

(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.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/14	
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
(86) (22) 出願日	平成15年2月20日 (2003. 2. 20)		サーナ・セラピューティクス・インコーポ
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月17日 (2004. 5. 17)		レイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/005043		Sirna Therapeutics,
(87) 国際公開番号	W02003/070750		Inc.
(87) 国際公開日	平成15年8月28日 (2003. 8. 28)		アメリカ合衆国コロラド州80301, ボ
(31) 優先権主張番号	60/358, 580		ウルダー, ウィルダーネス・プレイス 2
(32) 優先日	平成14年2月20日 (2002. 2. 20)		950
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	60/363, 124		弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成14年3月11日 (2002. 3. 11)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森田 耕司
(31) 優先権主張番号	PCT/US02/09187	(74) 代理人	100105991
(32) 優先日	平成14年3月26日 (2002. 3. 26)		弁理士 田中 玲子
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 短干渉核酸 (s i N A) を用いる C 型肝炎ウイルス (H C V) 遺伝子発現の R N A 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(HCV)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(HCV)の遺伝子の発現および/または活性に対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる小核酸分子、例えば、短干渉核酸(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、HCV感染、肝不全、肝細胞癌、肝硬変、およびHCV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。

【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。

40

【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 21 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 21 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 21 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siNA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siNA分子を含む、医薬組成物。

【請求項33】

請求項1記載のsiNA分子を含む医薬品。

【請求項34】

請求項1記載のsiNA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(siNA)分子の使用であって、ここで、二本鎖siNA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siNA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、McSwiggen, 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ตอบสนอง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ตอบสนอง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(siNA)、短干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、および短ヘアピンRNA(shRNA)分子に関連する。

【背景技術】

【0003】

以下はRNAiに関係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) の生成に应答して、相同的一本鎖 RNA またはウイルスゲノム RNA を特異的に破壊する細胞応答により進化してきたのであろう。細胞における dsRNA の存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi 応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼ PKR および 2', 5' - オリゴアデニレートシンターゼの dsRNA 媒介性活性化の結果リボヌクレアーゼ L による mRNA の非特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 (Bernstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干渉 RNA は、典型的には約 21 - 23 ヌクレオチドの長さであり、約 19 塩基対のデュプレックスを含む (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示唆されている保存された構造の前駆体 RNA から 21 および 22 ヌクレオチドの小さな一時的 RNA (stRNA) を切り出すことに関与することが示唆されている (Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi 応答はまた、一般に RNA 誘導性サイレンシング複合体 (RISC) と称されるエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これは siRNA デュプレックスのアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖 RNA の切断を媒介する。標的 RNA の切断は、siRNA デュプレックスのアンチセンス鎖に相補的な領域の中央部で生ずる (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。

20

【0006】

RNAi は種々の系で研究されてきた。Fire ら (1998, Nature, 391, 806) は、C. Elegans において最初に RNAi を観察した。Wianny および Goetz (1999, Nature Cell Biol., 2, 70) は、マウス胚において dsRNA により媒介される RNAi を記載する。Hammond ら (2000, Nature, 404, 293) は、dsRNA でトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞における RNAi を記載する。Elbashir ら (2001, Nature, 411, 494) は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞および HeLa 細胞において、合成の 21 ヌクレオチド RNA のデュプレックスを導入することにより誘導される RNAi を記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究 (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877) は、効率的な RNAi 活性を媒介するために必須である siRNA の長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21 ヌクレオチドの siRNA デュプレックスは 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 al., 2001, Nature, 409, 695)。

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デュプレックスの3'末端ヌクレオチドのオーバーハングしているセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置き換えても、RNAi活性に有害な影響を有しないことが示されている。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ヌクレオチドで置換すると、特にウリジンからチミジンおよび/またはシチジンからデオキシシチジンへの置換の場合に、干渉活性が実質的に減少することを見いだした(同上)。さらに、著者らは、ある種の塩基修飾、例えば、siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖において、ウラシルの代わりに4-チオウラシル、5-プロモウラシル、5-ヨードウラシル、および3-(アミノアリル)ウラシル、およびグアニンの代わりにイノシンの置換を試験した。4-チオウラシルおよび5-プロモウラシル置換は許容されたように見えたが、Parrishは、イノシンはいずれの鎖に取り込まれたときにも干渉活性における実質的な減少を生じたことを報告している。Parrishはまた、アンチセンス鎖における5-ヨードウラシルおよび3-(アミノアリル)ウラシルの取り込みによっても、RNAi活性が実質的に減少したことを報告している。

【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させるためにRNAiを用いることが

できることは疑わしいと述べている。Liら（国際公開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-Goez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に関連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

【0010】

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

20

30

40

【0011】

McCaffreyら（2002, Nature, 418, 38-39）は、マウスにおけるキメラHC VNS5B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】

50

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 l 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 l 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

、Genbank 受託番号 NM_031991.1 および XM_042972.3) の遺伝子の発現を調節する 1 またはそれ以上の siNA 分子および方法の特徴とする。

【0017】

HCV ゲノムの高い配列変異性のため、広い治療用途のための siNA 分子の選択には、HCV 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、HCV ゲノムの保存領域を標的とする siNA 分子に関する。HCV 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 (NCR, 5' - 非転写領域, UTR 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' - NCR が含まれる。HCV ゲノム RNA は、5' - NCR 中に内部リボソームエンタリー部位 (IRES) 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 (Wang et al., 1993, J. Virol., 67, 3338-44)。HCV RNA 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 15 種が存在するが (Simmonds, 1995, Hepatology, 21, 570-583)、HCV の 5' - NCR 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 IRES メカニズムを保存しているためであろう (Okamoto et al., 1991, J. General Virol., 72, 2697-2704)。したがって、HCV の異なる単離物のすべてを標的とするよう siNA 分子を設計することができる。種々の HCV 単離物の保存領域を標的とするよう設計された siNA 分子は、様々な患者集団において HCV 複製の有効な阻害を可能とし、HCV ゲノムの非保存領域における変異により進化する HCV 偽種に対する siNA 分子の有効性を確実に 10
20
30
40
50

【0018】

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、HCV および/または HCV 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 GenBank 受託番号により表される配列 (本明細書において一般に HCV 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 siNA 分子および方法の特徴とする。以下に、例示的 C 型肝炎ウイルス (HCV) 遺伝子 (本明細書において一般に HCV 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 HCV 遺伝子、例えば変異 HCV 遺伝子、HCV 遺伝子のスプライシング変種、および異なる株の HCV をコードする遺伝子、ならびに HCV 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、HCV 経路に関与する他の遺伝子、例えば、HCV 感染、肝不全、肝細胞癌、および肝硬変の維持および/または発達に関連する細胞蛋白質をコードする遺伝子、または HCV 感染に関連する他の蛋白質、例えば HCV 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、HCV 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 30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

されるように，“H C V”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。

【0019】

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

【0020】

1つの態様においては，本発明は，H C V R N Aに対するR N A i活性を有する s i N A分子を特徴とし，s i N A分子は，H C Vを有する任意のR N Aに相補的な配列またはH C Vがコードする他の配列，例えば表Iに示されるG e n B a n k受託番号を有する配列を含む。表I I IおよびI Vまたは本明細書に示される化学修飾を，本発明の任意の s i N Aコンストラクトに適用することができる。

10

【0021】

1つの態様においては，本発明は，H C V R N Aに対するR N A i活性を有する s i N A分子を特徴とし，s i N A分子は，H C Vコーディング配列，例えば，表Iに示されるH C VのG e n B a n k受託番号を有する配列を有する任意のR N Aに相補的な配列を含む。表I I IおよびI Vまたは本明細書に示される化学修飾を本発明の任意の s i N Aコンストラクトに適用することができる。

【0022】

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

20

【0023】

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。

30

【0024】

1つの態様においては，H C V s i N A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，H C V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

40

50

列番号 1 6 1 3 の配列を含むことができる。センス領域は配列番号 1 6 1 4 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 1 6 1 5 の配列を含むことができる。センス領域は配列番号 1 6 1 2 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 1 6 1 6 の配列を含むことができる。

【 0 0 2 5 】

1 つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、配列番号 1 - 1 6 2 7 のいずれかを含む。配列番号 1 - 1 6 2 7 に示される配列は限定的なものではない。本発明の *s i N A* 分子は、任意の連続する *H C V* 配列（例えば、約 1 9 - 約 2 5 個、または約 1 9 , 2 0 , 2 1 , 2 2 , 2 3 , 2 4 , または 2 5 個の連続する *H C V* ヌクレオチド）を含むことができる。

10

【 0 0 2 6 】

さらに別の態様においては、本発明は、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を含む配列または配列の一部に相補的な配列、例えば、*s i N A* コンストラクトのアンチセンス配列を含む *s i N A* 分子を特徴とする。表 I I I および I V 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 *s i R N A* コンストラクトに適用することができる。

【 0 0 2 7 】

本発明の 1 つの態様においては、*s i N A* 分子は、約 1 9 - 約 2 9 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、*H C V* 蛋白質をコードする *R N A* 配列に相補的であり、*s i N A* はさらに約 1 9 - 約 2 9（例えば、約 1 9 , 2 0 , 2 1 , 2 2 , 2 3 , 2 4 , 2 5 , 2 6 , 2 7 , 2 8 または 2 9）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 1 9 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

【 0 0 2 8 】

本発明の別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、約 1 9 - 約 2 9（例えば、約 1 9 , 2 0 , 2 1 , 2 2 , 2 3 , 2 4 , 2 5 , 2 6 , 2 7 , 2 8 または 2 9）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 *H C V* 蛋白質をコードする *R N A* 配列に相補的であり、*s i N A* はさらに約 1 9 - 約 2 9 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 1 9 の相補的ヌクレオチドを有する直鎖状分子を含む。

30

【 0 0 2 9 】

本発明の 1 つの態様においては、*s i N A* 分子は、*H C V* 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。*s i N A* はさらにセンス鎖を含み、センス鎖は *H C V* 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む。

【 0 0 3 0 】

別の態様においては、*s i N A* 分子は、*H C V* 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。*s i N A* 分子はさらにセンス領域を含み、センス領域は *H C V* 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む。

40

【 0 0 3 1 】

1 つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、*H C V* 遺伝子によりコードされる *R N A* の発現を調節する *R N A i* 活性を有する。*H C V* 遺伝子は互いにある程度の配列ホモロジーを共有することができるため、*s i N A* 分子は、異なる *H C V* 標的の間で共有されているかまたは特定の *H C V* 標的にユニークな配列を選択することにより、一群の *H C V* 遺伝子を標的とするか、または特定の *H C V* 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、*s i N A* 分子は、1 つの *s i N A* 分子でいくつかの *H C V* 遺伝子（例えば、異なる *H C V* 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 *H C V* 遺伝子間でホモロジーを有する *H C V* *R N A* 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プレックス、例えば、約 19 塩基対および 3' 末端モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、またはトリヌクレオチドオーバーハングを有する約 21 のヌクレオチドのデュプレックスを含む。

10

【 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示されている。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十分に許容され、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示される。

20

【 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。

30

40

【 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

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ナーまたは非ヌクレオチドリナ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（HCV）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、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な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な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（HCV）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 *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。

10

【 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。

20

【 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。

30

【 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，インビボ安定性および生物利用性の潜在的な制限を解消する有力な道具を提供する。例えば，化学的に修飾された核酸分子は血清中でより長い半減期を有する傾向にあるため，化学的に修飾された核酸分子を用いることにより，所定の治療効果に必要な特定の核酸分子の投与量を低下させることができる。さらに，ある種の化学的修飾は，特定の細胞または組織を標的とすることにより，および/または核酸分子の細胞取り込みを改良することにより，核酸分子の生物利用性を改良することができる。したがって，化学的に修飾された核酸分子の活性が，天然の核酸分子と比較して，例えば，全 *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

40

50

きる。

【0047】

本発明の *s i N A* 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 *s i N A* 分子の 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングは、核酸の糖、塩基、または骨格で化学的に修飾されたりボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含むことができる。3' 末端ヌクレオチドオーバーハングは、1 またはそれ以上の万能塩基リボヌクレオチドを含むことができる。3' 末端ヌクレオチドオーバーハングは、1 またはそれ以上の非環状ヌクレオチドを含むことができる。

10

【0048】

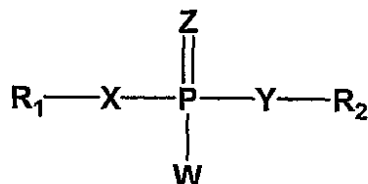
本発明の 1 つの態様は、本発明の少なくとも 1 つの *s i N A* 分子をコードする核酸配列を、核酸分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを提供する。本発明の別の態様は、そのような発現ベクターを含む哺乳動物細胞を提供する。哺乳動物細胞はヒト細胞であってもよい。発現ベクターの *s i N A* 分子は、センス領域およびアンチセンス領域を含むことができる。アンチセンス領域は *H C V* をコードする *R N A* または *D N A* 配列に相補的な配列を含むことができ、センス領域はアンチセンス領域に相補的な配列を含むことができる。*s i N A* 分子は、相補的なセンス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

【化 1】



30

[式中、

各 *R* 1 および *R* 2 は、独立して、任意のヌクレオチド、非ヌクレオチド、またはポリヌクレオチドであり、これは天然に生ずるものであっても化学的に修飾されたものでもよく、各 *X* および *Y* は、独立して、*O*、*S*、*N*、アルキル、または置換アルキルであり、各 *Z* および *W* は、独立して、*O*、*S*、*N*、アルキル、置換アルキル、*O* - アルキル、*S* - アルキル、アルカール、またはアラールキルであり、*W*、*X*、*Y*、および *Z* は任意に全て *O* でなくともよい]

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

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、*s i N A* デュープレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明の *s i N A* 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に、1 またはそれ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上) の式 I を有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的 *s i N A* 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 5' 末端に、約 1 - 約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5 個またはそれ以上) の式 I を有する化

50

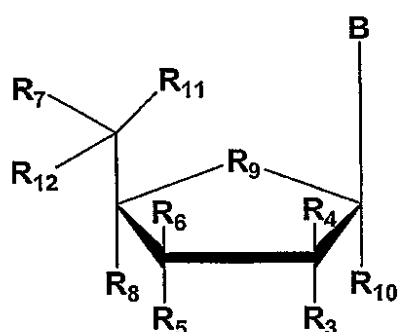
学的に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的 *s i N A* 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に式 I を有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を有する 1 またはそれ以上（例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上）のピリミジンヌクレオチドを含むことができる。さらに別の非限定的例においては、本発明の例示的 *s i N A* 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、式 I を有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を有する 1 またはそれ以上（例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上）のプリンヌクレオチドを含むことができる。別の態様においては、式 I のヌクレオチド間結合を有する本発明の *s i N A* 分子はまた、式 I - V I I のいずれかを有する化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

10

【 0 0 5 1 】

1 つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において 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 :

【 化 2 】



20

[式中 ,

各 R 3 , R 4 , R 5 , R 6 , R 7 , R 8 , R 1 0 , R 1 1 および R 1 2 は、独立して、H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカリールまたはアラキル, F, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-O-SH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, ONH₂, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカリール, アミノアルキルアミノ, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式 1 を有する基であり; R 9 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 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塩基、または非ヌクレオシド塩基、例えば、フェニル、ナフチル、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、ネブラリン、ピリドン、ピリジノン、または標的 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]

30

40

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。

【 0 0 5 2 】

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は、*s i N A* デュープレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明の *s i N A* 分子は、1 またはそれ以上の式 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、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方

50

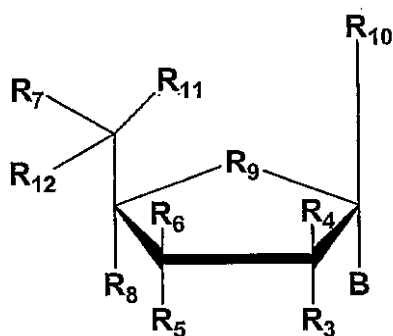
に含むことができる。例えば，本発明の例示的 *s i N A* 分子は，約 1 - 約 5 個またはそれ以上（例えば，約 1，2，3，4，5 個またはそれ以上）の式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の 5' 末端に含むことができる。別の非限定的例においては，本発明の例示的 *s i N A* 分子は，約 1 - 約 5 個またはそれ以上（例えば，約 1，2，3，4，5 個またはそれ以上）の式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の 3' 末端に含むことができる。

【 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：

10

【 化 3 】



20

[式中，

各 R 3，R 4，R 5，R 6，R 7，R 8，R 10，R 11 および R 12 は，独立して，H，OH，アルキル，置換アルキル，アルカールまたはアラキル，F，Cl，Br，CN，CF₃，OCF₃，OCN，O-アルキル，S-アルキル，N-アルキル，O-アルケニル，S-アルケニル，N-アルケニル，SO-アルキル，アルキル-O-SH，アルキル-OH，O-アルキル-OH，O-アルキル-SH，S-アルキル-OH，S-アルキル-SH，アルキル-S-アルキル，アルキル-O-アルキル，ONO₂，NO₂，N₃，NH₂，アミノアルキル，アミノ酸，アミノアシル，ONH₂，O-アミノアルキル，O-アミノ酸，O-アミノアシル，ヘテロシクロアルキル，ヘテロシクロアルカール，アミノアルキルアミノ，ポリアルキルアミノ，置換シリル，または式 1 を有する基であり；R 9 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 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，ネブラリン，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]

30

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 *s i N A* 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3' 末端に、約 1 - 約 5 個またはそれ以上（例えば、約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上）の式 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。

【0055】

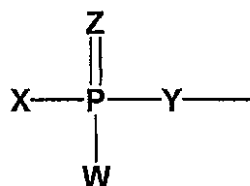
別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、式 I I または I I I を有するヌクレオチドを含み、ここで、式 I I または I I I を有するヌクレオチドは反転のコンフィギュレーションである。例えば、式 I I または I I I を有するヌクレオチドは、*s i N A* コンストラクトに 3' - 3', 3' - 2', 2' - 3', または 5' - 5' コンフィギュレーションで、例えば、*s i N A* 鎖の一方または両方の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に結合させることができる。

10

【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 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 V :

【化 4】



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 R N A に相補的な鎖に式 I V を有する 5' 末端リン酸基を有する *s i N A* 分子を特徴とし、ここで、*s i N A* 分子は、全 R N A *s i N A* 分子を含む。別の態様においては、本発明は、標的 - 相補的鎖に式 I V を有する 5' 末端リン酸基を有する *s i N A* 分子を特徴とし、ここで、*s i N A* 分子はまた、一方または両方の鎖の 3' 末端に約 1 - 約 4 個（例えば、約 1, 2, 3, または 4 個）のデオキシリボヌクレオチドを有する、約 1 - 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 I V を有する 5' 末端リン酸基は、本発明の *s i N A* 分子、例えば式 I - V I I のいずれかを有する化学的修飾を有する *s i N A* 分子の標的 - 相補的鎖に存在する。

30

【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 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 1 またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。例えば、非限定的例においては、本発明は、一方の *s i N A* 鎖に約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸 (*s i N A*) を特徴とする。さらに別の態様においては、本発明は、両方の *s i N A* 鎖に独立して約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸 (*s i N A*) を特徴とする。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、*s i N A* デュープレックスのオリゴヌクレオチド鎖の一方または両方に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明の *s i N A*

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。

10

【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くてもよい。

20

30

【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

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リ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リ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 個またはそれ以上のホスホリ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リ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。

【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リ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リ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リ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。

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

【0064】

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

10

【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プレックスを含み、この一方または両方を化学的に修飾することができ、各鎖は約18 - 約27(例えば、約18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, または27)ヌクレオチドの長さであり、デュプレックスは約18 - 約23(例えば、約18, 19, 20, 21, 22, または23)塩基対を有し、化学的修飾は、式I - V I Iのいずれかを有する構造を含む。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は2つの鎖を有するデュプレックスを含み、この一方または両方は式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾されていてもよく、各鎖は約21ヌクレオチドからなり、それぞれは2 - ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドオーバーハングを有し、デュプレックスは約19塩基対を有する。別の態様においては、本発明のs i N A分子は一本鎖ヘアピン構造を有し、ここで、s i N Aは約36 - 約70(例えば、約36, 40, 45, 50, 55, 60, 65, または70)ヌクレオチドの長さであり、約18 - 約23(例えば、約18, 19, 20, 21, 22, または23)塩基対を有し、s i N Aは式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含む化学的修飾を含むことができる。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は、式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された、約42 - 約50(例えば、約42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, または50)ヌクレオチドを有する直鎖状オリゴヌクレオチドを含み、ここで、直鎖状オリゴヌクレオチドは約19塩基対および2 - ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドオーバーハングを有するヘアピン構造を形成する。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ピボでの分解により3'末端オーバーハング、例えば約2ヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチドオーバーハングを有する二本鎖s i N A分子が生成されうるように設計される。

20

30

40

【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)ヌクレオチドの長さであり、約18 - 約23(例えば、約18, 19, 20, 21, 22, または23)塩基対を有し、s i N Aは化学的修飾を含むことができ、これは式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含む。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は、式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された約42 - 約50(例えば、約

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つのループを有するダンベル形状の構造を形成する。

【0067】

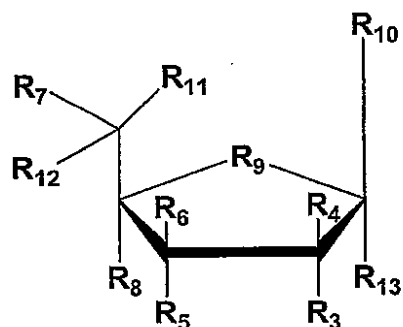
別の態様においては,本発明の環状 s i N A 分子は,2つのループモチーフを含み,ここで, s i N A 分子のループ部分の一方または両方は生物分解性である。例えば,本発明の環状 s i N A 分子は, s i N A 分子のループ部分のインピボでの分解により,3'末端オーバーハング,例えば約2ヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチドオーバーハングを有する二本鎖 s i N A 分子が生成することができるよう設計される。

【0068】

10

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】



20

[式中,

各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11, R12, およびR13は,独立して,H,OH,アルキル,置換アルキル,アルカールまたはアラルキル,F,Cl,Br,CN,CF3,OCF3,OCN,O-アルキル,S-アルキル,N-アルキル,O-アルケニル,S-アルケニル,N-アルケニル,SO-アルキル,アルキル-OSH,アルキル-OH,O-アルキル-OH,O-アルキル-SH,S-アルキル-OH,S-アルキル-SH,アルキル-S-アルキル,アルキル-O-アルキル,ONO2,NO2,N3,NH2,アミノアルキル,アミノ酸,アミノアシル,ONH2,O-アミノアルキル,O-アミノ酸,O-アミノアシル,ヘテロシクロアルキル,ヘテロシクロアルカール,アミノアルキルアミノ,ポリアルキルアミノ,置換シリル,または式1を有する基であり;R9は,O,S,CH2,S=O,CHF,またはCF2である]

30

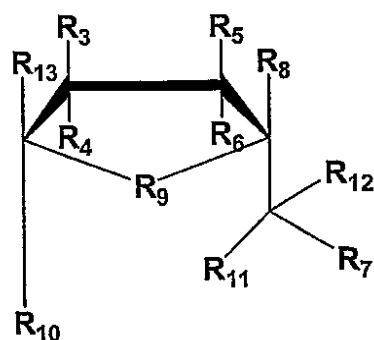
を有する化合物を含む。

【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】

40



50

別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、式 *V* または *V I* を有する無塩基残基を含み、ここで、式 *V I* または *V I* 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 *s i N A* 鎖の $3'$ 末端、 $5'$ 末端、または $3'$ 末端および $5'$ 末端の両方で *s i N A* コンストラクトに結合している。

【0074】

1つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、例えば、*s i N A* 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（*L N A*）ヌクレオチドを含む。

10

【0075】

別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、例えば、*s i N A* 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。

【0076】

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、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 $2' - \text{デオキシ} - 2' - \text{フルオロピリミジンヌクレオチド}$ であり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシ} - 2' - \text{フルオロピリミジンヌクレオチド}$ であるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシ} - 2' - \text{フルオロピリミジンヌクレオチド}$ 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 $2' - \text{デオキシプリンヌクレオチド}$ である（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシプリンヌクレオチド}$ であるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシプリンヌクレオチド}$ である）。

20

【0077】

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、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 $2' - \text{デオキシ} - 2' - \text{フルオロピリミジンヌクレオチド}$ であり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシ} - 2' - \text{フルオロピリミジンヌクレオチド}$ であるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシ} - 2' - \text{フルオロピリミジンヌクレオチド}$ 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 $2' - \text{デオキシプリンヌクレオチド}$ であり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシプリンヌクレオチド}$ であるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシプリンヌクレオチド}$ 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 $2' - \text{デオキシヌクレオチド}$ である。

30

40

【0078】

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 $2' - \text{デオキシ} - 2' - \text{フルオロピリミジンヌクレオチド}$ であり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシ} - 2' - \text{フルオロピリミジンヌクレオチド}$ であるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが $2' - \text{デオキシ} - 2' - \text{フルオロピリミジンヌクレオチド}$ 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 $2' - \text{O} - \text{メチルプリンヌクレオチド}$ である（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが $2' - \text{O} - \text{メチル}$

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。

【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)。

【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

ヌクレオチドである)，および末端キャップ修飾，例えば，本明細書に記載されるかまたは図 10 に示されるいずれかの修飾を含み，これは任意に，アンチセンス配列の 3' 末端，5' 末端，または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在してもよく，アンチセンス領域はさらに任意に，約 1 - 約 4 個（例えば，約 1，2，3，または 4 個）の 2' - デオキシヌクレオチドを有する 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを含んでいてもよく，ここでオーバーハングヌクレオチドはさらに 1 またはそれ以上（例えば，1，2，3，または 4 個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。これらの化学的に修飾された s i N A の非限定的例は図 4 および 5 および本明細書の表 I I I および I V に示される。

【0082】

10

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，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
20
ス領域の 3' 末端，5' 末端，または 3' 末端および 5' 末端の両方に任意に存在していてもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み，センス領域はさらに任意に，約 1 - 約 4 個（例えば，約 1，2，3，または 4 個）の 2' - デオキシリボヌクレオチドを有する 3' 末端オーバーハングを含み；かつ，s i N A 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
30
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 s i N A の非限定的例は，図 4 および 5 および本明細書の表 I I I および I V に示される。

40

【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 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，化学的に修飾された s i N A はセンス領域を含み，ここで，センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば，すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか，あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである），例えば，センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のプリンヌクレオチドは，2' - デオキシヌクレオチド，ロック核酸（L N A）ヌクレオチド，2' - メトキシエチルヌクレオチド，4' - チオヌクレオチド，および 2' - O - メチルヌクレオチド
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渉核酸分子はアンチセンス領域を含み，ここで，アンチセンス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば，すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか，あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである），アンチセンス領域中に存在する 1 またはそれ以上のプリンヌクレオチドは，2' - デオキシヌクレオチド，ロック核酸（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 に示されるいずれかの修飾を含み，これは任意にアンチセンス配列の 3' 末端，5' 末端，または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在していてもよく，アンチセンス領域はさらに任意に，約 1 - 約 4 個（例えば，約 1，2，3，または 4 個）の 2' - デオキシヌクレオチドを有する 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを含んでいてもよく，ここで，オーバーハングヌクレオチドはさらに 1 またはそれ以上（例えば 1，2，3，または 4 個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

【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

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(sRNA)を特徴とし、ここで、化学的修飾は、化学的に修飾されたsRNA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sRNA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sRNA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sRNA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sRNA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sRNA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sRNA分子に結合したコンジュゲート分子は、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、または細胞取り込みを媒介することができる細胞レセプターのリガンドである。化学的に修飾されたsRNA分子に結合させることができる、本発明により企図される特定のコンジュゲート分子の例は、Vargeeseら(米国特許出願10/201,394,本明細書の一部としてここに引用する)に記載される。用いられるコンジュゲートのタイプおよび本発明のsRNA分子のコンジュゲーションの程度は、同時にsRNAがRNAi活性を媒介する能力を維持しながら、sRNA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sRNAコンストラクトをスクリーニングして、sRNA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、sRNAがさらにsRNAのセンス領域とsRNAのアンチセンス領域とを連結させるヌクレオチド、非ヌクレオチド、または混合ヌクレオチド/非ヌクレオチドリナーを含む本発明の短干渉核酸(sRNA)分子を特徴とする。1つの態様においては、本発明のヌクレオチドリナーは、2ヌクレオチド以上の長さ、例えば、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, または10ヌクレオチドの長さのリナーでありうる。別の態様においては、ヌクレオチドリナーは、核酸アプタマーであってもよい。本明細書において用いる場合、"アプタマー"または"核酸アプタマー"とは、標的分子に特異的に結合する核酸分子を意味し、ここで、核酸分子は、その天然の設定において標的分子により認識される配列を含む配列を有する。あるいは、アプタマーは天然には核酸に結合しない標的分子に結合する核酸分子であってもよい。標的分子は目的とする任意の分子でありうる。例えば、アプタマーを用いて蛋白質のリガンド結合ドメインに結合させ、このことにより、天然に生ずるリガンドと蛋白質との相互作用を妨害することができる。これは非限定的例であり、当業者は当該技術分野において一般に知られる手法を用いて他の態様を容易に生成しうることを認識するであろう(例えば、Gold et al., 1995, Annu. Rev. Biochem., 64, 763; Brody and Gold, 2000, J. Biotechnol., 74, 5; Sun, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther., 2, 100; Kusser, 2000, J. Biotechnol., 74, 27; Hermann and Patel, 2000, Science, 287, 820; および Jayasena, 1999, Clinical Chemistry, 45, 1628を参照)。

【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ナーには、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、ポリエチレングリコール、例えば2-100個のエチレングリコール単位を有するもの)が含まれる。特定の例としては、Seela

and Kaiser, Nucleic Acids Res. 1990, 75:6353
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. Soc.
1991, 773:5109; Ma et al., Nucleic Acids
Res. 1993, 27:2585およびBiochemistry 1993, 32:
1751; Durand et al., Nucleic Acids Res. 1990,
75:6353; McCurdy et al., Nucleosides & Nucleo-
tides 1991, 10:287; Jschke et al., Tetra-
hedron Lett. 1993, 34:301; Ono et al., Bioch- 10
emistry 1991, 30:9914; Arnold et al., 国際公開W
O89/02439; 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
本明細書の一部としてここに引用する)に記載されるものが挙げられる。"非ヌクレオチ
ド"はさらに、1またはそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに糖および/またはリン
酸置換のいずれかにより核酸鎖中に取り込むことができ、残りの塩基がその酵素活性を
発揮することを可能とする任意の基または化合物を意味する。基または化合物は、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)を媒介しうる短干渉核酸(s i N A)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s i N A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、s i N A分子は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、ここで、s i N A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、s i N A分子は単一のオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、ここで、s i N A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inker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、s i N A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、s i N A中のすべての位置は、s i N A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RNAi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s i N A分子は、5'末端リン酸基を含む。別の態様においては、
本発明の一本鎖s i N A分子は5'末端リン酸基および3'末端リン酸基(例えば、2', 3'-環状リン酸)を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖s i N A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s i N A分子は、
本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。例えば、細胞中においてs i N A分子がRNAi活性を支持する能力が維持される程度に、s i N A分子中のすべての位置で、化学的に修飾されたヌク 40 50

レオチド，例えば式 I - V I I のいずれかを有するヌクレオチドまたはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

【 0 0 9 0 】

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

10

20

【 0 0 9 1 】

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

30

【 0 0 9 2 】

1つの態様においては，本発明の *s i N A* 分子は，細胞または再構成されたインビトロ系において *R N A i* 活性を媒介する一本鎖 *s i N A* 分子であり，ここで，*s i N A* 分子は，標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み，*s i N A* 中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば，すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか，あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである），アンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドはロック核酸（*L N A*）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 *L N A* 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 *L N A* ヌクレオチドである），および末端キャップ修飾，例えば

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いてもよく、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RNAi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いてもよく、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RNAi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HCV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、s i N A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)細胞中におけるHCV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を細胞に導入する、ことを含む。

【0097】

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

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な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。

10

【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關与する可能性のある標的遺伝子経路を決定するために用いることができる。本発明は、例えば、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 のレベルに回答しうる他の適応症の進行および / または維持に關与する遺伝子発現の経路を理解するために用いることができる。

20

30

【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、ことを含む方法の特徴とする。別の態様においては、(a) の s i N A 分子は、固定された長さ、例えば、約 23 ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては、(a) の s i N A 分子は、異なる長さのものであり、例えば、約 19 - 約 25 (例えば、約 19 , 20 , 21 , 22 , 23 , 24 , または 25) ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書に記載されるような再構成されたインビトロ s i N A アッセイを含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的 R N A が発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、標的 R N A のフラグメントを、例えば、ゲル電気泳動、ノザンプロット分析、または R N A s e 保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的 R N A 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的 R N A 配列は、当該技術分野において知られるように、例えば、

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ブラリを生成し；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の特徴とする。別の態様においては，(a)の $s i N A$ 分子は，固定された長さ，例えば約23ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては，(a)の $s i N A$ 分子は異なる長さのものであり，例えば，約19 - 約25 (例えば，約19，20，21，22，23，24，または25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては，アッセイは，本明細書の実施例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，ノザンブロット分析，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の特徴とする。1つの態様においては，(b)の $s i N A$ 分子は，固定された長さ，例えば約23ヌクレオチドの長さの鎖を有する。別の態様においては，(b)の $s i N A$ 分子は，異なる長さ，例えば，約19 - 約25 (例えば，約19，20，21，22，23，24，または25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては，アッセイは，本明細書に記載されるような再構成されたインビトロ $s i N A$ アッセイを含んでいてもよい。別の態様においては，アッセイは，標的 $R N A$ が発現されている細胞培養系を含むことができる。標的 $R N A$ のフラグメントを，検出可能なレベルの切断について，例えばゲル電気泳動，ノザンブロット分析，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の特徴とする。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 遺伝子標的を評価する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明の 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。

10

【 0 1 2 2 】

別の態様においては、本発明は、H C V 標的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いてもよく、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。

20

【 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。

30

【 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いてもよい本発明の 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いてもよい 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。

40

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

【 0 1 2 7 】

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

【0128】

1つの態様においては、本発明は、*s i N A*デュプレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) *s i N A*分子の第1のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第1のオリゴヌクレオチド配列鎖は*s i N A*の第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1のオリゴヌクレオチド配列鎖の足場上で*s i N A*の第2のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第2のオリゴヌクレオチド配列鎖はさらに、*s i N A*デュプレックスを精製するために用いることができる化学成分を含み；(c) 2つの*s i N A*オリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュプレックスを形成するのに適した条件下で(a)のリンカー分子を切断し；そして(d) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して*s i N A*デュ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、*s i N A*合成の方法は溶液相合成またはハイブリッド相合成であり、ここでは、第1の配列に結合され、第2の配列の合成の足場として作用する切断可能なリンカーを用いて、*s i N A*デュプレックスの両方の鎖をタンデムで合成する。別々の*s i N A*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*s i N A*分子が形成される。

【0130】

別の態様においては、本発明は、*s i N A*デュプレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) *s i N A*分子の一方のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、配列は他方のオリゴヌクレオチド配列の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1の配列鎖に対して相補性を有する第2のオリゴヌクレオチド配列を(a)の足場上で合成し、ここで、第2の配列は二本鎖*s i N A*分子の他方の鎖を含み、かつ、第2の配列はさらに、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる化学成分を含み；(c) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して、切断可能なリンカーにより接続された両方の*s i N A*オリゴヌクレオチド鎖を含む全長配列を単離するのに適した条件下で、かつ、2つの*s i N A*オリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュプレックスを形成するのに適した条件下で、(b)の生成物を精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の間に、例えば加水分解条件下で行う。別の態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の後に行う。別の態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(

C P G) またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含み、ここで、(a)の第1の配列は、スクシニルリンカー等の切断可能なリンカー上で、固体支持体を足場として用いて合成する。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーおよび(a)の切断可能なリンカーが同時にまたは別々に切断されるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性または異なる反応性を有することができる。1つの態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる(b)の化学成分は、トリチル基、例えばジメトキシトリチル基を含む。

【0131】

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 siNA 分子を作製する方法を特徴とし、該方法は、(a)第1の配列および第2の配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、ここで、第1の配列は第2の配列に相補的であり、第1のオリゴヌクレオチド配列は切断可能なリンカーを介して第2の配列に連結されており、かつ、第2の配列を有するオリゴヌクレオチドには末端 5' - 保護基、例えば、5' - O - ジメトキシトリチル基(5' - O - DMT)が残存しており；(b)オリゴヌクレオチドを脱保護し、このことにより脱保護によって2つのオリゴヌクレオチド配列を結合しているリンカーが切断され；そして(c)二本鎖 siNA 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。

10

【0132】

別の態様においては、本発明の siNA 分子の合成の方法は、Scarlinge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。

20

【0133】

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-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1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0134】

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 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)ヌクレアーゼ耐性が増加している 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。

30

【0135】

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。

【0136】

別の態様においては、本発明は、 siNA 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性が増加している siNA 分子を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 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性が増加している siNA 分子を単離するのに適した条件下で工程(a)の siNA 分子をアッセイする、ことを含む。

40

【0137】

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RNA配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載され

50

る 1 またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0138】

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。

【0139】

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 - 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 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。

10

【0140】

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 - 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 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。

20

【0141】

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。

【0142】

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 - 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 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。

30

【0143】

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。

40

【0144】

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 - 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 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。

【0145】

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 - V I I の

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、例えばスぺルミンまたはスぺルミジン；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 *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 5 3 】

別の態様においては，本発明の *s i N A* 化合物にポリエチレングリコール (P E G) を共有結合的に結合させることができる。結合した P E G は，任意の分子量のものであってよく，好ましくは約 2 , 0 0 0 - 約 5 0 , 0 0 0 ダルトン (D a) である。

【 0 1 5 4 】

本発明は，単独で，またはインビトロまたはインビボで R N A 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 *s i N A* 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 *s i N A* 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，B e i g e l m a n e t a l , 米国特許 6 , 3 9 5 , 7 1 3 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，U s m a n e t a l . , 米国特許出願 6 0 / 4 0 2 , 9 9 6 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。

【 0 1 5 5 】

本明細書において用いる場合，"短干渉核酸"，"*s i N A*"，"短干渉 R N A"，"*s i R N A*"，"短干渉核酸分子"，"短干渉オリゴヌクレオチド分子"，または"化学的に修飾された短干渉核酸分子"との用語は，例えば，配列特異的様式で R N A 干渉 (" R N A i ") 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する任意の核酸分子を表す (例えば，B a s s , 2 0 0 1 , N a t u r e , 4 1 1 , 4 2 8 - 4 2 9 ; E l b a s h i r e t a l . , 2 0 0 1 , N a t u r e , 4 1 1 , 4 9 4 - 4 9 8 ; および K r e u t z e r e t a l . , 国際公開 W O 0 0 / 4 4 8 9 5 ; Z e r n i c k a - G o e t z e t a l . , 国際公開 W O 0 1 / 3 6 6 4 6 ; F i r e , 国際公開 W O 9 9 / 3 2 6 1 9 ; P l a e t i n c k e t a l . , 国際公開 W O 0 0 / 0 1 8 4 6 ; M e l l o a n d F i r e , 国際公開 W O 0 1 / 2 9 0 5 8 ; D e s c h a m p s - D e p a i l l e t t e , 国際公開 W O 9 9 / 0 7 4 0 9 ; および L i e t a l . , 国際公開 W O 0 0 / 4 4 9 1 4 ; A l l s h i r e , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 1 8 1 8 - 1 8 1 9 ; V o l p e e t a l . , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 1 8 3 3 - 1 8 3 7 ; J e n u w e i n , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 2 2 1 5 - 2 2 1 8 ; および H a l l e t a l . , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 2 2 3 2 - 2 2 3 7 ; H u t v a g n e r a n d Z a m o r e , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 2 0 5 6 - 6 0 ; M c M a n u s e t a l . , 2 0 0 2 , R N A , 8 , 8 4 2 - 8 5 0 ; R e i n h a r t e t a l . , 2 0 0 2 , G e n e & D e v . , 1 6 , 1 6 1 6 - 1 6 2 6 ; および R e i n h a r t & B a r t e l , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 1 8 3 1 を参照) 。本発明の *s i N A* 分子の非限定的例は，図 4 - 6 および本明細書の表 I I , I I I および I V に示される。例えば，*s i N A* は，自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であってもよく，ここで，アンチセンス領域は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み，センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。*s i N A* は 2 つの別々のオリゴヌクレオチドから組み立てることができ，ここで一方の鎖はセンス鎖であり，他方はアンチセンス鎖であり，アンチセンス鎖およびセンス鎖は自己相補的であり (すなわち，各鎖は，他方の鎖中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み，例えば，アンチセンス鎖とセンス鎖とがデュ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 1 9 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*は単一のオリゴヌクレオチドから組み立ててもよく、ここで、*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ッシングされて、*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'-二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ナ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障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'-OH）含有ヌクレオチドを欠失している。本出願人は、ある態様において、*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'-OH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'-OH基を有する1またはそれ以上のヌクレオチドを含む、結合したリンカーまたは他の結合しているかまたは会合している基、成分、または鎖を有することができる。任意に、*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（*e p i g e n e t i c s*）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

成的制御は、クロマチン構造の *s i N A* 媒介性修飾により生じて遺伝子発現を変化させることができる（例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818 - 1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833 - 1837; 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、*s i N A* 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 *s i N A* 分子による遺伝子発現の阻害は、*s i N A* 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 *s i N A* ）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、*s i N A* 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、*s i N A* 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 mismatches を有する *s i N A* 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、トランスジーン、または外来遺伝子、例えば、病原体（例えばウイルス）の感染後に細胞中に存在する病原体の遺伝子でありうる。標的遺伝子を含む細胞は、任意の生物、例えば、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌または真菌に由来するかその中に含まれうる。植物の非限定的例には、単子葉植物、双子葉植物、または裸子植物が含まれる。動物の非限定的例には脊椎動物または無脊椎動物が含まれる。真菌の非限定的例には糸状菌または酵母が含まれる。

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活性に関与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；Frier et al.，1986，Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377；Turner et al.，1987，J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785を参照）。相補性のパーセンテージは，核酸分子中の，第2の核酸配列と水素結合（例えば，ワトソン-クリック塩基対形成）を形成しうる連続する残基のパーセンテージを示す（例えば，10塩基中の5，6，7，8，9，10塩基は，50%，60%，70%，80%，90%，および100%の相補性である）。"完全な相補性"とは，核酸配列の連続する残基がすべて第2の核酸配列中の同じ数の連続する残基と水素結合するであろうことを意味する。

【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

ⅠⅠⅠおよびⅠⅤ，および／または図４－５に示される。

【０１６９】

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

10

【０１７０】

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ピボで，バイオポリマー中に取り込ませてまたは取り込ませずに，局所的に投与することができる。特定の態様においては，本発明の核酸分子は表ⅠⅠ－ⅠⅠⅠおよび／または図４－５に示される配列を含む。そのような核酸分子の例は，これらの表および図面において規定される配列から本質的になる。さらに，表ⅠⅤに記載される化学的に修飾されたコンストラクトを本発明の任意の *s i N A* 配列に適用することができる。

20

【０１７１】

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

【０１７２】

"RNA"とは，少なくとも１つのリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。"リボヌクレオチド"とは， $-D-$ リボフラノース成分の 2' 位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は，二本鎖 RNA，一本鎖 RNA，単離された RNA，例えば部分的に生成された RNA，本質的に純粋な RNA，合成 RNA，組換え的に製造された RNA，ならびに１またはそれ以上のヌクレオチドの付加，欠失，置換および／または変更により天然に生ずる RNA と異なるように変更された RNA を含む。そのような変更は，非ヌクレオチド物質の付加，例えば，*s i N A* の末端または内部（例えば RNA の少なくとも１またはそれ以上のヌクレオチド）への付加を含むことができる。本発明の RNA 分子中のヌクレオチドはまた，標準的ではないヌクレオチド，例えば，天然に生じないヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドを含むことができる。これらの変更された RNA は，類似体または天然に生ずる RNA の類似体と称することができる。

30

【０１７３】

"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

【０１７４】

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

【０１７５】

本明細書において用いる場合，"万能塩基"との用語は，天然の DNA / RNA 塩基のそれぞれと，これらをほとんど区別せずに塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を表す

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、L o a k e s , 2 0 0 1 , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 2 9 , 2 4 3 7 - 2 4 4 7 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（C 1 , C 2 , C 3 , C 4 , または C 5 ）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。

10

【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 s i R N A 分子は、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、s i N A 分子を個別にまたは1またはそれ以上の薬剤と組み合わせて被験者に投与することができ、または当業者には明らかな他の適当な細胞に投与することができる。

【0178】

20

さらに別の態様においては、s i N A 分子を他の既知の治療法と組み合わせて用いて、上述の健康状態または疾病を治療することができる。例えば、本明細書に記載される分子を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 s i N A 分子と容易に組み合わせることができる他の治療剤の非限定的例は、酵素的核酸分子、アロステリック核酸分子、アンチセンス、デコイ、またはアプタマー核酸分子、抗体、例えばモノクローナル抗体、小分子、および他の有機および/または無機化合物、例えば金属、塩およびイオンである。

【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 s i N A 分子をコードする核酸配列を、その s i N A 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 s i N A 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 s i N A 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、P a u l e t a l . , 2 0 0 2 , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , 1 9 , 5 0 5 ; M i y a g i s h i a n d T a i r a , 2 0 0 2 , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , 1 9 , 4 9 7 ; L e e e t a l . , 2 0 0 2 , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , 1 9 , 5 0 0 ; および N o v i n a e t a l . , 2 0 0 2 , N a t u r e M e d i c i n e , a d v a n c e o n l i n e p u b l i c a t i o n d o i : 1 0 . 1 0 3 8 / n m 7 2 5 に記載されている。

40

【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、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 分子に対する相補性を有する s i N A 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 s i N A 分子をコードする核酸配列を含み、これらは同じであっても異なってもよい。

50

【 0 1 8 3 】

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

10

【 0 1 8 4 】

"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。

【 0 1 8 5 】

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 】

【 0 1 8 6 】

図面の簡単な説明

図1は、siNA分子を合成するスキームの非限定的例を示す。相補的siNA配列鎖である鎖1および鎖2をタンデムで合成し、切断可能な結合、例えばヌクレオチドスクシネートまたは無塩基スクシネートで結合させる。これは、固体支持体上の固相合成において用いられる切断可能なリンカーと同じであっても異なっていていてもよい。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siNA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

【 0 1 8 7 】

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-TOF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単一物質として精製しうることを示す。

40

【 0 1 8 8 】

図3は、RNAiに関与する標的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RNAi

50

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および4個の5'末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは（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いてもよく、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは、任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは（NN）ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【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いてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは（NN）ヌクレオチドを除き2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は、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（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

クレオチド，万能塩基，または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができ，存在しうるすべてのプリンヌクレオチドは 2' - デオキシヌクレオチドである。アンチセンス鎖は 2' 1' ヌクレオチドを含み，これは任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく，ここで，2 個の末端 3' - ヌクレオチドは任意に標的 RNA 配列に相補的であっててもよく，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。

【0194】

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

【0195】

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

【0196】

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

【0197】

図 6 は，本発明の種々の siRNA コンストラクトの非限定的例を示す。示される例 (コンストラクト 1，2，および 3) は典型的な 19 塩基対を有するが，本発明の異なる態様には本明細書に記載される任意の数の塩基対が含まれる。括弧内の領域は，例えば約 1，2，3，または 4 ヌクレオチドの長さ，好ましくは約 2 ヌクレオチドを含むヌクレオチドオーバーハングを表す。コンストラクト 1 および 2 は，RNAi 活性用に独立して用いることができる。コンストラクト 2 は，ポリヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリナ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

10

20

30

40

50

むことができ、このことにより、インビボおよび／またはインビトロでコンストラクト1が形成される。別の例においては、同じ原理でコンストラクト2を生成するためにコンストラクト3を用いることができ、ここで、リンカーはインビボおよび／またはインビトロで活性な s i N A コンストラクト2を生成するために用いられ、これは任意に別の生物分解性リンカーを用いてインビボおよび／またはインビトロで活性な s i N A コンストラクト1を生成することができる。そのように、s i N A コンストラクトの安定性および／または活性は、インビボまたはインビトロで、および／またはインビトロにおいて用いるための s i N A 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、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カセットを作製するために用いられるスキームの概略図である。 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(s i N A のセンス領域)を含むようにDNAオリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約19、20、21、または22ヌクレオチド(N)の長さを有し、その後例えば約3-約10ヌクレオチドを含む規定された配列(X)のループ配列を有する。

【0200】

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s i N A 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℃)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、発現カ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。

【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(s i N A のセンス領域)を有するように、DNAオリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約19、20、21、または22ヌクレオチド(N)の長さを含み、その後規定された配列(X)のループ配列に隣接する3'-制限部位(R2)を有する。

【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カセットを設計し、このことによりs i N A 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s i N A 媒介性 50

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

【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siNA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。

10

【0210】

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

【0211】

図10は、例えば、本発明のsiNA配列の3'末端を安定化させるために用いることができる、種々の安定化化学(1-10)の非限定的例を示す:(1)[3'-3']-反転デオキシリボース;(2)デオキシリボヌクレオチド;(3)[5'-3']-3'-デオキシリボヌクレオチド;(4)[5'-3']-リボヌクレオチド;(5)[5'-3']-3'-O-メチルリボヌクレオチド;(6)3'-グリセリル;(7)[3'-5']-3'-デオキシリボヌクレオチド;(8)[3'-3']-デオキシリボヌクレオチド;(9)[5'-2']-デオキシリボヌクレオチド;および(10)[5'-3']-ジデオキシリボヌクレオチド。図面に示されている修飾および非修飾の骨格化学に加えて、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。

20

【0212】

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

30

40

【0213】

図12は、HCV/ポリオウイルススキメラのウイルス複製を標的とするsiRNAコンストラクト29579/29586および29578/29585の非限定的例を、反転siNA対照コンストラクト29593/29600と比較して示す。

【0214】

図13は、HCV/ポリオウイルススキメラのウイルス複製を標的とするsiRNAコンストラクト29579/29586の用量応答実験の非限定的例を、反転siNA対照コンストラクト29593/29600と比較して示す。29579/29586siNAコンストラクトによるHCV/ポリオウイルススキメラの複製の阻害は、1nM, 5nM, 10nM, および25nM濃度の29579/29586siNAコンストラクトで測定

50

した。

【0215】

図14は、HCV/ポリオウイルス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、Huh7 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”),リボフェクタミン(“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、インビボで改良された安定性および活性を有すると予測されることを示す。したがって、この議論は、*siRNA*のみに限定されることを意味するものではなく、*siNA*全体に適用することができる。“RNAiを媒介する改良された能力”または“改良されたRNAi活性”とは、インビトロおよび/またはインビボで測定されたRNAi活性を含むことを意味し、ここで、RNAi活性は*siNA*がRNAiを媒介する能力と本発明の*siNA*の安定性との両方を反映する。本発明においては、これらの活性の積を、全RNA *siRNA*または複数のリボヌクレオチドを含む*siNA*と比較して、インビトロおよび/またはインビボで増加させることができる。場合によっては、*siNA*分子の活性または安定性は低下するかもしれないが(すなわち、10分の1以下)、*siNA*分子の全体的活性はインビトロおよび/またはインビボで増強される。

【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、相同的一本鎖RNAまたはウイルスゲノムRNA

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(sRNA)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、sRNAを含むエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これはsRNA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、sRNAデュプレックスのガイド配列に相補的な領域の中央部で生ずる(Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。さらに、RNA干渉には、小さいRNA(例えば、マイクロRNAまたはmiRNA)に媒介される遺伝子サイレンシングが関与する場合もある。これはおそらく、クロマチン構造を制御する細胞性メカニズムによるものであり、このことにより標的遺伝子配列の転写が妨害される(例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; およびHall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237を参照)。このように、本発明のsRNA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は種々の系で研究されてきた。Fireら(1998, Nature, 391, 806)は、C. Elegansにおいて最初にRNAiを観察した。WiannyおよびGoetz(1999, Nature Cell Biol., 2, 70)は、マウス胚においてdsRNAにより媒介されるRNAiを記載する。Hammondら(2000, Nature, 404, 293)は、dsRNAでトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記載する。Elbashirら(2001, Nature, 411, 494)は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞において、合成の21ヌクレオチドRNAのデュプレックスを導入することにより誘導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsRNAデュプレックスは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sRNA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sRNA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。sRNAデュプレックスの中心におけるミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおける切断部位の位置はsRNA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, 6

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

【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 μ mol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 μ mol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 μ Lの0.11 M = 6.6 μ mol)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 μ Lの0.25 M = 15 μ mol)を用いることができる。デオキシ残基の各カップリングサイクルにおいては、ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して22倍過剰(40 μ Lの0.11 M = 4.4 μ mol)のデオキシホスホルアミダイトおよび70倍過剰のS-エチルテトラゾール(40 μ Lの0.25 M = 10 μ mol)を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング収率は、トリチル画分の比色定量により決定して、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである: 脱トリチル化溶液は塩化メチレン中3% TCA (ABI) であり; キッピングは、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_2 , 49 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 0.25 M) は, American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは, ホスホロチオエート結合の導入のためには, ボーケージ試薬 (3H - 1, 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン 1, 1 - ジオキシド, アセトニトリル中 0.05 M) を用いる。

【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 °C で 10 分間懸濁する。20 °C 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 : H₂O / 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。

10

【0227】

本発明のある種の siNA 分子を含む RNA について用いられる合成方法は, Usman ら (1987 J. Am. Chem. Soc., 109, 7845), Scaringe ら (1990 Nucleic Acids Res., 18, 5433) および Wincott ら (1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684), Wincott ら (1997, Methods Mol. Bio., 74, 59) に記載の方法にしたがい, 慣用の核酸保護基およびカップリング基, 例えば, 5' 末端にジメトキシトリチル, および 3' 末端にホスホルアミダイトを用いて行う。非限定的例においては, 小スケールの合成は, 394 Applied Biosystems, Inc. 合成機で, 改変した 0.2 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 0.11 M = 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 0.25 M = 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 0.11 M = 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 0.25 M = 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 I₂, 49 mM ピリジン, 9% 水 (PERSEPTIVE (登録商標)) である。Burdick & Jackson 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S - エチルテトラゾール溶液 (アセトニトリル中 0.25 M) は, American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは, ホスホロチオエート結合の導入のためには, ボーケージ試薬 (3H - 1, 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン 1, 1 - ジオキシド, アセトニトリル中 0.05 M) を用いる。

20

30

40

【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

50

行う。2ポットプロトコルについては、ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4 mLのガラスねじ蓋バイアルに移し、40%水性メチルアミン(1 mL)の溶液中で65で10分間懸濁する。20に冷却した後、上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を1.0 mLのEtOH:MeCN:H₂O/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(1.5 mL N-メチルピロリジノン, 750 µL TEAおよび1.0 mL TEA・3 HFの溶液300 µL, HF濃度1.4 M)に再懸濁し、65に加熱する。1.5時間後、オリゴマーを1.5 M NH₄HCO₃で反応を停止させる。

【0229】

あるいは、1ポットプロトコルのためには、ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4 mL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(0.8 mL)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・3 HF(0.1 mL)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1.5 M NH₄HCO₃で反応を停止させる。

【0230】

トリチルオンオリゴマーの精製のためには、停止したNH₄HCO₃溶液を、アセトニトリル、続いて50 mM 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、1 M 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】

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

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; Shabarova 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, Bioconjugate 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、一緒につなげてよい。

【0233】

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、切断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、次にこれを切断して別々の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inkerであっても非ヌクレオチドリinker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

10

20

30

40

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。

10

【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】

20

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WO92/07065; 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WO93/15187; Rossi et al., 国際公開WO91/03162; Sproat, 米国特許5,334,711; Gold et al., US6,300,074およびBurgin et al., (上掲)を参照(これらはすべて本明細書の一部としてここに引用する)。上述の参考文献はすべて、本明細書に記載される核酸分子の塩基、リン酸および/または糖成分になしうる種々の化学修飾を記載する。細胞中におけるその抗力を増強するように修飾し、およびオリゴヌクレオチドの合成時間を短縮し化学物質の必要性を減少するために核酸分子から塩基を除去することが望ましい。

30

【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WO92/07065; Perrault et al. Nature 1990, 344, 565-568; Pieken et al. Science 1991, 253, 314-317; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 1992, 17, 334-339; Usman et al.

40

50

国際公開WO93/15187; Spr oat, 米国特許5,334,711, Beigelman et al., 1995 J. Biol. Chem. 270, 25702; Beigelman et al., 国際公開WO97/26270; Beigelman et al., 米国特許5,716,824; Usman et al., 米国特許5,627,053; Woolf et al., 国際公開WO98/13526; Thompson et al., 米国特許出願60/082,404(1998年4月20日出願); Karpeisky et al., 1998, Tetrahedron Lett., 39, 1131; Earnshaw and Gait, 1998, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences), 48, 39-55; Verma and Eckstein, 1998, Annu. Rev. Biochem., 67, 99-134; および Burlina et al., 1997, Bioorg. Med. Chem., 5, 1999-2010を参照, これらの参考文献はすべて, その全体を本明細書の一部としてここに引用する)。これらの刊行物は, 触媒活性を変更することなく, 糖, 塩基および/またはリン酸修飾等を核酸分子中に組み込む位置を決定する一般的方法および戦略を記載しており, 本明細書の一部としてここに引用する。このような教示の観点から, siNAが細胞においてRNAiを促進する能力が有意に阻害されない限り, 本明細書に記載されるように, 同様の修飾を用いて本発明のsiNA核酸分子を修飾することができる。

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

【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。そのようなヌクレオチドを本発明の核酸分子中に取り込ませることにより, 核酸標的の相補的配列またはテンプレート鎖に対する親和性および特異性の両方が増強される。別の態様においては, 本発明の核酸分子は1またはそれ以上(例えば, 約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10個またはそれ以上)のLNA"ロック核酸"ヌクレオチド, 例えば, 2', 4'-Cメチレンビスクロヌクレオチドを含む(例えば, Wengel et al., 国際公開WO00/66604およびWO99/14226を参照)。

【0242】

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(Sullenger and Cech, 米国特許5, 854, 038を参照)。本明細書に記載される分子のコンジュゲートは, 生物分解性のリンカー, 例えば生物分解性核酸リンカー分子を介して, 生物学的に活性な分子に結合させることができる。

10

20

【0243】

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に設計する。核酸に基づく生物分解性リンカー分子の安定性は, リボヌクレオチド, デオキシリボヌクレオチド, および化学的に修飾されたヌクレオチド, 例えば, 2'-O-メチル, 2'-フルオロ, 2'-アミノ, 2'-O-アミノ, 2'-C-アリル, 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単一のヌクレオチドを含むことができる。生物分解性核酸リンカー分子はまた, 核酸骨格, 核酸糖, または核酸塩基修飾を含むことができる。

30

【0244】

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。

40

【0245】

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

50

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。

【0246】

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アル基で任意に置換されていてもよい。

【0247】

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

【0248】

さらに別の態様においては，RNAiに關与する蛋白質の酵素活性を維持するかまたは増強させる化学的修飾を有するsiNA分子が提供される。そのような核酸はまた，一般に非修飾核酸よりヌクレアーゼに対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。

【0249】

本発明の核酸系分子の使用は，組み合わせ療法の可能性を提供することにより，疾病の進行のよりよい治療につながるであろう（例えば，異なる遺伝子を標的とする多数のsiNA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）。siNA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。

【0250】

別の観点においては，本発明のsiNA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siNA鎖のみに，アンチセンスsiNA鎖のみに，または両方のsiNA鎖に含む。

【0251】

"キャップ構造"とは，オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれている化学的修飾を意味する（例えば，Adamic et al.，米国特許5,998,203（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。これらの末端修飾は，核酸分子をエキソヌクレアーゼ分解から保護し，デリバリーおよび／または細胞中の局在化を助けるであろう。キャップは5'末端（5'-キャップ）に存在してもよく，または3'末端（3'-キャップ）に存在してもよく，両方の末端に存在してもよい。非限定的例においては，5'-キャップは，グリセリル，反転デオキシ無塩基残基（成分）；4'，5'-メチレンヌクレオチド；1-（ベータ-D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド，4'-チオヌクレオチド；炭素環式ヌクレオチド；1，5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート結合；スレオ-ペントフラノシルヌクレオチド；非環状3'，4'-セコヌクレオチド；非環状3，4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；非環状3，5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド，3'-3'-反転ヌクレオチド成分；3'-3'-反転無塩基成分；3'-2'-反転ヌクレオチド成分；3'-2'-反転無塩基成分；1，4-プタンジオールリン酸；3'-ホスホルアミデート；ヘキシルリン酸；アミノヘキシルリン酸；3'-リン酸；3'-ホスホロチオエート；ホスホロジチオエート；または架橋または非架橋メチルホスホネート成分からなる群より選択される。

10

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-アミノヘキシルリン酸；1，2-アミノドデシルリン酸；ヒドロキシプロピルリン酸；1，5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート；スレオペンタフラノシルヌクレオチド；非環状3'，4'セコヌクレオチド；3，4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；3，5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド，5'-5'-反転ヌクレオチド成分；5'-5'-反転無塩基成分；5'-ホスホルアミデート；5'-ホスホロチオエート；1，4-ブタンジオールリン酸；5'-アミノ；架橋および/または非架橋5'-ホスホルアミデート，ホスホロチオエートおよび/またはホスホロジチオエート，架橋または非架橋メチルホスホネートおよび5'-メルカプト成分からなる群より選択される（より詳細には，Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。

10

【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。

20

【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，NO₂またはN(CH₃)₂，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，NO₂，ハロゲン，N(CH₃)₂，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，NO₂またはN(CH₃)₂，アミノまたはSHである。

30

40

【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二アリール基が含まれる。これらはすべて任意に置換されていてもよい。アリール基の好ましい置換基は，ハロゲン，トリハロメチル，ヒドロキシル，SH，OH，シアノ，アルコキシ，アルキル，アルケニル，アルキニル，およびアミノ基である。"アルキルアリール"基は，アリール基（上述）に共有結合したアルキル基（上述）を表

50

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】

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; Uhlman & Peyman, (上掲) (すべて本明細書の一部としてここに引用する)を参照)。当該技術分野において知られる修飾核酸塩基のいくつかの例があり、Limbach et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183にまとめられている。核酸中に導入することができる塩基修飾のいくつかの非限定的例としては、例えば、イノシン、プリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、シュドウラシル、2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン(例えば5-メチルシチジン)、5-アルキルウリジン(例えばリボチミジン)、5-ハロウリジン(例えば5-プロモウリジン)または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン(例えば6-メチルウリジン)、プロピンおよびその他のものが挙げられる(Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, 上掲)。この観点において、"修飾塩基"とは、1'位におけるアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシル以外のヌクレオチド塩基またはそれらの同等物を意味する。

【0257】

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s i N A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。

【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、Adamic et al., 米国特許5, 998, 203を参照)。

【0259】

10

20

30

40

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'-NH₂または2'-O-NH₂を意味し、これは修飾されていてもされていなくてもよい。そのような修飾基は、例えば、Eckstein et al., 米国特許5,672,695およびMatulic-Adamic et al., 米国特許6,248,878 (いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

【0262】

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

【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、siNA分子は、被験者に投与するためのリポソーム等のデリバリーベヒクル、担体および希釈剤、およびそれらの塩を含むことができ、および/または薬学的に許容しうる処方中に存在することができる。核酸分子のデリバリーの方法は、Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Maurer et al., 1999, Mol. Membr. Biol., 16, 129-140; Hofland and Huang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137, 165-192; および Lee et al., 2000, ACS Symp. Ser., 752, 184-192 (いずれも本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。Beigelman et al., 米国特許6,395,713およびSullivan et al., PCT WO94/02595は、さらに、核酸分子をデリバリーするための一般的な方法を記載する。これらのプロトコルを用いて、事実上いかなる核酸分子もデリバリーすることができる。核酸分子は当業者に知られる種々の方法によって細胞に投与することができ、これには、限定されないが、リポソームへの封入、イオントホレシス、または他のベヒクル、例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン(例えば、Gonzalez et al., 1999, 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, Cliva. Cancer Res., 5, 2330-2337およびBarry et al., 国際公開WO99/31262に記載される無針手法により、皮下、筋肉内、または皮膚内に行うことができる。本発明の分子は医薬品として用いることができる。医薬品は、被験者における疾病状態を予防し、発症を調節しまたは治療する(症状をある程度、好ましくは症状をすべて軽減する)。

【0264】

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

【0265】

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】

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】

"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 siRNA 分子をアクセス可能な疾患組織に暴露する。薬剤が循環中に入る速度は，分子量またはサイズの関数であることが示されている。本発明の化合物を含むリボソームまたは他の薬剤担体を使用することにより，薬剤を，例えば，あるタイプの組織（例えば網状内皮系（RES）の組織）に局在化させることが可能である。薬剤と細胞（例えば白血球およびマクロファージ）の表面との会合を容易にすることができるリボソーム処方もまた有用である。この方法は，マクロファージおよび白血球による異常な細胞（例えば過剰の HCV を産生する細胞）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】

"薬学的に許容しうる処方"とは，本発明の核酸分子をその所望の活性に最も適した物理学的な位置に有効に分布させることができる組成物または処方を意味する。本発明の核酸分子とともに処方するのに適した薬剤の非限定的例には以下のものが含まれる： CNS 中への薬剤の侵入を促進することができる P-糖蛋白質阻害剤（Pluronic P85 等）（Jolliet-Riant and Tillement, 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 16-26）；大脳内移植後の徐放輸送用の生分解性ポリマー，例えばポリ（DL-ラクチド-co-グリコリド）微小球（Emrich, DF et al, 1999, *Cell Transplant*, 8, 47-58）（Alkermes, Inc. Cambridge, MA）；および薬剤を脳血管関門を越えて輸送することができ，神経の取り込みメカニズムを変更しうる，例えばポリブチルシアノアクリレートから作成される充填されたナノ粒子（Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999）。本発明の核酸分子のデリバリー戦略の他の非限定的例には，Boado et al., 1998, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1308-1315；Tyler et al., 1999, *FEBS Lett.*, 421, 280-284；

10

20

30

40

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. 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、アジュバントおよびベヒクルを含む用量単位処方中で、経口的に、局所的に、非経口的に、吸入またはスプレーにより、または直腸に投与することができる。本明細書において用いる場合、非経口的との用語には、経皮、皮下、血管内(例えば、静脈内)、筋肉内、または髄腔内注射または注入の手法等が含まれる。さらに、本発明の核酸分子および薬学的に許

10

20

30

40

50

容しうる担体を含む医薬処方提供される。1またはそれ以上の本発明の核酸分子は、1またはそれ以上の無毒性の薬学的に許容しうる担体および/または希釈剤、および/またはアジュバント、および所望の場合には他の活性成分とともに存在することができる。本発明の核酸分子を含有する医薬組成物は、経口使用に適した形、例えば、錠剤、トローチ剤、菱形剤、水性または油性懸濁液、分散可能な粉体または顆粒、乳剤、硬カプセルまたは軟カプセル、またはシロップまたはエリキシル剤の形であることができる。

【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、コーンスターチ、またはアルギン酸；結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム、および潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクでありうる。錠剤は被覆しなくてもよく、既知の手法により被覆してもよい。場合によっては、既知の手法によりそのような被覆を調製して、胃腸管における崩壊および吸収を遅延させ、このことによりより長い期間の持続的な作用を与えることができる。例えば、遅延用材料、例えばグリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートを用いることができる。

10

20

【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。分散剤または湿潤剤は、天然に生ずるホフファチド、例えば、レシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、またはエチレンオキシドと脂肪酸および無水ヘキシトールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエートであってもよい。水性懸濁液はまた、1またはそれ以上の保存剤、例えば、エチル-、またはn-プロピル-p-ヒドロキシベンゾエート、1またはそれ以上の着色剤、1またはそれ以上の芳香剤、および1またはそれ以上の甘味剤、例えばショ糖またはサッカリンを含んでいてもよい。

30

40

【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、分散剤または湿潤剤、懸濁剤および1またはそれ以上の保存剤との混合物中

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

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もよい。動物が治療上適当な量の組成物を飼料とともに接種できるよう，動物飼料および飲用水組成物を処方することが便利であろう。飼料または飲料水に加えるように組成物をプレミッ

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, Glycoconjugate J., 4, 317-328)は、ガラクトースと比較してレセプターに対してより高い親和性を有するN-アセチル-D-ガラクトースアミンを炭水化物成分として用いることによりこの高い特異性を得た。この"クラスターリング効果"はまた、マンノシル末端糖蛋白質またはグリココンジュゲートの結合および取込についても記載されている(Ponpipom et al., 1981, J. Med. Chem., 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ができることを認識するであろう。そのような核酸の活性は、酵素的核酸によりそれらを一次転写産物から放出させることにより増大させることができる(Draper et al., PCT WO93/23569, Sullivan et al.

l. , P C T W O 9 4 / 0 2 5 9 5 ; O h k a w a e t a l . , 1 9 9 2 N u c l e i c A c i d s S y m p . S e r . , 2 7 , 1 5 - 6 ; T a i r a e t a l . , 1 9 9 1 , N u c l e i c A c i d s R e s . , 1 9 , 5 1 2 5 - 3 0 ; V e n t u r a e t a l . , 1 9 9 3 N u c l e i c A c i d s R e s . , 2 1 , 3 2 4 9 - 5 5 ; C h o w r i r a e t a l . , 1 9 9 4 J . B i o l . C h e m . 2 6 9 , 2 5 8 5 6) 。

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

【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デュプレックスの一方または両方の鎖、または自己ハイブリダイズしてsiNAデュプレックスを生ずる1本の自己相補的鎖をコードすることができる。本発明のsiNA分子をコードする核酸配列は、そのsiNA分子の発現を可能とする様式で動作可能なように連結することができる（例えば、Paul et al. , 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al. , 2002, Nature Biotechnology, 19, 500; およびNovina et al. , 2002, Nature Medicine, advance online publication doi:10.1038/nm725を参照）。

【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ンリーディングフレーム（ORF）；および/またはイントロン（介在配列）を含んでいてもよい。

【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

の細胞におけるある pol I プロモーターのレベルは、近くに存在する遺伝子制御配列（エンハンサー、サイレンサー等）の性質に依存する。原核生物 RNA ポリメラーゼ酵素が適当な細胞中で発現される限り、原核生物 RNA ポリメラーゼプロモーターもまた用いられる（Elroy-Stein and Moss, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6743-7; Gao and Huang 1993 Nucleic Acids Res., 21, 2867-72; Lieber et al., 1993 Methods Enzymol., 217, 47-66; Zhou et al., 1990 Mol. Cell. Biol., 10, 4529-37）。何人かの研究者が、そのようなプロモーターから発現した核酸分子が哺乳動物細胞中で機能しうることを示している（例えば、Kashani-Sabet et al., 1992 Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Ojwang et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Yu et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992 EMBO J. 11, 4411-8; Lisziewicz et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 8000-4; Thompson et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2259; Sullenger & Cech, 1993, Science, 262, 1566）。より詳細には、転写ユニット、例えば U6 小核（snRNA）、転移 RNA（tRNA）およびアデノウイルス VA RNA をコードする遺伝子に由来するものは、細胞中において高濃度の所望の RNA 分子（例えば siNA）を生成するのに有用である（Thompson et al., (上掲); Couture and Stinchcomb, 1996, (上掲); Noonberg et al., 1994, Nucleic Acid Res., 22, 2830; Noonberg et al., 米国特許 5,1624,803; Good et al., 1997, Gene Ther. 4, 45; Beicreelman et al., 国際公開 WO96/18736）。上述の siNA 転写ユニットは、哺乳動物細胞中に導入するために種々のベクター中に組み込むことができる。ベクターとしては、限定されないが、プラスミド DNA ベクター、ウイルス DNA ベクター（例えばアデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスベクター）、またはウイルス RNA ベクター（例えばレトロウイルスまたはアルファウイルスベクター）が挙げられる（総説については、Couture and Stinchcomb, 1996, (上掲)を参照）。

【0292】

別の観点においては、本発明は、本発明の siNA 分子の少なくとも 1 つをコードする核酸配列を、その siNA 分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを特徴とする。1 つの態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域；b) 転写終止領域；および c) siNA 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み；この配列は、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、開始領域および終止領域に動作可能なように連結されている。

【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) siNA 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み、この配列は、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、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、開始領域、オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されている。さらに別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域；b) 転写終止領域；c) イントロン；および d) 少なくとも 1 つの siNA 分子をコードする核酸配列を含み；この配列は、核酸分子の発現および／またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域、イントロンおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

【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) s i N A分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み、この配列は、オープンリーディングフレームの3' - 末端に動作可能なように連結されており、配列は、s i N A分子の発現および/またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域、イントロン、オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

【0295】

H C Vの生物学および生化学

1989年、C型肝炎ウイルス(H C V)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、H C V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H C V 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】

H C V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H C Vが進化した(Simmonds et al., J. Gen. Virol. 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、ヒトと霊長類、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H C V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(quasispecies)から構成されることが示されている。すなわち、H C Vゲノムは超可変性であり、絶えず変化している。H C V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、H C V RNAの複製ならびにH C V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H C Vゲノム領域を標的とする治療用薬剤は、広範な種類のH C V遺伝子型に対して有意な影響を有するであろう。さらに、H C V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H C V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】

H C V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H C V RNAを検出することが可能である(Takahashi et al., American

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 : 33S - 40S)。

【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、代償性肝疾患を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%) が代償性疾患を有しているが、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%) は脱代償性肝疾患を有しており、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、代償性疾患を有する患者の6人 (0.5%) および脱代償性疾患を有する患者の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は、肝不全が49%；肝細胞癌が22%；出血が13%であった（D'Amico（上掲））。

10

【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の見積もられている（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%であるの見積もられており、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。

20

【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は、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; Marcellin 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。

30

【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（Marcellin 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（Hooftnagle et al., New England Journal of Medicine 1997; 336(5): 347-356）。

40

【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

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，顆粒球等の骨髓細胞，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；腹部および背中での痛み；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

【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。

20

【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：s i N Aコンストラクトのタンデム合成

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

30

【0311】

5'末端ジメトキシトリチル(5'-O-DMT)基がそのまま残るs i N Aオリゴおよびその相補鎖のタンデム合成(トリチルオン合成)が完了した後，オリゴヌクレオチドを上述のようにして脱保護する。脱保護の後，s i N A配列鎖を自発的にハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーションにより，一方の鎖が5'-O-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。

40

【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ートまたはグリセリルスクシネートリンカー(図1を参照)または同等の切断可能なリンカーを導入する時点までは，標準的なホスホルアミダイト合成化学を用いる。用いることができるリンカー結合条件の非限定的例には，活性化剤，例えばプロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸(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(DIPEA)および/またはDMA Pを使用することが含まれる。リンカーを結合させた後，標準

50

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、50 mM NaOAcまたは1.5 M NH₄H₂CO₃で反応を停止させる。

【0313】

s i N A デュープレックスの精製は、固相抽出、例えば、1カラム容量(CV)のアセトニトリル、2CVのH₂O、および2CVの50 mM NaOAcで調整したWaters C18 Sep Pak lg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H₂Oまたは50 mM NaOAcで洗浄する。失敗配列は1CVの14% ACN(水性; 50 mM NaOAcおよび50 mM NaClを含む)で溶出する。次にカラムを1CVのH₂O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H₂Oで、次に1CVの1 M NaClおよび再度のH₂Oで洗浄する。次に、s i N A デュープレックス生成物を、例えば、1CVの20%水性CANを用いて溶出する。

10

【0314】

図2は、精製したs i N A 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s i N A デュープレックスの個々のs i N A 鎖の計算質量に対応する。同じ精製s i N A は、キャピラリーゲル電気泳動(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s i N A に対応し、2つのピークはおそらく個々のs i N A 配列鎖に対応する。同じs i N A コンストラクトのイオン交換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s i N A コンストラクトの試験は、別々に合成したオリゴヌクレオチド配列鎖から生成したs i N A コンストラクトと比較して、RNAi活性が同じであることを示した。

20

【0315】

実施例2：任意のRNA配列中の潜在的s i N A 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s i N A 標的を生成する。そのような配列は、データベースから得ることができるか、または当該技術分野において知られるように実験的に決定することができる。既知の標的部位、例えば、リボザイムまたはアンチセンス等の他の核酸分子を用いた研究に基づいて有効な標的部位であると決定されている標的部位、または疾病または健康状態と関連していることが知られている標的、例えば変異または欠失を含む部位を用いて、これらの部位を標的とするs i N A 分子を設計することができる。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s i N A 分子をスクリーニングすることができる。非限定的例においては、用いるべきs i N A コンストラクトのサイズに基づいて、転写産物中のいずれかの位置の1-1000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エルまたはマルチプレートアッセイを用いて、s i N A 分子をスクリーニングするためのハイスループットスクリーニングアッセイを開発することができる。

30

40

【0316】

50

実施例 3 : R N A 中の s i N A 分子標的部位の選択

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

【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 P e r l スクリプトを用いて行うが、市販の配列分析プログラム、例えば、O l i g o , M a c V e c t o r , または t h e G C G W i s c o n s i n P a c k a g e も同様に用いることができる。

【0318】

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

10

20

【0319】

3. 場合によっては、s i N A のサブ配列は、1またはそれ以上の配列中には存在しないが、所望の標的配列中に存在する。これは、s i N A が標的とされないままに在るべきパラログス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 s i N A サブ配列をさらに分析して、G C 含量にしたがってランク付けすることができる。30 - 70 % の G C を含有する部位が好ましく、40 - 60 % の G C を含有する部位がさらに好ましい。

30

【0321】

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

40

【0323】

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

【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

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*s i N A*デュープレックスの上側（センス）鎖用に設計し合成し、一方、それぞれの選択された23-merサブ配列の左側21ヌクレオチドの逆相補鎖を*s i N A*デュープレックスの下側（アンチセンス）鎖用に設計し合成する（表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. *s i N A*分子をインビトロ、培養細胞または動物モデル系においてスクリーニングして、最も活性な*s i N A*分子、または標的RNA配列中の最も好ましい標的部位を同定する。 10

【0326】

別の方法においては、HCV標的配列に特異的な*s i N A*コンストラクトのプールを用いて、HCV RNAを発現する細胞、例えばヒト肝細胞癌（Hu h 7）細胞（例えば、R a n d a l l e t a l . , 2003, P N A S U S A , 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Hu h 7細胞）を*s i N A*コンストラクトのプールでトランスフェクトし、HCVの阻害に伴う表現型を示す細胞を分類する。*s i N A*コンストラクトのプールは、適当なベクター中に挿入された翻訳力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*s i N A*をシーケンスして、標的HCV RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。 20 30

【0327】

実施例4：HCVを標的とする*s i N A*の設計

*s i N A*の標的部位は、実施例3に記載される*s i N A*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*s i N A*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（*s i N A*の標的へのアクセス可能性を判定するために分析される任意の所与の配列の構造）に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、選択した。*s i N A*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、*s i N A*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*s i N A*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*s i N A*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、*s i N A*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。 40

【0328】

化学的に修飾された*s i N A*コンストラクトを設計して、RNAi活性を媒介する能力を保存しながら、インビボでの全身投与のためのヌクレアーゼ安定性および/または改良 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 s i N A 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 s i N A 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 R N A i 活性を定量しうる他の適当なアッセイを用いて，R N A i 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 R N A i 活性の両方を有する合成 s i N A 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 R N A を標的とするいずれかの s i N A 配列に安定化活性 s i N A 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 s i N A 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：s i N A の化学合成および精製

s i N A 分子は，R N A メッセージ中の種々の部位，例えば，本明細書に記載される R N A 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。s i N A 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。s i N A 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 s i N A 分子は，s i N A 分子の配列を標的配列に相補的で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，s i N A 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，U s m a n e t a l .，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；S c a r i n g e e t a l .，米国特許 6，111，086；6，008，400；6，111，086 を参照（いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する））。

【0330】

非限定的例においては，R N A 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 - t e r t - ブチルジメチルシリル，3' - O - 2 - シアノエチル N，N - ジイソプロピルホスホルアミダイト基，および環外アミン保護基（例えば，N6 - ベンゾイルアデノシン，N4 - アセチルシチジン，および N2 - イソブチリルグアノシン）のいずれかを含むヌクレオシドを使用する。あるいは，S c a r i n g e（上掲）により記載されるように，R N A 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，U s m a n e t a l .，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 - 保護基を切断する。それぞれの次のヌクレオチドについてこのサイクルを繰り返す。

【0332】

合成条件を改変して, 例えば, 合成すべき s i N A の特定の化学組成に応じて, 異なるカップリング時間, 異なる試薬 / ホスホルアミダイト濃度, 異なる接触時間, 異なる固体支持体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。s i N A 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 (U s m a n e t a l . , 米国特許 5 , 8 3 1 , 0 7 1 , 米国特許 6 , 3 5 3 , 0 9 8 , 米国特許 6 , 4 3 7 , 1 1 7 , B e l l o n e t a l . , 米国特許 6 , 0 5 4 , 5 7 6 , 米国特許 6 , 1 6 2 , 9 0 9 , 米国特許 6 , 3 0 3 , 7 7 3 および S c a r i n g e (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)) 。

10

【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 s i N A 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, T E A - H F を加え, 反応液をさらに 15 分間約 65 に維持する。

20

【0334】

実施例 6 : s i N A 活性を評価するための R N A i インビトロアッセイ

R N A i 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, H C V R N A 標的を標的とする s i N A コンストラクトを評価する。アッセイは, T u s c h l r a (1 9 9 9 , G e n e s a n d D e v e l o p m e n t , 1 3 , 3 1 9 1 - 3 1 9 7) および Z a m o r e r a (2 0 0 0 , C e l l , 1 0 1 , 2 5 - 3 3) に記載され, H C V 標的 R N A 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 R N A i 活性を再構築する。標的 R N A は, H C V を発現する適当なプラスミドから T 7 R N A 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 s i N A 鎖 (例えば各 20 μ M) は, 緩衝液 (例えば, 100 m M 酢酸カリウム, 30 m M H E P E S - K O H , p H 7 . 4 , 2 m M 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 m M 酢酸カリウム, 30 m M H E P E S - K O H (p H 7 . 4) , 2 m M 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 T B E 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, O r e g o n 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 [v o l / v o l] , R N A (10 - 50 p M の最終濃度) , および s i N A (10 n M の最終濃度) を含む 10 % [v o l / v o l] 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 m M のクレアチンリン酸, 10 μ g / m l のクレアチンホスホキナーゼ, 100 μ M の G T P , 100 μ M の U T P , 100 μ M の C T P , 500 μ M の A T P , 5 m M の D T T , 0 . 1 U / μ L の R N A s i n (P r o m e g a) , および 100 μ M の各アミノ酸を含む。酢酸カリウムの最終濃度は 100 m M に調節する。反応は氷上で予め組立て, 25 で 10 分間ブレインキュベートした後に R N A 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 P a s s i v e L y s i s B u f f e r (P r o m e g a) で反応を停止させる。標的 R N A の切断は, R T - P C R 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 s i N A が省略されている対照反応と比較する。

30

40

【0335】

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- ^{32}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'- ^{32}P 末端標識してもよい。アッセイは上述のようにして行い、標的RNAおよびRNAiにより生成する特異的RNA切断産物をゲルのオートラジオグラフィーで可視化する。切断のパーセントは、無傷の対照RNAまたはsiNAなしの対照反応からのRNA、およびアッセイにより生成する切断産物を表すバンドをPhosphorImager（登録商標）で定量することにより決定する。

【0336】

10

1つの態様においては、このアッセイを用いて、siNA媒介性RNAi切断のための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siNA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siNA分子を設計し、合成する。これらの核酸分子は、例えば以下の方法を用いることにより、インビボで切断活性について試験することができる。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siNAの効力を試験する。第1に、例えば、Hu h 7細胞（例えば、Randall 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siNA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siNA対照に対して作製したオリゴヌクレオチド配列の混合物と比較する。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siNA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siNA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例が図18に示される。siNAコンストラクト（表III）を25 nM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”の列）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”の列）と比較する。図18に示されるように、いくつかのsiNA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】

siNAの細胞へのデリバリー

HCVサブゲノムレプリコンクロン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 8.5×10^3 細胞/ウエルで播種する。siNA（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 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, 1 X TaqMan PCR反応緩衝液 (PE - Applied Biosystems), 5.5 mM MgCl₂, 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 - MLV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 で30分間, 95 で10分間, 次に, 95 で15秒間および60 で1分間を40サイクルからなるものであってもよい。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' - CCGGCTACCTGCCCAATTC - 3'; (配列番号: 1628)

neo - リバースプライマー, 5' - CCAGATCATCTCTGATCGACAAG - 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' - TCTATCATCAACGGGTACAAACGA - 3'; (配列番号: 1631)

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

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

【0342】

ウエスタンブロッティング

核抽出物は, 標準的なマイクロ調製手法 (例えば, Andrews and Fallier, 1991, Nucleic Acids Research, 19, 2499を参照) を用いて調製することができる。例えばTCA沈殿を用いて, 上清からの蛋白質抽出物を調製する。等量の20% TCAを細胞上清に加え, 氷上で1時間インキュベートし, 5分間の遠心分離によりベレット化する。ベレットをアセトンで洗浄し, 乾燥し, 水に再懸濁する。細胞蛋白質抽出物を10% Bis - Tris NuPage (核抽出物) または4 - 12% Tris - グリシン (上清抽出物) ポリアクリルアミドゲルに流し, ニトロセルロース膜に移す。非特異的結合は, 例えば, 5% 無脂乳とともに1時間インキュベートすることによりブロッキングすることができ, 次に一次抗体で4 で16時間反応させる。洗浄した後, 二次抗体, 例えば (1:10, 000希釈) を室温で1時間適用し, S

u p e r S i g n a l 試薬 (P i e r c e) でシグナルを検出する。

【 0 3 4 3 】

実施例 8 : H C V 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 H C V 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 H C V 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。

【 0 3 4 4 】

最近のいくつかの報告は , ヒト細胞株における H C V のインビトロ成長を示している (Mizutani et al. , Biochem Biophys Res Comm 10 1996 227 (3) : 822 - 826 ; Tagawa , et al. , Journal of Gastroenterology and Hepatology 1995 10 (5) : 523 - 527 ; Cribrier 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 Vir 20 1995 146 (4) : 285 - 288 ; Kato et al. , Biochem Biophys Res Comm . 1995 206 (3) : 863 - 869) 。 H C V 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 , R T - P C R に基づくアッセイまたは b - D N A アッセイのいずれかを用いて証明された。 H C V 細胞培養に関する最も最近の刊行物が 6 ヶ月 30 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 H C V 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。

【 0 3 4 5 】

H C V 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 H C V ゲノムの c D N A 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 ; Haratsu et al. , Journal of Viral Hepatitis 1997 4 S (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) 。 40

【 0 3 4 6 】

ヒト肝細胞癌細胞株である H u h 7 において複製させることに成功したサブゲノム H C V R N A 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 , H C V 非構造遺伝子上流にネオマイシン遺伝子を含み , H u h 7 細胞において複製可能な R N A の選択を可能とする。最初に , 低い頻度で R N A 複製が検出されたが (Lohmann et al. , Science 1999 285 : 110 - 113) , N S 5 A 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 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、蛋白質プロセッシング、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(Pietschmann 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に加え、溶液を軽くボルテックスする。siNA分子を所望の最終濃度に加え、溶液を再び軽くボルテックスし、室温で10分間インキュベートする。用量応答実験においては、10分間のインキュベート後にRNA/脂質複合体をDMEMで連続希釈する。

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; Pasquinnelli 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

40

【0349】

C型肝炎ウイルスをインビボ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WO99/16307)。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阻害をインビボ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RNAi媒介性阻害

s i N A コンストラクト（例えば，表 I I I に示される s i N A コンストラクト）を，例えば，H u h 7 細胞において，H C V RNA 発現を減少させる効力について試験する（例えば，R a n d a l l e t a l . , 2 0 0 3 , P N A S U S A , 1 0 0 , 2 3 5 - 2 4 0 を参照）。トランスフェクションの時点で細胞が 7 0 - 9 0 % 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 2 4 時間前に，9 6 ウエルプレートに 5 , 0 0 0 - 7 , 5 0 0 細胞 / ウエル，1 0 0 μ l / 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 s i N A を 5 0 μ l / 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 2 0 0 0 , I n v i t r o g e n）と混合し，室温で 2 0 10 分間インキュベートする。s i N A トランスフェクション混合物を細胞に加えて，1 5 0 μ l の容量中最終 s i N A 濃度を 2 5 n M とする。各 s i N A トランスフェクション混合物を 3 回の s i N A 処理用に 3 つのウエルに加える。細胞を s i N A トランスフェクション混合物の連続的存在下で 3 7 ° で 2 4 時間インキュベートする。2 4 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（3 6 B 4 , RNA ポリメラーゼサブユニット）について R T - P C R 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 s i N A による標的 m R N A の減少のパーセントをそれぞれの反転対照 s i N A と比較して判定する。 20

【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 s i N A 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，s i N A 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 s i N A コンストラクトをアッセイする。表 I V 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 s i N A 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，s i N A 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 s i 30 N A 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s i N A 阻害

H e L a 細胞において 2 1 ヌクレオチドの s i N A デュープレックスを用いてキメラ H C V / ポリオウイルスの阻害を調べた。H C V RNA の高度に保存された 5 ' 非翻訳領域（U T R）中の 3 つの領域を標的とする 7 つの s i N A を設計した。H C V の 5 ' - U T R に依存する 2 つの細胞培養系において s i N A をスクリーニングした。一方は，H C V / ルシフェラーゼ遺伝子の翻訳を必要とし，他方は，キメラ H C V / ポリオウイルス（P V）の複製を必要とする（B l a t t e t a l . , 米国特許出願 0 9 / 7 4 0 , 3 40 3 2（2 0 0 0 年 1 2 月 1 8 日出願，本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。H C V / P V システムのトランスフェクションは，H e L a 細胞（ピルビン酸ナトリウムおよび 1 0 0 m M H E P E S および 5 % F B S を補充した D M E M で成長させた）で，カチオン性脂質 N C 1 6 8 または L F A 2 K のいずれかを用いて，1 0 n M または 2 5 n M の s i N A 濃度で行った。無血清培地中で H e L a 細胞に H C V / P V ウイルスを m o i = 0 . 0 1 p f u / 細胞で 3 0 分間接種した。接種物を除去し，8 0 μ L の培地を加え，2 0 μ L 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 2 0 - 2 4 時間後に細胞および上清を凍結した。各プレートで 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 H e L a 細胞に 3 日間適用し，次に染色し計数した。図 1 4 - 1 7 に示される結果は p f u / m l \times 1 0 ⁵ で表される。 50

【0353】

同じ領域を標的とする(1ヌクレオチドのシフト)2つの*s i N A*(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、*s i N A*で処理した細胞においては、反転*s i N A*対照29593/29600と比較してHCV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*s i N A*を開発するために、*s i N A*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、*s i N A*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より高い活性な*s i N A*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*s i N A*コンストラクトは、表IIIに相互参照されるRPI番号で示される。*s i N A*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/ポリオウイルススキメラシステムにおける、化学的に修飾された*s i N A*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/ポリオウイルススキメラシステムにおける、化学的に修飾された*s i N A*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*s i N A*コンストラクト(29586/29579)および化学的に修飾された*s i N A*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*s i N A*で用いた、HCV/ポリオウイルス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*s i N A*コンストラクトは、HCV/ポリオウイルス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、*s i N A*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*s i N A*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。

【0354】

実施例11：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。

【0355】

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。

【0356】

実施例12：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病および/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(IFN)は、25種類以上のIFN- α のファミリー(Peseta, 1986, Methods Enzymol. 119, 3-14)、ならびにIF

N- β , および IFN- γ 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- α / β . 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, Annu. 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, is a 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/eIF-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- α および IFN- β 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- α サブタイプにおいて 85-166 アミノ酸が保存されている。IFN- α 偽遺伝子をのぞき, 約 25 種類の異なる IFN- α のサブタイプが知られている。こ

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siNA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siNA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 *s i N A* 分子は、種々の応用において、例えば、臨床、工業、環境、農業および/または研究の設定において、種々の診断用途、例えば分子標的（例えば *R N A*）の同定に用いることができる。そのような *s i N A* 分子の診断における使用は、再構成された *R N A* *i* 系、例えば、細胞溶解物または部分的に精製された細胞溶解物を利用することを含む。本発明の *s i N A* 分子を診断手段として使用し、疾病に罹患した細胞内の遺伝的浮動および変異を検査するか、または細胞において内因性のまたは外来の（例えばウイルス）*R N A* の存在を検出することができる。*s i N A* 活性と標的 *R N A* の構造との間の密接な関係により、分子のいずれの領域においても、標的 *R N A* の塩基対形成および3次元構造を変更する変異を検出することができる。本発明に記載される *s i N A* 分子を複数使用することにより、インピトロならびに細胞および組織における *R N A* の構造および機能に重要なヌクレオチド変化をマッピングすることができる。*s i N A* 分子による標的 *R N A* の切断を使用して、遺伝子の発現を阻害し、疾病または感染の進行における特定の遺伝子産物の役割を明らかにすることができる。このようにして、他の遺伝子標的を疾病の重要な介在物として明らかにすることができる。これらの実験は、組み合わせ療法の可能性を提供することにより、疾病進行のよりよい治療につながるであろう（例えば、異なる遺伝子を標的とする多数の *s i N A* 分子、既知の小分子阻害剤と組み合わせた *s i N A* 分子、*s i N A* 分子および/または他の化学的または生物学的分子と組み合わせた間欠的治療）。本発明の *s i N A* 分子の他のインピトロにおける使用は当該技術分野においてよく知られており、これには、疾病、感染または関連する健康状態に伴う *m R N A* の存在の検出が含まれる。そのような *R N A* は、*s i N A* 分子で処理した後、標準的な方法論、例えば蛍光共鳴エネルギー移動（*F R E T*）を使用して切断産物の存在を判定することにより検出する。

【0363】

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

【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】

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siNA分子を同定するために、過度の実験なしに本明細書に記載される修飾の特定の組み合わせを試験しうることを容易に理解することができる。

10

【0367】

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

20

【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。

30

【0369】

【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

【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 HCV238799	AJ238799.1	HCV238799
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 HCVCEMS1	X76918.1	HCVCEMS1
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 HPCK1R2	D50481.1	HPCK1R2
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】

表 II: HCV siNA および標的配列

NM_000594 (hHCV)

配列	配列 番号	上側配列	配列 番号	下側配列	配列 番号
GCCCCGGAGGUCUCGUAG	1	GCCCCGGAGGUCUCGUAG	1	CUACGAGACUCCCGGGG	697
UGUGGUACUGCCUGAUAGG	2	UGUGGUACUGCCUGAUAGG	2	CCUACAGGCAGUACCACA	698
UUGUGGUACUGCCUGAUAG	3	UUGUGGUACUGCCUGAUAG	3	CUAUCAGGCAGUACCACAA	699
CCCCGGAGGUCUCGUAGA	4	CCCCGGAGGUCUCGUAGA	4	UCUACGAGACUCCCGGG	700
GUGGUACUGCCUGAUAGG	5	GUGGUACUGCCUGAUAGG	5	CCCUAUCAGGCAGUACCAC	701
CUGCCUGAUAGGUGCUUG	6	CUGCCUGAUAGGUGCUUG	6	CAAGCACCCUACUACGGCAG	702
CCUUGUGGUACUGCCUGAU	7	CCUUGUGGUACUGCCUGAU	7	AUCAGGCAGUACCACAAGG	703
GCGAAAGGCCUUGUGGUAC	8	GCGAAAGGCCUUGUGGUAC	8	GUACCACAAGGCCUUCGCG	704
UACUGCCUGAUAGGUGCU	9	UACUGCCUGAUAGGUGCU	9	AGCACCCUACUACGGCAGUA	705
GGUACUGCCUGAUAGGUG	10	GGUACUGCCUGAUAGGUG	10	CACCCUACUACGGCAGUACC	706
AAAGGCCUUGUGGUACUGC	11	AAAGGCCUUGUGGUACUGC	11	GCAGUACCACAAGGCCUUC	707
AAGGCCUUGUGGUACUGCC	12	AAGGCCUUGUGGUACUGCC	12	GGCAGUACCACAAGGCCUUC	708
CUUGUGGUACUGCCUGAU	13	CUUGUGGUACUGCCUGAU	13	UAUCAGGCAGUACCACAAG	709
AGGCCUUGUGGUACUGCCU	14	AGGCCUUGUGGUACUGCCU	14	AGGCAGUACCACAAGGCCU	710
GUACUGCCUGAUAGGUGC	15	GUACUGCCUGAUAGGUGC	15	GCACCCUACUACGGCAGUAC	711
ACUGCCUGAUAGGUGCUU	16	ACUGCCUGAUAGGUGCUU	16	AAGCACCCUACUACGGCAGU	712
CUUGCGAGUGCCCCGGGAG	17	CUUGCGAGUGCCCCGGGAG	17	CUCCCGGGGCACUCGCAAG	713
CUGAUAGGUGCUUCGAG	18	CUGAUAGGUGCUUCGAG	18	CUCGAAAGCACCCUACUACG	714
UUGCGAGUGCCCCGGGAGG	19	UUGCGAGUGCCCCGGGAGG	19	CCUCCCGGGGCACUCGCAA	715
CCUGAUAGGUGCUUCGGA	20	CCUGAUAGGUGCUUCGGA	20	UCGCAAGCACCCUACUACGG	716
GGCCUUGUGGUACUGCCUG	21	GGCCUUGUGGUACUGCCUG	21	CAGGCAGUACCACAAGGCC	717
GCUUGCGAGUGCCCCGGGA	22	GCUUGCGAGUGCCCCGGGA	22	UCCCGGGGCACUCGCAAGC	718
UGCCUGAUAGGUGCUUUGC	23	UGCCUGAUAGGUGCUUUGC	23	GCAAGCACCCUACUACGGCA	719
GAAAGGCCUUGUGGUACUG	24	GAAAGGCCUUGUGGUACUG	24	CAGUACCACAAGGCCUUC	720
GCCUGAUAGGUGCUUUGCG	25	GCCUGAUAGGUGCUUUGCG	25	CGCAAGCACCCUACUACGGC	721
CGAAAGGCCUUGUGGUACU	26	CGAAAGGCCUUGUGGUACU	26	AGUACCACAAGGCCUUCG	722
GCCUUGUGGUACUGCCUGA	27	GCCUUGUGGUACUGCCUGA	27	UCAGGCAGUACCACAAGGC	723
GAGUGCCCCGGGAGGUCUC	28	GAGUGCCCCGGGAGGUCUC	28	GAGACUCCCGGGGCACUC	724
CCCCGGAGGUCUCGUAGAC	29	CCCCGGAGGUCUCGUAGAC	29	GUCUACGAGACUCCCGGG	725
UGCGAGUGCCCCGGGAGGU	30	UGCGAGUGCCCCGGGAGGU	30	ACUCCCGGGGCACUCGCA	726

【表 6】

UGGUACUGCCUGAUAGGGU	31	UGGUACUGCCUGAUAGGGU	31	ACCUAUACGGCAGUACCA	727
CCGGUGAGUACACCGGAU	32	CCGGUGAGUACACCGGAU	32	AUCCGGUGUACUACCCGG	728
GCGAGUGCCCGGGAGGUC	33	GCGAGUGCCCGGGAGGUC	33	GACUCCCGGGGCACUCGC	729
CGAGUGCCCGGGAGGUCU	34	CGAGUGCCCGGGAGGUCU	34	AGACUCCCGGGGCACUCG	730
UGCCCGGGAGGUCUCGUA	35	UGCCCGGGAGGUCUCGUA	35	UACGAGACCUCCCGGGGCA	731
GUGCCCGGGAGGUCUCGU	36	GUGCCCGGGAGGUCUCGU	36	ACGAGACCUCCCGGGGCAC	732
AGUGCCCGGGAGGUCUCG	37	AGUGCCCGGGAGGUCUCG	37	CGAGACCUCCCGGGGCACU	733
CCGGAGGUCUCGUAAGAC	38	CCGGAGGUCUCGUAAGAC	38	GGUCUACGAGACCUCCCGG	734
UGAUAGGGUGCUUGCGAGU	39	UGAUAGGGUGCUUGCGAGU	39	ACUCGCAAGCACCCUAUCA	735
GUGCUUGCGAGUGCCCGG	40	GUGCUUGCGAGUGCCCGG	40	CCGGGCACUCGCAAGCAC	736
AUAGGGUGCUUGCGAGUC	41	AUAGGGUGCUUGCGAGUC	41	GCACUCGCAAGCACCCUAU	737
GGGUGCUUGCGAGUGCCCC	42	GGGUGCUUGCGAGUGCCCC	42	GGGCACUCGCAAGCACCC	738
CGGGAGGUCUCGUAAGACG	43	CGGGAGGUCUCGUAAGACG	43	CGGUCUACGAGACCUCCCG	739
GGGAGGUCUCGUAAGACCGU	44	GGGAGGUCUCGUAAGACCGU	44	ACGGUCUACGAGACCUCC	740
GAUAGGGUGCUUGCGAGUG	45	GAUAGGGUGCUUGCGAGUG	45	CACUCGCAAGCACCCUAUC	741
GGAGGUCUCGUAAGACCGUG	46	GGAGGUCUCGUAAGACCGUG	46	CACGGUCUACGAGACCUCC	742
AGGGUGCUUGCGAGUGCCC	47	AGGGUGCUUGCGAGUGCCC	47	GGGCACUCGCAAGCACCCU	743
UGCUUGCGAGUGCCCGGG	48	UGCUUGCGAGUGCCCGGG	48	CCCGGGCACUCGCAAGCA	744
GGUGCUUGCGAGUGCCCGG	49	GGUGCUUGCGAGUGCCCGG	49	CGGGGCACUCGCAAGCAC	745
UAGGGUGCUUGCGAGUGCC	50	UAGGGUGCUUGCGAGUGCC	50	GGCACUCGCAAGCACCCUA	746
AGGUCUCGUAAGACCGUCA	51	AGGUCUCGUAAGACCGUCA	51	UGCACGGUCUACGAGACCU	747
GAGGUCUCGUAAGACCGUG	52	GAGGUCUCGUAAGACCGUG	52	GCACGGUCUACGAGACCU	748
GGAAACCGGUGAGUACACCG	53	GGAAACCGGUGAGUACACCG	53	CGGUGUACUCACCGGUUCC	749
CGGAACCGGUGAGUACACC	54	CGGAACCGGUGAGUACACC	54	GGUGUACUCACCGGUUCCG	750
CGGUGAGUACACCGGAUU	55	CGGUGAGUACACCGGAUU	55	AAUCCGGUGUACUCACCG	751
GCGGAACCGGUGAGUACAC	56	GCGGAACCGGUGAGUACAC	56	GUGUACUCACCGGUUCCGC	752
AACCGGUGAGUACACCGGA	57	AACCGGUGAGUACACCGGA	57	UCCGGUGUACUCACCGGUU	753
ACCGGUGAGUACACCGGAA	58	ACCGGUGAGUACACCGGAA	58	UUCGGUGUACUCACCGGU	754
CUCCGGAACCGGUGAGUAC	59	CUCCGGAACCGGUGAGUAC	59	GUACUCACCGGUUCCGCAG	755
GUCUGCGGAACCGGUGAGU	60	GUCUGCGGAACCGGUGAGU	60	ACUCACCGGUUCCGCAGAC	756
GAACCGGUGAGUACACCGG	61	GAACCGGUGAGUACACCGG	61	CCGGUGUACUCACCGGUUCC	757
UGCGGAACCGGUGAGUACA	62	UGCGGAACCGGUGAGUACA	62	UGUACUCACCGGUUCCGCA	758
UCUGCGGAACCGGUGAGUA	63	UCUGCGGAACCGGUGAGUA	63	UACUCACCGGUUCCGCAGA	759
GGGAGAGCCAUAGUGGUCU	64	GGGAGAGCCAUAGUGGUCU	64	AGACCACUAGGUCUCC	760
GUGGUCUGCGGAACCGGUG	65	GUGGUCUGCGGAACCGGUG	65	CACCGGUUCCGCAGACCAC	761
GGUCUGCGGAACCGGUGAG	66	GGUCUGCGGAACCGGUGAG	66	CUACCGGUUCCGCAGACC	762

10

20

30

40

【 0 3 7 5 】

【表 7】

CGGGAGAGCCAUAGUGGUC	67	CGGGAGAGCCAUAGUGGUC	67	GACCACUAUGGCUCUCCCG	763
CCGGAGAGCCAUAGUGGU	68	CCGGAGAGCCAUAGUGGU	68	ACCACUAUGGCUCUCCCGG	764
UGGUCUGCGGAACCGGUGA	69	UGGUCUGCGGAACCGGUGA	69	UCACCGGUUCCGCGAGCCA	765
GUGAGUACACCGGAUUJGC	70	GUGAGUACACCGGAUUJGC	70	GCAAUUCCGGUGUACUCAC	766
UGAGUACACCGGAUUJGCC	71	UGAGUACACCGGAUUJGCC	71	GGCAAUUCCGGUGUACUCAC	767
GGUGAGUACACCGGAUUJG	72	GGUGAGUACACCGGAUUJG	72	CAAUUCCGGUGUACUCACC	768
GAGCCAUAGUGGUCUGCGG	73	GAGCCAUAGUGGUCUGCGG	73	CCGAGAGCCACUAUGGCUC	769
AGAGCCAUAGUGGUCUGCG	74	AGAGCCAUAGUGGUCUGCG	74	CGCAGAGCCACUAUGGCUCU	770
UAGUGGUCUGCGGAACCGG	75	UAGUGGUCUGCGGAACCGG	75	CCGGUUCGCGAGACCCACUA	771
AUAGUGGUCUGCGGAACCG	76	AUAGUGGUCUGCGGAACCG	76	CGGUUCCGCGAGACCCACUAU	772
GAGAGCCAUAGUGGUCUGC	77	GAGAGCCAUAGUGGUCUGC	77	GCAGAGCCACUAUGGCUCUC	773
GCCAUAGUGGUCUGCGGAA	78	GCCAUAGUGGUCUGCGGAA	78	UUCGCGAGACCCACUAUGGC	774
AGUGGUCUGCGGAACCGGU	79	AGUGGUCUGCGGAACCGGU	79	ACCGGUUCCGCGAGACCCACU	775
CAUAGUGGUCUGCGGAACC	80	CAUAGUGGUCUGCGGAACC	80	GGUUCGCGAGACCCACUAUG	776
AGCCAUAGUGGUCUGCGGA	81	AGCCAUAGUGGUCUGCGGA	81	UCCGCGAGACCCACUAUGGCU	777
CCAUAGUGGUCUGCGGAAC	82	CCAUAGUGGUCUGCGGAAC	82	GUUCGCGAGACCCACUAUGG	778
CCCCUCCGGGAGAGCCAU	83	CCCCUCCGGGAGAGCCAU	83	AUGGCUCUCCCGGAGGGG	779
GGAGAGCCAUAGUGGUCUG	84	GGAGAGCCAUAGUGGUCUG	84	CAGAGCCAUAGGCUCUCC	780
CCCGGAGAGCCAUAGUGG	85	CCCGGAGAGCCAUAGUGG	85	CCACUAUGGCUCUCCCGGG	781
CCCCUCCCGGGAGAGCCA	86	CCCCUCCCGGGAGAGCCA	86	UGGCUCUCCCGGAGGGGG	782
UCCCGGGAGAGCCAUAGUG	87	UCCCGGGAGAGCCAUAGUG	87	CACUAUGGCUCUCCCGGGA	783
CCCCUCCCGGGAGAGCC	88	CCCCUCCCGGGAGAGCC	88	GGCUCUCCCGGAGGGGGG	784
CCUCCCGGGAGAGCCAU	89	CCUCCCGGGAGAGCCAU	89	UAUGGCUCUCCCGGAGGG	785
CCUCCCGGGAGAGCCAUAG	90	CCUCCCGGGAGAGCCAUAG	90	CUAUGGCUCUCCCGGAGG	786
CUCCCGGGAGAGCCAUAGU	91	CUCCCGGGAGAGCCAUAGU	91	ACUAUGGCUCUCCCGGGAG	787
UGUUGCCGCGAGGGGCC	92	UGUUGCCGCGAGGGGCC	92	GGGCCCUUGCGCGGCAACA	788
CCCCCCCUCGCGGAGAGC	93	CCCCCCCUCGCGGAGAGC	93	GCUCUCCCGGAGGGGGGG	789
CAUGGCGUAGUAGAGUG	94	CAUGGCGUAGUAGAGUG	94	CACUAUACUAACGCCAUG	790
UAGCCAUUGCGUAGUAGU	95	UAGCCAUUGCGUAGUAGU	95	CAUACUAACGCCAUGGCUA	791
AGCCAUUGCGUAGUAGUA	96	AGCCAUUGCGUAGUAGUA	96	UCAUACUAACGCCAUGGCU	792
CCAUGGCGUAGUAGUAGU	97	CCAUGGCGUAGUAGUAGU	97	ACUAUACUAACGCCAUGG	793
AUGGCGUAGUAGUAGUGU	98	AUGGCGUAGUAGUAGUGU	98	ACACUAUACUAACGCCAU	794
AAGCGUCUAGCCAUUGCGU	99	AAGCGUCUAGCCAUUGCGU	99	ACGCCAUUGGCUAGACGCUU	795
GUCUAGCCAUUGCGUAGU	100	GUCUAGCCAUUGCGUAGU	100	ACUACGCCAUUGGCUAGAC	796
AAAGCGUCUAGCCAUUGCG	101	AAAGCGUCUAGCCAUUGCG	101	CGCCAUUGGCUAGACGCUUU	797
GCGUCUAGCCAUUGCGUUA	102	GCGUCUAGCCAUUGCGUUA	102	UAACGCCAUUGGCUAGACGC	798

【 0 3 7 6 】

10

20

30

40

【表 8】

GCCAUGGCGUAGUAUGAG	103	GCCAUGGCGUAGUAUGAG	103	CUCAUAUAACGCCAUGGC	799
AGCGUUAAGCCAUAGCGUU	104	AGCGUUAAGCCAUAGCGUU	104	AACGCCAUGGCUAGACGCU	800
CGUUAAGCCAUAGCGUUAG	105	CGUUAAGCCAUAGCGUUAG	105	CUAACGCCAUGGCUAGACG	801
UCUAGCCAUAGCGUUAGUA	106	UCUAGCCAUAGCGUUAGUA	106	UACUAACGCCAUGGCUAGA	802
GAAAGCGUUAAGCCAUAGGC	107	GAAAGCGUUAAGCCAUAGGC	107	GCCAUGGCUAGACGCUUUC	803
CUAGCCAUAGCGUUAGUAU	108	CUAGCCAUAGCGUUAGUAU	108	AUACUAACGCCAUGGCUAG	804
CACUCCCCUGUGAGGAACU	109	CACUCCCCUGUGAGGAACU	109	AGUCCUCACAGGGGAGUG	805
ACCUCAAAAGAAAAACCAA	110	ACCUCAAAAGAAAAACCAA	110	UUUGUUUUUUUUUUUAGGU	806
CGCAGAAAAGCGUUAAGCCA	111	CGCAGAAAAGCGUUAAGCCA	111	UGGCUAGACGCUUUCUGCG	807
GGGUAAGGUUAUCGAUACC	112	GGGUAAGGUUAUCGAUACC	112	GGUAUCGAUGACCUUACCC	808
CAGAAAGCGUUAAGCCAU	113	CAGAAAGCGUUAAGCCAU	113	CAUGGCUAGACGCUUUCUG	809
AAACCUCAAAAAGAAAAACCA	114	AAACCUCAAAAAGAAAAACCA	114	UGGUUUUUUUUUUAGGUUU	810
GCAGAAAGCGUUAAGCCAU	115	GCAGAAAGCGUUAAGCCAU	115	AUGGCUAGACGCUUUCUGC	811
AGAAAGCGUUAAGCCAU	116	AGAAAGCGUUAAGCCAU	116	CCAUGGCUAGACGCUUUCU	812
ACGCAGAAAGCGUUAAGCC	117	ACGCAGAAAGCGUUAAGCC	117	GGCUAGACGCUUUCUGCGU	813
AACCUCAAAAAGAAAAACCAA	118	AACCUCAAAAAGAAAAACCAA	118	UUGGUUUUUUUUUUAGGUU	814
UGGGUAAGGUUAUCGAUAC	119	UGGGUAAGGUUAUCGAUAC	119	GUACGUAUGACCUUACCCA	815
GUAAAGGUUAUCGAUACCCU	120	GUAAAGGUUAUCGAUACCCU	120	AGGGUAUCGAUGACCUUAC	816
UUCACGCAGAAAAGCGUCUA	121	UUCACGCAGAAAAGCGUCUA	121	UAGACGCUUUCUGCGUGAA	817
GGUAAGGUUAUCGAUACCC	122	GGUAAGGUUAUCGAUACCC	122	GGUAUCGAUGACCUUACC	818
AUCACUCCCCUGUGAGGAA	123	AUCACUCCCCUGUGAGGAA	123	UUCUCACAGGGGAGUGAU	819
UCACUCCCCUGUGAGGAAC	124	UCACUCCCCUGUGAGGAAC	124	GUUCCUCACAGGGGAGUGA	820
UGUCUUAACGCAGAAAGCG	125	UGUCUUAACGCAGAAAGCG	125	CGCUUUCUGCGUGAAGACA	821
UCACGCAGAAAGCGUCUAG	126	UCACGCAGAAAGCGUCUAG	126	CUAGACGCUUUCUGCGUGA	822
CACGCAGAAAGCGUCUAGC	127	CACGCAGAAAGCGUCUAGC	127	GCUAGACGCUUUCUGCGUG	823
GACCGGUCCUUUCUUGGA	128	GACCGGUCCUUUCUUGGA	128	UCCAAGAAAGGACCCGGUC	824
GAGGAACUACUGUCUUCAC	129	GAGGAACUACUGUCUUCAC	129	GUGAAGACAGUAGUCCUC	825
CUGUGAGGAACUACUGUCU	130	CUGUGAGGAACUACUGUCU	130	AGACAGUAGUCCUCACAG	826
GGAACUACUGUCUUCACGC	131	GGAACUACUGUCUUCACGC	131	GCGUGAAGACAGUAGUCC	827
ACUCCCCUGUGAGGAACUA	132	ACUCCCCUGUGAGGAACUA	132	UAGUCCUCACAGGGGAGU	828
GUCUUCACGCAGAAAAGCGU	133	GUCUUCACGCAGAAAAGCGU	133	ACGCUUUCUGCGUGAAGAC	829
AGGAACUACUGUCUUCACG	134	AGGAACUACUGUCUUCACG	134	CGUGAAGACAGUAGUCCU	830
CCUGUGAGGAACUACUGUC	135	CCUGUGAGGAACUACUGUC	135	GACAGUAGUCCUCACAGG	831
UGUGAGGAACUACUGUCUU	136	UGUGAGGAACUACUGUCUU	136	AAGACAGUAGUCCUCACA	832
UCUUCACGCAGAAAAGCGUC	137	UCUUCACGCAGAAAAGCGUC	137	GACGCUUUCUGCGUGAAGA	833
GAACUACUGUCUUCACGCA	138	GAACUACUGUCUUCACGCA	138	UGCGUGAAGACAGUAGUUC	834

【 0 3 7 7 】

【表 9】

CCCUGAGGAAACUACUG	139	CCCUGAGGAAACUACUG	139	ACAGUAGUCCUACAGGG	835
CUUCACGCAGAAAGCGUCU	140	CUUCACGCAGAAAGCGUCU	140	AGACGCUUUCUGCGUGAAG	836
UGAGGAACUACUGUCUUA	141	UGAGGAACUACUGUCUUA	141	UGAAGACAGUAGUCCUCA	837
UGGCGUUAAGUAGAGUGUC	142	UGGCGUUAAGUAGAGUGUC	142	GACACUCAUAACGCA	838
CCCUGAGGAAACUACUG	143	CCCUGAGGAAACUACUG	143	CAGUAGUCCUACAGGGG	839
GUGAGGAACUACUGUCUUC	144	GUGAGGAACUACUGUCUUC	144	GAAGACAGUAGUCCUCAC	840
GGCGUUAAGUAGAGUGUCG	145	GGCGUUAAGUAGAGUGUCG	145	CGACACUCAUAACGCC	841
GCCGAGUAGUUGGGUCG	146	GCCGAGUAGUUGGGUCG	146	CGACCAACACUACUCGGC	842
ACUGUCUACACGAGAAAG	147	ACUGUCUACACGAGAAAG	147	CUUUCUGCGUGAAGACAGU	843
UGGGUCGCGAAAGGCCUUG	148	UGGGUCGCGAAAGGCCUUG	148	CAAGGCCUUCGCGACCCA	844
CUACUGUCUACACGAGAA	149	CUACUGUCUACACGAGAA	149	UUUCGCGUGAAGACAGUAG	845
CGAGUAGUUGGGUCGCG	150	CGAGUAGUUGGGUCGCG	150	CGGACCCAAACACUACUCG	846
GUAGUGUUGGGUCGCGAAA	151	GUAGUGUUGGGUCGCGAAA	151	UUUCGCGACCCAAACUAC	847
UAAACCUCAAAGAAAACC	152	UAAACCUCAAAGAAAACC	152	GGUUUUUCUUUGAGGUUUA	848
CCGAGUAGUUGGGUCGCG	153	CCGAGUAGUUGGGUCGCG	153	GCAGCCCAACACUACUCGG	849
AGCCGAGUAGUUGGGUC	154	AGCCGAGUAGUUGGGUC	154	GACCCAAACACUACUCGGCU	850
GUCGCGAAAGGCCUUGUGG	155	GUCGCGAAAGGCCUUGUGG	155	CCACAAGGCCUUCGCGAC	851
UAGUUGGGUCGCGAAAG	156	UAGUUGGGUCGCGAAAG	156	CUUUCGCGACCCAAACACUA	852
CUAGCCGAGUAGUUGGG	157	CUAGCCGAGUAGUUGGG	157	CCCAACACUACUCGGCUAG	853
GAGUAGUUGGGUCGCGA	158	GAGUAGUUGGGUCGCGA	158	UCGCGACCCAAACACUACUC	854
UCGCGAAAGGCCUUGUGGU	159	UCGCGAAAGGCCUUGUGGU	159	ACCACAAGGCCUUCGCGGA	855
GCGUUAAGUAGAGUGUCGU	160	GCGUUAAGUAGAGUGUCGU	160	ACGACACUCAUAACUACGCG	856
UAGCCGAGUAGUUGGGU	161	UAGCCGAGUAGUUGGGU	161	ACCCAACACUACUCGGCUA	857
AACUACUGUCUUCACGCGAG	162	AACUACUGUCUUCACGCGAG	162	CUGCGUGAAGACAGUAGUU	858
CGCGAAAGGCCUUGGGUA	163	CGCGAAAGGCCUUGGGUA	163	UACCACAAGGCCUUCGCG	859
AGUGUUGGGUCGCGAAAGG	164	AGUGUUGGGUCGCGAAAGG	164	CCUUCGCGACCCCAACACU	860
GUUGGGUCGCGAAAGGCCU	165	GUUGGGUCGCGAAAGGCCU	165	AGGCCUUCGCGACCCCAAC	861
AGUAGUUGGGUCGCGAA	166	AGUAGUUGGGUCGCGAA	166	UUCGCGACCCCAACACUACU	862
UUGGGUCGCGAAAGGCCU	167	UUGGGUCGCGAAAGGCCU	167	AAGGCCUUCGCGACCCCA	863
UCCCCUGAGGAAACUACU	168	UCCCCUGAGGAAACUACU	168	AGUAGUCCUACACAGGGGA	864
UACUGUCUUCACGCGAGAA	169	UACUGUCUUCACGCGAGAA	169	UUUCGCGUGAAGACAGUA	865
GUGUUGGGUCGCGAAAGGC	170	GUGUUGGGUCGCGAAAGGC	170	GCCUUUCGCGACCCCAACAC	866
ACUACUGUCUUCACGCGAGA	171	ACUACUGUCUUCACGCGAGA	171	UCUGCGUGAAGACAGUAGU	867
CUGUCUUCACGCGAGAAAGC	172	CUGUCUUCACGCGAGAAAGC	172	GCUUUCUGCGUGAAGACAG	868
GGGUCGCGAAAGGCCUUGU	173	GGGUCGCGAAAGGCCUUGU	173	ACAAAGGCCUUCGCGACCC	869
CCUAAACCUCAAAGAAAA	174	CCUAAACCUCAAAGAAAA	174	UUUUUCUUUGAGGUUAGG	870

10

20

30

【 0 3 7 8 】

40

【表 10】

GGUCGCGAAAGGCCUUGUG	175	GGUCGCGAAAGGCCUUGUG	175	CACAAGGCCUUUCGGACC	871
CUAAACCCUCAAAGAAAC	176	CUAAACCCUCAAAGAAAC	176	GUUUUUUUUGAGGUUAG	872
UGUUGGGUCGCGAAAGGCC	177	UGUUGGGUCGCGAAAGGCC	177	GGCCUUUCGCGACCCACA	873
CUCCCCUGUGAGGAACUAC	178	CUCCCCUGUGAGGAACUAC	178	GUAGUCCUCACAGGGGAG	874
UCCUAAACCUCAAAGAAAA	179	UCCUAAACCUCAAAGAAAA	179	UUUUUUUUGAGGUUUAGGA	875
ACCGGGUCCUUUCUUGGAU	180	ACCGGGUCCUUUCUUGGAU	180	AUCCAAGAAAGGACCCGGU	876
AAUCCUAAACCCUCAAAGAA	181	AAUCCUAAACCCUCAAAGAA	181	UUUUUUUUGAGGUUUAGGAU	877
UCAUAGCCUGGAGAUUUG	182	UCAUAGCCUGGAGAUUUG	182	CCAAUUCUCCAGGCAUUGA	878
AUGCCUGGAGAUUUGGGCG	183	AUGCCUGGAGAUUUGGGCG	183	CGCCAAUUCUCCAGGCAU	879
AAUGCCUGGAGAUUUGGGC	184	AAUGCCUGGAGAUUUGGGC	184	GCCCAAAUUCUCCAGGCAU	880
CCGACCUCUAGGGGUACAU	185	CCGACCUCUAGGGGUACAU	185	AUGACCCCAUAGAGGUCGG	881
GCUCAUAGCCUGGAGAUUU	186	GCUCAUAGCCUGGAGAUUU	186	AAUUCUCCAGGCAUUGAGC	882
CUCAUAGCCUGGAGAUUUG	187	CUCAUAGCCUGGAGAUUUG	187	CAAUUCUCCAGGCAUUGAG	883
GCUAGCCGAGUAGUUGG	188	GCUAGCCGAGUAGUUGG	188	CCAACACUACUCGGCUAGC	884
CGCUCAAUGCCUGGAGAUU	189	CGCUCAAUGCCUGGAGAUU	189	AAUUCUCCAGGCAUUGAGCG	885
CAUUGCCUGGAGAUUUGGG	190	CAUUGCCUGGAGAUUUGGG	190	CCCAAUUCUCCAGGCAUUG	886
GCCGACCUCUAGGGGUACA	191	GCCGACCUCUAGGGGUACA	191	UGUACCCCAUAGAGGUCGGC	887
AUCCUAAACCCUCAAAGAAA	192	AUCCUAAACCCUCAAAGAAA	192	UUUUUUUUGAGGUUUAGGAU	888
AGAUUUGGGCGUGCCCCCG	193	AGAUUUGGGCGUGCCCCCG	193	CGGGGCGACGCCCAAAUCU	889
CCGCUCAAUAGCCUGGAGA	194	CCGCUCAAUAGCCUGGAGA	194	UCUCCAGGCAUUGAGCGGG	890
GAGAUUUGGGCGUGCCCCC	195	GAGAUUUGGGCGUGCCCCC	195	GGGGCGACGCCCAAAUCUC	891
GGAGAUUUGGGCGUGCCCCC	196	GGAGAUUUGGGCGUGCCCCC	196	GGGGCGACGCCCAAAUCUC	892
GAUUUGGGCGUGCCCCCGC	197	GAUUUGGGCGUGCCCCCGC	197	GGGGGGCGACGCCCAAAUC	893
CCGCUCAAUAGCCUGGAGAU	198	CCGCUCAAUAGCCUGGAGAU	198	AUCCUCCAGGCAUUGAGCGG	894
AGUACACCGGAUUGCCAG	199	AGUACACCGGAUUGCCAG	199	CUGGCAAUUCCGGUGUACU	895
UACACCGGAUUGCCAGGA	200	UACACCGGAUUGCCAGGA	200	UCCUGGCAAUUCCGGUGUA	896
GAGUACACCGGAUUGCCA	201	GAGUACACCGGAUUGCCA	201	UGGCAAUUCCGGUGUACUC	897
GUACACCGGAUUGCCAGG	202	GUACACCGGAUUGCCAGG	202	CCUGGCAAUUCCGGUGUAC	898
UUGCCGCGCAGGGCCCCCA	203	UUGCCGCGCAGGGCCCCCA	203	UGGGCCCCUGCGCGGCAA	899
CUGGAGAUUUGGGCGUGCC	204	CUGGAGAUUUGGGCGUGCC	204	GGCACGCCCAAAUUCUCCAG	900
GUUGCCGCGCAGGGCCCCC	205	GUUGCCGCGCAGGGCCCCC	205	GGGGCCCCUGCGCGGCAAC	901
GCCUGGAGAUUUGGGCGUG	206	GCCUGGAGAUUUGGGCGUG	206	CACGCCCAAAUUCUCCAGG	902
UGGAGAUUUGGGCGUGCCC	207	UGGAGAUUUGGGCGUGCCC	207	GGGCACGCCCAAAUUCUCCA	903
CCUGGAGAUUUGGGCGUGC	208	CCUGGAGAUUUGGGCGUGC	208	GCACGCCCAAAUUCUCCAGG	904
UGCUAGCCGAGUAGUUG	209	UGCUAGCCGAGUAGUUG	209	CAACACUACUCGGCUAGCA	905
UGCCUGGAGAUUUGGGCGU	210	UGCCUGGAGAUUUGGGCGU	210	ACGCCCAAAUUCUCCAGGCA	906

10

20

30

40

【表 1 1】

CUGCUAGCCGAGUAGU	211	CUGCUAGCCGAGUAGU	211	AACACUACUGGCUAGCAG	907
ACUGCUAGCCGAGUAGU	212	ACUGCUAGCCGAGUAGU	212	ACACUACUGGCUAGCAGU	908
GACUGCUAGCCGAGUAGU	213	GACUGCUAGCCGAGUAGU	213	CACUACUGGCUAGCAGUC	909
AGACUGCUAGCCGAGUAGU	214	AGACUGCUAGCCGAGUAGU	214	ACUACUGGCUAGCAGUCU	910
ACCCGCUCAAUUGCCUGGAG	215	ACCCGCUCAAUUGCCUGGAG	215	CUCCAGGCAUUGAGCGGGU	911
AACCCGCUCAAUUGCCUGGA	216	AACCCGCUCAAUUGCCUGGA	216	UCCAGGCAUUGAGCGGGU	912
UGCCGCGCAGGGCCCCAG	217	UGCCGCGCAGGGCCCCAG	217	CUGGGCCCCUGCGCGGCA	913
AGGGCCCCCAGGUUGGUG	218	AGGGCCCCCAGGUUGGUG	218	CACCCAACUUGGGCCCCU	914
GGCCCCCAGGUUGGUGUG	219	GGCCCCCAGGUUGGUGUG	219	CACACCAACUUGGGCCCC	915
CAGGGCCCCCAGGUUGGUG	220	CAGGGCCCCCAGGUUGGUG	220	ACCCAACUUGGGCCCCUG	916
GGCCCCCAGGUUGGUGUGC	221	GGCCCCCAGGUUGGUGUGC	221	GCACACCAACUUGGGGCC	917
CGCAGGGCCCCCAGGUUGG	222	CGCAGGGCCCCCAGGUUGG	222	CCAACUUGGGGCCCCUGCG	918
UGGGCAGGAUUGGUCCUGU	223	UGGGCAGGAUUGGUCCUGU	223	ACAGGACCAUCCUGCCCA	919
GCCCCAGGUUGGUGUGCG	224	GCCCCAGGUUGGUGUGCG	224	CGCACACCAACUUGGGGC	920
GCAGGGCCCCCAGGUUGGG	225	GCAGGGCCCCCAGGUUGGG	225	CCCAACUUGGGGCCCCUGC	921
GGGCAGGAUUGGUCCUGUC	226	GGGCAGGAUUGGUCCUGUC	226	GACAGGACCAUCCUGCCCC	922
GGGGCCCCCAGGUUGGUGU	227	GGGGCCCCCAGGUUGGUGU	227	ACACCAACUUGGGGCCCC	923
GCCGCGCAGGGCCCCCAGG	228	GCCGCGCAGGGGCCCCAGG	228	CCUGGGCCCCUUGCGCGGC	924
GCGCAGGGCCCCCAGGUUG	229	GCGCAGGGGCCCCAGGUUG	229	CAACUUGGGGCCCCUGCGC	925
CGCGCAGGGCCCCCAGGUU	230	CGCGCAGGGGCCCCAGGUU	230	AACUUGGGGCCCCUGCGCG	926
CCGCGCAGGGCCCCCAGGU	231	CCGCGCAGGGGCCCCAGGU	231	ACCUGGGGCCCCUGCGCGG	927
AGGACGACCGGUCUUCUUC	232	AGGACGACCGGUCUUCUUC	232	GAAAGACCGGUCGUCUUCU	928
CAGGACGACCGGUCUUCU	233	CAGGACGACCGGUCUUCU	233	AAAGACCGGUCGUCUUCU	929
UGCCAGGACGACCGGUCUC	234	UGCCAGGACGACCGGUCUC	234	GGACCGGUCGUCUUCGCA	930
AUUGCCAGGACGACCGGGU	235	AUUGCCAGGACGACCGGGU	235	ACCCGUCGUCUUCUGGCAU	931
AAUUGCCAGGACGACCGGG	236	AAUUGCCAGGACGACCGGG	236	CCCGUCGUCUUCUGGCAU	932
UUGCCAGGACGACCGGGUC	237	UUGCCAGGACGACCGGGUC	237	GACCCGUCGUCUUCGGCAA	933
CCAGGACGACCGGGUCCU	238	CCAGGACGACCGGGUCCU	238	AAGACCCGUCGUCUCCUGG	934
GCCAGGACGACCGGGUCCU	239	GCCAGGACGACCGGGUCCU	239	AGGACCCGUCGUCUCCUGG	935
GAAUUGCCAGGACGACCGG	240	GAAUUGCCAGGACGACCGG	240	CCGUCGUCUUCUGGCAUUC	936
ACGACCGGGUCCUUCUUG	241	ACGACCGGGUCCUUCUUG	241	CAAGAAAGGACCCGUGCGU	937
GACGACCGGGUCCUUCUUC	242	GACGACCGGGUCCUUCUUC	242	AAGAAAGGACCCGUGCGUC	938
CGACCGGGUCCUUCUUGG	243	CGACCGGGUCCUUCUUGG	243	CCAAGAAAGGACCCGUGCG	939
GGACGACCGGGUCCUUCU	244	GGACGACCGGGUCCUUCU	244	AGAAAGGACCCGUGCGUCC	940
CCGGAAUUGCCAGGACGAC	245	CCGGAAUUGCCAGGACGAC	245	GUCGUCUUGGCAUUCGCGG	941
ACACCGGAAUUGCCAGGAC	246	ACACCGGAAUUGCCAGGAC	246	GUCCUGGCAUUCGCGGUGU	942

【 0 3 8 0 】

10

20

30

【表 1 2】

ACCGAAUUGCCAGGACGA	247	ACCGAAUUGCCAGGACGA	247	UCGUCUUGGCAUUCGGU	943
CGGAAUUGCCAGGACGACC	248	CGGAAUUGCCAGGACGACC	248	GGUCGUUUGGCAUUCGG	944
GGAUUGCCAGGACGACCG	249	GGAUUGCCAGGACGACCG	249	CGUCGUUUGGCAUUC	945
CACCGAAUUGCCAGGACG	250	CACCGAAUUGCCAGGACG	250	CGUCGUUUGGCAUUCGGUG	946
CCCCAGGUUGGGUGUGCGC	251	CCCCAGGUUGGGUGUGCGC	251	GCACACACCCAAACUUGGG	947
GAUCGUUGGGUGGAGUUUAC	252	GAUCGUUGGGUGGAGUUUAC	252	GUAAACUCCACCAACGAUC	948
CAGAUUCGUUGGGUGGAGUUU	253	CAGAUUCGUUGGGUGGAGUUU	253	AAACUCCACCAACGAUCUG	949
AGAUUCGUUGGGUGGAGUUUA	254	AGAUUCGUUGGGUGGAGUUUA	254	UAAACUCCACCAACGAUCU	950
CCCAGGUUGGGUGUGCGCG	255	CCCAGGUUGGGUGUGCGCG	255	CGCGCACACCCAAACUUGGG	951
CCAGGUUGGGUGUGCGCGC	256	CCAGGUUGGGUGUGCGCGC	256	GCAGCGCACACCCAAACUUGG	952
AGGUUGGGUGUGCGCGCGA	257	AGGUUGGGUGUGCGCGCGA	257	UCGCGCGCACACCCAAACCU	953
CAGGUUGGGUGUGCGCGCG	258	CAGGUUGGGUGUGCGCGCG	258	CGCGCGCACACCCAAACUUG	954
GGUUGGGUGUGCGCGCGAC	259	GGUUGGGUGUGCGCGCGAC	259	GUCGCGCGCACACCCAAAC	955
GAAAAACCAACGUAACAC	260	GAAAAACCAACGUAACAC	260	GUGUACGUUUGGUUUUUC	956
AGAAAAACCAACGUAACA	261	AGAAAAACCAACGUAACA	261	UGUUACGUUUGGUUUUUCU	957
AACCAACGUAACACCAAC	262	AACCAACGUAACACCAAC	262	GUUGGUUUGGUUUUUGGUU	958
AAAGAAAAACCAACGUA	263	AAAGAAAAACCAACGUA	263	UUACGUUUGGUUUUUCUUU	959
AAAAACCAACGUAACACC	264	AAAAACCAACGUAACACC	264	GGUUAACGUUUGGUUUUUU	960
AAGAAAAACCAACGUAAC	265	AAGAAAAACCAACGUAAC	265	GUUACGUUUGGUUUUUUCUU	961
CAAGAAAAACCAACGUA	266	CAAGAAAAACCAACGUA	266	UACGUUUGGUUUUUUCUUG	962
ACCCCGGCGUAGGUCGCG	267	ACCCCGGCGUAGGUCGCG	267	CGGACCUACGCCGGGGGU	963
GACCCCGGCGUAGGUCGC	268	GACCCCGGCGUAGGUCGC	268	GCGACCUACGCCGGGGGUC	964
CGUAGUAUGAGUGUCGUG	269	CGUAGUAUGAGUGUCGUG	269	CACGACACUACUACG	965
GUUAGUAUGAGUGUCGUGC	270	GUUAGUAUGAGUGUCGUGC	270	GCACGACACUACUAC	966
UUAGUAUGAGUGUCGUGCA	271	UUAGUAUGAGUGUCGUGCA	271	UGCACGACACUACUACUAA	967
CCAAACGUAACACCAACCG	272	CCAAACGUAACACCAACCG	272	CGGUUGGUUUGGUUUUGG	968
ACCAAACGUAACACCAACC	273	ACCAAACGUAACACCAACC	273	GGUUGGUUUGGUUUUGGU	969
UUUGGCGUGCCCCCGCGAG	274	UUUGGCGUGCCCCCGCGAG	274	CUUGGCGGGGCGACGCCCAA	970
AUUUGGCGUGCCCCCGCGG	275	AUUUGGCGUGCCCCCGCGG	275	CGCGGGGCGACGCCCAAU	971
UUUGGCGUGCCCCCGCGGA	276	UUUGGCGUGCCCCCGCGGA	276	UCGCGGGGCGACGCCCAA	972
AAACCAACGUAACACCAA	277	AAACCAACGUAACACCAA	277	UUGGUUUGGUUUUGGUUU	973
UGGCGUGCCCCCGCGAGA	278	UGGCGUGCCCCCGCGAGA	278	UCUCGGGGGCGACGCCCA	974
GUCAGAUUCGUUGGAGU	279	GUCAGAUUCGUUGGAGU	279	ACUCCACCAACGAUCGAC	975
GUGUCGUGCAGCCUCCAGG	280	GUGUCGUGCAGCCUCCAGG	280	CCUGGAGGCGUCACGACAC	976
GGUCAGAUUCGUUGGAG	281	GGUCAGAUUCGUUGGAG	281	CUCCACCAACGAUCGACC	977
AGUGUCGUGCAGCCUCCAG	282	AGUGUCGUGCAGCCUCCAG	282	CUUGGAGGCGUCACGACACU	978

10

20

30

40

【表 1 3】

GAGUGUCGUGCAGCCUCCA	283	GAGUGUCGUGCAGCCUCCA	283	UGGAGGCGUGCAGCACUC	979
UCGUAGACCGUGCACCAG	284	UCGUAGACCGUGCACCAG	284	CAUGGUGCAGGUCUACGA	980
GACCGUGCACCAGAGCAC	285	GACCGUGCACCAGAGCAC	285	GUGCUAUGGUGCAGGUC	981
AGUAUGAGUGUGCAGC	286	AGUAUGAGUGUGCAGC	286	GCUGACGACACUCAUACU	982
UAGUAUGAGUGUGCAG	287	UAGUAUGAGUGUGCAG	287	CUGACGACACUCAUACUA	983
UCAGAUUCGUUGGUGAGUU	288	UCAGAUUCGUUGGUGAGUU	288	AACUCCACCAACGAUCUGA	984
AGACCGUGCACCAGAGCA	289	AGACCGUGCACCAGAGCA	289	UGCUCAUGGUGCAGCGGUCU	985
AAAAACCAACGUAACACCA	290	AAAAACCAACGUAACACCA	290	UGGUGUUUACGUUUGGUUUU	986
GUAGACCGUGCACCAGAG	291	GUAGACCGUGCACCAGAG	291	CUCAUGGUGCAGGUCUAC	987
CUCGUAGACCGUGCACCAG	292	CUCGUAGACCGUGCACCAG	292	AUGGUGCAGGUCUACGAG	988
CGUAGACCGUGCACCAG	293	CGUAGACCGUGCACCAG	293	UCAUGGUGCAGGUCUACG	989
CCUGGGCUCAGCCCGGUA	294	CCUGGGCUCAGCCCGGUA	294	UACCCGGGUGAGCCCGAG	990
UAGACCGUGCACCAGAGC	295	UAGACCGUGCACCAGAGC	295	GCUCAUGGUGCAGGUCUA	991
GGUCUCGUAGACCGUGCAG	296	GGUCUCGUAGACCGUGCAG	296	GUGCAGGUGUACGAGACC	992
UCUCGUAGACCGUGCACC	297	UCUCGUAGACCGUGCACC	297	UGGUGCAGGUGUACGAGAG	993
GUCUCGUAGACCGUGCACC	298	GUCUCGUAGACCGUGCACC	298	GGUGCAGGUGUACGAGAG	994
UUGGGUAAGGUAUCGAUA	299	UUGGGUAAGGUAUCGAUA	299	UAUCGAUGACCUUACCCAA	995
UCGCCGACCUCAUGGGGUA	300	UCGCCGACCUCAUGGGGUA	300	UACCCCAUGAGGUGCGCGA	996
CCUCAAAGAAAAACCAAC	301	CCUCAAAGAAAAACCAAC	301	GUUUGGUUUUUCUUUGAG	997
GGCGUGCCCCCGGAGAC	302	GGCGUGCCCCCGGAGAC	302	GUCUCGGGGGCGACGCC	998
GGAUGAACCGGUGUAUAG	303	GGAUGAACCGGUGUAUAG	303	GCUAUCAGCCGGUUAUCC	999
UGGAUGAACCGGUGUAUAG	304	UGGAUGAACCGGUGUAUAG	304	CUAUCAGCCGGUUAUCCA	1000
CUCAAAGAAAAACCAACG	305	CUCAAAGAAAAACCAACG	305	CGUUUGGUUUUUCUUUGAG	1001
AGGAAGACUUCGAGCGGU	306	AGGAAGACUUCGAGCGGU	306	ACCGCUCGGAAGUCUUCU	1002
UCAAGAAAAACCAACCGU	307	UCAAGAAAAACCAACCGU	307	ACGUUUUGGUUUUUCUUUGA	1003
GGAAGACUUCGAGCGGUC	308	GGAAGACUUCGAGCGGUC	308	GACCGCUCGGAAGUCUUC	1004
CGCCGACCUCAUGGGGUAC	309	CGCCGACCUCAUGGGGUAC	309	GUACCCCAUGAGGUCGGCG	1005
CUUCCGAGCGGUCGCAACC	310	CUUCCGAGCGGUCGCAACC	310	GGUUGCAGCCGUCUGGAAG	1006
GGCGUGCCCCCGGAGACU	311	GGCGUGCCCCCGGAGACU	311	AGUCUCGGGGGCGACGCC	1007
UAUGAGUGUCGUGCAGCCU	312	UAUGAGUGUCGUGCAGCCU	312	AGGUGCAGCAGACACUAUA	1008
UGCCCCCGGAGACUGCUA	313	UGCCCCCGGAGACUGCUA	313	UAGCAGUCUCGGGGGCGA	1009
CGAGACUGCUAGCCGAGUA	314	CGAGACUGCUAGCCGAGUA	314	UACUCGGCUAGCAGUCUCG	1010
UGAGUGUCGUGCAGCCUCC	315	UGAGUGUCGUGCAGCCUCC	315	GGAGGCGUCGACGACACUA	1011
GCCCCCGGAGACUGCUAG	316	GCCCCCGGAGACUGCUAG	316	CUAGCAGUCUCGCGGGGGC	1012
GAGACUGCUAGCCGAGUAG	317	GAGACUGCUAGCCGAGUAG	317	CUACUCGGCUAGCAGUCUC	1013
CCCCCGGAGACUGCUAGC	318	CCCCCGGAGACUGCUAGC	318	GCUAGCAGUCUCGCGGGGG	1014

【 0 3 8 2 】

【表 1 4】

CGCGAGACUGCUAGCCGAG	319	CGCGAGACUGCUAGCCGAG	319	CUCGGCUAGCAGUCUCGCG	1015
GUAUGAGUGUCGUCAGCC	320	GUAUGAGUGUCGUCAGCC	320	GGCUGCACGACACUAC	1016
AUGAGUGUCGUCAGCCUC	321	AUGAGUGUCGUCAGCCUC	321	GAGGUGCACGACACUAC	1017
GCAGACUGCUAGCCGAGU	322	GCAGACUGCUAGCCGAGU	322	ACUCGGCUAGCAGUCUCGC	1018
CCCCGCGAGACUGCUAGCC	323	CCCCGCGAGACUGCUAGCC	323	GGCUAGCAGUCUCGCGGG	1019
CCGCGAGACUGCUAGCCGA	324	CCGCGAGACUGCUAGCCGA	324	UCGGCUAGCAGUCUCGCGG	1020
CCGCGAGACUGCUAGCCG	325	CCGCGAGACUGCUAGCCG	325	CGGCUAGCAGUCUCGCGGG	1021
GCUGCCCCCGCGAGACUG	326	GCUGCCCCCGCGAGACUG	326	CAGUCUCGCGGGGGCACGC	1022
GACCCCCCUCCCCGGGAGA	327	GACCCCCCUCCCCGGGAGA	327	UCUCCCCGGAGGGGGGUC	1023
CGGGUCCUUUCUUGGAUCA	328	CGGGUCCUUUCUUGGAUCA	328	UGAUCCAAAGAAAGGACCCG	1024
GUGCCCCCGCGAGACUGCU	329	GUGCCCCCGCGAGACUGCU	329	AGCAGUCUCGCGGGGGCAC	1025
CGUGCCCCCGCGAGACUGC	330	CGUGCCCCCGCGAGACUGC	330	GCAGUCUCGCGGGGGCACG	1026
UUCGCCGACCUCUAGGGGU	331	UUCGCCGACCUCUAGGGGU	331	ACCCAUAGAGGUCGCGGAA	1027
CGCCACAGGACGUCUAAAGU	332	CGCCACAGGACGUCUAAAGU	332	ACUUGACGUCCUGUGGGCG	1028
GCCCACAGGACGUCUAAAGU	333	GCCCACAGGACGUCUAAAGU	333	AACUUGACGUCCUGUGGGC	1029
ACCCCCCUCCCCGGGAGAG	334	ACCCCCCUCCCCGGGAGAG	334	CUCUCCCCGGAGGGGGGU	1030
GGACCCCCCUCCCCGGGAG	335	GGACCCCCCUCCCCGGGAG	335	CUCCCCGGAGGGGGGUCC	1031
CCGGGUCCUUUCUUGGAUC	336	CCGGGUCCUUUCUUGGAUC	336	GAUCCAAAGAAAGGACCCG	1032
CAGGACCCCCCUCCCCGGG	337	CAGGACCCCCCUCCCCGGG	337	CCCGGAGGGGGGUCCUG	1033
AGGACGUCUAAAGUUCGCGG	338	AGGACGUCUAAAGUUCGCGG	338	CCCGGGAACUUGACGUCCU	1034
AGGACCCCCCUCCCCGGGA	339	AGGACCCCCCUCCCCGGGA	339	UCCCCGGAGGGGGGUCCU	1035
CCACAGGACGUCUAAAGUCC	340	CCACAGGACGUCUAAAGUCC	340	GGAAUUGACGUCCUGUGG	1036
CAGGACGUCUAAAGUUCGCG	341	CAGGACGUCUAAAGUUCGCG	341	CCGGGAACUUGACGUCCUG	1037
ACAGGACGUCUAAAGUUCGCG	342	ACAGGACGUCUAAAGUUCGCG	342	CGGGAACUUGACGUCCUGU	1038
CACAGGACGUCUAAAGUUC	343	CACAGGACGUCUAAAGUUC	343	GGGAACUUGACGUCCUGUG	1039
CAGUGGAUGAACCGGCUGA	344	CAGUGGAUGAACCGGCUGA	344	UCAGCCGGUUCUACUCCACUG	1040
GGGCUACGCCCGGUACCC	345	GGGCUACGCCCGGUACCC	345	GGGUACCCGGGCUAGAGCC	1041
CCGAGCGGUCGCAACCUUG	346	CCGAGCGGUCGCAACCUUG	346	CGAGGUUGCGACCGCUCGCG	1042
CUGGGCUACGCCCGGUAC	347	CUGGGCUACGCCCGGUAC	347	GUACCCGGGCUAGAGCCAG	1043
AGUGGAUGAACCGGCUGAU	348	AGUGGAUGAACCGGCUGAU	348	AUCAGCCGGUUCUACUCCACU	1044
UCCGAGCGGUCGCAACCUUC	349	UCCGAGCGGUCGCAACCUUC	349	GAGGUUGCGACCGCUCGGA	1045
UGGGCUACGCCCGGUJACC	350	UGGGCUACGCCCGGUJACC	350	GGUACCCGGGCUAGAGCCCA	1046
GGUACCCUUGGCCCCUUA	351	GGUACCCUUGGCCCCUUA	351	UAGAGGGGCCCAAGGGUACC	1047
UUCGAGGGGUCGCAACCU	352	UUCGAGCGGUCGCAACCU	352	AGGUUGCGACCGCUCGGA	1048
GGGUACCCUUGGCCCCUUCU	353	GGGUACCCUUGGCCCCUUCU	353	AGAGGGGCCCAAGGGUACCC	1049
GGGUCCUUUCUUGGAUCAA	354	GGGUCCUUUCUUGGAUCAA	354	UUGAUCCAAAGAAAGGACCC	1050

【 0 3 8 3 】

【表 1 5】

CCCACAGGACGUAAGUUC	355	CCCACAGGACGUAAGUUC	355	GAACUUGACGUCCUGUGGG	1051
GGUUGCUCUUCUCUAUCU	356	GGUUGCUCUUCUCUAUCU	356	AGAUAGAGAAAGAGCAACC	1052
GUGGGCAGGAUGGCUCCUG	357	GUGGGCAGGAUGGCUCCUG	357	CAGGAGCCAUCCUGCCAC	1053
GGUGGGCAGGAUGGCUCCU	358	GGUGGGCAGGAUGGCUCCU	358	AGGAGCCAUCCUGCCAC	1054
GUUGCUCUUCUCUAUCUU	359	GUUGCUCUUCUCUAUCUU	359	AAGAUAGAGAAAGAGCAAC	1055
GUGGAUGAACCGGUGAUA	360	GUGGAUGAACCGGUGAUA	360	UAUCAGCCGGUUAUCCAC	1056
CCAGGACCCCCUCCCGG	361	CCAGGACCCCCUCCCGG	361	CCGGAGGGGGGUCCUGG	1057
GGUGGGCAGGAUGGCUCC	362	GGUGGGCAGGAUGGCUCC	362	GGAGCCAUCCUGCCACCC	1058
CUUCACGGAGGCUAUGACU	363	CUUCACGGAGGCUAUGACU	363	AGUCAUAGCCUCCGUGAAG	1059
ACGCCGCCACAGGACGU	364	ACGCCGCCACAGGACGU	364	ACGUCCUGUGGGCGGCGGU	1060
UCCAGGACCCCCUCCCG	365	UCCAGGACCCCCUCCCG	365	CGGAGGGGGGUCCUGGA	1061
AUAUGAUGAACUGGUC	366	AUAUGAUGAACUGGUC	366	GACCAGUUAUCAUAUAU	1062
UUCACGGAGGCUAUGACUA	367	UUCACGGAGGCUAUGACUA	367	UAGUCAUAGCCUCCUGAA	1063
UCACGGAGGCUAUGACUAG	368	UCACGGAGGCUAUGACUAG	368	CUAGUCAUAGCCUCCUGA	1064
AUGAACCGGCUAUGACUG	369	AUGAACCGGCUAUGACUG	369	ACGUAUCAGCCGGUUAU	1065
GGGAUAUGAUGAUAACUG	370	GGGAUAUGAUGAUAACUG	370	CAGUUAUCAUAUAUCCC	1066
UGCAGUGGAUGAACCGGCU	371	UGCAGUGGAUGAACCGGCU	371	AGCCGGUUAUCCACUGCA	1067
GUGCAGUGGAUGAACCGGC	372	GUGCAGUGGAUGAACCGGC	372	GCCGGUUAUCCACUGCAC	1068
UGAACCGGCUAUGACGUU	373	UGAACCGGCUAUGACGUU	373	AACGCUAUCAGCCGGUUA	1069
GGUAUGAUGAUAACUGG	374	GGUAUGAUGAUAACUGG	374	CCAGUUAUCAUAUAUCC	1070
GCUCUUUCUUAUCUCCU	375	GCUCUUUCUUAUCUCCU	375	AGGAAGUAAGAGAAAGAGC	1071
GGGGGCGACACUCCACCAU	376	GGGGGCGACACUCCACCAU	376	AUGGUGGAGUGUCGCCCC	1072
GAUGAACCGGCUAUGACG	377	GAUGAACCGGCUAUGACG	377	CGCUAUCAGCCGGUUAUC	1073
GAUAUGAUGAUAACUGGU	378	GAUAUGAUGAUAACUGGU	378	ACCAGUUAUCAUAUAUC	1074
UGGGAUAUGAUGAUAACU	379	UGGGAUAUGAUGAUAACU	379	AGUUAUCAUAUAUCCCA	1075
UUGCUCUUUCUUAUCUUC	380	UUGCUCUUUCUUAUCUUC	380	GAAGUAAGAGAAAGAGCAA	1076
UGGGGGCGACACUCCACCA	381	UGGGGGCGACACUCCACCA	381	UGGUGGAGUGUCGCCCCCA	1077
UGCUCUUUCUUAUCUUC	382	UGCUCUUUCUUAUCUUC	382	GGAAGUAAGAGAAAGAGCA	1078
GGUCCUUUCUUGGAUAAAC	383	GGUCCUUUCUUGGAUAAAC	383	GUUGAUCCAAAGAAAGGACC	1079
AAGACUCCGAGGUGCGC	384	AAGACUCCGAGGUGCGC	384	GCAGCCGUCUGGAAGUCUU	1080
AGCCCGGUAACCUUGGCC	385	AGCCCGGUAACCUUGGCC	385	GGCCAAAGGUAACCGGGCU	1081
UUUCUUGGAUAAACCGCU	386	UUUCUUGGAUAAACCGCU	386	AGCGGUUUAUCCAAAGAAA	1082
CAGCCCGGUAACCUUGGC	387	CAGCCCGGUAACCUUGGC	387	GCCAAGGGUACCGGGCUG	1083
AGACUCCGAGCGGUCGCA	388	AGACUCCGAGCGGUCGCA	388	UGCGACCGCUCGGAGUUCU	1084
UUCUUGGAUCAACCCGCU	389	UUCUUGGAUCAACCCGCU	389	GAGCGGUUUAUCCAAAGAA	1085
CCCGGGUACCCUUGGCCCC	390	CCCGGGUACCCUUGGCCCC	390	GGGGCCAAAGGGUAACCCGGG	1086

10

20

30

40

【表 17】

UCCCGGGCGGUGGUCAGAU	427	UCCCGGGCGGUGGUCAGAU	427	AUCUGACCACCGCCCGGGA	1123
GUUCCCGGGCGGUGGUCAG	428	GUUCCCGGGCGGUGGUCAG	428	CUGACCACCGCCCGGGAAC	1124
GCCCGGUAACCUUGGCC	429	GCCCGGUAACCUUGGCC	429	GGCCAAAGGUAACCCGGGC	1125
AAGGAGUAAGGCGAAGG	430	AAGGAGUAAGGCGAAGG	430	CCUUCGCCUUAUCUCUU	1126
AGGAGUAAGGCGAAGGC	431	AGGAGUAAGGCGAAGGC	431	GCCUUCGCCUUAUCUCUU	1127
GUUUAACCUUGUCCGCGCA	432	GUUUAACCUUGUCCGCGCA	432	UGCGCGCAACAGGUAAAC	1128
CUGUUGCCGCGCAGGGGCC	433	CUGUUGCCGCGCAGGGGCC	433	GGCCCCUGCGCGGCAACAG	1129
AACACCAACCGCGCCAC	434	AACACCAACCGCGCCAC	434	GUGGGCGCGGUUGGUGUU	1130
GAGUUUACCUUGUCCGCG	435	GAGUUUACCUUGUCCGCG	435	CGCGGCAACAGGUAAACUC	1131
UUUACCUUGUCCGCGCAG	436	UUUACCUUGUCCGCGCAG	436	CUGCGCGCAACAGGUAAA	1132
GGGUGGGCAGGAUGGCU	437	GGGUGGGCAGGAUGGCU	437	GAGCAUCCUGCCACCC	1133
GAAGACUCCGAGCGGUC	438	GAAGACUCCGAGCGGUC	438	CGACCGUCGGAAGUCUUC	1134
ACCUUGCCGCGCAGGGG	439	ACCUUGCCGCGCAGGGG	439	CCCCUGCGCGGCAACAGGU	1135
UACCUUGUCCGCGCAGGG	440	UACCUUGUCCGCGCAGGG	440	CCUUGCGCGCAACAGGUA	1136
UACCUUUAACUGGGCAG	441	UACCUUUAACUGGGCAG	441	CUGCCAGUUGAAGAGGUA	1137
CGUGAACUAUGCAACAGGG	442	CGUGAACUAUGCAACAGGG	442	CCUGUUGCAUAGUUCACG	1138
ACACCAACCGCGCCAC	443	ACACCAACCGCGCCAC	443	UGUGGGCGCGGUUGGUGU	1139
CCCGGGCGGUGGUCAGAU	444	CCCGGGCGGUGGUCAGAU	444	GAUCUGACCACCGCCCGG	1140
ACCUCUUAACUGGGCAGU	445	ACCUCUUAACUGGGCAGU	445	ACUGCCAGUUGAAGAGGU	1141
CUUCGCCAGCUCAUGGGG	446	CUUCGCCAGCUCAUGGGG	446	CCCCAUGAGGUCGCGAAG	1142
CCUGUUGCCGCGCAGGGG	447	CCUGUUGCCGCGCAGGGG	447	GCCCCUGCGCGCAACAGG	1143
CCAACCGCGGCCACAGGA	448	CCAACCGCGGCCACAGGA	448	UCCUGUGGGCGCGGUUGG	1144
ACCAACCGCGGCCACAGG	449	ACCAACCGCGGCCACAGG	449	CCUGUGGGCGCGGUUGGU	1145
UGGAGUUUACCUUGUCCG	450	UGGAGUUUACCUUGUCCG	450	CGGCAACAGGUAAACUCCA	1146
CACCAACCGCGCCACAG	451	CACCAACCGCGCCACAG	451	CUGUGGGCGCGGUUGGUG	1147
CAACGUAACACCAACCGC	452	CAACGUAACACCAACCGC	452	GCGGUUGGUGUACGUUUUG	1148
CAAGCGGAGACGGCUGGAG	453	CAAGCGGAGACGGCUGGAG	453	CUCCAGCCGUCUCGCUUG	1149
ACGGAGGCUAUGACUAGGU	454	ACGGAGGCUAUGACUAGGU	454	ACCUAGUCAUAGCCUCCGU	1150
UAACACCAACCGCGCCCA	455	UAACACCAACCGCGCCCA	455	UGGGCGCGGUUGGUGUUA	1151
AUCGUUGGAGUUUACC	456	AUCGUUGGAGUUUACC	456	GGUAAACUCCACCAACGUA	1152
GGGAGACAUUAUACACAG	457	GGGAGACAUUAUACACAG	457	GCUGAGUAUAUAGUCUCC	1153
AACUUCGUGGAAGGCGACA	458	AACUUCGUGGAAGGCGACA	458	UGUCGCCUCCACGAGGUU	1154
GGGGAGACAUUAUACACA	459	GGGGAGACAUUAUACACA	459	UGUGAUUAUAGUCUCCCC	1155
AACGUAACACCAACCGCG	460	AACGUAACACCAACCGCG	460	CGCGGUUGGUGUACGUU	1156
AAACGUAACACCAACCGCC	461	AAACGUAACACCAACCGCC	461	GGCGGUUGGUGUACGUUU	1157
GGGGAGACAUUAUACACAG	462	GGGGAGACAUUAUACACAG	462	CUGUGAUUAUAGUCUCCCC	1158

【 0 3 8 6 】

【表 18】

GAGAUAGGCGAAGGCGU	463	GAGAUAGGCGAAGGCGU	463	ACGCCUUCGCCUUAUCUC	1159
AAGCGGAGACGGCUGGAGC	464	AAGCGGAGACGGCUGGAGC	464	GCUCCAGCCGUCUCCGCUU	1160
GUACCCUUGGCCCCUUAU	465	GUACCCUUGGCCCCUUAU	465	AUAGAGGGGCCAAGGGUAC	1161
CUCCAGGACCCCCUCC	466	CUCCAGGACCCCCUCC	466	GGAGGGGGGUCUUGGAGG	1162
CUCCAGGACCCCCUCC	467	CUCCAGGACCCCCUCC	467	GGGAGGGGGUCCUGGAG	1163
UACCCUUGGCCCCUUAUG	468	UACCCUUGGCCCCUUAUG	468	CAUAGAGGGGCCAAGGGUA	1164
CAACCUUGGGAAGGCGAC	469	CAACCUUGGGAAGGCGAC	469	GUCGCCUUCACGAGGUUG	1165
CGGAGGCUAUGACUAGGUA	470	CGGAGGCUAUGACUAGGUA	470	UACCUAGUCAUAGCCUCCG	1166
GGAGAUAGGCGAAGGCG	471	GGAGAUAGGCGAAGGCG	471	CGCCUUCGCCUUAUCUCC	1167
AGAUAGGCGAAGGCGUC	472	AGAUAGGCGAAGGCGUC	472	GACGCCUUCGCCUUAUCU	1168
GUACACCAACCGCCGCC	473	GUACACCAACCGCCGCC	473	GGCGGCGGUUGGUGUUAU	1169
CGUACACCAACCGCCGCC	474	CGUACACCAACCGCCGCC	474	GGCGGCGGUUGGUGUUAU	1170
ACGUACACCAACCGCCGCC	475	ACGUACACCAACCGCCGCC	475	GCGGCGGUUGGUGUUAU	1171
CACGGAGGCUAUGACUAGG	476	CACGGAGGCUAUGACUAGG	476	CCUAGUCAUAGCCUCCGUG	1172
GUUGGUGGAGUUUACCUGU	477	GUUGGUGGAGUUUACCUGU	477	ACAGGUAAACUCCACCAAC	1173
CGUUGGUGGAGUUUACCUG	478	CGUUGGUGGAGUUUACCUG	478	CAGGUAAACUCCACCAACG	1174
ACCCUUGGCCCCUUAUGG	479	ACCCUUGGCCCCUUAUGG	479	CCAUAGAGGGGCCAAGGGU	1175
UUGGUGGAGUUUACCUGUU	480	UUGGUGGAGUUUACCUGUU	480	AACAGGUAAACUCCACCAA	1176
UGGUGGAGUUUACCUGUUG	481	UGGUGGAGUUUACCUGUUG	481	CAACAGGUAAACUCCACCA	1177
UCGUUGGUGGAGUUUACCU	482	UCGUUGGUGGAGUUUACCU	482	AGGUAAACUCCACCAACGA	1178
CGGGUACCCUUGGCCCCUC	483	CGGGUACCCUUGGCCCCUC	483	GAGGGGCCAAGGUACCCCG	1179
GGCUCAGCCCGGUACCCU	484	GGCUCAGCCCGGUACCCU	484	AGGUACCCCGGUGAGCC	1180
GAUCACUCCCCUGUGAGGA	485	GAUCACUCCCCUGUGAGGA	485	UCCUCACAGGGGAGUGAUC	1181
GGUGGUCAGAUUCGUUGGUG	486	GGUGGUCAGAUUCGUUGGUG	486	CACCAACGAUCUGAACACC	1182
GAUGAAGGCGAAGGCGUCC	487	GAUGAAGGCGAAGGCGUCC	487	GGACGCCUUCGCCUUAUC	1183
AGGAUGGCUCCUGUCACCC	488	AGGAUGGCUCCUGUCACCC	488	GGGUGACAGGAGCCAUCCU	1184
CUCAGCCCGGUACCCUUG	489	CUCAGCCCGGUACCCUUG	489	CAAGGGUACCCGGGUGAG	1185
UCAGCCCGGUACCCUUGG	490	UCAGCCCGGUACCCUUGG	490	CCAAGGGUACCCGGGUGA	1186
AUGAAGGCGAAGGCGUCCA	491	AUGAAGGCGAAGGCGUCCA	491	UGGACGCCUUCGCCUUAU	1187
CGGGGAGACAUUAUACAC	492	CGGGGAGACAUUAUACAC	492	GUGAUUAUGUUCUCCCCCG	1188
CAGGAUGGCUCCUUGACAC	493	CAGGAUGGCUCCUUGACAC	493	GGUACAGGAGCCAUCCUG	1189
UGAAGGCGAAGGCGUCCAC	494	UGAAGGCGAAGGCGUCCAC	494	GUGACGCCUUCGCCUUAU	1190
UGGUCAGAUUCGUUGGUGA	495	UGGUCAGAUUCGUUGGUGA	495	UCCACCAACGAUCUGACCA	1191
GCUCAGCCCGGUACCCU	496	GCUCAGCCCGGUACCCU	496	AAGGGUACCCGGGUGAGC	1192
GUGGUCAGAUUCGUUGGUGG	497	GUGGUCAGAUUCGUUGGUGG	497	CCACCAACGAUCUGACCCAC	1193
CAGCCUCCAGGACCCCC	498	CAGCCUCCAGGACCCCC	498	GGGGGGGUCCUGGAGGCUG	1194

【表 19】

GGCGGUGGUCAGAUUG	499	GGCGGUGGUCAGAUUG	499	CAACGAUCUGACACCGCC	1195
GCCUCCAGGACCCCCUC	500	GCCUCCAGGACCCCCUC	500	GAGGGGGGUCUUGGAGGC	1196
AACCGGUCAGUAGGUCG	501	AACCGGUCAGUAGGUCG	501	CGAACGUAUCAGCCGGUU	1197
AGCCUCCAGGACCCCCUC	502	AGCCUCCAGGACCCCCUC	502	AGGGGGGUCUUGGAGGCU	1198
CGGCUUCGCGGACCUCAU	503	CGGCUUCGCGGACCUCAU	503	CAUGAGGUCGGCGAAGCCG	1199
GCGGAGACGGCUGGAGCGC	504	GCGGAGACGGCUGGAGCGC	504	GCGUCCAGCGGUCUCCGC	1200
UCAUGGGGUACAUCGCU	505	UCAUGGGGUACAUCGCU	505	AGCGAAUGUACCCCAUGA	1201
GAACCGGUCAGUAGGUC	506	GAACCGGUCAGUAGGUC	506	GAACGUAUCAGCGGUUC	1202
GCGGUGGUCAGAUUGG	507	GCGGUGGUCAGAUUGG	507	CCAACGAUCUGACACCGC	1203
GGCAGGAUGGCUCCUGUA	508	GGCAGGAUGGCUCCUGUA	508	UGACAGGAGCCAUCCUGCC	1204
GCAGGAUGGCUCCUGUAC	509	GCAGGAUGGCUCCUGUAC	509	GUGACAGGAGCCAUCCUGC	1205
AUUUGGUAAGGUCAUCGA	510	AUUUGGUAAGGUCAUCGA	510	UCGAUGACCUUACCCAAU	1206
ACCGGUCAGUAGGUCG	511	ACCGGUCAGUAGGUCG	511	GCGAACGUAUCAGCCGGU	1207
CGGAGACGGCUGGAGCGG	512	CGGAGACGGCUGGAGCGG	512	CGCGUCCAGCCGUCUCCG	1208
GCGGCUUCGCGGACCUCAU	513	GCGGCUUCGCGGACCUCAU	513	AUGAGGUCGGCGAAGCCGC	1209
AUUUGGUAAGGUCAUCG	514	AUUUGGUAAGGUCAUCG	514	CGAUGACCUUACCCAAU	1210
GGGCGGUGGUCAGAUUG	515	GGGCGGUGGUCAGAUUG	515	AACGAUCUGACACCGCC	1211
CAACCGCGCGCACAGGAC	516	CAACCGCGCGCACAGGAC	516	GUCUUGUGGGCGGCGGUUG	1212
UGC GGCUUCGCGACCUCA	517	UGC GGCUUCGCGACCUCA	517	UGAGGUCGGCGAAGCCGCA	1213
CGGUGGUCAGAUUGG	518	CGGUGGUCAGAUUGG	518	ACCAACGAUCUGACACCG	1214
UUGGGUGUGCGCGACUA	519	UUGGGUGUGCGCGACUA	519	UAGUCGCGCGCACACCCAA	1215
GUGUGCGCGGACUAGGAA	520	GUGUGCGCGGACUAGGAA	520	UUCUAGUCGCGCGCACAC	1216
GAUGGCUUCGUCACCCCG	521	GAUGGCUUCGUCACCCCG	521	CGGGUGACAGGAGCCAU	1217
GGAUGGCUUCGUCACCC	522	GGAUGGCUUCGUCACCC	522	GGGUGACAGGAGCCAU	1218
UGUGCGCGGACUAGGAA	523	UGUGCGCGGACUAGGAA	523	CUUCUAGUCGCGGACACA	1219
UGGGUGUGCGCGGACUAG	524	UGGGUGUGCGCGGACUAG	524	CUAGUCGCGCGCACACCA	1220
GGUGUGCGCGGACUAGGA	525	GGUGUGCGCGGACUAGGA	525	UCCUAGUCGCGCGCACACC	1221
GGUGUGCGCGGACUAGG	526	GGUGUGCGCGGACUAGG	526	CCUAGUCGCGCGCACACCC	1222
CCCCGGGUAAGGUCGCUA	527	CCCCGGGUAAGGUCGCUA	527	UACGCGACCUACCGCGGG	1223
GAAGGCGACAACCUAUCCC	528	GAAGGCGACAACCUAUCCC	528	GGGAUAGGUUUGCGCCUUC	1224
CCCGGCGUAGGUCGCUAA	529	CCCGGCGUAGGUCGCUAA	529	UUACGCGACCUACGCGGG	1225
AGCGGAGACGGCUGGAGCG	530	AGCGGAGACGGCUGGAGCG	530	CGUCCAGCGGUCUCCGCU	1226
CCCCGGGUAAGGUCGCU	531	CCCCGGGUAAGGUCGCU	531	ACGCGACCUACGCGGGG	1227
AGGCGAAGGCGUCCACAGU	532	AGGCGAAGGCGUCCACAGU	532	ACUGGAGCGCCUUCGCCU	1228
AAGGCGAAGGCGUCCACAG	533	AAGGCGAAGGCGUCCACAG	533	CUGUGGAGCGCCUUCGCCU	1229
GUUGGGUGUGCGCGGACU	534	GUUGGGUGUGCGCGGACU	534	AGUCGCGCGCACACCCAAC	1230

10

20

30

【表 20】

CUAUGGGGUACAUCGCG	535	CUAUGGGGUACAUCGCG	535	GCGAAUGUACCCCAUGAG	1231
GGAAGGCGACAACCUAUC	536	GGAAGGCGACAACCUAUC	536	GGUAGGUUGUCGCCUUC	1232
GCAAGUUCUUGCCGACGG	537	GCAAGUUCUUGCCGACGG	537	CCGUCGGCAAGGAACUUG	1233
UGCAGCCUCCAGGACCC	538	UGCAGCCUCCAGGACCC	538	GGGGUCCUUGGAGGUGCA	1234
GGACUGCACGAUGCUCGUG	539	GGACUGCACGAUGCUCGUG	539	CACGAGCAUCGUGCAGUCC	1235
GAAGGCGAAGGCGUCCACA	540	GAAGGCGAAGGCGUCCACA	540	UGUGGACGCCUUCGCCUUC	1236
GCAACCUCUGGAAGCGGA	541	GCAACCUCUGGAAGCGGA	541	UCGCCUCCACGAGGUUGC	1237
GACGCGGCGUGUCUUGGU	542	GACGCGGCGUGUCUUGGU	542	ACCAAGCACAGCCCGCGUC	1238
ACGCGGCGUGUCUUGGUA	543	ACGCGGCGUGUCUUGGUA	543	UACCAAGCACAGCCCGCGU	1239
GUGCAGCCUCCAGGACCC	544	GUGCAGCCUCCAGGACCC	544	GGGUCCUGGAGGUGCAC	1240
GCAGCCUCCAGGACCC	545	GCAGCCUCCAGGACCC	545	GGGGUCCUGGAGGUGC	1241
CGCAACCUCUGGAAGCG	546	CGCAACCUCUGGAAGCG	546	CGCCUCCACGAGGUUGCG	1242
UGUCGUGCAGCCUCCAGGA	547	UGUCGUGCAGCCUCCAGGA	547	UCCUGGAGGUGCAGCAGCA	1243
AUGGCUUGGGGAUAUGAUGA	548	AUGGCUUGGGGAUAUGAUGA	548	UCAUCAUAUCCCAAGCCAU	1244
CUUGGGAUAUGAUGAUGAA	549	CUUGGGAUAUGAUGAUGAA	549	UUCAUCAUAUCCCAAG	1245
CCCUUGGCCCCUCUAUGGC	550	CCCUUGGCCCCUCUAUGGC	550	GCCAUAGAGGGGCCAAGGG	1246
UGGCUUGGGGAUAUGAU	551	UGGCUUGGGGAUAUGAU	551	AUCAUCAUAUCCCAAGCCA	1247
CUGUGCAGUGGAUGAACCG	552	CUGUGCAGUGGAUGAACCG	552	CGGUUCAUCCACUGCACAG	1248
AUGACGCGGCGUGUCUUG	553	AUGACGCGGCGUGUCUUG	553	CAAGCACAGCCCGCGUCAU	1249
GCUUGGGAUAUGAUGAUGA	554	GCUUGGGAUAUGAUGAUGA	554	UCAUCAUAUCCCAAGC	1250
UAUGACGCGGCGUGUCUUG	555	UAUGACGCGGCGUGUCUUG	555	AAGCACAGCCCGCGUCAU	1251
UGACGCGGCGUGUCUUGG	556	UGACGCGGCGUGUCUUGG	556	CCAAGCACAGCCCGCGUCA	1252
GGCUUGGGGAUAUGAUGAUG	557	GGCUUGGGGAUAUGAUGAUG	557	CAUCAUCAUAUCCCAAGCC	1253
UGUGCAGUGGAUGAACCGG	558	UGUGCAGUGGAUGAACCGG	558	CCGGUUCAUCCACUGCACA	1254
GCUGUGCAGUGGAUGAAC	559	GCUGUGCAGUGGAUGAAC	559	GGUUCAUCCACUGCACAGC	1255
CUCUACAACUGGGCAGUAA	560	CUCUACAACUGGGCAGUAA	560	UUACUGCCAGUUUAAGAG	1256
CCUCGUGGAAGGCGACAAC	561	CCUCGUGGAAGGCGACAAC	561	GUUGUCGCCUUCACGAGG	1257
UGUGUACCCAGACAGUCG	562	UGUGUACCCAGACAGUCG	562	CGACUGUCUGGUGACACA	1258
GGCGUGAACUAUGCAACAG	563	GGCGUGAACUAUGCAACAG	563	CUGUUGCAUAGUUCACGCC	1259
CGCGUGAACUAUGCAACA	564	CGCGUGAACUAUGCAACA	564	UGUUGCAUAGUUCACGCCG	1260
GUGUACCCAGACAGUCGA	565	GUGUACCCAGACAGUCGA	565	UCGACUGUCUGGGUGACAC	1261
CCUCUACAACUGGGCAGUA	566	CCUCUACAACUGGGCAGUA	566	UACUGCCAGUUUAAGAGG	1262
CGUGGAAGGCGACAACCUA	567	CGUGGAAGGCGACAACCUA	567	UAGGUUGUCGCCUUCACG	1263
UCGUGGAAGGCGACAACCU	568	UCGUGGAAGGCGACAACCU	568	AGGUUGUCGCCUUCACGA	1264
CGGCCUAGUUGGGCCCCA	569	CGGCCUAGUUGGGCCCCA	569	UGGGCCCCCAACUJAGGCCG	1265
CGACUAGGAAGACUUCGGA	570	CGACUAGGAAGACUUCGGA	570	UCGGAAGUUCUUCUJAGUCG	1266

10

20

30

40

【表 2 1】

UUUGGGUAAGGUCAUCGAU	571	UUUGGGUAAGGUCAUCGAU	571	AUCGAUGACCUUACCCAAA	1267
GUGGAAGCGACAAACCUAU	572	GUGGAAGCGACAAACCUAU	572	AUAGGUUGUGCCUUCAC	1268
ACCUCGUGGAAGCGACAA	573	ACCUCGUGGAAGCGACAA	573	UUGUGCCUUCACGAGGU	1269
GCGACUAGGAAGACUUCG	574	GCGACUAGGAAGACUUCG	574	CGGAAGUCUUCUAGUCGC	1270
GUCGUGCAGCCUCCAGGAC	575	GUCGUGCAGCCUCCAGGAC	575	GUCUGGAGGCGUCACGAC	1271
UAGGAAGACUCCGAGCGG	576	UAGGAAGACUCCGAGCGG	576	CCGUCGGAAGUCUUCUUA	1272
ACGGCGUGAACUAUGCAAC	577	ACGGCGUGAACUAUGCAAC	577	GUUGCAUAGUUCACGCCGU	1273
CUCGUGGAAGCGACAACC	578	CUCGUGGAAGCGACAACC	578	GGUUGUCGCCUUCACGAG	1274
GGUCGCAACCUUGGGAAG	579	GGUCGCAACCUUGGGAAG	579	CUUCCACGAGGUUGCGACC	1275
CGGUCGCAACCUUGGGA	580	CGGUCGCAACCUUGGGA	580	UUCACGAGGUUGCGACCG	1276
GCGCGGACUAGGAAGACU	581	GCGCGGACUAGGAAGACU	581	AGUCUUCUAGUCGCGCGC	1277
GACGGCGUGAACUAUGCAA	582	GACGGCGUGAACUAUGCAA	582	UUGCAUAGUUCACGCCGUC	1278
UAGAUACUCCCCUGUGAG	583	UAGAUACUCCCCUGUGAG	583	CUCACAGGGAGUGAUUA	1279
AGCGGUCGCAACCUUGG	584	AGCGGUCGCAACCUUGG	584	CCACGAGGUUGCGACCCGU	1280
UGGAAGGCGACAACCUAUC	585	UGGAAGGCGACAACCUAUC	585	GAUAGGUUGUGCCUUCOA	1281
CGCGGACUAGGAAGACUU	586	CGCGGACUAGGAAGACUU	586	AAGUCUUCUAGUCGCGCG	1282
CUAGGAAGACUUCGAGCG	587	CUAGGAAGACUUCGAGCG	587	CGCUCGGAAGUCUUCUAG	1283
GUGCGCGGACUAGGAAGA	588	GUGCGCGGACUAGGAAGA	588	UCUUCUAGUCGCGCGCAC	1284
AGAUACUCCCCUGUGAGG	589	AGAUACUCCCCUGUGAGG	589	CCUCACAGGGGAGUGAUUC	1285
UGCGGCGGACUAGGAAGAC	590	UGCGGCGGACUAGGAAGAC	590	GUCUUCUAGUCGCGCGCA	1286
AUAGAUACUCCCCUGUGA	591	AUAGAUACUCCCCUGUGA	591	UCACAGGGGAGUGAUUAU	1287
GAGCGGUCGCAACCUUGUG	592	GAGCGGUCGCAACCUUGUG	592	CACGAGGUUGCGACCCGUC	1288
CACGAACGACUGCUCCAAC	593	CACGAACGACUGCUCCAAC	593	GUUGGAGCAGUCGUUUGUG	1289
GGCAAGUUCUUGCCGACG	594	GGCAAGUUCUUGCCGACG	594	CGUCGGAAGGAACUUGCC	1290
UCGUGCAGCCUCCAGGACC	595	UCGUGCAGCCUCCAGGACC	595	GGUCCUGGAGGCGUCACGA	1291
GUCACGAACGACUGCUCCA	596	GUCACGAACGACUGCUCCA	596	UGGAGCAGUCGUUUGUGAC	1292
GCGGUCGCAACCUUGGGA	597	GCGGUCGCAACCUUGGGA	597	UCCACGAGGUUGCGACCGC	1293
GCGGACUAGGAAGACUUC	598	GCGGACUAGGAAGACUUC	598	GAAGUCUUCUAGUCGCGC	1294
GCUAUGACGGGGCUGUGC	599	GCUAUGACGGGGCUGUGC	599	GCACAGCCCGCGUCAUAGC	1295
UCACGAACGACUGCUCCAA	600	UCACGAACGACUGCUCCAA	600	UUGGAGCAGUCGUUUGUGA	1296
UCGCAACCUUGGGAAGGC	601	UCGCAACCUUGGGAAGGC	601	GCCUCCACGAGGUUGCGA	1297
CGUGCAGCCUCCAGGACCC	602	CGUGCAGCCUCCAGGACCC	602	GGGUCCUGGAGGCGUCACG	1298
GUCGCAACCUUGGGAAGG	603	GUCGCAACCUUGGGAAGG	603	CCUCCACGAGGUUGCGAC	1299
ACUAGGAAGACUUCGAGC	604	ACUAGGAAGACUUCGAGC	604	GCUCGGAAGUCUUCUAGU	1300
CGCGACUAGGAAGACUUC	605	CGCGACUAGGAAGACUUC	605	GGAAGUCUUCUAGUCGCG	1301
UGGGCGAAGCACAUUGGGA	606	UGGGCGAAGCACAUUGGGA	606	UCCACAUGUCUUCGCCCCA	1302

【 0 3 9 0 】

【表 2 2】

CCUUGCCUACUUAUCCAUG	607	CCUUGCCUACUUAUCCAUG	607	CAUGGAUAGUAGGCAAGG	1303
GCCUCAGGAAACUUGGGGU	608	GCCUCAGGAAACUUGGGGU	608	ACCCAAAUUUCUGAGGC	1304
UGCUAUGACGCGGCUGUG	609	UGCUAUGACGCGGCUGUG	609	CACAGCCGCGUCUAUAGCA	1305
UCGUGCUCGCCACCGCUAC	610	UCGUGCUCGCCACCGCUAC	610	GUAGCGGUGGCGAGCACGA	1306
UGCCUCAGGAAACUUGGGG	611	UGCCUCAGGAAACUUGGGG	611	CCCAAGUUAUCCUAGGCA	1307
UGUCUCUGCCCGACCCCG	612	UGUCUCUGCCCGACCCCG	612	CGGGUCGGGCACGAGACA	1308
UGUGCGGCAGGAGUUGGG	613	UGUGCGGCAGGAGUUGGG	613	CCCAUUCUUGCCGCCACA	1309
GUCGUGCUCGCCACCGCUA	614	GUCGUGCUCGCCACCGCUA	614	UAGCGGUGGCGAGCACGAC	1310
GAUUCCACUACGUGACGG	615	GAUUCCACUACGUGACGG	615	CCGUCACGUAUGGAAUUC	1311
GGCCUUGCCUACUUAUCC	616	GGCCUUGCCUACUUAUCC	616	GGAAUAGUAGGCAAGGCC	1312
GCCUUGCCUACUUAUCCA	617	GCCUUGCCUACUUAUCCA	617	AUGGAUAGUAGGCAAGGC	1313
GACUAGGAAGACUUCGAG	618	GACUAGGAAGACUUCGAG	618	CUCGGAAGUCUUCUAGUC	1314
GCGGGGAGACAUUAUCA	619	GCGGGGAGACAUUAUCA	619	UGAUUAUUGUCUCCCCGC	1315
CGAGCGGUCGCAACCUCGU	620	CGAGCGGUCGCAACCUCGU	620	ACGAGGUUGCGACCGCUCG	1316
GGCCUUGCCUACUUAUCCA	621	GGCCUUGCCUACUUAUCCA	621	UGGAUAGUAGGCAAGGCC	1317
AUUCCACUACGUGACGGG	622	AUUCCACUACGUGACGGG	622	CCGUCACGUAUGUGAAU	1318
GGACGUCAGUUCGCGGC	623	GGACGUCAGUUCGCGGC	623	GCCCGGAACUUGACGUCC	1319
GAGUCUAUGACGCGGGCU	624	GAGUCUAUGACGCGGGCU	624	AGCCCGGUAUAGCACUC	1320
GACGUCAGUUCGCGGGG	625	GACGUCAGUUCGCGGGG	625	CGCCCGGAACUUGACGUC	1321
UCAGCGACGGUCUUGGUC	626	UCAGCGACGGUCUUGGUC	626	GACCAAGACCGUCGCGUGA	1322
UCAAGUUCGCGGGGUGG	627	UCAAGUUCGCGGGGUGG	627	CCACCGCCGGAACUUGA	1323
UCAAGGAGAUAGAAGCGAA	628	UCAAGGAGAUAGAAGCGAA	628	UUCGCCUUAUCUCCUUGA	1324
CCUUAUCCCAAGGCUCCG	629	CCUUAUCCCAAGGCUCCG	629	GGCGAGCCUUGGGGAUAGG	1325
CUUGACCUACCUACAGAUCA	630	CUUGACCUACCUACAGAUCA	630	UGAUCUGAGGUAGGUCAAG	1326
UUUCCACUACGUGACGGGC	631	UUUCCACUACGUGACGGGC	631	GCCCGUCACGUAGUGGAA	1327
AGUGCUAUGACGCGGGCUG	632	AGUGCUAUGACGCGGGCUG	632	CAGCCCGCGUAUAGCACU	1328
ACGUCAGUUAUCCGCGCG	633	ACGUCAGUUAUCCGCGCG	633	CCGCCCGGAACUUGACGU	1329
UCUGGAGACUUGGGCCAG	634	UCUGGAGACUUGGGCCAG	634	CUGGCCGUAUUCUCCAGA	1330
GGCGAAGCACAUUGGAA	635	GGCGAAGCACAUUGGAA	635	UUCACAUUGUCUUCGCC	1331
UUGACCUACCUACAGAUCA	636	UUGACCUACCUACAGAUCA	636	AUGAUCUGAGGUAGGUCAA	1332
CCAAGCGGAGACGGCUGGA	637	CCAAGCGGAGACGGCUGGA	637	UCCAGCCGUCUCCGCUUGG	1333
ACCAAGCGGAGACGGCUGG	638	ACCAAGCGGAGACGGCUGG	638	CCAGCCGUCUCCGCUUGGU	1334
GGGUGGCUUAUGCCUACAG	639	GGGUGGCUUAUGCCUACAG	639	CUGAGGCAUGAAGCCACCC	1335
GUCAAGUUCGCGCGGUG	640	GUCAAGUUCGCGCGGUG	640	CACCGCCGGAACUUGAC	1336
CUCAAGGAGAUAGAAGCGA	641	CUCAAGGAGAUAGAAGCGA	641	UCGCCUUAUCUCCUUGAG	1337
GACCAAGCGGAGACGGCUG	642	GACCAAGCGGAGACGGCUG	642	CAGCCGUCUCCGCUUGGUC	1338

【 0 3 9 1 】

【表 2 3】

UCCAGGUCGGGCUCAACCA	643	UCCAGGUCGGGCUCAACCA	643	UGGUAGAGCCCGACCCUGGA	1339
CUCUUCUCUAUCUCCUC	644	CUCUUCUCUAUCUCCUC	644	GAGGAAGAUAGAGAAAGAG	1340
GUCUGGAGACUAGGGCCA	645	GUCUGGAGACUAGGGCCA	645	UGGCCCCGAUUCUCCAGAC	1341
GUUGAGACUUGGCCCCGA	646	GUUGAGACUUGGCCCCGA	646	UCGGGGGCGAAGUCACAAC	1342
AGACUUGGCUCCAGUCCAA	647	AGACUUGGCUCCAGUCCAA	647	UUGGACUGGAGCCAGGUCU	1343
CUUGCCUACUAUCCAUUG	648	CUUGCCUACUAUCCAUUG	648	CCAUUGAAUAGUAGGCAAG	1344
CCCGUUGCUCUUCUCUA	649	CCCGUUGCUCUUCUCUA	649	UAGAGAAAGAGCAACCCGG	1345
CUUUCUCUAUCUCCUCUU	650	CUUUCUCUAUCUCCUCUU	650	AAGAGGAAGAUAGAGAAAG	1346
AGGGUGGCUUACUAGCCUCA	651	AGGGUGGCUUACUAGCCUCA	651	UGAGGCAUGAAGCCACCCU	1347
AAGACCUUGGCUCCAGUCCA	652	AAGACCUUGGCUCCAGUCCA	652	UGGACUGGAGCCAGGUCUU	1348
CCGGUUGCUCUUCUCUAU	653	CCGGUUGCUCUUCUCUAU	653	AUAGAGAAAGAGCAACCCG	1349
CGGUUGCUCUUCUCUAUC	654	CGGUUGCUCUUCUCUAUC	654	GAUAGAGAAAGAGCAACCG	1350
UGGGGGAUUUCCACUACGU	655	UGGGGGAUUUCCACUACGU	655	ACGUAGUGGAAAUCCCCCA	1351
AUGUCACGAACGACUUCUC	656	AUGUCACGAACGACUUCUC	656	GAGCAGUCGUUCGUGACAU	1352
GGCCUAGUUGGGGCCCCAC	657	GGCCUAGUUGGGGCCCCAC	657	GUGGGCCCCAACUAGGCC	1353
UGGACCAAGCGGAGACGGC	658	UGGACCAAGCGGAGACGGC	658	GCCGUUCGCGUUGGUCCA	1354
UUCGAGGUCGGGCUCAACC	659	UUCGAGGUCGGGCUCAACC	659	GGUUGAGCCCGACCCUGAA	1355
AGCGGUGCGAGUUCUUGGU	660	AGCGGUGCGAGUUCUUGGU	660	ACCAGGAACUCGACCCCGCU	1356
CAAGGAGAUAGGCGGAAG	661	CAAGGAGAUAGGCGGAAG	661	CUUCGCCUUAUCUCCUUG	1357
CAUGUCACGAACGACUGCU	662	CAUGUCACGAACGACUGCU	662	AGCAGUCGUUCGUGACAU	1358
CAGCGGUCGAGUUCUCCUG	663	CAGCGGUCGAGUUCUCCUG	663	CCAGGAACUCGACCCCGUG	1359
UUCACUACGUGACGGGCA	664	UUCACUACGUGACGGGCA	664	UGCCCGUCACGUAGUGGAA	1360
UAGGGUGGCUUACUAGCCUC	665	UAGGGUGGCUUACUAGCCUC	665	GAGGCAUGAAGCCACCCUA	1361
UCCAGGACUGCAGCAUGCU	666	UCCAGGACUGCAGCAUGCU	666	AGCAUCGUGCAGUCCUGGA	1362
UCCACUACGUGACGGGCAU	667	UCCACUACGUGACGGGCAU	667	AUGCCCGUCACGUAGUGGA	1363
AAUAGGGUGGCUUACUAGCC	668	AAUAGGGUGGCUUACUAGCC	668	GGCAUGAAGCCACCCUAUU	1364
GUCUUCACGGAGGCUAUGA	669	GUCUUCACGGAGGCUAUGA	669	UCAUAGCCUCCGUGAAGAC	1365
AUAGGGUGGCUUACUAGCCU	670	AUAGGGUGGCUUACUAGCCU	670	AGGCAUGAAGCCACCCUAU	1366
UCUUCACGGAGGCUAUGAC	671	UCUUCACGGAGGCUAUGAC	671	GUCAUAGCCUCCGUGAAGA	1367
AUGCCUCAGGAAACUUGGG	672	AUGCCUCAGGAAACUUGGG	672	CCCAAGUUUCCUGAGGCAU	1368
ACCGGACGUGCUCAAGGA	673	ACCGGACGUGCUCAAGGA	673	UCCUUGAGCAGUCCCGGU	1369
GGGGCUGUGCAGUGGAUGA	674	GGGGCUGUGCAGUGGAUGA	674	UCAUCCACUGCAGACGCC	1370
AAGCUCCAGGACUGCACGA	675	AAGCUCCAGGACUGCACGA	675	UCGUGCAGUCCUGGAGCUU	1371
GCUCCAGGACUGCACGAUG	676	GCUCCAGGACUGCACGAUG	676	CAUCGUGCAGUCCUGGAGC	1372
UACCGGGACGUGCUCAAGG	677	UACCGGGACGUGCUCAAGG	677	CCUUGAGCAGUCCCGGUA	1373
GGGCUUGCAGUGGAUGAA	678	GGGCUUGCAGUGGAUGAA	678	UUCAUCCACUGCAGACGCC	1374

【 0 3 9 2 】

【表 2 4】

CGUCAAGUCCCCGGCGGU	679	CGUCAAGUUCGCGGCGGU	679	ACCGCCCGGGAACUUGACG	1375
UCAAUAGGGUGGCUUCAUG	680	UCAUAGGGUGGCUUCAUG	680	CAUGAAGCCACCCUUAUGA	1376
AGUCUUCACGGAGGCUAUG	681	AGUCUUCACGGAGGCUAUG	681	CAUAGCCUCCGUGAAGACU	1377
GGACCAAGCGGAGACGGCU	682	GGACCAAGCGGAGACGGCU	682	AGCCGUCUCCGCUUGGUCC	1378
GGCUCCAGUCCAAGCUCCU	683	GGCUCCAGUCCAAGCUCCU	683	AGGAGCUUGGACUGGAGCC	1379
GGCUGUGCAGUGGAUAAAC	684	GGCUGUGCAGUGGAUAAAC	684	GUUCAUCCACUGCACAGCC	1380
CUCCAGGACUGCACGAUGC	685	CUCCAGGACUGCACGAUGC	685	GCAUCGUGCAGUCCUGGAG	1381
GAGUCUUCACGGAGGCUAU	686	GAGUCUUCACGGAGGCUAU	686	AUAGCCUCCGUGAAGACUC	1382
UGGCUCCAGUCCAAGCUCC	687	UGGCUCCAGUCCAAGCUCC	687	GGAGCUUGGACUGGAGCCA	1383
GGGGAUUUCCACUACGUGA	688	GGGGAUUUCCACUACGUGA	688	UCACGUAGUGGAAAUCCCC	1384
CAUGCCUCAGGAAACUUGG	689	CAUGCCUCAGGAAACUUGG	689	CCAAGUUUCCUGAGGCAUG	1385
AUCAAUAGGGUGGCUUCAU	690	AUCAAUAGGGUGGCUUCAU	690	AUGAAGCCACCCUUAUUGAU	1386
GCGGGCCUUGCCUACUAAU	691	GCGGGCCUUGCCUACUAAU	691	AUAUAGGCAAGGCCCGC	1387
CCGGGACGUGCUCAAGGAG	692	CCGGGACGUGCUCAAGGAG	692	CUCCUUGAGCACGUCGCCG	1388
CCAUGGGUGGGAAACUGGGC	693	CCAUGGGUGGGAAACUGGGC	693	GCCCAUUUCCCCACCAUUG	1389
CAAUAGGGUGGCUUCAUGC	694	CAAUAGGGUGGCUUCAUGC	694	GCAUGAAGCCACCCUUAUUG	1390
AGCUCCAGGACUGCACGAU	695	AGCUCCAGGACUGCACGAU	695	AUCGUGCAGUCCUGGAGCU	1391
CGGGCCUUGCCUACUAAUUC	696	CGGGCCUUGCCUACUAAUUC	696	GAAUAGUAGGCAAGGCCCG	1392

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

【 0 3 9 3 】

【表 2 5】

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 IIb (sense)	B GGUCCUUUCUUGGAUCAACCC B	1413
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25238	HCV IRES Loop (antisense)	B GGUUGAUCCAAGAAAGGACC B	1414
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25251	HCV IRES Loop (sense) Inverted Control	B CCCAACUAGGUUCUUCUCCUGG B	1415
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25252	HCV IRES Loop IIb Inverted Control Compliment	B CCAGGAAGAACCUAGUUGGG B	1416
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25814	HCV IRES Loop IIb +2U overhang sense	GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCUU	1417
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25815	HCV IRES Loop IIb +2U overhang antisense	GGGUUGAUCCAAGAAAGGACCUU	1418
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25834	HCV IRES Loop IIb +2U overhang sense	BGGUCCUUUCUUGGAUCAACCCUUB	1419
GGUCCUUUCUUGGAUCAACCCGC	1393	25835	HCV IRES Loop IIb +2U overhang antisense	BGGGUUGAUCCAAGAAAGGACCUUB	1420
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	28415	HCV-Luc:325U21 TT siRNA sense	CCCCGGGAGGUCUCGUAGATT	1421
UGCGGAACCGGUGAGUACACCCGG	1395	28416	HCV-Luc:162U21 TT siRNA sense	CGGAACCGGUGAGUACACCTT	1422
GUGCCCCGGGAGGUCUCGUAGAC	1396	28417	HCV-Luc:324U21 TT siRNA sense	GCCCCGGGAGGUCUCGUAGTT	1423
GCGGAACCGGUGAGUACACCCGA	1397	28418	HCV-Luc:163U21 TT siRNA sense	GGAACCGGUGAGUACACCGTT	1424
UUUGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	28419	HCV-Luc:294U21 TT siRNA sense	GUGGUACUGCCUGAUAGGGTT	1425
CUUGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	28420	HCV-Luc:293U21 TT siRNA sense	UGUGGUACUGCCUGAUAGGTT	1426
CCUUGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	28421	HCV-Luc:292U21 TT siRNA sense	UUGUGGUACUGCCUGAUAGTT	1427
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	28422	HCV-Luc:343L21 TT siRNA (325C) antisense	UCUACGAGACCUCCCGGGGTT	1428
UGCGGAACCGGUGAGUACACCCGG	1395	28423	HCV-Luc:180L21 TT siRNA (162C) antisense	GGUGUACUACCCGGUUCGTT	1429
GUGCCCCGGGAGGUCUCGUAGAC	1396	28424	HCV-Luc:342L21 TT siRNA (324C) antisense	CUACGAGACCUCCCGGGGCTT	1430
GCGGAACCGGUGAGUACACCCGA	1397	28425	HCV-Luc:181L21 TT siRNA (163C) antisense	CGGUGUACUACCCGGUUCCTT	1431
UUUGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	28426	HCV-Luc:312L21 TT siRNA (294C) antisense	CCCUAUCAGGCGAGUACCACTT	1432
CUUGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	28427	HCV-Luc:311L21 TT siRNA (293C) antisense	CCUAUCAGGCGAGUACCACTT	1433
CCUUGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	28428	HCV-Luc:310L21 TT siRNA (292C) antisense	CUAUCAGGCGAGUACCACTT	1434
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	28429	HCV-Luc:325U21 TT siRNA inv control	TTAGUUCUCUGGAGGGGCCCC	1435

【0 3 9 4】

10

20

30

40

【表 2 6】

UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	28430	HCV-Luc:162U21 TT siRNA inv control	TCCACAUGAGUGGCCAAGGC	1436
GUGCCCCGGAGGUCUGUAGAC	1396	28431	HCV-Luc:324U21 TT siRNA inv control	TTGAUCUCUGGAGGCCCCG	1437
GCGGAACCGGUGAGUACACCGGA	1397	28432	HCV-Luc:163U21 TT siRNA inv control	TTGCCACAUGAGUGGCCAAGG	1438
UUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	28433	HCV-Luc:294U21 TT siRNA inv control	TTGGGAUAGUCCGUCUAUGGUG	1439
CUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	28434	HCV-Luc:293U21 TT siRNA inv control	TTGGAUAGUCCGUCUAUGGUGU	1440
CCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	28435	HCV-Luc:292U21 TT siRNA inv control	TTGAUAGUCCGUCUAUGGUGUU	1441
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	28436	HCV-Luc:343L21 TT siRNA (325C) inv control	TTGGGGCCCUCCAGAGCAUCU	1442
UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	28437	HCV-Luc:180L21 TT siRNA (162C) inv control	TTGCCUUUGGCCACUCUAUGUGG	1443
GUGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGAC	1396	28438	HCV-Luc:342L21 TT siRNA (324C) inv control	TTCGGGGCCCUCCAGAGCAUC	1444
GCGGAACCGGUGAGUACACCGGA	1397	28439	HCV-Luc:181L21 TT siRNA (163C) inv control	TTCCUUUGGCCACUCUAUGUGGC	1445
UUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	28440	HCV-Luc:312L21 TT siRNA (294C) inv control	TTCACCAUGACGGACUAUCCC	1446
CUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	28441	HCV-Luc:311L21 TT siRNA (293C) inv control	TTACACCAUGACGGACUAUCC	1447
CCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	28442	HCV-Luc:310L21 TT siRNA (292C) inv control	TTAACACCAUGACGGACUAUUC	1448
UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	29573	HCV-Luc:162U21 siRNA sense	CGGAACCGGUGAGUACACCGG	1449
GCGGAACCGGUGAGUACACCGGA	1397	29574	HCV-Luc:163U21 siRNA sense	GGAACCGGUGAGUACACCGGA	1450
CCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	29575	HCV-Luc:292U21 siRNA sense	UUGUGGUACUGCCUGAUAGGG	1451
CUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	29576	HCV-Luc:293U21 siRNA sense	UGUGGUACUGCCUGAUAGGGU	1452
UUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	29577	HCV-Luc:294U21 siRNA sense	GUGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1453
GUGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGAC	1396	29578	HCV-Luc:324U21 siRNA sense	GCCCCGGGAGGUCUCUGUAGAC	1454
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	29579	HCV-Luc:325U21 siRNA sense	CCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1455
UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	29580	HCV-Luc:182L21 siRNA (162C) antisense	GGUGUACUCACCGGUUCCGCA	1456
GCGGAACCGGUGAGUACACCGGA	1397	29581	HCV-Luc:183L21 siRNA (163C) antisense	CGGUGUACUCACCGGUUCCGCG	1457
CCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	29582	HCV-Luc:312L21 siRNA (292C) antisense	CUAUCAGGCAGUACCAACAGG	1458
CUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	29583	HCV-Luc:313L21 siRNA (293C) antisense	CCUAUCAGGCAGUACCAACAG	1459
UUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	29584	HCV-Luc:314L21 siRNA (294C) antisense	CCCUAUCAGGCAGUACCAACAA	1460
GUGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGAC	1396	29585	HCV-Luc:344L21 siRNA (324C) antisense	CUACGAGACCUCCCGGGGCAC	1461
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	29586	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) antisense	UCUACGAGACCUCCCGGGGCA	1462

【表 2 7】

UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	29587	antisense	GGCCACAUGAGUGGCCAAGGC	1463
GCGGAACCGGUGAGUACACCGGA	1397	29588	HCV-Luc:162U21 siRNA inv control	AGCCACAUGAGUGGCCAAGG	1464
CCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	29589	HCV-Luc:163U21 siRNA inv control	GGGAUAGUCCGUCUAUGGUGU	1465
CUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	29590	HCV-Luc:292U21 siRNA inv control	UGGGAUAGUCCGUCUAUGGUGU	1466
UUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	29591	HCV-Luc:293U21 siRNA inv control	GUGGGAUAGUCCGUCUAUGGUG	1467
GUGCCCCGGGAGGUCUCGUAGAC	1396	29592	HCV-Luc:294U21 siRNA inv control	CAGAUUCUCUGGAGGGCCCCG	1468
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	29593	HCV-Luc:324U21 siRNA inv control	CCAGAUUCUCUGGAGGGCCCC	1469
UGCGGAACCGGUGAGUACACCGG	1395	29594	HCV-Luc:325U21 siRNA inv control	ACGCCUUGGCCACUCUAUGUGG	1470
GCGGAACCGGUGAGUACACCGGA	1397	29595	HCV-Luc:182L21 siRNA (162C) inv control	CGCCUUGGCCACUCUAUGUGGC	1471
CCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGG	1400	29596	HCV-Luc:183L21 siRNA (163C) inv control	GGAAACCAUGACGGACUAUC	1472
CUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGU	1399	29597	HCV-Luc:312L21 siRNA (292C) inv control	GAACACCAUGACGGACUAUCC	1473
UUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGUG	1398	29598	HCV-Luc:313L21 siRNA (293C) inv control	AACACCAUGACGGACUAUCCC	1474
GUGCCCCGGGAGGUCUCGUAGAC	1396	29599	HCV-Luc:314L21 siRNA (294C) inv control	CACGGGGCCCCUCCAGAGCAUC	1475
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	29600	HCV-Luc:344L21 siRNA (324C) inv control	ACGGGGCCCCUCCAGAGCAUCU	1476
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	30051	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv control	BCsCsCsGsGGAGGUCUCGUAGAXXB	1477
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	30052	HCV-Luc:325U21 siRNA 5' P=S + 3' univ. base 2 + 5/3' invAba sense	BAsgsAsUsGsCUCUGGAGGGCCCCXXB	1478
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	30053	HCV-Luc:325U21 siRNA inv 5' P=S + 3' univ. base 2 + 5/3' invAba sense	UsCsUsAsCsGAGACCCUCCCGGGGXXB	1479
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	30054	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv 5' P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba	GsGsGsGsCsCCUCCAGAGCAUCUXXB	1480
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	30055	HCV-Luc:325U21 siRNA all Y P=S + 3' univ. base 2 + 5/3' invAba sense	BCsCsCsCsGGGAGGUsCsUsCsGsUsAGAXXB	1481
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	30056	HCV-Luc:325U21 siRNA inv all Y P=S + 3' univ. base 2 + 5/3' invAba	BAGAUsgCsUsCsUsGGAGGGCsCsCsCsXXB	1482
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	30057	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) all Y P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba antisense	UsCsUsACsGAGACsCsUsCsCsGGGGXXB	1483
UGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACC	1394	30058	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv all Y P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba	GGGGCsCsCsUsCsCsAGAGCsUsCsUsXXB	1484

【表 28】

UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30059	HCV-Luc:325U21 siRNA 4/3 P=S ends + all Y-2'F + 3' univ. base 2 + 5/3' invAba sense	BcscscscsGGGAGGucucGuAsGsAsXXB	1485
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30060	HCV-Luc:325U21 siRNA inv 4/3 P=S ends + all Y-2'F + 3' univ. base 2 + 5/3' invAba	BAsgsAsusGcucUGGAGGGccscscsXXB	1486
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30170	HCV-Luc:325U21 siRNA all Y-2'F + 3' univ. base 2 + 5/3' invAba sense	B ccccGGGAGGucucGuAGAXX B	1487
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30171	HCV-Luc:325U21 siRNA inv all Y-2'F + 3' univ. base 2 + 5/3' invAba	B AGAuGcucUGGAGGGcccccXX B	1488
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30172	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) all Y P=S + 3' univ. base 2 + 5/3' invAba antisense	UsCsUsACsGAGACsCsUsCsCsGGGGXX B	1489
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30173	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) all Y-2'F antisense	ucuAcGAGAccucccGGGG	1490
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30175	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) all Y-2'F + 3' univ. base 2 antisense	ucuAcGAGAccucccGGGGXX	1491
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30176	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv all Y-2'F + 3' univ. base 2	GGGGccucccAGAGcAucXX	1492
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30177	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) all Y-2'F + 3' univ. base 2 + 5/3' IB antisense	B ucuAcGAGAccucccGGGGXX B	1493
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30178	HCV-Luc:325U21 siRNA all Y P=S + 3' univ. base 2 + 3' invAba sense	CsCsCsCsGGGAGGUsCsUsCsGUsAGAXX B	1494
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30417	HCV-Luc:325U21 siRNA w/IB sense	CCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC B	1495
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30418	HCV-Luc:325U21 siRNA w/IB sense	B CCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC B	1496
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30419	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) w/IB antisense	UCUACGAGACCUCUCCCCGGGGCA B	1497
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30420	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) w/IB antisense	B UCUACGAGACCUCUCCCCGGGGCA B	1498
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30561	HCV-Luc:325U21 siRNA Y-2'OMe (stab06) + 5/3' invAba sense	BccccGGGAGGucucGuAGATTB	1499
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	30562	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) Y-2'F, R-2'OMe + TsT antisense	ucuAcGAGAccucccGGGGTsT	1500
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGUGA	1401	30649	HCV-Luc:153U21 siRNA stab07 sense	B AGuGGucUGcGGAAccGGuTT B	1501
GUCUGCGGAACCGGUGAGUACAC	1402	30650	HCV-Luc:159U21 siRNA stab07 sense	B cuGGGAAccGGuGAGuAcTT B	1502
GCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGG	1403	30651	HCV-Luc:291U21 siRNA stab07 sense	B cuuGuGGuAcuGccuGAuATT B	1503
UGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1404	30652	HCV-Luc:295U21 siRNA stab07 sense	B uGGuAcuGccuGAuAGGGuTT B	1504
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGCU	1405	30653	HCV-Luc:296U21 siRNA stab07 sense	B GGuAcuGccuGAuAGGGuGTT B	1505
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1406	30654	HCV-Luc:297U21 siRNA stab07 sense	B GuAcuGccuGAuAGGGuGcTT B	1506
GGUACUGCCUGAUAGGGUGCUUG	1407	30655	HCV-Luc:298U21 siRNA stab07 sense	B uAcuGccuGAuAGGGuGcuTT B	1507

【0397】

【表 2 9】

UACUGCCUGAUAGGGGUGCUUGCG	1408	30656	HCV-Luc:300U21 siRNA stab07 sense	B cuGccuGauAGGGGuGcuuGTT B	1508
ACUGCCUGAUAGGGGUGCUUGCGA	1409	30657	HCV-Luc:301U21 siRNA stab07 sense	B uGccuGauAGGGGuGcuuGcTT B	1509
UGCCUGAUAGGGGUGCUUGCGAGU	1410	30658	HCV-Luc:303U21 siRNA stab07 sense	B ccuGauAGGGGuGcuuGcGATT B	1510
CUGAUAGGGGUGCUUGCGAGUGCC	1411	30659	HCV-Luc:306U21 siRNA stab07 sense	B GAuAGGGGuGcuuGcGAGuGTT B	1511
GUGCCCCGGAGGUGUCUGUAGAC	1396	30660	HCV-Luc:324U21 siRNA stab07 sense	B GccccGGGAGGGuucGauGTT B	1512
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGUGA	1401	30661	HCV-Luc:173L21 siRNA (153C) stab08 antisense	AccGGuuuccGcAGAccAcuTsT	1513
GUCUGCGGAACCGGUGAGUACAC	1402	30662	HCV-Luc:179L21 siRNA (159C) stab08 antisense	GuAcucAccGGuuuccGcAGTsT	1514
GCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGG	1403	30663	HCV-Luc:311L21 siRNA (291C) stab08 antisense	uAucAGGcAGuAccAcAAGTsT	1515
UGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1404	30664	HCV-Luc:315L21 siRNA (295C) stab08 antisense	AcccuAucAGGcAGuAccATsT	1516
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGCU	1405	30665	HCV-Luc:316L21 siRNA (296C) stab08 antisense	cAcccuAucAGGcAGuAccTsT	1517
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1406	30666	HCV-Luc:317L21 siRNA (297C) stab08 antisense	GcAcccuAucAGGcAGuAcTsT	1518
GGUACUGCCUGAUAGGGUGCUUG	1407	30667	HCV-Luc:318L21 siRNA (298C) stab08 antisense	AGcAcccuAucAGGcAGuATsT	1519
UACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCG	1408	30668	HCV-Luc:320L21 siRNA (300C) stab08 antisense	cAAGcAcccuAucAGGcAGTsT	1520
ACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCGA	1409	30669	HCV-Luc:321L21 siRNA (301C) stab08 antisense	GcAAGcAcccuAucAGGcATsT	1521
UGCCUGAUAGGGUGCUUGCGAGU	1410	30670	HCV-Luc:323L21 siRNA (303C) stab08 antisense	ucGcAAGcAcccuAucAGGTsT	1522
CUGAUAGGGGUGCUUGCGAGUGCC	1411	30671	HCV-Luc:326L21 siRNA (306C) stab08 antisense	cAcucGcAAGcAcccuAucTsT	1523
GUGCCCCGGAGGUGUCUGUAGAC	1396	30672	HCV-Luc:344L21 siRNA (324C) stab08 antisense	cuAcGAGAccuccGGGGcTsT	1524
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGUGA	1401	30673	HCV-Luc:153U21 siRNA stab07 inv sense	B uGGccAAGGcGucGGuGATT B	1525
GUCUGCGGAACCGGUGAGUACAC	1402	30674	HCV-Luc:159U21 siRNA stab07 inv sense	B cAuGAGuGGccAAGGcGucTT B	1526
GCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGG	1403	30675	HCV-Luc:291U21 siRNA stab07 inv sense	B AuAGuccGucAuGGuGucTT B	1527
UGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1404	30676	HCV-Luc:295U21 siRNA stab07 inv sense	B uGGGAuAGuccGucAuGGuTT B	1528
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGCU	1405	30677	HCV-Luc:296U21 siRNA stab07 inv sense	B GuGGGAuAGuccGucAuGGTT B	1529
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1406	30678	HCV-Luc:297U21 siRNA stab07 inv sense	B cGuGGGAuAGuccGucAuGTT B	1530

【 0 3 9 8 】

【表 3 0】

GGUACUGCCUGAUAGGGUGGCUUG	1407	30679	HCV-Luc:298U21 siRNA stab07 inv sense	B ucGuGGGAuAGuccGucAuTT B	1531
UACUGCCUGAUAGGGUGGCUUGCG	1408	30680	HCV-Luc:300U21 siRNA stab07 inv sense	B GuucGuGGGAuAGuccGucTT B	1532
ACUGCCUGAUAGGGUGGCUUGCGA	1409	30681	HCV-Luc:301U21 siRNA stab07 inv sense	B cGuucGuGGGAuAGuccGuTT B	1533
UGCCUGAUAGGGUGGCUUGCGAGU	1410	30682	HCV-Luc:303U21 siRNA stab07 inv sense	B AGcGuucGuGGGAuAGuccTT B	1534
CUGAUAGGGUGGCUUGCGAGUGCC	1411	30683	HCV-Luc:306U21 siRNA stab07 inv sense	B GuGAGcGuucGuGGGAuAGTT B	1535
GUGCCCCGGAGGUCUCGUAGAC	1396	30684	HCV-Luc:324U21 siRNA stab07 inv sense	B GAuGcuucGGAGGGGccccGTT B	1536
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGUGA	1401	30685	HCV-Luc:173L21 siRNA (153C) stab08 inv antisense	ucAccAGAcGccuuGGccATsT	1537
GUCUGCGGAACCGGUGAGUACAC	1402	30686	HCV-Luc:179L21 siRNA (159C) stab08 inv antisense	GAcGccuuGGccAcucAuGTsT	1538
GCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGG	1403	30687	HCV-Luc:311L21 siRNA (291C) stab08 inv antisense	GAAcAccAuGAcGGGAcuAuTsT	1539
UGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1404	30688	HCV-Luc:315L21 siRNA (295C) stab08 inv antisense	AccAuGAcGGGAcuAuccccATsT	1540
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGCU	1405	30689	HCV-Luc:316L21 siRNA (296C) stab08 inv antisense	ccAuGAcGGGAcuAuucccAcTsT	1541
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGGCUU	1406	30690	HCV-Luc:317L21 siRNA (297C) stab08 inv antisense	cAuGAcGGGAcuAuucccAcGTsT	1542
GGUACUGCCUGAUAGGGUGGCUUG	1407	30691	HCV-Luc:318L21 siRNA (298C) stab08 inv antisense	AuGAcGGGAcuAuucccAcGATsT	1543
UACUGCCUGAUAGGGUGGCUUGCG	1408	30692	HCV-Luc:320L21 siRNA (300C) stab08 inv antisense	GAcGGGAcuAuucccAcGAAcTsT	1544
ACUGCCUGAUAGGGUGGCUUGCGA	1409	30693	HCV-Luc:321L21 siRNA (301C) stab08 inv antisense	AcGGGAcuAuucccAcGAAcGTsT	1545
UGCCUGAUAGGGUGGCUUGCGAGU	1410	30694	HCV-Luc:323L21 siRNA (303C) stab08 inv antisense	GGAcuAuucccAcGAAcGcuTsT	1546
CUGAUAGGGUGGCUUGCGAGUGCC	1411	30695	HCV-Luc:326L21 siRNA (306C) stab08 inv antisense	cuAuucccAcGAAcGcuAcTsT	1547
GUGCCCCGGAGGUCUCGUAGAC	1396	30696	HCV-Luc:344L21 siRNA (324C) stab08 inv antisense	cGGGGccccAGAcAuTsT	1548
UGCCCCGGAGGUCUCGUAGACC	1394	31340	HCV-Luc:325U21 siRNA stab04 sense	B ccccGGGAGGucucGuAGATT B	1549
UGCCCCGGAGGUCUCGUAGACC	1394	31341	HCV-Luc:325U21 siRNA inv stab04 sense	B AGAuGcuucGGAGGGGccccTT B	1550
UGCCCCGGAGGUCUCGUAGACC	1394	31342	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) stab05 antisense	ucuAcGAGAcuucccGGGGTsT	1551
UGCCCCGGAGGUCUCGUAGACC	1394	31343	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv	GGGGccccuccAGAGcAuCuTsT	1552

【 0 3 9 9 】

【表 3 1】

UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	31344	stab05 antisense	HCV-Luc:325U21 siRNA stab07 sense	B ccccGGGAGGGuGucGuAGATT B	1553
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	31345	HCV-Luc:325U21 siRNA stab07 sense	HCV-Luc:325U21 siRNA stab07 sense	B AGAuGcuGcGGAGGGGccccTT B	1554
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	31346	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) inv	GGGGccccuccAGAGcAucUtsT	1555
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	31347	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) stab11 antisense	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) stab11 antisense	ucuAcGAGAGccccGGGGTsT	1556
UGCCCCGGGAGGUCUCUGUAGACC	1394	31348	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) stab11 antisense	HCV-Luc:345L21 siRNA (325C) stab11 antisense	GGGGccccuccAGAGcAucUtsT	1557
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGUGA	1401	31453	HCV-Luc:153U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:153U21 siRNA stab04 sense	B AGuGGGuGcGGAAccGGuTT B	1558
GUCUGCGGAACCGGUGAGUACAC	1402	31454	HCV-Luc:159U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:159U21 siRNA stab04 sense	B cuGcGGAAccGGuGAGuAcTT B	1559
AAAGGCCUUGUGGUACUGCCUGA	1412	31455	HCV-Luc:287U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:287U21 siRNA stab04 sense	B AGGccuuGuGGuAcuGccuTT B	1560
GCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGG	1403	31456	HCV-Luc:291U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:291U21 siRNA stab04 sense	B cuuGuGGuAcuGccuGauATT B	1561
UGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1404	31457	HCV-Luc:295U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:295U21 siRNA stab04 sense	B uGGuAcuGccuGAGuAGGGuTT B	1562
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1405	31458	HCV-Luc:296U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:296U21 siRNA stab04 sense	B GGuAcuGccuGAGuAGGGuGTT B	1563
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1406	31459	HCV-Luc:297U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:297U21 siRNA stab04 sense	B GuAcuGccuGAGuAGGGuGcTT B	1564
GGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1407	31460	HCV-Luc:298U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:298U21 siRNA stab04 sense	B uAcuGccuGAGuAGGGuGcuTT B	1565
UACUGCCUGAUAGGGUGC	1408	31461	HCV-Luc:300U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:300U21 siRNA stab04 sense	B cuGccuGAGuAGGGuGcuuGTT B	1566
ACUGCCUGAUAGGGUGC	1409	31462	HCV-Luc:301U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:301U21 siRNA stab04 sense	B uGccuGAGuAGGGuGcuuGcTT B	1567
UGCCUGAUAGGGUGC	1410	31463	HCV-Luc:303U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:303U21 siRNA stab04 sense	B ccuGAGuAGGGuGcuuGcGATT B	1568
CUGAUAGGGUGC	1411	31464	HCV-Luc:306U21 siRNA stab04 sense	HCV-Luc:306U21 siRNA stab04 sense	B GAuAGGGuGcuuGcGAGuGTT B	1569
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGUGA	1401	31465	HCV-Luc:173L21 siRNA (153C) stab05 antisense	HCV-Luc:173L21 siRNA (153C) stab05 antisense	AccGGuuGcAGAccAcuTsT	1570
GUCUGCGGAACCGGUGAGUACAC	1402	31466	HCV-Luc:179L21 siRNA (159C) stab05 antisense	HCV-Luc:179L21 siRNA (159C) stab05 antisense	GuAcuAccGGuuGcAGTsT	1571
AAAGGCCUUGUGGUACUGCCUGA	1412	31467	HCV-Luc:307L21 siRNA (287C) stab05 antisense	HCV-Luc:307L21 siRNA (287C) stab05 antisense	AGGcAGuAccAaAGGGcuTsT	1572
GCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGG	1403	31468	HCV-Luc:311L21 siRNA (291C) stab05 antisense	HCV-Luc:311L21 siRNA (291C) stab05 antisense	uAucAGGcAGuAccAaAGTsT	1573
UGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1404	31469	HCV-Luc:315L21 siRNA (295C) stab05 antisense	HCV-Luc:315L21 siRNA (295C) stab05 antisense	AcccuAucAGGcAGuAccATsT	1574
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1405	31470	HCV-Luc:316L21 siRNA (296C) stab05 antisense	HCV-Luc:316L21 siRNA (296C) stab05 antisense	cAcccuAucAGGcAGuAccTsT	1575
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1406	31471	HCV-Luc:317L21 siRNA (297C) stab05 antisense	HCV-Luc:317L21 siRNA (297C) stab05 antisense	GcAcccuAucAGGcAGuAcTsT	1576
GGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1407	31472	HCV-Luc:318L21 siRNA (298C) stab05 antisense	HCV-Luc:318L21 siRNA (298C) stab05 antisense	AGcAcccuAucAGGcAGuATsT	1577
UACUGCCUGAUAGGGUGC	1408	31473	HCV-Luc:320L21 siRNA (300C) stab05 antisense	HCV-Luc:320L21 siRNA (300C) stab05 antisense	cAAGcAcccuAucAGGcAGTsT	1578

【表 3 2】

ACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCGA	1409	31474	HCV-Luc:321L21 siRNA (301C) stab05 antisense	GcAAGcAcccuAucAGGcATsT	1579
UGCCUGAUAGGGUGCUUGCGAGU	1410	31475	HCV-Luc:323L21 siRNA (303C) stab05 antisense	ucGcAAGcAcccuAucAGGTsT	1580
CUGAUAGGGUGCUUGCGAGUGCC	1411	31476	HCV-Luc:326L21 siRNA (306C) stab05 antisense	cAcucGcAAAGcAcccuAucTsT	1581
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGUGA	1401	31477	HCV-Luc:153U21 siRNA inv stab04 sense	B uGGcAAAGGcGucuGGuGATT B	1582
GUCUGCGGAACCGGUGAGUACAC	1402	31478	HCV-Luc:159U21 siRNA inv stab04 sense	B cAuGAGuUGGcAAAGGcGucTT B	1583
AAAGGCCUUGUGGUACUGCCUGA	1412	31479	HCV-Luc:287U21 siRNA inv stab04 sense	B uccGucAuGGuGuuuccGGATT B	1584
GCCUUGUGGUACUGCCUGAUUAGG	1403	31480	HCV-Luc:291U21 siRNA inv stab04 sense	B AuAGuccGucAuGGuGuuTT B	1585
UGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1404	31481	HCV-Luc:295U21 siRNA inv stab04 sense	B uGGGAuAGuccGucAuGGuTT B	1586
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGCU	1405	31482	HCV-Luc:296U21 siRNA inv stab04 sense	B GuGGGAuAGuccGucAuGGTT B	1587
UGGUACUGCCUGAUAGGGUGCUU	1406	31483	HCV-Luc:297U21 siRNA inv stab04 sense	B cGuGGGAuAGuccGucAuGTT B	1588
GGUACUGCCUGAUAGGGUGCUUG	1407	31484	HCV-Luc:298U21 siRNA inv stab04 sense	B ucGuGGGAuAGuccGucAuTT B	1589
UACUGCCUGAUAGGGUGCUUUGCG	1408	31485	HCV-Luc:300U21 siRNA inv stab04 sense	B GuucGuGGGAuAGuccGucTT B	1590
ACUGCCUGAUAGGGUGCUUGCGA	1409	31486	HCV-Luc:301U21 siRNA inv stab04 sense	B cGuuucGuGGGAuAGuccGuTT B	1591
UGCCUGAUAGGGUGCUUGCGAGU	1410	31487	HCV-Luc:303U21 siRNA inv stab04 sense	B AGcGuucGuGGGAuAGuccTT B	1592
CUGAUAGGGUGCUUGCGAGUGCC	1411	31488	HCV-Luc:306U21 siRNA inv stab04 sense	B GuGAGcGuuucGuGGGAuAGTT B	1593
AUAGUGGUCUGCGGAACCGGUGA	1401	31489	HCV-Luc:173L21 siRNA (153C) inv stab05 antisense	ucAccAGAcGccuuGGcATsT	1594
GUCUGCGGAACCGGUGAGUACAC	1402	31490	HCV-Luc:179L21 siRNA (159C) inv stab05 antisense	GAcGccuuGGcAcucAuGTsT	1595
AAAGGCCUUGUGGUACUGCCUGA	1412	31491	HCV-Luc:307L21 siRNA (287C) inv stab05 antisense	uccGGAAcAccAuGAcGGATsT	1596
GCCUUGUGGUACUGCCUGAUUAGG	1403	31492	HCV-Luc:311L21 siRNA (291C) inv stab05 antisense	GAAcAccAuGAcGGGAuAuTsT	1597
UGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGC	1404	31493	HCV-Luc:315L21 siRNA (295C) inv stab05 antisense	AccAuGAcGGGAuAuucccATsT	1598
GUGGUACUGCCUGAUAGGGUGCU	1405	31494	HCV-Luc:316L21 siRNA (296C) inv stab05 antisense	ccAuGAcGGGAuAuucccAcTsT	1599

【表 3 3】

UGGUACUGCCUGAUAGGGUGUCUU	1406	31495	HCV-Luc:317L21 siRNA (297C) inv	cAuGAcGGGAcuAuucccAcGTsT	1600
GGUACUGCCUGAUAGGGUGUCUUG	1407	31496	HCV-Luc:318L21 siRNA (298C) inv	AuGAcGGGAcuAuucccAcGATsT	1601
UACUGCCUGAUAGGGUGUCUUGCG	1408	31497	HCV-Luc:320L21 siRNA (300C) inv	GAcGGGAcuAuucccAcGAAcTsT	1602
ACUGCCUGAUAGGGUGUCUUGCGA	1409	31498	HCV-Luc:321L21 siRNA (301C) inv	AcGGGAcuAuucccAcGAAcGTsT	1603
UGCCUGAUAGGGUGUCUUGCGAGU	1410	31499	HCV-Luc:323L21 siRNA (303C) inv	GGAcuAuucccAcGAAcGcuTsT	1604
CUGAUAGGGUGUCUUGCGAGUGGCC	1411	31500	HCV-Luc:326L21 siRNA (306C) inv	cuAuucccAcGAAcGaucAcTsT	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 = デオキシシアデニン
G = デオキシグアニン
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)

【 表 3 4 】

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

Cap = 任意の末端キャップ, 例えば、図 10 を参照。
Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミン(TT) 残基を含むことができる。
Stab 1-11 化学はすべて、典型的には 21ヌクレオチドを含むが、本明細書に記載されるようにこれはさまざまであり得る。
S = センス鎖
AS = アンチセンス鎖

【表 3 5】

表 V

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

10

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

20

C. 0.2 μ mol 合成サイクル 96 ウェル装置

試薬	当量:DNA/2'-O-メチル/リボ	量: DNA/2'-O-メチル/リボ	待機時間* DNA	待機時間* 2'-O-メチル	待機時間* リボ
ホスホルアミダイト	22/33/66	40/60/120 μ L	60 sec	180 sec	360sec
S-エチルテトラゾール	70/105/210	40/60/120 μ L	60 sec	180 min	360 sec
無水酢酸	265/265/265	50/50/50 μ L	10 sec	10 sec	10 sec
N-メチルイミダゾール	502/502/502	50/50/50 μ L	10 sec	10 sec	10 sec
TCA	238/475/475	250/500/500 μ L	15 sec	15 sec	15 sec
ヨウ素	6.8/6.8/6.8	80/80/80 μ 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 μ L	NA	NA	NA

30

40

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

【図面の簡単な説明】

【0404】

【図1】図1は、s i N A分子を合成するスキームの例を示す。

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

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

50

図である。

【図 4】図 4 は、化学的に修飾された 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カセットを作製するために用いられるスキームの概略図である。

【図 8】図 8 は、発現カセットを作製して二本鎖 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、種々の安定化化学の例を示す。 10

【図 11】図 11 は、化学的に修飾された 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。

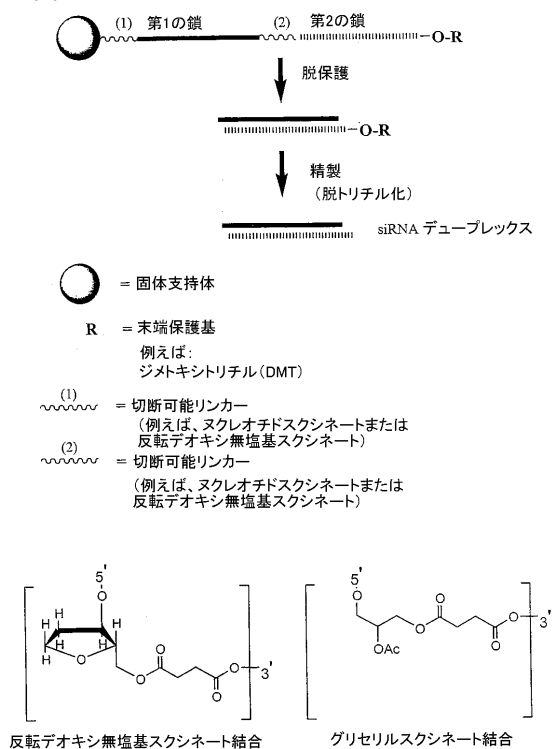
【図 15】図 15 は、H C V / ポリオウイルススキメラのウイルス複製を標的とする化学的に修飾された s i R N A コンストラクトの非限定的例を示す。 20

【図 16】図 16 は、H C V / ポリオウイルス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。

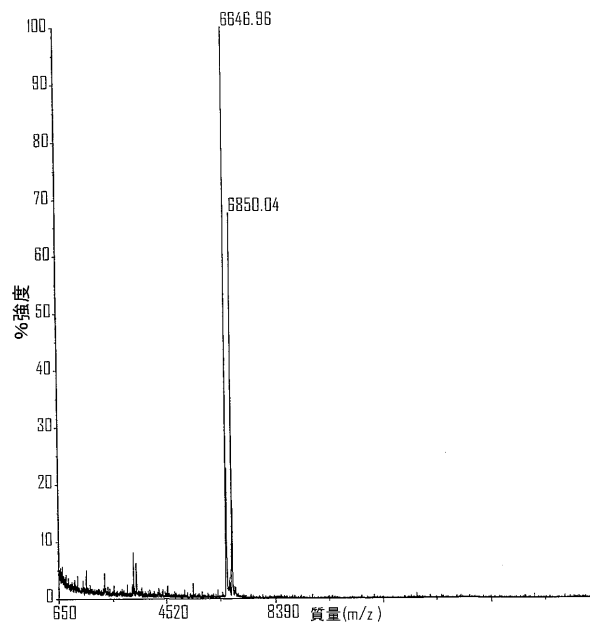
【図 17】図 17 は、H C V / ポリオウイルススキメラのウイルス複製を標的とするいくつかの化学的に修飾された s i R N A コンストラクトでの処理の非限定的例を示す。

【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。

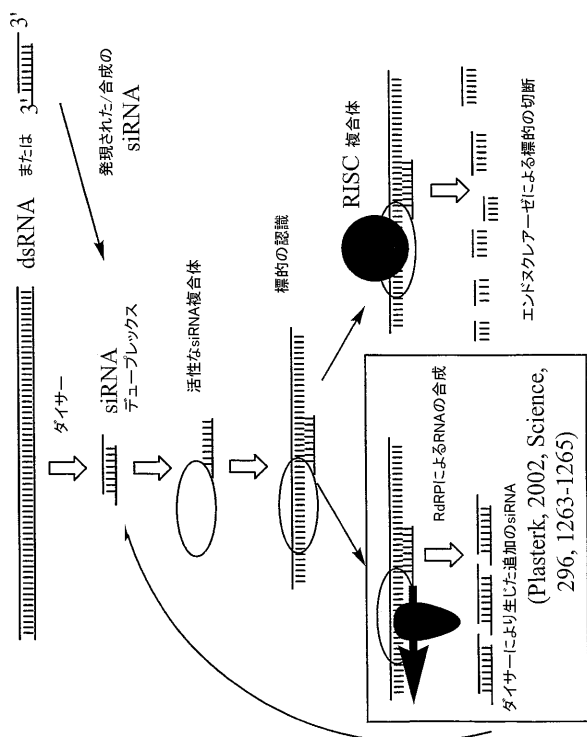
【 図 1 】



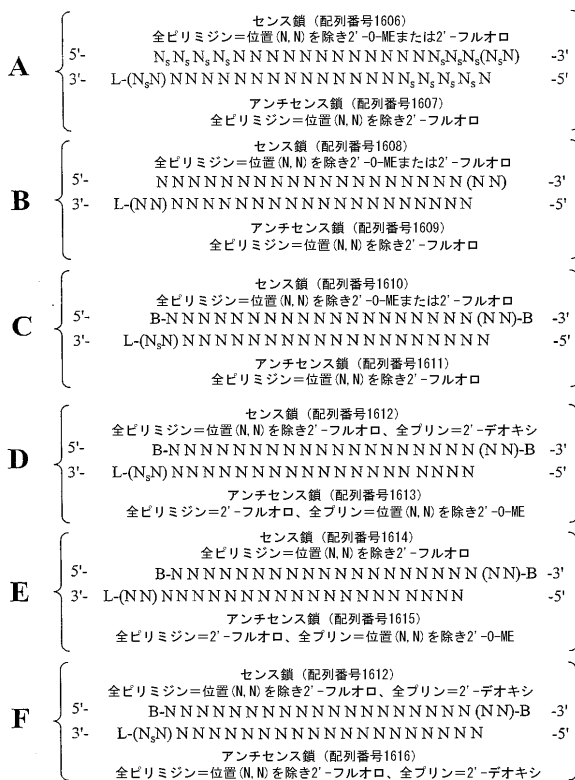
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



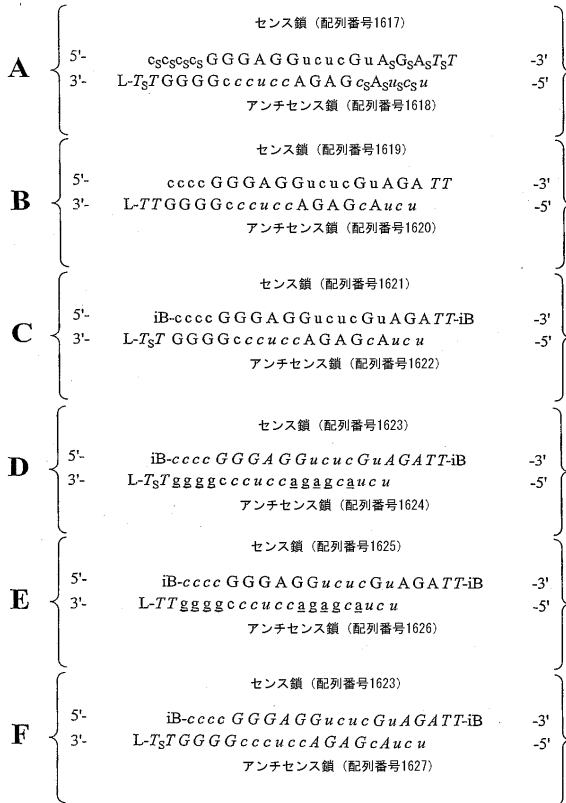
位置(N,N)は任意のヌクレオチド、例えばデオキシヌクレオチド（例えばチミジン）
または万能塩基を含むことができる

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

L=任意に存在していてもよいグリセリン成分

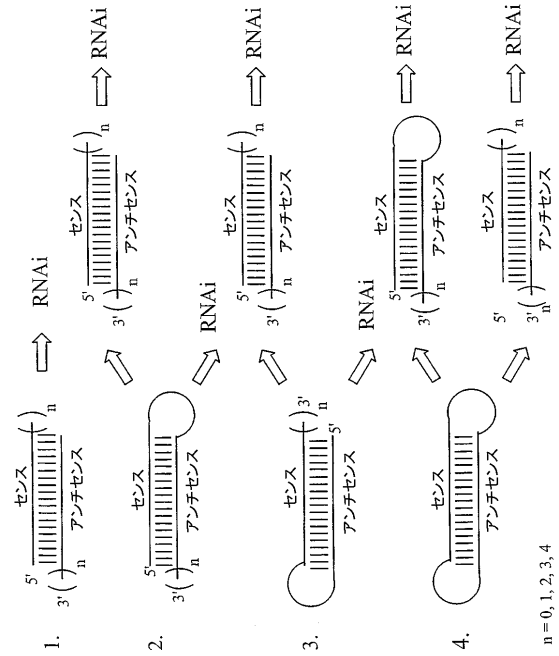
S=ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート

【 図 5 】

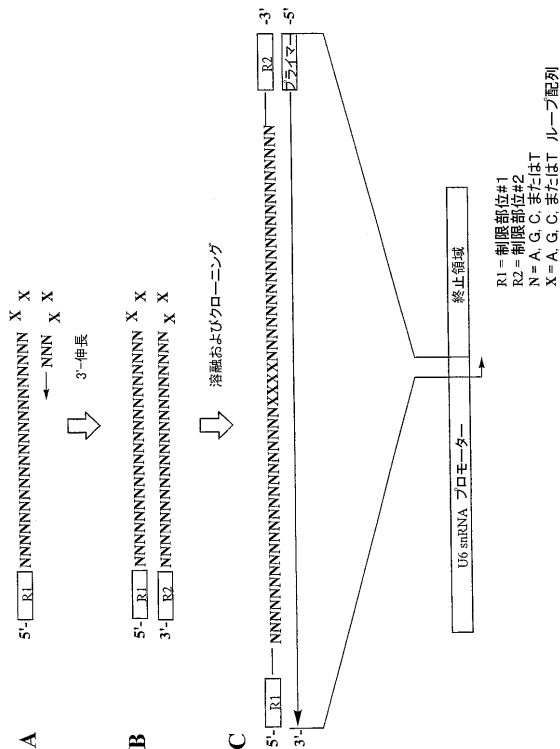


小文字=2'-0-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ イタリック大文字=デオキシ
 イタリック小文字=2'-デオキシ-2'-フルオロ B=反転デオキシ無塩基
 下線=2'-0-メチル L=任意に存在してもよいグリセリル成分
 S=ホスホロチオエートまたは
 ホスホロジチオエート

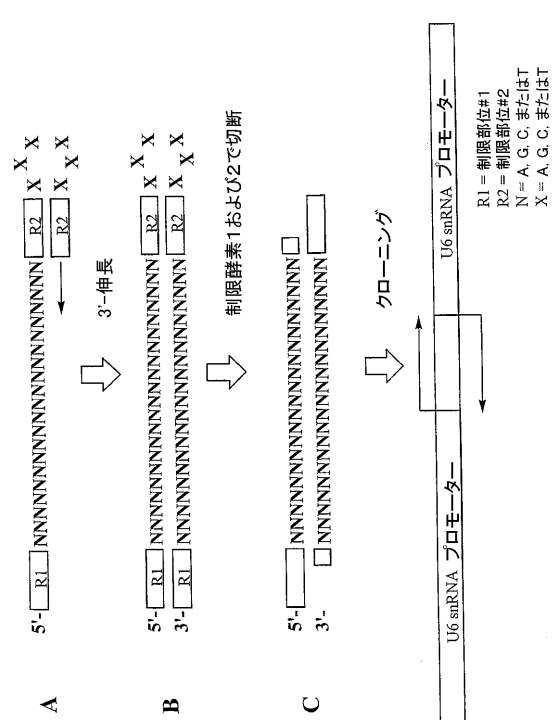
【 図 6 】



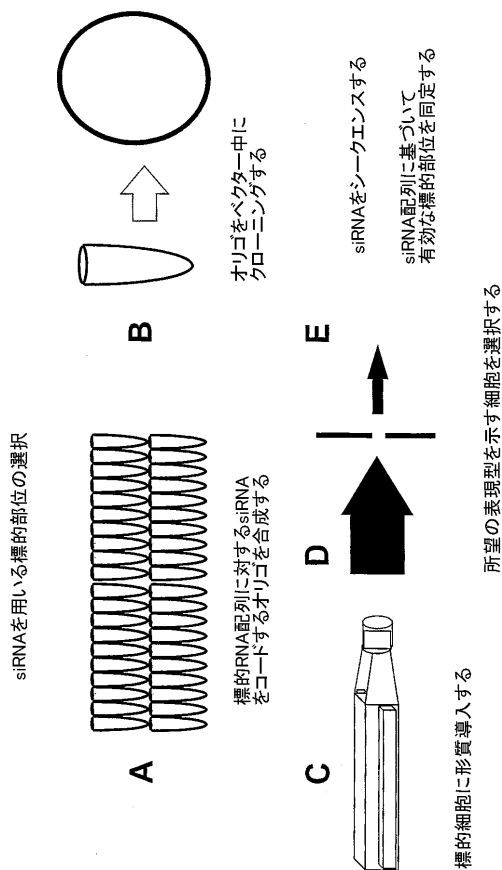
【 図 7 】



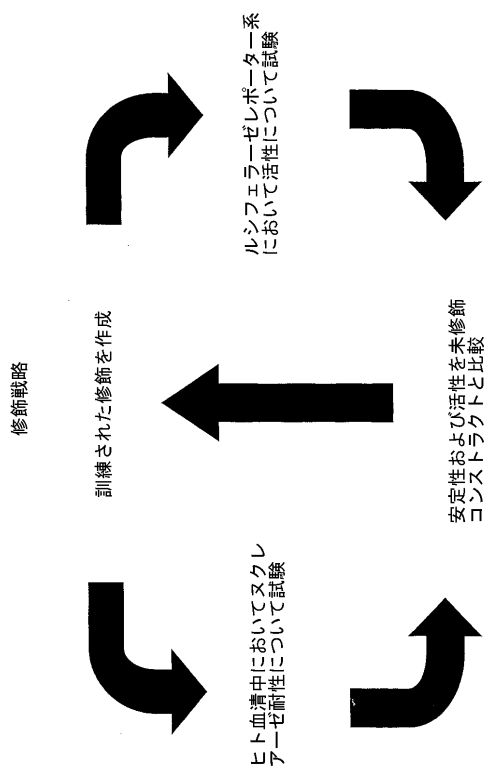
【 図 8 】



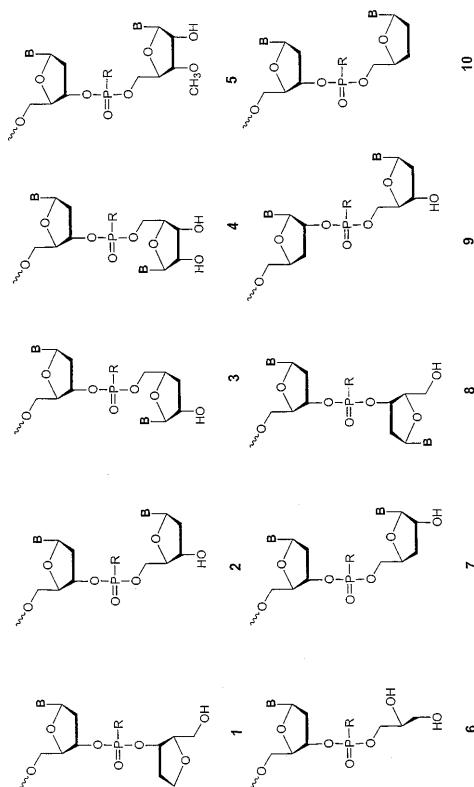
【図 9】



【図 11】

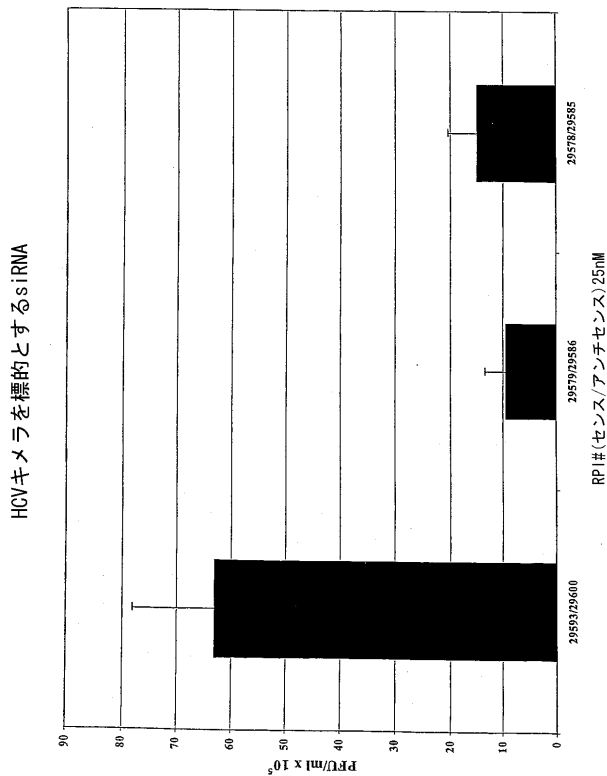


【図 10】

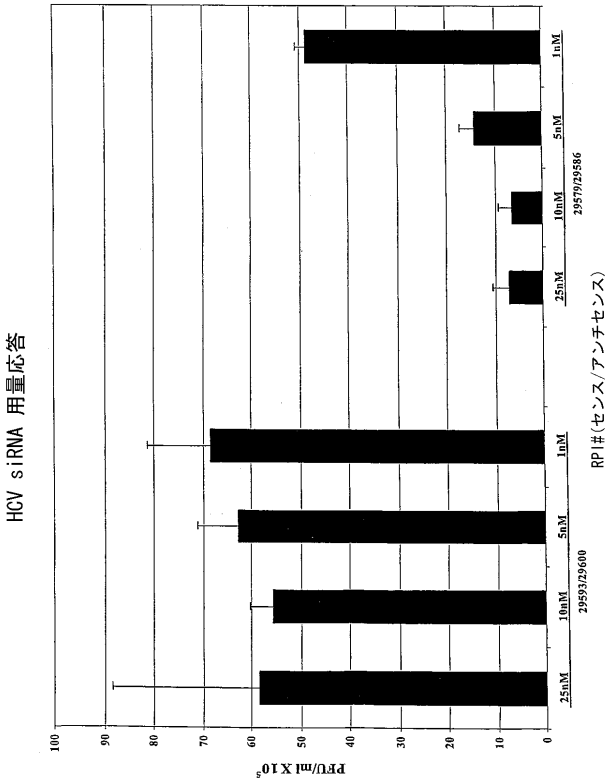


R=O, S, N, アルキル, 置換アルキル, O-アルキル, S-アルキル, アルカール, またはアラキル
 B=独立して任意のヌクレオチド塩基, 天然に生ずるもので化学的に修飾されたものでよい, またはH(無塩基)

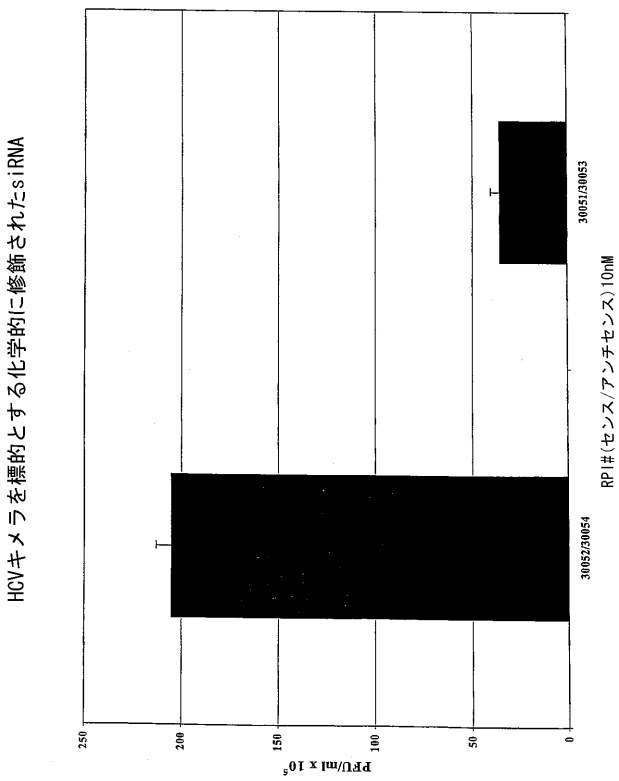
【図 12】



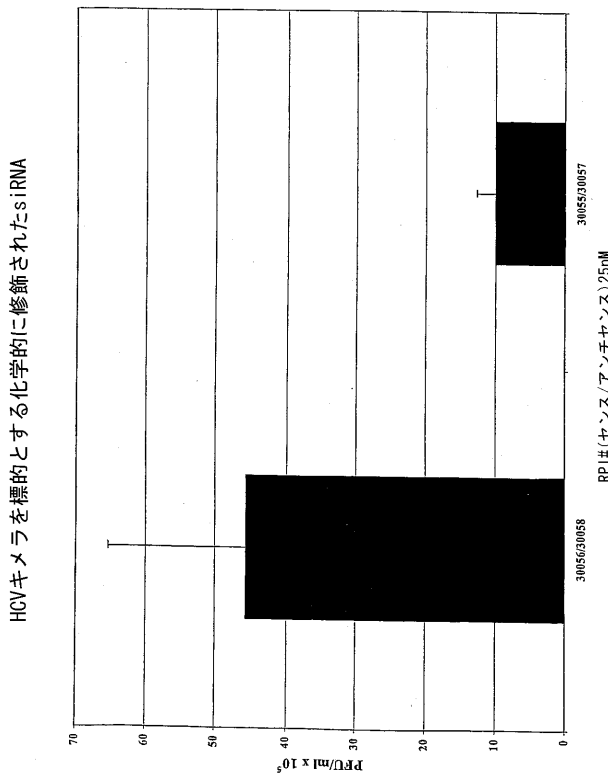
【図 1 3】



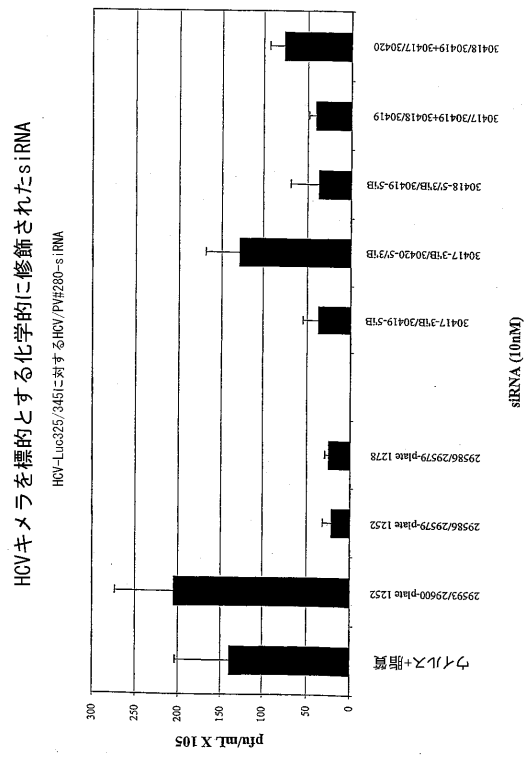
【図 1 4】



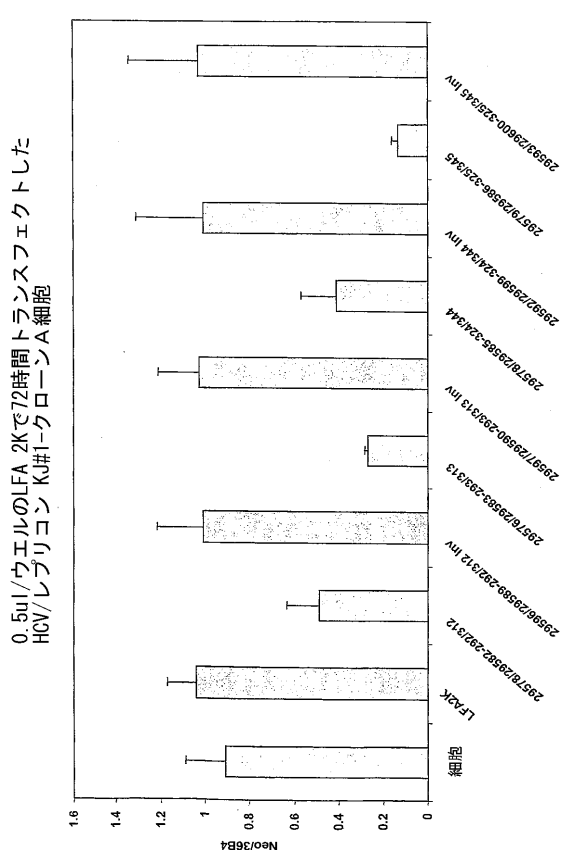
【図 1 5】



【図 1 6】



【 ㊦ 18 】



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 21 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 21 ヌクレオチドすべてが s i N A 分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成している，請求項 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 36】

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 37】

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 38】

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 39】

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 40】

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

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
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. FIELDS SEARCHED		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
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. Nature. 04 July 2002, Vol. 418, pages 38-39, see entire document.	1-35
Y, P	RANDALL et al. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. PNAS. January 2003, Vol. 100, No. 1, pages 235-240, especially page 235, materials and methods section.	1-35
A	FIRE et al. Potent and Specific genetic interference by double-stranded RNA in <i>Caenorhabditis elegans</i> . Nature. 19 February 1998, Vol. 391, pages 806-811, especially page 808, Figure 1.	1-35
<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	"T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/05043

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

CAplus, Biosis, Medline, USPatfull, Pctfull, 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. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5

(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,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100114465
 弁理士 北野 健
 (72)発明者 マクスウィゲン, ジェームズ
 アメリカ合衆国 8 0 3 0 1 コロラド州 ボールダー, フランクリン ドライブ 4 8 6 6
 (72)発明者 ベージェルマン, レオニド
 アメリカ合衆国 8 0 5 0 3 コロラド州 ロングモント, コルト ドライブ 5 5 3 0
 (72)発明者 マケジャク, デニス
 アメリカ合衆国 8 0 0 0 4 コロラド州 アルバダ, ユニオン ストリート 6 5 9 5
 (72)発明者 モーリセイ, デイビッド
 アメリカ合衆国 8 0 3 0 1 コロラド州 ボールダー, タングルウッド トレイル 4 7 6 9

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