

(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2018-531037

(P2018-531037A)

(43) 公表日 平成30年10月25日(2018.10.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z N A Z	4 C 0 7 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 131 頁)

(21) 出願番号 特願2018-521276 (P2018-521276)
 (86) (22) 出願日 平成28年10月19日 (2016.10.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年6月19日 (2018.6.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/057608
 (87) 国際公開番号 W02017/070151
 (87) 国際公開日 平成29年4月27日 (2017.4.27)
 (31) 優先権主張番号 62/243,565
 (32) 優先日 平成27年10月19日 (2015.10.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 311001370
 アルエックスアイ ファーマシューティ
 カルズ コーポレーション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 1 7 5 2、マールボロ、シマラーノ ドラ
 イブ 2 5 7、スイート 1 0 1
 (71) 出願人 518138310
 バイオガゼル エヌヴェー
 B I O G A Z E L L E N V
 ベルギー王国 9 0 5 2 ズウェイナル
 デ、テクノロギーパーク 3
 T e c h n o l o g i e p a r k 3 9
 0 5 2 Z w i j n a a r d e B e l g
 i u m

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 長い非コードRNAを標的とする減少したサイズの自己送達型核酸化合物

(57) 【要約】

本開示は、改善された細胞取り込み特徴を有するRNAiコンストラクトおよび長い非コードRNA (lncRNA) の発現をサイレンシングするためのこれらの化合物の使用の方法に関する。

【選択図】 図1

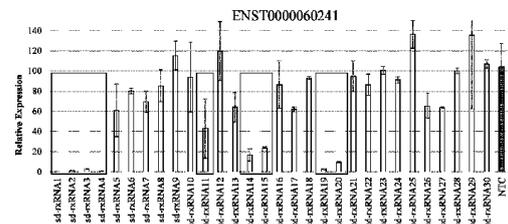


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

lncRNA配列に対する相補性を有する18～23ヌクレオチド長のガイド鎖、および8～16ヌクレオチド長のパッセンジャー鎖を含む、単離された二本鎖核酸分子であって、前記分子は、二本鎖領域および一本鎖領域を含み、前記一本鎖領域は、ガイド鎖の3'末端であり、2～13ヌクレオチド長であり、および少なくとも2個のホスホロチオアート修飾を含み、および、前記核酸分子における少なくとも50%のピリミジンは修飾されている、前記二本鎖核酸分子。

【請求項 2】

ガイド鎖の5'末端に対する最初のヌクレオチドが2'-O-メチル修飾を有する、任意に、2'-O-メチル修飾が、5P-2'-O-メチルU修飾、または5'ビニルホスホン酸2'-O-メチルU修飾である、請求項1に記載の核酸分子。

10

【請求項 3】

核酸分子における少なくとも60%、少なくとも80%、少なくとも90%または100%のピリミジンが、修飾されている、請求項1または請求項2に記載の核酸分子。

【請求項 4】

修飾されたピリミジンが、2'-フルオロまたは修飾された2'-O-メチルである、請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

少なくとも1つのUまたはCが疎水性修飾を含み、任意に複数のUおよび/またはCが疎水性修飾を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸分子。

20

【請求項 6】

疎水性修飾がメチルまたはエチル疎水性塩基修飾である、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項 7】

ガイド鎖が6～8個のホスホロチオアート修飾を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 8】

ガイド鎖が、ガイド鎖の3'末端に対する最初の10ヌクレオチド内に位置する少なくとも8個のホスホロチオアート修飾を含む、請求項7に記載の核酸分子。

【請求項 9】

ガイド鎖が4～14個のホスファート修飾を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の核酸分子。

30

【請求項 10】

ガイド鎖の一本鎖領域が、6ヌクレオチド長～8ヌクレオチド長である、請求項1～9のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 11】

二本鎖領域が13ヌクレオチド長である、請求項1～10のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 12】

二本鎖核酸分子が、平滑である1末端を有するか、または、1ヌクレオチド突出を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の核酸分子。

40

【請求項 13】

パッセンジャー鎖が3'末端で親油性基に対して連結されている、請求項1～12のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 14】

親油性基がステロールであり、任意に、ステロールがコレステロールである、請求項13に記載の核酸分子。

【請求項 15】

核酸分子がsd-rxRNAであり、および、sd-rxRNAのガイド鎖がlncRNAに対して相補的であり、任意に、lncRNAが、ENST00000585065

50

、ENST00000602414、ENST00000607352、ENST00000456581、ENST00000340510、ENST00000605920、ENST00000455699、ENST00000555578、ENST00000565493、ENST00000580048およびMALAT1からなる群から選択される、請求項1～14のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項16】

単離された二本鎖核酸分子がsd-rxRNAであり、および、sd-rxRNAのガイド鎖がMALAT1に対して相補的である、請求項1～15のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項17】

単離された二本鎖核酸分子がlncRNA阻害剤であり、および、ガイド鎖に対して相補的であるlncRNA配列が成熟lncRNAのアンチセンス鎖である、請求項1～16のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項18】

ガイド鎖が少なくとも50%化学修飾されている、請求項17に記載の核酸分子。

【請求項19】

核酸分子が、表1または表2内の配列の少なくとも12個の連続したヌクレオチドに対して向けられている、請求項17または18に記載の核酸分子。

【請求項20】

細胞を、lncRNAの発現および/または活性を調節するのに有効な量で、請求項1～19のいずれか一項に記載の核酸分子と接触させることを含む、細胞においてlncRNAの発現および/または活性を調節するための方法。

【請求項21】

lncRNAが細胞の核に局在している、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

lncRNAが細胞の細胞質に局在している、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

lncRNAが細胞の核および細胞質の両方に局在している、請求項20に記載の方法。

【請求項24】

細胞が細菌細胞または真核細胞である、請求項20～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

細胞が哺乳動物細胞である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

哺乳動物細胞が哺乳動物幹細胞である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

細胞を単離された核酸分子とin vivoまたはex vivoで接触させる、請求項20～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

単離された核酸分子を細胞へ投与することを含む、核酸分子を細胞へ送達する方法であって、単離された核酸がアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)に対して相補的であるセンス鎖を含み、センス鎖が8～15ヌクレオチド長であり、少なくとも2個のホスホロチオアート修飾を含み、センス鎖において少なくとも50%のピリミジンが修飾され、および、前記分子が疎水性抱合体を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2015年10月19日に提出された米国仮出願シリアル番号62/243,565、標

10

20

30

40

50

題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING NUCLEIC ACID COMPOUNDS TARGETING LONG NON-CODING RNA」の35 U.S.C. 119(e)下における利益を主張し、その全内容は本明細書に参照により組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、少なくともその一部において、*in vivo*での送達特性が改善された核酸分子の使用および長い非コードRNA (lncRNA)の発現を減少させるためのそれらの使用に関する。

【0003】

発明の背景

相補的なオリゴヌクレオチド配列は有望な治療剤であり、遺伝子の機能を解明する上での有用な研究用ツール (research tool) である。しかしながら、先行技術のオリゴヌクレオチド分子は、それらの臨床的開発を妨げる可能性があるいくつかの問題に悩まされており、これは、かかる組成物を*in vivo*で使用する遺伝子発現 (タンパク質合成を含む) の意図した効率的な阻害または増加の達成をしばしば困難にする。

主要な問題は、これらの化合物の、細胞および組織への送達であった。従来の二本鎖RNAi化合物は、19~29塩基長であって、およそ $1.5 \times (10 \sim 15) \text{ nm}$ のサイズの高度に負に荷電した強固ならせんを形成する。このロッド型の分子は細胞膜を透過することができず、その結果として、*in vitro*および*in vivo*での両方において極めて限定的な効力しか有さない。その結果として、従来の全てのRNAi化合物は、それらの組織分配および細胞取り込みを促進するために、何らかの種類の送達ビヒクルを必要とする。これは、RNAi技術の主要な限定要因であると考えられる。

【0004】

先には、それらの細胞取り込み特性を改善するために、オリゴヌクレオチドに化学修飾を適用する試みが存在している。1つのかかる修飾は、オリゴヌクレオチドへのコレステロール分子の付着であった。このアプローチについての最初の報告は、1989年のLetsingerらによるものであった。後に、ISIS Pharmaceuticals, Inc. (Carlsbad, CA) が、オリゴヌクレオチドへ、コレステロール分子を付着させる上でのより高度な技術を報告した (Manoharan, 1992)。

90年代後期におけるsiRNAの発見に関して、それらの送達プロフィールを増強するために、同様の型の修飾がこれらの分子へ試みられた。僅かに修飾された (Soutschek, 2004) および重度に修飾された (Wolfrum, 2007) siRNAへ抱合させたコレステロール分子が、文献に登場した。Yamadaら (2008) はまた、コレステロールを媒介したsiRNAの取り込みをさらに改善する高度なリンカーの化学 (linker chemistry) の使用について報告した。この努力にも拘わらず、これらの型の化合物の取り込みは、生体液の存在下において損なわれて阻害され、これが*in vivo*での遺伝子サイレンシングにおける効力を極めて限定させることになり、臨床の場でこれらの化合物の適用性を限定していると考えられる。

【0005】

哺乳動物ゲノムのシーケンシング後、約20,000個のタンパク質コード遺伝子が同定された。しかしながら、ゲノムの99%は、非機能的な反復配列を含有すると考えられていた。より最近では、トランスクリプトームプロファイリングアプローチを利用している研究者は、ゲノムのこれらの非機能的な配列の約60,000個が長い非コードRNA (lncRNA) に転写され、その多くは機能的であることを発見した (Iyer et al. (2015))。>200個のヌクレオチドを含有する長い非コードRNA (lncRNA) は、以下の生体プロセッシングにおいて機能することが見出された：細胞増殖、分化、転写の調節、エピジェネティックな調節、転写後調節、タンパク質複合体の構成、細胞間の連絡およびタンパク質のアロステリック調節 (Chen, 2015; Geisler et al. 2013)。

lncRNAは、細胞全体に位置することができる。しかしながら、大部分のlncRNAは核内に局在する (Cabili, 2015)。RNAiの機構が核ではなく細胞質に位置する

10

20

30

40

50

ことを考慮すると、RNAi化合物を使用して（核内に位置する）lncRNAのレベルを減少させることはうまくいかないであろうと考えられる。事実、研究者は、siRNAが細胞質ベースのlncRNAを標的とするために使用できることを示した。しかしながら、それらは、核内のlncRNAを標的とするように働くことは実証されていない。

【発明の概要】

【0006】

要旨

本開示は、lncRNAのサイレンシングのための組成物および方法を提供する。本発明は、自己送達型RNAi化合物が、細胞において細胞質および核の両方でlncRNAのレベルを口バストかつ強力に減少させることができるという驚くべき発見に少なくともその一部において基づく。siRNAは、細胞質ベースのlncRNAを標的とするために使用できるが、核内のlncRNAを標的とするためには使用できなかったことが以前に実証されていたため、本明細書に記載されるRNAi化合物による核内lncRNAのサイレンシングは特に驚くべきことである。さらに、本明細書に記載の自己送達型RNAi化合物は、驚くべきことに、送達ビヒクル（例えば、脂質媒介トランスフェクション剤）を使用せずに核を標的とするサイレンシングを媒介する。

10

【0007】

したがって、いくつかの側面において、本開示は、lncRNA配列に対する相補性を有する18~23ヌクレオチド長のガイド鎖および8~16ヌクレオチド長のパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を提供し、ここで、同分子は、二本鎖領域および一本鎖領域を含み、ここで、一本鎖領域は、ガイド鎖の3'末端であり、2~13ヌクレオチド長であり、少なくとも2個のホスホロチオアート修飾を含み、ここで、核酸分子中の少なくとも50%のピリミジンが修飾される。

20

いくつかの態様において、ガイド鎖の5'末端に対する最初のヌクレオチドは2'-O-メチル修飾を有し、任意にここで、2'-O-メチル修飾は5P-2'-O-メチルU修飾または5'ビニルホスホン酸2'-O-メチルU修飾である。

【0008】

いくつかの態様において、核酸分子中のピリミジンの少なくとも60%、少なくとも80%、少なくとも90%または100%が修飾される。いくつかの態様において、修飾されたピリミジンは、2'-フルオロまたは2'-O-メチル修飾される。

30

いくつかの態様において、少なくとも1つのUまたはCは疎水性修飾を含み、任意にここで、複数のUおよび/またはCは疎水性修飾を含む。いくつかの態様において、疎水性修飾はメチルまたはエチル疎水性塩基修飾である。

いくつかの態様において、ガイド鎖は6~8個のホスホロチオアート修飾を含む。いくつかの態様において、ガイド鎖は、ガイド鎖の3'末端に対して最初の10ヌクレオチド内に位置する少なくとも8個のホスホロチオアート修飾を含む。いくつかの態様において、ガイド鎖は4~14個のホスファート修飾を含む。いくつかの態様において、ガイド鎖の一本鎖領域は6ヌクレオチド長~8ヌクレオチド長である。

いくつかの態様において、二本鎖領域は13ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、二本鎖核酸分子は、平滑である1末端を有するか、または、1ヌクレオチド突出を含む。

40

【0009】

いくつかの態様において、パッセンジャー鎖は、3'末端で親油性基に連結される。いくつかの態様において、親油性基はステロールであり、任意にここで、ステロールはコレステロールである。

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子はsd-rxRNAであり、ここでガイド鎖はlncRNAに対して相補的であり、任意にここで、lncRNAはENST00000585065、ENST00000602414、ENST00000607352、ENST00000456581、ENST00000340510、ENST00000605920、ENST00000455699、ENST0000055

50

5578、ENST00000565493、ENST00000580048およびMALAT1からなる群から選択される。

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子はsd-rxRNAであり、ここで、ガイド鎖はMALAT1に対して相補的である。

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子はlncRNA阻害剤であり、ここで、ガイド鎖に対して相補的であるlncRNA配列は、成熟lncRNAのアンチセンス鎖である。いくつかの態様において、二本鎖核酸分子lncRNA阻害剤のガイド鎖は少なくとも50%が化学修飾される。

【0010】

いくつかの態様において、核酸分子は、表1または表2内の配列の少なくとも12個の連続したヌクレオチドに対して向けられる。

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子(例えば、sd-rxRNA)を、lncRNAの発現および/または活性を調節するのに有効な量で細胞に接触させることを含む、細胞におけるlncRNAの発現および/または活性を調節するための方法を提供する。

同方法のいくつかの態様において、lncRNAは細胞の核に局在する。同方法のいくつかの態様において、lncRNAは、細胞の細胞質に局在する。同方法のいくつかの態様において、lncRNAは、細胞の核および細胞質の両方に局在する。いくつかの態様において、細胞は細菌細胞または真核細胞である。いくつかの態様において、真核細胞は、植物細胞、節足動物細胞および動物細胞からなる群から選択される。いくつかの態様において、真核細胞はヒト細胞などの哺乳動物細胞である。いくつかの態様において、細胞は幹細胞、任意にヒト幹細胞である。

同方法のいくつかの態様において、細胞は単離された核酸分子とin vivoまたはex vivoで接触させられる。

【0011】

いくつかの側面において、本開示は、lncRNAの発現の調節不全に関連する疾患を処置するように構成された二本鎖分子に関する。lncRNAのレベルの調節不全または変化は、がん(肺癌、乳癌、前立腺癌、肝細胞癌など)、心臓血管疾患、神経学的障害、糖尿病およびHIVを含む多くの疾患の進行に関連することが示されている。したがって、いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子を標的lncRNAの発現レベルまたは活性を調節するのに有効な量で対象に投与することを含む、lncRNAの発現の調節不全に関連する疾患を有する対象を処置する方法を提供する。

【0012】

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、本明細書に記載の二本鎖分子のセンス鎖(例えば、sd-rxRNAのセンス鎖)は、二本鎖核酸分子のガイド鎖の送達に限定されない。むしろ、いくつかの態様において、本明細書に記載のパスセンジャー鎖は、他の分子(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ASO)を細胞の核に対して標的化する目的で、同分子に結合される(例えば、共有結合、非共有結合、抱合など)。したがって、いくつかの側面において、本開示は、単離された核酸分子を細胞に投与することを含み、ここで、単離された核酸はアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)に対して相補的であるセンス鎖を含み、ここでセンス鎖は8~15ヌクレオチド長であり、少なくとも2個のホスホロチオアート修飾を含み、センス鎖中のピリミジンの少なくとも50%が修飾され、ここで同分子は疎水性抱合体を含む、核酸分子を細胞に送達する方法を提供する。

本発明の限定の各々は、本発明の多様な態様を包含し得る。したがって、いずれか1の要素または要素の組み合わせを伴う本発明の限定の各々は、本発明の各側面に含まれ得ると考えられる。本発明はその適用において、以下の説明に記載されるまたは図面に例示される、解釈の詳細および構成要素の配置に限定されない。本発明は他の態様も可能であり、多様なやり方において実践または実行されることが可能である。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0013】

図の簡潔な説明

添付の図面は一定の縮尺で描かれることを意図していない。図面において、多様な図に例示されている同一またはほぼ同一の構成要素は、同様な番号で表されている。明確性の目的のために、すべての図面にすべての構成要素は標識され得ない。

【0014】

【図1】図1は、lncRNAを標的とする強力なsd-rxRNAの同定を示す(ENST0000060241)。sd-rxRNAを11のlncRNA標的に対してスクリーニングした。11のlncRNAのうち10について、21%の全体的なヒット率で、強力なsd-rxRNA(>60%のサイレンシング)が同定された。この特定のアッセイに記載されたlncRNAを標的とするsd-rxRNAは、ヒト肝細胞癌細胞株において標的遺伝子lncRNAのレベルをin vitroで大きく減少させた。

10

【図2】図2は、ヒト結腸直腸癌細胞株におけるMALAT1を標的とする強力なsd-rxRNAの同定を示す。この特定のアッセイに記載されたMALAT1を標的とするsd-rxRNAは、ヒト肝細胞癌細胞株においてin vitroで標的遺伝子lncRNAのレベルを大きく減少させた。

【図3】図3は、lncRNAを標的とする強力なsd-rxRNAの同定を示す。この特定のアッセイに記載されたlncRNAを標的とするsd-rxRNAは、ヒト肝細胞癌細胞株またはヒト結腸直腸癌細胞株においてin vitroで標的遺伝子lncRNAのレベルを大きく減少させた。

20

【0015】

詳細な説明

本開示は、一部分において、二本鎖核酸分子による長い非コードRNA(lncRNA)のサイレンシングのための組成物および方法に関する。

本明細書に使用される「長い非コードRNA」または「lncRNA」は、タンパク質をコードしない200を超えるヌクレオチドを含有する転写されたRNA分子を指す。lncRNAは、通常、ゲノムの遺伝子間領域内に位置する。一般に、lncRNAは、遺伝子機能の調節において種々の役割を果たす分子の多様なクラスである。例えば、lncRNAは、遺伝子転写(例えば、Goodrich et al. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7(8): 612-6, 2006に記載)、翻訳(例えば、Tiedge et al. PNAS 88(6): 2093-7, 1991に記載)およびエピジェネティック調節(例えば、Wutz et al. Nature Genetics, 30(2): 167-74, 2002に記載)を調節することが知られる。lncRNAの例は、これらに限定されないが、Kcnq1ot1、Xlirt、Xist、ANRILおよびMALAT1を含む。lncRNAのさらなる例は、例えば、Amaral et al. Nucleic Acids Research 39(Database issue): D146-D151, (2010)に記載されている。

30

【0016】

本開示は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子が、細胞質および核の両方において、細胞中の長い非コードRNA(lncRNA)のレベルをロバストかつ強力的に減少させることができるという驚くべき発見に少なくともその一部において基づく。本明細書に記載の分子による核内のlncRNAのサイレンシングは、先行技術がsiRNAは核内のlncRNAを標的化するのに有効でないことを実証したという事実を照らして特に驚くべきことである。

40

したがって、いくつかの側面において、本開示は、lncRNA配列に対する相補性を有する18~23ヌクレオチド長のガイド鎖および8~16ヌクレオチド長のパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を提供し、ここで、同分子は、二本鎖領域および一本鎖領域を含み、ここで、一本鎖領域は、ガイド鎖の3'末端であり、2~13ヌクレオチド長であり、少なくとも2個のホスホロチオアート修飾を含み、ここで、核酸分子中のピリミジンの少なくとも50%が修飾される。

【0017】

本明細書に使用される「核酸分子」は、これらに限定されないが：sd-rxRNA、

50

r x R N A o r i、オリゴヌクレオチド、A S O、s i R N A、s h R N A、m i R N A、n c R N A、c p - l a s i R N A、a i R N A、B M T - 1 0 1、R X I - 1 0 9、E X C - 0 0 1、一本鎖核酸分子、二本鎖核酸分子、R N AおよびD N Aを含む。いくつかの態様において、核酸分子は、化学修飾されたオリゴヌクレオチドなどの、化学修飾された核酸分子である。本発明の二本鎖核酸分子は、以下および例のセクションにおいてさらに詳細に記載される。

いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、l n c R N Aのレベルの調節不全または変化は、がん（肺癌、乳癌、前立腺癌、肝細胞癌など）、心臓血管疾患、神経学的障害、糖尿病およびH I Vを含む多くの疾患の進行に関連することが示されている（Chen, 2015）。したがって、いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子を標的l n c R N Aの発現レベルまたは活性を調節するのに有効な量で対象に投与することを含む、l n c R N Aの発現の調節不全に関連する疾患を有する対象を処置する方法を提供する。

【0018】

s d - r x R N A分子

本発明の側面は、s d - r x R N A分子に関する。本明細書において用いられる場合、「s d - r x R N A」または「s d - r x R N A分子」とは、2014年8月5日に付与された、米国特許第8,796,443号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2015年11月3日に付与された、米国特許第9,175,289号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、および2009年9月22日に出願されたPCT公開番号WO2010/033247（出願番号PCT/US2009/005247）、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」において記載され、これらから本明細書に参照により組み込まれるもののような、自己送達型R N A分子を指す。簡単に述べると、s d - r x R N A（s d - r x R N Aナノとも呼ばれる）は、最小長が16ヌクレオチドのガイド鎖および8~18ヌクレオチド長のパッセンジャー鎖を含む、単離された非対称二本鎖核酸分子であって、ここで二本鎖核酸分子は二本鎖領域および一本鎖領域を有し、一本鎖領域は4~12ヌクレオチド長を有し、かつ、少なくとも3つのヌクレオチド骨格修飾を有する。好ましい態様において、二本鎖核酸分子は、平滑である1末端を有するか、または、1つもしくは2つのヌクレオチド突出を含む。s d - r x R N A分子は、化学修飾を通じて、いくつかの例において疎水性抱合体の付着を通じて、最適化され得る。

【0019】

いくつかの態様において、s d - r x R N Aは、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を含み、ここで二本鎖である分子の領域は8~15ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は4~12ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖の一本鎖領域は3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のホスホロチオアート修飾を含有し、およびここで、二本鎖核酸のヌクレオチドの少なくとも40%は修飾されている。

本発明のポリヌクレオチドは、本明細書において、本発明の単離された二本鎖またはデュプレックス核酸、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、ナノ分子、ナノR N A、s d - r x R N Aナノ、s d - r x R N AまたはR N A分子と呼ばれる。

【0020】

s d - r x R N Aは、従来のs i R N Aと比較して、はるかに効果的に細胞によって取り込まれる。これらの分子は、標的遺伝子のサイレンシングにおいて高度に効率的であって、血清の存在下における高活性、効率的な自己送達、多様なリンカーとの適合性、および、毒性に関連する化学修飾の存在の減少または完全な欠如を含む、先に記載されたR N A i分子を凌駕する大きな利点を与える。

一本鎖ポリヌクレオチドとは対照的に、デュプレックスポリヌクレオチドは伝統的に細胞への送達が困難であったが、それは、これらが強固な構造および多数の負の電荷を有するために、その膜輸送が困難になっているからである。しかしながら、s d - r x R N Aは、部分的に二本鎖であるにも拘わらず、in vivoで一本鎖として認識され、したがって

10

20

30

40

50

、細胞膜を超えて効率的に送達されることが可能である。その結果、本発明のポリヌクレオチドは、多くの例において自己送達が可能である。よって、本発明のポリヌクレオチドは、従来のRNAi剤と同様の様式において製剤化されても、あるいは、細胞または対象へ単独で（または非送達型キャリアとともに）送達されてもよく、自己送達を可能にする。本発明の一態様において、分子の一部が従来のRNAデュプレックスに類似し、分子の第2の部分が一本鎖である、自己送達型非対称二本鎖RNA分子が提供される。

【0021】

本発明のオリゴヌクレオチドは、いくつかの側面において、二本鎖領域と5ヌクレオチドまたはそれより長い一本鎖領域とを含む非対称構造と、具体的な化学修飾パターンとの組み合わせを有し、親油性または疎水性の分子に抱合される。いくつかの態様において、このクラスのRNAi様化合物は、*in vitro*および*in vivo*で優れた効力を有する。強固なデュプレックス領域のサイズの低減が、一本鎖領域へ適用されるホスホロチオアート修飾と組み合わせられると、観察される優れた効力に寄与すると考えられる。

10

【0022】

*s d - r x RNA*を皮膚に効果的に投与し、遺伝子発現をサイレンシングする方法は、2014年3月4日に付与された米国特許第8,664,189、表題「RNA INTERFERENCE IN SKIN INDICATIONS」、2013年4月4日出願された米国特許公開番号US2014/0113950、表題「RNA INTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS」、2009年9月22日出願されたPCT公開番号WO2010/033246、表題「RNA INTERFERENCE IN SKIN INDICATIONS」および2011年3月24日出願されたPCT公開番号WO2011/119887、表題「RNA INTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS」において実証されている。上記の特許および刊行物の各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

本明細書に開示される*s d - r x RNA*分子は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開番号US2014/0113950に開示される*s d - r x RNA*分子と同じ様式で皮膚に投与され得ることを理解されたい。

【0023】

好ましい態様において、本発明のRNAi化合物は、デュプレックス領域（8～15塩基長の効率的なRISC侵入に必要とされる）および4～12ヌクレオチド長の一本鎖領域を含む非対称化合物を含む。いくつかの態様において、デュプレックス領域は、13または14ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、6または7ヌクレオチドの一本鎖領域が好ましい。新しいRNAi化合物の一本鎖領域はまた、2～12個のホスホロチオアートヌクレオチド間連結部（ホスホロチオアート修飾と呼ばれる）を含む。いくつかの態様において、6～8個のホスホロチオアートヌクレオチド間連結部が好ましい。さらに、本発明のRNAi化合物はまた、安定性を提供し、RISC侵入と適合するユニークな化学修飾パターンを含む。いくつかの態様において、これらの要素の組み合わせは、*in vitro*および*in vivo*でのRNAi試薬の送達に非常に有用であるという予期せぬ特性をもたらす。

30

安定性を提供し、かつ、RISC侵入に適合する、化学修飾されたパターンは、センス鎖またはパッセンジャー鎖ならびにアンチセンス鎖またはガイド鎖への修飾を含む。例として、パッセンジャー鎖は、安定性を確実にし、かつ、活性に干渉しない、いずれの化学的実体によっても、修飾され得る。かかる修飾は、2'リボ修飾（O-メチル、2'F、2デオキシ等）およびホスホロチオアート修飾のような骨格修飾を含む。パッセンジャー鎖における好ましい化学修飾パターンは、パッセンジャー鎖内のCおよびUヌクレオチドのOメチル修飾を含む。代わりに、パッセンジャー鎖は完全にOメチル修飾されてもよい。

40

【0024】

ガイド鎖はまた、例えば、RISC侵入に干渉せずに、安定性を確実にするいずれの化学修飾によっても修飾されてもよい。ガイド鎖における好ましい化学修飾パターンは、CおよびUヌクレオチドの大多数が2'F修飾され、かつ、5'末端がリン酸化されているものを含む。ガイド鎖における別の好ましい化学修飾パターンは、1位と11～18位の

50

C/Uとの2' Oメチル修飾および5'末端の化学的リン酸化を含む。ガイド鎖におけるさらに別の好ましい化学修飾パターンは、1位と11~18位のC/Uとの2' Oメチル修飾および5'末端の化学的リン酸化ならびに2~10位におけるC/Uの2' F修飾を含む。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖は、少なくとも1つの5-メチルCまたはU修飾を含有する。

【0025】

いくつかの態様において、sd-rxRNA中のヌクレオチドのうち少なくとも30%が修飾されている。例えば、sd-rxRNA中のヌクレオチドのうち少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%が修飾されている。いくつかの態様において、sd-rxRNA中のヌクレオチドの100%が修飾されている。

10

【0026】

本発明のオリゴヌクレオチドの上記の化学修飾パターンは、良好な耐性を示し、非対称RNAi化合物の効力を実際に改善した。いくつかの態様において、記載された構成要素（ガイド鎖の安定化、ホスホロチオアートの伸長、センス鎖の安定化および疎水性抱合体）のいずれかの排除、またはいくつかの例において、サイズの増加は、最適以下の効力をもたらし、いくつかの例において、効力の完全な喪失をもたらす。要素の組み合わせは、HeLa細胞などの細胞への受動的送達の後であっても十分に活性がある化合物の開発をもたらす。

20

【0027】

sd-rxRNAは、いくつかの例において、新規の型の化学的性質(chemistries)を使用して化合物の疎水性を改善することにより、さらに改善され得る。例えば、1つの化学的性質は、疎水性塩基修飾の使用に関する。あらゆる位置におけるあらゆる塩基が、修飾が塩基の分配係数の増大をもたらす限りにおいて、修飾されてもよい。修飾の化学的性質のための好ましい位置は、ピリミジンの4位および5位である。これらの位置の主要な利点は、(a)合成の容易性、および、(b)RISC複合体のローディングおよび標的認識のために必須である、塩基対形成およびA型らせん(A form helix)形成への干渉がないこと、である。複数のデオキシウリジンが全体的な化合物の効力に干渉せずに存在するsd-rxRNA化合物のバージョンが使用された。加えて、組織分布および細胞取り込みにおける主要な改善は、疎水性抱合体の構造を最適化することにより得られ得る。好ましい態様のいくつかにおいて、ステロールの構造は、C17に付着された鎖(C17 attached chain)を変える(増大する/減少する)ように修飾される。この型の修飾は、in vivoでの細胞取り込みの大きな増大を、および、組織取り込み成功率(prosperities)の改善をもたらす。

30

40

【0028】

本発明により処方されるdsRNAはまた、rxRNAoriを含む。rxRNAoriとは、2009年2月11日に出願されたPCT公開番号WO2009/102427(出願番号PCT/US2009/000852)、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」、および2010年11月1日に米国特許公開番号2011/0039914、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」において記載され、これらから参照により組み込まれる、RNA分子のクラスを指す。

いくつかの態様において、rxRNAori分子は、標的遺伝子の発現を阻害するための長さ12~35ヌクレオチドの二本鎖RNA(dsRNA)コンストラクトを含み、これは、5'末端および3'末端を有するセンス鎖、ここで、センス鎖は、2'修飾リポー

50

ス糖で高度に修飾され、およびここで、センス鎖の中央部における3～6ヌクレオチドは、2'修飾リボース糖で修飾されない、ならびに、5'末端および3'末端を有するアンチセンス鎖、これはセンス鎖および標的遺伝子のmRNAとハイブリダイズする、を含み、ここで、dsRNAは、配列依存的な様式において、標的遺伝子の発現を阻害する。

【0029】

rxRNAoriは、本明細書において記載される修飾のいずれのものを含んでもよい。いくつかの態様において、rxRNAori中のヌクレオチドの少なくとも30%が修飾される。例えば、rxRNAori中のヌクレオチドのうちの少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%が修飾される。いくつかの態様において、sd-rxRNA中のヌクレオチドの100%が修飾される。いくつかの態様において、rxRNAoriのパスセリジャー鎖のみが修飾を含む。

10

【0030】

本発明は、その適用に関して、以下の説明において記載されるかまたは図面において例示される構成および構成要素の配置の詳細に限定されない。本発明は、他の態様および多様な方法において実施されるかまたは行われることが可能である。また、本明細書に使用される用語および専門用語は、説明を目的とするものであり、限定するものとしてみなされるべきではない。本明細書における「含む(including)」、「含む(comprising)」または「有する(having)」、「含有する(containing)」、「伴う(involving)」およびそれらの変化形の使用は、その後列挙される項目およびその均等物ならびに追加の項目を包含することを意味する。

20

【0031】

したがって、本発明の側面は、ガイド(アンチセンス)鎖およびパスセリジャー(センス)鎖を含む、単離された二本鎖核酸分子に関する。本明細書に使用される用語「二本鎖」は、ヌクレオモノマーの少なくとも一部が相補的であり、二本鎖領域を形成するように水素結合されている、1以上の核酸分子を指す。いくつかの態様において、ガイド鎖の長さは、16～29ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、ガイド鎖は、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29ヌクレオチド長である。ガイド鎖は標的遺伝子に対して相補性を有する。ガイド鎖と標的遺伝子との間の相補性は、ガイド鎖のいずれの部分にわたっても存在することができる。本明細書に使用される相補性は、ガイド鎖が標的に対してRNAiを媒介できるように十分に相補的である限りにおいて、完全な相補性であっても、より不完全な相補性であってもよい。いくつかの態様において、相補性とは、ガイド鎖と標的との間の、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満のミスマッチを指す。完全な相補性とは、100%の相補性を指す。いくつかの態様において、標的配列と比較して挿入、欠失および単一の点変異を有するsiRNAもまた、阻害について有効であることが見出されている。さらに、siRNAの全ての部位が標的の認識について同等に寄与するわけではない。siRNAの中心におけるミスマッチは最も重要であり、本質的に(essentially)標的RNAの切断を無効化する。アンチセンス鎖に関して、中心の上流または切断部位の上流におけるミスマッチは、耐性を示すが、標的RNAの切断を著しく低減する。アンチセンス鎖に関して、中心または切断部位の下流におけるミスマッチ、好ましくは3'末端の付近、例えばアンチセンス鎖の3'末端から1、2、3、4、5または6ヌクレオチドに位置するものは、耐性を示し、標的RNAの切断をごく僅かしか低減しない。

30

40

【0032】

50

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの態様において、ガイド鎖は、少なくとも16ヌクレオチドの長さであり、RISC中でアルゴノータンパク質をアンカーする。いくつかの態様において、ガイド鎖がRISC中へロードするとき、これは明確なシード領域を有し、標的mRNAの切断は、ガイド鎖の10~11位にわたって行われる。いくつかの態様において、ガイド鎖の5'末端は、リン酸化されているかまたはリン酸化されることができる。本明細書に記載される核酸分子は、最短トリガーRNA (minimum trigger RNA) として言及される場合もある。

いくつかの態様において、パッセンジャー鎖の長さは、8~15ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、パッセンジャー鎖は、8、9、10、11、12、13、14または15ヌクレオチド長である。パッセンジャー鎖は、ガイド鎖に対して相補性を有する。パッセンジャー鎖とガイド鎖との間の相補性は、パッセンジャーまたはガイド鎖のいずれの部位にわたっても存在してもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間には、分子の二本鎖領域内に100%の相補性が存在する。

10

【0033】

本発明の側面は、最小二本鎖領域を有する二本鎖核酸分子に関する。いくつかの態様において、分子の二本鎖である領域は、8~15ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、分子の二本鎖である領域は、8、9、10、11、12、13、14または15ヌクレオチド長である。ある態様において、二本鎖領域は、13または14ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に100%の相補性が存在してもよく、または、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に1以上のミスマッチが存在してもよい。いくつかの態様において、二本鎖分子の一方の末端において、分子は、平滑末端であるかまたは1ヌクレオチドの突出を有する。分子の一本鎖領域は、いくつかの態様において、4~12ヌクレオチド長である。例えば、一本鎖領域は、4、5、6、7、8、9、10、11または12ヌクレオチド長であってよい。しかしながら、ある態様において、一本鎖領域はまた、4ヌクレオチド長未満であっても、または、12ヌクレオチド長より長くてもよい。ある態様において、一本鎖領域は少なくとも6または少なくとも7ヌクレオチド長である。

20

【0034】

本発明に関連するRNAiコンストラクトは、 -13 kkal/mol 未満の熱力学的安定性 (G) を有することができる。いくつかの態様において、熱力学的安定性 (G) は、 -20 kkal/mol 未満である。いくつかの態様において、(G) が -21 kkal/mol 未満となったとき、効力の喪失が存在する。いくつかの態様において、 -13 kkal/mol より高い (G) 値は、本発明の側面に適合性である。いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの態様において、相対的に高い (G) 値を有する分子は、相対的に高い濃度において活性になる場合があり、一方、相対的に低い (G) 値を有する分子は、相対的に低い濃度において活性になる場合がある。いくつかの態様において、(G) 値は、 -9 kcal/mol よりも高くてもよい。最小二本鎖領域を有する本発明に関連するRNAiコンストラクトにより媒介される遺伝子サイレンシング効果は予測できないが、それは、ほぼ同一の設計であるが熱力学的安定性がより低い分子は、不活性であることが示されているからである (Rana et al. 2004)。

30

40

【0035】

いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、本明細書に記載の結果は、dsRNAまたはdsDNAの8~10bpの伸長が、RISCのタンパク質構成要素またはRISCのコファクターにより構造的に認識されるであろうことを示唆する。さらに、タンパク質構成要素により感受され得るか、および/または、かかる構成要素と相互作用するために十分に安定であり得、その結果アルゴノータンパク質中へロードされ得る、トリガー化合物 (triggering compound) のためのフリーエネルギー要求が存在する。最適な熱力学が存在して、好ましくは少なくとも8ヌクレオチドである二本鎖部分が存在する場合、デュプレックスは認識され、RNAi機構中にロードされるであろう。

50

【0036】

いくつかの態様において、熱力学的安定性は、LNA塩基の使用を通して増大する。いくつかの態様において、追加の化学修飾が導入される。化学修飾の数個の非限定的例は、5'ホスファート、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-フルオロ、リボチミジン、C-5プロピニル-dC(pdC)およびC-5プロピニル-dU(pdU); C-5プロピニル-C(pC)およびC-5プロピニル-U(pU); 5-メチルC、5-メチルU、5-メチルdC、5-メチルdUメトキシ、(2,6-ジアミノプリン)、5'-ジメトキシトリチル-N4-エチル-2'-デオキシシチジンおよびMGB(副溝結合剤)を含む。同一分子内で1つより多くの化学修飾が組み合わせられ得ることが、理解されるべきである。

10

【0037】

本発明に関連する分子は、効力の増大および/または毒性の低減のために、最適化される。例えば、ガイドおよび/またはパッセンジャー鎖のヌクレオチドの長さ、および/または、ガイドおよび/またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオアート修飾の数は、いくつかの側面においてRNA分子の効力に影響を及ぼし、一方、2'-フルオロ(2'F)修飾を2'-O-メチル(2'OMe)修飾により置き換えることは、いくつかの側面において分子の毒性に影響を及ぼす。具体的には、分子の2'F含有物の低減は、分子の毒性を低下させると予測される。さらに、RNA分子中のホスホロチオアート修飾の数は、細胞内への分子の取り込み、例えば細胞内への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。本明細書に記載される分子の好ましい態様は、2'F修飾を有さず、なお細胞取り込みおよび組織への浸透における同等の効力により特徴づけられる。かかる分子は、2'Fの大量使用により重度に修飾されたAccellおよびWolfrumにより記載される分子などの先行技術に対して、顕著な改善を表す。

20

【0038】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、およそ18~19ヌクレオチドの長さであり、およそ2~14のホスファート修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、ホスファート修飾された2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または14より多くのヌクレオチドを含有し得る。ガイド鎖は、RISC侵入に干渉せずに安定性を増大させる1以上の修飾を含有してもよい。ホスホロチオアート修飾ヌクレオチドなどのホスファート修飾ヌクレオチドは、3'末端にあっても、5'末端にあっても、または、ガイド鎖全体に広がっていてもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖の3'末端の10ヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のホスホロチオアート修飾ヌクレオチドを含有する。ガイド鎖はまた、2'Fおよび/または2'OMe修飾も含有することができ、これは、分子全体に位置することができる。いくつかの態様において、ガイド鎖の1位のヌクレオチド(ガイド鎖の最も5'の位置におけるヌクレオチド)は、2'OMe修飾されているか、および/または、リン酸化されている。ガイド鎖中のCおよびUヌクレオチドは、2'F修飾され得る。例えば、19ntのガイド鎖の2~10位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるCおよびUヌクレオチドは、2'F修飾され得る。ガイド鎖中のCおよびUヌクレオチドもまた、2'OMe修飾され得る。例えば、19ntのガイド鎖の11~18位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるCおよびUヌクレオチドは、2'OMe修飾され得る。いくつかの態様において、ガイド鎖の最も3'末端におけるヌクレオチドは、未修飾である。ある態様において、ガイド鎖中のCおよびUの大部分は、2'F修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の態様において、1位、および、11~18位におけるCまたはUは、2'OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の態様において、1位、および、11~18位におけるCまたはUは、2'OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されており、2~10位におけるCまたはUは2'F修飾されている。

30

40

【0039】

いくつかの側面において、最適なパッセンジャー鎖は、およそ11~14ヌクレオチド

50

の長さである。パッセンジャー鎖は、安定性を増大させる修飾を含有してもよい。パッセンジャー鎖における1以上のヌクレオチドは、2' OMe修飾され得る。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖における1以上のCおよび/またはUヌクレオチドが2' OMe修飾されているか、または、パッセンジャー鎖におけるCおよびUヌクレオチドの全てが2' OMe修飾されている。ある態様において、パッセンジャー鎖における全てのヌクレオチドが2' OMe修飾されている。パッセンジャー鎖上の1以上のヌクレオチドはまた、ホスホロチオアート修飾などのホスファート修飾もなされ得る。パッセンジャー鎖はまた、2' リボ、2' Fおよび2デオキシ修飾、または、上のいずれの組み合わせをも含有し得る。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との両方における化学修飾パターンは、良好に耐容され得、化学修飾の組み合わせは、RNA分子の効力および自己送達の増大をもたらし得る。

10

【0040】

本発明の側面は、RNAiについて先に使用されてきた分子と比較した場合、二本鎖領域に対して相対的に長い一本鎖領域を有するRNAiコンストラクトに関する。分子の一本鎖領域は、細胞取り込みまたは遺伝子サイレンシングを促進するために修飾されているもよい。いくつかの態様において、一本鎖領域のホスホロチオアート修飾は、細胞取り込みおよび/または遺伝子サイレンシングに影響を及ぼす。ガイド鎖のホスホロチオアート修飾されている領域は、分子の一本鎖および二本鎖の両領域内にヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様において、一本鎖領域は、2~12のホスホロチオアート修飾を含む。例えば、一本鎖領域は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12のホスホロチオアート修飾を含み得る。いくつかの例において、一本鎖領域は、6~8のホスホロチオアート修飾を含む。

20

【0041】

本発明に関連する分子はまた、細胞取り込みのためにも最適化される。本明細書に記載されるRNA分子において、ガイド鎖および/またはパッセンジャー鎖は、抱合体に付着され得る。ある態様において、抱合体は疎水性である。疎水性の抱合体は、10より高い分配係数を有する低分子であり得る。抱合体は、コレステロールなどのステロール型分子であっても、または、C17に付着した長さが増大したポリ炭素鎖を有する分子であってもよく、抱合体の存在は、脂質トランスフェクション試薬の有無に関らずRNA分子が細胞に取り込まれる能力に影響を及ぼし得る。抱合体は、疎水性リンカーを通して、パッセンジャー鎖またはガイド鎖に付着され得る。いくつかの態様において、疎水性リンカーは5~12Cの長さであり、および/または、ヒドロキシピロリジンをベースとする。いくつかの態様において、疎水性抱合体はパッセンジャー鎖に付着し、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖のいずれかのCU残基は、修飾されている。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖のCU残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%は、修飾されている。いくつかの側面において、本発明に関連する分子は、自己送達性(sd)である。本明細書において用いられる場合、「自己送達(self-delivery)」とは、分子が、トランスフェクション試薬などの追加の送達ビヒクルを必要とせずに細胞へ送達される能力を指す。

30

40

【0042】

本発明の側面は、RNAiにおける使用のために分子を選択することに関する。いくつかの態様において、8~15ヌクレオチドの二本鎖領域を有する分子は、RNAiにおける使用のために選択され得る。いくつかの態様において、分子は、その熱力学的安定性(ΔG)に基づいて選択される。いくつかの態様において、 -13 kkal/mol 未満の(ΔG)を有する分子が選択されるであろう。例えば、(ΔG)値は、 -13 、 -14 、 -15 、 -16 、 -17 、 -18 、 -19 、 -21 、 -22 または -22 kkal/mol 未満であってもよい。他の態様において、(ΔG)値は、 -13 kkal/mol より高くてもよい。例えば、(ΔG)値は、 -12 、 -11 、 -10 、 -9 、 -8 、 -7 または -7 kkal/mol より高くてもよい。 ΔG は、当該技術分野において知られている

50

いずれの方法をも使用して計算され得ることが理解されるべきである。いくつかの態様において、 G は、Mfoldインターネットサイト (mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi) を通して利用可能なMfoldを使用して計算される。 G を計算するための方法は、以下の参考文献において記載され、それらから参照により組み込まれる：Zuker, M. (2003) *Nucleic Acid Res.*, 31(13):3406-15; Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D. H. (1999) *J. Mol. Biol.* 288:911-940; Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., and Turner, D. H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:7287-7292; Duan, S., Mathews, D. H., and Turner, D. H. (2006) *Biochemistry* 45:9819-9832; Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I. L., and Schuster, P. (1999) *Biopolymers* 49:145-165.

10

【0043】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、5' および / または 3' 末端の突出を含有する。ポリヌクレオチドの一端におけるヌクレオチド突出の数および / または配列は、ポリヌクレオチドの他端と同じであっても異なってもよい。ある態様において、突出ヌクレオチドの1以上は、ホスホロチオアートまたは2'-OMe修飾などの化学修飾を含有してもよい。

ある態様において、ポリヌクレオチドは、未修飾である。他の態様において、少なくとも1つのヌクレオチドが修飾されている。さらなる態様において、修飾は、ガイド配列の5'末端から2つ目のヌクレオチドにおいて、2'-Hまたは2'-修飾されたりリボース糖を含む。「2つ目のヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドの5'末端から2つ目のヌクレオチドとして定義される。

20

【0044】

本明細書に使用される「2'修飾されたりリボース糖」は、2'-OH基を有さないリボース糖を含む。「2'修飾されたりリボース糖」は、(未修飾の基準のDNAヌクレオチドにおいて見出される) 2'-デオキシリボースを含まない。例えば、2'修飾されているリボース糖は、2'-O-アルキルヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチドまたはこれらの組み合わせであってもよい。

ある態様において、2'修飾されているヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチド(例えばC/U)である。2'-O-アルキルヌクレオチドの例は、2'-O-メチルヌクレオチドまたは2'-O-アリルヌクレオチドを含む。

30

【0045】

ある態様において、上述の5'末端修飾を持つ本発明のsd-rxRNAポリヌクレオチドは、特定された5'末端修飾がない類似のコンストラクトと比較したとき、有意に(例えば、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%またはそれを超えて)より低い「オフ・ターゲット(off-target)」遺伝子サイレンシングを呈し、よって、RNAi試薬または治療の全体的な特異性を大きく改善する。

本明細書に使用される「オフ・ターゲット」遺伝子サイレンシングは、例えばアンチセンス(ガイド)配列と、意図しない標的mRNA配列との間の偽の配列相同性に起因する、意図しない遺伝子サイレンシングを指す。

40

【0046】

本発明のこの側面に従うと、あるガイド鎖修飾は、RNAi活性を有意に低下させることなく(またはRNAi活性を全く低下させずに)、ヌクレアーゼ安定性をさらに増大させ、および / または、インターフェロン誘導を低下させる。

ある修飾の組み合わせは、標的遺伝子の発現を阻害する能力の増強、血清安定性の増強、および / または、標的特異性の増大などにより部分的に表わされる、さらなる予想外の利点をもたらしてもよい。

ある態様において、ガイド鎖は、ガイド鎖の5'末端における2番目のヌクレオチドにて、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、かつ、他の修飾ヌクレオチドを含まない。

50

【0047】

他の側面において、本発明の *sd-rxRNA* 構造は、マイクロRNA 機構によって、配列依存的な遺伝子サイレンシングを媒介する。本明細書に使用される用語「マイクロRNA」(「*miRNA*」)はまた、当該技術分野において、「小分子RNA (small temporal RNA)」(「*stRNA*」)としても言及され、遺伝子的に(例えば、ウイルス、哺乳動物または植物ゲノムにより)コードされる小さい(10~50ヌクレオチドの)RNAであって、RNAサイレンシングを指向または媒介することができるものを指す。「*miRNA* 障害」は、*miRNA*の異常な発現または活性により特徴づけられる疾患または障害を指すべきである。

マイクロRNAは、マウス、線虫および哺乳動物において、発生またはがんなどの重要な経路において標的遺伝子を下方調節することに関与する。マイクロRNA機構を通じた遺伝子サイレンシングは、*miRNA*とその標的メッセンジャーRNA (*mRNA*)との特異的であるがなお不完全な塩基対形成により、達成される。標的*mRNA*発現のマイクロRNA媒介性の下方調節において、多様な機構が使用されてもよい。

【0048】

*miRNA*は、およそ22ヌクレオチドの非コードRNAであって、植物および動物の発生の間中、転写後または翻訳後のレベルにて、遺伝子発現を調節し得る。*miRNA*の1つの共通の特徴は、それらがプレ*miRNA* (*pre-miRNA*)と称されるおよそ70ヌクレオチドの前駆体RNAステムループから、恐らくはRNAse III型酵素であるダイサーまたはそのホモログによって、切り取られることである。天然に存在する*miRNA*は、*in vivo*で内因性遺伝子により発現され、ヘアピンまたはステムループ前駆体(プレ*miRNA*またはプリ*miRNA* (*pri-miRNA*))から、ダイサーまたは他のRNAseによりプロセッシングされる。*miRNA*は、*in vivo*で二本鎖デュプレックス(*double-stranded duplex*)として一過性に存在し得るが、一方の鎖のみが遺伝子サイレンシングを指揮するためにRISC複合体に取り込まれる。

【0049】

いくつかの態様において、細胞取り込みおよび*miRNA*活性の阻害において有効な*sd-rxRNA*化合物のバージョンが記載される。化合物は本質的に、RISC侵入性のバージョンに類似するが、大きな鎖の化学修飾パターンが、切断を遮断してRISC作用の効果的な阻害剤として作用するように、最適化されている。例えば、化合物は、先に記載のホスホロチオアート含有物で完全にまたはほとんどにおいてO-メチル修飾されていてもよい。これらの型の化合物について、いくつかの態様においては、5'リン酸化は必要でない。二本鎖領域の存在は、細胞取り込みおよび効率的なRISCローディングを促進するので、好ましい。

低分子RNAを配列特異的調節剤として使用する別の経路は、RNA干渉(*RNAi*)経路であり、これは、細胞における二本鎖RNA (*dsRNA*)の存在に対する、進化的に保存された応答である。*dsRNA*は、ダイサーにより、~20塩基対(*bp*)デュプレックスの低分子干渉RNA (*siRNA*)へと切断される。これらの低分子RNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と称される多タンパク質エフェクター複合体へと集合させられる。*siRNA*は次いで、完璧な相補性を持つ標的*mRNA*の切断をガイドする。

【0050】

バイオジェネシス、タンパク質複合体および機能のいくつかの側面は、*siRNA*経路と*miRNA*経路との間で共有される。一本鎖ポリヌクレオチドは、*siRNA*機構において*dsRNA*を模倣しても、または、*miRNA*機構においてマイクロRNAを模倣してもよい。

ある態様において、修飾*RNAi*コンストラクトは、同じ配列を有する未修飾*RNAi*コンストラクトと比較して、改善された血清および/または脳脊髄液中の安定性を有してもよい。

ある態様において、*RNAi*コンストラクトの構造は、ヒト、マウスおよび他のげっ歯

10

20

30

40

50

類ならびに他の非ヒト哺乳動物からの初代細胞を含む哺乳動物の初代細胞などの初代細胞において、インターフェロン応答を誘導しない。ある態様において、RNAiコンストラクトはまた、無脊椎生物において標的遺伝子の発現を阻害するためにも使用されてもよい。

【0051】

対象となるコンストラクトのin vivoでの安定性をさらに増大させるために、構造の3'末端は、保護基（単数または複数）により遮断されてもよい。例えば反転（inverted）ヌクレオチド、反転脱塩基部分またはアミノ末端修飾ヌクレオチドなどの保護基が使用されてもよい。反転ヌクレオチドは、反転デオキシヌクレオチドを含んでもよい。反転脱塩基部分は、3'，3'連結または5'，5'連結されたデオキシ脱塩基部分などの、反転デオキシ脱塩基部分を含んでもよい。

10

本発明のRNAiコンストラクトは、標的遺伝子（単数または複数）によりコードされるあらゆる標的タンパク質の合成を阻害することができる。本発明は、細胞において、in vitroまたはin vivoのいずれかで、標的遺伝子の発現を阻害する方法を含む。したがって、本発明のRNAiコンストラクトは、標的遺伝子の過剰発現により特徴づけられる疾患を持つ患者を処置するのに有用である。

【0052】

標的遺伝子は、細胞にとって内因性であっても外因性（例えば、ウイルスにより、または、組み換えDNA技術を使用して、細胞に導入されたもの）であってもよい。かかる方法は、標的遺伝子の発現を阻害するために十分な量でのRNAの細胞内への導入を含んでもよい。例えば、かかるRNA分子は、組成物が標的遺伝子の発現を阻害するように、標的遺伝子のヌクレオチド配列に対して相補的なガイド鎖を有してもよい。

20

本発明はまた、本発明の核酸を発現するベクター、および、かかるベクターまたは核酸を含む細胞にも関する。細胞は、in vivoのまたは培養中の、ヒト細胞などの哺乳動物細胞であり得る。

【0053】

本発明はさらに、対象となるRNAiコンストラクトと薬学的に許容し得るキャリアまたは希釈剤とを含む、組成物に関する。

方法は、in vitroで、ex vivoで、または、in vivoで、例えば、培養中のヒト細胞などの培養中の哺乳動物細胞において行ってもよい。

30

標的細胞（例えば哺乳動物細胞）は、脂質（例えばカチオン性脂質）またはリボソームなどの送達試薬の存在下において、接触させられてもよい。

本発明の別の側面は、哺乳動物細胞を、対象となるRNAiコンストラクトを発現するベクターと接触させることを含む、哺乳動物細胞において標的遺伝子の発現を阻害するための方法を提供する。

【0054】

本発明の一側面において、約16～約30ヌクレオチドの範囲のサイズである第1のポリヌクレオチドと、約26～約46ヌクレオチドの範囲のサイズである第2のポリヌクレオチドとを含む、より長いデュプレックスポリヌクレオチドが提供され、ここで、第1のポリヌクレオチド（アンチセンス鎖）は、第2のポリヌクレオチド（センス鎖）および標的遺伝子の両方に対して相補的であり、両方のポリヌクレオチドは、デュプレックスを形成し、ここで、第1のポリヌクレオチドは、長さが6塩基より長い一本鎖領域を含有し、別の化学修飾パターンにより修飾されており、および/または、細胞送達を容易にする抱合体部分を含む。この態様において、パッセンジャー鎖のヌクレオチドの約40～約90%、ガイド鎖のヌクレオチドの約40～約90%、第1のポリヌクレオチドの一本鎖領域のヌクレオチドの約40～約90%が、化学修飾ヌクレオチドである。

40

【0055】

一態様において、ポリヌクレオチドデュプレックス中の化学修飾ヌクレオチドは、上で詳細に議論されたものなどの、当該技術分野において知られているいずれの化学修飾ヌクレオチドであってもよい。特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、2'F修飾ヌ

50

クレオチド、2'-O-メチル修飾されたものおよび2'デオキシヌクレオチドからなる群より選択される。別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド塩基の「疎水性修飾」から生じる。別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドはホスホロチオアートである。さらなる別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオアート、2'-O-メチル、2'デオキシ、疎水性修飾およびホスホロチオアートの組み合わせである。これらの群の修飾が、リボース環、骨格およびヌクレオチドの修飾を指すなら、いくつかの修飾ヌクレオチドが、3つの修飾の型全ての組み合わせを持つことも実行可能である。

別の態様において、化学修飾は、デュプレックスの多様な領域にわたって同一ではない。特定の態様において、第1のポリヌクレオチド(パッセンジャー鎖)は、多数の多様な化学修飾を、多様な部位において有する。このポリヌクレオチドについて、ヌクレオチドの90%までが化学修飾されていてもよく、および/または、導入されたミスマッチを有していてもよい。

【0056】

別の態様において、第1のまたは第2のポリヌクレオチドの化学修飾は、これらに限定されないが、5'位のウリジンおよびシトシンの修飾(4-ピリジル、2-ピリジル、インドリル、フェニル(C₆H₅OH);トリプトファン(C₈H₆N)CH₂CH(NH₂)CO)、イソブチル、ブチル、アミノベンジル;フェニル;ナフチルなど)を含み、ここで、化学修飾は、ヌクレオチドの塩基対形成能力を変化させる場合がある。ガイド鎖について、本発明のこの側面の重要な特徴は、アンチセンスの5'末端に対する化学修飾の位置および配列である。例えば、ガイド鎖の5'末端の化学的リン酸化は通常、効力のために有益である。センス鎖のシード領域(5'末端に対して2~7位)におけるO-メチル修飾は、一般に良好な耐性を示さないが、一方、2'Fおよびデオキシは、良好な耐性を示す。ガイド鎖の中間部分およびガイド鎖の3'末端は、適用される化学修飾の型において、より許容的である。デオキシ修飾は、ガイド鎖の3'末端においては、耐性を示さない。

【0057】

本発明のこの側面のユニークな特徴は、塩基に対する疎水性の修飾の使用を伴う。一態様において、疎水性修飾は好ましくは、ガイド鎖の5'末端付近に位置し、他の態様においては、それらはガイド鎖の中間に局在し、他の態様においては、それらはガイド鎖の3'末端に局在し、さらに別の態様において、それらは、ポリヌクレオチドの全長を通して分布する。同じ型のパターンが、デュプレックスのパッセンジャー鎖に適用可能である。

分子の他方の部分は、一本鎖領域である。一本鎖領域は、7から40までのヌクレオチドの範囲であると予測される。

【0058】

一態様において、第1のポリヌクレオチドの一本鎖領域は、40%~90%の疎水性塩基修飾、40%~90%のホスホロチオアート、40%~90%のリボース部分の修飾、および、前述のものあらゆる組み合わせからなる群より選択される修飾を含有する。

ガイド鎖(第1のポリヌクレオチド)のRISC複合体中へのローディングの効率は、重度に修飾されたポリヌクレオチドについて変わる場合があるので、一態様においては、効率的なガイド鎖のローディングを促進するために、デュプレックスポリヌクレオチドは、ガイド鎖(第1のポリヌクレオチド)上のヌクレオチド9、11、12、13または14と、センス鎖(第2のポリヌクレオチド)上の反対のヌクレオチドとの間のミスマッチを含む。

より詳細な本発明の側面は、以下のセクションにおいて記載される。

【0059】

デュプレックスの特徴

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、2つの別々の相補的な核酸鎖により形成されてもよい。デュプレックス形成は、標的遺伝子を含有する細胞の内側または外側のいずれかで生じ得る。

10

20

30

40

50

本明細書に使用される用語「デュプレックス (duplex)」は、相補的な配列に水素結合している二本鎖 (double-stranded) 核酸分子 (単数または複数) の領域を含む。本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子に対してセンスであるヌクレオチド配列、および、標的遺伝子に対してアンチセンスである相補配列を含んでもよい。センスおよびアンチセンスヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列に対応し、例えば、標的遺伝子配列と同一であるかまたは標的遺伝子の阻害をもたらすために十分に同一 (例えば、ほぼ少なくとも約 98% 同一、96% 同一、94%、90% 同一、85% 同一または 80% 同一) である。

【0060】

ある態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖である、すなわち、分子のいずれの末端においても突出する一本鎖配列を有さない、すなわち、平滑末端である。他の態様において、個々の核酸分子は、異なる長さであってもよい。言い換えると、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖でない。例として、2つの別々の核酸分子が使用される時、分子の一方、例えばアンチセンス配列を含む第1の分子は、それにハイブリダイズする第2の分子より長くてもよい (分子の一部を一本鎖とする)。同様に、単一の核酸分子が使用される時、分子のいずれかの末端の部分が一本鎖のままであり得る。

一態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスマッチおよび/またはループまたはバルジを含有するが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約70%にわたって二本鎖である。別の態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約80%にわたって二本鎖である。別の態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約90%~95%にわたって二本鎖である。別の態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約96%~98%にわたって二本鎖である。ある態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個までのミスマッチを含有する。

【0061】

修飾

本発明のヌクレオチドは、糖部分、ホスホジエステル連結部および/または塩基を含む、多様な位置において修飾されてもよい。

いくつかの態様において、ヌクレオチドの塩基部分は修飾されてもよい。例えば、ピリミジン塩基はピリミジン環の2、3、4、5、および/または6位において修飾されてもよい。いくつかの態様において、シトシンの環外アミンが修飾されてもよい。プリン塩基もまた修飾されてもよい。例えば、プリン塩基は、1、2、3、6、7または8位において修飾されてもよい。いくつかの態様において、アデニンの環外アミンが修飾されてもよい。いくつかのケースにおいて、塩基部分の環の窒素原子は、例えば炭素などの別の原子で置換されてもよい。塩基部分への修飾は、いずれの好適な修飾でもあってもよい。修飾の例は当業者に知られている。いくつかの態様において、塩基の修飾は、アルキル化プリンまたはピリミジン、アシル化プリンまたはピリミジン、または、その他のヘテロ環を含む。

【0062】

いくつかの態様において、ピリミジンは5位において修飾されてもよい。例えばピリミジンの5位は、アルキル基、アルキニル基、アルケニル基、アシル基またはこれらの置換誘導体により修飾されてもよい。他の例において、ピリミジンの5位は、ヒドロキシル基またはアルコキシル基またはこれらの置換誘導体により修飾されてもよい。また、ピリミジンのN⁴位をアルキル化してもよい。さらに他の例において、ピリミジン5-6結合は飽和されていてもよく、ピリミジン環内の窒素原子は炭素原子により置換されてもよく、および/または、O²またはO⁴原子は、硫黄原子により置換されてもよい。他の修飾も可能であることが理解されるべきである。

10

20

30

40

50

他の例において、プリンの N^7 位および/または N^2 位および/または N^3 位は、アルキル基またはその置換誘導体により修飾されてもよい。さらなる例において、第3環はプリン二環系に縮合されてもよく、および/または、プリン環系内の窒素原子は炭素原子で置換されてもよい。他の修飾も可能であることが理解されるべきである。

【0063】

5位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5591843号、米国特許第7,205,297号、米国特許第6,432,963号および米国特許第6,020,483号に開示されており； N^4 位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5,580,731号に開示されており；8位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第6,355,787号および米国特許第5,580,972号に開示されており； N^6 位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第4,853,386号、米国特許第5,789,416号および米国特許第7,041,824号に開示されており；2位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第4,201,860号および米国特許第5,587,469号に開示されており；これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0064】

修飾塩基の非限定的例は、 N^4 、 N^4 -エタノシトシン、7-デアザキサントシン、7-デアザグアノシン、8-オキソ- N^6 -メチルアデニン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、 N^6 -イソペンテニル-アデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、 N^6 -メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ- N^6 -イソペンテニルアデニン、プソイドウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、2-チオシトシンおよび2,6-ジアミノプリンを含む。いくつかの態様において、塩基部分はプリンまたはピリミジン以外のヘテロ環式塩基であってもよい。ヘテロ環式塩基は任意に修飾および/または置換されてもよい。

20

【0065】

糖部分は、天然の未修飾糖、例えば単糖（ペントース、例えばリボース、デオキシリボース）、修飾糖および糖アナログを含む。一般に、可能なヌクレオモノマーの修飾、特に糖部分のものは、例えば、1以上のヒドロキシル基のハロゲン、ヘテロ原子、脂肪族基での置き換え、または、ヒドロキシル基の、エーテル、アミン、チオールなどとしての官能化を含む。

30

修飾ヌクレオモノマーの特に有用な一群は、2'-O-メチルヌクレオチドである。かかる2'-O-メチルヌクレオチドは、「メチル化されている」として言及されてもよく、対応するヌクレオチドは、非メチル化ヌクレオチドからアルキル化により、または直接的にメチル化ヌクレオチド試薬から、作られる。修飾ヌクレオモノマーは、未修飾ヌクレオモノマーと組み合わせて使用されてもよい。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、メチル化および非メチル化ヌクレオモノマーの両方を含有してもよい。

40

【0066】

いくつかの例示的な修飾ヌクレオモノマーは、糖または骨格（backbone）が修飾されたリボヌクレオチドを含む。修飾リボヌクレオチドは、5'位で修飾されたウリジンまたはシチジン、例えば5'-(2-アミノ)プロピルウリジンおよび5'-プロモウリジン；8位で修飾されたアデノシンおよびグアノシン、例えば8-プロモグアノシン；デアザヌクレオチド、例えば7-デアザ-アデノシン；ならびに N -アルキル化ヌクレオチド、例えば N^6 -メチルアデノシンなどの、天然に存在しない塩基を（天然に存在する塩基の代わりに）含有してもよい。また、糖修飾リボヌクレオチドは、H、アルコキシ（もしくはOR）、Rもしくはアルキル、ハロゲン、SH、SR、アミノ（ NH_2 、 NHR 、 NR_2 など）またはCN基で置き換えられた2'-OH基をも有していてもよく、ここで、Rは

50

、低級アルキル、アルケニルまたはアルキニルである。

【0067】

修飾リボヌクレオチドはまた、修飾基、例えばホスホロチオアート基により置き換えられた、隣接するリボヌクレオチドに繋がられたホスホジエステル基をも有してもよい。より一般的には、多様なヌクレオチド修飾が組み合わされてもよい。

アンチセンス(ガイド)鎖は、標的遺伝子(単数または複数)の少なくとも一部に対して実質的に同一であってもよいが、少なくとも塩基対形成特性に関連して、配列は、有用であるため、例えば標的遺伝子の表現型の発現を阻害するために、完全に同一である必要はない。一般により高い相同性は、より短いアンチセンス遺伝子の使用を埋め合わせるために使用され得る。いくつかのケースにおいて、アンチセンス鎖は、一般に、標的遺伝子に対して(アンチセンス方向において)実質的に同一であろう。

2'-O-メチル修飾RNAの使用はまた、細胞ストレス応答を最少化することが望ましい状況においても有益であり得る。2'-O-メチルヌクレオモノマーを有するRNAは、未修飾RNAを認識すると考えられる細胞機構によって認識され得ない。2'-O-メチル化されたかまたは部分的に2'-O-メチル化されたRNAは、標的RNA阻害を維持しつつ、二本鎖核酸に対するインターフェロン応答を回避し得る。これは、例えば、インターフェロンまたは他の細胞ストレス応答を回避するために、インターフェロン応答を誘導する短いRNAi(例えばsiRNA)配列、および、インターフェロン応答を誘導し得るより長いRNAi配列の両方において、有用であり得る。

【0068】

全体として、修飾糖は、D-リボース、2'-O-アルキル(2'-O-メチルおよび2'-O-エチルを含む)、すなわち、2'-アルコキシ、2'-アミノ、2'-S-アルキル、2'-ハロ(2'-フルオロを含む)、2'-メトキシエトキシ、2'-アリルオキシ(-OCH₂CH=CH₂)、2'-プロパルギル、2'-プロピル、エチニル、エテニル、プロペニルならびにシアノなどを含む。一態様において、糖部分は、記載されるように(Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992))、ヘキソースであってもよく、オリゴヌクレオチド中に組み込まれてもよい。例示的なヌクレオモノマーは、例えば米国特許第5,849,902号において見出され得、これは本明細書に参照により組み込まれる。

具体的な官能基の定義および化学用語は、以下にさらに詳細に記載される。本発明の目的のために、化学元素はCAS versionのHandbook of Chemistry and Physics, 75th Ed.の内表紙の元素周期表に従って同定され、具体的な官能基はこれに記載のようにして一般的に定義される。さらに、有機化学の一般原理ならびに具体的な官能部分および反応性は、Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999に記載され、この内容の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0069】

本発明のある化合物は、特定の幾何学的形態または立体異性形態で存在してもよい。本発明は全てのかかる化合物を考慮し、これには*cis*-および*trans*-異性体、*R*-および*S*-鏡像異性体、ジアステレオマー、(*D*)-異性体、(*L*)-異性体、これらのラセミ混合物、および、これらのその他の混合物を、本発明の範囲内であるとして含む。追加の不斉炭素原子が、アルキル基などの置換基中に存在してよい。全てのかかる異性体およびこれらの混合物は、本発明に含むことが意図される。

種々の異性体比のいずれかを含有する異性体混合物は、本発明に従って利用されてもよい。例えば、2種の異性体のみが組み合わせられるとき、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、95:5、96:4、97:3、98:2、99:1または100:0の異性体比を含有する混合物は全て、本発明に企図される。当業者は容易に、さらに複雑な異性体混合物について類似の比率が企図されることを理解するであろう。

【0070】

例として、本発明の化合物の特定のエナンチオマーが所望される場合、これは不斉合成

により、または、キラル補助基による誘導体化により調製されてもよく、ここで得られたジステレオマー混合物は分離され、補助基が切断されて、純粋な所望のエナンチオマーが提供される。代わりに、分子がアミノなどの塩基性官能基を含有する場合またはカルボキシルなどの酸性官能基を含有する場合、ジステレオマー塩が、適切な光学活性酸または塩基により形成され、次いでこうして形成されたジステレオマーが、当該技術分野において周知の分別結晶化またはクロマトグラフィー手段により分割され、続いて純粋なエナンチオマーが回収される。

ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、3'および5'末端(termini)を含む(環状オリゴヌクレオチドを除く)。一態様において、オリゴヌクレオチドの3'および5'末端は、例えば3'または5'結合を修飾することにより、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る(例えば米国特許第5,849,902号およびWO98/13526)。例えば、オリゴヌクレオチドは「ブロック基(blocking group)」を含めることにより抵抗性になされ得る。本明細書に使用される用語「ブロック基」は、合成のための保護基または結合基のどちらかとしてオリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに付着され得る、置換基(例えばOH基以外のもの)を指す(例えば、FITC、プロピル(CH₂-CH₂-CH₃)、グリコール(-O-CH₂-CH₂-O-)ホスファート(PO₃²⁻)、ホスホン酸水素またはホスホロアミダイト)。「ブロック基」はまた、「末端ブロック基」または「エキソヌクレアーゼブロック基」をも含み、これらは、修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ抵抗性構造を含む、オリゴヌクレオチドの、3'および5'末端を保護する。

【0071】

例示の末端ブロック基は、キャップ構造(例えば7-メチルグアノシンキャップ)、反転(inverted)ヌクレオモノマー、例えば3'-3'または5'-5'末端反転を有するもの(例えばOrtiagao et al. 1992. Antisense Res. Dev. 2:129を参照)、メチルホスホナート、ホスホロアミダイト、非ヌクレオチド基(例えば、非ヌクレオチドリinker、アミノリンカー、抱合体)などを含む。3'末端ヌクレオモノマーは、修飾糖部分を含み得る。3'末端ヌクレオモノマーは、オリゴヌクレオチドの3'-エキソヌクレアーゼ分解を防ぐブロック基により任意に置換され得る3'-Oを含む。例えば、3'-ヒドロキシルは、3' 3'ヌクレオチド間連結物を介してヌクレオチドにエステル化され得る。例えば、アルキルオキシラジカルは、メトキシ、エトキシまたはイソプロポキシであり得、好ましくはエトキシである。任意に、3'末端における3' 3'結合ヌクレオチドは、代替連結により連結され得る。ヌクレアーゼ分解を低減するために、最も5'の3' 5'連結部は、修飾連結部、例えばホスホロチオアートまたはP-アルキルオキシホスホトリエステル連結部であることができる。好ましくは、2つの最も5'の3' 5'連結部は、修飾連結部である。任意に、5'末端ヒドロキシ部分は、リン含有部分、例えば、ホスファート、ホスホロチオアートまたはP-エトキシホスファートで、エステル化され得る。

【0072】

合成方法が、本明細書に記載のとおり、種々の保護基を利用することを、当業者は理解するであろう。本明細書で使用される用語「保護基」は、特定の官能部分、例えばO、SまたはNを一時的に遮断して、多官能性化合物における別の反応部位にて反応が選択的に行われ得ることを意味する。ある態様において、保護基は良好な収率で選択的に反応して、計画された反応に対して安定である、保護された基質を与える；保護基は、容易に利用可能で好ましくは非毒性の、他の官能基を攻撃しない試薬により、良好な収率で選択的に除去可能であるべきである；保護基は、容易に分離可能な誘導体を(より好ましくは、新しい立体中心の生成なしに)形成する；および、保護基は、さらなる反応部位を有することを回避するために最小限の追加の官能性を有する。

【0073】

本明細書に詳述されるとおり、酸素、硫黄、窒素および炭素の保護基が利用されてもよい。ヒドロキシル保護基は以下を含む：メチル、メトキシメチル(MOM)、メチルチオ

10

20

30

40

50

メチル (MTM)、t-ブチルチオメチル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチル (SMOM)、ベンジルオキシメチル (BOM)、p-メトキシベンジルオキシメチル (PMBM)、(4-メトキシフェノキシ)メチル (p-AOM)、グアイアコルメチル (GUM)、t-ブトキシメチル、4-ペンテニルオキシメチル (POM)、シロキシメチル、2-メトキシエトキシメチル (MEM)、2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル、ビス(2-クロロエトキシ)メチル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル (SEMOR)、テトラヒドロピラニル (THP)、3-プロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、1-メトキシシクロヘキシル、4-メトキシテトラヒドロピラニル (MTHP)、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルS, S-ジオキシド、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル] - 4-メトキシピペリジン - 4-イル (CTMP)、1, 4-ジオキサン - 2-イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、2, 3, 3a, 4, 5, 6, 7, 7a-オクタヒドロ - 7, 8, 8-トリメチル - 4, 7-メタノベンゾフラン - 2-イル、

【0074】

1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、1-メチル-1-メトキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチル、2, 2, 2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、2-(フェニルセレニル)エチル、t-ブチル、アリル、p-クロロフェニル、p-メトキシフェニル、2, 4-ジニトロフェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、3, 4-ジメトキシベンジル、o-ニトロベンジル、p-ニトロベンジル、p-ハロベンジル、2, 6-ジクロロベンジル、p-シアノベンジル、p-フェニルベンジル、2-ピコリル、4-ピコリル、3-メチル-2-ピコリルN-オキシド、ジフェニルメチル、p, p'-ジニトロベンズヒドリル、5-ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、-ナフチルジフェニルメチル、p-メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ(p-メトキシフェニル)フェニルメチル、トリ(p-メトキシフェニル)メチル、4-(4'-プロモフェナシルオキシフェニル)ジフェニルメチル、4, 4', 4''-トリス(4, 5-ジクロロフタルイミドフェニル)メチル、4, 4', 4''-トリス(レプリノイルオキシフェニル)メチル、4, 4', 4''-トリス(ベンゾイルオキシフェニル)メチル、3-(イミダゾール-1-イル)ビス(4', 4''-ジメトキシフェニル)メチル、1, 1-ビス(4-メトキシフェニル)-1'-ピレニルメチル、9-アントリル、9-(9-フェニル)キサントニル、9-(9-フェニル-10-オキソ)アントリル、1, 3-ベンゾジチオラン - 2-イル、ベンズイソチアゾリルS, S-ジオキシド、

【0075】

トリメチルシリル (TMS)、トリエチルシリル (TES)、トリエチルプロピルシリル (TEIPS)、ジメチルイソプロピルシリル (IPDMS)、ジエチルイソプロピルシリル (DEIPS)、ジメチルテキシルシリル (dimethylhexylsilyl)、t-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、t-ブチルジフェニルシリル (TBDPS)、トリベンジルシリル、トリ-p-キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル (DPMS)、t-ブチルメトキシフェニルシリル (TBMPs)、ホルマート、ベンゾイルホルマート、アセタート、クロロアセタート、ジクロロアセタート、トリクロロアセタート、トリフルオロアセタート、メトキシアセタート、トリフェニルメトキシアセタート、フェノキシアセタート、p-クロロフェノキシアセタート、3-フェニルプロピオナート、4-オキソペンタノアート(レプリナート)、4, 4-(エチレンジチオ)ペンタノアート(レプリノイルジチオアセタール)、ピバロアート、アダマントアート、クロトナート、4-メトキシクロトナート、ベンゾアート、p-フェニルベンゾアート、2, 4, 6-トリメチルベンゾアート(メシトアート)、

【0076】

アルキルメチルカルボナート、9-フルオレニルメチルカルボナート (Fmoc)、アルキルエチルカルボナート、アルキル2, 2, 2-トリクロロエチルカルボナート (Troc)、2-(トリメチルシリル)エチルカルボナート (TMSEC)、2-(フェニルス

10

20

30

40

50

ルホニル)エチルカルボナート (P s e c)、2 - (トリフェニルホスホニオ)エチルカルボナート (P e o c)、アルキルイソブチルカルボナート、アルキルビニルカルボナートアルキルアリルカルボナート、アルキル p - ニトロフェニルカルボナート、アルキルベンジルカルボナート、アルキル p - メトキシベンジルカルボナート、アルキル 3 , 4 - ジメトキシベンジルカルボナート、アルキル o - ニトロベンジルカルボナート、アルキル p - ニトロベンジルカルボナート、アルキル S - ベンジルチオカルボナート、4 - エトキシ - 1 - ナフチルカルボナート、メチルジチオカルボナート、

【 0 0 7 7 】

2 - ヨードベンゾアート、4 - アジドブチラート、4 - ニトロ - 4 - メチルペンタノアート、o - (ジブロモメチル)ベンゾアート、2 - フォルミルベンゼンスルホナート、2 - (メチルチオメトキシ)エチル、4 - (メチルチオメトキシ)ブチラート、2 - (メチルチオメトキシメチル)ベンゾアート、2 , 6 - ジクロロ - 4 - メチルフェノキシアセタート、2 , 6 - ジクロロ - 4 - (1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルブチル)フェノキシアセタート、2 , 4 - ビス (1 , 1 - ジメチルプロピル)フェノキシアセタート、クロロジフェニルアセタート、イソブチラート、モノスクシノアート、(E) - 2 - メチル - 2 - プテノアート、o - (メトキシカルボニル)ベンゾアート、 - ナフトアート、ニトラート、アルキル N , N , N ' , N ' - テトラメチルホスホロジアミダート、アルキル N - フェニルカルバマート、ボラート、ジメチルホスフィノチオイル、アルキル 2 , 4 - ジニトロフェニルスルフェナート (dinitrophenylsulfenate)、スルファート、メタンスルホナート (メシラート)、ベンジルスルホナートおよびトシラート (T s)。

10

20

【 0 0 7 8 】

1 , 2 - または 1 , 3 - ジオールを保護するためには、保護基は以下を含む：メチレンアセタール、エチリデンアセタール、1 - t - ブチルエチリデンケタール、1 - フェニルエチリデンケタール、(4 - メトキシフェニル)エチリデンアセタール、2 , 2 , 2 - トリクロロエチリデンアセタール、アセトニド、シクロペンチリデンケタール、シクロヘキシリデンケタール、シクロヘプチリデンケタール、ベンジリデンアセタール、p - メトキシベンジリデンアセタール、2 , 4 - ジメトキシベンジリデンケタール、3 , 4 - ジメトキシベンジリデンアセタール、2 - ニトロベンジリデンアセタール、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、ジメトキシメチレンオルトエステル、1 - メトキシエチリデンオルトエステル、1 - エトキシエチリデンオルトエステル、1 , 2 - ジメトキシエチリデンオルトエステル、 - メトキシベンジリデンオルトエステル、1 - (N , N - ジメチルアミノ)エチリデン誘導体、 - (N , N ' - ジメチルアミノ)ベンジリデン誘導体、2 - オキサシクロペンチリデンオルトエステル、ジ - t - ブチルシリレン基 (D T B S)、1 , 3 - (1 , 1 , 3 , 3 - テトライソプロピルジシロキサニリデン)誘導体 (T I P D S)、テトラ - t - プトキシジシロキサン - 1 , 3 - ジイリデン誘導体 (T B D S)、環状カルボナート、環状ボロナート、エチルボロナートおよびフェニルボロナート。

30

40

50

【 0 0 7 9 】

アミノ保護基は、以下を含む：メチルカルバマート、エチルカルバマート、9 - フルオレニルメチルカルバマート (F m o c)、9 - (2 - スルホ)フルオレニルメチル (fluoro enylmethyl) カルバマート、9 - (2 , 7 - ジブロモ)フルオレニルメチルカルバマート、2 , 7 - ジ - t - ブチル - [9 - (1 0 , 1 0 - ジオキソ - 1 0 , 1 0 , 1 0 , 1 0 - テトラヒドロチオキサチル)] メチルカルバマート (D B D - T m o c)、4 - メトキシフェナシルカルバマート (P h e n o c)、2 , 2 , 2 - トリクロロエチルカルバマート (T r o c)、2 - トリメチルシリルエチルカルバマート (T e o c)、2 - フェニルエチルカルバマート (h Z)、1 - (1 - アダマンチル) - 1 - メチルエチルカルバマート (A d p o c)、1 , 1 - ジメチル - 2 - ハロエチルカルバマート、1 , 1 - ジメチル - 2 , 2 - ジブロモエチルカルバマート (D B - t - B O C)、1 , 1 - ジメチル - 2 , 2 , 2 - トリクロロエチルカルバマート (T C B O C)、1 - メチル - 1 - (4 - ビフェニルイル)エチルカルバマート (B p o c)、1 - (3 , 5 - ジ - t - ブチルフェニル)

- 1 - メチルエチルカルバマート (t - B u m e o c)、2 - (2 ' - および 4 ' - ピリジル) エチルカルバマート (P y o c)、2 - (N , N - ジシクロヘキシルカルボキサミド) エチルカルバマート、t - ブチルカルバマート (B O C)、1 - アダマンチルカルバマート (A d o c)、ビニルカルバマート (V o c)、アリルカルバマート (A l l o c)、1 - イソプロピルアリルカルバマート (I p a o c)、シンナミルカルバマート (C o c)、4 - ニトロシンナミルカルバマート (N o c)、8 - キノリルカルバマート、N - ヒドロキシピペリジニルカルバマート、アルキルジチオカルバマート、ベンジルカルバマート (C b z)、p - メトキシベンジルカルバマート (M o z)、

【 0 0 8 0 】

p - ニトロベンジルカルバマート、p - プロモベンジルカルバマート、p - クロロベンジルカルバマート、2 , 4 - ジクロロベンジルカルバマート、4 - メチルスルフィニルベンジルカルバマート (M s z)、9 - アントリルメチルカルバマート、ジフェニルメチルカルバマート、2 - メチルチオエチルカルバマート、2 - メチルスルホニルエチルカルバマート、2 - (p - トルエンスルホニル) エチルカルバマート、[2 - (1 , 3 - ジチアニル)] メチルカルバマート (D m o c)、4 - メチルチオフエニルカルバマート (M t p c)、2 , 4 - ジメチルチオフエニルカルバマート (B m p c)、2 - ホスホニオエチルカルバマート (P e o c)、2 - トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバマート (P p o c)、1 , 1 - ジメチル - 2 - シアノエチルカルバマート、m - クロロ - p - アシルオキシベンジルカルバマート、p - (ジヒドロキシボリル) ベンジルカルバマート、5 - ベンズイソキサゾリルメチルカルバマート、2 - (トリフルオロメチル) - 6 - クロモニルメチルカルバマート (T c r o c)、m - ニトロフェニルカルバマート、3 , 5 - ジメトキシベンジルカルバマート、o - ニトロベンジルカルバマート、3 , 4 - ジメトキシ - 6 - ニトロベンジルカルバマート、フェニル (o - ニトロフェニル) メチルカルバマート、フェノチアジニル - (1 0) - カルボニル誘導体、N ' - p - トルエンスルホニルアミノカルボニル誘導体、N ' - フェニルアミノチオカルボニル誘導体、

【 0 0 8 1 】

t - アミルカルバマート、S - ベンジルチオカルバマート、p - シアノベンジルカルバマート、シクロブチルカルバマート、シクロヘキシルカルバマート、シクロペンチルカルバマート、シクロプロピルメチルカルバマート、p - デシルオキシベンジルカルバマート、2 , 2 - ジメトキシカルボニルビニルカルバマート、o - (N , N - ジメチルカルボキサミド) ベンジルカルバマート、1 , 1 - ジメチル - 3 - (N , N - ジメチルカルボキサミド) プロピルカルバマート、1 , 1 - ジメチルプロピニルカルバマート、ジ (2 - ピリジル) メチルカルバマート、2 - フラニルメチルカルバマート、2 - ヨードエチルカルバマート、イソボルニルカルバマート、イソブチルカルバマート、イソニコチニルカルバマート、p - (p ' - メトキシフェニルアゾ) ベンジルカルバマート、1 - メチルシクロブチルカルバマート、1 - メチルシクロヘキシルカルバマート、1 - メチル - 1 - シクロプロピルメチルカルバマート、1 - メチル - 1 - (3 , 5 - ジメトキシフェニル) エチルカルバマート、1 - メチル - 1 - (p - フェニルアゾフェニル) エチルカルバマート、1 - メチル - 1 - フェニルエチルカルバマート、1 - メチル - 1 - (4 - ピリジル) エチルカルバマート、フェニルカルバマート、p - (フェニルアゾ) ベンジルカルバマート、2 , 4 , 6 - トリ - t - ブチルフェニルカルバマート、4 - (トリメチルアンモニウム) ベンジルカルバマート、2 , 4 , 6 - トリメチルベンジルカルバマート、

【 0 0 8 2 】

ホルムアミド、アセトアミド、クロロアセトアミド、トリクロロアセトアミド、トリフルオロアセトアミド、フェニルアセトアミド、3 - フェニルプロパンアミド、ピコリンアミド、3 - ピリジルカルボキサミド、N - ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、ベンズアミド、p - フェニルベンズアミド、o - ニトロフェニルアセトアミド、o - ニトロフェノキサセトアミド、アセトアセトアミド、(N ' - ジチオベンジルオキシカルボニルアミノ) アセトアミド、3 - (p - ヒドロキシフェニル) プロパンアミド、3 - (o - ニトロフェニル) プロパンアミド、2 - メチル - 2 - (o - ニトロフェノキシ) プロパンアミド、

10

20

30

40

50

2 - メチル - 2 - (o - フェニルアゾフェノキシ) プロパンアミド、4 - クロロブタンアミド、3 - メチル - 3 - ニトロブタンアミド、o - ニトロシナミド、N - アセチルメチオニン誘導体、o - ニトロベンズアミド、o - (ベンゾイルオキシメチル) ベンズアミド、4, 5 - ジフェニル - 3 - オキサゾリン - 2 - オン、N - フタルイミド、N - ジチアスクシンイミド (D t s)、N - 2, 3 - ジフェニルマレイミド、N - 2, 5 - ジメチルピロール、N - 1, 1, 4, 4 - テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物 (S T A B A S E)、5 - 置換 1, 3 - ジメチル - 1, 3, 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、5 - 置換 1, 3 - ジベンジル - 1, 3, 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、1 - 置換 3, 5 - ジニトロ - 4 - ピリドン、

【 0 0 8 3 】

N - メチルアミン、N - アリルアミン、N - [2 - (トリメチルシリル) エトキシ] メチルアミン (S E M)、N - 3 - アセトキシプロピルアミン、N - (1 - イソプロピル - 4 - ニトロ - 2 - オキソ - 3 - ピロリン - 3 - イル) アミン、第四級アンモニウム塩、N - ベンジルアミン、N - ジ (4 - メトキシフェニル) メチルアミン、N - 5 - ジベンゾスベリルアミン、N - トリフェニルメチルアミン (T r)、N - [(4 - メトキシフェニル) ジフェニルメチル] アミン (M M T r)、N - 9 - フェニルフルオレニルアミン (P h F)、N - 2, 7 - ジクロロ - 9 - フルオレニルメチレンアミン、N - フェロセニルメチルアミノ (F c m)、N - 2 - ピコリルアミノ N ' - オキシド、N - 1, 1 - ジメチルチオメチレンアミン、N - ベンジリデンアミン、N - p - メトキシベンジリデンアミン、N - ジフェニルメチレンアミン、N - [(2 - ピリジル) メチル] メチレンアミン、N - (N ' , N ' - ジメチルアミノメチレン) アミン、N, N ' - イソプロピリデンジアミン、N - p - ニトロベンジリデンアミン、N - サリシリデンアミン、N - 5 - クロロサリシリデンアミン、N - (5 - クロロ - 2 - ヒドロキシフェニル) フェニルメチレンアミン、N - シクロヘキシリデンアミン、N - (5, 5 - ジメチル - 3 - オキソ - 1 - シクロヘキセニル) アミン、N - ボラン誘導体、N - ジフェニルボリン酸誘導体、N - [フェニル (ペンタカルボニルクロム - またはタングステン) カルボニル] アミン、N - 銅キレート、N - 亜鉛キレート、N - ニトロアミン、N - ニトロソアミン、アミン N - オキシド、

【 0 0 8 4 】

ジフェニルホスフィンアミド (D p p)、ジメチルチオホスフィンアミド (M p t)、ジフェニルチオホスフィンアミド (P p t)、ジアルキルホスホルアミダート、ジベンジルホスホルアミダート、ジフェニルホスホルアミダート、ベンゼンスルフェンアミド、o - ニトロベンゼンスルフェンアミド (N p s)、2, 4 - ジニトロベンゼンスルフェンアミド、ペンタクロロベンゼンスルフェンアミド、2 - ニトロ - 4 - メトキシベンゼンスルフェンアミド、トリフェニルメチルスルフェンアミド、3 - ニトロピリジンスルフェンアミド (N p y s)、p - トルエンスルホンアミド (T s)、ベンゼンスルホンアミド、2, 3, 6 - トリメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (M t r)、2, 4, 6 - トリメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (M t b)、2, 6 - ジメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (P m e)、2, 3, 5, 6 - テトラメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (M t e)、4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (M b s)、2, 4, 6 - トリメチルベンゼンスルホンアミド (M t s)、2, 6 - ジメトキシ - 4 - メチルベンゼンスルホンアミド (i M d s)、2, 2, 5, 7, 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホンアミド (P m c)、メタンスルホンアミド (M s)、- トリメチルシリルエタンスルホンアミド (S E S)、9 - アントラセンスルホンアミド、4 - (4 ' , 8 ' - ジメトキシナフチルメチル) ベンゼンスルホンアミド (D N M B S)、ベンジルスルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミドおよびフェナシルスルホンアミド。

【 0 0 8 5 】

例示の保護基は本明細書に詳述される。しかしながら本発明は、これらの保護基に限定されることを意図せず、むしろ、種々の追加の等価な保護基が上の基準を使用して容易に同定され、本発明の方法において利用され得る。加えて、種々の保護基については Protective Groups in Organic Synthesis, Third Ed. Greene, T.W. and Wuts, P.G., Eds., Joh

10

20

30

40

50

n Wiley & Sons, New York: 1999に記載されており、この内容の全体は本明細書に参照により組み込まれる。

【0086】

本明細書に記載のとおり、化合物は、あらゆる数の置換基または官能部分により置換されてよいことが理解される。一般に、用語「任意に」が先行するかどうかに関わらず、用語「置換された」およびこの発明の式に含まれる置換基は、所与の構造中の水素ラジカルの、特定置換基のラジカルによる置き換えを指す。任意の所与の構造中の1つより多くの位置が、特定群から選択された1より多くの置換基により置換されてもよい場合、置換基は各位置において同一であっても異なってもよい。本明細書に使用される用語「置換された」は、有機化合物の全ての許容し得る置換基を含むことが企図される。広い見地からは、許容し得る置換基は、有機化合物の、非環式および環式、分枝および非分枝、炭素環式およびヘテロ環式、芳香族および非芳香族置換基を含む。窒素などのヘテロ原子は、水素置換基および/またはヘテロ原子の原子価を満たす、本明細書に記載の有機化合物のいずれの許容し得る置換基を有してよい。その上、本発明は、いかなる様式においても、有機化合物の許容し得る置換基によって限定されることを意図しない。本発明により想定される置換基および変数の組み合わせは、好ましくは、例えば感染症または増殖性疾患などの処置に有用な安定な化合物の形成をもたらすものである。用語「安定な」とは、好ましくは、本明細書において、製造を可能とするのに十分な安定性を有し、検出されるのに十分な時間の間化合物の完全性を維持し、好ましくは本明細書に詳述される目的のために十分な時間有用であるような、化合物を指す。

10

20

【0087】

本明細書に使用される用語「脂肪族」は、飽和および不飽和両方の、直鎖（すなわち非分枝）、分枝、非環式、環式または多環式の脂肪族炭化水素であって、任意に1以上の官能基により置換されているものを含む。当業者に理解されるとおり、本明細書において「脂肪族」は、これらに限定されないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニルおよびシクロアルキニル部分を含むことを意図する。よって、本明細書に使用される用語「アルキル」は、直鎖、分枝および環式アルキル基を含む。類似の慣例がその他の一般的用語、例えば「アルケニル」、「アルキニル」などにも適用される。その上、本明細書に使用される用語「アルキル」、「アルケニル」、「アルキニル」などは、置換および非置換基の両方を包含する。ある態様において、本明細書で使用される場合「低級アルキル」は、1~6個の炭素原子を有するアルキル基（環式、非環式、置換、非置換、分枝または非分枝）を示すために使用される。

30

【0088】

ある態様において、本発明に採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1~20個の脂肪族炭素原子を含有する。ある態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1~10個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1~8個の脂肪族炭素原子を含有する。さらなる他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1~6個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1~4個の脂肪族炭素原子を含有する。よって例示の脂肪族基は、これらに限定されないが、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、-CH₂-シクロプロピル、ビニル、アリル、n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、シクロブチル、-CH₂-シクロブチル、n-ペンチル、sec-ペンチル、イソペンチル、tert-ペンチル、シクロペンチル、-CH₂-シクロペンチル、n-ヘキシル、sec-ヘキシル、シクロヘキシル、-CH₂-シクロヘキシル部分等を含み、これは重ねて、1以上の置換基を有してもよい。アルケニル基は、これらに限定されないが、例えばエテニル、プロペニル、ブテニル、1-メチル-2-ブテン-1-イルなどを含む。代表的なアルキニル基は、これらに限定されないが、エチニル、2-プロピニル（プロパルギル）、1-プロピニルなどを含む。

40

50

【0089】

本発明の化合物の、上記の脂肪族（およびその他の）部分の置換基のいくつかの例は、これらに限定されないが以下を含む：脂肪族；ヘテロ脂肪族；アリール；ヘテロアリール；アリールアルキル；ヘテロアリールアルキル；アルコキシ；アリールオキシ；ヘテロアルコキシ；ヘテロアリールオキシ；アルキルチオ；アリールチオ；ヘテロアルキルチオ；ヘテロアリールチオ；-F；-Cl；-Br；-I；-OH；-NO₂；-CN；-CF₃；-CH₂CF₃；-CHCl₂；-CH₂OH；-CH₂CH₂OH；-CH₂NH₂；-CH₂SO₂CH₃；-C(O)R_x；-CO₂(R_x)；-CON(R_x)₂；-OC(O)R_x；-OCO₂R_x；-OCON(R_x)₂；-N(R_x)₂；-S(O)₂R_x；-NR_x(CO)R_x；ここでR_xの出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

10

【0090】

本明細書に使用される用語「ヘテロ脂肪族」は、例えば炭素原子の代わりに、1以上の酸素、硫黄、窒素、リンまたはケイ素原子を含む脂肪族部分を指す。ヘテロ脂肪族部分は分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、モルホリノ、ピロリジニルなどの飽和および不飽和のヘテロ環を含んでもよい。ある態様において、ヘテロ脂肪族部分は、それ上にある1以上の水素原子の、下記を含むがこれらに限定はされない1以上の部分による独立した置き換えによって置換される：脂肪族；ヘテロ脂肪族；アリール；ヘテロアリール；アリールアルキル；ヘテロアリールアルキル；アルコキシ；アリールオキシ；ヘテロアルコキシ；ヘテロアリールオキシ；アルキルチオ；アリールチオ；ヘテロアルキルチオ；ヘテロアリールチオ；-F；-Cl；-Br；-I；-OH；-NO₂；-CN；-CF₃；-CH₂CF₃；-CHCl₂；-CH₂OH；-CH₂CH₂OH；-CH₂NH₂；-CH₂SO₂CH₃；-C(O)R_x；-CO₂(R_x)；-CON(R_x)₂；-OC(O)R_x；-OCO₂R_x；-OCON(R_x)₂；-N(R_x)₂；-S(O)₂R_x；-NR_x(CO)R_x；ここでR_xの出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

20

30

本明細書に使用される用語「ハロ」および「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素から選択される原子を指す。

40

【0091】

用語「アルキル」は、飽和脂肪族基を含み、これは、直鎖アルキル基（例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなど）、分枝鎖アルキル基（イソプロピル、tert-ブチル、イソブチルなど）、シクロアルキル（脂環式）基（シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル）、アルキル置換シクロアルキル基およびシクロアルキル置換アルキル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルキルは、6個以下（例えば直鎖についてはC₁~C₆、分枝鎖についてはC₃~C₆）、より好ましくは4個以下の炭素原子をその骨格中に有する。同様に、好ましいシクロアルキルは、3~8個の炭素原子をその環構造中に有し、より好ましくは5または6個の炭素を環構造中に有する。用語C

50

$C_1 \sim C_6$ は、1～6個の炭素原子を含むアルキル基を含有する。

【0092】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルキルは、「非置換のアルキル」および「置換アルキル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の1以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有する、アルキル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、およびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。シクロアルキルは、例えば上記の置換基により、さらに置換されてもよい。「アルキルアリール」または「アリールアルキル」部分は、アリールで置換されたアルキル（例えばフェニルメチル（ベンジル））である。用語「アルキル」はまた、天然または非天然のアミノ酸の側鎖をも含む。用語「n-アルキル」は、直鎖（すなわち、非分枝）の非置換のアルキル基を意味する。

10

20

【0093】

用語「アルケニル」は、上記のアルキルと長さが類似し、これと置換が可能な不飽和脂肪族基であるが、少なくとも1つの二重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルケニル」は、直鎖アルケニル基（例えばエチレニル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニルなど）、分枝鎖アルケニル基、シクロアルケニル（脂環式）基（シクロプロペニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニル）、アルキルまたはアルケニル置換シクロアルケニル基およびシクロアルキルまたはシクロアルケニル置換アルケニル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルケニル基は、6個以下の炭素原子をその骨格中に有する（例えば直鎖については $C_2 \sim C_6$ 、分枝鎖については $C_3 \sim C_6$ ）。同様に、シクロアルケニル基は、その環構造中に3～8個の炭素原子、より好ましくは環構造中に5または6個の炭素を有してもよい。用語 $C_2 \sim C_6$ は、2～6個の炭素原子を含むアルケニル基を含有する。

30

【0094】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルケニルは、「非置換のアルケニル」および「置換アルケニル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の1以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有する、アルケニル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルキル基、アルキニル基、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。

40

50

【0095】

用語「アルキニル」は、上記のアルキルと長さが類似し、これと置換が可能な不飽和脂肪族基であるが、少なくとも1つの三重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルキニル」は、直鎖アルキニル基（例えばエチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニニル、デシニルなど）、分枝鎖アルキニル基およびシクロアルキルまたはシクロアルケニル置換アルキニル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルキニル基は、6個以下の炭素原子をその骨格中に有する（例えば直鎖については $C_2 \sim C_6$ 、分枝鎖については $C_3 \sim C_6$ ）。用語 $C_2 \sim C_6$ は、2～6個の炭素原子を含むアルキニル基を含有する。

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルキニルは、「非置換のアルキニル」および「置換アルキニル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の1以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有するアルキニル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルキル基、アルキニル基、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。

【0096】

炭素の数が他に特定されない限りにおいて、「低級アルキル」は、本明細書に使用されるとおり、上で定義されるが、1～5個の炭素原子をその骨格構造中に有するアルキル基を意味する。「低級アルケニル」および「低級アルキニル」は、例えば2～5個の炭素原子の鎖長を有する。

用語「アルコキシ」は、酸素原子に共有結合している置換および非置換のアルキル、アルケニルおよびアルキニル基を含む。アルコキシ基の例は、メトキシ、エトキシ、イソプロピルオキシ、プロポキシ、ブトキシおよびペントキシ基を含む。置換アルコキシ基の例は、ハロゲン化アルコキシ基を含む。アルコキシ基は、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル（sulfydryl）、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル（alkylsulfmyl）、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分などの、独立して選択される基により置換されていてもよい。ハロゲン置換アルコキシ基の例は、これらに限定されないが、フルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、クロロメトキシ、ジクロロメトキシ、トリクロロメトキシなどを含む。

【0097】

用語「ヘテロ原子」は、炭素または水素以外のあらゆる元素の原子を含む。好ましいへ

10

20

30

40

50

テロ原子は、窒素、酸素、硫黄およびリンである。

用語「ヒドロキシ」または「ヒドロキシル」は、(適切なカウンターイオンとともに) -OH または -O- を持つ基を含む。

用語「ハロゲン」は、フッ素、臭素、塩素、ヨウ素などを含む。用語「過ハロゲン化」は一般に、全ての水素がハロゲン原子により置き換えられている部分を指す。

用語「置換される」は、当該部分に配置され得、当該分子がその意図する機能を行うことを可能にする、独立して選択される置換基を含む。置換基の例は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、 $(CR'R'')$ ₀₋₃NR'R''、 $(CR'R'')$ ₀₋₃CN、NO₂、ハロゲン、 $(CR'R'')$ ₀₋₃C(ハロゲン)₃、 $(CR'R'')$ ₀₋₃CH(ハロゲン)₂、 $(CR'R'')$ ₀₋₃CH₂(ハロゲン)、 $(CR'R'')$ ₀₋₃CONR'R''、 $(CR'R'')$ ₀₋₃S(O)₁₋₂NR'R''、 $(CR'R'')$ ₀₋₃CHO、 $(CR'R'')$ ₀₋₃O(CR'R'')₀₋₃H、 $(CR'R'')$ ₀₋₃S(O)₀₋₂R'、 $(CR'R'')$ ₀₋₃O(CR'R'')₀₋₃H、 $(CR'R'')$ ₀₋₃COR'、 $(CR'R'')$ ₀₋₃CO₂R'、または $(CR'R'')$ ₀₋₃OR'基；ここで各R'およびR''は、各々独立して、水素、C₁~C₅アルキル、C₂~C₅アルケニル、C₂~C₅アルキニルもしくはアリール基であるか、または、R'およびR''は、一緒になって、ベンジリデン基もしくは $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ 基である、を含む。

10

【0098】

用語「アミン」または「アミノ」は、窒素原子が少なくとも1個の炭素またはヘテロ原子に共有結合している化合物または部分を含む。用語「アルキルアミノ」は、窒素が少なくとも1つのさらなるアルキル基に結合している基および化合物を含む。用語「ジアルキルアミノ」は、窒素原子が、少なくとも2つの追加のアルキル基に結合している基を含む。

20

用語「エーテル」は、2個の異なる炭素原子またはヘテロ原子に結合した酸素を含有する化合物または部分を含む。例えば、この用語は、「アルコキシアリル」を含み、これは、別のアルキル基に共有結合した酸素原子に共有結合しているアルキル、アルケニルまたはアルキニル基を指す。

【0099】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」および「オリゴヌクレオチド」は、2以上のヌクレオチドのポリマーを指す。ポリヌクレオチドは、DNA、RNAまたはこれらの誘導体もしくは修飾バージョンであり得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドは、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格において修飾され得、例えば分子の安定性、そのハイブリダイゼーションパラメータなどが改善される。ポリヌクレオチドは、限定することなく以下を含む群から選択される修飾塩基部分を含んでもよい：5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルクエオシン(galactosylqueosine)、イノシン、N⁶-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁶-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデニン、ワイブトキシソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシルおよび2,6-ジアミノプリン。ポリヌ

30

40

50

クレオチドは、修飾糖部分（例えば2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、2'-O-メチルシチジン、アラビノースおよびヘキソース）および/または修飾リン酸部分（例えばホスホロチオアートおよび5'-N-ホスホロアミダイト結合）を含んでもよい。ヌクレオチド配列は典型的には、タンパク質および酵素を作るために細胞機構によって使用される情報を含む、遺伝情報を持つ。これらの用語は、二本鎖または一本鎖のゲノムおよびcDNA、RNA、あらゆる合成のおよび遺伝子操作のポリヌクレオチド、および、センスおよびアンチセンスポリヌクレオチドの両方を含む。これは、一本鎖および二本鎖分子、すなわちDNA-DNA、DNA-RNA、およびRNA-RNAハイブリッド、ならびに、アミノ酸骨格に塩基を抱合させることにより形成された「タンパク質核酸」(PNA)を含む。

10

【0100】

用語「塩基」は、知られているプリンおよびピリミジンヘテロ環式塩基、デアザプリンならびにそのアナログ（ヘテロ環置換アナログ、例えばアミノエトキシフェノキサジンを含む）、誘導体（例えば1-アルキル-、1-アルケニル-、ヘテロ芳香族-および1-アルキニル誘導体）および互変異性体を含む。プリンの例は、アデニン、グアニン、イノシン、ジアミノプリンおよびキサントシンならびにそのアナログ（例えば8-オキソ-N6-メチルアデニンまたは7-ジアザキサントシン）および誘導体を含む。ピリミジンは、例えばチミン、ウラシルおよびシトシンならびにそれらのアナログ（例えば5-メチルシトシン、5-メチルウラシル、5-(1-プロピニル)ウラシル、5-(1-プロピニル)シトシンおよび4,4-エタノシトシン)を含む。好適な塩基の他の例は、2-アミノピリジンおよびトリアジン類などの非プリンおよび非ピリミジニル塩基を含む。

20

【0101】

好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオモノマーは、RNAヌクレオチドである。別の好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオモノマーは、修飾RNAヌクレオチドである。よって、オリゴヌクレオチドは、修飾RNAヌクレオチドを含有する。

用語「ヌクレオシド」は、糖部分、好ましくはリボースまたはデオキシリボースに共有結合した塩基を含む。好ましいヌクレオシドの例は、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドを含む。ヌクレオシドはまた、遊離カルボキシル基、遊離アミノ基または保護基を含んでもよいアミノ酸またはアミノ酸アナログに連結した塩基をも含む。好適な保護基は当該技術分野において周知である（P. G. M. WutsおよびT. W. Greene、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第2版、Wiley-Interscience、New York、1999年を参照）。

30

用語「ヌクレオチド」は、ホスファート基またはホスファートアナログをさらに含むヌクレオシドを含む。

【0102】

核酸分子は、分子の細胞への標的化および/または送達のために、疎水性部分と結びついてよい。ある態様において、疎水性部分はリンカーを介して核酸分子と結びつく。ある態様において、結びつきは非共有結合性相互作用を介する。他の態様において、結びつきは共有結合を介する。当該技術分野において知られているいずれのリンカーも、核酸を疎水性部分に結びつけるために使用されてもよい。当該技術分野において知られているリンカーは、公開された国際PCT出願：WO92/03464、WO95/23162、WO2008/021157、WO2009/021157、WO2009/134487、WO2009/126933、米国特許出願公開第2005/0107325号、米国特許第5,414,077号、米国特許第5,419,966号、米国特許第5,512,667号、米国特許第5,646,126号および米国特許第5,652,359号に記載されており、これらは本明細書に参照により組み込まれる。リンカーは、多原子リンカーに対する共有結合程度に単純であってもよい。リンカーは環式または非環式であってもよい。リンカーは、任意に置換されていてもよい。ある態様において、リンカーは核酸から切断されることができる。ある態様において、リンカーは、生理学的条件下で加水分解されることができる。ある態様において、リンカーは、酵素（例えばエステラーゼまたはホスホジエステラーゼ）により切断されることがで

40

50

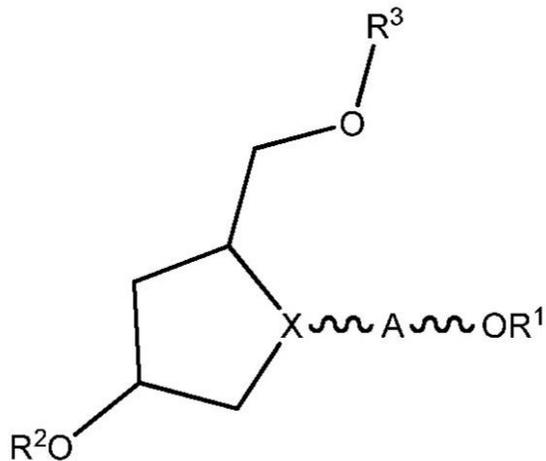
きる。ある態様において、リンカーは、核酸を疎水性部分から分離するスペーサー要素を含む。スペーサー要素は1～30個の炭素またはヘテロ原子を含んでもよい。ある態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素はプロトン化可能な官能基を含む。かかるプロトン化可能な官能基は、核酸分子のエンドソーム脱出を促進してもよい。プロトン化可能な官能基はまた、核酸の細胞への送達を支援することもでき、例えば分子の全体の電荷を中性化する。他の態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素は、生物学的に不活性である（すなわち、もたらされる核酸分子に対して生物学的活性または機能を付与しない）。

【0103】

ある態様において、リンカーおよび疎水性部分を持つ核酸分子は、本明細書に記載された式のものである。ある態様において、核酸分子は、式：

10

【化1】



20

式中、

Xは、NまたはCHであり；

Aは、結合；置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

30

R¹は、疎水性部分であり；

R²は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

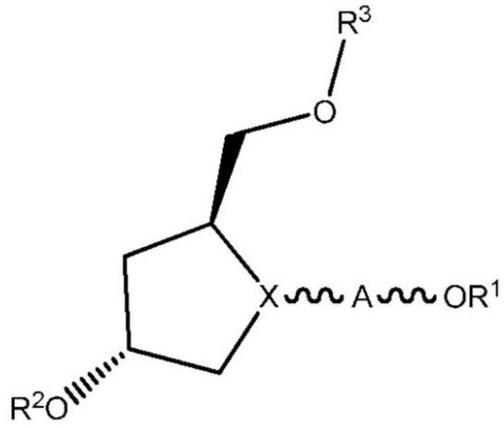
R³は、核酸である、

で表される。

【0104】

ある態様において、分子は、式：

【化2】



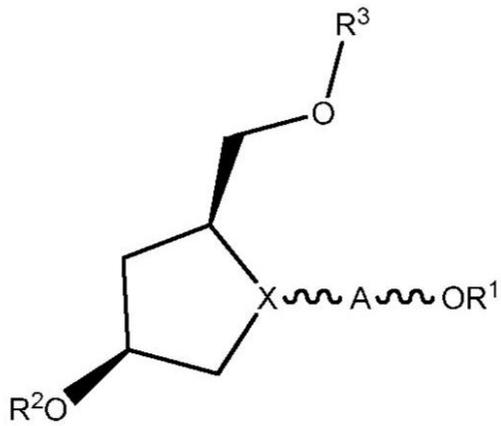
10

で表される。

【0105】

ある態様において、分子は、式：

【化3】



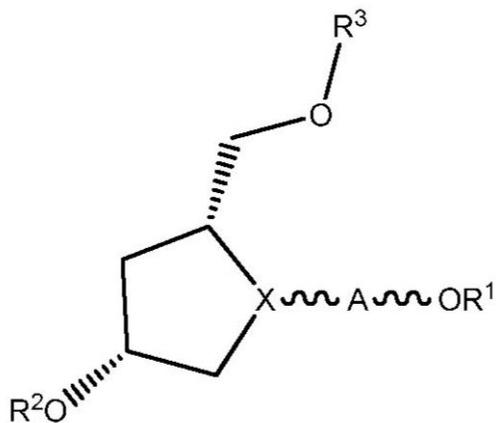
20

で表される。

【0106】

ある態様において、分子は、式：

【化4】



40

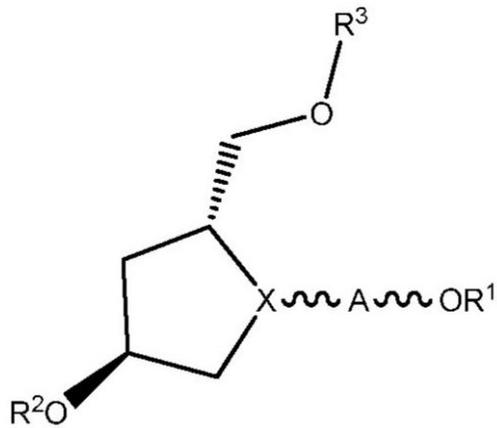
で表される。

【0107】

50

ある態様において、分子は、式：

【化 5】



10

で表される。

【0108】

ある態様において、XはNである。ある態様において、XはCHである。

ある態様において、Aは結合である。ある態様において、Aは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のアルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ - 20アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ - 12アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ - 10アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ - 8アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ - 6アルキルである。ある態様において、Aは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のヘテロ脂肪族である。

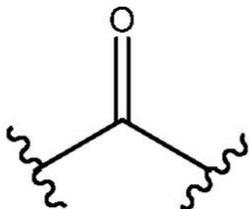
20

30

【0109】

ある態様において、Aは、式：

【化 6】



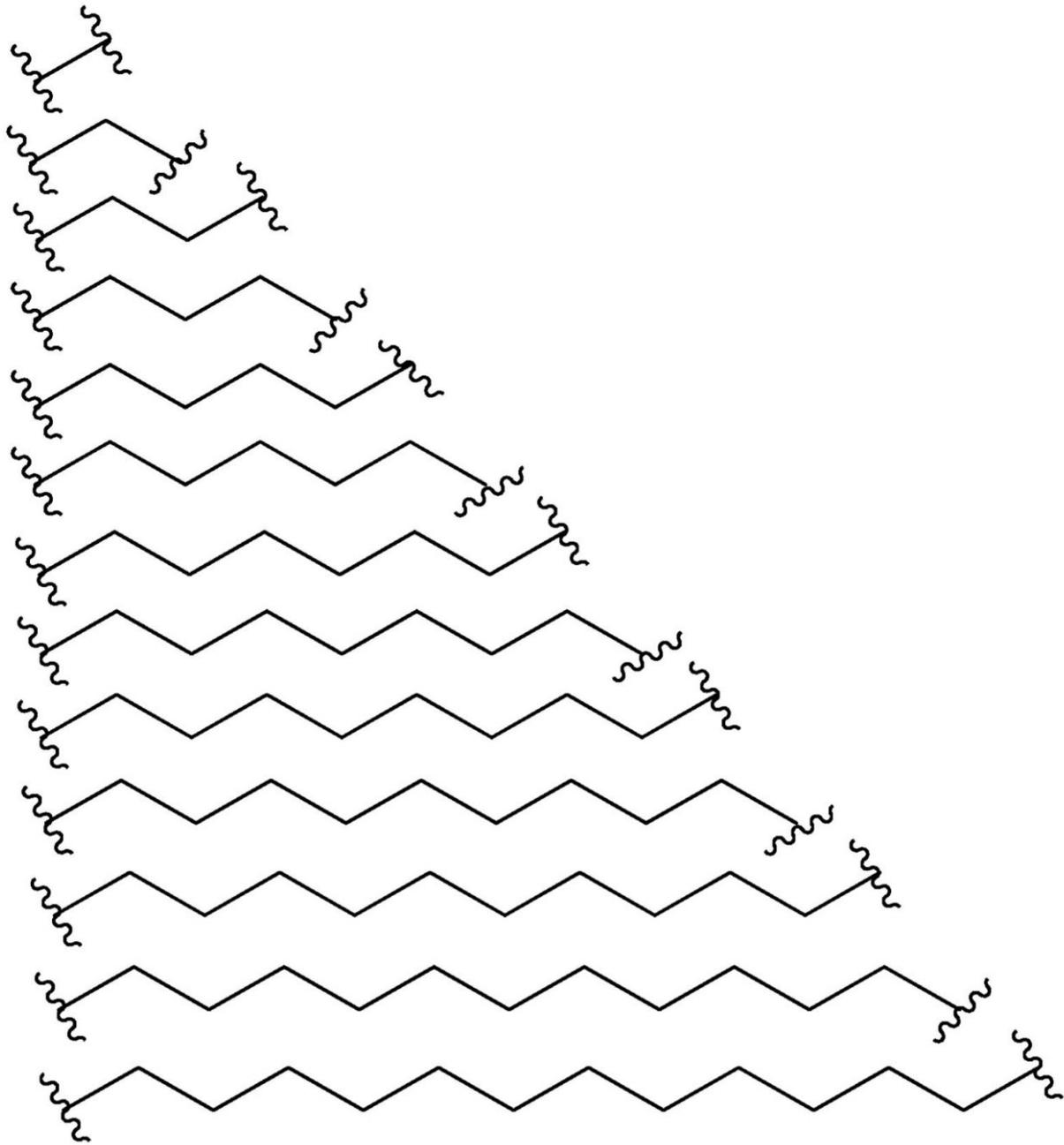
40

で表される。

【0110】

ある態様において、Aは、式：

【化7】

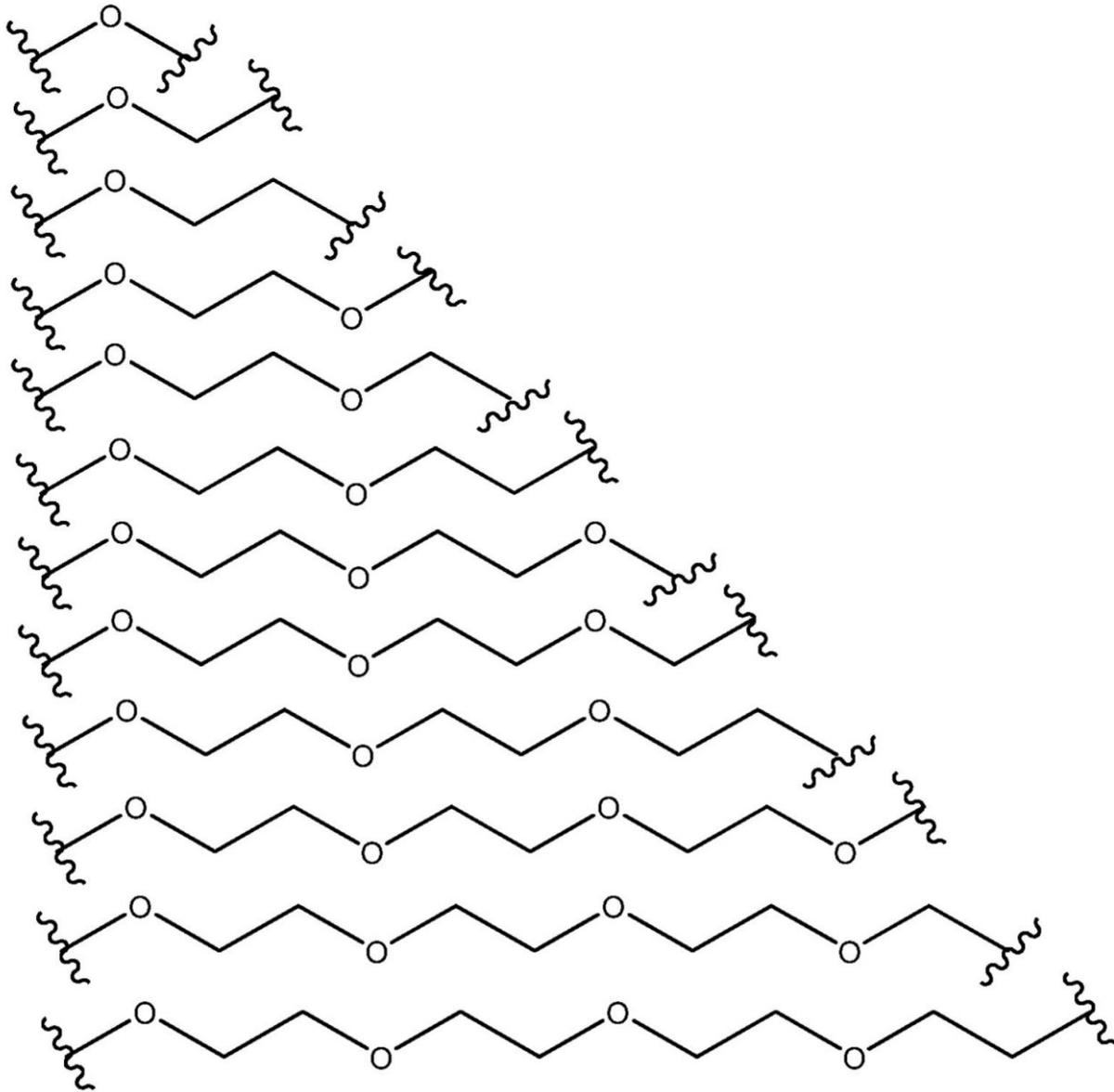


の1つで表される。

【0111】

ある態様において、Aは、式：

【化 8】



10

20

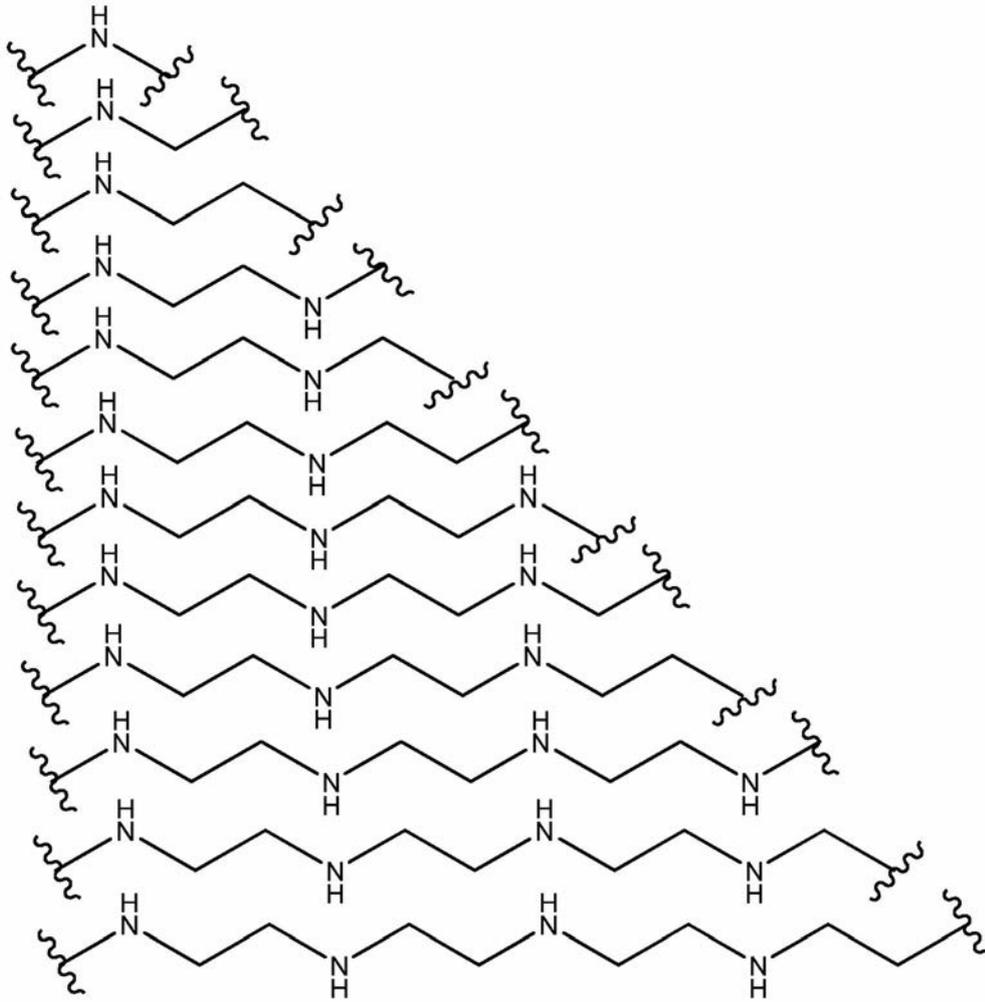
30

の 1 つで表される。

【 0 1 1 2】

ある態様において、A は、式：

【化 9】



10

20

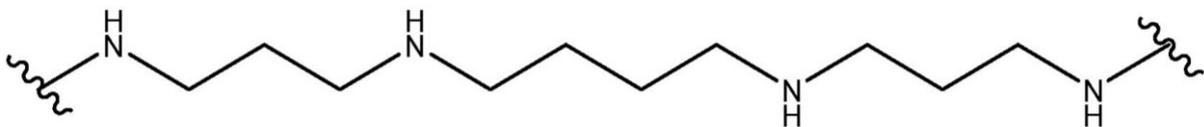
30

の 1 つで表される。

【 0 1 1 3 】

ある態様において、A は、式：

【化 1 0】



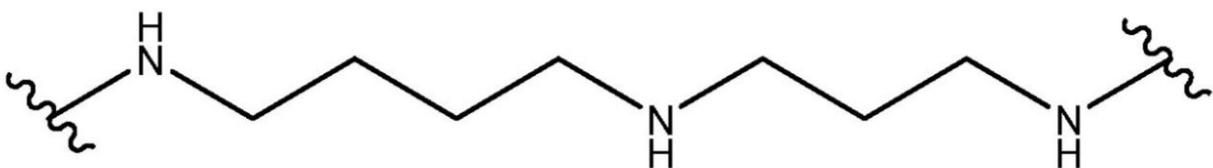
40

で表される。

【 0 1 1 4 】

ある態様において、A は、式：

【化 1 1】



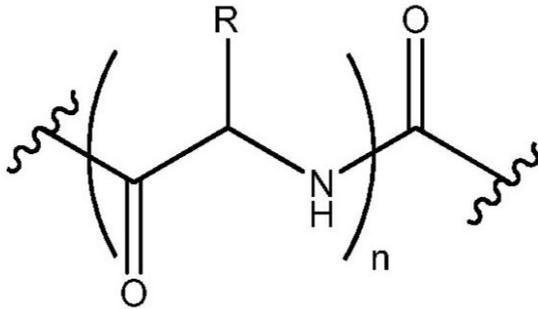
50

で表される。

【0115】

ある態様において、Aは、式：

【化12】



10

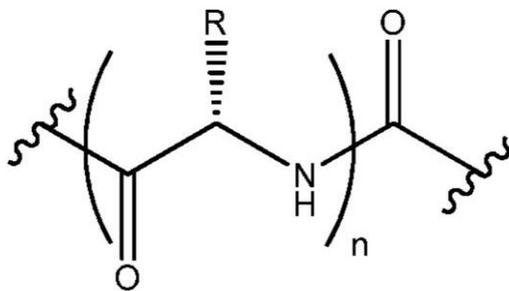
式中、

Rの出現の各々は、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；およびnは、1から20までの整数である（境界を含む）、
で表される。

【0116】

ある態様において、Aは、式：

【化13】



20

30

で表される。

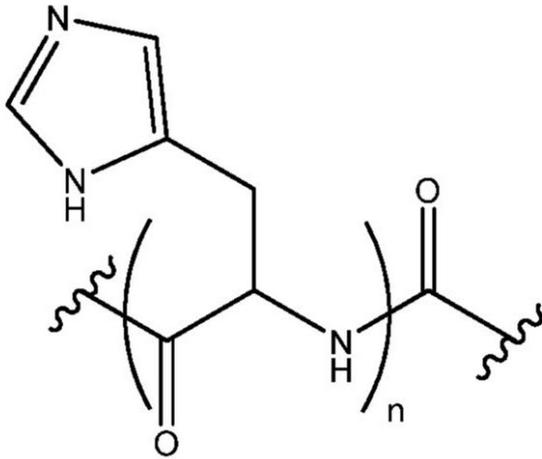
【0117】

ある態様において、Rの出現の各々は、独立して、天然のアミノ酸の側鎖である。ある態様において、nは、1から15までの整数である（境界を含む）。ある態様において、nは、1から10までの整数である（境界を含む）。ある態様において、nは、1から5までの整数である（境界を含む）。

【0118】

ある態様において、Aは、式：

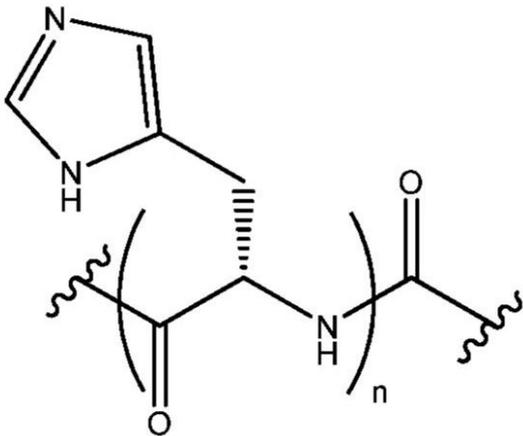
【化 1 4】



10

式中、 n は、1から20までの整数である（境界を含む）、
で表される。ある態様において、 A は、式：

【化 1 5】



20

30

で表される。

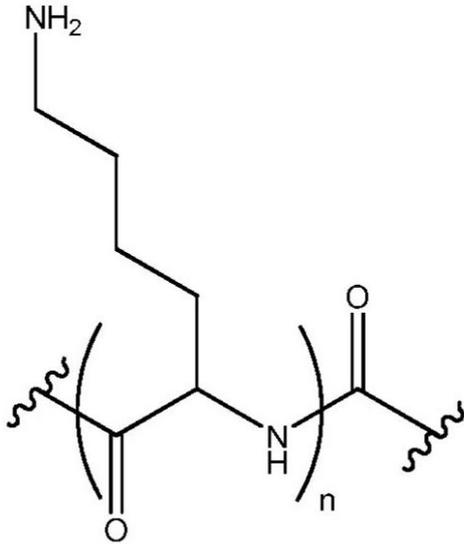
【0119】

ある態様において、 n は、1から15までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 n は、1から10までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 n は、1から5までの整数である（境界を含む）。

【0120】

ある態様において、 A は、式：

【化 1 6】



10

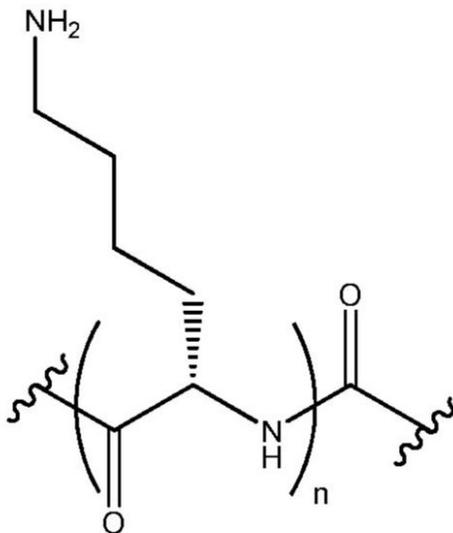
式中、 n は、1から20までの整数である（境界を含む）、
で表される。

【0121】

20

ある態様において、 A は、式：

【化 1 7】



30

で表される。

【0122】

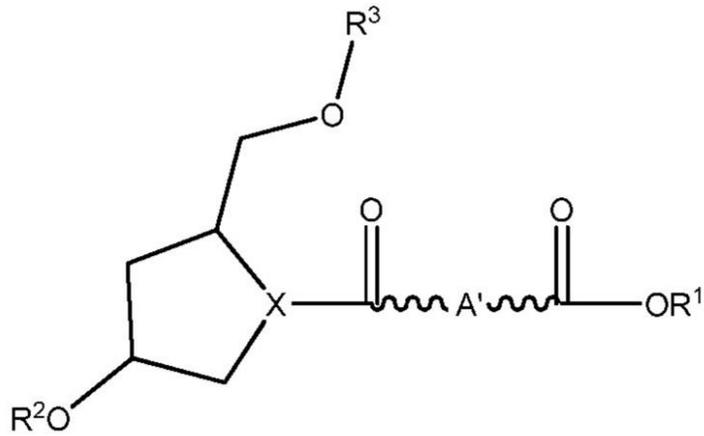
40

ある態様において、 n は、1から15までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 n は、1から10までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 n は、1から5までの整数である（境界を含む）。

【0123】

ある態様において、分子は、式：

【化 1 8】



10

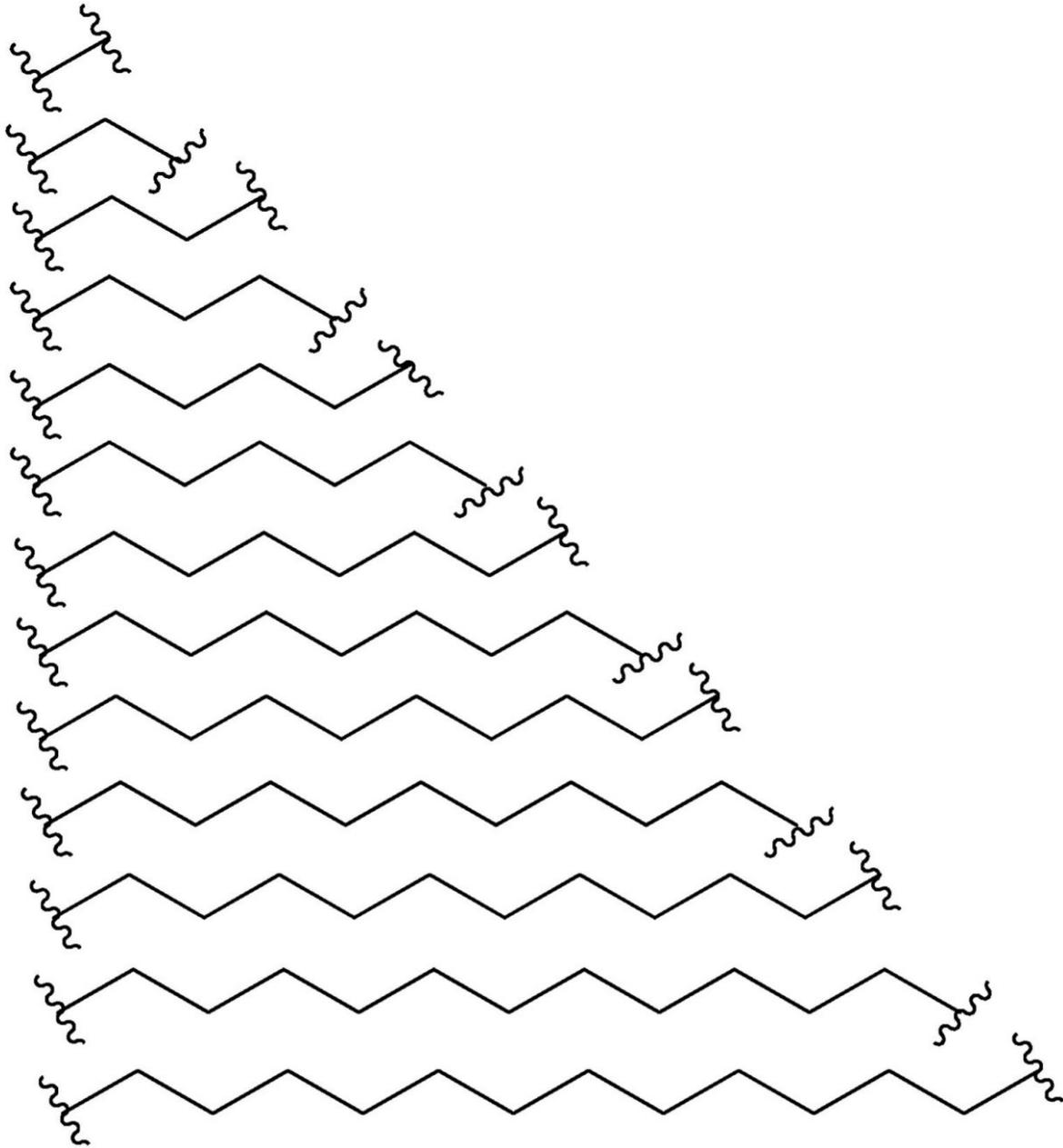
式中、 X 、 R^1 、 R^2 および R^3 は、本明細書に定義された通りであり；および A' は、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族であるか；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である、で表される。

【0 1 2 4】

ある態様において、 A' は、式：

20

【化 1 9】



10

20

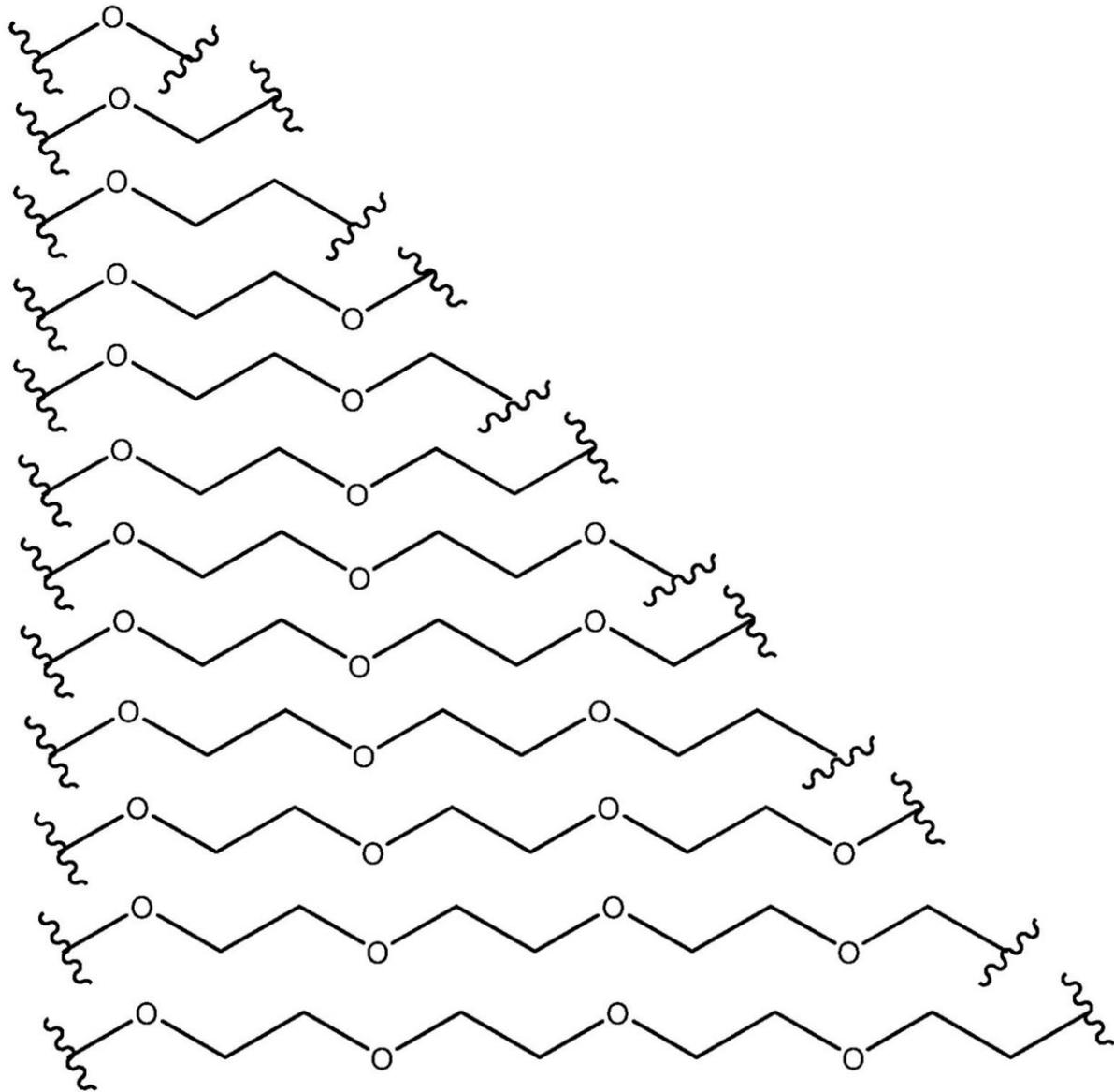
30

の 1 つで表される。

【 0 1 2 5】

ある態様において、A は、式：

【化 2 0】

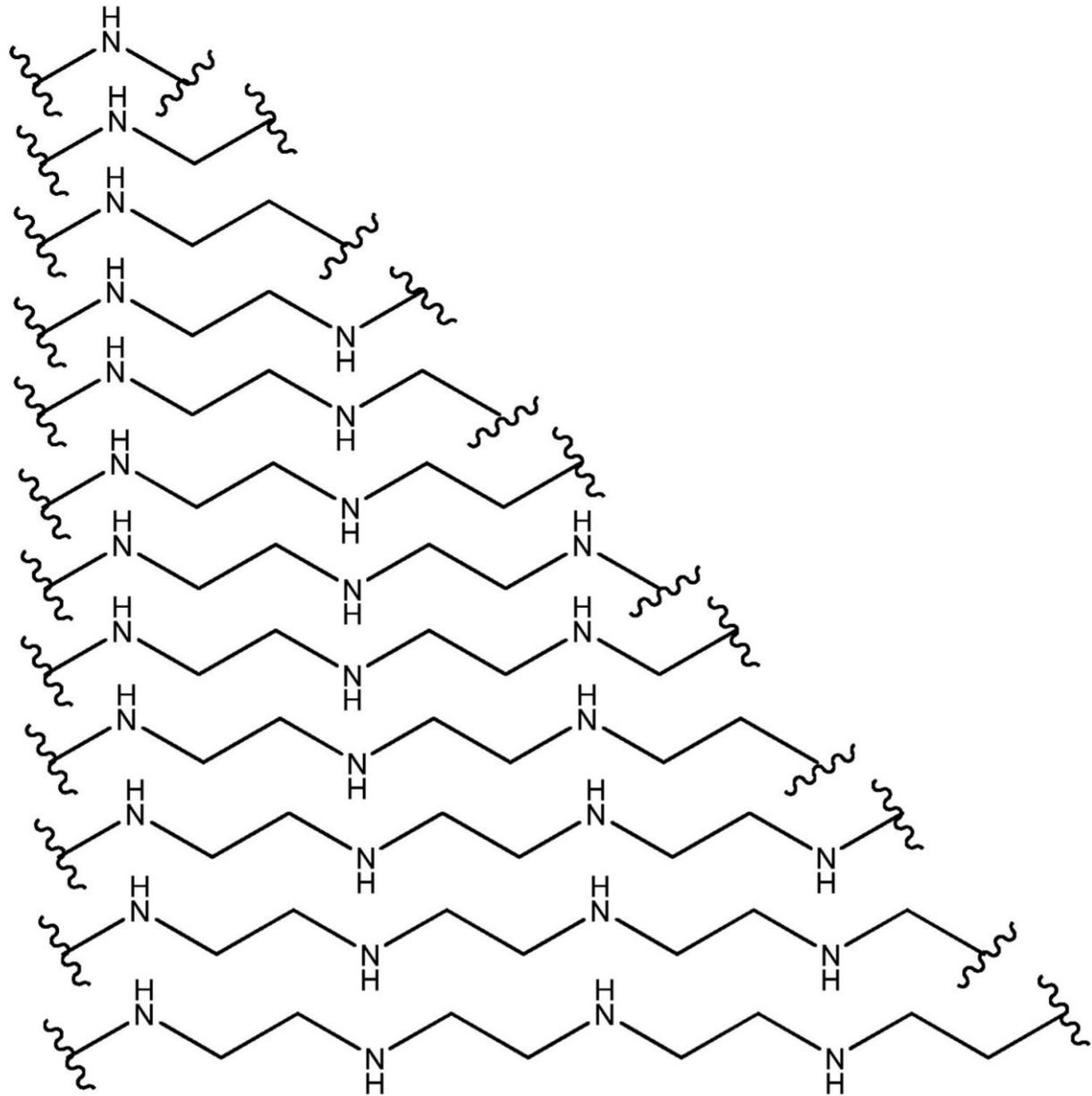


の 1 つで表される。

【 0 1 2 6】

ある態様において、A は、式：

【化 2 1】



10

20

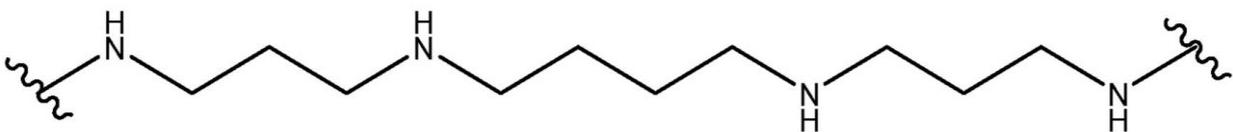
30

の 1 つで表される。

【 0 1 2 7】

ある態様において、A は、式：

【化 2 2】



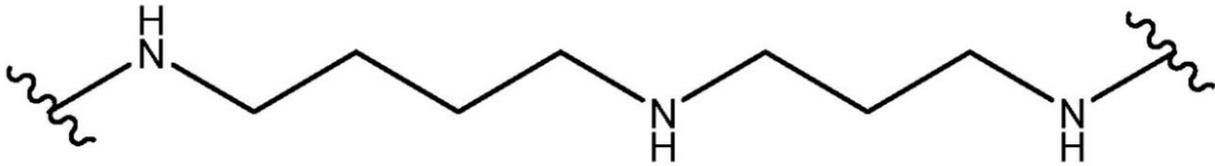
40

で表される。

【 0 1 2 8】

ある態様において、A は、式：

【化23】



で表される。

【0129】

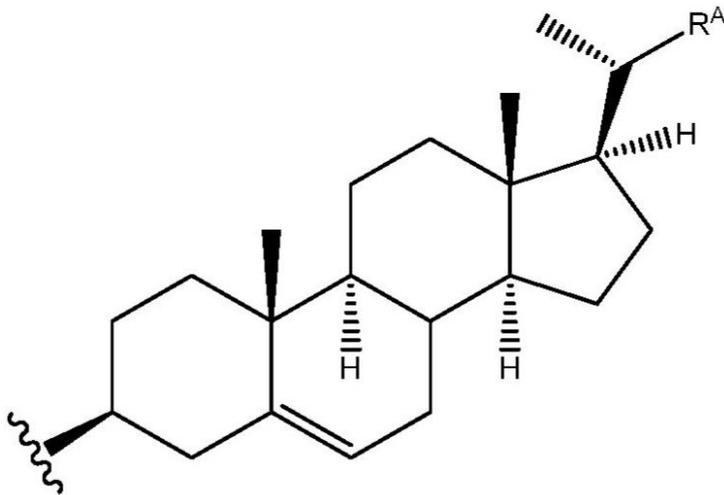
ある態様において、 R^1 はステロイドである。ある態様において、 R^1 はコレステロールである。ある態様において、 R^1 は親油性ビタミンである。ある態様において、 R^1 はビタミンAである。ある態様において、 R^1 はビタミンEである。

10

【0130】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化24】



20

30

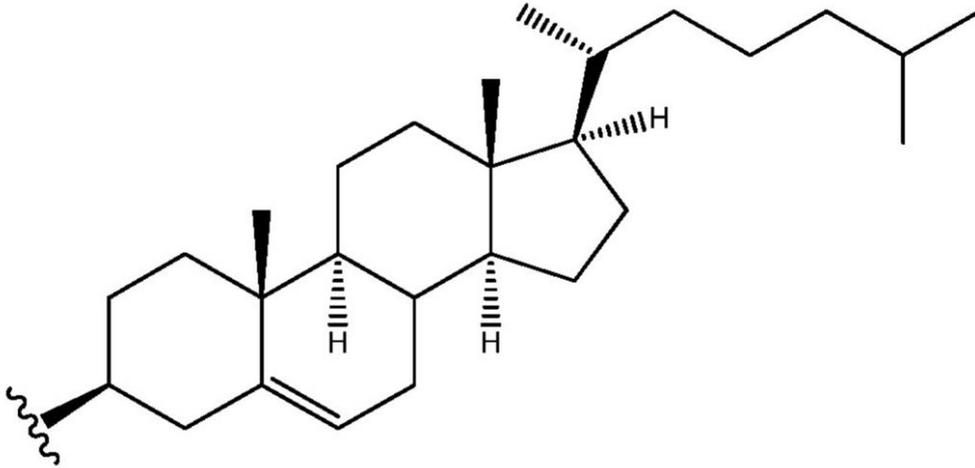
式中、 R^A は、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族であるか；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である、

で表される。

【0131】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 5】



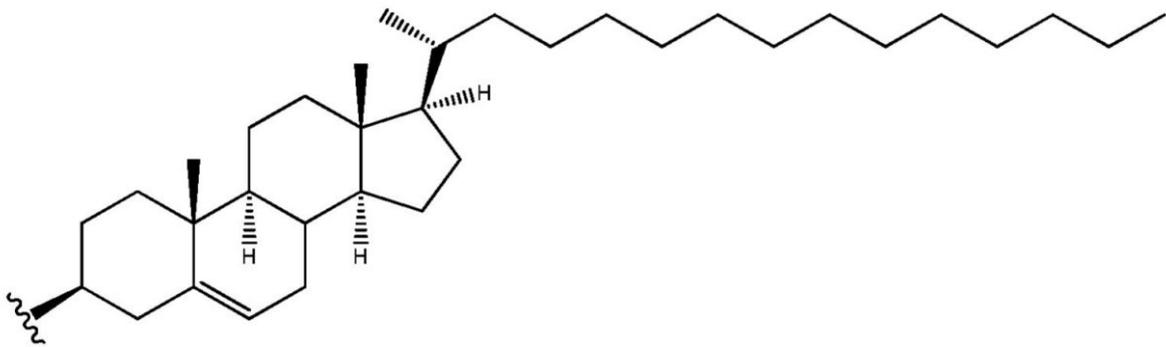
10

で表される。

【0132】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 6】



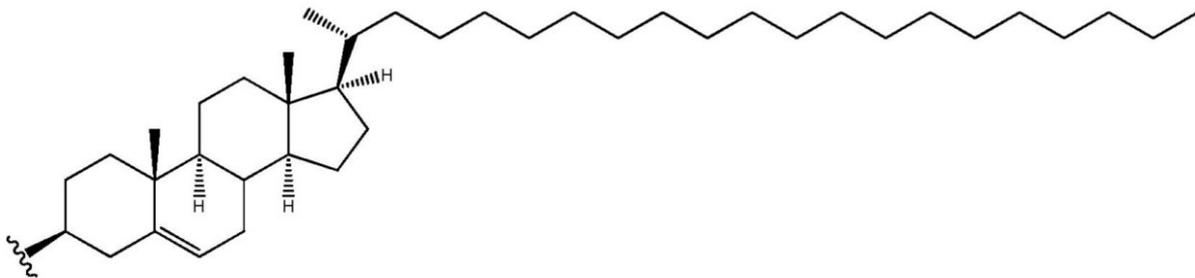
20

で表される。

【0133】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 7】



30

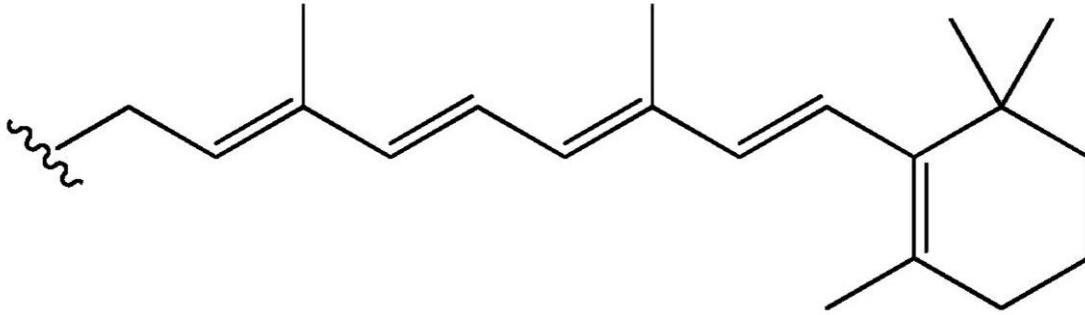
40

で表される。

【0134】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 8】



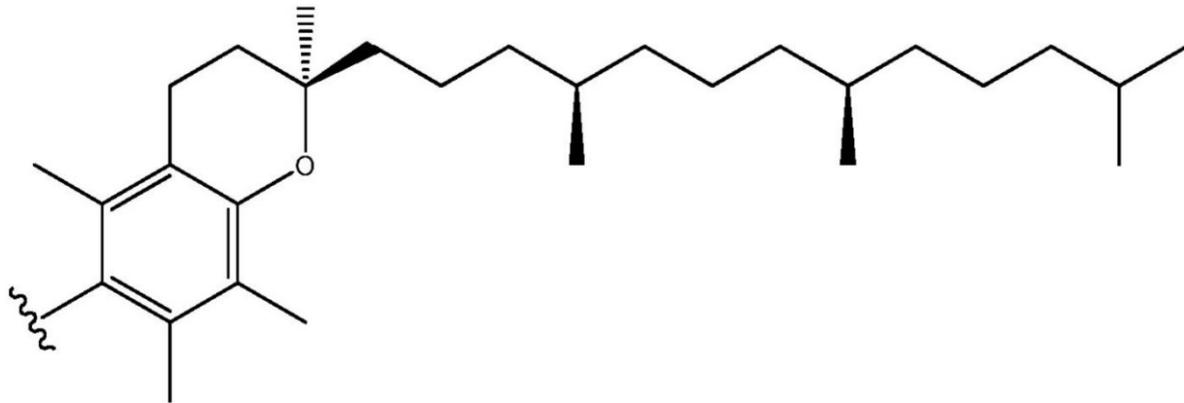
10

で表される。

【 0 1 3 5】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 9】



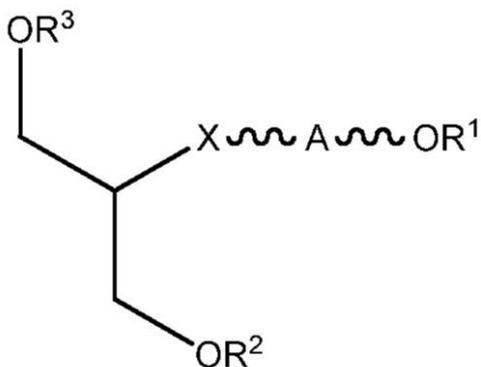
20

で表される。

【 0 1 3 6】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 0】



40

式中

 X は、 N または CH であり；

A は、結合；置換または非置換の、環式または非環式の、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換の、環式または非環式の、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

 R^1 は、疎水性部分であり； R^2 は、水素；酸素保護基；環式または非環式の、置換または非置換の、分枝または非

50

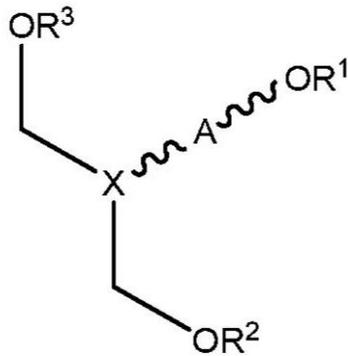
分枝の脂肪族；環式または非環式の、置換または非置換の、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換の、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換の、分枝もしくは非分枝のアリール；置換または非置換の、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

R³ は、核酸である、
で表される。

【0137】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化31】



10

20

式中、

X は、N または CH であり；

A は、結合；置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

R¹ は、疎水性部分であり；

R² は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

R³ は、核酸である、

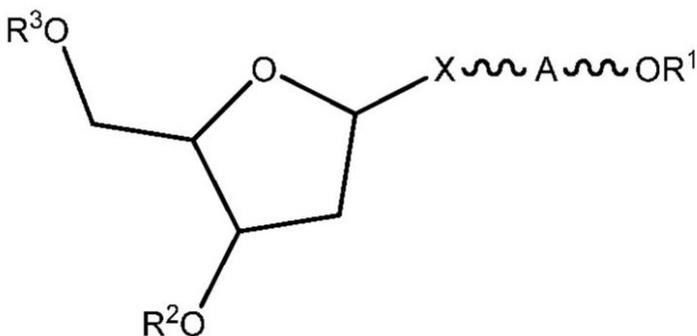
30

で表される。

【0138】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化32】



40

式中、

X は、N または CH であり；

A は、結合；置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

R¹ は、疎水性部分であり；

50

R² は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

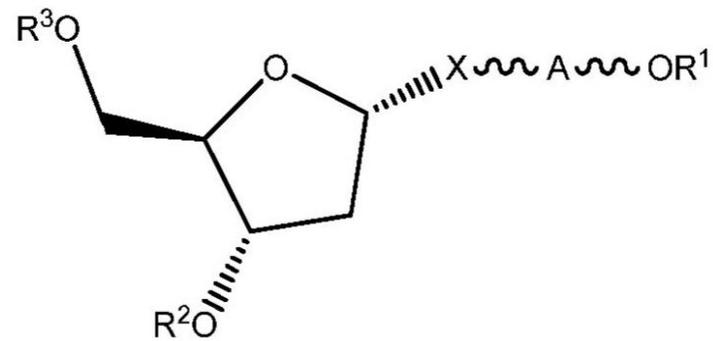
R³ は、核酸である、

で表される。

【0139】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化33】



10

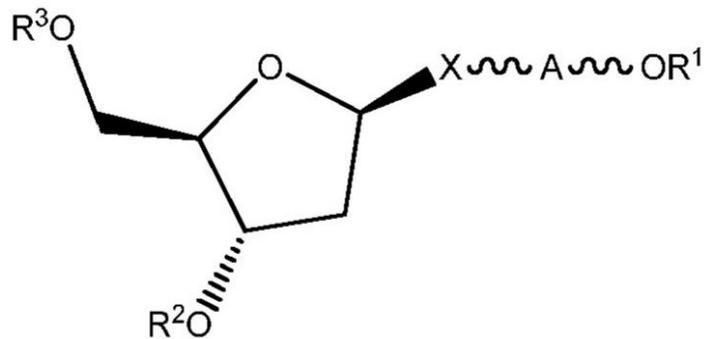
20

で表される。

【0140】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化34】



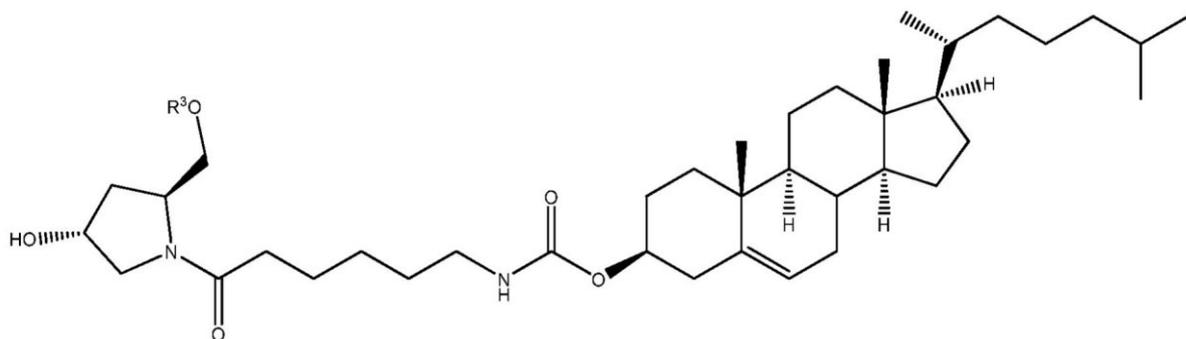
30

で表される。

【0141】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化35】



40

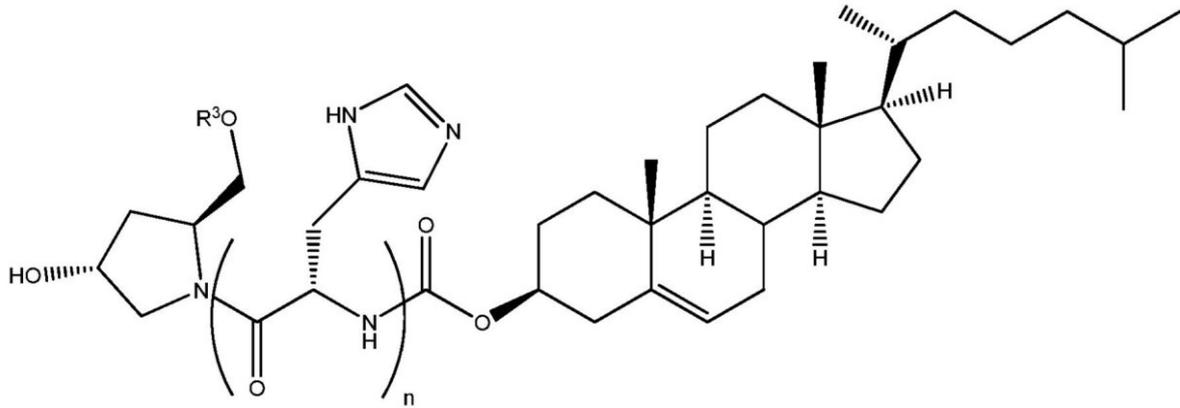
50

式中、 R^3 は、核酸である、
で表される。

【0142】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化36】



10

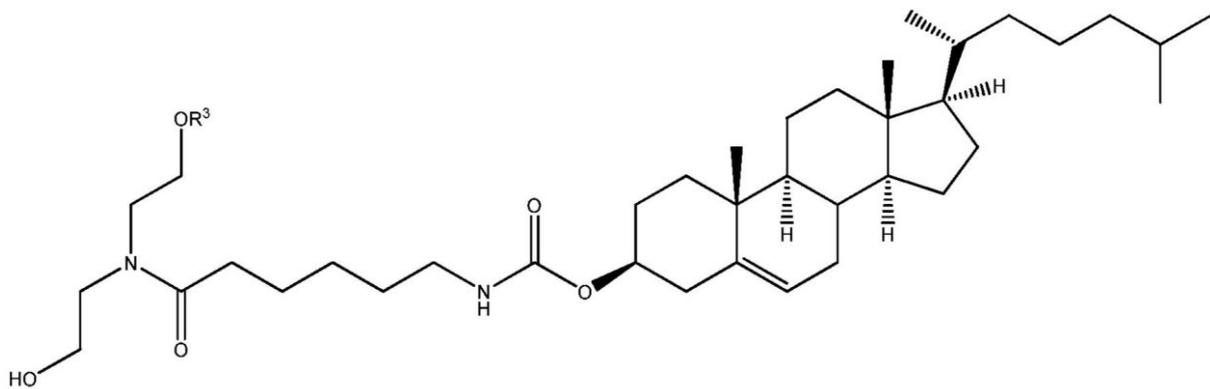
式中、 R^3 は、核酸であり；および
 n は、1 から 20 までの整数（境界を含む）である。
で表される。

20

【0143】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化37】



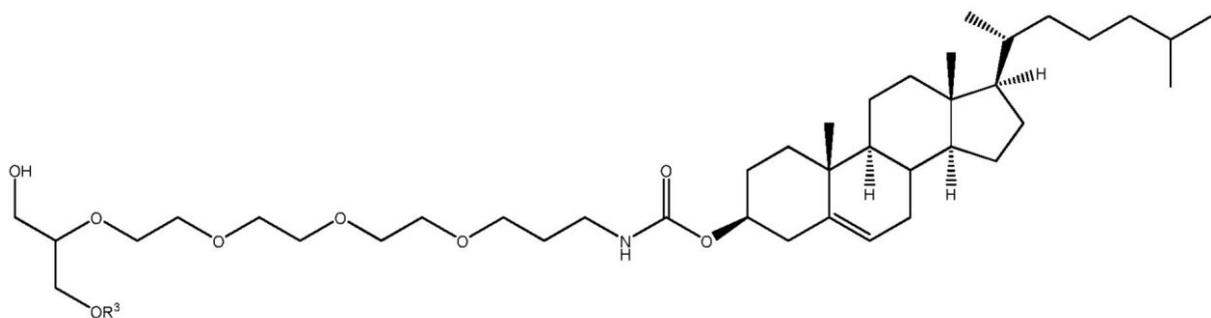
30

で表される。

【0144】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化38】



40

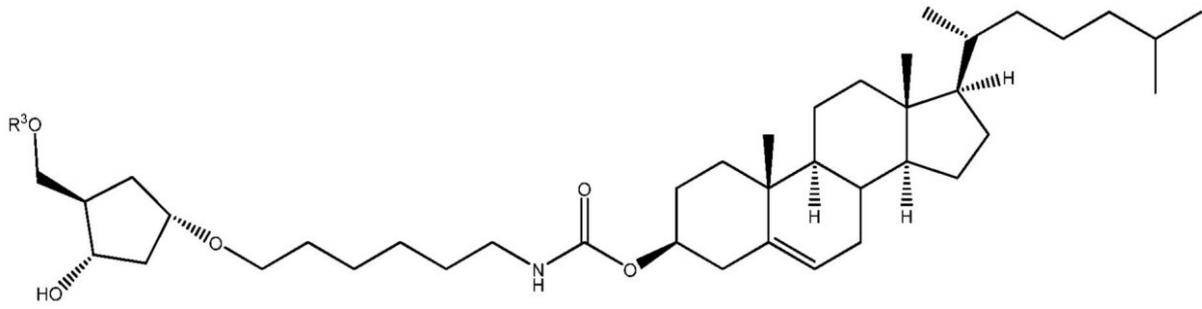
で表される。

50

【0145】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化39】



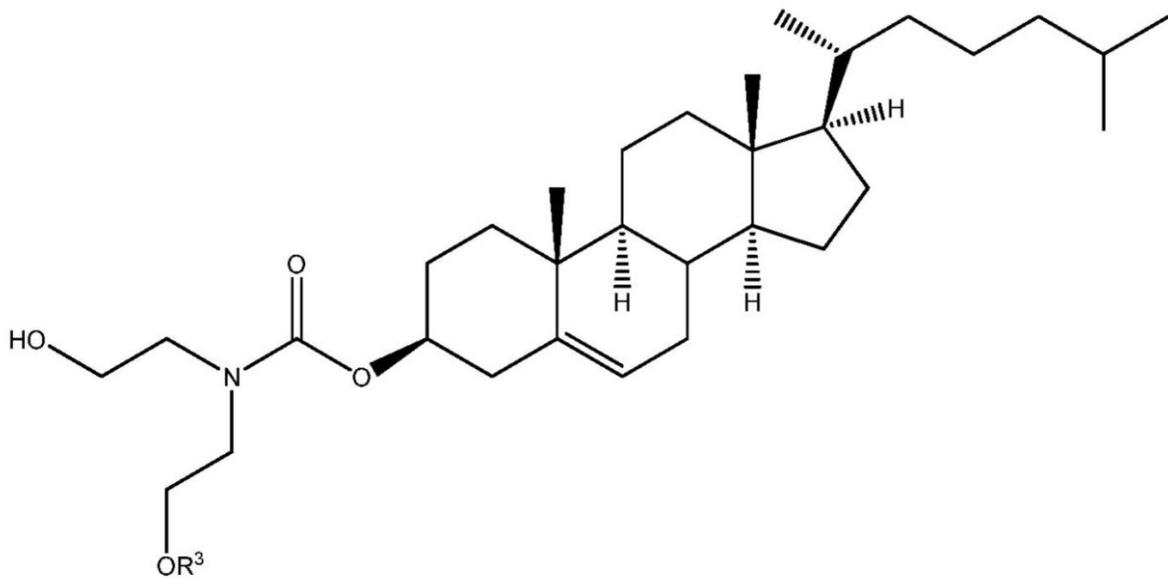
10

で表される。

【0146】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化40】



20

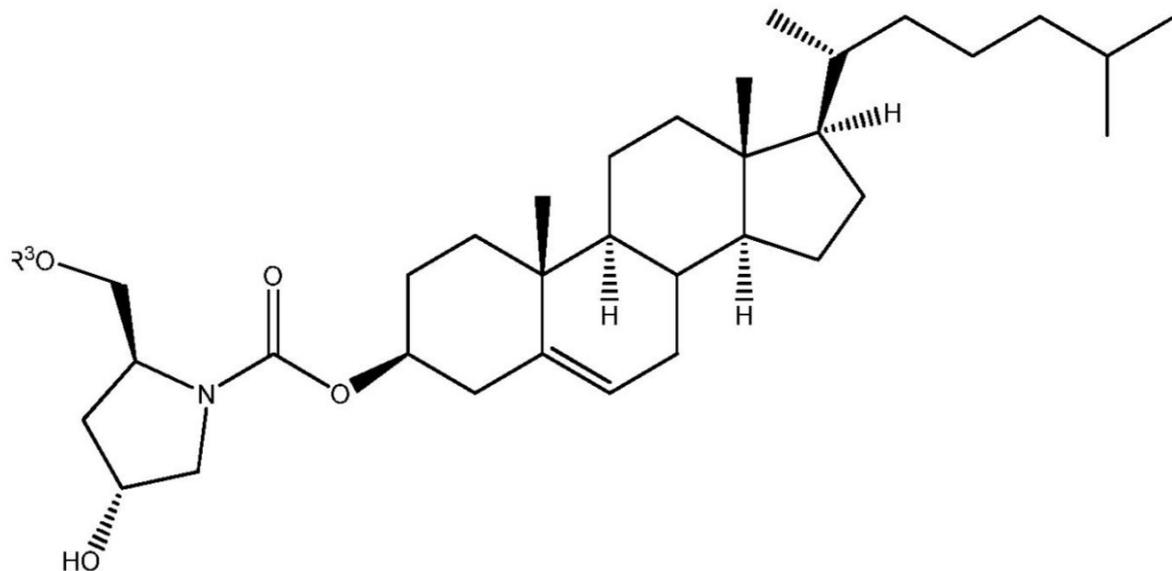
30

で表される。

【0147】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 4 1】



10

で表される。

20

【0148】

本明細書に使用される用語「連結部 (linkage)」は、天然に存在する、隣接するヌクレオモノマーに共有結合する未修飾ホスホジエステル部分 (-O-(P O²⁻)-O-) を含む。本明細書に使用される用語「置換連結部 (substitute linkage)」は、ネイティブなホスホジエステル基の、隣接するヌクレオモノマーに共有結合するあらゆるアナログまたは誘導体を含む。置換連結部は、ホスホジエステルアナログ、例えばホスホロチオアート、ホスホロジチオアートおよび P - エチオキシホスホジエステル (P-ethoxyphosphodiester)、P - エトキシホスホジエステル、P - アルキルオキシホスホジエステル、メチルホスホナートおよびリンを含有しない結合、例えばアセタールおよびアミドを含む。かかる置換連結部は、当該技術分野において知られている (例えば Bjergarde et al. 1991. Nucleic Acids Res. 19:5843; Caruthers et al. 1991. Nucleosides Nucleotides. 10:47)。ある態様において、ホスホロチオアート連結部などの非加水分解性連結部が好ましい。

30

【0149】

ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、疎水的に修飾されたヌクレオチドまたは「疎水性修飾」を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾」は、(1) 塩基の全体的な疎水性が著しく増大し、および/または、(2) 塩基がなお通常のワトソン-クリック相互作用に類似するものを形成することができるように修飾された塩基を指す。いくつかの非限定的な塩基修飾の例は、5位のウリジンおよびシチジン修飾、例えばフェニル、4-ピリジル、2-ピリジル、インドリル、および、イソブチル、フェニル (C₆H₅OH); トリプトファン (C₈H₆N)CH₂CH(NH₂)CO)、イソブチル、ブチル、アミノベンジル; フェニル; およびナフチルを含む。

40

末端 (3' または 5' 末端)、ループ領域または s d - r x RNA の他のいずれ部分にも付着し得る別の型の抱合体は、ステロール、ステロール型分子、ペプチド、低分子、タンパク質などを含む。いくつかの態様において、s d - r x RNA は、1つより多い抱合体 (同じまたは異なる化学的性質のもの) を含んでもよい。いくつかの態様において、抱合体は、コレステロールである。

【0150】

標的遺伝子特異性を増大させるかまたはオフ・ターゲットサイレンシング作用を低減するための別の方法は、ガイド配列の 5' 末端の 2 番目のヌクレオチドに対応する位置にて

50

、2'修飾(2'-O-メチル修飾など)を導入することである。本発明のアンチセンス(ガイド)配列は、RNA様およびDNA様の領域を含む「キメラオリゴヌクレオチド」であり得る。

語「RNase H活性化領域」は、オリゴヌクレオチド、例えばキメラオリゴヌクレオチドの、当該オリゴヌクレオチドが結合する標的RNA鎖を切断するRNase Hを動員することができる領域を含む。典型的には、RNase H活性化領域は、DNAまたはDNA様ヌクレオモノマーの(少なくとも約3~5、典型的には約3~12、より典型的には約5~12、より好ましくは約5~10の、連続したヌクレオモノマーの)最小コアを含む(例えば米国特許第5,849,902号を参照)。好ましくは、RNase H活性化領域は、約9個の連続したデオキシリボース含有ヌクレオモノマーを含む。

10

【0151】

語「非活性化領域」は、アンチセンス配列、例えばキメラオリゴヌクレオチドの領域であって、RNase Hを動員または活性化しないものを含む。好ましくは、非活性化領域は、ホスホロチオアートDNAを含まない。本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの非活性化領域を含む。一態様において、非活性化領域は、ヌクレアーゼに対して安定であることができるか、または、標的に対して相補的であることおよびオリゴヌクレオチドにより結合される標的核酸分子と水素結合を形成することにより、標的に対する特異性を提供し得る。

一態様において、連続したポリヌクレオチドの少なくとも一部は、置換連結部、例えばホスホロチオアート連結部により連結されている。

20

ある態様において、ガイド配列を超えるヌクレオチドの殆どまたは全ては(2'修飾されていようがいまいが)ホスホロチオアート連結部により連結されている。かかるコンストラクトは、その血清タンパク質に対するより高いアフィニティーに起因して、薬物動態が改善されている傾向がある。ポリヌクレオチドの非ガイド配列部分におけるホスホロチオアート連結部は一般に、一旦ガイド鎖がRISCにロードされた後は、ガイド鎖の活性に干渉しない。いくつかの態様において、高レベルのホスホロチオアート修飾が送達の改善をもたらし得る。いくつかの態様において、ガイドおよびノッパセンジャー鎖は、完全にホスホロチオアート化されている。

【0152】

本発明のアンチセンス(ガイド)配列は、「モルホリノオリゴヌクレオチド」を含んでもよい。モルホリノオリゴヌクレオチドは非イオン性であり、RNase H非依存的機構により機能する。モルホリノオリゴヌクレオチドの4つの遺伝子塩基(アデニン、シトシン、グアニンおよびチミン/ウラシル)は、6員のモルホリン環に連結されている。モルホリノオリゴヌクレオチドは、例えば非イオン性ホスホロジアミダート(phosphorodiamidate)サブユニット間連結部によって、4つの異なるサブユニット型を結合することにより作られる。モルホリノオリゴヌクレオチドは、以下を含む多数の利点を有する:ヌクレアーゼに対する完全な耐性(Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1996. 6:267);予測可能な標的化(Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141);細胞における確実な活性(Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:63);優れた配列特異性(Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:151);最小限の非アンチセンス活性(Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141);および簡便な浸透圧または搔爬による送達(Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:291)。モルホリノオリゴヌクレオチドはまた、高用量におけるその非毒性のために好ましい。モルホリノオリゴヌクレオチドの調製の議論は、Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:187において見出され得る。

30

40

【0153】

本明細書に記載の化学修飾は、本明細書に記載のデータに基づき、一本鎖ポリヌクレオチドのRISC中へのローディングを促進すると考えられる。一本鎖ポリヌクレオチドは、RISC中へのローディングおよび遺伝子サイレンシングの誘導において活性であることが示されている。しかしながら、一本鎖ポリヌクレオチドについての活性のレベルは、デュプレックスポリヌクレオチドと比較したとき、2~4桁の規模でより低いと考えられ

50

る。

本発明は、(a)一本鎖ポリヌクレオチドの安定性を著しく増大し、(b)ポリヌクレオチドのRISC複合体への効率的なローディングを促進し、および(c)一本鎖ヌクレオチドの細胞による取り込みを改善する、化学修飾パターンの説明を提供する。化学修飾パターンは、リボース修飾、骨格修飾、疎水性ヌクレオシド修飾と、抱合体型修飾との組み合わせを含んでもよい。加えて、態様のいくつかにおいて、単一のポリヌクレオチドの5'末端は、化学的にリン酸化されていてもよい。

【0154】

さらに別の態様において、本発明は、RISC阻害性ポリヌクレオチドの機能を改善する化学修飾パターンの説明を提供する。一本鎖ポリヌクレオチドは、基質競合機構を通して、予めロードされたRISC複合体の活性を阻害することが示されている。通常アンタゴマー(antagomer)と称されるこれらの型の分子について、活性には、通常、高濃度が必要であり、in vivoでの送達はあまり効果的ではない。本発明は、(a)一本鎖ポリヌクレオチドの安定性を著しく増大し、(b)RISCによるポリヌクレオチドの基質としての効率的な認識を促進し、および/または、(c)細胞による一本鎖ヌクレオチドの取り込みを改善する、化学修飾パターンの説明を提供する。化学修飾パターンは、リボース修飾、骨格修飾、疎水性ヌクレオシド修飾と、抱合体型修飾との組合せを含んでもよい。

10

本発明により提供される修飾は、全てのポリヌクレオチドに対して適用可能である。これは、一本鎖RISC侵入性ポリヌクレオチド、一本鎖RISC阻害性ポリヌクレオチド、多様な長さ(15~40bp)の従来のデュプレックス化ポリヌクレオチド、非対称性デュプレックス化ポリヌクレオチドなどを含む。ポリヌクレオチドは、5'末端修飾、リボース修飾、骨格修飾および疎水性ヌクレオシド修飾を含む、多様な化学修飾パターンにより修飾されていてもよい。

20

【0155】

合成

本発明のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において知られているいずれの方法によっても、例えば酵素による合成および/または化学合成を使用して、合成され得る。オリゴヌクレオチドは、in vitroで(例えば酵素による合成および化学合成を使用して)、またはin vivoで(当該技術分野において周知の組み換えDNA技術を使用して)合成され得る。

30

好ましい態様において、化学合成は、修飾ポリヌクレオチドのために使用される。直鎖オリゴヌクレオチドの化学合成は、当該技術分野において周知であり、溶液または固相の技術により達成され得る。好ましくは、合成は、固相方法によるものである。オリゴヌクレオチドは、ホスホロアミダイト、垂リン酸トリエステル、H-ホスホナートおよびホスホトリエステル方法を含む、いくつかの異なる合成手順のいずれかにより、典型的には自動合成方法により、作られてもよい。

【0156】

オリゴヌクレオチドの合成プロトコルは当該技術分野において周知であり、例えば米国特許第5,830,653号;WO98/13526;Stec et al. 1984. J. Am. Chem. Soc. 106:6077;Stec et al. 1985. J. Org. Chem. 50:3908;Stec et al. J. Chromatog. 1985. 326:263;LaPlanche et al. 1986. Nucl. Acid. Res. 1986. 14:9081;Fasman G. D., 1989. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 1989. CRC Press, Boca Raton, Fla.;Lamone. 1993. Biochem. Soc. Trans. 21:1;米国特許第5,013,830号;米国特許第5,214,135号;米国特許第5,525,719号;Kawasaki et al. 1993. J. Med. Chem. 36:831;WO92/03568;米国特許第5,276,019号;および米国特許第5,264,423号において見出され得る。

40

【0157】

選択される合成方法は、所望のオリゴヌクレオチドの長さに依存し得、かかる選択は、当業者の技術の範囲内である。例えば、ホスホロアミダイトおよび垂リン酸トリエステル法により、175またはそれより多いヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを生成し

50

得、一方、H - ホスホナート法は、100ヌクレオチド未満のオリゴヌクレオチドのために良好に機能する。修飾塩基がオリゴヌクレオチドに組み込まれる場合、および特に、修飾ホスホジエステル連結部が使用される場合、合成手順は、必要に応じて、公知の手順に従って変えられる。このことに関して、Uhlmannら(1990, Chemical Reviews 90:543-584)は、修飾塩基および修飾ホスホジエステル連結部を有するオリゴヌクレオチドを作製するための参考文献および概略手順を提供する。オリゴヌクレオチドを作製するための他の例示的な方法は、Sonveaux、1994年、「Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis」;Agrawal、Methods in Molecular Biology 26:1において教示される。例示的な合成方法はまた、「Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach」(Gait, M. J. IRL Press at Oxford University Press. 1984)においても教示される。その上、修飾ヌクレオチドを持ついくつかの配列を含む規定の配列の直鎖オリゴヌクレオチドは、数個の商業的供給源から容易に入手可能である。

10

20

30

40

50

【0158】

オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、または、ゲルクロマトグラフィーおよび高圧液体クロマトグラフィーを含む多数のクロマトグラフィー的方法のいずれにより、精製されてもよい。ヌクレオチド配列、特に未修飾ヌクレオチド配列を確認するために、オリゴヌクレオチドは、マクサム・ギルバートシーケンシング、サンガーシーケンシング、キャピラリー電気泳動シーケンシング、ワンダーリングスポット(wandering spot)シーケンシングの手順を含む、知られている手順のいずれかにより、またはHybond紙に結合させたオリゴヌクレオチドの選択的化学分解を使用することにより、DNAシーケンシングに供されてもよい。短いオリゴヌクレオチドの配列はまた、レーザー脱離質量分析または高速原子衝撃によっても分析され得る(McNeal, et al., 1982, J. Am. Chem. Soc. 104:976; Viari, et al., 1987, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 14:83; Grotjahn et al., 1982, Nuc. Acid Res. 10:4671)。シーケンシング方法はまた、RNAオリゴヌクレオチドについても利用可能である。

【0159】

合成されたオリゴヌクレオチドの品質は、オリゴヌクレオチドを、例えばBergot and Egan. 1992. J. Chrom. 599:35の方法を使用して、キャピラリー電気泳動および分解性強アニオンHPLC(denaturing strong anion HPLC:SAX-HPLC)により試験することにより、確認され得る。

他の例示的な合成技術は、当該技術分野において周知である(例えばSambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Volumes I and II (DN Glover Ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M J Gait Ed, 1984); Nucleic Acid Hybridisation (B D Hames and S J Higgins eds. 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); またはシリーズであるMethods in Enzymology (Academic Press, Inc.)を参照)。

ある態様において、対象とするRNA iコンストラクトまたは少なくともその一部は、対象とするコンストラクトをコードする発現ベクターから転写される。この目的のために、当該技術分野において認識されるいずれのベクターも使用されてもよい。転写されたRNA iコンストラクトは、所望の修飾(未修飾センス鎖を修飾されたものにより置き換えることなど)が行われる前に、単離、精製されてもよい。

【0160】

送達/キャリア

本発明は、一部分においては、本明細書に記載の二本鎖核酸分子が、細胞質および核の両方における細胞内の長い非コードRNA(lncRNA)のレベルをロバストかつ強力に減少させることができるという驚くべき発見に基づく。いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、発明者は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子(例えば、sd-rxRNA)のパッセンジャー鎖およびガイド鎖上の修飾の特定のパターンが、ガイド鎖の核への侵入を容易にし、ガイド鎖が遺伝子サイレンシング(例えば、lncRNAのサイレンシング)を媒介すると考える。

【0161】

いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの潜在的な作用機構がこの活性を説明することができるであろう。例えば、いくつかの態様において、核酸分子（例えば、sd-rxRNA）のガイド鎖（例えば、アンチセンス鎖）は、パッセンジャー鎖から解離して、一本鎖として核に入ることができる。いったん核内に入ると、一本鎖のガイド鎖は、RNAse Hまたは別のリボヌクレアーゼと結合し、標的（例えば、lncRNA）を切断する（「アンチセンス作用機構」）。いくつかの態様において、核酸分子（例えば、sd-rxRNA）のガイド鎖（例えば、アンチセンス鎖）は、細胞質中または核外でアルゴノート（Argo）タンパク質と結合し、ロードされたArgo複合体を形成し得る。このロードされたArgo複合体は、核に移動し、次いで標的（例えば、lncRNA）を切断し得る。いくつかの態様において、核酸分子（例えば、sd-rxRNA）の両方の鎖（例えば、デュプレックス）は核に入り得、ガイド鎖は、RNAse H、Argoタンパク質または別のリボヌクレアーゼと結合し得、標的（例えば、lncRNA）を切断する。

10

【0162】

当業者は、本明細書に記載の二本鎖分子のセンス鎖（例えば、sd-rxRNAのセンス鎖）は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子のガイド鎖の送達に限定されないことを理解する。むしろ、いくつかの態様において、本明細書に記載のパッセンジャー鎖は、他の分子（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ASO）を細胞の核に対して標的化する目的で、同分子に結合（例えば、共有結合、非共有結合、抱合、相補性の領域を介したハイブリダイズなど）される。いくつかの態様において、本明細書に記載のセンス鎖に結合した分子は、合成アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）である。いくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドに結合したセンス鎖は、8～15ヌクレオチド長であり、化学修飾され、疎水性抱合体を含む。

20

【0163】

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、ASOは、水素結合によって相補的なパッセンジャー鎖に結合され得る。したがって、いくつかの側面において、本開示は、単離された核酸分子を細胞に投与することを含む、核酸分子を細胞に送達する方法を提供し、ここで、単離された核酸はアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）に対して相補的であるセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は8～15ヌクレオチド長であり、少なくとも2個のホスホロチオアート修飾を含み、センス鎖中のピリミジンの少なくとも50%が修飾され、ここで、同分子は疎水性抱合体を含む。

30

【0164】

細胞によるオリゴヌクレオチドの取り込み

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物は、1以上の細胞または細胞ライセートと接触させられて（すなわち、接触させられるか、または、本明細書においては投与または送達される）として言及される）、これに取り込まれる。用語「細胞」は、原核および真核細胞、好ましくは脊椎動物細胞、より好ましくは哺乳動物細胞を含む。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は細菌細胞と接触させられる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は真核細胞（例えば、植物細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞などの節足動物細胞）と接触させられる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は幹細胞と接触させられる。好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、ヒト細胞と接触させられる。

40

【0165】

本発明のオリゴヌクレオチド組成物を、in vitroで、例えば試験管または培養ディッシュ中で（対象中へ導入されても、されなくてもよく）、またはin vivoで、例えば哺乳動物対象などの対象において、細胞と接触させてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、局所的に、またはエレクトロポレーションを通して投与される。オリゴヌクレオチドは、エンドサイトーシスによって遅い速度で細胞に取り込まれるが、エンドサイトーシスされたオリゴヌクレオチドは、一般に隔絶され、例えば標的核酸分子へのハ

50

イブリダイゼーションのために利用可能ではない。一態様において、細胞による取り込みを、エレクトロポレーションまたはリン酸カルシウム沈殿により容易になされ得る。しかしながら、これらの手順は *in vitro* または *ex vivo* の態様でのみ有用であり、便利ではなく、いくつかのケースにおいては細胞毒性と関連する。

【0166】

別の態様において、細胞中へのオリゴヌクレオチドの送達は、リン酸カルシウム、DM SO、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な、当該技術分野において認識される方法により、または、トランスフェクションにより、例えばカチオン性、アニオン性または中性脂質組成物もしくはリポソームを使用して、当該技術分野において知られている方法を使用して（例えばWO90/14074；WO91/16024；WO91/17424；米国特許第4,897,355号；Bergan et al. 1993. *Nucleic Acid Research*. 21:3567を参照）、増強され得る。増強されたオリゴヌクレオチドの送達はまた、ベクター（例えばShi, Y. 2003. *Trends Genet* 2003 Jan. 19:9；Reichhart J M et al. *Genesis*. 2002. 34(1-2):1604；Yu et al. 2002. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 99:6047；Sui et al. 2002. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 99:5515を参照）、ウイルス、ポリアミンまたはポリリジン、プロタミンもしくはNi、N12-ビス（エチル）スペルミンなどの化合物を使用するポリカチオン抱合体（例えばBartzatt, R. et al. 1989. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11:133；Wagner E. et al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:4255を参照）の使用によっても媒介され得る。

【0167】

ある態様において、本発明のsd-rxRNAは、多様なベータ-グルカン含有粒子を使用して送達されてもよく、該粒子はGeRP（グルカンカプセル化RNAロード粒子）として言及され、これは2010年3月4日出願の米国仮出願第61/310,611号、表題「食細胞への標的化送達のための製剤および方法」に記載されており、参照により組み込まれる。かかる粒子はまた、米国特許公開US2005/0281781 A1およびUS2010/0040656、ならびにPCT公開WO2006/007372およびWO2007/050643においても記載されており、参照により組み込まれる。sd-rxRNA分子は、疎水的に修飾されていてもよく、および任意に、脂質および/または両親媒性ペプチドと結びついていてもよい。ある態様において、ベータ-グルカン粒子は酵母に由来する。ある態様において、ペイロードトラップ（payload trapping）分子は、少なくとも約1000Da、10,000Da、50,000Da、100kDa、500kDa等の分子量のポリマーである。好ましいポリマーは、（限定せずに）カチオン性ポリマー、キトサンまたはPEI（ポリエチレンジアミン）などを含む。

【0168】

グルカン粒子は、酵母細胞壁などの真菌細胞壁の不溶性構成要素に由来し得る。いくつかの態様において、酵母はパン酵母である。酵母由来グルカン分子は、1以上の（1,3）-グルカン、（1,6）-グルカン、マンナンおよびキチンを含み得る。いくつかの態様において、グルカン粒子は中空の酵母細胞壁を含み、これにより、粒子は細胞に似た3次元構造を維持し、この中でRNA分子などの分子と複合体化するかまたはこれをカプセル化し得る。酵母細胞壁粒子の使用に関連するいくつかの利点は、構成要素の利用可能性、それらの生分解性の性質、および、それらの食作用細胞を標的化する能力である。

【0169】

いくつかの態様において、グルカン粒子は細胞壁からの不溶性構成要素を抽出することにより調製され得、例えばパン酵母（フライシュマンのもの）を1MのNaOH/pH4.0、H₂Oで抽出し、続いて洗浄および乾燥することによる。酵母細胞壁粒子を調製するための方法は以下の文献に議論され、これらから参照により組み込まれる：米国特許第4,810,646号、同第4,992,540号、同第5,082,936号、同第5,028,703号、同第5,032,401号、同第5,322,841号、同第5,401,727号、同第5,504,079号、同第5,607,677号、同第5,968,811号、同第6,242,594号、同第6,444,448号、同第6,476,003号、米国特許公開第2003/0216346号、同第2004/0014715号および同第2010/0040656号ならびにPCT公開第WO02/12348号

。

【 0 1 7 0 】

グルカン粒子を調製するためのプロトコルもまた、以下の文献に記載されており、これらから参照により組み込まれる：Soto and Ostroff (2008), "Characterization of multilayered nanoparticles encapsulated in yeast cell wall particles for DNA delivery"; Bioconjug Chem 19(4):840-8; Soto and Ostroff (2007), "Oral Macrophage Mediated Gene Delivery System," Nanotech, Volume 2, Chapter 5 ("Drug Delivery"), pages 378-381; および Li et al. (2007), "Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88-and Syk kinase-dependent pathways." Clinical Immunology 124(2):170-181.

10

【 0 1 7 1 】

酵母細胞壁粒子などのグルカン含有粒子はまた、商業的にも得られ得る。いくつかの非限定的例は以下を含む：Biorigin (Sao Paulo, Brazil) からの Nutricell MOS 55、SAF-annan (SAF Agri, Minneapolis, Minn.)、Nutrex (Sensient Technologies, Milwaukee, Wis.)、アルカリ抽出粒子、例えば Nutricepts (Nutricepts Inc., Burnsville, Minn.) および ASA Biotech 製造のもの、Biopolymer Engineering からの酸抽出 W G P 粒子および有機溶媒抽出粒子、例えば Alpha-beta Technology, Inc. (Worcester, Mass.) からの Adjuvax (商標) および Novogen (Stamford, Conn.) からの微粒子グルカン。

【 0 1 7 2 】

酵母細胞壁粒子などのグルカン粒子は、製造および/または抽出方法に依存して種々のレベルの純度を有し得る。いくつかの例において、粒子はアルカリ抽出、酸抽出または有機溶媒抽出して、細胞内構成要素および/または細胞壁の外部マンノタンパク質層を除去する。かかるプロトコルは、50 ~ 90% の範囲のグルカン含量 (w/w) を有する粒子を製造し得る。いくつかの例において、低純度の粒子、すなわち低グルカン w/w 含量の粒子が好ましい場合もあり、一方他の態様においては、高純度すなわち高グルカン w/w 含量の粒子が好ましい場合もある。

20

酵母細胞壁粒子などのグルカン粒子は、天然の脂質含量を有し得る。例えば、粒子は 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20% または 20% w/w を超える脂質を含有し得る。例のセクションにおいて、グルカン粒子 2 つのバッチ：Y G P S A F および Y G P S A F + L (天然脂質含有) の有効性を試験する。いくつかの態様において、天然脂質の存在は R N A 分子の複合体化または捕捉を支援し得る。

30

【 0 1 7 3 】

グルカン含有粒子は典型的には、および 2 ~ 4 ミクロンの直径を有するが、2 ミクロン未満または 4 ミクロンを超える直径の粒子もまた、本発明の側面に適合する。

送達する R N A 分子 (単数または複数) は、グルカン粒子に複合体化されるか、そのシェル内に「捕捉」される。粒子のシェルまたは R N A 構成要素は、Soto and Ostroff (2008) Bioconjug Chem 19:840 に記載され、参照により組み込まれているように、視覚化のために標識され得る。G e R P をロードする方法は以下にさらに議論される。

オリゴヌクレオチドの取り込みのための最適なプロトコルは、多数の因子に依存するであろうが、最も重要なのは、使用される細胞の型である。取り込みにおいて重要な他の因子は、これらに限定されないが、オリゴヌクレオチドの性質および濃度、細胞のコンフルエンス、細胞を入れる培養の種類 (例えば懸濁培養であるかまたはプレート培養であるか) および細胞を培養する培地の種類を含む。

40

【 0 1 7 4 】

カプセル化剤

カプセル化剤は、ベシクル内にオリゴヌクレオチドを捕捉する。本発明の別の態様において、オリゴヌクレオチドは、キャリアまたはビヒクル、例えばリポソームまたはミセルと結びついてよいが、他のキャリアを使用され得ることは、当業者により理解される通りである。リポソームは、生体膜と類似する構造を有する脂質二重層からなるベシクルで

50

ある。かかるキャリアは、細胞による取り込みを促進するため、または、オリゴヌクレオチドを標的化するため、または、オリゴヌクレオチドの薬物動態または毒性学的特性を改善するために、使用される。

【0175】

例えば、本発明のオリゴヌクレオチドはまた、その中に活性成分が分散してまたは脂質層に接着した水性濃縮層からなる小体中に多様に存在して含有される医薬組成物であるリポソーム中にカプセル化されても、投与されてもよい。オリゴヌクレオチドは、溶解性に依存して、水性層および脂質層の両方に存在しても、一般にリポソーム懸濁液 (liposomic suspension) と称されるものの中に存在してもよい。疎水性層は一般に、必ずではないが、レシチンおよびスフィンゴミエリンなどのリン脂質、コレステロールなどのステロイド、リン酸ジアセチルなどの多かれ少なかれイオン性の界面活性剤、ステアリルアミンまたはホスファチジル酸または疎水性の性質の他の材料を含む。リポソームの直径は一般に、およそ15 nmから約5ミクロンまでの範囲である。

10

【0176】

薬物送達ビヒクルとしてのリポソームの使用は、幾つかの利点を与える。リポソームは、細胞内安定性を増大し、取り込み効率を増大し、生物学的活性を改善する。リポソームは、細胞膜を構成する脂質と類似の様式において配置された脂質からなる、中空の球体ベシクルである。これらは、水溶性化合物を封入する内部の水性の空間を有し、直径0.05から数ミクロンまでの範囲のサイズである。数個の研究から、リポソームが核酸を細胞へ送達し得ること、および、核酸が生物学的に活性であり続けることが示される。例えば、リポフェクチンまたはLIPOFECTAMINE (商標) 2000などの本来は研究用ツールとして設計された脂質送達ビヒクルは、無傷の (intact) 核酸分子を細胞へ送達し得る。

20

【0177】

リポソームを使用することの具体的な利点は以下を含む：それらは組成物において非毒性であり生分解性であること；それらは長期の循環半減期を呈すること；および、認識分子が、組織へ標的化するために、それらの表面へ容易に付着され得ること。最後に、液体懸濁液または凍結乾燥製品のいずれにおいても、リポソームベースの医薬のコスト効率の良い製造は、受容可能な薬物送達システムとしてのこの技術のバイアビリティを実証している。

30

いくつかの側面において、本発明に関連する製剤は、天然に存在するかまたは化学的に合成されたかまたは修飾された、飽和および不飽和の脂肪酸残基のクラスについて選択されてもよい。脂肪酸は、トリグリセリド類、ジグリセリド類または個々の脂肪酸の形態で存在してもよい。別の態様において、非経口栄養のために薬理学において現在使用されている脂肪酸および/または脂質のエマルジョンの、よく検証された混合物の使用が利用されてもよい。

【0178】

リポソームベースの製剤は、オリゴヌクレオチドの送達のために広範に使用される。しかしながら、市販の脂質またはリポソーム製剤の殆どは、少なくとも1つの正に荷電した脂質 (カチオン性脂質) を含有する。この正に荷電した脂質の存在は、高レベルのオリゴヌクレオチドのローディングを得るために、および、リポソームの膜融合特性を増強するために、必須であると考えられている。最適な正に荷電した脂質の化合物を同定するための、数個の方法が実施され、公開されている。しかしながら、カチオン性脂質を含有する市販のリポソーム製剤は、高レベルの毒性によって特徴づけられる。in vivoでの限定された治療インデックスにより、正に荷電した脂質を含有するリポソーム製剤が、RNAサイレンシングを達成するために必要とされる濃度よりもごく僅かに高い濃度において、毒性 (すなわち肝臓の酵素の増大) と関連することが明らかとなっている。

40

【0179】

本発明に関連する核酸は、疎水的に修飾され得、中性ナノトランスポーターに包含され得る。中性ナノトランスポーターのさらなる説明は、2009年9月22日に出願されたPCT出願PCT/US2009/005251、表題「中性ナノトランスポーター」および2011年9月29日に公開され

50

た米国特許公開第US2011/0237522号、表題「中性ナノトランスポーター」から参照により組み込まれる。かかる粒子は、非荷電の脂質混合物中へのオリゴヌクレオチドの定量的な組み込みを可能にする。かかる中性ナノトランスポーター組成物においてカチオン性脂質が毒性レベルを欠いていることは、重要な特性である。

【0180】

PCT/US2009/005251に実証されているとおり、オリゴヌクレオチドは、カチオン性脂質を有さない脂質混合物中に効率的に組み込まれ得、かかる組成物は、治療用オリゴヌクレオチドを機能的な様式で細胞に効果的に送達し得る。例えば、脂質混合物が、ホスファチジルコリンベースの脂肪酸およびコレステロールなどのステロールから構成されたとき、高レベルの活性が観察された。例として、中性脂質混合物の1つの好ましい製剤は、少なくとも20%のDOPCまたはDSPCおよび少なくとも20%のコレステロールなどのステロールから構成される。1:5の脂質対オリゴヌクレオチド比率という低さでも、オリゴヌクレオチドの非荷電製剤中での完全なカプセル化を得るのに充分であることが示された。

10

【0181】

中性ナノトランスポーター組成物は、オリゴヌクレオチドの中性脂質製剤中への効率的なローディングを可能にする。組成物は、分子の疎水性が増大するような様式において修飾されている（例えば、疎水性分子が、疎水性分子に、オリゴヌクレオチド末端または末端でないヌクレオチド、塩基、糖もしくは骨格上で、（共有結合的にまたは非共有結合的に）付着されている）オリゴヌクレオチドを含み、修飾オリゴヌクレオチドは、中性脂質製剤と混合されている（例えば、少なくとも25%のコレステロールおよび25%のDOPCまたはそのアナログを含有する）。別の脂質などのカーゴ分子もまた、組成物中に含まれ得る。この組成物は、製剤の一部がオリゴヌクレオチド自体中に構築される場合、中性脂質粒子中におけるオリゴヌクレオチドの効率的なカプセル化を可能にする。

20

【0182】

いくつかの側面において、50から140nmまでの範囲のサイズの安定な粒子は、疎水性オリゴヌクレオチドを好ましい製剤と複合体化することにより形成され得る。製剤は、それ自体では典型的には小さい粒子を形成せず、むしろ集塊物を形成し、これは疎水性修飾オリゴヌクレオチドを付加することにより、安定な50~120nmの粒子へと転換されることに言及することは興味深い。

30

本発明の中性ナノトランスポーター組成物は、疎水性修飾ポリヌクレオチド、中性脂質混合物および任意にカーゴ分子を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの修飾の前よりも疎水性にする少なくとも1つの修飾を有する、本発明のポリヌクレオチド（すなわちsd-rxRNA）である。修飾は、疎水性分子をポリヌクレオチドに付着（共有結合的または非共有結合的に）することにより達成されてもよい。いくつかの例において、疎水性分子は、親油性基であるかまたは親油性基を含む。

【0183】

用語「親油性基」は、水に対するアフィニティーよりも高い、脂質に対するアフィニティーを有する基を意味する。親油性基の例は、これらに限定されないが、コレステロール、コレステリルまたは修飾コレステリル残基、アダマンチン、ジヒドロテストロン（dihydrotestosterone）、長鎖アルキル、長鎖アルケニル、長鎖アルキニル、オレイル-リトコール酸、コレン酸、オレオイル-コレン酸、パルミチル酸、ヘプタデシル酸、ミリスチル酸、胆汁酸、コール酸またはタウロコール酸、デオキシコール酸、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド類、ビタミンEなどのビタミン類、飽和または不飽和のいずれかの脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル類、ピレン類、ポルフィリン類、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン類、ピオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、Texas-Red、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、シアニン色素（例えばCy3またはCy5）、Hoechst 33258色素、ソラレン

40

50

またはイブプロフェンを含む。コレステロール部分は還元されても（例えばコレスタン中のように）、または、置換されても（例えば八口ゲンにより）よい。1分子における異なる親油性基の組み合わせもまた可能である。

【0184】

疎水性分子は、ポリヌクレオチドの多様な位置において付着されてもよい。上記のとおり、疎水性分子は、ポリヌクレオチドの3'または5'末端などのポリヌクレオチドの末端の残基に連結されていてもよい。代わりに、これは、ポリヌクレオチドの内部のヌクレオチドまたは枝上のヌクレオチドに連結されていてもよい。疎水性分子は、例として、ヌクレオチドの2'位に付着されていてもよい。疎水性分子はまた、ポリヌクレオチドのヌクレオチドの複素環式塩基、糖または骨格にも連結されていてもよい。

10

【0185】

疎水性分子は、リンカー部分によりポリヌクレオチドに繋がられていてもよい。任意に、リンカー部分は、非ヌクレオチド性のリンカー部分である。非ヌクレオチド性のリンカーは、例えば、脱塩基残基（dスペーサー）、トリエチレングリコール（スペーサー9）もしくはヘキサエチレングリコール（スペーサー18）などのオリゴエチレングリコール、またはブタンジオールなどのアルカンジオールである。スペーサーユニットは、好ましくは、ホスホジエステルまたはホスホロチオアート結合により連結されている。リンカーユニットは、分子中に1回のみ現れても、または、例えばホスホジエステル、ホスホロチオアート、メチルホスホナートまたはアミン連結部などを介して、数回組み込まれてもよい。

20

典型的な抱合プロトコルは、配列の1以上の位置においてアミノリンカーを保有するポリヌクレオチドの合成を含むが、しかしながらリンカーは必要ではない。アミノ基は、次いで、適切なカップリングまたは活性化試薬を使用して、抱合される分子と反応させられる。抱合反応は、まだ固体支持体に結合しているポリヌクレオチドを用いて、または、溶液相中でのポリヌクレオチドの切断に続いて、実施されてもよい。HPLCによる修飾ポリヌクレオチドの精製は、典型的には、結果として純粋な材料を生じる。

【0186】

いくつかの態様において、疎水性分子は、ミセル中へ組み込まれるために十分な疎水性を提供する、ステロール型抱合体、フィトステロール抱合体、コレステロール抱合体、側鎖の長さを変えられたステロール型抱合体、脂肪酸抱合体、任意の他の疎水性基抱合体、および/または内部ヌクレオシドの疎水性修飾である。

30

本発明の目的のために、用語「ステロール」またはステロイドアルコール類は、A環の3位においてヒドロキシル基を持つステロイドのサブグループを指す。これらは、アセチル・コエンザイムAからHMG-CoAレダクターゼ経路を介して合成される両親媒性脂質である。全体的な分子は、極めて扁平である。A環上のヒドロキシル基は、極性である。脂肪族鎖の残りは、非極性である。通常、ステロールは、17位において8炭素鎖を有すると考えられる。

本発明の目的のために、用語「ステロール型分子」は、ステロイドアルコール類を指し、これは、ステロールと構造が類似する。主要な差異は、環の構造および21位に結合する側鎖の炭素の数である。

40

【0187】

本発明の目的のために、用語「フィトステロール」（また植物ステロールとも称される）は、植物において天然に存在する植物化学物質である、一群のステロイドアルコール類である。200種を超えるフィトステロールが知られている。

本発明の目的のために、用語「ステロールの側鎖」は、ステロール型分子の17位にて付着する側鎖の化学組成を指す。標準的な定義において、ステロールは、8炭素鎖を17位に保有する4環構造に限定される。本発明において、従来のもものよりも長いおよび短い側鎖を持つステロール型分子が記載される。側鎖は、分枝であってもよいし、二重の骨格を含有していてもよい。

よって、本発明に有用なステロールは、例えば、コレステロール、ならびに、17位に

50

2～7個または9個の炭素より長い側鎖が結合しているユニークなステロールを含む。特定の態様において、ポリ炭素テイルの長さは、5～9個の炭素の間で変動する。かかる抱合体は、特に肝臓への送達において、有意により良好な *in vivo* 効力を有してもよい。これらの型の分子は、従来のコレステロールに抱合されたオリゴヌクレオチドよりも5～9倍低い濃度にて働くことが期待される。

【0188】

代わりに、ポリヌクレオチドは、タンパク質、ペプチド、または、疎水性分子として機能する正に荷電した化学物質に結合していてもよい。タンパク質は、プロタミン、dsRNA結合ドメインおよびアルギニンリッチペプチドからなる群から選択されてもよい。例示的な正に荷電した化学物質は、スペルミン、スペルミジン、カダベリンおよびプトレシンを含む。

10

別の態様において、疎水性分子抱合体は、疎水性修飾、ホスホロチオアート修飾および2'リボ修飾を含むがこれらに限定されないポリヌクレオチドの最適な化学修飾パターンと組み合わせられたとき(本明細書に詳細に記載されるとおり)、さらに高い効力を実証し得る。

【0189】

別の態様において、ステロール型分子は、天然に存在するフィトステロールであってもよい。ポリ炭素鎖は、9個より長くても、直鎖であっても、分枝鎖であっても、および/または、二重結合を含有していてもよい。ポリヌクレオチド抱合体を含有するいくつかのフィトステロールは、多様な組織へのポリヌクレオチドの送達において、有意により強力かつ活性であり得る。いくつかのフィトステロールは組織選択性を実証し得ることから、RNAiを特異的に特定の組織へ送達するための手段として使用され得る。

20

【0190】

疎水性修飾ポリヌクレオチドは、中性脂肪酸混合物と混合されて、ミセルを形成する。中性脂肪酸混合物は、疎水性修飾ポリヌクレオチドとともにミセルを形成し得る生理学的pHにおいてまたはその付近において、正味の中性または僅かに正味の負の電荷を有する、脂質の混合物である。本発明の目的のために、用語「ミセル」は、非荷電性脂肪酸とリン脂質との混合物により形成される、小さいナノ粒子を指す。中性脂肪酸混合物は、毒性を引き起こさない量で存在する限りにおいて、カチオン性脂質を含んでもよい。好ましい態様において、中性脂肪酸混合物は、カチオン性脂質を含まない。カチオン性脂質を含まない混合物は、全脂質のうちの1%未満、好ましくは0%が、カチオン性脂質であるものである。用語「カチオン性脂質」は、生理学的pHにおいてまたはその付近において、正味の正の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。用語「アニオン性脂質」は、生理学的pHにおいてまたはその付近において、正味の負の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。

30

中性脂質は、強力であるが共有結合ではない引力(例えば静電気、ファンデルワールス、パイ・スタッキング(pi-stacking)などの相互作用)により、本発明のオリゴヌクレオチドに結合する。

【0191】

中性脂質混合物は、天然に存在するかまたは化学合成された、または、修飾された、飽和および不飽和脂肪酸残基のクラスから選択される製剤を含んでもよい。脂肪酸は、トリグリセリド、ジグリセリドまたは個別の脂肪酸の形態で存在し得る。別の態様において、薬理学において非経口栄養のために現在使用されている脂肪酸のよく確認された混合物および/または脂質エマルジョンが利用されてもよい。

40

中性脂肪酸混合物は、好ましくは、コリンをベースとする脂肪酸およびステロールの混合物である。コリンをベースとする脂肪酸は、例として、DDPC、DLPC、DMPC、DPPC、DSPC、DOPC、POPCおよびDEPCなどの合成のホスホコリン誘導体を含む。DOPC(化合物登録番号4235-95-4)は、ジオレオイルホスファチジルコリンである(ジオレオイルホスファチジルコリン、ジオレオイル-PC、ジオレオイルホスホコリン、ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、ジオレイルホスファ

50

チジルコリンとしても知られる)。D S P C (化合物登録番号816-94-4は、ジステアロイルホスファチジルコリンである(1, 2 -ジステアロイル - sn -グリセロ - 3 -ホスホコリンとしても知られる)。

【0192】

中性脂肪酸混合物中のステロールは、例として、コレステロールであってもよい。中性脂肪酸混合物は、完全にコリンベースの脂肪酸およびステロールからなっても、または、これは任意にカーゴ分子を含んでもよい。例として、中性脂肪酸混合物は、少なくとも20%または25%の脂肪酸および20%または25%のステロールを有してもよい。

本発明の目的のために、用語「脂肪酸」は、脂肪酸の従来の説明に関する。これらは、個別の実体またはジグリセリドおよびトリグリセリドの形態において存在し得る。本発明の目的のために、用語「脂質エマルジョン」は、食事から十分な脂質を得ることができない対象へ静脈内に与えられる安全な脂質製剤を指す。これは、大豆油(または他の天然に存在するオイル)と卵のリン脂質とのエマルジョンである。脂質エマルジョンは、いくつかの不溶性麻酔剤の製剤のために使用されている。本開示において、脂質エマルジョンは、イントラリピッド(Intralipid)、リポシン(Liposyn)、ニュートリピッド(Nutrilipid)などの市販の製剤の一部、特定の脂肪酸が濃縮されている改変された市販の製剤、または、全く新たに処方された脂肪酸とリン脂質との組合せであってもよい。

【0193】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つを含む混合物と、約12時間~約24時間の間接触させられる。別の態様において、オリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つを含む混合物と、約1~約5日間接触させられる。一態様において、細胞は、脂質およびオリゴヌクレオチドを含む混合物と、約3日間~約30日間接触させられる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約5~約20日間、接触状態に置かれる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約7~約15日間、接触状態に置かれる。

【0194】

製剤の50%~60%は、任意に、他のいずれの脂質または分子であってもよい。かかる脂質または分子は、本明細書において、カーゴ脂質またはカーゴ分子として言及される。カーゴ分子は、これらに限定されずに、イントラリピッド(intralipid)、低分子、膜融合ペプチドもしくは脂質を含むか、または、他の低分子が、細胞取り込み、エンドソームによる放出または組織分布特性を変えるために添加されてもよい。かかる特性が望ましい場合、カーゴ分子に耐性を示す能力は、これらの粒子の特性の改変のために重要である。例として、いくつかの組織特異的代謝物の存在は、組織分布プロファイルを大幅に変える場合がある。例えば、多様な飽和レベルを有するより短いまたはより長い脂質鎖が濃縮されているイントラリピッド(intralipid)型製剤の使用は、これらの型の製剤の組織分布プロファイル(およびそれらのローディング)に影響を及ぼす。

【0195】

本発明に従い有用なカーゴ脂質の例は、膜融合脂質である。例として、双性イオン脂質D O P E (化合物登録番号4004-5-1、1, 2 -ジオレオイル - sn -グリセロ - 3 -ホスホエタノールアミン)は、好ましいカーゴ脂質である。

イントラリピッド(Intralipid)は、以下の組成から構成され得る: 1000 mLが以下を含有する: 精製大豆油90 g、精製卵リン脂質12 g、無水グリセロール22 g、注射用水(1000 mLへの十分量)。pHは、水酸化ナトリウムで、約pH 8に調整される。エネルギー含量/L: 4.6 MJ (190 kcal)。浸透圧(およそ): 300 m O s m / 水1 k g。別の態様において、脂質エマルジョンは、5%のベニバナ油、5%の大豆油、乳化剤として添加される最大1.2%までの卵リン脂質および注射用水中の2.5%のグリセリンを含有する、リポシン(Liposyn)である。これはまた、pH調整のために水酸化ナトリウムを含有してもよい。pH 8.0 (6.0~9.0)。リポシンは、

276 mOsmol / リットル (実測値) の浸透圧を有する。

【0196】

カーゴ脂質のアイデンティティー、量および比率のバリエーションは、これらの化合物の細胞による取り込みおよび組織分布の特徴に影響を及ぼす。例えば、脂質テイルの長さおよび飽和性のレベルは、肝臓、肺、脂肪および心筋細胞への異なる取り込みに影響を及ぼす。ビタミン類または異なる形態のステロールなどの特別な疎水性分子の添加は、特定の化合物の代謝に関する特別な組織への分布に有利に働き得る。いくつかの態様において、ビタミンAまたはEが用いられる。複合体は、異なるオリゴヌクレオチド濃度にて形成され、より高い濃度は、より効率的な複合体形成に有利に働く。

別の態様において、脂質エマルジョンは、脂質の混合物に基づく。かかる脂質は、天然の化合物、化学合成された化合物、精製脂肪酸または他のいずれの脂質をも含んでもよい。さらに別の態様において、脂質エマルジョンの組成は、完全に人工的なものである。特定の態様において、脂質エマルジョンは、70%を超えて、リノール酸である。さらに別の特定の態様において、脂質エマルジョンは、少なくとも1%のカルジオリピンである。リノール酸(LA)は、不飽和オメガ-6脂肪酸である。これは、18-炭素鎖および2個のシス二重結合を有するカルボン酸からなる無色の液体である。

【0197】

本発明のさらに別の態様において、疎水性修飾ポリヌクレオチドの組織分布を変えるための手段として、脂質エマルジョンの組成の変更が使用される。この方法論は、特定の組織へのポリヌクレオチドの特異的送達をもたらす。

別の態様において、カーゴ分子の脂質エマルジョンは、70%を超えるリノール酸($C_{18}H_{32}O_2$)および/またはカルジオリピンを含む。

イントラリピッド(intralipid)などの脂質エマルジョンは、いくつかの非水溶性薬物(プロポフォル(Propofol)(Diprivanとして再処方されている)など)のための送達用製剤として、前から使用されてきた。本発明のユニークな特徴は、(a)修飾ポリヌクレオチドを1以上の疎水性化合物と組み合わせ、それによりこれが脂質ミセル中に組み込まれ得るというコンセプト、および(b)可逆性キャリアを提供するためにこれを脂質エマルジョンと混合すること、を含む。血流中への注射の後で、ミセルは通常、アルブミン、HDL、LDLおよびその他の血清タンパク質と結合する。この結合は可逆性であり、最終的に脂質は細胞により吸収される。ミセルの一部として組み込まれるポリヌクレオチドは、次いで、細胞の表面近くに送達されるであろう。その後、ステロール型送達を含むがこれらに限定されない多様な機構を通して、細胞による取り込みが起こり得る。

【0198】

複合体化剤

複合体化剤は、強力であるが共有結合ではない引力(例えば静電気、ファンデルワールス、パイ・スタッキングなどの相互作用)により、本発明のオリゴヌクレオチドに結合する。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの細胞による取り込みを増大するために、複合体化剤と複合体化され得る。複合体化剤の例は、カチオン性脂質を含む。カチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドを細胞へ送達するために使用され得る。しかしながら、上記のとおり、カチオン性脂質を含まない製剤が、いくつかの態様において好ましい。

【0199】

用語「カチオン性脂質」は、極性および非極性ドメインの両方を有する脂質および合成脂質であって、生理学的pHまたはその付近において正に荷電することができ、核酸などのポリアニオンに結合して核酸の細胞中への送達を促進するものを含む。一般に、カチオン性脂質は、飽和および不飽和アルキル、ならびに、脂環式のエーテル類およびアミンのエステル類、アミド類、または、これらの誘導体を含む。カチオン性脂質の直鎖および分枝アルキルおよびアルケニル基は、例えば、1から約25個の炭素原子を含有し得る。好ましい直鎖または分枝アルキルまたはアルケン基は、6個以上の炭素原子を有する。脂環式基は、コレステロールおよび他のステロイド基を含む。カチオン性脂質は、例えばC1

10

20

30

40

50

、 Br^- 、 I^- 、 F^- 、アセタート、トリフルオロ酢酸、スルファート、亜硝酸化合物 (nitrite) およびニتراتを含む多様な対イオン (アニオン) とともに調製され得る。

【0200】

カチオン性脂質の例は、ポリエチレンイミン、ポリアミドアミン (PAMAM) スターバースト dendrimer、リポフェクチン (DOTMA と D O P E との組合せ)、リポフェクターゼ (Lipofectase)、LIPOFECTAMINE (商標) (例えば、LIPOFECTAMINE (商標) 2000)、D O P E、サイトフェクチン (Cytofectin) (Gilead Sciences, Foster City, Calif.)、およびユーフェクチン (Eufectins) (JBL, San Luis Obispo, Calif.) を含む。例示的なカチオン性リポソームは、N - [1 - (2 , 3 - ジオレオロキシ) - プロピル] - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N - [1 - (2 , 3 - ジオレオロキシ) - プロピル] - N , N , N - トリメチルアンモニウムメチルスルファート (DOTAP)、3 - [N - (N' , N' - ジメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (DC-Chol)、2 , 3 , - ジオレイルオキシ - N - [2 (スペルミンカルボキサミド) エチル] - N , N - ジメチル - 1 - プロパンアミニウムトリフルオロアセタート (DOSPA)、1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド ; およびジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB) から製造され得る。例えばカチオン性脂質 N - (1 - (2 , 3 - ジオレイルオキシ) プロピル) - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) は、ホスホチオアートオリゴヌクレオチドのアンチセンス効果を 1000 倍増大することが見出された (Vlassov et al., 1994, Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。オリゴヌクレオチドはまた、例えばポリ (L - リジン) またはアビジンと複合体化されてもよく、脂質は、この混合物中、例えばステリル - ポリ (L - リジン) に含まれても含まれなくてもよい。

【0201】

カチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドを細胞に送達するために当該技術分野において使用されてきた (例えば米国特許第5,855,910号 ; 同第5,851,548号 ; 同第5,830,430号 ; 同第5,780,053号 ; 同第5,767,099号 ; Lewis et al. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3176; Hope et al. 1998. Molecular Membrane Biology 15:1を参照)。今回のオリゴヌクレオチドの取り込みを容易にするために使用され得る他の脂質組成物は、クレームされる方法と組み合わせて使用され得る。上で列記されるものに加えて、例えば米国特許第4,235,871号 ; 米国特許第4,501,728号 ; 同第4,837,028号 ; 同第4,737,323号において教示されるものを含む他の脂質組成物もまた、当該技術分野において知られている。

【0202】

一態様において、脂質組成物は、剤、例えばウイルスタンパク質を、オリゴヌクレオチドの脂質媒介性トランスフェクションを増強するためにさらに含み得る (Kamata, et al., 1994. Nucl. Acids. Res. 22:536)。別の態様において、オリゴヌクレオチドは、例えば米国特許第5,736,392号に教示されるとおりのオリゴヌクレオチド、ペプチドおよび脂質を含む組成物の一部として、細胞と接触させられる。血清耐性である改善された脂質もまた記載されている (Lewis, et al., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:3176)。カチオン性脂質および他の複合体化剤は、エンドサイトーシスを通して細胞中へ運搬されるオリゴヌクレオチドの数を増大するために作用する。

【0203】

別の態様において、オリゴヌクレオチドの取り込みを最適化するために、N - 置換グリシンオリゴヌクレオチド (ペプチド) が使用され得る。ペプチドは、トランスフェクションのためのカチオン性脂質様化合物を作製するために使用されてきた (Murphy, et al., 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:1517)。ペプチドは、標準的な方法 (例えば Zuckermann, R. N., et al. 1992. J. Am. Chem. Soc. 114:10646; Zuckermann, R. N., et al. 1992. Int. J. Peptide Protein Res. 40:497) を使用して合成され得る。カチオン性脂質とペプチドとの組合せであるリプトイド (liptoid) もまた、目的のオリゴヌクレ

オチドの取り込みを最適化するために使用され得る (Hunag, et al., 1998. Chemistry and Biology. 5:345)。リプトイドは、ペプチドオリゴヌクレオチドを産生して、アミノ末端のサブモノマーをそのアミノ基を介して脂質にカップリングすることにより合成され得る (Hunag, et al., 1998. Chemistry and Biology. 5:345)。

正に荷電したアミノ酸を、高活性カチオン性脂質を作製するために使用され得ることは、当該技術分野において知られている (Lewis et al. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. US A. 93:3176)。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、親油性部分に結合した多数のアルギニン、リジン、ヒスチジンまたはオルニチン残基を含む (例えば米国特許第5,777,153号を参照)。

【0204】

別の態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、約1~約4個の塩基性残基を有するペプチドを含む。これらの塩基性残基は、例えばペプチドのアミノ末端、C末端または内部領域に位置され得る。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されてきた。これらのファミリーは、塩基性側鎖 (例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖 (例えばグリシン (これはまた非極性であるとも考えられる)、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖 (例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ-分枝側鎖 (例えばスレオニン、バリン、イソロイシン) および芳香族側鎖 (例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を持つアミノ酸を含む。塩基性アミノ酸以外にも、ペプチドの他の残基の大多数または全てが、非塩基性アミノ酸から、例えばリジン、アルギニンまたはヒスチジン以外のアミノ酸から選択され得る。好ましくは、長い中性の側鎖を有する中性アミノ酸が優位に使用される。

【0205】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、1以上のガンマカルボキシグルタミン酸残基または -Gla 残基を有する天然または合成のポリペプチドを含む。これらのガンマカルボキシグルタミン酸残基により、ポリペプチドが、互いにおよび膜表面に、結合することが可能になる。言い換えると、一連の -Gla を有するポリペプチドは、RNAi コンストラクトが、それが接触した膜が何であれそれに固着することを助けるための汎用送達モダリティーとして使用され得る。これは、少なくとも、RNAi コンストラクトが血流からクリアランスされることを遅延し、それらが標的にホーミングするチャンスを増強し得る。

【0206】

ガンマカルボキシグルタミン酸残基は、天然のタンパク質中に存在してもよい (例えばプロトロンビンは10個の -Gla 残基を有する)。代わりに、これらは、精製された、組み換え的に作製された、または、化学合成されたポリペプチド中に、カルボキシル化により、例えばビタミンK依存性カルボキシラーゼを使用して、導入され得る。ガンマカルボキシグルタミン酸残基は、連続的であっても非連続的であってもよく、ポリペプチド中のかかるガンマカルボキシグルタミン酸残基の総数および位置は、ポリヌクレオチドの異なるレベルの「固着性 (stickiness)」を達成するために調節/微調整され得る。

【0207】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物と接触させられる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つなどの脂質を含む混合物と、約12時間~約24時間接触させられる。別の態様において、オリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つなどの脂質を含む混合物と、約1日~約5日間接触させられる。一態様において、細胞は、脂質およびオリゴヌクレオチドを含む混合物と、約3日間~約30日間までの長さにより接触させられる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約5~約20日間接触させたままに置かれる。別の

10

20

30

40

50

態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約7～約15日間接触させたままで置かれる。

【0208】

例えば、一態様において、オリゴヌクレオチド組成物は、サイトフェクチンCSまたはGSV (Glen Research; Sterling, Va.から入手可能)、GS3815、GS2888などの脂質の存在下において、本明細書に記載されるとおり、長期のインキュベーション期間にわたって細胞と接触させられてもよい。

一態様において、細胞の、脂質およびオリゴヌクレオチド組成物を含む混合物とのインキュベーションは、細胞のバイアビリティを低下させない。好ましくは、トランスフェクション期間の後で、細胞は実質的に生存している。一態様において、トランスフェクションの後で、細胞は、少なくとも約70%～少なくとも約100%生存している。別の態様において、細胞は、少なくとも約80%～少なくとも約95%生存している。さらに別の態様において、細胞は、少なくとも約85%～少なくとも約90%生存している。

【0209】

一態様において、オリゴヌクレオチドは、本明細書において「輸送ペプチド」として言及される、オリゴヌクレオチドを細胞中へ輸送するペプチド配列を付着させることにより修飾される。一態様において、組成物は、タンパク質をコードする標的核酸分子に対して相補的であるオリゴヌクレオチドおよび共有結合で付着している輸送ペプチドを含む。

語「輸送ペプチド」は、オリゴヌクレオチドの細胞中への輸送を容易にさせるアミノ酸配列を含む。それが連結されている部分の細胞中への輸送を容易にさせる例示的なペプチドは、当該技術分野において知られており、例えばHIV TAT転写因子、ラクトフェリン、ヘルペスVP22タンパク質および線維芽細胞増殖因子2を含む (Pooga et al. 1998. Nature Biotechnology. 16:857; およびDerossi et al. 1998. Trends in Cell Biology. 8:84; Elliott and O'Hare. 1997. Cell 88:223)。

【0210】

オリゴヌクレオチドは、知られている技術 (例えばProchiantz, A. 1996. Curr. Opin. Neurobiol. 6:629; Derossi et al. 1998. Trends Cell Biol. 8:84; Troy et al. 1996. J. Neurosci. 16:253; Vives et al. 1997. J. Biol. Chem. 272:16010) を使用して輸送ペプチドに付着させ得る。例えば、一態様において、活性化チオール基を保有するオリゴヌクレオチドは、そのチオール基を介して、輸送ペプチド中に存在するシステインに (例えばDerossi et al. 1998. Trends Cell Biol. 8:84; Prochiantz. 1996. Current Opinion in Neurobiol. 6:629; Allinquant et al. 1995. J Cell Biol. 128:919において教示されるとおり、例えばアンテナペディアホメオドメインの第2と第3とのヘリックスの間のターン中に存在するシステインに) 連結させる。別の態様において、Boc-Cys-(Npy)OH基は、最後の(N末端)アミノ酸およびSH基を保有するオリゴヌクレオチドがペプチドにカップリングされ得るように、輸送ペプチドにカップリングされ得る (Troy et al. 1996. J. Neurosci. 16:253)。

【0211】

一態様において、連結基 (linking group) はヌクレオモノマーに付着され得、輸送ペプチドはリンカーへ共有結合で付着させられ得る。一態様において、リンカーは、輸送ペプチドについての結合部位として、および、ヌクレアーゼに対する安定性を提供し得るものの両方として、機能し得る。好適なリンカーの例は、置換または非置換のC₁～C₂₀アルキル鎖、C₂～C₂₀アルケニル鎖、C₂～C₂₀アルキニル鎖、ペプチドおよびヘテロ原子 (例えばS、O、NHなど) を含む。他の例示的なリンカーは、スルホスクシンイミジル-4-(マレイミドフェニル)-酪酸 (SMPB) (例えばSmith et al. Biochem J 1991.276: 417-2を参照) などの二官能性架橋剤を含む。

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、受容体により媒介されるエンドサイトーシス機構を遺伝子の細胞中への送達のために利用する、分子抱合体として合成される (例えばBunnell et al. 1992. Somatic Cell and Molecular Genetics. 18:559およびこれにおいて引用される参考文献を参照)。

10

20

30

40

50

【0212】

標的化剤

オリゴヌクレオチドの送達はまだ、オリゴヌクレオチドを細胞受容体へ標的化することによっても改善され得る。標的化部分は、オリゴヌクレオチドに抱合させても、オリゴヌクレオチドに結合したキャリア基（すなわち、ポリ（L-リジン）またはリポソーム）に付着させてもよい。この方法は、特異的受容体により媒介されるエンドサイトーシスを呈す細胞にとって良好に適する。

例として、6-ホスホマンノシル化タンパク質に対するオリゴヌクレオチドの抱合体は、マンノース-6-リン酸特異的受容体を発現する細胞により、遊離オリゴヌクレオチドよりも20倍効率的に内部移行される。オリゴヌクレオチドはまた、細胞受容体に対するリガンドに、生分解性リンカーを使用してカップリングされてもよい。別の例において、送達コンストラクトは、ビオチン化オリゴヌクレオチドと緊密な複合体を形成するマンノシル化ストレプトアビジンである。マンノシル化ストレプトアビジンは、ビオチン化オリゴヌクレオチドの内部移行を20倍増大することが見出された（Vlassov et al. 1994. *Biochimica et Biophysica Acta* 1197:95-108）。

10

【0213】

加えて、特異的リガンドは、ポリリジンベースの送達システムのポリリジン成分に抱合させられ得る。例えば、トランスフェリン-ポリリジン、アデノウイルス-ポリリジンおよびインフルエンザウイルス赤血球凝集素HA-2のN末端膜融合ペプチド-ポリリジン抱合体は、真核細胞における受容体媒介性DNA送達を大いに増強する。肺胞マクロファージ中のポリ（L-リジン）に抱合したマンノシル化糖タンパク質は、オリゴヌクレオチドの細胞による取り込みを増強するために採用されている（Liang et al. 1999. *Pharmazie* 54:559-566）。

20

悪性細胞は、葉酸およびトランスフェリンなどの必須栄養素に対して高い必要性を有するので、これらの栄養素は、オリゴヌクレオチドをがん性細胞に標的化するために用いることができる。例えば、葉酸をポリ（L-リジン）に連結させると、前骨髄球性白血病（HL-60）細胞およびヒトメラノーマ（M-14）細胞において増強されたオリゴヌクレオチド取り込みが観察される（Ginobbi et al. 1997. *Anticancer Res.* 17:29）。別の例において、マレイル化されたウシ血清アルブミン、葉酸またはプロトポルフィリン三価鉄IXによりコートされたリポソームは、マウスマクロファージ、KB細胞および2.2.15ヒト肝細胞腫細胞において、オリゴヌクレオチドの増強された細胞による取り込みを示す（Liang et al. 1999. *Pharmazie* 54:559-566）。

30

【0214】

リポソームは、肝臓、脾臓、網膜内皮系において自然に蓄積する（いわゆる受動的標的化）。リポソームを、抗体およびプロテインAなどの多様なリガンドにカップリングすることにより、これらは、特定の細胞集団に対して能動的に標的化され得る。例えば、プロテインA保有リポソームを、マウス主要組織適合複合体によりコードされるL細胞上に発現するH-2Kタンパク質に標的化されたH-2K特異的抗体により、予め処置されてもよい（Vlassov et al. 1994. *Biochimica et Biophysica Acta* 1197:95-108）。

他のin vitroおよび/またはin vivoでのRNAi試薬の送達は、当該技術分野において知られており、目的のRNAiコンストラクトを送達するために使用され得る。例えば、数例を挙げると、米国特許出願公開第20080152661号、同第20080112916号、同第20080107694号、同第20080038296号、同第20070231392号、同第20060240093号、同第20060178327号、同第20060008910号、同第20050265957号、同第20050064595号、同第20050042227号、同第20050037496号、同第20050026286号、同第20040162235号、同第20040072785号、同第20040063654号、同第20030157030号、WO2008/036825、WO04/065601およびAU2004206255B2を参照（全て参照により組み込まれる）。

40

【0215】

処置の適応症

いくつかの側面において、本開示は、疾患に関連するlncRNAを標的とするための

50

sd-rxRNAの使用に関する。いくつかの態様において、疾患に関連するlncRNAは、新生物（例えば、がん）に関連する。がんの例には、肺癌、肝細胞癌、子宮内膜間質肉腫、子宮頸がん、乳がん、骨肉腫および結腸直腸がんを含む。いくつかの態様において、疾患に関連するlncRNAは、アルコール依存症と関連する（例えば、Eimann et al. 2012を参照）。いくつかの態様において、疾患に関連するlncRNAは、ウイルス感染に関連する（例えば、Eimann et al. 2012を参照）。いくつかの態様において、疾患に関連するlncRNAは、糖尿病に関連する（例えば、Liu et al. Cell Death and Disease 2014, 5を参照）。

【0216】

いくつかの例において、sd-rxRNAは、新生物または新生物組織に標的化され、新形成に関連する状態または障害の少なくとも1つの症状を改善するために使用される。新形成は、細胞の異常な増殖を指し、しばしば異常な塊の組織（すなわち、新生物）をもたらす。新生物は、良性、前悪性（例えば、in situの癌）または悪性（がん性）であり得る。良性新生物は、がんに変換しない子宮筋腫およびメラノサイト性母斑（すなわち、母斑）を含む。潜在的に悪性または前がん性の新生物は、周辺組織に浸潤せず、むしろ通常の環境下で増殖する、癌の初期形態であるin situの癌が含まれる。悪性新生物は一般にがんと呼ばれ、周囲の組織に侵入して周囲の組織を破壊し、転移を形成し、最終的に宿主にとって致死的であり得る。

いくつかの例において、sd-rxRNAは、新生物または上皮起源の新生細胞に標的化される。上皮細胞は、内皮で覆われた血管、リンパ管および心臓内部、および中皮で覆われた胸腔および腹腔を除く、体の全表面を覆い、体の中空構造の大部分を覆う1以上の層に存在する。

【0217】

上皮新生物は、これらに限定されないが、乳房線維腫および結腸腺腫などの良性および前悪性上皮腫瘍、および悪性上皮腫瘍を含む。悪性上皮腫瘍は、癌とも呼ばれる原発性腫瘍および上皮起源の転移とも呼ばれる続発性腫瘍を含む。癌は、これらに限定されないが、腺癌、小葉癌、肺癌（腺癌腫、腺筋上皮腫、篩状癌および円柱腫とも称される）、腺腫性癌、腺癌、副腎皮質の癌、肺癌、肺泡上皮癌（細気管支癌、肺泡上皮腫および肺腺腫とも称される）、基底細胞癌、癌性基底細胞（基底細胞癌、または基礎細胞癌、および毛母癌とも称される）、類基底細胞癌、基底扁平細胞癌、乳癌、気管支肺泡上皮癌、細気管支癌、気管支原性肺癌、大脳様癌、胆管細胞癌（胆管癌および胆管細胞癌とも称される）、絨毛癌、粘液癌、面胞癌、コーパス癌（corpus carcinoma）、篩状癌、癌腫（carcinoma en cuirasse）、皮膚癌、円柱状癌、円柱状細胞癌、腺管癌、デュラム癌（carcinoma durum）、胚性癌腫、髄様癌、眼球上癌（epibulbar carcinoma）、類表皮癌、癌腫上皮アデノイド、潰瘍癌、癌腫線維症（carcinoma fibrosum）、ゼラチン様癌（gelatinous carcinoma）、巨細胞癌（giant cell carcinoma）、巨大細胞性腺癌（gigantocellulare, glandular carcinoma）、顆粒膜細胞癌、毛母癌、血液様癌、肝細胞癌（ヘパトーマ、悪性ヘパトーマおよび肝臓癌腫とも称される）、ハースル細胞癌、ヒアリン癌、副腎様癌、乳児胚性癌、上皮内癌（carcinoma in situ）、表皮内癌、上皮内癌（intraepithelial carcinom）、クロミッフエ癌（Krompecher's carcinoma）、クルチツキー細胞癌（Kulchitzky-cell carcinoma）、レンズ状癌（lenticular carcinoma）、レンズ状癌（carcinoma lenticulare）、脂肪腫性癌、リンパ上皮癌、癌腫乳様突起炎（carcinoma mastitoides）、髄様癌（medullary carcinoma）、髄様癌（carcinoma melanodes）、黒色癌、粘液性癌（mucinous carcinoma）、粘液性癌（carcinoma muciparum）、粘液性癌（carcinoma mucocellulare）、粘表皮癌、粘液癌（carcinoma mucosum）、粘液癌（mucous carcinoma）、粘液腫状癌、上咽頭癌、ニグラム癌（carcinoma nigrum）、燕麦細胞癌、骨化性癌（carcinoma ossificans）、骨様癌、卵巣癌、乳頭癌、門脈周囲癌、前浸潤癌、前立腺癌、腎臓の腎細胞癌（腎臓の腺癌および副腎様癌とも称される）、予備細胞癌、肉腫様癌（carcinoma sarcomatodes）、シャインデリアン癌（scheinderman carcinoma）、硬性癌、陰囊癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞癌、ソラノイド癌（solanoide carcinoma）、回転楕円面

10

20

30

40

50

細胞癌、紡錘細胞癌、海綿様癌、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、糸状癌 (string carcinoma)、毛細血管拡張性癌 (carcinoma telangiectaticum)、毛細血管拡張性癌 (carcinoma telangiectodes)、移行上皮癌、結節癌 (carcinoma tuberosum)、結節癌 (tuberous carcinoma)、疣状癌、絨毛癌 (carcinoma vilosum) などを含む。

【0218】

他の例において、sd-rxRNAは、新生物または間葉起源の新生細胞、例えば、肉腫を形成する新生細胞に標的化される。肉腫は、骨および軟部組織において生じるまれな間葉新生物である。脂肪肉腫 (粘液性脂肪肉腫および多形性脂肪肉腫を含む)、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、悪性末梢神経鞘腫 (悪性シュワン腫、神経線維肉腫、または神経原性肉腫とも称される)、ユーイング腫瘍 (骨のユーイング肉腫、骨外性 [非骨] ユーイング肉腫、および原始神経外胚葉性腫瘍 [PNET] を含む)、滑膜肉腫、血管肉腫 (angiosarcomas)、血管肉腫 (hemangiosarcomas)、リンパ肉腫、カボジ肉腫、血管内皮腫、線維肉腫、類腱腫 (侵襲性線維腫症とも称される)、隆起性皮膚線維肉腫 (DFSP)、悪性線維性組織球腫 (MFH)、血管外皮腫、悪性間葉腫、胞状軟部肉腫、類上皮肉腫、明細胞肉腫、線維形成性小細胞腫瘍、消化管間質腫瘍 (GIST) (GI間質性肉腫としても知られる)、骨性および骨外性の骨肉腫 (としても知られる骨原性肉腫)、および軟骨肉腫を含む、異なる型の肉腫が認識される。

【0219】

さらに他の例において、sd-rxRNAはメラニン細胞起源の新生物または新生細胞を標的とする。メラノーマは、皮膚および他の器官のメラニン細胞系から生じる腫瘍である。メラノーマの例は、悪性メラノーマ、表在拡大型メラノーマ、結節性メラノーマおよび末端黒子型メラノーマが含まれる。さらに他の例において、sd-rxRNAは、これらに限定されないが、胆道がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、ポーエン疾患およびパジェット疾患を含む上皮内新生物、肝がん、扁平上皮癌を含む経口がん、線維肉腫および骨肉腫を含む肉腫、メラノーマを含む皮膚がん、カボジ肉腫、胚腫瘍 (セミノーマ、非セミノーマ (テラトーマ、絨毛癌)) を含む精巣がん、間質腫瘍および生殖細胞腫瘍、甲状腺癌および髄様癌を含む甲状腺がん、および、腺癌およびウィルムス腫瘍を含む腎がんにおいて見出されるものを含む、悪性新生物または新生細胞を標的とする。

【0220】

他の例において、sd-rxRNAは、骨、筋肉または結合組織に由来する新生物または新生細胞を標的とする。新生細胞は、骨および結合組織の原発性腫瘍 (例えば、肉腫) において見出され得る。

いくつかの例において、sd-rxRNAは、例えば、針および注射器を使用する注射によって、新生物に直接的に送達される。新生物への注射は、大量のsd-rxRNAが標的細胞に直接的に送達される一方、全身部位への送達を最小化することを可能にする。新生物への直接注射により、sd-rxRNAによるRNA干渉を促進する有効量は、新生物の少なくともかなりの量にわたって分配される。いくつかの例において、sd-rxRNAの送達は、新生物への単一の注射を必要とする。他の例において、sd-rxRNAの送達は、新生物の全体がsd-rxRNAによるRNA干渉を促進するのに有効な量で与えられるように、新生物の別々の領域への複数の注入を必要とする。米国特許第5,162,115号および第5,051,257号およびLivraghi et al, Tumori 72 (1986), pp. 81-87 (これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

【0221】

総用量、濃度、送達されるsd-rxRNAの量、および送達速度は、所与の新生物の型、サイズおよび構造について最適化され得る。これらのパラメータを最適化することにより、RNA干渉帯は制御され得る。新生物に送達されるsd-rxRNAの量および濃度は、腫瘍全体のRNA干渉を促進するのに十分でなければならない。注射の数および新生物の構造に関連するそれらの配置に依存して、新生物の体積未満の、新生物の体積超の、または新生物の体積にほぼ同等の総sd-rxRNA量を投与することは有用であり得る。

10

20

30

40

50

いくつかの例において、*sd-rxRNA*は、移植可能なデバイスを使用して新生物に直接的に送達される。

いくつかの例において、新生物への*sd-rxRNA*注射は、超音波誘導を伴い得る。

【0222】

他の例において、*sd-rxRNA*は、全身投与、例えば、静脈内、動脈内、筋肉内または皮下投与される。

新生物を標的とする*sd-rxRNA*は、いくつかの例において、増殖性遺伝子または新生物組織において他の組織よりも高いレベルで発現される遺伝子を調節 (regulate) または調節 (modulate) する *lncRNA* を標的とする。いくつかの態様において、*sd-rxRNA* は、新生物に関連する *lncRNA* を標的とする。本明細書で使用される場合、**10** 「新生物に関連する」 *lncRNA* は、新生物を有する対象において調節不全にされる (例えば、新生物を有さない対象における発現レベルに対して対象において過剰発現または低発現される) *lncRNA* である。

lncRNA は、神経芽細胞腫、急性リンパ球性白血病、メラノーマ、前立腺がん、肝細胞癌、結腸直腸がん、乳がん、卵巣がんおよび非小細胞肺癌を含むいくつかの異なるがんの型に關与することが示されている。

【0223】

例えば、*lncRNA MALAT1* は、肺、肝細胞癌、子宮内膜間質肉腫、子宮頸がん、乳癌、骨肉腫および結腸直腸がんなどのいくつかのがんにおいて調節不全されることが知られている (例えば、Ei mann et al. RNA Biology, 2012 Aug 1 ; 9(8): 1076-108 **20** 7を参照)。

MALAT1 もまた、糖尿病誘発性の微小血管機能障害において上方調節されることが見出されている (Liu et al. 2014)。いくつかの態様において、*Malat1* は、糖尿病性網膜症などの糖尿病関連微小血管合併症のための抗血管新生療法の標的である。*MALAT1* もまた、ウイルス感染症およびアルコール依存症と関連している。いくつかの態様において、*MALAT1* はウイルス感染症またはアルコール依存症の処置の標的である。

いくつかの側面において、本明細書に記載された方法に従って処置される障害は、高血圧、脳卒中、肥大および心不全を含む心臓血管疾患；アルツハイマー疾患、統合失調症、統合失調性感情障害、双極性障害、大うつ病および自閉症性障害を含む神経学的および精神医学的障害；代謝性疾患；免疫機能不全または炎症に関連する疾患からなる群から選択される。 **30**

【0224】

投与

オリゴヌクレオチドの投与または送達の最適な経路は、所望の結果および/または処置される対象に依存して変動し得る。本明細書に使用される「投与」は、細胞をオリゴヌクレオチドに接触させることを指し、*in vitro*で、または*in vivo*で実施され得る。標的核酸分子から翻訳されるタンパク質の発現を最適に減少させるために、オリゴヌクレオチドの投薬量は、例えばRNA安定性の読み出しによりまたは治療応答により測定されるものとして、過度の実験なしに調整されてもよい。 **40**

例えば、核酸標的によりコードされるタンパク質の発現が測定され得、投薬レジメンがそれに従って調整される必要があるか否かを決定し得る。加えて、細胞におけるまたは細胞により産生されるRNAまたはタンパク質のレベルの増大または減少は、当該技術分野において認識されるいずれの技術をも使用して測定され得る。転写が減少したか否かを決定することにより、標的RNAの切断を誘導する上でのオリゴヌクレオチドの有効性が決定され得る。

【0225】

上記オリゴヌクレオチド組成物のいずれも、単独でまたは薬学的に許容し得るキャリアと組み合わせて、使用され得る。本明細書に使用される「薬学的に許容し得るキャリア」は、好適な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅 **50**

延剤などを含む。医薬活性物質のためのかかる媒体および剤は、当該技術分野において周知である。従来 of いずれの媒体または剤が活性成分と適合しない場合を除いて、これは治療用組成物において使用され得る。補足の活性成分もまた、組成物中に組み込まれ得る。

【0226】

いくつかの態様において、本開示は、オリゴヌクレオチド（例えば、単離された二本鎖核酸分子）を含有する組成物（例えば、医薬組成物）に関する。いくつかの態様において、組成物は、さらなる治療剤を含む。さらなる治療剤の非限定的例は、これらに限定されないが、核酸（例えば、*s d - r x R N A* など）、小分子（例えば、がん、神経変性疾患、感染性疾患、自己免疫疾患などを処置するのに有用な小分子）、ペプチド（例えば、がん、神経変性疾患、感染性疾患、自己免疫疾患などを処置するのに有用なペプチド）およびポリペプチド（例えば、がん、神経変性疾患、感染性疾患、自己免疫疾患などを処置するのに有用な抗体）を含む。本開示の組成物は、いくつかの態様において、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多いさらなる治療薬を有してもよい。いくつかの態様において、組成物は、10よりも多いさらなる治療薬を含む。

10

【0227】

オリゴヌクレオチドは、非経口投与のために、リポソームもしくはポリエチレングリコールで修飾されたリポソーム中へ組み込んでも、または、カチオン性脂質と混和されてもよい。追加の物質、例えば特定の標的細胞上に見出される膜タンパク質に対して反応性の抗体の、リポソーム中への組み込みは、特異的な細胞型に対するオリゴヌクレオチドの標的化に役立ち得る。

20

*in vivo*での適用に関して、本発明の製剤を、選択した投与の経路（例えば、非経口、経口または腹腔内）に適応した種々の形態で患者に投与することができる。好ましい非経口投与は、以下の経路による投与を含む：静脈内；筋肉内；間質内（*interstitially*）；動脈内；皮下；眼内；滑膜内（*intrasynovial*）；経皮を含む経上皮；吸入を介した肺；眼（*ophthalmic*）；舌下および口腔内；眼（*ophthalmic*）を含む局所；経皮；眼（*ocular*）；直腸；ならびに送気を介した経鼻吸入。好ましい態様において、*s d - r x R N A*分子は、皮内注射によりまたは皮下的に投与される。

【0228】

*in vivo*適用に関連して、いくつかの態様において、本発明の製剤は、コンストラクトを眼に送達するように適合された種々の形態で患者に投与され得る。いくつかの態様において、非経口投与は眼である。眼内投与は、硝子体内、前房内、網膜下、結膜下、またはテノン嚢下であり得る。

30

*s d - r x R N A*分子は、それらを全身に送達することが望ましいとき、注射による（例えば、ポーラス注射または連続注入による）非経口投与用に処方され得る。注射用製剤は、単位投薬量形態、例えば、アンプルまたは複数用量容器中に、防腐剤を加えて提供され得る。組成物は、油性または水性ビヒクルの懸濁液、溶液またはエマルジョンなどの形態をとり得、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤などの処方剤を含有し得る。

【0229】

非経口投与用の医薬製剤は、水溶性または水分散性の形態での活性化合物の水溶液を含む。加えて、好適な油性注射用懸濁液としての活性化合物の懸濁液も、投与されてもよい。好適な親油性溶媒またはビヒクルは、脂肪油、例えばゴマ油、または、合成脂肪酸エステル類、例えばオレイン酸エチルまたはトリグリセリドを含む。水性注射用懸濁液は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどの、懸濁液の粘性を増大させる物質を含有してもよく、任意に、懸濁液はまた、安定化剤を含んでもよい。本発明のオリゴヌクレオチドは、液体の溶液、好ましくはハンクス溶液またはリンガー溶液などの生理学的に適合性の緩衝液中で処方されてもよい。さらに、オリゴヌクレオチドは、固体の形態において処方されて、使用の直前に再溶解されるか懸濁されてもよい。凍結乾燥形態もまた、本発明において含まれる。

40

局所投与用の医薬製剤は、経皮貼付剤、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴下剤、スプレー、坐剤、液体または粉末を含む。加えて、従来 of 医薬用キャリア、水性、粉末ま

50

たは油性の基剤、または、増粘剤も、局所投与用の医薬製剤に使用されてもよい。

【0230】

経口投与用の医薬製剤は、散剤または顆粒、水または非水性媒体中の懸濁液または、溶液、カプセル、サケット (sachet) または錠剤を含む。加えて、増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散化補助剤または結合剤も、経口投与用の医薬製剤に使用されてもよい。

経粘膜または経皮投与用に、浸透すべき障壁に適切な浸透剤 (penetrant) が、製剤中に使用される。かかる浸透剤は当該技術分野において知られており、例えば、経粘膜投与用に、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体ならびに界面活性剤を含む。経粘膜投与は、鼻用スプレーを通して、または、坐剤を使用するものであってもよい。経口投与用に、オリゴヌクレオチドが、カプセル、錠剤およびトニックなどの従来の経口投与形態中へ製剤化される。局所投与用に、本発明のオリゴヌクレオチドが、当該技術分野において知られている軟膏 (ointment)、軟膏 (salve)、ゲルまたはクリーム中へに製剤化される。

10

【0231】

吹送などの吸入による投与のために、本発明による使用のための *s d - r x R N A* 分子は、加圧パックまたは噴霧器からのエアロゾルスプレー提示の形態で、好適な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガスを使用して、便利に送達され得る。加圧エアロゾルの場合、投薬量単位は、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。例えば、吸入器または注入器における使用のためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物と乳糖またはデンプンなどの好適な粉末基剤との粉末混合物を含有するように処方され得る。

20

【0232】

本明細書では *s d - r x R N A* 分子の肺送達についても考慮される。 *s d - r x R N A* 分子は、吸入しながら哺乳動物の肺に送達され、肺上皮の内側を横切って血流に至る。吸入分子の他の報告は、Adjei et al., 1990, *Pharmaceutical Research*, 7:565 569; Adjei et al., 1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135 144 (酢酸ロイプロリド); Braquet et al., 1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13(suppl. 5):143 146 (エンドセリン - 1); Hubbard et al., 1989, *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pp. 206 212 (a1 抗トリプシン); Smith et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (a1 - プロテイナーゼ); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March (組換えヒト成長ホルモン); Debs et al., 1988, *J. Immunol.* 140:3482 3488 (インターフェロン γ および腫瘍壊死因子アルファ) および Platz et al., U.S. Patent No. 5,284,656 (顆粒球コロニー刺激因子) を含む。全身効果のための薬物の肺送達のための方法および組成物は、1995年9月19日に発行された Wong et al. の米国特許第 5,451,569号に記載されており、参照によって組み込まれる。

30

【0233】

本発明の実施における使用のために考慮されるものは、これらに限定されないが、当業者によく知られている噴霧器、計量吸入器、および粉末吸入器を含む治療用製品の肺送達のために設計された広範囲の機械デバイスである。

40

本発明の実施に好適な市販のデバイスのいくつかの具合的な例は、Mallinckrodt, Inc. (St. Louis, Missouri) によって製造された Ultravent 噴霧器; Marquest Medical Products (Englewood, Colorado) によって製造された Acorn II 噴霧器; Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina によって製造された Ventolin 計量吸入器; および Fisons Corp., Bedford, Massachusetts によって製造された Spinhaler 粉末吸入器である。

【0234】

かかるデバイスはすべて、オリゴヌクレオチド (または誘導体) の分配に好適な製剤の使用を必要とする。典型的には、各製剤は、採用されるデバイスの型に特異的であり、治療に有用な通常の希釈剤、アジュバントおよび/またはキャリアに加えて、適切な噴射剤材料の使用を伴い得る。また、リポソーム、マイクロカプセルまたはマイクロスフィア、

50

包接体、または他の型のキャリアの使用が考慮される。化学修飾されたオリゴヌクレオチドもまた、化学修飾の型または採用されるデバイスの型に依存して異なる製剤で調製され得る。

【0235】

ジェットまたは超音波のいずれかの噴霧器での使用に好適な製剤は、典型的には、溶液 1 mL 当たり約 0.1 ~ 25 mg の生物学的に活性なオリゴヌクレオチドの濃度で水に溶解したオリゴヌクレオチド（または誘導体）を含むであろう。同製剤もまた、緩衝液および単糖（例えば、オリゴヌクレオチドの安定化および浸透圧の調節のため）を含み得る。噴霧剤製剤もまた、界面活性剤を含有して、エアロゾルを形成する際の溶液の霧化によって引き起こされるオリゴヌクレオチドの表面誘導凝集を減少または予防し得る。

10

【0236】

計量吸入器デバイスでの使用のための製剤は、一般に、界面活性剤の支援で噴射剤中に懸濁された *s d - r x R N A* 分子を含有する、乾燥粉末製剤などの微細に分割された粉末を含むであろう。噴射剤は、クロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、またはトリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、および 1, 1, 1, 2 テトラフルオロエタンを含む炭化水素、またはそれらの組み合わせなどの、この目的に採用される任意の従来の材料であり得る。好適な界面活性剤は、トリオレイン酸ソルビタンおよび大豆レシチンを含む。オレイン酸もまた界面活性剤として有用であり得る。

【0237】

粉末吸入器デバイスから分配するための製剤は、オリゴヌクレオチド（または誘導体）を含有する微細に分割された乾燥粉末を含むであろうし、また、デバイスからの粉末の分散を容易にする量、例えば製剤の 50 ~ 90 重量%、の乳糖、ソルビトール、スクロースまたはマンニトールなどの増量剤を含み得る。*s d - r x R N A* 分子は、離れた肺への最も有効な送達のために、10 mm（またはミクロン）未満、最も好ましくは 0.5 ~ 5 mm の平均粒子サイズを有する微粒子形態で調製され得る。

20

本発明の医薬組成物の鼻内送達もまた考慮される。鼻内送達は、肺における製品の沈着の必要性なしに、治療用製品を鼻に投与した後に、本発明の医薬組成物が血流へ直接的に通過することを可能にする。鼻内送達のための製剤はデキストランまたはシクロデキストランを有するものを含む。

30

【0238】

鼻内投与について、有用なデバイスは、計量スプレーが取り付けられた小型の硬い瓶である。一態様において、計量された投与量は、本発明の溶液の医薬組成物を所定の容積のチャンパーに引き込むことによって送達され、同チャンパーは、チャンパー内の液体が圧縮されたときにスプレーを形成することによってエアロゾル製剤をエアロゾル化するように寸法決めされた開口部を有する。チャンパーは本発明の医薬組成物を投与するために圧縮される。具体的な態様において、チャンパーはピストン配置である。かかるデバイスは市販されている。

代替的には、圧搾されたときにスプレーを形成することによってエアロゾル製剤をエアロゾル化するように寸法決めされた開口部（aperture）または穴（opening）を有するプラスチック製の瓶型搾り出し容器（squeeze bottle）が使用される。穴は、通常、瓶の上部に見られ、上部は、エアロゾル製剤の効率的な投与のために、鼻内通路に部分的に収まるように、一般に先細になっている。好ましくは、鼻内吸入器は、測定された用量の薬物を投与するために、計量された量のエアロゾル製剤を提供するであろう。

40

【0239】

薬物送達ビヒクルは、例えば *in vitro* での投与のため、全身投与のためまたは局所投与のために、選ばれ得る。これらのビヒクルは、遅延放り出りバとして機能するように、または、この含有物を標的細胞に直接的に送達するように、設計され得る。いくつかの直接送達用薬物ビヒクルを使用する利点は、1回の取り込みごとに複数の分子が送達されることである。かかるビヒクルは、さもなくば血流から急速にクリアランスされるであろう

50

薬物の循環半減期を延長することが示されている。このカテゴリーに分類されるかかる特殊化された薬物送達ビヒクルのいくつかの例は、リポソーム、ハイドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセルおよび生体粘着性マイクロスフィアである。

【0240】

記載のオリゴヌクレオチドは、対象へ全身投与されてもよい。全身吸収は、これに続いて全身にわたって分布する、薬物の血流中への侵入を指す。全身吸収をもたらす投与経路は以下を含む：静脈内、皮下、腹腔内および鼻内。これらの投与経路の各々は、オリゴヌクレオチドを、アクセス可能な罹患細胞に送達する。皮下投与に続いて、治療剤は局所リンパ節中へ流れ、リンパのネットワークを通して循環中へと進む。循環中への侵入の速度は、分子量またはサイズの関数であることが示されている。リポソームまたは他の薬物キャリアの使用は、オリゴヌクレオチドをリンパ節に局在させる。オリゴヌクレオチドを細胞中へ拡散するように修飾しても、未修飾または修飾オリゴヌクレオチドの細胞中への送達にリポソームが直接的に参加してもよい。

10

【0241】

選ばれた送達方法は、細胞中への侵入をもたらすであろう。いくつかの態様において、好ましい送達方法は、リポソーム（10～400nm）、ハイドロゲル、制御放出ポリマーおよび他の薬学的に適用可能なビヒクルならびにマイクロインジェクションまたはエレクトロポレーション（*ex vivo*での処置のため）を含む。

本発明の医薬製剤は、エマルジョンとして調製され製剤化されてもよい。エマルジョンは通常、1つの液体が別の液体中に通常は直径0.1μmを超える液滴の形態で分散した、均質な系である。本発明のエマルジョンは、乳化剤、安定化剤、色素、脂質、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、保存剤などの賦形剤を含んでもよく、抗酸化剤もまた、必要に応じてエマルジョン中に存在してもよい。賦形剤は、水相、油相またはそれ自体が別の相として、溶液として存在してもよい。

20

【0242】

本発明のエマルジョン製剤に使用されてもよい天然に存在する乳化剤の例は、ラノリン、ミツロウ、リン脂質、レシチンおよびアカシアを含む。微細に分割された固体もまた、特に界面活性剤と組み合わせ、粘性の製剤において、良好な乳化剤として使用されてきた。乳化剤として使用されてもよい微細に分割された固体は、重金属水酸化物などの極性無機固体、ベントナイト、アタパルジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウムおよびコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウムなどの非膨潤性粘土、顔料ならびに炭素またはステアリン酸グリセリルなどの非極性固体を含む。

30

【0243】

エマルジョン製剤に含まれてもよい保存剤の例は、メチルパラベン、プロピルパラベン、4級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステルおよびホウ酸を含む。エマルジョン製剤に含まれてもよい抗酸化剤の例は、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエンなどのフリーラジカルスカベンジャーまたはアスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウムなどの還元剤ならびにクエン酸、酒石酸およびレシチンなどの抗酸化剤補助剤（antioxidant synergist）を含む。

40

【0244】

一態様において、オリゴヌクレオチドの組成物は、マイクロエマルジョン（microemulsion）として製剤化される。マイクロエマルジョンは、水、油および両親媒性物質の系であって、単一の光学的等方性および熱力学的安定性の溶液である。典型的には、マイクロエマルジョンは、第1に油を水性界面活性剤溶液中に分散させ、次いで、透明な系を形成するために、十分な量の第4の成分、一般的には中程度の鎖長のアルコールを加えることにより調製される。

マイクロエマルジョンの調製において使用されてもよい界面活性剤は、これらに限定されないが、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレン

50

オレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル類、テトラグリセロールモノラウレート (ML310)、テトラグリセロールモノオレアート (MO310)、ヘキサグリセロールモノオレアート (PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレアート (PO500)、デカグリセロールモノカプラート (MCA750)、デカグリセロールモノオレアート (MO750)、デカグリセロールセキオレアート (SO750)、デカグリセロールデカオレアート (DA0750) が、単独でまたは共界面活性剤 (cosurfactant) と組合せて、含む。共界面活性剤、通常はエタノール、1-プロパノールおよび1-ブタノールなどの短鎖アルコールは、界面活性剤のフィルム中に浸透して、その後、界面活性剤分子の間で生み出される空隙のために不規則なフィルムを作り出すことにより、界面の流動性を増大させるのに役立つ。

【0245】

しかしながら、マイクロエマルジョンは、共界面活性剤の使用なしで調製されてもよく、アルコールを含まない自己乳化マイクロエマルジョン系が、当該技術分野において知られている。水相は、典型的には、これらに限定されないが、水、薬物の水溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコールおよびエチレングリコールの誘導体であってもよい。油相は、これらに限定されないが、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル類、中鎖 ($C_8 \sim C_{12}$) モノ、ジおよびトリ-グリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル類、脂肪アルコール類、ポリグリコール化 (polyglycolized) グリセリド、飽和ポリグリコール化 $C_8 \sim C_{10}$ グリセリド、植物油およびシリコン油などの材料を含んでもよい。

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化および増強された薬物の吸収の観点から特に関心がある。脂質ベースのマイクロエマルジョン (油/水および水/油の両方) が、薬物の経口でのバイオアベイラビリティを増強するために提案されている。

【0246】

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化の改善、酵素による加水分解からの薬物の保護、界面活性剤により誘導される膜の流動性および透過性の変化に起因する薬物吸収の増強の可能性、調製の容易性、固体投与形態と比べた経口投与の容易性、臨床的効力の改善ならびに毒性の低減を与える (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11:1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85:138-143)。マイクロエマルジョンはまた、化粧品および医薬適用の両方における、活性成分の経皮送達においても有効であった。本発明のマイクロエマルジョンの組成物および製剤は、胃腸管からのオリゴヌクレオチドの全身吸収の増大を促進し、ならびに、胃腸管、膈、口腔および他の投与の領域内における、オリゴヌクレオチドの局所的な細胞による取り込みを改善することが予測される。

【0247】

一態様において、本発明は、核酸、特にオリゴヌクレオチドの、動物の皮膚への効率的な送達に影響を及ぼす多様な浸透増強剤を採用する。越えるべき膜を浸透増強剤で処置した場合、非親油性薬物すら、細胞膜を越えることができる。細胞膜を越える非親油性薬物の拡散を増大することに加えて、浸透増強剤はまた、親油性薬物の浸透性を増強するようにも作用する。

本発明において使用されてもよい5種のカテゴリーの浸透増強剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤および非キレート性非界面活性剤を含む。投与されるオリゴヌクレオチドの浸透を増強するために利用されてもよい他の剤は、エチレングリコールおよびプロピレングリコールなどのグリコール類、2-15ピロールなどのピロール類、アゾン類、リモネンなどのテルペン類ならびにメントンを含む。

【0248】

オリゴヌクレオチド、特に脂質製剤中のものはまた、医療用デバイス、例えば血管形成バルーンカテーテルなどのカテーテルを、カチオン性脂質製剤によりコーティングすることによっても投与され得る。コーティングは、例えば脂質製剤または脂質製剤と、好適な溶媒、例えば水をベースとする緩衝液、水性溶媒、エタノール、塩化メチレン、クロロフォルムなど、との混合物中に、医療用デバイスを浸漬することにより、達成されてもよい。一定量の製剤がデバイスの表面に自然に接着し、デバイスがその後適宜患者へ投与され

10

20

30

40

50

る。代わりに、脂質製剤の凍結乾燥混合物は、デバイスの表面に特異的に結合されてもよい。かかる結合技術は、例えばK. Ishihara et al., Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 27, pp. 1309-1314 (1993)に記載され、その開示は、本明細書においてその全体を参照により組み込まれる。

【0249】

投与されるべき有用な投薬量および特定の投与の形態は、細胞型、in vivoでの使用については年齢、体重および特定の動物および処置されるべきその領域、使用される特定のオリゴヌクレオチドおよび送達方法、企図される治療および診断用途ならびに製剤の形態、例えば懸濁液、エマルジョン、ミセルまたはリポソームなどの要因に依存して変動し、このことは当業者に容易に明らかであろう。典型的には、投薬量は、より低い量で投与され、所望の結果が達成されるまで増加させられる。オリゴヌクレオチドを送達するために脂質が使用されるとき、投与される脂質化合物の量は変化し得、一般に、投与されているオリゴヌクレオチド剤の量に依存する。例えば、脂質化合物のオリゴヌクレオチド剤に対する重量比は、好ましくは約1:1から約15:1までであり、約5:1~約10:1の重量比がより好ましい。一般に、投与されるカチオン性脂質化合物の量は、約0.1ミリグラム(mg)~約1グラム(g)まで変化する。一般的なガイドンスのために、典型的には、患者の体重の各1kg毎に約0.1mg~約10mgの特定のオリゴヌクレオチド剤および約1mg~約100mgの脂質組成物が投与されるが、より高いおよびより低い量も使用され得る。

10

【0250】

本発明の剤は、医薬の投与に好適な生物学的に適合性の形態で、対象へ投与されるか、または、細胞と接触させられる。「投与に好適な生物学的に適合性の形態」は、オリゴヌクレオチドの治療効果があらゆる毒性効果を凌ぐ形態で、オリゴヌクレオチドが投与されることを意味する。一態様において、オリゴヌクレオチドは、対象へ投与される。対象の例は、哺乳動物、例えばヒトおよび他の霊長類；ウシ、ブタ、ウマおよび農耕(farming)(農業(agricultural))用動物；イヌ、ネコおよび他の家庭のペット；マウス、ラットおよびトランスジェニック非ヒト動物を含む。

20

【0251】

本発明のオリゴヌクレオチドの活性量の投与は、所望の結果を達成するために必要な投与量および時間において、有効量として定義される。例えば、オリゴヌクレオチドの活性量は、細胞の型、使用されるオリゴヌクレオチド、ならびに、in vivoでの使用については疾患の状態、個体の年齢、性別および体重、ならびに、個体において所望の応答を惹起するオリゴヌクレオチドの能力などの因子に従って変動してもよい。細胞中でのオリゴヌクレオチドの治療的レベルの確立は、取り込みの速度と流出または分解の速度に依存する。分解の度合いを低下させることは、オリゴヌクレオチドの細胞内半減期を延長する。よって、化学修飾されたオリゴヌクレオチド、例えばリン酸骨格の修飾を持つものは、異なる用量を必要とする場合がある。

30

【0252】

正確なオリゴヌクレオチドの投薬量および投与される用量の回数は、実験的におよび臨床試験において生み出されるデータに依存するであろう。所望の効果、送達ビヒクル、疾患の兆候および投与の経路などの数個の因子が、投薬量に影響を及ぼすであろう。投薬量は当業者により容易に決定され得、対象とする医薬組成物中へ製剤化される。好ましくは、処置の期間は、少なくとも疾患の症状の経過全体に及ぶであろう。

40

投薬レジメンは、最適な治療応答を提供するために調整されてもよい。例えば、オリゴヌクレオチドは、繰り返して投与されてもよく、例えば数回の用量が毎日投与してもよく、または、その用量が、治療状況の要件に従って比例的に低減させてもよい。オリゴヌクレオチドが細胞へ投与されるかまたは対象へ投与されるかに関わらず、当業者は、対象とするオリゴヌクレオチドの適切な用量および投与のスケジュールを容易に決定することができるであろう。

【0253】

50

s d - r x R N A の硝子体内、前房内、網膜下、結膜下、およびテノン嚢下投与を含む眼内投与は、投薬レジメンの試験を通して最適化され得る。いくつかの態様において、単回投与で充分である。投与された s d - r x R N A の効果をさらに延長するために、s d - r x R N A は、当業者が精通しているとおり、遅延放出製剤またはデバイスにおいて投与され得る。s d - r x R N A 化合物の疎水性の性質により、広範で多様なポリマーの使用が可能となり、これらのいくつかは、従来のオリゴヌクレオチド送達に適合しない。

【0254】

s d - r x R N A の静脈内投与は、投薬レジメンの試験を通じて最適化され得る。いくつかの例において、静脈内投与は、例えば、注入ポンプを使用して対象の循環系に分子を注入することを通じた注入を通じて達成される。注入は、連続的または断続的であり得る。いくつかの例において、投薬レジメンが短期連続注入の反復投与を伴うことが好ましい。例えば、連続注入は、いずれの中間値を含む、およそ、5分間、10分間、20分間、30分間、40分間、50分間、1.0時間、1.1時間、1.2時間、1.3時間、1.4時間、1.5時間、1.6時間、1.7時間、1.8時間、1.9時間、2.0時間、2.1時間、2.2時間、2.3時間、2.4時間、2.5時間、2.6時間、2.7時間、2.8時間、2.9時間、3.0時間、3.1時間、3.2時間、3.3時間、3.4時間、3.5時間、3.6時間、3.7時間、3.8時間、3.9時間、4.0時間、4.1時間、4.2時間、4.3時間、4.4時間、4.5時間、4.6時間、4.7時間、4.8時間、4.9時間、5.0時間、5.1時間、5.2時間、5.3時間、5.4時間、5.5時間、5.6時間、5.7時間、5.8時間、5.9時間、6.0時間、または6.0時間超、持続し得る。

10

20

【0255】

注入は反復的であり得る。いくつかの例において、それは、毎日、隔週、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月、2ヶ月毎、3ヶ月毎、4ヶ月毎、5ヶ月毎、6ヶ月毎、または6ヶ月毎よりも低頻度で投与される。いくつかの例において、それは、1日、1週間、1ヶ月および/または1年に複数回投与される。例えば、それは、およそ、1時間毎、2時間毎、3時間毎、4時間毎、5時間毎、6時間毎、7時間毎、8時間毎、9時間毎、10時間毎、12時間毎または12時間超毎に投与され得る。それは、1日当たり、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回または10回超、投与され得る。

皮内注射または皮下送達などを通じた s d - r x R N A の投与は、投薬レジメンの試験を通じて最適化され得る。いくつかの態様において、単一の投与は十分である。投与された s d - r x R N A の効果をさらに延長するために、当業者によく知られているように、s d - r x R N A は、徐放性製剤またはデバイスで投与され得る。s d - r x R N A 化合物の疎水性の性質は、多様なポリマー、そのうちのいくつかは従来のオリゴヌクレオチド送達に適合しないものである、の使用を可能にし得る。

30

【0256】

他の態様において、s d - r x R N A は複数回投与される。いくつかの例において、これは、毎日、週2回、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月、2カ月毎、3カ月毎、4カ月毎、5カ月毎、6カ月毎または6カ月に1回未満、投与される。いくつかの例において、これは、1日、1週間、1カ月および/または1年あたり、複数回投与される。例えば、これは、およそ1時間毎、2時間毎、3時間毎、4時間毎、5時間毎、6時間毎、7時間毎、8時間毎、9時間毎、10時間毎、12時間毎、または12時間よりも長い時間毎に、投与することができる。これは、1日あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または10回よりも多い回数、投与することができる。

40

本発明の側面は、s d - r x R N A 分子を対象へ投与することに関する。いくつかの例において、対象は患者であり、s d - r x R N A 分子の投与には、s d - r x R N A 分子を医院で投与することが関与する。いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、連続注入は正常なクリアランス機構を飽和させ、血液中で比較的高い化合物レベルを維持して組織分配を確実にする。s d - r x R N A は、それらの低レベルの毒性のためかかるアプローチによく適している。

50

【0257】

いくつかの例において、眼内投与を通じて送達される $sd-rxRNA$ の有効量は、いずれの中間値を含む、少なくともおよそ、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 μg または 100 μg 超である。

10

【0258】

本明細書に記載の方法を通じて投与される $sd-rxRNA$ 分子は、眼における全ての細胞型を効果的に標的とする。

いくつかの態様において、1種より多くの $sd-rxRNA$ 分子が同時に投与される。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種または10種より多くの異なる $sd-rxRNA$ 分子を含む組成物が投与されてもよい。ある態様において、組成物は2または3種の異なる $sd-rxRNA$ 分子を含む。組成物が1種より多くの $sd-rxRNA$ 分子を含むとき、組成物中の $sd-rxRNA$ 分子は、同一の遺伝子または異なる遺伝子に指向し得る。

20

【0259】

いくつかの例において、皮下投与によって送達される $sd-rxRNA$ の有効量は、少なくともおよそ1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 mg/kg 、または100 mg/kg より多く、全ての中間の値を含む。

30

【0260】

皮下投与もまた反復的であり得る。いくつかの例において、それは、毎日、隔週、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月、2ヶ月毎、3ヶ月毎、4ヶ月毎、5ヶ月毎、6ヶ月毎、6ヶ月毎よりも低頻度で投与される。いくつかの例において、それは、1日、1週間、1ヶ月おおよび/または1年に複数回投与される。例えば、それは、およそ、1時間毎、2時間毎、3時間毎、4時間毎、5時間毎、6時間毎、7時間毎、8時間毎、9時間毎、10時間毎、12時間毎または12時間超毎に投与され得る。それは、1日当たり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回または10回超投与され得る。

40

【0261】

いくつかの例において、 $sd-rxRNA$ は吹送を通じて投与される。いくつかの例において、吹送によって送達される $sd-rxRNA$ の有効量は、いずれの中間値を含む、少なくとも、およそ、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、

50

82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 mg/kgまたは100 mg/kg超である。

【0262】

吹送による投与もまた反復的であり得る。いくつかの例において、それは、毎日、隔週、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月、2ヶ月毎、3ヶ月毎、4ヶ月毎、5ヶ月毎、6ヶ月毎、6ヶ月毎よりも低頻度で投与される。いくつかの例において、それは、1日、1週間、1ヶ月および/または1年に複数回投与される。例えば、それは、およそ、1時間毎、2時間毎、3時間毎、4時間毎、5時間毎、6時間毎、7時間毎、8時間毎、9時間毎、10時間毎、12時間毎または12時間超毎に投与され得る。それは、1日当たり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回または10回超投与され得る。

10

【0263】

静脈内、皮下および吹送を含む本明細書に記載の方法によって投与される sd-rxRNA 分子は、肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓および皮膚を含む体内の種々の遠隔組織を標的とし得る。

いくつかの例において、皮内注射を通じて送達される sd-rxRNA の有効量は、少なくとも約 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 μ g または 950 μ g より多く、全ての中間の値を含む。

20

【0264】

本明細書に記載の方法により投与される sd-rxRNA 分子は、皮膚における全ての細胞型に対して効率的に標的化される。

対象（例えば、対象の細胞）中へ核酸を導入する種々の様式が、本開示により企図される。例えば、核酸（例えば、核酸を含む溶液）を対象へ注射（例えば、細胞へ注射）することができ、または、核酸で被覆された粒子を対象（例えば、細胞）に衝突させることができる。いくつかの態様において、細胞または生体が、核酸の溶液中に浸漬される。いくつかの態様において、核酸は、核酸の存在下における細胞膜のエレクトロポレーションによって細胞中または生体中へ導入される。いくつかの態様において、核酸を含むウイルスコンストラクトがウイルス粒子中にパッケージングされて、細胞中への核酸の導入および核酸の転写を達成する。対象（例えば、対象の細胞）中へ核酸を導入するための様式のさらなる例は、これらに限定されないが、脂質媒介性キャリア輸送、化学媒介性輸送（例えば、リン酸カルシウム）などを含む。

30

【0265】

核酸は、追加の構成要素とともに導入することができる。例えば、いくつかの態様において、核酸は、細胞による核酸の取り込みを増強する構成要素とともに導入される。いくつかの態様において、核酸は、一本鎖のアニリングを阻害する構成要素とともに導入される。いくつかの態様において、核酸は、核酸分子を安定化させるか、あるいはそうでなければ標的遺伝子の阻害を増大させる、構成要素とともに導入される。

核酸は、細胞中へ直接導入されても（すなわち細胞内で）；または細胞外から、腔、間質の空間中へ、生体の循環中へ導入しても、経口で導入しても、または、細胞もしくは生体を、核酸を含む溶液中に浸漬することにより導入されてもよい。血管のまたは血管外の循環、血液またはリンパ系および脳脊髄液は、核酸が導入されてもよい部位である。

40

【0266】

いくつかの態様において、標的遺伝子を持つ細胞は、いずれの生物から由来してもよい。いくつかの態様において、標的遺伝子を持つ細胞は、いずれの生物に含有され（例えば、格納され、または内に存在し）てもよい。例えば、生物は、植物、動物、原虫、細菌、節足動物、ウイルスまたは真菌であってよい。植物は、単子葉、双子葉または裸子植物であってよく；動物は脊椎動物であっても無脊椎動物であってもよい。好ましい微生物は、農業においてまたは工業により使用されるものであり、植物または動物に対して病原性で

50

あるものである。

代わりに、ベクター、例えば本発明の s i R N A をコードする導入遺伝子は、当該技術分野において認識される技術を使用して、宿主細胞またはトランスジェニック動物中へ操作され得る。

【 0 2 6 7 】

本発明の剤（またはそれをコードするベクターまたは導入遺伝子）についてのさらに好ましい使用は、真核細胞または真核の非ヒト生物、好ましくは哺乳動物の細胞または成体、最も好ましくはヒト細胞、例えば H e L a または 2 9 3 などの細胞株、または、げっ歯類、例えばラットおよびマウスにおいて行われる機能分析である。標的特異的 R N A 干渉に指向させるために標的 m R N A 配列に対して十分に相補的である好適なプライミング剤 / R N A i 剤を投与することにより、標的細胞において、例えば細胞培養においてまたは標的生物において、特異的なノックアウトまたはノックダウン表現型が得られ得る。

10

【 0 2 6 8 】

よって、本発明のさらなる主題は、標的遺伝子特異的ノックアウトまたはノックダウン表現型を示す真核細胞または真核の非ヒト生物であって、完全に、または少なくとも部分的に、少なくとも1つの内因性標的遺伝子の発現を欠損するものであって、ここで、該細胞または生物は、標的遺伝子の発現を阻害することができる R N A i 剤をコードする D N A を含む、少なくとも1つのベクターによりトランスフェクトされている。本発明が、R N A i 剤の特異性に起因して、数個の異なる内因性遺伝子の標的特異的ノックアウトまたはノックダウンを可能にすることは、注目されるべきである。

20

細胞または非ヒト生物、特にヒト細胞または非ヒト哺乳動物の遺伝子特異的ノックアウトまたはノックダウン表現型は、処理の分析 (analytic to procedures) において、例えば遺伝子発現プロファイルおよび / またはプロテオームの分析などの複雑な生理学的プロセスの機能的および / または表現型的分析において、使用されてもよい。好ましくは、分析は、オリゴヌクレオチドベースのチップを使用するハイスループット法により行われる。

【 0 2 6 9 】

治療的使用

遺伝子（例えば l n c R N A ）の発現を阻害することにより、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、l n c R N A の発現が関与するあらゆる疾患を処置するために使用することができる。オリゴヌクレオチド組成物によって処置され得る疾患の例は、ただ例示のために、がん、網膜症、自己免疫疾患、炎症性疾患（すなわち、I C A M - 1 関連障害、乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン疾患）、ウイルス性疾患（すなわち、H I V、C 型肝炎）、m i R N A 障害、および心血管血管疾患を含む。

30

【 0 2 7 0 】

一態様において、オリゴヌクレオチドによる in vitro での細胞の処置を、対象から取り除かれた細胞の ex vivo での治療のため（例えば白血病またはウイルス感染の処置のため）、または、対象に由来しないが対象へ投与される予定の細胞の処置のため（例えば対象へ移植される予定の細胞における移植抗原の発現の除去）に使用することができる。加えて、in vitro での細胞の処置を、非治療的セッティングにおいて、例えば遺伝子の機能を評価するため、遺伝子の調節およびタンパク質合成を研究するため、または、遺伝子発現またはタンパク質合成を調節するように設計されたオリゴヌクレオチドに対して行われた改善を評価するために、使用することができる。in vivo での細胞の処置は、タンパク質の発現を阻害することが望ましい特定の臨床的セッティングにおいて有用であり得る。アンチセンス治療が好適であることが報告されている多数の医療条件（例えば米国特許第5,830,653号を参照）ならびに呼吸器多核体ウイルス感染症（W095/22,553）、インフルエンザウイルス（W094/23,028）および悪性腫瘍（W094/08,003）が存在する。アンチセンス配列の臨床的使用の他の例は、例えば Glaser, 1996. Genetic Engineering News 16:1 において概説される。オリゴヌクレオチドによる切断のための例示的な標的として、例えばタンパクキナーゼ C a、I C A M - 1、c - r a f キナーゼ、p 5 3、c - m y b および慢

40

50

性骨髄性白血病において見出される *bcr / abl* 融合遺伝子が挙げられる。

【0271】

対象とする核酸は、ヒト、非ヒト霊長類、非ヒト哺乳動物、非ヒト脊椎動物、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、ウサギなど）、家畜動物、ペット（ネコ、イヌなど）、ツメガエル、魚類、昆虫（ショウジョウバエなど）および線虫（*C. elegans*）などの RNAi 経路を有する任意の動物において、RNAi に基づく治療に使用することができる。

本発明は、対象へ治療剤（例えば RNAi 剤またはこ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、対象において、異常なまたは望ましくない標的遺伝子の発現または活性に関連する疾患または状態を予防するための方法を提供する。適切である場合、対象を始めに、続く RNAi 治療に対してより応答性となるように、プライミング剤により処置する。異常な、または望ましくない標的遺伝子の発現または活性により引き起こされるかこれが寄与する疾患についてのリスクを有する対象は、例えば本明細書に記載の診断または予後診断アッセイのいずれかまたは任意の組み合わせにより同定することができる。予防剤の投与は、疾患または障害が予防されるように、標的遺伝子の異常の特徴である症状の顕在化に先だって行われても、あるいは、その進行において遅れて行われてもよい。標的遺伝子の異常の型に依存して、例えば標的遺伝子、標的遺伝子アゴニストまたは標的遺伝子アンタゴニスト剤を、対象を処置するために使用することができる。

10

【0272】

別の側面において、本発明は、治療を目的として、標的遺伝子発現、タンパク質の発現または活性を調節するための方法に関する。したがって、例示的な態様において、本発明の調節方法は、標的遺伝子を発現することができる細胞を、標的遺伝子またはタンパク質に対して特異的な（例えば前記遺伝子によりコードされる mRNA に対して特異的な、または前記タンパク質のアミノ酸配列を特定する）本発明の治療剤と、標的タンパク質の発現または 1 以上の活性が調節されるように、接触させることを含む。これらの調節方法は、*in vitro* で（例えば細胞を剤とともに培養することにより）、*in vivo* で（例えば剤を対象へ投与することにより）、または、*ex vivo* で行うことができる。典型的には、対象を始めに、続く RNAi 治療に対してより応答性になるように、プライミング剤で処置する。したがって、本発明は、標的遺伝子のポリペプチドまたは核酸分子の異常なまたは望ましくない発現または活性により特徴づけられる疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。標的遺伝子の活性の阻害は、標的遺伝子が異常に制御されていないか、および/または、低下した標的遺伝子の活性が有益な効果を有する可能性がある状況において望ましい。

20

30

【0273】

本発明の治療剤は、異常なまたは望ましくない標的遺伝子（例えば *lncRNA*）の活性に関連する障害を処置（予防的または治療的に）するために、個体に投与することができる。かかる処置と組み合わせて、薬理ゲノミクス（すなわち、個体のジェノタイプと外来化合物または薬物に対する個体の応答との間の関係の研究）を考慮する。治療剤の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との関係を変化させることにより、重篤な毒性または治療の失敗をもたらす可能性がある。よって、医師または臨床医は、治療剤を投与するか否かを決定する上で、ならびに、投薬量および/または治療剤による処置の治療レジメンを調整する上で、関連する薬理ゲノミクス研究において得られる知識を適用することを考慮してもよい。薬理ゲノミクスは、罹患個体における薬物の体内処理 (*disposition*) および異常作用の変化に起因する、薬物に対する応答における臨床的に重要な遺伝的バリエーションに対処する。例えば、Eichelbaum, M. et al. (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23(10-11): 983-985 および Linder, M. W. et al. (1997) *Clin. Chem.* 43(2):254-266 を参照。

40

【0274】

皮膚の適応症における RNAi

本明細書に記載の核酸分子、または核酸分子を含む組成物は、いくつかの態様において

50

、損傷した皮膚を前処置、処置または予防するために投与され得る。本明細書で使用される場合、「損傷した皮膚」は、正常な皮膚とは別個の特徴を呈する皮膚を指す。損傷した皮膚は、皮膚科学的条件と関連して生じ得る。皮膚科学的条件のいくつかの非限定的例は、酒さ、尋常性ざ瘡、脂漏性皮膚炎、口囲皮膚炎、アクネ型発疹、一過性棘融解性皮膚症、および粟粒状壊死性アクネを含む。いくつかの例において、損傷した皮膚は、創傷および/または癒痕組織を含み得る。いくつかの例において、本発明に関連する方法および組成物は、創傷の治癒、癒痕の予防、減少または阻害、および/または創傷の再上皮化の促進を促進するために使用され得る。

【0275】

対象の皮膚が損傷する前に、対象は、本発明に関連する分子で前処置または予防的に処置され得る。本明細書で使用される「前処置」または「予防的処置」は、皮膚が損傷する前に皮膚に核酸を投与することを指す。例えば、対象は、皮膚が損傷を受ける15分前、30分前、1時間前、2時間前、3時間前、4時間前、5時間前、6時間前、7時間前、8時間前、9時間前、10時間前、11時間前、12時間前、24時間前、48時間前、3日前、4日前、5日前、6日前、7日前、8日前または8日超前に前処置され得るであろう。他の態様において、対象は、皮膚が損傷する直前および/または皮膚が損傷すると同時および/または皮膚が損傷した後に、本発明に関連する分子で処置され得る。いくつかの態様において、皮膚は、待機手術を含む手術などの医療処置を通じて損傷される。ある態様において、方法および組成物は、損傷するリスクがあると考えられる皮膚の領域に適用され得る。当業者が単なる日常的な実験を使用して投与のタイミングを最適化することができるであろうことは理解されるべきである。

10

20

【0276】

いくつかの側面において、本発明に関連する方法は、損傷した皮膚の治癒を促進するために適用され得る。たとえ損傷した皮膚がすでに部分的に治癒していたとしても、投与は損傷した皮膚が治癒するまでいつでも生じ得る。投与のタイミングは、損傷した皮膚の性質、損傷した皮膚内の損傷の程度、および損傷した領域のサイズを含むいくつかの因子に依存し得る。いくつかの態様において、投与は、皮膚が損傷した直後、または皮膚が損傷した30分後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、8時間後、12時間後、24時間後、48時間後、または48時間超後に生じ得る。本発明の方法および組成物は、必要に応じて1回以上投与され得る。例えば、いくつかの態様において、組成物は、毎日または1日2回投与され得る。いくつかの例において、組成物は、損傷した皮膚の形成の前後両方で投与され得る。

30

40

【0277】

本発明に関連する組成物は任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの態様において、投与は、損傷した皮膚の領域で局所的に生じる。例えば、組成物は、皮内注射によって投与され得る。皮内注射のための組成物は注射可能な溶液を含み得る。皮内注射は、いくつかの態様において、損傷した皮膚の領域の周囲または皮膚が損傷する可能性がある部位で生じ得る。いくつかの態様において、組成物は、クリームまたは軟膏などの局所的な形態でも投与され得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の組成物の投与は、損傷した皮膚の初期処置または前処置の部分を含むが、他の態様において、かかる組成物の投与は、損傷した皮膚の領域についてフォローアップケアを含む。

【0278】

適用される組成物または医薬品の適切な量は、多くの異なる因子に依存し得、日常的な実験を通じて当業者によって決定され得る。考えられ得るいくつかの非限定的因子は、剤の生体活性およびバイオアベイラビリティ、剤の性質、投与の様式、半減期および処置される対象の特徴を含む。

いくつかの側面において、本発明に関連する核酸分子は、肺線維症、肝硬変、強皮症および糸球体腎炎、肺線維症、肝線維症、皮膚線維症、筋線維症、放射線線維症、腎線維症、増殖性硝子体網膜症および子宮線維症を含む、線維性障害の処置および/または予防においても使用され得る。

50

【0279】

本明細書に記載の核酸分子の治療上有効な量は、いくつかの態様において、損傷した皮膚の形成を予防および/または損傷した皮膚の状態を改善するのに十分な量であり得る。いくつかの態様において、損傷した皮膚の状態の改善は、創傷治癒の促進および/または瘢痕の阻害および/または上皮再生の促進に対応し得る。損傷した皮膚の形成の予防および/または損傷した皮膚の状態の改善の程度は、いくつかの例において、例えば、医師または臨床医によって決定され得る。

本発明に関連する核酸分子が損傷した皮膚の形成を予防し、および/または損傷した皮膚の状態を改善する能力は、いくつかの例において、皮膚によって呈された特性を参照して測定され得る。いくつかの例において、これらの特性は、同等の時点での対照皮膚と比較して、上皮形成速度および/または損傷した皮膚の領域の減少したサイズを含み得る。

10

【0280】

本明細書で使用される場合、例えば外科的処置の前の損傷した皮膚の形成の予防および/または例えば外科的処置の後の損傷した皮膚の状態の改善は、対照試料中で生じた治癒の速度と比較した損傷した皮膚における治癒の速度の任意の増加を包含し得る。いくつかの例において、損傷した皮膚の状態は、処置された対照の皮膚で達成された再上皮形成の速度の比較、または同等の時点での損傷した皮膚の処置された対照領域の相対面積の比較のいずれかに関して評価され得る。いくつかの側面において、損傷した皮膚の形成を予防するか、または損傷した皮膚の治癒を促進する分子は、投与に際し、損傷した皮膚の領域が、同等の時点での対照と比較して、再上皮化の増加した速度および/または損傷した皮膚のサイズの減少を呈することをもち分子であり得る。いくつかの態様において、損傷した皮膚の治癒は、対照で生じる割合よりも大きい、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%である治癒率をもち得る。

20

【0281】

いくつかの側面において、本発明に関連する方法および組成物によって処置される対象は、手術などの医療処置を受ける予定である、受けている、または受けた対象であり得る。いくつかの態様において、対象は、高齢者の皮膚創傷などの、不完全な、遅延した、またはそうでなければ損なわれた再上皮化を起こしやすい。創傷治癒が遅延した、またはそうでなければ損なわれた再上皮化に関連する状態または障害の他の非限定的例は、糖尿病を患う患者、多剤療法患者、閉経後の女性、圧力傷害を受けやすい患者、静脈疾患患者、臨床的に肥満患者、化学療法を受けている患者、放射線療法を受けている患者、ステロイド処置を受けている患者、および免疫不全患者を含む。いくつかの例において、不完全な再上皮化の応答は、創傷部位における感染および潰瘍などの慢性創傷の形成に寄与し得る。

30

【0282】

いくつかの態様において、本発明に関連する方法は、潰瘍などの慢性創傷における損傷した皮膚の再上皮化を促進し得、また創傷治癒に関連する瘢痕を阻害し得る。他の態様において、本発明に関連する方法は、慢性創傷に発展する損なわれた創傷治癒に罹患しやすい患者の急性創傷における損傷した皮膚の予防または処置に適用される。他の側面において、本発明に関連する方法は、一般的な臨床状況における使用について、瘢痕を予防、減少または阻害する一方、損傷した皮膚の治癒の加速を促進するために適用される。いくつかの側面において、これは外科的切開の処置を伴い得、かかる方法の適用は、そうでなければかかる治癒に際して生じ得る瘢痕の予防、減少または阻害をもち得る。かかる処置は、目立たないより正常な皮膚構造の再生を呈する瘢痕をもち得る。他の態様において、処置される損傷した皮膚は、外科的切開によって引き起こされる損傷した皮膚ではない。損傷した皮膚は、再上皮化および治癒を促進するために、継続的なケアおよび薬物の継続的な適用に供し得る。

40

【0283】

いくつかの側面において、本発明に関連する方法は、移植処置に関連する損傷した皮膚

50

の治療にも使用され得る。これは、移植片供与部位および/または移植片受容部位での処置を伴い得る。移植片は、いくつかの態様において、皮膚、人工皮膚、または皮膚代用物を伴い得る。本発明に関連する方法は、上皮再生を促進するために使用され得る。本明細書で使用される場合、上皮再生の促進は、対照処置または未処置上皮において生じる再生と比較した上皮再生速度の任意の増加を包含する。達成される上皮再生の速度は、いくつかの例において、当該技術分野において公知の任意の好適な上皮再生モデルを使用する対照処置または未処置上皮において生じるものと比較され得る。上皮再生の促進は、再上皮化応答が損なわれ、阻害され、遅らされるか、またはそうでなければ不完全である状況において有効な再上皮形成を誘導するために有用であり得る。上皮再生の促進は、上皮損傷を患う患者の不完全または正常な上皮再生応答の速度を早め得る。

10

【0284】

再上皮化応答が不完全であり得るいくつかの例は、天疱瘡、ヘイリー・ヘイリー疾患（家族性良性天疱瘡）、中毒性表皮壊死症（TEN）/ライエル症候群、表皮水疱症、皮膚リーシュマニア症および日光角化症などの状態を含む。肺の不完全な再上皮化は、特発性肺線維症（IPF）または間質性肺疾患と関連し得る。眼の不完全な再上皮化は、部分的な角膜縁幹細胞の欠損または角膜びらんなどの状態と関連し得る。胃腸管または結腸の不完全な再上皮化は、慢性肛門裂傷（裂肛）、潰瘍性大腸炎またはクローン病、および他の炎症性腸疾患などの状態と関連し得る。

いくつかの側面において、本発明に関連する方法は、瘢痕に関連する損傷した皮膚を予防、減少またはそうでなければ阻害するために使用される。これは、皮膚、眼、神経、腱、靭帯、筋肉、および口腔（唇および口蓋を含む）および内臓（肝臓、心臓、脳、腹腔、骨盤腔、胸腔、消化管および生殖組織など）を含む身体および任意の組織または器官内の任意の部位に適用され得る。皮膚において、治療はコラーゲン線維の形態および組織を変化させ得、瘢痕の視認性を低下させ、周囲の皮膚に混入させ得る。本明細書で使用される場合、瘢痕の予防、減少または阻害は、対照の処置または未処置の創傷に生じる瘢痕のレベルと比較して、瘢痕における予防、減少または阻害の任意の程度を包含する。

20

【0285】

皮膚の瘢痕に関連する損傷した皮膚などの損傷した皮膚の予防、減少または阻害は、微視的および/または巨視的な特徴を参照して評価および/または測定され得る。巨視的な特徴は、皮膚の色、高さ、表面の質感、および硬さを含み得る。いくつかの例において、皮膚の色、高さ、表面の質感および硬さが、未処置の対照よりも処置後により密接に正常な皮膚のものに似ているとき、損傷した皮膚の予防、減少または阻害は示され得る。損傷した皮膚の微視的な評価は、細胞外マトリックス（ECM）繊維の厚さおよび/または配向および/または組成、および損傷した皮膚の細胞性などの特徴を検討することを伴い得る。いくつかの例において、細胞外マトリックス（ECM）繊維の厚さおよび/または配向および/または組成、および/または損傷した皮膚の細胞性が、未処置の対照よりも処置後により密接に正常な皮膚のものに似ているとき、損傷した皮膚の予防、減少または阻害は示され得る。

30

【0286】

いくつかの側面において、本発明に関連する方法は、少なくともその一部において、損傷した皮膚の美容的外観の改善に寄与する化粧目的に使用される。いくつかの態様において、本発明に関連する方法は、体の関節を覆う創傷の瘢痕などの損傷した皮膚を予防、減少または阻害するために使用され得る。他の態様において、本発明に関連する方法は、加速した創傷治療を促進するために、および/または、収縮性瘢痕を形成するリスク、および/または皮膚の張力の高い部位に位置する創傷のリスクが増加した創傷の瘢痕を予防、減少または阻害するために使用され得る。

40

いくつかの態様において、本発明に関連する方法は、正常な瘢痕よりも顕著な有害効果を有し得る肥厚性瘢痕およびケロイドなどの病理学的瘢痕形成の増加したリスクがある場合において、損傷した皮膚の治療を促進するために適用され得る。いくつかの態様において、損傷した皮膚の加速した治療の促進および/または瘢痕の予防、減少または阻害のた

50

めの本明細書に記載の方法は、病的瘢痕の修正手術によって生成された損傷した皮膚に適用される。

【0287】

本発明の側面は、熱傷によって引き起こされた損傷した皮膚に適用され得る。熱傷に対する応答における治癒は、肥厚性瘢痕の形成を含む有害な瘢痕をもたらし得る。本発明に関連する方法は、表皮が損傷している皮膚への損傷などの上皮層への損傷を伴う全ての傷害の処置に適用され得る。上皮組織への損傷の他の非限定的例は、呼吸上皮、消化上皮または内臓組織または器官の周囲の上皮を伴う損傷を含む。

本発明は、以下の例によってさらに例示されるが、これらは決して、さらに限定するものとして解釈されるべきではない。本出願を通して引用された全ての参考資料（参考文献、交付済み特許、公開された特許出願および同時係属の特許出願を含む）の全体の内容は、参照によりここに明示的に組み込まれる。

【0288】

例

例1：lncRNA ENST00000602414を標的とする強力なsd-rxRNAの同定

lncRNA ENST00000602414を標的とするsd-rxRNAを設計し、合成し、in vitroでスクリーニングして、標的lncRNAレベルを低下させるsd-rxRNAの能力を決定した。sd-rxRNAを、ヒト肝細胞癌細胞株（40,000細胞/ウェル、96ウェルプレート）の活性について試験した。細胞を、10% FCSを含有する培地において、ENST00000602414 lncRNAを標的とするsd-rxRNAまたは非標的化対照（#26247）のパネルで処理した。試験したsd-rxRNAの濃度は5 μMであった。非標的化対照sd-rxRNA（#26247）は、lncRNAを標的とするsd-rxRNAと同様の構造であり、両方の鎖全体に同様の安定化修飾を含有する。投与から48時間後、細胞を溶解し、lncRNAに特異的なSYBR Green I qPCRアッセイおよびSsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix（Bio-Rad）により、製造者のプロトコルに従ってlncRNAレベルを決定した。図1は、表1および表2にそれぞれ見出されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を含むlncRNAを標的とするsd-rxRNAが、ヒト肝細胞癌細胞株における標的遺伝子lncRNAレベルをin vitroで大きく減少させることを示す。表1中の全てのセンス配列は以下の修飾を有する：TEG-Ch1（ここで、Ch1はコレステロールを表し、TEGはリンカーである）。4種のハウスキーピング遺伝子のパネルに対して幾何平均を使用してデータを正規化し、モック（トランスフェクションされていない）対照に関してグラフ化した。試料を生物学的なデュプリケートで検討した。

【0289】

以下に示すように、ヒトlncRNA配列は、Ensembl転写物ID：ENST00000602414（配列番号1）によって表される。

GGAATAGCGTCATCAGTTCTATAAGAGAGCGTGTGCCGAAGGCCTCGGCCTTTCACATTCGGGAAGCGTCGGGATTAGGT
GAAAGTACGTAGTTGTCTTTTCGTAAGTTAAAATGATAATTGGGCCGAAACTTACTGCCTTACCTAAAAGGCAGCGCAGTC
AGGATATTGGTAGGTCGGGGCGGCTTTGGAAACCCTTAAGTTTACAAGCATGCGCGGACTTGAGTGCTCATTAGGTCGC
CGGGCGTCCACGTGCAGCCCTGGACCCTGAACCCCGCGTGCCTGGGCCGTTGGGCCCTCGGGGAAAGTTCCGTGCACTC
GGGACTCCGGTGAAGCCTGTTTCAGCCGTCTGTGTGCATGTGCCATCTTGAGTCTACTCTGTGCTCTTTGTGCCCTAGCA
CCCCGAGAACCCTCAGTTTGGAGCCAGATGGAAGCTGAGCTGAACACATTACGATGGATGATGGAACATAAGACTATCAA
GAAATCCAAGTGGTAATGGGCGAAGTTTATTTCAGCATCCGGCAATGGACTTATCGTAGTTGGGGAAACGGGTGTTCCGAA
TAATATCCTGGAAGTTATCAGGACACCTATTTTAAATATAGGCCTGAATTTTGTAAAGTAATATTTAAGGTGGTCCGTGA
TAATTAATAAAAATGCTTAATTCATGTGGCTA

【0290】

例2：lncRNA MALAT1を標的とする強力なsd-rxRNAの同定

lncRNA MALAT1を標的とするsd-rxRNAを設計し、合成し、in vitroでスクリーニングして、標的lncRNAレベルを減少させるsd-rxRNAの能力

を決定した。s d - r x R N A を、ヒト肝細胞癌細胞株 (4 0 , 0 0 0 細胞 / ウェル、9 6 ウェルプレート) およびヒト結腸直腸癌細胞株 (4 0 , 0 0 0 細胞 / ウェル) の活性について試験した。細胞を、1 0 % F C S を含有する培地において、M A L A T 1 を標的とする s d - r x R N A または非標的化対照 (# 2 6 2 4 7) のパネルで処理した。試験した s d - r x R N A の濃度は 5 μ M であった。非標的化対照 s d - r x R N A (# 2 6 2 4 7) は、M A L A T 1 を標的とする s d - r x R N A と同様の構造であり、両方の鎖全体に同様の安定化修飾を含有する。投与から 4 8 時間後、細胞を溶解し、M A L A T 1 に特異的な SYBR Green I qPCR アッセイおよび SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) により、製造者のプロトコルに従って M A L A T 1 レベルを決定した。図 2 は、それぞれ表 1 および表 2 に見出されるセンス配列およびアンチセンス配列を含む M A L A T 1 を標的とする s d - r x R N A が、ヒト肝細胞癌細胞株において標的遺伝子 l n c R N A レベルを *in vitro* で大きく減少させることを示す。表 1 中の全てのセンス配列は以下の修飾を有する : T E G - C h l (ここで、C h l はコレステロールを表し、T E G はリンカーである) 。4 種のハウスキーピング遺伝子のパネルに対して幾何平均を使用してデータを正規化し、モック (トランスフェクションされていない) 対照に関してグラフ化した。試料を生物学的なデュプリケートで検討した。

【 0 2 9 1 】

ヒト M A L A T 1 配列は、以下に示すように、G e n B a n k アクセション番号 E F 1 7 7 3 8 1 (配列番号 2) によって表される。

GTAAAGGACTGGGGCCCCGCAACTGGCCTCTCTGCCCTCTTAAGCGCAGCGCCATTTTAGCAACGCAGAAGCCCCGGCGC
CGGGAAGCCTCAGCTCGCCTGAAGGCAGGTCCTCTGACGCCTCCGGGAGCCCAGGTTTCCCAGAGTCCTTTGGGACGCA
GCGACGAGTTGTGCTGCTATCTTAGCTGTCTTATAGGCTGGCCATTCCAGGTGGTGGTATTTAGATAAAACCACTCAAA
CTCTGCAGTTTGGTCTTGGGGTTTGGAGGAAAGCTTTTATTTTTCTTCTGCTCCGGTTCAGAAGGTCTGAAGCTCATAC
CTAACAGGCATAACACAGAACTGCAAAAACAAAAACCCCTAAAAAGCAGACCCAGAGCAGTGTAACACTTCTGGGTG
TGTCCTGACTGGCTGCCCAAGGTCTCTGTGTCTTCGGAGACAAAAGCCATTCGCTTAGTTGGTCTACTTTAAAAAGCCAC
TTGAACTCGCTTTCCATGGCGATTTGCCTTGTGAGCACTTTCAGGAGAGCCTGGAAGCTGAAAAACGGTAGAAAAATTTTC
CGTGCGGGCCGTGGGGGGCTGGCGGCAACTGGGGGGCCGAGATCAGAGTGGGCCACTGGCAGCCAACGGCCCCCGGGGC
TCAGGCGGGGAGCAGCTCTGTGGTGTGGGATTGAGGCGTTTTCCAAGAGTGGGTTTTTCACGTTTTCTAAGATTTCCCAAGC
AGACAGCCCGTGTGCTCCGATTTCTGAACAAAAAGCAAAACGTGTGGCTGTCTTGGGAGCAAGTCGCAGGACTGCAA
GCAGTTGGGGGAGAAAGTCGCCATTTTGCCACTTCTCAACCGTCCCTGCAAGGCTGGGGCTCAGTTGCGTAATGAAAAG
TAAAGCCCTGAACTATCACACTTTAATCTTCCTTCAAAAGGTGGTAAACTATACCTACTGTCCCTCAAGAGAACAACAAGA
AGTGCTTTAAGAGGTATTTTAAAAAGTTCCGGGGTTTTGTGAGGTGTTTGTGACCCGTTTTAAAAATATGATTTCCATGTT
TCTTTTGTCTAAAGTTTGCAGCTCAAACTTTCCACACGCTAGTAATTTAAGTATTTCTGCATGTGTAGTTTGCATTCAA
GTTCCATAAGCTGTTAAGAAAAATCTAGAAAAAGTAAAACTAGAACCTATTTTAAACGAAGAACTACTTTTTGCCTCCCT
CACAAAGGCGGCGGAAGGTGATCGAATTCGGGTGATGCGAGTTGTTCTCCGTCTATAAATACGCCCTCGCCCCGAGCTGTGC
GGTAGGCATTGAGGCAGCCAGCGCAGGGGCTTCTGCTGAGGGGGCAGGCGGAGCTTGAGGAAACCGCAGATAAGTTTTTT
TCTCTTTGAAAGATAGAGATTAATAACAATACTTAAAAAATATAGTCAATAGGTTACTAAGATATTGCTTAGCGTTAAGT
TTTTAACGTAATTTAATAGCTTAAGATTTTAAAGAGAAAATATGAAGACTTAGAAGAGTAGCATGAGGAAGGAAAAGATA
AAAGTTTTCTAAAACATGACGGAGGTTGAGATGAAGCTTCTTCATGGAGTAAAAAATGTATTTAAAAAGAAAATTGAGAGA
AAGGACTACAGAGCCCCGAATTAATACCAATAGAAGGGCAATGCTTTTAGATTAAAAATGAAGGTGACTTAAACAGCTTAA
AGTTTAGTTTTAAAAAGTTGTAGGTGATTAATAATTTGAAGGCATCTTTTAAAAAGAGATTAAACCGAAGGTGATTA
AGACCTTGAATCCATGACGCAGGGAGAAATTGCGTCAATTTAAAGCCTAGTTAACGCATTTACTAAACGCAGACGAAAATG
GAAAGATTAATTTGGGAGTGGTAGGATGAAACAATTTGGAGAAGATAGAAGTTTGAAGTGAAAACCTGGAAGACAGAAGTA
CGGGAAGGCGAAGAAAAGAATAGAGAAGATAGGAAAATTAGAAGATAAAAAACATACTTTTGAAGAAAAAAGATAAAATTT
AAACCTGAAAAGTAGGAAGCAGAAGAAAAAAGACAAGCTAGGAAAACAAAAAGCTAAGGGCAAAAATGTACAACTTAGAAG
AAAATTTGAAGATAGAAAACAAGATAGAAAATGAAAATATTGTCAAGAGTTTTAGATAGAAAATGAAAACAAGCTAAGAC
AAGTATTGGAGAAGTATAGAAGATAGAAAAATATAAAGCCAAAAATTTGGATAAAAATAGCACTGAAAAAATGAGGAAATTA
TTGGTAACCAATTTATTTTAAAAAGCCCATCAATTTAATTTCTGGTGGTGCAGAAGTTAGAAGGTAAAGCTTGAGAAGATG
AGGGTGTTTACGTAGACCAGAACCAATTTAGAAGAATACTTGAAGCTAGAAGGGGAAGTTGGTTAAAAATCACATCAAAA
AGCTACTAAAAGGACTGGTGTAAATTTAAAAAATACTAAGGCAGAAGGCTTTTGAAGAGTTAGAAGAATTTGGAAGGCCT

10

20

30

40

50

TAAATATAGTAGCTTAGTTTGAAAAATGTGAAGGACTTTCGTAACGGAAGTAATTCAAGATCAAGAGTAATTACCAACTT
AATGTTTTTGCATTGGACTTTGAGTTAAGATTATTTTTTAAATCCTGAGGACTAGCATTAAATTGACAGCTGACCCAGGTG
CTACACAGAAGTGGATTTCAGTGAATCTAGGAAGACAGCAGCAGACAGGATTCCAGGAACCCAGTGTGGATGAAGCTAGGA
CTGAGGAGCAAGCGAGCAAGCAGCAGTTCGTGGTGAAGATAGGAAAAAGAGTCCAGGAGCCAGTGCATTTGGTGAAGGAA
GCTAGGAAGAAGGAAGGAGCGCTAACGATTTGGTGGTGAAGCTAGGAAAAAGGATTCCAGGAAGGAGCGAGTGCAATTTG
GTGATGAAGGTAGCAGGCGGCTTGGCTTGGCAACCACACGGAGGAGGCGAGCAGGCGTTGTGCGTAGAGGATCCTAGACC
AGCATGCCAGTGTGCCAAGGCCACAGGAAAAGCGAGTGGTTGGTAAAAATCCGTGAGGTCGGCAATATGTTGTTTTTCTG
GAACTTACTTATGGTAACCTTTTTATTTATTTTCTAATAATAATGGGGGAGTTTCGTAAGGATTGAAAGGGATTTATATG
GGGACGTAGGCCGATTTCCGGGTGTTGTAGGTTTCTTTTTTTCAGGCTTATACTCATGAATCTTGTCTGAAGCTTTTTGAG
GGCAGACTGCCAAGTCTCGGAGAAAATAGTAGATGGCAAGTTTGTGGGTTTTTTTTTTTTTACACGAATTTGAGGAAAACCA 10
AATGAATTTGATAGCCAAATTGAGACAATTTAGCAAACTCTGTAAGCAGTTTGTATGTTTGTAGTTGGGGTAATGAAGTATT
TCAGTTTTGTGAATAGATGACCTGTTTTTACTTCCCTCACCCCTGAATTCGTTTTGTAAATGTAGAGTTTGGATGTGTAAC
GAGGCGGGGGGAGTTTTTTCAGTATTTTTTTTTTGTGGGGGTGGGGGCAAAATATGTTTTTTCAGTTCTTTTTTCCCTTAGGTCT
GTCTAGAATCCTAAAGGCAAAATGACTCAAGGTGTAAACAGAAAAACAAGAAAAATCCAATATCAGGATAATCAGACCACCACA
GGTTTACAGTTTATAGAAAATAGAGCAGTTCTCACGTTGAGGTCTGTGGAAGAGATGTCCATTGGAGAAAATGGCTGGTAG
TACTCTTTTTTCCCCCACCCTTAATCAGACTTTAAAAGTGCCTAACCCCTTAAACTTGTATTTTTTACTTGAAGC
ATTTTGGGATGGTCTTAACAGGGAAAGAGAGAGGGTGGGGGAGAAAATGTTTTTTTCTAAGATTTTCCACAGATGCTATAG
TACTATTGACAAACTGGGTTAGAGAAGGAGTGTACCGCTGTGCTGTTGGCACGAACACCTTCAGGGACTGGAGCTGCTTT
TATCCTTGAAGAGTATCCCAGTTGAAGCTGAAAAGTACAGCACAGTGCAGCTTTGGTTCATATTCAGTCATCTCAGGA
GAACTTCAGAAGAGCTTGAGTAGGCCAAATGTTGAAGTTAAGTTTTTCCAATAATGTGACTTCTTAAAAGTTTTATTAAG 20
GGGAGGGGCAAAATATTGGCAATTAGTTGGCAGTGGCCTGTTACGGTTGGGATTGGTGGGGTGGGTTTTAGGTAATTTGTTTA
GTTTATGATTGCAGATAAACTCATGCCAGAGAACTTAAAGTCTTAGAATGGAAAAAGTAAAGAAAATATCAACTTCCAAGT
TGGCAAGTAACTCCCAATGATTTAGTTTTTTTCCCCCAGTTTGAATTGGGAAGCTGGGGGAAGTTAAATATGAGCCACT
GGGTGTACCAGTGCAATTAATTTGGGCAAGGAAAAGTGCATAATTTGATACTGTATCTGTTTTTCCCTCAAAGTATAGAGCT
TTTGGGGAAGGAAAAGTATTGAACTGGGGGTTGGTCTGGCCTACTGGGCTGACATTAACTACAATTATGGGAAAATGCAAAA
GTTGTTTGGATATGGTAGTGTGTGGTTCTCTTTTTGGAATTTTTTTTTCAGGTGATTTAATAATAATTTAAAACACTATAGA
AACTGCAGAGCAAAGGAAGTGGCTTAATGATCCTGAAGGGATTTCTTCTGATGGTAGCTTTTGTATTATCAAGTAAGATT
CTATTTTTCAGTTGTGTGAAGCAAGTTTTTTTTTGTAGTGTAGGAGAAAATACTTTTCCATTGTTTAACTGCAAAAACAAGATG
TTAAGGTATGCTTCAAAAATTTTGTAAATGTTTATTTTAACTTATCTGTTTGTAAATGTAAGTATTGTAAGTATTGTTG
ATAGTTCAGCTTGAATGTCTCTTAGAGGGTGGGCTTTTGTGATGAGGGAGGGGAAAACCTTTTTTTTTTTTCTATAGACTTT 30
TTTCAGATAACATCTTCTGAGTCATAACCAGCCTGGCAGTATGATGGCCTAGATGCAGAGAAAACAGCTCCTTGGTGAAT
TGATAAGTAAAGGCAGAAAAGATTATATGTCATACCTCCATTGGGGAAATAAGCATAACCCTGAGATTCTTACTACTGATG
AGAACATTATCTGCATATGCCAAAAAATTTAAGCAAATGAAAAGCTACCAATTTAAAGTTACGGAATCTACCATTTTAAA
GTTAATTTGCTTGTCAAGCTATAACCACAAAAATAATGAATTTGATGAGAAAATACAATGAAGAGGCAATGTCCATCTCAAAA
TACTGCTTTTACAAAAGCAGAATAAAAAGCGAAAAGAAAATGAAAATGTTTACACTACATTAATCCTGGAATAAAAAGAAGCCG
AAATAAATGAGAGATGAGTTGGGATCAAGTGGATTGAGGAGGCTGTGCTGTGTGCCAATGTTTCGTTTGCCTCAGACAGG
TATCTCTTCGTTATCAGAAGAGTTGCTTCAATTTTCTCTGGGAGCAGAAAACAGCAGGCAGCTGTTAACAGATAAGTTTAA
CTTGCATCTGCAGTATTGCATGTTAGGGATAAGTGCTTATTTTTAAGAGCTGTGGAGTTCTTAAATATCAACCATGGCAC
TTTTCTCCTGACCCCTTCCCTAGGGGATTTTTCAGGATTGAGAAAATTTTTTCCATCGAGCCTTTTTTAAAATTTGAGGACTTGT 40
CCTGTGGGCTTCAGTGATGGGATAGTACACTTCACTCAGAGGCATTTGCATCTTTAATAATTTCTTAAAAGCCTCTAAA
GTGATCAGTGCCCTTGTGATGCCAACTAAGGAAAATTTGTTTATGATTGAATCTCTGAAGGCTCTATGAAAGGAATAGCATGAT
GTGCTGTTAGAATCAGATGTTACTGCTAAAAATTTACATGTTGTGATGTAATTTGTGTAGAAAACCATTAATCATTCAAAA
ATAATAAACTATTTTTATTAGAGAATGTATACTTTTAGAAAAGCTGTCTCCTTATTTAATAAAAATAGTGTTTGTCTGTAG
TTCAGTGTGGGGCAATCTTGGGGGGGATTCTTCTCTAATCTTTTTCAGAAAATTTGTCTGCGAACACTCTTTAATGGACCA
GATCAGGATTTGAGCGGAAGAACGAATGTAACCTTAAAGGCAGGAAAAGACAAAATTTTATTCTTCAAAAAGTATGAGCATA
TAATAATTTCCAGGCACATGGCAATAGAGGCCCTCTAAATAAGGAATAAATAACCTCTTAGACAGGTGGGAGATTATGATC
AGAGTAAAAGTAATTTACACATTTTATTTTCCAGAAAAGTCAAGGGTCTATAAATTTGACAGTGATTAGAGTAATACTTTTTTC
ACATTTCCAAAAGTTTGCATGTTAACTTTAAAATGCTTACAATCTTAGAGTGGTAGGCAATGTTTTTACACTATTGACCTTAT
ATAGGGAAGGGAGGGGGTGCCTGTGGGGTTTTTAAAGAAATTTTCCCTTTCAGAGGCATTTTCTCCTTTCATGAAGCCATTCA
GGATTTTGAATTCATATGAGTGCTTGGCTTCTCCTTCTGTTCTAGTGAGTGTATGAGACCTTGCAGTGAGTTTATCAGC 50

ATACTCAAAATTTTTTCTGGAATTTGGAGGGATGGGAGGAGGGGGTGGGGCTTACTTGTGTAGCTTTTTTTTTTTTT
 ACAGACTTCACAGAGAATGCAGTTGTCTTGACTTCAGGTCTGTCTGTTCTGTTGGCAAGTAAATGCAGTACTGTTCTGAT
 CCCGCTGCTATTAGAATGCATTGTGAAACGACTGGAGTATGATTAAGTTGTGTTCCCAATGCTTGGAGTAGTGATTG
 TTGAAGGAAAAATCCAGCTGAGTGATAAAGGCTGAGTGTGGAGGAAATTTCTGCAGTTTTAAGCAGTCGTATTTGTGAT
 TGAAGCTGAGTACATTTTGTGGTGTATTTTGTAGTAAAATGCTTTTTGTTCAATTTCTGGTGGTGGGAGGGGACTGAAGC
 CTTTAGTCTTTTCCAGATGCAACCTTAAAATCAGTGACAAGAAACATTCCAAAACAAGCAACAGTCTTCAAGAAATTAAC
 TGGCAAGTGGAAATGTTTAAACAGTTCAGTGATCTTTAGTGCATTGTTTATGTGTGGGTTTCTCTCTCCCTCCCTTGGT
 CTTAATTTCTTACATGCAGGAACACTCAGCAGACACACGTATGCGAAGGGCCAGAGAAGCCAGACCCAGTAAGAAAAATA
 GCCTATTTACTTTAAATAAACCAACATTTCCATTTTAAATGTGGGGATTGGGAACCACTAGTTCTTTTCAGATGGTATTCT
 TCAGACTATAGAAGGAGCTTCCAGTTGAATTCACCAGTGACAAAAATGAGGAAAACAGGTGAACAAGCTTTTTCTGTATT
 TACATACAAAGTCAGATCAGTTATGGGACAATAGTATTGAATAGATTTTCAGCTTTATGCTGGAGTAAGTGGCATGTGAGC
 AAAGTGTGTTGGCGTGGGGTGGAGGGTGGAGTGGGCGCTAAGCCTTTTTTAAAGATTTTTCAGGTACCCCTCACTAAA
 GGCACCGAAGGCTTAAAGTAGGACAACCATGGAGCCTTCTGTGGCAGGAGAGACAACAAGCGCTATTATCCTAAGGTC
 AAGAGAAGTGTGAGCCTCACCTGATTTTTTATTAGTAATGAGGACTTGCCTCAACTCCCTCTTTCTGGAGTGAAGCATCCG
 AAGGAATGCTTGAAGTACCCCTGGGCTTCTCTTAACATTTAAGCAAGCTGTTTTTATAGCAGCTCTTAATAATAAGCCC
 AAATCTCAAGCGTGCTTGAAGGGGAGGGAAAGGGGAAAGCGGGCAACCACTTTTCCCTAGCTTTTCCAGAAGCCTGTT
 AAAAGCAAGGTCTCCCACAAGCAACTTCTCTGCCACATCGCCACCCCGTGCCTTTTGATCTAGCACAGACCCCTCACCC
 CTCACCTCGATGCAGCCAGTAGCTTGGATCCTTGTGGGCATGATCCATAATCGGTTTTCAAGGTAACGATGGTGTGAGGT
 CTTTGGTGGTGAAGTATGTTAGAAAAGGCCATTAATTTGCCTGCAAAATGTTAACAGAAGGGTATTAACCACAGCT
 AAGTAGCTCTATTATAACTTATCCAGTGACTAAAACCAACTTAAACCAGTAAGTGGAGAAAATAACATGTTCAAGAACT
 GTAATGCTGGGTGGGAACATGTAACCTGTAGACTGGAGAAGATAGGCATTTGAGTGGCTGAGAGGGCTTTTTGGGTGGGAA
 TGCAAAAATTTCTGCTAAGACTTTTTTCAGGTGAACATAACAGACTTGGCCAAGCTAGCATCTTAGCGGAAGCTGATCTC
 CAATGCTCTCAGTAGGGTCATGAAGGTTTTTCTTTTCTGAGAAAACAACACGTATTGTTTTCTCAGGTTTTGCTTTTT
 GGCCTTTTTCTAGCTTAAAAAAAAAAAAAGCAAAAGATGCTGGTGGTGGCACTCCTGGTTCCAGGACGGGGTTCAAA
 CCCTGCGGCGTCTTTGCTTTGACTACTAATCTGTCTTCAGGACTCTTTCTGTATTTCTCCTTTTTCTCTGCAGGTGCTAGT
 TCTTGGAGTTTTGGGAGGTGGGAGGTAACAGCACAATATCTTTGAACTATATACATCCTTGATGTATAATTTGTCAGGA
 GCTTGACTTGATTGTATATTCATATTTACACGAGAACCTAATAAAGTGCCTTGTCTTTTTTCAGGTAATAGCCTGCAGCT
 GGTGTTTTGAGAAGCCCTACTGCTGAAAACCTTAAACAATTTTGTGTAATAAAAAATGGAGAAGCTCTAAA

10

20

【 0 2 9 2 】

例 3 : l n c R N A を 標 的 と す る s d - r x R N A の 同 定
 以下 の l n c R N A を 標 的 と す る s d - r x R N A を 設 計 し、 合 成 し、 i n v i t r o で ス ク
 リーニングして、標的 l n c R N A レベルを減少させる s d - r x R N A の能力を決定し
 た ; E N S T 0 0 0 0 0 5 8 5 0 6 5、 E N S T 0 0 0 0 0 6 0 7 3 5 2、 E N S T 0 0
 0 0 0 4 5 6 5 8 1、 E N S T 0 0 0 0 0 3 4 0 5 1 0、 E N S T 0 0 0 0 0 6 0 5 9 2
 0、 E N S T 0 0 0 0 0 4 5 5 6 9 9、 E N S T 0 0 0 0 0 5 5 5 5 7 8、 E N S T 0 0
 0 0 0 5 6 5 4 9 3、 5 8 0 0 4 8。 s d - r x R N A を、 ヒト肝細胞癌細胞株 (4 0 ,
 0 0 0 細胞 / ウェル、 9 6 ウェルプレート) またはヒト結腸直腸癌細胞株 (4 0 , 0 0 0
 細胞 / ウェル、 9 6 ウェルプレート) の活性について試験した。細胞を、 1 0 % F C S を
 含有する培地において、 l n c R N A を 標 的 と す る s d - r x R N A または非標的化対照
 (# 2 6 2 4 7) のパネルで処理した。試験した s d - r x R N A の濃度は 5 μ M であつ
 た。非標的化対照 s d - r x R N A (# 2 6 2 4 7) は、 l n c R N A を 標 的 と す る s d
 - r x R N A と同様の構造であり、両方の鎖全体に同様の安定化修飾を含有する。投与か
 ら 4 8 時間後、細胞を溶解し、 l n c R N A に特異的な SYBR Green I qPCR アッセイおよ
 び SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) により、製造者のプロトコル
 に従って l n c R N A レベルを決定した。図 3 は、それぞれ表 1 および表 2 に見出される
 センス配列およびアンチセンス配列を含む l n c R N A を 標 的 と す る s d - r x R N A が
 、 ヒト肝細胞癌細胞株またはヒト結腸直腸癌細胞株における標的遺伝子 l n c R N A レベ
 ルを i n v i t r o で大きく減少させることを示す。表 1 中の全てのセンス配列は以下の修飾を
 有する : T E G - C h 1 (ここで、 C h 1 はコレステロールを表し、 T E G はリンカーで
 ある)。 4 種 の ハ ウ ス キーピング 遺 伝 子 の パネル 対 して 幾 何 平 均 を 使 用 し て データ を 正

30

40

50

規化し、モック（トランスフェクションされていない）対照に関してグラフ化した。試料を生物学的なデュプリケートで検討した。

【 0 2 9 3 】

【 表 1 - 1 】

表1. センス鎖オリゴヌクレオチド

オリゴID	遺伝子名	アクセッション番号	開始部位	配列番号	センス配列	センス化学	センス骨格
lncRala1 1	LNC Rala1	ENST00000340510	140	3	CCGCUUCAGA AUCA	mm0mmmm00m 0mmm	ooooooooo oosso
lncRala1 2	LNC Rala1	ENST00000340510	296	4	UGAUCCCGAG CCUA	mm0mmmm000 mmmm	ooooooooo oosso
lncRala1 3	LNC Rala1	ENST00000340510	366	5	UUUUUCCGCU GUAA	mmmmmmmm0m m0mmm	ooooooooo oosso
lncRala1 4	LNC Rala1	ENST00000340510	367	6	UUUUCGCUG UAAA	mmmmmm0mm0 m0mm	ooooooooo oosso
lncRala1 5	LNC Rala1	ENST00000340510	368	7	UUUCCGCUGU AAAA	mmmm0mm0m 00mm	ooooooooo oosso
lncRala1 6	LNC Rala1	ENST00000340510	369	8	UCCGCUGUA AAUA	mmmm0mm0m0 00mm	ooooooooo oosso
lncRala1 7	LNC Rala1	ENST00000340510	370	9	UCCGCUGUAA AUAA	mmm0mm0m000 mmm	ooooooooo oosso
lncRala1 8	LNC Rala1	ENST00000340510	487	10	GCCAAGCGGA AUUA	mmm000m00m0 mmm	ooooooooo oosso
lncRala1 9	LNC Rala1	ENST00000340510	488	11	CCAAGCGGAA UUUA	mm000m0000m mmm	ooooooooo oosso
lncRala1 10	LNC Rala1	ENST00000340510	489	12	CAAGCGGAU UUAA	mm00m00m0mm mmm	ooooooooo oosso
lncRala1 11	LNC Rala1	ENST00000340510	490	13	AAGCGGAAU UAAA	mm0m00m0mm m0mm	ooooooooo oosso
lncRala1 12	LNC Rala1	ENST00000340510	491	14	AGCGGAAUU AAAA	mmm00m0mmm 00mm	ooooooooo oosso
lncRala1 13	LNC Rala1	ENST00000340510	492	15	GCGGAAUUA AAUA	mm00m0mmm00 0mm	ooooooooo oosso
lncRala1 14	LNC Rala1	ENST00000340510	620	16	UGAGCCGCAG AGAA	mm00mm0m00m 0mm	ooooooooo oosso
lncRala1 15	LNC Rala1	ENST00000340510	622	17	AGCCGCAGAG AUCA	mmmm0m00m00 mmm	ooooooooo oosso
lncRala1 16	LNC Rala1	ENST00000340510	852	18	UACCACGUCA GUCA	mmmm0m0mm0 0mmm	ooooooooo oosso
lncRala1 17	LNC Rala1	ENST00000340510	853	19	ACCACGUCAG UCUA	mmm0m0mm00 mmmm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 2 9 4 】

50

【表 1 - 2】

IncRala1 18	LNC Rala1	ENST00000 340510	1662	20	ACGAGCUUAA CACA	mm000mmm00m 0mm	ooooooooo oosso
IncRala1 19	LNC Rala1	ENST00000 340510	1663	21	CGAGCUU AAC ACGA	mmm0mmm00m 0mmm	ooooooooo oosso
IncRala1 20	LNC Rala1	ENST00000 340510	1664	22	GAGCUUAACA CGCA	mm0mmm00m0 m0mm	ooooooooo oosso
IncRala1 21	LNC Rala1	ENST00000 340510	1205	23	CCUUUCGAAU GCAA	mmmmmm000m 0mmm	ooooooooo oosso
IncRala1 22	LNC Rala1	ENST00000 340510	1208	24	UUCGAAUGCA CUUA	mmm000m0m0m mmm	ooooooooo oosso
IncRala1 23	LNC Rala1	ENST00000 340510	1926	25	UCAAGUCGAC GUCA	mm000mm00m0 mmm	ooooooooo oosso
IncRala1 24	LNC Rala1	ENST00000 340510	2933	26	AGGCCCGAA CUUA	mm0mmmm000 mmmm	ooooooooo oosso
IncRala1 25	LNC Rala1	ENST00000 340510	1857	27	CCAUCGUUAC AAUA	mm0mm0mm0m 00mm	ooooooooo oosso
IncRala1 26	LNC Rala1	ENST00000 340510	1203	28	AUCCUUUCGA AUGA	mmmmmmmm00 0mmm	ooooooooo oosso
IncRala1 27	LNC Rala1	ENST00000 340510	1784	29	GGCCAUACC CUAA	mmmm0m0mm mmmm	ooooooooo oosso
IncRala1 28	LNC Rala1	ENST00000 340510	99	30	UAUAGACCCU GAAA	mmm00mmmm 00mm	ooooooooo oosso
IncRala1 29	LNC Rala1	ENST00000 340510	1480	31	UAGUGCUAUC ACAA	mm0m0mm0mm 0mmm	ooooooooo oosso
IncRala1 30	LNC Rala1	ENST00000 340510	1154	32	GUUGACCACU GCAA	mmm00mm0mm 0mmm	ooooooooo oosso
IncZBTB42 1	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	588	33	UCUGCCCGAA UCUA	mmm0mmm000 mmmm	ooooooooo oosso
IncZBTB42 2	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	590	34	UGCCGAAUC UUCA	mmmm000mm mmmm	ooooooooo oosso
IncZBTB42 3	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	593	35	CCGAAUCUUC ACAA	mm000mmmm 0mmm	ooooooooo oosso
IncZBTB42 4	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	801	36	AAUUCGACCC GUAA	mmmm00mmm 0mmm	ooooooooo oosso
IncZBTB42 5	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	804	37	UCGACCCGUA ACAA	mm00mmm0m00 mmm	ooooooooo oosso
IncZBTB42 6	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	807	38	ACCCGUAACA GCUA	mmmm0m00m00 mmm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 2 9 5 】

【表 1 - 3】

lncZBTB42 7	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	836	39	UCCGAUGUGC UUCA	mmm00m0m0m mmmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 8	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	960	40	ACGGACCUUU AUUA	mm000mmmmm 0mmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 9	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1073	41	UCUCCGAAGA GAUA	mmmmm000m00 0mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 10	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1075	42	UCCGAAGAGA UUCA	mmm000m000m mmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 11	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1076	43	CCGAAGAGAU UCCA	mm000m000mm mmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 12	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1281	44	AGCCGAUUAG CUGA	mmmm00mm00 mmmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 13	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1581	45	CUUAUCGCCA CACA	mmm0mm0mm0 m0mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 14	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2212	46	UGGACGUUUG AAAA	mm00m0mmm00 0mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 15	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2213	47	GGACGUUUGA AAAA	mm0m0mmm00 m0mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 16	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2137	48	UAGGCCUAAU CAAA	mm00mmm00m m0mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 17	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2141	49	CCUAAUCAAC GUAA	mmm00mm00m0 mmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 18	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	636	50	UUCCCGUCUU UAUA	mmmmm0mmm mm0mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 19	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1574	51	ACACAAGCUU AUCA	mm0m000mmm0 mmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 20	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1575	52	CACAAGCUUA UCGA	mmm000mmm0 mmmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 21	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	694	53	CUCACCCUAA CUUA	mmm0mmmm00 mmmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 22	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	699	54	CCUAAUUGA UGGA	mmm00mmm00 m0mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 23	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2145	55	AUCAACGUAA AUCA	mmm00m0m000 mmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 24	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2149	56	ACGUAAAUCU GUCA	mm0m000mmm0 mmm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 25	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	700	57	CUAACUUGAU GGAA	mm00mmm00m0 0mm	ooooooooo oosso

【 0 2 9 6 】

10

20

30

40

【表 1 - 4】

lncZBTB42 26	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2134	58	AGUUAGGCCU AAUA	mmmm000mmm 00mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 27	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1307	59	GUGUAAGGAC UGCA	mm0m00m00mm 0mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 28	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	640	60	CGUCUUUAUA AGGA	mmmmmmm0m0 00mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 29	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1616	61	CCUGGAUUAC AAGA	mmm000mm0m0 0mm	ooooooooo oosso
lncZBTB42 30	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2133	62	GAGUUAGGCC UAAA	mm0mm000mm m0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 1	LNC PANK1	ENST00000 455699	174	63	AUUGGAGCUC AACA	mmm00m0mmm 00mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 2	LNC PANK1	ENST00000 455699	176	64	UGGAGCUCAA CUAA	mm000mmm00m mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 3	LNC PANK1	ENST00000 455699	179	65	AGCUCAACUA CCGA	mmmm00mm0 mmmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 4	LNC PANK1	ENST00000 455699	188	66	ACCGACUGUG UCAA	mmm00mm0m0 mmmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 5	LNC PANK1	ENST00000 455699	191	67	GACUGUGUCA AUCA	mmmm0m0mm0 0mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 6	LNC PANK1	ENST00000 455699	211	68	AGUAUCAGGU UCCA	mmm0mm000m mmmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 7	LNC PANK1	ENST00000 455699	419	69	GGUCUAUAGU CUUA	mmmm0m000m mmmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 8	LNC PANK1	ENST00000 455699	565	70	CUUGUAUCCG UAAA	mmm0m0mmm0 m0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 9	LNC PANK1	ENST00000 455699	568	71	GUAUCCGUAA GUCA	mm0mmm0m000 mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 10	LNC PANK1	ENST00000 455699	571	72	UCCGUAAGUC ACAA	mmm0m000mm0 mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 11	LNC PANK1	ENST00000 455699	573	73	CGUAAGUCAC ACAA	mmm000mm0m0 mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 12	LNC PANK1	ENST00000 455699	636	74	AAAUGUCGAA AAGA	mm0m0mm000m 0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 13	LNC PANK1	ENST00000 455699	415	75	UGCAGGUCUA UAGA	mmm000mmm0 m0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 14	LNC PANK1	ENST00000 455699	418	76	AGGUCUAUAG UCUA	mm0mmm0m00 mmmm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 2 9 7 】

【表 1 - 5】

lncPANK1 15	LNC PANK1	ENST00000 455699	505	77	AGGAUUAUA UGCCA	mm00mm0m0m0 mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 16	LNC PANK1	ENST00000 455699	259	78	AGACAAUACC AGAA	mm0m00m0mm0 0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 17	LNC PANK1	ENST00000 455699	421	79	UCUAUAGUCU UUA	mmm0m00mmm mmmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 18	LNC PANK1	ENST00000 455699	502	80	ACCAGGAUUA UAUA	mmm00m0mm0 m0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 19	LNC PANK1	ENST00000 455699	341	81	AGUAAUAGCU GCAA	mmm00m00mm0 mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 20	LNC PANK1	ENST00000 455699	351	82	GCAUAACCUU GAGA	mm0m00mmmm 00mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 21	LNC PANK1	ENST00000 455699	257	83	GCAGACAAUA CCA	mm000m00m0m mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 22	LNC PANK1	ENST00000 455699	367	84	GAUACUGACU GAGA	mmm0mm00mm 00mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 23	LNC PANK1	ENST00000 455699	55	85	UGAGUCUUAU GUCA	mm00mmmm0m 0mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 24	LNC PANK1	ENST00000 455699	424	86	AUAGUCUUA CUCA	mm00mmmm0 mmmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 25	LNC PANK1	ENST00000 455699	253	87	CUUGGCAGAC AAUA	mmm00m000m0 0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 26	LNC PANK1	ENST00000 455699	217	88	AGGUUCCUGU GCUA	mm0mmmm0m 0mmm	ooooooooo oosso
lncPANK1 27	LNC PANK1	ENST00000 455699	545	89	AAGCCUCUAU UGUA	mm0mmmm0m m0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 28	LNC PANK1	ENST00000 455699	304	90	CCAAAUGUUA GGAA	mm000m0mm00 0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 29	LNC PANK1	ENST00000 455699	115	91	AGGAUGUAG AAGUA	mm00m0m00m0 0mm	ooooooooo oosso
lncPANK1 30	LNC PANK1	ENST00000 455699	150	92	CAAAGCAUCU CCA	mm000m0mmm mmmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 1	LNC EBF3	ENST00000 456581	744	93	UGGCGACUUU UGUA	mm0m00mmmm m0mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 2	LNC EBF3	ENST00000 456581	746	94	GCGACUUUUG UAUA	mm00mmmm0 m0mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 3	LNC EBF3	ENST00000 456581	1506	95	UAAAGACGGA UGAA	mm0m00m000m 0mm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【表 1 - 6】

lncEBF3 4	LNC EBF3	ENST00000 456581	1593	96	UAAAGACGAA UAUA	mm0000m000m0 mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 5	LNC EBF3	ENST00000 456581	1596	97	AGACGAAUUAU GCUA	mm0m000m0m0 mmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 6	LNC EBF3	ENST00000 456581	1652	98	AGGAAUCGUC AACA	mm000mm0mm0 0mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 7	LNC EBF3	ENST00000 456581	1655	99	AAUCGUCAAC AUCA	mmmm0mm00m 0mmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 8	LNC EBF3	ENST00000 456581	1656	100	AUCGUCAACA UCUA	mmmm0mm00m0 mmmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 9	LNC EBF3	ENST00000 456581	1657	101	UCGUCAACAU CUUA	mm0mm00m0m mmmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 10	LNC EBF3	ENST00000 456581	2032	102	GAAGCCGUUG CAGA	mm00mm0mm0 m0mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 11	LNC EBF3	ENST00000 456581	2209	103	CCGUGGAAUU GUGA	mm0m00m0mm0 mmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 12	LNC EBF3	ENST00000 456581	2593	104	CAAUUUCGAA AGGA	mm0mmmm000 m0mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 13	LNC EBF3	ENST00000 456581	2595	105	AUUUCGAAAG GUUA	mmmmmm000m00 mmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 14	LNC EBF3	ENST00000 456581	2597	106	UUCGAAAGGU UCCA	mmmm000m00mm mmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 15	LNC EBF3	ENST00000 456581	240	107	UGCUCGGCUU UUUA	mmmmmm00mmmm mmmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 16	LNC EBF3	ENST00000 456581	2193	108	ACAUCGUUCU CUUA	mm0mm0mmmm mmmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 17	LNC EBF3	ENST00000 456581	1878	109	CGUAAUGGUC CCAA	mmmm00m00mm mmmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 18	LNC EBF3	ENST00000 456581	2205	110	UGCUCCGUGG AAUA	mmmmmmmm0m00 m0mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 19	LNC EBF3	ENST00000 456581	1511	111	ACGGAUGAUU GUCA	mm000m00mm0 mmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 20	LNC EBF3	ENST00000 456581	1843	112	GUACCAGAGG UGAA	mm0mm00m0m0 mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 21	LNC EBF3	ENST00000 456581	1879	113	GUAAUGGUCC CAGA	mm00m00mmmm m0mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 22	LNC EBF3	ENST00000 456581	1354	114	UGACUGGUAC AGAA	mm0mm00m0m0 0mm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 2 9 9 】

【表 1 - 7】

lncEBF3 23	LNC EBF3	ENST00000 456581	2317	115	AGUAAGACUC ACAA	mmm00m0mmm 0mmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 24	LNC EBF3	ENST00000 456581	1527	116	GAGGUCCAAG CUUA	mm00mmm000m mmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 25	LNC EBF3	ENST00000 456581	1544	117	UGUAGGCCUU UGUA	mmm000mmmm m0mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 26	LNC EBF3	ENST00000 456581	1325	118	GCCCAUGUAU CUGA	mmmm0m0m0m mmmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 27	LNC EBF3	ENST00000 456581	2409	119	CUGAUGACUU GAGA	mm00m00mmm0 0mm	ooooooooo oosso
lncEBF3 28	LNC EBF3	ENST00000 456581	933	120	UCUGGUAAGU UCAA	mmm00m000mm mmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 29	LNC EBF3	ENST00000 456581	1296	121	UAAUAACCCC UUUA	mm0m00mmmm mmmm	ooooooooo oosso
lncEBF3 30	LNC EBF3	ENST00000 456581	1297	122	AAUAACCCCU UUGA	mmm00mmmmm mmmm	ooooooooo oosso
lncScand1 1	LNC Scand 1	ENST00000 565493	849	123	GCCGACGUAU GAUA	mmm00m0m0m0 0mm	ooooooooo oosso
lncScand1 2	LNC Scand 1	ENST00000 565493	851	124	CGACGUAUGA UAAA	mm0m0m0m00m 0mm	ooooooooo oosso
lncScand1 3	LNC Scand 1	ENST00000 565493	985	125	AUACGUCCAC GUUA	mm0m0mmm0m 0mmm	ooooooooo oosso
lncScand1 4	LNC Scand 1	ENST00000 565493	2663	126	UAGUCCCGAU UUUA	mm0mmmm00m mmmm	ooooooooo oosso
lncScand1 5	LNC Scand 1	ENST00000 565493	2971	127	UAUAGCGGAC AAAA	m0m00m000m00 mm	ooooooooo oosso
lncScand1 6	LNC Scand 1	ENST00000 565493	2973	128	UAGCGGACAA ACUA	mm0m000m000 mmm	ooooooooo oosso
lncScand1 7	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3283	129	UAUAAGCGGA CAUA	mmm000m000m 0mm	ooooooooo oosso
lncScand1 8	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3285	130	UAAGCGGACA UAGA	mm00m000m0m 0mm	ooooooooo oosso
lncScand1 9	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3288	131	GCGGACAUAG GAGA	mm000m0m00m 0mm	ooooooooo oosso
lncScand1 10	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3312	132	GUCUAGUCGA UGUA	mmmm00mm00 m0mm	ooooooooo oosso
lncScand1 11	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3313	133	UCUAGUCGAU GUUA	mmm00mm00m0 mmm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 3 0 0 】

【表 1 - 8】

IncScand1 12	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3314	134	CUAGUCGAUG UUAA	mm00mm00m0m mmm	ooooooooo oosso
IncScand1 13	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4972	135	UAGAGGCGUG UUGA	mm00m0m0m0m mmm	ooooooooo oosso
IncScand1 14	LNC Scand 1	ENST00000 565493	654	136	GCUGUCGGAA GAGA	mmm0mm000m0 0mm	ooooooooo oosso
IncScand1 15	LNC Scand 1	ENST00000 565493	656	137	UGUCGGAAGA GAGA	mmmm000m0m0 0mm	ooooooooo oosso
IncScand1 16	LNC Scand 1	ENST00000 565493	733	138	ACUGGCCGUU UAUA	mmm00mm0mm m0mm	ooooooooo oosso
IncScand1 17	LNC Scand 1	ENST00000 565493	736	139	GGCCGUUUUAU GGAA	mmmm0mmm0m 00mm	ooooooooo oosso
IncScand1 18	LNC Scand 1	ENST00000 565493	991	140	CCACGUUUGU UAAA	mm0m0mmm0m m0mm	ooooooooo oosso
IncScand1 19	LNC Scand 1	ENST00000 565493	1057	141	UAUGCUAGAC UGGA	mmm0mm000m m0mm	ooooooooo oosso
IncScand1 20	LNC Scand 1	ENST00000 565493	1386	142	CAGCGAGGCA AGAA	mm0m00m0m00 0mm	ooooooooo oosso
IncScand1 21	LNC Scand 1	ENST00000 565493	1459	143	CAGACGAGUC CUAA	mm00m000mmm mmm	ooooooooo oosso
IncScand1 22	LNC Scand 1	ENST00000 565493	1778	144	UGCCCGAUGU AUGA	mmmmmm00m0m 0mmm	ooooooooo oosso
IncScand1 23	LNC Scand 1	ENST00000 565493	2158	145	AAUUCGUAGG AAAA	mmmmmm0m00m 00mm	ooooooooo oosso
IncScand1 24	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3981	146	AACACCCCUC UAAA	mmm0mmmmm mm00m	ooooooooo oosso
IncScand1 25	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4064	147	AGCGAAUGCA GACA	mmm000m0m00 0mm	ooooooooo oosso
IncScand1 26	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4168	148	GGUCUAACCA UUGA	mmmmmm00mm0 mmmm	ooooooooo oosso
IncScand1 27	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4435	149	UCUAGACGAU GGUA	mmm000m00m0 0mm	ooooooooo oosso
IncScand1 28	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4440	150	ACGAUGGUUU UAGA	mm00m00mmm m0mm	ooooooooo oosso
IncScand1 29	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4474	151	GAGCGUUUUU AGUA	mm0m0mmmmm 00mm	ooooooooo oosso
IncScand1 30	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4535	152	AGCUUACGA AUGA	mmmmmm0m00 0mmm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 3 0 1 】

【表 1 - 9】

lncFAM69 C2 1	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	166	153	CCGCUAAGAG AUA	mm0mm000m00 mmm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 2	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	240	154	AAUUCGAUGA GCGA	mmmmm00m000 mmm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 3	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	241	155	AUUCGAUGAG CGCA	mmmm00m000m 0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 4	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	242	156	UUCGAUGAGC GCGA	mmm00m000m0 mmm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 5	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	764	157	AACGUUCGAC AAGA	mmm0mmm00m 00mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 6	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	766	158	CGUUCGACAA GGAA	mmmmm00m00 m0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 7	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	768	159	UUCGACAAGG ACUA	mmm00m00m00 mmm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 8	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	790	160	ACGUUAACGG CACA	mm0mm00m00m 0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 9	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	795	161	AACGGCACAG CAUA	mmm00m00m0m 0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 10	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	932	162	UGUAGACGAA UAAA	mmm000m000m 0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 11	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1391	163	UUCCAACGAG UGGA	mmmm00m000m 0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 12	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1999	164	UUAUAACGAC AUUA	mm0m00m00m0 mmm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 13	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2001	165	AUAACGACAU UGCA	mm00m00m0mm 0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 14	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	531	166	CGAUUUCGAG AAAA	mm0mmmm000 m0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 15	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	535	167	UUCGAGAAAU GACA	mmm000m00m0 0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 16	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	597	168	UCUCGAAUGG CUCA	mmmm000m00m mmm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 17	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	876	169	GAACCUCGAG UUAA	mm0mmmm000 mmmm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 18	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	879	170	CCUCGAGUUA GAGA	mmmm000mm00 0mm	ooooooooo oosso
lncFAM69 C2 19	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1573	171	CUGCGAAGAU GCAA	mm0m000m0m0 mmm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 3 0 2 】

【表 1 - 1 0】

IncFAM69 C2 20	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1575	172	GCGAAGAUGC AAAA	mm000m0m0m0 0mm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 21	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1927	173	UUAUGCUUAG UGGA	mm0m0mmm00 m0mm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 22	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2019	174	GCUACACUCC AUGA	mmm0m0mmmm 0mmm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 23	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2674	175	GUAUCAAGGA CCUA	mm0mm00m00m mmm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 24	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2721	176	AUGCCCUAAU GAAA	mm0mmmm0mm 00mm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 25	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	3316	177	AUCCCAACUU GUAA	mmmmm00mmm 0mmm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 26	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1749	178	ACUAUCGAAA UAAA	mmm0mm00m0 m0mm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 27	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2532	179	CUUAUACCAG GAGA	mmm0m0mm00 m0mm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 28	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2724	180	CCCUAUUGAA CAUA	mmmm0mm000 m0mm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 29	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2744	181	UAGUAAGAU GGCUA	mm0m00m0m00 mmm	ooooooooo oosso
IncFAM69 C2 30	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	3321	182	AACUUGUAGC UGCA	mmmmm0m00m m0mm	ooooooooo oosso
IncVEZF1 1	LNC VEZF1	ENST00000 585065	239	183	AUAUCGAGUA CUGA	mm0mm000m0m m0m	ooooooooo oosso
IncVEZF1 2	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2307	184	UGUACUCGAG AAAA	mmm0mmm00m 00mm	ooooooooo oosso
IncVEZF1 3	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2637	185	UGCGAUUUGU UGGA	mmm00mmm0m m0mm	ooooooooo oosso
IncVEZF1 4	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2638	186	GCGAUUUGUU GGAA	mm00mmm0mm 00mm	ooooooooo oosso
IncVEZF1 5	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2863	187	GCCCUCGACU ACCA	mmmmmm00mm 0mmm	ooooooooo oosso
IncVEZF1 6	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3477	188	UGACAACGGC AGAA	mm0m00m00m0 0mm	ooooooooo oosso
IncVEZF1 7	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3478	189	GACAACGGCA GAGA	mmm00m00m00 0mm	ooooooooo oosso
IncVEZF1 8	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3675	190	CGUUUACCUU AGA	mmmmm0mmm m0mm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 3 0 3 】

【表 1 - 1 1】

lncVEZF1 9	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3804	191	CCACUCGAUA ACAA	mm0mmm00m00 mmm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 10	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3805	192	CACUCGAUAA CACA	mmmmm00m00 m0mm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 11	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3806	193	ACUCGAUAAC ACCA	mmmm00m00m0 mmm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 12	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3808	194	UCGAUAACAC CAAA	mm00m00m0mm 0mm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 13	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4348	195	AAUGCGUCCA UCUA	mmm0m0mmm0 mmmm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 14	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4349	196	AUGCGUCCA CUGA	mm0m0mmm0m mmmm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 15	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4350	197	UGCGUCCAUC UGAA	m0m0mmm0mm m0mm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 16	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4351	198	GCGUCCAUCU GAAA	mm0mmm0mmm 00mm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 17	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2309	199	UACUCGAGAA ACUA	mmmmm000m00 mmm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 18	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2312	200	UCGAGAAACU UUGA	mm000m00mmm mmm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 19	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2449	201	ACCAUUACC UACA	mmmm0mm0mm m0mm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 20	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2539	202	GGUGCCUAUG AGUA	mmm0mmm0m0 00mm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 21	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2541	203	UGCCUAUGAG UAUA	mmmmm0m000 m0mm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 22	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3674	204	CCCGUUUACC UUAA	mmm0mmm0mm mmmm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 23	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3727	205	CUUGGCGAAA GUAA	mmm00m00m00 mmm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 24	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3730	206	GGCGAAAGUA AAAA	mmm00000m000 mm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 25	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4441	207	UCUUGGACUA GAGA	mmmm000mm00 0mm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 26	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4444	208	UGGACUAGAG ACAA	mm00mm00m00 mmm	ooooooooo oosso
lncVEZF1 27	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4650	209	AAGUUCGAUU UUUA	mm0mmm00mm mmmm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【表 1 - 1 2】

IncVEZF1 28	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2723	210	UGAUAGGUU UAGCA	mm0m000mmm0 0mm	ooooooooo oosso
IncVEZF1 29	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3116	211	CCUUAGUGUG CUUA	mmmm00m0m0 mmmm	ooooooooo oosso
IncVEZF1 30	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3369	212	AGUUGGUCCA UUA	mmmm00mmm0 mmmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 1	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	198	213	UUUAUAUGUC GUCA	mmm0m0m0mm 0mmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 2	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	199	214	UUAUAUGUCG UCUA	mm0m0m0mm0 mmmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 3	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	886	215	CUUUGUCGUA AGUA	mmmm0mm0m0 00mm	ooooooooo oosso
IncFBXO 4	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	887	216	UUUGUCGUAA GUUA	mmm0mm0m000 mmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 5	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	888	217	UUGUCGUAAG UUA	mm0mm0m000m mmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 6	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	889	218	UGUCGUAAGU UAUA	mmmm0m000m m0mm	ooooooooo oosso
IncFBXO 7	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	890	219	GUCGUAAGUU AUGA	mmm0m000mm0 mmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 8	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2596	220	UGAGAGCGUU GUUA	mm00m0m0mm0 mmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 9	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2598	221	AGAGCGUUGU UUA	mm00m0mm0m mmmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 10	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2842	222	GUCUUGCGAC UGAA	mmmmmm0m00m m0mm	ooooooooo oosso
IncFBXO 11	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2844	223	CUUGCGACUG AUA	mmm0m00mm00 mmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 12	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2846	224	UGCGACUGAU CUUA	mmmm00mm00m mmmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 13	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2845	225	UUGCGACUGA UCUA	mm0m00mm00m mmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 14	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2847	226	GCGACUGAUC UUA	mm00mm00mm mmmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 15	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2871	227	CCUAUCCGUU ACUA	mmm0mmm0mm 0mmm	ooooooooo oosso
IncFBXO 16	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2873	228	UAUCCGUUAC UGAA	mmmmmm0mm0m m0mm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 3 0 5 】

【表 1 - 1 3】

lncFBXO 17	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	3806	229	ACUCGAUAAC ACCA	mmmm00m00m0 mmm	ooooooooo oosso
lncFBXO 18	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	685	230	GGUAGAUCUA GCUA	mmm000mmm00 mmm	ooooooooo oosso
lncFBXO 19	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	687	231	UAGAUCUAGC UUCA	mm00mmm00m mmmm	ooooooooo oosso
lncFBXO 20	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	689	232	GAUCUAGCUU CAUA	mmmmmm00mmm m0mm	ooooooooo oosso
lncFBXO 21	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	1073	233	AGGUAUCCAA UCCA	mm0m0mmm00 mmmm	ooooooooo oosso
lncFBXO 22	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	1071	234	UAAGGUAUCC AAUA	mm000m0mmm0 0mm	ooooooooo oosso
lncFBXO 23	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2071	235	GACUAGCAUA GGUA	mmmm00m0m00 0mm	ooooooooo oosso
lncFBXO 24	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2074	236	UAGCAUAGGU CUGA	mm0m0m000mm mmm	ooooooooo oosso
lncFBXO 25	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2076	237	GCAUAGGUCU GUUA	mm0m000mmm0 mmm	ooooooooo oosso
lncFBXO 26	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2600	238	AGCGUUGUUU AAUA	mmm0mm0mmm 00mm	ooooooooo oosso
lncFBXO 27	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2870	239	UCCUAUCCGU UACA	mmmm0mmm0m m0mm	ooooooooo oosso
lncFBXO 28	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2874	240	AUCCGUUACU GAAA	mmmm0mm0mm 00mm	ooooooooo oosso
lncFBXO 29	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2876	241	CCGUUACUGA AAGA	mm0mm0mm000 0mm	ooooooooo oosso
lncFBXO 30	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	200	242	UAUAUGUCGU CUUA	mmm0m0mm0m mmmm	ooooooooo oosso
lncNDST3 1	LNC NDST3	ENST00000 602414	77	243	AAAGUACGUA GUUA	mm00m0m0m00 mmm	ooooooooo osso
lncNDST3 2	LNC NDST3	ENST00000 602414	78	244	AAGUACGUAG UUGA	mm0m0m0m00m mmm	ooooooooo osso
lncNDST3 3	LNC NDST3	ENST00000 602414	79	245	AGUACGUAGU UGUA	mmmm0m0m00m m0mm	ooooooooo osso
lncNDST3 4	LNC NDST3	ENST00000 602414	81	246	UACGUAGUUG UCUA	mmmm0m00mm0 mmmm	ooooooooo osso
lncNDST3 5	LNC NDST3	ENST00000 602414	440	247	ACAUUACGAU GGAA	mm0mm0m00m0 0mm	ooooooooo osso

10

20

30

40

【 0 3 0 6 】

【表 1 - 1 4】

IncNDST3 6	LNC NDST3	ENST00000 602414	441	248	CAUUACGAUG GAUA	mmmm0m00m00 0mm	ooooooooo osso
IncNDST3 7	LNC NDST3	ENST00000 602414	442	249	AUUACGAUGG AUGA	mmm0m00m000 mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 8	LNC NDST3	ENST00000 602414	443	250	UUACGAUGGA UGAA	mm0m00m000m 0mm	ooooooooo osso
IncNDST3 9	LNC NDST3	ENST00000 602414	444	251	UACGAUGGAU GAUA	mmm00m000m0 0mm	ooooooooo osso
IncNDST3 10	LNC NDST3	ENST00000 602414	445	252	ACGAUGGAUG AUGA	mm00m000m00 mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 11	LNC NDST3	ENST00000 602414	508	253	AGCAUCCGGC AAUA	mmm0mmm00m 00mm	ooooooooo osso
IncNDST3 12	LNC NDST3	ENST00000 602414	523	254	ACUUAUCGUA GUUA	mmmm0mm0m0 0mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 13	LNC NDST3	ENST00000 602414	524	255	CUUAUCGUAG UUGA	mmm0mm0m00 mmmm	ooooooooo osso
IncNDST3 14	LNC NDST3	ENST00000 602414	625	256	GUGGUCCGUG AUAA	mm0mmm0m00 mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 15	LNC NDST3	ENST00000 602414	626	257	UGGUCCGUGA UAAA	mm0mmm0m00 m0mm	ooooooooo osso
IncNDST3 16	LNC NDST3	ENST00000 602414	627	258	GGUCCGUGAU AAUA	mmmmm0m00m 00mm	ooooooooo osso
IncNDST3 17	LNC NDST3	ENST00000 602414	628	259	GUCCGUGAUA AUUA	mmmm0m00m00 mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 18	LNC NDST3	ENST00000 602414	629	260	UCCGUGAUAA UUAA	mmm0m00m00m mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 19	LNC NDST3	ENST00000 602414	91	261	UCUUUCGUAA GUUA	mmmmmm0m00 0mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 20	LNC NDST3	ENST00000 602414	92	262	CUUUCGUAA UUAA	mmmm00m000m mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 21	LNC NDST3	ENST00000 602414	515	263	GGCAAUGGAC UUAA	mmm00m000mm mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 22	LNC NDST3	ENST00000 602414	550	264	UCCGAAUAAU AUCA	mmm000m00m0 mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 23	LNC NDST3	ENST00000 602414	551	265	CCGAAUAAUA UCCA	mm000m00m0m mmm	ooooooooo osso
IncNDST3 24	LNC NDST3	ENST00000 602414	623	266	AGGUGGUCCG UGAA	mm0m00mmm0 m0mm	ooooooooo osso

10

20

30

40

【表 1 - 15】

IncNDST3 25	LNC NDST3	ENST00000 602414	624	267	GGUGGUCCGU GAUA	mmm00mmm0m 00mm	oooooooo osso	
IncNDST3 26	LNC NDST3	ENST00000 602414	630	268	CCGUGAUAAU UAAA	mm0m00m00mm 0mm	oooooooo osso	
IncNDST3 27	LNC NDST3	ENST00000 602414	130	269	UGCCUUACCU AAAA	mmmmmm0mm m00mm	oooooooo osso	
IncNDST3 28	LNC NDST3	ENST00000 602414	131	270	GCCUUACCUA AAAA	mmmmmm0mmm0 00mm	oooooooo osso	10
IncNDST3 29	LNC NDST3	ENST00000 602414	516	271	GCAAUGGACU UAUA	mm00m000mmm 0mm	oooooooo osso	
IncNDST3 30	LNC NDST3	ENST00000 602414	519	272	AUGGACUUAU CGUA	mm000mmm0m m0mm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 1	LNC Malat1	MALAT1	445	273	UUCGCUUAGU UGGA	mmm0mmm00m m0mm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 2	LNC Malat1	MALAT1	860	274	GUUGCGUAAU GGAA	mmm0m0m00m0 0mm	oooooooo osso	20
IncMALAT 1 3	LNC Malat1	MALAT1	1006	275	AUGACCCGUU UAAA	mm00mmm0mm m0mm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 4	LNC Malat1	MALAT1	1007	276	UGACCCGUUU AAAA	mm0mmm0mmm 00mm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 5	LNC Malat1	MALAT1	1818	277	UAAACGCAGA CGAA	mm00m0m000m 0mm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 6	LNC Malat1	MALAT1	1821	278	ACGCAGACGA AAAA	mm0m000m00m 0mm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 7	LNC Malat1	MALAT1	2513	279	UUCGUAACGG AAGA	mmm0m00m00m 0mm	oooooooo osso	30
IncMALAT 1 8	LNC Malat1	MALAT1	2813	280	AGCGCUAACG AUUA	mmm0mm00m00 mmm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 9	LNC Malat1	MALAT1	3087	281	UCGUACUGAG GUGA	mm0m0mm00m0 mmm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 10	LNC Malat1	MALAT1	7883	282	UAAUCGGUUU CAAA	mm0mm00mmm m0mm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 11	LNC Malat1	MALAT1	8585	283	ACGAGAACCU AAUA	mm000m0mmm0 0mm	oooooooo osso	40
IncMALAT 1 12	LNC Malat1	MALAT1	1218	284	CGAAUUCGG UGAA	mm00mmmm00 m0mm	oooooooo osso	
IncMALAT 1 13	LNC Malat1	MALAT1	1251	285	UAAAUACGCC UCGA	mm00m0m0mm mmmm	oooooooo osso	

【 0 3 0 8 】

【表 1 - 1 6】

lncMALAT1 114	LNC Malat1	MALAT1	3014	286	UCGGCAAUAU GUUA	mm00m00m0m0 mmm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 115	LNC Malat1	MALAT1	5094	287	UUACGGAAUC UACA	mm0m00m0mm m0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 116	LNC Malat1	MALAT1	5338	288	UCGUUUGCCU CAGA	mm0mmm0mmm m0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 117	LNC Malat1	MALAT1	5970	289	GUCUGCGAAC ACUA	mmmm0m000m0 mmm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 118	LNC Malat1	MALAT1	6008	290	AGCGGAAGAA CGAA	mmm000m00mm 0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 119	LNC Malat1	MALAT1	6634	291	AUCCCGCUGC UAUA	mmmmm0mm0m m0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 120	LNC Malat1	MALAT1	6662	292	AACGACUGGA GUAA	mmm00mm00m0 mmm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 121	LNC Malat1	MALAT1	6782	293	GUCGUUUUG UGAA	mmm0m0mmm0 m0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 122	LNC Malat1	MALAT1	7439	294	ACCGAAGGCU UAAA	mmm000m0mm m0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 123	LNC Malat1	MALAT1	7681	295	UCAAGCGGUG CUUA	mm000m00m0m mmm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 124	LNC Malat1	MALAT1	8219	296	UAGCGGAAGC UGAA	mm0m00m00mm 0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 125	LNC Malat1	MALAT1	4012	297	UGAGUAGGCC AAAA	mm00m000mm0 0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 126	LNC Malat1	MALAT1	2325	298	ACGUAGACCA GAAA	mm0m000mm00 0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 127	LNC Malat1	MALAT1	2742	299	UUCGUGGUGA AGAA	mmmm0m00m000 0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 128	LNC Malat1	MALAT1	1423	300	CUUAGCGUUA AGUA	mmmm00m0mm00 0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 129	LNC Malat1	MALAT1	1610	301	CCCGAAUUA UACA	mmmm000mm00m 0mm	ooooooooo oosso
lncMALAT1 130	LNC Malat1	MALAT1	810	302	AAGUCCGCCA UUUA	mm0mmm0mm0 mmmm	ooooooooo oosso
lncFAM22 E1 1	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	509	303	UAGAGGUUAU UCCCA	mm00m0m0mm mmmm	ooooooooo osso
lncFAM22 E1 2	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	716	304	CCGUGCGCUU UAUA	mm0m0m0mmm m0mm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 3 0 9 】

【表 1 - 17】

IncFAM22 E1 3	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1139	305	CCAGCCUUA AUCA	mm00mmmm000 mmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 4	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1148	306	AAUCGAGCCG ACUA	mmmm000mm00 mmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 5	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1149	307	AUCGAGCCGA CUAA	mmm000mm00m mmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 6	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1150	308	UCGAGCCGAC UACA	mm000mm00mm 0mm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 7	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1328	309	GCUUCAGCGG AAUA	mmmmmm00m00 m0mm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 8	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1334	310	GCGGAAUACC UACA	mm00m0m0mm m0mm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 9	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1335	311	CGGAAUACCU ACUA	mm000m0mmm0 mmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 10	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1362	312	AACAAGCCGA UUGA	mmm000mm00m mmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 11	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1363	313	ACAAGCCGAU UGAA	mm000mm00mm 0mm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 12	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1364	314	CAAGCCGAUU GAUA	mm00mm00mm0 0mm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 13	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1365	315	AAGCCGAUUG AUCA	mm0mm00mm00 mmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 14	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1366	316	AGCCGAUUGA UCAA	mmmm00mm00 mmmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 15	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1367	317	GCCGAUUGAU CACA	mmm00mm00m m0mm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 16	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1368	318	CCGAUUGAUC ACAA	mm00mm00mm0 mmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 17	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1369	319	CGAUUGAUCA CAUA	mm0mm00mm0 m0mm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 18	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1562	320	UACCCUUAUG GCUA	mmmmmmmm0m0 0mmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 19	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1563	321	ACCCUUAUGG CUAA	mmmmmm0m00 mmmm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 20	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1564	322	CCCUUAUGGC UAAA	mmmmmm0m00m m0mm	ooooooooo oosso
IncFAM22 E1 21	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1140	323	CAGCCUAAA UCGA	mm0mmmm000 mmmm	ooooooooo oosso

10

20

30

40

【 0 3 1 0 】

【表 1 - 18】

IncFAM22 E1 22	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1565	324	CCUUAUGGCU AAAA	mmmm0m00mm 00mm	oooooooo oosso
IncFAM22 E1 23	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	507	325	ACUAGAGGUA UUCA	mmm000m0m0m mmm	oooooooo oosso
IncFAM22 E1 24	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	508	326	CUAGAGGUAU UCCA	mm00m00m0mm mmm	oooooooo oosso
IncFAM22 E1 25	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1141	327	AGCCUUAAAU CGAA	mmmmmm000m m0mm	oooooooo oosso
IncFAM22 E1 26	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1142	328	GCCUUAAAUC GAGA	mmmmmm000mm 00mm	oooooooo oosso
IncFAM22 E1 27	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1370	329	GAUUGAUCAC AUUA	mmmm00mm0m 0mmm	oooooooo oosso
IncFAM22 E1 28	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1389	330	CUCUAGCAGU GCAA	mmmm00m0m0 mmm	oooooooo oosso
IncFAM22 E1 29	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1390	331	UCUAGCAGUG CAAA	mmm00m00m0m 0mm	oooooooo oosso
IncFAM22 E1 30	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1492	332	UCUUAUGACA GCAA	mmmm0m00m00 mmm	oooooooo oosso

10

20

図 1 凡例：

o : ホスホジエステル

P : 5'リン酸化

f : 2'-フルオロ

【0311】

【表 2 - 1】

s : ホスホロチオアート

0 : 2'-OH

m : 2'-O-メチル

30

表2: アンチセンス鎖オリゴヌクレオチド

オリゴID	遺伝子名	アクセッション 番号	開始 部位	配列 番号	アンチセンス配列	アンチセンス化学	アンチセンス骨格
IncRala1 1	LNC Rala1	ENST00000 340510	140	333	UGAUUCUGAAG CGGAACCU	Pm00ffff00m0f 00m0ff0	oooooooo ooosssssso
IncRala1 2	LNC Rala1	ENST00000 340510	296	334	UAGGCUCGGGA UCAUGUAA	Pm000fff0m00 ff0f0f00	oooooooo ooosssssso
IncRala1 3	LNC Rala1	ENST00000 340510	366	335	UUACAGCGGAA AAAGGCAG	Pmf0f00f00m0 0m000f00	oooooooo ooosssssso
IncRala1 4	LNC Rala1	ENST00000 340510	367	336	UUUACAGCGGA AAAAGGCA	Pmff0f00f000 m000m0f0	oooooooo ooosssssso
IncRala1 5	LNC Rala1	ENST00000 340510	368	337	UUUUACAGCGG AAAAAGGC	Pmfff0f0f000 m00m000	oooooooo ooosssssso
IncRala1 6	LNC Rala1	ENST00000 340510	369	338	UAUUUACAGCG GAAAAAGG	Pm0fff0f00f00 m00m0m0	oooooooo ooosssssso

40

【0312】

50

【表 2 - 2】

IncRala1 7	LNC Rala1	ENST00000 340510	370	339	UUAUUUACAGC GGAAAAAG	Pmf0fff0f00f00 0m0m00	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 8	LNC Rala1	ENST00000 340510	487	340	UAAUUCGCUU GGCAAGAA	Pm00ffff0fff00 f00m00	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 9	LNC Rala1	ENST00000 340510	488	341	UAAAUUCGCU UGGCAAGA	Pm000ffff0fff0 0f0000	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 10	LNC Rala1	ENST00000 340510	489	342	UAAAAUCCGC UUGGCAAG	Pmf000ffff0fff 00f000	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 11	LNC Rala1	ENST00000 340510	490	343	UUAAAUCCG CUUGCAA	Pmff000ffff0fff 00f00	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 12	LNC Rala1	ENST00000 340510	491	344	UUUUAAUUC GCUUGGCA	Pmfff000ffff0ff f00f0	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 13	LNC Rala1	ENST00000 340510	492	345	UAUUAAAUUC CGCUUGGC	Pm0fff000ffff0 fff000	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 14	LNC Rala1	ENST00000 340510	620	346	UUCUCUGCGGC UCAAAUGU	Pmffff0f00fff0 00f00	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 15	LNC Rala1	ENST00000 340510	622	347	UGAUCUCUGCG GCUCAAU	Pm00ffff0f00f ff00m0	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 16	LNC Rala1	ENST00000 340510	852	348	UGACUGACGUG GUAGGAU	Pm00ff00f0f00 f00m0f0	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 17	LNC Rala1	ENST00000 340510	853	349	UAGACUGACGU GGUAGGAU	Pm000ff00f0f0 0f00m00	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 18	LNC Rala1	ENST00000 340510	1662	350	UGUGUUAAGCU CGUUUCC	Pm0f0ff000fff0 ffff0	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 19	LNC Rala1	ENST00000 340510	1663	351	UCGUGUUAAGC UCGUUUUC	Pmf0f0ff000fff 0fff0	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 20	LNC Rala1	ENST00000 340510	1664	352	UGCGUGUUAAG CUCGUUUU	Pm0f0f0ff000ff f0fff0	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 21	LNC Rala1	ENST00000 340510	1205	353	UUGCAUUCGAA AGGAUCCA	Pmf0f0fff0m00 m00fff0	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 22	LNC Rala1	ENST00000 340510	1208	354	UAAGUGCAUUC GAAAGGAU	Pm000f0f0fff0 00m00m0	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 23	LNC Rala1	ENST00000 340510	1926	355	UGACGUCGACU UGAGAAAG	Pm00f0ff00fff0 00m0m0	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 24	LNC Rala1	ENST00000 340510	2933	356	UAAGUUCGGG CCUACAAA	Pm000fff0000f ff0f000	ooooooooo ooosssssso
IncRala1 25	LNC Rala1	ENST00000 340510	1857	357	UAUUGUAACGA UGGAGCUG	Pm0ff0f00f00f 0000ff0	ooooooooo ooosssssso

10

20

30

40

【表 2 - 3】

lncRala1 26	LNC Rala1	ENST00000 340510	1203	358	UCAUUCGAAAG GAUCCAUC	Pmf0fff000m0 00fff0f0	00000000 000ssssso
lncRala1 27	LNC Rala1	ENST00000 340510	1784	359	UUAGGGUAUGG GCCUAAAU	Pmf00m0f0f00 0fff0000	00000000 000ssssso
lncRala1 28	LNC Rala1	ENST00000 340510	99	360	UUUCAGGGUCU AUAUAAGA	Pmfff0000fff0f 0f00m0	00000000 000ssssso
lncRala1 29	LNC Rala1	ENST00000 340510	1480	361	UUGUGAUAGCA CUACUACA	Pmf0f00f00f0ff 0ff0f0	00000000 000ssssso
lncRala1 30	LNC Rala1	ENST00000 340510	1154	362	UUGCAGUGGUC AACUUGUA	Pmf0f00f00ff0 0fff0f0	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 1	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	588	363	UAGAUUCGGGC AGAGAUUG	Pm000fff000f0 m000ff0	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 2	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	590	364	UGAAGAUUCGG GCAGAGAU	Pm00m00fff00 0f000m00	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 3	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	593	365	UUGUGAAGAUU CGGGCAGA	Pmf0f0m000fff 000f000	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 4	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	801	366	UUACGGGUCGA AUUGUGUC	Pmf0f000ff000 ff0f0f0	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 5	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	804	367	UUGUUACGGGU CGAAUUGU	Pmf0ff0f000ff0 00ff00	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 6	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	807	368	UAGCUGUUACG GGUCGAAU	Pm00ff0ff0f00 0ff0000	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 7	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	836	369	UGAAGCACAUC GGAUGUGU	Pmm000f0f0ff 000f0f00	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 8	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	960	370	UAAUAAAGGUC CGUGGAAA	Pm00f000m0ff f0f000m0	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 9	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1073	371	UAUCUCUUCGG AGAGAUC	Pm0ffffff000 m000ff0	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 10	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1075	372	UGAAUCUCUUC GGAGAGAU	Pm000ffffff00 000m00	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 11	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1076	373	UGGAAUCUCUU CGGAGAGA	Pmm000ffffff 0000m00	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 12	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1281	374	UCAGCUAAUCG GCUAUGGA	Pmf00ff00ff00f f0f000	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 13	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1581	375	UGUGUGGCGAU AAGCUUGU	Pm0f0f00f00f0 00fff00	00000000 000ssssso
lncZBTB 42 14	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2212	376	UUUCAAACGU CCAGCAGC	Pmffff000f0ff 00f000	00000000 000ssssso

10

20

30

40

【表 2 - 4】

IncZBTB 42 15	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2213	377	UUUUCAAACG UCCAGCAG	Pmffff000f0ff 00f00	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 16	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2137	378	UUUGAUUAGGC CUAACUCA	Pmff00ff000ff 00ff0	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 17	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2141	379	UUACGUUGAUU AGGCCUAA	Pmf0f0ff00ff0 0ff00	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 18	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	636	380	UAUAAAGACGG GAAAUUUG	Pm0f00m00f0 0m00ff0	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 19	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1574	381	UGAUAAAGCUUG UGUCCAUC	Pm00f000ff0f 0ff0f0	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 20	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1575	382	UCGAUAAGCUU GUGUCCAUC	Pmf00f000ff0f 0ff00	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 21	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	694	383	UAAGUUAGGGU GAGUCAUC	Pm000ff00m0f 000ff0f0	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 22	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	699	384	UCCAUCAAGUU AGGGUGAG	Pmff0ff000ff0 m00f000	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 23	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2145	385	UGAUUUACGUU GAUUAGGC	Pm00ff0f0ff00 ff0000	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 24	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2149	386	UGACAGAUUUA CGUUGAUU	Pm00f000ff0f 0ff00f0	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 25	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	700	387	UCCAUCAAGU UAGGGUGA	Pmfff0ff00ff0 00mf00	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 26	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2134	388	UAUUAGGCCUA ACUCACAG	Pm0ff000fff00f ff0f00	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 27	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1307	389	UGCAGUCCUUA CACAGAGU	Pm0f00ffff0f0 f00m0	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 28	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	640	390	UCCUUAUAAAG ACGGGAAA	Pmffff0f0m000 f000m00	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 29	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	1616	391	UCUUGUAAUCC AGGGCCUU	Pmfff0f00ff0 m00ff0	00000000 00ssssssso
IncZBTB 42 30	LNC ZBTB42	ENST00000 555578	2133	392	UUUAGGCCUAA CUCACAGG	Pmff000ff00ff f0f000	00000000 00ssssssso
IncPAN K1 1	LNC PANK1	ENST00000 455699	174	393	UGUUGAGCUCC AAUGCUGA	Pm0ff000ffff0 f0ff00	00000000 00ssssssso
IncPAN K1 2	LNC PANK1	ENST00000 455699	176	394	UUAGUUGAGCU CCAAUGCU	Pmf00ff000fff 00f0f0	00000000 00ssssssso
IncPAN K1 3	LNC PANK1	ENST00000 455699	179	395	UCGGUAGUUGA GCUCCAUA	Pmf00f00ff00 ffff000	00000000 00ssssssso

10

20

30

40

【 0 3 1 5 】

【表 2 - 5】

IncPAN K1 4	LNC PANK1	ENST00000 455699	188	396	UUGACACAGUC GGUAGUUG	Pmf00f0f00ff0 0f00ff0	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 5	LNC PANK1	ENST00000 455699	191	397	UGAUUGACACA GUCGGUAG	Pm00ff00f0f00 ff00f00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 6	LNC PANK1	ENST00000 455699	211	398	UGGAACCUGAU ACUCUUAU	Pmm000fff00f 0ffff00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 7	LNC PANK1	ENST00000 455699	419	399	UAAGACUAUAG ACCUGCAU	Pmm000ff0f00 0ff0f00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 8	LNC PANK1	ENST00000 455699	565	400	UUUACGGAUAC AAGUGCUG	Pmff0f000f0f0 00f0ff0	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 9	LNC PANK1	ENST00000 455699	568	401	UGACUACGGA UACAAGUG	Pm00fff0f000f 0f000f0	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 10	LNC PANK1	ENST00000 455699	571	402	UUGUGACUUAC GGAUACAA	Pmf0f00ff0f00 0f0f00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 11	LNC PANK1	ENST00000 455699	573	403	UUGUGUGACUU ACGGAUAC	Pmf0f0f00ff0f 000f00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 12	LNC PANK1	ENST00000 455699	636	404	UCUUUUCGACA UUUUCCAU	Pmffffff00f0fff fff00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 13	LNC PANK1	ENST00000 455699	415	405	UCUAUAGACCU GCAUUAAA	Pmff0f000ff0f 0ff000	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 14	LNC PANK1	ENST00000 455699	418	406	UAGACUAUAGA CCUGCAUU	Pm000ff0f000f ff0f0f0	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 15	LNC PANK1	ENST00000 455699	505	407	UGGCAUAUAAU CCUGGUGC	Pm00f0f0f00fff f00f00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 16	LNC PANK1	ENST00000 455699	259	408	UUCUGGUAUUG UCUGCCAA	Pmfff00f0ff0fff 0ff00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 17	LNC PANK1	ENST00000 455699	421	409	UAAAAGACUAU AGACCUGC	Pmf00m00ff0f 000fff00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 18	LNC PANK1	ENST00000 455699	502	410	UAUAUAAUCCU GGUGCCAA	Pm0f0f00ffff0 f0ff00	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 19	LNC PANK1	ENST00000 455699	341	411	UUGCAGCUAAU ACUUGUCU	Pmf0f00ff0ff0f ff0ff0	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 20	LNC PANK1	ENST00000 455699	351	412	UCUCAAGGUUA UGCAGCUA	Pmfff00m0ff0f 0f00ff0	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 21	LNC PANK1	ENST00000 455699	257	413	UUGGUAUUGUC UGCCAAGA	Pmf00f0f0fff0 ff0000	00000000 000SSSSSS0
IncPAN K1 22	LNC PANK1	ENST00000 455699	367	414	UCUCAGUCAGU AUCUUGCU	Pmfff00ff00f0f fff0f0	00000000 000SSSSSS0

10

20

30

40

【表 2 - 6】

IncPAN K1 23	LNC PANK1	ENST00000 455699	55	415	UGACAU AAGAC UCAAUCCU	Pm00f0f0m00f ff00fff0	oooooooo ooosssssso
IncPAN K1 24	LNC PANK1	ENST00000 455699	424	416	UGAGUAAAGAC UAUAGACC	Pm000f00m00f f0f000f0	oooooooo ooosssssso
IncPAN K1 25	LNC PANK1	ENST00000 455699	253	417	UAUUGUCUGCC AAGAUGAU	Pm0ff0fff0fff0 00f000	oooooooo ooosssssso
IncPAN K1 26	LNC PANK1	ENST00000 455699	217	418	UAGCACAGGAA CCUGAUAC	Pm00f0f00m00 fff00f00	oooooooo ooosssssso
IncPAN K1 27	LNC PANK1	ENST00000 455699	545	419	UACAAUAGAGG CUUCAU AU	Pm0f00f00m00 ffff0f00	oooooooo ooosssssso
IncPAN K1 28	LNC PANK1	ENST00000 455699	304	420	UUCCUAACAUU UGGUCACU	Pmffff00f0fff0 0ff0f0	oooooooo ooosssssso
IncPAN K1 29	LNC PANK1	ENST00000 455699	115	421	UACUUCUACAU CCUGUUGU	Pm0ffff0f0ffff 0ff00	oooooooo ooosssssso
IncPAN K1 30	LNC PANK1	ENST00000 455699	150	422	UUGGAGAUGCU UUGCACAC	Pmf00m00f0fff f0f0f00	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 1	LNC EBF3	ENST00000 456581	744	423	UACAAAAGUCG CCAGGCAU	Pm0f00m00ff0 ff000f00	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 2	LNC EBF3	ENST00000 456581	746	424	UAUACAAAAGU CGCCAGGC	Pm0f0f00m00f f0ff0m00	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 3	LNC EBF3	ENST00000 456581	1506	425	UUCAUCCGUCU UUACCAGC	Pmff0fff0ffff0 ff000	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 4	LNC EBF3	ENST00000 456581	1593	426	UAU AUUCGUCU UUACUACC	Pm0f0fff0ffff0 ff0f0	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 5	LNC EBF3	ENST00000 456581	1596	427	UAGCAU AUUCG UCUUUACU	Pm00f0f0fff0ff fff0f0	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 6	LNC EBF3	ENST00000 456581	1652	428	UGUUGACGAUU CCUGCCA U	Pm0ff00f00ffff f0ff00	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 7	LNC EBF3	ENST00000 456581	1655	429	UGAUGUUGACG AUUCCUGC	Pm00f0ff00f00 fffff00	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 8	LNC EBF3	ENST00000 456581	1656	430	UAGAUGUUGAC GAUUC CUG	Pm000f0ff00f0 0ffff0	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 9	LNC EBF3	ENST00000 456581	1657	431	UAAGAUGUUGA CGAUUCCU	Pmm000f0ff00 f00ffff0	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 10	LNC EBF3	ENST00000 456581	2032	432	UCUGCAACGGC UUCUUGU	Pmff0f00f00fff ffff00	oooooooo ooosssssso
IncEBF3 11	LNC EBF3	ENST00000 456581	2209	433	UCACAAUCCA CGGAGCAA	Pmf0f00ffff0f0 000f00	oooooooo ooosssssso

10

20

30

40

【 0 3 1 7 】

【表 2 - 7】

IncEBF3 12	LNC EBF3	ENST00000 456581	2593	434	UCCUUUCGAAA UUGCUCAU	Pmffffff0m00ff 0fff00	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 13	LNC EBF3	ENST00000 456581	2595	435	UAACCUUUCGA AAUUGCUC	Pm00ffffff00m 0ff0ff0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 14	LNC EBF3	ENST00000 456581	2597	436	UGGAACCUUUC GAAAUUGC	Pmm000ffffff0 00mff00	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 15	LNC EBF3	ENST00000 456581	240	437	UAAAAAGCCGA GCACUGGA	Pm000m00ff00 0f0ff000	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 16	LNC EBF3	ENST00000 456581	2193	438	UAAGAGAACGA UGUUUGUG	Pm000m000f0 0f0fff0f0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 17	LNC EBF3	ENST00000 456581	1878	439	UUGGGACCAU ACGUGAAA	Pmf0m00ff0ff0 f0f0m0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 18	LNC EBF3	ENST00000 456581	2205	440	UAUCCACGGA GCAAGAGA	Pm0ffff0m000 f00m000	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 19	LNC EBF3	ENST00000 456581	1511	441	UGACAAUCAUC CGUCUUUA	Pm00f00ff0fff0 ffff0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 20	LNC EBF3	ENST00000 456581	1843	442	UUCACCUCUGG UACAUCUA	Pmfff0ffff00f0f 0fff0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 21	LNC EBF3	ENST00000 456581	1879	443	UCUGGGACCAU UACGUGAA	Pmff00m0ff0ff 0f0f000	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 22	LNC EBF3	ENST00000 456581	1354	444	UUCUGUACCAG UCAUAGCC	Pmfff0f0ff00ff 0f00f0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 23	LNC EBF3	ENST00000 456581	2317	445	UUGUGAGUCUU ACUGCAGA	Pmf0f000ffff0f f0f000	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 24	LNC EBF3	ENST00000 456581	1527	446	UAAGCUUGGAC CUCUAAGA	Pm000fff000fff ff00m0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 25	LNC EBF3	ENST00000 456581	1544	447	UACAAAGGCCU ACAGUAAA	Pm0f00m00fff 0f00f000	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 26	LNC EBF3	ENST00000 456581	1325	448	UCAGAUACAUG GGCGAACA	Pmf000f0f0f00 0f000f0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 27	LNC EBF3	ENST00000 456581	2409	449	UCUCAAGUCAU CAGACUCU	Pmfff000ff0ff0 00fff0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 28	LNC EBF3	ENST00000 456581	933	450	UUGAACUUACC AGAGACUU	Pmf000fff0ff00 0m0ff0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 29	LNC EBF3	ENST00000 456581	1296	451	UAAAGGGGUUA UUACAAAA	Pm000m000ff0 ff0f00m0	ooooooooo ooosssssso
IncEBF3 30	LNC EBF3	ENST00000 456581	1297	452	UCAAGGGGUU AUUACAAA	Pmf000m000ff 0ff0f000	ooooooooo ooosssssso

10

20

30

40

【表 2 - 8】

IncScand 1 1	LNC Scand 1	ENST00000 565493	849	453	UAUCAUACGUC GGCAACCU	Pm0ff0f0f0ff0 f00ff0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 2	LNC Scand 1	ENST00000 565493	851	454	UUUAUCAUACG UCGGCAAC	Pmff0ff0f0f0ff 00f000	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 3	LNC Scand 1	ENST00000 565493	985	455	UAACGUGGACG UAUCGCUU	Pm00f0f0000ff 0ff0ff0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 4	LNC Scand 1	ENST00000 565493	2663	456	UAAAAUCGGGA CUAAUUUG	Pmm000ff0m0 0ff00ff0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 5	LNC Scand 1	ENST00000 565493	2971	457	UUUUGUCCGCU AUAUACAC	Pmfff0ff0ff0f0 f0f00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 6	LNC Scand 1	ENST00000 565493	2973	458	UAGUUUGUCCG CUAUAUAC	Pm00fff0fff0ff 0f0f00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 7	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3283	459	UAUGUCCGCUU AUAUACAC	Pm0f0fff0fff0f 0f0f00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 8	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3285	460	UCUAUGUCCGC UUAUAUAC	Pmff0f0fff0fff0 f0f00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 9	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3288	461	UCUCCUAUGUC CGCUUAUA	Pmffffff0f0fff0f ff0f0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 10	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3312	462	UACAUCGACUA GACGUAAA	Pm0f0ff00ff00 0f0f000	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 11	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3313	463	UACAUCGACU AGACGUAA	Pm00f0ff00ff0 00f0f00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 12	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3314	464	UUAACAUCGAC UAGACGUA	Pmf00f0ff00ff0 00f0f0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 13	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4972	465	UCAACACGCCU CUAGAUAA	Pmf00f0f0fffff 000f00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 14	LNC Scand 1	ENST00000 565493	654	466	UCUCUUCGAC AGCAAAGU	Pmffffff00f00f 00m00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 15	LNC Scand 1	ENST00000 565493	656	467	UCUCUCUCCG ACAGCAA	Pmffffff00f0 0f000	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 16	LNC Scand 1	ENST00000 565493	733	468	UAUAAACGGCC AGUAAAUC	Pm0f000f00ff0 0f000f0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 17	LNC Scand 1	ENST00000 565493	736	469	UCCAUAACG GCCAGUAA	Pmfff0f0000f0f f00f00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 18	LNC Scand 1	ENST00000 565493	991	470	UUUAACAAACG UGGACGUA	Pmff00f0000f0f 000f0f0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 19	LNC Scand 1	ENST00000 565493	1057	471	UCCAGUCUAGC AUAGAACC	Pmff00fff00f0f 00m0f0	00000000 000SSSSSSO

10

20

30

40

【 0 3 1 9 】

【表 2 - 9】

IncScand 1 20	LNC Scand 1	ENST00000 565493	1386	472	UUCUUGCCUCG CUGUAAAC	Pmffff0ffff0ff0 f0000	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 21	LNC Scand 1	ENST00000 565493	1459	473	UUAGGACUCGU CUGUCCUU	Pmf00m0fff0ff f0ffff0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 22	LNC Scand 1	ENST00000 565493	1778	474	UCAUACAUCGG GCACUUCU	Pmf0f0f0ff000f 0ffff0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 23	LNC Scand 1	ENST00000 565493	2158	475	UUUCCUACGA AUUCAAC	Pmffffff0f000ff ff000	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 24	LNC Scand 1	ENST00000 565493	3981	476	UUUAGAGGGGU GUUACUUA	Pmff000m000f 0ff00ff0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 25	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4064	477	UGUCUGCAUUC GCUCCUAA	Pm0fff0f0fff0ff fff00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 26	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4168	478	UCA AUGGUUAG ACCAUCUG	Pmf00f00ff000 ff0fff0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 27	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4435	479	UACCAUCGUCU AGAU AUGG	Pm0ff0ff0fff00 0f0f00	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 28	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4440	480	UCUAAAACCAU CGUCUAGA	Pmff00m0ff0ff 0fff000	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 29	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4474	481	UACUAAAACG CUCUUGUA	Pm0ff00m00f0 ffffff0f0	00000000 000SSSSSSO
IncScand 1 30	LNC Scand 1	ENST00000 565493	4535	482	UCAUUCGUAAA GCUUAGAU	Pmf0fff0f000m fff00m0	00000000 000SSSSSSO
IncFAM6 9C2 1	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	166	483	UUAUCUCUUAG CGGCUUCC	Pmf0ffffff00f0 0ffff0	00000000 000SSSSSSO
IncFAM6 9C2 2	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	240	484	UCGCUCAUCGA AUUUAGAU	Pmf0fff0ff000f ff0000	00000000 000SSSSSSO
IncFAM6 9C2 3	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	241	485	UGCGCUCAUCG AAUUUAGA	Pm0f0fff0ff000 fff000	00000000 000SSSSSSO
IncFAM6 9C2 4	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	242	486	UCGCGCUCAUC GAAUUUAG	Pmf0f0fff0ff00 0fff00	00000000 000SSSSSSO
IncFAM6 9C2 5	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	764	487	UCUUGUCGAAC GUUUUAAA	Pmfff0ff000f0f fff000	00000000 000SSSSSSO
IncFAM6 9C2 6	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	766	488	UCCUUGUCGA ACGUUUUA	Pmffffff0ff00f 0ffff0	00000000 000SSSSSSO
IncFAM6 9C2 7	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	768	489	UAGUCCUUGUC GAACGUUU	Pm00ffffff0ff00 0f0ff0	00000000 000SSSSSSO
IncFAM6 9C2 8	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	790	490	UGUGCCGUUAA CGUUCAUA	Pm0f0ff0ff00f0 fff0f0	00000000 000SSSSSSO

10

20

30

40

【 0 3 2 0 】

【表 2 - 1 0】

IncFAM6 9C2 9	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	795	491	UAUGCUGUGCC GUUAACGU	Pm0f0ff0f0ff0f f0f0f0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 10	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	932	492	UUUAUUCGUCU ACACAGGU	Pmff0fff0fff0f0 f0000	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 11	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1391	493	UCCACUCGUUG GAAUGAUU	Pmff0fff0fff0m 00f00f0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 12	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1999	494	UAAUGUCGUUA UAAACUUG	Pm00f0ff0ff0f0 00fff0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 13	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2001	495	UGCAAUGUCGU UAUAAACU	Pm0f00f0ff0ff0 f000f0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 14	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	531	496	UUUUCUCGAAA UCGGAGCG	Pmffffff0000ff 0m00f0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 15	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	535	497	UGUCAUUUCUC GAAAUCGG	Pm0ff0ffffff00 0mff00	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 16	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	597	498	UGAGCCAUUCG AGAGAUUU	Pm000ff0fff00 000mff0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 17	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	876	499	UUAACUCGAGG UUCAUGAA	Pmf00fff0000ff f0f000	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 18	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	879	500	UCUCUAAUCUG AGGUUCAU	Pmffff00fff000 0fff00	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 19	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1573	501	UUGCAUCUUCG CAGCUUAG	Pmf0f0fffff0f0 0fff00	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 20	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1575	502	UUUUGCAUCUU CGCAGCUU	Pmfff0f0fffff0f 00ff0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 21	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1927	503	UCCACUAAGCA UAACCUAG	Pmff0ff000f0f0 0fff00	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 22	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2019	504	UCAUGGAGUGU AGCAUCCA	Pmf0f0000f0f0 0f0fff0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 23	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2674	505	UAGGUCCUUGA UACCAACA	Pm000fffff00f0 ff00f0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 24	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2721	506	UUUCAAUAGGG CAUUGAGA	Pmffff00f0m00f 0ff0m00	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 25	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	3316	507	UUACAAGUUGG GAUCCUCU	Pmf0f000ff000 0fffff0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 26	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	1749	508	UUUAUUUCGAU AGUUUCUG	Pmff0ffff00f00 fffff0	00000000 00ssssssso
IncFAM6 9C2 27	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2532	509	UCUCCUGGUAU AAGUGCUU	Pmffff00f0f00 0f0ff0	00000000 00ssssssso

10

20

30

40

【 0 3 2 1】

【表 2 - 1 1】

IncFAM6 9C2 28	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2724	510	UAUGUCAAUA GGGCAUUG	Pm0f0fff00f00 m0f0ff0	00000000 000ssssso
IncFAM6 9C2 29	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	2744	511	UAGCCAUCUUA CUACAGCC	Pm00ff0ffff0ff 0f00f0	00000000 000ssssso
IncFAM6 9C2 30	LNC FAM69C2	ENST00000 580048	3321	512	UGCAGCUACAA GUUGGGAU	Pm0f00ff0f000 ff000m0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 1	LNC VEZF1	ENST00000 585065	239	513	UCAGUACUCGA UAUAUCAA	Pmf00f0fff00f0 f0ff00	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 2	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2307	514	UUUUCUCGAGU ACAGAGGU	Pmfffff000f0f 00m000	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 3	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2637	515	UCCAACAAAUC GCAAGUAA	Pmff00f000ff0f 000f00	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 4	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2638	516	UCCAACAAAU CGCAAGUA	Pmffff00f00ff0 f000f0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 5	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2863	517	UGGUAGUCGAG GGCUUUUA	Pm00f00ff000 m0ffff0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 6	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3477	518	UUCUGCCGUUG UCAAUUAC	Pmffff0ff0ff0ff0 0ff00	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 7	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3478	519	UCUCUGCCGUU GUCAAUUA	Pmffff0ff0ff0ff 00ff0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 8	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3675	520	UCUAAGGUAAA CGGGCAA	Pmff00m0f000 f000f000	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 9	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3804	521	UUGUUAUCGAG UGGUUCUA	Pmf0ff0ff000f0 0ffff0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 10	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3805	522	UGUGUUAUCGA GUGGUUCU	Pm0f0ff0ff000f 00ff0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 11	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3806	523	UGGUGUUAUCG AGUGGUUC	Pm00f0ff0ff00 0f00ff0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 12	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3808	524	UUUGGUGUUAU CGAGUGGU	Pmff00f0ff0ff0 00f000	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 13	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4348	525	UAGAUGGACGC AUUAUUUU	Pm000f000f0f0 ff0ff0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 14	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4349	526	UCAGAUGGACG CAUUAUUU	Pmf000f000f0f 0ff0ff0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 15	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4350	527	UUCAGAUGGAC GCAUUAUU	Pmff000f000f0 f0ff0f0	00000000 000ssssso
IncVEZF 1 16	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4351	528	UUUCAGAUGGA CGCAUUUA	Pmffff000f000f 0f0ff00	00000000 000ssssso

10

20

30

40

【表 2 - 1 2】

lncVEZF 1 17	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2309	529	UAGUUUCUCGA GUACAGAG	Pm00fffff000f 0f0m00	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 18	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2312	530	UCAAGUUUCU CGAGUACA	Pmf00m0fffff 000f0f0	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 19	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2449	531	UGUAGGUAUG GGUCACAC	Pm0f000f00f00 0ff0f00	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 20	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2539	532	UACUCAUAGGC ACCAACAU	Pm0fff0f000f0f f00f00	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 21	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2541	533	UAUACUCAUAG GCACCAAC	Pm0f0fff0f000f 0ff000	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 22	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3674	534	UUAAGGUAAC GGGCAAAG	Pmf00m0f000f 000f0m00	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 23	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3727	535	UUACUUUCGCC AAGUGACA	Pmf0ffff0ff00 0f00f0	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 24	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3730	536	UUUUUACUUUC GCCAAGUG	Pmffff0ffff0ff 000f0	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 25	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4441	537	UCUCUAGUCCA AGACAUCU	Pmffff00fff0m 00f0ff0	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 26	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4444	538	UUGUCUCUAGU CCAAGACA	Pmf0ffff00ff0 00mf0	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 27	LNC VEZF1	ENST00000 585065	4650	539	UAAAAAUCGAA CUUCUGGU	Pm00m00ff000 ffff000	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 28	LNC VEZF1	ENST00000 585065	2723	540	UGCUGAAACCUA UCAGCUUC	Pm0ff000fff0ff 00fff0	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 29	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3116	541	UAAGCACACUA AGGGCUUU	Pm000f0f0ff0 m000fff0	ooooooooo ooosssssso
lncVEZF 1 30	LNC VEZF1	ENST00000 585065	3369	542	UUAUGGACCA ACUCUUA	Pmf00f000ff00 fffff0	ooooooooo ooosssssso
lncFBXO 1	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	198	543	UGACGACAUAU AAACGGCC	Pm00f00f0f0f0 00f00f0	ooooooooo ooosssssso
lncFBXO 2	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	199	544	UAGACGACAU UAAACGGC	Pm000f00f0f0f 000f000	ooooooooo ooosssssso
lncFBXO 3	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	886	545	UACUUACGACA AAGCUACA	Pm0fff0f00f00 m0ff0f0	ooooooooo ooosssssso
lncFBXO 4	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	887	546	UAACUUACGAC AAAGCUAC	Pm00fff0f00f0 m00ff00	ooooooooo ooosssssso
lncFBXO 5	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	888	547	UUAACUUACGA CAAAGCUA	Pmf00fff0f00f0 000ff0	ooooooooo ooosssssso

10

20

30

40

【 0 3 2 3】

【表 2 - 1 3】

lncFBXO 6	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	889	548	UAUAACUUACG ACAAAGCU	Pm0f00fff0f00f 00m0f0	00000000 000ssssso
lncFBXO 7	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	890	549	UCAUAACUUAC GACAAAGC	Pmf0f00fff0f00 f00m00	00000000 000ssssso
lncFBXO 8	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2596	550	UAACAACGCUC UCAACCAG	Pm00f00f0ffff 00ff00	00000000 000ssssso
lncFBXO 9	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2598	551	UUAACAACGC UCUCAACC	Pmf000f00f0fff ff00f0	00000000 000ssssso
lncFBXO 10	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2842	552	UUCAGUCGCAA GACAGAAC	Pmff00ff0f000 mf00m00	00000000 000ssssso
lncFBXO 11	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2844	553	UGAUCAGUCGC AAGACAGA	Pm00ff00ff0f0 0m0f000	00000000 000ssssso
lncFBXO 12	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2846	554	UAAGAUCAGUC GCAAGACA	Pm0000ff00ff0 f0m00f0	00000000 000ssssso
lncFBXO 13	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2845	555	UAGAUCAGUCG CAAGACAG	Pm000ff00ff0f 0000f00	00000000 000ssssso
lncFBXO 14	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2847	556	UGAAGAUCAGU CGCAAGAC	Pm00m00ff00f f0f00m00	00000000 000ssssso
lncFBXO 15	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2871	557	UAGUAACGGAU AGGACAAC	Pm00f00f000f0 000f000	00000000 000ssssso
lncFBXO 16	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2873	558	UUCAGUAACGG AUAGGACA	Pmff00f00f000 f00m0f0	00000000 000ssssso
lncFBXO 17	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	3806	559	UGGUGUUAUCG AGUGGUUC	Pm00f0ff0ff00 0f00ff0	00000000 000ssssso
lncFBXO 18	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	685	560	UAGCUAGAUCU ACCUCACA	Pm00ff000ffff fff0f0	00000000 000ssssso
lncFBXO 19	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	687	561	UGAAGCUAGAU CUACCUCA	Pmm000ff000f ff0ffff0	00000000 000ssssso
lncFBXO 20	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	689	562	UAUGAAGCUAG AUCUACCU	Pm0f00m0ff00 0fff0ff0	00000000 000ssssso
lncFBXO 21	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	1073	563	UGGAUUGGAUA CCUUAAGA	Pm000ff000f0f fff00m0	00000000 000ssssso
lncFBXO 22	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	1071	564	UAUUGGAUACC UUAAGAUG	Pm0ff000f0ffff 0000f0	00000000 000ssssso
lncFBXO 23	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2071	565	UACCUAUGCUA GUCAAGAG	Pm0fff0f0ff00f f000m0	00000000 000ssssso
lncFBXO 24	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2074	566	UCAGACCUAUG CUAGUCA	Pmf000fff0f0ff 00ff00	00000000 000ssssso

10

20

30

40

【表 2 - 1 4】

IncFBXO 25	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2076	567	U AACAGACCUA U GCUAGUC	Pm00f000fff0f 0ff00f0	00000000 000ssssso	
IncFBXO 26	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2600	568	U AUUAAACAAC G CUCUCA A	Pm0ff000f00f0 ffff00	00000000 000ssssso	
IncFBXO 27	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2870	569	U GUAACGGAUA G GACAACC	Pm0f00f000f00 m0f00f0	00000000 000ssssso	
IncFBXO 28	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2874	570	U UUCAGUAACG G AUAGGAC	Pmfff00f00f00 0f000m0	00000000 000ssssso	10
IncFBXO 29	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	2876	571	U CUUUCAGUAA C GG AUAGG	Pmffffff00f00f0 00f000	00000000 000ssssso	
IncFBXO 30	LNC FBXO 256	ENST00000 607352	200	572	U AAGACGACAU A UAAACGG	Pmm000f00f0f 0f000f00	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 1	LNC NDST3	ENST00000 602414	77	573	U AACUACGUAC U UUCACCU	Pm00ff0f0f0fff ff0ff0	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 2	LNC NDST3	ENST00000 602414	78	574	U CAACUACGUA C UUUCACC	Pmf00ff0f0f0ff fff0f0	00000000 000ssssso	20
IncNDST 3 3	LNC NDST3	ENST00000 602414	79	575	U ACAACUACGU A CUUUCAC	Pm0f00ff0f0f0f ffff00	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 4	LNC NDST3	ENST00000 602414	81	576	U AGACAACUAC G UACUUUC	Pm000f00ff0f0 f0ffff0	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 5	LNC NDST3	ENST00000 602414	440	577	U UCCAUCGUAA U GUGUUCA	Pmfff0ff0f00f0 f0fff0	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 6	LNC NDST3	ENST00000 602414	441	578	U AUCCAUCGUA A UGUGUUC	Pm0fff0ff0f00f 0f0ff0	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 7	LNC NDST3	ENST00000 602414	442	579	U CAUCCAUCGU A AUGUGUU	Pmf0fff0ff0f00 f0f0f0	00000000 000ssssso	30
IncNDST 3 8	LNC NDST3	ENST00000 602414	443	580	U UCAUCCAUCG U AAUGUGU	Pmff0fff0ff0f0 0f0f00	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 9	LNC NDST3	ENST00000 602414	444	581	U AUCAUCCAUC G UAAUGUG	Pm0ff0fff0ff0f 00f0f0	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 10	LNC NDST3	ENST00000 602414	445	582	U CAUCAUCCAUC G UAAUGU	Pmf0ff0fff0ff0f 00f00	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 11	LNC NDST3	ENST00000 602414	508	583	U AUUGCCGGAU G CUGAAUA	Pm0ff0ff000f0f f000f0	00000000 000ssssso	40
IncNDST 3 12	LNC NDST3	ENST00000 602414	523	584	U AACUACGAUA A GUCCAUC	Pm00ff0f00f00 0ff0f0	00000000 000ssssso	
IncNDST 3 13	LNC NDST3	ENST00000 602414	524	585	U CAACUACGAU A AGUCCAUC	Pmf00ff0f00f0 00fff00	00000000 000ssssso	

【表 2 - 1 5】

IncNDST 3 14	LNC NDST3	ENST00000 602414	625	586	UUAUCACGGAC CACCUUAA	Pmf0ff0f000ff0 ffff00	00000000 000ssssso
IncNDST 3 15	LNC NDST3	ENST00000 602414	626	587	UUUAUCACGGA CCACCUUA	Pmff0ff0f000ff 0ffff0	00000000 000ssssso
IncNDST 3 16	LNC NDST3	ENST00000 602414	627	588	UAUUAUCACGG ACCACCUU	Pm0ff0ff0f000f f0ffff0	00000000 000ssssso
IncNDST 3 17	LNC NDST3	ENST00000 602414	628	589	UAAUUAUCACG GACCACCU	Pm00ff0ff0f00 0ff0ff0	00000000 000ssssso
IncNDST 3 18	LNC NDST3	ENST00000 602414	629	590	UUAUUUAUCAC GGACCACC	Pmf00ff0ff0f00 0ff0f0	00000000 000ssssso
IncNDST 3 19	LNC NDST3	ENST00000 602414	91	591	UAACUUACGAA AGACAACU	Pm00fff0f000 m00f00f0	00000000 000ssssso
IncNDST 3 20	LNC NDST3	ENST00000 602414	92	592	UUAACUUACGA AAGACAAC	Pmf00fff0f00m 000f000	00000000 000ssssso
IncNDST 3 21	LNC NDST3	ENST00000 602414	515	593	UUAAGUCCAUI GCCGGAUG	Pmf000fff0ff0f f000f0	00000000 000ssssso
IncNDST 3 22	LNC NDST3	ENST00000 602414	550	594	UGAUUUUAUUC GGAACACC	Pm00f0ff0fff0 m00f0f0	00000000 000ssssso
IncNDST 3 23	LNC NDST3	ENST00000 602414	551	595	UGGAUUUAUUC CGGAACAC	Pm000f0ff0fff0 0m0f00	00000000 000ssssso
IncNDST 3 24	LNC NDST3	ENST00000 602414	623	596	UUCACGGACCA CCUUAAA	Pmff0f000ff0ff ff00m0	00000000 000ssssso
IncNDST 3 25	LNC NDST3	ENST00000 602414	624	597	UAUCACGGACC ACCUUAAA	Pm0ff0f000ff0f fff000	00000000 000ssssso
IncNDST 3 26	LNC NDST3	ENST00000 602414	630	598	UUUAAUUAUCA CGGACCAC	Pmff00ff0ff0f0 00ff00	00000000 000ssssso
IncNDST 3 27	LNC NDST3	ENST00000 602414	130	599	UUUUAGGUAAG GCAGUAAG	Pmfff000f0m0 0f00f000	00000000 000ssssso
IncNDST 3 28	LNC NDST3	ENST00000 602414	131	600	UUUUUAGGUAA GGCAGUAA	Pmffff000f000 mf00f00	00000000 000ssssso
IncNDST 3 29	LNC NDST3	ENST00000 602414	516	601	UAUAAGUCCAU UGCCGGAU	Pm0f000ff0ff0 ff00m0	00000000 000ssssso
IncNDST 3 30	LNC NDST3	ENST00000 602414	519	602	UACGAUAAGUC CAUUGCCG	Pm0f00f000fff 0ff0ff0	00000000 000ssssso
IncMAL AT1 1	LNC Malat1	MALAT1	445	603	UCCAACUAAGC GAAUGGCU	Pmff00ff000f0 00f00f0	00000000 000ssssso
IncMAL AT1 2	LNC Malat1	MALAT1	860	604	UCCAUAUACGC AACUGAGC	Pmffff0ff0f00 ff00m0	00000000 000ssssso

10

20

30

40

【表 2 - 1 6】

IncMAL AT1 3	LNC Malat1	MALAT1	1006	605	UUUAAACGGGU CAUCAAC	Pmff000f000f0 0ff00m0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 4	LNC Malat1	MALAT1	1007	606	UUUAAACGGG UCAUCAA	Pmfff000f000ff 0ff000	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 5	LNC Malat1	MALAT1	1818	607	UUCGUCUGCGU UUAGUAAA	Pmff0fff0f0fff0 0f000	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 6	LNC Malat1	MALAT1	1821	608	UUUUUCGUCUG CGUUUAGU	Pmffff0fff0f0f ff000	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 7	LNC Malat1	MALAT1	2513	609	UCUUCCGUAC GAAAGUCC	Pmffff0ff0f00 0m0ff0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 8	LNC Malat1	MALAT1	2813	610	UAAUCGUUAGC GCUCCUUC	Pm00ff0ff0f0f fffff0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 9	LNC Malat1	MALAT1	3087	611	UCACCUCAGUA CGAAACUC	Pmf0ffff0f0f0 0m0fff	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 10	LNC Malat1	MALAT1	7883	612	UUUGAAACCGA UUAUGGAU	Pmff0m00ff00f f0f00m0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 11	LNC Malat1	MALAT1	8585	613	UAUUAGGUUCU CGUGUAAA	Pm0ff000ffff0 f0f000	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 12	LNC Malat1	MALAT1	1218	614	UUCACCGGAU UCGAUCAC	Pmff0ff0m00ff f00ff00	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 13	LNC Malat1	MALAT1	1251	615	UCGAGGCGUAU UUAUAGAC	Pmf00m0f0f0ff f0f00m0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 14	LNC Malat1	MALAT1	3014	616	UAACAUUUGC CGACCUCA	Pm00f0f0ff0ff0 0ffff0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 15	LNC Malat1	MALAT1	5094	617	UGUAGAUUCCG UAACUUUA	Pm0f000ffff0f0 0ffff0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 16	LNC Malat1	MALAT1	5338	618	UCUGAGGCAA CGAAACAU	Pmff0000f000f 00m0f00	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 17	LNC Malat1	MALAT1	5970	619	UAGUGUUCGCA GACAAAGU	Pm00f0fff0f00 0f00m00	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 18	LNC Malat1	MALAT1	6008	620	UUCGUUCUUC GCUCAAU	Pmff0ffffff0ff 00m0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 19	LNC Malat1	MALAT1	6634	621	UAUAGCAGCGG GAUCAGAA	Pm0f00f00f00 m0ff00m0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 20	LNC Malat1	MALAT1	6662	622	UUACUCCAGUC GUUCACA	Pmf0ffff0ff0ff ff0f0	00000000 00ssssssso
IncMAL AT1 21	LNC Malat1	MALAT1	6782	623	UUCACAAUAC GACUGCUU	Pmff0f000f0f0 0ff0ff0	00000000 00ssssssso

10

20

30

40

【 0 3 2 7 】

【表 2 - 1 7】

lncMAL AT1 22	LNC Malat1	MALAT1	7439	624	UUUAAGCCUUC GGUGCCUU	Pmff000fffff00 f0fff0	ooooooooo ooosssssso
lncMAL AT1 23	LNC Malat1	MALAT1	7681	625	UAAGCACCGCU UGAGAUUU	Pm000f0ff0fff0 000ff0	ooooooooo ooosssssso
lncMAL AT1 24	LNC Malat1	MALAT1	8219	626	UUCAGCUUCCG CUAAGAUG	Pmff00ffff0ff0 00mf0	ooooooooo ooosssssso
lncMAL AT1 25	LNC Malat1	MALAT1	4012	627	UUUUGGCCUAC UCAAGCUC	Pmfff00fff0fff0 00ff0	ooooooooo ooosssssso
lncMAL AT1 26	LNC Malat1	MALAT1	2325	628	UUUCUGGUCUA CGUAAACA	Pmffff00fff0f0f 000f0	ooooooooo ooosssssso
lncMAL AT1 27	LNC Malat1	MALAT1	2742	629	UUCUUCACCAC GAACUGCU	Pmffffff0ff0f00 Off0f0	ooooooooo ooosssssso
lncMAL AT1 28	LNC Malat1	MALAT1	1423	630	UACUUAACGCU AAGCAAUA	Pm0fff00f0ff00 0f00f0	ooooooooo ooosssssso
lncMAL AT1 29	LNC Malat1	MALAT1	1610	631	UGUAUUAAUUC GGGGCUCU	Pm0f0ff00ffff0 m00fff0	ooooooooo ooosssssso
lncMAL AT1 30	LNC Malat1	MALAT1	810	632	UAAAUGGCGGA CUUUCUCC	Pm000f00f000f ffffff0	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 1	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	509	633	UGGGAAUACCU CUAGUUCU	Pm00m00f0ffff f00fff0	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 2	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	716	634	UAUAAAGCGCA CGGAUGGA	Pm0f00m0f0f0 f000f000	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 3	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1139	635	UGAUUUAAAGC UGGUAUCC	Pm00fff0m00ff 00f0ff0	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 4	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1148	636	UAGUCGGCUCG AUUUAAAGG	Pm00ff00fff0of ff00m0	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 5	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1149	637	UUAGUCGGCUC GAUUUAAG	Pmf00ff00fff00 fff000	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 6	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1150	638	UGUAGUCGGCU CGAUUUA	Pm0f00ff00fff0 0fff00	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 7	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1328	639	UAUCCGCUGA AGCCAACU	Pm0ffff0ff00m 0ff00f0	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 8	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1334	640	UGUAGGUAUUC CGCUGAAG	Pm0f000f0fff0 0f00m0	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 9	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1335	641	UAGUAGGUAUU CCGCUGAA	Pm00f000f0fff 0ff000	ooooooooo ooosssssso
lncFAM2 2E1 10	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1362	642	UCAAUCGGCUU GUUGAAUA	Pmf00ff00fff0f f000f0	ooooooooo ooosssssso

10

20

30

40

【表 2 - 1 8】

IncFAM2 2E1 11	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1363	643	UCAAUCGGCU UGUUGAAU	Pmff00ff00fff0 ff00m0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 12	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1364	644	UAUCAAUCGGC UUGUUGAA	Pm0ff00ff00fff 0ff000	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 13	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1365	645	UGAUCAAUCGG CUUGUUGA	Pm00ff00ff00ff f0ff00	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 14	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1366	646	UGAUCAAUCG GCUUGUUG	Pmf00ff00ff00f ff0ff0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 15	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1367	647	UGUGAUCAAUC GGCUUGUU	Pm0f00ff00ff0 0ff0f0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 16	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1368	648	UUGUGAUCAAU CGGCUUGU	Pmf0f00ff00ff0 0fff00	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 17	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1369	649	UAUGUGAUCAA UCGGCUUG	Pm0f0f00ff00ff 00fff0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 18	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1562	650	UAGCCAUAAAGG GUAAGGGA	Pm00ff0f0m00 0f00m00	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 19	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1563	651	UUAGCCAUAAAG GGUAAGGG	Pmf00ff0f000 m0f00m0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 20	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1564	652	UUUAGCCAUAA GGGUAAGG	Pmff00ff0f00m 00f00m0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 21	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1140	653	UCGAUUUAAGG CUGGUAUC	Pmf00fff0m00f f00f0f0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 22	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1565	654	UUUUAGCCAUAA AGGGUAAG	Pmfff00ff0f0m 000f000	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 23	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	507	655	UGAAUACCUCU AGUUCUUC	Pm000f0fffff00 fffff0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 24	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	508	656	UGGAAUACCUC UAGUUCUUC	Pm00m0f0fffff 00ffff0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 25	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1141	657	UUCGAUUUAAG GCUGGUAU	Pmff00ff0m00 ff00f00	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 26	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1142	658	UCUCGAUUUAA GGCUGGUA	Pmfff00fff00m 0ff00f0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 27	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1370	659	UAAUGUGAUCA AUCGGCUU	Pm00f0f00ff00 ff00ff0	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 28	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1389	660	UUGCACUGCUA GAGCUGAA	Pmf0f0ff0ff0m 00ff000	00000000 00ssssssso
IncFAM2 2E1 29	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1390	661	UUUGCACUGCU AGAGCUGA	Pmff0f0ff0ffm 000ff00	00000000 00ssssssso

10

20

30

40

【表 2 - 19】

IncFAM2 2E1 30	LNC FAM22E1	ENST00000 605920	1492	662	UUGCUGUCAUA AGAUCAAA	Pmf0ff0ff0f0m 00ff000	ooooooooo ooosssso
-------------------	----------------	---------------------	------	-----	-------------------------	--------------------------	-----------------------

表 2 凡例：

o : ホスホジエステル s : ホスホロチオアート
 P : 5'リン酸化 0 : 2' - OH
 f : 2' - フルオロ m : 2' O - メチル

【 0 3 3 0 】

均等物

当業者は、慣用的な実験のみを使用して、本明細書に記載される本発明の具体的な態様についての多数の均等物を理解するかまたはそれに気付くことができるであろう。かかる均等物は、以下のクレームによって包含されることが意図される。

特許文書を含め、本明細書に開示される全ての参考文献は、それらの全体が参照されることによって組み込まれる。本出願は、2009年9月22日に提出されたPCT公開番号WO2010/033247（出願番号PCT/US2009/005247）、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2014年8月5日に発行され、2012年2月16日にUS2012/0040459として公開された、米国特許第8,796,443号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2009年2月11日に提出されたPCT公開番号WO2009/102427（出願番号PCT/US2009/000852）、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」、2011年3月24日に提出されたPCT公開番号WO2011/119887（出願番号PCT/US2011/029867）、表題「RNA INTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS」、および2014年3月4日に発行され、2011年9月29日にUS2011/0237648として公開された、米国特許第8,664,189号、表題「RNA INTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS」の、全ての図面および明細書の全ての部分を含む全内容（配列表またはアミノ酸/ポリヌクレオチド配列を含む）を、参照によって組み込む。

10

20

【 図 1 】

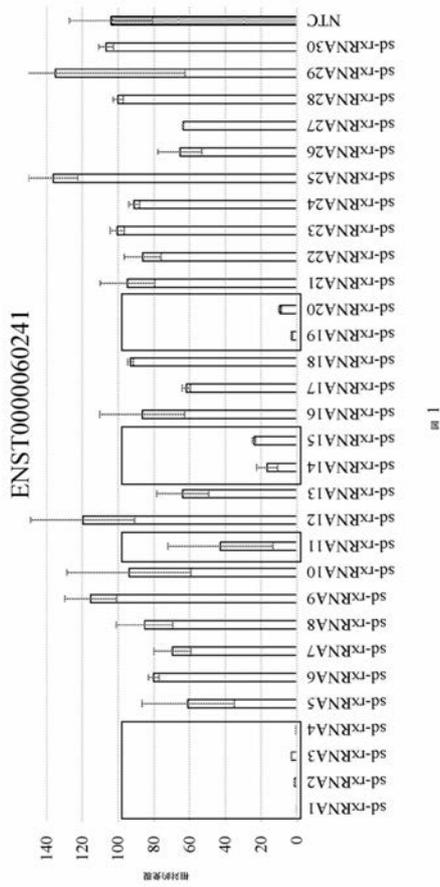


図 1

【 図 2 】

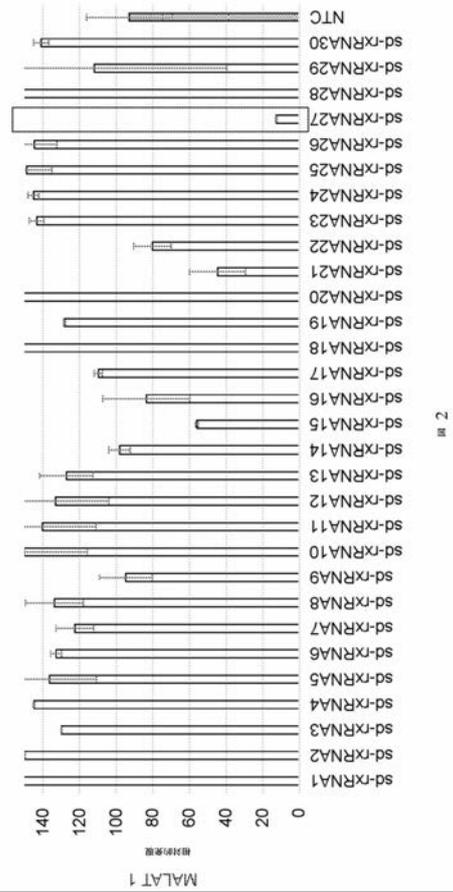


図 2

【 図 3 】

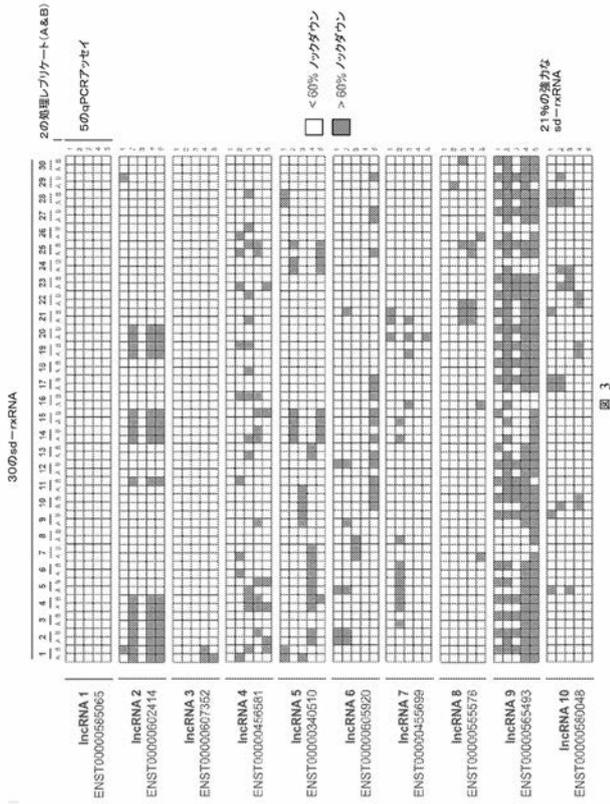


図 3

【配列表】

2018531037000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US16/57608									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/11, 15/113; A61K 31/713 (2018.01) CPC - C12N 15/11, 15/113; A61K 31/713 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) Classifications: C12N 15/11, 15/113; A61K 31/713, 31/712; C12Q 1/68 (2016.01) CPC Classifications: C12N 15/11, 15/113, 15/1136; A61K 31/713, 31/712; C12Q 1/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; PubMed; EBSCO; isolat*, nucle*, acid*, RNA*, DNA, noncod*, non-cod*, long*, lncRNA, guld*, passeng, antisens*, anti-sens*, sens*, Kanq1ot1, x1sirt, xist, ANRIL, MALAT1, singl*, doubl*, phosphorothioat*, PS, pyrimidin*, uracil*, cytosin*, thymin*, '2'-O-methyl', modif*, deliver*, administer*, cell*											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2014/0364482 A1 (RXI PHARMACEUTICALS CORPORATION) 11 December 2014; paragraphs [0008], [0010], [0012], [0013], [0021], [0028], [0032], [0034], [0177], [0189], [0200], [0215], [0233], [0411]</td> <td>28 ---</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2015/024986 A1 (VIB VZW, et al.) 26 February 2015; abstract; page 3, lines 18-25</td> <td>1-2, 3/1-2</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2014/0364482 A1 (RXI PHARMACEUTICALS CORPORATION) 11 December 2014; paragraphs [0008], [0010], [0012], [0013], [0021], [0028], [0032], [0034], [0177], [0189], [0200], [0215], [0233], [0411]	28 ---	Y	WO 2015/024986 A1 (VIB VZW, et al.) 26 February 2015; abstract; page 3, lines 18-25	1-2, 3/1-2
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	US 2014/0364482 A1 (RXI PHARMACEUTICALS CORPORATION) 11 December 2014; paragraphs [0008], [0010], [0012], [0013], [0021], [0028], [0032], [0034], [0177], [0189], [0200], [0215], [0233], [0411]	28 ---									
Y	WO 2015/024986 A1 (VIB VZW, et al.) 26 February 2015; abstract; page 3, lines 18-25	1-2, 3/1-2									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 15 December 2016 (15.12.2016)		Date of mailing of the international search report 15 FEB 2017									
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. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4900 PCT OSP: 571-272-7774									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/57608

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.: 4-27
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:

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.:

- 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.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 カーディア, ジェームズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02038、フランクリン、ベーコン ストリート 11

(72)発明者 ブロック, カレン, ジー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01756、メンドン、パーク ストリート 44

(72)発明者 ヴァンデサンペール, ジョーク, ヘドヴィク

ベルギー王国 9052 ズウェイナーレデ、テフノロジーパルク 3、バイオガゼル

(72)発明者 ヴァン ペール, ゲール

ベルギー王国 9052 ズウェイナーレデ、テフノロジーパルク 3、バイオガゼル

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC41 EE59 FF34

4C084 AA13

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04