'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 23】**

s i N A分子の各鎖の約19ヌクレオチドがs i N A分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成し，s i N A分子の各鎖の少なくとも2つの3'末端ヌクレオチドがs i N A分子の他方の鎖のヌクレオチドと塩基対形成しない，請求項22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2つの3'末端ヌクレオチドが2' - デオキシ - ピリミジンである，請求項23記載のs i N A分子。  
30

**【請求項 25】**

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24記載のs i N A分子。

**【請求項 26】**

s i N A分子の各鎖の2'ヌクレオチドがs i N A分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成する，請求項22記載のs i N A分子。

**【請求項 27】**

アンチセンス鎖の約19ヌクレオチドがH C V 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する，請求項22記載のs i N A分子。  
40

**【請求項 28】**

アンチセンス鎖の2'ヌクレオチドがH C V 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する，請求項22記載のs i N A分子。

**【請求項 29】**

アンチセンス鎖の5'末端が任意にリン酸基を含んでいてもよい，請求項1記載のs i N A分子。

**【請求項 30】**

アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部がH C V R N Aの5' - 非翻訳領域のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である，請求項1記載のs i N A分子。

**【請求項 31】**

アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部が、すべてのHCV単離物のRNA中に存在するHCV RNAのヌクレオチド配列またはその一部に相補的である、請求項1記載のsiRNA分子。

【請求項32】

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

【請求項33】

請求項1記載のsiRNA分子を含む医薬品。

【請求項34】

請求項1記載のsiRNA分子を含む活性成分。

【請求項35】

C型肝炎ウイルス(HCV)の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸(siRNA)分子の使用であって、ここで、二本鎖siRNA分子の鎖の一方はHCV 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むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖siRNA分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分が糖修飾を含むことを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、McSwiggan, PCT/US02/09187(2002年3月26日出願)、米国特許出願60/401,104(2002年8月5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。

【0002】

本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)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、HCV経路に関与する遺伝子の発現および/または活性の調節に応答する健康状態および疾病に関連する化合物、組成物、および方法に関する。特に、本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)の遺伝子発現に対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる小核酸分子、例えば短干渉核酸(siRNA)、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)分子に関連する。

【背景技術】

【0003】

以下はRNAiに関する関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

10

20

30

40

50

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) の生成に応答して、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

## 【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 (siRNA) 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 (Bershtein 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 塩基対のデュープレックスを含む (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 siRNA デュー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、siRNA デュー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)。

20

## 【0006】

RNAi は種々の系で研究してきた。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سفェクトしたショウジョウワバエ細胞における 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 のデュー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。ショウジョウワ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 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 デュープレックスは 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 siRNA 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 siRNA 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。siRNA デュー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 siRNA ガイド配列の 3' 末端ではなくガイド配列の 5' 末端によ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 デュー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 (Nykanen et

30

40

50

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siRNAデュープレックスの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、RNAi活性に有害な影響を有しないことが示されている。siRNA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、siRNAを2' - O - メチルヌクレオチドで置換すると、RNAi活性が完全に破壊されたことを報告する。Liら(国際公開WO00/44914)およびBeachら(国際公開WO01/68836)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。

【0008】

Parrishら(2000, Molecular Cell, 6, 1977 - 1087)は、C. elegansにおいて長い(>25nt)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T3RNA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リボ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 - ブロモウラシル、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 - ブ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。

【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WO01/68836)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WO01/75164)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するために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WO00/44914)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-Goetzら(国際公開WO01/36646)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WO99/32619)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WO00/01846)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WO01/29058)は、dsRNA媒介性RNAiに関する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。

10

20

30

40

## 【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を用いてポリコー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。Honner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、ショウジョウワバエにおけるRNAiに関連するかもしれないある種のショウジョウワ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を媒介するある長さのdsRNA(25ヌクレオチドより長い)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。

50

50

## 【0011】

McCaffreyら(2002, Nature, 418, 38-39)は、マウスにおけるキメラHCVNS5B蛋白質/ルシフェラーゼ転写産物を標的とするある種のsiRNAコンストラクトの使用を記載する。

## 【0012】

R a n d a l l ら ( 2 0 0 3 , P N A S U S A , 1 0 0 , 2 3 5 - 2 4 0 ) は , H u h 7 肝癌細胞株中の H C V R N A を標的とするある種の s i R N A コンストラクトを記載する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

発明の概要

本発明は、短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を用いて R N A 干渉 ( R N A i ) により、遺伝子、例えば、H C V 感染、肝不全、肝細胞癌、肝硬変、および / または H C V 感染に伴う他の疾病状態の発達または維持に関連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。本発明はまた、小核酸分子、例えば、短干渉核酸 ( s i N A ) 、短干渉 R N A ( s i R N A ) 、二本鎖 R N A ( d s R N A ) 、マイクロ R N A ( m i R N A ) 、および短ヘアピン R N A ( s h R N A ) 分子を用いて、R N A 干渉 ( R N A i ) により、C 型肝炎ウイルス ( H C V ) の発現および活性、または C 型肝炎ウイルス ( H C V ) 遺伝子の発現および / または活性に関与する遺伝子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、C 型肝炎ウイルス ( H C V ) の発現を調節するのに用いられる小核酸分子、例えば、短干渉核酸 ( s i N A ) 、短干渉 R N A ( s i R N A ) 、二本鎖 R N A ( d s R N A ) 、マイクロ R N A ( m i R N A ) 、および短ヘアピン R N A ( s h R N A ) 分子および方法を特徴とする。本発明の s i N A 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 s i N A 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、R N A 干渉 ( R N A i ) により細胞における C 型肝炎ウイルス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 ( s i N A ) 分子を特徴とする。化学的に修飾された s i N A 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 s i N A 分子の種々の特性が改良される。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 s i N A はその R N A i 活性を保持している。本発明の s i N A 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。

【 0 0 1 4 】

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、C 型肝炎ウイルスをコードする遺伝子の発現を調節する 1 またはそれ以上の s i N A 分子および方法を特徴とする。詳細には、本発明は、H C V 蛋白質、例えば、表 I に示される G e n b a n k 受託番号の配列によりコードされる蛋白質の発現を調節する s i N A 分子を特徴とする。

【 0 0 1 5 】

1 つの態様においては、本発明は、H C V マイナス鎖、例えば、G e n b a n k 受託番号 H P C K 1 S 1 、C 型肝炎ウイルス ( H C V - 1 b 株、クローン H C V - K 1 - S 1 ) 、完全ゲノム；G e n b a n k 受託番号 D 5 0 4 8 3 ; 9 4 1 0 n t . に対して R N A i 特異性を有する s i N A 分子を特徴とする。

【 0 0 1 6 】

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、H C V 感染の細胞標的、例えば、細胞レセプター、細胞表面分子、細胞酵素、細胞転写因子、および / またはサイトカイン、セカンドメッセンジャー、および細胞アクセサリ分子、例えば、限定されないが、インターフェロン制御因子 ( I R F ; 例えば、G e n b a n k 受託番号 A F 0 8 2 5 0 3 . 1 ) ；細胞 P K R 蛋白質キナーゼ ( 例えば、G e n b a n k 受託番号 X M \_ 0 0 2 6 6 1 . 7 ) ；ヒト真核生物開始因子 2 B ( e 1 F 2 B ガンマ； 例えば、G e n b a n k 受託番号 A F 2 5 6 2 2 3 , および / または e 1 F 2 ガンマ； 例えば、G e n b a n k 受託番号 N M \_ 0 0 6 8 7 4 . 1 ) ；ヒト D E A D ボックス蛋白質 ( D D X 3 ; 例えば G e n b a n k 受託番号 X M \_ 0 1 8 0 2 1 . 2 ) ；および H C V 3 ' - U T R のポリ ( U ) トラクトに結合する細胞蛋白質、例えばポリピリミジントラクト結合蛋白質 ( 例えば

10

20

30

30

40

50

, G e n b a n k 受託番号 N M \_ 0 3 1 9 9 1 . 1 および X M \_ 0 4 2 9 7 2 . 3 ) の遺伝子の発現を調節する 1 またはそれ以上の s i N A 分子および方法を特徴とする。

【 0 0 1 7 】

H C V ゲノムの高い配列変異性のため, 広い治療用途のための s i N A 分子の選択には, H C V ゲノムの保存領域が含まれるであろう。1つの態様においては, 本発明は, H C V ゲノムの保存領域を標的とする s i N A 分子に関する。H C V ゲノムの保存領域の例には, 限定されないが, 5 ' - 非コーディング領域 ( N C R , 5 ' - 非転写領域, U T R とも称される), コア蛋白質コーディング領域の 5 ' 末端, および 3 ' - N C R が含まれる。H C V ゲノム R N A は, 5 ' - N C R 中に内部リボソームエントリー部位 ( I R E S ) を含み, これは 5 ' - キャップ構造と独立して翻訳を媒介する ( W a n g e t a l . , 1 9 9 3 , J . V i r o l . , 6 7 , 3 3 3 8 - 4 4 )。H C V R N A ゲノムの全長配列は臨床的に単離されたサブタイプの間で異なり, これには少なくとも 1 5 種が存在するが ( S i m m o n d s , 1 9 9 5 , H e p a t o l o g y , 2 1 , 5 7 0 - 5 8 3 ) , H C V の 5 ' - N C R 配列はすべての既知のサブタイプの間で高度に保存されており, これはおそらく共通の I R E S メカニズムを保存しているためであろう ( O k a m o t o e t a l . , 1 9 9 1 , J . G e n e r a l V i r o l . , 7 2 , 2 6 9 7 - 2 7 0 4 )。したがって, H C V の異なる単離物のすべてを標的とするよう s i N A 分子を設計することができる。種々の H C V 単離物の保存領域を標的とするよう設計された s i N A 分子は, 様々な患者集団において H C V 複製の有効な阻害を可能とし, H C V ゲノムの非保存領域における変異により進化する H C V 偽種に対する s i N A 分子の有効性を確実にすることができる。したがって, H C V の保存ヌクレオチド配列と相互作用するよう s i N A 分子を設計することにより, 1 つの s i N A 分子を H C V のすべての単離物に対して標的化させることができる ( そのような保存配列は, すべての H C V 単離物の R N A に存在すると予測される )。

【 0 0 1 8 】

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, H C V および / または H C V 感染, 肝不全, 肝細胞癌, および肝硬変の維持または発達に関連する細胞蛋白質をコードする遺伝子, 例えば, 表 I に示される G e n B a n k 受託番号により表される配列 ( 本明細書において一般に H C V と称される ) をコードする遺伝子の発現を調節する 1 またはそれ以上の s i N A 分子および方法を特徴とする。以下に, 例示的 C 型肝炎ウイルス ( H C V ) 遺伝子 ( 本明細書において一般に H C V と称する ) を参照して, 本発明の種々の観点および態様を説明する。しかし, このような参照は例示のみを意味し, 本発明の種々の観点および態様はまた, 別の H C V 遺伝子, 例えば変異 H C V 遺伝子, H C V 遺伝子のスプライシング変種, および異なる株の H C V をコードする遺伝子, ならびに H C V の細胞標的, 例えば本明細書に記載されるものを発現する他の遺伝子にも向けられている。種々の観点および態様はまた, H C V 経路に関与する他の遺伝子, 例えば, H C V 感染, 肝不全, 肝細胞癌, および肝硬変の維持および / または発達に関与する細胞蛋白質をコードする遺伝子, または H C V 感染に関連する他の蛋白質, 例えば H C V のライフサイクルにおいて利用される細胞蛋白質を発現する他の遺伝子にも向けられている。そのような追加の遺伝子は, H C V に関して本明細書に記載される方法を用いて, 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行うことができる。言い換えれば, 以下に定義され記載される態様において引用される " H C V " との用語は, H C V 感染の発達または維持に関連する遺伝子, 例えば, 異なる株の H C V のポリペプチド等の H C V ポリペプチドをコードする遺伝子, 变異 H C V 遺伝子, および H C V 遺伝子のスプライシング変種, ならびに遺伝子発現, 複製, および / または H C V 活性の H C V 経路に関与する細胞遺伝子を包含することを意味する。また, 以下に定義され記載される態様において引用される " H C V " との用語は, H C V ウィルス遺伝子産物および H C V 感染に関与する細胞遺伝子産物, 例えば本明細書に記載されるものを包含することを意味する。すなわち, 本明細書に " H C V " との用語を参照して記載されるそれぞれの態様は, 本明細書においてその用語が定義

10

20

30

40

50

されるように，“HCV”との用語によりカバーされるすべてのウイルス、細胞およびウイルス蛋白質、ペプチド、ポリペプチド、および／またはポリヌクレオチド分子に適用可能である。

【 0 0 1 9 】

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

【 0 0 2 0 】

1つの態様においては、本発明は、HCV RNAに対するRNAi活性を有するsiRNA分子を特徴とし、siRNA分子は、HCVを有する任意のRNAに相補的な配列またはHCVがコードする他の配列、例えば表Iに示されるGenBank受託番号を有する配列を含む。表IIIIおよびIVまたは本明細書に示される化学修飾を、本発明の任意のsiRNAコンストラクトに適用することができます。

【 0 0 2 1 】

1つの態様においては、本発明は、HCV RNAに対するRNAi活性を有するsiRNA分子を特徴とし、siRNA分子は、HCVコーディング配列、例えば、表Iに示されるHCVの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IIIIおよびIVまたは本明細書に示される化学修飾を本発明の任意のsiRNAコンストラクトに適用することができる。

【 0 0 2 2 】

別の態様においては、本発明はHCV遺伝子に対するRNAi活性を有するsiNA分子を特徴とし、siNA分子はHCV遺伝子、例えば表Iに示されるGenBank受託番号を有するHCV配列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、HCV遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用してHCV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、例えば、siNAは、HCV遺伝子のクロマチン構造を変化させてHCV遺伝子の転写を防止する細胞プロセスによりHCV遺伝子発現の制御を媒介する。

【 0 0 2 3 】

別の態様においては、本発明は、s i N A 分子のアンチセンス領域に、ヌクレオチド配列、例えば、H C V 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ヌクレオチド配列を含む s i N A 分子を特徴とする。別の態様においては、本発明は、H C V 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、s i N A コンストラクトのアンチセンス領域を含む s i N A 分子を特徴とする。

【 0 0 2 4 】

1つの態様においては、HCVsinaコンストラクトのアンチセンス領域は、配列番号1-696または1393-1413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。1つの態様においては、アンチセンス領域はまた、配列番号697-1392, 1414, 1420, 1428-1434, 1456-1462, 1479, 1483, 1489-1491, 1493, 1497-1498, 1500, 1513-1524, 1551, 1556, 1570-1581, 1618, 1620, 1622, 1624, 1626, または1627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、HCVコンストラクトのセンス領域は、配列番号1-696, 1393-1413, 1417-1419, 1421-1427, 1449-1455, 1477, 1481, 1485, 1487, 1494-1496, 1499, 1501-1512, 1549, 1553, 1558-1569, 1582-1593, 1617, 1619, 1621, 1623, または1625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1606の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1607の配列を含むことができる。センス領域は配列番号1608の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1609の配列を含むことができる。センス領域は配列番号1610の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1611の配列を含むことができる。センス領域は配列番号1612の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1613の配列を含むことができる。

列番号 1613 の配列を含むことができる。センス領域は配列番号 1614 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 1615 の配列を含むことができる。センス領域は配列番号 1612 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 1616 の配列を含むことができる。

【0025】

1つの態様においては、本発明の siNA 分子は、配列番号 1-1627 のいずれかを含む。配列番号 1-1627 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 HCV 配列（例えば、約 19-約 25 個、または約 19, 20, 21, 22, 23, 24、または 25 個の連続する HCV ヌクレオチド）を含むことができる。

10

【0026】

さらに別の態様においては、本発明は、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配列、例えば、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 II および IV および本明細書に記載される化学修飾を本発明の任意の siRNA コンストラクトに適用することができる。

【0027】

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、アンチセンス鎖は、HCV 蛋白質をコードする RNA 配列に相補的であり、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、センス鎖および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。

20

【0028】

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、アンチセンス領域は HCV 蛋白質をコードする RNA 配列に相補的であり、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、センス領域および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。

30

【0029】

本発明の 1 つの態様においては、siNA 分子は、HCV 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、センス鎖は HCV 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む。

30

【0030】

別の態様においては、siNA 分子は、HCV 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、センス領域は HCV 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む。

40

【0031】

1 つの態様においては、本発明の siNA 分子は、HCV 遺伝子によりコードされる RNA の発現を調節する RNAi 活性を有する。HCV 遺伝子は互いにある程度の配列ホモジニーを共有することができるため、siNA 分子は、異なる HCV 標的の間で共有されているかまたは特定の HCV 標的にユニークな配列を選択することにより、一群の HCV 遺伝子を標的とするか、または特定の HCV 遺伝子を標的とするよう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 HCV 遺伝子（例えば、異なる HCV アイソフォーム、スプライシング変種、変異体遺伝子等）を標的とするように、いくつかの HCV 遺伝子間でホモジニーを有する HCV 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、

50

s i N A 分子は，s i N A 分子がR N A i 活性を媒介するために必要とする高度の特異性のため，特定のH C V R N A 配列にユニークな配列を標的とするよう設計することができる。

【 0 0 3 2 】

1つの態様においては，R N A 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s i N A 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塩基対を含むデュー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s i N A 分子は約1-約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ープレックス，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ープレックスを含む。

【 0 0 3 3 】

1つの態様においては，本発明は，H C V を発現する核酸分子，例えばH C V 蛋白質をコードするR N A 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s i N A 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s i N A コンストラクト中で用いた場合，細胞においてR N A 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でき。さらに，P a r r i s h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充分に許容され，修飾s i N A 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でき。

【 0 0 3 4 】

1つの態様においては，本発明のs i N A 分子は，R N A i を媒介する能力を維持しながら，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s i N A 分子は，s i N A 分子中に存在するヌクレオチドの総数の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s i N A 分子は，一般に，約5% - 約100%の修飾ヌクレオチド(例えば，約5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%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s i N A 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，s i N A 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。s i N A 分子が一本鎖である場合，修飾のパーセントは一本鎖s i N A 分子中に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。同様に，s i N A 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 3 5 】

1つの態様においては，本発明は，C型肝炎ウイルス(H C V)の複製を阻害する二本鎖干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし，二本鎖s i N A 分子の一方の鎖は，H C V R N A 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鎖であり，他方の鎖は，アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。1つの態様においては，H C V R N A はH C Vマイナス鎖R N A を含む。別の態様においては，H C V R N A はH C Vプラス鎖R N A を含む。

【 0 0 3 6 】

1つの態様においては，本発明は，C型肝炎ウイルス(H C V)の複製を阻害する二本鎖干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし，二本鎖s i N A 分子の一方の鎖はH C V R

10

20

30

30

40

50

N A 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鎖であり，他方の鎖は，アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり，二本鎖 s i N A 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分は糖修飾を含む。1つの態様においては，二本鎖 s i N A 分子中に存在するすべてのピリミジンヌクレオチドは糖修飾を含む。1つの態様においては，二本鎖 s i N A 分子の各鎖は約 19 - 約 29 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。別の態様においては，二本鎖 s i N A 分子は 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 s i N A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列を含み，第 2 のフラグメントは s i N A 分子のセンス鎖のヌクレオチド配列を含む。さらに別の態様においては，二本鎖 s i N A 分子のセンス鎖は，リンカー分子，例えば，ポリヌクレオチドリンカーまたは非ヌクレオチドリンカーを介してアンチセンス鎖と連結されている。別の態様においては，二本鎖 s i N A 分子のセンス鎖に存在する任意のピリミジンヌクレオチド（すなわち，1 またはそれ以上またはすべて）は 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり，センス領域に存在する任意のプリンヌクレオチド（すなわち，1 またはそれ以上またはすべて）は 2' - デオキシプリンヌクレオチドである。さらに別の態様においては，二本鎖 s i N A 分子のセンス鎖は 3' 末端および 5' 末端を含み，センス鎖の 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（例えば，反転デオキシ無塩基成分）が存在する。別の態様においては，二本鎖 s i N A 分子のアンチセンス鎖は 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。さらに別の態様においては，二本鎖 s i N A 分子のアンチセンス鎖に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり，アンチセンス鎖に存在する任意のプリンヌクレオチドは 2' - O - メチルプリンヌクレオチドである。別の態様においては，二本鎖 s i N A 分子のアンチセンス鎖は，アンチセンス鎖の 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。さらに別の態様においては，アンチセンス鎖はアンチセンス鎖の 3' 末端にグリセリル修飾を含む。さらに別の態様においては，アンチセンス鎖の 5' 末端は任意にリン酸基を含んでいてもよい。

## 【 0037 】

1 つの態様においては，本発明は，C 型肝炎ウイルス（ H C V ）の複製を阻害する二本鎖短干涉核酸（ s i N A ）分子を特徴とし，二本鎖 s i N A 分子の一方の鎖は H C V R N A 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鎖であり，他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり，二本鎖 s i N A 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分は糖修飾を含み，前記 s i N A 分子の 2 つの鎖のそれぞれは 21 ヌクレオチドを含む。1 つの態様においては，アンチセンス鎖の 21 ヌクレオチドは H C V 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する。別の態様においては，アンチセンス鎖の約 19 ヌクレオチドは H C V 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する。1 つの態様においては， s i N A 分子の各鎖は s i N A 分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成する。別の態様においては， s i N A 分子の各鎖の約 19 ヌクレオチドは s i N A 分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成し， s i N A 分子の各鎖の少なくとも 2 つの 3' 末端ヌクレオチドは s i N A 分子の他方の鎖のヌクレオチドと塩基対形成しない。1 つの態様においては， s i N A 分子の各鎖の塩基対形成しない 2 つの 3' 末端ヌクレオチドのそれぞれは， 2' - デオキシ - ピリミジン，例えば 2' - デオキシ - チミジンである。

## 【 0038 】

1 つの態様においては，本発明は，C 型肝炎ウイルス（ H C V ）の複製を阻害する二本鎖短干涉核酸（ s i N A ）分子を特徴とし，二本鎖 s i N A 分子の一方の鎖は H C V R N A 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鎖であり，他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を

10

20

30

40

50

含むセンス鎖であり，二本鎖 s i N A 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分は糖修飾を含み，アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は H C V R N A またはその一部の 5' - 非翻訳領域のヌクレオチド配列に相補的である。

【 0 0 3 9 】

別の態様においては，本発明は，C 型肝炎ウイルス ( H C V ) の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とし，二本鎖 s i N A 分子の一方の鎖は H C V R N A 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鎖であり，他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり，二本鎖 s i N A 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分は糖修飾を含み，アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部はすべての H C V の R N A に存在する H C V R N A のヌクレオチド配列に相補的である。

【 0 0 4 0 】

1 つの態様においては，本発明は，C 型肝炎ウイルス ( H C V ) の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とし，二本鎖 s i N A 分子の一方の鎖は H C V 蛋白質またはそのフラグメントをコードする R N A 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ンチセンス鎖であり，他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。1 つの態様においては，二本鎖 s i N A 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分は糖修飾を含む。

【 0 0 4 1 】

1 つの態様においては，本発明は，本発明の s i N A 分子を，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。

【 0 0 4 2 】

1 つの態様においては，本発明は，本発明の s i N A 分子を含む医薬品を特徴とする。

【 0 0 4 3 】

1 つの態様においては，本発明は，本発明の s i N A 分子を含む活性成分を特徴とする。

【 0 0 4 4 】

1 つの態様においては，本発明の s i N A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は，全ての H C V 単離物の R N A 中に存在する H C V R N A のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である。

【 0 0 4 5 】

1 つの態様においては，本発明は，C 型肝炎ウイルス ( H C V ) の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸 ( s i N A ) 分子の使用を特徴とし，前記二本鎖 s i N A 分子の一方の鎖は H C V R N A 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鎖であり，他方の鎖は，アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり，前記二本鎖 s i N A 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分は糖修飾を含む。

【 0 0 4 6 】

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 R N A 分子に固有の，インビオ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 R N A 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 s i N A とは異なり，化学的に修飾された s i N A 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

10

20

30

40

50

きる。

【0047】

本発明の siNA 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 siNA 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リ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。

10

【0048】

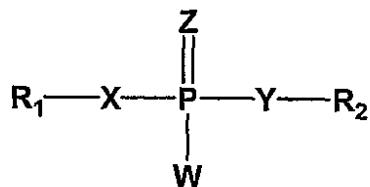
本発明の 1 つの態様は、本発明の少なくとも 1 つの siNA 分子をコードする核酸配列を、核酸分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを提供する。本発明の別の態様は、そのような発現ベクターを含む哺乳動物細胞を提供する。哺乳動物細胞はヒト細胞であってもよい。発現ベクターの siNA 分子は、センス領域およびアンチセンス領域を含むことができる。アンチセンス領域は HCV をコードする RNA または DNA 配列に相補的な配列を含むことができ、センス領域はアンチセンス領域に相補的な配列を含むことができる。siNA 分子は、相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有する 2 つの別々の鎖を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

20

【0049】

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 HCV 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 (siNA) 分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式 I :

【化 1】



30

[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、アルカリール、またはアラルキルであり、W, X, Y、および Z は任意に全て O でなくてよい]

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。

40

【0050】

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、siNA 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 siNA 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 siNA 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

50

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 siNA 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 siNA 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 siNA 分子はまた、式 I - VI 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

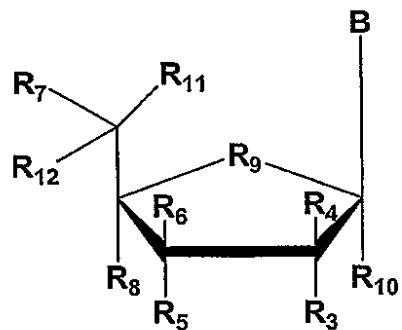
30

40

## 【0051】

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 HCV 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（siNA）分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式 II：

## 【化 2】



## [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ルキル、F, Cl, Br, CN, CF3, OC F3, 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 I 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、ネブライン、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。

## 【0052】

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、siNA 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 siNA 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

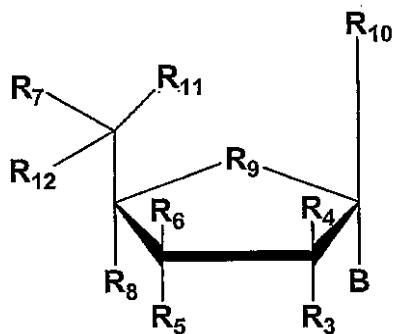
50

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 I I 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 I I 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。

### 【 0 0 5 3 】

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 H C V 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、式 I I I :

### 【 化 3 】



10

20

30

### [ 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, O H, 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, C l, B r, C N, C F 3, O C F 3, O C N, O - アルキル, S - アルキル, N - アルキル, O - アルケニル, S - アルケニル, N - アルケニル, S O - アルキル, アルキル - O S H, アルキル - O H, O - アルキル - O H, O - アルキル - S H, S - アルキル - O H, S - アルキル - S H, アルキル - S - アルキル, アルキル - O - アルキル, O N O 2, N O 2, N 3, N H 2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, O N H 2, O - アミノアルキル, O - アミノ酸, O - アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカリール, アミノアルキルアミノ, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式 1 を有する基であり； R 9 は, O, S, C H 2, S = O, C H F, または C F 2 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 R N A 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 - ニトロインドール, ネプラリン, ピリドン, ピリジノン, または標的 R N A 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。

40

### 【 0 0 5 4 】

式 I I I 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 I I I 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 I I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは

50

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 siNA 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 I 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含むことができる。

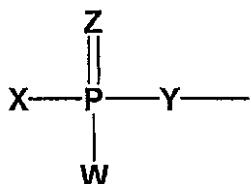
【0055】

別の態様においては、本発明の siNA 分子は、式 I II または I III を有するヌクレオチドを含み、ここで、式 I II または I 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 I II または I III を有するヌクレオチドは、siNA 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、siNA 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。

【0056】

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 HCV 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（siNA）分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式 IV :

【化 4】



10

20

[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、アルカリール、アラルキル、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]

を有する 5' 末端リン酸基を含む。

【0057】

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 siNA 分子を特徴とし、ここで、siNA 分子は、全 RNA siNA 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 siNA 分子を特徴とし、ここで、siNA 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 - 約 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 siNA 分子、例えば式 I - VII のいずれかを有する化学的修飾を有する siNA 分子の標的 - 相補的鎖に存在する。

【0058】

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 HCV 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（siNA）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 siNA 鎖に約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 個またはそれ以上のホスホ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（siNA）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 siNA 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（siNA）を特徴とする。ホスホチオエートヌクレオチド間結合は、siNA 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 siNA

30

40

50

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, 10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, 10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。

#### 【0059】

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, 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またはそれ以上の(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またはそれ以上の、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またはそれ以上の、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ていないくともよい。

#### 【0060】

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

10

20

30

40

50

、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てなくてもよい。

## 【0061】

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/または約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（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 siNA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 siNA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ていなくてもよい。

## 【0062】

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 siNA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 siNA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

10

20

30

40

50

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。

【0063】

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スクレオチド間結合を有する、化学的に修飾された短干涉核酸(s i N A)分子を特徴とする。

【0064】

別の態様においては、本発明は、2'-5'ス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'ス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'ス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、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スクレオチドの約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上、例えばすべてのスクレオチド間結合は、2'-5'ス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スクレオチドの約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上、例えばすべてのスクレオチド間結合は、2'-5'スクレオチド間結合を含むことができる。

【0065】

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ープレックスを含み、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)スクレオチドの長さであり、デュープレックスは約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-VII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ープレックスを含み、この一方または両方は式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スクレオチドからなり、それぞれは2-スクレオチドの3'末端スクレオチドオーバーハングを有し、デュープレックスは約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)ス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-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-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)スクレオチドを有する直鎖状オリゴスクレオチドを含み、ここで、直鎖状オリゴスクレオチドは約19塩基対および2-スクレオチドの3'末端ス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。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スクレオチドを含む3'末端ス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。

【0066】

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)ス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-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-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化学的修飾で化学的に修飾された約42-約50(例えば、約42

10

20

30

40

50

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。

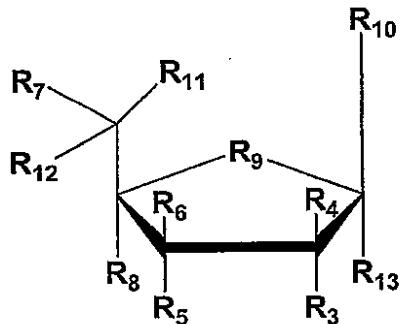
【0067】

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設計される。

【0068】

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】



10

20

30

40

[式中,

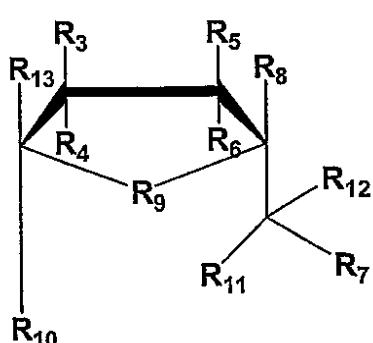
各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11, R12, およびR13は, 独立して, H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカリールまたはアラルキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OC F3, OC N, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-O SH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ON O2, NO2, N O2, N3, NH2, 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である]

を有する化合物を含む。

【0069】

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VI:

【化6】



50

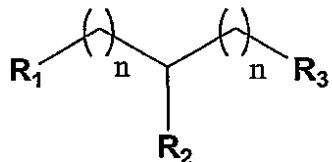
【式中】

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> , OC<sub>2</sub>F<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 - OS<sub>H</sub> , 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。 10

【0070】

別の態様においては , 本発明の siNA 分子は , 少なくとも 1 つ ( 例えは , 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 , 例えは , 式 V II :

【化 7】



20

【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> , OC<sub>2</sub>F<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 - OS<sub>H</sub> , 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。 30

【0071】

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 は 1 であり , R<sub>3</sub> 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 V II 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 ( 例えは , 図 10 の修飾 6 を参照 )。 40

【0072】

別の態様においては , 式 V , V I または V II 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。例えは , 式 V , V I または V II 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 V II 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。

【0073】

50

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 V 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。

【 0 0 7 4 】

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。

10

【 0 0 7 5 】

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。

【 0 0 7 6 】

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）。

20

【 0 0 7 7 】

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），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。

30

【 0 0 7 8 】

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（siNA）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

40

50

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）。

【0079】

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。

10

【0080】

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）。

20

【0081】

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H C V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），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

30

40

50

50

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に示されるいすれかの修飾を含み，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。これらの化学的に修飾されたsiRNAの非限定的例は図4および5および本明細書の表IIIAおよびIVに示される。

## 【0082】

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HCV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（siRNA）分子を特徴とし，ここで，siRNA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，siRNA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siRNAの非限定的例は，図4および5および本明細書の表IIIAおよびIVに示される。

## 【0083】

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HCV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（siRNA）分子を特徴とし，化学的に修飾されたsiRNA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），例えは，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（LNA）ヌクレオチド，2' - メトキシエチルヌクレオチド，4' - チオヌクレオチド，および2' - O - メチルヌクレオチド

10

20

30

40

50

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（LNA）ヌクレオチド、2' - メトキシエチルヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、および 2' - O - メチルヌクレオチドが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（LNA）ヌクレオチド、2' - メトキシエチルヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、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涉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（LNA）ヌクレオチド、2' - メトキシエチルヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、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（LNA）ヌクレオチド、2' - メトキシエチルヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、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（LNA）ヌクレオチド、2' - メトキシエチルヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、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 に示されるいすれかの修飾を含み、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。

## 【0084】

別の態様においては、本発明の siNA 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 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 - リボフラノシリル) ヌクレオチド）；2' - メトキシエトキシ（MOE）ヌクレオチド；2' - メチル - チオ - エチル、2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - クロロヌクレオチド、2' - アジドヌクレオチド、および 2' - O - メチルヌクレオチドが挙げられる。

## 【0085】

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

10

20

30

40

50

いて HCV 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 (siRNA) を特徴とし、ここで、化学的修飾は、化学的に修飾された siRNA 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 siRNA 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 siRNA 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 siRNA 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 siRNA 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 siRNA 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 siRNA 分子に結合したコンジュゲート分子は、ポリエチレンギリコール、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 siRNA 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、Vargese 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 siRNA 分子のコンジュゲーションの程度は、同時に siRNA が RNAi 活性を媒介する能力を維持しながら、siRNA 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 siRNA コンストラクトをスクリーニングして、siRNA 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。

10

20

30

40

50

#### 【0086】

1つの態様においては、本発明は、siRNA がさらに siRNA のセンス領域と siRNA 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 / 非ヌクレオチドリンカーを含む本発明の短干渉核酸 (siRNA) 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ンカーは、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ンカーでありうる。別の態様においては、ヌクレオチドリンカーは、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, *Ann. 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)。

#### 【0087】

さらに別の態様においては、本発明の非ヌクレオチドリンカーには、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、ポリエチレンギリコール、例えば 2-100 個のエチレンギ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: 635  
 3およびNucleic Acids Res. 1987, 75: 3113; Cload  
 and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 173: 63  
 24; Richardson and Schepartz, J. Am. Chem. So  
 c. 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. 199  
 0, 75: 6353; McCurdy et al., Nucleosides & Nuc  
 leotides 1991, 10: 287; Jschke et al., Tetra  
 hedron Lett. 1993, 34: 301; Ono et al., Bioch  
 emistry 1991, 30: 9914; Arnold et al., 国際公開W  
 089/02439; Usman et al., 国際公開WO95/06731; Du  
 dycz et al., 国際公開WO95/11910およびFerentz and  
 Verdine, J. Am. Chem. Soc. 1991, 773: 4000 (すべて  
 10 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  
 ソ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、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。  
 20

## 【0088】

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)を媒介する短干渉核酸(siRNA)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siRNA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。例えば、siRNA分子は、单一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、siRNAのセンス領域およびアンチセンス領域は、オリゴヌクレオチド中に存在するリボヌクレオチド(例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド)を有しない別々のオリゴヌクレオチドを含む。別の例においては、siRNA分子は单一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、siRNAのセンス領域およびアンチセンス領域は、本明細書に記載されるヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリソニカーにより連結されているか環化されており、オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド中に存在するリボヌクレオチド(例えば2'-OH基を有するヌクレオチド)を有しない。本出願人は、驚くべきことに、RNAi活性を支持するためには、siRNA分子中におけるリボヌクレオチド(例えば、2'-ヒドロキシル基を有するヌクレオチド)の存在が必要または必須ではないことを見いだした。したがって、1つの態様においては、siRNA中のすべての位置は、siRNA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。  
 30

## 【0089】

1つの態様においては、本発明のsiRNA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siRNA分子であり、ここで、siRNA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siRNA分子は、5'末端リソニ酸基を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖siRNA分子は5'末端リソニ酸基および3'末端リソニ酸基(例えば、2', 3'-環状リソニ酸)を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖siRNA分子は、約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siRNA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siRNA分子がRNAi活性を支持する能力が維持される程度に、siRNA分子中のすべての位置で、化学的に修飾されたヌク  
 40

レオチド、例えば式 I - VI 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。

【 0 0 9 0 】

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）、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、 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る、 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。

【 0 0 9 1 】

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' - 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、 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る、 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。

【 0 0 9 2 】

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）、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

10

20

30

40

50

，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。

## 【0093】

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' - 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。

## 【0094】

別の態様においては，本発明の一本鎖s i N A分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは，天然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s i N A分子を特徴とする。このように，本発明の一本鎖s i N A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R N A iを媒介する能力を維持する。

## 【0095】

1つの態様においては，本発明は，細胞中においてH C V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H C V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H C V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。

## 【0096】

1つの態様においては，本発明は，細胞中においてH C V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H C V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の配列と同一の配列を含み；そして（b）細胞におけるH C V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。

## 【0097】

10

20

30

40

50

別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のHCV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HCV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HCV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。

【0098】

別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のHCV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HCV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、siNAのセンス鎖配列は、標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして(b)細胞におけるHCV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。

【0099】

1つの態様においては、本発明は、組織外植片におけるHCV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HCV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)組織外植片におけるHCV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HCV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。

【0100】

1つの態様においては、本発明は、組織外植片においてHCV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HCV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、siNAのセンス鎖配列は標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして(b)組織外植片におけるHCV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HCV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。

【0101】

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HCV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HCV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)組織外植片におけるHCV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HCV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。

【0102】

1つの態様においては、本発明は、生物においてHCV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HCV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HCV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。

【0103】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のHCV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HCV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HCV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

10

20

30

40

50

に導入する，ことを含む。

【0104】

1つの態様においては，本発明は，細胞内においてHCV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HCV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HCV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。

【0105】

別の態様においては，本発明は，細胞内において2以上のHCV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HCV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HCV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。

10

【0106】

1つの態様においては，本発明は，組織外植片においてHCV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HCV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HCV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HCV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

【0107】

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HCV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HCV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HCV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HCV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

【0108】

1つの態様においては，本発明は，生物においてHCV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HCV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HCV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。

【0109】

別の態様においては，本発明は，生物において2以上のHCV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HCV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HCV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

【0110】

1つの態様においては，本発明は，生物においてHCV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HCV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。

【0111】

別の態様においては，本発明は，生物において2以上のHCV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HCV遺伝子の発現を調節するのに適した条件

50

下で、生物を1またはそれ以上の本発明のs i N A分子と接触させることを含む。

【0112】

本発明のs i N A分子は、種々のR N A分子を標的とするR N A iにより標的(H C V)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s i N A分子は、標的遺伝子に対応する種々のR N Aを標的とするよう用いられる。そのようなR N Aの非限定的例には、メッセンジャーR N A(m R N A)、標的遺伝子の選択的R N Aスプライシング変種、標的遺伝子の転写後修飾R N A、標的遺伝子のプレ-m R N A、および/またはR N A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重要性を判定することができる。これらのR N A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s i N A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(E S T)から入手可能な部分配列から実行することができる。

【0113】

別の態様においては、本発明のs i N A分子は、遺伝子ファミリー、例えばH C Vファミリー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H C V標的を標的とするs i N A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、s i N A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、m R N A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関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、H C V感染、肝不全、肝細胞癌、肝硬変および細胞または組織におけるH C Vのレベルに応答しうる他の適応症の進行および/または維持に関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。

【0114】

1つの態様においては、本発明のs i N A分子および/または方法は、G e n b a n k受託番号で表されるR N Aをコードする遺伝子、例えば、本明細書においてG e n b a n k受託番号(例えば表Iに示されるG e n b a n k受託番号)で表されるR N A配列をコードするH C V遺伝子の発現を阻害するために用いられる。

【0115】

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、ことを含む方法を特徴とする。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、本明細書に記載されるような再構成されたインピットロ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、

10

20

30

40

50

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。

【0116】

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プラリを生成し；そして(b) 標的H C V 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を特徴とする。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6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，H C V 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H C V R N A 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的H C V 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。

【0117】

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を特徴とする。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。

【0118】

"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。

【0119】

"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R N A の切断(および切断産物R N A の形成)を意味する。ほとんどの検出方法について，標的R N A 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。

【0120】

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s i N A 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 s i N A 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。

【 0 1 2 1 】

別の態様においては、本発明は、H C V 標的遺伝子を評価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 H C V 標的遺伝子の R N A に相補的な配列を含み；( b ) 細胞、組織、または生物において H C V 標的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、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。

【 0 1 2 2 】

別の態様においては、本発明は、H C V 標的遺伝子を評価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されてもよく、s i N A 鎖の一方は H C V 標的遺伝子の R N A に相補的な配列を含み；( b ) 生物学的システムにおける H C V 標的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。

【 0 1 2 3 】

"生物学的システム"とは、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 R N A i 活性に必要な成分を含む。"生物学的システム"との用語には、例えば、細胞、組織、または生物、またはそれらの抽出物が含まれる。生物学的システムとの用語にはまた、インビトロの設定で用いることができる再構成された R N A i 系が含まれる。

【 0 1 2 4 】

"表現型変化"とは、本発明の核酸分子(例えば s i N A )との接触または処理に応答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 R N A 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变化が含まれる。検出可能な変化にはまた、グリーン蛍光蛋白質( G F P )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。

【 0 1 2 5 】

1 つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されてもよい本発明の s i N A 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 H C V 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もよい 2 以上の本発明の s i N A 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 H C V 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。

【 0 1 2 6 】

1 つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されてもよい本発明の 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。

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

50

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 siNA分子の合成は、(a) siNA分子の2つの相補的鎖を合成し；(b)二本鎖siNA分子を得るのに適した条件下で2つの相補的鎖を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、siNA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、siNA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。

【0128】

1つの態様においては、本発明は、siNA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) siNA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siNA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siNA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、siNA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siNA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siNAデュープレックスを精製する、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、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。

【0129】

さらに別の態様においては、siNA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、siNAデュープレックスの両方の鎖をタンデムで合成する。別々のsiNA配列鎖がハイブリダイズするのに適した条件下でリンカーを切断することにより、二本鎖siNA分子が形成される。

【0130】

別の態様においては、本発明は、siNA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) siNA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siNA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siNA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siNA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、(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(

10

20

30

40

50

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。

【 0 1 3 1 】

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 - D M T ) 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。

【 0 1 3 2 】

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，Scaringe 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。

【 0 1 3 3 】

1 つの態様においては，本発明は H C V 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。

【 0 1 3 4 】

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。

【 0 1 3 5 】

1 つの態様においては，本発明は H C V 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。

【 0 1 3 6 】

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 分子に導入し，そして( b ) 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 7 】

1 つの態様においては，本発明は，H C V 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 コンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的標的 R N A 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

10

20

30

40

50

る 1 またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【 0 1 3 8 】

1 つの態様においては、本発明は、HCV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。

【 0 1 3 9 】

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。

【 0 1 4 0 】

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。

【 0 1 4 1 】

1 つの態様においては、本発明は、HCV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。

【 0 1 4 2 】

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。

【 0 1 4 3 】

1 つの態様においては、本発明は、細胞においてHCV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。

【 0 1 4 4 】

別の態様においては、本発明は、HCVに対する改良されたRNAi活性を有する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)改良されたRNAi活性を有する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。

【 0 1 4 5 】

さらに別の態様においては、本発明は、HCV標的RNAに対する改良されたRNAi活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIの

10

20

30

40

50

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。

【 0 1 4 6 】

さらに別の態様においては，本発明は，H C V 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 4 7 】

1つの態様においては，本発明は，H C V 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，s i N A コンストラクトの細胞取り込み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。

【 0 1 4 8 】

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，H C V 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 4 9 】

1つの態様においては，本発明は，H C V 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。

【 0 1 5 0 】

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。

【 0 1 5 1 】

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。

【 0 1 5 2 】

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

10

20

30

40

50

生物利用性を有する 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。

【0153】

別の態様においては, 本発明の siNA 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。

【0154】

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, 本発明の siNA 分子, および本明細書に記載されるような, 目的とする細胞内への siNA の導入を促進するベヒクルが含まれる (例えば, 脂質および当該技術分野において知られる他のトランスフェクション法を用いる。例えば, Beigelman et al., 米国特許 6,395,713 を参照)。キットは, 例えば, 遺伝子機能および/または活性の決定において標的評価のために, または薬剤最適化において, および薬剤の発見において用いることができる (例えば, Usman et al., 米国特許出願 60/402,996 を参照)。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んでいてもよい。

【0155】

本明細書において用いる場合, "短干渉核酸", "siNA", "短干渉 RNA", "siRNA", "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, 例えば, 配列特異的様式で RNA 干渉 ("RNAi") または遺伝子サイレンシングを媒介することにより遺伝子発現またはウイルス複製をダウンレギュレート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; Melillo and Fire, 国際公開 WO 01/29058; Deschamps-Depailliette, 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 siNA 分子の非限定的例は, 図 4-6 および本明細書の表 II, III および IV に示される。例えば, siNA 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。siNA 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み, 例えば, アンチセンス鎖とセンス鎖とがデュープレックスまたは二本鎖構造を形成し, 例えば, 二本鎖領域は約 19 塩基対である); ア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

10

20

30

40

50

部に対応するヌクレオチド配列を含む。あるいは、s i N Aは单一のオリゴヌクレオチドから組み立ててもよく、ここで、s i N A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。s i N A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。s i N A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シ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、R N A iを媒介しうる活性なs i N A分子を生ずることができる。s i N A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s i N A分子がs i N A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s i N A分子は、別々のセンスおよびアンチセンス配列または領域を含んでいてもよく、センスおよびアンチセンス領域は、当該技術分野において知られるヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリンカー分子により共有結合により結合しているか、あるいは、イオン相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水的相互作用、および/またはスタッキング相互作用により非共有結合的に結合している。ある態様においては、本発明のs i N A分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的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s i N A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、s i N A分子はR N A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'-O H)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、R N A i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'-O H基を有するヌクレオチド)を含まなくてもよい。しかし、R N A iを支持するためにs i N A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s i N A分子は、2'-O H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、s i N A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"s i M O N"と称される。本明細書において用いる場合、s i N Aとの用語は、配列特異的R N A i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R N A(s i R N A)、二本鎖R N A(d s R N A)、マイクロR N A(m i R N A)、短ヘアピンR N A(s h R N A)、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s i R N A、転写後遺伝子サイレンシングR N A(p t g s R N A)、および他のものと同等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、R N A iとの用語は、配列特異的R N A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)と同等であることを意味する。例えば、本発明のs i N A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s i N A分子による遺伝子発現の後

10

20

30

40

50

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, 181-188; Volpe et al., 2002, Science, 297, 183-183; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218；およびHall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237を参照）。

## 【0156】

"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。

10

## 【0157】

"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。

20

## 【0158】

"阻害する"、"ダウンレギュレートする"、または"減少させる"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1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットの活性が、本発明の核酸分子（例えばsiNA）の非存在下において観察されるより低く減少していることを意味する。1つの態様においては、siNA分子による阻害、ダウンレギュレーションまたは低下は、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、siNA分子による阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、例えば、スクランブル化配列を有するかミスマッチを有するsiNA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、本発明の核酸分子による遺伝子発現の阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、核酸分子の存在下においてその非存在下におけるより大きい。

30

## 【0159】

"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、トランスシン、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。標的遺伝子を含有する細胞は、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。

40

## 【0160】

本明細書において用いる場合、"HCV"とは、C型肝炎ウイルス、またはC型肝炎ウイルス活性を有するかHCVゲノムによりコードされる任意の蛋白質、ペプチドまたはポリペプチドを意味する。"HCV"との用語にはまた、HCV感染の発達および/または維持に関連するRNAまたは蛋白質をコードする核酸分子、例えばHCV RNAまたは異なる株のHCVのポリペプチドを含むポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、表Iに示されるGenbank受託番号を有するポリヌクレオチド），変異体HCV遺伝子、およびHCV遺伝子のスプライシング変種、ならびに遺伝子発現のHCV経路および/またはHCV活性に関する遺伝子が含まれる。また、"HCV"との用語は、HCVウ

50

イルス遺伝子産物およびHCV感染の細胞標的を調節する遺伝子、例えば本明細書に記載されるものを含むことを意味する。

【0161】

"HCV蛋白質"とは、C型肝炎ウイルス活性を有するかまたはHCVゲノムにコードされる蛋白質、ペプチドまたはポリペプチドを意味する。

【0162】

"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。

【0163】

"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。

【0164】

"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。

【0165】

"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。

【0166】

"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; Friier 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。

【0167】

本発明のsiNA分子は、種々の疾病および状態、例えば、HCV感染、肝不全、肝細胞癌、肝硬変、および細胞または組織におけるHCVのレベルに応答しうる他の任意の適応症を治療するための新規な治療方法である。

【0168】

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デュープレックスは、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に示される。本発明の例示的合成siNA分子は、表

10

20

30

40

50

I I I および I V , および / または図 4 - 5 に示される。

【 0 1 6 9 】

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。

10

【 0 1 7 0 】

本発明の s i N A 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, リポ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, 関連する組織にエクスピボで, または注射, 注入ポンプまたはステントを用いてインビボで, 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 I I - I I I 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 I V 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 s i N A 配列に適用することができる。

20

【 0 1 7 1 】

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ます。

【 0 1 7 2 】

"R N A" 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 R N A , 一本鎖 R N A , 単離された R N A , 例えば部分的に生成された R N A , 本質的に純粋な R N A , 合成 R N A , 組換的に製造された R N A , 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 R N A と異なるように変更された R N A 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 R N A 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 R N A 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 R N A は, 類似体または天然に生ずる R N A の類似体と称することができます。

30

【 0 1 7 3 】

"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。

40

【 0 1 7 4 】

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ジチオエートヌクレオチド間結合の両方を表す。

【 0 1 7 5 】

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 D N A / R N A 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

50

。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。

#### 【0176】

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。

#### 【0177】

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状態を治療するために用いることができる（例えば，本発明のsiRNA分子は，例えば，HCV感染，肝不全，肝細胞癌，肝硬変，および細胞または組織におけるHCVのレベルに応答しうる他の適応症を治療するための使用に適合させることができる）。例えば，特定の疾病または状態を治療するために，治療に適した条件下で，siRNA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。

#### 【0178】

さらに別の態様においては，siRNA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siRNA分子と容易に組み合わせ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，またはアブタマー核酸分子，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。

#### 【0179】

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siRNA分子をコードする核酸配列を，そのsiRNA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siRNA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siRNA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。

#### 【0180】

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。

#### 【0181】

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siRNA分子の配列を含む。

#### 【0182】

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siRNA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いてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0183】

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siRNA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。siRNAを発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノ隨伴ウイルス、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。siRNA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、siRNA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、siRNA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。siRNA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。10

## 【0184】

“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。

## 【0185】

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。20

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0186】

図面の簡単な説明

図1は、siRNA分子を合成するスキームの非限定的例を示す。相補的siRNA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ットまたは無塩基スクシネットで結合させる。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siRNA鎖は自発的にハイブリダイズしてsiNA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。30

## 【0187】

図2は、本発明の方法により合成された精製siNAデュープレックスのMALDI-TOV質量分析を示す。示される2つのピークは、別々のsiNA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siNA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单一物質として精製しうることを示す。40

## 【0188】

図3は、RNAiに関する標的RNA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RNA、例えばウイルス、トランスポゾン、または他の外因性RNAからRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRP)により生成される二本鎖RNA(dsRNA)が、ダイサー(DICER)酵素を活性化し、次にこれはsiNA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siNA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siNA複合体が形成され、これは標的RNAを認識し、その結果、RISCエンドヌクレアーゼ複合体により標的RNAが分解されるか、またはRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRP)により追加のRNAが合成され、これはダイサーを活性化して追加のsiNA分子が生じ、このことによりRNAi50

応答が増幅される。

【0189】

図4A-Fは、本発明の化学的に修飾されたsiNA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(NN)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。siNA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。

【0190】

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(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。

【0191】

図4B:センス鎖は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'-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。

【0192】

図4C: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'-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。

【0193】

図4D: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

10

20

30

40

50

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21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。

## 【 0 1 9 4 】

10

図4E：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，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。

20

## 【 0 1 9 5 】

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。

30

## 【 0 1 9 6 】

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HCV siNA配列に適用したものである。

40

## 【 0 1 9 7 】

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，RNA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ンカーを含むことができ，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

50

むことができ、このことにより、インビオおよび／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、リンカーはインビオおよび／またはインビトロで活性なsiRNA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オおよび／またはインビトロで活性なsiRNAコンストラクト1を生成することができる。そのように、siRNAコンストラクトの安定性および／または活性は、インビオ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siRNA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。

#### 【0198】

図7A-Cは、siRNAヘアピンコンストラクトを生成するための発現力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。 10

#### 【0199】

図7A: 5'-制限部位(R1)配列、次に予め決定されたHCV標的配列と同一の配列を有する領域(siRNA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、その後に例えば約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。

#### 【0200】

図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、HCV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siRNA転写産物が得られる。 20

#### 【0201】

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。 30

#### 【0202】

図8A-Cは、発現力セットを作製して二本鎖siRNA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。

#### 【0203】

図8A: 5'-制限(R1)部位配列、次に予め決定されたHCV標的配列と同一の配列を有する領域(siRNA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、その後に規定された配列(X)のループ配列に隣接する3'-制限部位(R2)を有する。

#### 【0204】

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。 40

#### 【0205】

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力セットを設計し、このことによりsiRNA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。

#### 【0206】

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siRNA媒介性 50

R N A i 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。

【0207】

図9A: s i N A 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 s i N A のアンチセンス領域に相補的な配列を含むよう、s i N A オリゴヌクレオチドのプールを合成する。

【0208】

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 s i N A が発現するように(図9C)、ベクター中に挿入する(図9B)。

【0209】

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。

【0210】

図9E: 分類された細胞から s i N A を単離し、シークエンスして、標的核酸配列中の有効な標的部位を同定する。

【0211】

図10は、例えば、本発明の s i N A 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;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-VII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。

【0212】

図11は、ヌクレアーゼに耐性であるがR N A i 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 s i N A 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 s i N A 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P K / 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、R N A i 活性について s i N A コンストラクトを試験する。次に、特定の特徴を有するがR N A i 活性を保持しているリード s i N A 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R N A i 活性を有する s i N A - コンジュゲート分子を同定することができる。

【0213】

図12は、H C V / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とする s i R N A コンストラクト 2 9 5 7 9 / 2 9 5 8 6 および 2 9 5 7 8 / 2 9 5 8 5 の非限定的例を、反転 s i N A 対照コンストラクト 2 9 5 9 3 / 2 9 6 0 0 と比較して示す。

【0214】

図13は、H C V / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とする s i R N A コンストラクト 2 9 5 7 9 / 2 9 5 8 6 の用量応答実験の非限定的例を、反転 s i N A 対照コンストラクト 2 9 5 9 3 / 2 9 6 0 0 と比較して示す。2 9 5 7 9 / 2 9 5 8 6 s i N A コンストラクトによるH C V / ポリオウイルスキメラの複製の阻害は、1 n M, 5 n M, 10 n M、および 25 n M 濃度の 2 9 5 7 9 / 2 9 5 8 6 s i N A コンストラクトで測定

した。

【0215】

図14は、HCV / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とする化学的に修飾されたsiRNAコンストラクト30051 / 30053の非限定的例を、反転siNA対照コンストラクト30052 / 30054と比較して示す。

【0216】

図15は、HCV / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とする化学的に修飾されたsiRNAコンストラクト30055 / 30057の非限定的例を、反転siNA対照コンストラクト30056 / 30058と比較して示す。

【0217】

図16は、HCV / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とするいくつかの化学的に修飾されたsiRNAコンストラクトの10nMでの処理の非限定的例を、脂質対照および反転siNA対照コンストラクト29593 / 29600と比較して示す。

【0218】

図17は、HCV / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とするいくつかの化学的に修飾されたsiRNAコンストラクトの25nMでの処理の非限定的例を、脂質対照および反転siNA対照コンストラクト29593 / 29600と比較して示す。

【0219】

図18は、Hu h 7 HCVレプリコンシステムのウイルス複製を標的とするいくつかの化学的に修飾されたsiRNAコンストラクトの25nMでの処理の非限定的例を、未処理細胞（“細胞”）、リポフェクタミン（“LFA2K”）および反転siNA対照コンストラクトでトランスフェクションした細胞と比較して示す。

【0220】

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、インビポ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、インビトロおよび/またはインビポで測定された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、インビトロおよび/またはインビポ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ビトロおよび/またはインビポで増強される。

【0221】

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）の生成に応答して、相同一本鎖RNAまたはウイルスゲノムRN

10

20

30

40

50

A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。

### 【0222】

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(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塩基対のデュープレックスを含む。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デュー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。これはおそらくは、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。

### 【0223】

RNAiは種々の系で研究してきた。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ワバエ細胞における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のデュー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。ショウジョウワ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デュープレックスは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デュー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, 650)

877)。他の研究は、siRNAデュー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。

#### 【0224】

##### 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、10  
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siRNAオリゴヌクレオチド配列またはタンデムで合成されたsiRNA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。

#### 【0225】

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、一般的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、サイクルに最少の変更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0.11M = 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0.25M = 15 μmol)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 μLの0.11M = 4.4 μmol)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 μLの0.25M = 10 μmol)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 I<sub>2</sub>, 4.9 mMピリジン, 9%水(PERSEPTIVE(登録商標))である

10

20

30

40

50

。 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 0.25M）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 0.05M）を用いる。

### 【0226】

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 度 10 分間懸濁する。-20 度に冷却した後、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 : 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。

### 【0227】

本発明のある種の siRNA 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 μmol 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 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 0.11M = 6.6 μmol）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 μL の 0.25M = 15 μmol）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 μL の 0.11M = 13.2 μmol）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 μL の 0.25M = 30 μmol）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 I<sub>2</sub>, 49 mM ピリジン, 9% 水 (PERS EPTIVE (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 0.25M）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 0.05M）を用いる。

### 【0228】

RNA 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4mLのガラスねじ蓋バイアルに移し、40%水性メチルアミン(1mL)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1.0mLのEtOH:MeCN: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TEA/HF/NMP溶液(1.5mL N-メチルピロリジノン、750μL TEAおよび1.0mL TEA・3HFの溶液300μL, HF濃度1.4M)に再懸濁し、65に加熱する。1.5時間後、オリゴマーを1.5M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>で反応を停止させる。

## 【0229】

10

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4mLのガラスねじ蓋バイアルに移し、33%エタノール性メチルアミン/DMSO:1/1(0.8mL)の溶液中で、65で15分間懸濁する。バイアルを室温にする。TEA・3HF(0.1mL)を加え、バイアルを65で15分間加熱する。試料を-20に冷却し、次に1.5M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>で反応を停止させる。

## 【0230】

20

トリチルオンオリゴマーの精製のためには、停止したNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液を、アセトニトリル、続いて50mM TEAで予備洗浄したC-18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、RNAを0.5%TFAで13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、1M NaClで塩交換し、再び水で洗浄する。次に、30%アセトニトリルでオリゴヌクレオチドを溶出する。

## 【0231】

平均段階カッピング収率は、典型的には>98%である(Wincott et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684)。当業者は、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、96ウエ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。

## 【0232】

30

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(Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al.国際公開WO93/23569; Shabarov et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, Bellon et al., 1997, Biocconjugate Chem. 8, 204),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、一緒につなげてもよい。

## 【0233】

40

本発明のsiNA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siNA鎖を、切斷可能なリンカー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、次にこれを切斷して別々のsiNA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siNA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ンカーであっても非ヌクレオチドリンカーであってもよい。本明細書に記載されるsiNA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siNAのタンデム合成はまた、バッチャリアクター、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。

## 【0234】

siNA分子はまた、一方のフラグメントがRNA分子のセンス領域を含み、第2のフ

50

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。

【0235】

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）。siNA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。

【0236】

本発明の別の観点においては、本発明の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、siNA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。

【0237】

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; Rossie 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い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。

【0238】

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、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 TIBS 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WO 92/07065; 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. 50

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, Biolog. 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, siRNA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siRNA核酸分子を修飾することができる。

## 【0239】

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。

## 【0240】

活性を維持または増強する化学的修飾を有する短干涉核酸(siRNA)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。

## 【0241】

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。こ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Gクランプヌクレオチドを含む。

8, 9, 10 個またはそれ以上) の L N A "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, W e n g e l e t a l . , 国際公開 W O 0 0 / 6 6 6 0 4 および W O 9 9 / 1 4 2 2 6 を参照)。

【 0 2 4 2 】

別の態様においては, 本発明は, 本発明の s i N A 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 s i N A 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( S u l l e n g e r a n d C e c h , 米国特許 5, 8 5 4, 0 3 8 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。

【 0 2 4 3 】

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 s i N A 分子に, または本発明の s i N A 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 - アリル, 2' - O - アリル, 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单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。

【 0 2 4 4 】

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。

【 0 2 4 5 】

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。

【 0 2 4 6 】

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。

【 0 2 4 7 】

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。

【 0 2 4 8 】

さらに別の態様においては、R N A i に関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。

【 0 2 4 9 】

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、疾病的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。

【 0 2 5 0 】

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。

【 0 2 5 1 】

"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、A d a m i c e t a l.、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、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 - ジヒドロキシベ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；ヘキシリリン酸；アミノヘキシリリン酸；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

20

30

40

50

## 【0252】

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 - アミノヘキシリリン酸；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' - メルカブ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)。

10

20

30

40

50

## 【0253】

"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。

## 【0254】

"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<sub>2</sub>またはN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、アミノまたはSHである。

## 【0255】

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。

## 【0256】

10

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 McSwiggen(上掲); Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Uhlmann & 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、シュードウラシル、2', 4', 6'-トリメトキシベンゼン、3'-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5'-アルキルシチジン(例えば5'-メチルシチジン)、5'-アルキルウリジン(例えばリボチミジン)、5'-ハロウリジン(例えば5'-ブロモウリジン)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; Uhlmann & 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。

20

## 【0257】

30

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siRNA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 Leumann, 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。

40

## 【0258】

"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、Adamiec et al., 米国特許5,998,203を参照)。

## 【0259】

50

"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。

【0260】

"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。

【0261】

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5,672,610 10 95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。

【0262】

核酸 siRNA 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。

【0263】

核酸分子の投与

本発明の siRNA 分子は，単独で，または他の療法と組み合わせて，例えば，HCV 感染，肝不全，肝細胞癌，肝硬変，および細胞または組織におけるHCV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，siRNA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，ACSSymp. 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 20 および Sullivan et al.，PCT WO94/02595 30 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，Bioconjugate 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，Clivava. Cancer Res.，5，2330-2337 40 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)。

【0264】

10

20

30

40

50

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、緩衝液等に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。リポソームデリバリー・メカニズムを利用することが望ましい場合には、リポ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。

## 【0265】

10

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。

## 【0266】

20

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ない。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。

## 【0267】

30

"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ポ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ポ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（例えば過剰の HCV を產生する細胞）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。

## 【0268】

40

"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位置に有效地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-コ-グリコリド）微小球（Emrich, D F et al, 1999, Cell Transplant, 8, 47-58）（Alkermes, Inc. Cambridge, MA）；および薬剤を脳血管閥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 Neurop Psychopharmacol 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；Tylor et al., 1999, FEBS Lett., 421, 280-284；

50

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。

【0269】

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. 1. 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。

【0270】

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。

【0271】

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 mg / kg - 100 mg / kg 体重 / 日の活性成分を投与する。

【0272】

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vant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

10

20

30

40

50

容しうる担体を含む医薬処方が提供される。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vant、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。

#### 【0273】

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合う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いてもよい。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、コーンスターク、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。

#### 【0274】

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。

#### 【0275】

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。分散剤または湿润剤は、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。

#### 【0276】

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ッツ油、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。

#### 【0277】

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、分散剤または湿润剤、懸濁剤および1またはそれ以上の保存剤との混合物中

10

20

30

40

50

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。

【0278】

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。

10

【0279】

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、リソ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。

20

【0280】

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。

30

【0281】

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。

【0282】

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-約7g）。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1mg-約500mgの活性成分を含む。

40

【0283】

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。

【0284】

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

50

クスとして製造することも便利であろう。

【0285】

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。

【0286】

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, Glycococonjugate 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。

【0287】

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 AntiseNSE Res. Dev., 2, 3-15; Dropulic et al., 1992 J. Virol. 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991 J. Virol., 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10802-6; Chen et al., 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarver et al., 1990 Science 247, 1222-1225; Thompson et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2259; Good et al., 1997, Gene Therapy, 4, 45）。当業者は、真核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れることにより増大させることができる (Draper et al., PCT WO 93/23569, Sullivan et al. 50

1., 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).

【0288】

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、pol III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ができる。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ざれかの手段により、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）。

【0289】

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デュー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デュー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）。

【0290】

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ソ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。

【0291】

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

10

20

30

40

50

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. 10, 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. 20, 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 siRNA）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 WO 96/18736）。上述の siRNA 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）。

### 【0292】

別の観点においては、本発明は、本発明の siRNA 分子の少なくとも 1 つをコードする核酸配列を、その siRNA 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) siRNA 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、siRNA 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のように連結されている。

### 【0293】

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) siRNA 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' - 末端に動作可能のように連結されており、配列は、siRNA 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の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 siRNA 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のように連結されている。

10

20

30

40

40

50

## 【0294】

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) siRNA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、siRNA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。

## 【0295】

HCVの生物学および生化学

1989年、C型肝炎ウイルス(HCV)は、RNAウイルスであると決定され、ほとんどの非A非B肝炎の原因となるウイルスであることが同定された(Choo et al., *Science*. 1989; 244: 359-362)。HIV等のレトロウイルスとは異なり、HCVはDNA複製期を通らず、ウイルスゲノムが宿主染色体内にインテグレーションした形は検出されていない(Houghton et al., *Hepatology* 1991; 14: 381-388)。その代わり、コーディング(プラス)鎖の複製は、複製(マイナス)鎖の生成により媒介され、数コピーのプラス鎖HCV RNAが生成される。ゲノムは、ポリ蛋白質に翻訳される単一の大きなオープンリーディングフレームから構成される(Kato et al., *FEBS Letters*. 1991; 280: 325-328)。このポリ蛋白質は、続いて翻訳後切断を受け、いくつかのウイルス蛋白質が生ずる(Leinbach et al., *Virology*. 1994; 204: 163-169)。

## 【0296】

HCVの9.5キロベースのゲノムの研究は、ウイルス核酸が高い率で変異しうることを示した(Smith et al., *Mol. Evol.* 1997; 45: 238-246)。この変異率により、約70%の配列同一性を共有する、いくつかの区別しうる遺伝子型のHCVが進化した(Simmonds et al., *J. Gen. Virology*. 1994; 75: 1053-1061)。これらの配列は、進化的には非常に区別されるものであることに注目することが重要である。例えば、ヒトと靈長類、例えばチンパンジーとの間の遺伝的同一性は約98%である。さらに、一人の患者におけるHCV感染は、RNAレベルで98%の同一性を有するいくつかの異なりかつ進化した亜種(quasiespecies)から構成されることが示されている。すなわち、HCVゲノムは超可変性であり、絶えず変化している。HCVゲノムは超可変性であるが、高度に保存されているゲノムの3つの領域が存在する。これらの保存配列は、5'および3'非コーディング領域、ならびにコア蛋白質コーディング領域の5'-末端に存在し、HCV RNAの複製ならびにHCVポリ蛋白質の翻訳に必須であると考えられる。すなわち、これらの保存HCVゲノム領域を標的とする治療用薬剤は、広範な種類のHCV遺伝子型に対して有意な影響を有するであろう。さらに、HCVゲノムの保存領域に特異的な酵素的核酸によっては、薬剤耐性は生じないであろう。これに対し、ウイルスプロテアーゼまたはヘリカーゼ等の酵素の阻害を標的とする療法は、ウイルスにコードされるこれらの酵素のRNAがHCVゲノムの超可変性部分に位置するため、薬剤耐性株の選択が生ずるであろう。

## 【0297】

HCVへの最初の暴露の後、患者において肝酵素の過渡的上昇が生ずるであろう。これは、炎症性のプロセスが生じていることを示す(Alter et al., IN: Seeff LB, Lewis JH eds. *Current Perspectives in Hepatology*. New York: Plenum Medical Book Co; 1989: 83-89)。この肝酵素の上昇は、最初の暴露の少なくとも4週間後に起こり、2ヶ月まで持続するであろう(Farci et al., *New England Journal of Medicine*. 1991; 325: 98-104)。肝酵素の上昇の前に、RT-PCR分析を用いて患者血清中のHCV RNAを検出することが可能である(Takahashi et al., *American* 50

Journal of Gastroenterology. 1993; 88: 2: 240-243)。疾患のこの段階は急性段階と称され、HCV感染からの急性肝炎ウイルスを有する患者の75%が無症候性であるため、通常は検出されないままである。これらの患者の残りの25%は黄疸または肝炎の他の症状を発症する。

#### 【0298】

急性HCV感染は良性疾患であるが、急性HCV患者の80%程度が、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)レベルの持続的上昇および循環HCV RNAの継続的な存在により示される慢性肝疾患に進行する(Sherlock, Lancet 1992; 339: 802)。慢性HCV感染は10-20年間に自然に進行して、20-50%の患者で肝硬変となり(Davis et al., Infectious Agents and Disease 1993; 2: 150: 154), HCV感染の肝細胞癌への進行は、詳細に報告されている(Liang et al., Hepatology 1993; 18: 1326-1333; Tong et al., Western Journal of Medicine, 1994; Vol. 160, No. 2: 133-138)。肝硬変および/または肝細胞癌に進行する可能性の高い亜集団を判定した研究はない。したがって、すべての患者は進行の等しいリスクを有する。

#### 【0299】

肝細胞癌を有すると診断された患者の生存は、最初の診断からわずか0.9-12.8月であることに注目することが重要である(Takahashi et al., American Journal of Gastroenterology. 1993; 88: 2: 240-243)。肝細胞癌の化学療法剤による治療は、有効ではないことが証明されており、肝臓の広い範囲に腫瘍が侵入するため、患者のわずか10%しか外科手術の恩恵を受けないであろう(Trinchet et al., Presse Medicine. 1994; 23: 831-833)。原発性肝細胞癌の侵略的な性質のため、外科手術に代わる唯一の実行可能な治療は肝移植である(Pichlmayr et al., Hepatology. 1994; 20: 335-405)。

#### 【0300】

慢性HCV感染を有する患者は、肝硬変に進行すると、臨床的肝硬変に共通する臨床的特徴が現れる(D'Amico et al., Digestive Diseases and Sciences. 1986; 31: 5: 468-475)。これらの臨床的特徴には、出血性食道静脈瘤、腹水症、黄疸、および脳障害が含まれる(Zakim D, Boyer TD. Hepatology a textbook of liver disease. Second Edition Volume 1. 1990 W. B. Saunders Company. Philadelphia)。肝硬変の初期段階においては、患者は、代償性(compensated)として分類される。これは、肝臓組織傷害が生じているにもかかわらず、患者の肝臓は依然として血流中の代謝物を解毒することができることを意味する。さらに、代償性肝疾患有するほとんどの患者は、無症候性であり、症状を有する少数の者は、味覚不全および虚弱などの小さな症状しか報告していない。肝硬変のより後期においては、患者は、脱代償性(decompensated)と分類される。これは、その患者が血中代謝物を解毒する能力が低下していることを意味し、上述した臨床的特徴が現れるのはこの段階である。

#### 【0301】

1986年、D'Amicoらは、アルコール関連およびウイルス関連の肝硬変を有する1155人の患者の臨床的発現および生存率を記載した(D'Amico(上掲))。1155人の患者のうち、435人(37%)が代償性疾患有しているが、研究の開始時には70%は無症候性であった。残りの720人の患者(63%)は脱代償性肝疾患有しており、このうち、78%は腹水の病歴を、31%は黄疸を、17%は出血を有し、16%は脳障害を有していた。肝細胞癌は、代償性疾患有する患者の6人(0.5%)および脱代償性疾患有する患者の30人(2.6%)において認められた。

#### 【0302】

10

20

30

40

50

6年間の経過の間に、代償性肝硬変を有する患者は、1年に10%の割合で、脱代償性疾患の臨床的特徴を発症した。ほとんどのケースにおいては、腹水症が脱代償性の最初の現れであった。さらに、6年間の研究の終わりには、最初は代償性疾患が現れていた59人の患者で肝細胞癌が発症した。

### 【0303】

生存に関しては、D'Amicoの研究は、研究したすべての患者についての5年生存率はわずか40%であることを示した。最初に代償性肝硬変を有していた患者についての6年生存率は54%であり、最初に脱代償性疾患を有していた患者についての6年生存率はわずか21%であった。アルコール性肝硬変を有する患者とウイルス関連肝硬変を有する患者との間には、生存率の有意な差はなかった。D'Amicoの研究における患者の主要な死亡原因是、肝不全が49%；肝細胞癌が22%；出血が13%であった(D'Amico(上掲))。

### 【0304】

慢性C型肝炎は、ゆっくり進行する肝臓の炎症性疾患であり、ウイルス(HCV)により媒介され、10-20年間の間に、肝硬変、肝不全および/または肝細胞癌を引き起こしうる。米国においては、HCVによる感染は、毎年新たに50,000人の急性肝炎が発生していると見積もられている(NIH Consensus Development Conference Statement on Management of Hepatitis C, March 1997)。米国におけるHCVの罹患率は、1.8%であると見積もられており、CDCは、慢性的に感染した米国人の人数が約450万人であると認めている。CDCはまた、慢性HCV感染により引き起こされる死亡は1年間に10,000人に達すると推定している。

### 【0305】

慢性HCV感染の治療にインターフェロン(IFN-アルファ)を用いる多数のよく制御された臨床試験は、週3回の治療により、6ヶ月の治療の終了時までに、約50% (40% - 70%の範囲) の患者において血清ALT値が低下することを示した(Davis et al., New England Journal of Medicine 1989; 321: 1501-1506; Marcelin et al., Hepatology 1991; 13: 393-397; Tong et al., Hepatology 1997; 26: 747-754; Tong et al., Hepatology 1997; 26(6): 1640-1645)。しかし、インターフェロン治療の終了後、応答した患者の約50%が再発し、"持続可能な"応答の比率は、血清ALT濃度により標準化して約20-25%であった。

### 【0306】

分岐DNAまたはリバーストランスクリプターゼ-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)分析のいずれかを用いて、HCV RNAを直接測定することが可能である。一般に、RT-PCR法は、より感度が高く、臨床経過のより正確な評価をもたらす(Tong et al., (上掲))。臨床的エンドポイントとしてHCV RNA値の変化を用いる6ヶ月の1型インターフェロン療法を試験した研究は、治療の終わりまでには、35%の患者がHCV RNAを失うことを示した(Marceffin et al., (上掲))。しかし、ALTエンドポイントと同様に、約50%の患者は、治療の終了から6ヶ月後に再発し、持続可能なウイルス応答はわずか12%であった(Marcelin et al.(上掲))。48週間の治療を試験した研究は、持続するウイルス応答が25%以下であることを示した(NIH Consensus Statement: 1997)。すなわち、現在、1型インターフェロンによる慢性HCV感染の治療の標準は、有効性の主な評価としてHCV RNA濃度の変化を用いる48週間の治療である(Hoofnagle et al., New England Journal of Medicine 1997; 336(5): 347-356)。

### 【0307】

1型インターフェロンによる治療に起因する副作用は、4つの一般的カテゴリーに分類

10

20

30

40

50

することができる。すなわち、(1)インフルエンザ様症状；(2)神経精神医学；(3)実験室的異常；および(4)その他(Dushieko et al., Journal of Viral Hepatitis 1994; 1: 3-5)。インフルエンザ様症状の例としては、疲労、発熱；筋肉痛；倦怠；食欲喪失；頻脈；悪寒；頭痛および関節痛がある。インフルエンザ様症状は、通常は短期間であり、投与の最初の4週間の後には軽減する傾向にある(Dushieko et al., (上掲))。神経精神医学的副作用としては、被刺激性、無関心；気分変化；不眠；認識変化および鬱病がある。これらの神経精神病学的副作用の最も重要なものは鬱病であり、鬱病の病歴を有する患者には1型インターフェロンを投与してはならない。実験室的異常としては、顆粒球等の骨髄細胞、血小板、および頻度は低いが赤血球の減少がある。これらの血液細胞の変化が有意な臨床的結末につながることはほとんどない(Dushieko et al., (上掲))。さらに、トリグリセリドの濃度の増加および血清アラニンおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの濃度の上昇が認められている。最後に、甲状腺異常が報告されている。これらの甲状腺異常は、通常はインターフェロン治療の終了後は可逆的であり、治療の間には適当な薬物で調節することができる。その他の副作用には、吐き気；下痢；腹部および背中の痛み；そう痒；脱毛；および鼻漏がある。一般に、ほとんどの副作用は、治療の4-8週間後には軽減するであろう(Dushieko et al., (上掲))。

10

20

30

40

50

## 【0308】

したがって、HCV遺伝子を標的とする小干渉核酸分子は、HCV感染、肝不全、肝細胞癌、肝硬変、またはHCV遺伝子の調節に応答する他の任意の疾病または状態の治療および診断において用いることができる一群の新規治療剤を提供する。

## 【実施例1】

## 【0309】

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。

## 【0310】

実施例1：siRNAコンストラクトのタンデム合成

本発明の例示的siRNA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、RNAi分子を高収率で得る。この方法はハイスループットRNAiスクリーニングを支えるsiRNA合成に非常に適しており、マルチカラムまたはマルチウェルの合成プラットフォームに容易に適合させることができる。

## 【0311】

5'末端ジメトキシトリチル(5'-O-DMT)基がそのまま残るsiRNA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、siRNA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-DMT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C18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。

## 【0312】

タンデムリンカー、例えば反転デオキシ無塩基スクシネットまたはグリセリルスクシネットリンカー(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(PyBrop)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(DIPA)および/またはDMAP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-DMT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、50mM NaOAcまたは1.5M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で反応を停止させる。

【0313】

siNA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(CV)のアセトニトリル、2CVのH<sub>2</sub>O、および2CVの50mM NaOAcで調整したWaters C18 SepPak 1g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、1CVのH<sub>2</sub>Oまたは50mM NaOAcで洗浄する。失敗配列は1CVの14%ACN(水性；50mM NaOAcおよび50mM NaClを含む)で溶出する。次にカラムを1CVのH<sub>2</sub>O等で洗浄し、例えば、1CVの1%水性トリフルオロ酢酸(TFA)をカラムに通し、次にさらに1CVの1%水性TFAをカラムに加えて約10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TFA溶液を除去し、カラムをH<sub>2</sub>Oで、次に1CVの1M NaClおよび再度のH<sub>2</sub>Oで洗浄する。次に、siNAデュープレックス生成物を、例えば、1CVの20%水性CANを用いて溶出する。

【0314】

図2は、精製したsiNAコンストラクトのMALDI-TOF質量分析の例を示し、ここで、各ピークはsiNAデュープレックスの個々のsiNA鎖の計算質量に対応する。同じ精製siNAは、キャピラリーゲル電気泳動(CGE)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はデュープレックスsiNAに対応し、2つのピークはおそらく個々のsiNA配列鎖に対応する。同じsiNAコンストラクトのイオン交換HPLC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siNA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siNAコンストラクトと比較して、RNAi活性が同じであることを示した。

【0315】

実施例2：任意のRNA配列中の潜在的siNA標的部位の同定

目的とするRNA標的、例えばウイルスまたはヒトmRNA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、Genbank等のデータベースから得られる遺伝子またはRNA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siNA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siNA分子を設計することができる。種々のパラメータを用いて、標的RNA配列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RNA構造、標的配列のヌクレオチド塩基組成、標的配列の種々の領域間のホモロジーの程度、またはRNA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、RNA転写産物中の任意の数の標的部位を選択して、例えば、インビトロRNA切断アッセイ、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siNA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siNA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1-1000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ェルまたはマルチプレートアッセイを用いて、siNA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。

【0316】

10

20

20

30

30

40

40

50

### 実施例3：RNA中のsiRNA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siRNAの選択を行うことができる。

#### 【0317】

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23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Perl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、Oligo、MacVector、またはthe GCG Winsconsin Packageも同様に用いることができる。

#### 【0318】

2. 場合によっては、siRNA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siRNAの使用が可能となるであろう。

#### 【0319】

3. 場合によっては、siRNAのサブ配列は、1またはそれ以上の配列中には存在しないが、所望の標的配列中に存在する。これは、siRNAが標的とされない今までい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。

#### 【0320】

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

#### 【0321】

5. ランク付けされたsiRNA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。

#### 【0322】

6. ランク付けされたsiRNAサブ配列をさらに分析して、配列中にGGGまたはCCC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GGG（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、RNAi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。CCCはアンチセンス鎖にGGGを配置するため、標的鎖中で検索する。

#### 【0323】

7. ランク付けされたsiRNA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UU（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AA（アンチセンス配列に3'UU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TTチミジンジヌクレオチドを有するsiRNA分子を設計することができる。

#### 【0324】

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

10

20

30

40

50

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siNA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siNA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IIおよびIIIを参照)。末端TT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TTで置き換える。

### 【0325】

9. siNA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siNA分子、または標的RNA配列中の最も好ましい標的部位を同定する。

### 【0326】

別の方法においては、HCV標的配列に特異的なsiNAコンストラクトのプールを用いて、HCV RNAを発現する細胞、例えばヒト肝細胞癌(Huh7)細胞(例えば、Randall et al., 2003, PNAS USA, 100, 235-240を参照)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な戦略は図9に示される。そのようなプールの非限定的例は、それぞれ、配列番号1-696, 1393-1413, 1417-1419, 1421-1427, 1449-1455, 1477, 1481, 1485, 1487, 1494-1496, 1499, 1501-1512, 1549, 1553, 1558-1569, 1582-1593, 1617, 1619, 1621, 1623、および1625を含むセンス配列、および配列番号697-1392, 1414, 1420, 1428-1434, 1456-1462, 1479, 1483, 1489-1491, 1493, 1497-1498, 1500, 1513-1524, 1551, 1556, 1570-1581, 1618, 1620, 1622, 1624, 1626、および1627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。HCVを発現する細胞(例えばHuh7細胞)をsiNAコンストラクトのプールでトランسفェクトし、HCVの阻害に伴う表現型を示す細胞を分類する。siNA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翻訳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8を参照)。ポジティブの表現型変化(例えば、増殖の低下、HCV mRNAレベルの低下またはHCV蛋白質発現の低下)を示す細胞からのsiNAをシークエンスして、標的HCV RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。

### 【0327】

#### 実施例4：HCV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、HCV RNA標的の配列を分析し、任意にフォールディング(siNA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に設計し、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デュー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。

### 【0328】

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、インビトロ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

10

20

30

40

50

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 を標的とするいづれかの 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）。

10

20

30

40

50

### 【0329】

#### 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（いづれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する））。

### 【0330】

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）のいづれかを含むヌクレオシドを使用する。あるいは，Scaringe（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。

### 【0331】

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'-ヒドロキシリル基を無水酢酸等のキャッピング試薬を用いてキャッピングして，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 - 保護基を切斷する。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。

【0332】

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 (Usman et al. , 米国特許 5,831,071 , 米国特許 6,353,098 , 米国特許 6,437,117 , Bellon et al. , 米国特許 6,054,576 , 米国特許 6,162,909 , 米国特許 6,303,773 および Scaringe (上掲) (これら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) )。

【0333】

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。

【0334】

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

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、HCV 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、HCV 標的 RNA 用に適合させた系を含む。シンシチ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、HCV を発現する適当なプラスミドから T7 RNA 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 20  $\mu$ M) は、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) 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  $\mu$ g / ml のクレアチニンホスホキナーゼ、100  $\mu$ M の GTP, 100  $\mu$ M の UTP, 100  $\mu$ M の CTP, 500  $\mu$ M の ATP, 5 mM の DTT, 0.1 U /  $\mu$ L の RNasin (Promega)、および 100  $\mu$ M 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 分間プ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 1.25 x Passive Lysis Buffer (Promega) で反応を停止させる。標的 RNA の切斷は、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。

【0335】

10

20

30

40

50

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、スピン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siRNA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Phosphor Imager（登録商標）で定量することにより決定する。

## 【0336】

10

1つの態様においては、このアッセイを用いて、siRNA媒介性RNAi切断のためのHCV 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siRNAコンストラクトをHCV RNA標的のRNAi媒介性切断についてスクリーニングする。

## 【0337】

実施例7：HCV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HCV RNAを標的とするsiRNA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。HCV 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。

20

## 【0338】

2つのフォーマットを用いて、HCVを標的とするsiRNAの効力を試験する。第1に、例えば、Hu h 7細胞（例えば、Randal et al., 2003, PNAS USA, 100, 235-240を参照）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、HCV標的に対するsiRNA試薬（例えば、表IIおよびIIIを参照）を選択する。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、Hu h 7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、ABI 7700 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siRNA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と比較する。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siRNA分子を用いてRNAの阻害の経時変化を測定する。

30

## 【0339】

さらに、細胞-プレーティングフォーマットを用いてRNA阻害を決定することができる。HCV RNAのsiRNA媒介性阻害をアッセイする多標的スクリーニングの非限定的例が図18に示される。siRNAコンストラクト（表III）を25nMでHu h 7細胞にトランスフェクトし、HCV RNAを定量して、未処理細胞（図中の“細胞”的列）およびリポフェクタミンでトランスフェクトした細胞（図中の“LFA2K”的列）と比較する。図18に示されるように、いくつかのsiRNAコンストラクトは、Hu h 7レプリコンシステムにおいてHCV RNA発現の有意な阻害を示す。このシステムは、Riceら（米国特許5,874,565および6,127,116、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。

40

## 【0340】

siRNAの細胞へのデリバリー

HCVサブゲノムレプリコンクローンAまたはAva.5で安定にトランスフェクトしたHu h 7b細胞を、トランスフェクションの前日に、96ウエルプレートにDMEM（Gibco）中で例えば8.5×10<sup>3</sup>細胞/ウエルで播種する。siRNA（最終濃度、

50

例えば 25 nM) およびカチオン性脂質である Lipofectamine 2000 (例えば最終濃度 0.5 μl / ウエル) を, ポリプロピレンマイクロチューブ中で Optimem (Gibco) 中で 37 °C で 20 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, 24 - 72 時間インキュベートする。

### 【0341】

#### mRNA の Taqman 定量

総 RNA は, siNA デリバリーの後に, 例えば, 大規模抽出用には Ambion Rnaqueous 4 - PCR 精製キットを, または 96 ウエルアッセイ用には Ambion Rnaqueous - 96 精製キットを用いて, 細胞から調製する。Taqman 分析のためには, 例えば, 5' 末端に共有結合したレポーター染料 FAM または VIC および 3' 末端にコンジュゲート化させたクエンチャー染料 TAMARA を有するように二重標識プローブを合成する。1段階 RT - PCR 増幅は, 10 μL の総 RNA, 100 nM

フォワードプライマー, 100 nM リバースプライマー, 100 nM プローブ, 10 °C TaqMan PCR 反応緩衝液 (PE-Applied Biosystems), 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 各 100 μM の dATP, dCTP, dGTP および dTTP, 0.2 U RNase 阻害剤 (Promega), 0.025 U AmpliTaq Gold (PE-Applied Biosystems) および 0.2 U M-MLVI リバーストランスクリプターゼ (Promega) からなる 50 μL の反応液を用いて, 例えば, ABI PRISM 7700 Sequence 検出器で行うことができる。熱サイクル条件は, 48 °C で 30 分間, 95 °C で 10 分間, 次に, 95 °C で 15 秒間および 60 °C で 1 分間を 40 サイクルからなるものであってもよい。標的 mRNA レベルの定量は, 連続希釈した全細胞 RNA (300, 100, 30, 10 ng / rxn) から作製した標準物質に対して決定し, 例えば平行したまたは同じチューブのいずれかの TaqMan 反応の 36B4 mRNA に対して標準化する。HCV レプリコン mRNA の定量のためには, ネオマイシン遺伝子に特異的な PCR プライマーおよびプローブを用いた:

neo - フォワードプライマー, 5' - CCGGCTACCTGCCCCATTCTC - 3'; (配列番号: 1628)

neo - リバースプライマー, 5' - CCAGATCATCCTGATCGACAG - 3'; (配列番号: 1629)

neo - プローブ, 5' FAM - ACATCGCATCGAGCGAGCACGTAC - TAMARA 3'; (配列番号: 1630)。

標準化のためには, 36B4 PCR プライマーおよびプローブを用いた:

36B4 - フォワードプライマー, 5' - TCTATCATCAACGGGTACAAA CGA - 3'; (配列番号: 1631)

36B4 リバースプライマー, 5' - CTTTTCAAGCAAGTGGGAAAGGTG - 3'; (配列番号: 1632)

36B4 プローブ, 5' VIC - CCTGGCCTTGTCCTGTTGGAGACGGAT TA - TAMARA 3'; (配列番号: 1633)。

### 【0342】

#### ウェスタンプロットティング

核抽出物は, 標準的なマイクロ調製手法 (例えば, Andrews and Faller, 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% Bis - 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プロッキングすることができ, 次に一次抗体で 4 °C 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, S

10

20

30

40

50

upper Signal 試薬 (Pierce) でシグナルを検出する。

【0343】

実施例8：HCV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

培養細胞におけるHCVの複製についての報告はあるが（以下を参照），これらの系は，複製が困難であり，信頼性があるとは考えられていない。したがって，インターフェロンおよびリバビリン等の他の抗HCV療法の開発の場合と同様に，動物実験で安全性が証明された後，臨床的実用性研究に直接進むことができる。

【0344】

最近のいくつかの報告は，ヒト細胞株におけるHCVのインビトロ成長を示している（10 Mizutani et al., Biochem Biophys Res Commun 1996 227(3):822-826; Tagawa, et al., Journal of Gastroenterology and Hepatology 1995 10(5):523-527; Cribier et al., Journal of General Virology 76(10):2485-2491; Seipp et al., Journal of General Virology 1997 78(10):2467-2478; Iacovacci et al., Research Virology 1997 148(2):147-151; Iocavacci et al., Hepatology 1997 26(5):1328-1337; Ito et al., Journal of General Virology 1996 77(5):1043-1054; Nakajima et al., Journal of Virology 1996 70(5):3325-3329; Mizutani et al., Journal of Virology 1996 70(10):7219-7223; Valli et al., Res Virol 1995 146(4):285-288; Kato et al., Biochem Biophys Res Comm. 1995 206(3):863-869）。HCVの複製は，T細胞株およびB細胞株の両方，ならびにヒト肝細胞に由来する細胞株において示されている。複製は，RT-PCRに基づくアッセイまたはb-DNAアッセイのいずれかを用いて証明された。HCV細胞培養に関する最も最近の刊行物が6ヶ月までの複製を証明していることに注目することは重要である。しかし，これらの細胞株において観察されるHCV複製のレベルは，抗ウイルス化合物のスクリーニングに十分なほどは高くない。

【0345】

HCVに感染させることができる細胞株に加えて，いくつかのグループは，細胞株を全長または部分的HCVゲノムのcDNAクローンでトランスフォーメーションすることに成功したことを報告した（Harada et al., Journal of General Virology 1995 76(5):1215-1221; Haramatsu et al., Journal of Viral Hepatitis 1997 4S(1):61-67; Dash et al., American Journal of Pathology 1997 151(2):363-373; Mizuno et al., Gastroenterology 1995 109(6):1933-40; Yoo et al., Journal of Virology 1995 69(1):32-38）。

【0346】

ヒト肝細胞癌細胞株であるHu h 7において複製させることに成功したサブゲノムHCV RNAレプリコンの最近の開発は，信頼しうる細胞培養モデルへの著しい進歩である。これらのレプリコンは，HCV非構造遺伝子の上流にネオマイシン遺伝子を含み，Hu h 7細胞において複製可能なRNAの選択を可能とする。最初に，低い頻度でRNA複製が検出されたが（Lohmann et al. Science 1999 285:110-113），NS5A領域中に細胞に適応性のある変異を有するレプリコンの同定に

10

20

30

40

50

より、複製の効率が 10,000 倍高まった (Blight et al. Science 2000 290: 1972-1975)。HCV のライフサイクルの工程、例えば、翻訳、蛋白質プロセシング、および RNA 複製は、サブゲノムレプリコンシステム中で再現されるが、初期事象（ウイルス付着およびアンコーティング）およびウイルスアセンブリーは生じない。HCV の構造遺伝子をレプリコン中に組み込むことにより、HCV コアおよびエンベロープ蛋白質が産生されるが、ウイルスアセンブリーは生じない (Pletschmann et al. Journal of Virology 2002 76: 4008-4021)。このようなレプリコンシステムを用いて、siRNA 媒介性の HCV RNA 阻害が研究されている（例えば、Randall et al. , 2003, PNAS USA, 100, 235-240 を参照）。

10

### 【0347】

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で加え、溶液を軽くボルテックスする。siNA 分子を所望の最終濃度で加え、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。

20

### 【0348】

#### 動物モデル

動物モデルにおいて抗 HCV 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。HCV 感染について最もよく特性決定されている動物系はチンパンジーである。さらに、チンパンジーおよびヒトにおいて HCV 感染により引き起こされる慢性肝炎は非常に類似している。臨床的には適切であるが、チンパンジーモデルはいくつかの実用的な障害を有するため、このモデルの使用は困難である。例えば、コストが高く、長期間のインキュベーションが必要であり、十分な量の動物が得られないことである。これらの原因のため、多くのグループが、慢性 C 型肝炎感染の齧歯類モデルの開発を試みてきた。直接感染は可能ではないが、いくつかのグループは、HCV ゲノムの一部または全部を齧歯類に安定的にトランスフェクションしたことを報告している (Yamamoto et al. , Hepatology 1995, 22(3): 847-855; Galun et al. , Journal of Infectious Disease 1995 172(1): 25-30; Koike et al. , Journal of General Virology 1995 76(12): 3031-3038; Pasquini et al. , Hepatology 1997 25(3): 719-727; Hayashi et al. , Princess Takamatsu Symp 1995 25: 143-149; Mariya et al. , Journal of General Virology 1997 78(7): 1527-1531; Takehara et al. , Hepatology 1995 21(3): 746-751; Kawamura et al. , Hepatology 1997 25(4): 1014-1021)。さらに、HCV 感染ヒト肝臓を免疫無防備状態マウスに移植すると、動物の血液中で HCV RNA がより長く検出される。

30

(Yamamoto et al. , Hepatology 1995, 22(3): 847-855; Galun et al. , Journal of Infectious Disease 1995 172(1): 25-30; Koike et al. , Journal of General Virology 1995 76(12): 3031-3038; Pasquini et al. , Hepatology 1997 25(3): 719-727; Hayashi et al. , Princess Takamatsu Symp 1995 25: 143-149; Mariya et al. , Journal of General Virology 1997 78(7): 1527-1531; Takehara et al. , Hepatology 1995 21(3): 746-751; Kawamura et al. , Hepatology 1997 25(4): 1014-1021)。さらに、HCV 感染ヒト肝臓を免疫無防備状態マウスに移植すると、動物の血液中で HCV RNA がより長く検出される。

40

### 【0349】

C 型肝炎ウイルスをインビオ動物モデルで発現させる方法が開発されている (Vierling, 国際公開 WO 99/16307)。生存可能な HCV 感染ヒト肝細胞を scid / scid マウス宿主の肝臓実質内に移植する。次に、scid / scid マウス宿主を生存状態で維持し、このことにより、生存可能な、形態学的に無傷のヒト肝細胞がドナー組織中に残留し、C 型肝炎ウイルスは残留するヒト肝細胞中で複製する。このモデルは、酵素的核酸による HCV 阻害をインビオで研究する有効な手段を提供する。

50

## 【0350】

実施例9：HCV RNA発現のsiNA i媒介性阻害

siNAコンストラクト（例えば、表IIIに示されるsiNAコンストラクト）を、例えば、Hu h 7細胞において、HCV RNA発現を減少させる効力について試験する（例えば、Randall et al., 2003, PNAS USA, 100, 235-240を参照）。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/ウエルで細胞を播種する。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する。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とする。各siNAトランスフェクション混合物を3回のsiNA処理用に3つのウエルに加える。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度24時間インキュベートする。24時間において、処理した細胞の各ウエルからRNAを調製する。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を調製する。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により評価する。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る。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siNAと比較して判定する。

## 【0351】

非限定的例においては、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、ならびに、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のセンス鎖が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、アンチセンス鎖が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コンストラクトをアッセイする。表IVに記載されるさらに別の安定化化学についても同様に活性をアッセイする。これらのsiNAコンストラクトを、適当なマッチした化学の反転対照と比較する。さらに、siNAコンストラクトはまた、未処理細胞、脂質およびスクランブル化siNAコンストラクトでトランスフェクトした細胞、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）とも比較する。

## 【0352】

実施例10：HeLa細胞におけるキメラHCV / ポリオウイルスのsiNA阻害

HeLa細胞において21ヌクレオチドのsiNAデュープレックスを用いてキメラHCV / ポリオウイルスの阻害を調べた。HCV RNAの高度に保存された5'非翻訳領域（UTR）中の3つの領域を標的とする7つのsiNAを設計した。HCVの5' - UTRに依存する2つの細胞培養系においてsiNAをスクリーニングした。一方は、HCV / ルシフェラーゼ遺伝子の翻訳を必要とし、他方は、キメラHCV / ポリオウイルス（PV）の複製を必要とする（Blatt et al., 米国特許出願09/740,332（2000年12月18日出願、本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。HCV / PVシステムのトランスフェクションは、HeLa細胞（ピルビン酸ナトリウムおよび100mMHEPESおよび5%FBSを補充したDMEMで成長させた）で、力チオン性脂質NC168またはLFA2Kのいすれかを用いて、10nMまたは25nMのsiNA濃度で行った。無血清培地でHeLa細胞にHCV / PVウイルスをmoi=0.01pfu/細胞で30分間接種した。接種物を除去し、80μLの培地を加え、20μLのトランスフェクション複合体を各ウエルに加えた。トランスフェクションの20-24時間後に細胞および上清を凍結した。各プレートを3回の凍結融解サイクルで処理し、上清を回収した。上清をHeLa細胞に3日間適用し、次に染色し計数した。図14-17に示される結果はpfu/ml × 10<sup>5</sup>で表される。

【 0 3 5 3 】

同じ領域を標的とする（1ヌクレオチドのシフト）2つの siNA（29579 / 29586 および 29578 / 2958）は、いずれのシステムにおいても活性である（図12を参照）。例えば、siNAで処理した細胞においては、反転 siNA 対照 29593 / 29600 と比較して HCV PV 複製の 85% 以上の低下が認められ（図12），IC50 は約 2.5 nM であった（図13）。インビボ用途のためにヌクレアーゼ耐性 siNA を開発するために、siNA は、安定化化学修飾を含むように改変することができる。そのような修飾には、siNA鎖の一方または両方における、ホスホロチオエート結合（P=S），2'-O-メチルヌクレオチド，2'-フルオロ（F）ヌクレオチド，2'-デオキシヌクレオチド，万能塩基ヌクレオチド，5' および / または 3' 末端修飾および種々の他のヌクレオチドおよび非ヌクレオチド修飾、例えば本明細書に記載される修飾が含まれる。この系統的アプローチを用いることにより、ヌクレアーゼに対する耐性が実質的に高い活性な siNA 分子を同定した。これらのコンストラクトのいくつかを HCV / ポリオウイルスキメラシステムで試験し、ウイルス複製の有意な減少が示された（図14-17を参照）。図14-17に示される siNA コンストラクトは、表IIに相互参照される RPI 番号で示される。siNA 活性を適切な対照（未処理細胞、スクランブル化 / 不活性対照配列、またはトランスフェクション対照）と比較する。図14は、HCV / ポリオウイルスキメラシステムにおける、化学的に修飾された siNA コンストラクト 30051 / 30053 を用いる HCV RNA の阻害を示す。このコンストラクトは、3' 末端および 5' 末端に反転デオキシ無塩基ヌクレオチド、いくつかのホスホロチオエート結合、および 5'-ニトロインドールヌクレオチドを有する。図15は、HCV / ポリオウイルスキメラシステムにおける、化学的に修飾された siNA コンストラクト 30055 / 30057 を用いる HCV RNA の阻害を示す。このコンストラクトは、3' 末端および 5' 末端に反転デオキシ無塩基ヌクレオチド、いくつかのホスホロチオエート結合、および 5'-ニトロインドールヌクレオチドを有する。図16および17は、修飾されていない siNA コンストラクト（29586 / 29579）および化学的に修飾された siNA コンストラクト（30417 / 30419, 30417 / 30420, 30418 / 30419、およびこれらの組み合わせ）をそれぞれ 10 nM および 25 nM の siNA で用いた、HCV / ポリオウイルスキメラシステムにおける HCV RNA の阻害を示す。図14-17に示されるように、本発明の siNA コンストラクトは、HCV / ポリオウイルスキメラシステムにおいて HCV RNA の強力な阻害を与える。したがって、siNA コンストラクト、例えば化学的に修飾された、ヌクレアーゼ耐性 siNA 分子は、慢性 HCV 感染を治療するための重要な治療剤である。

〔 0 3 5 4 〕

### 実施例 1.1：適応症

HCV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、HCV活性をアッセイする方法、およびHCV発現を制御しうる化合物の必要性を示す。本明細書に記載されるように、本発明の核酸分子は、HCVレベルに関連する疾病状態を診断するためのアッセイにおいて用いることができる。さらに、核酸分子は、HCVレベルに関連する疾病状態を治療するために用いることができる。

[ 0 3 5 5 ]

HCV 発現の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、HCV 感染、肝不全、肝細胞癌、肝硬変、および / または HCV 感染に関連する他の疾病状態が含まれる。

[ 0 3 5 6 ]

## 実施例 1.2：インターフェロン

インターフェロンは、本発明の s i N A 分子と組み合わせて、本明細書に記載される疾患および／または状態の治療に用いることができる一群の化合物の非限定的例である。タイプ I インターフェロン ( I F N ) は、25種類以上の I F N - のファミリー ( P e s t a , 1 9 8 6 , M e t h o d s E n z y m o l . 1 1 9 , 3 - 1 4 ) , ならびに I F

N- , およびIFN- を含む , 一群の天然のサイトカインである。進化的には同じ遺伝子に由来するものであるが (Diaz et al. , 1994 , *Genomics* 22 , 540 - 552 ) , これらの分子の一次配列には多くの差異があり , 生物学的活性が進化的に分岐してきたことが暗示される。すべてのタイプIのIFNは , IFNが細胞表面レセプターに結合することから始まる生物学的効果の共通のパターンを共有する (Pfeffer & Strulovici , 1992 , *Transmembrane secondary messengers for IFN- / . In: Interferon. Principles and Medical Applications* . S. Baron , D. H. Coopenhaver , F. Dianzani , W. R. Fleischmann Jr. , T. K. Hughes Jr. , G. R. Kimpel , D. W. Niesel , G. J. Stanton , and S. K. Tyring , eds. 151 - 160 ) 。結合した後 , ヤヌス (Janus) チロシンキナーゼおよびSTAT蛋白質等のチロシンキナーゼが活性化され , いくつかのIFN- 刺激性遺伝子産物が産生される (Johnson et al. , 1994 , *Sci. Am.* 270 , 68 - 75 ) 。IFN- 刺激性遺伝子産物は , 抗ウイルス , 抗増殖および免疫調節効果 , サイトカイン誘導 , およびHLAクラスIおよびクラスII制御を含む , タイプI IFNの多面的な生物学的効果の原因である (Pestka et al. , 1987 , *Ann. Rev. Biochem.* 56 , 727 ) 。IFN- 刺激性遺伝子産物の例としては , 2-5-オリゴアデニレートシンターゼ (2-5 OAS) , 2-ミクログロブリン , ネオプテリン , p68キナーゼ , およびMX蛋白質 (Chebath & Revel , 1992 , *The 2-5 A system: 2-5 A synthetase, its species and functions. In: Interferon. Principles and Medical Applications* . S. Baron , D. H. Coopenhaver , F. Dianzani , W. R. Jr. Fleischmann , T. K. Jr. Hughes , G. R. Kimpel , D. W. Niesel , G. J. Stanton , and S. K. Tyring , eds. , pp. 225 - 236 ; Samuel , 1992 , *The RNA-dependent P1/e IF-2 protein kinase. In: Interferon. Principles and Medical Applications* . S. Baron , D. H. Coopenhaver , F. Dianzani , W. R. Fleischmann Jr. , T. K. Hughes Jr. , G. R. Kimpel , D. W. Niesel , G. H. Stanton , and S. K. Tyring , eds. 237 - 250 ; Horisberger , 1992 , *MX protein: function and Mechanism of Action. In: Interferon. Principles and Medical Applications* . S. Baron , D. H. Coopenhaver , F. Dianzani , W. R. Fleischmann Jr. , T. K. Hughes Jr. , G. R. Kimpel , D. W. Niesel , G. H. Stanton , and S. K. Tyring , eds. 215 - 224 ) 。すべてのタイプI IFNは類似する生物学的効果を有するが , すべての活性が各タイプIのIFNに共通なわけではなく , 多くの場合 , 活性の程度は , 各IFNサブタイプにより非常に異なる (Fish et al. , 1989 , *J. Interferon Res.* 9 , 97 - 114 ; Ozes et al. , 1992 , *J. Interferon Res.* 12 , 55 - 59 ) 。より詳細には , 異なるサブタイプのIFN- およびIFN- の分子ハイブリッドの特性の研究は , 薬理学的特性の相違を示した (Rubinstein , 1987 , *J. Interferon Res.* 7 , 545 - 551 ) 。これらの薬理学的相違は , 3アミノ酸残基程度の変化によっても生じうる (Lee et al. , 1982 , *Cancer Res.* 42 , 1312 - 1316 ) 。

【0357】

既知のIFN- サブタイプにおいて85 - 166アミノ酸が保存されている。IFN- 偽遺伝子をのぞき , 約25種類の異なるIFN- のサブタイプが知られている。こ

10

20

30

40

50

これらの非対立遺伝子サブタイプの対の比較により、一次配列の差異が2% - 23%であることが示された。天然に生ずるIFNに加え、コンセンサスインターフェロン(CIFN)として知られる非天然型組換えタイプIインターフェロンが治療用化合物として合成された(Tong et al., 1997, Hepatology 26, 747-754)。

### 【0358】

インターフェロンは、現在、感染性疾患および自己免疫疾患および癌を含む、少なくとも12の異なる適応症において用いられている(Borden, 1992, N. Engl. J. Med. 326, 1491-1492)。自己免疫疾患については、IFNは、慢性関節リウマチ、多発性硬化症およびクローヴン病の治療に用いられてきた。癌の治療については、IFNは、単独でまたは多くの異なる化合物との組み合わせで用いられてきた。IFNが用いられている特定のタイプの癌には、扁平上皮癌、黒色腫、副腎腫、血管腫、毛様細胞性白血病およびカボジ肉腫が含まれる。感染性疾患の治療においては、IFNは、マクロファージの食作用活性および白血球の細胞毒性を増加させ、細胞性病原体の増殖を阻害する。IFNが治療に用いられている特定の適応症には、B型肝炎、ヒトパピローマウイルスタイプ6および11(すなわち、性器ゆうぜい)(Leventhal et al., 1991, N. Engl. J. Med. 325, 613-617)、慢性肉芽腫疾患およびC型肝炎ウイルスが含まれる。

### 【0359】

慢性HCV感染の治療におけるIFN-アルファの、多くのよく統制された臨床試験は、週3回の治療により、6ヶ月の治療の終わりには患者の約50%(40%-70%の範囲)で血清ALT値が低下することを示している(Davis et al., 1989, The New England Journal of Medicine 321, 1501-1506; Marcellin et al., 1991, Hepatology 13, 393-397; Tong et al., 1997, Hepatology 26, 747-754; Tong et al., Hepatology 26, 1640-1645)。しかし、インターフェロン治療を中止した後、応答した患者の約50%が再発し、"永続的"応答率は、血清ALT濃度の正常化により評価して約20-25%であった。さらに、HCV RNAの値の変化を臨床的エンドポイントとして用いた6ヶ月間のタイプIインターフェロン治療を試験した研究は、35%までの患者が治療の終わりまでにHCV RNAを失うことを示した(Tong et al., 1997, (上掲))。しかし、ALTのエンドポイントに関しては、約50%の患者が治療の中止から6ヶ月後に再発し、永続的なウイルス性応答はわずか12%(23%)であった。48週間の治療を試験した研究は、持続するウイルス性応答は25%までであることを示した。

### 【0360】

PEG化インターフェロン、すなわち、ポリエチレングリコール(PEG)とコンジュゲート化したインターフェロンは、インターフェロンより改良された特性を示す。PEGコンジュゲーションにより与えられる利点には、PEGを有しないインターフェロンと比較して改良された薬物動態学プロファイルが含まれ、したがって、より便利な投与計画、改良された許容度、および改良された抗ウイルス効力が与えられる。そのような改良は、ポリエチレングリコールインターフェロンアルファ-2a(PEGASYS, Roche)およびポリエチレングリコールインターフェロンアルファ-2b(VIRAFERON PEG, PEG-INTRON, Enzon / Schering Plough)の両方の臨床研究で示されている。

### 【0361】

インターフェロンおよびポリエチレングリコールインターフェロンと組み合わせたs i N A分子は、HCVまたは上述した他のいずれかの適応症の治療の有効性を改良する可能性を有する。HCV感染等の疾患に関連するRNAを標的とするs i N A分子を、個々にまたはインターフェロンおよびポリエチレングリコールインターフェロン等の他の療法と

10

20

30

40

50

組み合わせて用いて、増強された有効性を達成することができる。

【0362】

実施例13：診断用途

本発明の siNA 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 RNA）の同定に用いることができる。そのような siNA 分子の診断における使用は、再構成された RNAi 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 siNA 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）RNA の存在を検出することができる。 siNA 活性と標的 RNA 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 RNA の塩基対形成および 3 次元構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 siNA 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 RNA の構造および機能に重要なスクレオチド変化をマッピングすることができる。 siNA 分子による標的 RNA 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を明らかにすることができます。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ます。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 siNA 分子、既知の小分子阻害剤と組み合わせた siNA 分子、 siNA 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 siNA 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 mRNA の存在の検出が含まれる。そのような RNA は、 siNA 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（FRET）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。

【0363】

特定の例においては、標的 RNA の野生型または変異型のみしか切断できない siNA 分子をアッセイに使用する。第 1 の siNA 分子（すなわち、野生型の標的 RNA のみを切断するもの）を用いて試料中の野生型 RNA の存在を同定し、第 2 の siNA 分子（すなわち、変異型の標的 RNA のみを切断するもの）を用いて試料中の変異型 RNA 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 RNA の合成基質を両方の siNA 分子で切断し、反応における siNA 分子の相対効率および"非標的" RNA 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 RNA 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 siNA 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 RNase 保護アッセイを用いて確認し、各 RNA 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 RNA 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 mRNA 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ブを両方の転写産物に使用すれば、 RNA 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。 RNA 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。

【0364】

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。

【0365】

10

20

30

40

50

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。

【0366】

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、RNAi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siRNA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。

【0367】

本明細書に例示的に記載されている発明は、本明細書に特定的に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内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的に開示してきたが、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。

【0368】

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。

【0369】

10

20

30

【表1】

表 I: HCV 受託番号

配列名	受託番号	遺伝子座
gi 329763 gb M84754.1 HPCGENANTI	M84754.1	HPCGENANTI
gi 567059 gb U16362.1 HCU16362	U16362.1	HCU16362
gi 5918956 gb AF165059.1 AF165059	AF165059.1	AF165059
gi 385583 gb S62220.1 S62220	S62220.1	S62220
gi 6010587 gb AF177040.1 AF177040	AF177040.1	AF177040
gi 5748510 emb AJ238800.1 HCJ238800	AJ238800.1	HCJ238800
gi 7650221 gb AF207752.1 AF207752	AF207752.1	AF207752
gi 11559454 dbj AB049094.1 AB049094	AB049094.1	AB049094
gi 3550760 dbj D84263.1 D84263	D84263.1	D84263
gi 221610 dbj D90208.1 HPCJCG	D90208.1	HPCJCG
gi 558520 dbj D28917.1 HPCK3A	D28917.1	HPCK3A
gi 2176577 dbj E08461.1 E08461	E08461.1	E08461
gi 6707285 gb AF169005.1 AF169005	AF169005.1	AF169005
gi 12309923 emb AX057094.1 AX057094	AX057094.1	AX057094
gi 6010585 gb AF177039.1 AF177039	AF177039.1	AF177039
gi 7329202 gb AF238482.1 AF238482	AF238482.1	AF238482
gi 11559464 dbj AB049099.1 AB049099	AB049099.1	AB049099
gi 5918932 gb AF165047.1 AF165047	AF165047.1	AF165047
gi 5918946 gb AF165054.1 AF165054	AF165054.1	AF165054
gi 7650233 gb AF207758.1 AF207758	AF207758.1	AF207758
gi 19568932 gb AF483269.1	AF483269.1	
gi 7650247 gb AF207765.1 AF207765	AF207765.1	AF207765
gi 12309919 emb AX057086.1 AX057086	AX057086.1	AX057086
gi 5708597 dbj E10839.1 E10839	E10839.1	E10839
gi 2327074 gb AF011753.1 AF011753	AF011753.1	AF011753
gi 12310062 emb AX057317.1 AX057317	AX057317.1	AX057317
gi 221606 dbj D10750.1 HPCJ491	D10750.1	HPCJ491
gi 2174448 dbj E06261.1 E06261	E06261.1	E06261
gi 3098640 gb AF054251.1 AF054251	AF054251.1	AF054251
gi 18027684 gb AF313916.1 AF313916	AF313916.1	AF313916
gi 329873 gb M62321.1 HPCPLYPRE	M62321.1	HPCPLYPRE
gi 464177 dbj D14853.1 HPCCGS	D14853.1	HPCCGS
gi 15422182 gb AY051292.1	AY051292.1	
gi 676877 dbj D49374.1 HPCFG	D49374.1	HPCFG
gi 1030706 dbj D50480.1 HPCK1R1	D50480.1	HPCK1R1
gi 7650223 gb AF207753.1 AF207753	AF207753.1	AF207753
gi 7650237 gb AF207760.1 AF207760	AF207760.1	AF207760
gi 11559444 dbj AB049089.1 AB049089	AB049089.1	AB049089
gi 3550762 dbj D84264.1 D84264	D84264.1	D84264
gi 12831192 gb AF333324.1 AF333324	AF333324.1	AF333324
gi 13122265 dbj AB047641.1 AB047641	AB047641.1	AB047641
gi 7329204 gb AF238483.1 AF238483	AF238483.1	AF238483
gi 11559468 dbj AB049101.1 AB049101	AB049101.1	AB049101
gi 5918934 gb AF165048.1 AF165048	AF165048.1	AF165048
gi 5918948 gb AF165055.1 AF165055	AF165055.1	AF165055
gi 7650235 gb AF207759.1 AF207759	AF207759.1	AF207759
gi 7650249 gb AF207766.1 AF207766	AF207766.1	AF207766
gi 9843676 emb AJ278830.1 HEC278830	AJ278830.1	HEC278830
gi 11559450 dbj AB049092.1 AB049092	AB049092.1	AB049092
gi 2943783 dbj D89815.1 D89815	D89815.1	D89815

10

20

30

40

50

【表2】

gi 9626438 ref NC_001433.1	NC_001433.1	
gi 12310134 emb AX057395.1 AX057395	AX057395.1	AX057395
gi 11559460 dbj AB049097.1 AB049097	AB049097.1	AB049097
gi 12309922 emb AX057092.1 AX057092	AX057092.1	AX057092
gi 2174644 dbj E06457.1 E06457	E06457.1	E06457
gi 2176559 dbj E08443.1 E08443	E08443.1	E08443
gi 5918960 gb AF165061.1 AF165061	AF165061.1	AF165061
gi 2326454 emb Y12083.1 HCV12083	Y12083.1	HCV12083
gi 5918938 gb AF165050.1 AF165050	AF165050.1	AF165050
gi 7650225 gb AF207754.1 AF207754	AF207754.1	AF207754
gi 7650261 gb AF207772.1 AF207772	AF207772.1	AF207772
gi 1030704 dbj D50485.1 HPCK1S2	D50485.1	HPCK1S2
gi 3550758 dbj D84262.1 D84262	D84262.1	D84262
gi 7650239 gb AF207761.1 AF207761	AF207761.1	AF207761
gi 3550764 dbj D84265.1 D84265	D84265.1	D84265
gi 7329206 gb AF238484.1 AF238484	AF238484.1	AF238484
gi 2176516 dbj E08399.1 E08399	E08399.1	E08399
gi 5918936 gb AF165049.1 AF165049	AF165049.1	AF165049
gi 11559446 dbj AB049090.1 AB049090	AB049090.1	AB049090
gi 5441837 emb AJ242653.1 SSE242653	AJ242653.1	SSE242653
gi 3098641 gb AF054252.1 AF054252	AF054252.1	AF054252
gi 4753720 emb AJ132997.1 HCV132997	AJ132997.1	HCV132997
gi 5420376 emb AJ238799.1 HCJ238799	AJ238799.1	HCJ238799
gi 11559440 dbj AB049087.1 AB049087	AB049087.1	AB049087
gi 15529110 gb AY045702.1	AY045702.1	
gi 560788 dbj D30613.1 HPCPP	D30613.1	HPCPP
gi 11225869 emb AX036253.1 AX036253	AX036253.1	AX036253
gi 11559456 dbj AB049095.1 AB049095	AB049095.1	AB049095
gi 329770 gb M58335.1 HPCHUMR	M58335.1	HPCHUMR
gi 6707279 gb AF169002.1 AF169002	AF169002.1	AF169002
gi 221586 dbj D10749.1 HPCHCJ1	D10749.1	HPCHCJ1
gi 2171981 dbj E03766.1 E03766	E03766.1	E03766
gi 6010579 gb AF177036.1 AF177036	AF177036.1	AF177036
gi 1030703 dbj D50484.1 HPCK1S3	D50484.1	HPCK1S3
gi 3098650 gb AF054257.1 AF054257	AF054257.1	AF054257
gi 5821154 dbj AB016785.1 AB016785	AB016785.1	AB016785
gi 5918962 gb AF165062.1 AF165062	AF165062.1	AF165062
gi 7650227 gb AF207755.1 AF207755	AF207755.1	AF207755
gi 7650263 gb AF207773.1 AF207773	AF207773.1	AF207773
gi 1183030 dbj D63822.1 HPCJK046E2	D63822.1	HPCJK046E2
gi 13122271 dbj AB047644.1 AB047644	AB047644.1	AB047644
gi 2443428 gb U89019.1 HCU89019	U89019.1	HCU89019
gi 2462303 emb Y13184.1 HCV1480	Y13184.1	HCV1480
gi 7329208 gb AF238485.1 AF238485	AF238485.1	AF238485
gi 1160327 dbj D14484.1 HPCJRNA	D14484.1	HPCJRNA
gi 12309921 emb AX057090.1 AX057090	AX057090.1	AX057090
gi 3098643 gb AF054253.1 AF054253	AF054253.1	AF054253
gi 21397075 gb AF511948.1	AF511948.1	
gi 1030701 dbj D50482.1 HPCK1R3	D50482.1	HPCK1R3
gi 1030702 dbj D50483.1 HPCK1S1	D50483.1	HPCK1S1
gi 3098632 gb AF054247.1 AF054247	AF054247.1	AF054247
gi 59478 emb X61596.1 HCVJK1G	X61596.1	HCVJK1G
gi 3098652 gb AF054258.1 AF054258	AF054258.1	AF054258
gi 5918950 gb AF165056.1 AF165056	AF165056.1	AF165056
gi 7650251 gb AF207767.1 AF207767	AF207767.1	AF207767

10

20

30

40

【表3】

gi 5918964 gb AF165063.1 AF165063	AF165063.1	AF165063
gi 5918928 gb AF165045.1 AF165045	AF165045.1	AF165045
gi 5532421 gb AF139594.1 AF139594	AF139594.1	AF139594
gi 13122267 dbj AB047642.1 AB047642	AB047642.1	AB047642
gi 5441831 emb AJ242651.1 SSE242651	AJ242651.1	SSE242651
gi 7650265 gb AF207774.1 AF207774	AF207774.1	AF207774
gi 7650229 gb AF207756.1 AF207756	AF207756.1	AF207756
gi 1183032 dbj D63821.1 HPCJK049E1	D63821.1	HPCJK049E1
gi 2175714 dbj E07579.1 E07579	E07579.1	E07579
gi 1212741 dbj D45172.1 HPCHCPO	D45172.1	HPCHCPO
gi 5708511 dbj E05027.1 E05027	E05027.1	E05027
gi 1483141 dbj D50409.1 D50409	D50409.1	D50409
gi 13122261 dbj AB047639.1 AB047639	AB047639.1	AB047639
gi 6521008 dbj AB031663.1 AB031663	AB031663.1	AB031663
gi 633201 emb X76918.1 HCVCENS1	X76918.1	HCVCENS1
gi 329737 gb M67463.1 HPCCGAA	M67463.1	HPCCGAA
gi 11559452 dbj AB049093.1 AB049093	AB049093.1	AB049093
gi 13619567 emb AX100563.1 AX100563	AX100563.1	AX100563
gi 221604 dbj D13558.1 HPCJ483	D13558.1	HPCJ483
gi 11225872 emb AX036256.1 AX036256	AX036256.1	AX036256
gi 1749761 dbj D89872.1 D89872	D89872.1	D89872
gi 5918940 gb AF165051.1 AF165051	AF165051.1	AF165051
gi 4753718 emb AJ132996.1 HCV132996	AJ132996.1	HCV132996
gi 7650241 gb AF207762.1 AF207762	AF207762.1	AF207762
gi 3098645 gb AF054254.1 AF054254	AF054254.1	AF054254
gi 9930556 gb AF290978.1 AF290978	AF290978.1	AF290978
gi 11559462 dbj AB049098.1 AB049098	AB049098.1	AB049098
gi 2764397 emb AJ000009.1 HCVPOLYP	AJ000009.1	HCVPOLYP
gi 221608 dbj D10988.1 HPCJ8G	D10988.1	HPCJ8G
gi 3098634 gb AF054248.1 AF054248	AF054248.1	AF054248
gi 221650 dbj D00944.1 HPCPOLP	D00944.1	HPCPOLP
gi 306286 gb M96362.1 HPCUNKCDS	M96362.1	HPCUNKCDS
gi 3098654 gb AF054259.1 AF054259	AF054259.1	AF054259
gi 5918952 gb AF165057.1 AF165057	AF165057.1	AF165057
gi 7650253 gb AF207768.1 AF207768	AF207768.1	AF207768
gi 5918966 gb AF165064.1 AF165064	AF165064.1	AF165064
gi 15487693 gb AF356827.1 AF356827	AF356827.1	AF356827
gi 5738246 gb AF176573.1 AF176573	AF176573.1	AF176573
gi 11559448 dbj AB049091.1 AB049091	AB049091.1	AB049091
gi 21397077 gb AF511950.1	AF511950.1	
gi 3098638 gb AF054250.1 AF054250	AF054250.1	AF054250
gi 6707281 gb AF169003.1 AF169003	AF169003.1	AF169003
gi 329739 gb L02836.1 HPCCGENOM	L02836.1	HPCCGENOM
gi 6010581 gb AF177037.1 AF177037	AF177037.1	AF177037
gi 11559442 dbj AB049088.1 AB049088	AB049088.1	AB049088
gi 21397076 gb AF511949.1	AF511949.1	
gi 1030705 dbj D50481.1 HPCCK1R2	D50481.1	HPCCK1R2
gi 2176384 dbj E08264.1 E08264	E08264.1	E08264
gi 3660725 gb AF064490.1 AF064490	AF064490.1	AF064490
gi 2252489 emb Y11604.1 HCV4APOLY	Y11604.1	HCV4APOLY
gi 5918942 gb AF165052.1 AF165052	AF165052.1	AF165052
gi 2895898 gb AF046866.1 AF046866	AF046866.1	AF046866
gi 7650243 gb AF207763.1 AF207763	AF207763.1	AF207763
gi 11559458 dbj AB049096.1 AB049096	AB049096.1	AB049096
gi 13122263 dbj AB047640.1 AB047640	AB047640.1	AB047640

10

20

30

40

【表4】

gi 5708574 dbj E08263.1 E08263	E08263.1	E08263
gi 7650257 gb AF207770.1 AF207770	AF207770.1	AF207770
gi 3098647 gb AF054255.1 AF054255	AF054255.1	AF054255
gi 11559466 dbj AB049100.1 AB049100	AB049100.1	AB049100
gi 1181831 gb U45476.1 HCU45476	U45476.1	HCU45476
gi 2327070 gb AF011751.1 AF011751	AF011751.1	AF011751
gi 3098636 gb AF054249.1 AF054249	AF054249.1	AF054249
gi 7329210 gb AF238486.1 AF238486	AF238486.1	AF238486
gi 221612 dbj D11168.1 HPCJTA	D11168.1	HPCJTA
gi 960359 dbj D63857.1 HPVHCVN	D63857.1	HPVHCVN
gi 13122273 dbj AB047645.1 AB047645	AB047645.1	AB047645
gi 5918954 gb AF165058.1 AF165058	AF165058.1	AF165058
gi 7650255 gb AF207769.1 AF207769	AF207769.1	AF207769
gi 437107 gb U01214.1 HCU01214	U01214.1	HCU01214
gi 471116 dbj D10934.1 HPCRNA	D10934.1	HPCRNA
gi 13026028 dbj E66593.1 E66593	E66593.1	E66593
gi 2316097 gb AF009606.1 AF009606	AF009606.1	AF009606
gi 6707283 gb AF169004.1 AF169004	AF169004.1	AF169004
gi 514395 dbj D17763.1 HPCEGS	D17763.1	HPCEGS
gi 9757541 dbj AB030907.1 AB030907	AB030907.1	AB030907
gi 7329200 gb AF238481.1 AF238481	AF238481.1	AF238481
gi 6010583 gb AF177038.1 AF177038	AF177038.1	AF177038
gi 2172621 dbj E04420.1 E04420	E04420.1	E04420
gi 8926244 gb AF271632.1 AF271632	AF271632.1	AF271632
gi 5918930 gb AF165046.1 AF165046	AF165046.1	AF165046
gi 7650231 gb AF207757.1 AF207757	AF207757.1	AF207757
gi 5918944 gb AF165053.1 AF165053	AF165053.1	AF165053
gi 7650245 gb AF207764.1 AF207764	AF207764.1	AF207764
gi 12309920 emb AX057088.1 AX057088	AX057088.1	AX057088
gi 5918958 gb AF165060.1 AF165060	AF165060.1	AF165060
gi 7650259 gb AF207771.1 AF207771	AF207771.1	AF207771
gi 7341102 gb AF208024.1 AF208024	AF208024.1	AF208024
gi 3098649 gb AF054256.1 AF054256	AF054256.1	AF054256
gi 1944375 dbj D85516.1 D85516	D85516.1	D85516
gi 2327072 gb AF011752.1 AF011752	AF011752.1	AF011752
gi 221614 dbj D11355.1 HPCJTB	D11355.1	HPCJTB
gi 13122269 dbj AB047643.1 AB047643	AB047643.1	AB047643

10

20

30

【0 3 7 3】

【表5】

配列番号	配列	上側配列	下側配列	配列番号
1	GCCCCGGAGGUUCGUAG	GUACUGCCUGAUAGG	UGGGGUACUGCCUGAUAG	697
2	UGGGGUACUGCCUGAUAG	UUGGGGUACUGCCUGAUAG	UUGGGGUACUGCCUGAUAG	698
3	UUGGGGUACUGCCUGAUAG	CCCCGGGGAGGUACUGUAGA	CCCCGGGGAGGUACUGUAGA	699
4	CCCCGGGGAGGUACUGUAGA	GUGGUACUGCCUGAUAGGG	UCUACGAGACCUCCGGGG	700
5	GUGGUACUGCCUGAUAGGG	CUGCCUGAUAGGGCUUUG	CCUAUACAGGCAGUACCCAC	701
6	CUGCCUGAUAGGGCUUUG	CCUUGUGGUACUGCCUGAU	CAAGCACCCUAUCAGGCAG	702
7	CCUUGUGGUACUGCCUGAU	GGAAAAGGCCUUGGGGUAC	AUCAGGGCAGUACACAAGG	703
8	GGAAAAGGCCUUGGGGUAC	UACUGCCUGAUAGGGUGCU	GUACACACAAGGCCUUUCGC	704
9	UACUGCCUGAUAGGGUGCU	GGUACUGCCUGAUAGGGUG	AGCACCCUAUCAGGCAGUAA	705
10	GGUACUGCCUGAUAGGGUG	AAAGGCCUUGGGGUACUGC	CACCCUAUCAGGCAGUACC	706
11	AAAGGCCUUGGGGUACUGC	AAGGCCCUUAGGGGUACUGG	GCAGUACACAAAGGCCUUU	707
12	AAGGCCCUUAGGGGUACUGG	CUUUGGGGUACUGCCUGAU	GGCAGUACACAAAGGCCUU	708
13	CUUUGGGGUACUGCCUGAU	AGGCCUUGGGGUACUGCCU	UAUCAGGGCAGUACACAAG	709
14	AGGCCUUGGGGUACUGCCU	GUACUGCCUGAUAGGGUGC	AGGCAGGUACCAAGGCCU	710
15	GUACUGCCUGAUAGGGUGC	ACUGCCUGAUAGGGUGCUU	GCACCCCUAUACAGGCAGU	711
16	ACUGCCUGAUAGGGUGCUU	CUUGCGAGUGGCCGGAG	AAGCACCCUAUCAGGCAGU	712
17	CUUGCGAGUGGCCGGAG	CUGAUAGGGUGGUUGCGAG	CUCCGGGGGCACUGGCAAG	713
18	CUGAUAGGGUGGUUGCGAG	UUGCGAGUGGCCGGAGG	CUCGCAAGGCACCUUAUCAG	714
19	UUGCGAGUGGCCGGAGG	CCUGAUAGGGUGGUUGCGA	CCUCCGGGGGCACUGGCAA	715
20	CCUGAUAGGGUGGUUGCGA	GGCCUUGGGGUACUGCCUG	UGCGCAAGCACCCUAUCAGG	716
21	GGCCUUGGGGUACUGCCUG	GCUUGCGAGUGGCCGGGA	CAGGCAGUACACAAAGGCC	717
22	GCUUGCGAGUGGCCGGGA	UGCCUGAUAGGGUGGUUGC	UCCGGGGGCACUCGCAAGC	718
23	UGCCUGAUAGGGUGGUUGC	GAAAGGCCUUGGGGUACUG	GCAAGGCACCCUAUCAGGCA	719
24	GAAAGGCCUUGGGGUACUG	GCCUGAUAGGGUGGUUGCG	CAGUACACACAAGGCCUUUC	720
25	GCCUGAUAGGGUGGUUGCG	CGAAAGGCCUUGGGGUACU	CGCAAGGCACCCUAUCAGGC	721
26	CGAAAGGCCUUGGGGUACU	GCCUUGGGGUACUGCCUGA	AGUACACACAAGGCCUUUCG	722
27	GCCUUGGGGUACUGCCUGA	GAGUGCCCGGGAGGUUCUC	UCAGGGCAGUACCCACAAGGC	723
28	GAGUGCCCGGGAGGUUCUC	CCGGGGAGGUUCUGUAAGAC	GAGACCUCCGGGGCACUC	724
29	CCGGGGAGGUUCUGUAAGAC	UGCGAGUGGCCGGGAGGU	GUACUACGAGACCUCCGGGG	725
30	UGCGAGUGGCCGGGAGGU	ACCUCCGGGGACUCUGCA	ACCUCCGGGGACUCUGCA	726

表 II: HCV siNA および標的配列

【表6】

UGGUACUGCCUGAUAGGGU	31	UGGUACUGGCCUGAUAGGGU	31	ACCCUAUCAGGGCAGUACCCA	727
CCGGUGAGUACACGGGAAU	32	CCGGUGAGUACACGGGAAU	32	AUUCGGUGUGUACUCACCGG	728
GCGAGUGCCGGAGGUC	33	GCGAGUGCCGGAGGUC	33	GACCUCCGGGACUCUGC	729
CGAGUGCCGGAGGUCU	34	CGAGUGCCGGAGGUCU	34	AGACCUCCGGGACUCUGC	730
UGCCCGGGAGGUCUCGUA	35	UGCCCGGGAGGUCUCGUA	35	UACGAGACCUCCGGGGCA	731
GUGCCCGGGAGGUCUCGU	36	GUGCCCGGGAGGUCUCGU	36	ACGAGACCUCCGGGGCAC	732
AGUGCCCCGGAGGUCUCG	37	AGUGCCCCGGAGGUCUCG	37	CGAGACCUCCGGGGCACU	733
CCGGGAGGGUCUCGUAGACC	38	CCGGGAGGGUCUCGUAGACC	38	GGUCUACGAGACCUCCCGG	734
UGAUAGGGUGCUUGCGAGU	39	UGAUAGGGUGCUUGCGAGU	39	ACUCGGAAGGACCCCUAUA	735
GUGCUUGCGAGUGCCCCG	40	GUGCUUGCGAGUGCCCCG	40	CGGGGGCACUCGGAAGCAC	736
AUAGGGUGCUUGCGAGUGC	41	AUAGGGUGCUUGCGAGUGC	41	GCACUCGCAAGCACCCUAU	737
GGGUGGUUUCGGAGGGCCC	42	GGGUGGUUUCGGAGGGCCC	42	GGGGCACUCGGAAGGACCC	738
CGGGAGGUUCGUAGACCCG	43	CGGGAGGUUCGUAGACCCG	43	CGGUUCUACGAGACCUCCG	739
GGGAGGUUCGUAGACCGU	44	GGGAGGUUCGUAGACCGU	44	ACGGGUUCUACGAGACCUCC	740
GAUAGGGUGCUUGCGAGUG	45	GAUAGGGUGCUUGCGAGUG	45	CACUCGCAAGGACCCUAUC	741
GGAGGUCUUCGUAGACCGUG	46	GGAGGUCUUCGUAGACCGUG	46	CACGGGUUCUACGAGACCUCC	742
AGGGUGGUUGCGAGUGCCC	47	AGGGUGGUUGCGAGUGCCC	47	GGGCACUCUGCAAGCACCCU	743
UCGUUGCGAGGCCGGG	48	UCGUUGCGAGGCCGGG	48	CCCGGGGACUCGCAAGGCA	744
GGUGCUUUGCGAGGGCCCG	49	GGUGCUUUGCGAGGGCCCG	49	CGGGGGCACUCGCAAGGACCC	745
UAGGGUGGUUGCGAGUGCC	50	UAGGGUGGUUGCGAGUGCC	50	GGCACUCUGCAAGGACCCUA	746
AGGUUCUUCGUAGACCGUGCA	51	AGGUUCUUCGUAGACCGUGCA	51	UGCACGGGUUCUACGGAGACCU	747
GAGGUUCUUCGUAGACCGUGC	52	GAGGUUCUUCGUAGACCGUGC	52	GCACGGGUUCUACGAGACCC	748
GGAACCCGGUGAGUACACCG	53	GGAACCCGGUGAGUACACCG	53	CGGUGGUACUCACGGGUUCC	749
CGGAACCCGGUGAGUACACC	54	CGGAACCCGGUGAGUACACC	54	GGGUACUCACCGGUUCCG	750
CGGUGAGUACACCGGAAU	55	CGGUGAGUACACCGGAAU	55	AAUUCGGUGUACUCACCG	751
GCGGAACCCGGUGAGUACAC	56	GCGGAACCCGGUGAGUACAC	56	GUGUACUCACCGGUUCCGC	752
AACCGGGUGAGUACACCGGA	57	AACCGGGUGAGUACACCGGA	57	UCCGGGUUGUACACCGGUU	753
ACCGGGUGAGUACACCGGA	58	ACCGGGUGAGUACACCGGA	58	UCCGGGUUGUACACCGGUU	754
CUGCGGAACCGGGUGAGUAC	59	CUGCGGAACCGGGUGAGUAC	59	GUACUCACCGGUUCCGCAG	755
GUUGCGGGAAACCGGGUGAGU	60	GUUGCGGGAAACCGGGUGAGU	60	ACUCACCGGUUCCGCAGAC	756
GAACCCGGUGAGUACACCGG	61	GAACCCGGUGAGUACACCGG	61	CGGGGUUGUACACCGGUUUC	757
UGGGGAACCGGGUGAGUACA	62	UGGGGAACCGGGUGAGUACA	62	UGUACUCACCGGUUCCGCAG	758
UCUGCGGGAAACCGGGUGAGU	63	UCUGCGGGAAACCGGGUGAGU	63	UACUCACCGGUUCCGCAGA	759
GGGAGAGCCAUAGGGUGCU	64	GGGAGAGCCAUAGGGUGCU	64	AGACCAUCUAGGGUGCUCCC	760
GUGGUGCUGGGAAACCGGGUG	65	GUGGUGCUGGGAAACCGGGUG	65	CACCGGUUUCGGCAGACCC	761
GGUCUGCGGAACCGGGUGAG	66	GGUCUGCGGAACCGGGUGAG	66	CUCACCGGUUUCGGCAGACCC	762

【0 3 7 5】

40

10

20

30

【表7】

CGGAGAGCCAUAGUGGUC	67	CGGGAGAGCCAUAGUGGUC	67	GACCACUAUGGCCUCUCCCG	763
CGGGAGAGCCAUAGUGGU	68	CGGGGAGAGCCAUAGUGGU	68	ACACAUAGGGCUCUCCCGG	764
UGGUCUGGGAAACGGGUGA	69	UGGUCUGGGAAACGGGUGA	69	UCACCGGUUCCGAGACCA	765
GUGAGUAACCGGAAUUGC	70	GUGAGUAACCGGAAUUGC	70	GCAAUUCCGGUGUACUCAC	766
UGAGUACACCGGAAUUGC	71	UGAGUACACCGGAAUUGC	71	GGCAAUUCCGGUGUACUCA	767
GUGAGUAACCGGAAUUG	72	GUGAGUAACCGGAAUUG	72	CAAUUCGGGUACUCACC	768
GAGCCAUAUGGGUCUGGG	73	GAGCCAUAUGGGUCUGGG	73	CGCGAGACCAUCUAGGCUC	769
AGAGCCAUAGGGUCUGCG	74	AGAGCCAUAGGGUCUGCG	74	CGCAGACCAUCUAGGCUCU	770
UAGUGGUUCUGGGAAACCG	75	UAGUGGUUCUGGGAAACCG	75	CGGGUUCGGCAGACCAUCU	771
AUAGUGGUUCUGGGAAACCG	76	AUAGUGGUUCUGGGAAACCG	76	CGGUUUCGGCAGACCAUCU	772
GAGAGCCAUAUGGGUCUGC	77	GAGAGCCAUAUGGGUCUGC	77	GCAGACCAUCUAGGCUCUC	773
GCCAUAGUGGUUCUGGGAA	78	GCCAUAGUGGUUCUGGGAA	78	UCCCGAGACCAUCUAGGGC	774
AGUGGUUCUGGGAAACCGG	79	AGUGGUUCUGGGAAACCGG	79	ACCGGUUCCGAGACCAUCU	775
CAUAGUGGUUCUGGGAAACC	80	CAUAGUGGUUCUGGGAAACC	80	GUUUCGGCAGACCAUCUAG	776
AGCCAUAGGGUCUGGGGA	81	AGCCAUAGGGUCUGGGGA	81	UCCGAGACCAUCUAGGGC	777
CAUAGUGGUUCUGGGAAC	82	CAUAGUGGUUCUGGGAAC	82	GUUCCGAGACCAUCUAGGG	778
CCCUCCCCGGAGGCCAU	83	CCCUCCCCGGAGGCCAU	83	AUGGCUCUCCCGGAGGGG	779
GGAGAGCCAUAGGGUCUG	84	GGAGAGCCAUAGGGUCUG	84	CAGACCACUAUGCUCUCC	780
CCCGGGAGAGCCAUAGGG	85	CCCGGGAGAGCCAUAGGG	85	CCACUAUGGCCUCUCCGGG	781
CCCCCUCCCCGGAGGCCA	86	CCCCCUCCCCGGAGGCCA	86	UGGCUCUCCCGGAGGGGG	782
UCCCGGGAGGCCAUAGUG	87	UCCCGGGAGGCCAUAGUG	87	CACUAUGGCCUCUCCGGGA	783
CCCCCCUCCCCGGAGGCC	88	CCCCCCUCCCCGGAGGCC	88	GGCUCUCCCGGAGGGGG	784
CCCUCCCCGGAGGCCAU	89	CCCUCCCCGGAGGCCAU	89	UAGGGCUCUCCCGGAGGG	785
CCUCCCCGGAGGCCAUAG	90	CCUCCCCGGAGGCCAUAG	90	CUAUGGGCUCUCCCGGAGGG	786
CUCCCCGGAGGCCAUAGU	91	CUCCCCGGAGGCCAUAGU	91	ACUAUGGGCUCUCCCGGAG	787
UGUUGCCGGCAGGGCCC	92	UGUUGCCGGCAGGGCCC	92	GGGGCCUGGCCAGGGCAACA	788
CCCCCCCCCCCCGGAGAGC	93	CCCCCCCCCCCCGGAGAGC	93	GCUCUCCCGGAGGGGGG	789
CAUGGGCNUAUAGGAGUG	94	CAUGGGCNUAUAGGAGUG	94	CACUCAUACUAACGCCAUG	790
UAGCCAUAGGGCNUAUAGU	95	UAGCCAUAGGGCNUAUAGU	95	CAUCAUACAGCCCAUGGCUA	791
AGCCAUAGGGCNUAUAGU	96	AGCCAUAGGGCNUAUAGU	96	UCAUACUAACGCCAUGGCU	792
CCAUGGGCNUAUAGGAGU	97	CCAUGGGCNUAUAGGAGU	97	ACUCAUACUAACGCCAUGG	793
AUGGGCNUAUAGGAGUGU	98	AUGGGCNUAUAGGAGUGU	98	ACACUCAUACUAACGCCAUG	794
AAGGGCNUAUAGGCCGU	99	AAGGGCNUAUAGGCCGU	99	ACGCCAUAGGGCNUAUAGC	795
GUCCUAGGCCAUAGGCCGU	100	GUCCUAGGCCAUAGGCCGU	100	ACUAACGCCAUAGGCCUAG	796
AAAGGGCNUAUAGGCCGU	101	AAAGGGCNUAUAGGCCGU	101	CGCCAUAGGCCAUAGGCC	797
GCGCUUAGCCAUGGGGUUA	102	GCGCUUAGCCAUGGGGUUA	102	UAACGCCAUAGGCC	798

【表8】

GCCAUGGGGUUAGUAUGAG	103	GCCAUGGGGUUAGUAUGAG	103	CUCAUACUAACGCCAUGGGC	799
AGCGUUCUAGGCCAUGGGGUU	104	AGCGUUCUAGGCCAUGGGGUU	104	AACGCCAUGGGGUAGACGGC	800
CGUCUAGGCCAUGGGGUUAG	105	CGUCUAGGCCAUGGGGUUAG	105	CUAACGCCAUGGGGUAGACG	801
UCUAGGCCAUGGGGUUAGUA	106	UCUAGGCCAUGGGGUUAGUA	106	UACUAACGCCAUGGGGUAGA	802
GAAAGCGGUUCUAGGCCAUGGC	107	GAAAGCGGUUCUAGGCCAUGGC	107	GCCAUAGGGGUAGACGGCUUU	803
CUAGCCAUAGGGGUUAGUAU	108	CUAGCCAUAGGGGUUAGUAU	108	AUACUAACGCCAUGGGCUAG	804
CACUCCCCUGUGAGGAACU	109	CACUCCCCUGUGAGGAACU	109	AGUUCUCUACAGGGGAGUG	805
ACCUCAAAGAAAAACCAA	110	ACCUCAAAGAAAAACCAA	110	UUGGUUUUUUCCUJUGAGGU	806
CGCGAGAAAGCGGUUCUAGCCA	111	CGCGAGAAAGCGGUUCUAGCCA	111	UGGUCAUGACGCCUUUCUGCG	807
GGGUAAAGGUCAUCGAUACC	112	GGGUAAAGGUCAUCGAUACC	112	GGUAUCGAUGACCUUACCC	808
CAGAAAGCGGUUCUAGGCCAUG	113	CAGAAAGCGGUUCUAGGCCAUG	113	CAUGGCCUAGACGCCUUUCUG	809
AAACCUCAAAGAAAAACCA	114	AAACCUCAAAGAAAAACCA	114	UGGUUUUUCCUJUGAGGUUU	810
GCAGAAAAGCGGUUCUAGCCAU	115	GCAGAAAAGCGGUUCUAGCCAU	115	AUGGUCAUGACGCCUUUCUGC	811
AGAAAAGCGGUUCUAGCCAUGG	116	AGAAAAGCGGUUCUAGCCAUGG	116	CCAUGGGGUAGACGCCUUUCU	812
ACGCAGAAAAGCGGUUCUAGCC	117	ACGCAGAAAAGCGGUUCUAGCC	117	GGCUAGACGCCUUUCUGCGU	813
ACCUCAAAGAAAAACCAA	118	ACCUCAAAGAAAAACCAA	118	UUGGUUUUUCCUJUGAGGUU	814
UGGUAAAGGUCAUCGAUAC	119	UGGUAAAGGUCAUCGAUAC	119	GUAUCCGUAGACCUUACCCA	815
GUAAAGGUCAUCGAUACCCU	120	GUAAAGGUCAUCGAUACCCU	120	AGGGGUAAUCGAUGACCUUAC	816
UUCACCGAGAAAGCGUCUA	121	UUCACCGAGAAAGCGUCUA	121	UAGACGCCUUUCUGCGUGAA	817
GGUAAAGGUCAUCGAUACCC	122	GGUAAAGGUCAUCGAUACCC	122	GGGUAAUCGAUGACCUUACCC	818
AUCACUCCCCUGUGAGGAA	123	AUCACUCCCCUGUGAGGAA	123	UUCUCUACAGGGGAGUGAU	819
UCACUCCCCUGUGAGGAAC	124	UCACUCCCCUGUGAGGAAC	124	GUUCCUCACAGGGGAGUGA	820
UGUCUUUCAGCGAGAAAGCG	125	UGUCUUUCAGCGAGAAAGCG	125	CGCUUUUCUGCGUAGAGACA	821
UCACGGCAGAAAAGCGUCUAG	126	UCACGGCAGAAAAGCGUCUAG	126	CUAGACGCCUUUCUGCGUGA	822
CAACGAGAAAAGCGUCUAGC	127	CAACGAGAAAAGCGUCUAGC	127	GUUAAGACGCCUUUCUGCGUG	823
GACCGGGGUUUUJUGGA	128	GACCGGGGUUUUJUGGA	128	UCCAAGAAAGGACCCGGGUC	824
AGAGAACUACUGUCUUCAC	129	AGAGAACUACUGUCUUCAC	129	GUGAAGACAGGUAGGUCCUC	825
CUUGUGAGGAACUACUGUCU	130	CUUGUGAGGAACUACUGUCU	130	AGACAGUAGGUCCUCACAG	826
GGAAACUACUGUCUUCACGC	131	GGAAACUACUGUCUUCACGC	131	GCGUGAAGACAGGUAGUCC	827
ACUCCCCUGUGAGGAACUA	132	ACUCCCCUGUGAGGAACUA	132	UAGUUCUCACAGGGGAGU	828
GUUCUUCAGCGAGAAAGCGU	133	GUUCUUCAGCGAGAAAGCGU	133	ACGCCUUUCUGCGUGAAGAC	829
AGGAACUACUGUCUUCACG	134	AGGAACUACUGUCUUCACG	134	CGUGAAGACAGGUAGUCCU	830
CCUGUGAGGAACUACUGUC	135	CCUGUGAGGAACUACUGUC	135	GACAGUAGGUCCUCACAGG	831
UGUGAGGAACUACUGUCUU	136	UGUGAGGAACUACUGUCUU	136	AAGACAGUAGGUCCUCACAC	832
UCUUUACGGAGAAAGCGUC	137	UCUUUACGGAGAAAGCGUC	137	GACGCCUUUCUGCGUGAAGA	833
GAACUACUGUCUUACCGCA	138	GAACUACUGUCUUACCGCA	138	UGCGUGAAGACAGGUAGUUC	834

【表9】

CCCUGUGAGGAACUACUGU	139	CCCUGUGAGGAACUACUGU	139	ACAGUAGUUCCUCACAGGG	835
CUUCACCGGAGAAAGGGUCU	140	CUUCACCGGAGAAAGGGUCU	140	AGACGGCUUUUCUGCGUGAAG	836
UGAGGAACUACUGCUUCA	141	UGAGGAACUACUGCUUCA	141	UGAAGACAGUAGUUCCUCA	837
UGGCGUUAGUAUGAGUGUC	142	UGGCGUUAGUAUGAGUGUC	142	GACACUCAUACUACAGGCCA	838
CCCUGUGAGGAACUACUG	143	CCCUGUGAGGAACUACUG	143	CAGUAGUUCCUCACAGGG	839
GUAGGAACUACUGCUUC	144	GUAGGAACUACUGCUUC	144	GAAGACAGUAGUUCCUCAC	840
GGCGGUUAGUAUGAGUGUC	145	GGCGGUUAGUAUGAGUGUC	145	CGACACUCAUACUACGCC	841
GCCGAGUAGUGUUGGGUCG	146	GCCGAGUAGUGUUGGGUCG	146	CGACCCAAACACUACUCCGGC	842
ACUGUCUUACCGCAGAAAG	147	ACUGUCUUACCGCAGAAAG	147	CUUUCUGCGGUGAAGACAGU	843
UGGGUGCGAAAGGCCUUG	148	UGGGUGCGAAAGGCCUUG	148	CAAGGCCUUUCGGGACCCA	844
CUACUGUCUUACGCAGAA	149	CUACUGUCUUACGCAGAA	149	UUCGGCGUGAAGACAGUAG	845
CGAGUAGUUGGGGUUGGGCG	150	CGAGUAGUUGGGGUUGGGCG	150	CGCGACCCAACACUACUCUG	846
GUAGUGUUGGGGUUCGGAAA	151	GUAGUGUUGGGGUUCGGAAA	151	UUUCGGCGACCCAACACUAC	847
UAAACCUCAAAGAAAAACC	152	UAAACCUCAAAGAAAAACC	152	GGUUUUUCUUUUGGGUUUUA	848
CGAGUAGUUGGGGUUCGGC	153	CGAGUAGUUGGGGUUCGGC	153	GCGACCCAACACUACUCUGG	849
AGCCGAGUAGUGUUGGGUC	154	AGCCGAGUAGUGUUGGGUC	154	GACCCAAACACUACUCCGGCU	850
GUICGCGAAGGCCUUGGGG	155	GUICGCGAAGGCCUUGGGG	155	CCACAAGGCCUUUCGGCAC	851
UAGUGUUGGGGUUCGGCAAAG	156	UAGUGUUGGGGUUCGGCAAAG	156	CUUUCGGGACCCAAACACUA	852
CUAGCCGAGUAGUGUUGGG	157	CUAGCCGAGUAGUGUUGGG	157	CCCAACACACUACUCCGGCUAG	853
GAGUAGUGUUGGGGUUCGGA	158	GAGUAGUGUUGGGGUUCGGA	158	UCGGCGACCCAAACACUACUC	854
UGCGAAAGGCCUUGGGGU	159	UGCGAAAGGCCUUGGGGU	159	ACCACAAAGGCCUUUCGGCA	855
GCGUUAGUAGAGUGUCGU	160	GCGUUAGUAGAGUGUCGU	160	ACGACACUCUAUACUACAGC	856
UAGCCGAGUAGUGUUGGGU	161	UAGCCGAGUAGUGUUGGGU	161	ACCCAAACACUACUCCGGCUA	857
AACUACUGUCUUCACGCAG	162	AACUACUGUCUUCACGCAG	162	CUGCGUGAAGACAGUAGUU	858
CGCGAAAGGCCUUGGGUUA	163	CGCGAAAGGCCUUGGGUUA	163	UACCACAAAGGCCUUUCGG	859
AGUGUUGGGGUUCGGCAAAG	164	AGUGUUGGGGUUCGGCAAAG	164	CCUUUCGGGACCCAAACACU	860
GUUGGGUGCGGAAGGCCU	165	GUUGGGUGCGGAAGGCCU	165	AGGCCUUUCGGGACCCAAAC	861
AGUAGUGUUGGGGUUCGGA	166	AGUAGUGUUGGGGUUCGGA	166	UUCGGCGACCCAAACACUACU	862
UUGGGGUUGCGGAAGGCCU	167	UUGGGGUUGCGGAAGGCCU	167	AAGGGCCUUUCGGGACCCAA	863
UCCCCUGUGAGGAACUACU	168	UCCCCUGUGAGGAACUACU	168	AGUAGUUCCUCACAGGGGA	864
UACUGUCUUCACGCAGAA	169	UACUGUCUUCACGCAGAA	169	UUUCUGCGUGAAGACAGUA	865
GUUGGGGUUGCGGAAGGGC	170	GUUGGGGUUGCGGAAGGGC	170	GCCUUUCGGGACCCAAACAC	866
ACUACUGUCUUCACGCAGA	171	ACUACUGUCUUCACGCAGA	171	UCUGCGUGAAGACAGUAGU	867
CUGUCUUCACGCAGAAAGC	172	CUGUCUUCACGCAGAAAGC	172	GCUUUCUGCGUGAAGACAG	868
GGGUGCGGAAGGCCUUGU	173	GGGUGCGGAAGGCCUUGU	173	ACAAGGCCUUUCGGCACCC	869
CCUAAAACCUCAAAGAAAAA	174	CCUAAAACCUCAAAGAAAAA	174	UUUUUUUUUGGGUUUAGG	870

【0 3 7 8】

【表10】

GUUCGCGAAAGGCCUUGUG	175	GUUCGCGAAAGGCCUUGUG	175	CACAAGGCCUUUCGGCACC	871
CUAAACCUCAAAGAAAAAC	176	CUAAACCUCAAAGAAAAAC	176	GUUUUUUUUUGAGGUUUUAG	872
UGUUGGGUUCGCCAAAGGCC	177	UGUUGGGUUCGCCAAAGGCC	177	GGCCUUUUCGCGAACCAACA	873
CUCCCCUGUGAGGAACUAC	178	CUCCCCUGUGAGGAACUAC	178	GUAGUUUCUCACAGGGGAG	874
UCCUAAACCUCAAAGAAAA	179	UCCUAAACCUCAAAGAAAA	179	UUUUUUUJUGAGGUUJAGGA	875
ACGGGUCCUUUCUUGGAU	180	ACGGGUCCUUUCUUGGAU	180	AUCCAAGAAAGGCCGGU	876
AUCCUAAACCUCAAAGAA	181	AUCCUAAACCUCAAAGAA	181	UUCUUUAGGUUJAGGAU	877
UCAAUUGCCUGGAGAUUJGG	182	UCAAUUGCCUGGAGAUUJGG	182	CCAAUUCUCCAGCAUUGA	878
AUGGCCUGGAGAUUJGGCG	183	AUGGCCUGGAGAUUJGGCG	183	CGCCCAAUCUCCAGGCAU	879
AUGGCCUGGAGAUUJGGGC	184	AUGGCCUGGAGAUUJGGGC	184	GCCCAAUCUCCAGGCAU	880
CCGACCUCAUGGGGUACAU	185	CCGACCUCAUGGGGUACAU	185	AUGUACCCCAGGAGUCCGG	881
GUCAAUGCCUGGAGAUU	186	GUCAAUGCCUGGAGAUU	186	AAAUCUCCAGGCAGUUGAGC	882
CUCAAUGCCUGGAGAUU	187	CUCAAUGCCUGGAGAUU	187	AAAUCUCCAGGCAGUUGAG	883
GCUAGGCCAGUAGGUUGG	188	GCUAGGCCAGUAGGUUGG	188	CCAAACACUACUCGGCUAGC	884
CGCUCAAUGCCUGGAGAU	189	CGCUCAAUGCCUGGAGAU	189	AAUCLUCAGGCCAUJAGGCC	885
CAAUGCCUGGAGAUUJGG	190	CAAUGCCUGGAGAUUJGG	190	CCCAAUCUCCAGGCAUUG	886
GCCGACCUCAUGGGGUACA	191	GCCGACCUCAUGGGGUACA	191	UGUACCCCAGGAGUCCGGC	887
AUCCUAAACCUCAAAGAAA	192	AUCCUAAACCUCAAAGAAA	192	UUUUUUJUGGUUJAGGAU	888
AGAUUUGGGCGUGCCCCG	193	AGAUUUGGGCGUGCCCCG	193	CGGGGGCACGCCAAUUCU	889
CCCGCUCAUGCCUGGAGA	194	CCCGCUCAUGCCUGGAGA	194	UCUCCAGGCAGUUGAGGGGG	890
GAGAUUUGGGCGUGCCCC	195	GAGAUUUGGGCGUGCCCC	195	GGGGCACGCCAAUUCUC	891
GGAGAUUUGGGCGUGGCC	196	GGAGAUUUGGGCGUGGCC	196	GGGGCACGCCAAUUCUCC	892
GAUUUGGGCGUGCCCCG	197	GAUUUGGGCGUGCCCCG	197	GGGGGGCACGCCAAUUC	893
CCGCUCUCAAUGCCUGGAGAU	198	CCGCUCUCAAUGCCUGGAGAU	198	AUCUCCAGGCAUJAGGCC	894
AQUACACGGAAUUGCCAG	199	AQUACACGGAAUUGCCAG	199	CUGGCAAUUCGGGUACU	895
UACACCGGAAUUGCCAGGA	200	UACACCGGAAUUGCCAGGA	200	UCCUGGCAAUUCGGGUUA	896
GAUACACCGGAAUUGCCA	201	GAUACACCGGAAUUGCCA	201	UGGCAAUUCGGGUACUC	897
GUACACCGGAAUUGCCAGG	202	GUACACCGGAAUUGCCAGG	202	CCUGGCAAUUCGGGUAC	898
UUGCCGGCGAGGGGCCCA	203	UUGCCGGCGAGGGGCCCA	203	UGGGGGCCCCUGGGGGCAA	899
CUGGAGAUUUGGGUGGCC	204	CUGGAGAUUUGGGUGGCC	204	GGCACGCCAAAUUCUCCAG	900
GUUGCCGGCGAGGGGCCCA	205	GUUGCCGGCGAGGGGCCCA	205	GGGGCCCCUGGCAGGCCAAC	901
GCCUGGAGAUUUGGGCGAG	206	GCCUGGAGAUUUGGGCGAG	206	CACGCCAAAUUCUCCAGG	902
UGGAGAUUUGGGCGUGCC	207	UGGAGAUUUGGGCGUGCC	207	GGGCACGCCAAAUUCUCCA	903
CUGGAGAUUUGGGUGUC	208	CUGGAGAUUUGGGUGUC	208	GCACGCCAAAUUCUCCAGG	904
UGCUAGCCGAGUAGGUUG	209	UGCUAGCCGAGUAGGUUG	209	CAACACUACUCGGGUAGCA	905
UGCCUGGAGAUUUGGGGU	210	UGCCUGGAGAUUUGGGGU	210	ACGCCAAAUUCUCCAGGCA	906

【表11】

CUCCUAGCCGAGUAGUU	211	CUCCUAGCCGAGUAGUU	211	AACACUACUCGGCUAGCAG	907
ACUGCUAGCCGAGUAGUU	212	ACUGCUAGCCGAGUAGUU	212	ACACUACUCGGCUAGCAGU	908
GAUCUGCUAGCCGAGUAGU	213	GAUCUGCUAGCCGAGUAGU	213	CACUACUCGGCUAGCAGUC	909
AGACUGCUAGCCGAGUAGU	214	AGACUGCUAGCCGAGUAGU	214	ACUACUCGGCUAGCAGUCU	910
ACCCGCUAAUGCUGGAG	215	ACCCGCUAAUGCUGGAG	215	CUCCAGGCAUUGAGGGGU	911
AACCCGCUAAUGCUGGAG	216	AACCCGCUAAUGCUGGAG	216	UCCAGGCAUUGAGGGGU	912
UGCCGCGCAGGGGCCAG	217	UGCCGCGCAGGGGCCAG	217	CUGGGGCCCCUGGGGGCA	913
AGGGGCCCCAGGUUGGGUG	218	AGGGGCCCCAGGUUGGGUG	218	CACCCAAACCUGGGGGCCC	914
GGGGCCCCAGGUUGGGUG	219	GGGGCCCCAGGUUGGGUG	219	CACACCCAAACCUGGGGGCC	915
CAGGGGGCCCAGGUUGGGU	220	CAGGGGGCCCAGGUUGGGU	220	ACCCAAACCUGGGGGCCCUG	916
GGCCCCAGGUUGGGUGGC	221	GGCCCCAGGUUGGGUGGC	221	GCACACCCAAACCUGGGGGC	917
CGCAAGGGGCCAGGUUGG	222	CGCAAGGGGCCAGGUUGG	222	CCAACCUUGGGGCCUGGG	918
UGGCAGGGAUUGCUCUGU	223	UGGCAGGGAUUGCUCUGU	223	ACAGGAGCCAUCUCGCCA	919
GCCCCAGGUUGGGUGGCC	224	GCCCCAGGUUGGGUGGCC	224	CGCACACCCAAACCUGGGGC	920
GCAGGGGGCCCAGGUUGGG	225	GCAGGGGGCCCAGGUUGGG	225	CCCAACCUUGGGGGCCCUGGC	921
GGGCAGGAUGGCUCUGUC	226	GGGCAGGAUGGCUCUGUC	226	GACAGGAGCCAUCUCGCC	922
GGGGCCCCAGGUUGGGUGU	227	GGGGCCCCAGGUUGGGUGU	227	ACACCCAAACCUGGGGGCCC	923
GCCGCGCAGGGGCCAGG	228	GCCGCGCAGGGGCCAGG	228	CCUGGGGCCUGGGGGC	924
GGCGCAGGGGCCAGGUUG	229	GGCGCAGGGGCCAGGUUG	229	CAACCUUGGGGCCUGGGCG	925
CGCGCAGGGGCCAGGUU	230	CGCGCAGGGGCCAGGUU	230	AACCUGGGGCCUGGGCGG	926
CCGGCGCAGGGGCCAGGU	231	CCGGCGCAGGGGCCAGGU	231	ACCUGGGGCCUGGGCGG	927
AGGACGACGGGUUCUUUC	232	AGGACGACGGGUUCUUUC	232	GAAAGGACCGGGUGGUCCU	928
CAGGACGACGGGUUCUUU	233	CAGGACGACGGGUUCUUU	233	AAAGGACCGGGUGGUCCUG	929
UGCCAGGAGCAGCCGGGUCC	234	UGCCAGGAGCAGCCGGGUCC	234	GGACCCGGGUCCUGGGCA	930
AUUGCAGGAGCAGCCGGU	235	AUUGCAGGAGCAGCCGGU	235	ACCCGGGUCCUGGGCAAU	931
AAUUGCAGGAGCAGCCGG	236	AAUUGCAGGAGCAGCCGG	236	CCCGGUCCUGGGCAAU	932
UUGCCAGGAGCAGCCGGUC	237	UUGCCAGGAGCAGCCGGUC	237	GACCCGGGUCCUGGGCA	933
CCAGGAGCAGCCGGGUCCU	238	CCAGGAGCAGCCGGGUCCU	238	AAGGACCCGGGUCCUGGG	934
GCCAGGGACGGACGGGUCCU	239	GCCAGGGACGGACGGGUCCU	239	AGGACCCGGGUCCUGGGC	935
GAUUUGCAGGAGCAGCCGG	240	GAUUUGCAGGAGCAGCCGG	240	CCGGGUCCUGGGGUCC	936
ACGACCGGGGUCCUUCUUG	241	ACGACCGGGGUCCUUCUUG	241	CAAGAAAGGACCCGGUGGU	937
GAAGACCGGGGUCCUUCU	242	GAAGACCGGGGUCCUUCU	242	AAGAAAGGACCCGGUGGU	938
CGACCGGGGUCCUUCUUGG	243	CGACCGGGGUCCUUCUUGG	243	CCAAGAAAGGACCCGGUGGU	939
GGACGACGGGUCCUUCU	244	GGACGACGGGUCCUUCU	244	AGAAAAGGACCCGGUGGU	940
CCGGAAUUGCAGGAGCAG	245	CCGGAAUUGCAGGAGCAG	245	GUCCGUCCUGGCAUUCGG	941
ACACCGGGAAUUGCAGGAC	246	ACACCGGGAAUUGCAGGAC	246	GUCCUGGGAAUUCGGUGU	942

【0380】

【表12】

ACCGGAAUUGCCAGGACGA	247	ACCGGAAUUGCCAGGACGA	247	UCGUCCUGGCCAUUCCGGU	943
CGGAAUUGCCAGGACCC	248	CGGAAUUGCCAGGACCC	248	GGUCCUGGCCAUUCCGG	944
GGAAUUGCCAGGACCG	249	GGAAUUGCCAGGACCG	249	CGGUCCUGGCCAUUCCGG	945
CACCGGAAUUGCCAGGACG	250	CACCGGAAUUGCCAGGACG	250	CGUCCUGGCCAUUCCGGGG	946
CCCCAGGUUGGGUGUGCGC	251	CCCCAGGUUGGGUGUGCGC	251	GCGCACACCCAAACCCUGGG	947
GAUCGUUGGGAGUUAC	252	GAUCGUUGGGAGUUAC	252	GUAAACUCCACCAACGAUC	948
CAGAUCGUUGGGAGUUU	253	CAGAUCGUUGGGAGUUU	253	AAACUCACCAACGAUCUG	949
AGAUUCGUUGGGAGUUU	254	AGAUUCGUUGGGAGUUU	254	AAAUCUCCACCAACGAUCU	950
CCAGGUUGGGUGUGCGCG	255	CCAGGUUGGGUGUGCGCG	255	CGCGCACACCCAAACCCUGGG	951
CCAGGUUGGGUGUGCGCG	256	CCAGGUUGGGUGUGCGCG	256	GCGGCAACACCCAAACUGG	952
AGGUUGGGUGUGCGCGA	257	AGGUUGGGUGUGCGCGA	257	UCGCGGCGCACACCCAAACCU	953
CAGGUUGGGUGUGCGCG	258	CAGGUUGGGUGUGCGCG	258	CGGCGGCGCACACCCAAACUG	954
GGUUGGGUGUGCGCGAC	259	GGUUGGGUGUGCGCGAC	259	GUUCGCGGCGCACACCCAAACC	955
GAAAAACCAAACGUAAAC	260	GAAAAACCAAACGUAAAC	260	GUGUACGUUUUGGUUUUUC	956
AGAAAAAACCAAACGUAAACA	261	AGAAAAAACCAAACGUAAACA	261	UGUUAUCGUUUUGGUUUUCU	957
AACCAAACGUAAACCAAC	262	AACCAAACGUAAACCAAC	262	GUUGGGGUUACGUUUUGGUU	958
AAAGAAAAACCAAACGUAA	263	AAAGAAAAACCAAACGUAA	263	UUACGUUUUGGUUUUUCUUU	959
AAAAACCAAACGUAAACACC	264	AAAAACCAAACGUAAACACC	264	GGGUUACGUUUUGGUUUU	960
AGAAAAAACCAAACGUAC	265	AGAAAAAACCAAACGUAC	265	GUUACGUUUGGUUUUUCUU	961
CAAAGAAAAACCAAACGU	266	CAAAGAAAAACCAAACGU	266	UACGUUUGGUUUUUCUUUG	962
ACCCCCGGCGUAGGUUCGCG	267	ACCCCCGGCGUAGGUUCGCG	267	CGCGACCUACGCGGGGGGU	963
GACCCCCGGGUAGGUUCGC	268	GACCCCCGGGUAGGUUCGC	268	GCGACCUACGCGGGGGGU	964
CGUUAGUAGUAGUUCGUG	269	CGUUAGUAGUAGUUCGUG	269	CACGACACCUACUACUACG	965
GUUAGUAGUAGUUCGUGC	270	GUUAGUAGUAGUUCGUGC	270	GCACGACACCUACUACUAC	966
UUAGUAGUAGUUCGUGCA	271	UUAGUAGUAGUUCGUGCA	271	UGCACGACACCUACUACUAA	967
CCAAAACGUAAACACCG	272	CCAAAACGUAAACACCG	272	CGGUUUGGUUACGUUUUGG	968
ACCCAAAACGUAAACCAACC	273	ACCCAAAACGUAAACCAACC	273	GGUUGGGGUUACGUUUUGGU	969
UUGGGCGUGCCCCCGCGAG	274	UUGGGCGUGCCCCCGCGAG	274	CUCGGCGGGGGCACGCCCAA	970
AUUGGGCGUGCCCCCGCG	275	AUUGGGCGUGCCCCCGCG	275	CGCGGGGGGGCACGCCCAA	971
UUGGGCGUGCCCCCGCGA	276	UUGGGCGUGCCCCCGCGA	276	UCGCGGGGGGGCACGCCCAA	972
AAACCAAACGUAAACCCAA	277	AAACCAAACGUAAACCCAA	277	UGGGGUUACGUUUUGGUU	973
UGGGCGUGCCCCGGGAGA	278	UGGGCGUGCCCCGGGAGA	278	UCUGGGGGGGGGCACGCCCAA	974
GUAGAGAUUCGUUGGGAGU	279	GUAGAGAUUCGUUGGGAGU	279	ACUCCACCAACGAUCUGAC	975
GUUGUCGUUGGCAGCCUCCAGG	280	GUUGUCGUUGGCAGCCUCCAGG	280	CCUGGAGGGCUGCACGACAC	976
GUUCAGAUUCGUUGGGAG	281	GUUCAGAUUCGUUGGGAG	281	CUCACCAACGAUCUGAC	977
AGUGUCGUUGGCAGCCUCCAG	282	AGUGUCGUUGGCAGCCUCCAG	282	CUGGAGGGCUGCACGACACU	978

【0 3 8 1】

【表13】

GAGUGUCCGUGGCCUCCA	283	GAGUGUCCGUGGCCUCCA	283	UGGAGGCCUGGCACACUC	979
UCGUAGACCGUGGCCAUG	284	UCGUAGACCGUGGCCAUG	284	CAUGGUCCGUGGCCUACGA	980
GACCGUGGCCAACUGAGCAC	285	GACCGUGGCCAACUGAGCAC	285	GUGCUCAUGGUCCAGGGUC	981
AQUAUGAGUGUGUGCCAGC	286	AQUAUGAGUGUGUGCCAGC	286	GCUGCACGACACUCAUACU	982
UAGUAUGAGUGUGCCAGC	287	UAGUAUGAGUGUGCCAGC	287	CUGCACGACACUCAUACU	983
UCAGAUCCGUGGGAGUU	288	UCAGAUCCGUGGGAGUU	288	AACUCCACCAACGAUCUGA	984
AGACCGUGGCCAACUGAGCA	289	AGACCGUGGCCAACUGAGCA	289	UGCUCAUGGUCCAGGGUCU	985
AAAACCAACGUAAACCCA	290	AAAACCAACGUAAACCCA	290	UGGUGUACGUUUGGUUUU	986
GUAGACCCGUGGCACOUGAG	291	GUAGACCCGUGGCACOUGAG	291	CUCAUGGUCCAGGGUCUAC	987
CUCGUAGACCGUGGCCAU	292	CUCGUAGACCGUGGCCAU	292	AUGGUGUCCAGGGUCUACGAG	988
CGUAGACCCGUGGCCAUGA	293	CGUAGACCCGUGGCCAUGA	293	UCAUGGUCCAGGGUCUACG	989
CCUGGGCUCAGCCCCGGUA	294	CCUGGGCUCAGCCCCGGUA	294	UACCCGGGUGAGGCCAGG	990
UAGACCGUGGCCAACUGAGC	295	UAGACCGUGGCCAACUGAGC	295	GCUCAUGGUCCACGGUCUA	991
GGUCUCGUAGACCGUGCCAC	296	GGUCUCGUAGACCGUGCCAC	296	GUGGACGGGUCCUACGAGACC	992
UCUCGUAGACCGUGCCACCA	297	UCUCGUAGACCGUGCCACCA	297	UGGUGUCCAGGGUCUACGAGA	993
GUUCGUAGACCGUGGCC	298	GUUCGUAGACCGUGGCC	298	GGUGGCACGGGUCCUACGAGAC	994
UUGGGUAAAGGUCAUCGUA	299	UUGGGUAAAGGUCAUCGUA	299	UAUCGAUGGACCUUACCCAA	995
UCGCCGACCUCAUGGGUA	300	UCGCCGACCUCAUGGGUA	300	UACCCCAUGGGUCCGGCGA	996
CCUCAAAGAAAAACCAAC	301	CCUCAAAGAAAAACCAAC	301	GUUUGGUUUUUCUJUUGAGG	997
GGGGCGUGCCCCCGCGAGAC	302	GGGGCGUGCCCCCGCGAGAC	302	GUCUCGGGGGGGACGGCCC	998
GGAUAGAACCGGGCUGAUAGC	303	GGAUAGAACCGGGCUGAUAGC	303	GCUAUCAGGGGUUCAUCC	999
UGGAUGAACCCGGCUGAUAG	304	UGGAUGAACCCGGCUGAUAG	304	CUAUCAGGGGUUCAUCCA	1000
CUCAAAGAAAAACCAAC	305	CUCAAAGAAAAACCAAC	305	CGUUUUGGUUUUUCUJUUGAG	1001
AGGAAGAGACUUCGGAGCGGU	306	AGGAAGAGACUUCGGAGCGGU	306	ACCGCUCGGAAAGGUCCU	1002
UCAAAGAAAAACCAACGU	307	UCAAAGAAAAACCAACGU	307	ACGUUUGGUUUUUCUJUUGA	1003
GGAAGACUUCGGAGCGGU	308	GGAAGACUUCGGAGCGGU	308	GACCGCUCGGAAAGGUCCU	1004
CGCCGACCUCAUGGGGUAC	309	CGCCGACCUCAUGGGGUAC	309	GUACCCCAUGGAGGUCCGG	1005
CUUCCGAGGGGUCCAAAC	310	CUUCCGAGGGGUCCAAAC	310	GGUUGCGACCGCUCCGGAAAG	1006
GGCGUGCCCCGGAGACU	311	GGCGUGCCCCGGAGACU	311	AGUCUGCGGGGGCACGCC	1007
UAUGAGUGUCGUGCAAGCU	312	UAUGAGUGUCGUGCAAGCU	312	AGGCUGCACGACACUCAUA	1008
UGCCCCGGCAGACUGCUA	313	UGCCCCGGCAGACUGCUA	313	UAGCAGUCUCGGGGGGCA	1009
CGAGACUGCUAGCCAGUA	314	CGAGACUGCUAGCCAGUA	314	UACUCCGGCUAGCAGUCU	1010
UGAGUGUGUGCCGUCC	315	UGAGUGUGUGCCGUCC	315	GGAGGGCUGCCACGACACUCA	1011
GCCCCCGGGAGACUGCUAG	316	GCCCCCGGGAGACUGCUAG	316	CUAGCAGUCUCGGGGGGC	1012
AGAGACUGCUAGCCAGUA	317	AGAGACUGCUAGCCAGUA	317	CUACUCGGCUAGCAGUCU	1013
CCCCCGGGAGACUGCUAGC	318	CCCCCGGGAGACUGCUAGC	318	GUAGCAGUCUCGGGGGG	1014

【表14】

CGCGAGACUGCUAGCGAG	319	CGCGAGACUGCUAGGCCGAG	319	CUCGGCUAGCAGUCUCGGCG	1015
GUAIUGAUGUUCGGCAGCC	320	GUAIUGAUGUUCGGCAGCC	320	GGCUUGCAAGCAGACCUAUAC	1016
AUGAGUGUGUGUGCAGCCUC	321	AUGAGUGUGUGUGCAGCCUC	321	GAGGCUUGCAAGCAGACCUAU	1017
GCGAGACUGCUAGCCGAGU	322	GCGAGACUGCUAGCCGAGU	322	ACUCGGCUAGCAGUCUCGGC	1018
CCCCGGAGAGACUGCUAGCC	323	CCCCGGAGAGACUGCUAGCC	323	GGCUAGCAGUCUCGGGGGG	1019
CCCGGAGACUGCUAGCCGA	324	CCCGGAGACUGCUAGCCGA	324	UCGGCUAGCAGUCUCGGGG	1020
CCCGGAGACUGCUAGCCCG	325	CCCGGAGACUGCUAGCCCG	325	CGGCUAGCAGUCUCGGGG	1021
GGGUGGCCCGCGAGACUG	326	GGGUGGCCCGCGAGACUG	326	CAGUCUUCGGGGGGCACGC	1022
GACCCCCCUCCCCGGAGA	327	GACCCCCCUCCCCGGAGA	327	UCUCCCCGGAGGGGGGUUC	1023
CGGGGUCCCCUUGGAUCA	328	CGGGGUCCCCUUGGAUCA	328	UGAUCCCAAGAAGGACCCG	1024
GUGCCCCCGCGAGACUGCU	329	GUGCCCCCGCGAGACUGCU	329	AGCAGUCUCGGGGGGCAC	1025
CGUGCCCCCGCGAGACUGC	330	CGUGCCCCCGCGAGACUGC	330	GCAGUCUCGGGGGGCACG	1026
UUCGCCGACCUAUGGGGU	331	UUCGCCGACCUAUGGGGU	331	ACCCCAUGAGGUUCGGGGGAA	1027
CGCCCAACAGGACGUCAAGU	332	CGCCCAACAGGACGUCAAGU	332	ACUUGACGUCCUGGGGGCG	1028
GCCCACAGGACGUCAAGUU	333	GCCCACAGGACGUCAAGUU	333	AAUCUUGACGUCCUGGGGGC	1029
ACCCCCCUCCCCGGAGAG	334	ACCCCCCUCCCCGGAGAG	334	CUCUCCCCGGAGGGGGGUU	1030
GGACCCCCCUCCCCGGAG	335	GGACCCCCCUCCCCGGAG	335	CUCCCGGGAGGGGGGUUC	1031
CGGGGUCCCCUUGGAUC	336	CGGGGUCCCCUUGGAUC	336	GAUCCAAGAAAAGGACCCGG	1032
CAGGACCCCCCUCCCGGG	337	CAGGACCCCCCUCCCGGG	337	CCCGGGAGGGGGGUUCUG	1033
AGGACGUCAAGUUCGGGG	338	AGGACGUCAAGUUCGGGG	338	CCCGGGAAACUUGACGUCCU	1034
AGGACCCCCCUCCCGGG	339	AGGACCCCCCUCCCGGG	339	UCCCGGGAGGGGGGUUCU	1035
CACAGGGACGUCAAGUUC	340	CACAGGGACGUCAAGUUC	340	GGAAACUUGACGUCCUGGG	1036
CAGGACGUCAAGUUCGG	341	CAGGACGUCAAGUUCGG	341	CGGGGAACUUGACGUCCUG	1037
ACAGGACGUCAAGUUCGG	342	ACAGGACGUCAAGUUCGG	342	CGGGAAACUUGACGUCCUGU	1038
CACAGGACGUCAAGUUC	343	CACAGGACGUCAAGUUC	343	GGGAACUUGACGUCCUGUG	1039
CAGUGGAUGAACCGGCUA	344	CAGUGGAUGAACCGGCUA	344	UCAGGCCGUUCAUCCACUG	1040
GGGCUCAAGCCCCGGUACU	345	GGGCUCAAGCCCCGGUACU	345	GGGUACCCGGGUAGGCC	1041
CCGAGCGGGGUCAACCUC	346	CCGAGCGGGGUCAACCUC	346	CGAGGGUUGCGACCGCUCGG	1042
CUGGGCUAGCCCCGGUAC	347	CUGGGCUAGCCCCGGUAC	347	GUACCCGGGUAGGCCAG	1043
AGUGGAUGAACCGGCUAU	348	AGUGGAUGAACCGGCUAU	348	AUCAGGCCGUUCAUCCACU	1044
UCCGAGGGGUUGCAACCUC	349	UCCGAGGGGUUGCAACCUC	349	GAGGUUGCGACCGCUCGG	1045
UGGGCUAGCCCCGGUAC	350	UGGGCUAGCCCCGGUAC	350	GGUACCCGGGUAGGCCA	1046
GGUACCCUUGGCCCUUA	351	GGUACCCUUGGCCCUUA	351	UAGAGGGGGCAAGGGGUACC	1047
UCCGAGGGGUUGCAACC	352	UCCGAGGGGUUGCAACC	352	AGGUUGCGACCGCUCGGAA	1048
GGGUACCCUUGGCCCUU	353	GGGUACCCUUGGCCCUU	353	AGAGGGGGCAAGGGGUACCC	1049
GGGUACCCUUCUUGGAUCA	354	GGGUACCCUUCUUGGAUCA	354	UUGAUCCAAGAAAAGGACCC	1050

【0 3 8 3】

【表15】

CCCACAGGACGUCAAGUUC	355	CCCACAGGACGUCAAGUUC	355	GAACUUUAGCUCUCUGGGG	1051
GGUUGGCUUUUCUCAUCU	356	GGUUGGCUUUUCUCAUCU	356	AGAUAGAGAAAAGGAAACC	1052
GUUGGCAGGAUGGUCCUG	357	GUUGGCAGGAUGGUCCUG	357	CAGGAGGCCAUCUGGCCAC	1053
GUUGGGCAGGAUGGUCCU	358	GUUGGGCAGGAUGGUCCU	358	AGGAGGCCAUCUGGCCAC	1054
GUUGCUUUUCUCAUCUU	359	GUUGCUUUUCUCAUCUU	359	AGAUAGAGAAAAGGAAAC	1055
GUUGAUGAACCGGGUGAUA	360	GUUGAUGAACCGGGUGAUA	360	UAUCAGCCGGGUUCAUCCAC	1056
CCAGGACCCCCUCCGG	361	CCAGGACCCCCUCCGG	361	CCGGGAGGGGGGUCCUGG	1057
GGGUGGGCAGGAUGGUCC	362	GGGUGGGCAGGAUGGUCC	362	GGAGGCCAUCUGGCCACCC	1058
CUUCACGGAGGGCUAUGACU	363	CUUCACGGAGGGCUAUGACU	363	AGUCAUAGCCUCGGUGAAG	1059
ACCGGCCGCCACAGGACGU	364	ACCGGCCGCCACAGGACGU	364	ACGUCCUGGGGGGGGGGGGU	1060
UCCAGGACCCCCUCCCG	365	UCCAGGACCCCCUCCCG	365	CGGGAGGGGGGUCCUGGA	1061
AUAUAGAUGAUGAACGGUC	366	AUAUAGAUGAUGAACGGUC	366	GACCAGUUCAUCAUCAUAU	1062
UUCACGGAGGGCUAUGACUA	367	UUCACGGAGGGCUAUGACUA	367	UAGUCAUAGCCUCGGUGAA	1063
UCACGGAGGGCUAUGACUAG	368	UCACGGAGGGCUAUGACUAG	368	CUAGUCAUAGCCUCGGUGA	1064
AUGAACCGGGCUGAUGCGU	369	AUGAACCGGGCUGAUGCGU	369	ACGCUCAUCAGCCGGGUUCAU	1065
GGGAUUAUGAUGAACUG	370	GGGAUUAUGAUGAACUG	370	CAGUUCAUCAUCAUAUCCC	1066
UGCAGUGGAUGAACCGGU	371	UGCAGUGGAUGAACCGGU	371	AGCCGGGUUCAUCACUGCA	1067
GUUCAGUGGAUGAACCGGC	372	GUUCAGUGGAUGAACCGGC	372	GCCGGGUUCAUCACUGCAC	1068
UGAACCCGGCUGAUGCGUU	373	UGAACCCGGCUGAUGCGUU	373	AACGCUAUACAGCCGGGUUCA	1069
GGAUUAUGAUGAACUGG	374	GGAUUAUGAUGAACUGG	374	CCAGUUCAUCAUCAUAUCC	1070
GCUCUUUCUCAUCUCCU	375	GCUCUUUCUCAUCUCCU	375	AGGAAGAUAGAGAAAGAGC	1071
GGGGGGGACACUCCACAU	376	GGGGGGGACACUCCACAU	376	AUGGUGGAGUGUGUGGGCCCC	1072
GAUGAACCGGGCUGAUGCG	377	GAUGAACCGGGCUGAUGCG	377	CGCUAUACAGCCGGGUUCAUC	1073
GAUAUAGAUGAUGAACUGGU	378	GAUAUAGAUGAUGAACUGGU	378	ACCAGUUCAUCAUCAUAC	1074
UGGGAUUAUGAUGAACU	379	UGGGAUUAUGAUGAACU	379	AGUUCAUCAUCAUAUCCCA	1075
UGGCUCUUUCUCAUCUUC	380	UGGCUCUUUCUCAUCUUC	380	GAAGAUAGAGAAAAGAGCAA	1076
UGGGGGGACACUCCACCA	381	UGGGGGGACACUCCACCA	381	UGGUGGGAGUGUGGCCCA	1077
UGCUCUUUCUCAUCUCC	382	UGCUCUUUCUCAUCUCC	382	GGAAAGAUAGAGAAAAGAGCA	1078
GUCCUUUCUUGGAUCAAC	383	GUCCUUUCUUGGAUCAAC	383	GUUGAUCCAAGAAAAGGACC	1079
AAGACUUUCGAGGGUGCG	384	AAGACUUUCGAGGGUGCG	384	GCGACCGGCUCGGGAAGUCUU	1080
AGCCGGGGUACCCUUGGCC	385	AGCCGGGGUACCCUUGGCC	385	GGCCAAGGGGUACCCGGGCC	1081
UUUCUUGGAUCAACCGGU	386	UUUCUUGGAUCAACCGGU	386	AGCGGGGUUGAUCCAAGAAA	1082
CAGCCGGGUACCCUUGGC	387	CAGCCGGGUACCCUUGGC	387	GCCAAGGGGUACCCGGGCCUG	1083
AGACUUUCGAGGGUGCGCA	388	AGACUUUCGAGGGUGCGCA	388	UGCGACCGGCUCGGGAAGUCU	1084
UUCUUGGAUCAACCGCUC	389	UUCUUGGAUCAACCGCUC	389	GAGCGGGGUUGAUCCAAGAAA	1085
CCGGGGUACCCUUGGCC	390	CCGGGGUACCCUUGGCC	390	GGGGCCAAAGGGUACCCGGG	1086

【0 3 8 4】

40

10

20

30

【表16】

GUCCCCUJGGGAUCAACC	391	GUCCUUUUUJGGGAUCAACC	391	GGUUGAUCCAAGAAAGGAC	1087
CUUUUUJGGGAUCAACCCG	392	CUUUUUJGGGAUCAACCCG	392	GGGGGUJUGAUCCAAGAAAG	1088
CCUUUUJGGGAUCAACCCG	393	CCUUUUJGGGAUCAACCCG	393	CGGGUJUGAUCCAAGAAAGG	1089
UCCUUUJGGGAUCAACCC	394	UCCUUUJGGGAUCAACCC	394	GGGUUGAUCCAAGAAAGGA	1090
AAGUUCCCCGGGGGGGUC	395	AAGUUCCCCGGGGGGGUC	395	GACCACGCCGGGAACUU	1091
GCAGUGGGGAUCAACGGGCG	396	GCAGUGGGGAUCAACGGGCG	396	CAGCGGUUCAUCCACUGC	1092
CCGGGUACCCUUGGGCCU	397	CCGGGUACCCUUGGGCCU	397	AGGGGCAAGGGGUACCCGG	1093
AGUUCCCCGGGGGGGUCA	398	AGUUCCCCGGGGGGGUCA	398	UGACCAACCGGGGGGAACU	1094
CUUGGAUCAACCCGGCUAA	399	CUUGGAUCAACCCGGCUAA	399	UUGAGGGGUUGAUCCAAG	1095
GGAUCAACCCGGCUAAUGC	400	GGAUCAACCCGGCUAAUGC	400	GCAUUGAGGGGUUGUAUCC	1096
ACUUCCGAGGGGUUCGCAAC	401	ACUUCCGAGGGGUUCGCAAC	401	GUUGCGACCGCUUGGGAAAGU	1097
UCUUGGAUCAACCCGGCUA	402	UCUUGGAUCAACCCGGCUA	402	UGAGGGGUUGAUCCAAGA	1098
UUGGAUCAACCCGGCUAAU	403	UUGGAUCAACCCGGCUAAU	403	AUUGAGGGGUUGAUCCAAGA	1099
AACCGCCGCCACAGGACG	404	AACCGCCGCCACAGGACG	404	CGUCCUGUGGGGGGGGUU	1100
GCGUGAAUCAUAGCAACAGG	405	GCGUGAAUCAUAGCAACAGG	405	CCUGUUGCAUAGUUCACGC	1101
AUCAACCCGGCUAAUGCCU	406	AUCAACCCGGCUAAUGCCU	406	AGGCAUJAGGGGGGUUGAU	1102
GAUCAACCCGGCUAAUGCC	407	GAUCAACCCGGCUAAUGCC	407	GGCAUJAGGGGGGUUGAU	1103
CAACCCGGCUAAUGCCUGG	408	CAACCCGGCUAAUGCCUGG	408	CCAGGCAUJAGGGGGGUJG	1104
GCUUUCGGGACCUAUGGG	409	GCUUUCGGGACCUAUGGG	409	CCCAUAGGGGUUGGGCGAAGC	1105
GACUUUCGGGACCUAUGGCAA	410	GACUUUCGGGACCUAUGGCAA	410	UUGCGACCCGGCUUGGGAGUC	1106
UCAACCCGGCUAAUGCCUG	411	UCAACCCGGCUAAUGCCUG	411	CAGGGCAUJAGGGGGGUJGA	1107
GCCUUUCGGGACCUAUGGG	412	GCCUUUCGGGACCUAUGGG	412	CCAUGAGGGGUUGGGGAAGGCC	1108
UGGAUCAACCCGGCUAAUG	413	UGGAUCAACCCGGCUAAUG	413	CAUUGAGGGGGGUUGAUCCA	1109
CGGGGGGGGUCAAGAUCGU	414	CGGGGGGGGUCAAGAUCGU	414	ACGAUCUGACCCACGCCCG	1110
CUUGGCCCUAUGGCAA	415	CUUGGCCCUAUGGCAA	415	UUGCCAUJAGGGGGCCAAG	1111
CGGGGGGGGUCAAGAUCG	416	CGGGGGGGGUCAAGAUCG	416	CGAUCUGACCCGCCCGG	1112
UGGGGGGGGGCAGGAUGGC	417	UGGGGGGGGGCAGGAUGGC	417	AGCCAUCUJAGGGGCCACCA	1113
GGAGGUUJACCUGUACCGC	418	GGAGGUUJACCUGUACCGC	418	GGGGCAACAGGUAAACUCC	1114
CCUUGGGCCCCCUAUGGCA	419	CCUUGGGCCCCCUAUGGCA	419	UGCCAUJAGGGGGCCAAGG	1115
GUGGAGGUUACCUGUUGCC	420	GUGGAGGUUACCUGUUGCC	420	GGCAACAGGUAAACUCCAC	1116
GGUGGAGGUUACCUGUUGC	421	GGUGGAGGUUACCUGUUGC	421	GCAACAGGUAAACUCCAC	1117
UUCCCGGGGGGGUUGCAGA	422	UUCCCGGGGGGGUUGCAGA	422	UCUGACACCCGGGGGGAA	1118
UGAACUAUGGCAACAGGGAA	423	UGAACUAUGGCAACAGGGAA	423	UUCCGUGGUUGCAUJGUUCA	1119
AGUUUACCUJGUUGCCGCC	424	AGUUUACCUJGUUGCCGCC	424	GCGGGGGCAACAGGUAAACU	1120
GUGAACUAUGGCAACAGGGAA	425	GUGAACUAUGGCAACAGGGAA	425	UCCUGUUGCAUJGUUCA	1121
UUACCUGUUGCCGCCAGG	426	UUACCUGUUGCCGCCAGG	426	CCUGCGGGCAACAGGUAA	1122

【表17】

UCCGGGGGGGUUCAGAU	427	UCCCGGGGGGUUCAGAU	427	AUCUGACCACCGCCCCGGGA	1123
GUUCCCGGGGGGUUCAG	428	GUUCCCGGGGGGUUCAG	428	CUGACCAACCGCCCCGGGAAC	1124
GCCCGGGGUACCCUUGGCC	429	GCCCGGGGUACCCUUGGCC	429	GGGCCAAGGGGUACCCGGGC	1125
AAGGAGAUGAAGGGCAAGG	430	AAGGAGAUGAAGGGCAAGG	430	CCUUCGCCUUCAUCUCCUU	1126
AGGAGAUGAAGGGCAAGGC	431	AGGAGAUGAAGGGCAAGGC	431	GCCUUUCGCCUUCAUCUCCUU	1127
GUUACCUGUUGCCGGCA	432	GUUACCUGUUGCCGGCA	432	UGCGGGCAACAGGUAAAC	1128
CUGUUGCCGGCAGGGCC	433	CUGUUGCCGGCAGGGCC	433	GGCCCUUGCCGCGCAACAG	1129
ACACCAACCGGCCAC	434	ACACCAACCGGCCAC	434	GUGGGGGGGGUUGGGGUU	1130
GAGUUUACCUUGCCGG	435	GAGUUUACCUUGCCGG	435	CGGGGCAACAGGUAAACUC	1131
UUUACCUGUUGCCGGCAG	436	UUUACCUGUUGCCGGCAG	436	CUGCGGGCAACAGGUAAA	1132
GGGGGGGGCAGGAUGGCUC	437	GGGGGGGGCAGGAUGGCUC	437	GAGCCAUCCUGCCACCCC	1133
GAAGACGUUCCGAGGGUCG	438	GAAGACGUUCCGAGGGUCG	438	CGACCCGUCCGGAAAGGUUC	1134
ACCUGUUGCCGCAAGGG	439	ACCUGUUGCCGCAAGGG	439	CCCGUGGGGGCAACAGGU	1135
UACCUGUUGCCGCAAGGG	440	UACCUGUUGCCGCAAGGG	440	CCCUUGCCGGCAACAGGU	1136
UACCUUUCAACUGGGCAG	441	UACCUUUCAACUGGGCAG	441	CUGCCOAGUUGAAGGGUA	1137
CGUGAACUAUGCAACAGGG	442	CGUGAACUAUGCAACAGGG	442	CCCUGUUGCAUAGGUUCACG	1138
ACACCAACCGGCCACACA	443	ACACCAACCGGCCACACA	443	UGUGGGGGGGGUUGGGGU	1139
CCCGGGCGGGGUUCAGAU	444	CCCGGGCGGGGUUCAGAU	444	GAUCUGACCCGCCGGG	1140
ACCUUUCAACUGGGCAGU	445	ACCUUUCAACUGGGCAGU	445	ACUGCCAGUUGAAGAGGU	1141
CUUCGCCGACCUUGGG	446	CUUCGCCGACCUUGGG	446	CCCCAUGAGGGUUGGGGAAG	1142
CCUGUUGCCGCGACGGGC	447	CCUGUUGCCGCGACGGGC	447	GCCCCUGGGGGCAACAGG	1143
CCAACCGGGCCACAGGA	448	CCAACCGGGCCACAGGA	448	UCCUGUGGGGGGGGUUGGG	1144
ACCAACCGGCCACAGG	449	ACCAACCGGCCACAGG	449	CCUGUGGGGGGGGUUGGU	1145
UGGAGUUUACCUUGGCC	450	UGGAGUUUACCUUGGCC	450	CGGCAACAGGUAAACUCCA	1146
CACCAACCGGCCACAG	451	CACCAACCGGCCACAG	451	CUGUGGGGGGGGUUGGGUG	1147
CAAACGUACACCAACCGC	452	CAAACGUACACCAACCGC	452	CGGGGUUGGGGUUACGUUUG	1148
CAAGCGGAGACGGCUUGGAG	453	CAAGCGGAGACGGCUUGGAG	453	CUCCAGCCGUCUCCGUUG	1149
ACGGAGGGCUAUGACUAGGU	454	ACGGAGGGCUAUGACUAGGU	454	ACCUAGUCAUAGGCCUCGU	1150
UAACACCAACGGCCGCCA	455	UAACACCAACGGCCGCCA	455	UGGGCGGGGGGUUGGGGUUA	1151
AUCGUUGGGGGAGUUUACC	456	AUCGUUGGGGGAGUUUACC	456	GGUAAACUCCACCAACGAU	1152
GGGAGACAUUAUACACAGC	457	GGGAGACAUUAUACACAGC	457	GCUGUGAUUAUGGUUCCCC	1153
AACCUCGGGAAGGGGACA	458	AACCUCGGGAAGGGGACA	458	UGUGGGCCUCCACGGAGGU	1154
GGGGGAGACAUUAUACACA	459	GGGGGAGACAUUAUACACA	459	UGUGAUUAUGGUUCCCCC	1155
AACGUAAACACCAACGGCG	460	AACGUAAACACCAACGGCG	460	CGGGGGGUUGGGGUUACGUU	1156
AAACGUAAACACCAACGCC	461	AAACGUAAACACCAACGCC	461	GGGGGUUGGGGUUACGUU	1157
GGGGAGACAUUAUACACAG	462	GGGGAGACAUUAUACACAG	462	CUGUGAUUAUGGUUCCCCC	1158

【表18】

GAGAUGAAGGGCGAAGGGGU	463	GAGAUGAAGGGCGAAGGGGU	463	ACGCCUUCGCCUUCUCAUCUC	1159
AAGCGGGAGAACGGCGUGGAGC	464	AAGCGGGAGAACGGCGUGGAGC	464	GCUCAGGGCGUUCGGCGUU	1160
GUACCCUUGGCCCCUCUAU	465	GUACCCUUGGCCCCUCUAU	465	AUAGAGGGGCCAACGGGUAC	1161
CCUCCAGGACCCCCCUCC	466	CCUCCAGGACCCCCCUCC	466	GGAGGGGGGGGUCCUGGGAGG	1162
CUCCAGGACCCCCCUCC	467	CUCCAGGACCCCCCUCC	467	GGAGGGGGGGGUCCUGGGAGG	1163
UACCCUUGGCCCCUCUUAUG	468	UACCCUUGGCCCCUCUUAUG	468	CAUAGAGGGGCCAACGGGUAA	1164
CAACCUCUGGGAAAGGCGAC	469	CAACCUCUGGGAAAGGCGAC	469	GUCCGUUCUCCACGGGGUUG	1165
CGGAGGCUAUGACUAGGUAA	470	CGGAGGCUAUGACUAGGUAA	470	UACCUAGUAGCCUCUCCG	1166
GGAGAUGAAGGGCGAAGGGCG	471	GGAGAUGAAGGGCGAAGGGCG	471	CGCCUUCGCCUUCUCAUCUC	1167
AGAUGAAGGGCGAAGGGGUC	472	AGAUGAAGGGCGAAGGGGUC	472	GACGCCUUCGCCUUCUCAUCU	1168
GUAAACACCAACCGCGGCC	473	GUAAACACCAACCGCGGCC	473	GGGGGGGGGUUUGGGGUUAC	1169
CGUAAACACCAACCGCGCC	474	CGUAAACACCAACCGCGCC	474	GGGGGGGGGUUUGGGGUUAC	1170
ACGUAAACACCAACCGCGC	475	ACGUAAACACCAACCGCGC	475	GGGGGGGUUUGGGGUUACGU	1171
CACGGAGGGCUUAUGACUAGG	476	CACGGAGGGCUUAUGACUAGG	476	CCUAGUCAUAGCCUCCGUG	1172
GUUUGGGAGGUUACCUGUU	477	GUUUGGGAGGUUACCUGUU	477	ACAGGUAAACUCCACCAAC	1173
CGUUGGGAGGUUACCUUG	478	CGUUGGGAGGUUACCUUG	478	CAGGUAAACUCCACCAAC	1174
ACCCUUGGCCCCUCUUAUGG	479	ACCCUUGGCCCCUCUUAUGG	479	CCAUAGAGGGGCCAACGGGU	1175
UUGGUGGAGGUUACCUUU	480	UUGGUGGAGGUUACCUUU	480	AACAGGUAAACUCCACAA	1176
UGGUGGGAGGUUACCUUG	481	UGGUGGGAGGUUACCUUG	481	CAACAGGUAAACUCCACCA	1177
UCGUUGGGAGGUUACCU	482	UCGUUGGGAGGUUACCU	482	AGGUAAACUCCACCAACGA	1178
CGGGGUACCCUUGGCCCCUC	483	CGGGGUACCCUUGGCCCCUC	483	GAGGGGCCAACGGGUACCCG	1179
GGCUCAGGGGGGUACCCU	484	GGCUCAGGGGGGUACCCU	484	AGGGUACCCGGGCGUGAGGCC	1180
GAUCACUCCCCUGUGAGGA	485	GAUCACUCCCCUGUGAGGA	485	UCCUCACAGGGGAGAGUAUC	1181
GGUGGUCAUGGUUGGGUG	486	GGUGGUCAUGGUUGGGUG	486	CACCAACGAUCUGACCACC	1182
GAUGAAGGGCGAAGGGGUCC	487	GAUGAAGGGCGAAGGGGUCC	487	GGACGGCCUUCGCCUUCAUC	1183
AGGAUGGCUCUGUCACCC	488	AGGAUGGCUCUGUCACCC	488	GGGUUGACAGGGCCAUCCU	1184
CUCAGCCCCGGGUACCCUUG	489	CUCAGCCCCGGGUACCCUUG	489	CAAGGGGUACCCGGGGCUGAG	1185
UCAGCCCCGGGUACCCUUGG	490	UCAGCCCCGGGUACCCUUGG	490	CCAAGGGGUACCCGGGGCUGA	1186
AUGAAGGGCGAAGGGGUCCA	491	AUGAAGGGCGAAGGGGUCCA	491	UGGACGGCCUUCGCCUUCAU	1187
CGGGGGAGACAUUAUCAC	492	CGGGGGAGACAUUAUCAC	492	GUGAUUAUGGUUCUCCCCG	1188
CAGGAUGGCUCUGUCACCC	493	CAGGAUGGCUCUGUCACCC	493	GGUGACAGGGGCCAACCCUG	1189
UGAAGGGCGAAGGGGUCCAC	494	UGAAGGGCGAAGGGGUCCAC	494	GUGGACGGCCUUCGCCUUCA	1190
UGGUCAGAUCGUUGGGUGGA	495	UGGUCAGAUCGUUGGGUGGA	495	UCCACCAACGAUCUGACCA	1191
GCUCAGCCCCGGGUACCCUU	496	GCUCAGCCCCGGGUACCCUU	496	AAGGGGUACCCGGGCGUGAGC	1192
GUGGUCAUGGUUGGGUGG	497	GUGGUCAUGGUUGGGUGG	497	CCACCAACGAUCUGACCAC	1193
CAGCCUCCAGGACCCCCC	498	CAGCCUCCAGGACCCCCC	498	GGGGGGGUCCUGGGGGCUG	1194

【0 3 8 7】

40

10

20

30

【表19】

GGCGGUGGGUCAGAUCGUUG	499	GGCGGUGGGUCAGAUCGUUG	499	CAACGAUCUGACCACCGGCC	1195
GCCUCCAGGACCCCCUC	500	GCCUCCAGGACCCCCUC	500	GAGGGGGGUCCUGGGAGGC	1196
AACCGGCUGAUAGCGUUCG	501	AACCGGCUGAUAGCGUUCG	501	CGAACGUACAGCCGGUU	1197
AGCCUCCAGGACCCCCU	502	AGCCUCCAGGACCCCCU	502	AGGGGGGUCCUGGGAGGCC	1198
CGGCUUCGGGACCUCAUG	503	CGGCUUCGGGACCUCAUG	503	CAUGAGGUCCGGGAAGGCC	1199
GCGGAGACGGCUGGAGGC	504	GCGGAGACGGCUGGAGGC	504	GCGCUCAGCCGUCCUGGC	1200
UCAUGGGGUACAUCCGCU	505	UCAUGGGGUACAUCCGCU	505	AGCGGAUGGUACCCCCAUGA	1201
GAACCGGGUAGGUAUAGGUUC	506	GAACCGGGUAGGUAUAGGUUC	506	GAACGCUAUAGCCGGUUUC	1202
GCGGUGGUAGAUCGUUGG	507	GCGGUGGUAGAUCGUUGG	507	CCAACGAUCUGACCACCGC	1203
GGCAGGAUGGCUCGUCA	508	GGCAGGAUGGCUCGUCA	508	UGACAGGAGGCCAUCCUGCC	1204
GCAGGAUGGCUCGUCA	509	GCAGGAUGGCUCGUCA	509	GUGACAGGAGGCCAUCCUGC	1205
AUUUGGGUAAGGUCAUCGA	510	AUUUGGGUAAGGUCAUCGA	510	UCGAUGGUACCUUACCCAAAU	1206
ACCGGCUGAUAGCGUUCGC	511	ACCGGCUGAUAGCGUUCGC	511	GCGAACGCUAUAGCCGGU	1207
CGGAGACGGCUGGAGGC	512	CGGAGACGGCUGGAGGC	512	CGCGCUCCAGCCGUCCUGG	1208
GCGGCUUCGCCGACCUAU	513	GCGGCUUCGCCGACCUAU	513	AUGAGGUCCGGGAAGGCCG	1209
AAUUUGGGUAAGGUCAUCG	514	AAUUUGGGUAAGGUCAUCG	514	CGAUGGUCCUUACCCAAAU	1210
GGGGGGGGUGGUAGAUCGUU	515	GGGGGGGGUGGUAGAUCGUU	515	AACGAUCUGACCACCGGCC	1211
CAACCGGCCACAGGAC	516	CAACCGGCCACAGGAC	516	GUCCUGUGGGGGGGGUUG	1212
UGCGGCUUCGCCGACCUA	517	UGCGGCUUCGCCGACCUA	517	UGAGGUCCGGGAAGCCGCA	1213
CGGUGGUAGAUCGUUGGU	518	CGGUGGUAGAUCGUUGGU	518	ACCAACGAUCUGACCACCG	1214
UGGGUGUGGCCGCGACUA	519	UGGGUGUGGCCGCGACUA	519	UAGUCGGCGCGCACACCCAA	1215
GUGUGCGGGGACUAGGAA	520	GUGUGCGGGGACUAGGAA	520	UUCUAGUCGGCGGCACAC	1216
GAUGGCUCUGUCACCCG	521	GAUGGCUCUGUCACCCG	521	CGGGGGUGACAGGAGCCAU	1217
GGAUGGCUCUGUCACCC	522	GGAUGGCUCUGUCACCC	522	GGGGUGACAGGAGCCAU	1218
UGUGGGGGGACUAGGAA	523	UGUGGGGGGACUAGGAA	523	CUUCCUAGUCGGGGGACA	1219
UGGGUGUGGCCGACUAG	524	UGGGUGUGGCCGACUAG	524	CUAGUGGGCGGCACACCC	1220
GGUGUGGGGGGACUAGGA	525	GGUGUGGGGGGACUAGGA	525	UCCUAGUGGGGGCACACC	1221
GEGUGUGGGGACUAGG	526	GEGUGUGGGGACUAGG	526	CCUAGUGGGGGCACACC	1222
CCCGGGGUAGGGUCGCUA	527	CCCGGGGUAGGGUCGCUA	527	UACGGCGACCUACGCCGGG	1223
GAAGGGCGACAACCUAUCC	528	GAAGGGCGACAACCUAUCC	528	GGGAUAGGUUGGUCCUUU	1224
CCGGGGGUAGGGUCGCUA	529	CCGGGGGUAGGGUCGCUA	529	UJACGGCGACCUACGCCGGG	1225
AGCGGAGAGGGCUGGAGCG	530	AGCGGAGAGGGCUGGAGCG	530	CGCUCCAGCCGUCCCGCU	1226
CCCCGGGGGUAGGGUCGCU	531	CCCCGGGGGUAGGGUCGCU	531	ACCGGACCUACGCCGGGG	1227
AGGCAGAGGGGUCCACAGU	532	AGGCAGAGGGGUCCACAGU	532	ACUGUGGAGGCCUUCGCCU	1228
AAGGGCGAAAGGGGUCCACAG	533	AAGGGCGAAAGGGGUCCACAG	533	CUGUGGAGGCCUUCGCCU	1229
GUUGGGGUAGGGGGGACU	534	GUUGGGGUAGGGGGGACU	534	AGUGGGGUAGGGGGCACACCAAC	1230

【0 3 8 8】

40

10

20

30

【表20】

CUCAUGGGGUACAUUCCGC	535	CUCAUGGGGUACAUUCCGC	535	GCGGAAUGUACCCCAUGAG	1231
GGAAAGGGGACAACCUAUC	536	GGAAAGGGGACAACCUAUC	536	GGAUAGGUUGGUUGGCCUUCC	1232
GCAAGUUUCUUGCCGACGG	537	GCAAGUUUCUUGCCGACGG	537	CGUGGGCAAGGAACUUGC	1233
UGCAGCCUCCAGGACCCC	538	UGCAGCCUCCAGGACCCC	538	GGGGGUCCUGGGCUGCAGA	1234
GGACUGCAAGCAGUCUG	539	GGACUGCAAGCAGUCUG	539	CACGAGCAUCUGGAGAGUCC	1235
GAAGGGCGAAGGGGUCCACA	540	GAAGGGCGAAGGGGUCCACA	540	UGGGGACGCCUUCGCCUUUC	1236
GCAACCUCUGGGAAAGGCGA	541	GCAACCUCUGGGAAAGGCGA	541	UGCCCUUCCACGAGGUUGC	1237
GACGCCGGGCUUGGUUGGU	542	GACGCCGGGCUUGGUUGGU	542	ACCAAGCACAGCCCGCGUC	1238
ACGCCGGGCUUGGUUGGU	543	ACGCCGGGCUUGGUUGGU	543	UACCAAGCACAGCCCGCGU	1239
GUGCAGCCUCCAGGACCCC	544	GUGCAGCCUCCAGGACCCC	544	GGGGGUCCUGGGCUGGCAC	1240
GCAGCCUCCAGGACCCC	545	GCAGCCUCCAGGACCCC	545	GGGGGUCCUGGGCUGCUC	1241
CGCAACCUCUGGGAAAGGCG	546	CGCAACCUCUGGGAAAGGCG	546	CGCCUUCCACGAGGUUGC	1242
UGUCGUGCAAGCCUCAGGA	547	UGUCGUGCAAGCCUCAGGA	547	UCCUGGAGGGCUGCAGGACA	1243
AUGGGUUGGGAUAGAUGA	548	AUGGGUUGGGAUAGAUGA	548	UCAUCAUAUCCCAAGCCAU	1244
CUUUGGAUAGAUGAUGAA	549	CUUUGGAUAGAUGAUGAA	549	UICAUCAUAUCCCAAGCCAU	1245
CCCUUUGGCCCUAUGGC	550	CCCUUUGGCCCUAUGGC	550	GCCAUUAUGGGGCCAACGG	1246
UGGCUUGGGAUAGAUGAU	551	UGGCUUGGGAUAGAUGAU	551	AUCAUCAUAUCCCAAGCCA	1247
CUGUGCAUGGAAGAACCG	552	CUGUGCAUGGAAGAACCG	552	CGGUUCAUCCACUGCACAG	1248
AUGACGCCGGCUGGUUG	553	AUGACGCCGGCUGGUUG	553	CAAGCACAGCCCGGUCAU	1249
GCUUUGGGAUAGAUGA	554	GCUUUGGGAUAGAUGA	554	UCAUCAUAUCCCAAGGC	1250
UAUGACGCCGGCUGGUUU	555	UAUGACGCCGGCUGGUUU	555	AAGCACAGCCCGGUCAU	1251
UGACGCCGGCUGGUUGG	556	UGACGCCGGCUGGUUGG	556	CCAAGCACAGCCCGGUCA	1252
GCGUUUGGGAUAGAUGAUG	557	GCGUUUGGGAUAGAUGAUG	557	CAUCAUCAUAUCCCAAGCC	1253
UGUGCAUGGAUGAACCGG	558	UGUGCAUGGAUGAACCGG	558	CGGGGUCAUCCACUGGCCAC	1254
GCUGUGCAUGGAAGAAC	559	GCUGUGCAUGGAAGAAC	559	GGUUCAUCCACUGCACAGC	1255
CUCUUCAACUGGGCAGUAA	560	CUCUUCAACUGGGCAGUAA	560	UUACUGGCCAGUUGAAGAG	1256
CCUCGUGGAAGGGACAAC	561	CCUCGUGGAAGGGACAAC	561	GUUGUGGCCUUCACGAGG	1257
UGUGUCACCCAGACAGUC	562	UGUGUCACCCAGACAGUC	562	CGACUGUCUGGGUGGACACA	1258
GCGGUGAACUAGCAACAG	563	GCGGUGAACUAGCAACAG	563	CUGUUGCAUAGUUCACGCC	1259
CGGCUGAACUAGCAACA	564	CGGCUGAACUAGCAACA	564	UGUUGCAUAGUUCACGCC	1260
GUGUCACCCAGACAGUC	565	GUGUCACCCAGACAGUC	565	UCGACUGUCUGGGUGGACAC	1261
CCUCUUCUACUGGGCAGUA	566	CCUCUUCUACUGGGCAGUA	566	UACUGGCCAGUUGAAGAGG	1262
CGUGGAAGGGCAGAACUA	567	CGUGGAAGGGCAGAACUA	567	UAGGUUGUGGCCUUCACG	1263
UCGUGGAAGGGCAGAACU	568	UCGUGGAAGGGCAGAACU	568	AGGUUGUGGCCUUCACG	1264
CGGCCUAGGUUGGGCCCA	569	CGGCCUAGGUUGGGCCCA	569	UGGGGCCAACUAGGCCG	1265
CGACUAGGAAGACUCCGA	570	CGACUAGGAAGACUCCGA	570	UCGGAAGGUUCUCCUAGUC	1266

【0 3 8 9】

【表21】

UUUGGGUAGGUCAUCGAU	571	UUUGGGUAGGUCAUCGAU	571	AUCGAUGACCUUACCCAAA	1267
GUGGAAGGGGAGACAACUAU	572	GUGGAAGGGGAGACAACUAU	572	AUAGGGUUGUOGGCUUCCGAC	1268
ACCUUCGGGAGGGGACAA	573	ACCUUCGGGAGGGGACAA	573	UUGUCGCCUUCGAGGU	1269
GCGACUAGGAAGACUUCGG	574	GCGACUAGGAAGACUUCGG	574	CGGAAGGUUCUAGUGUCGC	1270
GUCCGUGGAGGCCUCCAGGAC	575	GUCCGUGGAGGCCUCCAGGAC	575	GUCCUGGGAGGCUGACGAC	1271
UAGGAAGACUUCGGAGGG	576	UAGGAAGACUUCGGAGGG	576	CGGCUCGGGAAGGUUCUCCUA	1272
ACGGCGGUGAACUUAUGCAAC	577	ACGGCGGUGAACUUAUGCAAC	577	GUUGCAUAGGUUCAGGCCGU	1273
CUCGUGGAAGGGGAGACAACC	578	CUCGUGGAAGGGGAGACAACC	578	GUUUGUGCCUUCACGAG	1274
GGUCGCAACCUCUGGGAAG	579	GGUCGCAACCUCUGGGAAG	579	CUUCCACGAGGUUGGCAGCC	1275
CGGUCCGCAACCUCUGGGAAG	580	CGGUCCGCAACCUCUGGGAAG	580	UUCCACGAGGUUGGCAGCC	1276
GCGCGCGACUAGGAAGACU	581	GCGCGCGACUAGGAAGACU	581	AGUCUUCUAGUGGCCGCGC	1277
GACGGGGUGAACUUAUGCAA	582	GACGGGGUGAACUUAUGCAA	582	UUGCAUAGGUUCAGGCCGUC	1278
UAGAUUCACUCCCCUGAGAG	583	UAGAUUCACUCCCCUGAGAG	583	CUCACAGGGAGGUAGUAUCIA	1279
AGCGGGGUCCGCAACCUCUAC	584	AGCGGGGUCCGCAACCUCUAC	584	CCACGAGGUUGGCCGACCGCU	1280
UGGAAGGGGAGACAACCUAC	585	UGGAAGGGGAGACAACCUAC	585	GAUAGGUUGGUCCUUCUA	1281
CGCGCGACUAGGAAGACUU	586	CGCGCGACUAGGAAGACUU	586	AAGUCUUCUAGUGGCCGCG	1282
CUAGGAAGACUUCCGAGCG	587	CUAGGAAGACUUCCGAGCG	587	CGCUCCGGAAGGUUCCUUAG	1283
GUGCGCGCGACUAGGAAGA	588	GUGCGCGCGACUAGGAAGA	588	UCUUCUCCUAGUGGCCGCGC	1284
AGAUACACUCCCCUGUGAGG	589	AGAUACACUCCCCUGUGAGG	589	CCUCACAGGGGAGGUAGCU	1285
UGCGCGCGACUAGGAAGAC	590	UGCGCGCGACUAGGAAGAC	590	GCUUUCUAGUGGCCGCGCA	1286
AUAGAUACACUCCCCUGUGA	591	AUAGAUACACUCCCCUGUGA	591	UCACAGGGAGGUAGCUAU	1287
GAGCGGGUGCGCAACCUCUGUG	592	GAGCGGGUGCGCAACCUCUGUG	592	CACGAGGUUGGCCGACCGCU	1288
CACGAACAGACUGCUCCAAC	593	CACGAACAGACUGCUCCAAC	593	GUUGGGAGCAGUGGUUCUGUG	1289
GGCAAGGUUCUUGGCCGACG	594	GGCAAGGUUCUUGGCCGACG	594	CGUCGGCAAGGAACUUGCC	1290
UCCGUGCGACUCCAGGACC	595	UCCGUGCGACUCCAGGACC	595	GGUCCUUGGGAGGUUCGACAA	1291
GUACACGACUGCUCCA	596	GUACACGACUGCUCCA	596	UGGAGCAGUGGUUCUGUGAC	1292
CGGGGUCCGCAACCUCUGGGA	597	CGGGGUCCGCAACCUCUGGGA	597	UCCACGAGGUUGGCCGAC	1293
GCGCGACUAGGAAGACUUC	598	GCGCGACUAGGAAGACUUC	598	GAAGUCUUCUAGUGGCCG	1294
GCUAUGGACGGGGCUGUGC	599	GCUAUGGACGGGGCUGUGC	599	GCACAGGCCGCGUCAUGC	1295
UCACGAACGACUGCUCAA	600	UCACGAACGACUGCUCAA	600	UUGGAGCAGUGGUUCUGUGA	1296
UGCGCAACCUCUGGGAGGC	601	UGCGCAACCUCUGGGAGGC	601	GCCUUUCACGAGGUUGCGCA	1297
CGUGCGAGCCUCCAGGACCC	602	CGUGCGAGCCUCCAGGACCC	602	GGGUCCUUGGGAGGUUGCAGG	1298
GUCCGCAACCUCUGGGAGG	603	GUCCGCAACCUCUGGGAGG	603	CCUUCACGAGGUUGCGAC	1299
ACUAGGAAGACUUCCGAGC	604	ACUAGGAAGACUUCCGAGC	604	GCUCGGGAAGGUUCUCCUAGU	1300
CGCGACUAGGAAGACUUC	605	CGCGACUAGGAAGACUUC	605	GGAAGLICUUCUAGUGCGG	1301
UGGGCGGAAGCACAUUGGGA	606	UGGGCGGAAGCACAUUGGGA	606	UCCACAUUGGUUCUCCCA	1302

【表22】

CCUUGCCUACUAUUCCAUG	607	CCUUGCCUACUAUUCCAUG	607	CAUGGAUAGUAGGGCAAGG	1303
GCCUCAGGAAACUUGGGU	608	GCCUCAGGAAACUUGGGU	608	ACCCCAAGUUUCCUGAGGGC	1304
UGCUAUGACGGGGCUGUG	609	UGCUAUGACGGGGCUGUG	609	CACAGCCCGGCGUCAUAGCA	1305
UGUGGCUUCCGACCGCUAC	610	UGUGGCUUCCGACCGCUAC	610	GUAGGGGUGGGCGAGCACGA	1306
UGCCUCAGAAACUUGGGG	611	UGCCUCAGAAACUUGGGG	611	CCCCAAGUUUCCUGAGGGCA	1307
UGUCUCUGGCCGACCCCG	612	UGUCUCUGGCCGACCCCG	612	CGGGGUUGGGCACCGAGACA	1308
UGUGGCGCAGGAGAUGGG	613	UGUGGCGCAGGAGAUGGG	613	CCCAUCUCCUGCGGCCACA	1309
GUCCGGCUUCCACCGCUA	614	GUCCGGCUUCCACCGCUA	614	UAGGGGUUGGGGAGCACGAC	1310
GAUUCCACUACGGUGACGG	615	GAUUCCACUACGGUGACGG	615	CCGUACGUAGUAGGGAAUC	1311
GGGCCUUGCCUACUAUUCC	616	GGGCCUUGCCUACUAUUCC	616	GGAAAUAGUAGGGCAAGGCC	1312
GCCUUGCCUACUAUUCCAU	617	GCCUUGCCUACUAUUCCAU	617	AUGGAAUAGUAGGGCAAGGC	1313
GACUAGGAAGACUUCGAG	618	GACUAGGAAGACUUCGAG	618	CUCGGAAGUCUUCUAGUC	1314
GCGGGGGAGACAUUAUCA	619	GCGGGGGAGACAUUAUCA	619	UGAUUAUAGUAGGGCAAGGCC	1315
CGAGCGGCUUCGCAACUCGU	620	CGAGCGGCUUCGCAACUCGU	620	ACGAGGGUUGGGGACCGCUUG	1316
GGCCUUGCCUACUAIUCCA	621	GGCCUUGCCUACUAIUCCA	621	UGGAAUAGUAGGGCAAGGCC	1317
AUUCCACUACGGUGACGGG	622	AUUCCACUACGGUGACGGG	622	CCCGUACGUAGUGGGAAAU	1318
GGACGUCAAGUUCGGGGC	623	GGACGUCAAGUUCGGGGC	623	GCCCCGGAAACUUGACGUCC	1319
GAAGUGCUAUGACGGGGCU	624	GAAGUGCUAUGACGGGGCU	624	AGCCCCGGGUCAUAGCACUC	1320
GAAGGUCAAGUUCGGGGC	625	GAAGGUCAAGUUCGGGGC	625	CGCCCCGGAAACUUGACGUCC	1321
UCAGCGACGGGUUCUGGU	626	UCAGCGACGGGUUCUGGU	626	GACCAAGGACCCGGUUCUGGU	1322
UCAAGGUUCGGGGGGGG	627	UCAAGGUUCGGGGGGGG	627	CCACCCGGGGGGAAACUUGA	1323
UCAAGGAGAAGGGGAA	628	UCAAGGAGAAGGGGAA	628	UUCGCCUUCAUCUCCUUGA	1324
CCUAUCCCCAAGGCUCGCC	629	CCUAUCCCCAAGGCUCGCC	629	GGCGAGCCUUGGGAUAGG	1325
CUUGACCUACCUAGAUCA	630	CUUGACCUACCUAGAUCA	630	UGAUCUGAGGGGUCAAG	1326
UUUCCACUACGGGGC	631	UUUCCACUACGGGGC	631	GCCCCGUACGUAGGGAAA	1327
AGUGCUAUGACGGGGCUG	632	AGUGCUAUGACGGGGCUG	632	CAGCCCCGGGUCAUAGCACU	1328
ACGUCAAGUUCGGGGC	633	ACGUCAAGUUCGGGGC	633	CGCCCCGGAAACUUGACGU	1329
UCUGGAGACAUCCGGCCAG	634	UCUGGAGACAUCCGGCCAG	634	CUGGCCCGAUGGUCCAGA	1330
GGGCGAAGGCACAUUGGGAA	635	GGGCGAAGGCACAUUGGGAA	635	UCCCAUAGUGGUCCGGCC	1331
UGACCUACCUAGAUCAU	636	UGACCUACCUAGAUCAU	636	AUGAUUCUGAGGUAGGUCA	1332
CCAAGCGGGAGACGGCUGGA	637	CCAAGCGGGAGACGGCUGGA	637	UCCAGCGGCUCCGGCUUGG	1333
ACCAAGCGGGAGACGGCUGG	638	ACCAAGCGGGAGACGGCUGG	638	CCAGCGGCUCCGGCUUGG	1334
GGGUGGGCUUCAUGGOCUCAG	639	GGGUGGGCUUCAUGGOCUCAG	639	CUGAGGGCAUGAAGGCCACCC	1335
GUCAAGGUUCGGGGGGGUG	640	GUCAAGGUUCGGGGGGUG	640	CACCGGCCGGGGAAUCUUGAC	1336
CUCAAGGAGAAGGGCGA	641	CUCAAGGAGAAGGGCGA	641	UCGCCUUCUACUUCUUGAG	1337
GAACCAAGGGAGACGGCUG	642	GAACCAAGGGAGACGGCUG	642	CAGCCCGUCCGGGUUGGUC	1338

【表23】

UCCAGGUCCCCCUAACCA	643	UCCAGGUCCCCCUAACCA	643	UGGUAGAGCCCCGACCUGGA	1339
CUCUUUCUCUACUUCUC	644	CUCUUUCUCUACUUCUC	644	GAGGAAGAUAGAGAAAGAG	1340
GUUCGGAGACAUCGGCCA	645	GUUCGGAGACAUCGGCCA	645	UGGCCCGAUGUCUCCAGAGC	1341
GUUGUGACUUGCCCCGA	646	GUUGUGACUUGCCCCGA	646	UCGGGGGCCAACGUACAAC	1342
AGACCUGGCCUCCAGUCAA	647	AGACCUGGCCUCCAGUCAA	647	UGGACUGGGAGCCAGGUCU	1343
CUUGCCUACAUUCCAUUG	648	CUUGCCUACAUUCCAUUG	648	CCAUGGAUAGUAGGGCAAG	1344
CCCGGUUGCUUUCUCUA	649	CCCGGUUGCUUUCUCUA	649	UAGAGAAAGGCAACCGGG	1345
CUUUCUCUACUUCUCCUU	650	CUUUCUCUACUUCUCCUU	650	AAGAGGAAGAUAGAGAAAG	1346
AGGGUGGCCUCAUGCCUCA	651	AGGGUGGCCUCAUGCCUCA	651	UGAGGCCAUAGAGGCCACCCU	1347
AAGACCUGGCCUCCAGUCCA	652	AAGACCUGGCCUCCAGUCCA	652	UGGACUGGGAGCCAGGUUU	1348
CCGGGUUGCUUUCUCUAU	653	CCGGGUUGCUUUCUCUAU	653	AUAGAGAAAGGCAACCGG	1349
CGGUUGGCCUUUCUCUAUC	654	CGGUUGGCCUUUCUCUAUC	654	GAUAGAGAAAGGCAACCG	1350
UGGGGGAUUUCACUACGU	655	UGGGGGAUUUCACUACGU	655	ACGUAGUGGAAAUCCCCCA	1351
AUGUCACGAAACGACUGCU	656	AUGUCACGAAACGACUGCU	656	GAGCAGUCGUUCCUGGACAU	1352
GGCCUAGGUUGGGCCCCAC	657	GGCCUAGGUUGGGCCCCAC	657	GUGGGCCCCAACUAGGCC	1353
UGGACCAAGCGGGAGACGGC	658	UGGACCAAGCGGGAGACGGC	658	GCCGUUCUCCGCUUCCGUCA	1354
UCCAGGUUGGGCUAACCA	659	UCCAGGUUGGGCUAACCA	659	GGUUGAGGCCGACCUGGAA	1355
ACGGGGGUUCUGGU	660	ACGGGGGUUCUGGU	660	ACCGGAACUCGACCCGCCU	1356
CAAGGAGAUGAAGGCGAAG	661	CAAGGAGAUGAAGGCGAAG	661	CUUCGCCUUCUACUCCUUG	1357
CAUGUCACGAACGACUGCU	662	CAUGUCACGAACGACUGCU	662	AGCAGUCGUUCGUAGACAUG	1358
CAGCGGGGUUGAGUUCUGG	663	CAGCGGGGUUGAGUUCUGG	663	CCAGGAACUCGACCCGCCUG	1359
UCCACAUACGGACGGCA	664	UCCACAUACGGACGGCA	664	UGCCCGUUCACGUAGUGGAA	1360
UAGGGGGGUUCUACUGCCUC	665	UAGGGGGGUUCUACUGCCUC	665	GAGGCAUGAAGCCACCCUA	1361
UCCAGGACUGCACGAUGCU	666	UCCAGGACUGCACGAUGCU	666	AGCAUCGGACUGGUCCUGGA	1362
UCCACAUACGGACGGCAU	667	UCCACAUACGGACGGCAU	667	AUGGCCGUACGUAGUGGAA	1363
AAUAGGGGUUCUACUGCC	668	AAUAGGGGUUCUACUGCC	668	GGCAUGAAGGCCACCCUAU	1364
GUUUUCACGGAGGUUAUGA	669	GUUUUCACGGAGGUUAUGA	669	UCAUAGGCCACCCUAU	1365
AUAGGGGUUGGCCUUAUGCU	670	AUAGGGGUUGGCCUUAUGCU	670	AGGCCAUAGAAGGCCACCCUAU	1366
UCUUCACGGAGGUUAUGAC	671	UCUUCACGGAGGUUAUGAC	671	GUCAUGAAGGCCACCCUAU	1367
AUGCCUCAGGAACUUGGG	672	AUGCCUCAGGAACUUGGG	672	CCCAAGUUUCUCCUGAGGCCAU	1368
ACCGGGACUGGUCAAGGA	673	ACCGGGACUGGUCAAGGA	673	UCCUUGAGCACGUCCCGGU	1369
GGGGCUGUGGAGGAUGA	674	GGGGCUGUGGAGGAUGA	674	UCAUCCACUGGACAGGGCCC	1370
AAGCUCCAGGACUGCACGA	675	AAGCUCCAGGACUGCACGA	675	UCGUGGAGGUCCUGGAGCU	1371
GUCCAGGACUGACGAUG	676	GUCCAGGACUGACGAUG	676	CAUCGUGGAGGUCCUGGAGC	1372
UACCGGGACUGGUCAAGG	677	UACCGGGACUGGUCAAGG	677	CCUUGAGCACGUCCGGUA	1373
GGGCUGUGGAGGAUGAA	678	GGGCUGUGGAGGAUGAA	678	UUCAUCCACUGCACAGCCCC	1374

【表24】

CGUCAAGUUCGGGGGU	679	CGUCAAGUUCGGGGGU	679	ACGCCCGGGAACUUGACG	1375
UCAAUAGGGGGCUUCAUG	680	UCAAUAGGGGGCUUCAUG	680	CAUGAAGGCACCCUUAUJGA	1376
AGCUUCACGGGGCUAUG	681	AGCUUCACGGGGCUAUG	681	CAUAGGCCUCCGUGAAGACU	1377
GGACCAAGCGGAGCGCU	682	GGACCAAGCGGAGCGCU	682	AGCCGUCUCCGCUUGGUCC	1378
GGCUCCAGGUCCAAGCUCCU	683	GGCUCCAGGUCCAAGCUCCU	683	AGGAGCUUJGGACUGGGAGCC	1379
GGCUGUGGAGGGAUAGAC	684	GGCUGUGGAGGGAUAGAC	684	GUUCAUCCACUGGCACAGCC	1380
CUCCAGGACUGGCACGAUGC	685	CUCCAGGACUGGCACGAUGC	685	GOAUCUGGUGAGGUCCUGGAG	1381
GAGUCLUUCAGGGAGGCUAU	686	GAGUCLUUCAGGGAGGCUAU	686	AUAGGCCUUCGUGAAGACUC	1382
UGGCUCCAGGUCCAAGCUCC	687	UGGCUCCAGGUCCAAGCUCC	687	GGAGCUUJGGACUGGGGCCA	1383
GGGGAUUUCACUACGUJA	688	GGGGAUUUCACUACGUJA	688	UCACGUAGUUGGAAAUCCCC	1384
CAUGCCUCAGGAAACUJGG	689	CAUGCCUCAGGAAACUJGG	689	CCAAGUUUCCUGAGGCAUG	1385
AUCAAUAGGGGGGUUCAU	690	AUCAAUAGGGGGGUUCAU	690	AUGAAGGCCACCCUUAUGAU	1386
GCGGGCCUJGCUACUAUU	691	GCGGGCCUJGCUACUAUU	691	AAUAGUAGGCAAGGCCCGC	1387
CCGGGACGUGGUCAAGGAG	692	CCGGGACGUGGUCAAGGAG	692	CUCCUUGAGGCACGUCCGG	1388
CCAUGGGGGGAACUGGGC	693	CCAUGGGGGGAACUGGGC	693	GCCCCAGUJUCCACCAUJGG	1389
CAAUAGGGGGCUUCAUGC	694	CAAUAGGGGGCUUCAUGC	694	GCAUGAAGGCCACCCUUAUJG	1390
AGCUCCAGGACUGGCACGAU	695	AGCUCCAGGACUGGCACGAU	695	AUGUGGCAGGUCCUGGAGCU	1391
CGGGCCUJGCUACUJUC	696	CGGGCCUJGCUACUJUC	696	GAUAGUAGGCAAGGCCCG	1392

siRNA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る。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つてもよい。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。

【0393】

【表25】

表 III: HCV 合成修飾 siNA コンストラクト

HCV 標的配列	配列番号	RPI#	別名	配列	配列番号
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25237	HCV IRES Loop IIIb (sense)	B GGUCCUUUUCUUGGAUCAACCC B	1413
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCGC	1393	25238	HCV IRES Loop (antisense)	B GGGUUGGAUCCAAGAAAGGACCC B	1414
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCGC	1393	25251	HCV IRES Loop (sense) Inverted Control	B CCCAACUAGGUUUUCUGG B	1415
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25252	HCV IRES Loop IIIb Inverted Control Compliment	B CCAGGAAAGAACGUAGUUGGG B	1416
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25814	HCV IRES Loop IIIb +2U overhang sense	GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCUU	1417
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25815	HCV IRES Loop IIIb +2U overhang antisense	GGGUUGAUCCAAGAAAGGACCUU	1418
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25834	HCV IRES Loop IIIb +2U overhang sense	BGGUCCUUUCUUGGAUCAACCCUU	1419
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25835	HCV IRES Loop IIIb +2U overhang antisense	BGGGUUGAUCCAAGAAAGGACCUU	1420
UGCCCCGGGAGGGUCUGUAGACC	1394	28415	HCV-Luc:325U21 TT siRNA sense	CCCGGGAGGGUCUGUAGATT	1421
UGGGAAACCCGGGAGGUACACCGG	1395	28416	HCV-Luc:162U21 TT siRNA sense	CGGAACCCGGGAGGUACACCTT	1422
GUGCCCCGGGAGGGUCUGUAGAC	1396	28417	HCV-Luc:324U21 TT siRNA sense	GCCCCGGGAGGGUCUGUAGTT	1423
GCGGAACCGGGAGGUACACCGGA	1397	28418	HCV-Luc:163U21 TT siRNA sense	GGAACCCGGGAGGUACACCGTT	1424
UGUGGGUACGCCUGAUAGGGUG	1398	28419	HCV-Luc:294U21 TT siRNA sense	GUGGUACUGGCCUGAUAGGGTT	1425
CUUGGGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	28420	HCV-Luc:293U21 TT siRNA sense	UGGGGUACUGCCUGAUAGGGTT	1426
CCUUGGGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	28421	HCV-Luc:292U21 TT siRNA sense	UUGGGGUACUGCCUGAUAGTT	1427
UGCCCCGGGAGGGUCUGUAGACC	1394	28422	HCV-Luc:343L21 TT siRNA (325C) antisense	UCUACGAGACCUCGGGGGTT	1428
UGCGGAACCGGGAGGUACACCGG	1395	28423	HCV-Luc:180L21 TT siRNA (162C) antisense	GGUGGUACUCACGGGUUCGGTT	1429
GUGCCCCGGGAGGUACUGUAGAC	1396	28424	HCV-Luc:342L21 TT siRNA (324C) antisense	CUACGAGACCUCGGGGGCTT	1430
CGGGAACCGGGAGGUACACCGGA	1397	28425	HCV-Luc:181L21 TT siRNA (163C) antisense	CGGUGGUACUCACGGGUUCCTT	1431
UGUGGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	28426	HCV-Luc:312L21 TT siRNA (294C) antisense	CCCUAUACAGGCAGUACCACCTT	1432
CUUGGGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	28427	HCV-Luc:311L21 TT siRNA (293C) antisense	CCUAUCAGGCAGUACCACATT	1433
CCUUGGGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	28428	HCV-Luc:325U21 TT siRNA (292C) antisense	CUAUCAUGGCAGUACCACATT	1434
UGCCCCGGGAGGGUCUGUAGACC	1394	28429	HCV-Luc:325U21 TT siRNA inv control	TTAGAUGGCUGGGGGCCCC	1435

【0394】

【表26】

UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	28430	HCV-Luc:162U21 TT siRNA inv control	TCCACAUAGAGUGGCCAAGGC	1436
GUGCCCCGGGGGUCCGUAGAC	1396	28431	HCV-Luc:324U21 TT siRNA inv control	TTGAUGCUCUGGAGGGCCCCG	1437
GCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1397	28432	HCV-Luc:163U21 TT siRNA inv control	TTGCCACAUAGAGUGGCCAAGG	1438
UUGGGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	28433	HCV-Luc:294U21 TT siRNA inv control	TTGGGAUAGUCCGUCAUGGUG	1439
CUUGGGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	28434	HCV-Luc:293U21 TT siRNA inv control	TTGGGAUAGUCCGUCAUGGUGU	1440
CCUUGGGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	28435	HCV-Luc:292U21 TT siRNA inv control	TTGAUAGUCCGUCAUGGUGUU	1441
UGCCCCGGGGGUCCGUAGACC	1394	28436	HCV-Luc:343L21 TT siRNA (325C) inv control	TTGGGGCCCUCAGAGCAUCU	1442
UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	28437	HCV-Luc:180L21 TT siRNA (162C) inv control	TTGCCUUGGCCACUCUAUGUGG	1443
GUGCCCCGGGGGUCCGUAGAC	1396	28438	HCV-Luc:342L21 TT siRNA (324C) inv control	TTGGGGGCCUCAGAGCAUC	1444
GCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1397	28439	HCV-Luc:181L21 TT siRNA (163C) inv control	TTCCUUGGCCACUCUAUGUGGC	1445
UUGGGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	28440	HCV-Luc:312L21 TT siRNA (294C) inv control	TTACCAUAGACGGACUAUCC	1446
CUUGGGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	28441	HCV-Luc:311L21 TT siRNA (293C) inv control	TTACACCAUAGACGGACUAUCC	1447
CCUUGGGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	28442	HCV-Luc:310L21 TT siRNA (292C) inv control	TTAACACCAUAGACGGACUAUC	1448
UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	29573	HCV-Luc:162U21 siRNA sense	CGGAACCGGGUGAGUACACCGG	1449
GCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1397	29574	HCV-Luc:163U21 siRNA sense	GGAACCCGGUGAGUACACCGGA	1450
CCUUGGGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	29575	HCV-Luc:292U21 siRNA sense	UUGGGGUACUGCCUGAUAGGG	1451
CUUGGGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	29576	HCV-Luc:293U21 siRNA sense	UGGGGUACUGCCUGAUAGGGU	1452
UUGGGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	29577	HCV-Luc:294U21 siRNA sense	UGGGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1453
GUGCCCCGGGGAGGUCCGUAGAC	1396	29578	HCV-Luc:324U21 siRNA sense	GCCCCGGGGAGGUCCGUAGAC	1454
UGCCCCGGGGAGGUCCGUAGACC	1394	29579	HCV-Luc:325U21 siRNA sense	CCCCGGGGAGGUCCGUAGACC	1455
UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	29580	HCV-Luc:182L21 siRNA (162C) antisense	GGGUACUCACGGGUUCCGCA	1456
GCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1397	29581	HCV-Luc:183L21 siRNA (163C) antisense	CGGUGGUACUCACGGGUUCCGCG	1457
CCUUGGGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	29582	HCV-Luc:312L21 siRNA (292C) antisense	CUAUCAAGGGCAGUACCAAGG	1458
CUUGGGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	29583	HCV-Luc:313L21 siRNA (293C) antisense	CCUAUCAGGGCAGUACCAAGG	1459
UUGGGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	29584	HCV-Luc:314L21 siRNA (294C) antisense	CCCUAUCAAGGGCAGUACCAAGA	1460
GUGCCCCGGGGAGGUCCGUAGAC	1396	29585	HCV-Luc:344L21 siRNA (324C) antisense	CUACGAGACCUCCGGGGCAC	1461
UGCCCCGGGGAGGUCCGUAGACC	1394	29586	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C)	UCUACGAGACCUCCGGGGCAC	1462

【0 3 9 5】

【表27】

			antisense	
UGGGAAACGGGAGGUACACGGG GCGGAACCGGGAGGUACACGGG	1395 1397	29587 29588	HCV-Luc:162U21 siRNA inv control HCV-Luc:163U21 siRNA inv control	GGCCACAUAGAGUGGGCAAGGG AGGCCACAUAGAGUGGCCAAGG
CCUUGGGGUACUGCCUGAUAGGG CUUGGGGUACUGCCUGAUAGGGU	1400 1399	29589 29590	HCV-Luc:292U21 siRNA inv control HCV-Luc:293U21 siRNA inv control	GGGAUAGGUCCGUCAUGGUGU UGGGAUAGGUCCGUCAUGGUGU
UUGGGGUACUGCCUGAUAGGGUG GUGCCCCGGAGGUUCGUAGAC	1398 1396	29591 29592	HCV-Luc:294U21 siRNA inv control HCV-Luc:324U21 siRNA inv control	GUGGGAUAGGUCCGUCAUGGUG CAGAUGCUCUGGAGGGCCCCG
UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC UGGGAAACCCGGAGGUACACCGG	1394 1395	29593 29594	HCV-Luc:325U21 siRNA inv control HCV-Luc:182U21 siRNA (162C) inv control	CCAGAUGCUCUGGAGGGCCCC ACGCCUUGGCCACUCAUGUGGG
CCUUGGGGUACUGCCUGAUAGGG CUUGGGGUACUGCCUGAUAGGGU	1400 1397	29596 29595	HCV-Luc:312U21 siRNA (292C) inv control HCV-Luc:183U21 siRNA (163C) inv control	GGAACACCAUAGACGGACUAUC CGCCUUGGCCACUCAUGUGGG
UUGGGGUACUGCCUGAUAGGGUG GUGCCCCGGAGGUUCGUAGAC	1399 1396	29597 29598	HCV-Luc:313U21 siRNA (293C) inv control HCV-Luc:344U21 siRNA (324C) inv control	GAACACCAUAGACGGACUAUC AACACCAUAGACGGACUAUCC
UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC	1394 1394	29600 30051	HCV-Luc:345U21 siRNA (325C) inv control HCV-Luc:325U21 siRNA 5' P=S + 3' univ. base 2 + 5'/3' invAba sense	ACGGGGCCCUCUAGAGCAUC BCsCsCsGsGGAGGUUCGUAGAXXB
UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC	1394 1394	30052 30053	HCV-Luc:325U21 siRNA inv 5' P=S + 3' univ. base 2 + 5'/3' invAba P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba antisense	ACGGGGCCCUCUAGAGCAUC BasGsAsUsGscCUCUGGAGGGCCCCXB
UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC	1394 1394	30054 30055	HCV-Luc:345U21 siRNA (325C) 5' P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba 5' P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba HCV-Luc:325U21 siRNA all Y P=S + 3' univ. base 2 + 5'/3' invAba sense	ACGGGGCCCUCUAGAGCAUC UsCsUsAsCsGAGACCUCCGGGGXXB
UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC	1394 1394	30056 30057	HCV-Luc:325U21 siRNA inv all Y P=S + 3' univ. base 2 + 5'/3' invAba HCV-Luc:345U21 siRNA (325C) all Y P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba antisense	ACGGGGCCCUCUAGAGCAUC BCsCsCsGsGGAGGUUCGUAGAXXB
UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC UGCCCCGGAGGUUCGUAGACC	1394 1394	30058	HCV-Luc:345U21 siRNA (325C) inv all Y P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba	ACGGGGCCCUCUAGAGCAUC UsCsUsACsCsUsCsCsGsGGGGXXB

【0 3 9 6】

【表28】

UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30059	HCV-Luc:325U21 siRNA 4/3 P=S ends + all Y-2F + 3' univ. base 2 + 5'/3' invAba sense	BccscscsGGAGGGGucuGGAGGGccscsXXB	1485
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30060	HCV-Luc:325U21 siRNA inv 4/3 P=S ends + all Y-2F + 3' univ. base 2 + 5'/3' invAba	BAsGsAsUsGcucuGGAGGGccscsXXB	1486
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30170	HCV-Luc:325U21 siRNA all Y-2F + 3' univ. base 2 + 5'/3' invAba sense	BccccGGAGGGucuGuAGAXX B	1487
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30171	HCV-Luc:325U21 siRNA inv all Y-2F + 3' univ. base 2 + 5'/3' invAba	B AGAuGcucuGGAGGGccscsXX B	1488
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30172	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) all Y-P=S + 3' univ. base 2 + 5'/3' invAba antisense	UsCsUsACsGAGACsCsUsCsCsGGGGXX B	1489
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30173	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) all Y-2F antisense	ucuAcGAGAccuocGGGG	1490
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30175	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) all Y-2F + 3' univ. base 2 antisense	ucuAcGAGAccuocGGGGXX	1491
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30176	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv all Y-2F + 3' univ. base 2	GGGGccucccAGAGcAucuXX	1492
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30177	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) all Y-2F + 3' univ. base 2 + 5'/3' iB antisense	B ucuAcGAGAccuocGGGGXX B	1493
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30178	HCV-Luc:325U21 siRNA all Y P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba sense	CsCsCsCsGGAGGGusCsUsGsUsAGAXX B	1494
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30417	HCV-Luc:325U21 siRNA w/iB sense	CCCCGGGGAGGUUCGUAGACC B	1495
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30418	HCV-Luc:325U21 siRNA w/iB sense	B CCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC B	1496
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30419	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) w/iB antisense	UCUACGAGACCUCCGGGGCA B	1497
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30420	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) w/iB antisense	B UCUACGAGACCUCCGGGGCA B	1498
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30561	HCV-Luc:325U21 siRNA Y-2'OMe (stab06) + 5'/3' invAba sense	BccccGGAGGGucuGuAGATTB	1499
UGCCCCGGGGAGGUUCGUAGACC	1394	30562	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) Y-2F, R-2'OMe + TST antisense	ucuAcGAGAccuocGGGGT T	1500
AUAGUGGGUCUGCGGGAAACCGGGUGA	1401	30649	HCV-Luc:153U21 siRNA stab07 sense	B AGuGcucuGcGGAAccGGTT B	1501
GUCUGGGAAACCGGGUGAGUACAC	1402	30650	HCV-Luc:159U21 siRNA stab07 sense	B cuGcGGAAccGGuGAQuACTT B	1502
GCCUUUGGGUACGGCCUGAUAGG	1403	30651	HCV-Luc:291U21 siRNA stab07 sense	B cuuGUGGUAcuGGuAUATT B	1503
UGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGGC	1404	30652	HCV-Luc:295U21 siRNA stab07 sense	B uGGuAcuGccuGAuAGGGGuGTT B	1504
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGGU	1405	30653	HCV-Luc:296U21 siRNA stab07 sense	B GGuAcuGccuGAuAGGGGuGTT B	1505
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGGU	1406	30654	HCV-Luc:297U21 siRNA stab07 sense	B GuAcuGccuGAuAGGGGuGCTT B	1506
GGUACUGCCUGAUAGGGUGGU	1407	30655	HCV-Luc:298U21 siRNA stab07 sense	B uAcuGccuGAuAGGGGuGcTT B	1507

【0 3 9 7】

【表 29】

UACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCG	1408	30656	HCV-Luc:300U21 siRNA stab07 sense	B cu Gccu GAuAGGGGuGcuuGTT B	1508
ACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCGA	1409	30657	HCV-Luc:301U21 siRNA stab07 sense	B uGccu GAuAGGGGuGcuuGTT B	1509
UGCCUGAUAGGGUGCUUGCGAGU	1410	30658	HCV-Luc:303U21 siRNA stab07 sense	B ccu GAuAGGGGuGcuuGc GATT B	1510
CUGAUAGGGUGCUUGCGAGUGCC	1411	30659	HCV-Luc:306U21 siRNA stab07 sense	B GAuAGGGGuGcuuGc GAGuGTT B	1511
GUGCCCCGGAGGUUCUUGUAGAC	1396	30660	HCV-Luc:324U21 siRNA stab07 sense	B Gcccc GGGAGGUucuGAGTT B	1512
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGGUGA	1401	30661	HCV-Luc:173U21 siRNA (153C)	AccGGuuccGcAGAccAcuTsT	1513
GUCUGGGGAACCGGGUGAGUACAC	1402	30662	stab08 antisense	GuAcuAccGGGuuAccAcAGTsT	1514
GCCUJUGGGUACUGGCCUGAUAGG	1403	30663	HCV-Luc:311U21 siRNA (291C)	uAucAGGGAGuAccAcAGuAccTsT	1515
UGGGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1404	30664	stab08 antisense	AccuAucAGGGAGuAccTsT	1516
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGCU	1405	30665	HCV-Luc:315U21 siRNA (295C)	cAccuAucAGGGAGuAccTsT	1517
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1406	30666	stab08 antisense	GcAccuAucAGGcAGuAcTsT	1518
GGUACUGCCUGAUAGGGUGCUUG	1407	30667	HCV-Luc:318U21 siRNA (298C)	AGcAccuAucAGGcAGuAtsT	1519
UACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCG	1408	30668	stab08 antisense	cAAGGcAccuAucAGGcAGTsT	1520
ACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCGA	1409	30669	HCV-Luc:320U21 siRNA (300C)	GcAACGcAccuAucAGGcAtsT	1521
UGCCUGAUAGGGUGCUUGCGAGU	1410	30670	HCV-Luc:321U21 siRNA (301C)	uGcAAGGcAccuAucAGGgTsT	1522
CUGAUAGGGUGCUUGCGAGUGCC	1411	30671	HCV-Luc:323U21 siRNA (303C)	cAcuGcAAAGcAccuAucAuctsT	1523
GUGCCCCGGAGGUUCUUGGAGAC	1396	30672	stab08 antisense	cuAcGAGAccuCCGGGGcTsT	1524
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGGUGA	1401	30673	HCV-Luc:153U21 siRNA stab07 inv	B uGGccAGGGcGGuuGGuGATT B	1525
GUCUJCGGAACCGGGUGAGUACAC	1402	30674	HCV-Luc:159U21 siRNA stab07 inv	B oAuGAuGGcAAGGcGGuTT B	1526
GCCUJUGGGUACUGGCCUGAUAGG	1403	30675	sense	B AuAGuGcGGuuGGuuCTT B	1527
UGGGGUACUGCCUGAUAGGGUGGC	1404	30676	HCV-Luc:295U21 siRNA stab07 inv	B uGGGcAuAGGuccGuuAuGGTT B	1528
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGCU	1405	30677	sense	B GuGGGcAuAGGuccGuuAuGGTT B	1529
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1406	30678	sense	B cGuGGGcAuAGGuccGuuAuGGTT B	1530

【0 3 9 8】

【 30 】

GGUACUGGCCUGAUAGGGGUCCUUG	1407	30679	HCV-Luc:298U21 siRNA stab07 inv sense	B ucGuGGGAuAGuccGucaTT B	1531
UACUGCCUGAUAGGGGUCCUUGCG	1408	30680	HCV-Luc:300U21 siRNA stab07 inv sense	B GuucGuGGGAuAGuccGucaTT B	1532
ACUGCCUGAUAGGGGUCCUUGCGA	1409	30681	HCV-Luc:301U21 siRNA stab07 inv sense	B cGuucGuGGGAuAGuccGucaTT B	1533
UGCCUGAUAGGGGUCCUUGCGAGU	1410	30682	HCV-Luc:303U21 siRNA stab07 inv sense	B AGcGuucGuGGGAuAGuccGucaTT B	1534
CUGAUAGGGGUCCUUGCGAGUGCC	1411	30683	HCV-Luc:306U21 siRNA stab07 inv sense	B GuGAGcGuucGuGGGAuAGTT B	1535
GUGCCCCGGAGGGUCCUUGCGUGA	1396	30684	HCV-Luc:324U21 siRNA stab07 inv sense	B GAuGuucGGAGGGccccGTT B	1536
AUAGUGGUCCUGCGAACCGGUGA	1401	30685	HCV-Luc:179L21 siRNA (153C) stab08 inv antisense	ucAccAGAcGccuGGccATsT	1537
GUCUGGGAACCGGUGAGUACAC	1402	30686	HCV-Luc:179L21 siRNA (159C) stab08 inv antisense	GAcGccuGGccAcuGuGTTsT	1538
GCCUUGGGGUACUGGCCUGAUAGG	1403	30687	HCV-Luc:311L21 siRNA (291C) stab08 inv antisense	GAACAccAUGAcGGACuAUtTsT	1539
UGUGGUACUGGCCUGAUAGGGUG	1404	30688	HCV-Luc:315L21 siRNA (295C) stab08 inv antisense	AccAUGAcGGAcuAucccAcTsT	1540
GUGGUACUGGCCUGAUAGGGUGCU	1405	30689	HCV-Luc:316L21 siRNA (296C) stab08 inv antisense	ccAuGAcGGAcuAucccAcTsT	1541
UGGUACUGGCCUGAUAGGGUGCUU	1406	30690	HCV-Luc:317L21 siRNA (297C) stab08 inv antisense	caUGAcGGAcuAucccAcGTTsT	1542
GGUACUGGCCUGAUAGGGUGCUUG	1407	30691	HCV-Luc:318L21 siRNA (298C) stab08 inv antisense	AuGAcGGAcuAucccAcGATsT	1543
UACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCG	1408	30692	HCV-Luc:320L21 siRNA (300C) stab08 inv antisense	GAcGGAcuAucccAcGAAAcTsT	1544
ACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCGA	1409	30693	HCV-Luc:321L21 siRNA (301C) stab08 inv antisense	AcGGAcuAucccAcGAAAcGTTsT	1545
UGCCUGAUAGGGUGCUUGCGAGU	1410	30694	HCV-Luc:323L21 siRNA (303C) stab08 inv antisense	GGAcuAucccAcGAAAcGTTsT	1546
CUGAUAGGGUGCUUGCGAGUGCC	1411	30695	HCV-Luc:326L21 siRNA (306C) stab08 inv antisense	GUAUcccAcGAAAcGTTsT	1547
GUGCCCCGGAGGUCCUGUAGAC	1396	30696	HCV-Luc:344L21 siRNA (324C) stab08 inv antisense	cGGGGccccuGGAGGGccccTT B	1548
UGCCCCGGAGGUCCUGUAGACC	1394	31340	HCV-Luc:325U21 siRNA stab04 sense sense	B cccccGGAGGGcucGuAGATT B	1549
UGCCCCGGAGGUCCUGUAGACC	1394	31341	HCV-Luc:325U21 siRNA inv stab04 sense	B AGAuGuucGGAGGGccccTT B	1550
UGCCCCGGAGGUCCUGUAGACC	1394	31342	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) stab05 antisense	ucuAccAGAGAccuccGGGGTsT	1551
UGCCCCGGAGGUCCUGUAGACC	1394	31343	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv	GGGGccccuGGAGGGcucGuTTsT	1552

【 0399 】

【表31】

UGCCCCGGGGUCUCGUAGACC	1394	31344	stab05 antisense	HCV-Luc:325U21 siRNA stab07 sense	B ccccccGGGGucucGUAGATTB	1553
UGCCCCGGGGUCUCGUAGACC	1394	31345	sense	HCV-Luc:325U21 siRNA inv stab07	B AGAU Gcuu GGAGGGGccctTtB	1554
UGCCCCGGGGAGGUUCUCGUAGACC	1394	31346	stab08 antisense	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv	GGGGGcccucAGAGcAucutST	1555
UGCCCCGGGGAGGUUCUCGUAGACC	1394	31347	stab11 antisense	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C)	ucuACGAGAccuccGGGGTtST	1556
UGCCCCGGGGAGGUUCUCGUAGACC	1394	31348	stab11 antisense	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv	GGGGGcccucAGAGcAucutST	1557
AUAGUGGGUCUGGGAAACCGGGUGA	1401	31453	HCV-Luc:153U21 siRNA stab04 sense	B AGUGGauuGcGGAAccGGGtttB	1558	
GUUCUGGGAAACCGGGUGAGUACAC	1402	31454	HCV-Luc:159U21 siRNA stab04 sense	B cuGcGGAAccGGGAGuActtB	1559	
AAAGGGCCUUGGGUACUGGCCUGA	1412	31455	HCV-Luc:287U21 siRNA stab04 sense	B AGGccuGUGGGuAcuGccutTtB	1560	
GCCUUGGGUACUGGCCUGAUAAGGG	1403	31456	HCV-Luc:291U21 siRNA stab04 sense	B cuuGuGGGuAcuGccuGAuAGGGtttB	1561	
UGGGGUACUGGCCUGAUAAGGGUGGC	1404	31457	HCV-Luc:295U21 siRNA stab04 sense	B uGGGuAcuGccuGAuAGGGtttB	1562	
GUGGUACUGGCCUGAUAAGGGUGGU	1405	31458	HCV-Luc:296U21 siRNA stab04 sense	B GGUAcuGccuGAuAGGGGuGtttB	1563	
UGGUACUGGCCUGAUAAGGGUGGU	1406	31459	HCV-Luc:297U21 siRNA stab04 sense	B GuAcuGccuGAuAGGGGuGcttB	1564	
GGGUACUGGCCUGAUAAGGGUGGU	1407	31460	HCV-Luc:298U21 siRNA stab04 sense	B uAcuGccuGAuAGGGGuGccutTtB	1565	
UACUGCCUGAUAAGGGUGGU	1408	31461	HCV-Luc:300U21 siRNA stab04 sense	B cuGccuGAuAGGGGuGccuGtttB	1566	
ACUGCCUGAUAAGGGUGGUUGCGA	1409	31462	HCV-Luc:301U21 siRNA stab04 sense	B uGccuGAuAGGGGuGccuGcttB	1567	
UGCCUGAUAAGGGUGGUUGGGAGU	1410	31463	HCV-Luc:303U21 siRNA stab04 sense	B cuuGAuAGGGGuGccuGcattB	1568	
CUGAUAGGGUGGUUGCGAGUGGCC	1411	31464	HCV-Luc:306U21 siRNA stab04 sense	B GAuAGGGGuGccuGcAGtTtB	1569	
			HCV-Luc:173L21 siRNA (153C)			
AUAGUGGGUCUGCGGGAAACCGGGUGA	1401	31465	stab05 antisense	HCV-Luc:179L21 siRNA (159C)	AccGGGiuccGcAGAccAcutST	1570
GUCUGCGGAACCGGGUGAGUACAC	1402	31466	stab05 antisense	HCV-Luc:306U21 siRNA stab04 sense	GuAcuAccGGGuuGGccGcAGtST	1571
AAGGGCCUUGGGUACUGGCCUGA	1412	31467	stab05 antisense	HCV-Luc:307L21 siRNA (287C)	AGGcAGuAccAcAGGccutST	1572
GCCUUGGGUACUGGCCUGAUAGGG	1403	31468	stab05 antisense	HCV-Luc:311L21 siRNA (291C)	uAucAGGGcAGuAccAcAAAGtST	1573
UGGGGUACUGCCUGAUAGGGUGGC	1404	31469	stab05 antisense	HCV-Luc:315L21 siRNA (295C)	AcccuAucAGGGcAGuAccAtST	1574
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGGU	1405	31470	stab05 antisense	HCV-Luc:316L21 siRNA (296C)	cAcccuAucAGGGcAGuAccTsT	1575
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGGU	1406	31471	stab05 antisense	HCV-Luc:317L21 siRNA (297C)	GcAcccuAucAGGGcAGuActST	1576
GGUACUGCCUGAUAGGGUGGU	1407	31472	stab05 antisense	HCV-Luc:318L21 siRNA (298C)	AGcAcccuAucAGGGcAGuAtST	1577
UACUGCCUGAUAAGGGUGGU	1408	31473	stab05 antisense	HCV-Luc:320L21 siRNA (300C)	cAAGcAcccuAucAGGGcAGtST	1578

【表32】

ACUGCCUUGAUAGGGUCCUUGCGGA	1409	31474	HCV-Luc:321L21 siRNA (301C) stab05 antisense	GcAAAGcAccuAucAGGcATST	1579
UGCCUGAUAGGGUGCUUUGCGAGAU	1410	31475	HCV-Luc:323L21 siRNA (303C) stab05 antisense	ucGcAAAGcAccuAucAGGcTST	1580
CUGAUAGGGUGCUUUGCGAGUGCC	1411	31476	HCV-Luc:326L21 siRNA (306C) stab05 antisense	cAcuGcAAAGcAccuAucGTST	1581
AUAGUGGUUCUGCGGAACCGGGUGA	1401	31477	HCV-Luc:153U21 siRNA inv stab04 sense	B uGGccAAGGcGcGucGGuGATTB	1582
GUCCUGGGGAACCGGGUGAGUACAC	1402	31478	HCV-Luc:287U21 siRNA inv stab04 sense	B uAuGAGuGGccAAGGcGcGucTTB	1583
AAAGGCCUUGGGGUACUGGCCUGA	1412	31479	HCV-Luc:159U21 siRNA inv stab04 sense	B uccGucAuGGuGuuccGGATTB	1584
GCCUJUGGGGUACUGGCCUGAUAGG	1403	31480	HCV-Luc:291U21 siRNA inv stab04 sense	B AuAGuccGucAuGGuGuuccTTB	1585
UGGGGUACUGGCCUGAUAGGGUGGC	1404	31481	HCV-Luc:295U21 siRNA inv stab04 sense	B uGGGAuAGuccGucAuGGuTTB	1586
GUUGGUACUGGCCUGAUAGGGUGGU	1405	31482	HCV-Luc:297U21 siRNA inv stab04 sense	B GuGGGAuAGuccGucAuGGTTB	1587
UGGUACUGGCCUGAUAGGGUGGUU	1406	31483	HCV-Luc:298U21 siRNA inv stab04 sense	B cGuGGGAuAGuccGucAuGTTB	1588
GGUACUGGCCUGAUAGGGUGGUU	1407	31484	HCV-Luc:297U21 siRNA inv stab04 sense	B ucGuGGGAuAGuccGucAuTTB	1589
UACUGCCUUGAUAGGGUGGUUGCG	1408	31485	HCV-Luc:300U21 siRNA inv stab04 sense	B GuuGGGGAUAGuccGucTTB	1590
ACUGCCUUGAUAGGGUGGUUGCGA	1409	31486	HCV-Luc:301U21 siRNA inv stab04 sense	B cGuuGGGGAUAGuccGuTTB	1591
UGCCUGAUAGGGUGGUUGCGAGU	1410	31487	HCV-Luc:303U21 siRNA inv stab04 sense	B AGcGluGucGuGGGAuAGuccTTB	1592
CUGAUAGGGUGGUUGCGAGUGCC	1411	31488	HCV-Luc:306U21 siRNA inv stab04 sense	B GuGAGGcGucGuGGGAuAGTTB	1593
AUAGUGGUUCUGCGGAACCGGGUGA	1401	31489	HCV-Luc:173L21 siRNA (153C) inv stab05 antisense	ucAccAGAcGccuGGccATST	1594
GUCCUGGGGAACCGGGUGAGUACAC	1402	31490	HCV-Luc:179L21 siRNA (159C) inv stab05 antisense	GAcGccuGGccAcuAuGTST	1595
AAAGGCCUUGGGGUACUGGCCUGA	1412	31491	HCV-Luc:307L21 siRNA (287C) inv stab05 antisense	ucGGAAcAccAuGAcGGATST	1596
GCCUJUGGGGUACUGGCCUGAUAGG	1403	31492	HCV-Luc:311L21 siRNA (291C) inv stab05 antisense	GAACAccAuGAccGGAcuAuTST	1597
UGGGGUACUGGCCUGAUAGGGUGGC	1404	31493	HCV-Luc:315L21 siRNA (295C) inv stab05 antisense	AccAuGAccGGAcuAucccATST	1598
GUUGGUACUGGCCUGAUAGGGUGGU	1405	31494	HCV-Luc:316L21 siRNA (296C) inv stab05 antisense	ccAuGAccGGAcuAucccActST	1599

【0401】

【表33】

UGGUACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1406	31495	HCV-Luc:317L21 siRNA (297C) inv stab05 antisense	cAuGAGGGACuAucccAcGTsT	1600
GGUACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1407	31496	HCV-Luc:318L21 siRNA (298C) inv stab05 antisense	AuGAGGGACuAucccAcGATsT	1601
UACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1408	31497	HCV-Luc:320L21 siRNA (300C) inv stab05 antisense	GACGGACuAucccAcGAACTsT	1602
ACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1409	31498	HCV-Luc:321L21 siRNA (301C) inv stab05 antisense	AcGGACuAucccAcGAAcGTsT	1603
UGCCUGAUAGGGUGCUU	1410	31499	HCV-Luc:323L21 siRNA (303C) inv stab05 antisense	GGACuAucccAcGAAcGcuTsT	1604
CUGAUAGGGUGCUU	1411	31500	HCV-Luc:326L21 siRNA (306C) inv stab05 antisense	cuAucccAcGAAcGcuAcTsT	1605

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 = チミジン

B = 反転デオキシ無塩基

S = ホスホロチオエート結合

A = デオキシアデノシン

G = デオキシグアノシン

X = 万能塩基(5-ニトロインドール)

Z = 万能塩基(3-ニトロピロール)

【0402】

【表34】

表IV

化学的に修飾されたsiNA構築物用の安定化化学の非限定的例

化学	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[AS]
“Stab3”	2'-フルオロ	リボ	—	5'末端に4 3'末端に4	通常[AS]
“Stab4”	2'-フルオロ	リボ	5'および3'末端	—	通常[AS]
“Stab5”	2'-フルオロ	リボ	—	3'末端に1	通常[AS]
“Stab6”	2'-O-メチル	リボ	5'および3'末端	—	通常[AS]
“Stab7”	2'-フルオロ	2'-デオキシ	5'および3'末端	—	通常[AS]
“Stab8”	2'-フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に1	通常[AS]
“Stab9”	リボ	リボ	5'および3'末端	—	通常[AS]
“Stab10”	リボ	リボ	—	3'末端に1	通常[AS]
“Stab11”	2'-フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に1	通常[AS]

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

【0403】

【表35】

表V

A.  $2.5 \mu\text{mol}$  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 $\mu\text{L}$	45 sec	2.5 min	7.5 min
S-エチルテトラゾール	23.8	238 $\mu\text{L}$	45 sec	2.5 min	7.5 min
無水酢酸	100	233 $\mu\text{L}$	5 sec	5 sec	5 sec
N-メチルイミダゾール	186	233 $\mu\text{L}$	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 $\mu\text{L}$	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	6.67 mL	NA	NA	NA

B.  $0.2 \mu\text{mol}$  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 $\mu\text{L}$	45 sec	233 sec	465 sec
S-エチルテトラゾール	38.7	31 $\mu\text{L}$	45 sec	233 min	465 sec
無水酢酸	655	124 $\mu\text{L}$	5 sec	5 sec	5 sec
N-メチルイミダゾール	1245	124 $\mu\text{L}$	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	700	732 $\mu\text{L}$	10 sec	10 sec	10 sec
ヨウ素	20.6	244 $\mu\text{L}$	15 sec	15 sec	15 sec
ボーケージ	7.7	232 $\mu\text{L}$	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	2.64 mL	NA	NA	NA

C.  $0.2 \mu\text{mol}$  合成サイクル 96 ウエル装置

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 $\mu\text{L}$	60 sec	180 sec	360sec
S-エチルテトラゾール	70/105/210	40/60/120 $\mu\text{L}$	60 sec	180 min	360 sec
無水酢酸	265/265/265	50/50/50 $\mu\text{L}$	10 sec	10 sec	10 sec
N-メチルイミダゾール	502/502/502	50/50/50 $\mu\text{L}$	10 sec	10 sec	10 sec
TCA	238/475/475	250/500/500 $\mu\text{L}$	15 sec	15 sec	15 sec
ヨウ素	6.8/6.8/6.8	80/80/80 $\mu\text{L}$	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 $\mu\text{L}$	NA	NA	NA

- 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フィラメントのダブルカップリングを利用する

## 【図面の簡単な説明】

## 【0404】

【図1】図1は、siRNA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 siRNA デュープレックスの MALDI - TOF V 質量分析を示す。

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

10

20

30

40

50

図である。

【図4】図4は，化学的に修飾されたs i N A 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s i N A 配列の例を示す。

【図6】図6は，種々s i N A コンストラクトの例を示す。

【図7】図7は，s i N A ヘアピンコンストラクトを生成するための発現力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，発現力セットを作製して二本鎖s i N A 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，s i N A 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10，種々の安定化化学の例を示す。

【図11】図11は，化学的に修飾されたs i N A 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，H C V / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とするs i R N A コンストラクトの非限定的例を示す。

【図13】図13は，H C V / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とするs i R N A コンストラクトの非限定的例を示す。

【図14】図14は，H C V / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とする化学的に修飾されたs i R N A コンストラクトの非限定的例を示す。

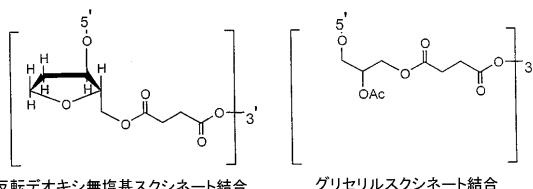
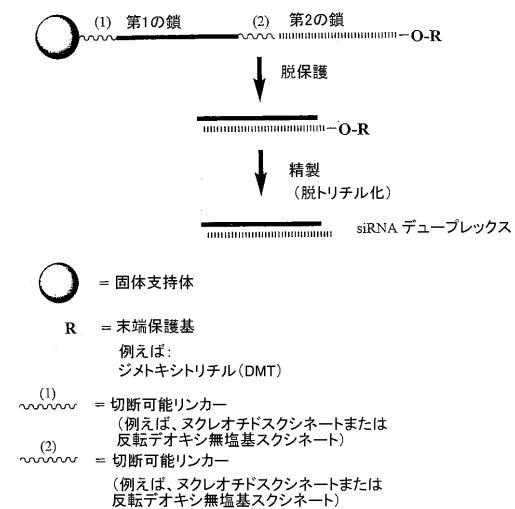
【図15】図15は，H C V / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とする化学的に修飾されたs i R N A コンストラクトの非限定的例を示す。

【図16】図16は，H C V / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とするいくつかの化学的に修飾されたs i R N A コンストラクトでの処理の非限定的例を示す。

【図17】図17は，H C V / ポリオウイルスキメラのウイルス複製を標的とするいくつかの化学的に修飾されたs i R N A コンストラクトでの処理の非限定的例を示す。

【図18】図18は，H u h 7 H C V レプリコンシステムのウイルス複製を標的とするいくつかの化学的に修飾されたs i R N A コンストラクトでの処理の非限定的例を示す。

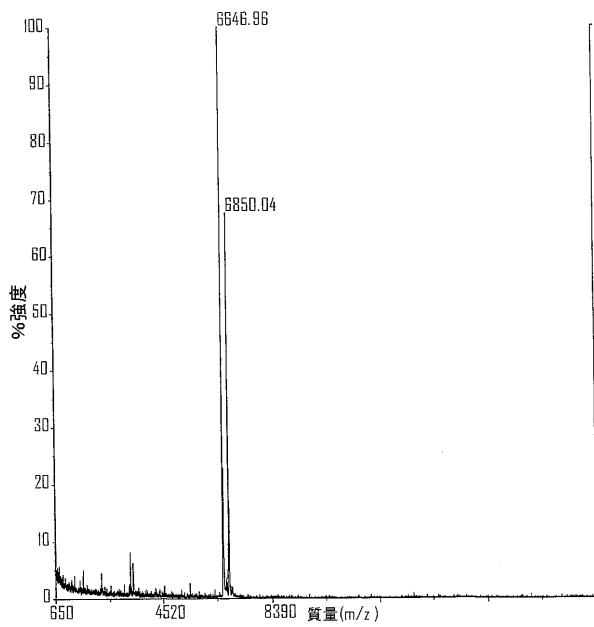
【図1】



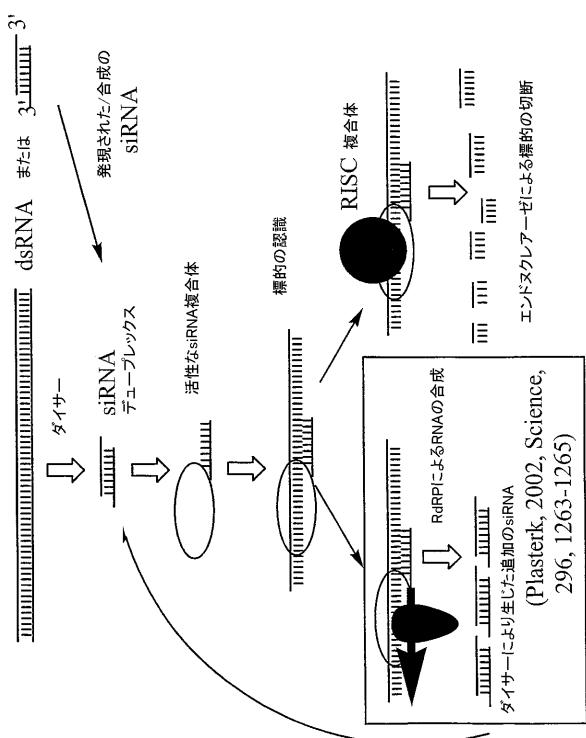
反転デオキシ無塩基スクシネット結合

グリセリルスクシネット結合

【図2】



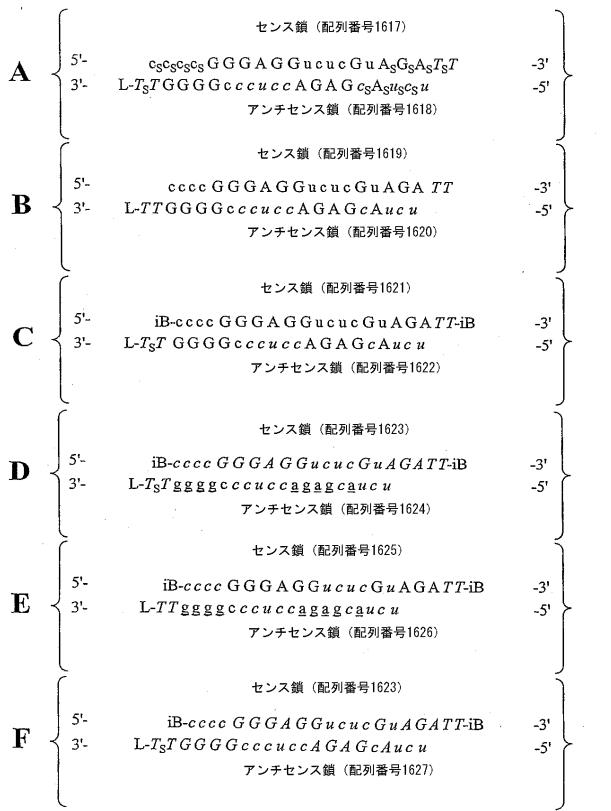
【図3】



【図4】

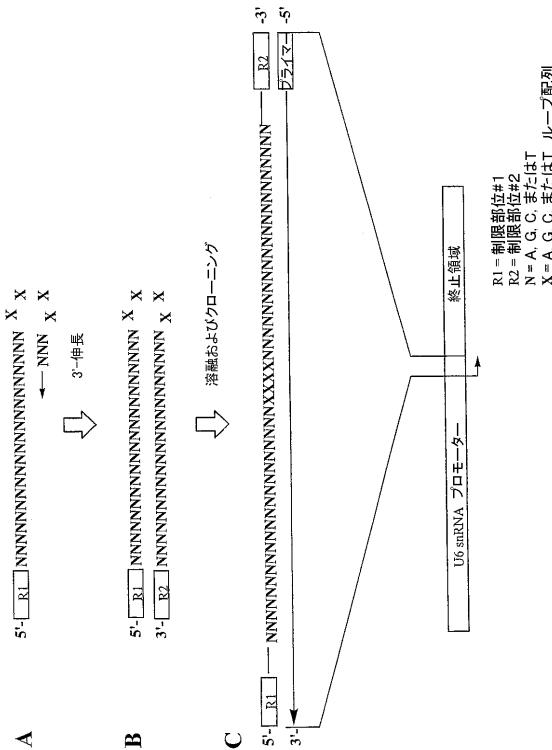
A	センス鎖 (配列番号1606) 全ピリミジン=位置(N,N)を除き2'-0-MEまたは2'-フルオロ N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub>N<sub>5</sub>N<sub>6</sub>N<sub>7</sub>N<sub>8</sub>N<sub>9</sub>N<sub>10</sub>N<sub>11</sub>N<sub>12</sub>N<sub>13</sub>N<sub>14</sub>N<sub>15</sub>N<sub>16</sub>N<sub>17</sub>N<sub>18</sub>N<sub>19</sub>N<sub>20</sub>(N<sub>21</sub>N<sub>22</sub>N<sub>23</sub>N<sub>24</sub>N<sub>25</sub>N<sub>26</sub>N<sub>27</sub>N<sub>28</sub>N<sub>29</sub>N<sub>30</sub>N<sub>31</sub>N<sub>32</sub>N<sub>33</sub>N<sub>34</sub>N<sub>35</sub>N<sub>36</sub>N<sub>37</sub>N<sub>38</sub>N<sub>39</sub>N<sub>40</sub>N<sub>41</sub>N<sub>42</sub>N<sub>43</sub>N<sub>44</sub>N<sub>45</sub>N<sub>46</sub>N<sub>47</sub>N<sub>48</sub>N<sub>49</sub>N<sub>50</sub>N<sub>51</sub>N<sub>52</sub>N<sub>53</sub>N<sub>54</sub>N<sub>55</sub>N<sub>56</sub>N<sub>57</sub>N<sub>58</sub>N<sub>59</sub>N<sub>60</sub>N<sub>61</sub>N<sub>62</sub>N<sub>63</sub>N<sub>64</sub>N<sub>65</sub>N<sub>66</sub>N<sub>67</sub>N<sub>68</sub>N<sub>69</sub>N<sub>70</sub>N<sub>71</sub>N<sub>72</sub>N<sub>73</sub>N<sub>74</sub>N<sub>75</sub>N<sub>76</sub>N<sub>77</sub>N<sub>78</sub>N<sub>79</sub>N<sub>80</sub>N<sub>81</sub>N<sub>82</sub>N<sub>83</sub>N<sub>84</sub>N<sub>85</sub>N<sub>86</sub>N<sub>87</sub>N<sub>88</sub>N<sub>89</sub>N<sub>90</sub>N<sub>91</sub>N<sub>92</sub>N<sub>93</sub>N<sub>94</sub>N<sub>95</sub>N<sub>96</sub>N<sub>97</sub>N<sub>98</sub>N<sub>99</sub>N<sub>100</sub>N<sub>101</sub>N<sub>102</sub>N<sub>103</sub>N<sub>104</sub>N<sub>105</sub>N<sub>106</sub>N<sub>107</sub>N<sub>108</sub>N<sub>109</sub>N<sub>110</sub>N<sub>111</sub>N<sub>112</sub>N<sub>113</sub>N<sub>114</sub>N<sub>115</sub>N<sub>116</sub>N<sub>117</sub>N<sub>118</sub>N<sub>119</sub>N<sub>120</sub>N<sub>121</sub>N<sub>122</sub>N<sub>123</sub>N<sub>124</sub>N<sub>125</sub>N<sub>126</sub>N<sub>127</sub>N<sub>128</sub>N<sub>129</sub>N<sub>130</sub>N<sub>131</sub>N<sub>132</sub>N<sub>133</sub>N<sub>134</sub>N<sub>135</sub>N<sub>136</sub>N<sub>137</sub>N<sub>138</sub>N<sub>139</sub>N<sub>140</sub>N<sub>141</sub>N<sub>142</sub>N<sub>143</sub>N<sub>144</sub>N<sub>145</sub>N<sub>146</sub>N<sub>147</sub>N<sub>148</sub>N<sub>149</sub>N<sub>150</sub>N<sub>151</sub>N<sub>152</sub>N<sub>153</sub>N<sub>154</sub>N<sub>155</sub>N<sub>156</sub>N<sub>157</sub>N<sub>158</sub>N<sub>159</sub>N<sub>160</sub>N<sub>161</sub>N<sub>162</sub>N<sub>163</sub>N<sub>164</sub>N<sub>165</sub>N<sub>166</sub>N<sub>167</sub>N<sub>168</sub>N<sub>169</sub>N<sub>170</sub>N<sub>171</sub>N<sub>172</sub>N<sub>173</sub>N<sub>174</sub>N<sub>175</sub>N<sub>176</sub>N<sub>177</sub>N<sub>178</sub>N<sub>179</sub>N<sub>180</sub>N<sub>181</sub>N<sub>182</sub>N<sub>183</sub>N<sub>184</sub>N<sub>185</sub>N<sub>186</sub>N<sub>187</sub>N<sub>188</sub>N<sub>189</sub>N<sub>190</sub>N<sub>191</sub>N<sub>192</sub>N<sub>193</sub>N<sub>194</sub>N<sub>195</sub>N<sub>196</sub>N<sub>197</sub>N<sub>198</sub>N<sub>199</sub>N<sub>200</sub>N<sub>201</sub>N<sub>202</sub>N<sub>203</sub>N<sub>204</sub>N<sub>205</sub>N<sub>206</sub>N<sub>207</sub>N<sub>208</sub>N<sub>209</sub>N<sub>210</sub>N<sub>211</sub>N<sub>212</sub>N<sub>213</sub>N<sub>214</sub>N<sub>215</sub>N<sub>216</sub>N<sub>217</sub>N<sub>218</sub>N<sub>219</sub>N<sub>220</sub>N<sub>221</sub>N<sub>222</sub>N<sub>223</sub>N<sub>224</sub>N<sub>225</sub>N<sub>226</sub>N<sub>227</sub>N<sub>228</sub>N<sub>229</sub>N<sub>230</sub>N<sub>231</sub>N<sub>232</sub>N<sub>233</sub>N<sub>234</sub>N<sub>235</sub>N<sub>236</sub>N<sub>237</sub>N<sub>238</sub>N<sub>239</sub>N<sub>240</sub>N<sub>241</sub>N<sub>242</sub>N<sub>243</sub>N<sub>244</sub>N<sub>245</sub>N<sub>246</sub>N<sub>247</sub>N<sub>248</sub>N<sub>249</sub>N<sub>250</sub>N<sub>251</sub>N<sub>252</sub>N<sub>253</sub>N<sub>254</sub>N<sub>255</sub>N<sub>256</sub>N<sub>257</sub>N<sub>258</sub>N<sub>259</sub>N<sub>260</sub>N<sub>261</sub>N<sub>262</sub>N<sub>263</sub>N<sub>264</sub>N<sub>265</sub>N<sub>266</sub>N<sub>267</sub>N<sub>268</sub>N<sub>269</sub>N<sub>270</sub>N<sub>271</sub>N<sub>272</sub>N<sub>273</sub>N<sub>274</sub>N<sub>275</sub>N<sub>276</sub>N<sub>277</sub>N<sub>278</sub>N<sub>279</sub>N<sub>280</sub>N<sub>281</sub>N<sub>282</sub>N<sub>283</sub>N<sub>284</sub>N<sub>285</sub>N<sub>286</sub>N<sub>287</sub>N<sub>288</sub>N<sub>289</sub>N<sub>290</sub>N<sub>291</sub>N<sub>292</sub>N<sub>293</sub>N<sub>294</sub>N<sub>295</sub>N<sub>296</sub>N<sub>297</sub>N<sub>298</sub>N<sub>299</sub>N<sub>300</sub>N<sub>301</sub>N<sub>302</sub>N<sub>303</sub>N<sub>304</sub>N<sub>305</sub>N<sub>306</sub>N<sub>307</sub>N<sub>308</sub>N<sub>309</sub>N<sub>310</sub>N<sub>311</sub>N<sub>312</sub>N<sub>313</sub>N<sub>314</sub>N<sub>315</sub>N<sub>316</sub>N<sub>317</sub>N<sub>318</sub>N<sub>319</sub>N<sub>320</sub>N<sub>321</sub>N<sub>322</sub>N<sub>323</sub>N<sub>324</sub>N<sub>325</sub>N<sub>326</sub>N<sub>327</sub>N<sub>328</sub>N<sub>329</sub>N<sub>330</sub>N<sub>331</sub>N<sub>332</sub>N<sub>333</sub>N<sub>334</sub>N<sub>335</sub>N<sub>336</sub>N<sub>337</sub>N<sub>338</sub>N<sub>339</sub>N<sub>340</sub>N<sub>341</sub>N<sub>342</sub>N<sub>343</sub>N<sub>344</sub>N<sub>345</sub>N<sub>346</sub>N<sub>347</sub>N<sub>348</sub>N<sub>349</sub>N<sub>350</sub>N<sub>351</sub>N<sub>352</sub>N<sub>353</sub>N<sub>354</sub>N<sub>355</sub>N<sub>356</sub>N<sub>357</sub>N<sub>358</sub>N<sub>359</sub>N<sub>360</sub>N<sub>361</sub>N<sub>362</sub>N<sub>363</sub>N<sub>364</sub>N<sub>365</sub>N<sub>366</sub>N<sub>367</sub>N<sub>368</sub>N<sub>369</sub>N<sub>370</sub>N<sub>371</sub>N<sub>372</sub>N<sub>373</sub>N<sub>374</sub>N<sub>375</sub>N<sub>376</sub>N<sub>377</sub>N<sub>378</sub>N<sub>379</sub>N<sub>380</sub>N<sub>381</sub>N<sub>382</sub>N<sub>383</sub>N<sub>384</sub>N<sub>385</sub>N<sub>386</sub>N<sub>387</sub>N<sub>388</sub>N<sub>389</sub>N<sub>390</sub>N<sub>391</sub>N<sub>392</sub>N<sub>393</sub>N<sub>394</sub>N<sub>395</sub>N<sub>396</sub>N<sub>397</sub>N<sub>398</sub>N<sub>399</sub>N<sub>400</sub>N<sub>401</sub>N<sub>402</sub>N<sub>403</sub>N<sub>404</sub>N<sub>405</sub>N<sub>406</sub>N<sub>407</sub>N<sub>408</sub>N<sub>409</sub>N<sub>410</sub>N<sub>411</sub>N<sub>412</sub>N<sub>413</sub>N<sub>414</sub>N<sub>415</sub>N<sub>416</sub>N<sub>417</sub>N<sub>418</sub>N<sub>419</sub>N<sub>420</sub>N<sub>421</sub>N<sub>422</sub>N<sub>423</sub>N<sub>424</sub>N<sub>425</sub>N<sub>426</sub>N<sub>427</sub>N<sub>428</sub>N<sub>429</sub>N<sub>430</sub>N<sub>431</sub>N<sub>432</sub>N<sub>433</sub>N<sub>434</sub>N<sub>435</sub>N<sub>436</sub>N<sub>437</sub>N<sub>438</sub>N<sub>439</sub>N<sub>440</sub>N<sub>441</sub>N<sub>442</sub>N<sub>443</sub>N<sub>444</sub>N<sub>445</sub>N<sub>446</sub>N<sub>447</sub>N<sub>448</sub>N<sub>449</sub>N<sub>450</sub>N<sub>451</sub>N<sub>452</sub>N<sub>453</sub>N<sub>454</sub>N<sub>455</sub>N<sub>456</sub>N<sub>457</sub>N<sub>458</sub>N<sub>459</sub>N<sub>460</sub>N<sub>461</sub>N<sub>462</sub>N<sub>463</sub>N<sub>464</sub>N<sub>465</sub>N<sub>466</sub>N<sub>467</sub>N<sub>468</sub>N<sub>469</sub>N<sub>470</sub>N<sub>471</sub>N<sub>472</sub>N<sub>473</sub>N<sub>474</sub>N<sub>475</sub>N<sub>476</sub>N<sub>477</sub>N<sub>478</sub>N<sub>479</sub>N<sub>480</sub>N<sub>481</sub>N<sub>482</sub>N<sub>483</sub>N<sub>484</sub>N<sub>485</sub>N<sub>486</sub>N<sub>487</sub>N<sub>488</sub>N<sub>489</sub>N<sub>490</sub>N<sub>491</sub>N<sub>492</sub>N<sub>493</sub>N<sub>494</sub>N<sub>495</sub>N<sub>496</sub>N<sub>497</sub>N<sub>498</sub>N<sub>499</sub>N<sub>500</sub>N<sub>501</sub>N<sub>502</sub>N<sub>503</sub>N<sub>504</sub>N<sub>505</sub>N<sub>506</sub>N<sub>507</sub>N<sub>508</sub>N<sub>509</sub>N<sub>510</sub>N<sub>511</sub>N<sub>512</sub>N<sub>513</sub>N<sub>514</sub>N<sub>515</sub>N<sub>516</sub>N<sub>517</sub>N<sub>518</sub>N<sub>519</sub>N<sub>520</sub>N<sub>521</sub>N<sub>522</sub>N<sub>523</sub>N<sub>524</sub>N<sub>525</sub>N<sub>526</sub>N<sub>527</sub>N<sub>528</sub>N<sub>529</sub>N<sub>530</sub>N<sub>531</sub>N<sub>532</sub>N<sub>533</sub>N<sub>534</sub>N<sub>535</sub>N<sub>536</sub>N<sub>537</sub>N<sub>538</sub>N<sub>539</sub>N<sub>540</sub>N<sub>541</sub>N<sub>542</sub>N<sub>543</sub>N<sub>544</sub>N<sub>545</sub>N<sub>546</sub>N<sub>547</sub>N<sub>548</sub>N<sub>549</sub>N<sub>550</sub>N<sub>551</sub>N<sub>552</sub>N<sub>553</sub>N<sub>554</sub>N<sub>555</sub>N<sub>556</sub>N<sub>557</sub>N<sub>558</sub>N<sub>559</sub>N<sub>560</sub>N<sub>561</sub>N<sub>562</sub>N<sub>563</sub>N<sub>564</sub>N<sub>565</sub>N<sub>566</sub>N<sub>567</sub>N<sub>568</sub>N<sub>569</sub>N<sub>570</sub>N<sub>571</sub>N<sub>572</sub>N<sub>573</sub>N<sub>574</sub>N<sub>575</sub>N<sub>576</sub>N<sub>577</sub>N<sub>578</sub>N<sub>579</sub>N<sub>580</sub>N<sub>581</sub>N<sub>582</sub>N<sub>583</sub>N<sub>584</sub>N<sub>585</sub>N<sub>586</sub>N<sub>587</sub>N<sub>588</sub>N<sub>589</sub>N<sub>590</sub>N<sub>591</sub>N<sub>592</sub>N<sub>593</sub>N<sub>594</sub>N<sub>595</sub>N<sub>596</sub>N<sub>597</sub>N<sub>598</sub>N<sub>599</sub>N<sub>600</sub>N<sub>601</sub>N<sub>602</sub>N<sub>603</sub>N<sub>604</sub>N<sub>605</sub>N<sub>606</sub>N<sub>607</sub>N<sub>608</sub>N<sub>609</sub>N<sub>610</sub>N<sub>611</sub>N<sub>612</sub>N<sub>613</sub>N<sub>614</sub>N<sub>615</sub>N<sub>616</sub>N<sub>617</sub>N<sub>618</sub>N<sub>619</sub>N<sub>620</sub>N<sub>621</sub>N<sub>622</sub>N<sub>623</sub>N<sub>624</sub>N<sub>625</sub>N<sub>626</sub>N<sub>627</sub>N<sub>628</sub>N<sub>629</sub>N<sub>630</sub>N<sub>631</sub>N<sub>632</sub>N<sub>633</sub>N<sub>634</sub>N<sub>635</sub>N<sub>636</sub>N<sub>637</sub>N<sub>638</sub>N<sub>639</sub>N<sub>640</sub>N<sub>641</sub>N<sub>642</sub>N<sub>643</sub>N<sub>644</sub>N<sub>645</sub>N<sub>646</sub>N<sub>647</sub>N<sub>648</sub>N<sub>649</sub>N<sub>650</sub>N<sub>651</sub>N<sub>652</sub>N<sub>653</sub>N<sub>654</sub>N<sub>655</sub>N<sub>656</sub>N<sub>657</sub>N<sub>658</sub>N<sub>659</sub>N<sub>660</sub>N<sub>661</sub>N<sub>662</sub>N<sub>663</sub>N<sub>664</sub>N<sub>665</sub>N<sub>666</sub>N<sub>667</sub>N<sub>668</sub>N<sub>669</sub>N<sub>670</sub>N<sub>671</sub>N<sub>672</sub>N<sub>673</sub>N<sub>674</sub>N<sub>675</sub>N<sub>676</sub>N<sub>677</sub>N<sub>678</sub>N<sub>679</sub>N<sub>680</sub>N<sub>681</sub>N<sub>682</sub>N<sub>683</sub>N<sub>684</sub>N<sub>685</sub>N<sub>686</sub>N<sub>687</sub>N<sub>688</sub>N<sub>689</sub>N<sub>690</sub>N<sub>691</sub>N<sub>692</sub>N<sub>693</sub>N<sub>694</sub>N<sub>695</sub>N<sub>696</sub>N<sub>697</sub>N<sub>698</sub>N<sub>699</sub>N<sub>700</sub>N<sub>701</sub>N<sub>702</sub>N<sub>703</sub>N<sub>704</sub>N<sub>705</sub>N<sub>706</sub>N<sub>707</sub>N<sub>708</sub>N<sub>709</sub>N<sub>710</sub>N<sub>711</sub>N<sub>712</sub>N<sub>713</sub>N<sub>714</sub>N<sub>715</sub>N<sub>716</sub>N<sub>717</sub>N<sub>718</sub>N<sub>719</sub>N<sub>720</sub>N<sub>721</sub>N<sub>722</sub>N<sub>723</sub>N<sub>724</sub>N<sub>725</sub>N<sub>726</sub>N<sub>727</sub>N<sub>728</sub>N<sub>729</sub>N<sub>730</sub>N<sub>731</sub>N<sub>732</sub>N<sub>733</sub>N<sub>734</sub>N<sub>735</sub>N<sub>736</sub>N<sub>737</sub>N<sub>738</sub>N<sub>739</sub>N<sub>740</sub>N<sub>741</sub>N<sub>742</sub>N<sub>743</sub>N<sub>744</sub>N<sub>745</sub>N<sub>746</sub>N<sub>747</sub>N<sub>748</sub>N<sub>749</sub>N<sub>750</sub>N<sub>751</sub>N<sub>752</sub>N<sub>753</sub>N<sub>754</sub>N<sub>755</sub>N<sub>756</sub>N<sub>757</sub>N<sub>758</sub>N<sub>759</sub>N<sub>760</sub>N<sub>761</sub>N<sub>762</sub>N<sub>763</sub>N<sub>764</sub>N<sub>765</sub>N<sub>766</sub>N<sub>767</sub>N<sub>768</sub>N<sub>769</sub>N<sub>770</sub>N<sub>771</sub>N<sub>772</sub>N<sub>773</sub>N<sub>774</sub>N<sub>775</sub>N<sub>776</sub>N<sub>777</sub>N<sub>778</sub>N<sub>779</sub>N<sub>780</sub>N<sub>781</sub>N<sub>782</sub>N<sub>783</sub>N<sub>784</sub>N<sub>785</sub>N<sub>786</sub>N<sub>787</sub>N<sub>788</sub>N<sub>789</sub>N<sub>790</sub>N<sub>791</sub>N<sub>792</sub>N<sub>793</sub>N<sub>794</sub>N<sub>795</sub>N<sub>796</sub>N<sub>797</sub>N<sub>798</sub>N<sub>799</sub>N<sub>800</sub>N<sub>801</sub>N<sub>802</sub>N<sub>803</sub>N<sub>804</sub>N<sub>805</sub>N<sub>806</sub>N<sub>807</sub>N<sub>808</sub>N<sub>809</sub>N<sub>810</sub>N<sub>811</sub>N<sub>812</sub>N<sub>813</sub>N<sub>814</sub>N<sub>815</sub>N<sub>816</sub>N<sub>817</sub>N<sub>818</sub>N<sub>819</sub>N<sub>820</sub>N<sub>821</sub>N<sub>822</sub>N<sub>823</sub>N<sub>824</sub>N<sub>825</sub>N<sub>826</sub>N<sub>827</sub>N<sub>828</sub>N<sub>829</sub>N<sub>830</sub>N<sub>831</sub>N<sub>832</sub>N<sub>833</sub>N<sub>834</sub>N<sub>835</sub>N<sub>836</sub>N<sub>837</sub>N<sub>838</sub>N<sub>839</sub>N<sub>840</sub>N<sub>841</sub>N<sub>842</sub>N<sub>843</sub>N<sub>844</sub>N<sub>845</sub>N<sub>846</sub>N<sub>847</sub>N<sub>848</sub>N<sub>849</sub>N<sub>850</sub>N<sub>851</sub>N<sub>852</sub>N<sub>853</sub>N<sub>854</sub>N<sub>855</sub>N<sub>856</sub>N<sub>857</sub>N<sub>858</sub>N<sub>859</sub>N<sub>860</sub>N<sub>861</sub>N<sub>862</sub>N<sub>863</sub>N<sub>864</sub>N<sub>865</sub>N<sub>866</sub>N<sub>867</sub>N<sub>868</sub>N<sub>869</sub>N<sub>870</sub>N<sub>871</sub>N<sub>872</sub>N<sub>873</sub>N<sub>874</sub>N<sub>875</sub>N<sub>876</sub>N<sub>877</sub>N<sub>878</sub>N<sub>879</sub>N<sub>880</sub>N<sub>881</sub>N<sub>882</sub>N<sub>883</sub>N<sub>884</sub>N<sub>885</sub>N<sub>886</sub>N<sub>887</sub>N<sub>888</sub>N<sub>889</sub>N<sub>890</sub>N<sub>891</sub>N<sub>892</sub>N<sub>893</sub>N<sub>894</sub>N<sub>895</sub>N<sub>896</sub>N<sub>897</sub>N<sub>898</sub>N<sub>899</sub>N<sub>900</sub>N<sub>901</sub>N<sub>902</sub>N<sub>903</sub>N<sub>904</sub>N<sub>905</sub>N<sub>906</sub>N<sub>907</sub>N<sub>908</sub>N<sub>909</sub>N<sub>910</sub>N<sub>911</sub>N<sub>912</sub>N<sub>913</sub>N<sub>914</sub>N<sub>915</sub>N<sub>916</sub>N<sub>917</sub>N<sub>918</sub>N<sub>919</sub>N<sub>920</sub>N<sub>921</sub>N<sub>922</sub>N<sub>923</sub>N<sub>924</sub>N<sub>925</sub>N<sub>926</sub>N<sub>927</sub>N<sub>928</sub>N<sub>929</sub>N<sub>930</sub>N<sub>931</sub>N<sub>932</sub>N<sub>933</sub>N<sub>934</sub>N<sub>935</sub>N<sub>936</sub>N<sub>937</sub>N<sub>938</sub>N<sub>939</sub>N<sub>940</sub>N<sub>941</sub>N<sub>942</sub>N<sub>943</sub>N<sub>944</sub>N<sub>945</sub>N<sub>946</sub>N<sub>947</sub>N<sub>948</sub>N<sub>949</sub>N<sub>950</sub>N<sub>951</sub>N<sub>952</sub>N<sub>953</sub>N<sub>954</sub>N<sub>955</sub>N<sub>956</sub>N<sub>957</sub>N<sub>958</sub>N<sub>959</sub>N<sub>960</sub>N<sub>961</sub>N<sub>962</sub>N<sub>963</sub>N<sub>964</sub>N<sub>965</sub>N<sub>966</sub>N<sub>967</sub>N<sub>968</sub>N<sub>969</sub>N<sub>970</sub>N<sub>971</sub>N<sub>972</sub>N<sub>973</sub>N<sub>974</sub>N<sub>975</sub>N<sub>976</sub>N<sub>977</sub>N<sub>978</sub>N<sub>979</sub>N<sub>980</sub>N<sub>981</sub>N<sub>982</sub>N<sub>983</sub>N<sub>984</sub>N<sub>985</sub>N<sub>986</sub>N<sub>987</sub>N<sub>988</sub>N<sub>989</sub>N<sub>990</sub>N<sub>991</sub>N<sub>992</sub>N<sub>993</sub>N<sub>994</sub>N<sub>995</sub>N<sub>996</sub>N<sub>997</sub>N<sub>998</sub>N<sub>999</sub>N<sub>1000</sub>N<sub>1001</sub>N<sub>1002</sub>N<sub>1003</sub>N<sub>1004</sub>N<sub>1005</sub>N<sub>1006</sub>N<sub>1007</sub>N<sub>1008</sub>N<sub>1009</sub>N<sub>1010</sub>N<sub>1011</sub>N<sub>1012</sub>N<sub>1013</sub>N<sub>1014</sub>N<sub>1015</sub>N<sub>1016</sub>N<sub>1017</sub>N<sub>1018</sub>N<sub>1019</sub>N<sub>1020</sub>N<sub>1021</sub>N<sub>1022</sub>N<sub>1023</sub>N<sub>1024</sub>N<sub>1025</sub>N<sub>1026</sub>N<sub>1027</sub>N<sub>1028</sub>N<sub>1029</sub>N<sub>1030</sub>N<sub>1031</sub>N<sub>1032</sub>N<sub>1033</sub>N<sub>1034</sub>N<sub>1035</sub>N<sub>1036</sub>N<sub>1037</sub>N<sub>1038</sub>N<sub>1039</sub>N<sub>1040</sub>N<sub>1041</sub>N<sub>1042</sub>N<sub>1043</sub>N<sub>1044</sub>N<sub>1045</sub>N<sub>1046</sub>N<sub>1047</sub>N<sub>1048</sub>N<sub>1049</sub>N<sub>1050</sub>N<sub>1051</sub>N<sub>1052</sub>N<sub>1053</sub>N<sub>1054</sub>N<sub>1055</sub>N<sub>1056</sub>N<sub>1057</sub>N<sub>1058</sub>N<sub>1059</sub>N<sub>1060</sub>N<sub>1061</sub>N<sub>1062</sub>N<sub>1063</sub>N<sub>1064</sub>N<sub>1065</sub>N<sub>1066</sub>N<sub>1067</sub>N<sub>1068</sub>N<sub>1069</sub>N<sub>1070</sub>N<sub>1071</sub>N<sub>1072</sub>N<sub>1073</sub>N<sub>1074</sub>N<sub>1075</sub>N<sub>1076</sub>N<sub>1077</sub>N<sub>1078</sub>N<sub>1079</sub>N<sub>1080</sub>N<sub>1081</sub>N<sub>1082</sub>N<sub>1083</sub>N<sub>1084</sub>N<sub>1085</sub>N<sub>1086</sub>N<sub>1087</sub>N<sub>1088</sub>N<sub>1089</sub>N<sub>1090</sub>N<sub>1091</sub>N<sub>1092</sub>N<sub>1093</sub>N<sub>1094</sub>N<sub>1095</sub>N<sub>1096</sub>N<sub>1097</sub>N<sub>1098</sub>N<sub>1099</sub>N<sub>1100</sub>N<sub>110</sub>

【 図 5 】

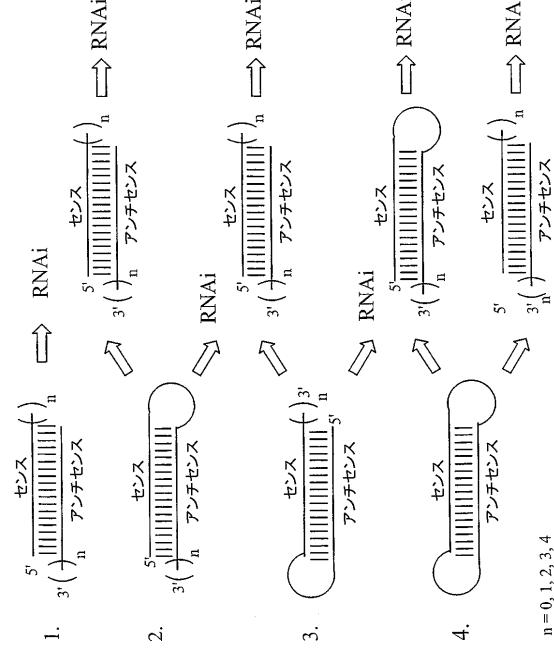


小文字=2'-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ イタリック大文字=デオキシ  
イタリック小文字=2'-デオキシ-2'-フルオロ B=反転デオキシ塗基  
下線=2'-メチル L=任意に直してもよいグリセリル成分  
S=ホスホジチオエートまたは  
ホスホジオキエート

【 図 7 】

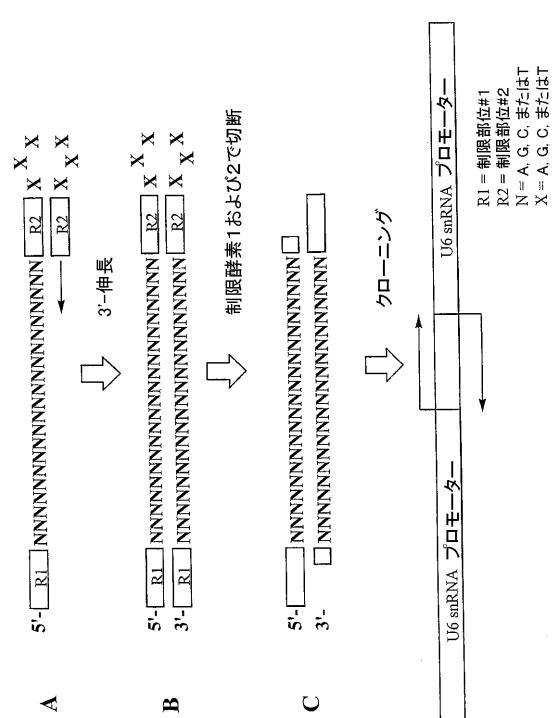


【 図 6 】

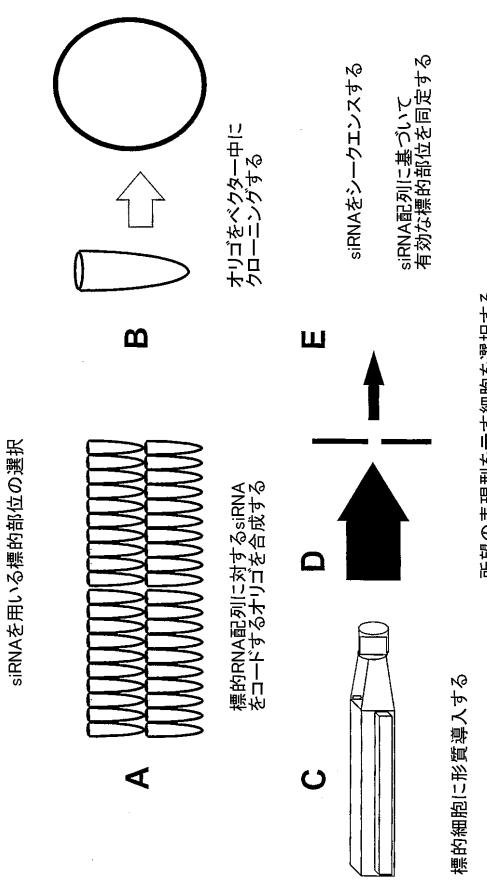


$$n = 0, 1, 2, 3, 4$$

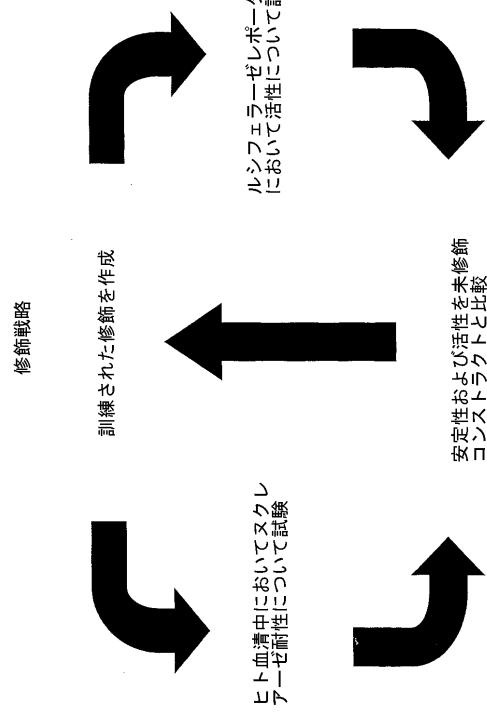
〔 四 8 〕



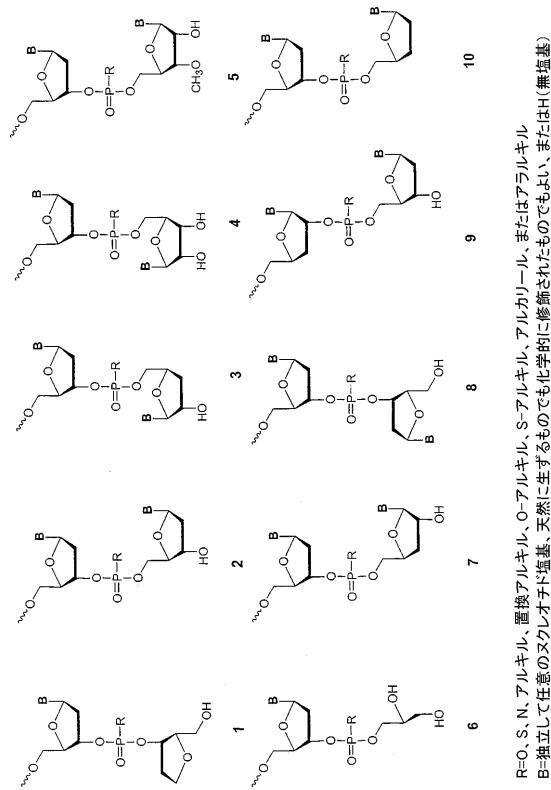
【図 9】



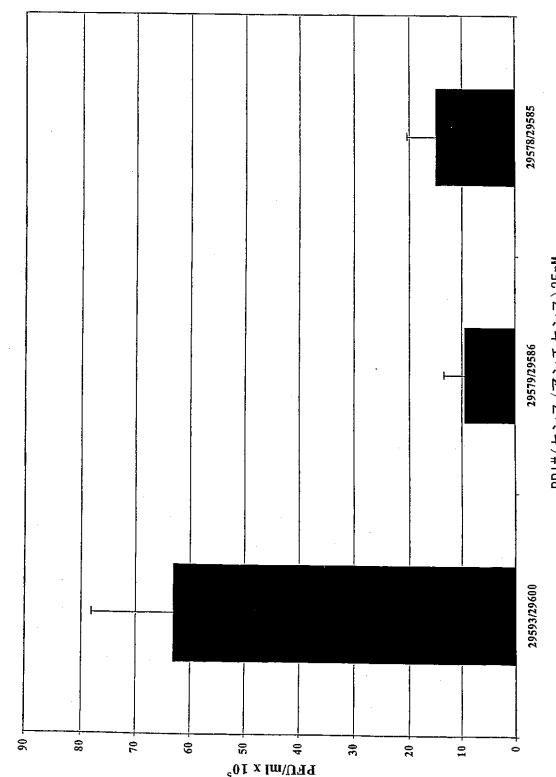
【図 11】



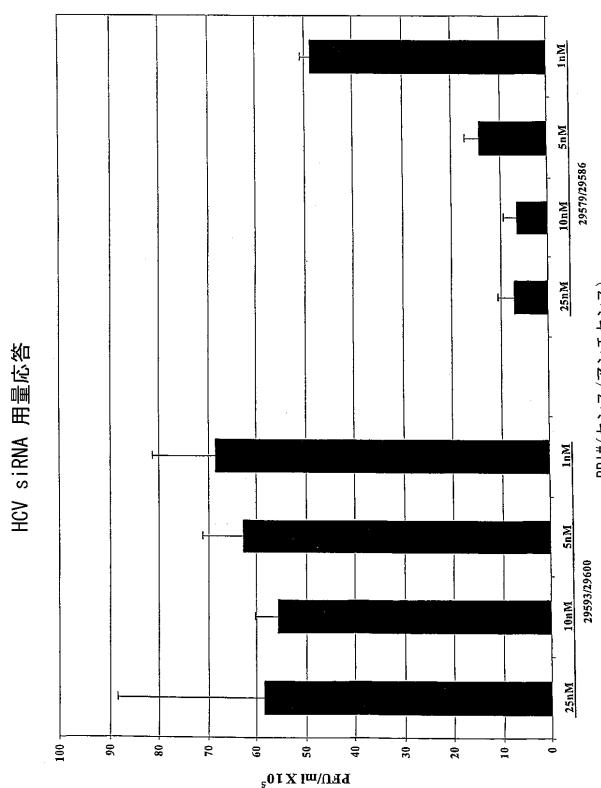
【図 10】



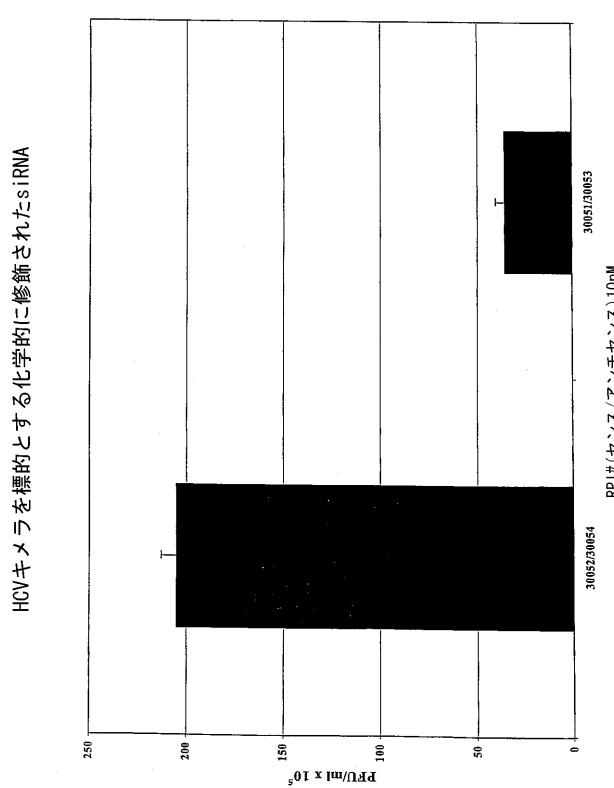
【図 12】



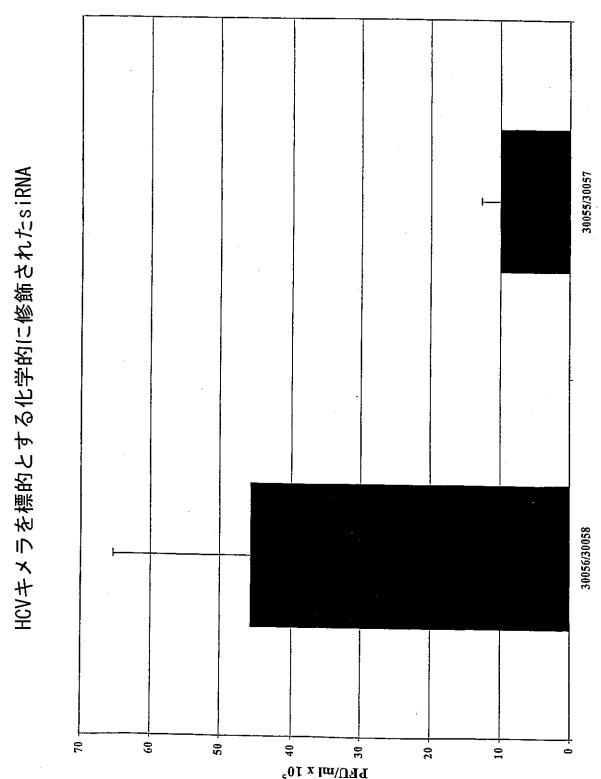
【図13】



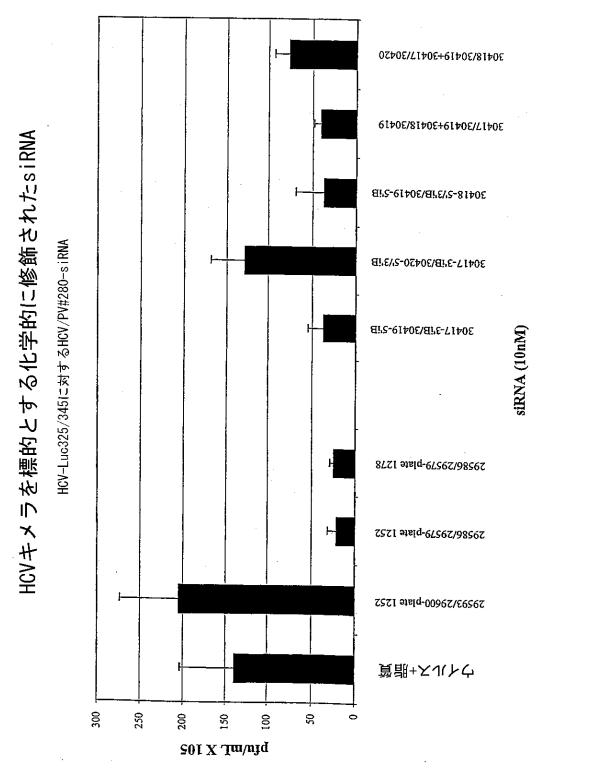
【図14】



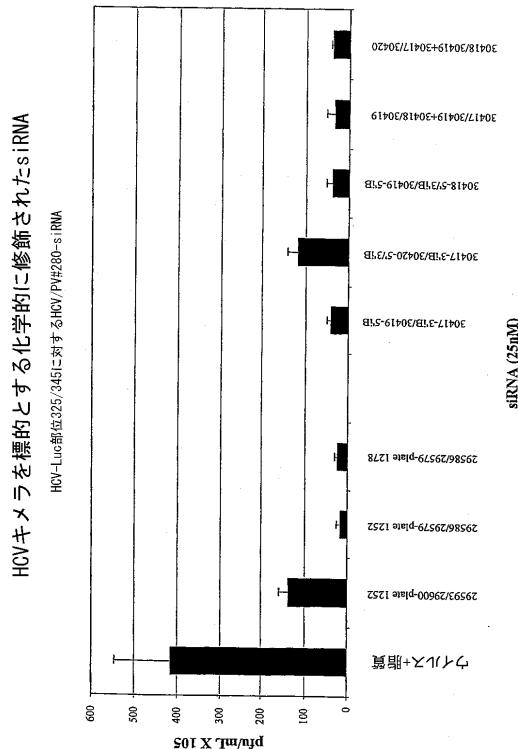
【図15】



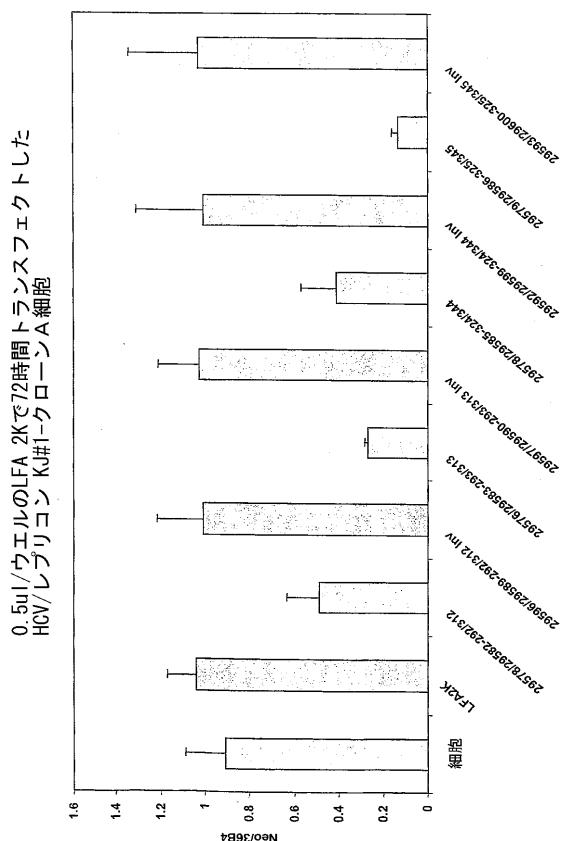
【図16】



【図17】



【図18】



## 【手続補正書】

【提出日】平成16年5月17日(2004.5.17)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

RNA干渉(RNAi)によりC型肝炎ウイルス(HCV)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(siRNA)分子であって、

a. 前記siRNA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siRNA分子の一方の鎖は、前記HCV RNAに対してsiRNA分子がRNA干渉によりHCV 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siRNA分子は、少なくとも1つ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、  
 ことを特徴とするsiRNA分子。

## 【請求項2】

前記siRNA分子がリボヌクレオチドを含まない、請求項1記載のsiRNA分子。

## 【請求項3】

前記siRNA分子が1またはそれ以上のリボヌクレオチドを含む、請求項1記載のsiRNA分子。

## 【請求項4】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-デオキシ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】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロ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 6】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが 2' - O - メチル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 7】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドがホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む，請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 8】

前記非ヌクレオチドが無塩基成分を含む，請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 9】

前記無塩基成分が反転デオキシ無塩基成分を含む，請求項 8 記載の s i N A 分子。

【請求項 10】

前記非ヌクレオチドがグリセリル成分を含む，請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 11】

前記二本鎖 s i N A 分子の一方の鎖が H C V 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 s i N A 分子の第 2 の鎖が前記 H C V R N A のヌクレオチド配列またはその一部と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 12】

s i N A 分子の各鎖が約 19 - 約 23 ヌクレオチドを含み，各鎖が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 11 記載の s i N A 分子。

【請求項 13】

前記 s i N A 分子は H C V 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 H C V 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と実質的に同一の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 13 記載の s i N A 分子。

【請求項 15】

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，H C V 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 16】

前記 s i N A 分子が 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，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 13 記載の s i N A 分子。

【請求項 17】

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 13 記載の s i N A 分子。

【請求項 18】

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 17 記載の s i N A 分子。

【請求項 19】

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 17 記載の s i N A 分子。

【請求項 20】

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13記載のs i N A分子。

【請求項21】

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13記載のs i N A分子。

【請求項22】

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13記載のs i N A分子。

【請求項23】

前記センス領域を含むフラグメントが，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16記載のs i N A分子。

【請求項24】

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23記載のs i N A分子。

【請求項25】

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13記載のs i N A分子。

【請求項26】

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13記載のs i N A分子。

【請求項27】

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13記載のs i N A分子。

【請求項28】

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13記載のs i N A分子。

【請求項29】

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13記載のs i N A分子。

【請求項30】

前記s i N A分子の2つのフラグメントのそれぞれが2'ヌクレオチドを含む，請求項16記載のs i N A分子。

【請求項31】

s i N A分子の各フラグメントの約19ヌクレオチドが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'末端ヌクレオチドが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30記載のs i N A分子。

【請求項32】

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31記載のs i N A分子。

【請求項33】

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32記載のs i N A分子。

【請求項34】

s i N A分子の各フラグメントの2'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30記載のs i N A分子。

【請求項35】

アンチセンス領域の約19ヌクレオチドがH C V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30記載のs i N A分子。

**【請求項 3 6】**

アンチセンス領域の 21 ヌクレオチドが HCV 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と塩基対形成している，請求項 30 記載の siRNA 分子。

**【請求項 3 7】**

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んでいてもよい，請求項 16 記載の siRNA 分子。

**【請求項 3 8】**

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

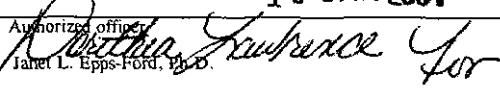
**【請求項 3 9】**

前記 HCV RNA が HCV マイナス鎖 RNA を含む，請求項 1 記載の siRNA 分子。

**【請求項 4 0】**

前記 HCV RNA が HCV プラス鎖 RNA を含む，請求項 1 記載の siRNA 分子。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/05043												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12Q 1/68; C07H 21/02, 21/04 US CL : 435/6; 536/23.1, 24.3, 24.31, 24.33, 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, 24.3, 24.31, 24.33, 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) Please See Continuation Sheet														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y, P</td> <td style="padding: 2px;">MCCAFFREY et al. RNA interference in adult mice. <i>Nature</i>. 04 July 2002, Vol. 418, pages 38-39, see entire document.</td> <td style="padding: 2px;">I-35</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y, P</td> <td style="padding: 2px;">RANDALL et al. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. <i>PNAS</i>. January 2003, Vol. 100, No. 1, pages 235-240, especially page 235, materials and methods section.</td> <td style="padding: 2px;">I-35</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">FIRE et al. Potent and Specific genetic interference by double-stranded RNA in <i>Caenorhabditis elegans</i>. <i>Nature</i>. 19 February 1998, Vol. 391, pages 806-811, especially page 808, Figure 1.</td> <td style="padding: 2px;">I-35</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y, P	MCCAFFREY et al. RNA interference in adult mice. <i>Nature</i> . 04 July 2002, Vol. 418, pages 38-39, see entire document.	I-35	Y, P	RANDALL et al. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. <i>PNAS</i> . January 2003, Vol. 100, No. 1, pages 235-240, especially page 235, materials and methods section.	I-35	A	FIRE et al. Potent and Specific genetic interference by double-stranded RNA in <i>Caenorhabditis elegans</i> . <i>Nature</i> . 19 February 1998, Vol. 391, pages 806-811, especially page 808, Figure 1.	I-35
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y, P	MCCAFFREY et al. RNA interference in adult mice. <i>Nature</i> . 04 July 2002, Vol. 418, pages 38-39, see entire document.	I-35												
Y, P	RANDALL et al. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. <i>PNAS</i> . January 2003, Vol. 100, No. 1, pages 235-240, especially page 235, materials and methods section.	I-35												
A	FIRE et al. Potent and Specific genetic interference by double-stranded RNA in <i>Caenorhabditis elegans</i> . <i>Nature</i> . 19 February 1998, Vol. 391, pages 806-811, especially page 808, Figure 1.	I-35												
<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 *E* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 10 October 2003 (10.10.2003)		Date of mailing of the international search report 16 JAN 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  Janet L. Epps-Ford, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196												

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/05043

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**  
CAplus, Biosis, Medline, USPatfull, Patfull, EPO, JPO, Derwent  
search terms: hepatitis C virus, HCV, dsRNA, short interfering nucleic acid, siRNA, siNA

## 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 61 P 35/00	A 61 P 35/00	
A 61 P 43/00	A 61 P 43/00	105

(31) 優先権主張番号 60/386,782  
 (32) 優先日 平成14年6月6日(2002.6.6)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 60/401,104  
 (32) 優先日 平成14年8月5日(2002.8.5)  
 (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,MX,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 マクスウェイゲン, ジェームズ  
 アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー, フランクリン ドライブ 4866  
 (72) 発明者 ベージエルマン, レオニド  
 アメリカ合衆国 80503 コロラド州 ロングモント, コルト ドライブ 5530  
 (72) 発明者 マケジャク, デニス  
 アメリカ合衆国 80004 コロラド州 アルバダ, ユニオン ストリート 6595  
 (72) 発明者 モーリセイ, デイビッド  
 アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー, タングルウッド トレイル 4769  
 F ターム(参考) 4B024 AA01 BA33 CA04 CA05 CA10 CA11 DA03 HA17  
 4C084 AA13 NA14 ZA751 ZB212 ZB261 ZB331  
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 NA14  
 ZA75 ZB21 ZB26 ZB33