

(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2012-528882

(P2012-528882A)

(43) 公表日 平成24年11月15日(2012.11.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G	4 C 0 8 4
C 0 7 K 2/00 (2006.01)	C 0 7 K 2/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 186 頁) 最終頁に続く		

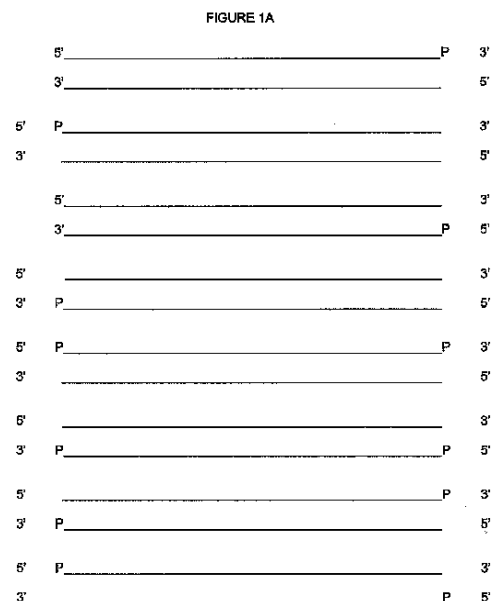
(21) 出願番号	特願2012-514131 (P2012-514131)	(71) 出願人	511072747
(86) (22) 出願日	平成22年6月3日 (2010.6.3)		ダイセルナ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成24年2月3日 (2012.2.3)		D I C E R N A P H A R M A C E U T I C A L S, I N C.
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/037263		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 7 4 2, ウォータータウン, アーセ ナル ストリート 4 8 0
(87) 国際公開番号	W02010/141724	(74) 代理人	100150142
(87) 国際公開日	平成22年12月9日 (2010.12.9)		弁理士 相原 礼路
(31) 優先権主張番号	61/183, 818	(72) 発明者	バス, スジト, クマー
(32) 優先日	平成21年6月3日 (2009.6.3)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 4 5 9, ニュートン, ロベット ロ ード 3 8
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/183, 815		
(32) 優先日	平成21年6月3日 (2009.6.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ペプチドダイサー基質剤およびその特異的な遺伝子発現阻害のための方法

(57) 【要約】

本発明は、ダイサー基質 s i R N A (D s i R N A)
ーペプチドコンジュゲートの使用により標的RNAおよ
びタンパク質レベルを減少させるのに有用な化合物、組
成物および方法に関する。

【選択図】 図 1 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5'末端および3'末端を有する第一のオリゴヌクレオチド鎖と5'末端および3'末端を有する第二のオリゴヌクレオチド鎖とペプチドとを含む単離二本鎖リボ核酸(d s R N A)組成物であって、前記第一鎖と前記第二鎖が、少なくとも16ヌクレオチド長かつ最大で50ヌクレオチド長の長さを有し、前記ペプチドが約+5以下の正味荷電をもち、かつ前記ペプチドがd s R N Aとコンジュゲートされている単離二本鎖リボ核酸(d s R N A)組成物。

【請求項 2】

5'末端および3'末端を有する第一のオリゴヌクレオチド鎖と5'末端および3'末端を有する第二のオリゴヌクレオチド鎖とペプチドとを含む単離二本鎖リボ核酸(d s R N A)組成物であって、前記第一鎖と前記第二鎖が、少なくとも16ヌクレオチド長かつ最大で50ヌクレオチド長の長さを有し、前記ペプチドが正味荷電を持たず、かつ前記ペプチドが前記d s R N Aとコンジュゲートされている単離二本鎖リボ核酸(d s R N A)組成物。

【請求項 3】

5'末端および3'末端を有する第一のオリゴヌクレオチド鎖と5'末端および3'末端を有する第二のオリゴヌクレオチド鎖とペプチドとを含む単離二本鎖リボ核酸(d s R N A)組成物であって、前記第一鎖と前記第二鎖が、少なくとも16ヌクレオチド長かつ最大で50ヌクレオチド長の長さを有し、前記ペプチドが約+5以下の正味荷電をもち、かつ前記ペプチドが少なくとも1つの陰イオン性アミノ酸残基を有し、かつ前記ペプチドが前記d s R N Aとコンジュゲートされている単離二本鎖リボ核酸(d s R N A)組成物。

【請求項 4】

前記陰イオン性アミノ酸がグルタミン酸またはアスパラギン酸である、請求項3に記載の単離組成物。

【請求項 5】

5'末端および3'末端を有する第一のオリゴヌクレオチド鎖と5'末端および3'末端を有する第二のオリゴヌクレオチド鎖とペプチドとを含む単離二本鎖リボ核酸(d s R N A)組成物であって、前記第一鎖と前記第二鎖が、少なくとも6ヌクレオチド長かつ最大で19ヌクレオチド長の長さを有し、前記ペプチドが約+4以下の正味荷電をもち、かつ前記ペプチドがd s R N Aとコンジュゲートされている単離二本鎖リボ核酸(d s R N A)組成物。

【請求項 6】

前記第一鎖および前記第二鎖が、少なくとも25ヌクレオチドかつおよび最大で35ヌクレオチド、少なくとも19ヌクレオチドかつ最大で35ヌクレオチド、少なくとも19ヌクレオチドかつ最大で24ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチドかつ最大で30ヌクレオチド、少なくとも26ヌクレオチドかつ最大で30ヌクレオチドまたは少なくとも21ヌクレオチドかつ最大で23ヌクレオチドの長さを有する、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項 7】

前記第二鎖が3'末端にオーバーハングを含む、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項 8】

前記第一鎖が3'末端にオーバーハングを含む、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項 9】

前記第二鎖および前記第一鎖の少なくとも一方が3'末端にオーバーハングを含む、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項 10】

前記第一鎖および／または前記第二鎖の前記 3' オーバーハングの前記ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドを含む、請求項 9 に記載の単離組成物。

【請求項 11】

前記 3' オーバーハング（1 つまたは複数）が 1 ～ 5 ヌクレオチド長である、請求項 9 に記載の単離組成物。

【請求項 12】

前記第一および前記第二鎖がそれぞれ同数のヌクレオチド残基からなる、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 13】

前記第一鎖の前記 5' 末端の最終残基と前記第二鎖の前記 3' 末端の最終残基がミスマッチ塩基対を形成している、請求項 12 に記載の単離組成物。 10

【請求項 14】

前記第一鎖の前記 3' 末端の最終残基と前記第二鎖の前記 5' 末端の最終残基がミスマッチ塩基対を形成している、請求項 12 に記載の単離組成物。

【請求項 15】

前記第一鎖の前記 5' 末端の最終残基および最後から 2 番目の残基と、前記第二鎖の前記 3' 末端の最終残基および最後から 2 番目の残基が 2 つのミスマッチ塩基対を形成している、請求項 12 に記載の単離組成物。

【請求項 16】

前記第一鎖の前記 3' 末端の最終残基および最後から 2 番目の残基と、前記第二鎖の前記 5' 末端の最終残基および最後から 2 番目の残基が 2 つのミスマッチ塩基対を形成している、請求項 12 に記載の単離組成物。 20

【請求項 17】

前記ペプチドが 6 ～ 50 個のアミノ酸を含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 18】

前記ペプチドが 10 ～ 50 個のアミノ酸を含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 19】

前記ペプチドが 15 ～ 30 個のアミノ酸を含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。 30

【請求項 20】

前記ペプチドが 10 個以下のアミノ酸を含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 21】

前記ペプチドが約 +2 以下の正味荷電をもつ、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 22】

前記ペプチドが約 +1 以下の正味荷電をもつ、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。 40

【請求項 23】

前記ペプチドが 1 個以上のプロリン残基を含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 24】

前記ペプチドが 1 個以上の疎水性アミノ酸残基を含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 25】

前記ペプチドが 5 個以上の陽イオン性アミノ酸残基を含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 26】

前記ペプチドが4個の陽イオン性アミノ酸残基を含む、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項27】

前記ペプチドが3個の陽イオン性アミノ酸残基を含む、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項28】

前記ペプチドが2個の陽イオン性アミノ酸残基を含む、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項29】

前記ペプチドが1個の陽イオン性アミノ酸残基を含む、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

10

【請求項30】

前記ペプチドが陽イオン性アミノ酸残基を有さない、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項31】

前記ペプチドが安定なリンカーにより前記dsRNAとコンジュゲートされている、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項32】

前記安定なリンカーがホモ二官能性架橋剤を含む、請求項31に記載の単離組成物。

【請求項33】

20

前記安定なリンカーがヘテロ二官能性架橋剤を含む、請求項31に記載の単離組成物。

【請求項34】

前記ペプチドが、切断可能なリンカーにより前記dsRNAとコンジュゲートされている、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項35】

前記切断可能なリンカーがジスルフィドリンカーを含む、請求項34に記載の単離組成物。

【請求項36】

前記ペプチドが、炭素リンカーにより前記dsRNAとコンジュゲートされている、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

30

【請求項37】

前記炭素リンカーが18個以下の炭素を含む、請求項36に記載の単離組成物。

【請求項38】

前記炭素リンカーが6個の炭素を含む、請求項36に記載の単離組成物。

【請求項39】

前記ペプチドと前記dsRNAがリンカーなしでコンジュゲートされている、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項40】

前記ペプチドが前記dsRNAの前記第一鎖の3'末端とコンジュゲートされている、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

40

【請求項41】

前記ペプチドが前記dsRNAの前記第二鎖の3'末端とコンジュゲートされている、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項42】

前記ペプチドが前記dsRNAの前記第一鎖の5'末端とコンジュゲートされている、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項43】

前記ペプチドが前記dsRNAの前記第二鎖の5'末端とコンジュゲートされている、請求項1、2、3または5に記載の単離組成物。

【請求項44】

50

前記ペプチドが、前記 d s R N A の前記第一鎖の 5' 末端および前記第二鎖の 5' 末端とコンジュゲートされている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 45】

前記ペプチドが、前記 d s R N A の前記第一鎖の 5' 末端および前記第二鎖の前記 3' 末端とコンジュゲートされている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 46】

前記ペプチドが、前記 d s R N A の前記第一鎖の 3' 末端および前記第二鎖の 3' 末端とコンジュゲートされている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 47】

前記ペプチドが、前記 d s R N A の前記第一鎖の 3' 末端および前記第二鎖の前記 5' 末端とコンジュゲートされている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。 10

【請求項 48】

少なくとも 1 つのペプチドが前記 d s R N A の前記第一鎖と内側でコンジュゲートされている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 49】

少なくとも 1 つのペプチドが前記 d s R N A の前記第二鎖と内側でコンジュゲートされている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 50】

少なくとも 1 つのペプチドが前記 d s R N A の前記第一鎖と内側でコンジュゲートされ、かつ少なくとも 1 つのペプチドが前記 d s R N A の前記第二鎖と内側でコンジュゲートされている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。 20

【請求項 51】

少なくとも 2 つのペプチドが前記 d s R N A とコンジュゲートされている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 52】

前記少なくとも 2 つのペプチドが同一である、請求項 51 に記載の単離組成物。

【請求項 53】

前記少なくとも 2 つのペプチドが同一ではない、請求項 51 に記載の単離組成物。

【請求項 54】

少なくとも 1 つの色素分子をさらに含み、前記色素分子が前記 d s R N A および前記ペプチドの少なくとも 1 つとコンジュゲートされている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。 30

【請求項 55】

前記色素分子が多環芳香族である、請求項 54 に記載の単離組成物。

【請求項 56】

前記色素が蛍光色素である、請求項 54 に記載の単離組成物。

【請求項 57】

治療剤をさらに含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 58】

前記治療剤が抗癌剤である、請求項 57 に記載の単離組成物。 40

【請求項 59】

前記抗癌剤が、パクリタキセル、タモキシフェン、シスプラチン、ドキシソルビシンおよびビンブラスチンからなる群より選択される、請求項 58 に記載の単離組成物。

【請求項 60】

前記治療剤が代謝性の疾患または障害を治療するための薬物である、請求項 58 に記載の組成物。

【請求項 61】

少なくとも 1 つの標的化ペプチドを含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の組成物。

【請求項 62】

前記ペプチドが毒素の転移ドメインの一部を含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の 50

単離組成物。

【請求項 6 3】

前記神経毒素がクロストリジウム神経毒素である、請求項 6 2 の単離組成物。

【請求項 6 4】

前記 d s R N A の第一のオリゴヌクレオチド鎖の 3' 末端における最初のヌクレオチド (1 位) から始めて、1、2 および / または 3 位が修飾ヌクレオチドで置換されている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 6 5】

前記修飾ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドである、請求項 6 4 に記載の単離 d s R N A。

【請求項 6 6】

前記第一のオリゴヌクレオチド鎖および前記第二のオリゴヌクレオチド鎖の一方または両方が 5' リン酸を含む、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離 d s R N A。

【請求項 6 7】

前記第一鎖または前記第二鎖の少なくとも 1 つのヌクレオチドが修飾されている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 6 8】

前記修飾ヌクレオチド残基が、2'-O-メチル、2'-メトキシエトキシ、2'-フルオロ、2'-アシル、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、4'-チオ、4'-CH₂-O-2'-架橋、4'-(CH₂)₂-O-2'-架橋、2'-L N A、2'-アミノおよび 2'-O-(N-メチルカルバマート) からなる群より選択される、請求項 6 7 に記載の単離組成物。

【請求項 6 9】

前記 d s R N A が、前記細胞中でダイサーにより内因的に切断される、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 7 0】

標的遺伝子の発現を減少させるのに十分な前記単離二本鎖核酸の量が、前記細胞環境中で 1 ナノモル以下、200 ピコモル以下、100 ピコモル以下、50 ピコモル以下、20 ピコモル以下、および 10 ピコモル以下からなる群より選択される、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 7 1】

前記第一鎖と前記第二鎖が化学的リンカーにより連結されている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 7 2】

前記第一鎖の前記 3' 末端と前記第二鎖の前記 5' 末端が化学的リンカーにより連結されている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 7 3】

前記第二鎖または前記第一鎖のヌクレオチドが、ダイサー切断の方向を指定する修飾ヌクレオチドで置換されている、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 7 4】

修飾ヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、非環状ヌクレオチド、3'-デオキシアデノシン (コルジセピン)、3'-アジド-3'-デオキシチミジン (A Z T)、2', 3'-ジデオキシイノシン (d d I)、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアチジン (3 T C)、2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシチミジン (d 4 T)、3'-アジド-3'-デオキシチミジン (A Z T)、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアチジン (3 T C) のヌクレオチド-リン酸および 2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシチミジン (d 4 T) のヌクレオチド-リン酸、4-チオウラシル、5-プロモウラシル、5-ヨードウラシル、5-(3-アミノアシル)-ウラシル、2'-O-アルキルリボヌクレオチド、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-アミノリボヌクレオチド、2'-フルオロリボヌクレオチドおよびロック

10

20

30

40

50

ト核酸からなる群より選択される、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 75】

リン酸骨格が、ホスホナート、ホスホロチオアートおよびホスホトリエステルからなる群より選択される、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 76】

前記第一鎖の前記 3' 末端の前記修飾ヌクレオチド残基が、デオキシリボヌクレオチド、非環状ヌクレオチドおよび蛍光分子からなる群より選択される、請求項 64 に記載の単離組成物。

【請求項 77】

前記第一鎖の前記ヌクレオチドの少なくとも 1 つと、前記第二鎖の前記ヌクレオチドの少なくとも 1 つがミスマッチ塩基対を形成している、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

10

【請求項 78】

前記ペプチドが、配列番号 1～89 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1、2、3 または 5 に記載の単離組成物。

【請求項 79】

細胞中の標的遺伝子の発現を減少させるための方法であって、参照 dsRNA と比べて細胞中の標的遺伝子の発現を減少させるのに効果的な量の請求項 1、2、3 または 5 に記載の前記単離組成物と細胞とを接触させることを含む方法。

【請求項 80】

細胞の増殖を選択的に阻害するための方法であって、細胞の増殖を阻害するのに十分な量の請求項 1、2、3 または 5 に記載の前記単離組成物と細胞とを接触させることを含む方法。

20

【請求項 81】

動物における標的遺伝子の発現を減少させるための方法であって、参照 dsRNA と比べて動物の細胞中の標的遺伝子の発現を減少させるのに効果的な量の請求項 1、2、3 または 5 に記載の前記単離組成物で動物を治療することを含む方法。

【請求項 82】

前記単離組成物が、適当な対照 dsRNA と比べて増強された薬物動態を有する、請求項 81 に記載の方法。

30

【請求項 83】

前記 dsRNA が、適当な対照 dsRNA と比べて増強された薬力学を有する、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 84】

前記 dsRNA が、適当な対照 dsRNA と比べて減少した毒性を有する、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 85】

前記 dsRNA が、適当な対照 dsRNA と比べて増強された細胞内取り込みを有する、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 86】

被検体の細胞中の標的遺伝子発現を減少させるための医薬組成物であって、参照 dsRNA と比べて細胞中の標的遺伝子の発現を減少させるのに効果的な量の請求項 1、2、3 または 5 に記載の前記単離組成物と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

40

【請求項 87】

請求項 1～78 のいずれか 1 項に記載の dsRNA-ペプチドコンジュゲートを合成する方法であって、前記 dsRNA を化学的または酵素的に合成することを含む方法。

【請求項 88】

請求項 1～74 のいずれか 1 項に記載の dsRNA-ペプチドコンジュゲートと、その使用説明書とを含むキット。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2009年6月3日に出願された米国特許仮出願第61/183,815号および2009年6月3日に出願された米国特許仮出願第61/183,818号に関連し、かつ米国特許法第119条(e)の下、これらに対する優先権を主張するものである。上記出願の全教示が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、ペプチド-ダイサー基質コンジュゲートおよびその使用方法に関する。

【背景技術】

10

【0003】

ペプチドアプタマーの同定は、治療用分子の安全で効率的な送達の必要性を考慮すれば重要である。ペプチドアプタマーが記載されている(Beldhøen, 2008, Int. J. Mol. Sci. 9:1276-1320; Moschosら, 2007, Biochemical Society Transaction Vol. 35, pt 4:807-810において概説されている)。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、ペプチドとコンジュゲートされている二本鎖RNA(「dsRNA」)を含有する組成物およびそれらの調製法に関する。本発明のdsRNAは、効率的な送達および標的化のために、ならびに長い阻害効果持続時間を任意に有する効率的かつ強力な阻害剤として作用するように、ペプチドとのコンジュゲーションにより最適化された構造を有する、二本鎖RNA、低分子干渉RNA(siRNA)およびダイサー基質siRNA(「DsiRNA」)である。

20

【0005】

一実施形態では、本発明は、5'末端と3'末端とを有する第一のオリゴヌクレオチド鎖および5'末端と3'末端とを有する第二のオリゴヌクレオチド鎖であって、前記第一鎖および前記第二鎖が少なくとも16ヌクレオチド長かつ最大で50ヌクレオチド長の長さであるオリゴヌクレオチド鎖、ならびに約+5以下の正味荷電をもち、かつ前記dsRNAとコンジュゲートされているペプチドを含む、単離二本鎖リボ核酸(dsRNA)組成物を提供する。

30

【0006】

別の実施形態では、本発明は、5'末端と3'末端とを有する第一のオリゴヌクレオチド鎖および5'末端と3'末端とを有する第二のオリゴヌクレオチド鎖であって、前記第一鎖および前記第二鎖が少なくとも16ヌクレオチド長かつ最大で50ヌクレオチド長の長さであるオリゴヌクレオチド鎖、ならびに正味荷電をもたず、かつ前記dsRNAとコンジュゲートされているペプチドを含む、単離二本鎖リボ核酸(dsRNA)組成物を提供する。

【0007】

別の実施形態では、本発明は、5'末端と3'末端とを有する第一のオリゴヌクレオチド鎖および5'末端と3'末端とを有する第二のオリゴヌクレオチド鎖であって、前記第一鎖および前記第二鎖が少なくとも16ヌクレオチド長かつ最大で50ヌクレオチド長の長さであるオリゴヌクレオチド鎖、ならびに約+4以下の正味荷電をもち、かつ少なくとも1つの陰イオン性アミノ酸残基を有し、かつ前記dsRNAとコンジュゲートされているペプチドを含む、単離二本鎖リボ核酸(dsRNA)組成物を提供する。

40

【0008】

一態様では、陰イオン性アミノ酸はグルタミン酸またはアスパラギン酸である。

【0009】

別の実施形態では、本発明は、5'末端と3'末端とを有する第一のオリゴヌクレオチド鎖および5'末端と3'末端とを有する第二のオリゴヌクレオチド鎖であって、前記第

50

一鎖および前記第二鎖が少なくとも6ヌクレオチド長かつ最大で19ヌクレオチド長の長さであるオリゴヌクレオチド鎖、ならびに約+4以下の正味荷電をもち、かつ前記dsRNAとコンジュゲートされているペプチドを含む、単離二本鎖リボ核酸(dsRNA)組成物を提供する。

【0010】

別の態様では、第一鎖および前記第二鎖は、少なくとも25かつ最大で35ヌクレオチド、少なくとも19かつ最大で35ヌクレオチド、少なくとも19かつ最大で24ヌクレオチド、少なくとも25かつ最大で30ヌクレオチド、少なくとも26かつ最大で30ヌクレオチドまたは少なくとも21かつ最大で23ヌクレオチドの長さである。

【0011】

10

別の態様では、第二鎖は3'末端にオーバーハングを含む。

【0012】

別の態様では、第一鎖は3'末端にオーバーハングを含む。

【0013】

別の態様では、前記第二鎖および前記第一鎖の少なくとも一方が、3'末端にオーバーハングを含む。

【0014】

別の態様では、前記第一および／または第二鎖の前記3'オーバーハングのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。

【0015】

20

別の態様では3'オーバーハング(1つまたは複数)は1~5ヌクレオチド長である。

【0016】

別の態様では、前記第一および第二鎖はそれぞれ、同数のヌクレオチド残基からなる。

【0017】

別の態様では、前記第一鎖の前記5'末端の最終残基と前記第二鎖の前記3'末端の最終残基が、ミスマッチ塩基対を形成する。

【0018】

別の態様では、前記第一鎖の前記3'末端の最終残基と前記第二鎖の前記5'末端の最終残基が、ミスマッチ塩基対を形成する。

【0019】

30

別の態様では、前記第一鎖の前記5'末端の最終残基および最後から2番目の残基と、前記第二鎖の前記3'末端の最終残基および最後から2番目の残基が、2つのミスマッチ塩基対を形成する。

【0020】

別の態様では、前記第一鎖の前記3'末端の最終残基および最後から2番目の残基と、前記第二鎖の前記5'末端の最終残基および最後から2番目の残基が、2つのミスマッチ塩基対を形成する。

【0021】

別の態様では、ペプチドは6~50個のアミノ酸を含む。

【0022】

40

別の態様では、ペプチドは10~50個のアミノ酸を含む。

【0023】

別の態様では、ペプチドは15~30個のアミノ酸を含む。

【0024】

別の態様では、ペプチドは10個以下のアミノ酸を含む。

【0025】

別の態様では、ペプチドは約+2以下の正味荷電をもつ。

【0026】

別の態様では、ペプチドは約+1以下の正味荷電をもつ。

【0027】

50

別の態様では、ペプチドは1個以上のプロリン残基を含む。

【0028】

別の態様では、ペプチドは1個以上の疎水性アミノ酸残基を含む。

【0029】

別の態様では、ペプチドは5個以上の陽イオン性アミノ酸残基を含む。

【0030】

別の態様では、ペプチドは4個の陽イオン性アミノ酸残基を含む。

【0031】

別の態様では、ペプチドは3個の陽イオン性アミノ酸残基を含む。

【0032】

別の態様では、ペプチドは2個の陽イオン性アミノ酸残基を含む。

【0033】

別の態様では、ペプチドは1個の陽イオン性アミノ酸残基を含む。

【0034】

別の態様では、ペプチドは陽イオン性アミノ酸残基を有さない。

【0035】

別の態様では、ペプチドは、安定なリンカーで前記 dsRNA とコンジュゲートされている。

【0036】

別の態様では、安定なリンカーはホモ二官能性架橋剤を含む。

【0037】

別の態様では、安定なリンカーはヘテロ二官能性架橋剤を含む。

【0038】

別の態様では、ペプチドは、切断可能なリンカーで前記 dsRNA とコンジュゲートされている。

【0039】

別の態様では、切断可能なリンカーはジスルフィドリンカーを含む。

【0040】

別の態様では、ペプチドは、炭素リンカーで前記 dsRNA とコンジュゲートされている。

【0041】

別の態様では、炭素リンカーは18個以下の炭素を含む。

【0042】

別の態様では、炭素リンカーは6個の炭素を含む。

【0043】

別の態様では、ペプチドと前記 dsRNA は、リンカー無しでコンジュゲートされている。

【0044】

別の態様では、ペプチドは、前記 dsRNA の第一鎖の3'末端とコンジュゲートされている。

【0045】

別の態様では、ペプチドは、前記 dsRNA の前記第二鎖の3'末端とコンジュゲートされている。

【0046】

別の態様では、ペプチドは、前記 dsRNA の第一鎖の5'末端とコンジュゲートされている。

【0047】

別の態様では、ペプチドは、前記 dsRNA の前記第二鎖の5'末端とコンジュゲートされている。

【0048】

10

20

30

40

50

別の態様では、ペプチドは、前記 d s R N A の第一鎖の 5' 末端および前記第二鎖の 5' 末端とコンジュゲートされている。

【0049】

別の態様では、ペプチドは、前記 d s R N A の前記第一鎖の 5' 末端および前記第二鎖の前記 3' 末端とコンジュゲートされている。

【0050】

別の態様では、ペプチドは、前記 d s R N A の第一鎖の 3' 末端および前記第二鎖の 3' 末端とコンジュゲートされている。

【0051】

別の態様では、ペプチドは、前記 d s R N A の前記第一鎖の 3' 末端および前記第二鎖の前記 5' 末端とコンジュゲートされている。

10

【0052】

別の態様では、少なくとも 1 つのペプチドが、前記 d s R N A の前記第一鎖と内側でコンジュゲートされている。

【0053】

別の態様では、少なくとも 1 つのペプチドが、前記 d s R N A の前記第二鎖と内側でコンジュゲートされている。

【0054】

別の態様では、少なくとも 1 つのペプチドが前記 d s R N A の前記第一鎖と内側でコンジュゲートされ、かつ少なくとも 1 つのペプチドが前記 d s R N A の前記第二鎖と内側でコンジュゲートされている。

20

【0055】

別の態様では、少なくとも 2 つのペプチドが前記 d s R N A とコンジュゲートされている。

【0056】

別の態様では、少なくとも 2 つのペプチドが同一である。

【0057】

別の態様では、少なくとも 2 つのペプチドが同一ではない。

【0058】

別の態様では、単離組成物は、少なくとも 1 つの色素分子をさらに含み、かつ前記色素分子は、前記 d s R N A および前記ペプチドの少なくとも一方とコンジュゲートされている。

30

【0059】

別の態様では、色素分子は多環芳香族である。

【0060】

別の態様では、色素は蛍光色素である。

【0061】

別の態様では、単離組成物は治療剤をさらに含む。

【0062】

別の態様では、治療剤は抗癌剤である。

40

【0063】

別の態様では、抗癌剤は、パクリタキセル、タモキシフェン、シスプラチン、ドキシソルビシンおよびビンブラスチンからなる群より選択される。

【0064】

別の態様では、治療剤は代謝性疾患または障害を治療するための薬物である。

【0065】

別の態様では、単離組成物は、少なくとも 1 つの標的化ペプチドをさらに含む。

【0066】

別の態様では、ペプチドは毒素の転移ドメイン一部を含む。

【0067】

50

別の態様では、神経毒はクロストリジウム神経毒である。

【0068】

前記 dsRNA の第一オリゴヌクレオチド鎖の 3' 末端の最初のヌクレオチド (1 位) から始まる別の態様では、1、2 および / または 3 位が修飾ヌクレオチドで置換されている。

【0069】

別の態様では、修飾ヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドである。

【0070】

別の態様では、第一および第二のオリゴヌクレオチド鎖の一方または両方が 5' リン酸を含む。

10

【0071】

別の態様では、前記第一または第二鎖の少なくとも 1 つのヌクレオチドが修飾されている。

【0072】

別の態様では、修飾ヌクレオチド残基は、2'-O-メチル、2'-メトキシエトキシ、2'-フルオロ、2'-アシル、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、4'-チオ、4'-CH₂-O-2'-架橋、4'-(CH₂)₂-O-2'-架橋、2'-LNA、2'-アミノおよび 2'-O-(N-メチルカルバマートからなる群より選択される。

【0073】

20

別の態様では、dsRNA がダイサーにより前記細胞内で内因的に切断される。

【0074】

別の態様では、標的遺伝子の発現を減少させるのに十分な前記単離二本鎖核酸の量は、前記細胞の環境中で 1 ナノモル以下、200 ピコモル以下、100 ピコモル以下、50 ピコモル以下、20 ピコモル以下および 10 ピコモル以下からなる群より選択される。

【0075】

別の態様では、第一鎖と第二鎖が化学的リンカーにより連結されている。

【0076】

別の態様では、前記第一鎖の 3' 末端と前記第二鎖の前記 5' 末端が化学的リンカーにより連結されている。

30

【0077】

別の態様では、前記第二または第一鎖のヌクレオチドが、ダイサー切断の方向を指定する修飾ヌクレオチドで修飾されている。

【0078】

別の態様では、単離組成物は、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、非環状ヌクレオチド、3'-デオキシアデノシン (コルジセピン)、3'-アジド-3'-デオキシチミジン (AZT)、2', 3'-ジデオキシイノシン (ddI)、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアチジン (3TC)、2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシチミジン (d4T)、3'-アジド-3'-デオキシチミジン (AZT) のヌクレオチド-リン酸、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアチジン (3TC)、および 2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシチミジン (d4T) のヌクレオチド-リン酸、4-チオウラシル、5-プロモウラシル、5-ヨードウラシル、5-(3-アミノアシル)-ウラシル、2'-O-アルキルリボヌクレオチド、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-アミノリボヌクレオチド、2'-フルオロリボヌクレオチド、およびロクト核酸からなる群より選択される修飾ヌクレオチドを含む。

40

【0079】

別の態様では、単離組成物は、ホスホナート、ホスホロチオアートおよびホスホトリエステルからなる群より選択されるリン酸骨格修飾を含む。

【0080】

別の態様では、前記第一鎖の前記 3' 末端の修飾ヌクレオチド残基は、デオキシリボヌ

50

クレオチド、非環状ヌクレオチドおよび蛍光分子からなる群より選択される。

【0081】

別の態様では、前記第一鎖の少なくとも1つの前記ヌクレオチドと前記第二鎖の少なくとも1つの前記ヌクレオチドがミスマッチ塩基対を形成する。

【0082】

別の態様では、ペプチドは、配列番号1～89からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する。

【0083】

別の実施形態では、本発明は、細胞内での標的遺伝子発現を減少させるための方法を提供し、この方法は、参照 dsRNA に比べて細胞内での標的遺伝子発現を減少させるのに効果的な量の本発明の単離組成物と細胞とを接触させることを含む。

10

【0084】

別の実施形態では、本発明は、細胞増殖を阻害するのに十分な量の本発明の前記単離組成物と細胞とを接触させることを含む、細胞増殖を選択的に阻害するための方法を提供する。

【0085】

別の実施形態では、本発明は、動物における標的遺伝子発現を減少させるための方法を提供し、この方法は、参照 dsRNA に比べて動物細胞内での標的遺伝子発現を減少させるのに効果的な量の本発明の単離組成物で動物を治療することを含む。

【0086】

20

一態様では、単離組成物は、適当な対照 dsRNA に比べて増強された薬物動態を有する。

【0087】

別の態様では、dsRNA は、適当な対照 dsRNA に比べて増強された薬力学を有する。

【0088】

別の態様では、dsRNA は、適当な対照 dsRNA に比べて減少した毒性を有する。

【0089】

別の態様では、dsRNA は、適当な対照 dsRNA に比べて増強された細胞内取り込みを有する。

30

【0090】

別の実施形態では、本発明は、被検体の細胞内での標的遺伝子発現を減少させるための医薬組成物を提供し、この組成物は、参照 dsRNA に比べて細胞内での標的遺伝子発現を減少させるのに効果的な量の本発明の単離組成物と薬学的に許容される担体とを含む。

【0091】

別の実施形態では、本発明は、dsRNA を化学的または酵素的に合成することを含む、本発明の dsRNA-ペプチドコンジュゲートの合成法を提供する。

【0092】

別の実施形態では、本発明は、本発明の dsRNA-ペプチドコンジュゲートとその使用説明書とを含むキットを提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1A】本発明による有用な dsRNA-ペプチドコンジュゲートの典型的な構造を表す図である。「P」=本発明によるペプチド（A-平滑末端-平滑末端）、（BおよびC-オーバーハング）、（DおよびE-非対称）および（FおよびG-ミスマッチ末端）。

【図1B】同上。

【図1C】同上。

【図1D】同上。

【図1E】同上。

【図1F】同上。

50

【図 1 G】同上。

【図 2】本発明の H P R T 1 および K R A S 標的化 d s R N A の典型的な配列を示す図である。下線部の残基は 2' - O - メチル修飾の位置を示す。矢印は d s R N A 内のダイサー酵素切断の予測部位を示し、破線は対応する標的 R N A 配列内の A r g o n a u t e 2 を介した切断の予測位置を示す。

【図 3】本発明のペプチドコンジュゲート d s R N A の典型的なペプチド配列を示す図である。各ペプチドの正味荷電も記載されている。

【図 4】本発明の典型的な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートの模式図であり、番号 2、3 および 5 の各 D s i R N A - ペプチドコンジュゲートに関して、適切にコンジュゲートされた分子のサイズシフトがレーン 2、3 および 5 に示されている。模式図中の矢頭は、D s i R N A および D s i R N A - ペプチドコンジュゲート内の予測されるダイサー酵素切断部位を示す。

10

【図 5】さらなる本発明の典型的な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートの模式図であり、番号 2、3、5 および 6 の各 D s i R N A - ペプチドコンジュゲートに関して、適切にコンジュゲートされた分子のサイズシフトがレーン 2、3、5 および 6 に示されている。模式図中の矢頭は、D s i R N A および D s i R N A - ペプチドコンジュゲート内の予測されるダイサー酵素切断部位を示す。

【図 6】さらなる本発明の典型的な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートの模式図であり、番号 2 および 3 の D s i R N A - ペプチドコンジュゲートに関して、適切にコンジュゲートされた分子を示すサイズシフトがレーン 2 および 3 に示されている。模式図中の矢頭は、D s i R N A および D s i R N A - ペプチドコンジュゲート内の予測されるダイサー酵素切断部位を示す。

20

【図 7】切断可能なペプチドコンジュゲートを含めた本発明の典型的な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートの模式図であり、番号 2、3、4 および 5 の各 D s i R N A - ペプチドコンジュゲートに関して、適切にコンジュゲートされた分子のサイズシフトがレーン 2、3、4 および 5 に示されている。模式図中の矢頭は、D s i R N A および D s i R N A - ペプチドコンジュゲート内の予測されるダイサー酵素切断部位を示す。

【図 8】本発明の典型的な D s i R N A - 環状ペプチドコンジュゲートの模式図であり、番号 2 の D s i R N A - ペプチドコンジュゲートに関して、適切にコンジュゲートされた分子を示すサイズシフトがレーン 2 に示されている。模式図中の矢頭は、D s i R N A および D s i R N A - ペプチドコンジュゲート内の予測されるダイサー酵素切断部位を示す。

30

【図 9】本発明の典型的な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートの模式図であり、各図は、D s i R N A および D s i R N A - ペプチドコンジュゲートに関するダイサープロセッシングアッセイの結果を示す。

【図 10】同上。

【図 11】トランスフェクトされた D s i R N A - ペプチドコンジュゲートが、インビトロでの効力を保持する効率的な遺伝子サイレンシング剤であったことを示すヒストグラムのデータを表す図である。トランスフェクションアッセイは H e L a 細胞で行った。

【図 12】同上。

40

【図 13】典型的な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートの血清安定性を示す図であり、半減期が示されている。

【図 14】同上。

【図 15】典型的な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートが、トランスフェクション媒体の非存在下、インビトロでの標的遺伝子サイレンシング効果を示したことを示すヒストグラムのデータを表す図であり、D s i R N A - ペプチドコンジュゲート濃度の増加により送達の向上が観察された。アッセイは H e L a 細胞で行った。

【図 16】同上。

【図 17】同上。

【図 18】典型的な D s i R N A および D s i R N A - ペプチドコンジュゲートが、トラ

50

ンスフェクション媒体の非存在下、インビトロでHepG2細胞内の標的遺伝子をノックダウンしたことを示すヒストグラムのデータを表す図である。DsRNA、DsRNA-ペプチドおよびペプチドは5 μMの濃度で投与した。

【図19】典型的なDsRNAおよびDsRNA-ペプチドコンジュゲートが、トランスフェクション媒体の非存在下、インビトロでHepG2細胞内の標的遺伝子をノックダウンしたことを示すIC₅₀曲線のデータを表す図である。試験薬剤の模式図も示す。

【発明を実施するための形態】

【0094】

本発明は、標的へのdsRNAの送達および／または生体内分布あるいは標的化を増強する、ならびにさらなる機能性を追加する、ならびに／あるいは例えば、そのような薬剤の薬物動態または薬力学を、本明細書に記載のペプチドを含まないdsRNA分子に比べて増強することができるペプチドを含む二本鎖RNA（「dsRNA」）を含有する組成物に関する。本発明はまた、インビボまたはインビトロで遺伝子のレベルおよび／または発現を減少させることができるペプチドを含むdsRNAの調製法にも関する。

【0095】

本発明は、新規dsRNAペプチドコンジュゲートを提供する。

【0096】

本発明はまた、特定組織に対してdsRNAを標的化するための新規dsRNA-ペプチドコンジュゲートも提供する。本明細書に記載のペプチドによる標的化は、標的化ペプチドが、対象とする組織または腫瘍上の表面マーカーと高度に特異的に結合することを介して生じる。ペプチドのこの結合特異性により、当該技術分野で公知のdsRNA標的化の方法または薬剤に有利な高度に特異的、選択的かつ効率的な方法で、dsRNAを標的に対して標的化する能力の増大が本発明のdsRNA-ペプチドコンジュゲートにもたらされる。

【0097】

本発明は以下の利点をもたらす。本発明は、本発明のdsRNAの送達を増強する送達ペプチドを提供する。本発明は、ほぼ中性または中性である送達ペプチドを提供する。例えば、陽イオン性ペプチドとコンジュゲートされた核酸。TAT（Tat⁴⁸⁻⁶⁰）、ペネトラチン（Antp⁴³⁻⁵⁸、オリゴアルギニン（R8、R9）など）が当該技術分野で公知である。中性またはほぼ中性である本発明のペプチドとは異なり、陽イオン性ペプチドコンジュゲーションは、核酸の多価陰イオン性により特にdsRNAコンジュゲーションには不利である。

【0098】

本発明のペプチドはまた、当該技術分野で公知のペプチドよりも有利であるが、それは、ダイサー酵素が本発明のdsRNA-ペプチドをプロセシングして、RISC経路におけるプロセシングに適したsiRNA分子を生じるため、本明細書に記載のペプチドを、切断可能なリンカーを介してdsRNAと連結する必要はなく、安定なリンカーを介してdsRNAとコンジュゲートすることができるからである。このことは、安定なリンカーの向上した安定性により、医薬組成物に特に有利である（切断可能なリンカーは、製造および／または保管中に切断されてその機能を喪失する場合がある）。

【0099】

定義

本発明は、細胞内での標的遺伝子発現を減少させるための向上した組成物および方法を提供し、細胞内での標的遺伝子発現を減少させるのに効果的な量の単離dsRNAと標的とを接触させることを含む。本発明のdsRNA分子は、本明細書中で定義されるようにdsRNA-ペプチドコンジュゲートを提供するためペプチドを含む。このペプチドは、あるパターンの修飾ヌクレオチドを含有しない、対応する長さのdsRNA剤と比べて、標的RNAへのdsRNAの送達および／または生体内分布または標的化を増強し、かつ機能性、例えば、薬物動態または薬力学をさらに追加する。

【0100】

10

20

30

40

50

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明の属する分野の当業者により一般的に理解されている意味を有する。以下の参考文献は、本発明において使用される数多くの用語の一般的定義を当業者に提供する：Singletonら、Dictionary of Microbiology and Dictionary of Microbiology（第2版，1994）；The Cambridge Dictionary of Science and Technology（Walker編，1988）；The Glossary of Genetics，第5版，R. Riegerら（編），Springer Verlag（1991）；およびHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology（1991）。本明細書で使用される場合、以下の用語は、別途明記されない限り、以下でそれらのものとされる意味を有する。 10

【0101】

本発明は、本発明による1つ以上のペプチドとコンジュゲートされた1つ以上のdsRNA分子、およびこれらのdsRNA分子を用いて対象とするRNAまたはコードされたタンパク質のレベルを調節する方法に関する。

【0102】

本発明のdsRNA-ペプチドは、ダイサーにより切断することができ、かつ標的RNAの発現を阻害することができる。

【0103】

本明細書で使用される「ペプチド」は、「送達ペプチド」および「標的化ペプチド」を包含する。 20

【0104】

本明細書で使用される「ペプチド」は、直鎖ペプチド、分岐ペプチドまたは環状ペプチドを意味する。

【0105】

本発明はさらに、所望の標的、例えば、細胞または細胞上もしくは細胞内受容体、所望の標的組織あるいは所望の標的細胞へdsRNAを運搬するためのペプチドの使用に関する。

【0106】

本発明に従えば、所望の部位は、例えば、非限定的に脳、副腎または脳外のその他の部位（例えば、頭蓋外部位）、例えば腎臓、肝臓、膵臓、心臓、脾臓、胃腸（GI）管（例えば、胃、腸、結腸）、眼、肺、皮膚、脂肪、筋肉、リンパ節、骨髄、泌尿および生殖器系（卵巣、乳房、精巣、前立腺）、胎盤、血液細胞などならびにそれらの組合せであり得る。したがって、所望の標的部位は、脳、脳外の副腎またはその他の部位（例えば、頭蓋外部位）、例えば腎臓、肝臓、膵臓、心臓、脾臓、胃腸（GI）管（例えば、胃、腸、結腸）、眼、肺、皮膚、脂肪、筋肉、リンパ節、骨髄、泌尿および生殖器系（卵巣、乳房、精巣、前立腺）、胎盤、血液細胞などならびにそれらの組合せからなる群より選択される1つ以上の部位であり得る。 30

【0107】

「標的細胞」は、本明細書で定義される任意の細胞、例えば、脳、副腎または脳外のその他の部位（例えば、頭蓋外部位）、例えば腎臓、肝臓、膵臓、心臓、脾臓、胃腸（GI）管（例えば、胃、腸、結腸）、眼、肺、皮膚、脂肪、筋肉、リンパ節、骨髄、泌尿および生殖器系（卵巣、乳房、精巣、前立腺）、胎盤、血液細胞などならびにそれらの組合せを含むがこれらに限定されない、任意の器官に由来するか、またはそこに存在する細胞であり得る。 40

【0108】

本明細書で使用される「送達ペプチド」は、中性または実質的に中性であるペプチドを意味する。「実質的に中性」は、+5以下、例えば、+5、+4、+3、+2、+1またはゼロの正味荷電をもつことを意味する。

【0109】

本発明による「正味荷電」は、当該技術分野で公知の方法により決定される。例えば、本明細書で定義される正味荷電は、陽イオン性アミノ酸（リジン、アルギニン、ヒスチジン）の総数と陰イオン性アミノ酸（アスパラギン酸およびグルタミン酸）の総数の正味荷電を得ることにより決定される。

【0110】

本明細書で使用される「送達ペプチド」は、ペプチドが約+5以下（例えば、+5、+4、+3、+2、+1またはゼロ）の正味荷電をもつ少なくとも6個のアミノ酸を意味する。一態様では、ペプチドは6～100個のアミノ酸、例えば、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100個のアミノ酸であり、かつ約+5以下の正味荷電をもつ。別の実施形態では、ペプチドは10～50個のアミノ酸（例えば、10、15、20、25、30、35、40、45または50個のアミノ酸）であり、かつ約+5以下の正味荷電をもつ。別の実施形態では、ペプチドは15～30個のアミノ酸（例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個のアミノ酸）であり、かつ約+5以下の正味荷電をもつ。

10

【0111】

本発明による「送達ペプチド」は、少なくとも6個のアミノ酸であり、かつ中性ペプチドであるペプチドを包含する。一態様では、ペプチドは6～100個のアミノ酸、例えば、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100個のアミノ酸であり、かつ正味荷電をもたない。別の実施形態では、ペプチドは10～50個のアミノ酸（例えば、10、15、20、25、30、35、40、45または50個のアミノ酸）であり、かつ正味荷電をもたない。別の実施形態では、ペプチドは15～30個のアミノ酸（例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個のアミノ酸）であり、かつ正味荷電をもたない。

20

【0112】

本発明による「送達ペプチド」はまた、少なくとも6個かつ19個以下のアミノ酸であり、約+5以下（例えば、+5、+4、+3、+2、+1またはゼロ）の正味荷電をもつペプチドも意味する。

【0113】

本明細書で使用される「送達ペプチド」は、ペプチドが約+5以下（例えば、+5、+4、+3、+2、+1またはゼロ）の正味荷電をもち、かつペプチドが少なくとも1つの陰イオン性アミノ酸を有する、少なくとも6個のアミノ酸を意味する。一態様では、ペプチドは6～100個のアミノ酸、例えば、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100個のアミノ酸であり、かつ約+4以下の正味荷電をもつ。別の実施形態では、ペプチドは10～50個のアミノ酸（例えば、10、15、20、25、30、35、40、45または50個のアミノ酸）であり、かつ約+5以下の正味荷電をもつ。別の実施形態では、ペプチドは15～30個のアミノ酸（例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個のアミノ酸）であり、かつ約+5以下の正味荷電をもつ。

30

40

【0114】

本明細書で使用される「少なくとも1つの陰イオン性アミノ酸」は、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）のうちの少なくとも1つを意味する。例えば、Xが任意のアミノ酸であるXXXEXXまたはXXXDXXまたはXXDXEXXまたはXXXEDXXにおいて、ペプチドは+5以下の正味荷電をもつ。

【0115】

正味荷電をもたないペプチドは「中性ペプチド」を意味する。

【0116】

本明細書で使用される「中性ペプチド」は、中性pH（例えば、pH6、6.1、6.

50

2、6、3、6、4、6、5、6、6、6、7、6、8、6、9、7、7、1、7、2、7、3、7、4、7、5、7、6、7、7、7、8、7、9、8、8、1、8、2、8、3、8、4または8、5）において約ゼロである正味荷電をもつ。

【0117】

「中性ペプチド」はまた、中性pHにおいて約ゼロである正味荷電をもつ、および／または約pH7（例えば、pH6、6、1、6、2、6、3、6、4、6、5、6、6、6、7、6、8、6、9、7、7、1、7、2、7、3、7、4、7、5、7、6、7、7、7、8、7、9、8、8、1、8、2、8、3、8、4または8、5）の等電点（pI）をもつペプチドも包含する。

【0118】

正荷電アミノ酸はリジン（Lys、K）、アルギニン（Arg、R）およびヒスチジン（His、H）である。負荷電アミノ酸はアスパラギン酸またはアスパラギン酸塩（Asp、D）、グルタミン酸またはグルタミン酸塩（Glu、E）である。（参考文献：Lehninger Principles of Biochemistry, 第3版, 2000, David L. NelsonおよびMichael M. Cox編, Worth Publishers, New York, NY）。

【0119】

本発明による「送達ペプチド」は、本発明のdsRNAとコンジュゲートされている場合に、dsRNAを適切な標的RNAまで送達することができるアミノ酸配列である。

【0120】

「送達ペプチド」はまた、dsRNAがペプチドとコンジュゲートされている場合に、細胞膜を横断してdsRNAを輸送することができるアミノ酸配列も意味する。

【0121】

本発明による有用な「送達ペプチド」は、ペプチドがdsRNAとコンジュゲートされている場合、ペプチドとコンジュゲートされていないdsRNAと比べて、標的細胞へのdsRNAの内部移行を増加させる。

【0122】

本発明による有用な「送達ペプチド」は、ペプチドがdsRNAとコンジュゲートされている場合、ペプチドとコンジュゲートされていないdsRNAと比べて、標的RNAへのdsRNAの送達を増加させる。

【0123】

本明細書で使用する「増加させる（する）」は、標的RNAへのペプチドーdsRNAの送達が、ペプチドとコンジュゲートされていないdsRNAの送達の1、2、3、4、5、10、15、20、25、40、35、40、45、50、100、1000または10、000倍以上多いことを意味する。

【0124】

本明細書で使用する「増加させる（する）」は、標的へのペプチドーdsRNAの送達が、ペプチドとコンジュゲートされていないdsRNAの送達よりも1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%多いことを意味する。

【0125】

dsRNA、ペプチドまたはdsRNAーペプチドコンジュゲートの「送達」は、後述の内部移行または取り込みアッセイにより評価される。

【0126】

別の実施形態では、本明細書で使用する「ペプチド」は、6～100個のアミノ酸、例えば、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100個のアミノ酸であり、かつ標的細胞と結合する「標的化ペプチド」を意味する。

【0127】

本発明による「標的化ペプチド」は、本明細書で定義されるようにdsRNAとコンジ

10

20

30

40

50

ュゲートされている場合に、標的または結合部位と特異的に結合する。

【0128】

本明細書で使用される「特異的に結合する」は、対象とする受容体への水素結合または静電引力を介することを意味する。

【0129】

一態様では、標的は受容体または受容体結合タンパク質である。

【0130】

一態様では、標的または結合部位または受容体は、細胞表面上にある。

【0131】

別の態様では、標的または結合部位または受容体は、内部、例えば細胞内（例えば、細胞質中、核内または核表面上）にある。

10

【0132】

別の態様では、標的または結合部位または受容体は、溶液中で裸である。

【0133】

「特異的結合」は、当該技術分野で公知のおよび本明細書で定義される結合アッセイにより判定される（例えば、米国特許出願公開第20080064092号および同第2009004174号を参照されたい）。一実施形態では、特異的結合は、すべての受容体を一混合物中に存在させて、dsRNA-送達ペプチドと所定の対応する受容体との結合を、dsRNAと他の受容体との結合と比較することにより判定される。本明細書で定義される、他の受容体と比較した所定の受容体との結合の増加は、特異的結合を示すものである。

20

【0134】

一実施形態では、特異的結合は、すべての細胞を一混合物中に存在させて、dsRNA-送達ペプチドと所定の細胞との結合を、dsRNAと他の細胞との結合と比較することにより判定される。本明細書で定義される、他の細胞と比較した所定の細胞との結合の増加は、特異的結合を示すものである。

【0135】

「特異的結合」は、dsRNA-ペプチドと溶液中の裸の受容体との結合を判定することによりインビトロで、またはdsRNA-ペプチドと細胞との結合を判定することによりインビボで判定される。

30

【0136】

本明細書で使用される「受容体」は、細胞表面受容体、溶液中の裸の受容体および細胞内部、例えば細胞質、核中または核表面上にある受容体を包含する。

【0137】

本明細書で使用される「受容体結合タンパク質は意味する。

【0138】

本明細書で使用される「標的化ペプチド」は、dsRNAとコンジュゲートされている場合に細胞膜を横断すること、本発明によるdsRNAとコンジュゲートされている場合に細胞膜を横断してdsRNAを輸送すること、およびdsRNAとコンジュゲートされている場合にリガンドに対する受容体、例えば細胞表面受容体と結合することのうち少なくとも1つのことが可能である。

40

【0139】

一態様では、「標的化ペプチド」は、転移ドメインまたはその一部、例えば神経毒の転移ドメインとコンジュゲートされている。

【0140】

本明細書で使用される転移ドメインは、タンパク質の透過および／または内部移行を促進するアミノ酸配列を指す。

【0141】

本明細書で使用される「その一部」は、機能、例えば、細胞内移行の指示または細胞表面結合、例えば本明細書で定義されるような細胞表面受容体結合の促進を維持するのに十

50

分なアミノ酸配列を意味する。「その一部」はまた、完全なアミノ酸配列の1%以上、例えば、1、5、10、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または99%も意味する。

【0142】

一態様では、標的化ペプチドは内部移行（例えば、直接的な透過による、またはエンドソーム形成を必要とし、受容体介在性エンドサイトーシスとも呼ばれるエンドサイトーシス経路による）が可能である。

【0143】

dsRNA、ペプチドまたはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの「結合」は、リガンド結合アッセイにより評価される。

10

【0144】

一実施形態では、対応する受容体に対するペプチドまたはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの結合親和性は、約100 μ Mである。別の実施形態では、対応する受容体に対するペプチドまたはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの結合親和性は、約1 μ Mである。別の実施形態では、対応する受容体に対するペプチドまたはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの結合親和性は、約100 nMである。別の実施形態では、対応する受容体に対するペプチドまたはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの結合親和性は、約10 nMである。別の実施形態では、対応する受容体に対するペプチドまたはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの結合親和性は、約5 nMである。別の実施形態では、対応する受容体に対するペプチドまたはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの結合親和性は、約1 nMである。別の実施形態では、対応する受容体に対するペプチドまたはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの結合親和性は、約0.1 nM以下である（Gauguinら, J Biol Chem. 2008; 283: 2604-2613; Gruppingerら, Endocrinology 1997; 138(10): 4064-4068; ならびに Stone, ChervinおよびKranz, Immunology. 2009; 126(2): 165-76）。

20

【0145】

一実施形態では、「標的化ペプチド」は、標的細胞と結合する6~100個のアミノ酸、例えば、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100個のアミノ酸を意味し、かつそれは対象とするアミノ酸配列、例えば標的ペプチドのアミノ酸配列の一部を含む。

30

【0146】

本発明による有用なペプチドは、ペプチドがdsRNAとコンジュゲートされている場合、ペプチドとコンジュゲートされていないdsRNAと比べて、細胞に対するdsRNAの標的化を増大させる。

【0147】

本明細書で使用される「増大（増加）させる」は、細胞に対するペプチド-dsRNAコンジュゲートの標的化が、ペプチドとコンジュゲートされていないdsRNAの標的化の1、2、3、4、5、10、15、20、25、40、35、40、45、50、100、1000または10,000倍以上高いことを意味する。

40

【0148】

本明細書で使用される「増大（増加）させる」は、細胞に対するペプチド-dsRNAコンジュゲートの標的化が、ペプチドとコンジュゲートされていないdsRNAの標的化よりも1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%高いことを意味する。

【0149】

本明細書で使用される「増大（増加）させる」は、以下に定義されるような細胞に対するペプチド-dsRNAコンジュゲートの標的化が、ペプチドとコンジュゲートされていない、後述のアッセイでのIC₅₀により判定される同レベルの結合、会合または内部移

50

行を達成するために必要とされる、同一の dsRNA の量または用量と比べて、より少ない dsRNA (低用量の dsRNA) を必要とすることを意味する。例えば、インビボまたはインビトロで測定される、RNA/遺伝子発現の 50% 減少を達成するために必要な dsRNA-ペプチドコンジュゲートの IC₅₀ は、ペプチドとコンジュゲートされていない同一の dsRNA と比べて減少している (例えば、Heffner ら, J Biomol Tech. 2008 Sep; 19 (4) 231-237; Zimmermann ら, Nature. 2006 May 4; 441 (7089): 111-114; Durcan ら, Mol Pharm. 2008 Jul-Aug; 5 (4): 559-566; Heidehl ら, Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Apr 3; 104 (14): 5715-5721 を参照されたい)。

10

【0150】

本明細書で使用される「減少している」は、dsRNA-ペプチドコンジュゲートの IC₅₀ が、ペプチドとコンジュゲートされていない同一の dsRNA の IC₅₀ の 1、2、3、4、5、10、15、20、25、40、35、40、45、50、100、1000 または 10,000 倍以上低いことを意味する。

【0151】

本明細書で使用される「減少した」は、dsRNA-ペプチドコンジュゲートの IC₅₀ が、ペプチドとコンジュゲートされていない同一の dsRNA の IC₅₀ の 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99 または 100% 低いことを意味する。

20

【0152】

一実施形態では、結合係数 K_d により表される、dsRNA 単独と比べた dsRNA-ペプチドコンジュゲートの標的化の増加は約 25% である。別の実施形態では、dsRNA 単独と比べた dsRNA-ペプチドコンジュゲートの標的化の増加は約 100% である、すなわち、dsRNA-ペプチドコンジュゲートは、dsRNA 単独と比べて約 2 倍の結合親和性増加 (すなわち、K_d の減少) を示す。別の実施形態では、dsRNA-ペプチドコンジュゲートは、dsRNA 単独と比べて約 5 倍の結合親和性増加を示す。別の実施形態では、dsRNA-ペプチドコンジュゲートは、dsRNA 単独と比べて約 10 倍の結合親和性増加を示す。別の実施形態では、dsRNA-ペプチドコンジュゲートは、dsRNA 単独と比べて約 100 倍の結合親和性増加を示す。別の実施形態では、dsRNA-ペプチドコンジュゲートは、dsRNA 単独と比べて約 1,000 倍以上の結合親和性増加を示す。

30

【0153】

「結合」は、当該技術分野で公知のまたは本明細書で定義される結合アッセイにより判定される。一実施形態では、結合は、dsRNA-送達ペプチドと所定の受容体との結合を判定することにより判定される。

【0154】

別の実施形態では、結合は、すべての細胞を一混合物中に存在させて、dsRNA-送達ペプチドと所定の細胞との結合を判定することにより判定される。

【0155】

「結合」は、dsRNA-ペプチドと溶液中の裸の受容体との結合を判定することによりインビトロで、または dsRNA-ペプチドと細胞との結合を判定することによりインビボで判定される。

40

【0156】

本明細書で使用される「標的化」は、受容体の混合物中において、dsRNA-ペプチドコンジュゲートが別の受容体と比べて、対象とする受容体と優先的または特異的に結合または会合または内部移行することを意味する。本明細書で使用される「標的化」は、細胞の混合物中において、dsRNA-ペプチドコンジュゲートが細胞上の別の受容体と比べて、細胞上の対象とする受容体と優先的または特異的に結合または会合または内部移行することを意味する。本明細書で使用される「標的化」は、細胞の混合物中において、dsR

50

N A ペプチドコンジュゲートが別の細胞と比べて、ある細胞と優先的または特異的に結合または会合または内部移行することを意味する。すなわち、本発明による「標的化」は、インビトロおよびインビボの両方で判定または測定される。

【0157】

「標的化」はまた、細胞上の適切な結合部位への本発明の「ペプチド」の輸送または送達を意味し、例えば、ペプチドがリガンドである場合、標的化は、そのリガンドに対する適切な受容体、結合または接着タンパク質へのペプチドの送達を意味する。

【0158】

本発明によるペプチドは、本発明の d s R N A の第一鎖の 5' もしくは 3' 末端または第二鎖の 5' もしくは 3' 末端と、あるいは第一鎖の 5' 末端および第二鎖の 5' 末端と、第一鎖の 5' 末端および第二鎖の 3' 末端と、第一鎖の 3' 末端および第二鎖の 5' 末端と、あるいは第一鎖の 3' 末端および第二鎖の 3' 末端と結合し得る。

【0159】

本発明によるペプチドはまた、例えば、アミノ酸残基上の特定の官能基（例えば、C y s 上の - S H 基または L y s 上のアミノ基）を介して、第一および／または第二鎖と内部でも結合し得る。

【0160】

一態様では、2つ以上のペプチド、例えば、二量体、三量体または多数のペプチドが d s R N A と結合している。

【0161】

本明細書で使用される「二量体」は、互いにコンジュゲートされ、2つのペプチドのうちの1つが d s R N A とコンジュゲートされている2つペプチドを意味する。二量体はまた、各ペプチドが d s R N A 上の固有の部位とコンジュゲートされている2つのペプチドも意味する。

【0162】

本明細書で使用される「三量体」は、互いにコンジュゲートされ、3つのペプチドのうちの1つが d s R N A とコンジュゲートされている3つペプチドを意味する。三量体はまた、各ペプチドが d s R N A 上の固有の部位とコンジュゲートされている3つのペプチドも意味する。三量体はまた、3つのペプチドのうちの2つが互いにコンジュゲートされ、その2つのペプチドのうちの1つが d s R N A とコンジュゲートされ、かつ第三のペプチドが d s R N A 上の固有の部位とコンジュゲートされている3つのペプチドも意味する。

【0163】

本明細書で使用される「多数」は、2つ以上のペプチド、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれを超えるペプチドを意味する。本発明は、ペプチドが同じまたは異なる配列である複数のペプチドとコンジュゲートされた d s R N A を提供する。一実施形態では、多数のペプチドは、1つ以上の送達ペプチドおよび1つ以上の標的化ペプチドを意味する。

【0164】

「ペプチド」という用語は、互いにペプチド結合した限られた数の隣接するアミノ酸を包含し、またペプチドが天然に存在する分子または合成物（すなわち、天然に存在する分子またはその化学的／物理的に修飾されたバリエーション）のいずれであるかにかかわらず、ペプチド標的、例えば、細胞または細胞上の受容体への d s R N A の送達および／またはそれとの結合が可能である、本明細書で定義されるような標的化または送達ペプチドを含む。

【0165】

本明細書で使用される「ペプチド」は、天然に存在するタンパク質に由来し得る。

【0166】

本明細書で使用される「ペプチド」は、異なるタンパク質ドメインを含み得る（例えば、キメラペプチド）。

【0167】

本明細書で使用される「ペプチド」は、特定のアミノ酸配列の構造機能関係に基づいて設計された合成ペプチドであってよく、必ずしも天然配列と相同性を有するとは限らない。

【0168】

本発明のペプチドは本発明の dsRNA とコンジュゲートされている。

【0169】

本明細書で使用される「コンジュゲートされている」は、当該技術分野で公知の任意の共有または非共有結合を介して結合していることを意味する。

【0170】

本発明のペプチドは、ペプチド中の任意のアミノ酸残基を介して、例えば、C末端のC末端アミノ酸がC末端アミノ酸のカルボキシル基を介して、もしくはN末端のN末端アミノ酸がN末端アミノ酸の α -アミノ基を介して本発明の dsRNA と、またはアミノ酸残基上の特定の官能基（例えば、Cys 上の-SH基またはLys 上のアミノ基）とコンジュゲートされ得る。

【0171】

本発明のペプチドは、ペプチド配列内部の任意のアミノ酸残基を介して、例えば、ペプチド配列中間部のリジン残基のアミノ基を介して、本発明の dsRNA とコンジュゲートされ得る。

【0172】

本発明のペプチドは、ゼロ距離リンカー、ホモ二官能性リンカー、ヘテロ二官能性リンカーまたは三官能性リンカーを含むがこれらに限定されない安定な共有結合を介して、本発明の dsRNA とコンジュゲートされ得る（参考文献：Bioconjugate Techniques, 1996. Greg T. Hermanson, Academic Press, San Diego, CA.; Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, 1991. Shan S. Wong, CRC Press, Boca Raton, FL）。

【0173】

本明細書で使用される「ゼロ距離リンカー」は、反応物（例えば、dsRNA 上の反応基と、アミノ酸側鎖上の反応基、末端アミノ酸残基の遊離アミノおよびカルボキシル基のようなペプチド上の官能基など）が凝縮してリンカーなしでコンジュゲート分子を形成する反応によるコンジュゲーションを意味する。「ゼロ距離リンカー」は、例えば、ペプチドの末端反応物を dsRNA の末端反応物と反応させることにより形成される。ゼロ距離リンカーの例としては、ジスルフィド、アミド、エステル、チオエステルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0174】

本明細書で使用される「ホモ二官能性リンカー」は、2つの同様な官能基を有するリンカーによるコンジュゲーションを意味する。ホモ二官能性リンカーの例としては、アミノ指向性、カルボキシル指向性、スルフィドリル指向性などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0175】

本明細書で使用される「ヘテロ二官能性リンカー」は、異なる特異性の2つの異なる官能基を有するリンカーによるコンジュゲーションを意味する。ヘテロ二官能性リンカーの例としては、アミノおよびスルフィドリル指向性、アミノおよびカルボキシル指向性、カルボキシルおよびスルフィドリル指向性などの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0176】

本明細書で使用される「三官能性リンカー」は、3つの反応性官能基を有するリンカーによるコンジュゲーションを意味する。三官能性リンカーの例としては、4-アジド-2-ニトロフェニルビオシチン-4-ニトロフェニルエステル（ABNP）、スルホスクシ

10

20

30

40

50

ンイミジル-2-[6-(ビオチンアミド)-2-(p-アジドベンズアミド)ヘキサノアミド]エチル-1,3'-ジチオプロピオナート(スルホ-SBED)、その他のビオシチン系分子などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0177】

本発明によるペプチドはまた、限定されるわけではないがジスルフィド、エステル、グリコール、ジアゾおよびスルホンリンカーを含めた切断可能なリンカーを介して、dsRNAとコンジュゲートされ得る。

【0178】

本発明によるペプチドは、炭素リンカー、例えば、1個以上の炭素、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個またはそれを超える炭素である炭素リンカーによりdsRNAとコンジュゲートされ得る。

10

【0179】

本発明によるペプチドは、補欠分子族を用いてdsRNAとコンジュゲートされ得る。補欠分子族としては、金属イオン、ポルフィリン類、補酵素およびその他の非ペプチジル部分、例えば炭水化物またはオリゴ糖が挙げられるが、これらに限定されない(Wong, S. S. (1991), Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press)。

【0180】

一実施形態では、ペプチドとdsRNAは、融合構築物として発現することによりコンジュゲートされ得る。

20

【0181】

「ペプチド」は、当業者に公知である任意の従来の化学コンジュゲーション技術によりdsRNAと結合され得る。これに関しては、Hermanson, G. T. (1996), Bioconjugate techniques, Academic Press およびWong, S. S. (1991), Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Pressを参照する。

【0182】

「ペプチド」は、イオン相互作用を介してdsRNAと非共有結合的にコンジュゲートされ得る。

30

【0183】

本明細書で使用される「ペプチド-dsRNAコンジュゲート」は、限定されるわけではないが本明細書に記載の結合/コンジュゲーション法を含めた方法により、dsRNAとコンジュゲートされたペプチドを意味する。

【0184】

一態様では、ペプチド-dsRNAコンジュゲートは、1つ以上の色素分子をさらに含む。

【0185】

本明細書で使用される「色素分子」としては、多環芳香族色素または蛍光色素、例えば、Cy3、Cy5、Cy5.5、Alexa Fluor (登録商標) (例えば、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 647など)が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0186】

一態様では、ペプチド-dsRNAコンジュゲートは、本明細書で定義される送達ペプチドをさらに含む。

【0187】

一態様では、ペプチド-dsRNAコンジュゲートは、治療剤、例えば、抗癌剤または代謝性疾患もしくは障害を治療する薬剤をさらに含む。抗癌剤としては、抗ウイルス剤(Fiumeら, FEBS Lett. 1983; 153(1): 6-10)、シスプラチ

50

ン (Mukhopadhyay Sら, Bioconj Chem. 2008; 19 (1): 39-49)、ドキシソルビシン (Guan Hら, Bioconj Chem. 2008; 19 (9): 1813-21)、パクリタキセル (Dubikovskaya EAら, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105 (34): 12128-33, Regina (「e」にウムラウトあり) Aら, Br J Pharmacol. 2008; 155 (2): 185-97)、タモキシフェン (Rickertら, Biomacromolecules. 2007; 8 (11): 3608-3612) およびビンブラスチン (DeFeo-Jones Dら, Mol Cancer Ther. 2002; 1 (7): 451-459) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0188】

「ペプチド-dsRNAコンジュゲート」は、前記ペプチドおよび前記dsRNAが共にその機能を保持している分子を指す。

【0189】

本明細書で使用される「減少している」、例えば、dsRNA-ペプチドコンジュゲートの作用発現の減少またはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの送達速度の減少は、ペプチドとコンジュゲートされていない同一のdsRNAの作用発現または送達速度の1、2、3、4、5、10、15、20、25、40、35、40、45、50、100、1000または10、000倍以上低いことを意味する。

【0190】

本明細書で使用される「減少している」、例えば、dsRNA-ペプチドコンジュゲートの作用発現の減少またはdsRNA-ペプチドコンジュゲートの送達速度の減少は、ペプチドとコンジュゲートされていない同一のdsRNAの作用発現または送達速度よりも1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%低いことを意味する。

20

【0191】

本明細書で使用される「作用発現」は、インビトロ（例えば、細胞へまたは組織培地への）またはインビボ（例えば、ヒトまたは動物（例えば、マウスまたはラット）被検体への）でのdsRNAの投与と、標的RNAへのdsRNAの到達との間の時間を意味する。

30

【0192】

本明細書で使用される「送達速度」は、dsRNAの投与後にdsRNAが標的RNAに到達するのに必要な時間を意味する。

【0193】

本明細書で使用される「作用持続時間」は、dsRNAが標的RNAの発現を阻害する間の時間を意味する。

【0194】

本明細書で使用される「対照」または「参照」、例えば対照dsRNAは、特定の標的RNAに対して特異的なdsRNA（試験dsRNA）に匹敵する長さであるが、特定の標的RNAに対して特異的ではないdsRNAを意味する。対照RNAは、対象とする標的に対して特異的なdsRNAと同一ではないヌクレオチド配列を有する。対照、例えば対照ペプチドは、長さおよび電荷の1つ以上において匹敵するが、標的RNAに対して特異的なdsRNAとコンジュゲートされたペプチド（試験ペプチド）のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するペプチドを意味する。対照、例えば対照dsRNA-ペプチドコンジュゲートは、dsRNAが、特定の標的RNAに対して特異的なdsRNAに匹敵する長さであるが、特定の標的RNAに対して特異的ではないdsRNA-ペプチドコンジュゲートを意味する。対照dsRNA-ペプチドコンジュゲートはまた、ペプチドが長さおよび電荷の1つ以上において匹敵するが、標的RNAに対して特異的なdsRNAとコンジュゲートされたペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するdsRNA-ペプチドコンジュゲートも意味する。対照dsRNA-ペプチドコンジュゲートは

40

50

また、ペプチドが長さおよび電荷の1つ以上において匹敵するが、標的RNAに対して特異的なdsRNAとコンジュゲートされたペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有し、かつdsRNAが特定の標的RNAに対して特異的なdsRNAに匹敵する長さであるが、特定の標的RNAに対して特異的ではないdsRNA-ペプチドコンジュゲートも意味する。

【0195】

本明細書で使用される試験ペプチドまたは試験dsRNAは、本発明に従って標的RNAの発現を減少させるコンジュゲートを含む、ペプチドまたはdsRNAを意味する。試験dsRNAは、本発明に従って標的RNAの発現を減少させるdsRNAを意味する。

「試験」dsRNA-ペプチドコンジュゲートは、試験ペプチドとコンジュゲートされた試験dsRNAを含む。

【0196】

本明細書で使用される「核酸」という用語は、一本または二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドおよびそれらのポリマーを指す。この用語は、既知のヌクレオチド類似体または修飾骨格残基または連結を含有する核酸であって、合成、天然および非天然であり、参照核酸と同様の結合特性を有し、かつ参照ヌクレオチドと同様の方法で代謝される核酸を包含する。このような類似体の例としては、ホスホロチオアート、ホスホルアミダート、メチルホスホナート、キラル-メチルホスホナート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が非限定的に挙げられる。

【0197】

本明細書で使用される「ヌクレオチド」は、当該技術分野で公知の天然塩基(標準)および修飾塩基を有するものを包含することが当該技術分野において認められているように使用される。このような塩基は一般に、ヌクレオチド糖部分の1'位に位置している。ヌクレオチドは一般に、塩基、糖およびリン酸基を含む。ヌクレオチドは修飾されていないもの、あるいは糖、リン酸および/または塩基部分で修飾されているもの(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、非標準ヌクレオチドなどとも呼ばれる;例えば、すべて参照により本明細書に組み込まれる、UsmanおよびMcSwiggan, 同上;Ecksteinら, 国際PCT公開第92/07065号;Usmanら, 国際PCT公開第93/15187号;UhlmanおよびPeyman, 同上を参照されたい)であり得る。当該技術分野で公知の修飾核酸塩基にはいくつかの例があり、Limbachら(Nucleic Acids Res. 22:2183, 1994)により要約されている。核酸分子内に導入することができるいくつかの塩基修飾の非限定的な例としては、ヒポキサンチン、プリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、プソイドウラシル、2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン(例えば、5-メチルシチジン)、5-アルキルウリジン(例えば、リボチミジン)、5-ハロウリジン(例えば、5-ブロモウリジン)または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン(例えば、6-メチルウリジン)、プロピンなどが挙げられる(Burginら, Biochemistry 35:14090, 1996;UhlmanおよびPeyman, 同上)。この意味で「修飾塩基」は、1'位のアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルまたはそれらの等価物以外のヌクレオチド塩基を意味する。

【0198】

本明細書で使用される「修飾ヌクレオチド」は、ヌクレオシド、核酸塩基、ペントース環またはリン酸基に対する1つ以上の修飾を有するヌクレオチドを指す。例えば、修飾ヌクレオチドは、アデノシン-リン酸、グアノシン-リン酸、ウリジン-リン酸およびシチジン-リン酸を含有するリボヌクレオチド、ならびにデオキシアデノシン-リン酸、デオキシグアノシン-リン酸、デオキシチミジン-リン酸およびデオキシシチジン-リン酸を含有するデオキシリボヌクレオチドは除外する。修飾は、メチルトランスフェラーゼのようなヌクレオチドを修飾する酵素による修飾の結果得られる天然に存在するものを包含す

る。修飾ヌクレオチドはまた、合成または非天然のヌクレオチドも包含する。ヌクレオチドにおける合成または非天然の修飾としては、2'修飾、例えば、2'-O-メチル、2'-メトキシエトキシ、2'-フルオロ、2'-アシル、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、4'-チオ、4'-CH₂-O-2'-架橋、4'-(CH₂)₂-O-2'-架橋、2'-LNAおよび2'-O-(N-メチルカルバマート)を有するもの、または塩基類似体を含むものが挙げられる。本開示で記載されている2'修飾ヌクレオチドに関連して、「アミノ」は2'-NH₂または2'-O-NH₂を意味し、これらは修飾または非修飾であり得る。このような修飾群は、例えば、Ecksteinら、米国特許第5,672,695号およびMatulic-Adamicら、米国特許第6,248,878号に記載されている。

10

【0199】

本開示の核酸分子に関して、修飾はこれらの物質上で、dsRNAの一方または両方の鎖にパターンで存在し得る。本明細書で使用される「交互位置」は、dsRNA鎖の定められた長さにわたり、ヌクレオチドが1つ置きに修飾ヌクレオチドであるか、または各修飾ヌクレオチドの間に非修飾ヌクレオチド（例えば、非修飾リボヌクレオチド）が存在するパターンを指す（例えば、5'-MNMNMN-3'；3'-MNMNMN-5'；Mは修飾ヌクレオチド、Nは非修飾ヌクレオチドである）。特定の実施形態では、修飾パターンは、本明細書に記載のいずれかの位置番号付けの規定に従って、5'または3'末端のいずれかの最初のヌクレオチド位置から始まる（特定の実施形態では、本発明のDsiRNA剤の予測されるダイサー切断事象後の鎖の末端残基に関して1位を指定する；したがって、1位は、本発明のプロセッシング前の薬剤の3'末端または5'末端残基を常に構成するとは限らない）。他の実施形態では、1位は、反対側の鎖の5'または3'末端に相補的な第一または第二鎖のヌクレオチド残基に関して1位を指定する。例えば、特定の実施形態では、1位は、第一のオリゴヌクレオチド鎖の5'末端ヌクレオチド残基に相補的な第二鎖のヌクレオチド残基である。本発明は、修飾パターンが、本明細書に記載のいずれかの位置番号付けの規定に従って、5'または3'末端から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24位のいずれかで始まるdsRNAを包含する。本発明はまた、修飾パターンが、5'または3'末端残基から少なくとも1ヌクレオチドである任意の位置で始まるdsRNAも包含する。

20

30

【0200】

交互位置での修飾ヌクレオチドのパターンは、鎖の全長にわたっていてもよいが、特定の実施形態では、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個またはそれを超える修飾ヌクレオチドをそれぞれ含有する、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28個またはそれを超えるヌクレオチドを含む。

【0201】

本明細書で使用される「交互の対位置」は、dsRNA鎖の定められた長さにわたり、2個の連続する修飾ヌクレオチドが2個の連続する非修飾ヌクレオチドにより隔てられているパターンを指す（例えば、5'-MMNMMNMMNMMN-3'；3'-MMNMMNMMNMMN-5'；Mは修飾ヌクレオチド、Nは非修飾ヌクレオチドである）。一実施形態では、修飾パターンは、本明細書に記載のいずれかの位置番号付けの規定に従って、5'または3'末端のいずれかの最初のヌクレオチド位置から始まる。交互位置での修飾ヌクレオチドのパターンは、鎖の全長にわたっていてもよいが、好ましくは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個の修飾ヌクレオチドをそれぞれ含有する、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28個のヌクレオチドを含む。上記修飾パターンは典型的なものであって、本発明の範囲に対す

40

50

る制限を意図するものではないことを強調しておく。

【0202】

本明細書で使用される「塩基類似体」は、核酸二本鎖内に組み込まれ得る修飾ヌクレオチド内のヌクレオチド糖部分の1'位（または核酸二本鎖内に組み込まれ得るヌクレオチド糖部分置換における同等の位置）に位置する複素環部分を指す。本発明のdsNAにおいては、塩基類似体は一般に、通常の塩基であるグアニン（G）、シトシン（C）、アデニン（A）、チミン（T）およびウラシル（U）を除く、プリンまたはピリミジン塩基のどちらかである。塩基類似体は、dsRNA中の他の塩基または塩基類似体と二本鎖を形成し得る。塩基類似体としては、本発明の化合物および方法において有用なもの、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Bennerに対する米国特許第5,432,272号および第6,001,983号、ならびにManoharanに対する米国特許出願公開第20080213891号に開示されているものが上げられる。塩基の非限定的な例としては、ヒポキサンチン（I）、キサンチン（X）、3 β -D-リボフラノシル（2,6-ジアミノピリミジン）（K）、3- β -D-リボフラノシル（1-メチルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン-5,7(4H,6H)-ジオン）（P）、イソシトシン（イソ-C）、イソグアニン（イソ-G）、1- β -D-リボフラノシル（5-ニトロインドール）、1- β -D-リボフラノシル（3-ニトロピロール）、5-ブロモウラシル、2-アミノプリン、4-チオ-dT、7-（2-チエニル）-イミダゾ[4,5-b]ピリジン（Ds）およびピロール-2-カルボアルデヒド（Pa）、2-アミノ-6-（2-チエニル）プリン（S）、2-オキソピリジン（Y）、ジフルオロトリル、4-フルオロ-6-メチルベンゾイミダゾール、4-メチルベンゾイミダゾール、3-メチルイソカルボスチリル、5-メチルイソカルボスチリルおよび3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリル、7-アザインドリル、6-メチル-7-アザインドリル、イミジゾピリジニル、9-メチル-イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリル、7-プロピニルイソカルボスチリル、プロピニル-7-アザインドリル、2,4,5-トリメチルフェニル、4-メチルインドリル、4,6-ジメチルインドリル、フェニル、ナフタレニル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベンジル、テトラセニル、ペンタセニルならびにそれらの構造誘導体が挙げられる（Schweitzerら, J. Org. Chem., 59:7238-7242 (1994); Bergerら, Nucleic Acids Research, 28(15):2911-2914 (2000); Moranら, J. Am. Chem. Soc., 119:2056-2057 (1997); Moralesら, J. Am. Chem. Soc., 121:2323-2324 (1999); Guckianら, J. Am. Chem. Soc., 118:8182-8183 (1996); Moralesら, J. Am. Chem. Soc., 122(6):1001-1007 (2000); McMinnaら, J. Am. Chem. Soc., 121:11585-11586 (1999); Guckianら, J. Org. Chem., 63:9652-9656 (1998); Moranら, Proc. Natl. Acad. Sci., 94:10506-10511 (1997); Dasら, J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1:197-206 (2002); Shibataら, J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1:1605-1611 (2001); Wuら, J. Am. Chem. Soc., 122(32):7621-7632 (2000); O'Neillら, J. Org. Chem., 67:5869-5875 (2002); Chaudhuriら, J. Am. Chem. Soc., 117:10434-10442 (1995); および米国特許第6,218,108号）。塩基類似体はまた、ユニバーサル塩基であってもよい。

【0203】

本明細書で使用される「ユニバーサル塩基」は、核酸二本鎖中に存在する場合、二重らせん構造（例えば、リン酸骨格の構造）を変化させずに2種類以上の塩基と反対側に位置し得る、修飾ヌクレオチド中のヌクレオチド糖部分の1'位またはヌクレオチド糖部分置

10

20

30

40

50

換における同等の位置に位置する複素環部分を指す。さらに、ユニバーサル塩基は、それが存在する一本鎖核酸が標的核酸と二本鎖を形成する能力を損なわい。ユニバーサル塩基を含有する一本鎖核酸が標的核酸と二本鎖を形成する能力は、当業者に明らかな方法（例えば、UV吸収、円二色性、ゲルシフト、一本鎖ヌクレアーゼ感受性など）によりアッセイすることができる。さらに、二本鎖形成が観察される条件を、例えば、融解温度（ T_m ）は核酸二本鎖の安定性に関連するため、温度を変化させて、二本鎖の安定性または形成を判定し得る。標的核酸と正確に相補的な参照一本鎖核酸と比べて、ユニバーサル塩基を含有する一本鎖核酸は、相補的な核酸と共に形成される二本鎖よりも T_m が低い二本鎖を、標的核酸と共に形成する。しかし、単一ミスマッチが生じるようにユニバーサル塩基を塩基で置き換えた参照一本鎖核酸と比べた場合、ユニバーサル塩基を含有する一本鎖核酸は、ミスマッチ塩基を有する核酸と共に形成される二本鎖よりも T_m が高い二本鎖を、標的核酸と共に形成する。

10

【0204】

一部のユニバーサル塩基は、塩基対形成条件下で、ユニバーサル塩基と、グアニン（G）、シトシン（C）、アデニン（A）、チミン（T）およびウラシル（U）のすべての塩基との間で水素結合を形成することにより塩基対を形成することが可能である。ユニバーサル塩基は、単一の相補的な塩基のみと塩基対を形成する塩基ではない。二本鎖内で、ユニバーサル塩基は、二本鎖の反対鎖上のそれと向かい合うG、C、A、TおよびUのそれぞれと、水素結合を形成しないか、1つの水素結合または2つ以上の水素結合を形成し得る。ユニバーサル塩基は、二本鎖の反対鎖上のそれと向かい合う塩基と相互作用しないことが好ましい。二本鎖内では、ユニバーサル塩基間の塩基対形成は、リン酸骨格の二重らせん構造を変化させることなく生じる。ユニバーサル塩基はまた、スタッキング相互作用により、同じ核酸鎖上の隣接するヌクレオチド内の塩基とも相互作用し得る。このようなスタッキング相互作用は、特にユニバーサル塩基が二本鎖の反対鎖上にそれと向かい合って位置する塩基との水素結合を全く形成しない状況において、二本鎖を安定化させる。ユニバーサル結合ヌクレオチドの非限定的な例としては、イノシン、1- β -D-リボフラノシル-5-ニトロインドールおよび／または1- β -D-リボフラノシル-3-ニトロピロールが挙げられる（Quayらに対する米国特許出願公開第20070254362号；Van Aerschotら, An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. Nucleic Acids Res. 1995 Nov 11; 23(21): 4363-70; Loakesら, 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. Nucleic Acids Res. 1995 Jul 11; 23(13): 2361-6; LoakesおよびBrown, 5-Nitroindole as an universal base analogue. Nucleic Acids Res. 1994 Oct 11; 22(20): 4039-43）。

20

30

【0205】

本明細書で使用される「ループ」は、核酸の一本鎖により形成される構造を指し、この構造では、特定の一本鎖ヌクレオチド領域に隣接する相補的領域が、相補的領域間にある一本鎖ヌクレオチド領域が二本鎖形成またはWatson-Crick塩基対形成から除外されるようにハイブリダイズする。ループは任意の長さの一本鎖ヌクレオチド領域である。ループの例としては、ヘアピン、ステムループまたは伸長ループのような構造中に存在する不對ヌクレオチドが挙げられる。

40

【0206】

本明細書で使用される、dsRNAとの関連における「伸長ループ」は、一本鎖ループおよび加えて、ループに隣接する1、2、3、4、5、6または20以下の塩基対または二本鎖を指す。伸長ループにおいては、5'側のループと隣接するヌクレオチドが、3'側のループと隣接するヌクレオチドと二本鎖を形成する。伸長ループはヘアピンまたはス

50

テムループを形成し得る。

【0207】

本明細書で使用される、dsRNAとの関連における「テトラループ」は、隣接するWatson-Crickハイブリッド形成ヌクレオチドの安定性に寄与する安定な二次構造を形成する、4つのヌクレオチドからなるループ（一本鎖領域）を指す。理論に制限されるわけではないが、テトラループはスタッキング相互作用により、隣接するWatson-Crick塩基対を安定化させ得る。さらに、テトラループ内の4つのヌクレオチドの間の相互作用としては、非Watson-Crick塩基対形成、スタッキング相互作用、水素結合および接触相互作用が挙げられるが、これらに限定されない（Cheongら, Nature 1990 Aug 16; 346 (6285): 680-2; HeussおよびPardi, Science 1991 Jul 12; 253 (5016): 191-4）。テトラループは、隣接する二本鎖の融解温度（ T_m ）を、任意の4つの塩基からなる単純なモデルループ配列から予想されるよりも高く上昇させる。例えば、テトラループは、少なくとも2塩基対の長さの二本鎖を含むヘアピンに、10mM NaHPO₄中で少なくとも55℃の融解温度をもたらし得る。テトラループは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドおよびそれらの組合せを含有し得る。RNAテトラループの例としては、テトラループのUNCGファミリー（例えば、UCG）、テトラループのGNRAファミリー（例えば、GAA）およびCUUGテトラループが挙げられる。（Woeseら, Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Nov; 87 (21): 8467-71; Antaoら, Nucleic Acids Res. 1991 Nov 11; 19 (21): 5901-5）。DNAテトラループの例としては、テトラループのd(GNNA)ファミリー（例えば、d(GTTA)）、テトラループのd(GNRA)ファミリー、テトラループのd(GNAB)ファミリー、テトラループのd(CNNG)ファミリー、テトラループのd(TNCG)ファミリー（例えば、d(TTCG)）が挙げられる。（Nakanoら, Biochemistry, 41 (48), 14281-14292, 2002.; SHINJIら, Nippon Kagakkaï Koen Yokoshu VOL. 78th; NO. 2; PAGE. 731 (2000).）。

【0208】

本発明のdsRNA組成物は、少なくとも部分的にはそのような組成物の鎖長により、ダイサー酵素の基質としてRNAi経路に入るように形成されているため、本明細書ではダイサー基質siRNA（「DsiRNA」）剤とも呼ばれる。本発明の「DsiRNA剤」組成物は、ダイサー酵素プロセシングのための前駆体分子であるdsRNAを含む、すなわち、本発明のDsiRNAは、インビボでプロセシングされて活性siRNAを生じる。具体的には、DsiRNAはダイサーによりプロセシングされて、RISC内に組み込まれる活性siRNAになる。本明細書において主に「DsiRNA剤」または「DsiRNA分子」と呼ばれるこの前駆体分子は、本明細書において前駆体RNAi分子とも呼ばれ得る。本明細書で使用される「活性siRNA」という用語は、各鎖がRNA、RNA類似体（1つまたは複数）またはRNAとDNAを含む二本鎖核酸を指す。siRNAは、19～23個の間のヌクレオチドを含むか、または21個のヌクレオチドを含む。活性siRNAは通常、siRNA中の二本鎖領域が17～21個のヌクレオチドまたは19個のヌクレオチドを含むように、各鎖の3'末端に2bpのオーバーハングを有する。

【0209】

特定の実施形態では、本発明のdsRNAは、長さが16～50個の間、19～35個の間、19～24個の間、25～30個の間、25～35個の間、26～30個の間、21～23個の間のヌクレオチドを含む第一および第二鎖を含むdsRNAを含むが、これらに限定されない。

【0210】

本発明のDsiRNA剤は、それがダイサーによりプロセシングされてsiRNAを生

じるのに十分な長さを有する。したがって、適切な D s i R N A 剤は、長さが少なくとも 25ヌクレオチドかつ約 35ヌクレオチド以下の 1つのオリゴヌクレオチドである、第一の配列を含有する。この R N A 配列は、約 26～35個の間、26～34個の間、26～33個の間、26～32個の間、26～31個の間、26～30個の間および 26～29個の間のヌクレオチドの長さであり得る。この配列は、約 27もしくは 28ヌクレオチドの長さまたは 27ヌクレオチドの長さであり得る。D s i R N A 剤の第二の配列は、真核細胞の細胞質内のような生物学的条件下で第一の配列とアニールする、任意の配列であり得る。一般的には、第二のオリゴヌクレオチド配列は、第一のオリゴヌクレオチド配列と相補的な少なくとも 19個の塩基対を有し、より通常には、第二のオリゴヌクレオチド配列は、第一のオリゴヌクレオチド配列と相補的な約 21個以上の塩基対または相補的な約 25個以上の塩基対を有する。一実施形態では、第二の配列は、第一の配列と同じ長さであり、かつ D s i R N A 剤は平滑末端化されている。別の実施形態では、D s i R N A 剤の末端は 1つ以上のオーバーハングを有する。特定の実施形態では、第二の配列が第一の配列と同じ長さであり、前記第一鎖の前記 3'末端の最終残基と第二鎖の前記 5'末端の最終残基がミスマッチ塩基対を形成する。他の実施形態では、第二の配列が第一の配列と同じ長さであり、前記第一鎖の 5'末端の最終残基と第二鎖の 3'末端の最終残基がミスマッチ塩基対を形成する。他の実施形態では、第二の配列が第一の配列と同じ長さであり、第一鎖の 3'末端の最終残基および最後から 2番目の残基と第二鎖の 5'末端の最終残基および最後から 2番目の残基とが 2つのミスマッチ塩基対を形成する。さらに他の実施形態では、第二の配列が第一の配列と同じ長さであり、第一鎖の 5'末端の最終残基および最後から 2番目の残基と第二鎖の 3'末端の最終残基および最後から 2番目の残基とが 2つのミスマッチ塩基対を形成する。

10

20

【0211】

特定の実施形態では、D s i R N A 剤の第一および第二のオリゴヌクレオチド配列は、化学的に合成することができ、また通常は化学合成された、別々のオリゴヌクレオチド上に存在する。いくつかの実施形態では、両鎖は長さが 26～35ヌクレオチドの間である。他の実施形態では、両鎖は、長さが 25～30ヌクレオチドまたは 26～30ヌクレオチドの間である。一実施形態では、両鎖は長さが 27ヌクレオチドであり、完全に相補的であり、かつ平滑末端を有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖の一方または両方がダイサーに対する基質として働き得る。他の実施形態では、二本鎖 R N A 構造が遺伝子発現を阻害する効率を最大化する配向でダイサーが二本鎖 R N A 構造と結合することを促進する、少なくとも 1つの修飾が存在する。本発明の特定の実施形態では、D s i R N A 剤は異なる長さの 2つのオリゴヌクレオチド鎖からなり、D s i R N A は、第一鎖（センス鎖）の 3'末端に平滑末端を、および第二鎖（アンチセンス鎖）の 3'末端に 3'オーバーハングを有する。D s i R N A はまた、1つ以上のデオキシリボ核酸（D N A）塩基置換も含有する。

30

【0212】

2つ別々のオリゴヌクレオチドを含有する適切な D s i R N A 組成物は、化学的連結基により、それらのアニーリング領域以外で化学的に連結することができる。多くの適切な化学的連結基が当該技術分野で公知であり、使用することができる。適切な基は、D s i R N A 上のダイサー活性をブロックせず、かつ標的遺伝子から転写された R N A の指令された破壊を妨げない。あるいは、D s i R N A 組成物を形成している 2つのオリゴヌクレオチドのアニーリングの際にヘアピン構造が生じるように、2つの別々のオリゴヌクレオチドを第三のオリゴヌクレオチドにより連結することができる。ヘアピン構造は、D s i R N A 上のダイサー活性をブロックせず、かつ標的 R N A の指令された破壊を妨げない。

40

【0213】

本明細書で使用される、標的 R N A または c D N A 配列と「十分に相補的な」配列を有する d s R N A、例えば、D s i R N A または s i R N A は、d s R N A が、R N A i 機構（例えば、R I S C 複合体）またプロセスによる標的 R N A（c D N A を取り上げる場合、その取り上げられた c D N A に対応する R N A 配列）の破壊を誘発するのに十分な配

50

列を有することを意味する。dsRNA分子は、アンチセンス鎖のすべての残基が標的分子中の残基と相補的になるように設計することができる。あるいは、前記分子のプロセシング活性を安定化および／または増強するために、分子内で置換を行うことができる。置換は、鎖内で行うか、または鎖の末端の残基に対して行うことができる。特定の実施形態では、置換および／または修飾は、DsiRNA剤の特定の残基において行う。このような置換および／または修飾は、例えば、DsiRNA剤のセンス鎖の3'末端位置から数えて1、2および3位の1つ以上の残基におけるデオキシ修飾；DsiRNA剤のアンチセンス鎖の5'末端位置から数えて1、2、3または4位の1つ以上の残基におけるデオキシ修飾ならびにDsiRNA剤のアンチセンス鎖の3'末端残基における2'-O-アルキル（例えば、2'-O-メチル）修飾の導入を含んでもよく、このような修飾はさらに、または代わりに、アンチセンス鎖の3'部分のオーバーハング位置におよび／またはDsiRNA剤全体にわたって、例えば、プロセシングされて活性siRNA剤を形成するDsiRNA剤の領域内に含まれるDsiRNAのアンチセンス鎖の交互の残基で、または残基の対で存在する。上記修飾は典型的なものとして提供されるものであり、決して制限することを意図するものではない。本発明のDsiRNA剤に対して行い得るさらなる修飾および置換の記載を含めた、好適なDsiRNA剤の構造のさらなる考察を以下に見出すことができる。

【0214】

「相補性」は、核酸が、従来のWatson-Crickまたは他の非従来のタイプのいずれかにより、別の核酸と水素結合（1つまたは複数）形成し得ることを意味する。本発明の核酸分子に関しては、核酸分子のその相補的な配列との結合自由エネルギーは、核酸の関連する機能、例えばRNAi活性を進行させるのに十分なものである。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は当該技術分野で公知である（例えば、Turnerら、1987, CSH Symp. Quant. Biol. LI pp. 123-133; Frierら、1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83: 9373-9377; Turnerら、1987, J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-3785を参照されたい）。パーセント相補性は、第二の核酸配列と水素結合（例えば、Watson-Crick塩基対形成）を形成し得る核酸分子中の連続する残基のパーセンテージを表す（例えば、10ヌクレオチドを有する第二の核酸配列と塩基対を形成している第一のオリゴヌクレオチド中の全10ヌクレオチドのうちの5、6、7、8、9または10個のヌクレオチドは、それぞれ50%、60%、70%、80%、90%および100%相補的であることを表す）。「完全に相補的な」は、核酸配列のすべての連続する残基が、第二の核酸配列の同数の連続する残基と水素結合することを意味する。一実施形態では、本発明のDsiRNA分子は、1つ以上の標的核酸分子またはその一部と相補的な約19～約30個（例えば、約19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29個または30個以上）のヌクレオチドを含む。

【0215】

「二本鎖領域」という語句は、相補的または実質的に相補的なオリゴヌクレオチド間での二本鎖形成を可能にするWatson-Crick塩基対形成またはその他の任意の方法により互いに塩基対を形成する2つの相補的または実質的に相補的なオリゴヌクレオチド内の領域を指す。例えば、21ヌクレオチド単位を有するオリゴヌクレオチド鎖は、21ヌクレオチド単位の別のオリゴヌクレオチドと塩基対を形成することができるが、各鎖上の19塩基のみが相補的または実質的に相補的であるため、「二本鎖領域」は19塩基対で構成される。残りの塩基対は、例えば、5'および3'オーバーハングとして存在する。さらに、二本鎖領域内では100%の相補性は必要なく；実質的な相補性が二本鎖領域内で許容される。

【0216】

実質的な相補性は、生物学的条件下でアニーリング可能であるような鎖間の相補性を指す。2つの鎖が生物学的条件下でアニーリング可能であるか否かを実験的に判定する技術は、当該技術分野において公知である。あるいは、2つの鎖を合成して生物学的条件下で

共に加え、それらが互いにアニールするか否かを判定することができる。

【0217】

多数の塩基にわたって塩基対を形成する一本鎖核酸を「ハイブリダイズ」という。ハイブリダイゼーションは通常、生理学的なまたは生物学的に関連する条件下（例えば、細胞内：pH 7.2、140 mM カリウムイオン；細胞外：pH 7.4、145 mM ナトリウムイオン）で判定される。ハイブリダイゼーション条件は一般に、一価陽イオンおよび生物学的に許容される緩衝剤を含有し、二価陽イオン、錯陰イオン（例えば、グルコン酸カリウム由来のグルコン酸）、ショ糖のような非荷電種、および試料中の水の活性を減少させる不活性ポリマー、例えばPEGを含有してもしなくてもよい。このような条件は、塩基対が形成され得る条件を含む。

【0218】

ハイブリダイゼーションは、二本鎖を形成している一本鎖核酸を解離するのに必要な温度、すなわち（融解温度； T_m ）により測定される。ハイブリダイゼーション条件はまた、塩基対が形成され得る条件でもある。様々なストリンジェンシー条件を用いてハイブリダイゼーションを判定することができる（例えば、Wahl, G. M. および S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507を参照されたい）。ストリンジェントな温度条件としては通常、少なくとも約30℃、より好ましくは少なくとも約37℃、そして最も好ましくは約42℃が挙げられる。50塩基対未満の長さであると予想されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度（ T_m ）よりも5～10℃低くなければならず、ここで T_m は、以下の方程式により決定される。18塩基対未満の長さのハイブリッドでは、 $T_m (^\circ\text{C}) = 2 (A + T \text{塩基数}) + 4 (G + C \text{塩基数})$ 。18～49塩基対の間の長さのハイブリッドでは、 $T_m (^\circ\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\%G + C) - (600/N)$ であり、式中、Nはハイブリッド中の塩基数であり、 $[\text{Na}^+]$ はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオン濃度（1×SSCの $[\text{Na}^+] = 0.165 \text{ M}$ ）である。例えば、ハイブリダイゼーション判定用緩衝液を表1に示す。

【0219】

【表1】

	最終濃度	販売元	カタログ 番号	ロット 番号	m.w. / ストック	50mL 溶液作製 に要する量
NaCl	100 mM	Sigma	S-5150	41K8934	5M	1 mL
KCl	80 mM	Sigma	P-9541	70K0002	74.55	0.298 g
MgCl ₂	8 mM	Sigma	M-1028	120K8933	1M	0.4 mL
スクロース	2% w/v	Fisher	BP220- 212	907105	342.3	1 g
Tris-HCl	16 mM	Fisher	BP1757- 500	12419	1M	0.8 mL
NaH ₂ PO ₄	1 mM	Sigma	S-3193	52H- 029515	120.0	0.006 g
EDTA	0.02 mM	Sigma	E-7889	110K89271	0.5M	2 μL
H ₂ O		Sigma	W-4502	51K2359		50mLになるまで
20℃で pH=7.0	HCl で調整					

【0220】

ハイブリダイゼーション条件に関する有用な変形物は、当業者には用意に明らかになるであろう。ハイブリダイゼーション技術は当業者に公知であり、例えば、Benton および Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein および Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72:396

1, 1975); Ausubelら (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); BergerおよびKimmel (Antisense to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); ならびに Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

【0221】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド鎖」は一本鎖核酸分子である。オリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド（例えば、2'修飾を有するヌクレオチド、合成塩基類似体など）またはそれらの組合せを含む。このような修飾オリゴヌクレオチドは、例えば、増強された細胞取り込みおよびヌクレアーゼ存在下での増加した安定性のような特性により、本来の形態よりも好適であり得る。

【0222】

本発明の特定のdsRNAは、キメラ二本鎖リボ核酸(dsRNA)であり得る。本発明との関連における「キメラdsRNA」または「キメラ」は、それぞれ少なくとも1つのヌクレオチドからなる2つ以上の化学的に異なる領域を含有するdsRNAである。こうしたdsRNAは通常、ダイサー基質siRNA(「DsiRNA」)分子を形成するリボヌクレオチド(修飾リボヌクレオチドを任意に含む)を主として含む、少なくとも1つの領域を含有する。このDsiRNA領域は、リボヌクレオチド二本鎖領域のいずれかの側で塩基対形成したデオキシリボヌクレオチドを含む、第二の領域(「dsRNA領域」)と共有結合的に結合させることができ、このことが1つ以上の有益な特性(例えば、増大した有効性、例えば、増大したDsiRNA活性の効力および/または持続時間、例えば培養中の細胞または被検体に投与された場合の認識ドメインまたはキメラdsRNAを特定の位置に標的化する手段としての機能、官能基、ペイロード、検出用/検出可能な部分の結合向上のための延長領域としての機能、より望ましい修飾および/またはこのような修飾のスペーシングの向上を可能にする延長領域としての機能など)をもたらし得る。例えば塩基対形成したデオキシリボヌクレオチドを含む、この第二の領域はまた、修飾もしくは合成ヌクレオチドおよび/または修飾もしくは合成デオキシリボヌクレオチドも含み得る。

【0223】

本明細書で使用される「リボヌクレオチド」という用語は、天然および合成の非修飾および修飾リボヌクレオチドを包含する。修飾は、オリゴヌクレオチド中の糖部分、塩基部分および/またはリボヌクレオチド間の連結に対する改変を含む。本明細書で使用される「リボヌクレオチド」という用語は特に、2'リボース環部分に単一のプロトン基を有するヌクレオチドであるデオキシリボヌクレオチドは除外する。

【0224】

本明細書で使用される「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、天然および合成の非修飾および修飾デオキシリボヌクレオチドを包含する。修飾は、オリゴヌクレオチド中の糖部分、塩基部分および/またはデオキシリボヌクレオチド間の連結に対する改変を含む。本明細書で使用される「デオキシリボヌクレオチド」という用語はまた、dsRNA剤のダイサー切断をさせない修飾ヌクレオチド、例えば、残基の結合においてダイサー切断を生じさせない2'-O-メチルリボヌクレオチド、ホスホロチオアート修飾リボヌクレオチド残基なども包含する。

【0225】

本明細書で使用される「PS-NA」という用語は、ホスホロチオアート修飾ヌクレオチド残基を指す。したがって、「PS-NA」という用語は、ホスホロチオアート修飾リボヌクレオチド(「PS-RNA」)およびホスホロチオアート修飾デオキシリボヌクレオチド(「PS-DNA」)を包含する。

【0226】

本明細書で使用される「ダイサー」は、dsRNAまたはdsRNA含有分子、例えば二本鎖RNA (dsRNA) またはプレマイクロRNA (miRNA) を、通常は3'末端に2塩基オーバーハングを有する約19~25ヌクレオチド長の二本鎖核酸フラグメントに切断する、RNアーゼIIIファミリー内のエンドリボヌクレアーゼを指す。本発明のdsRNAに関しては、本発明のdsRNAのdsRNA領域により形成される二本鎖は、ダイサーにより認識され、かつ二本鎖の少なくとも一本の鎖上のダイサー基質である。ダイサーは、RNA干渉経路の最初の段階を触媒し、これにより標的RNAの分解が生じる。ヒトダイサーのタンパク質配列は、NCBIデータベースにおいてアクセッション番号NP_085124で提供され、これは参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0227】

ダイサー「切断」は以下のように判定される (例えば、Collingwoodら、Oligonucleotides 18:187-200 (2008) を参照されたい)。ダイサー切断アッセイでは、RNA二本鎖 (100 pmol) を、1単位の組換えヒトダイサー (Stratagene、La Jolla、CA) を含むかまたは含まない、20 µLの20 mM Tris pH 8.0、200 mM NaCl、2.5 mM MgCl₂ 中で18~24時間、37℃でインキュベートする。Performa SR 96ウェルプレート (Edge Biosystems、Gaithersburg、MD) を用いて試料を脱塩する。ダイサー処理の前および後の二本鎖RNAのエレクトロスプレーイオン化液体クロマトグラフィー質量分析 (ESI-LCMS) を、ThermoFinnigan TSQ7000、Xcaliburデータシステム、ProMassデータ処理ソフトウェアおよびParadigm MS4 HPLC (Michrom BioResources、Auburn、CA) からなるOligo HTCSシステム (Novatia、Princeton NJ; Hailら、2004) を用いて行う。このアッセイでは、ダイサー基質dsRNA (すなわち、25~30 bpのdsRNA、好ましくは26~30 bpのdsRNA) の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または100%さえもが、より短いdsRNA (例えば、19~23 bpのdsRNA、好ましくは21~23 bpのdsRNA) に切断されるダイサー切断が生じる。

20

【0228】

本明細書で使用される「ダイサー切断部位」は、ダイサーがdsRNA (例えば、本発明のdsRNAのdsRNA領域) を切断する部位を指す。ダイサーは、通常はdsRNAのセンスおよびアンチセンス両鎖を切断する2つのRNアーゼIIIドメインを含有する。RNアーゼIIIドメインとPAZドメイン間の平均距離が、その生成する短い二本鎖核酸フラグメントの長さを決定し、この距離は様々であり得る (Macrae Iら、(2006), 「Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer」, Science 311 (5758): 195-8)。ダイサーは、アンチセンス鎖の3'末端から除去された21番目と22番目のヌクレオチドの間の部位およびセンス鎖の5'末端から除去された21番目と22番目のヌクレオチドの間の対応する部位に、2ヌクレオチドの3'オーバーハングを有するアンチセンス鎖を有する、本発明の特定の二本鎖核酸を切断すると予測される。dsRNAのこれらとは異なる予測されるおよび/または一般的なダイサー切断部位 (1つまたは複数) は当該技術分野で公知であるか、またはMacraeらに記載のものを含めた当該技術分野において認められている方法により同様に特定し得る。dsRNA (例えば、DsiRNA) のダイサー切断は、ダイサーにプロセッシングされたsiRNAの19~23ヌクレオチド長の長さを生じさせ得る。実際、以下でより詳細に記載されている本発明の一態様では、二本鎖DNA領域が、通常は好ましくない19mers siRNAの一般的なダイサー切り出しを指令するために、dsRNA内に含まれる。

30

40

【0229】

本明細書で使用される「オーバーハング」は、dsRNAの5'末端または3'末端の

50

いずれかに1、2、3、4または5個の遊離末端を有する二本鎖との関連において、不対ヌクレオチドを指す。特定の実施形態では、オーバーハングはアンチセンス鎖またはセンス鎖上の3'または5'オーバーハングである。

【0230】

本明細書で使用される「Dm i R N A」という用語は、Dm i R N A剤のアンチセンス（ガイド）鎖内、具体的には、R N A干渉剤として機能し、標的R N Aの配列とハイブリダイズすると考えられるアンチセンス鎖の領域内に、少なくとも1つのミスマッチヌクレオチドを有するダイサー基質s i R N A（「D s i R N A」）種を指す。このようなミスマッチヌクレオチドは、センス鎖（パッセンジャー）鎖に関して、Dm i R N Aのアンチセンス鎖がハイブリダイズすると考えられる標的R N A配列に関して、またはその両方に関して存在し得る。

10

【0231】

本明細書で使用される「R N Aプロセシング」という用語は、以下でより詳細に記載されているs i R N A、m i R N AまたはR NアーゼH経路の構成要素（例えば、D r o s h a、ダイサー、A r g o n a u t e 2またはその他のR I S Cエンドリボヌクレアーゼ、およびR NアーゼH）により行われるプロセシング活性を指す（以下の「R N Aプロセシング」の節を参照されたい）。この用語は、転写後プロセスのR N Aの5'キャップ形成および非R I S Cまたは非R NアーゼH仲介プロセスを介したR N A分解とは明確に区別される。このようなR N Aの「分解」は、いくつかの形態、例えば、脱アデニル化（3'ポリ（A）テールの除去）および／またはいくつかのエンドヌクレアーゼもしくはエキソヌクレアーゼ（例えば、R NアーゼI I I、R NアーゼP、R NアーゼT 1、R NアーゼA（1、2、3、4／5）、オリゴヌクレオチダーゼなど）のいずれかによるR N Aの一部または全体のヌクレアーゼ消化であり得る。

20

【0232】

「相同配列」は、遺伝子、遺伝子産物および／または非コードポリヌクレオチドのような1つ以上のポリヌクレオチドの配列で共通するヌクレオチド配列を意味する。例えば、相同配列は、関連するが異なるタンパク質をコードする2つ以上の遺伝子、例えば遺伝子ファミリーの異なるメンバー、異なるタンパク質エピトープ、異なるタンパク質アイソフォーム、またはサイトカインとその対応する受容体のような完全に異なる遺伝子などで共通するヌクレオチド配列であり得る。相同配列は、非コードD N AまたはR N A、調節配列、イントロンおよび転写制御または調節部位のような2つ以上の非コードポリヌクレオチドで共通するヌクレオチド配列であり得る。相同配列はまた、2つ以上のポリヌクレオチド配列に共通する保存配列領域も包含し得る。相同性は完全な相同性（例えば、100%）である必要はなく、部分的な相同配列も本発明により考慮される（例えば、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%など）。実際、本発明のD s i R N A剤の設計および使用は、本明細書に記載のD s i R N A剤と完全な相補性を有する対象とする標的R N Aに対するD s i R N A剤だけでなく、例えば、前記D s i R N A剤に対して99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%などだけ相補的な配列を有する対象とする標的R N Aに対するD s i R N A剤の使用の可能性も考慮する。同様に、本明細書に記載の本発明のD s i R N A剤は、前記D s i R N A剤と、例えば、特定の対立遺伝子変異体（例えば、治療目的を強化した対立遺伝子）の対象とする標的R N Aとの間の相補性の程度を増大させるために、当業者により容易に変化させ得ることが考慮される。実際、対象とする標的配列に対して挿入、欠失および単一点突然変異を有するD s i R N A剤配列も阻害に有用であり得る（おそらく、標的とする転写産物の破壊よりもマイクロR N A様の翻訳阻害を介して作用すると考えられる；したがって、このようなD s i R N A剤は「Dm i R N A」と呼ぶことができる）。あるいは、ヌクレオチド類似体置換または挿入を有するD s i R N A剤配列が阻害に有用であり得る。

30

40

50

【0233】

配列同一性は、当該技術分野で公知の配列比較およびアライメントアルゴリズムにより決定し得る。2つの核酸配列（または2つのアミノ酸配列）のパーセント相同性を決定するために、配列を最適比較の目的で整列させる（例えば、最適アライメントのために第一配列または第二配列中にギャップを導入し得る）。次いで、対応するヌクレオチド（またはアミノ酸）位置におけるヌクレオチド（またはアミノ酸残基）を比較する。第一配列中のある位置が第二配列中の対応する位置と同じ残基で占められていれば、その分子はその位置において同一である。2つの配列のパーセント同一性は、任意に導入ギャップ数および／または導入ギャップ長に対してペナルティスコアを加算した、配列に共通の同一位置数の関数である（すなわち、 $\% \text{同一性} = \text{同一位置数} / \text{位置の総数} \times 100$ ）。

10

【0234】

2つの配列間の配列比較およびパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。一実施形態では、十分な同一性を有する整列配列の特定部分に関してアライメントを作成するが、同一性の低い部分に関しては作成しない（すなわち、ローカルアライメント）。配列比較に使用されるローカルアライメントアルゴリズムの好ましい非限定的な例は、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77におけるように修正された、KarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムはAltschulら, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のBLASTプログラム（バージョン2.0）内に組み込まれている。

20

【0235】

別の実施形態では、適当なギャップを導入することによりアライメントを最適化し、整列配列の長さにわたってパーセント同一性を決定する（すなわち、ギャップアライメント）。比較目的でギャップアライメントを得るために、Altschulら, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載のようにGapped BLASTを用いることができる。別の実施形態では、適当なギャップを導入することによりアライメントを最適化し、整列配列の全長にわたってパーセント同一性を決定する（すなわち、グローバルアライメント）。配列の全域比較に使用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、MyersおよびMiller, CABIOS (1989)のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）内に組み込まれている。アミノ酸配列の比較のためにALIGNプログラムを用いる場合、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を使用することができる。

30

【0236】

DsiRNAアンチセンス鎖と対象RNA配列の一部との間で80%を超える配列同一性、例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性が好ましい。あるいは、DsiRNAは、対象とするRNAの一部とハイブリダイズすることができる（例えば、400mM NaCl、40mM PIPES pH6.4、1mM EDTA、50℃または70℃でのハイブリダイゼーションを12～16時間；次いで洗浄）ヌクレオチド配列（またはオリゴヌクレオチド配列）として機能的に定義され得る。さらなる好適なハイブリダイゼーション条件としては、1×SSC中70℃もしくは1×SSC中50℃、50%ホルムアミドでのハイブリダイゼーション、次いで0.3×SSC中70℃での洗浄、または4×SSC中70℃もしくは4×SSC中50℃、50%ホルムアミドでのハイブリダイゼーション、次いで1×SSC中67℃での洗浄が挙げられる。50塩基対未満の長さであると予想されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度（ T_m ）よりも5～10℃低くするべきであり、ここで T_m は、以下の方程式により決定され

40

50

る。18塩基対未満の長さのハイブリッドでは、 $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(A + T \text{ 塩基数}) + 4(G + C \text{ 塩基数})$ 。18～49塩基対の間の長さのハイブリッドでは、 $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - (600/N)$ であり、式中、Nはハイブリッド中の塩基数であり、 $[\text{Na}^+]$ はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオン濃度(1×SSCの $[\text{Na}^+] = 0.165\text{M}$)である。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのためのストリンジェンシー条件のさらなる例は、Sambrook, J., E. F. FritschおよびT. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 第9および11章、ならびにCurrent Protocols in Molecular Biology, 1995, F. M. Ausubelら編, John Wiley & Sons, Inc., 第2.10および6.3-6.4節に記載されている。同一ヌクレオチド配列の長さは、少なくとも約10、12、15、17、20、22、25、27または30塩基であり得る。

【0237】

「保存配列領域」は、ポリヌクレオチド中の1つ以上の領域のヌクレオチド配列が、世代間で、または1つの生物学的システム、被検体もしくは生物体と別の生物学的システム、被検体もしくは生物体とで有意に変化しないことを意味する。ポリヌクレオチドは、コードおよび非コードDNAおよびRNAを共に含み得る。

【0238】

「センス領域」は、DsiRNA分子のアンチセンス領域と相補性を有するDsiRNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、DsiRNA分子のセンス領域は、標的核酸配列と同一性を有する核酸配列を含み得る。

【0239】

「アンチセンス領域」は、標的核酸配列と相補性を有するDsiRNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、DsiRNA分子のアンチセンス領域は、DsiRNA分子のセンス領域と相補性を有する核酸配列を含む。

【0240】

本明細書で使用される「アンチセンス鎖」は、標的RNAの配列と相補的な配列を有する一本鎖核酸分子を指す。アンチセンス鎖が塩基類似体を有する修飾ヌクレオチドを含有する場合、それは必ずしもその全長にわたって相補的であるとは限らないが、少なくとも標的RNAとハイブリダイズしなければならない。

【0241】

本明細書で使用される「センス鎖」は、アンチセンス鎖の配列と相補的な配列を有する一本鎖核酸分子を指す。アンチセンス鎖が塩基類似体を有する修飾ヌクレオチドを含有する場合、センス鎖はアンチセンス鎖の全長にわたって相補的である必要はないが、少なくともアンチセンス鎖と二本鎖を形成しなければならない。

【0242】

本明細書で使用される「ガイド鎖」は、RNA干渉をもたらすために標的RNAの配列と十分に相補的な配列を有する、dsRNAまたはdsRNA含有分子の一本鎖核酸分子を指す。ダイサーによるdsRNAまたはdsRNA含有分子の切断後、ガイド鎖のフラグメントはRISCと会合したままであり、RISC複合体の構成要素として標的RNAと結合し、RISCによる標的RNAの切断を促進する。本明細書で使用されるガイド鎖は、必ずしも連続する一本鎖核酸を指すわけではなく、好ましくはダイサーにより切断される部位において、不連続性を有し得る。ガイド鎖はアンチセンス鎖である。

【0243】

本明細書で使用される「パッセンジャー鎖」は、ガイド鎖の配列と相補的な配列を有するdsRNAまたはdsRNA含有分子のオリゴヌクレオチド鎖を指す。本明細書で使用されるパッセンジャー鎖は、必ずしも連続する一本鎖核酸を指すわけではなく、好ましくはダイサーにより切断される部位において、不連続性を有し得る。パッセンジャー鎖はセ

ンス鎖である。

【0244】

「標的核酸」は、その発現、レベル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であり得る。発現レベルを、対象とする標的の上流エフェクターの標的化を介して標的化してもよく、または調節もしくは誤制御された標的の作用を、例えば、対象とする標的のシグナル伝達経路の下流の分子を標的化することにより調節してもよい。

【0245】

公知の通り、RNAi法は、多種多様な生物体における多種多様な遺伝子に適用可能であり、本開示の組成物および方法は、上記それぞれとの関連において使用することができる。本開示の組成物および方法により標的化し得る遺伝子の例としては、細胞または通常は細胞に天然ではない遺伝子に天然な遺伝子である内因性遺伝子が挙げられる。このような遺伝子としては、癌遺伝子、サイトカイン遺伝子、イディオタイプ (Id) タンパク質遺伝子、プリオン遺伝子、血管新生を誘導する分子を発現する遺伝子、接着分子、細胞表面受容体、転移関連タンパク質、プロテアーゼのための遺伝子、アポトーシス遺伝子、細胞周期制御遺伝子、EGFおよびEGF受容体を発現する遺伝子、MDR1遺伝子のような多剤耐性遺伝子が非限定的に挙げられる。

【0246】

より具体的には、本発明の標的mRNAは、細胞タンパク質（たとえば、核、細胞質、膜貫通または膜関連タンパク質）のアミノ酸配列を指定する。別の実施形態では、本発明の標的mRNAは、細胞外タンパク質（例えば、細胞外基質タンパク質または分泌タンパク質）のアミノ酸配列を指定する。本明細書で使用される、タンパク質の「アミノ酸配列を指定する」という語句は、mRNA配列が遺伝暗号の規則に従ってアミノ酸配列に翻訳されることを意味する。以下のタンパク質のクラスを例示の目的で列挙する：発生タンパク質（例えば、接着分子、サイクリンキナーゼインヒビター、Wntファミリーメンバー、Paxファミリーメンバー、Wingedヘリックスファミリーメンバー、Hoxファミリーメンバー、サイトカイン／リンホカインおよびそれらの受容体、成長／分化因子およびそれらの受容体、神経伝達物質およびそれらの受容体）；癌遺伝子にコードされるタンパク質（例えば、ABL1、BCL1、BCL2、BCL6、CBFA2、CBL、CSF1R、ERBA、ERBB、EBRB2、ETSI、ETSI、ETV6、FGR、FOS、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TALI、TCL3およびYES）；腫瘍抑制タンパク質（例えば、BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NFI、NF2、RBI、TP53およびWT1）；および酵素（例えば、ACCシンターゼおよびオキシダーゼ、ACPデサチュラーゼおよびヒドロキシラーゼ、ADP-グルコースピロホリラーゼ、ATPアーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アミラーゼ、アミログルコシダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、カルコンシンターゼ、キチナーゼ、シクロオキシゲナーゼ、デカルボキシラーゼ、デキストリナーゼ、DNAおよびRNAポリメラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコースオキシダーゼ、顆粒結合デンプンシンターゼ、GTPアーゼ、ヘリカーゼ、ヘミセルラーゼ、インテグラーゼ、イヌリナーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ラクターゼ、リパーゼ、リポキシゲナーゼ、リゾチーム、ノパリンシンターゼ、オクトピンシンターゼ、ペクチンエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、ホスホリラーゼ、フィターゼ、植物成長制御因子シンターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテイナーゼおよびペプチダーゼ、プラナーゼ、リコンビナーゼ、逆転写酵素、RUBISCO、トポイソメラーゼおよびキシラナーゼ）、ApoB100およびHPT1。

【0247】

一態様では、本発明の標的mRNA分子は、病的状態に関連するタンパク質のアミノ酸配列を指定する。例えば、タンパク質は、病原体関連タンパク質（例えば、宿主の免疫抑

10

20

30

40

50

制、病原体の複製、病原体の伝染または感染の維持に關与するウイルスタンパク質)、あるいは宿主内への病原体の侵入、病原体もしくは宿主による薬物代謝、病原体ゲノムの複製もしくは組込み、宿主内での感染の確立もしくは伝播または次世代の病原体組立てを促進する宿主タンパク質であり得る。病原体としては、RNAウイルス、例えばフラビウイルス、ピコルナウイルス、ラブドウイルス、フィロウイルス、レンチウイルスを含めたレトロウイルスなど、またはDNAウイルス、例えばアデノウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ヘパドナウイルスなどが挙げられる。さらなる病原体としては、細菌、真菌、蠕虫、住血吸虫およびトリパノソーマが挙げられる。その他の種類の病原体としては、哺乳動物転移因子を挙げ得る。あるいは、タンパク質は腫瘍関連タンパク質または自己免疫性疾患関連タンパク質であり得る。

10

【0248】

標的遺伝子は、任意の生物体に由来するか、またはそれに含有され得る。生物体は、植物、動物、原生動物、細菌、ウイルスまたは真菌であり得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,506,559号を参照されたい。

【0249】

本発明の一実施形態では、本発明のDsiRNA分子の各配列は、独立して約25～約35ヌクレオチドの長さであり、特定の実施形態では、約25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35ヌクレオチドの長さである。別の実施形態では、本発明のDsiRNA二本鎖は、独立して約25～約30塩基対(例えば、約25、26、27、28、29または30塩基対)を含む。別の実施形態では、本発明のDsiRNA分子の1つ以上の鎖は独立して、対象とする標的核酸分子に相補的な約19～約35個のヌクレオチド(例えば、約19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35個)を含む。本発明の典型的なDsiRNA分子を図1および以下に示す。

20

【0250】

本明細書で使用される「細胞」は、その通常の生物学的意味で使用され、多細胞生物全体を指すものではなく、例えば、特にヒトを指すものではない。細胞は、生物体、例えば、鳥類、植物および哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ヒツジ、類人猿、サル、ブタ、イヌおよびネコなどの中に存在し得る。細胞は原核(例えば、細菌細胞)または真核(例えば、哺乳動物または植物細胞)であり得る。細胞は、体細胞または生殖系列起源、全能性または多能性、分裂または非分裂であり得る。細胞はまた、配偶子もしくは胚、幹細胞または完全に分化した細胞に由来し得るか、またはそれらを含み得る。特定の態様においては、「細胞」という用語は、特に、本開示の1つ以上の単離dsRNA分子を含有する、ヒト細胞のような哺乳動物細胞を指す。特定の態様では、細胞は、標的核酸のRNA干渉を生じるdsRNAまたはdsRNA含有分子を有し、かつRNAiに必要なタンパク質およびタンパク質複合体、例えば、ダイサーおよびRISCを含有する。

30

【0251】

本発明のDsiRNA分子は直接加えるか、または陽イオン性脂質と複合体を形成するか、リポソーム内にパッケージするか、他の方法で標的細胞もしくは組織まで送達し得る。核酸または核酸複合体は、それらをバイオポリマー中に組み込むか、または組み込まずに、エキソビボで、または直接的な真皮適用、経皮適用または注射によりインビボで関連する組織へ局所的に投与し得る。本発明の特定の態様では、図1に示される典型的なdsRNA一ペプチド構造のdsRNAは、DsiRNA剤の修飾様式の以下の記載に従って修飾し得る。図1に記載の構築物の化学的修飾形態および以下の典型的構造は、本明細書に記載のDsiRNA剤に関して記載されているあらゆる使用において使用し得る。

40

【0252】

別の態様では、本発明は、本発明の1つ以上のDsiRNA分子を含有する哺乳動物細胞を提供する。1つ以上のDsiRNA分子は、独立して同じまたは異なる部位に標的化し得る。

【0253】

50

「RNA」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」は、 β -D-リボフラノース部分の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離RNA、例えば部分精製RNA、実質的に純粋なRNA、合成RNA、組換え生成RNA、ならびに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／または改変による、天然RNAとは異なる改変RNAなどを包含する。このような改変は、DsRNAの末端（1つまたは複数）への、または例えば、RNAの1つ以上のヌクレオチドの内側での非ヌクレオチド物質の付加を含み得る。本発明のRNA分子のヌクレオチドはまた、非天然ヌクレオチドまたは化学合成ヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドのような非標準ヌクレオチドも含み得る。これらの改変RNAは、類似体または天然RNAの類似体と呼ばれ得る。

10

【0254】

「被検体」は、外植細胞のドナーもしくはレシピエントである生物体またはその細胞自体を意味する。「被検体」はまた、本発明のDsRNA剤を投与され得る生物体も指す。被検体は、ヒトまたはヒト細胞を含めた、哺乳動物または哺乳動物細胞であり得る。

【0255】

「薬学的に許容される担体」という語句は、治療剤投与のための担体を指す。典型的な担体としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組合せが挙げられる。経口投与される薬物に関して、薬学的に許容される担体としては、薬学的に許容される添加剤、例えば不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、甘味剤、着色剤、着色剤および保存剤などが挙げられるが、これらに限定されない。適切な不活性希釈剤としては、炭酸ナトリウムおよびカルシウム、リン酸ナトリウムおよびカルシウム、ならびにラクトースが挙げられ、コーンスターチおよびアルギン酸は適切な崩壊剤である。結合剤としては、デンプンおよびゼラチンを挙げ得る一方、潤滑剤は、もし存在すれば、一般的に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ろう。必要に応じて、錠剤をモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルのような物質でコーティングして、消化管での吸収を遅延させ得る。本開示のdsRNA組成物の薬学的に許容される担体は、ミセル構造体、例えばリポソーム、キャプシド、キャプソイド、ポリマーナノカプセルまたはポリーマイクロカプセルなどであり得る。

20

【0256】

ポリマーナノカプセルまたはマイクログラブルは、カプセル化または結合dsRNAの細胞内への輸送または放出を促進する。これらには、特にポリブチルシアノアクリレートを含めた、ポリマーおよびモノマー材料が含まれる。材料および製造法の要約が公開されている（Kreuter, 1991を参照されたい）。重合／ナノ粒子生成段階においてモノマーおよび／またはオリゴマー前駆体から形成されるポリマー材料は、それ自体が従来技術から知られるものであり、ナノ粒子製造分野の当業者が通常の技術に従って適切に選択し得るポリマー材料の分子量および分子量分布も同様に知られる。

30

【0257】

本発明の様々な方法が、値、レベル、特徴、特質、特性などを、本明細書において互換的に「適当な対照」と呼ばれる「適切な対照」と比較することを含む段階を含む。「適切な対照」または「適当な対照」は、比較目的に有用な当業者に公知の任意の対照または基準である。一実施形態では、「適切な対照」または「適当な対照」は、本明細書に記載のようにRNAi法を行う前に決定される値、レベル、特徴、特質、特性などである。例えば、転写速度、mRNAレベル、翻訳速度、タンパク質レベル、生物学的活性、細胞の特質または特性、遺伝子型、表現型などを、本発明のRNAサイレンシング剤（例えば、DsRNA）を細胞または生物体内に導入する前に決定し得る。別の実施形態では、「適切な対照」または「適当な対照」は、細胞または生物体、例えば正常な形質を示す、例えば対照または正常の細胞または生物体において決定される値、レベル、特徴、特質、特性などである。さらに別の実施形態では、「適切な対照」または「適当な対照」は、所定の値、レベル、特徴、特質、特性などである。

40

50

【0258】

「インビトロ」という用語は、例えば、精製試薬または抽出物、例えば細胞抽出物を含めた、当該技術分野において認められているその意味を有する。「インビトロ」という用語はまた、例えば、生細胞、例えば不死化細胞、初代細胞、細胞系および／または生体内の細胞を含めた、当該技術分野において認められているその意味も有する。

【0259】

本明細書で使用される「治療（処置）」または「治療（処置）すること」は、疾患もしくは障害または疾患もしくは障害の症状を治す、治癒させる、軽減する、緩和する、変化させる、矯正する、改善する、向上させるまたはそれらに影響を与える目的で、障害を有する患者に治療剤（例えば、D s i R N A 剤またはそれをコードするベクターもしくは導入遺伝子）を投与または適用すること、あるいは障害を有する患者由来の単離組織または細胞系に治療剤を適用または投与することと定義される。「治療（処置）」または「治療（処置）すること」という用語はまた、本明細書では予防的な薬剤投与との関連においても使用される。「有効量」または「有効投与量」という用語は、所望の効果を達成する、または少なくとも部分的に達成するのに十分な量と定義される。「治療有効量」という用語は、既に疾患に罹患している患者における疾患およびその合併症を治す、または少なくとも部分的に阻止するのに十分な量と定義される。「患者」という用語は、予防的または治療的処置のいずれかを受けるヒトおよびその他の哺乳動物被検体を包含する。

【0260】

d s R N A -ペプチドの設計／合成

25～約35ヌクレオチド（D s i R N A）、および特に25～約30ヌクレオチドの比較的長いd s R N A種が、意外にも効力および作用持続時間の点で、19～23 m e r s i R N A 剤と比べて効果的な結果を生じることが実験的に見出された。d s R N A プロセシング機序の基礎理論に拘束されることを望むものではないが、比較的長いd s R N A 種は、細胞の細胞質中においてダイサー酵素の基質として働くと考えられる。本発明のd s R N A をより短いセグメントに切断することに加え、ダイサーは、切断されたd s R N A に由来する一本鎖切断産物の、対象とする標的R N A の破壊に関与するR I S C 複合体体内への取込みを促進すると考えられる。ダイサーによるd s R N A 種（特にD s i R N A 剤）の切断性は、d s R N A 種の効力および作用持続時間の増加と対応していることが、先行研究（R o s s i ら、米国特許出願公開第2007／0265220号）により示されている。

【0261】

本発明は、第一鎖と第二鎖とを含む二本鎖R N A を含むd s R N A であって、第一鎖および第二鎖が、少なくとも16ヌクレオチド長かつ最大で50ヌクレオチド長（例えば、16～50、19～35、19～24、25～30、25、35、19～23および21～23ヌクレオチド長）の長さであるd s R N A を包含する。

【0262】

A. d s R N A

D s i R N A を含めたd s R N A の設計は、数多くの可能なD s i R N A 剤の予測される活性／有効性のコンピュータによる評価をある配列領域にわたり行う、予測スコアリングアルゴリズムの使用を任意に含み得る。このようなスコアリングアルゴリズムの設計に関する情報は、例えば、G o n g ら（B M C B i o i n f o r m a t i c s 2006, 7:516）に見出すことができるが、より最近の「v3」アルゴリズムは、当該技術分野においてこれまで利用可能であったs i R N A スコアリングアルゴリズムに比べて理論的に向上したアルゴリズムである。（「v3」スコアリングアルゴリズムは、ヒト配列におけるいかなるバイアスにも依らない機械学習アルゴリズムである。さらに、「v3」アルゴリズムは、G o n g らに記載のような旧型「v2」が導出を行うデータセットよりも約3倍大きなデータセットから導出を行う。）

【0263】

本発明のD s i R N A 剤の第一および第二のオリゴヌクレオチドは、完全に相補的であ

る必要はない。実際、一実施形態では、センス鎖の3'末端は1つ以上のミスマッチを含有する。一態様では、約2つのミスマッチがセンス鎖の3'末端において組み込まれている。別の実施形態では、本発明のdsRNAは、それぞれが27ヌクレオチドの長さであり、かつ互いにアニールすれば、センス鎖の3'末端（アンチセンス鎖の5'末端）上に平滑末端および2ヌクレオチドミスマッチを有する2つのRNAオリゴヌクレオチドを含有する、二本鎖RNA分子である。ミスマッチの使用または低下した熱力学的安定性（特に、3'センス/5'アンチセンス位置において）が、おそらくsiRNAのRISC内への移行と共に生じるいくつかの律速的な巻戻し段階に影響を与えることにより、アンチセンス鎖のRISC内への移行を促進する、または移行を有利にすることが提唱されている（Schwarzら、2003、Cell 115:199-208；Khvorovovaら、2003、Cell 115:209-216）。したがって、活性な21mer siRNA二本鎖の選択のために、末端塩基組成物が設計アルゴリズムに含まれてきた（Ui-Teiら、2004、Nucleic Acids Res 32:936-948；Reynoldsら、2004、Nat Biotechnol 22:326-330）。この実施形態のdsRNAのダイサー切断により、ミスマッチを含有する小さな終末端配列は、アンチセンス鎖と不對のままにされる（3'-オーバーハングの一部となる）か、または最終的な21mer siRNAから完全に切断されるかのいずれかとなる。したがって、これらの「ミスマッチ」は、RISCの最終的なRNA成分においてミスマッチとして存続しない。ダイサー基質のセンス鎖の3'末端における塩基ミスマッチまたはセグメントの不安定化は、おそらくダイサーによるプロセッシングを促進することにより、RNAiにおける合成二本鎖の効力を向上させたという発見は、25~30mer dsRNA（本明細書では「dsRNA」とも呼ばれる）の設計および使用について記載している過去の研究の驚くべき発見であった（Rossiら、米国特許出願公開第2005/0277610号、第2005/0244858号および第2007/0265220号）。

【0264】

B. ペプチド

本発明は、ペプチドとコンジュゲートされた本発明のdsRNAを含む組成物を提供する。

【0265】

送達ペプチド

特定の実施形態では、対象とするペプチドは、上で定義されるような送達ペプチドである。

【0266】

本発明による有用な送達ペプチド配列

本発明による有用な送達ペプチドは、非コンジュゲートdsRNAと比べて、dsRNAの作用発現、送達されたdsRNAによる作用持続時間または本発明のdsRNAの送達速度の少なくとも1つを増大させる。本発明のペプチドは、本明細書で定義されるように、非コンジュゲートdsRNAと比べて、対象とするdsRNAが標的RNAに到達するまでの遅延時間が減少するように作用発現を減少させる。本発明による有用な送達ペプチドは、本明細書で定義されるように、非コンジュゲートdsRNAと比べて、dsRNA-ペプチドコンジュゲートが標的RNAを長時間阻害するように作用持続時間を増加させる。本発明による有用な送達ペプチドは、本明細書で定義されるように、dsRNA-ペプチドコンジュゲートが非コンジュゲートdsRNAよりも速く標的RNAに到達するようにdsRNAの送達速度を増大させる。

【0267】

本発明に従えば、送達ペプチドのアミノ酸配列が決定され、送達されるdsRNAに対して最適化される。本発明による送達ペプチドに有用なペプチド配列を本明細書に記載する。

【0268】

一実施形態では、本発明による送達ペプチドは、プロリン残基、例えば、 $x_1 - P - x_2 - P - x_3$ の配列を含み、式中、 x_1 および x_3 は任意のアミノ酸または2～50個のアミノ酸を含むペプチドセグメントであり、 x_2 は0もしくは1個のアミノ酸または2～20個のアミノ酸を含むペプチドセグメントである。別の実施形態では、 $x_1 = 5$ 個のアミノ酸残基を含むペプチド； $x_2 = 7$ 個のアミノ酸残基を含むペプチドおよび $x_3 = 4$ 個のアミノ酸残基を含むペプチドである。別の実施形態では、 $x_1 = 8$ 個のアミノ酸残基を含むペプチド； $x_2 = 7$ 個のアミノ酸残基を含むペプチドおよび $x_3 = 4$ 個のアミノ酸残基を含むペプチドである。さらに別の実施形態では、 $x_1 = 8$ 個のアミノ酸残基を含むペプチド； $x_2 = 8$ 個のアミノ酸残基を含むペプチドおよび $x_3 = 4$ 個のアミノ酸残基を含むペプチドである（Deberら，Arch Biochem Biophys. 1986；251（1）：68－76；およびDuら，J Pept Res. 1998；51（3）：235－43.）。

10

【0269】

本発明に有用な送達ペプチド配列は以下のもの：

VRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL（配列番号1）

VRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL（配列番号2）

KSVKAPGI（配列番号3）

HKAIDGRSLYNKTLTD（配列番号4）

LRLTKNSRDDST（配列番号5）

KNIVSVKGIRKSI（配列番号6）

20

KSVIPRKGTKAPPRLL（配列番号7）

KPVMYKNTGKSEQ（配列番号8）

EFVMNPANAQGHTPGTRL（配列番号9）

EFVMNPANAQGH TAGTRL（配列番号10）

EFVMNAANAQGHTPGTRL（配列番号11）

EFVMNPANAQGRHTPGTRL（配列番号12）

NPKEFVMNPANAQGHTPGTRL（配列番号13）

NPKEFVMNPANAQGRHTPGTRL（配列番号14）

KKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGEL（配列番号15）

CVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL（配列番号16）

30

CVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL（配列番号17）

CKSVKAPGI（配列番号18）

CHKAIDGRSLYNKTLTD（配列番号19）

CLRLTKNSRDDST（配列番号20）

CKNIVSVKGIRKSI（配列番号21）

CKSVIPRKGTKAPPRLL（配列番号22）

CKPVMYKNTGKSEQ（配列番号23）

CEFVMNPANAQGHTPGTRL（配列番号24）

CEFVMNPANAQGH TAGTRL（配列番号25）

CEFVMNAANAQGHTPGTRL（配列番号26）

40

CEFVMNPANAQGRHTPGTRL（配列番号27）

CNPKEFVMNPANAQGHTPGTRL（配列番号28）

CNPKEFVMNPANAQGRHTPGTRL（配列番号29）

CKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGEL（配列番号30）

GVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL（配列番号31）

GVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL（配列番号32）

GKSVKAPGI（配列番号33）

GHKAIDGRSLYNKTLTD（配列番号34）

GLRLTKNSRDDST（配列番号35）

GKNIVSVKGIRKSI（配列番号36）

50

GKSVIPRKGTKAPPRL (配列番号37)	
GKPVMYKNTGKSEQ (配列番号38)	
GEFVMNPANAQGHTPGTRL (配列番号39)	
GEFVMNPANAQGH TAGTRL (配列番号40)	
GEFVMNAANAQGHTPGTRL (配列番号41)	
GEFVMNPANAQGRHTPGTRL (配列番号42)	
GNPKEFVMNPANAQGHTPGTRL (配列番号43)	
GNPKEFVMNPANAQGRHTPGTRL (配列番号44)	
GKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLG GEL (配列番号45)	
VRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLC (配列番号46)	10
VRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDLC (配列番号47)	
KSVKAPGIC (配列番号48)	
HKAIDGRSLYNKTLDC (配列番号49)	
LRLTKNSRDDSTC (配列番号50)	
KNIVSVKGIRKSIC (配列番号51)	
KSVIPRKGTKAPPRLC (配列番号52)	
KPVMYKNTGKSEQC (配列番号53)	
EFVMNPANAQGHTPGTRLC (配列番号54)	
EFVMNPANAQGH TAGTRLC (配列番号55)	
EFVMNAANAQGHTPGTRLC (配列番号56)	20
EFVMNPANAQGRHTPGTRLC (配列番号57)	
NPKEFVMNPANAQGHTPGTRLC (配列番号58)	
NPKEFVMNPANAQGRHTPGTRLC (配列番号59)	
KKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLG GELC (配列番号60)	
KSVKAPGIGGKSVKAPGI (配列番号61)	
KSVKAPGIGGKSVKAPGIGGKSVKAPGI (配列番号62)	
KSVKAPGIGG(KSVKAPGI) ₂ (配列番号63)	
CKSVKAPGIGGKSVKAPGI (配列番号64)	
CKSVKAPGIGGKSVKAPGIGGKSVKAPGI (配列番号65)	
GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG (配列番号66)	30
CGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG (配列番号67)	
GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGC (配列番号68)	
GRGDGG (配列番号69)	
CRGDGG (配列番号70)	
GRGDGC (配列番号71)	
THALWHT (配列番号72)	
GTHALWHT (配列番号73)	
THALWHTG (配列番号74)	
CTHALWHT (配列番号75)	
THALWHTC (配列番号76)	40
QPFMQCLCLIYDASC (配列番号77)	
GQPFMQCLCLIYDASC (配列番号78)	
QPFMQCLCLIYDASC G (配列番号79)	
RNVPPPIFNDVYWIAF (配列番号80)	
GRNVPPPIFNDVYWIAF (配列番号81)	
RNVPPPIFNDVYWIAFG (配列番号82)	
CRNVPPPIFNDVYWIAF (配列番号83)	
RNVPPPIFNDVYWIAFC (配列番号84)	
VFRVRPWYQSTSQS (配列番号85)	
GVFRVRPWYQSTSQS (配列番号86)	50

VFRVRPWYQSTSQSG (配列番号87)

CVFRVRPWYQSTSQS (配列番号88)

VFRVRPWYQSTSQSC (配列番号89)

GEFVMNAANAQGHTAGTRL (配列番号149)

TQIENLKEKG (配列番号150)

H2N-c[D(Cys-Ser-Lys-Cys)]Gly-Peg12-Lys (配列番号151)

H2N-c[Cys-Phe-Thr-Lys-D-Trp-Phe-Phe-Cys]-Peg12-Lys (配列番号152)

H2N-Thr-Phe-Thr-Lys-D-Trp-Phe-Phe-D-Phe- Peg12-Lys (配列番号153)

またはこれらの一部分が挙げられるが、これらに限定されない。

【0270】

10

標的化ペプチド

他の実施形態では、対象とするペプチドは、上で定義されるような標的化ペプチドである。

【0271】

本発明に従って、標的化ペプチドのアミノ酸配列を決定し、送達のためのペプチドとコンジュゲートされた dsRNA に対して最適化する。本発明による標的化ペプチドに有用なペプチド配列を本明細書に記載する。

【0272】

各リガンドファミリーには、異なるペプチド配列パターンが適切である。一実施形態では、本発明による LDL-受容体の標的化に有用なペプチドは、 $x_1-F-x_2-YGG-x_3$ の配列を含有してもよく、式中、 x_1 および x_3 は任意のアミノ酸または 2~40 個のアミノ酸を含有するペプチドセグメントであり、 x_2 は任意のアミノ酸である。(Hussain, Strickland および Bakillah, Annu Rev Nutr. 1999; 19: 141-172. Hussain, Front Biosci. 2001; 6: D417-D428)。

20

【0273】

本発明による有用な標的化ペプチド

本発明による有用な標的化ペプチドとしては、以下のリガンドのいずれかに由来のアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない：

1. 副甲状腺ホルモン (PTH) および PTH-関連タンパク質

30

P01270; PTHY__HUMAN

P22858; PTHR__MOUSE

Q811S6; Q811S6__MOUSE

P01270; PTHY__HUMAN

MIPAKDMAKV MIVMLAICFL TKSDGKSVKK RSVSEIQLMH NLGKHLNSME RVEWLRKKLQ DVHNFVALGA

PLAPRDAGSQ RPRKKEDNVL VESHEKSLGE ADKADVNVLT KAKSQ (配列番号90)

2. 甲状腺刺激ホルモン (TSH)

P01222; TSHB__HUMAN

40

P12656; TSHB__MOUSE

P01222; TSHB__HUMAN

MTALFLMSML FGLACGQAMS FCIPTEYTMH IERRECAVCL TINTTICAGY CMTRDINGKL FLPKYALSQD

VCTYRDFIYR TVEIPGCPLH VAPYFSYPVA LSCKCGKCNT DYSDCIHEAI KTNVCTKPQK SYLVGFSV (配列番号91)

3. TSH 放出ホルモン

B2R8R1; B2R8R1__HUMAN

50

B 2 R 8 R 1 ; B 2 R 8 R 1 _ _ H U M A N

MPGPWLLLAL ALTNLNTGVP GGRAQPEAAQ QEAVTAAEHP GLDDFLRQVE RLLFLRENIQ RLQGDQGEHS
ASQIFQSDWL SKRQHPGKRE EEEEEGVEEE EEEEGGAVGP HKRQHPGRRE DEASWSVDVT QHKRQHPGRR
SPWLAYAVPK RQHPGRRLLAD PKAQRSWEEE EEEEEEREEDL MPEKRQHPGK RALGGPCGPQ GAYGQAGLLL
GLDDLSRSQ GAEEKRQHPG RRAAWVREPL EE (配列番号92)

4. F S H / L H 放出ホルモン

P 0 1 1 4 8 ; G O N 1 _ _ H U M A N

O 4 3 5 5 5 ; G O N 2 _ _ H U M A N

P 1 3 5 6 2 ; G O N 1 _ _ M O U S E

10

P 0 1 1 4 8 ; G O N 1 _ _ H U M A N

MKPIQKLLAG LILLTWCVEG CSSQHSYGL RPPGKRDAEN LIDSFQEIVK EVGQLAETQR FECTTHQPRS
PLRDLKGALE SLIEEETGQK KI (配列番号93)

O 4 3 5 5 5 ; G O N 2 _ _ H U M A N

MASSRRGLLL LLLTAHLGP SEAQHSWGW YPGGKRALSS AQDPQNALRP PGRALDTAAG SPVQTAHGLP
SDALAPLDDS MPWEGRTTAQ WSLHRKRHLA RTLLTAAREP RPAPPSSNKV (配列番号94)

5. 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (C R H)

20

P 0 6 8 5 0 ; C R F _ _ H U M A N

Q 8 C I T 0 ; C R F _ _ M O U S E

P 0 6 8 5 0 ; C R F _ _ H U M A N

MRLPLLVSAG VLLVALLPCP PCRALLSRGP VPGARQAPQH PQPLDFFQPP PQSEQPQQPQ ARPVLLRMGE
EYFLRLGNLN KSPAAPLSPA SLLAGSGS RPSPEQATAN FFRVLLQQLL LPRSLDSPA ALAERGARNA
LGGHQAEPER ERRSEPPIS LDLTFFHLLRE VLEMARAEQL AQQAHSNRKL MEIIGK (配列番号95)

6. 副腎皮質刺激ホルモン (A C T H)

30

P 0 1 1 8 9 ; C O L I _ _ H U M A N

P 0 1 1 9 3 ; C O L I _ _ M O U S E

P 0 1 1 8 9 ; C O L I _ _ H U M A N

MPRSCCSRSG ALLLALLLQA SMEVRGWCLE SSQCQDLTTE SNLLECIRAC KPDLSAETPM FPGNGDEQPL
TENPRKYVMG HFRWDRFGRN NSSSSGSSGA GQKREDVSAG EDCGPLPEGG PEPRSDGAKP GPREGKRSYS
MEHFRWGKPV GKRRPVKVY PNGAEDESAE AFPLEFKREL TGQRLREGDG PDGPADDGAG AQADLEHSL
VAAEKKDEGP YRMEHFRWGS PPKDKRYGGF MTSEKSQTPL VTLFKNALIK NAYKKGE (配列番号96)

7. プロテイナーゼ活性化受容体 (P A R) リガンドおよびトロンビン受容体アゴニスト

40

P 0 0 7 3 4 ; T H R B _ _ H U M A N

P 1 9 2 2 1 ; T H R B _ _ M O U S E

P 0 0 7 3 4 ; T H R B _ _ H U M A N

MAHVRGLQLP GCLALALCS LVHSQHVFLL PQQARSLLQR VRRANTFLEE VRKGNLEREC VEETCSYEEA
FEALESSTAT DVFWAKYTAC ETARTPRDKL AACLEGNAE GLGTNYRGHV NITRSGIECQ LWRSRYPHKP
EINSTTHPGA DLQENFCRNP DSSTTGPPCY TTDPTVRRQE CSIPVCGQDQ VTVAMTPRSE GSSVNLSPPL
EQCVPRDGGQ YQGRLLAVTTH GLPCLAWASA QAKALSKHQD FNSAVQLVEN FCRNPDGDEE GVWCYVAGKP
GDFGYCDLNY CEEAVEEETG DGLDESDRA IEGRTATSEY QTFFNPRTFG SGEADCGLRP LFEKKSLEDK
TERELLESYI DGRIVEGSDA EIGMSPWQVM LFRKSPQELL CGASLISDRW VLTAAHCLLY PPWDKNFTEN
DLLVRIGKHS RTRYERNIEK ISMLEKIYIH PRYNWRENLD RDIALMKLKK PVAFSDYIHP VCLPDRETAA

50

SLLQAGYKGR VTGWGNLKET WTANVGKGQP SVLQVVNLPI VERPVCKDST RIRITDNMFC AGYKPDEGKR
GDACEGDSGG PFVMKSPFNN RWYQMGIVSW GEGCDRDGKY GFYTHVFRLK KWIQKVIDQF GE (配列番号97)
)

8. 補体受容体リガンド

P 0 1 0 2 4 ; C O 3 _ H U M A N

P 0 1 0 2 7 ; C O 3 _ M O U S E

P 0 1 0 2 4 ; C O 3 _ H U M A N

MGPTSGPSLL	LLLLTHLPLA	LGSPMYSIIT	PNILRLESEE	TMVLEAHDAQ	GDVPVTVTVH	DFPGKKLVLS	10
SEKTVLTPAT	NHMGNTFTI	PANREFKSEK	GRNKFVTVQA	TFGTQVVEKV	VLVSLQSGYL	FIQTDKTIYT	
PGSTVLYRIF	TVNHKLLPVG	RTVMVNIENP	EGIPVKQDSL	SSQNQLGVLP	LSWDIPELVN	MGQWKIRAYY	
ENSPQQVFST	EFEVKEYVLP	SFEVIVEPTE	KFYIYNEKG	LEVTTITARFL	YGKKVEGTAF	VIFGIQDGEQ	
RISLPESLKR	IPIEDGSGEV	VLSRKVLLDG	VQNPRADLV	GKSLYVSATV	ILHSGSDMVQ	AERSGIPIVT	
SPYQIHFTKT	PKYFKPGMPF	DLMVFVTNPD	GSPAYRVPVA	VQGEDTVQSL	TQGDGVAKLS	INTHPSQKPL	
SITVRTKKQE	LSEAEQATRT	MQALPYSTVG	NSNNYLHLSV	LRTELRPGET	LNVNFLLRMD	RAHEAKIRYY	
TYLIMNKGRL	LKAGRQVREP	GQDLVVLPLS	ITTDIFPSFR	LVAYYTLIGA	SGQREVADS	VWVDVKDSCV	
GSLVVKSGQS	EDRQPVPGQQ	MTLKIEGDHG	ARVVLVAVDK	GVFVLNKKNK	LTQSKIWDVV	EKADIGCTPG	
SGKDYAGVFS	DAGLTFTSSS	GQQTAAQRAEL	QCPQPAARRR	RSVQLTEKRM	DKVGKYPKEL	RKCCEDGMRE	
NPMRFSCQRR	TRFISLGEAC	KKVFLDCCNY	ITELRRQHAR	ASHLGLARSN	LDEDIAEEN	IVSRSEFPES	20
WLWNVEDLKE	PPKNGISTKL	MNIFLKDSIT	TWEILAVSMS	DKKGICVADP	FEVTVMQDFF	IDLRLPYSVV	
RNEQVEIRAV	LYNYRQNQEL	KVRVELLHNP	AFCSLATTKR	RHQQTVTIPP	KSSLSPYVI	VPLKTGLQEV	
EVKAAVYHHF	ISDGVKSLK	VVPEGIRMNK	TVAVRTLDP	RLGREGVQKE	DIPPADLSDQ	VPDTESETRI	
LLQGTPVAM	TEDAUDAERL	KHLIVTPSGC	GEQNMIGMTP	TVIAVHYLDE	TEQWEKFGLE	KRQGALELIK	
KGYTQQLAFR	QPSSAAFAFV	KRAPSTWLTA	YVVKVFLAV	NLIAIDSQVL	CGAVKWLILE	KQKPDGVFQE	
DAPVIHQEMI	GGLRNNNEKD	MALTAFLVIS	LQEAKDICEE	QVNSLPGSIT	KAGDFLEANY	MNLQRSYTVA	
IAGYALAQM	RLKGPLLKNF	LTTAKDKNRW	EDPGKQLYNV	EATSYALLAL	LQLKDFDFVP	PVVRWLNEQR	
YGGGYGSTQ	ATFMVFQALA	QYQKDAPDHQ	ELNLDVSLQL	PSRSSKITHR	IHWESASLLR	SEETKENEGF	
TVTAEGKGQG	TLSVVTMYHA	KAKDQLTCNK	FDLKVTKIPA	PETEKRPQDA	KNTMILEICT	RYRGDQDATM	
SILDISMMTG	FAPDDDLKQ	LANGVDYRIS	KYELDKAFSD	RNTLIYILDK	VSHSEDDCLA	FKVHQYFNVE	30
LIQPGAVKVY	AYYNLEESCT	RFYHPEKEDG	KLNLKCRDEL	CRCAEENCFI	QKSDDKVTLE	ERLDKACEPG	
VDYVYKTRLV	KVQLSNDFDE	YIMAIEQTIK	SGSDEVQVGQ	QRTFISPIKC	REALKLEEKK	HYLMWGLSSD	
FWGEKPNLSY	IIGKDTWVEH	WPEEDECQDE	ENQKQCQDLG	AFTESMVVFG	CPN (配列番号98)		

P 0 C 0 L 5 ; C O 4 B _ H U M A N

MRLWGLIWA	SSFTLSLQK	PRLLLFSPSV	VHLGVPLSVG	VQLQDVPRGQ	VVKGSVFLRN	PSRNNVPCSP	
KVDFTLSSER	DFALLSLQVP	LKDAKSCGLH	QLLRGPEVQL	VAHSPWLKDS	LSRTTNIQGI	NLLFSSRRGH	
LFLQTDQPIY	NPGQVRVRYR	FALDQKMRPS	TDTITVMVEN	SHGLRVRKKE	VYMPSSIFQD	DFVIPDISEP	
GTWKISARFS	DGLESNSSTQ	FEVKKYVLPN	FEVKITPGKP	YILTVPGHLD	EMQLDIQARY	IYGKPVQGVA	
YVRFGLLED	GKKTFFRGLE	SQTKLVNGQS	HISLSKAEFQ	DALEKLNMG	TDLQGLRLYV	AAAIIESPGG	40
EMEEAELTSW	YFVSSPFLD	LSKTKRHLVP	GAPFLLQALV	REMSGSPASG	IPVKVSATVS	SPGSVPEVQD	
IQQNTDGSQ	VSIPIIIPQT	ISELQLSVSA	GSPHPAIARL	TVAAPPSSGGP	GFLSIERPDS	RPPRVGDTLN	
LNLRAVGSGA	TFSHYYYMIL	SRGQIVFMNR	EPKRTLTSVS	VFVDHHLAPS	FYFVAFYYHG	DHPVANSLRV	
DVQAGACEGK	LELSVDGAKQ	YRNGESVKLH	LETDSLALVA	LGALDTALYA	AGSKSHKPLN	MGKVFAMNS	
YDLGCGPGGG	DSALQVFQAA	GLAFSDGDQW	TLSRKRLSCP	KEKTTRKKRN	VNFQKAINNEK	LGQYASPTAK	
RCCQDGVTRL	PMMRSCEQRA	ARVQQPDCRE	PFLSCCQFAE	SLRKKSRDKG	QAGLQRALEI	LQEEDLIDED	
DIPVRSFFPE	NWLWRVETVD	RFQILTLWLP	DSLTTWEIHG	LSLSKTKGLC	VATPVQLRVF	REFHLHLRLP	
MSVRRFEQLE	LRPVLYNYLD	KNLTVSVHVS	PVEGLCLAGG	GGLAQQVLVP	AGSARPVAFS	VVPTAAAVS	
LKVVARGSFE	FPVGDAVSKV	LQIEKEGAIH	REELVYELNP	LDHRGRTLEI	PGNSDPNMIP	DGDFNSYVRV	
TASDPLDTLG	SEGALSPGGV	ASLLRLPRGC	GEQTMIIYLP	TLAASRYLDK	TEQWSTLPPE	TKDHAVDLIQ	50

KGYMRIQQFR KADGSYAAWL SRDSSTWLTA FVLKVLSLAQ EQVGGSPPEKL QETSNWLLSQ QQADGSFQDL
 SPVIHRSMQG GLVGNDQETVA LTAFVTIALH HGLAVFQDEG AEPLKQORVEA SISKANSFLG EKASAGLLGA
 HAAAITAYAL SLTKAPVDLL GVAHNNLMAM AQETGDNLYW GSVTGSQSNA VSPTPAPRNP SDPMPQAPAL
 WIETTAYALL HLLLHEGKAE MADQASAWLT RQGSFQGGFR STQDQTVIALD ALSAYWIASH TTEERGLNVT
 LSSTGRNGFK SHALQLNNRQ IRGLEEELQF SLGSKINVKV GGNKSKGTLKV LRTYNNVLDMM NTTCQDLQIE
 VTVKGHVEYT MEANEDYEDY EYDELPKDD PDAPLQPVTP LQLFEGRRNR RRREAPKVVE EQESRVHYTV
 CIWRNGKVGL SGMAIADVTI LSGFHALRAD LEKLTSLSDR YVSHFETEGP HVLLYFDSVP TSRECVGFEEA
 VQEVVGLVQ PASATLYDYY NPERRCSVFY GAPSKSRLLA TLCSAEVCQC AEGKCPRQRR ALERGLQDED
 GYRMKFACY PRVEYGFQVK VLREDSRAAF RLFETKITQV LHFTKDVKAA ANQMRNFLVR ASCRLRLEPG
 KEYLIMGLDG ATYDLEGHPQ YLLDSNSWIE EMPSERLCRS TRQRAACAQL NDFLQEYGTQ GCQV (配列番号 1099)

9. LDL受容体ファミリーに対するリガンド

P 0 5 0 6 7 ; A 4 _ _ H U M A N

P 1 2 0 2 3 ; A 4 _ _ M O U S E

P 0 5 0 6 7 ; A 4 _ _ H U M A N

MLPGLALLLL AAWTARALEV PTDGNAGLLA EPQIAMFCGR LNMHMNVQNG KWSDSPSGTK TCIDTKEGIL
 QYCQEVYPEL QITNVVEANQ PVTIQNWCKR GRKQCKTHPH FVIPYRCLVG EFVSDALLVP DKCKFLHQER
 MDVCETHLHW HTVAKETCSE KSTNLHDYGM LLPCGIDKFR GVEFVCCPLA EESDNVDSAD AEEDDSVWWW
 GGADTDYADG SEDKVVEVAE EEEVAEEVEE EADDDDEDED GDEVEEEAE E PYEEATERTT SIATTTTTTT
 ESVEEVVREV CSEQAETGPC RAMISRWFYD VTEGKCAPFF YGGCGGNRRN FDTEEYCMV CGSAMSQSLL
 KTTQEPLARD PVKLPTTAAS TPDVAVDKYLE TPGDENEHAH FQKAKERLEA KHRERMSQVM REWEEAERQA
 KNLPKADKKA VIQHFQEKVE SLEQEAAANER QQLVETHMAR VEAMLNDRRR LALENYITAL QAVPPRPRHV
 FNMLKKYVRA EQKDRQHTLK HFEHVRMVDK KKAQIRSQV MTHLRVIYER MNQSLSLLYN VPAVAEEIQD
 EVDELLQKEQ NYSDDVLAM ISEPRISYGN DALMPSLTET KTTVELLPVN GEFSLDDLQP WHSFGADSV
 ANTENEVEPV DARPAADRGL TTRPGSGLTN IKTEEISEVK MDAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG
 AIIGLMVGGV VIATVIVITL VMLKKKQYTS IHHGVVEVDA AVTPEERHLS KMQQNGYENP TYKFFEQMQN (配列番号100)

10. 内分泌および外分泌受容体リガンド

P 0 1 2 4 1 ; S O M A _ _ H U M A N

P 0 6 8 8 0 ; S O M A _ _ M O U S E

Q 9 U B U 3 ; G H R L _ _ H U M A N

Q 9 E Q X 0 ; G H R L _ _ M O U S E

P 0 1 2 4 1 ; S O M A _ _ H U M A N

MATGSRTSLL LAFGLLCLPW LQEGSAFPTI PLSRLFDNAM LRAHRLHQLA FDTYQEFEEA YIPKEQKYSF
 LQNPQTSLCF SESIPTPSNR EETQQKSNLE LLRISLLLIQ SWLEPVQFLR SVFANSLVYG ASDSNVYDLL
 KDLEEGIQTL MGRLEDGSPR TGQIFKQYTS KFDTNSHNDD ALLKNYGLLY CFRKDMDKVE TFLRIVQCRS
 VEGSCGF (配列番号101)

Q 9 U B U 3 ; G H R L _ _ H U M A N

MPSPGTVCSL LLLGMLWLDL AMAGSSFLSP EHQRVQQRKE SKKPPAKLQP RALAGWLRPE DGGQAEGAED
 ELEVRFNAPF DVGIKLSGVQ YQQHSQALGK FLQDILWEEA KEAPADK (配列番号102)

11. トランスフォーミング増殖因子リガンド

P 0 1 1 3 7 ; T G F B 1 _ _ H U M A N

P 0 4 2 0 2 ; T G F B 1 _ _ M O U S E

P 0 1 1 3 7 ; T G F B 1 _ _ H U M A N

MPPSGLRLLL LLLPLLWLLV LTPGRPAAGL STCKTIDMEL VKRKRIEAIR GQILSKLRLA SPSPQGEVPP
GPLPEAVLAL YNSTRDRVAG ESAEPEPEPE ADYYAKEVTR VLMVETHNEI YDKFKQSTHS IYMFNTSEL
REAVPEPVLL SRAELRLLRL KLKVEQHVEL YQKYSNNSWR YLSNRLAPS DSPEWLSFDV TGVVRQWLSR
GGEIEGFRLS AHCSCDSRDN TLQVDINGFT TGRRGDLATI HGMNRPFLLL MATPLERAQH LQSSRHRRAL
DTNYCFSSTE KNCCVRQLYI DFRKDLGWKW IHEPKGYHAN FCLGPCPYIW SLDTQYSKVL ALYNQHNPQA
SAAPCCVPQA LEPLPIVYV GRKPKVEQLS NMIVRSCKCS (配列番号103)

1 2 . ケモカイン受容体リガンド

P 1 3 5 0 0 ; C C L 2 _ _ H U M A N

P 1 0 1 4 8 ; C C L 2 _ _ M O U S E

10

P 1 3 5 0 0 ; C C L 2 _ _ H U M A N

MKVSAALLCL LLIAATFIPQ GLAQPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV
AKEICADPKQ KVVQDSMDHL DKQTQTPKT (配列番号104)

1 3 . インテグリン

P 0 5 5 5 6 ; I T B 1 _ _ H U M A N

P 0 9 0 5 5 ; I T B 1 _ _ M O U S E

20

P 0 5 5 5 6 ; I T B 1 _ _ H U M A N

MNLQPIFWIG LISSVCCVFA QTENRCLKA NAKSCGECIQ AGPNCGWCTN STFLQEGMPT SARCDLEAL
KKKGCPDDI ENPRGSKDIK KNKNVTNRSK GTAEKLPED ITQIQPQQLV LRLRSGEPQT FTLKFKRAED
YPIDLYLMD LSYSMKDDLE NVKSLGTDLM NEMRRITSDF RIGFGSFVEK TVMPYISTTP AKLRNPCTSE
QNCTSPFSYK NVLSLTNKGE VFNELVGKQR ISGNLDSPEG GFDAIMQVAV CGSLIGWRNV TRLLVFSTDA
GFHFAGDGKL GGIVLPNDGQ CHLENNMYTM SHYYDYPISA HLVQKLENN IQTIFAVTEE FQPVYKELKN
LIPKSAVGTL SANSSNVIQL IIDAYNSLSS EVILENGKLS EGVITISYKSY CKNGVNGTGE NGRKCSNISI
GDEVQFEISI TSNKCPKIDS DSFKIRPLGF TEEVEVILQY ICECECQSEG IPESPKCHEG NGTFECGACR
CNEGRVGRHC ECSTDEVNSE DMDAYCRKEN SSEICSNNGE CVCQCVCRC RDNTNEIYSG KFCECDNFNC
DRSNGLICGG NGVCKCRVCE CNPNYTGSA DCSLDTSTCE ASNGQICNGR GICECGVCKC TDPKFQGGQC
EMCQTCLGVC AEHKECVQCR AFNKGEKKDT CTQECSYFNI TKVESRDKLP QPVQPDVSH CKEKDVEDCW
FYFTYSVNGN NEVMHVVEN PECPTGPDII PIVAGVVAGI VLIGLALLLI WKLLMIHDR REFAKFEKEK
MNAKWDGTEN PIYKSAVTTV VNPKYEGK (配列番号105)

30

1 4 . インターロイキン

Q 1 3 1 6 9 ; Q 1 3 1 6 9 _ _ H U M A N

Q 0 P G S 4 ; Q 0 P G S 4 _ _ M O U S E

Q 1 3 1 6 9 ; Q 1 3 1 6 9 _ _ H U M A N

MYRMQLLSCL ALILALVTNS APTSSSTKKT KKTQLQLEHL LLDLQMILNG INNYKNPKLT RMLTFKFYMP
KKATELKQLQ CLEELKPLE EVLNLAQSKN FHLRPRDLIS NINVIVLELK GSETTFMCEY ADETATIVEF
LNRWITFCQS IISTLT (配列番号106)

40

1 5 . 分化因子様骨分化因子

P 1 3 4 9 7 ; B M P 1 _ _ H U M A N

P 9 8 0 6 3 ; B M P 1 _ _ M O U S E

P 1 3 4 9 7 ; B M P 1 _ _ H U M A N

MPGVARLPLL LGLLLLPRPG RPLDLADYTY DLAEEDDSEP LNYKDPCKAA AFLGDIALDE EDLRAFQVQQ
AVDLRRHTAR KSSIKAAVPG NTSTPSCQST NGQPQRGACG RWRGRSRSR AATSRPERVW PDGVIPFVIG

50

GNFTGSQRAV FRQAMRHWEK HTCVTFLERT DEDSYIVFTY RPCGCCSYVG RRGGGPQAIS IGKNCDFGI
 VVHELGHVVG FWHEHTRPDR DRHVSIVREN IQPGQEYNFL KMEPQEVESL GETYDFDSIM HYARNTFSRG
 IFLDTIVPKY EVNGVKPPIG QRTRLSKGGDI AQARKLYKCP ACGETLQDST GNFSSPEYPN GYSAHMHCVW
 RISVTPGEKI ILNFTSLDLY RSRLCWYDYV EVRDGFWRKA PLRGRFCGSK LPEPIVSTDS RLWVEFRSSS
 NWVGKGFFAV YEAICGGDVK KDYGHIQSPN YPDDYRPSKV CIWRIQVSEG FHVGLTFQSF EIERHDS CAY
 DYLEVVDGHS ESSTLIGRYC GYEKPDDIKS TSSRLWLKFV SDGSINKAGF AVNFFKEVDE CSRPNRGGCE
 QRCLNTLGSY KCSCDPGYEL APDKRRCEAA CGGFLTKLNG SITSPGWPKE YPPNKNCIWQ LVAPTQYRIS
 LQFDFFEFEG NDVCKYDFVE VRSGLTADSK LHGKFCGSEK PEVITSQYNN MRVEFKSDNT VSKKGFKAHF
 FSDKDECKSD NGGCQQDCVN TFGSYECQCR SGFVLHDNKH DCKEAGCDHK VTSTSGTITS PNWPDKYPSK
 KECTWAISST PGHRVKLTFM EMDIESQPEC AYDHLEVFDG RDAKAPVLGR FCGSKKPEPV LATGSRMFLR
 FYSDNSVQRK GFQASHATEC GGQVRADVKT KDLYSHAQFG DNNYPGGVDC EWVIVAEEGY GVELVFQTFE
 VEEETDCGYD YMELFDGYDS TAPRLGRYCG SGPPEEVYSA GDSVLVKFHS DDTITKKGFH LRYTSTKFKD
 TLHSRK (配列番号107)

10

16. ガストリン放出ペプチド

P 0 7 4 9 2 ; G R P _ _ H U M A N

Q 8 R 1 I 2 ; G R P _ _ M O U S E

P 0 7 4 9 2 ; G R P _ _ H U M A N

MRGSELPLVL LALVLCLAPR GRAVPLPAGG GTVLTMYPR GNHWAVGHLN GKKSTGESSS VSERGLKQQ
 LREYIRWEEA ARNLLGLIEA KENRNHQPPQ PKALGNQQPS WDSSESSNFK DVGSKGKVGR LSAPGSQREG
 RNPQLNQQ (配列番号108)

20

17. 血管作動性腸ペプチド (VIP)

P 0 1 2 8 2 ; V I P _ _ H U M A N

P 3 2 6 4 8 ; V I P _ _ M O U S E

P 0 1 2 8 2 ; V I P _ _ H U M A N

MDTRNKAQLL VLLTLLSVLF SQTSAWPLYR APSALRLGDR IPFEGANEPD QVSLKEDIDM LQNALAENDT
 PYYDVSRNAR HADGVFTSDF SKLLGQLSAK KYLESLMGKR VSSNISED PVKRRHSDAVF TDNYTRLRKQ
 MAVKKYLNSI LNGKRSSEGE SPDFPEELEK (配列番号109)

30

18. インスリンおよびインスリン様成長因子

P 0 1 3 0 8 ; I N S _ _ H U M A N

P 0 1 3 4 3 ; I G F 1 A _ _ H U M A N

P 0 5 0 1 9 ; I G F 1 B _ _ H U M A N

P 0 5 0 1 7 ; I G F 1 _ _ M O U S E

P 0 1 3 0 8 ; I N S _ _ H U M A N

MALWMRLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY LVCGERGFFY TPKTRREAED LQVGQVELGG
 GPGAGSLQPL ALEGLQKRG IVEQCCTSI SLYQLENYCN (配列番号110)

40

P 0 1 3 4 3 ; I G F 1 A _ _ H U M A N

MGKISSLPTQ LFKCCFCDFL KVKMHTMSSS HLFYALCLL TFTSSATAGP ETLCGAELVD ALQFVCGDRG
 FYFNKPTGYG SSSRRAPQTG IVDECCFRSC DLRRLEMYCA PLKPAKSARS VRAQRHTDMP KTQKEVHLKN
 ASRGSAGNKN YRM (配列番号111)

P 0 5 0 1 9 ; I G F 1 B _ _ H U M A N

MGKISSLPTQ LFKCCFCDFL KVKMHTMSSS HLFYALCLL TFTSSATAGP ETLCGAELVD ALQFVCGDRG
 FYFNKPTGYG SSSRRAPQTG IVDECCFRSC DLRRLEMYCA PLKPAKSARS VRAQRHTDMP KTQKYQPPST

50

NKNTKSQRRK GWPKTHPGGE QKEGTEASLQ IRGKKKEQRR EIGSRNAECR GKKGK
(配列番号112)

19. カルシトニンおよびカルシトニン遺伝子関連ペプチド

P 0 1 2 5 8 ; C A L C _ _ H U M A N

P 7 0 1 6 0 ; C A L C _ _ M O U S E

P 0 1 2 5 8 ; C A L C _ _ H U M A N

MGFQKFSPFL ALSILVLLQA GSLHAAPFRS ALESSPADPA TLSEDEARLL LAALVQDYVQ MKASELEQEQ
EREGSSLDSP RSKRCGNLST CMLGTYTQDF NKFHTFPQTA IGVGAPGKKR DMSSDLERDH RPHVSMPQNA
N (配列番号113)

10

20. 炎症性細胞様マスト細胞、好酸球、マクロファージ、単球および好中球に対するリ
ガンド

P 0 9 6 0 3 ; C S F 1 _ _ H U M A N

P 0 7 1 4 1 ; C S F 1 _ _ M O U S E

P 0 C 0 L 5 ; C O 4 B _ _ H U M A N

P 0 1 0 2 9 ; C O 4 B _ _ M O U S E

P 0 9 6 0 3 ; C S F 1 _ _ H U M A N

20

MTAPGAAGRC PPTTWLGSLL LLVCLLASRS ITEEVSEYCS HMIGSGHLQS LQRLIDSQME TSCQITFEFV
DQEQLKDPVC YLKKAFLLVQ DIMEDTMRFR DNTPNAIAIV QIQELSLRLK SCFTKDYEHH DKACVRTFYE
TPLQLLEKVK NVFNETKNLL DKDWNIFSKN CNNSFAECSS QDVVTKPDCN CLYPKAIPSS DPASVSPHQP
LAPSMAPVAG LTWEDSEGTE GSSLLPGEQP LHTVDPGSAK QRPPRSTCQS FEPPETPVVK DSTIGGSPQP
RPSVGAFNPG MEDILDSAMG TNWVPEEASG EASEIPVPQG TELSPSRPGG GSMQTEPARP SNFLSASSPL
PASAKGQQPA DVTGTALPRV GPVRPTGQDW NHTPQKTDHP SALLRDPPEP GSPRISSLRP QGLSNPSTLS
AQPQLSRSHS SGSVLPLGEL EGRRSTRDRR SPAEPEGGPA SEGAARPLPR FNSVPLTDTG HERQSEGSSS
PQLQESVFHL LVPSVILVLL AVGGLLFYRW RRRSHQEPQR ADSPLEQPEG SPLTQDDRQV ELPV (配列番号
114)

【 0 2 7 4 】

30

本発明による有用なさらなる標的化ペプチドは以下のもの：

GTFVYGGCRAKRNNFKSAED (配列番号115)

GPFFYGGCGNRNNFDTEEY (配列番号116)

GTFFYGGCRGKRNNFKTEEY (配列番号117)

GTFFYGGSRGKRNNFKTEEY (配列番号118)

GRFFYGGSRGKRNNFRTEEY (配列番号119)

GTFFYGGSRGRRNNFRTEEY (配列番号120)

CTFVYGGCRAKRNNFKSAED (配列番号121)

CPFFYGGCGNRNNFDTEEY (配列番号122)

CTFFYGGCRGKRNNFKTEEY (配列番号123)

40

CTFFYGGSRGKRNNFKTEEY (配列番号124)

CRFFYGGSRGKRNNFRTEEY (配列番号125)

CTFFYGGSRGRRNNFRTEEY (配列番号126)

TFVYGGCRAKRNNFKSAEDG (配列番号127)

PFFYGGCGNRNNFDTEEYG (配列番号128)

TFFYGGCRGKRNNFKTEEYG (配列番号129)

TFFYGGSRGKRNNFKTEEYG (配列番号130)

RFFYGGSRGKRNNFRTEEYG (配列番号131)

TFFYGGSRGRRNNFRTEEYG (配列番号132)

TFVYGGCRAKRNNFKSAEDC (配列番号133)

50

PFFYGGCGNRNNFDTEEYC (配列番号134)
 TFFYGGCRGKRNNFKTEEYC (配列番号135)
 TFFYGGSRGKRNNFKTEEYC (配列番号136)
 RFFYGGSRGKRNNFRTEEYC (配列番号137)
 TFFYGGSRGRRNNFRTEEYC (配列番号138)

を含むが、これらに限定されない。

【0275】

一実施形態では、本発明のペプチドは、転移ドメイン、例えば神経毒の転移ドメインとコンジュゲートされている。本発明による有用な神経毒転移ドメインペプチド配列としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。ペプチド配列は、配列内の任意のサブユニットから選択される。本発明の指定に適合する配列に基づいたペプチドセグメントが選択される。

1. A型ボツリヌス神経毒 (B o N T / A) (E C 3. 4. 2 4. 6 9) (ボントキシリシン-A)

P 1 0 8 4 5 ; B X A 1 _ C L O B O

MPFVNKQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNVGQM QPVKAFKIHN KIWVIPERDT FTNPEEGDLN PPPEAKQVPV
 SYDSTYLST DNEKDNLYKG VTKLFERIYS TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG STIDTELKVI DTNCINVIQP
 DGSYRSEELN LVIIGPSADI IQFECKSFHG EVLNLTRNGY GSTQYIRFSP DFTFGFEESL EVDTNPLLGA
 GKFATDPAVT LAHELIHAGH RLYGIAINPN RVFKVNTNAY YEMSGLEVSF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN
 EFRLYYYNKF KDIASLTNKA KSIVGTTASL QYMKNVFEKE YLLSEDTSKG FSVDKLKFDK LYKMLTEIYT
 EDNFVKFFKV LNRKTYLNF D KAVFKINIVP KVNVTIYDGF NLRNTNLAAN FNGQNTTEINN MNFTKLKNFT
 GLFEFYKLLC VRGIITSKTK SLDKGYNKAL NDLCKVNNW DLFFSPSEDN FTNDLNKGEE ITSNTNIEAA
 EENISLDLIQ QYYLTFNFDN EPENISIENL SSDIIGQLEL MPNIERFPNG KKYELDKYTM FHYLRAQEFE
 HGKSRIALTN SVNEALLNPS RVYTFSSDY VKKVNKATEA AMFLGWVEQL VYDFTDETSE VSTTDKIADI
 TIIIPYIGPA LNIGNMLYKD DFGALIFSG AVILLEFIPE IAIPVLGTFA LVSYIANKVL TVQTIDNALS
 KRNEKWDEVY KYIVTNWLAK VNTQIDLIRK KMKEALENQA EATKAIINYQ YNQYTEEEKN NINFNIDDL
 SKLNESINKA MININKFLNQ CSVSYLMNSM IPYGVKRLD FDSLKDALL KYIYDNRGTL IGQVDRLKDK
 VNNTLSTDIP FQLSKYVDNQ RLLSTFTFYI KNIINTSILN LRYESNHLID LSRYSKINI GSKVNFDPID
 KNQIQLFNLE SSKIEVILKN AIVNSMYEN FSTSFWRIP KYFNSISLNN EYTIINCMMEN NSGWKVSINY
 GEIWTQLQDT QEIKQRVVFK YSQMINISDY INRWIFVTIT NNRLNNSKIY INGRLLDQKP ISNLGNIHAS
 NNIMFKLDGC RDTHRYIWK YFNLFDKELN EKEIKDLYDN QSNKGILKDF WGDYLYQDKP YYMLNLYDPN
 KYVDVNVVGI RGYMYLKGPR GSVMTTNIYL NSSLYRGTKF IKKYASGNK DNIVRNNDRV YINVVVKNKE
 YRLATNASQA GVEKILSALE IPDVGNSQV VVMKSKNDQG ITNKCKMNLQ DNNGNDIGFI GFHQFNNAK
 LVASNWYNRQ IERSSRTLGC SWEFIPVDDG WGERPL (配列番号139)

2. B型ボツリヌス神経毒 (B o N T / B) (E C 3. 4. 2 4. 6 9) (ボントキシリシン-B)

B 1 I N P 5 ; B X B _ C L O B K

MPVTINNFNY NDPIDNNII MMEPPFARGT GRYKAFKIT DRIWIIPERY TFGYKPEDFN KSSGIFNRDV
 CEYDPPDYLN TNDKKNIFLQ TMIKLFNRIK SKPLGEKLE MIINGIPYLG DRRVPLEEFN TNIASVTVNK
 LISNPGEVER KKGIFANLII FGPGPVLNEN ETIDIGIQNH FASREGFGGI MQMKFCPEYV SVFNNVQENK
 GASIFNRRGY FSDPALILMH ELIHVLHGLY GIKVDDLPIV PNEKKFFMQS TDAIQAEELY TFGGQDPSII
 TPSTDKSIYD KVLQNFRGIV DRLNKLVC I SDPNININII KNKFKDKYKF VEDSEGKYSI DVESFDKLYK
 SLMFGFTETN IAENYKIKTR ASYFSDSLPP VKIKNLLDNE IYTIIEGFNI SDKDMEKEYR GQNKAINKQA
 YEEISKEHLA VYKIQMCKSV KAPGICIDVD NEDLFFIADK NSFSDDLNKN ERIEYNTQSN YIENDFPINE
 LILDTDLISK IELPSENTES LTDFNVDVPV YEKQPAIKKI FTDENTIFQY LYSQTFPLDI RDISLTSSFD
 DALLFSNKVY SFFSMDYIKT ANKVVEAGLF AGWVKQIVND FVIEANKSNT MDKIADISLI VPIYIGLALNV
 GNETAKGNFE NAFEIAGASI LLEFIPELLI PVVGAFLLS YIDNKNKIIK TIDNALTKRN EKWSDMYGLI
 VAQWLSTVNT QFYTIKEGMY KALNYQAQAL EEIKYRYNI YSEKEKSNIN IDFNIDNSKL NEGINQAIDN
 INNFINGCSV SYLMKKMIPL AVEKLLDFDN TLKKNLLNII DENKLYLIGS AEYEKSKVKN YLKTIMPFDL

SIYTNDTILI EMFNKYNSEI LNNIILNLRY KDNNLIDLSG YGAKVEVYDG VELNDKNQFK LTSSANSKIR
 VTQNQNIIFN SVFLDFSVSF WIRIPKYKND GIQNYIHNEY TIINCMKNNS GWKISIRGNR IIWTLIDING
 KTKSVFFEYN IREDISEYIN RWFFVTITNN LNNAKIYING KLESNTDIKD IREVIANGEI IFKLDGDIDR
 TQFIWMKYFS IFNTELSQSN IEERYKIQSY SEYLKDFWGN PLMYNKEYYM FNAGNKNSYI KLKKDSPVGE
 ILTRSKYNQN SKYINYRDLI IGEKFIIRRK SNSQSINDDI VRKEDIYILD FFNLNQEWVRV YTYKYFKKEE
 EKLFLAPISD SDEFYNTIQI KEYDEQPTYS CQLLFKKDEE STDEIGLIGI HRFYESGIVF EEEKDYFCIS
 KWYLKEVKRK PYNLKLGCNW QFIPKDEGWT E (配列番号140)

3. C1型ボツリヌス神経毒 (BONT/C1) (EC3.4.24.69) (ボントキシリシン-C1)

10

P18640; BXC1_CLOB

MPITINNFNY SDPVDNKNIL YLDTHLNTLA NEPEKAFRIT GNIWVIPDRF SRNSNPNLNK PPRVTSPKSG
 YYDPNYLSTD SDKDPFLKEI IKLFKRINSR EIGEELIYRL STDIPFPGNN NTPINTFDFD VDFNSVDVKT
 RQGNWVKTG SINPSVIITG PRENIIDPET STFKLTNNTF AAQEGFGALS IISISPRFML TYSNATNDVG
 EGRFSKSEFC MDPILILMHE LNHAMHNLYG IAIPNDQTIS SVTSNIFYSQ YNVKLEYAEI YAFGGPTIDL
 IPKSARKYFE EKALDYRSI AKRLNSITTA NPSSFNKYIG EYKQKLIRKY RFVVESSGEV TVNRNKFVEL
 YNELTQIFTE FNYAKIYNVQ NRKIYLSNVY TPTANILDD NVYDIQNGFN IPKSNLNVLF MGQNLNRNPA
 LRKVPENML YLFTKFCHKA IDGRSLYNKT LDCRELLVKN TDLPIFGDIS DVKTDIFLRK DINEETEVYI
 YPDNVSDQV ILSKNTSEHG QLDLLYPSID SESEILPGEN QVFYDNRTQN VDYLSNYYYL ESQKLSDNVE
 DFTFTRSIEE ALDNSAKVYT YFPTLANKVN AGVQGGFLM WANDVVEDFT TNILRKDTLD KISDVSAIIP
 YIGPALNISN SVRRGNFTEA FAVTGVITILL EAFPEFTIPA LGAFVIYSKV QERNEIIKTI DNCLEQRIKR
 WKDSYEWMMG TWLSRIITQF NNISYQMYDS LNYQAGAIKA KIDLEYKKYS GSDKENIKSQ VENLKNSLDV
 KISEAMNNIN KFIRESVITY LFKNMLPKVI DELNEFDRNT KAKLINLIDS HNIILVGEVD KLKAKVNNSF
 QNTIPFNIFS YTNSLLKDI INEYFNNIND SKILSLQNRK NTLVDTSGYN AEVSEEGDVQ LNPIFPDFDK
 LGSSGEDRGK VIVTQENIV YNSMYESFSI SFWIRINKWV SNLPGYTIID SVKNNSGWSI GIISNFLVFT
 LKQNEDEQS INFSDISNN APGYNKWWFV TVTNNMMGM KIYINGKLID TIKVKELTGI NFSKTITFEI
 NKIPDTGLIT SDSAINDMWI RDFYIFAKEL DGKDINILFN SLQYTNVVKD YWGNLRYNK EYVMVNDYD
 NRYMYANSRQ IVFNTRNNN DFNEGYKIII KRIRGNTNDT RVRGGDILYF DMTINNKAYN LFMKNETMYA
 DNHSTEDIYA IGLREQTKDI NDNIIFQIQP MNNTYYASQ IFKSNFNGEN ISGICSIGTY RFRLGGDWYR
 HNYLVPTVKQ GNYASLLEST STHWGFVPVS E (配列番号141)

20

30

4. D型ボツリヌス神経毒 (BONT/D) (EC3.4.24.69) (ボントキシリシン-D)

P19321; BXD_CLOB

MTWPVKDFNY SDPVNDNDIL YLRIPQNKLI TTPVKAFMIT QNIWVIPERF SSDTNPSLSK PPRPTSKYQS
 YYDPSYSTD EQKDTFLKGI IKLFKRINER DIGKKLINYL VVGSPFMGDS STPEDTFDFT RHTTNIAVEK
 FENGSWKVTN IITPSVLIFG PLPNILDYTA SLTLQGQSN PSFEGFGTSL ILKVAPEFLL TFSDVTSNQS
 SAVLGKSIFC MDPVIALMHE LTHSLHQLYG INIPSDKRIR PQVSEGGFFSQ DGPNVQFEEL YTFGGDLVEI
 IPQIERSQLR EKALGHYKDI AKRLNNINKT IPSSWISNID KYKKIFSEKY NFDKDNTGNF VVNIDKFNSL
 YSDLTNVMSE VVYSSQYNVK NRTHYFSRHY LPVFANILDD NIYTIRDGFN LTNKGFNIEN SGQNIERNPA
 LQKLSSSESV DLFTKVCLRL TKNSRDDSTC IKVKNRPLPY VADKDSISQE IFENKIITDE TNVQNYSDKF
 SLDESILDGQ VPINPEIVDP LLPNVNMEPL NLPGEIEVFY DDITKYVDYL NSYYLESQK LSNNVENITL
 TTSVEEALGY SNKIYTFPLS LAEKNVKGQV AGLFLNWANE VVEDFTTNIM KKDTLDKISD VSVIIPYIGP
 ALNIGNSALR GNFNQAFATA GVAFLLEGFP EFTIPALGVF TFYSSIQERE KIIKTIENCL EQRVKRWKDS
 YQWMVSNWLS RITTQFNHIN YQMYDSLSYQ ADAIKAKIDL EYKKYSGSDK ENIKSQVENL KNSLDVKISE
 AMNNINKFIR ECSVTYLFKN MLPKVIDELN KFDLRTKTEL INLIDSHNII LVGEVDRLKA KVNESFENTM
 PFNIFSYTNN SLLKDIINEY FNSINDSKIL SLQNKKNALV DTSGYNAEVR VGDNVQLNTI YTNDFKLSSS
 GDKIIVNLNN NILYSAYEN SSVSFWIKIS KDLTNSHNEY TIINSIEQNS GWKLCIRNGN IEWILQDVNR
 KYKSLIFDYS ELSHTGYTN KWFFVTITNN IMGYMKLYIN GELKQSQKIE DLDEVKLDKT IVFGIDENID
 ENQMLWIRDF NIFSKELSNE DINIVYEQI LRNVIKDYWG NPLKFDTEYY IINDNYIDRY IAPESNVLVL

40

50

VQYPDRSKLY TGNPITIKSV SDKNPYSRIL NGDNIILHML YNSRKYMIIR DTDTIYATQG GECSQNCVYA
LKLQSNLGN Y GIGIFSINKI VSKNKYCSQI FSSFRENTML LADIYKPWRF SFKNAYTPVA VTNYETKLLS
TSSFWKFISR DPGWVE (配列番号142)

5. E型ボツリヌス神経毒 (BONT/E) (EC3.4.24.69) (ボントキシリ
シン-E)

Q00496; B X E _ C L O B O

MPKINSFNYN	DPVNDRTILY	IKPGGCQEFY	KSFNIMKNIW	IIPERNVIGT	TPQDFHPPTS	LKNGDSSYYD	
PNYLQSDEEK	DRFLKIVTKI	FNRINNNLSG	GILLEELSKA	NPYLGNDNTP	DNQFHIGDAS	AVEIKFSNGS	
QDILLPNVII	MGAEPDLFET	NSSNISLRNN	YMPSNHRFGS	IAIVTFSPEY	SFRFNDNCMN	EFIQDPALTL	10
MHELIHSLHG	LYGAKGITT	YTITQKQNPL	ITNIRGTNIE	EFLTFGGTDL	NIITSAQSND	IYTNLLADYK	
KIASKLSKVQ	VSNPLLNPYK	DVFEAKYGLD	KDASGIYSVN	INKFNDIFKK	LYSFTEFDLR	TKFQVKCRQT	
YIGQYKYFKL	SNLLNDSIYN	ISEGYNINNL	KVNFRGQAN	LNPRIITPIT	GRGLVKKIIR	FCKNIVSVKG	
IRKSICIEIN	NGELFFVASE	NSYNDNINT	PKEIDDTVTS	NNNYENDLDQ	VILNFNSESA	PGLSDEKLNL	
TIQNDAYIPK	YDSNGTSDIE	QHDVNELNVF	FYLDAQVPE	GENNVNLTSS	IDTALLEQPK	IYTFSSSEFI	
NNVNKPQVAA	LFVSWIQQVL	VDFTEANQK	STVDKIADIS	IVVPYIGLAL	NIGNEAQKGN	FKDALELLGA	
GILLEFEPEL	LIPTILVFTI	KSFLGSSDNK	NKVIKAINNA	LKERDEKWKE	VYSFIVSNWM	TKINTQFNKR	
KEQMYQALQN	QVNAIKTIE	SKYNSYTLLE	KNELTNKYDI	KQIENELNOK	VSIAMNNIDR	FLTESSISYL	
MKIINEVKIN	KLREYDENVK	TYLLNYIIQH	GSILGESQQE	LNSMVTDTLN	NSIPFKLSSY	TDDKILISYF	
NKFFKRIKSS	SVLNMRYKND	KYVDTSGYDS	NININGDVYK	YPTNKNQFGI	YNDKLSEVNI	SQNDYIIYDN	20
KYKNFSISFW	VRIPNYDNKI	VNVNNEYTII	NCMRDNNSGW	KVSLNHNEII	WTFEDNRGIN	QKLAFNYGNA	
NGISDYINKW	IFVTITNDRL	GDSKLYINGN	LIDQKSILNL	GNIHVSDNIL	FKIVNCSYTR	YIGIRYFNIF	
DKELDETEIQ	TLYSNEPNTN	ILKDFWGNYL	LYDKEYYLLN	VLKPNNFIDR	RKDSTLSINN	IRSTILLANR	
LYSGIKVKIQ	RVNNSSTNDN	LVRKNDQVYI	NFVASKTHLF	PLYADTATTN	KEKTIKISSS	GNRFNQVVM	
NSVGNCTMNF	KNNNGNNIGL	LGFKADTVVA	STWYYTHMRD	HTNSNGCFWN	FISEEHGWQE	K (配列番号143)	

6. F型ボツリヌス神経毒 (BONT/F) (EC3.4.24.69) (ボントキシリ
シン-F)

P30996; B X F _ C L O B O

MPVAINSFNY	NDPVNDTIL	YMQIPYEEKS	KKYYKAFFIM	RNVWIIPERN	TIGTNPSDFD	PPASLKNSS	
AYYDPNYLTT	DAEKDRYLKT	TIKLFKRINS	NPAGKVLLQE	ISYAKPYLGN	DHTPIDEFSP	VTRTTSVNIK	
LSTNVESML	LNLVLGAGP	DIFESCCYPV	RKLIDPDVYV	DPSNYGFGSI	NIVTFSPEYE	YTFNDISGGH	
NSSTESFIAD	PAISLAHELI	HALHGLYGAR	GVTYEETIEV	KQAPLMIAEK	PIRLEEFLTF	GGQDLNIITS	
AMKEKIYNL	LANYEKIATR	LSEVNSAPPE	YDINEYKDYF	QWKYGLDKNA	DGSYTVNENK	FNEIYKKLYS	
FTESDLANKF	KVKCRNTYFI	KYEFLKVPNL	LDDDIYTVSE	GFNIGNLAVN	NRGQSIKLN	KIIDSIPDKG	
LVEKIVKFK	SVIPRKGTKA	PPRLCIRVNN	SELFFVASES	SYNENDINTP	KEIDDTTNLN	NNYRNLDDEV	
ILDYNSQTIP	QISNRTLNTL	VQDNSYVPRY	DSNGTSEIEE	YDVVDNFVFF	YLHAQKVPEG	ETNISLTSSI	
DTALLEESKD	IFFSSEFIDT	INKPVNAALF	IDWISKVIRD	FTTEATQKST	VDKIADISLI	VPYVGLALNI	
IIEAEKGNFE	EAFELLGVGI	LLEFVPELTI	PVILVFTIKS	YIDSYENKNK	AIKAINNSLI	EREAKWKEIY	40
SWIVSNWLTR	INTQFNKRKE	QMYQALQNQV	DAIKTAIEYK	YNNYTSDEKN	RLESEYNINN	IEEELNKKVS	
LAMKNIERFM	TESSISYLMK	LINEAKVGKL	KKYDNHVKSD	LLNYILDHRS	ILGEQTNELS	DLVTSTLNSS	
IPFELSSYTN	DKILIIYFNR	LYKKIKDSSI	LDMRYENKFI	IDISGYGSNI	SINGNVYIYS	TNRNQFGIYN	
SRLSEVNIAQ	NNDIIYNSRY	QNFSISFWVR	IPKHYKPMNH	NREYTIINCM	GNNNSGWKIS	LRTVRDCEII	
WTLQDTSGNK	ENLIFRYEEL	NRISNYINKW	IFVTITNNRL	GNSRIYINGN	LIVEKSIKSNL	GDIHVSDNIL	
FKIVGCDDET	YVGIRYFKVF	NTELDKTEIE	TLYSNEPDPS	ILKNYWGNYL	LYNKKYYLFN	LLRKDKYITL	
NSGILNINQQ	RGVTEGVSFL	NYKLYEGVEV	IIRKNGPIDI	SNTDNFVRKN	DLAYINVVDR	GVEYRLYADT	
KSEKEKIIRT	SNLNDLSGQI	IVMDSIGNNC	TMNFQNNNGS	NIGLLGFHSN	NLVASSWYYN	NIRNTSSNG	
CFWSSISKEN	GWKE (配列番号144)						

7. G型ボツリヌス神経毒 (B o N T / G) (E C 3. 4. 2 4. 6 9) (ボントキシリシン-G)

Q 6 0 3 9 3 ; B X G _ C L O B O

MPVNIKXFNY NDPINDDII MMEPFNDPGP GTYYKAFRII DRIWIVPERF TYGFQPDQFN ASTGVFSKDV
 YEYDPTYLK TDAEKDKFLK TMIKLFNRIN SKPSGQRLLD MIVDAIPYLG NASTPPDKFA ANVANVSINK
 KIIQPGAEDQ IKGLMTNLI I FGPGPVLSDN FTDSMIMNGH SPISEGFGAR MMIRFCPSCL NVFNNVQENK
 DTSIFSRRAY FADPALTLMH ELIHVLHGLY GIKISNLPIT PNTKEFFMQH SDPVQAEELY TFGGHDPSTVI
 SPSTDMNIYN KALQNFQDIA NRLNIVSSAQ GSGIDISLYK QIYKNKYDFV EDPNGKYSVD KDKFDKLYKA
 LMGFTETNL AGEYGIKTRY SYFSEYLPPI KTEKLLDNTI YTQNEGFNIA SKNLKTEFNG QNKAVNKEAY
 EEISLEHLVI YRIAMCKPVM YKNTGKSEQC IIVNEDLFF IANKDSFSKD LAKAETIAYN TQNNTEENNF
 SIDQLILDND LSSGIDL PNE NTEPFTNFDD IDIPVYIKQS ALKKIFVDGD SLFEYLHAQT FPSNIENLQL
 TNSLNDALRN NNKVYTFST NLVEKANTVV GASLFVNWVK GVIDDFTSES TQKSTIDKVS DVSIIIPYIG
 PALNVGNETA KENFKNAFEI GGAAILMEFI PELIVPIVGF FTLESYVGNG GHIIMTISNA LKKRDQKWT
 MYGLIVSQWL STVNTQFYTI KERMYNALNN QSQAIEKII E DQYNRYSEED KMNINIDFND IDFKLNQSI
 LAINNIDDFI NQCSISYLMN RMIPLAVKKL KDFDDNLKRD LLEYIDTNEL YLLDEVNLIK SKVNRHLKDS
 IPFDLSLYTK DTILIQVFNN YISNISSNAI LSLSYRGGR L IDSSGYGATM NVGSDVIFND IGNGQFKLNN
 SENSNITAHQ SKFVVYDSMF DNFSINFWVR TPKYNNNDIQ TYLQNEYTII SCIKNDSGWK VSIKGNRIIW
 TLIDVNAKSK SIFFEYSIKD NISDYINKWF SITITNDRLG NANIYINGSL KKSEKILNLD RINSSNDIDF
 KLINCTDTTK FVWIKDFNIF GRELNATEVS SLYWISSTN TLKDFWGNPL RYDTQYYLFN QGMQNIYIKY
 FSKASMGETA PRTNFNAAI NYQNLYLGLR FIIKKASNSR NINNDNIVRE GDYIYLNIDN ISDESRYVYV
 LVNSKEIQTQ LFLAPINDDP TFYDVLQIKK YYEKTTYNCQ ILCEKDTKTF GLFGIGKFKV DYGYVWDTYD
 NYFCISQWYL RRISENINKL RLGCNWQFIP VDEGWTE (配列番号145)

10

20

8. 破傷風毒素 (E C 3. 4. 2 4. 6 8) (テントキシリシン)

P 0 4 9 5 8 ; T E T X _ C L O T E

MPITINNFRY SDPVNNDTII MMEPPYCKGL DIYYKAFKIT DRIWIVPERY EFGTKPEDFN PPSSLIEGAS
 EYDYPNYLRT DSDKDRFLQT MVKLFNRIKN NVAGEALLDK IINAIPYLG NYSLLDKFDT NSNSVSFNLL
 EQDPSGATTK SAMLTNLIIF GPGPVLNKNE VRGIVLRVDN KNYFPCRDFG GSIMQMAFCP EYVPTFDNVI
 ENITSLTIGK SKYFQDPALL LMHELHVLH GLYGMQVSSH EIIPSKQEYI MQHTYPI SAE ELFTFGGQDA
 NLISIDIKND LYEKTLDNDYK AIANKLSQVT SCNDPNIDID SYKQIYQQKY QFDKDSNGQY IVNEDKFQIL
 YNSIMYGFT E IELGKKFNIK TRLSYFSMNH DPKIPNLLD DTIYNDTEGF NIESKDLKSE YKGQNMVRNT
 NAFRNVDSG LVSKLIGLCK KIIPPTNIRE NLYNRTASLT DLGGELCIKI KNEDLTFIAE KNSFSEEPFQ
 DEIVSYNTKN KPLNFNYS LD KIIVDYNLQS KITLPNDRTT PVTKGIPYAP EYKSNAASTI EIHNIDDNTI
 YQYLYAQKSP TTLQRITMTN SVDDALINST KIYSYFPSVI SKVNQGAQGI LFLQWVRDII DDFTNESSQK
 TTIDKISDVS TIVPYIGPAL NIVKQGYEGN FIGALETTGV VLLLEYIPEI TLPVIAALSI AESSTQKEKI
 IKTIDNFLEK RYEWIEVYK LVKAKWLGTV NTQFQKRSYQ MYRSLEYQVD AIKKIIDYEY KIYSGPDKEQ
 IADEINN LKN KLEEKANKAM ININIFMRES SRSFLVNQMI NEAKKQLLEF DTQSKNIMQ YIKANSKFIG
 ITELKKLESK INKVFTSTPIP FSYSKNLDCW VDNEEDIDVI LKKSTILNLD INNDIISDIS GFNSSVITYP
 DAQLVPGING KAIHLVNNE SEVIVHKAMD IEYNDMFNNF TVSFWRVLPK VSASHLEQYG TNEYSIISSM
 KKHSLSIGSG WSVSLKGNL IWTLKDSAGE VRQITFRDLP DKFNAYLANK WVFITITNDR LSSANLYING
 VLMGSAEITG LGAIREDNNI TLKLDRCNNN NQYVSDKFR IFCKALNPKE IEKLYTSYLS ITFLRDFWGN
 PLRYDTEYYL IPVASSSKDV QLKNI TDYMY LTNA PSYTNG KLNIIYRRLY NGLKFIIKRY TPNNEIDSFV
 KSGDFIKLYV SYNNEHIVG YPKDGNFNN LDRILRVGYN APGIPLYKKM EAVKLRLDKT YSVQLKLYDD
 KNASLGLVGT HNGQIGNDPN RDILIASNWy FNHLKDKILG CDWYFVPTDE GWTND (配列番号146)

30

40

9. ジフテリア毒素 (D T) (N A D (+) - ジフタミド A D P - リボシルトランスフェラーゼ) (E C 2. 4. 2. 3 6)

P 0 0 5 8 8 ; D T X _ C O R B E

MLVRGYVVS R KLFASILIGA LLGIGAPPSA HAGADDVVD SSKSFVMENFS SYHGTPGYV DSIQKGIQKP
 KSGTQGN YDD DWKGFYSTDN KYDAAGYSVD NENPLSGKAG GVVKVTPGL TKVLALKVDN AETIKKELGL

50

SLTEPLMEQV GTEEFIKRFG DGASRVVLSL PFAEGSSSVE YINNWEQAKA LSVELEINFE TRGKRGQDAM
 YEYMAQACAG NRVRSSVGSS LSCINLDWDV IRDKTKTKIE SLKEHGPIKN KMSESPNKT V SEEKAKQYLE
 EFHQTALEHP ELSELKTVTG TNPVFAGANY AAWAVNVAQV IDSETADNLE KTTAALSILP GIGSVMGIAD
 GAVHHNTEEI VAQSIALSSL MVAQAIPLVG ELVDIGFAAY NFVESIINLF QVVHNSYNRP AYSPGHKTQP
 FLHDGYAVSW NTVEDSIIRT GFQGESGHD I KITAENTPLP IAGVLLPTIP GKLDVNKSKT HISVNGRKIR
 MRCRAIDGDV TFCRPKSPVY VGNGVHANLH VAFHRSSSEK IHSNEISSDS IGV LGYQKTV DHTKVNSKLS
 LFFEIKS (配列番号147)

10. シュードモナスエキソトキシン

P 1 1 4 3 9 ; T O X A _ _ P S E A E

10

MHLTPHWIPL VASLGLLAGG SFASAAEEAF DLWNECAKAC VLDLKDGVRS SRMSVDP AIA DTNGQGV LHY
 SMVLEGGNDA LKLAIDNALS ITSDGLTIRL EGGVEPNKPV RYSYTRQARG SWSLNLVPI GHEKPSNIKV
 FIHELNAGNQ LSHMSPIYTI EMGDELLAKL ARDATFFVRA HESNEMQPTL AISHAGVS VV MAQAQPRREK
 RWSEWASGV LCLLDPLDGV YNYLAQQR CN LDDTWEGKIY RVLAGNPAKH DLDIKPTVIS HRLHFPEGGS
 LAALTAHQAC HLPLETFTRH RQPRGWEQLE QCGYPVQRLV ALYLAARLSW NQVDQVIRNA LASPGSGGDL
 GEAIREQPEQ ARLALTLAAA ESERFVRQGT GNDEAGAASA DVVSLTCPVA AGECA GPADS GDALLERNYP
 TGAEFLGDGG DISFSTRGTQ NWTVERLLQA HRQLEERGYV FVG YHGT FLE AAQSIVFGGV RARSQDLDAI
 WRGFYIAGDP ALAYGYAQDQ EPDARGRIRN GALLRVYVPR SSLPGFYRTG LTLAAPEAAAG EVERLIGHPL
 PLRLDAITGP EEEGGRLETI LGWPLAERTV VIPSAIPTDP RNVGGDL DPS SIPDKEQAIS ALPDYASQPG
 KPPREDLK (配列番号148)

20

【0276】

ペプチド合成

ペプチドを得るための方法は少なくとも4つある：(1) 生物学的システム（例えば、組織、血清、尿など）からの精製；(Donini Pら, *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1966; 52(2): 169-85およびDonini Pら, *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1966; 52(2): 186-98.) (2) タンパク質消化後のペプチドフラグメントの精製；(Schulz-Knappe Pら, *Eur J Med Res*. 1996; 1(5): 223-36ならびにKilara AおよびPanyam D. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003; 43(6): 607-33) (3) 当該技術分野で公知の遺伝子工学および組換え技術(Martial JAら, *Science*. 1979; 205(4406): 602-7)ならびに(4) 直接化学合成(*Peptide Synthesis and Applications*, 1984. Edited by John Howl (Methods in Molecular Biology, Vol. 298), Humana Press, Totowa, NJ. *Chemistry of Peptide Synthesis*, 2005. N. Leo Benoiton, CRC Press, Boca Raton, FL)。

30

【0277】

最初の2つの方法はペプチド配列の制御を欠くため、実用的でない場合が多い。最初の方法はまた、生物試料中のペプチド濃度が低く、精製前に大幅な濃縮段階を必要とすることから問題がある。したがって通常は、短いペプチドには直接化学合成が魅力的な選択肢であり、大きなペプチドには組換え技術が好ましい。

40

【0278】

従来の有機化学合成法は一般に、4または5個を超えるアミノ酸残基を有するペプチドに対しては、アミノ酸およびペプチドの複雑さを理由に実用的ではない。問題としては、ペプチド中に複数の反応基の存在し、その反応基がペプチド上に複数のコンジュゲーション部位を生じることで、対象とするペプチドに関して純粋ではないペプチド混合物を生じるため、各段階後に精製が必要であるということが挙げられる。(参考文献: Lehninger Principles of Biochemistry, 第3版, 2000. David L. NelsonおよびMichael M. Cox編, Worth P

50

ublishers, New York, NY.)。

【0279】

ペプチドを固体支持体の一端に固定化したままペプチドを合成する固相ペプチド合成 (Merri field, 1962) が登場したことにより、ペプチドの直接化学合成が大きく進歩した。今日、ほとんどの固相ペプチド合成が Fmoc 化学を含む。簡潔には、カルボキシル末端 (C 末端) からアミノ末端 (N 末端) へと化学合成が進行する。固相支持体は不溶性のポリマーまたはレジンである。9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基が、アミノ酸残基の α -アミノ基における不要な反応を阻止する。反応サイクルにおいて標準的な反応のセットを用いて、レジン上で 1 度に 1 アミノ酸ずつペプチドが形成される。最初に、Fmoc 基により保護された α -アミノ基を有する C 末端アミノ酸をレジン上の反応基と結合させる。レジンと結合したアミノ酸の α -アミノ基上の保護基を、一般には弱い有機塩基で除去する。この時点で、C 末端アミノ酸を有するレジンペプチドの 2 番目のアミノ酸を受け取る準備ができています。 α -アミノ基 (Fmoc) およびカルボキシル基 (一般的には、ジシクロヘキシルカルボジイミド、DCC) において異なる化学物質で保護されたアミノ酸がそれぞれ受け取られる。DCC を除去することにより 2 番目のアミノ酸のカルボキシル基が活性化され、固体支持体上の 1 番目のアミノ酸の脱保護された α -アミノ基と反応してペプチド結合を形成する (Peptide Synthesis and Applications, 1984. John Howl 編 (Methods in Molecular Biology, Vol. 298), Humana Press, Totowa, NJ. Chemistry of Peptide Synthesis, 2005. N. Leo Benoiton, CRC Press, Boca Raton, FL) (参考文献: Lehninger Principles of Biochemistry, 第3版, 2000. David L. Nelson および Michael M. Cox 編, Worth Publishers, New York, NY.)。

【0280】

サイクル内の連続する各段階において、保護化学基が不要な反応を阻止し、(i) 新生ペプチド上の α -アミノ基の脱保護; (ii) 次のアミノ酸上のカルボキシル基の活性化および (iii) ペプチド結合を形成する反応のシーケンスが、全ペプチド配列が合成されるまで続く。ペプチド合成が完了すると、レジンとペプチド間の連結が切断されて、最終的なペプチドが得られる。最先端の固相ペプチド合成技術は自動化されており、何種類かの市販の機器が現在入手可能であり、当該技術分野で公知である (Peptide Synthesis and Applications, 1984. John Howl 編 (Methods in Molecular Biology, Vol. 298), Humana Press, Totowa, NJ. Chemistry of Peptide Synthesis, 2005. N. Leo Benoiton, CRC Press, Boca Raton, FL; Lehninger Principles of Biochemistry, 第3版, 2000. David L. Nelson および Michael M. Cox 編, Worth Publishers, New York, NY.)。

【0281】

固相合成は長いペプチドのための段階的プロセスであることから、全収率が低いためにコストが増すという重要な制限がある。例えば、96% の段階的収率では、21mer、51mer および 100mer ペプチドの全収率は、それぞれ 44%、13% および 1.7% である。同様に、99.8% の段階的収率では、21mer、51mer および 100mer ペプチドの全収率は、それぞれ 96%、90% および 82% である。したがって、長いペプチドでは、遺伝子工学により発現カセット中に配列を合成し、適当な発現系 (例えば、大腸菌 (E. coli) または酵母のような微生物発現系) または哺乳動物発現系 (細胞培養) において発現させる方が、コスト的にも時間的にもより効率的である。しかし、小さなペプチドでは、遺伝子工学により配列を合成して発現させ、ペプチドを精製

するコストは、一般的に固相ペプチド合成と比べて、コスト的にも時間的にも効率的である。

【0282】

本発明に有用なペプチドは、上記方法または当該技術分野で公知の他の合成、発現もしくは精製方法を用いて合成、発現または精製される。

【0283】

dsRNA-ペプチドコンジュゲートの形成

少なくとも1のペプチドを第一もしくは第二鎖のいずれかまたは両方に、3'末端もしくは5'末端のいずれかまたは両方で、または内側でdsRNAとコンジュゲートする。本発明のペプチドは、ペプチド中の任意のアミノ酸残基を介して、例えば、C末端のC末端アミノ酸がC末端アミノ酸のカルボキシル基を介して、もしくはN末端のN末端アミノ酸がN末端アミノ酸の α -アミノ基を介して本発明のdsRNAと、またはアミノ酸残基上の特定の官能基（例えば、Cys上の-SH基またはLys上のアミノ基）とコンジュゲートし得る。

10

【0284】

dsRNAは、ペプチドまたはタンパク質のための当該技術分野で公知の任意のコンジュゲーション化学を用いて本発明のペプチドとコンジュゲートする（参考文献：Bioconjugate Techniques, 1996. Greg T. Hermanson, Academic Press, San Diego, CA.; Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, 1991. Shan S. Wong, CRC Press, Boca Raton, FL）。

20

【0285】

一実施形態では、 $(CH_2)_6NH_3$ リンカーを有する第一または第二鎖の5'末端を合成し、マレイミド化学を用いてペプチドのCysの-SH基とコンジュゲートし、安定なコンジュゲートを形成する。

【0286】

別の実施形態では、 $(CH_2)_6-SH$ リンカーを有する第一または第二鎖の3'末端を合成し、ジスルフィド交換を介してCysの-SH基またはペプチドとコンジュゲートし、切断可能なコンジュゲートを形成する。

30

【0287】

コンジュゲーション後に、dsRNA-ペプチドコンジュゲートを当該技術分野で公知の方法により精製し（Oehlke Jら, Eur J Biochem. 2002; 269(16): 4025-32, Hama TおよびMiller PS. Bioconjug Chem. 2003; 14(2): 320-30, Zatssepina TSら, Bioconjug Chem. 2005; 16(3): 471-89, Ferencs Gら, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2005; 24(5-7): 1059-61）、標準的な分析法により同一性および純度に関して特徴付ける。

【0288】

dsRNA-送達ペプチドコンジュゲートの機能の判定

本発明のdsRNA-ペプチドコンジュゲートを、dsRNAが適切な標的に送達され、かつRNAi切断を仲介する能力を判定するためにアッセイする（以下の「DsRNA活性を評価するためのRNAiインビトロアッセイ」と題する節に記載されている）。また本発明のdsRNAペプチドコンジュゲートを、ペプチドが適切な標的まで送達される能力を判定するためにアッセイする。

40

【0289】

一実施形態では、dsRNA-ペプチドまたは単独のペプチドが細胞表面と結合するか、または相互作用する。dsRNA-ペプチドコンジュゲートまたは単独のペプチドは、細胞膜を直接透過することにより、エンドサイトーシス経路により、その両方により、ま

50

たは当該技術分野で公知の他の方法により、細胞に取り込まれる。

【0290】

本発明の dsRNA-ペプチドコンジュゲートの機能性は、以下の方法による dsRNA オリゴヌクレオチドの定量化により判定し得る。

【0291】

血漿または組織試料由来の DsiRNA オリゴヌクレオチドを定量化するために使用される技術は、基質から分析物を単離するための固相抽出、それに続く逆相イオン対超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) による分離およびエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (ESI-MS/MS) による検出で構成される。分析機器は、Waters Quattro Premier 三連四重極型質量分析計と直列に接続されたフォ

10

【0292】

固相抽出は、Phenomenex の Clarity 抽出媒体およびプロトコルを用いて行う。オリゴを含有する血漿試料に「負荷/溶解」緩衝液を加えて、任意の結合したタンパク質を除去する。オリゴが固相媒体上に優先的に吸着される。次いで、一連の緩衝液を用いてオリゴを洗浄して、分離およびイオン化を阻害する夾雑物および塩を除去する。最後に、オリゴを媒体から溶出し、濃縮して、下流の分析に従った緩衝液中に懸濁する。

【0293】

クロマトグラフィーによる分離は、ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) とトリエチルアミン (TEA) の移動相および C₁₈ 固定相を用いて行う。質量分析検出は、エレクトロスプレーイオン化、次いでタンデム MS (MS/MS) 分析を用いて行う。その特定のオリゴヌクレオチド分子に特徴的な遷移を判定するように LC/MS システムを組み立てる。試料中の DsiRNA 含有量の定量化は、試料の MS 応答を、様々な濃度の試験試料中の同じ DsiRNA の標準曲線と比較することにより行う (Linら, J Pharm Biomed Anal. 2007 Jun 28; 44 (2): 330-341)。最終データを、試料の単位体積当たりの DsiRNA オリゴ質量の濃度 (例えば、ng/mL) として表す。

20

【0294】

DsiRNA の修飾

dsRNA および dsRNA-ペプチドコンジュゲートを細胞培養モデル内にインビトロでトランスフェクトし、dsRNA dsRNA-ペプチドコンジュゲート取り込みまたは送達の比較を確立する。適当な細胞培養モデルを使用し、エンドポイント測定には、限定されるわけではないが以下のもの: (i) qPCR を用いた mRNA 定量化; (ii) ウェスタンブロットを用いたタンパク質の定量化; (iii) dsRNA および dsRNA-ペプチドコンジュゲートの標識細胞への内部移行の 1 つ以上が含まれる。dsRNA および dsRNA-ペプチドコンジュゲート取り込みまたは送達の比較は、送達された dsRNA の量、dsRNA の送達速度および送達された dsRNA の安定性に関して、例えば、上記エンドポイント測定を用いて評価する。

30

40

【0295】

一つの例では、dsRNA または dsRNA-ペプチドコンジュゲートを HeLa 細胞内にトランスフェクトするために、24~48 ウェルプレート中でトランスフェクションを行う。適用前に、dsRNA および dsRNA-ペプチドコンジュゲートを細胞培地中に希釈し、室温で約 30 分間インキュベートする。用量反応実験用に、適用される dsRNA および dsRNA-ペプチドコンジュゲートの最終濃度を 0~50 nM の範囲内で変化させる。経時的実験用には、本明細書で定義されるような dsRNA が送達される速度を判定するために、用量反応実験から決定された dsRNA-ペプチドコンジュゲートの最適濃度を、様々なインキュベーション時間、例えば、30 分~7 日に関して調べる。

【0296】

50

ペプチドおよびdsRNAを蛍光タグで別々に標識して蛍光共局在実験を行うことにより、ペプチド、dsRNAおよびdsRNA-ペプチドコンジュゲートの機能性も試験する。ペプチドを緑色蛍光色素でタグを付け、dsRNAを赤色蛍光色素でタグを付ける。この方法を用いて遊離（すなわち、非コンジュゲート）dsRNAの局在と比較することにより、ペプチドが単独のペプチドおよびdsRNA-ペプチドコンジュゲートの両方を内部移行させる能力を確認する。以下の参考文献は、蛍光局在および細胞輸送実験を行う方法を記載している—Moschosら, Bioconj Chem. 2007; 18(5): 1450-1459; Moschosら, Biochemical Society Transactions 2007; 35(4): 807-810; Lord-Fontaineら, J. Neurotrauma 2008; 25: 1309-1322; Wintonら, J. Biol Chem. 2002; 36(6): 32820-32829; Lu, LangerおよびChen. Mol Pharm. 2009 Mar 30. [印刷前電子出版]; McNaughtonら, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Apr 14; 106(15): 6111-6116。

10

【0297】

dsRNAの修飾

二本鎖RNA（「dsRNA」）の作用を阻害する1つの主な因子は、ヌクレアーゼによるdsRNA（例えば、二本鎖RNA、siRNAおよびDsiRNA）の分解である。3'-エキソヌクレアーゼは血清中に存在する主要なヌクレアーゼ活性であり、分解を防ぐためにアンチセンスDNAオリゴヌクレオチドの3'末端を修飾することが重要である（Ederら, 1991, Antisense Res Dev, 1: 141-151）。siRNAの調節および分解に関与する3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する、ERI-1と呼ばれるRNアーゼ-Tファミリーヌクレアーゼが同定されている（Kennedyら, 2004, Nature 427: 645-649; Hongら, 2005, Biochem J, 390: 675-679）。この遺伝子は、マウスにおいてはThex1（NM_02067）として、またはヒトにおいてはTHEX1（NM_153332）としても知られており、ヒストンmRNAの分解に関与し；また、siRNAにおける3'-オーバーハングの分解も仲介するが、二本鎖RNAは分解しない（Yangら, 2006, J Biol Chem, 281: 30447-30454）。したがって、当然のことながら、本発明のDsiRNAを含めたdsRNAの3'末端安定化が安定性を向上させることが予想される。

20

30

【0298】

XRN1（NM_019001）は、Pボディ内に存在する5'→3'エキソヌクレアーゼであり、miRNAにより標的化されるmRNAの分解に関与するとされ（Rehwinkelら, 2005, RNA 11: 1640-1647）、また、siRNAに指令される内部切断により開始された分解の完了にも関与し得る。XRN2（NM_012255）は、核RNAプロセシングに関与する別の5'→3'エキソヌクレアーゼである。これらは共に、現在のところsiRNAおよびmiRNAの分解またはプロセシングには関与すると考えられていないが、RNAを分解することができる既知のヌクレアーゼであり、考慮すべき重要なことでもあり得る。

40

【0299】

RNアーゼAは、RNAを分解する、哺乳動物における主なエキソヌクレアーゼ活性である。これはssRNAに対して特異的であり、ピリミジン塩基の3'末端で切断する。RNアーゼA切断と一致するsiRNA分解産物を、血清中でのインキュベーション後の質量分析により検出し得る（Turnerら, 2007, Mol Biosyst 3: 43-50）。3'-オーバーハングは、siRNAのRNアーゼ分解に対する感受性を増強する。血清からのRNアーゼAの枯渇は、siRNAの分解を低下させ；この分解は配列に対するいくつかの配列選択性を確かに示し、末端にポリA/U配列を有する配列に対してはさらに劣る（Haupenthalら, 2006 Biochem Pharma

50

col 71:702-710)。このことは、二本鎖の低安定性領域が、RNアーゼAによる分解に利用される一時的な一本鎖種を「吐き出し」て提供することを示唆している。RNアーゼA阻害剤を血清に添加して、siRNAの寿命および効力を向上させ得る (Haupenthalら, 2007, Int J. Cancer 121:206-210)

【0300】

21merにおいて、ホスホロチオアートまたはボラノホスファート修飾は、ヌクレオシド間のリン酸結合を直接安定化させる。ボラノホスファート修飾RNAは、サイレンシング剤としてヌクレアーゼ耐性が高く、強力であり、かつ比較的無毒である。ボラノホスファート修飾RNAは、標準的な化学合成法を用いて製造することは不可能であり、代わりにインビトロ転写 (IVT) により作製される (Hallら, 2004, Nucleic Acids Res 32:5991-6000; Hallら, 2006, Nucleic Acids Res 34:2773-2781)。ホスホロチオアート (PS) 修飾は、任意の所望の位置でRNA二本鎖中に容易に配置することができ、かつ標準的な化学合成法を用いて作製することができる。PS修飾は用量依存的な毒性を示すため、ほとんどの研究者はsiRNA中への限定的な組込みを推奨し、ヌクレアーゼからの保護が最も重要である3'末端を好む (Harborthら, 2003, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 13:83-105; ChiuおよびRana, 2003, Mol Cell 10:549-561; Braaschら, 2003, Biochemistry 42:7967-7975; Amarzguiouira, 2003, Nucleic Acids Research 31:589-595)。より広範なPS修飾は、強力なRNAi活性と適合し得る; しかし、糖修飾の使用 (2'-O-メチルRNAなど) の方が優れている場合がある (Choungら, 2006, Biochem Biophys Res Commun 342:919-927)。

【0301】

様々な置換は、二本鎖の安定性 (Tm) を一般に増大させるリボースの2'位に配置することができ、ヌクレアーゼ耐性を大幅に向上させることができる。2'-O-メチルRNAiは、哺乳動物のリボソームRNAおよび転移RNAにおいて見られる天然の修飾である。siRNAにおける2'-O-メチル修飾が知られているが、効力を保持するために二本鎖内での修飾塩基の正確な位置が重要であり、RNAの2'-O-メチルRNAへの完全な置換はsiRNAを不活性化する。例えば、交互の2'-O-メチル塩基を用いるパターンは、未修飾RNAと同等の効力を有し、かつ血清中で非常に安定である (Choungら, 2006, Biochem Biophys Res Commun 342:919-927; Czaudernaら, 2003, Nucleic Acids Research 31:2705-2716)。

【0302】

2'-フルオロ (2'-F) 修飾もdsRNA (例えば、siRNAおよびDsiRNA) 機能に適合し; これはピリミジン部位で行われるのが最も一般的であり (試薬のコストおよび有用性による)、プリン位置での2'-O-メチル修飾と組み合わせることができる; 2'-Fプリンが入手可能であり、使用することもできる。この種の大幅に修飾された二本鎖は、インビトロでのRNAiの強力なトリガーとなり得 (Allersonら, 2005, J Med Chem 48:901-904; Prakashら, 2005, J Med Chem 48:4247-4253; KraynackおよびBaker, 2006, RNA 12:163-176)、かつインビボで使用した際に効果を向上させ、作用持続時間を延長させ得る (Morrisseyら, 2005, Hepatology 41:1349-1356; Morrisseyら, 2005, Nat Biotechnol 23:1002-1007)。交互の2'-Fおよび2'-O-Me塩基を含有する、非常に強力な、ヌクレアーゼ安定性である、平滑末端の19mer二本鎖がAllersonにより教示されている。この設計では、交互の2'-O-Me残基

が、C z a u d e r n aにより用いられたものと同じパターンで位置しているが、残りのRNA残基が2'-F修飾塩基に変換されている。M o r r i s s e yにより用いられた非常に強力なヌクレアーゼ耐性s i R N Aは、インビボで非常に強力なヌクレアーゼ耐性s i R N Aを用いた。2'-O-Me RNAおよび2'-F RNAに加え、この二本鎖は、DNA、RNA、反転した脱塩基残基および3'末端PSヌクレオシド間結合を含む。広範な修飾は特定の利点を有するが、より限定的な二本鎖修飾もインビボでの効果を向上させることができ、かつ製造がより容易かつ低コストである。S o u t s c h e kら(2004, N a t u r e 432:173-178)は、インビボで二本鎖を使用し、ほとんどのRNAが2つの2'-O-Me RNA塩基および限定的な3'末端PSヌクレオシド間結合を有していた。

10

【0303】

ロックト核酸(LNA)は、dsRNA(例えば、s i R N AおよびD s i R N A)を安定化するために使用し得る別の種類の2'-修飾である。効力を保持するLNA組み込みのパターンは、2'-O-メチルまたは2'-F塩基よりも限定されるため、限定的な修飾が好ましい(B r a a s c hら, 2003, B i o c h e m i s t r y 42:7967-7975; G r u n w e l l e rら, 2003, N u c l e i c A c i d s R e s 31:3185-3193; E l m e nら, 2005, N u c l e i c A c i d s R e s 33:439-447)。限定的な組み込みであっても、LNA修飾の使用はインビボでのdsRNAの効果を向上させることができ、かつオフターゲット効果プロファイルも向上させ得る(M o o kら, 2007, M o l C a n c e r T h e r 6:833-843)。

20

【0304】

細胞または生きた動物内に導入された合成核酸は、「異質である」として認識されて免疫応答を誘発する。免疫刺激は、実験結果を劇的に変化させ、細胞死さえ引き起こし得る、主なオフターゲット効果の種類を構成する。自然免疫系は、これらの応答を仲介する、DNAおよびRNAと特異的に相互作用する受容体分子の集合を含み、その一部は細胞質中に局在し、また一部はエンドソーム中に存在する(M a r q u e sおよびW i l l i a m s, 2005, N a t B i o t e c h n o l 23:1399-1405; S c h l e eら, 2006, M o l T h e r 14:463-470)。陽イオン性脂質またはリポソームによるs i R N Aの送達、s i R N Aを細胞質およびエンドソーム区画の両方に露出させ、インビトロおよびインビボの両方における1型インターフェロン(IFN)応答誘発の危険性を最大にする(M o r r i s s e yら, 2005, N a t B i o t e c h n o l 23:1002-1007; S i o u dおよびS o r e n s e n, 2003, B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m u n 312:1220-1225; S i o u d, 2005, J M o l B i o l 348:1079-1090; M aら, 2005, B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m u n 330:755-759)。細胞内で転写されるRNAは免疫原性が低く((R o b b i n sら, 2006, N a t B i o t e c h n o l 24:566-571)、脂質による方法を用いて送達した場合に免疫原性となる合成RNAは、力学的手段により細胞に導入すればインビボでさえ免疫刺激を回避し得る(H e i d e lら, 2004, N a t B i o t e c h n o l 22:1579-1582)。しかし、脂質による送達方法は、簡便、効率的であり、広く使用されている。特に、すべての細胞型が存在し、免疫応答を生じる危険性が最も高いインビボ適用に対しては、免疫応答を防ぐ何らかの一般的な戦略が必要とされる。化学修飾RNAの使用は、こうした問題の大部分、またはすべてでさえ解決し得る。

30

40

【0305】

特定の配列モチーフは他のものより明らかに免疫原性が強いが、自然免疫系の受容体は一般に、原核生物RNAよりも哺乳動物RNAにおいてよく見られる特定の塩基修飾の存在の有無を区別すると思われる。例えば、シュードウリジン、N6-メチル-Aおよび2'-O-メチル修飾塩基は「自己」として認識され、合成RNA内にこれらの残基を含む

50

ことは、免疫感知の回避に役立ち得る (Karikoら, 2005, Immunity 23:165-175)。未修飾RNAとして強い免疫刺激性のある配列の広範な2'-修飾は、マウスに静脈内投与された場合に免疫応答を阻止し得る (Morrisseyら, 2005, Nat Biotechnol 23:1002-1007)。しかし、免疫感知を回避するために広範な修飾は必要ではなく、ンビトロおよびインビボの両方での1型IFN応答を阻止するためには、siRNA二本鎖の一本の鎖におけるわずか2つの2'-O-メチル塩基の置換で十分であり得；修飾UおよびG塩基が最も有効である (Judgeら, 2006, Mol Ther 13:494-505)。さらなる利点として、2'-O-メチル塩基の選択的組込みは、オフターゲット効果の度を低下させ得る (Jacksonら, 2006, RNA 12:1197-1205)。したがって、2'-O-メチル塩基の使用は、インビボ適用を対象とするすべてのdsRNAに対して、免疫応答を阻止する手段として考慮されるべきであり、かつヌクレアーゼ安定性の向上およびオフターゲット効果の可能性の低減というさらなる利点を有する。

10

【0306】

細胞死は免疫刺激の結果生じ得るが、細胞生存率の評価はIFN応答の誘導をモニターするための適切な方法ではない。IFN応答は細胞死を伴わずに存在することがあり、細胞死はIFN誘発の非存在下で標的ノックダウンにより生じることがある (例えば、標的遺伝子が細胞生存に不可欠である場合)。関連するサイトカインを培地中で直接測定することが可能であり、そのようなアッセイの実施をルーティン化する様々な市販のキットが存在する。多くの異なった免疫エフェクター分子を測定し得るが、スクリーニング目的では通常、トランスフェクションの4時間および24時間後にIFN- α 、TNF- α およびIL-6のレベルを試験することで十分である。陽イオン性脂質は、特定の細胞において核酸カーゴの非存在下でも免疫応答を誘発し得るため、「トランスフェクション試薬のみの対照」を含むことが重要である。細胞培養研究では、IFN経路誘導に関する対照を含むことが考慮されるべきである。インビボで核酸を投与する場合は、IFN応答誘発の危険性が最も高いため、常に免疫刺激に関して試験することが不可欠である。

20

【0307】

修飾が、DsiRNA剤がダイサーの基質として働くことを妨げない限り、本発明のDsiRNA剤に修飾を含み得る。一実施形態では、DsiRNA剤のダイサープロセッシングを増強する1つ以上の修飾を行い得る。第二の実施形態では、より効率的なRNAi生成をもたらす1つ以上の修飾を行い得る。第三の実施形態では、より大きなRNAi効果を補助する1つ以上の修飾を行い得る。第四の実施形態では、細胞に送達される各DsiRNA剤分子当たりのより大きな効力を生じる1つ以上の修飾を行い得る。修飾は、3'末端領域、5'末端領域、3'末端および5'末端領域の両方、またはいくつかの場合には、配列内の様々な位置に組み込み得る。上記制限を考慮して、任意の数および組合せの修飾をDsiRNA剤内に組み込み得る。複数の修飾が存在する場合、それらは同じであっても異なってもよい。塩基、糖部分、リン酸骨格およびそれらの組合せに対する修飾が考えられる。いずれの5'末端もリン酸化し得る。

30

【0308】

リン酸骨格に関して考えられる修飾の例としては、メチルホスホナート、ホスホロチオアート、およびアルキルホスホトリエステルのようなホスホトリエステル修飾を含めたホスホナートなどが挙げられる。糖部分に関して考えられる修飾の例としては、2'-アルキルピリミジン、例えば2'-O-メチル、2'-フルオロ、アミノおよびデオキシ修飾などが挙げられる (例えば、Amarguioiら, 2003, Nucleic Acids Research 31:589-595を参照されたい)。塩基グループに関して考えられる修飾の例としては、脱塩基糖、2'-O-アルキル修飾ピリミジン、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5-(3-アミノアリル)-ウラシルなどが挙げられる。ロック核酸またはLNAも組み込み得る。他の多くの修飾が知られており、上記基準を満たす限り使用することができる。修飾の例は、米国特許第5,684,143号、第5,858,988号および第6,291,438号なら

40

50

びに米国特許出願公開第2004/0203145A1号にも開示されている。その他の修飾は、Herdewijn (2000, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10:297-310)、Eckstein (2000, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10:117-21)、Rusckowskiら (2000, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10:333-345)、Steinら (2001, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 11:317-25); Vorobjevら (2001, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 11:77-85) に開示されている。

【0309】

考えられる1つ以上の修飾をいずれかの鎖内に組み込み得る。DsiRNA剤における修飾の配置は、より大きな効力および安定性の付与、毒性の低下、ダイサープロセシングの増強および免疫応答の最小化を含めたDsiRNA剤の特性に大きな影響を与え得る。一実施形態では、アンチセンス鎖もしくはセンス鎖または両鎖が1つ以上の2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。別の実施形態では、アンチセンス鎖が2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含有する。別の実施形態では、アンチセンス鎖が、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドからなる3'オーバーハングを含有する。アンチセンス鎖は、追加の2'-O-メチル修飾ヌクレオチドも含み得る。

【0310】

本発明の特定の実施形態では、DsiRNA剤は、ダイサーによるそのプロセシングを増強する1つ以上の特性を有する。これらの実施形態によれば、DsiRNA剤は、それがダイサーによりプロセシングされて活性siRNAを生じるのに十分な長さ、ならびに少なくとも1つの以下の特性を有する：(i) DsiRNA剤は非対称である、例えば、アンチセンス鎖上に3'オーバーハングを有する、および(ii) DsiRNA剤は、ダイサーが結合してdsRNAを活性siRNAにプロセシングする方向を指定するために、センス鎖に修飾された3'末端を有する。この実施形態によれば、dsRNA中の最長鎖は25~35個のヌクレオチドを含む。一実施形態では、DsiRNA剤は、センス鎖が25~28個のヌクレオチドを含み、かつアンチセンス鎖が25~30個のヌクレオチドを含むような非対称となっている。したがって、得られたdsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端上にオーバーハングを有する。オーバーハングは1~4ヌクレオチド、例えば2ヌクレオチドである。センス鎖は5'リン酸も有し得る。

【0311】

他の実施形態では、ダイサープロセシングのために、DsiRNA剤のセンス鎖をセンス鎖の3'末端に位置する適切な修飾剤により修飾する、すなわち、ダイサーの結合およびプロセシングの方向を指定するようにDsiRNA剤を設計する。適切な修飾剤としては、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、非環状ヌクレオチドなどのようなヌクレオチド、蛍光分子などのような立体障害分子が挙げられる。非環状ヌクレオチドは、dNMP中に通常存在する2'-デオキシリボフラノシル糖の代わりに2'-ヒドロキシエトキシメチル基を有する。他のヌクレオチド修飾剤としては、3'-デオキシアデノシン (コルジセピン)、3'-アジド-3'-デオキシチミジン (AZT)、2', 3'-ジデオキシイノシン (ddI)、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアシチジン (3TC)、2', 3'-ジデオキシ-2', 3'-ジデオキシチミジン (d4T)、ならびに3'-アジド-3'-デオキシチミジン (AZT)、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアシチジン (3TC) および2', 3'-ジデオキシ-2', 3'-ジデオキシチミジン (d4T) の一リン酸ヌクレオチドを挙げ得る。一実施形態では、デオキシヌクレオチドを修飾剤として使用する。ヌクレオチド修飾剤を用いる場合、センス鎖の3'末端上のリボヌクレオチドを1~3個のヌクレオチド修飾剤または2個のヌクレオチド修飾剤に置換する。立体障害分子を用いる場合、それらをアンチセンス鎖の3'末端のリボヌクレオチドに結合させる。したがって、修飾剤の組み込みによって鎖の長さは変わらない。別の実施形態では、本発明は、アンチセンス鎖のダイサープロセシングの方向を指定するた

10

20

30

40

50

めに、D s i R N A 剤中で2つのD N A 塩基を代わりに用いることを考慮する。本発明のさらなる実施形態では、センス鎖3'末端およびアンチセンス鎖5'末端上で二本鎖の平滑末端を形成しているセンス鎖3'末端上の2つのリボヌクレオチドが、2つの末端D N A 塩基に置換され、2ヌクレオチドのR N A オーバーハングがアンチセンス鎖の3'末端上に位置する。これは、平滑末端上にD N A を、およびオーバーハング末端上にR N A 塩基を有する非対称組成物である。

【0312】

本発明のD s i R N A 剤のセンスとアンチセンス鎖は、細胞の細胞質中で見られる条件のような生物学的条件下でアニールする。さらに、D s i R N A 剤の、特にアンチセンス鎖の一配列の領域は、少なくとも19ヌクレオチドの配列長を有し、これらのヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端に隣接する21ヌクレオチド領域中にあり、かつ標的遺伝子から産生されるR N A のヌクレオチド配列と十分に相補的である。

【0313】

D s i R N A 剤はまた、1つ以上の以下のさらなる特性も有し得る：(a) アンチセンス鎖は典型的な21merから右方へのシフトを有する、(b) 鎖は完全に相補的でなくてもよい、すなわち、鎖は単純なミスマッチ対を含有し得る、および(c) ロックト核酸(1つまたは複数)のような塩基修飾がセンス鎖の5'末端に含まれ得る。「典型的な」21mer s i R N A は従来技術を用いて設計される。一技術では、試薬の1つが効果的であることを期待して、一般に様々な部分を、並行して、または同じ標的に対して特異的なくつかの異なるs i R N A 二本鎖を含有するプールにおいて試験する(J i ら, 2003, F E B S L e t t 552:247-252)。他の技術では、活性なR N A i エフェクター分子を得る可能性を高める設計規則およびアルゴリズムを用いる(S c h w a r z ら, 2003, C e l l 115:199-208; K h v o r o v a ら, 2003, C e l l 115:209-216; U i - T e i ら, 2004, N u c l e i c A c i d s R e s 32:936-948; R e y n o l d s ら, 2004, N a t B i o t e c h n o l 22:326-330; K r o l ら, 2004, J B i o l C h e m 279:42230-42239; Y u a n ら, 2004, N u c l A c i d s R e s 32(Webserver issue):W130-134; B o e s e ら, 2005, M e t h o d s E n z y m o l 392:73-96)。s i R N A のハイスループットな選択も開発されている(米国特許出願公開第2005/0042641A1号)。潜在的な標的部位を二次構造予測により解析することもできる(H e a l e ら, 2005, N u c l e i c A c i d s R e s 33(3):e30)。次いで、この21merを用いて、21merの5'末端上に3~9個の追加のヌクレオチドを含むように右方シフトを設計する。これらの追加のヌクレオチドの配列は、任意の配列を有し得る。一実施形態では、追加されるリボヌクレオチドは、標的遺伝子の配列に基づくものである。この実施形態においてさえ、標的配列とアンチセンスs i R N A の間の完全な相補性を必要としない。

【0314】

本発明のD s i R N A 剤の第一および第二のオリゴヌクレオチドは完全に相補的である必要はない。これらは、生物学的条件下でアニールし、かつ標的配列と十分に相補的なs i R N A を産生するダイサー基質を供給するために、実質的に相補的であることが必要なだけである。ロックト核酸またはL N A は当業者に公知である(E l m e n ら, 2005, N u c l e i c A c i d s R e s 33:439-447; K u r r e c k ら, 2002, N u c l e i c A c i d s R e s 30:1911-1918; C r i n e l l i ら, 2002, N u c l e i c A c i d s R e s 30:2435-2443; B r a a s c h および C o r e y, 2001, C h e m B i o l 8:1-7; B o n d e n s g a a r d ら, 2000, C h e m i s t r y 6:2687-2695; W a h l e s t e d t ら, 2000, P r o c N a t l A c a d S c i U S A 97:5633-5638)。一実施形態では、L N A をセンス鎖の5'末端で組み込む。別の実施形態では、アンチセンス鎖上に3'オーバーハングを含むように設計された二本

鎖のセンス鎖 5' 末端で LNA を組み込む。

【0315】

特定の実施形態では、本発明の DsiRNA 剤は非対称構造を有し、センス鎖は 25 塩基対の長さを有し、アンチセンス鎖は、2 塩基の 3' -オーバーハングを含む 27 塩基対の長さを有する。他の実施形態では、非対称構造を有するこの DsiRNA 剤はさらに、2 つのリボヌクレオチドの代わりにセンス鎖の 3' 末端に 2 つのデオキシヌクレオチドを含有する。

【0316】

2 つの別々のオリゴヌクレオチドを含有する特定の DsiRNA 剤組成物を、第三の構造体により連結し得る。第三の構造体は DsiRNA 剤上でのダイサー活性を阻止せず、標的遺伝子から転写された RNA の指令された破壊を阻害しない。一実施形態では、第三の構造体は化学連結基であり得る。多くの適切な化学連結基が当該技術分野で公知であり、使用することができる。あるいは、第三の構造体は、dsRNA 組成物を構成する 2 つのオリゴヌクレオチドのアニーリングの際にヘアピン構造を生じるように DsiRNA 剤の 2 つのオリゴヌクレオチドを連結する、オリゴヌクレオチドであり得る。ヘアピン構造は DsiRNA 剤上でのダイサー活性を阻止せず、標的 RNA の指令された破壊を阻害しない。

【0317】

特定の実施形態では、本発明の DsiRNA 剤は、ダイサーによるそのプロセッシングを増強するいくつかの特性を有する。このような実施形態によれば、DsiRNA 剤は、それがダイサーによりプロセッシングされて siRNA を生じるのに十分な長さ、ならびに少なくとも 1 つの以下の特性を有する：(i) DsiRNA 剤は非対称である、例えば、アンチセンス鎖上に 3' -オーバーハングを有する、および(ii) DsiRNA 剤は、ダイサーが結合して dsRNA を活性 siRNA にプロセッシングする方向を指定するために、センス鎖に修飾された 3' 末端を有する。これらの実施形態によれば、DsiRNA 剤中の最長鎖は 25 ~ 30 個のヌクレオチドを含む。一実施形態では、センス鎖が 25 ~ 30 個のヌクレオチドを含み、かつアンチセンス鎖が 25 ~ 28 個のヌクレオチドを含む。したがって、得られた dsRNA は、センス鎖の 3' 末端上にオーバーハングを有する。オーバーハングは 1 ~ 4 ヌクレオチド、例えば 2 ヌクレオチドなどである。アンチセンス鎖は 5' リン酸も有し得る。

【0318】

特定の実施形態では、ダイサープロセッシングのために、DsiRNA 剤のセンス鎖をセンス鎖の 3' 末端に位置する適切な修飾剤により修飾する、すなわち、ダイサーの結合およびプロセッシングの方向を指定するように DsiRNA 剤を設計する。適切な修飾剤としては、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、非環状ヌクレオチドなどのようなヌクレオチド、および蛍光分子などのような立体障害分子が挙げられる。非環状ヌクレオチドは、dNMP 中に通常存在する 2'-デオキシリボフラノシル糖の代わりに 2'-ヒドロキシエトキシメチルを有する。他のヌクレオチド修飾剤としては、3'-デオキシアデノシン（コルジセピン）、3'-アジド-3'-デオキシチミジン（AZT）、2', 3'-ジデオキシイノシン（ddI）、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアシチジン（3TC）、2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシチミジン（d4T）、ならびに 3'-アジド-3'-デオキシチミジン（AZT）、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアシチジン（3TC）および 2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシチミジン（d4T）の一リン酸ヌクレオチドを挙げ得る。一実施形態では、デオキシヌクレオチドを修飾剤として使用する。ヌクレオチド修飾剤を用いる場合、センス鎖の 3' 末端上のリボヌクレオチドを 1 ~ 3 個のヌクレオチドまたは 2 個のヌクレオチドに置換する。立体障害分子を用いる場合、それらをアンチセンス鎖の 3' 末端のリボヌクレオチドに結合させる。したがって、修飾剤の組込みによって鎖の長さは変わらない。別の実施形態では、本発明は、アンチセンス鎖のダイサープロセッシングの方向を指定するために、dsRNA 中で 2 つの DNA 塩基を代わりに用いることを考慮する。さらなる発明では、

アンチセンス鎖 5' 末端およびセンス鎖 3' 末端で二本鎖の平滑末端を形成している 2 つのリボヌクレオチドの代わりに、2 つの末端 DNA 塩基がセンス鎖の 3' 末端上に位置し、2 ヌクレオチドの RNA オーバーハングがアンチセンス鎖の 3' 末端上に位置する。これは、平滑末端上に DNA を、およびオーバーハング末端上に RNA 塩基を有する非対称組成物である。

【0319】

他の特定の実施形態では、ダイサープロセッシングのために、Ds i RNA 剤のアンチセンス鎖をアンチセンス鎖の 3' 末端に位置する適切な修飾剤により修飾する、すなわち、ダイサーの結合およびプロセッシングの方向を指定するように Ds i RNA 剤を設計する。適切な修飾剤としては、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、非環状ヌクレオチドなどのようなヌクレオチド、および蛍光分子などのような立体障害分子が挙げられる。非環状ヌクレオチドは、dNMP 中に通常存在する 2'-デオキシリボフラノシル糖の代わりに 2'-ヒドロキシエトキシメチルを有する。他のヌクレオチド修飾剤としては、3'-デオキシシアデノシン（コルジセピン）、3'-アジド-3'-デオキシチミジン（AZT）、2', 3'-ジデオキシイノシン（ddI）、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアシチジン（3TC）、2', 3'-ジデオキシ-2', 3'-ジデオキシチミジン（d4T）、ならびに 3'-アジド-3'-デオキシチミジン（AZT）、2', 3'-ジデオキシ-3'-チアシチジン（3TC）および 2', 3'-ジデオキシ-2', 3'-ジデオキシチミジン（d4T）の一リン酸ヌクレオチドを挙げ得る。一実施形態では、デオキシヌクレオチドを修飾剤として使用する。ヌクレオチド修飾剤を用いる場合、アンチセンス鎖の 3' 末端上のリボヌクレオチドを 1~3 個のヌクレオチドまたは 2 個のヌクレオチドに置換する。立体障害分子を用いる場合、それらをアンチセンス鎖の 3' 末端のリボヌクレオチドに結合させる。したがって、修飾剤の組み込みによって鎖の長さは変わらない。別の実施形態では、本発明は、ダイサープロセッシングの方向を指定するために、dsRNA 中で 2 つの DNA 塩基を代わりに用いることを考慮する。さらなる発明では、センス鎖 5' 末端およびアンチセンス鎖 3' 末端で二本鎖の平滑末端を形成している 2 つのリボヌクレオチドの代わりに、2 つの末端 DNA 塩基がアンチセンス鎖の 3' 末端上に位置し、2 ヌクレオチドの RNA オーバーハングがセンス鎖の 3' 末端上に位置する。これも、平滑末端上に DNA を、およびオーバーハング末端上に RNA 塩基を有する非対称組成物である。

【0320】

センスとアンチセンス鎖は、細胞の細胞質中で見られる条件のような生物学的条件下でアニールする。さらに、dsRNA の、特にアンチセンス鎖の一配列の領域は、少なくとも 19 ヌクレオチドの配列長を有し、これらのヌクレオチドは、アンチセンス鎖の 3' 末端に隣接し、かつ標的 RNA のヌクレオチド配列と十分に相補的である。

【0321】

さらに、ダイサーによる切断から生じるオリゴヌクレオチドセグメントが遺伝子発現の阻害に最も効果的であるオリゴヌクレオチドの一部となることが確実になるように、Ds i RNA 剤構造を最適化し得る。例えば、本発明の一実施形態では、Ds i RNA 剤構造の 27 bp オリゴヌクレオチドを合成し、このオリゴヌクレオチドでは、遺伝子発現を阻害する予想される 21~22 bp セグメントが、アンチセンス鎖の 3' 末端上に位置する。アンチセンス鎖の 5' 末端上に位置する残りの塩基は、ダイサーにより切断され、破棄される。この切断された部分は、相同（すなわち、標的配列の配列に基づく）または非相同であり得、核酸鎖を延長するために付加され得る。

【0322】

米国特許出願公開第 2007/0265220 号は、27mer Ds i RNA が、化学修飾がなくても、同等の 21mer siRNA 組成物を上回る向上した血清安定性を示すことを開示している。Ds i RNA 剤の修飾、例えば、上で詳述されているようなパターンでアンチセンス鎖中に 2'-O-メチル RNA を含むことなどは、5' リン酸の付加と組み合わせた場合、Ds i RNA 剤の安定性を向上させ得る。合成 RNA 二本鎖のす

すべての鎖に5'-リン酸を付加することは、ある程度のヌクレアーゼ安定性を付与するための安価かつ生理学的な方法となり得る。本発明のDsiRNA剤の化学修飾パターンは、このような薬剤の有効性を増強するように設計される。したがって、このような修飾は、DsiRNA剤の効力低下を回避する；DsiRNA剤のダイサープロセシングの阻害を回避する；DsiRNA剤の生体液中での安定性を向上させる（ヌクレアーゼ感受性を低下させる）；または自然免疫系による感知を阻止または回避するように設計される。このような修飾はまた、毒性であることを回避し、かつ本発明のDsiRNA剤の製造コストの増加を回避するまたは製造簡便性に影響を及ぼすようにも設計される。

【0323】

DsiRNA活性を評価するためのRNAiインビトロアッセイ

無細胞系においてRNAiを再現するインビトロアッセイを用いて、対象RNA配列（1つまたは複数）を標的とするDsiRNA構築物を評価し得る。このアッセイは、標的RNAに対するDsiRNAでの使用に適合させた、Tuschlら（1999, *Genes and Development*, 13, 3191-3197）およびZamoreら（2000, *Cell*, 101, 25-33）により記載されているシステムを含む。シンシチウム胚盤葉由来のショウジョウバエ（*Drosophila*）抽出物を用いて、インビトロでRNAi活性を再構築する。T7 RNAポリメラーゼを用いた、標的RNAを発現する適当なプラスミドからのインビトロ転写により、または化学合成により標的RNAを作製する。センスおよびアンチセンスDsiRNA鎖（例えば、それぞれ20 μ M）を、90℃で1分間、次いで37℃で1時間の緩衝液（100mM酢酸カリウム、30mM HEPES-KOH、pH7.4、2mM酢酸マグネシウムなど）中でのインキュベーションによりアニールさせ、次いで、溶解緩衝液（例えば、100mM酢酸カリウム、pH7.4の30mM HEPES-KOH、2mM酢酸マグネシウム）中で希釈する。アニーリングは、TBE緩衝液中、アガロースゲル上でのゲル電気泳動および臭化エチジウム染色によりモニターし得る。酵母を加えた糖蜜寒天上で回収し、卵膜除去して溶解させた、Oregon Rバエの0～2時間齢胚を用いて、ショウジョウバエ（*Drosophila*）溶解物を調製する。溶解物を遠心分離し、上清を単離する。アッセイは、50%溶解物 [vol/vol]、RNA（最終濃度10～50 pM）およびDsiRNA（最終濃度10 nM）含有10% [vol/vol] 溶解緩衝液を含有する反応混合物を含む。反応混合物はまた、10mMのクレアチンリン酸、10 μ g/mlのクレアチンホスホキナーゼ、100 μ MのGTP、100 μ MのUTP、100 μ MのCTP、500 μ MのATP、5mMのDTT、0.1 U/ μ LのRNasin（Promega）および100 μ Mの各アミノ酸も含有する。酢酸カリウムの最終濃度を100mMに調整する。反応物を氷上で予備会合を行い、25℃で10分間インキュベートしてからRNAを加え、次いで、25℃でさらに60分間インキュベートする。4体積の1.25×Passive Lysis Buffer（Promega）で反応を停止させる。標的RNAの切断を、RT-PCR解析または当該技術分野で公知の他の方法によりアッセイし、反応にDsiRNAを含めない対照反応と比較する。

【0324】

あるいは、内側で標識したアッセイ用のRNAを[アルファ- ^{32} P]CTPの存在下、インビトロ転写により調製して、スピンクロマトグラフィーによりG50 Sephadexカラムに通し、さらなる精製を行わずに標的RNAとして使用する。任意に、T4ポリヌクレオチドキナーゼ酵素を用いて、標的RNAを5'- ^{32} P末端標識する。上記のようにアッセイを行い、標的RNAおよびRNAiにより生じた特定のRNA断片をゲルのオートラジオグラフ上で可視化する。インタクトの対照RNAまたはDsiRNAを含まない対照反応のRNAおよびアッセイにより生じた切断産物を表すバンドのPHOSPHOR IMAGER（登録商標）（オートラジオグラフィー）定量化により、切断のパーセンテージを決定する。

【0325】

一実施形態では、このアッセイを用いて、DsiRNA仲介によるRNAi切断のため

の対象RNA標的中の標的部位を決定し、ここでは、例えば、標識された標的RNAの電気泳動またはノーザンブロッティングのみならず、当該技術分野で公知の他の方法によりアッセイ反応を解析することで、RNAi仲介による対象RNA標的の切断に関して複数のDsiRNA構築物をスクリーニングする。

【0326】

d siRNA-ペプチド剤の構造

特定の実施形態では、本発明のd siRNA剤は、以下の構造のいずれかを有し得る。

【0327】

1つの上記実施形態では、d siRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

10

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1~4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」=DNAであり、かつ「P」=ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

【0328】

別の上記実施形態では、d siRNAは：

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

20

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1~4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」=DNAであり、かつ「P」=ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

【0329】

別の上記実施形態では、d siRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

30

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1~4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」=DNAであり、かつ「P」=ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

【0330】

別の上記実施形態では、d siRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

40

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

を含み、「X」=RNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1~4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」=DNAであり、かつ「P」=ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

【0331】

別の上記実施形態では、d siRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1~4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」=DNAであり、かつ「P」=ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

【0332】

別の上記実施形態では、d siRNAは：

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

50

3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「Y」は任意に2'－O－メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」＝DNAであり、かつ「P」＝ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

【0333】

別の上記実施形態では、dsRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「Y」は任意に2'－O－メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」＝DNAであり、かつ「P」＝ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

10

【0334】

別の上記実施形態では、dsRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「Y」は任意に2'－O－メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」＝DNAであり、かつ「P」＝ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

20

【0335】

別の上記実施形態では、dsRNAは：

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「Y」は任意に2'－O－メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」＝DNAであり、かつ「P」＝ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

【0336】

別の上記実施形態では、dsRNAは：

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「Y」は任意に2'－O－メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」＝DNAであり、かつ「P」＝ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

30

【0337】

別の実施形態では、DsiRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

10

20

30

40

50

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

20

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

30

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

40

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

10

20

30

40

50

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

10

20

30

40

50

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

10

20

30

40

50

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

10	
20	
30	
40	
50	

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

10

20

30

40

50

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

10

20

30

40

50

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

10

20

30

40

50

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

10

20

30

40

50

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

10

20

30

40

50

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

10

20

30

40

50

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

10

20

30

40

50

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

10

20

30

40

50

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

10

20

30

40

50

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

10

20

30

40

50

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

10

20

30

40

50

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

10

20

30

40

50

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

10

20

30

40

50

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

50

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

10

20

30

40

50

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

10

20

30

40

50

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

10

20

30

40

50

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

10

20

30

40

50

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

10

20

30

40

50

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
 3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
 または
 5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

10

20

30

40

50

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または

10

20

30

40

50

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'
または
5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDDP-3'
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
または
5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

10

20

30

40

50

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

10

20

30

40

50

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'

または

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

または

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXP-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「X」=2'-O-メチルRNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1~4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、下線部の残基は2'-O-メチルRNAモノマーであり、「D」=DNAであり、かつ「P」=ペプチドである。上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。

【0338】

別の実施形態では、dsRNAは長さの等しい鎖を含む。

【0339】

1つの上記実施形態では、dsRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「M」は核酸残基（RNA、DNAまたは非天然もしくは修飾核酸）であり、かつ「P」=ペプチドである。上記薬剤の上記残基はいずれも、任意に2'-O-メチルRNAモノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の3'末端残基から始まる2'-O-メチルRNAモノマーの交互位置を、上記平滑-平滑dsRNA剤において使用してもよい。

【0340】

1つの上記実施形態では、dsRNAは：

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「M」は核酸残基（RNA、DNAまたは非天然もしくは修飾核酸）であり、かつ「P」=ペプチドである。上記薬剤の上記残基はいずれも、任意に2'-O-メチルRNAモノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の3'末端残基から始まる2'-O-メチルRNAモノマーの交互位置を、上記平滑-平滑dsRNA剤において使用してもよい。

【0341】

1つの上記実施形態では、dsRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-3'

10

20

30

40

50

3' -XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「M」は核酸残基（RNA、DNAまたは非天然もしくは修飾核酸）であり、かつ「P」＝ペプチドである。上記薬剤の上記残基はいずれも、任意に2'－O－メチルRNAモノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の3'末端残基から始まる2'－O－メチルRNAモノマーの交互位置を、上記平滑－平滑dsRNA剤において使用してもよい。

【0342】

1つの上記実施形態では、dsRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「M」は核酸残基（RNA、DNAまたは非天然もしくは修飾核酸）であり、かつ「P」＝ペプチドである。上記薬剤の上記残基はいずれも、任意に2'－O－メチルRNAモノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の3'末端残基から始まる2'－O－メチルRNAモノマーの交互位置を、上記平滑－平滑dsRNA剤において使用してもよい。

【0343】

1つの上記実施形態では、dsRNAは：

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-3'

3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「M」は核酸残基（RNA、DNAまたは非天然もしくは修飾核酸）であり、かつ「P」＝ペプチドである。上記薬剤の上記残基はいずれも、任意に2'－O－メチルRNAモノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の3'末端残基から始まる2'－O－メチルRNAモノマーの交互位置を、上記平滑－平滑dsRNA剤において使用してもよい。

【0344】

1つの上記実施形態では、dsRNAは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「M」は核酸残基（RNA、DNAまたは非天然もしくは修飾核酸）であり、かつ「P」＝ペプチドである。上記薬剤の上記残基はいずれも、任意に2'－O－メチルRNAモノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の3'末端残基から始まる2'－O－メチルRNAモノマーの交互位置を、上記平滑－平滑dsRNA剤において使用してもよい。

【0345】

1つの上記実施形態では、dsRNAは：

5'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-3'

3'-PXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMP-5'

を含み、配列中、「X」＝RNAであり、「M」は核酸残基（RNA、DNAまたは非天然もしくは修飾核酸）であり、かつ「P」＝ペプチドである。上記薬剤の上記残基はいずれも、任意に2'－O－メチルRNAモノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の3'末端残基から始まる2'－O－メチルRNAモノマーの交互位置を、上記平滑－平滑dsRNA剤において使用してもよい。

【0346】

本発明はまた、以下に記載する典型的な構造のいずれかを考慮し、これらの構造では、少なくとも1つの本発明のペプチドが、本発明のdsRNAの第一もしくは第二鎖の少なくとも一方の少なくとも一端と、または第一もしくは第二鎖の少なくとも一方と内側でコンジュゲートされている。

【0347】

別の実施形態では、DsiRNAは、ダイサー切断を方向付ける働きをする1～3個のミスマッチ残基を有する長さの等しい鎖を含む（特に、第一鎖と第二鎖が互いにアニール

10

20

30

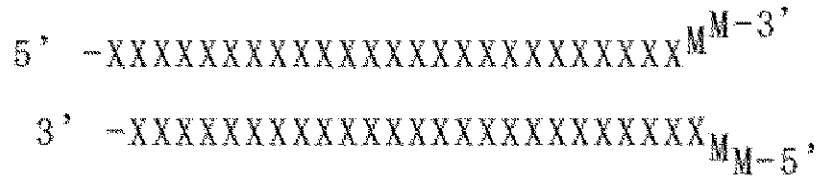
40

50

する場合、D s i R N A の第一鎖上の 3' 末端残基から数えて 1、2 または 3 位の 1 つ以上が、第二鎖上の 5' 末端領域の対応する残基とミスマッチである）。2 個の末端ミスマッチ残基を有する典型的な 27mer D s i R N A 剤を示す：

【0348】

【化1】



10

【0349】

配列中、「X」=RNAであり、「M」は、鎖がアニールする場合、別の相補的な鎖の対応する「M」残基と塩基対（水素結合）を形成しない核酸残基（RNA、DNAまたは非天然もしくは修飾核酸）である。上記薬剤の残基はいずれも、任意に 2'-O-メチルRNAモノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の 3' 末端残基から始まる 2'-O-メチルRNAモノマーの交互位置を、上記「平滑／ほつれ（f r a y）」D s i R N A 剤において使用してもよい。上の鎖（第一鎖）がセンス鎖であり、下の鎖（第二鎖）がアンチセンス鎖である。

【0350】

20

特定のさらなる実施形態では、本発明は、予測されるセンス鎖ダイサー切断部位の 3' およびそれに対応して、予測されるアンチセンス鎖ダイサー切断部位の 5' に位置する二本鎖核酸（d s N A）の領域内に 1 つ以上の塩基対形成したデオキシリボヌクレオチドを有する、RNA干渉（RNAi）のための組成物を提供する。本発明の組成物は、前駆体分子である d s N A を含む、すなわち、本発明の d s N A は、インビボでプロセシングされて活性な小型の干渉核酸（s i R N A）を生じる。d s N A はダイサーによりプロセシングされて、R I S C 内に組み込まれる活性 s i R N A となる。

【0351】

特定の実施形態では、本発明の D s i R N A 剤は、以下の典型的な構造のいずれかを有し得る。

30

【0352】

1 つの上記実施形態では、D s i R N A は：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*D_NDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*D_NXX-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「Y」は任意に 2'-O-メチルRNAモノマーである 0～10 個のRNAモノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に 2'-O-メチルRNAモノマーである 1～4 個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」=DNAであり、かつ「N」=1～50 以上であるが、任意に 1～8 である。「N*」=0～15 以上であるが、任意に 0、1、2、3、4、5 または 6 である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖である。

40

【0353】

関連する一実施形態では、D s i R N A は：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*D_NDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*D_NDD-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「Y」は任意に 2'-O-メチルRNAモノマーである 0～10 個のRNAモノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に 2'-O-メチルRNAモノマーである 1～4 個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」=DNAであり、かつ

50

「N」= 1～50以上であるが、任意に1～8である。「N*」= 0～15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖である。

【0354】

別の上記実施形態では、D s i R N Aは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*D_NDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*D_NZZ-5'

を含み、配列中、「X」= RNAであり、「X」= 2'-O-メチルRNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである0～10個のRNAモノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」= DNAであり、「Z」= DNAまたはRNAであり、かつ「N」= 1～50以上であるが、任意に1～8である。「N*」= 0～15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖であり、2'-O-メチルRNAモノマーが上の図に今示した下の鎖ではなく、上の鎖に沿った交互の残基に位置する。

10

【0355】

別の上記実施形態では、D s i R N Aは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*D_NDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*D_NZZ-5'

を含み、配列中、「X」= RNAであり、「X」= 2'-O-メチルRNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである0～10個のRNAモノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」= DNAであり、「Z」= DNAまたはRNAであり、かつ「N」= 1～50以上であるが、任意に1～8である。「N*」= 0～15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖であり、2'-O-メチルRNAモノマーが上の図に今示した下の鎖ではなく、上の鎖に沿った交互の残基に位置する。

20

30

【0356】

別の実施形態では、D s i R N Aは：

5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*[X1/D1]_NDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*[X2/D2]_NZZ-5'

を含み、配列中、「X」= RNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである0～10個のRNAモノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」= DNAであり、「Z」= DNAまたはRNAであり、かつ「N」= 1～50以上であるが、任意に1～8であり、ここでは、少なくとも1つのD_{1N}が上の鎖中に存在し、かつ下の鎖中の対応するD_{2N}と塩基対を形成している。任意に、D_{1N}およびD_{1N+1}は、対応するD_{2N}およびD_{2N+1}と塩基対を形成する塩基である；D_{1N}、D_{1N+1}およびD_{1N+2}は、対応するD_{2N}、D_{1N+1}およびD_{1N+2}と塩基対を形成する塩基である、などである。「N*」= 0～15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖であり、2'-O-メチルRNAモノマーが上の図に今示した下の鎖ではなく、上の鎖に沿った交互の残基に位置する。

40

【0357】

50

上で示した構造のいずれにおいても、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかの 5' 末端は、リン酸基を任意に含む。

【0358】

別の実施形態では、DNA : DNA-伸長 D s i RNA は、ダイサー切断を方向付ける働きをする 1~3 個のミスマッチ残基を有する長さの等しい鎖を含む（特に、第一鎖と第二鎖が互いにアニールする場合、D s i RNA の第一鎖上の 3' 末端残基から数えて 1、2 または 3 位の 1 つ以上が、第二鎖上の 5' 末端領域の対応する残基とミスマッチである）。2 個の末端ミスマッチ残基を有する典型的な DNA : DNA-伸長 D s i RNA 剤を示す：

【0359】

【化 2】

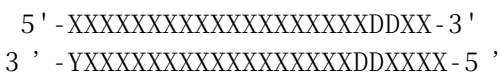


【0360】

配列中、「X」= RNA であり、「M」は、鎖がアニールする場合、別の相補的な鎖の対応する「M」残基と塩基対（水素結合）を形成しない核酸残基（RNA、DNA または非天然もしくは修飾核酸）であり、「D」= DNA であり、かつ「N」= 1~50 以上であるが、任意に 1~8 である。「N*」= 0~15 以上であるが、任意に 0、1、2、3、4、5 または 6 である。上記薬剤の残基はいずれも、任意に 2'-O-メチル RNA モノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の 3' 末端残基から始まる 2'-O-メチル RNA モノマーの交互位置を、上記「平滑／ほつれ（f r a y）」D s i RNA 剤において使用してもよい。一実施形態では、上の鎖（第一鎖）がセンス鎖であり、下の鎖（第二鎖）がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖である。また非対称／オーバーハング薬剤に関して上に示されるものと同等な修飾および DNA : DNA 延長パターンを、上記「平滑／ほつれ（f r a y e d）」薬剤内に組み込んでもよい。

【0361】

一実施形態では、ダイサー切断の特定の方向付けを介して機能するように形成された部位に位置するデオキシリボヌクレオチドを含む、長さが延長された D s i RNA 剤が提供されるが、これは、塩基対形成したデオキシリボヌクレオチドの存在を d s N A 構造中に必要としない。このような分子の典型的な構造を示す：



配列中、「X」= RNA であり、「Y」は任意に 2'-O-メチル RNA モノマーである 0~10 個の RNA モノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に 2'-O-メチル RNA モノマーである 1~4 個の RNA モノマーからなるオーバーハングドメインであり、かつ「D」= DNA である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖である。上記構造は、その一次プロセッシング後形態として最低で 21 m e r の二本鎖をダイサーに切断させるように形成されている。上記構造の下の鎖がアンチセンス鎖である実施形態では、2 つのデオキシリボヌクレオチド残基がアンチセンス鎖の 5' 末端の最終残基および最後から 2 番目の残基に位置することにより、オフターゲット効果が減少すると思われる（先行研究では、少なくともアンチセンス鎖の 5' 末端から最後から 2 番目の 2'-O-メチル修飾がオフターゲット効果を減少させることが示されている；例えば、米国特許出願公開第 2007/0223427 号を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0362】

一実施形態では、D s i R N A は：

5'-D_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*Y-3'

3'-D_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである0~10個のRNAモノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1~4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、「D」=DNAであり、かつ「N」=1~50以上であるが、任意に1~8である。「N*」=0~15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖である。

10

【0363】

関連する一実施形態では、D s i R N A は：

5'-D_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*DD-3'

3'-D_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*XX-5'

を含み、配列中、「X」=RNA、任意に2'-O-メチルRNAモノマーであり、「D」=DNAであり、かつ「N」=1~50以上であるが、任意に1~8である。「N*」=0~15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖である。

20

【0364】

別の上記実施形態では、D s i R N A は：

5'-D_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*DD-3'

3'-D_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*ZZ-5'

を含み、配列中、「X」=RNA、任意に2'-O-メチルRNAモノマーであり、「D」=DNAであり、かつ「N」=1~50以上であるが、任意に1~8である。「N*」=0~15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。「Z」=DNAまたはRNAである。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖であり、2'-O-メチルRNAモノマーが上の図に今示した下の鎖ではなく、上の鎖に沿った交互の残基に位置する。

30

【0365】

別の上記実施形態では、D s i R N A は：

5'-D_NZZXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*DD-3'

3'-D_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*ZZ-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「X」=2'-O-メチルRNAであり、「D」=DNAであり、「Z」=DNAまたはRNAであり、かつ「N」=1~50以上であるが、任意に1~8である。「N*」=0~15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖であり、2'-O-メチルRNAモノマーが上の図に今示した下の鎖ではなく、上の鎖に沿った交互の残基に位置する。

40

【0366】

別の上記実施形態では、D s i R N A は：

5'-D_NZZXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*Y-3'

3'-D_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_N*-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「X」=2'-O-メチルRNAであり、「D」=DNAであり、「Z」=DNAまたはRNAであり、かつ「N」=1~50以上であるが、任意に1~8である。「N*」=0~15以上であるが、任意に0、1、2、3、

50

4、5または6である。「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである0～10個のRNAモノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインである。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖であり、2'-O-メチルRNAモノマーが上の図に今示した下の鎖ではなく、上の鎖に沿った交互の残基に位置する。

【0367】

別の実施形態では、Ds i RNAは：

5'-[X1/D1]_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_{N*}DD-3'

10

3'-[X2/D2]_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_{N*}ZZ-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「D」=DNAであり、「Z」=DNAまたはRNAであり、かつ「N」=1～50以上であるが、任意に1～8であり、ここでは、少なくとも1つのD_{1N}が上の鎖中に存在し、かつ下の鎖中の対応するD_{2N}と塩基対を形成している。任意に、D_{1N}およびD_{1N+1}は、対応するD_{2N}およびD_{2N+1}と塩基対を形成する塩基である；D_{1N}、D_{1N+1}およびD_{1N+2}は、対応するD_{2N}、D_{1N+1}およびD_{1N+2}と塩基対を形成する塩基である、などである。「N*」=0～15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖であり、2'-O-メチルRNAモノマーが上の図に今示した下の鎖ではなく、上の鎖に沿った交互の残基に位置する。

20

【0368】

関連する一実施形態では、Ds i RNAは：

5'-[X1/D1]_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_{N*}Y-3'

3'-[X2/D2]_NXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX_{N*}-5'

を含み、配列中、「X」=RNAであり、「D」=DNAであり、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである0～10個のRNAモノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に2'-O-メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、かつ「N」=1～50以上であるが、任意に1～8であり、ここでは、少なくとも1つのD_{1N}が上の鎖中に存在し、かつ下の鎖中の対応するD_{2N}と塩基対を形成している。任意に、D_{1N}およびD_{1N+1}は、対応するD_{2N}およびD_{2N+1}と塩基対を形成する塩基である；D_{1N}、D_{1N+1}およびD_{1N+2}は、対応するD_{2N}、D_{1N+1}およびD_{1N+2}と塩基対を形成する塩基である、などである。「N*」=0～15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖であり、2'-O-メチルRNAモノマーが上の図に今示した下の鎖ではなく、上の鎖に沿った交互の残基に位置する。

30

【0369】

上で示した構造のいずれにおいても、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかの5'末端は、リン酸基を任意に含む。

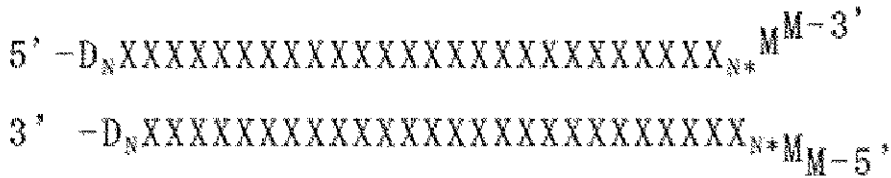
40

【0370】

別の実施形態では、DNA：DNA-伸長Ds i RNAは、ダイサー切断を方向付ける働きをする1～3個のミスマッチ残基を有する長さの等しい鎖を含む（特に、第一鎖と第二鎖が互いにアニールする場合、Ds i RNAの第一鎖上の3'末端残基から数えて1、2または3位の1つ以上が、第二鎖上の5'末端領域の対応する残基とミスマッチである）。2個の末端ミスマッチ残基を有する典型的なDNA：DNA-伸長Ds i RNA剤を示す：

【0371】

【化 3】

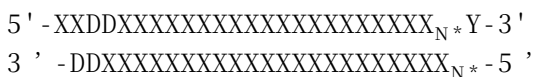


【0372】

配列中、「X」＝RNAであり、「M」は、鎖がアニールする場合、別の相補的な鎖の対応する「M」残基と塩基対（水素結合）を形成しない核酸残基（RNA、DNAまたは非天然もしくは修飾核酸）であり、「D」＝DNAであり、かつ「N」＝1～50以上であるが、任意に1～8である。「N*」＝0～15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。上記薬剤の残基はいずれも、任意に2'－O－メチルRNAモノマーであってもよく、また上記非対称の薬剤で示されるような下の（第二）鎖の3'末端残基から始まる2'－O－メチルRNAモノマーの交互位置を、上記「平滑末端／ほつれ（fray）」DsiRNA剤において使用してもよい。一実施形態では、上の鎖（第一鎖）がセンス鎖であり、下の鎖（第二鎖）がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖である。また非対称／オーバーハングに関して上に示されるものと同等な修飾およびDNA：DNA延長パターンを、上記「平滑末端／ほつれ（frayed）」薬剤内に組み込んでもよい。

【0373】

別の実施形態では、ダイサー切断の特定の方向付けを介して機能するように形成された部位に位置するデオキシリボヌクレオチドを含む、長さが延長されたDsiRNA剤が提供されるが、これは、塩基対形成したデオキシリボヌクレオチドの存在をdsRNA構造中に必要としない。このような分子の典型的な構造を示す：



配列中、「X」＝RNAであり、「Y」は任意に2'－O－メチルRNAモノマーである0～10個のRNAモノマーからなる任意選択のオーバーハングドメインであり、特定の実施形態では、「Y」は任意に2'－O－メチルRNAモノマーである1～4個のRNAモノマーからなるオーバーハングドメインであり、かつ「D」＝DNAである。「N*」＝0～15以上であるが、任意に0、1、2、3、4、5または6である。一実施形態では、上の鎖がセンス鎖であり、下の鎖がアンチセンス鎖である。あるいは、下の鎖がセンス鎖であり、上の鎖がアンチセンス鎖である。上記構造は、その一次プロセッシング後形態として最低で21merの二本鎖をダイサーに切断させるように形成されている。上記構造の下の鎖がアンチセンス鎖である実施形態では、2つのデオキシリボヌクレオチド残基がアンチセンス鎖の5'末端の最終残基および最後から2番目の残基に位置することにより、オフターゲット効果が減少すると思われる（先行研究では、少なくともアンチセンス鎖の5'末端から最後から2番目の2'－O－メチル修飾がオフターゲット効果を減少させることが示されている；例えば、米国特許出願公開第2007/0223427号を参照されたい）。

【0374】

特定の実施形態では、上記構造のいずれかの「D」残基は、少なくとも1つのPS-DNAまたはPS-RNAを含む。任意に、上記構造のいずれかの「D」残基は、ダイサー切断を阻害する少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。

【0375】

上記「DNA延長」DsiRNA剤は、「左延長」または「右延長」のいずれかに分類し得るが、単一薬剤内に左および右の両延長DNAを含有する配列を含む（例えば、コアドsRNA構造を囲む両側がdsRNA延長である）DsiRNA剤も、「右延長」および「左延長」薬剤に関して本明細書に記載のものと同様の方法で生成して使用し得る。

【0376】

いくつかの実施形態では、本発明の D s i R N A は、D N A : D N A - 伸長 D s i R N A 剤のセンス鎖とアンチセンス鎖を連結する連結部分またはドメインをさらに含む。任意に、このような連結部分ドメインは、センス鎖の 3' 末端とアンチセンス鎖の 5' 末端を連結する。連結部分は、オリゴメチレンジオールリンカー、オリゴエチレングリコールリンカーまたはその他の当該技術分野で認められているリンカー部分のような化学（非ヌクレオチド）リンカーであり得る。あるいは、リンカーは、任意に延長ループおよび／またはテトラループを含むヌクレオチドリリンカーであり得る。

【0377】

一実施形態では、D s i R N A 剤は、センス鎖が 25 塩基対の長さであり、アンチセンス鎖が 1 ~ 4 塩基 3' - オーバーハング（例えば、1 塩基 3' - オーバーハング、2 塩基 3' - オーバーハング、3 塩基 3' - オーバーハングまたは 4 塩基 3' - オーバーハング）を有する 27 塩基対の長さである、非対称構造を有する。別の実施形態では、この D s i R N A 剤は、センス鎖の 3' 末端に 2 個のデオキシヌクレオチドをさらに含有する非対称構造を有する。

10

【0378】

別の実施形態では、D s i R N A 剤は、アンチセンス鎖が 25 塩基対の長さであり、センス鎖が 1 ~ 4 塩基 3' - オーバーハング（例えば、1 塩基 3' - オーバーハング、2 塩基 3' - オーバーハング、3 塩基 3' - オーバーハングまたは 4 塩基 3' - オーバーハング）を有する 27 塩基対の長さである、非対称構造を有する。別の実施形態では、この D s i R N A 剤は、アンチセンス鎖の 3' 末端に 2 個のデオキシヌクレオチドをさらに含有する非対称構造を有する。

20

【0379】

上記本発明の平滑／ほつれ（f r a y）薬剤に関して、ほつれ（f r a y e d）末端構造の正確な配列は有効性に重要ではないことが認められており、例えば、第一鎖の 1 個または 2 個の 3' 末端残基が、第二鎖の対応する 5' 末端残基と非相補的であるだけでよい。特定の実施形態では、本発明の D s i R N A 剤は、例えば、第一鎖の少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個または少なくとも 26 個の残基が、第二鎖の対応する残基と相補的であることが必要である。特定の関連する実施形態では、第二鎖の対応する残基に相補的なこれらの第一鎖残基は任意に、連続した残基である。加えておよび／またはあるいは、特定のミスマッチ残基が、例えばセンス鎖の 5' 側半分の中に位置していてもよく、これは、特定の実施形態では、第一鎖と第二鎖の間の完全な相補性が、第一鎖の 3' 末端／第二鎖の 5' 末端におけるほつれ（f r a y）構造を除いても、第一および第二鎖の全体にわたって適用されるのではないという意味であり、このような実施形態では、第一鎖と第二鎖の間の残基全体の相補性の程度は、ほつれ（f r a y e d）薬剤のための第一鎖の 2 つの 3' 末端残基／第二鎖の 2 つの 5' 末端残基を任意に除き、残基の少なくとも 80 %、残基の少なくとも 85 %、残基の少なくとも 90 %、残基の少なくとも 90 %、残基の少なくとも 96 % であるが、第一鎖は有効な第一鎖であり得る。特定の実施形態では、第一鎖に対する、または標的 R N A 配列に対する本発明の D s i R N A の第二鎖の相補性の程度は、このような D s i R N A の第一鎖に関して上で記載したものと同等の、第一鎖または標的 R N A 配列との相補性のレベルであり得る。

30

40

【0380】

R N A プロセシング

s i R N A

s i R N A 伸介による R N A i のプロセスは、細胞内の長い d s R N A 分子の存在により誘発される。R N A i の開始段階において、これらの d s R N A は、2 つの R N A ーゼ I I I 様ドメインを含む酵素の保存されたファミリーであるダイサーにより 21 ~ 23 ヌクレオチド（n t）の低分子干渉 R N A 二本鎖（s i R N A）に分解される（B e r n s t e i n ら、2001；E l b a s h i r ら、2001）。s i R N A は、各鎖上の 19

50

～21塩基対の二本鎖領域および2ヌクレオチドの3'オーバーハングを特徴とする。RNAiのエフェクター段階では、siRNAはRNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)と呼ばれる多量体タンパク質複合体の中に組み込まれ、そこでは、分解のための完全に相補的なmRNA基質を選択するためのガイドとして働く。分解はsiRNAに相補的な領域内でのmRNAのヌクレオチド鎖切断により開始される。より正確には、ガイドsiRNAの5'末端から10ヌクレオチドの位置でmRNAが切断される(Elbashirら, 2001 Genes & Dev. 15:188-200; Nykanenら, 2001 Cell 107:309-321; Martinezら, 2002 Cell 110:563-574)。この切断に参与するエンドヌクレアーゼはArgonaute 2として同定された(Ago 2; Liuら, Science, 305:1437-41)。

【0381】

miRNA

ヒトmiRNAの大部分(70%)、そしておそらく他の哺乳動物のmiRNAの大部分は、イントロンおよび/またはエクソンから転写され、約30%が遺伝子間領域に存在する(Rodriguezら, Genome Res. 2004, 14(10A), 1902-1910)。ヒトおよび動物では、miRNAは通常、RNAポリメラーゼIIにより(Farhら, Science 2005, 310(5755)、そしていくつかの場合にはpol IIIにより(Borchertら, Nat. Struct. Mol. Biol. 2006, 13(12), 1097-1101)転写される。ウイルスによりコードされる特定のmiRNAは、RNAポリメラーゼIIIにより転写され(Pfefferら, Nat. Methods 2005, 2(4), 269-276; Anderssonら, J. Virol. 2005, 79(15), 9556-9565)、一部のものはウイルス遺伝子のオープンリーディングフレーム内に存在する(Pfefferら, Nat. Methods 2005, 2(4), 269-276; Samolsら, J. Virol. 2005, 79(14), 9301-9305)。miRNA転写により、大型のモノシストロニック、バイシストロニックまたはポリシストロニックな一次転写産物(primary miRNA)が産生される。単一のprimary miRNAは、長さが約200ヌクレオチド(nt)～数千ベース(kb)の範囲であり、かつ5'7-メチルグアノシン(m7)キャップと3'ポリ(A)テールを共に有し得る。成熟miRNA配列は、primary miRNA内の不完全なステムループ配列の領域に局在するのが特徴的である(Cullen, Mol. Cell 2004, 16(6), 861-865)。

【0382】

核内でのmiRNA成熟の第一段階は、RNAアーゼIII Drosha-DGCR8核マイクロプロセッサー複合体によるprimary miRNAの認識および切断であり、これにより、5'末端に一リン酸および3'末端にヒドロキシル基を有する2ntのオーバーハングを有する、pre-miRNAと呼ばれる約70ntのヘアピンを含む前駆体分子が放出される(Caiら, RNA 2004, 10(12), 1957-1966; Leeら, Nature 2003, 425(6956), 415-419; Kim Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005, 6(5), 376-385)。次の段階は、担体タンパク質であるエクスポートン5による、pre-miRNAの核から細胞質内への核輸送である(Yiら, Genes. Dev. 2003, 17(24), 3011-3016, Bohnsackら, RNA 2004, 10(2), 185-191)。エクスポートン5およびGTP結合型のその補助因子Ranが共に、pre-miRNAに特徴的な2ヌクレオチドの3'オーバーハングおよび隣接するステムを認識して結合する(Basyukら, Nucl. Acids Res. 2003, 31(22), 6593-6597, Zamore Mol. Cell 2001, 8(6), 1158-1160)。細胞質中では、GTP加水分解によりpre-miRNAが放出され、次いで、これが細胞エンドヌクレアーゼIII酵素ダイサーによりプロセシングされる(Bohnsackら)。ダイサーは、RNA干渉(RNAi)を仲介するsiRNAの生成

におけるその役割により最初に認識された。ダイサーは、その補助因子TRBP（トランス活性化部位結合タンパク質；Chendrimataら, *Nature* 2005, 436 (7051), 740-744）およびPACT（インターフェロン誘導性二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼ活性化因子；Leeら, *EMBO J.* 2006, 25 (3), 522-532）と共同して働く。これらの酵素は、pre-miRNAヘアピン底部の3' 2ヌクレオチドオーバーハングで結合して末端ループを除去し、両末端が5' -リン酸、3' 2ヌクレオチドオーバーハングおよび3' ヒドロキシル基を有する約21 ntのmiRNA二本鎖中間体を生じる。次いで、その5' 末端がエネルギー的に安定性の低いmiRNAガイド鎖がRISC（RNA誘導型サイレンシング複合体）内への組み込みを選択されるが、「パッセンジャー」は放出されて分解される（Maniatakira, *Genes. Dev.* 2005, 19 (24), 2979-2990；Hammondら, *Nature* 2000, 404 (6775), 293-296）。RISCの組成はまだ完全には明らかになっていないが、鍵となる構成要素はArgonaute（Ago）タンパク質ファミリーのメンバーである（Maniatakira；Meisterら, *Mol. Cell.* 2004, 15 (2), 185-197）。

10

【0383】

次いで成熟miRNAが、RISCを相補的なmRNA種へ導く。標的mRNAが、miRNAを備えたRISCと完全に相補的であれば、そのmRNAは切断され、分解される（Zengら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100 (17), 9779-9784；Hutvagnerら, *Science* 2002, 297 (5589), 2056-2060）。しかし、哺乳動物細胞における最も一般的な状態としては、miRNAは不完全な相補性のmRNAを標的とし、それらの翻訳を抑制することにより、対応するタンパク質の発現を減少させる（Yektara, *Science* 2004, 304 (5670), 594-596；Olsenら, *Dev. Biol.* 1999, 216 (2), 671-680）。miRNAの5' 領域、特にmiRNAのヌクレオチド2～7または8（5' 末端の1位から始めて）におけるmiRNAと標的配列の間のマッチはシード領域と呼ばれ、miRNA標的化に基本的に重要であり、このシード領域は、miRNA標的化のコンピュータ予測で広く用いられる基本原理にもなっている（Lewisら, *Cell* 2005, 120 (1), 15-20；Brenneckera, *PLoS Biol.* 2005, 3 (3), e85）。miRNA-mRNA二本鎖のmiRNA調節は、主として3' UTR内の複数の相補的部位により仲介されるが、数多くの例外がある。miRNAはまた、mRNAの5' UTRおよび／またはコード領域とも結合して、同様の結果をもたらし得る（Lytleら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104 (23), 9667-9672）。

20

30

【0384】

RNアーゼH

RNアーゼHは、DNA/RN二本鎖中のRNAの3' -O-P結合を切断して、3' -ヒドロキシルおよび5' -リン酸で終わる産物を生じるリボヌクレアーゼである。RNアーゼHは非特異的エンドヌクレアーゼであり、酵素結合二価金属イオンによる補助を受けて、加水分解機構を介したRNA切断を触媒する。RNアーゼHファミリーのメンバーは、古細菌および原核生物から真核生物のほぼすべての生物体において見られる。DNA複製中に、RNアーゼHは、岡崎フラグメントの生成開始に関与するRNAプライマーを切断すると考えられている；しかし、RNアーゼH酵素は、より一般的には、十分な長さの任意のDNA:RNAハイブリッド配列（例えば、典型的には、哺乳動物における4塩基対以上の長さのDNA:RNAハイブリッド配列）を切断するために使用され得る。

40

【0385】

マイクロRNAおよびマイクロRNA様治療剤

マイクロRNA（miRNA）は、鋳型転写産物の3' UTRと結合して、古典的なRNA干渉と関連するがそれとは異なる機序により、鋳型転写産物によりコードされるタンパク質の発現を阻害することで作用すると記載されている。具体的には、miRNAは、

50

標的転写産物の安定性を低下させるのではなく、その翻訳を低下させることにより作用すると考えられている。天然のmiRNAは通常、約22ntの長さである。これらは、約70nt長の小分子RNA(stRNA)として知られるより大きな前駆体由来すると考えられている。

【0386】

siRNAのような干渉薬剤、より具体的には、例えば3'UTR内(または、標的転写産物内の他の場所、例えばNotchおよび/またはNotchファミリーの転写産物の、例えば反復エレメント内)で結合して翻訳を阻害するmiRNAなどは、siRNA/鑄型(miRNA/鑄型)二本鎖中の多数のミスマッチを許容し得、特に、二本鎖の中心領域内のミスマッチを許容し得る。実際、いくつかのミスマッチが望ましいまたは必要なものであり得るという証拠があり、天然のstRNAがそのようなミスマッチを示すことが多いのと同様、インビトロで転写を阻害することが示されているmiRNAもそのようなミスマッチを示す(Zengら, Molecular Cell, 9:1-20)。例えば、標的転写産物とハイブリダイズした場合、このようなmiRNAは、ミスマッチ領域により隔てられた2つの完全に相補的なストレッチを含むことが多い。このようなハイブリダイズ複合体は通常、ヌクレオチド対を含む完全に相補的な2つの領域と、少なくとも1つのミスマッチ塩基対、例えば、G:A、G:U、G:G、A:A、A:C、U:U、U:C、C:C、G:-、A:-、U:-、C:-などであり得る塩基対とを含む。このようなミスマッチヌクレオチドは、特に直列に存在する場合(例えば、ミスマッチの2、3または4ヌクレオチド領域)、二本鎖部分が両側に位置するようにそれを隔てるバルジを形成し得る。様々な構造が可能である。例えば、miRNAは、複数の非同一(ミスマッチ)の領域を含み得る。非同一(ミスマッチ)の領域は、標的とmiRNAが共に不對ヌクレオチドを含むという意味で、対称性である必要はない。例えば、一方の鎖だけが不對ヌクレオチドを含む構造が記載されている(Zengら, 図14)。通常、miRNA剤内の完全に相補的なストレッチが少なくとも5ヌクレオチド長、例えば、6、7またはそれを超えるヌクレオチド長であるのに対し、ミスマッチ領域は、例えば、1、2、3または4ヌクレオチド長であり得る。

【0387】

一般に、任意の特定のsiRNAは、(i)標的転写産物の安定性が低下し、多くの場合siRNAと標的の間の完全な相補性が好ましい、「古典的」siRNA経路を介して、および(ii)標的転写産物の翻訳が阻害される「代替」経路(一般的に、動物におけるmiRNA経路として特徴付けられる)によっても、遺伝子発現を阻害するように機能し得る。一般的には、機序(i)を介する特定のsiRNAにより標的とされる転写産物は、機序(ii)を介して標的とされる転写産物と異なり得るが、古典的および代替経路の両方の標的として働き得る領域を単一の転写産物が含有し得ることがあり得る。(「古典的」および「代替」という用語は、単に便宜上使用されるのであって、一般的には、動物細胞におけるそのような機序発見の歴史上のタイミングを反映するものではないことに留意されたい。)siRNA設計の1つの共通の目的は、機序(ii)を介して誘発される可能性のある効果を含めたオフターゲット効果を最小化しながら、機序(i)を介して単一の転写産物を高度な特異性で標的とすることであった。しかし、天然のmiRNAの活性を模倣する目的で、あるいはミスマッチを許容する、および実際はおそらくそれにより増強される「DmiRNA」剤の阻害および/または治療の効果/効力を有する、対応するmiRNAが現在知られていない標的RNAに対する薬剤を作出するために、設計によるミスマッチ残基を有するRNA干渉剤を提供することが本発明の目的に含まれる。

【0388】

ミスマッチヌクレオチドに対するmiRNA剤の許容性(ならびに実際は、細胞中の上記機序(ii)の存在および自然な使用)は、機序(i)を介して作用する完全に相補的なsiRNAの「古典的な」使用に有利な、および/またはそれを発展させる方法でのmiRNAの使用を示唆する。miRNAは天然に存在する分子であるため、miRNAを

治療剤として適用する明らかな利点があると思われる。miRNAは、その機能の何億年もの進化的「微調整」の恩恵を受けている。したがって、配列特異的「オフターゲット」効果は、天然のmiRNAに関して、ひいては、天然のmiRNAを直接模倣するように設計された本発明の合成DmiRNAに関して問題となるはずがない。さらに、miRNAが、上方および下方制御を駆動して（特定の場合には、細胞内で単一のmiRNAが複数の標的RNAに無差別に作用して両機能を同時に行い）遺伝子群の発現を調節するように進化してきた結果、複雑な細胞機能が調節され得る。このような天然のmiRNAの代替は、1つ以上のmiRNAの下方制御により影響を受けてきた正常な増殖、アポトーシス、細胞周期およびその他の細胞機能を回復させる目的で、合成miRNAまたはmiRNA模倣物（例えば、DmiRNA）を患部組織内に導入することを含み得る。特定の場合において、このようなmiRNA制御にされた経路の再活性化が有意な治療応答をもたらしている（例えば、心肥大に関する一研究において、miRNA発現カセットのアデノウイルス仲介性の送達によるmiR-133の過剰発現が、動物のアゴニスト誘導性心肥大を防いだのに対し、野生型マウスにおけるantagomirによるmiR-133の減少は、逆に肥大マーカーの増加を引き起こした（Careira, Nat. Med. 13: 613-618））。

10

【0389】

これまで、600を超えるmiRNAがヒトゲノム内でコードされているものとして同定されており、こうしたmiRNAは、核および細胞質内のタンパク質の組合せにより発現およびプロセシングされる。miRNAは脊椎動物の間では高度に保存されており、哺乳動物の全遺伝子の約2%を占める。各miRNAは複数の、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10～数百の異なる遺伝子の発現を制御すると思われるため、miRNAは「マスタースイッチ」として機能し、複数の細胞経路およびプロセスを効率的に制御および統合している可能性がある。複数の遺伝子の発現を統合することにより、miRNAは胚発生、免疫、炎症ならびに細胞の成長および増殖において重要な役割を果たす。

20

【0390】

発現および機能の研究により、特定のmiRNAの発現の変化が様々なヒト疾患に重要であることが示唆されている。疾患細胞および組織内への特定のmiRNAの導入が、好ましい治療応答を引き起こし得るという証拠が増えている（Pappasら, Expert Opin Ther Targets. 12: 115-27）。miRNA治療の有望性は、特定のmiRNAの腫瘍抑制因子としての明白な役割から、おそらく癌において最も高いであろう。例えば、癌に対するmiRNAベースの治療法の理論的根拠は、少なくとも部分的には以下の知見により支持される：

30

（1）miRNAは、正常組織に比べて、患部組織において誤制御され、変化したレベルで発現される場合が多い。癌組織において、その対応する正常組織に対するmiRNAレベルの変化が数多くの研究により示されている。多くの場合、発現の変化は、特定のmiRNAの発現の増加または減少を引き起こす遺伝子突然変異の結果である。固有のmiRNA発現署名を有する疾患は、診断および予後マーカーとして利用することができ、かつ本発明のDsiRNA（DmiRNA）剤で標的化することができる。

40

（2）誤制御されたmiRNAは、癌遺伝子または腫瘍抑制因子として機能することにより、癌発達に寄与する。癌遺伝子は、その過剰発現または不適切な活性化が発癌を引き起こす遺伝子として定義される。腫瘍抑制因子は、細胞が癌性になるのを防ぐために必要な遺伝子であり；腫瘍抑制因子の下方制御または不活性化は癌の一般的な誘発因子である。両タイプの遺伝子が好適な薬物標的であるため、標的化は、特定の癌の分子基盤に特異的に作用し得る。発癌性miRNAの例はmiR-155およびmiR-17-92であり；let-7は腫瘍抑制性miRNAの例である。

（3）miRNAの投与は、前臨床動物実験において、腫瘍増殖を阻止または低減することにより治療応答を引き起こす。miRNA機能を回復させることにより、インビトロおよび動物モデルにおいても癌細胞の増殖を阻止または低減し得ることを示す概念実証研究

50

が、科学文献により提供される。よく特徴付けられた例は、乳癌および肺癌のモデルにおける *let-7* の抗腫瘍活性である。*let-7* を模倣するように設計された本発明の *DsiRNA* (*DmiRNA*) を用いて、このような癌を標的化することが可能であり、また本明細書に記載の *DsiRNA* 設計パラメーターを用いて、対応する天然の *miRNA* が知られていない標的 *RNA* (例えば、*Notch* またはその他の転写産物内の反復) に対する新規な *DsiRNA* (*DmiRNA*) 剤を生成し、治療リード化合物、例えば、前臨床動物モデルにおいて腫瘍量を低減することができる薬剤をスクリーニングすることも可能である。

(4) 特定の *miRNA* は複数の細胞経路を制御するため、優れた治療活性を有し得る。その生物学によれば、*miRNA* はゲノムの「マスタースイッチ」として機能し、複数の遺伝子産物を制御し、複数の経路を統合している可能性がある。*miRNA* により制御される遺伝子には、従来の癌遺伝子および腫瘍抑制因子をコードする遺伝子が含まれ、これらの多くは、それぞれ薬物標的として医薬業界により探求されている。したがって、*miRNA* 治療剤は、複数の疾患および／または癌関連遺伝子を標的化することにより、*siRNA* およびその他の形態のリード化合物よりも優れた活性を有し得る。*miRNA* の誤制御が多くの場合、腫瘍形成のプロセスにおける初期事象であるという知見を考慮すれば、欠けた *miRNA* の代わりとなる *miRNA* 療法は、最も適切な治療法となり得る。

(5) *miRNA* は天然の分子であるため、非特異的な副作用を引き起こす傾向が少ない。何百万年もの進化が、*miRNA* と標的メッセンジャー *RNA* との相互作用を微調整する *miRNA* の制御ネットワークの発達を促した。したがって、*miRNA* および *miRNA* 誘導体 (例えば、天然の *miRNA* を模倣するように設計された *DmiRNA*) は、適切な状況で適用すれば、その配列特異的「オフターゲット」効果は、もしあるとしてもごく僅かであろう。

【0391】

siRNA と *miRNA* の物理的特性は類似している。したがって、*siRNA* (例えば、本発明の *DsiRNA*) の送達に有用な技術は、合成 *miRNA* (例えば、本発明の *DmiRNA*) の送達においても同様に有用である。

【0392】

DsiRNA 剤のコンジュゲーションおよび送達

特定の実施形態では、本発明は、疾患もしくは障害を有する、または疾患もしくは障害が発症する危険性のある患者を治療するための方法に関する。このような実施形態では、*DsiRNA* は、疾患または障害を制御するための新規な治療剤として作用し得る。この方法は、標的 *RNA* の発現、レベルおよび／または活性が減少するように、本発明の医薬組成物を患者 (例えば、ヒト) に投与することを含む。また対象とする *RNA* によりコードされるポリペプチドの発現、レベルおよび／または活性も、*DsiRNA* が転写産物の非コード領域 (例えば、標的化された 5' UTR または 3' UTR 配列) に対するものであるが、本発明の *DsiRNA* により減少し得る。本発明の *DsiRNA* はその高度な特異性により、任意に、個々および／または集団の中に多型対立遺伝子が存在する対立遺伝子に特異的な方法で、細胞および組織の対象とする配列を特異的に標的化し得る。

【0393】

疾患または障害の治療において、*DsiRNA* は被検体の細胞または組織、例えば、タンパク質の調節異常を示す、および／または別にタンパク質レベルを減少させるために標的化された、被検体の細胞または組織と接触させ得る。例えば、対象とする *RNA* 配列のすべてまたは一部と実質的に同一な *DsiRNA* を、このような細胞とインビボまたはインビトロで接触させるか、またはその中に導入し得る。同様に、対象とする *RNA* 配列のすべてまたは一部と実質的に同一な *DsiRNA* を、疾患または障害を有するかまたはその危険性のある被検体に、直接投与し得る。

【0394】

本発明の *DsiRNA* 剤の治療的使用は、複数の異なる *DsiRNA* 剤の配列を含む *DsiRNA* 剤の製剤の使用を含み得る。例えば、本明細書に記載されている薬剤の 2 つ以

10

20

30

40

50

上、3つ以上、4つ以上、5つ以上などを組み合わせて、例えば、標的RNAの複数の異なる領域を標的とする、または対象とするRNAを標的とするだけでなく、例えば、対象とする標的RNAと関連する疾患もしくは障害と関連する細胞標的遺伝子も標的とする、製剤を作製し得る。本発明のDsiRNA剤はまた、DsiRNA剤の両鎖が独立してRNA標的の2つ以上の領域を標的とするように、またはDsiRNA剤の一方の鎖が当該技術分野で公知の標的mRNAの細胞標的遺伝子を標的とするように構築し得る。

【0395】

標的核酸分子の1つ以上の領域を標的とする多機能性DsiRNA分子の使用も、RNAレベルおよび発現の強力な阻害をもたらし得る。例えば、本発明の単一の多機能性DsiRNA構築物は両方を標的とし得る。

10

【0396】

したがって、本発明のDsiRNA剤は、標的RNAと関連した疾患または障害を治療、阻害、低減または予防するために、単独で、または他の薬物と組み合わせてもしくは併用して使用し得る。例えば、DsiRNA分子を単独で、または治療に適切な条件下で1つ以上の薬物と組み合わせて、被検体に投与するか、または当業者に明らかな他の適当な細胞に投与し得る。

【0397】

DsiRNA分子はまた、被検体または生物体中の標的RNAと関連した疾患または障害を治療、阻害、低減または予防するために、他の既知の治療と組み合わせて使用することもできる。例えば、記載の分子は、当該技術分野で公知の被検体または生物体中の標的RNAと関連した疾患または障害を治療、阻害、低減または予防するために、1つ以上の既知の化合物、治療または手順と組み合わせて使用し得る。

20

【0398】

本発明のDsiRNA剤は、別の部分（例えば、ペプチドのような非核酸部分）、有機化合物（例えば、色素、コレステロールなど）とコンジュゲート（例えば、そのセンスまたはアンチセンス鎖のその5'または3'末端で）されていてもコンジュゲートされていなくてもよい。このようにDsiRNA剤を修飾することは、対応する非コンジュゲートDsiRNA剤に比べて、得られたDsiRNA剤誘導体の細胞取り込みを向上させるか、もしくは細胞標的化活性を増強し得る、細胞内のDsiRNA剤誘導体の追跡に有用である、または対応する非コンジュゲートDsiRNA剤に比べて、DsiRNA剤誘導体の安定性を向上させる。

30

【0399】

本発明はまた、治療剤とさらにコンジュゲートされたdsRNA-ペプチドコンジュゲート、例えば、疾患、例えば癌の症状および／または進行を治療または改善する薬剤も考慮する。

【0400】

核酸、ベクターの導入法および宿主細胞

本発明のDsiRNA剤は、細胞へ直接（すなわち、細胞内に）導入；または生物体の腔、間質腔へ、血液中へ、細胞外に導入、経口的に導入し得るか、あるいは核酸を含有する溶液中に細胞または生物体を浸漬することにより導入し得る。血管または血管外循環、血液またはリンパ系、および脳脊髄液は、核酸を導入し得る部位である。

40

【0401】

本発明のDsiRNA剤は、当該技術分野で公知の核酸送達法を用いて導入することができ、このような方法としては、核酸を含有する溶液の注射、核酸に覆われた粒子によるボンバードメント、核酸の溶液中への細胞もしくは生物体の浸漬、または核酸存在下での細胞膜のエレクトロポレーションが挙げられる。核酸を細胞に導入するための当該技術分野で公知の他の方法、例えば脂質による担体輸送、化学物質による輸送、およびリン酸カルシウムのようなカチオン性リポソームトランスフェクションなどを使用し得る。核酸を、以下の作用：細胞による核酸取り込みを増強する作用、または標的RNAの阻害を増加させる作用の1つ以上を行う他の成分と共に導入し得る。

50

【0402】

標的RNAを有する細胞は、生殖系または体細胞系細胞、全能性または多能性細胞、分裂または非分裂細胞、実質または上皮細胞、不死化または形質転換細胞などに由来し得る。細胞は幹細胞または分化した細胞であり得る。分化した細胞型としては、脂肪細胞、線維芽細胞、筋細胞、心筋細胞、内皮、ニューロン、グリア、血液細胞、巨核球、リンパ球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、白血球、顆粒球、ケラチノサイト、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞および内分泌または外分泌腺の細胞が挙げられる。

【0403】

特定の標的RNA配列および送達されるDsiRNA剤物質の用量に応じて、このプロセスはRNAの部分的または完全な機能喪失をもたらし得る。標的細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%以上のRNAレベルまたは発現（RNA発現またはコードされるポリペプチドの発現のいずれか）の減少または喪失が典型的である。RNAレベルまたは発現の阻害は、RNAまたはRNAにコードされるタンパク質のレベルの非存在（または観察可能な減少）を指す。特異性は、細胞の他の遺伝子に対する明らかな作用を伴わずにRNAを阻害する能力を指す。阻害の結果は、細胞もしくは生物体の外見的特徴の検査により、または生化学的技術、例えばRNA溶液ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、ノーザンハイブリダイゼーション、逆転写、マイクロアレイによる遺伝子発現モニター、抗体結合、酵素結合免疫測定法（ELISA）、ウェスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ（RIA）、その他のイムノアッセイおよび蛍光励起細胞解析（FACS）などにより確認し得る。本発明のDsiRNA剤による標的RNA配列（1つまたは複数）の阻害も、対象とする標的RNAに関連する疾患または障害の発症／進行、例えば、腫瘍の形成、増殖、転移などに対する当該DsiRNA剤の投与の効果に基づき、インビボまたはインビトロのいずれかで測定し得る。腫瘍または癌細胞レベルの治療および／または減少は、腫瘍増殖または癌細胞レベルの停止もしくは減少、または例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%以上の減少を含み得、かつ対数で測定することもでき、例えば、本発明のDsiRNA剤の細胞、組織または被検体への投与により、癌細胞レベルにおいて10倍、100倍、1000倍、 10^5 倍、 10^6 倍、 10^7 倍の減少を達成し得る。

【0404】

細胞系または全生物体におけるRNA仲介による阻害では、タンパク質産物が容易にアッセイされるレポーターまたは薬剤耐性遺伝子の発現を測定し得る。このようなレポーター遺伝子としては、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（AHS）、アルカリホスファターゼ（AP）、 β -ガラクトシダーゼ（LacZ）、 β -グルクロニダーゼ（GUS）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ルシフェラーゼ（Luc）、ノパリンシンターゼ（NOS）、オクトピンシンターゼ（OCS）およびそれらの誘導体が挙げられる。アンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ヒグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、ホスフィノスリシン、ピューロマイシンおよびテトラサイクリンに対する耐性を付与する複数の選択可能なマーカーが利用可能である。アッセイによっては、遺伝子発現量の定量化により、本発明による治療を行わなかった細胞に比べて、10%、33%、50%、90%、95%または99%高い阻害の程度を決定することができる。

【0405】

注射した物質が低用量で、RNAサイレンシング剤の投与後の時間が長いほど、より少ない割合の細胞（例えば、標的細胞の少なくとも10%、20%、50%、75%、90%または95%）において阻害が生じ得る。細胞中の遺伝子発現の定量化は、標的RNAの蓄積または標的タンパク質の翻訳のレベルでの同様の量の阻害を示し得る。例として、阻害効率を細胞中の遺伝子産物の量を評価することにより評価してもよく；RNAを阻害

D s i R N A に使用される領域外のヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブで検出してもよく、または翻訳されたポリペプチドをその領域のポリペプチド配列に対する抗体で検出してもよい。

【0406】

D s i R N A 剤は、細胞当たり少なくとも1コピーの送達を可能にする量で導入し得る。より高用量（例えば、細胞当たり少なくとも5、10、100、500または1000コピー）の物質はより効果的な障害を生じ得るが；より低用量でも特定の適用には有用であり得る。

【0407】

医薬組成物

特定の実施形態では、本発明は、本発明の d s R N A - ペプチド剤を含む医薬組成物を提供する。d s R N A - ペプチド剤試料を適切に製剤化して、十分な分量の試料が細胞内に入り、生じるのであれば遺伝子サイレンシングを引き起こすことを可能にする任意の手段により、細胞環境内に導入し得る。d s R N A のための多くの製剤が当該技術分野で公知であり、d s R N A が標的細胞内に入り作用することができる限り使用することができる。例えば、米国特許出願公開第2004/0203145A1号および第2005/0054598A1号を参照されたい。例えば、本発明の d s R N A - ペプチド剤は、リン酸緩衝生理食塩水溶液のような緩衝液、リポソーム、ミセル構造およびキャプシド中に製剤化し得る。陽イオン性脂質による D s i R N A 剤製剤を使用して、D s i R N A 剤の細胞内へのトランスフェクションを促進し得る。例えば、リポフェクチン（米国特許第5,705,188号）、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリリジン（P C T 国際出願公開第97/30731号）のようなポリカチオン分子を使用し得る。適切な脂質としては、オリゴフェクタミン、リポフェクタミン（L i f e T e c h n o l o g i e s）、N C 3 8 8（R i b o z y m e P h a r m a c e u t i c a l s, I n c., B o u l d e r, C o l o.）またはFuGene 6（R o c h e）が挙げられるが、これらはすべて製造者の使用説明書に従って使用し得る。

【0408】

上記組成物は通常、核酸分子および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的投与に適合する生理食塩水、溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを包含する。補助的な活性化合物も組成物内に組み込み得る。

【0409】

医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように製剤化する。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、真皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜および直腸内投与が挙げられる。非経口、真皮内または皮下適用に使用される液剤または懸濁剤としては、以下の成分を挙げ得る：無菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の合成溶媒など；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のようなキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のような緩衝剤、および塩化ナトリウムまたはデキストロースのような浸透圧調節のための薬剤。p H は、塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基により調節し得る。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは複数回投与用バイアル中に封入し得る。

【0410】

注射用途に適した医薬組成物としては、無菌水溶液剤（水溶性の場合）または分散液剤、および無菌注射液剤もしくは分散剤の即時調製のための無菌粉末剤が挙げられる。静脈内投与には、適切な担体として生理食塩水、静菌水、C r e m o p h o r E L（商標）（B A S F, P a r s i p p a n y, N. J.）またはリン酸緩衝生理食塩水（P B S）が挙げられる。すべての場合において、組成物は無菌でなければならず、その容易な注射

針通過性 (syringability) が存在する程度まで流動性であるべきである。それは製造および保管条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌のような微生物の汚染活動から保護されなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング剤の使用により、分散液剤の場合、必要な粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により維持し得る。微生物活動の防止は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより達成し得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マニトール、ソルビトールのようなポリアルコール、塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。組成物中に、吸収を遅らせる物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことにより、注射用組成物の持続的吸収をもたらし得る。

10

【0411】

無菌注射液剤は、必要量の活性化合物を、必要に応じて上で挙げた成分の1つまたは組合せと共に、適当な溶媒中に組み込んだ後、ろ過滅菌することにより調製し得る。一般に分散液剤は、活性化合物を、基本となる分散媒および上で挙げた他の成分のうち必要なもの含有する無菌媒体中に組み込むことにより調製し得る。無菌注射液剤調製のための無菌粉末剤の場合、好適な調製法は、有効成分に予め滅菌ろ過したその溶液由来の任意の追加的な所望の成分を加えた粉末が得られる、真空乾燥および凍結乾燥である。

【0412】

20

経口組成物は一般に、不活性希釈剤または食用担体を含む。経口的治療投与の目的には、活性化合物を賦形剤と組合せて、錠剤、トローチ剤またはカプセル剤、例えばゼラチンカプセル剤の形態で使用し得る。経口組成物はまた、口腔洗浄剤として使用するための液体担体を用いて調製することもできる。薬学的に適合する結合剤および／またはアジュバント物質を組成物の一部として含み得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分または同様な性質の化合物のいずれも含有し得る：微結晶性セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチンのような結合剤；デンプンもしくはラクトースのような賦形剤、アルギン酸、Primogelもしくはコーンスターチのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotesのような潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素のような流動促進剤；ショ糖もしくはサッカリンのような甘味剤；またはハッカ油、サリチル酸メチルもしくはオレンジ香料のような着香剤。

30

【0413】

吸入による投与では、適切な噴射剤、例えば二酸化炭素のようなガスを含有する加圧容器もしくはディスペンサ、または噴霧器からのエアロゾルスプレーの形態で化合物を送達する。このような方法は、米国特許第6,468,798号に記載の方法を含む。

【0414】

全身投与は、経粘膜的または経皮的手段によるものでもあり得る。経粘膜または経皮投与では、バリアを透過するのに適した浸透剤を製剤中で使用する。このような浸透剤は、一般に当該技術分野で公知であり、例えば、経粘膜投与には、界面活性剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、経鼻スプレー剤または坐剤の使用により行い得る。経皮投与では、一般に当該技術分野で公知の軟膏剤、塗布剤、ゲル剤またはクリーム剤に製剤化する。

40

【0415】

化合物はまた、直腸内送達のための坐剤（例えば、カカオバターまたはその他のグリセリドのような坐剤基剤により）または停留浣腸の形態にも調製し得る。

【0416】

化合物はまた、当該技術分野で公知の方法を用いたトランスフェクションまたは感染によっても投与することができ、このような方法としては、McCaffreyら（2002）、Nature, 418（6893）、38-9（流体力学的トランスフェクション）；Xiaら（2002）、Nature Biotechnol., 20（10）、1

50

006-10 (ウイルス仲介による送達) ; または Putnam (1996), Am. J. Health Syst. Pharm. 53 (2), 151-160, erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. 53 (3), 325 (1996) に記載の方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0417】

化合物はまた、DNAワクチンのような、核酸薬剤の投与に適した任意の方法によっても投与し得る。このような方法としては、遺伝子銃、バイオインジェクターおよび皮膚パッチ、ならびに無針方法、例えば米国特許第6, 194, 389号に開示されている微粒子DNAワクチン技術および米国特許第6, 168, 587号に開示されている粉末型ワクチンの哺乳動物経皮無針ワクチン接種などが挙げられる。さらに、特に Hamajima ら (1998), Clin. Immunol. Immunopathol., 88 (2), 205-10 に記載されている鼻腔内送達が可能である。リポソーム (例えば、米国特許第6, 472, 375号に記載されている) およびマイクロカプセル化も使用し得る。生物分解性の標的化可能な微粒子送達システムも使用し得る (例えば、米国特許第6, 471, 996号に記載されている)。

【0418】

一実施形態では、インプラントおよびマイクロカプセル送達システムを含めた徐放製剤のような、身体からの急速な排泄から化合物を保護する担体で活性化化合物を調製する。生物分解性の生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などを使用し得る。このような製剤は標準的な技術を用いて調製し得る。また材料は、Alza Corporation および Nova Pharmaceuticals, Inc から購入することもできる。リポソーム懸濁液 (ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により感染細胞に対して標的化されたりリポソームを含む) も薬学的に許容される担体として使用し得る。これらは、例えば、米国特許第4, 522, 811号に記載の当業者に公知の方法に従って調製し得る。

【0419】

当該化合物の毒性および治療効果は、例えば、LD₅₀ (集団の50%に対して致死的な量) および ED₅₀ (集団の50%において治療的に有効な量) を決定するための細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順により判定し得る。毒性と治療効果の間の用量比が治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀ の比として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。有害な副作用を示す化合物を使用してもよいが、そのような化合物を罹患組織の部位に対して標的化する送達システムは、非感染細胞に対する損傷の可能性を最小限にして副作用を低減するように、慎重に設計すべきである。

【0420】

細胞培養および動物実験から得られたデータは、ヒトでの使用のための用量範囲を策定する際に使用し得る。当該化合物の用量は、毒性がほとんどまたは全くない ED₅₀ を含む循環血中濃度の範囲内にあるのが好ましい。用量は、使用する剤形および用いる投与経路に応じてこの範囲内で変化し得る。本発明の方法で使用されるいずれの化合物に関しても、治療有効量を最初に細胞培養アッセイから推定し得る。動物モデルにおいて、細胞培養で決定された IC₅₀ (すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度) を含む循環血漿中濃度範囲を達成するための用量を定め得る。こうした情報を用いて、ヒトでの有効量をより正確に決定し得る。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定し得る。

【0421】

本明細書で定義される核酸分子の治療有効量 (すなわち、効果的な用量) は、選択される核酸によって異なる。例えば、DsiRNA 剤をコードするプラスミドが選択された場合、約 1 pg ~ 1000 mg の範囲の単回用量を投与し得るが ; いくつかの実施形態では、10、30、100 もしくは 1000 pg、または 10、30、100 もしくは 1000 ng、または 10、30、100 もしくは 1000 μg、または 10、30、100 も

しくは1000mgを投与し得る。いくつかの実施形態では、1～5gの組成物を投与し得る。組成物は、隔日で1回を含め、1日当たり1回以上～1週間当たり1回以上、投与し得る。限定されるわけではないが、疾患または障害の重症度、これまでの治療、被検体の全般的健康状態および／または年齢ならびに他の疾患の存在を含めた特定の因子が、被検体を効果的に治療するために必要な用量およびタイミングに影響し得ることを当業者は理解するであろう。さらに、治療有効量のタンパク質、ポリペプチドまたは抗体による被検体の治療は、単回治療を含み得る、またはこのましくは一連の治療を含み得る。

【0422】

本発明による治療に有用なペプチドは、ペプチド-dsRNAコンジュゲートの標的化を上で定義されるように「増大させる」ため、ペプチドとコンジュゲートされていない、かつ以下に記載されるアッセイでIC₅₀により決定される同レベルの結合、会合または内部移行を達成するのに必要とされる、同一のdsRNAの量または用量と比べて、より少ないdsRNA（より低用量のdsRNA）が必要である。例えば、RNA／遺伝子発現の50%低下を達成するのに必要なdsRNA-ペプチドコンジュゲートのIC₅₀は、インビボまたはインビトロで測定される、ペプチドとコンジュゲートされていない同一のdsRNAのIC₅₀と比べて減少する（例えば、Hefnerら, J Biomol Tech. 2008 Sep:19(4)231-237; Zimmermannら, Nature. 2006 May 4:441(7089):111-114; Durcanら, Mol Pharm. 2008 Jul-Aug;5(4):559-566; Heidelら, Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Apr 3:104(14):5715-5721を参照されたい）。

【0423】

本明細書で定義されるdsRNA-ペプチドの有効量は、約0.1mg/kg～100mg/kg、例えば、0.2kg/mg～50kg/mg、0.5kg/mg～30kg/mgまたは0.5kg/mg～20mg/kg（0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20kg/mg以上を含む）である。

【0424】

本発明の核酸分子は、発現構築物、例えば、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、発現カセットまたはプラスミドウイルスベクター内に、例えば、限定されるわけではないがXiaら（2002）、同上に記載のものを含めた当該技術分野で公知の方法を用いて挿入し得る。発現構築物は、例えば、吸入、経口、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照されたい）により、または定位的注入（例えば、Chenら（1994）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3054-3057を参照されたい）により被検体に送達し得る。送達ベクターの医薬製剤は、許容される希釈剤中にベクターを含み得るか、または送達媒体が埋め込まれた徐放マトリックスを含み得る。あるいは、完全な送達ベクター、例えばレトロウイルスベクターが、組換え細胞からインタクトで産生され得る場合、医薬製剤は遺伝子送達システムを産生する1つ以上の細胞を含み得る。

【0425】

発現構築物は、適当な発現系での使用に適した任意の構築物であってよく、当該技術分野で公知のレトロウイルスベクター、直鎖発現カセット、プラスミドおよびウイルスまたはウイルス由来ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。このような発現構築物は、1つ以上の誘導性プロモーター、U6 snRNAプロモーターもしくはH1 RNAポリメラーゼIIIプロモーターのようなRNA Pol IIIプロモーター系、または当該技術分野で公知の他のプロモーターを含み得る。構築物はsiRNAの一方または両方の鎖を含み得る。両方の鎖を発現する発現構築物は、両鎖を連結するループ構造も含み得るか、または各鎖が同じ構築物内の別々のプロモーターから別々に転写され得る。各

鎖は別々の発現構築物からも転写され得る（例えば、Tuschl（2002, Nature Biotechnol 20:500-505））。

【0426】

DsRNA剤を細胞環境内に導入する方法は、細胞の型およびその環境構成により異なることが理解され得る。例えば、細胞が液体内にある場合、1つの好適な製剤は、リポフェクタミンにおけるような脂質製剤によるものであり、DsRNA剤を細胞の液体環境に直接添加し得る。脂質製剤はまた、静脈内、筋肉内もしくは腹腔内注射により、または経口的に、または吸入もしくは当該技術分野で公知の他の方法により動物へ投与し得る。製剤が哺乳動物のような動物およびより具体的にヒトへの投与に適する場合、製剤も薬学的に許容される。オリゴヌクレオチド投与のための薬学的に許容される製剤が知られており、使用することができる。いくつかの場合には、DsRNA剤を緩衝液または生理食塩水溶液中に製剤化し、卵母細胞での実験のように、製剤化されたDsRNA剤を細胞内に直接注入することが好適であり得る。DsRNA剤二本鎖の直接注入も行い得る。dsRNA（例えば、DsRNA剤）の適切な導入法に関しては、米国特許出願公開第2004/0203145A1号を参照されたい。

10

【0427】

適切な量のDsRNA剤を導入しなければならず、このような量は標準的な方法を用いて実験的に決定し得る。通常、細胞環境中での各DsRNA剤種の有効濃度は、約50ナノモル以下、10ナノモル以下であるか、または組成物中の濃度が約1ナノモル以下のものを使用し得る。別の実施形態では、約200ピコモル以下、100ピコモル以下、50ピコモル以下、20ピコモル以下の濃度、および約10ピコモル以下、5ピコモル以下、2ピコモル以下または1ピコモル以下の濃度でさえ、多くの環境において使用し得る。

20

【0428】

十分な量のDsRNA剤が細胞に入り、その効果を発揮し得るようにDsRNA剤組成物を製剤化するのであれば、細胞が生存可能な任意の細胞外マトリックスにDsRNA剤組成物を添加することによりこの方法を行い得る。例えば、この方法は、液体培養もしくは細胞増殖培地のような液体中に、組織移植片中に、または哺乳動物および特にヒトのような動物を含めた全生物体中に存在する細胞での使用に許容される。

【0429】

RNAのレベルまたは活性は、現在当該技術分野で公知であるか、または後に開発される任意の適切な方法により判定し得る。標的RNAおよび／または標的RNAの発現を測定するための方法は、標的RNAの性質によって異なり得ることが理解され得る。例えば、標的RNA配列がタンパク質をコードする場合、「発現」という用語は、対象とする遺伝子（ゲノム性または外来性のいずれか）に由来するタンパク質またはRNA／転写産物を指し得る。このような場合、標的RNAの発現は、標的RNA／転写産物の量を直接測定することにより、または対象とするRNAのタンパク質産物の量を測定することにより判定し得る。タンパク質は、タンパク質アッセイにおいて、例えば染色もしくはイムノブロットングにより、またはタンパク質が測定可能な反応を触媒する場合は、反応速度を測定することにより測定し得る。このような方法はすべて当該技術分野で公知であり、使用することができる。標的RNAレベルを測定する場合、RNAレベルを検出するための当該技術分野で認められている任意の方法を使用し得る（例えば、RT-PCR、ノーザンブロットングなど）。本発明のDsRNA剤でRNAを標的化する際に、インビボもしくはインビトロいずれかの被検体中、組織中、細胞中、または細胞抽出物中のRNAまたはタンパク質レベルの減少におけるDsRNA剤の効果の測定を用いて、特定の対象RNAに関連した表現型（例えば、疾患または障害、例えば癌または腫瘍の形成、増殖、転移、伝播など）の減少の程度を決定し得ることが期待される。上記測定のいずれも、細胞、細胞抽出物、組織、組織抽出物または他の任意の適切な原材料に対して行い得る。

30

40

【0430】

標的RNAの発現が減少したか否かの判定は、RNAレベルの変化を確実に検出し得る

50

任意の適切な方法によるものであり得る。通常、D s i R N A 剤の少なくとも一部が細胞質に入るように未消化のD s i R N A を細胞環境内に導入した後、標的R N A のレベルを測定することにより判定を行う。同じ測定を同一の未処置細胞に対して行い、各測定から得られた結果を比較する。

【0431】

D s i R N A 剤は、薬学的有効量のD s i R N A 剤と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物として製剤化し得る。薬学的大約および治療有効量は、意図される薬理学的、治療的または予防的結果を生じるのに有効なD s i R N A 剤の量を指す。「薬学的有効量」および「治療有効量」または単に「有効量」という語句は、意図される薬理学的、治療的または予防的結果を生じるのに有効なR N A の量を指す。例えば、所与の臨床治療が、疾患または障害に関連した測定可能なパラメーターにおいて少なくとも20%の減少が見られたときに有効であると見なされる場合、その疾患または障害の治療のための薬物の治療有効量は、そのパラメーターにおける少なくとも20%の減少をもたらすのに必要な量である。

10

【0432】

適切に製剤化された本発明の医薬組成物は、当該技術分野で公知の任意の手段により、例えば静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、直腸内、腔内および局所（パッカルおよび舌下を含む）投与を含めた非経口経路などにより投与し得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物を、静脈内または非経口内部（i n t r a p a r e n t e r a l ）注入または注射により投与する。

20

【0433】

一般に、d s R N A の適切な用量単位は、1日当たりで受容者の体重1キログラム当たり0.001~0.25ミリグラムの範囲、または1日当たりで体重1キログラム当たり0.01~20マイクログラムの範囲、または1日当たりで体重1キログラム当たり0.01~10マイクログラムの範囲、または1日当たりで体重1キログラム当たり0.10~5マイクログラムの範囲、または1日当たりで体重1キログラム当たり0.1~2.5マイクログラムの範囲である。d s R N A を含む医薬組成物は1日一回投与し得る。しかし、治療剤は、1日を通して適当な間隔で投与される2、3、4、5、6またはそれを超えるサブ用量を含有する投与単位でも投与し得る。その場合、各サブ用量に含有されるd s R N A は、1日の総投与単位に達するように、それに応じてより少量でなければならない。投与単位はまた、例えば、数日にわたりd s R N A を持続的に一貫して放出する従来の徐放性製剤を用いて、数日にわたる単回投与用に配合し得る。徐放性製剤は当該技術分野で公知である。この実施形態では、投与単位は対応する倍数の1日投与量を含有する。製剤を問わず、医薬組成物は、治療される動物またはヒトにおける標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な量のd s R N A を含有しなければならない。組成物は、複数の単位のd s R N A を合わせた合計が十分な用量を含有するように配合し得る。

30

【0434】

細胞培養アッセイおよび動物実験からデータを得て、ヒトに対する適切な用量範囲を定め得る。本発明の組成物の用量は、毒性がほとんどまたは全くないE D ₅₀（既知の方法により決定される）を含む循環血中濃度の範囲内にある。用量は、使用する剤形および用いる投与経路に応じてこの範囲内で変化し得る。本発明の方法で使用されるいずれの化合物に関しても、治療有効量を最初に細胞培養アッセイから推定し得る。動物モデルにおいて、細胞培養で決定されたI C ₅₀（すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿中濃度範囲を達成するための用量を定め得る。こうした情報を用いて、ヒトでの有効量をより正確に決定し得る。血漿中のd s R N A レベルは標準的な方法、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定し得る。

40

【0435】

医薬組成物は、投与のための説明書と共にキット、容器、パックまたはディスペンサ内に含まれ得る。

【0436】

50

治療法

本発明は、全面的にまたは部分的に対象RNA（例えば、転写産物および／またはタンパク質レベルの誤制御および／または上昇）により引き起こされる、あるいは対象RNAの選択的標的化により治療可能な疾患または障害の危険性がある（またはそれに罹患しやすい）被検体を治療する予防および治療法を共に提供する。

【0437】

本明細書で使用される「治療（処置）」または「治療（処置）すること」は、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害の素因を治す、治癒させる、軽減する、緩和する、変化させる、矯正する、改善する、向上させるまたはそれらに影響を与える目的で、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害の素因を有する患者に治療剤（例えば、DsiRNA剤またはそれをコードするベクターもしくは導入遺伝子）を投与または適用すること、あるいは患者由来の単離組織または細胞系に治療剤を投与または適用することと定義される。

10

【0438】

一態様では、本発明は、被検体に治療剤（例えば、DsiRNA剤またはそれをコードするベクターもしくは導入遺伝子）を投与することにより、被検体における上記疾患または障害を予防する（例えば、対象とするRNAの発現阻害により被検体内の形質転換事象の開始を予防する）ための方法を提供する。疾患の危険性のある患者は、例えば、本明細書に記載の診断または予後アッセイのいずれかまたはその組合せにより同定し得る。予防剤の投与は、疾患または障害が予防される、あるいはその進行が遅延されるように、例えば被検体における癌の検出、または疾患もしくは障害に特徴的な症状の発現の前に行い得る。

20

【0439】

本発明の別の態様は、被検体を治療的に処置する、すなわち、疾患または障害の症状の発症を変化させる方法に関する。これらの方法は、インビトロで（例えば、DsiRNA剤と共に細胞を培養することにより）、あるいはインビボで（例えば、DsiRNA剤を被検体に投与することにより）行い得る。

【0440】

予防的および治療的処置法の両方に関して、このような治療は、薬理ゲノミクスの分野から得られる知識に基づいて、特異的に調整または改変し得る。本明細書で使用される「薬理ゲノミクス」は、遺伝子配列決定、統計遺伝学および遺伝子発現解析のようなゲノミクス技術を、臨床開発中のおよび市販の薬物に応用することを指す。より具体的には、この用語は、患者の遺伝子が薬物に対するその患者の応答を決定する仕組み（例えば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」）の研究を指す。したがって、本発明の別の態様は、個人の薬物応答遺伝子型に従って、本発明の標的RNA分子または標的RNAモジュレーターの一つれかによる個人の予防的または治療的処置を調整するための方法を提供する。薬理ゲノミクスにより、臨床医または医師が、治療から最も恩恵を受ける患者に対する予防的または治療的処置を目標にすること、および有害な薬物関連の副作用を経験するであろう患者の治療を回避することが可能となる。

30

【0441】

治療剤は、適当な動物モデルにおいて試験し得る。例えば、本明細書に記載のDsiRNA剤（またはそれをコードする発現ベクターもしくは導入遺伝子）を動物モデルに使用して、前記薬剤による治療の有効性、毒性または副作用を判定し得る。あるいは、薬剤（例えば、治療剤）を動物モデルに使用して、その薬剤の作用機序を判定し得る。

40

【0442】

mRNAレベルおよび発現の下方制御の評価に有用なモデル

細胞培養

本発明のdsRNA-ペプチド剤は、例えば以下の手順を用いて、インビボで切断活性を試験し得る。

【0443】

50

本発明の dsRNA-ペプチド試薬を HeLa または他の哺乳動物細胞を用いた細胞培養中で試験し、標的 RNA および標的タンパク質阻害の程度を判定し得る。dsRNA-ペプチド試薬（例えば、図 1 および上記構造を参照されたい）を本明細書に記載の標的に対して選択する。適切なトランスフェクション剤により、例えば、培養 HeLa 細胞または培養中の他の形質転換もしくは非形質転換哺乳動物細胞に上記試薬の送達した後、標的 RNA 阻害を測定する。アクチンまたはその他の適当な対照に対する標的 RNA の相対量を、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））を用いて測定する。無関係な標的に対して作製したオリゴヌクレオチド配列の混合物、または全長および化学的性質が同じであるが、各位置においてランダムに置換されているランダム化した DsiRNA 対照、または単に適当な媒体処置もしくは未処置対照との比較を行う。標的に対して一次および二次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剤濃度を選択した後、RNA の経時的阻害をリード DsiRNA 分子により行う。

10

【0444】

TaqMan（登録商標）（増幅のリアルタイム PCR モニタリング）および mRNA の Lightcycler 定量化

dsRNA 送達の後、例えば大規模抽出用の Ambion Rn aqueous 4-PCR 精製キットまたは 96 ウェルアッセイ用の Ambion Rn aqueous-96 精製キットを用いて、細胞から全 RNA を調製する。Taqman 解析には、二重標識プローブを、例えば、レポーター色素 FAM または VIC を 5' 末端で共有結合させ、消光色素 TAMARA を 3' 末端とコンジュゲートして合成する。1 段階 RT-PCR 増幅を、例えば、10 μ L の全 RNA、100 nM の順方向プライマー、100 mM の逆方向プライマー、100 nM のプローブ、1x TaqMan PCR 反応緩衝液（PE-Applied Biosystems）、5.5 mM の MgCl₂、それぞれ 100 μ M の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、0.2 U の RNアーゼ阻害剤（Promega）、0.025 U の AmpliTaq Gold（PE-Applied Biosystems）ならびに 0.2 U の M-MLV 逆転写酵素（Promega）からなる 50 μ L の反応物を用いて、ABI PRISM 7700 配列検出器で行う。温度サイクル条件は、48 $^{\circ}$ C で 30 分、95 $^{\circ}$ C で 10 分、次いで、95 $^{\circ}$ C で 15 秒および 60 $^{\circ}$ C で 1 分の 40 サイクルからなり得る。標的 KRAS mRNA レベルの定量化を、連続的に希釈した全細胞 RNA（300、100、30、10 ng/rxn）から作製した標準に対して決定し、例えば、並行または同一チューブの TaqMan 反応物のいずれかにおける 36B4 mRNA に正規化する。

20

30

【0445】

ウェスタンブロッティング

核抽出物を、標準的なマイクロ調製技術（例えば、Andrews および Fallier, 1991, Nucleic Acids Research, 19, 2499 を参照されたい）を用いて調製し得る。上清由来のタンパク質抽出物を、例えば TCA 沈殿を用いて調製する。等体積の 20% TCA を細胞上清に加え、氷上で 1 時間インキュベートし、5 分間の遠心分離によりペレット化する。ペレットをアセトン中で洗浄し、乾燥させて、水中に際懸濁させる。細胞タンパク質抽出物を 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上で泳動させ、ニトロセルロース膜上に転写する。非特異的結合を、例えば、5% の無脂肪乳と共に 1 時間、次いで一次抗体と共に 4 $^{\circ}$ C で 16 時間のインキュベーションによりブロックする。洗浄後、二次抗体を、例えば（1:10, 000 希釈）室温で 1 時間作用させ、SuperSignal 試薬（Pierce）によりシグナルを検出する。

40

【0446】

いくつかの細胞培養系では、陽イオン性脂質が、培養中の細胞に対するオリゴヌクレオチドのバイオアベイラビリティを増強することが示されている（Bennetら, 1992, Mol. Pharmacology, 41, 1023-1033）。一実施形態で

50

は、細胞培養実験のために本発明の D s i R N A 分子と陽イオン性脂質の複合体を形成する。D s i R N A と陽イオン性脂質の混合物を、細胞への添加の直前に無血清 D M E M 中で調製する。添加物を加えた D M E M を室温（約 20 ～ 25℃）まで温め、陽イオン性脂質を所望の最終濃度まで加え、溶液を短時間ボルテックスする。D s i R N A 分子を所望の最終濃度まで加え、溶液を再び短時間ボルテックスし、室温で 10 分間インキュベートする。用量反応実験では、10 分間のインキュベーション後に R N A / 脂質複合体を D M E M 中に連続希釈する。

【0447】

動物モデル

動物モデルにおける d s R N A - ペプチド剤の有効性を評価することは、ヒト臨床試験への重要な前提条件である。当該技術分野で公知の癌および／または増殖性の疾患、状態もしくは障害の様々な動物モデルを、治療的使用に向けた標的遺伝子発現の調節における本発明の D s i R N A 組成物の有効性の全臨床評価での使用に適合させ得る。

10

【0448】

例えば、細胞培養モデルにおけるように標的が K R A S である場合、最も R a s 感受性の高いマウス腫瘍異種移植片は、変異 R a s タンパク質を発現する癌細胞に由来するものである。H - R a s 形質転換した膀胱癌細胞異種移植片を有するヌードマウスは、抗 R a s アンチセンス核酸に對して感受性であり、31 日間の治療期間後に腫瘍増殖の 80 % の阻害という結果を生じた (W i c k s t r o m, 2001, M o l . B i o t e c h n o l ., 18, 35-35)。Z h a n g ら (2000, G e n e T h e r ., 7, 2041) は、K R A S 変異体 (K R A S コドン 12 G G T から G T T へ; それぞれ H 4 4 1 および H 1 7 2 5 細胞) を標的とする抗 K R A S リボザイムアデノウイルスベクター (K R b z - A D V) を記載している。変異体 K R a s タンパク質を発現する非小細胞肺癌細胞 (N S C L C H 4 4 1 および H 1 7 2 5 細胞) をヌードマウス異種移植片において使用し、関連変異を欠く N S C L C H 1 6 5 0 細胞と比較した。K R b z - A D V による前処置は、H 4 4 1 および H 1 7 2 5 細胞の両方の生着を抑制し、未処置腫瘍細胞または対照ベクターを受容した動物における 100 % 生着および腫瘍増殖と比べ対照的であった。K R A S 誤制御／変異の他のマウスモデルも記載されている (例えば、肺腺癌の促進における K R A S の役割を特定した、K i m ら, C e l l 121: 823-835)。上記研究は、抗 R a s 剤による R a s 発現 (例えば、K R A S 発現) の阻害が動物における腫瘍増殖の阻害を引き起こす証拠を提供する。

20

30

【0449】

したがって、これらのモデルは、その他の K R A S 関連の表現型、疾患または障害の K R A S レベル、発現、腫瘍／癌形成、増殖、伝播、発達などの阻害における本発明の D s i R N A 分子の有効性の評価に使用し得る。これらのモデルなどは、全臨床設定において本発明の D s i R N A 分子の安全性／毒性および有効性を評価するために同様に使用し得る。

【0450】

本発明の実施では、別途明示されない限り、当該分野の技術の範囲内である化学、分子生物学、微生物学、組換え DNA、遺伝学、免疫学、細胞生物学、細胞培養およびトランスジェニック生物学の従来技術を用いる。例えば、M a n i a t i s ら, 1982, M o l e c u l a r C l o n i n g (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, C o l d S p r i n g H a r b o r, N. Y.) ; S a m b r o o k ら, 1989, M o l e c u l a r C l o n i n g, 第 2 版. (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, C o l d S p r i n g H a r b o r, N. Y.) ; S a m b r o o k および R u s s e l l, 2001, M o l e c u l a r C l o n i n g, 第 3 版. (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, C o l d S p r i n g H a r b o r, N. Y.) ; A u s u b e l ら, 1992), C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y (J o h n W i l e y & S o n s, 定期的

40

50

更新を含む) ; Glover, 1985, DNA Cloning (IRL Press, Oxford) ; Anand, 1992 ; GuthrieおよびFink, 1991 ; HarlowおよびLane, 1988, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) ; JakobyおよびPastan, 1979 ; Nucleic Acid Hybridization (B. D. HamesおよびS. J. Higgins編, 1984) ; Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins編, 1984) ; Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986) ; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ; 論文, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. MillerおよびM. P. Calos編, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ; Methods In Enzymology, Vol. 154および155 (Wuら編), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (MayerおよびWalker編, Academic Press, London, 1987) ; Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編, 1986) ; Riott, Essential Immunology, 第6版, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988 ; Hoganら, Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. , 1986) ; Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), (第4版, Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000) を参照されたい。

10

20

30

【0451】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術および科学用語は、本発明の属する分野の当業者により一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似または同等の方法および材料を、本発明の実施または試験に使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許およびその他の参考文献は、その内容全体が参照により組み込まれる。矛盾が生じる場合には、定義を含め本明細書が統制する。さらに、材料、方法および実施例は単に例示的なものであり、限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0452】

本発明を以下の実施例を参照しながら説明するが、これらは例として提供されるものであり、決して本発明を限定することを意図するものではない。当該技術分野で公知の標準的技術または以下に具体的に記載されている技術が用いられた。

40

【0453】

実施例1：二本鎖RNAオリゴヌクレオチドの調製
オリゴヌクレオチドの合成および精製

RNAメッセージ内の様々な部位、例えば、本明細書に記載のRNA配列内の標的配列と相互作用するようにDsiRNA分子を設計し得る。DsiRNA分子を本明細書に記載の方法を用いて化学的に合成する。一般的には、19～23mer siRNAに関して記載されている固相オリゴヌクレオチド合成法を用いてDsiRNA構築物を合成する

50

(例えば、Usmanら、米国特許第5,804,683号;第5,831,071号;第5,998,203号;第6,117,657号;第6,353,098号;第6,362,323号;第6,437,117号;第6,469,158号;Scaringeら、米国特許第6,111,086号;第6,008,400号;第6,111,086号を参照されたい)。

【0454】

標準的方法に従って、各RNA鎖を合成しHPLC精製する(Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa)。例えば、固相ホスホラミダイト化学を用いてRNAオリゴヌクレオチドを合成し、標準的技術を用いてNAP-5カラム(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.)上で脱保護および脱塩する(DamhaおよびOlgivie, 1993, Methods Mol Biol 20:81-114;Wincottら, 1995, Nucleic Acids Res 23:2677-84)。15分段階の線形勾配を用いたAmersham Source 15Qカラム(1.0cm×25cm;Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.)でのイオン交換高速液体クロマトグラフィー(IE-HPLC)を用いて、オリゴマーを精製する。濃度勾配は、90:10緩衝液A:Bから52:48緩衝液A:Bまで変化し、ここでは、緩衝液Aは100mM Tris(pH8.5)であり、緩衝液Bは100mM Tris(pH8.5)、1M NaClである。試料を260nmでモニターし、完全長オリゴヌクレオチド種に対応するピークを回収し、プールし、NAP-5カラム上で脱塩し、凍結乾燥する。

【0455】

各オリゴマーの純度をBeckman PACE 5000(Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif.)でのキャピラリー電気泳動(CE)により決定した。CEキャピラリーは内径が100μmであり、ssDNA 100Rゲル(Beckman-Coulter)を含有する。通常、約0.6ナノモルのオリゴヌクレオチドをキャピラリー内に注入し、444V/cmの電場で泳動させ、260nmでのUV吸収により検出した。変性Tris-ホウ酸7M-尿素泳動緩衝液をBeckman-Coulterから購入した。以下に記載する実験で使用するために、CEによる評価で少なくとも90%の純度のオリゴヌクレオチドを得た。化合物の同一性を、製造者の推奨プロトコールに従って、Voyager DE(商標)Biospectrometry Work Station(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)でのマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析により検証した。全オリゴマーの相対分子量を、多くの場合、予想分子質量の0.2%以内で得た。

【0456】

二本鎖の調製

一本鎖RNA(ssRNA)オリゴマーを、例えば、100mM酢酸カリウム、30mM HEPESからなる二本鎖緩衝液(pH7.5)中に100μMの濃度で再懸濁させた。相補的なセンス鎖とアンチセンス鎖を等モル量で混合し、例えば50μMの二本鎖の最終溶液を得る。試料をRNA緩衝液(IDT)中で100℃まで5分間加熱し、使用前に室温まで冷却させた。二本鎖RNA(dsRNA)オリゴマーは-20℃で保管した。一本鎖RNAオリゴマーは凍結乾燥させてまたは無ヌクレアーゼ水中に-80℃で保管した。

【0457】

命名法

一貫性をもたせるために、本明細書において以下の命名法を用いた。二本鎖に与えられる名称は、オリゴマーの長さおよびオーバーハングの有無を示す。「25/27」は、25塩基センス鎖と2塩基3'-オーバーハングを有する27塩基アンチセンス鎖とを有する非対称二本鎖である。「27/25」は、27塩基センス鎖と25塩基アンチセンス鎖

とを有する非対称二本鎖である。

【0458】

細胞培養およびRNAトランスフェクション

HeLa細胞をATCCから入手し、10%ウシ胎仔血清（HyClone）を添加したDulbeccoの改変Eagle培地（HyClone）中、5%CO₂下、37℃で維持した。RNAトランスフェクションでは、HeLa細胞を、リポフェクタミン（商標）RNAiMAX（Invitrogen）を用いて製造者の説明書に従い、図示されるように1nMまたは0.1nMの最終濃度のDsiRNAによりトランスフェクトした。簡潔には、各DsiRNAの0.2μMまたは0.02μMのストック溶液2.5μLを、46.5μLのOpti-MEM I（Invitrogen）および1μLのリポフェクタミン（商標）RNAiMAXと混合した。得られた混合物50μLを、12ウェルプレートの各ウェル内に加え、室温で20分間インキュベートして、DsiRNA：リポフェクタミン（商標）RNAiMAX複合体を形成させた。一方で、HeLa細胞をトリプシン処理し、367細胞/μLの最終濃度で培地中に再懸濁させた。最後に、450μLの細胞懸濁液を各ウェルに加え（最終体積500μL）、プレートを恒温器内に24時間置いた。

10

【0459】

阻害の評価

標的遺伝子ノックダウンをqRT-PCRにより判定し、値をリポフェクタミン（商標）RNAiMAXのみ（媒体対照）または未処置を含むHPR T発現対照処置に正規化した。

20

【0460】

RNA単離および解析

細胞を2mLのPBSで1回洗浄し、RNeasy Mini Kit（商標）（Qiagen）を用いて全RNAを抽出し、30μLの最終体積で溶出した。Transcriptor^{1st} Strnd cDNA Kit（商標）（Roche）およびランダムヘキサマーを製造者の説明書に従い使用して、1μgの全RNAを逆転写した。得られたcDNAの30分の1（0.66μL）を、3.33μLのH₂O、ならびにヒト遺伝子HPR T-1（アクセッション番号NM_000194）およびKRAS標的配列に特異的なプライマーおよびプローブを含有する3μMの混合物1μLと共に、5μLのIQ Multiplex Powermix（Bio-Rad）と混合した。

30

【0461】

定量的RT-PCR

C1000サーマルサイクラー（Bio-Rad）を備えたCFX96リアルタイムシステムを増幅反応に用いた。PCR条件は：95℃で3分間；次いで、95℃で10秒間；55℃で1分間の40サイクルの繰り返しであった。各試料は三重反復で試験した。相対的HPR TmRNAレベルを標的mRNAレベルに正規化し、トランスフェクション試薬のみの処置および未処置の対照試料で得られたmRNAレベルと比較した。Bio-Rad CFX Managerバージョン1.0ソフトウェアを用いてデータを解析した。

40

【0462】

実施例2：DsiRNA-ペプチドコンジュゲートの調製および使用

本発明のオリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートを、HyNic（6-ヒドラジノニコチンアミド）修飾ペプチドと4FB（4-ホルミルベンズアミド）修飾オリゴヌクレオチドとのコンジュゲーションに基づく化学により合成した。その他の当該技術分野で公知のペプチド合成法およびコンジュゲーション手順も適用可能である。

【0463】

HyNic部分をペプチド上に、NまたはC末端で、それぞれ6-Boc-HyNicまたはFMOC-Lys-（ε-6-BocHyNic）OHを用いて組み込んだ。TFA／アセトン／水／トリイソプロピルシラン（TIS）（92.5／2.5／2.5／2

50

． 5) を用いて、レジンからの切断を 2 時間行った。アセトンの存在が、T F A と強求核性のヒドラジンとの反応由来のいずれのフルオロアセトアミド形成もその場で阻止する脱保護ヒドラジン部分を有するヒドラゾンを形成する。粗ペプチドを H P L C および E S - M S により解析した。濃度勾配法を用いた R P - H P L C により生成物を単離した。P e g 1 2 ペプチドでは、固相ペプチド合成中にポリエチレングリコールシントンを直接加えた。いくつかの場合には、ポリエチレングリコールオリゴヌクレオチドシントンをを用いて、追加のポリエチレングリコールスパーサーもオリゴヌクレオチド末端に加えた。

【 0 4 6 4 】

アミノ修飾オリゴヌクレオチドを 5' - 4 F B - オリゴヌクレオチドに変換した。H y N i c - ペプチドと 4 F B 修飾オリゴヌクレオチドの連結は、2 ~ 5 モル過剰の H y N i c - ペプチドで行い、概ね 8 0 % を超えるコンジュゲート収率を得た。アニリンを含むことにより、ヒドラゾン結合形成が触媒されて反応速度が 1 0 ~ 1 0 0 倍向上し、概ね 9 5 % を超えるコンジュゲート収率が生じた。最適コンジュゲーション速度 (ヒドラゾン結合の形成) は、p H 4 . 5 ~ 5 . 0 の間で得られた。しかし、より高い p H においても、より遅い速度ではあるが反応が進行し得る。各コンジュゲーションの最適 p H を、異なるペプチド配列の溶解度も考慮して実験的に決定した。コンジュゲーションの段階は分光測定によりモニターし得る。ビス-アリアルヒドラゾン結合の形成を用いて、既知のモル吸光係数 (3 5 4 n m において 2 9 , 0 0 0) を用いてコンジュゲーション反応の進行の追跡および定量化の両方を行った。ダイアフィльтраーションを用いて過剰なペプチドを除去し、オリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートを得た。H y N i c をクエンチしたペプチドを生成するために、H y N i c - ペプチドを 2 - スルホベンズアルデヒドと反応させて、ペプチド上の H y N i c 反応部分を不活性化した。

【 0 4 6 5 】

無細胞ダイシングアッセイ

D s i R N A またはペプチドコンジュゲート D s i R N A (5 μ M の最終濃度) を組換えヒトダイサー酵素混合物 (G e n l a n t i s , 番号 T 5 2 0 0 2) と共に 3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし、停止液で反応を停止させた。この最終溶液をゲルローディング緩衝液 (B i o - R a d , 番号 1 6 1 - 0 7 6 7) と混合した。ダイサー切断 d s R N A およびインタクト D s i R N A を 1 8 % ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。B i o - R a d V e r s a D o c (商標) イメージングシステム (モデル番号 4 0 0 0 M P) を用いてゲルイメージを得た。

【 0 4 6 6 】

血清安定性アッセイ

D s i R N A またはペプチドコンジュゲート D s i R N A (2 μ M の最終濃度) を 9 0 % (v / v) マウス血清 (S i g m a , 番号 # M 5 9 0 5) 中、3 7 $^{\circ}$ C でインキュベートした。異なる時点 (0、2、4、8、1、1 0 および 2 5 時間) で、試料 1 0 μ L を 2 μ L の H ₂ O および 3 μ L のゲルローディング緩衝液 (B i o - R a d , 番号 1 6 1 - 0 7 6 7) と混合し、直ちにアルコール乾燥氷浴中で急速冷凍した。試料を 1 8 % ネイティブポリアクリルアミドゲル (B i o - R a d , 番号 1 6 1 - 1 2 1 6) 上で電気泳動した。分離した s i R N A バンドを、B i o - R a d V e r s a D o c (商標) イメージングシステム (B i o - R a d , モデル番号 4 0 0 0 M P) を用いて定量化した。9 0 % 血清中の各 d s R N A の半減期を、経時的な d s R N A バンド強度の変化をプロットすることにより計算した。

【 0 4 6 7 】

H P R T 1 および K R A S 標的化 D s i R N A

図 2 に示す、オリゴヌクレオチド配列、2' - O - メチルおよび末端修飾を有する H P R T 1 および K R A S 標的遺伝子に対する典型的な D s i R N A を、本明細書に記載の通りに合成した。

【 0 4 6 8 】

コンジュゲートペプチド

10

20

30

40

50

本発明の D s i R N A とのコンジュゲーションに使用されたまたは使用可能な典型的なペプチドを図 3 に列挙し、各ペプチドに関連した正味荷電も示す。

【0469】

様々なペプチド-D s i R N A コンジュゲートの良好な合成は、良好なコンジュゲーションに伴うサイズの増加（およびしたがって、電気泳動移動速度の低下）の観察により確認した。図 4～6 で示されるように、H P R T 1 および K R A S 標的化 D s i R N A は共に多くのペプチドと良好にコンジュゲートされ、以下のコンジュゲートを形成した：K 1 3 7 9-配列番号 3 2；K 1 3 7 9-配列番号 6 2；K 1 4 5 9-配列番号 3 2（図 4）；K 1 4 5 9-配列番号 1 1 8；K 1 4 5 9-P e g 1 2-配列番号 1 1 8；K 1 3 7 9-配列番号 1 1 8；K 1 3 7 9-P e g 1 2-配列番号 1 1 8（図 5）；H 1 4 6 0-配列番号 1 1 8；および H 1 4 6 0-P e g 1 2-配列番号 1 1 8（図 6）。

10

【0470】

切断可能なリンカー部分（例えば、ジスルフィド基）を有する D s i R N A-ペプチドコンジュゲートも良好に合成された。具体的には、図 7 は、配列番号 1 1 8 および 1 2 0 のペプチドと K R A S 標的化 D s i R N A の K 1 3 7 9 との安定かつ切断可能なコンジュゲートが生成されたことを示す。

【0471】

D s i R N A は環状ペプチドともコンジュゲートされた。図 8 に示されるように、K R A 標的化 D s i R N A である K 1 4 5 9 が環状ペプチドである配列番号 1 5 1 と良好にコンジュゲートされた。

20

【0472】

特定のペプチド-D s i R N A コンジュゲートのダイサー切断を評価するために、K 1 0 9 6-配列番号 3 9 および K 1 0 9 6-配列番号 1 2 0 のコンジュゲートに関して、無細胞ダイシングアッセイを上記のように行った。図 9 および 1 0 に示されるように、両コンジュゲートのダイサー切断が観察された。

【0473】

実施例 3：トランスフェクトされた d s R N A-ペプチドコンジュゲート（例えば、d s R N A-送達ペプチドコンジュゲート）は細胞中の標的遺伝子レベルの発現を減少させた細胞培養および R N A トランスフェクション

H e L a および H e p G 2 細胞を A T C C から入手し、10%ウシ胎仔血清（H y C l o n e）を添加した D u l b e c c o の改変 E a g l e 培地（H y C l o n e）中、5% C O₂ 下、37℃で維持した。d s R N A および d s R N A-送達ペプチドコンジュゲートのトランスフェクションでは、H e L a 細胞を、リポフェクタミン（商標）R N A i M A X（I n v i t r o g e n）の存在下、図示された最終濃度（例えば、1 n M または 0.1 n M）で非コンジュゲートまたはコンジュゲート D s i R N A によりトランスフェクトした。特定の例では、非コンジュゲート D s i R N A を陽性対照としても使用した。特定の例では、各 D s i R N A の 0.2 μ M または 0.02 μ M のストック溶液 2.5 μ L を、47.5 μ L の O p t i-M E M I（I n v i t r o g e n）と混合した。リポフェクタミン（商標）対照では、各 D s i R N A の 0.2 μ M または 0.02 μ M のストック溶液 2.5 μ L を、46.5 μ L の O p t i-M E M I（I n v i t r o g e n）および 1 μ L のリポフェクタミン（商標）R N A i M A X と混合した。得られた混合物 50 μ L を、12 ウェルプレートの各ウェル内に加え、室温で 20 分間インキュベートして、D s i R N A：リポフェクタミン（商標）R N A i M A 複合体を形成させた。一方で、H e L a または H e p G 2 細胞をトリプシン処理し、約 367 細胞/μ L の最終濃度で培地中に再懸濁させた。最後に、450 μ L の細胞懸濁液を各ウェルに加え（最終体積 500 μ L）、プレートを恒温器内に 24 時間置いた。用量反応実験では、トランスフェクトした D s i R N A の濃度を最初 1 p M から 1 n M に変化させた。トランスフェクション媒体の非存在下で細胞に投与する D s i R N A-ペプチドコンジュゲートの用量反応実験では、投与した D s i R N A および D s i R N A-ペプチドコンジュゲートの濃度を約 5 n M から約 5 μ M に変化させた。経時的実験も行うことができ、約 4 時間～約 72 時間のイン

30

40

50

キュベーション時間を調べた。

【0474】

阻害の評価

標的遺伝子ノックダウンをqRT-PCRにより判定し、値をリポフェクタミン（商標）RNAiMAXのみ（媒体対照）または未処置を含むHPRT発現対照処置に正規化した。

【0475】

RNA単離および解析

細胞を2mLのPBSで1回洗浄し、RNeasy Mini Kit（商標）（Qiagen）を用いて全RNAを抽出し、30μLの最終体積で溶出した。Transcript^{1st} Strand cDNA Kit（商標）（Roche）およびランダムヘキサマーを製造者の説明書に従い使用して、1μgの全RNAを逆転写した。得られたcDNAの30分の1（0.66μL）を、3.33μLのH₂O、ならびにヒト遺伝子HPRT-1（アクセッション番号NM_000194）およびKRAS標的配列に特異的なプライマーおよびプローブを含有する3μMの混合物1μLと共に、5μLのIQ Multiplex Powermix（Bio-Rad）と混合した。

【0476】

定量的RT-PCR

C1000サーマルサイクラー（Bio-Rad）を備えたCFX96リアルタイムシステムを増幅反応に用いた。PCR条件は：95℃で3分間；次いで、95℃で10秒間；55℃で1分間の40サイクルの繰り返しであった。各試料は二重反復（各薬剤に関して二重反復実験を行い、図2～19にそのデータを示す）で試験した。相対的HPRT mRNAレベルを標的mRNAレベルに正規化し、トランスフェクション試薬のみの処置および未処置の対照試料で得られたmRNAレベルと比較した。Bio-Rad CFX Managerバージョン1.0ソフトウェアを用いてデータを解析した。発現データを、非コンジュゲートdsRNA処置下での発現とdsRNA-送達ペプチドコンジュゲート処置下での発現との比較として表した。

【0477】

最初にDsiRNA-ペプチドコンジュゲートを、トランスフェクションにより投与した場合に細胞中の標的mRNAレベルを阻害する能力に関して調べた。図11および12に示されるように、KRAS標的化DsiRNAであるK1096コンジュゲートの3つの異なるペプチドコンジュゲート（K1096-配列番号39；K1096-Peg12-配列番号32；およびK1096-配列番号120）はすべて、0.1nMおよびそれより高い濃度でのトランスフェクションによりHeLa細胞に投与した場合、標的mRNAレベルを少なくとも80%阻害することが観察された。また、ペプチド-DsiRNAコンジュゲートに見られる標的遺伝子阻害のレベルが、遊離K1096 DsiRNAに見られるものと同様であることも観察された。したがって、ペプチド-DsiRNAコンジュゲートは、トランスフェクションによりHeLa細胞に投与した場合、標的RNAレベルの効果的な阻害剤あることが観察された。

【0478】

実施例4：DsiRNA-ペプチドコンジュゲートは血清中での安定性を示した

DsiRNA剤の血清安定性を本明細書に記載の通りに評価した。図13および14に示されるように、DsiRNA K1096と配列番号39または120のペプチドとのコンジュゲーションにより、別の同一の修飾パターンを有するが配列番号39または120のペプチドを欠くDsiRNAと比べて、コンジュゲート薬剤K1096-配列番号39（半減期=12.1時間）およびK1096-配列番号120（半減期=13.3時間）の半減期の有意な延長が生じた。

【0479】

実施例5：トランスフェクション媒体なしで投与されたdsRNA-ペプチドコンジュゲート（例えば、dsRNA-送達ペプチドコンジュゲート）は細胞中の標的遺伝子レベル

10

20

30

40

50

の発現を減少させた

典型的な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートが、いかなるトランスフェクション媒体も存在しない状態で、このようなコンジュゲート薬剤の標的細胞への送達を促進する能力を評価するために、一連の D s i R N A - ペプチドコンジュゲートを 20 nM ~ 2 μM の範囲の濃度で H e L a 細胞に投与した。図 15 ~ 17 に示されるように、標的 m R N A レベルの有意な阻害を達成するためには、トランスフェクトした D s i R N A に比べて高濃度の D s i R N A - ペプチドコンジュゲート必要であった。しかし、試験した 6 つのコンジュゲート（図 15 の K 1 0 9 6 - P e g 1 2 - 配列番号 3 2 および K 1 0 9 6 - P e g 1 2 - 配列番号 6 2 ; 図 16 の K 1 0 9 6 - P e g 1 2 - 配列番号 1 1 8 および K 1 0 9 6 - 配列番号 1 2 0 ; ならびに図 17 の K 1 3 3 6 - 配列番号 3 2 および K 1 3 3 6 - 配列番号 6 2 ）はすべて用量反応的に作用し、2 μM の濃度において、すべてのコンジュゲート分子で有意なレベルの標的遺伝子阻害が観察された。実際、図 16 の K 1 0 9 6 - 配列番号 1 2 0 コンジュゲートは、すべての試験濃度（20 nM、200 nM および 2 μM）において、標的 m R N A レベルの驚くべきかつ有意な減少を示した。

10

20

30

40

50

【0480】

次いで、K 1 3 7 9 - 配列番号 1 1 8 および K 1 3 7 9 - 配列番号 1 2 0 の D s i R N A - ペプチドコンジュゲートを、トランスフェクション媒体の非存在下、5 μM の濃度で H e p G 2 細胞に投与した場合に K R A S 標的遺伝子を阻害する能力に関して評価した。図 18 に示されるように、トランスフェクション媒体の非存在下、5 μM の濃度で H e p G 2 細胞に投与した両コンジュゲートで、90% を超える標的 m R N A レベルの減少が認められたことは注目すべきである。このような結果は、1 nM で H e p G 2 細胞に投与した単独の K 1 3 7 9 D s i R N A で観察された結果と同様であった。驚くべきことに、H e p G 2 細胞に投与する混合物中に、クエンチされたペプチド（クエンチされた配列番号 1 1 8 またはクエンチされた配列番号 1 2 0 ）を遊離 D s i R N A K 1 3 7 9 と共に含むことにより、いずれの標的 m R N A 阻害活性も完全に喪失した。

【0481】

典型的な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートが、送達媒体の非存在下で、対応する遊離 D s i R N A よりも効率的な標的 m R N A の阻害剤であるか否かを調べるために、遊離 K 1 3 7 9 D s i R N A と K 1 3 7 9 - 配列番号 1 1 8 コンジュゲートとを比較する、および遊離 K 1 3 7 9 D s i R N A と K 1 3 7 9 - 配列番号 1 2 0 コンジュゲートも比較する用量反応曲線を得た。図 19 に示されるように、K 1 3 7 9 - ペプチドコンジュゲートは、参考となる濃度である I C₅₀ のすべてにわたって、対応する遊離 K 1 3 7 9 D s i R N A よりも有意に良好に作用した。実際、トランスフェクション媒体の非存在下での D s i R N A - ペプチドコンジュゲートに関して測定された I C₅₀ 値は、対応する D s i R N A - ペプチドコンジュゲートと比べて、遊離 D s i R N A が 2 ~ 3 倍高かった（したがって、作用が弱かった）。

D s i R N A よりも有意に良好に作用した。実際、トランスフェクション媒体の非存在下での D s i R N A - ペプチドコンジュゲートに関して測定された I C₅₀ 値は、対応する D s i R N A - ペプチドコンジュゲートと比べて、遊離 D s i R N A が 2 ~ 3 倍高かった（したがって、作用が弱かった）。

【0482】

実施例 6 : さらに送達ペプチド - d s R N A および / または標的化ペプチド - d s R N A コンジュゲートの調製

さらなる好適な標的 D s i R N A 剤を、予備スクリーニングした D s i R N A 集団から選択する。D s i R N A の設計は、数多くの可能な D s i R N A の予測される活性 / 有効性の評価をある配列領域にわたりコンピュータで行う、予測スコアリングアルゴリズムの使用を任意に含み得る。

【0483】

本明細書の上記方法のいずれかにより、本発明の d s R N A を送達ペプチドまたは標的化ペプチドとコンジュゲートする。5' アミノ基を有する約 20 mg の D s i R N A (約 1 μmol) を、マレイミド化学を用いて、末端スルフィドリル基を有する 3 ~ 5 mol 過剰のペプチドと反応させる (M o s c h o s ら, B i o c o n j u g C h e m . 2007 ; 18 (5) : 1450 - 9 ; N i s h i n a ら, M o l T h e r . 2008 ; 16 (4) : 734 - 40) 。ペプチド - R N A コンジュゲートをダイアフィルトレーションに

より精製して過剰なペプチドを除去し、脱塩して、凍結乾燥粉末として得る。最終産物の純度を、デコンボリューションと共に分析用陰イオン交換HPLCおよびエレクトロスプレー質量分析により決定する。

【0484】

実施例7：細胞中の標的遺伝子の発現を減少させるためのdsRNA-標的化ペプチドコンジュゲートのさらなる使用

細胞培養およびRNAトランスフェクション

HeLa、Hep3B、HepG2、HT29、LS174TおよびNeuro2aをATCCから入手し、10%の熱不活性化FBSを含有する推奨基礎培地中、5%CO₂下、37℃で維持する。dsRNAおよびdsRNA-標的化ペプチドコンジュゲートのトランスフェクションでは、細胞を、図示されるように1nMまたは0.1nMの最終濃度の非コンジュゲートまたはコンジュゲートDsiRNAによりトランスフェクトする。リポフェクタミン（商標）RNAiMAX（Invitrogen）。DsiRNAは陽性対照としても使用する。簡潔には、各DsiRNAの0.2μMまたは0.02μMのストック溶液2.5μLを、47.5μLのOpti-MEM I（Invitrogen）と混合する。リポフェクタミン（商標）対照では、各DsiRNAの0.2μMまたは0.02μMのストック溶液2.5μLを、46.5μLのOpti-MEM I（Invitrogen）および1μLのリポフェクタミン（商標）RNAiMAXと混合する。得られた混合物50μLを、12ウェルプレートの各ウェル内に加え、室温で20分間インキュベートして、DsiRNA：リポフェクタミン（商標）RNAiMAX複合体を形成させる。一方で、細胞をトリプシン処理し、約367細胞/μLの最終濃度で培地中に再懸濁させる。最後に、450μLの細胞懸濁液を各ウェルに加え（最終体積500μL）、プレートを恒温器内に24時間置く。用量反応実験では、DsiRNAの濃度を最初1pMから1nMに変化させる。経時的実験では、約4時間～約72時間のインキュベーション時間を調べる。

【0485】

阻害の評価

標的遺伝子ノックダウンをqRT-PCRにより判定し、値をリポフェクタミン（商標）RNAiMAXのみ（媒体対照）または未処置を含むHPR T発現対照処置に正規化する。

【0486】

RNA単離および解析

細胞を2mLのPBSで1回洗浄し、RNeasy Mini Kit（商標）（Qiagen）を用いて全RNAを抽出し、30μLの最終体積で溶出する。Transcript^{1st} Strand cDNA Kit（商標）（Roche）およびランダムヘキサマーを製造者の説明書に従い使用して、1μgの全RNAを逆転写する。得られたcDNAの30分の1（0.66μL）を、3.33μLのH₂O、ならびにヒト遺伝子HPR T-1（アクセッション番号NM_000194）およびKRAS標的配列に特異的なプライマーおよびプローブを含有する3μMの混合物1μLと共に、5μLのIQ Multiplex Powermix（Bio-Rad）と混合する。

【0487】

定量的RT-PCR

C1000サーマルサイクラー（Bio-Rad）を備えたCFX96リアルタイムシステムを増幅反応に用いる。PCR条件は：95℃で3分間；次いで、95℃で10秒間；55℃で1分間の40サイクルの繰り返しである。各試料は三重反復で試験する。相対的HPR TmRNAレベルを標的mRNAレベルに正規化し、トランスフェクション試薬のみの処置および未処置の対照試料で得られたmRNAレベルと比較する。Bio-Rad CFX Managerバージョン1.0ソフトウェアを用いてデータを解析する。発現データを、非コンジュゲートdsRNA処置下での発現とdsRNA-標的化ペプチドコンジュゲート処置下での発現との比較として表す。

【0488】

実施例8：動物中の標的遺伝子の発現を減少させるためのdsRNA-送達ペプチドコンジュゲートの使用

dsRNA、ペプチドおよびdsRNA-送達ペプチドコンジュゲートの送達効率およびその後の機能性を評価するために、皮下(s.c.)腫瘍モデル(Judgeら, J Clin Invest. 2009; 119(3): 661-73)を用いる。雌SCID/beigeマウスにおいて、50 μ LのPBS中 3×10^6 個の細胞を左後方側腹内にs.c.注射することによりHep3B腫瘍を確立する。腫瘍が触知可能な播種後10~17日目に、マウスを無作為に治療群に分ける。dsRNA、ペプチドおよびdsRNA-送達ペプチドコンジュゲートの製剤またはPBS媒体対照を、各個体の体重に従ってmg(dsRNA)/kg(体重)の基準を基に計算して、標準的な静脈内(i.v.)注射により側尾静脈から投与する。デジタルキャリパーを用いて腫瘍の2つの寸法(幅×長さ)を測定し、腫瘍増殖を評価する。方程式 $x \times y \times y / 2$ (式中、 x =長径および y =短径である)を用いて腫瘍体積を計算し、群平均 $\pm$ SDとして表す。また、異なる処置群の個体から腫瘍組織を摘出し、遺伝子ノックダウンを確認する。腫瘍体積、生存およびRNA発現のデータを、非コンジュゲートdsRNA処置とdsRNA-送達ペプチドコンジュゲート処置の間の比較として表す。

10

【0489】

実施例9：細胞中の標的遺伝子の発現を減少させるためのdsRNA-標的化ペプチドコンジュゲートの使用

20

dsRNA、ペプチドおよびdsRNA-標的化ペプチドコンジュゲートの標的化効率およびその後の機能性を評価するために、肝内腫瘍モデル(Judgeら, J Clin Invest. 2009; 119(3): 661-73)を用いる。マウスにおいて、Hep3BまたはNeuro2a腫瘍細胞の直接的な肝内注射により肝腫瘍を確立する。Hep3BおよびNeuro2a腫瘍のための宿主として、雌SCID/beigeマウスおよび雄A/Jマウスをそれぞれ使用する。マウスをガス麻酔下に保持し、胸骨下方に正中線を横切る単一の1.5cmの切開を行い、左側肝葉を露出させる。25 μ LのPBS中に懸濁させた 1×10^6 個のHep3B細胞または 1×10^5 個のNeuro2a細胞を、Hamiltonシリンジおよび30ゲージ針を用いて、浅い角度で徐々に肝葉内に注射する。次いで、穿刺創傷にスワブを適用して縫合前に止血する。マウスを無菌ケージ内で麻酔から回復させ、従来の飼育に戻す前に2~4時間、厳重にモニターする。腫瘍移植の8~11日後に、マウスを無作為に処置群に分ける：dsRNA、ペプチドおよびdsRNA-送達ペプチドコンジュゲートの製剤またはPBS媒体対照を、各個体の体重に従ってmg(dsRNA)/kg(体重)の基準を基に計算して、標準的な静脈内(i.v.)注射により側尾静脈から投与する。腫瘍量の増大および治療耐性の指標として、実験期間を通して体重をモニターする。有効性の実験では、明確な人道的エンドポイントを生存の代わりとして決定する。臨床兆候、体重減少および腹部膨満の組合せに基づいて評価を行い、腫瘍量を理由とする安楽死の日を定める。異なる処置群の個体から腫瘍組織を摘出し、遺伝子ノックダウンを確認する。

30

【0490】

40

また、ペプチドおよび/またはdsRNAを蛍光タグで標識し、生存動物イメージングシステム(XenogenまたはBioRad)を用いて蛍光生体内分布実験を行うことにより、腫瘍細胞標的化に関するペプチド、dsRNAおよびdsRNA-ペプチドコンジュゲートの機能性も試験する(Eguchiら, Nat Biotechnol. 2009 May 17. [印刷前電子出版])。この方法を用いて、および遊離(すなわち、非コンジュゲート)dsRNAと比較することにより、単独のペプチドおよびdsRNA-ペプチドコンジュゲートの両方に関して、ペプチドが腫瘍細胞と結合する能力が確認される。これに対し、この実験で対照として使用する非コンジュゲートdsRNAは、コンジュゲートdsRNAが腫瘍表面に対すると同程度には結合することができない。有効性エンドポイント、RNA発現および生体内分布のデータを、非コンジュゲートdsRNA

50

A 処置と d s R N A - 標的化ペプチドコンジュゲート処置の間の比較として表す。

【0491】

実施例10：K R A S 遺伝子発現の下方制御を評価するためのさらなる細胞培養モデルの使用

抗 R a s 薬剤での処置後に R a s 仲介による効果を見るために、細胞培養モデルにおいて様々なエンドポイントが用いられている。表現型エンドポイントとしては、細胞増殖の阻害、R N A 発現および R a s タンパク質発現の減少が挙げられる。K R A S 癌遺伝子変異は特定の腫瘍細胞の増殖の増大と直接関連するため、細胞培養アッセイでは増殖エンドポイントを一次スクリーニングとして使用することが好ましい。このエンドポイントを測定し得る方法がいくつかある。本発明の D s i R N A - ペプチドコンジュゲートで細胞を処置した後、細胞を増殖させ（通常、5日）、その後細胞生存率、細胞 D N A 内への [³H] チミジン取り込みおよび／または細胞密度を測定する。細胞密度のアッセイは、市販の蛍光核酸染色剤（例えば、S y t o（登録商標）13または C y Q u a n t（登録商標）など）を用いた96ウェルフォーマットで行い得る。2つ目の確認エンドポイントとして、D s i R N A - ペプチド仲介による K R a s タンパク質発現レベルの減少を、K R a s 特異的 E L I S A を用いて評価し得る。

10

【0492】

実施例11：K R A S 誤制御のマウスモデルにおける抗 K R A S D s i R N A の有効性の評価

インビトロアッセイから選択された抗 K R A S D s i R N A - ペプチドコンジュゲートを、例えば、異種移植およびその他の動物モデルを含めたマウスモデルにおいて、上記のようにさらに試験し得る。1つの例では、K R A S レベルの誤制御（例えば、上昇）を有するマウスに、本発明の D s i R N A - ペプチド剤を尾静脈への水圧注入により投与する。1群当たり3～4匹のマウス（試験する特定の D s i R N A 剤に基づいて分けた）に 50 μ g または 200 μ g の D s i R N A を注射する。R T - q P C R を用いて K R A S R N A のレベルを評価する。加えてまたは代わりに、当該技術分野で認められている方法を用いて K R a s レベル（例えば、K R a s タンパク質レベルおよび／または癌細胞／腫瘍形成、増殖または伝播）を評価し得るか、または K R A S の誤制御に関連した表現型（例えば、腫瘍の形成、増殖、転移など）をモニターする（任意に K R A S 転写産物または K R a s タンパク質レベルの測定の代わりとして）。次いで、上記動物モデルにおける活性な D s i R N A - ペプチドコンジュゲートを、標準的な化学療法と組み合わせて試験することもできる。

20

30

【0493】

実施例12：診断的使用

本発明の d s R N A - ペプチド分子は、例えば様々な応用、例えば臨床的、産業的、環境的、農業的および／または研究的設定における分子標的（例えば、R N A）の同定のような、様々な診断応用において使用し得る。d s R N A - ペプチド分子のこのような診断的使用は、例えば、細胞溶解物または部分精製細胞溶解物を用いた、再構築された R N A i システムを用いることを含む。本発明の d s R N A - ペプチド分子は、疾患細胞内の遺伝的浮動または変異を調べるための診断ツールとして使用し得る。d s R N A - ペプチド活性と標的 R N A の構造との間の密接な関係により、標的 R N A の塩基対形成および三次元構造を変化させる標的分子の任意の領域における変異の検出が可能となる。本発明で記載されている複数の d s R N A - ペプチド分子を使用することにより、インビトロのみならず細胞および組織における R N A 構造および機能にとって重要なヌクレオチド変化を位置付け得る。D s i R N A 分子による標的 R N A の切断を用いて遺伝子発現を阻害し、特定の標的に関連した疾患または障害の進行における特定の遺伝子産物の役割を明らかにし得る。このようにして、他の遺伝子標的を重要な疾患メディエーターとして明らかにし得る。こうした実験は、併用療法（例えば、異なる遺伝子に対して標的化した複数の D s i R N A 分子、既知の小分子阻害剤と結合した D s i R N A 分子または D s i R N A 分子および／またはその他の化学的もしくは生物学的分子と組み合わせた間欠的治療）の可能性

40

50

を提供することにより、疾患進行のより優れた治療をもたらすであろう。本発明の D s i R N A 分子のその他のインビトロ使用は当該技術分野で公知であり、疾患または関連する状態に関連した R N A の存在の検出を含む。このような R N A は、D s i R N A での治療後の切断産物の存在を標準的な方法、例えば蛍光共鳴エネルギー転移 (F R E T) を用いて判定することにより検出される。

【 0 4 9 4 】

特定の例では、標的 K R A S R N A の野生型または変異もしくは多型形態のみを切断する D s i R N A 分子をアッセイに使用し得る。1 つ目の D s i R N A 分子 (すなわち、標的 K R A S R N A の野生型形態のみを切断するもの) を用いて試料中に存在する野生型 K R A S R N A を同定し、2 つ目の D s i R N A 分子 (すなわち、標的 R N A i の変異または多型形態のみを切断するもの) を用いて試料中の変異または多型 K R A S R N A を同定する。反応対照として、野生型および変異または多型 K R A S R N A の両方の合成基質を両 D s i R N A 分子により切断し、反応における D s i R N A の相対的効率および「非標的」K R A S R N A 種の切断の非存在を示す。合成基質由来の切断産物は、試料集団中の野生型および変異 K R A S R N A の解析のサイズマーカーを生成する働きもある。したがって、各解析には 2 種類の D s i R N A 分子、2 種類の基質および 1 種類の未知試料、合わせて 6 つの反応物が必要である。切断産物の存在は、各 K R A S R N A の完全長および切断フラグメントがポリアクリルアミドゲルの 1 つのレーンで解析され得るように R N A ーゼ保護アッセイを用いて判定する。標的細胞における変異または多型 K R A S R N A の発現および K R A S 関連の表現型変化の推定リスクの洞察を得るために、必ずしも結果を定量化する必要はない。そのタンパク質産物が表現型の発現に関与するとされる (すなわち、疾患に関連する / 付随する) K R A S m R N A の発現は、リスクを確立するのに適している。同程度の比活性のプローブを両転写産物に対して使用した場合、K R A S R N A レベルの定性的比較が適切であり、かつ初期診断のコストを低減する。野生型に対する変異または多型形態の高い比は、K R A S R N A レベルを定性的に比較するか、または定量的に比較するかに関わりなく、高いリスクと関連付けられる。

【 0 4 9 5 】

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、本発明が属する技術分野の当業者の技術レベルを示すものである。本開示で引用されるすべての参考文献は、各参考文献が個々にその内容全体が参照により組み込まれた場合と同様に、参照により組み込まれる。

【 0 4 9 6 】

本発明が、目的を遂行し、言及される結果および利点ならびに本発明に固有のそれらを得るために十分に適合されることを、当業者であれば容易に理解するであろう。現時点で好適な実施形態の代表的なものとして本明細書に記載されている方法および組成物は典型的なものであり、本発明の範囲の制限を意図するものではない。それらの改変およびその他の使用を当業者は思いつくであろうが、それらは本発明の精神の範囲内に包含されるものであり、特許請求の範囲により規定される。

【 0 4 9 7 】

様々な置換および修飾が、本発明の範囲および精神を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行われ得ることは、当業者には容易に明らかとなるであろう。したがって、このような追加の実施形態は、本発明および以下の特許請求の範囲内にある。本発明は、R N A i 活性を仲介するための活性が向上した核酸構築物の生成を目的として、本明細書に記載の化学修飾の様々な組合せおよび / または置換を試験することを当業者に教示する。このような向上した活性は、向上した安定性、向上したバイオアベイラビリティおよび / または R N A i を仲介する細胞応答の向上した活性化を含み得る。したがって、本明細書に記載の特定の実施形態は限定的なものではなく、当業者は、本明細書に記載の修飾の特定の組合せを、向上した R N A i 活性を有する D s i R N A 分子の同定を目的として、必要以上の実験を行わずに試験し得ることを容易に理解し得る。

【 0 4 9 8 】

本明細書に例として記載されている本発明は、本明細書に具体的に開示されていない任意の1つまたは複数の要素、1つまたは複数の制限の非存在下で適切に実施し得る。したがって、例えば、本明細書の各場合において、「～を含む」、「本質的に～からになる」および「～からなる」のいずれの用語も、他の2つと互いに置き換え得る。使用されている用語および表現は、制限ではなく説明のための用語として使用され、示されているおよび記載されている特性またはその一部のあらゆる等価物を排除するような用語および表現の使用を意図するものではないが、特許請求される本発明の範囲内で様々な修正が可能であることが理解される。したがって、本発明は好適な実施形態、任意の特性により具体的に開示されているが、本明細書で開示される概念の修正および変形は当業者により用いられ得るものであること、そしてこのような修正および変形は説明および添付の特許請求の範囲により規定される本発明の範囲内にあると見なされることが理解されるべきである。

10

【0499】

さらに、本発明の特性または態様がマーカッシュ群または他の分類の選択肢で記載されている場合、本発明は、マーカッシュ群または他の群の任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループでも記載されることを当業者は理解するであろう。

【0500】

本発明の記載との関連における（特に、以下の特許請求との関連における）「a」および「an」および「the」ならびに同様の指示語は、本明細書に別途示されるか、または文脈により明らかに否定されない限り、単数および複数の両方を含めると解釈されるべきである。「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」および「含有する（containing）」は、別途注記されない限り、制約のない用語（すなわち、「～を含むが、これらに限定されない」を意味する）として解釈されるべきである。本明細書における数値範囲の記載は、本明細書に別途示されない限り、その範囲内に含まれる各個別の数値に個々に言及するための単なる簡略な表記法としての役割を果たすことが意図され、各個別の数値は、それが本明細書に個々に記載され場合と同様に本明細書に組み込まれる。本明細書に記載のすべての方法は、本明細書に別途示されるか、または文脈により別途明らかに否定されない限り、任意の適切な順序で行い得る。本明細書に記載されるあらゆる例または例示的語句（例えば、「～のような（例えば～など）」は、単に本発明をより理解しやすくすることを意図するものであり、別途特許請求されない限り、本発明の範囲を制限するものではない。本明細書の語句はいずれも、本発明の実施に不可欠なものとして特許請求されていない任意の要素を示すものとして解釈されるべきではない。

20

30

【0501】

本発明の実施形態は、本発明を実施するために、本発明者らの知る最良の態様を含めて本明細書に記載されている。このような実施形態の変更は、上の記載を読めば当業者に明らかとなり得る。

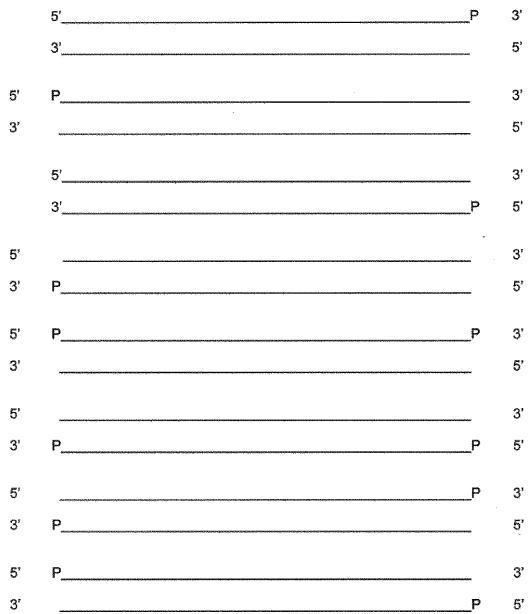
【0502】

本発明者らは、当業者が必要に応じてこのような変形物を用いることを予想し、かつ本発明者らは、本発明が、本明細書に具体的に記載のものとは別の方法で実施されることを意図する。したがって、本発明は、適用法により認められる本明細書に添付の特許請求の範囲に記載される対象のすべての修正物および等価物を含む。さらに、本明細書に別途示されるか、または文脈により別途明らかに否定されない限り、すべての可能なそれらの変形物における上記要素の任意の組合せが本明細書に包含される。当業者は、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態の数多くの等価物を認識する、または日常的な実験のみを用いて確認することができるであろう。このような等価物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

40

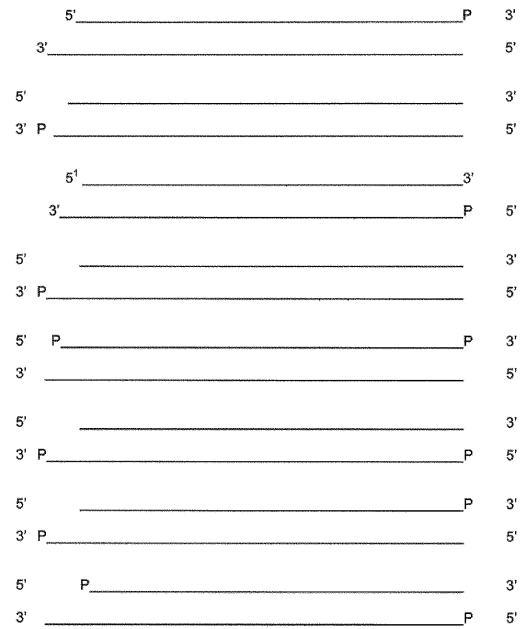
【図 1 A】

図 1 A



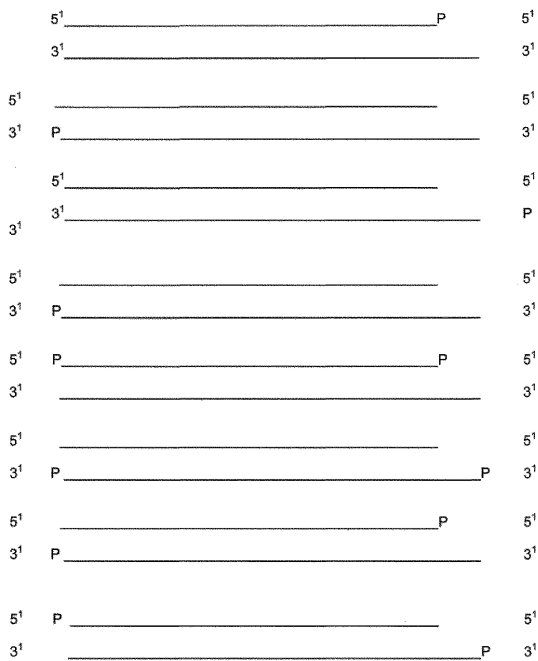
【図 1 B】

図 1 B



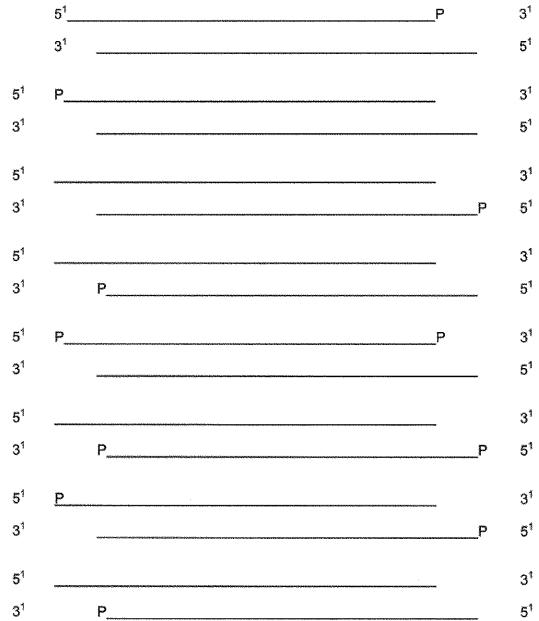
【図 1 C】

図 1 C

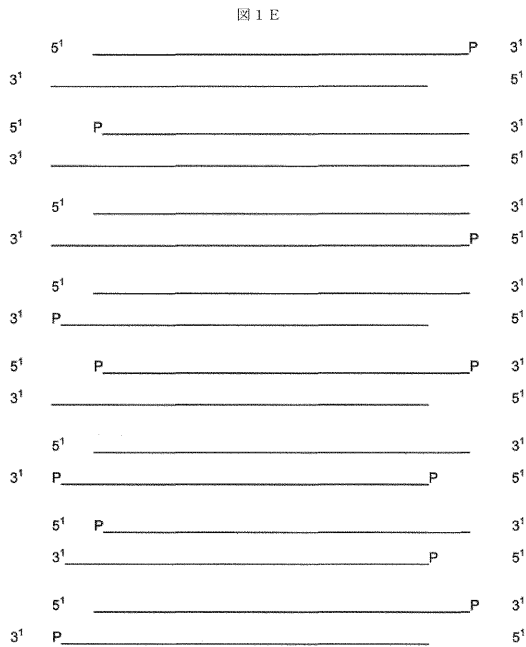


【図 1 D】

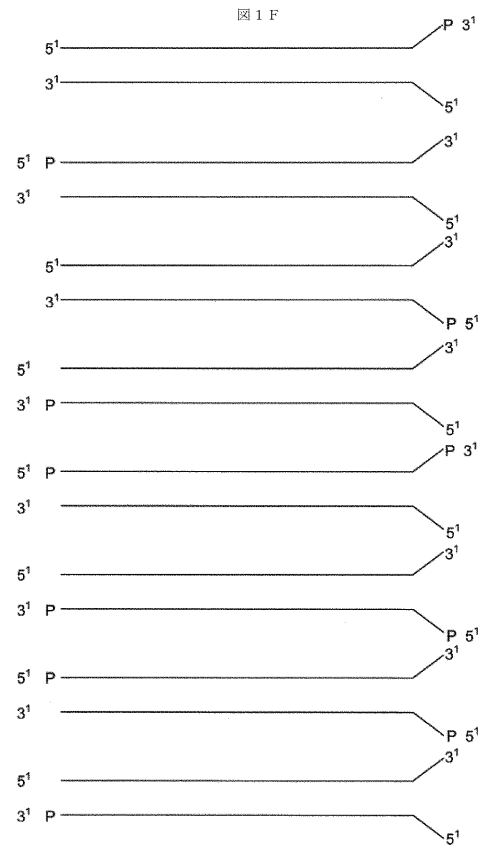
図 1 D



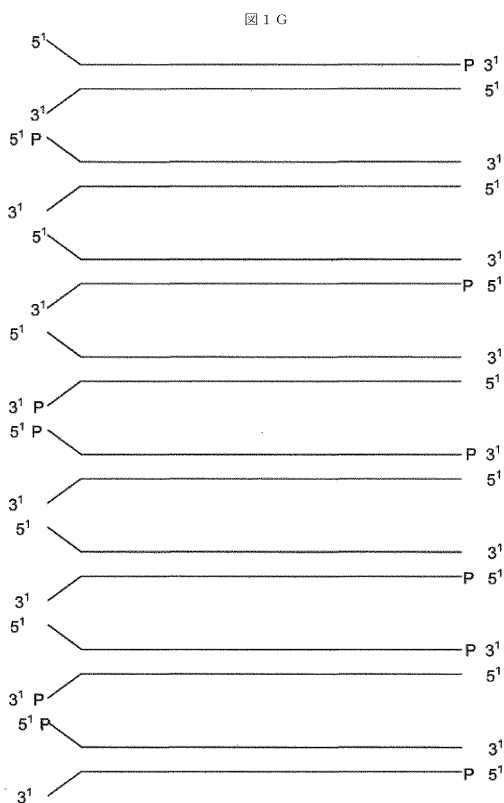
【図 1 E】



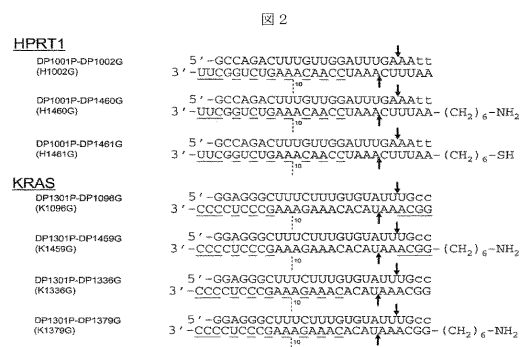
【図 1 F】



【図 1 G】



【図 2】

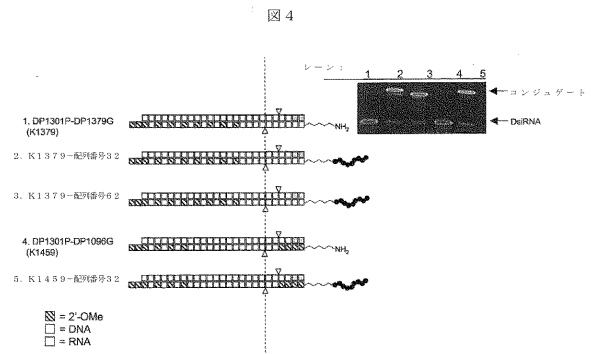


【図 3】

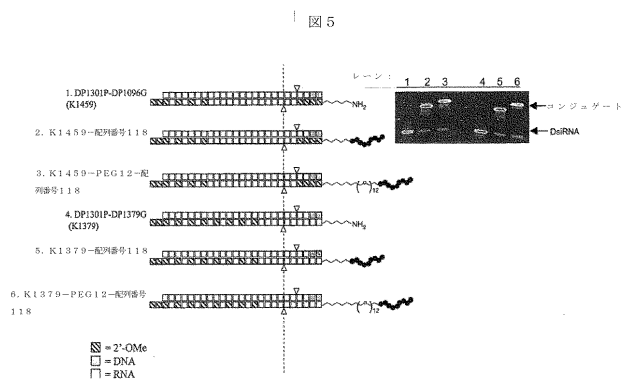
図 3

配列番号	配列	正味荷電
39	— GEFVMNPANAQGHPTGTRL	+1
149	— GEFVMNAANAQGHTAGTRL	+1
118	— GTFFYGGSRGRNNFKTEEY	+2
120	— GTFFYGGSRGRNNFRTEEY	+2
31	— GVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDL	+3
32	— GVRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL	+1
33	— GKSVKAPGI	+2
62	— GKSVKAPGIGGKSVKAPGI	+4
37	— GKSVIPRKGTAPPR	+5
150	— TQIENLKEKG	0
151	H ₂ N-c[D(Cys-Ser-Lys-Cys)]Gly-Peg12-Lys—	+2
152	H ₂ N-c[Cys-Phe-Thr-Lys-D-Trp-Phe-Phe-Cys]-Peg12-Lys—	+2
153	H ₂ N-Thr-Phe-Thr-Lys-D-Trp-Phe-Phe-D-Phe-Peg12-Lys—	+2

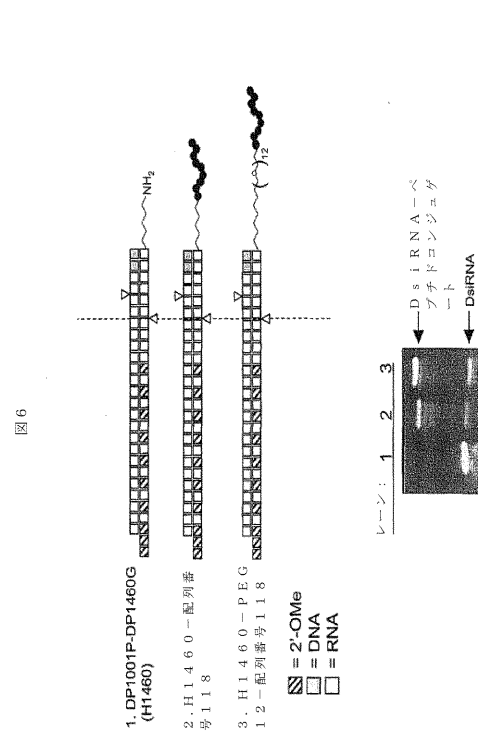
【図 4】



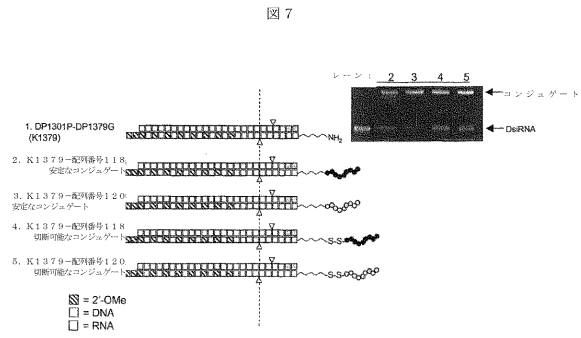
【図 5】



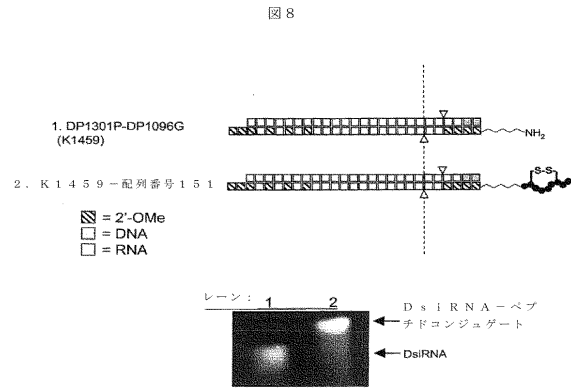
【図 6】



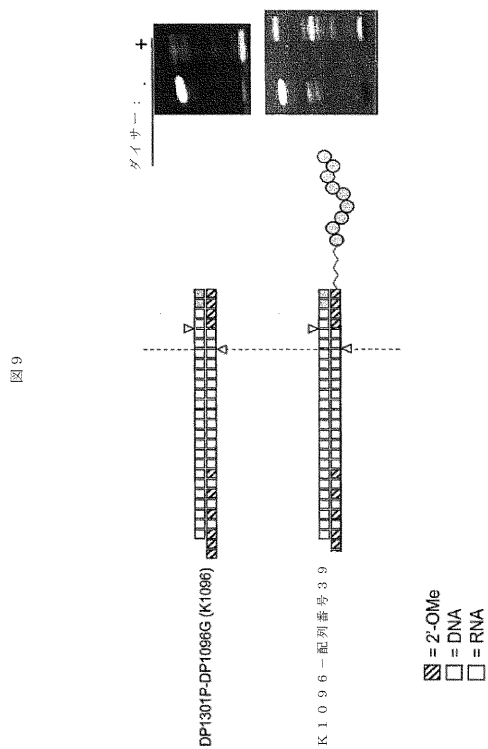
【図 7】



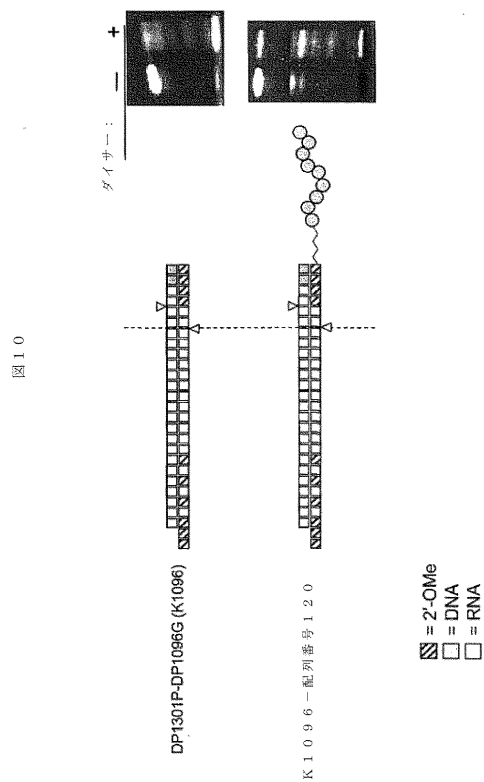
【図 8】



【図 9】

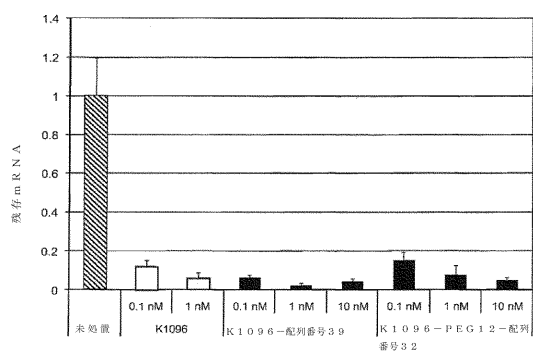


【図 10】



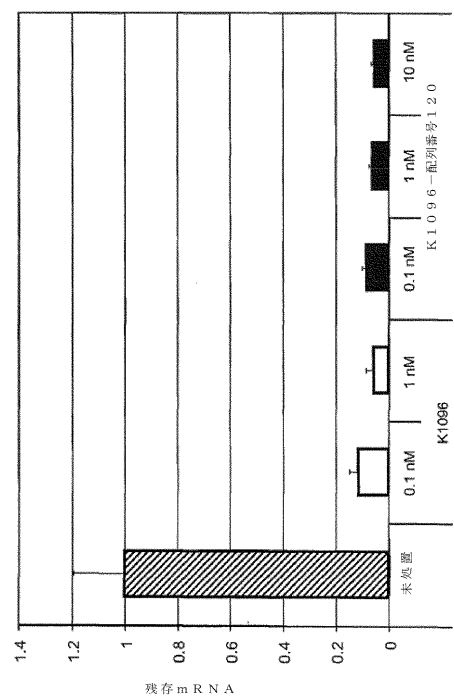
【図 1 1】

図 1 1



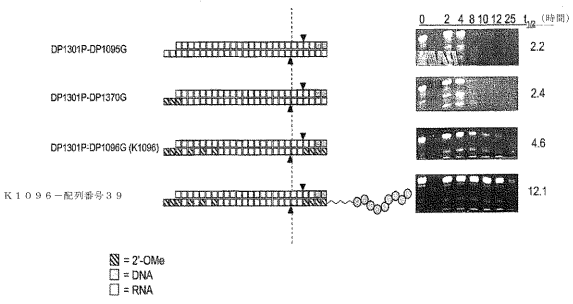
【図 1 2】

図 1 2



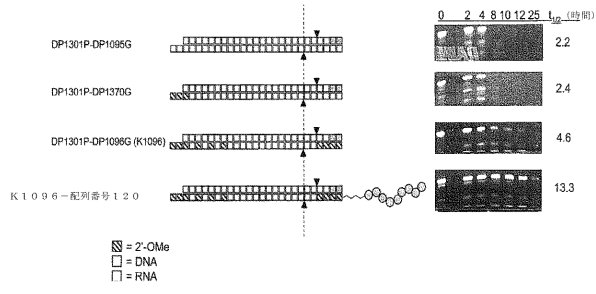
【図 1 3】

図 1 3

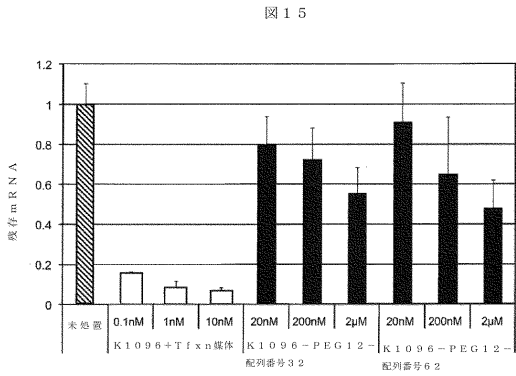


【図 1 4】

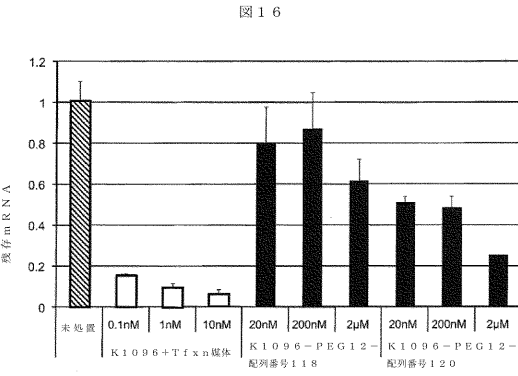
図 1 4



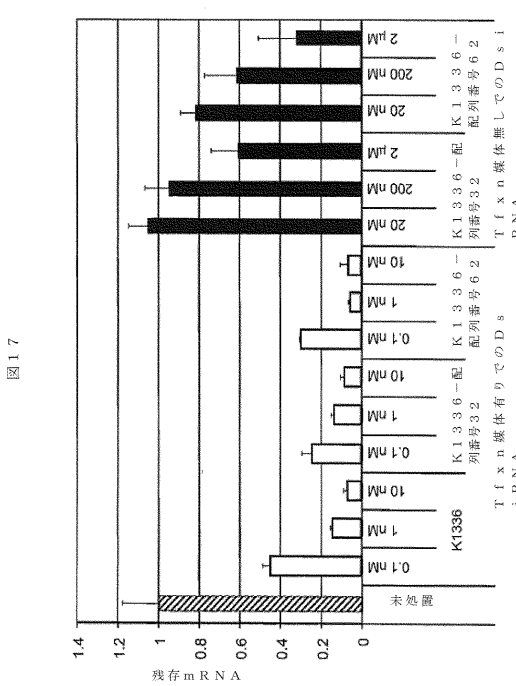
【図 1 5】



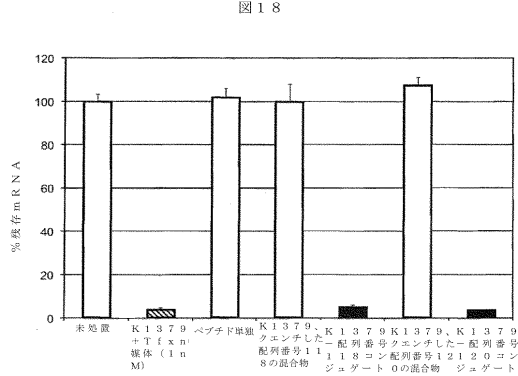
【図 1 6】



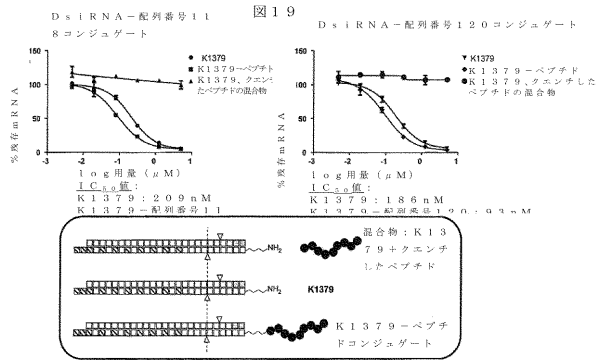
【図 1 7】



【図 1 8】



【図 19】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/37263

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/713; C07H 21/00 (2010.01) USPC - 514/44A 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) IPC(8) - A61K 31/713; C07H 21/00 (2010.01) USPC - 514/44A Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 514/44A; 514/2; 536/24.5 (Text Search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); Google Scholar and PubMed. Search Terms: peptide-dicar substrate, peptide-dsRNA, peptide, dsRNA, neutral, net charge, homobifunctional, heterobifunctional, nucleotide, carbon, linker, linkage, oligonucleotide, internal, Internally, conjugate, dye, polyaromatic, paclitaxel, metabolic disorder,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2008/0076701 A1 (QUAY et al.) 27 March 2008 (27.03.2008) SEQ ID NO: 1, 3-4, 8-11, 14, 32; table 12, 22; claim 6, 16; para [0005], [0008]-[0012], [0016], [0020], [0026], [0034], [0041], [0043], [0044], [0055], [0074], [0075], [0079], [0081], [0082], [0100], [0119], [0127], [0134], [0141], [0142], [0175], [0240], [0317], [0347]-[0349], [0375], [0376].	1, 3-4, 6-30, 39-43, 57-60, 64-72, 74-77 and 79-86 31-38, 44-56, 61-63, 73 and 78
Y	US 2002/0177150 A1 (MANOHARAN et al.) 28 November 2002 (28.11.2002) para [0013], [0020], [0023], [0024], [0032].	31-35
Y	US 6,316,190 B1 (REIN et al.) 13 November 2001 (13.11.2001) col 21, ln 5-41.	36-38
Y	US 2005/0186591 A1 (BUMCROT et al.) 25 August 2005 (25.08.2005) para [0345].	44-53
Y	US 2006/0167239 A1 (SLATTUM et al.) 27 July 2006 (27.07.2006) para [0004], [0009], [0045].	54-56
Y	US 2005/0255093 A1 (SHONE et al.) 17 November 2005 (17.11.2005) para [0013]-[0020], [0035].	61-63
Y	US 2005/0244858 A1 (ROSSI et al.) 03 November 2005 (03.11.2005) para [0014], [0015].	73
Y	US 2008/0064092 A1 (FOSTER et al.) 13 March 2008 (13.03.2008) SEQ ID NO: 55; para [0018], [0025].	78
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 December 2010 (06.12.2010)		Date of mailing of the international search report 13 DEC 2010
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. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/37263

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 87-88
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

Group I: Claims 1, 3-4, and 6-86, drawn to an isolated double stranded ribonucleic acid composition comprising oligonucleotide strands and a peptide, wherein said peptide has a net charge of about +5 or less, and wherein the peptide has an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or 45.

Group II+: Claims 1, 3-4, and 6-86, drawn to an isolated double stranded ribonucleic acid composition comprising oligonucleotide strands and a peptide, wherein said peptide has a net charge of about +5 or less, and wherein the peptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2-44 and 46-89. If Applicant elects to have this group searched, Applicant must specify the specific amino acid sequence to be searched. Each structurally unrelated amino acid sequence constitutes an inventive concept.

---please see continuation on extra sheet---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1, 3-4, and 6-86, limited to SEQ ID NOs: 1 and 45

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/37263

Continuation of:
Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group III+: Claims 2 and 6-86, drawn to an isolated double stranded ribonucleic acid composition comprising oligonucleotide strands and a peptide, wherein said peptide has a net charge, and wherein the peptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-89. If Applicant elects to have this group searched, Applicant must specify the specific amino acid sequence to be searched. Each structurally unrelated amino acid sequence constitutes an inventive concept.

Group IV+: Claims 5-86, drawn to an isolated double stranded ribonucleic acid composition comprising oligonucleotide strands and a peptide, wherein said peptide has a net charge of about +4 or less, and wherein the peptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-89. If Applicant elects to have this group searched, Applicant must specify the specific amino acid sequence to be searched. Each structurally unrelated amino acid sequence constitutes an inventive concept.

The inventions listed as Groups I, II+, III+, and IV+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The technical feature shared by the inventions listed as Groups I, II+, III+, and IV+ is an isolated double stranded ribonucleic acid (dsRNA) composition comprising a first oligonucleotide strand having a 5' terminus and a 3' terminus, a second oligonucleotide strand having a 5' terminus and a 3' terminus, and a peptide, wherein said peptide is conjugated to said dsRNA and may have a positive or no net charge. This shared technical feature does not provide a contribution over the prior art, as evidenced by US 2008/0076701 A1 to Quay et al. (published March 27, 2008; hereinafter "Quay"). Quay teaches an isolated double stranded ribonucleic acid (dsRNA) composition (para [0010]) comprising a first oligonucleotide strand having a 5' terminus and a 3' terminus and a second oligonucleotide strand having a 5' terminus and a 3' terminus (para [0010]), wherein a peptide is conjugated to said dsRNA (para [0010]). Quay further discloses that the peptide comprises a plurality of non-polar (neutrally charged) amino acid residues which may be linked to a plurality of charged amino acid residues (para [0041]), for example at least two positively charged amino acids (claim 16). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Another technical feature shared by the inventions listed as Groups I, II+, and III+ is wherein said first strand and said second dsRNA strand have a length that is at least 16 and at most 50 nucleotides in length. This shared technical feature does not provide a contribution over the prior art, because Quay further discloses wherein said first strand and said second strand have a length that is at least 16 and at most 50 nucleotides in length (para [0010] - "double-stranded region of from 25 to 30 base pairs"). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

A further special technical feature of each of the inventions listed as Groups I, II+, III+, and IV+ is the specific amino acid sequence recited therein. Significant structural similarities cannot readily be ascertained among the sequences. Without significant structural similarities, the sequences do not have a shared special technical feature. In the absence of a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another. In this case, the first named structurally related sequences that will be searched without additional fees are SEQ ID NOs: 1 and 45. In order for more sequences to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid and the desired sequences to be searched clearly identified.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/138 (2006.01)	A 6 1 K 31/138	
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 31/475 (2006.01)	A 6 1 K 31/475	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, S E, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, I L, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ , OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ブラウン, ボブ, デール
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07946, ミリングトン, レプレチャウン ドライ
ブ 54

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11
4C084 AA02 AA19 BA03 BA17 BA18 BA19 BA23 BA35 BA44 CA04
DA33 DC50 MA02 NA05 NA14 ZB262 ZC212
4C086 AA01 BA02 CB21 EA10 EA16 HA12 HA28 MA02 MA04 NA05
ZB26
4C206 AA01 FA23 MA02 MA04 NA05 ZB26
4H045 BA09 BA54 BA70 BA71 BA72 EA20 FA50 FA70