

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-517452

(P2005-517452A)

(43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 P 1/04</b>	A 6 1 P 1/04	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 3/10</b>	A 6 1 P 3/10	
<b>A 6 1 P 7/00</b>	A 6 1 P 7/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-569860 (P2003-569860)	(71) 出願人	500203684
(86) (22) 出願日	平成15年2月18日 (2003. 2. 18)		サーナ・セラピューティクス・インコーポ レイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月21日 (2004. 7. 21)		Sirna Therapeutics, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/004908		アメリカ合衆国コロラド州80301, ボ ウルダー, ウィルダース・プレイス 2 950
(87) 国際公開番号	W02003/070969	(74) 代理人	230104019
(87) 国際公開日	平成15年8月28日 (2003. 8. 28)		弁護士 大野 聖二
(31) 優先権主張番号	60/358, 580	(74) 代理人	100106840
(32) 優先日	平成14年2月20日 (2002. 2. 20)		弁理士 森田 耕司
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100105991
(31) 優先権主張番号	60/363, 124		弁理士 田中 玲子
(32) 優先日	平成14年3月11日 (2002. 3. 11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/386, 782		
(32) 優先日	平成14年6月6日 (2002. 6. 6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 短干渉核酸 (s i N A) を用いる B C L 2 遺伝子発現の R N A 干渉媒介性阻害

## (57) 【要約】

本発明は、種々の用途、例えば、治療、診断、標的評価およびゲノム発見用途における使用において B C L 2 遺伝子発現を調節するのに有用な方法および試薬に関する。詳細には、本発明は、B C L 2、B C L - X L、M C L - 1、B C L 2 - L 1、C E D - 9、B A G - 1、E 1 B - 1 9 4 および / または B C L - A 1 の発現の調節に応答する他の任意の病気 . の治療において有用な、B C L 2、B C L - X L、M C L - 1、B C L 2 - L 1、C E D - 9、B A G - 1、E 1 B - 1 9 4 および / または B C L - A 1 遺伝子の発現および / または活性に対する R N A 干渉 ( R N A i ) を媒介しうる小核酸分子、例えば、短干渉核酸 ( s i N A )、短干渉 R N A ( s i R N A )、二本鎖 R N A ( d s R N A )、マイクロ R N A ( m i R N A )、および短ヘアピン R N A ( s h R N A ) 分子に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

R N A 干渉により B C L 2 遺伝子の発現をダウンレギュレートする短干渉核酸 ( s i N A ) 分子。

## 【請求項 2】

前記 B C L 2 遺伝子が G e n b a n k 受託番号 N M \_ 0 0 0 6 3 3 を含む配列をコードする, 請求項 1 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 3】

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

## 【請求項 4】

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

## 【請求項 5】

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

## 【請求項 6】

前記 s i N A 分子が B C L 2 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み, 前記 s i N A 分子はさらにセンス鎖を含み, ここで, 前記センス鎖は B C L 2 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む, 請求項 5 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 7】

前記アンチセンス鎖および前記センス鎖がそれぞれ約 1 9 - 約 2 9 ヌクレオチドを含み, 前記アンチセンス鎖および前記センス鎖が少なくとも約 1 9 の相補的ヌクレオチドを共有する, 請求項 6 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 8】

前記 s i N A 分子が B C L 2 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含み, 前記 s i N A 分子はさらにセンス領域を含み, ここで, 前記センス領域は B C L 2 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む, 請求項 5 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 9】

前記アンチセンス領域および前記センス領域がそれぞれ約 1 9 - 約 2 9 ヌクレオチドを含み, 前記アンチセンス領域および前記センス領域が少なくとも約 1 9 の相補的ヌクレオチドを共有する, 請求項 8 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 10】

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

## 【請求項 11】

前記 s i N A 分子が B C L 2 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含む, 請求項 10 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 12】

前記 s i N A 分子が約 1 9 - 約 2 9 ヌクレオチドを有する配列を含む, 請求項 11 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 13】

前記 s i N A 分子がセンス領域およびアンチセンス領域を含み, 前記アンチセンス領域は B C L 2 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み, 前記センス領域は前記アンチセンス領域に相補的なヌクレオチド配列を含む, 請求項 1 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 14】

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

## 【請求項 15】

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

10

20

30

40

50

13記載の siNA 分子。

【請求項16】

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

【請求項17】

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

【請求項18】

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

【請求項19】

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

【請求項20】

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

【請求項21】

アンチセンス領域の3'末端オーバーハングが BCL2 蛋白質をコードする RNA に相補的である，請求項19記載の siNA 分子。

【請求項22】

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

【請求項23】

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

【請求項24】

前記センス領域中に存在する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチドである，請求項19記載の siNA 分子。

【請求項25】

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

【請求項26】

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

【請求項27】

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

【請求項28】 40

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

【請求項29】

前記アンチセンス領域中に存在する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチドである，請求項19記載の siNA 分子。

【請求項30】

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

## 【請求項 3 1】

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

## 【請求項 3 2】

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

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

## 【0001】

本発明は、McSwiggen, 米国特許出願 60/396,905 (2002年7月18日出願), Beigelman, 米国特許出願 60/358,580 (2002年2月20日出願), Beigelman, 米国特許出願 60/363,124 (2002年3月11日出願), Beigelman, 米国特許出願 60/386,782 (2002年6月6日出願), Beigelman 米国特許出願 60/406,784 (2002年8月29日出願), Beigelman, 米国特許出願 60/408,378 (2002年9月5日出願), Beigelman, 米国特許出願 60/409,293 (2002年9月9日出願), および Beigelman, 米国特許出願 60/440,129 (2003年1月15日出願) に基づく優先権を主張する。これらの出願は、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

20

## 【0002】

本発明は、BCL2 の遺伝子発現および/または活性の調節に応答する健康状態および疾病の研究、診断、および治療のための化合物、組成物、および方法に関する。本発明はまた、BCL2 経路に關与する遺伝子の発現および/または活性の調節に應答する健康状態および疾病に關連する化合物、組成物、および方法に關する。特に、本発明は、BCL2 の遺伝子発現に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介しうる小核酸分子、例えば短干渉核酸 (siNA), 短干渉 RNA (siRNA), 二本鎖 RNA (dsRNA), マイクロ RNA (miRNA), および短ヘアピン RNA (shRNA) 分子に關連する。

30

## 【背景技術】

## 【0003】

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

## 【0004】

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

40

50

## 【0005】

細胞中に長い dsRNA が存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼ III 酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNA をプロセシングして短干渉 RNA ( siRNA ) として知られる短い断片の dsRNA にすることに関与している ( Berstein et al. , 2001 , Nature , 409 , 363 )。ダイサー活性から生ずる短干渉 RNA は、典型的には約 21 - 23 ヌクレオチドの長さであり、約 19 塩基対のデュプレックスを含む ( Elbashir et al. , 2001 , Genes Dev. , 15 , 188 )。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示唆されている保存された構造の前駆体 RNA から 21 および 22 ヌクレオチドの小さな一時的 RNA ( stRNA ) を切り出すことに関与することが示唆されている ( Hutvagner et al. , 2001 , Science , 293 , 834 )。RNAi 応答はまた、一般に RNA 誘導性サイレンシング複合体 ( RISC ) と称されるエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これは siRNA デュプレックスのアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖 RNA の切断を媒介する。標的 RNA の切断は、siRNA デュプレックスのアンチセンス鎖に相補的な領域の中央部で生ずる ( Elbashir et al. , 2001 , Genes Dev. , 15 , 188 )。

10

## 【0006】

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

20

30

40

## 【0007】

2 ヌクレオチドの 3' - オーバーハングを有する 21 - mer の siRNA デュプレックスの 3' 末端ヌクレオチドのオーバーハングしているセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置き換えても、RNAi 活性に有害な影響を有しないことが示されている。siRNA の各末端で 4 個までのヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドで置き換えることはよく許容されると報告されているが、デオキシリボヌクレオチドで完全に置換すると RNAi 活性がなくなる ( Elbashir et al. , 2001 , EMBO J. , 20 , 6877 )。さらに、Elbashir ら ( 上掲 ) はまた、siRNA を 2' - O - メチルヌクレオチドで置換すると、RNAi 活性が完全に破壊されたことを報告する

50

。Liら(国際公開WO00/44914)およびBeachら(国際公開WO01/68836)は, siRNAがリン酸-糖骨格またはヌクレオシドのいずれかに窒素またはイオウ複素原子の少なくとも1つを含むよう修飾することができることを予備的に示唆する。しかし, いずれの出願も, siRNA分子においてそのような修飾がどの程度許容されるかを仮定しておらず, そのような修飾siRNAのそれ以上の指針または実例を提供していない。Kreutzerら(カナダ特許出願2,359,180)もまた, dsRNAコンストラクトにおいて二本鎖RNA依存性蛋白質キナーゼPKRの活性化を妨げる目的で用いるためのある種の化学的修飾, 特に2'-アミノまたは2'-O-メチルヌクレオチド, および2'-Oまたは4'-Cメチレン架橋を含むヌクレオチドを記載する。しかし, Kreutzerらも同様に, siRNA分子においてこれらの修飾がどの程度許容されるかについての実例または指針を提供していない。 10

#### 【0008】

Parrishら(2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087)は, C.elegansにおいて長い(>25nt) siRNA転写産物を用いてunc-22遺伝子を標的とするある種の化学的修飾を試験した。著者らは, T7およびT3RNAポリメラーゼによりチオリン酸ヌクレオチド類似体を取り込ませることによりこれらのsiRNA転写産物中にチオリン酸残基を導入すること, および2個のホスホロチオエート修飾塩基を有するRNAもRNAiとしての有効性を実質的に低下させたことを記載する。さらに, Parrishらは, 2残基より多いホスホロチオエート修飾は, 干渉活性をアッセイすることができないほど大きくインビトロでRNAを不安定化させたことを報告する(同上, 1081)。著者らはまた, 長いsiRNA転写産物中のヌクレオチド糖の2'位におけるある種の修飾を試験して, リボヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換すると, 特にウリジンからチミジンおよび/またはシチジンからデオキシシチジンへの置換の場合に, 干渉活性が実質的に減少することを見いだした(同上)。さらに, 著者らは, ある種の塩基修飾, 例えば, siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖において, ウラシルの代わりに4-チオウラシル, 5-ブロモウラシル, 5-ヨードウラシル, および3-(アミノアシル)ウラシル, およびグアニンの代わりにイノシンの置換を試験した。4-チオウラシルおよび5-ブロモウラシル置換は許容されたように見えたが, Parrishは, イノシンはいずれの鎖に取り込まれたときにも干渉活性における実質的な減少を生じたことを報告している。Parrishはまた, アンチセンス鎖における5-ヨードウラシルおよび3-(アミノアシル)ウラシルの取り込みによっても, RNAi活性が実質的に減少したことを報告している。 20 30

#### 【0009】

より長いdsRNAの使用が記載されている。例えば, Beachら(国際公開WO01/68836)は, 内因性dsRNAを用いて遺伝子発現を弱めるための特定の方法を記載する。Tuschlら(国際公開WO01/75164)は, ショウジョウバエのインビトロRNAiシステム, およびある種の機能的ゲノム用途およびある種の治療用途に特定のsiRNA分子を用いることを記載する。しかし, Tuschl(2001, Chem. Biochem., 2, 239-245)は, インターフェロン応答の活性化の危険性のため, 遺伝的疾患またはウイルス感染を治癒させるためにRNAiを用いることができることは疑わしいと述べている。Liら(国際公開WO00/44914)は, ある種の標的遺伝子の発現を弱めるために特定のdsRNAを用いることを記載する。Zernicka-Goetzら(国際公開WO01/36646)は, ある種のdsRNA分子を用いて哺乳動物細胞において特別の遺伝子の発現を阻害するある種の方法を記載する。Fireら(国際公開WO99/32619)は, 遺伝子発現の阻害に用いるためにある種のdsRNA分子を細胞内に導入するための特別の方法を記載する。Plaetinckら(国際公開WO00/01846)は, 特定のdsRNA分子を用いて細胞において特別の表現型を与える原因である特定の遺伝子を同定するある種の方法を記載する。Melloら(国際公開WO01/29058)は, dsRNA媒介性RNAiに関する特定の遺伝子の同定を記載する。Deschamps Depailletteら(国際 40 50

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

#### 【0010】

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

#### 【0011】

Linら(国際公開WO02/10374)は、BCL2発現を標的とする特定のmRNA-cDNAデュプレックスを用いるある種の遺伝子サイレンシング法を記載する。

#### 【0012】

Warrelら(国際公開WO02/17852)は、ある種のBCL2アンチセンスオリゴヌクレオチドを記載する。

#### 【0013】

Thompsonら(米国特許5,750,390)は、BCL2発現の核酸媒介性阻害を記載する。

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0014】

#### 発明の概要

本発明は、小核酸分子、例えば、短干渉核酸(sicNA)、短干渉RNA(sicRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、および短ヘアピンR

10

20

30

40

50

NA (shRNA) 分子を用いる RNA 干渉 (RNAi) により BCL2 発現を調節するのに有用な化合物, 組成物, および方法に関する。本発明はまた, 小核酸分子, 例えば, 短干渉核酸 (siNA), 短干渉 RNA (siRNA), 二本鎖 RNA (dsRNA), マイクロ RNA (miRNA), および短ヘアピン RNA (shRNA) 分子を用いる RNA 干渉 (RNAi) により, BCL2 遺伝子, または遺伝子発現の BCL2 経路に關与する遺伝子の発現および活性および/または BCL2 活性を調節するのに有用な化合物, 組成物, および方法に関する。特に, 本発明は, BCL2 遺伝子の発現を調節するのに用いられる小核酸分子, 例えば, 短干渉核酸 (siNA), 短干渉 RNA (siRNA), 二本鎖 RNA (dsRNA), マイクロ RNA (miRNA), および短ヘアピン RNA (shRNA) 分子および方法の特徴とする。本発明の siNA は, 修飾しなくてもよく, 化学的に修飾してもよい。本発明の siNA は, 化学的に合成してもよく, ベクターから発現させてもよく, 酵素的に合成してもよい。本発明はまた, RNA 干渉 (RNAi) により細胞における BCL2 遺伝子の発現または活性を調節しうる種々の化学的に修飾された合成短干渉核酸 (siNA) 分子の特徴とする。化学的に修飾された siNA を使用することにより, インピボでのヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加, および/または細胞取り込みの改良のため, 天然の siNA 分子の種々の特性が改良される。さらに, 初期に発表された研究に反して, 多くの化学的修飾を有する siNA はその RNAi 活性を保持している。本発明の siNA 分子は, 種々の治療, 診断, 標的評価, ゲノム発見, 遺伝子工学, およびファーマコゲノミクスの用途に有用な試薬および方法を提供する。

10

20

30

50

**【0015】**

1つの態様においては, 本発明は, 独立してまたは組み合わせて, 癌および他の増殖性疾患に関連する蛋白質, 例えば BCL2 蛋白質をコードする遺伝子, 例えば, 表 I に示される GenBank 受託番号により表される配列 (本明細書において一般に BCL2 と称される) を含む配列をコードする遺伝子の発現を調節する, 1またはそれ以上の siNA 分子および方法の特徴とする。以下に, 例示的 BCL2 蛋白質, およびそれらの成分またはサブユニットを参照して, 種々の観点および態様を記載する。しかし, 種々の観点および態様はまた, 他の BCL2 または BCL2 関連蛋白質, 例えば, BCL-XL, BCL2-L1, MCL-1 CED-9, BAG-1, E1B-194 および BCL-A1 (本明細書においてはすべて BCL2 と称する) にも向けられている。種々の観点および態様はまた, 疾病 (例えば癌) の進行, 発達, または維持に關与するシグナル伝達または遺伝子発現の BCL2 媒介性経路に關与する他の遺伝子にも向けられている。これらの追加の遺伝子は, BCL2 について本明細書に記載される方法を用いて, 標的部位について分析することができる。すなわち, 他の遺伝子の阻害およびそのような阻害の効果は, 本明細書に記載されるようにして行うことができる。

**【0016】**

1つの態様においては, 本発明は, BCL2 遺伝子の発現をダウンレギュレートする siNA 分子の特徴とし, ここで, 例えば, BCL2 遺伝子は BCL2 コーディング配列を含む。

**【0017】**

1つの態様においては, 本発明は, BCL2 RNA に対する RNAi 活性を有する siNA 分子の特徴とし, ここで, siNA 分子は, BCL2 または他の BCL2 コーディング配列, 例えば, 表 I に示される GenBank 受託番号を有する配列を有する任意の RNA に相補的な配列を含む。表 I I I および I V に示されるかまたは本明細書に記載される化学的修飾を, 本発明の任意の siNA コンストラクトに適用することができる。

40

**【0018】**

1つの態様においては, 本発明は, BCL2 RNA に対する RNAi 活性を有する siNA 分子の特徴とし, siNA 分子は, BCL2 のコーディング配列を有する任意の RNA に相補的な配列, 例えば, 表 I に示される BCL2 の GenBank 受託番号を有する配列を含む。表 I I I および I V または本明細書の他の箇所に示される化学的修飾を本発明の任意の siNA コンストラクトに適用することができる。

## 【0019】

別の態様においては、本発明は、BCL2遺伝子に対するRNAi活性を有するsiNA分子を特徴とし、ここで、siNA分子は、BCL2遺伝子のヌクレオチド配列、例えば表Iに示されるGenBank受託番号を有するBCL2配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明のsiNA分子は、BCL2遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用することができ、このことによりBCL2遺伝子発現のサイレンシングを媒介することができるヌクレオチド配列を含み、ここで、siNAは、例えば、BCL2遺伝子のクロマチン構造を調節し、BCL2遺伝子の転写を防止する細胞プロセスによりBCL2遺伝子発現の制御を媒介する。

## 【0020】

別の態様においては、本発明は、ヌクレオチド配列、例えば、BCL2遺伝子のヌクレオチド配列または配列の一部に相補的なsiNA分子のアンチセンス領域中のヌクレオチド配列を含むsiNA分子を特徴とする。別の態様においては、本発明は、BCL2遺伝子配列を含む配列または配列の一部に相補的な領域、例えば、siNAコンストラクトのアンチセンス領域を含むsiNA分子を特徴とする。

## 【0021】

1つの態様においては、BCL2 siNAコンストラクトのアンチセンス領域は、配列番号1-414または829-832のいずれかを有する配列に相補的な配列を含むことができる。アンチセンス領域はまた、配列番号415-828、837-840、845-848、853-856、873、875、877、879、881または882のいずれかを有する配列を含むことができる。別の態様においては、BCL2コンストラクトのセンス領域は、配列番号1-414、829-836、841-844、849-852、872、874、876、878または880のいずれかを有する配列を含むことができる。センス領域は配列番号861の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号862の配列を含むことができる。センス領域は配列番号863の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号864の配列を含むことができる。センス領域は配列番号865の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号866の配列を含むことができる。センス領域は配列番号867の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号868の配列を含むことができる。センス領域は配列番号869の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号870の配列を含むことができる。センス領域は配列番号867の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号871の配列を含むことができる。

## 【0022】

1つの態様においては、本発明のsiNA分子は、配列番号1-882のいずれかを含む。配列番号1-882に示される配列は限定的なものではない。本発明のsiNA分子は、任意の連続するBCL2配列（例えば、約19-約25個、または約19、20、21、22、23、24または25個の連続するBCL2ヌクレオチド）を含むことができる。

## 【0023】

さらに別の態様においては、本発明は、表1に示されるGenBank受託番号により表される配列を含む配列または配列の一部に相補的な配列、例えば、siNAコンストラクトのアンチセンス配列を含むsiNA分子を特徴とする。表IIIおよびIVに示され、本明細書に記載される化学的修飾を、本発明の任意のsiRNAコンストラクトに適用することができる。

## 【0024】

本発明の1つの態様においては、siNA分子は、約19-約29ヌクレオチドを有するアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、BCL2蛋白質をコードするRNA配列に相補的であり、前記siNAは、さらに約19-約29（例えば、約19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29）ヌクレオチドを有するセンス鎖を含み、前記センス鎖および前記アンチセンス鎖は、少なくとも約19の相補的

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを有する別々のヌクレオチド配列である。

【0025】

本発明の別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、約 19 - 約 29 (例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 または 29) ヌクレオチドを有するアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域は BCL2 蛋白質をコードする RNA 配列に相補的であり、前記 *s i N A* はさらに約 19 - 約 29 ヌクレオチドを有するセンス領域を含み、ここで、前記センス領域および前記アンチセンス領域は、少なくとも約 19 の相補的ヌクレオチドを有する直鎖状分子を含む。

【0026】

本発明の 1 つの態様においては、*s i N A* 分子は BCL2 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。*s i N A* はさらにセンス鎖を含み、ここで前記センス鎖は BCL2 遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列を含む。

10

【0027】

別の態様においては、*s i N A* 分子は BCL2 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含む。*s i N A* 分子はさらにセンス領域を含み、ここで、前記センス領域は、BCL2 遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列を含む。

【0028】

1 つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、BCL2 遺伝子によりコードされる RNA の発現を調節する RNA i 活性を有する。BCL2 遺伝子は互いにある程度の配列ホモロジーを共有することができるため、異なる BCL2 標的の間で共有されているか、または特定の BCL2 標的にユニークである配列を選択することにより、一群の BCL2 遺伝子 (および関連するレセプターまたはリガンド遺伝子) または特定の BCL2 遺伝子を標的とするよう *s i N A* 分子を設計することができる。したがって、1 つの態様においては、*s i N A* 分子は、1 つの *s i N A* 分子でいくつかの BCL2 遺伝子 (例えば、異なる BCL2 アイソフォーム、スプライシング変種、変異体遺伝子等) を標的とするように、いくつかの BCL2 レセプター遺伝子の間でホモロジーを有する BCL2 RNA 配列の保存領域を標的とするよう設計することができる。別の態様においては、*s i N A* 分子が RNA i 活性を媒介するためには高度の特異性を必要とするため、*s i N A* 分子は特定の BCL2 RNA 配列にユニークである配列を標的とするよう設計することができる。

20

30

【0029】

1 つの態様においては、RNA 干渉遺伝子サイレンシング応答のメディエータとして作用する本発明の核酸分子は二本鎖核酸分子である。別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、約 19 - 約 25 (例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24 または 25) ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの間に約 19 塩基対を含むデュプレックスから構成される。さらに別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は約 1 - 約 3 (例えば、約 1, 2, または 3) ヌクレオチドのオーバーハング末端を有するデュプレックス、例えば、約 19 塩基対および 3' 末端モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、またはトリヌクレオチドオーバーハングを有する約 21 のヌクレオチドのデュプレックスを含む。

40

【0030】

1 つの態様においては、本発明は、BCL2 を発現する核酸分子、例えば BCL2 蛋白質をコードする RNA に対する特異性を有する、1 またはそれ以上の化学的に修飾された *s i N A* コンストラクトを特徴とする。そのような化学的修飾の非限定的例には、限定されないが、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、2' - デオキシリボヌクレオチド、2' - O - メチルリボヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロリボヌクレオチド、"万能塩基"ヌクレオチド、"非環状"ヌクレオチド、5 - C - メチルヌクレオチド、および末端グリセリルおよび / または反転デオキシ無塩基残基を取り込むことが含まれる。これらの化学的修飾は、種々の *s i N A* コンストラクト中で用いた場合、細胞において RNA i 活性を保ち、同時に、これらの化合物の血清安定性を劇的に増加させることが示され

50

ている。さらに、Parrrishら(上掲)により公表されたデータに反して、本発明においては、多数(2以上)のホスホロチオエート置換が十分に許容され、修飾*s i N A*コンストラクトの血清安定性を実質的に増加させることが示される。

#### 【0031】

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

10

#### 【0032】

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

20

30

#### 【0033】

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

40

#### 【0034】

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

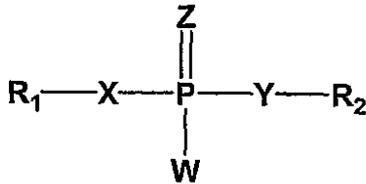
50

領域を有する一本の鎖を含むことができる。

【0035】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてBC L 2に対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式I:

【化1】



10

[式中、

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

を有する骨格修飾ヌクレオチド間結合を含む、1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)のヌクレオチドを含む。 20

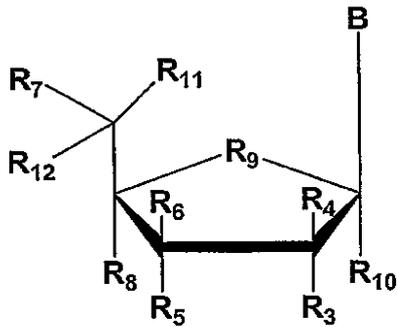
【0036】

例えば任意のZ、W、X、および/またはYが独立してイオウ原子を含む式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合は、s i N Aデュプレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明のs i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に、1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端に、約1-約5 30  
個またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5個またはそれ以上)の式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を有する1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)のピリミジンヌクレオチドを含むことができる。さらに別の非限定的例においては、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を有する1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)のプリンヌクレオチドを含むことができる。別の態様においては、式Iのヌクレオチド間結合を有する本発明のs i N A分子はまた、式I-V I Iの 40  
いずれかを有する化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

【0037】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてBC L 2に対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式I I:

## 【化 2】



10

[ 式中 ,

各 R 3 , R 4 , R 5 , R 6 , R 7 , R 8 , R 1 0 , R 1 1 および R 1 2 は , 独立して , H , OH , アルキル , 置換アルキル , アルカールまたはアラキル , F , Cl , Br , CN , CF 3 , OCF 3 , OCN , O - アルキル , S - アルキル , N - アルキル , O - アルケニル , S - アルケニル , N - アルケニル , SO - アルキル , アルキル - OSH , アルキル - OH , O - アルキル - OH , O - アルキル - SH , S - アルキル - OH , S - アルキル - SH , アルキル - S - アルキル , アルキル - O - アルキル , ONO 2 , NO 2 , N 3 , NH 2 , アミノアルキル , アミノ酸 , アミノアシル , ONH 2 , O - アミノアルキル , O - アミノ酸 , O - アミノアシル , ヘテロシクロアルキル , ヘテロシクロアルカール ,

20

アミノアルキルアミノ , ポリアルキルアミノ , 置換シリル , または式 1 を有する基であり ; R 9 は , O , S , CH 2 , S = O , CHF , または CF 2 であり , B は , ヌクレオシド塩基 , 例えば , アデニン , グアニン , ウラシル , シトシン , チミン , 2 - アミノアデノシン , 5 - メチルシトシン , 2 , 6 - ジアミノプリン , または標的 RNA に相補的であっても相補的でなくてもよい他の任意の天然に生じない塩基 , または非ヌクレオシド塩基 , 例

30

【 0 0 3 8 】

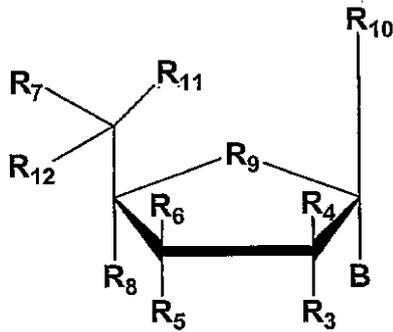
式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドは , siNA デュープレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖 , 例えば , センス鎖 , アンチセンス鎖 , または両方の鎖に存在することができる。本発明の siNA 分子は , 1 またはそれ以上の式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを , センス鎖 , アンチセンス鎖 , または両方の鎖の 3 ' 末端 , 5 ' 末端 , または 3 ' 末端および 5 ' 末端の両方に含むことができる。例えば , 本発明の例示的 siNA 分子は , 約 1 - 約 5 個またはそれ以上 ( 例え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

40

【 0 0 3 9 】

1 つの態様においては , 本発明は , 細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において BCL 2 に対する RNA 干渉 ( RNAi ) を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸 ( siNA ) 分子を特徴とし , ここで , 化学的修飾は , 式 I I I :

## 【化 3】



10

[ 式中，

各 R<sub>3</sub>，R<sub>4</sub>，R<sub>5</sub>，R<sub>6</sub>，R<sub>7</sub>，R<sub>8</sub>，R<sub>10</sub>，R<sub>11</sub>およびR<sub>12</sub>は，独立して，H，OH，アルキル，置換アルキル，アルカールまたはアラキル，F，Cl，Br，CN，CF<sub>3</sub>，OCF<sub>3</sub>，OCN，O-アルキル，S-アルキル，N-アルキル，O-アルケニル，S-アルケニル，N-アルケニル，SO-アルキル，アルキル-O-SH，アルキル-OH，O-アルキル-OH，O-アルキル-SH，S-アルキル-OH，S-アルキル-SH，アルキル-S-アルキル，アルキル-O-アルキル，ONO<sub>2</sub>，NO<sub>2</sub>，N<sub>3</sub>，NH<sub>2</sub>，アミノアルキル，アミノ酸，アミノアシル，ONH<sub>2</sub>，O-アミノアルキル，O-アミノ酸，O-アミノアシル，ヘテロシクロアルキル，ヘテロシクロアルカール，アミノアルキルアミノ，ポリアルキルアミノ，置換シリル，または式1を有する基であり；R<sub>9</sub>は，O，S，CH<sub>2</sub>，S=O，CHF，またはCF<sub>2</sub>であり，Bは，ヌクレオシド塩基，例えば，アデニン，グアニン，ウラシル，シトシン，チミン，2-アミノアデノシン，5-メチルシトシン，2，6-ジアミノプリン，または標的RNAに相補的であっても相補的でなくてもよいように用いることができる他の任意の天然に生じない塩基，または非ヌクレオシド塩基，例えば，フェニル，ナフチル，3-ニトロピロール，5-ニトロインドール，ネブラリン，ピリドン，ピリジノン，または標的RNAに相補的であっても相補的でなくてもよい他の任意の天然に生じない万能塩基である]

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

20

30

## 【0040】

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

40

## 【0041】

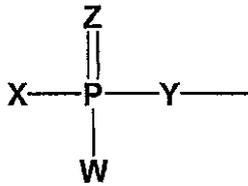
別の態様においては，本発明のsiNA分子は，式IIまたはIIIを有するヌクレオチドを含み，ここで，式IIまたはIIIを有するヌクレオチドは反転のコンフィギュレーションである。例えば，式IIまたはIIIを有するヌクレオチドは，siNAコンストラクトに3'-3'，3'-2'，2'-3'，または5'-5'コンフィギュレーションで，例えば，siNA鎖の一方または両方の3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に結合させることができる。

50

## 【0042】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてBCL2に対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(sRNA)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式IV:

## 【化4】



10

[式中、

各XおよびYは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロゲンであり；各ZおよびWは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカール、アラキル、またはアルキルハロゲンであり；W、X、YおよびZはすべてOではない]

を有する5'末端リン酸基を含む。

## 【0043】

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

20

## 【0044】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてBCL2に対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(sRNA)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は1またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。例えば、非限定的例においては、本発明は、一方のsRNA鎖に約1、2、3、4、5、6、7、8個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸(sRNA)を特徴とする。さらに別の態様においては、本発明は、両方のsRNA鎖に独立して約1、2、3、4、5、6、7、8個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸(sRNA)を特徴とする。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、sRNAデュプレックスのオリゴヌクレオチド鎖の一方または両方に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明のsRNA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に1またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的sRNA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端に、約1-約5個またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、個またはそれ以上)の連続するホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的sRNA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)のピリミジンホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。さらに別の非限定的例においては、本発明の例示的sRNA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)のプリンホスホロチ

30

40

50

オエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0045】

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

【0046】

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

【0047】

1つの態様においては、本発明は、アンチセンス鎖が1またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または約1またはそれ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デ

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

10

## 【 0 0 4 8 】

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

20

30

40

## 【 0 0 4 9 】

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

## 【 0 0 5 0 】

別の態様においては , 本発明は , 2' - 5' ヌクレオチド間結合を含む s i N A 分子を特徴とする。2' - 5' ヌクレオチド間結合は , s i N A 配列鎖の一方または両方の 3' 末端 , 5' 末端 , または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在することができる。さらに , 2' - 5' ヌクレオチド間結合は , s i N A 配列鎖の一方または両方の種々の他の位置に存在することができる , 例えば , s i N A 分子の一方または両方の鎖のピリミジンヌクレ

50

オチドの約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上, 例えばすべてのヌクレオチド間結合は, 2' - 5' ヌクレオチド間結合を含むことができ, または s i N A 分子の一方または両方の鎖のプリンヌクレオチドの約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上, 例えばすべてのヌクレオチド間結合は, 2' - 5' ヌクレオチド間結合を含むことができる。

#### 【0051】

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

#### 【0052】

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

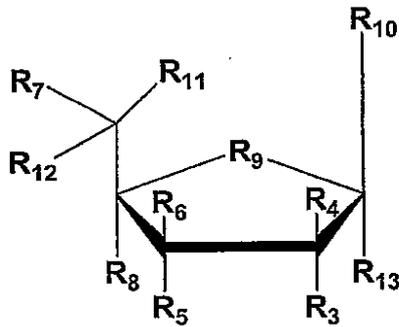
#### 【0053】

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

#### 【0054】

1つの態様においては, 本発明の s i N A 分子は, 少なくとも 1つ (例えば, 約 1, 2 50

, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)の無塩基成分, 例えば, 式V:  
【化5】



10

[ 式中,

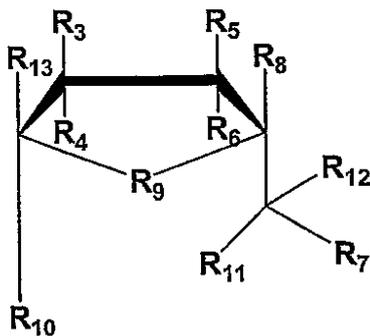
各 R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11, R12, および R13 は, 独立して, H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカリールまたはアラルキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-OH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, NO2, N3, NH2, アミノアルキ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

20

【0055】

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

【化6】



30

[ 式中,

各 R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11, R12, および R13 は, 独立して, H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカリールまたはアラルキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-OH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, NO2, N3, NH2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, ONH2, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカリール, アミノアルキルアミノ, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式Iを有する基であり; R9 は, O, S, CH2, S=O, CHF, または CF2 であり, R2, R

40

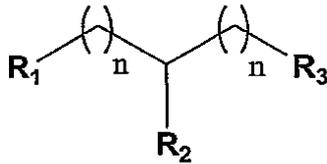
50

3, R8またはR13のいずれかは, 本発明の siNA 分子への結合の点として働く] を有する化合物を含む。

【0056】

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

【化7】



[式中, 各nは, 独立して, 1-12の整数であり, 各R1, R2およびR3は, 独立して, H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカールまたはアラキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-O-SH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, NO2, N3, NH2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, ONH2, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカール, アミノアルキルアミノ, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式Iを有する基であり, R1, R2またはR3は, 本発明の siNA 分子への結合の点として働く] を有する化合物を含む。

【0057】

別の態様においては, 本発明は, R1およびR2はヒドロキシル(OH)基であり, nは1であり, R3はOを含み, かつ本発明の二本鎖 siNA 分子の一方または両方の鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方への, または本発明の一本鎖 siNA 分子への結合の点である, 式VIIを有する化合物を特徴とする。この修飾は, 本明細書において"グリセリル"と称される(例えば, 図10の修飾6を参照)。

【0058】

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

【0059】

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

【0060】

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

【0061】

10

20

30

40

50

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

【0062】

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

10

【0063】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i N A がセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とし、ここで、センス領域中に存在する任意の（例えば 1 またはそれ以上、またはすべての）ピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、センス領域中に存在する任意の（例えば、1 またはそれ以上、またはすべての）プリンヌクレオチドは 2' - デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドである）、ここで、前記センス領域中に存在する 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドは 2' - デオキシヌクレオチドである。

20

【0064】

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

30

40

【0065】

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

50

ルプリンヌクレオチドであり（例えば，すべてのプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドであるか，あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドである），ここで，前記アンチセンス領域中に存在する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドは2'-デオキシヌクレオチドである。

【0066】

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

10

【0067】

1つの態様においては，本発明は，細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてBCL2に対するRNA干渉（RNAi）を媒介しうる，本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（*siNA*）分子を特徴とし，ここで，化学的に修飾された*siNA*はセンス領域を含み，ここで，センス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば，すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか，あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである），センス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば，すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドであるか，あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである），および，センス領域の3'末端，5'末端，または3'末端，および5'末端の両方に存在していてもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み，センス領域はさらに約1-約4個（例えば，約1，2，3，または4個）の2'-デオキシリボヌクレオチドを有する3'末端オーバーハングを含んでいてもよく；かつ，化学的に修飾された短干渉核酸分子はアンチセンス領域を含み，ここで，アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば，すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか，あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである），アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり（例えば，すべてのプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドであるか，あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドである），および末端キャップ修飾，例えば，本明細書に記載されるかまたは図10に示されるいずれかの修飾を含み，これは任意に，アンチセンス配列の3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に存在してもよく，アンチセンス領域はさらに任意に，約1-約4個（例えば，約1，2，3，または4個）の2'-デオキシヌクレオチドを有する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含んでいてもよく，ここでオーバーハングヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば，1，2，3，または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。これらの化学的に修飾された*siNA*の非限定的例は図4および5および本明細書の表IIIおよびIVに示される。

20

30

40

【0068】

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

50

いて B C L 2 に対する R N A 干渉 ( R N A i ) を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とし、ここで、s i N A はセンス領域を含み、ここで、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり ( 例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである )、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のプリンヌクレオチドはプリンリボヌクレオチドであり ( 例えば、すべてのプリンヌクレオチドがプリンリボヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドがプリンリボヌクレオチドである )、およびセンス領域の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に任意に存在して 10  
いてもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み、センス領域はさらに任意に、約 1 - 約 4 個 ( 例えば、約 1, 2, 3, または 4 個 ) の 2' - デオキシリボヌクレオチドを有する 3' 末端オーバーハングを含み ; かつ、s i N A はアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり ( 例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである )、アンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは 2' - O - メチルプリン 20  
ヌクレオチドであり ( 例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドである )、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図 10 に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在してもよく、アンチセンス領域はさらに任意に約 1 - 約 4 個 ( 例えば、約 1, 2, 3, または 4 個 ) の 2' - デオキシヌクレオチドを有する 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを含んでいてもよく、ここで、オーバー 30  
ハングヌクレオチドはさらに 1 またはそれ以上 ( 例えば、1, 2, 3, または 4 個 ) のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。これらの化学的に修飾された s i N A の非限定的例は、図 4 および 5 および本明細書の表 I I I および I V に示される。

#### 【 0 0 6 9 】

1 つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において B C L 2 に対する R N A 干渉 ( R N A i ) を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とし、化学的に修飾された s i N A はセンス領域を含み、ここで、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり ( 例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである )、例えば、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のプリンヌクレオチドは、2' - デオキシヌクレオチド、ロック核酸 ( L N A ) ヌクレオチド、2' - メトキシエチルヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、および 2' - O - メチルヌクレオチドからなる群より選択され ( 例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2' - デオキシヌクレオチド、ロック核酸 ( L N A ) ヌクレオチド、2' - メトキシエチルヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、および 2' - O - メチルヌクレオチドからなる群より選択される )、かつ、任意にセンス領域の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に反転デオキシ無塩基修飾が存在していてもよく、センス領域はさらに任意に約 1 - 約 4 個 ( 例えば、約 1, 2, 3, または 4 個 ) の 2' - デオキシリボヌクレオチドを有する 3' 末端オーバーハングを含んでいてもよく ; かつ、化学的に修飾された短干渉核酸分子はアンチセンス領域を含 40  
50

み、ここで、アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチド、ロック核酸(LNA)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択され(例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチド、ロック核酸(LNA)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択されるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチド、ロック核酸(LNA)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択される)、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示されるいずれかの修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在していてもよく、アンチセンス領域はさらに任意に、約1-約4個(例えば、約1, 2, 3, または4個)の2'-デオキシヌクレオチドを有する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含んでいてもよく、ここで、オーバーハングヌクレオチドはさらに1またはそれ以上(例えば1, 2, 3, または4個)のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

10

20

#### 【0070】

別の態様においては、本発明の*siNA*分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは、好ましくは、本発明の*siNA*分子のアンチセンス鎖に存在するが、また任意に、センスおよび/またはアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に存在していてもよく、これは、天然に生ずるリボヌクレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、本発明は、ノザンコンフォメーション(例えば、ノザン偽回転サイクル、例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984を参照)を有する修飾ヌクレオチドを含む*siNA*分子を特徴とする。このように、本発明の*siNA*分子中に存在する化学的に修飾されたヌクレオチドは、好ましくは、本発明の*siNA*分子のアンチセンス鎖に存在するが、また任意にセンスおよび/またはアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方に存在してもよく、これはヌクレアーゼ分解に対して耐性であると同時にRNAiを媒介する能力を維持する。ノザンコンフィギュレーションを有するヌクレオチドの非限定的例としては、ロック核酸(LNA)ヌクレオチド(例えば、2'-O, 4'-C-メチレン-(D-リボフラノシル)ヌクレオチド); 2'-メトキシエトキシ(MOE)ヌクレオチド; 2'-メチル-チオ-エチル, 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド, 2'-デオキシ-2'-クロロヌクレオチド, 2'-アジドヌクレオチド, および2'-O-メチルヌクレオチドが挙げられる。

30

#### 【0071】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてBCL2に対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸分子(*siNA*)を特徴とし、ここで、化学的修飾は、化学的に修飾された*siNA*分子に共有結合したコンジュゲートを含む。別の態様においては、コンジュゲートは化学的に修飾された*siNA*分子に生物分解性リンカーを介して共有結合している。1つの態様においては、コンジュゲート分子は、化学的に修飾された*siNA*分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端に結合している。別の態様においては、コンジュゲート分子は、化学的に修飾された*siNA*分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端に結合している。さらに別の態様においては、コンジュゲート分子は、化学的に修飾された*siNA*分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端および5'末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせに結合している。1つの態様

40

50

においては、本発明のコンジュゲート分子は、化学的に修飾された *siNA* 分子の生物学的システム（例えば細胞）へのデリバリーを促進する分子を含む。別の態様においては、化学的に修飾された *siNA* 分子に結合したコンジュゲート分子は、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、または細胞取り込みを媒介することができる細胞レセプターのリガンドである。化学的に修飾された *siNA* 分子に結合させることができる、本発明により企図される特定のコンジュゲート分子の例は、Vargeeseら（米国特許出願 10/201,394、本明細書の一部としてここに引用する）に記載される。用いられるコンジュゲートのタイプおよび本発明の *siNA* 分子のコンジュゲーションの程度は、同時に *siNA* が *RNAi* 活性を媒介する能力を維持しながら、*siNA* コンストラクトの改良された薬物動態学プロファイル、生物利用性、および/または安定性について評価することができる。このように、当業者は、例えば、当該技術分野において一般的に知られる動物モデルにおいて、種々のコンジュゲートで修飾された *siNA* コンストラクトをスクリーニングして、*siNA* コンジュゲート複合体が *RNAi* を媒介する能力を維持しながら改良された特性を有するかを判定することができる。

#### 【0072】

1つの態様においては、本発明は、*siNA* がさらに *siNA* のセンス領域と *siNA* のアンチセンス領域とを連結させるヌクレオチド、非ヌクレオチド、または混合ヌクレオチド/非ヌクレオチドリナーを含む本発明の短干渉核酸 (*siNA*) 分子を特徴とする。1つの態様においては、本発明のヌクレオチドリナーは、2ヌクレオチド以上の長さ、例えば、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, または10ヌクレオチドの長さのリナーでありうる。別の態様においては、ヌクレオチドリナーは、核酸アプタマーであってもよい。本明細書において用いる場合、“アプタマー”または“核酸アプタマー”とは、標的分子に特異的に結合する核酸分子を意味し、ここで、核酸分子は、その天然の設定において標的分子により認識される配列を含む配列を有する。あるいは、アプタマーは天然には核酸に結合しない標的分子に結合する核酸分子であってもよい。標的分子は目的とする任意の分子でありうる。例えば、アプタマーを用いて蛋白質のリガンド結合ドメインに結合させ、このことにより、天然に生ずるリガンドと蛋白質との相互作用を妨害することができる。これは非限定的例であり、当業者は当該技術分野において一般に知られる手法を用いて他の態様を容易に生成しうることを認識するであろう（例えば、Gold et al., 1995, *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 763; Brody and Gold, 2000, *J. Biotechnol.*, 74, 5; Sun, 2000, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2, 100; Kusser, 2000, *J. Biotechnol.*, 74, 27; Hermann and Patel, 2000, *Science*, 287, 820; および Jayasena, 1999, *Clinical Chemistry*, 45, 1628を参照）。

#### 【0073】

さらに別の態様においては、本発明の非ヌクレオチドリナーには、無塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素、または他のポリマー性化合物（例えば、ポリエチレングリコール、例えば2-100個のエチレングリコール単位を有するもの）が含まれる。特定の例としては、Seela and Kaiser, *Nucleic Acids Res.* 1990, 75:6353 および *Nucleic Acids Res.* 1987, 75:3113; Cload and Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113:6324; Richardson and Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113:5109; Ma et al., *Nucleic Acids Res.* 1993, 21:2585 および *Biochemistry* 1993, 32:1751; Durand et al., *Nucleic Acids Res.* 1990, 75:6353; McCurdy et al., *Nucleosides & Nucleotides* 1991, 10:287; Jschke et al., *Tetrahedron Lett.* 1993, 34:301; Ono et al., *Bioch*

emistry 1991, 30:9914; Arnold et al., 国際公開WO89/02439; Usman et al., 国際公開WO95/06731; Dudycz et al., 国際公開WO95/11910およびFerentz and Verdine, J. Am. Chem. Soc. 1991, 773:4000 (すべて本明細書の一部としてここに引用する)に記載されるものが挙げられる。"非ヌクレオチド"はさらに、1またはそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに糖および/またはリン酸置換のいずれかにより核酸鎖中に取り込むことができ、残りの塩基がその酵素活性を発揮することを可能とする任意の基または化合物を意味する。基または化合物は、一般に認識されているヌクレオチド塩基、例えばアデノシン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミンを、例えば糖のC1位に含まない場合、無塩基でありうる。

10

## 【0074】

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

## 【0075】

1つの態様においては、本発明のsRNA分子は、細胞または再構成されたインビトロ系においてRNAi活性を媒介する一本鎖sRNA分子であり、ここで、sRNA分子は、標的核酸配列に対して相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含む。別の態様においては、本発明の一本鎖sRNA分子は、5'末端リン酸基を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖sRNA分子は5'末端リン酸基および3'末端リン酸基(例えば、2', 3'-環状リン酸)を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖sRNA分子は、約19-約29ヌクレオチドを含む。さらに別の態様においては、本発明の一本鎖sRNA分子は、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。例えば、細胞中においてsRNA分子がRNAi活性を支持する能力が維持される程度に、sRNA分子中のすべての位置で、化学的に修飾されたヌクレオチド、例えば式I-VIIのいずれかを有するヌクレオチドまたはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

20

30

## 【0076】

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

40

50

## 【0077】

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

10

## 【0078】

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

20

30

## 【0079】

1つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、細胞または再構成されたインビトロ系において *R N A i* 活性を媒介する一本鎖 *s i N A* 分子であり、ここで、*s i N A* 分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、*s i N A* 中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、およびアンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-メトキシエチルプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-メトキシエチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-メトキシエチルプリンヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の3'末端、5'

40

50

末端，または3'末端および5'末端の両方に存在していてもよく，s i N A はさらに任意に，s i N A 分子の3'末端に約1 - 約4個（例えば，約1，2，3，または4個）の末端2'-デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく，ここで末端ヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば，1，2，3，または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ，s i N A はさらに任意に，末端リン酸基，例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

【0080】

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

10

【0081】

1つの態様においては，本発明は，細胞中においてBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし，該方法は，（a）本発明のs i N A 分子を合成し，これは化学的に修飾してもよく，s i N A 鎖の一方はBCL2遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして（b）細胞におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A 分子を細胞に導入する，ことを含む。

20

【0082】

1つの態様においては，本発明は，細胞中においてBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし，該方法は，（a）本発明のs i N A 分子を合成し，これは化学的に修飾してもよく，s i N A 鎖の一方はBCL2遺伝子のRNAに相補的な配列を含み，s i N A のセンス鎖配列は標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして（b）細胞中におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A 分子を細胞に導入する，ことを含む。

【0083】

別の態様においては，本発明は，細胞中において2以上のBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし，該方法は，（a）本発明のs i N A 分子を合成し，これは化学的に修飾してもよく，s i N A 鎖の一方はBCL2遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして（b）細胞におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A 分子を細胞に導入する，ことを含む。

30

【0084】

別の態様においては，本発明は，細胞中において2以上のBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし，該方法は，（a）本発明のs i N A 分子を合成し，これは化学的に修飾してもよく，s i N A 鎖の一方はBCL2遺伝子のRNAに相補的な配列を含み，s i N A のセンス鎖配列は，標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして（b）細胞におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A 分子を細胞に導入する，ことを含む。

40

【0085】

1つの態様においては，本発明は，組織外植片におけるBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし，該方法は，（a）本発明のs i N A 分子を合成し，これは化学的に修飾してもよく，s i N A 鎖の一方はBCL2遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして（b）組織外植片におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で，s i N A 分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入する，ことを含む。別の態様においては，この方法はさらに，その生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で，組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入する

50

ことを含む。

【0086】

1つの態様においては、本発明は、組織外植片においてBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNA鎖の一方はBCL2遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、siNAのセンス鎖配列は標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして(b)組織外植片におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入する、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

10

【0087】

別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNA鎖の一方はBCL2遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)組織外植片におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入する、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0088】

1つの態様においては、本発明は、生物においてBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNA鎖の一方はBCL2遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsiNA分子を生物に導入する、ことを含む。

20

【0089】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNA鎖の一方はBCL2遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsiNA分子を生物に導入する、ことを含む。

30

【0090】

1つの態様においては、本発明は、細胞内においてBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはBCL2遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)細胞におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsiNA分子を細胞に導入する、ことを含む。

【0091】

別の態様においては、本発明は、細胞内において2以上のBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはBCL2遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)細胞におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子をインピトロまたはインピボで細胞と接触させる、ことを含む。

40

【0092】

1つの態様においては、本発明は、組織外植片においてBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはBCL2遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)組織外植片におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞と接触させる、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるBCL2遺伝子の発現を調

50

節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0093】

別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはBCL2遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)組織外植片におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入する、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

10

【0094】

1つの態様においては、本発明は、生物においてBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはBCL2遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsiNA分子を生物に導入する、ことを含む。

【0095】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはBCL2遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsiNA分子を生物に導入する、ことを含む。

20

【0096】

1つの態様においては、本発明は、生物においてBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、生物を本発明のsiNA分子と接触させることを含む。

【0097】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のBCL2遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、生物におけるBCL2遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、生物を1またはそれ以上の本発明のsiNA分子と接触させることを含む。

30

【0098】

本発明のsiNA分子は、種々のRNA分子を標的とするRNAiにより標的(BCL2)遺伝子の発現が阻害されるよう設計することができる。1つの態様においては、本発明のsiNA分子は、標的遺伝子に対応する種々のRNAを標的とするよう用いられる。そのようなRNAの非限定的例には、メッセンジャーRNA(mRNA)、標的遺伝子の選択的RNAスプライシング変種、標的遺伝子の転写後修飾RNA、標的遺伝子のpre-mRNA、および/またはRNAテンプレートが含まれる。選択的スプライシングにより、適当なエクソンの使用により区別される転写産物のファミリーが生ずる場合には、本発明は、適当なエクソンにより遺伝子発現を阻害して、遺伝子ファミリーメンバーの機能を特異的に阻害するかまたはその間を区別するために用いることができる。例えば、選択的スプライシングされた貫膜ドメインを含む蛋白質を、膜結合型および分泌型の両方の形で発現させることができる。本発明を用いて貫膜ドメインを含むエクソンを標的とすることにより、分泌型の蛋白質に対して、膜結合型の薬学的ターゲティングの機能的な重要性を判定することができる。これらのRNA分子を標的とすることに関連する本発明の用途の非限定的例には、治療的医薬用途、医薬の発見用途、分子診断および遺伝子機能用途、および遺伝子マッピング、例えば本発明のsiNA分子を用いる単一ヌクレオチド多型のマッピングが含まれる。そのような用途は、既知の遺伝子配列を用いて、または発現配列タグ(EST)から入手可能な部分配列から実行することができる。

40

【0099】

50

別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、遺伝子ファミリー、例えば *B C L 2* ファミリー遺伝子に対応する保存配列を標的とするために用いられる。そのように、多くの *B C L 2* 標的を標的とする *s i N A* 分子は、増加した治療効果を提供することができる。さらに、*s i N A* は、種々の応用法において遺伝子機能の経路を特性決定するために用いることができる。例えば、本発明を用いて、経路における標的遺伝子の活性を阻害して、遺伝子機能分析、*m R N A* 機能分析、または翻訳分析において、特性決定されていない遺伝子の機能を決定することができる。本発明は、医薬開発に向けて、種々の疾病および健康状態に關与する可能性のある標的遺伝子経路を決定するために用いることができる。本発明は、例えば、癌の進行および/または維持に關与する遺伝子発現の経路を理解するために用いることができる。

10

## 【0100】

1つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子および/または方法は、*Genbank* 受託番号で表される *R N A* をコードする遺伝子、例えば、本明細書において *Genbank* 受託番号（例えば表 I に示される *Genbank* 受託番号）で表される *R N A* 配列をコードする *B C L 2* 遺伝子の発現を阻害するために用いられる。

## 【0101】

1つの態様においては、本発明は、(a) 予め決定された複雑性を有する *s i N A* コンストラクトのライブラリを生成し、そして (b) 標的 *R N A* 配列中の *R N A i* 標的部位を決定するのに適した条件下で、上述の (a) の *s i N A* コンストラクトをアッセイする、ことを含む方法の特徴とする。別の態様においては、(a) の *s i N A* 分子は、固定された長さ、例えば、約 23 ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては、(a) の *s i N A* 分子は、異なる長さのものであり、例えば、約 19 - 約 25（例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24, または 25）ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書に記載されるような再構成されたインビトロ *s i N A* アッセイを含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的 *R N A* が発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、標的 *R N A* のフラグメントを、例えば、ゲル電気泳動、ノザンプロット分析、または *R N A s e* 保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的 *R N A* 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的 *R N A* 配列は、当該技術分野において知られるように、例えば、クローニングおよび/またはインビトロ系については転写、インビボ系においては細胞発現により、得ることができる。

20

30

## 【0102】

1つの態様においては、本発明は、(a) 予め決定された複雑性、例えば  $4^N$  ( $N$  は、*s i N A* コンストラクトの鎖のそれぞれにおいて塩基対形成したヌクレオチドの数を示し、例えば、19 塩基対を有する 21 ヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する *s i N A* コンストラクトについては、複雑性は  $4^{19}$  となる) を有するランダム化された *s i N A* コンストラクトのライブラリを生成し；そして (b) 標的 *B C L 2 R N A* 配列中の *R N A i* 標的部位を決定するのに適した条件下で、上述の (a) の *s i N A* コンストラクトをアッセイする、の各工程を含む方法の特徴とする。別の態様においては、(a) の *s i N A* 分子は、固定された長さ、例えば約 23 ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては、(a) の *s i N A* 分子は異なる長さのものであり、例えば、約 19 - 約 25（例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24, または 25）ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書の実施例 7 に記載されるような、再構成されたインビトロ *s i N A* アッセイを含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的 *R N A* が発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、*B C L 2 R N A* のフラグメントを、例えば、ゲル電気泳動、ノザンプロット分析、または *R N A s e* 保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的 *B C L 2 R N A* 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的 *B C L 2 R N A* 配列は、当該技術分野において知られるように、例えば、クローニングおよび/またはインビトロ系については転写により、インビボ系においては細胞発現により、得る

40

50

ことができる。

【0103】

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

10

【0104】

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

20

【0105】

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

【0106】

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

30

【0107】

別の態様においては、本発明は、BCL2遺伝子標的を評価する方法の特徴とし、該方法は、(a) 本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNA鎖の一方はBCL2標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；(b) 細胞、組織、または生物においてBCL2標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子を細胞、組織、または生物に導入し；そして(c) 細胞、組織、または生物における表現型変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

40

【0108】

別の態様においては、本発明は、BCL2標的を評価する方法の特徴とし、該方法は、(a) 本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾されていてもよく、siNA鎖の一方はBCL2標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；(b) 生物学的システムにおけるBCL2標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子を生物学的システムに導入し；そして(c) 生物学的システムにおける表現型の変化をアッセイ

50

することにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

【0109】

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

【0110】

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

10

【0111】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のsiNA分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物におけるBCL2標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。別の態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい2以上の本発明のsiNA分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物において2以上のBCL2標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。

20

【0112】

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

【0113】

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

30

【0114】

1つの態様においては、本発明は、siNAデュプレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) siNA分子の第1のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第1のオリゴヌクレオチド配列鎖はsiNAの第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1のオリゴヌクレオチド配列鎖の足場上でsiNAの第2のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第2のオリゴヌクレオチド配列鎖はさらに、siNAデュプレックスを精製するために用いることができる化学成分を含み；(c) 2つのsiNAオリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュプレックスを形成するのに適した条件下で(a)のリンカー分子を切断し；そして(d) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用してsiNAデュプレックスを精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の間に、例えば、メチルアミン等のアルキルアミン塩基を用いて加水分解条件下で行う。1つの態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(CPG)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含み、ここで、(a)の第1の配列は、固体支持体を足場として用いてス

40

50

クシニルリンカー等の切断可能なリンカー上で合成される。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーと(a)の切断可能なリンカーの切断が同時に行われるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性を有することができる。別の態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列の単離に用いることができる(b)の化学成分は、ジメトキシトリチル基等のトリチル基を含み、これは本明細書に記載されるトリチルオン合成戦略において利用することができる。さらに別の態様においては、ジメトキシトリチル基等の化学成分は、精製の間、例えば酸性条件を用いて除去する。

【0115】

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

【0116】

別の態様においては、本発明は、s i N A デュープレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) s i N A 分子の一方のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、配列は他方のオリゴヌクレオチド配列の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1の配列鎖に対して相補性を有する第2のオリゴヌクレオチド配列を(a)の足場上で合成し、ここで、第2の配列は二本鎖s i N A 分子の他方の鎖を含み、かつ、第2の配列はさらに、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる化学成分を含み；(c) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して、切断可能なリンカーにより接続された両方のs i N A オリゴヌクレオチド鎖を含む全長配列を単離するのに適した条件下で、かつ、2つのs i N A オリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュープレックスを形成するのに適した条件下で、(b)の生成物を精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の間に、例えば加水分解条件下で行う。別の態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の後に行う。別の態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(C P G)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含み、ここで、(a)の第1の配列は、スクシニルリンカー等の切断可能なリンカー上で、固体支持体を足場として用いて合成する。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーおよび(a)の切断可能なリンカーが同時にまたは別々に切断されるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性または異なる反応性を有することができる。1つの態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる(b)の化学成分は、トリチル基、例えばジメトキシトリチル基を含む。

【0117】

別の態様においては、本発明は、1回の合成プロセスで二本鎖s i N A 分子を作製する方法を特徴とし、該方法は、(a) 第1の配列および第2の配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、ここで、第1の配列は第2の配列に相補的であり、第1のオリゴヌクレオチド配列は切断可能なリンカーを介して第2の配列に連結されており、かつ、第2の配列を有するオリゴヌクレオチドには末端5' - 保護基、例えば、5' - O - ジメトキシトリチル基(5' - O - D M T)が残存しており；(b) オリゴヌクレオチドを脱保護し、このことにより脱保護によって2つのオリゴヌクレオチド配列を結合しているリンカーが切断され；そして(c) 二本鎖s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、例えば本明細書に記載されるトリチル - オン合成戦略を用いて、(b)の生成物を精製する、の工程を含む。

【0118】

別の態様においては、本発明のs i N A 分子の合成の方法は、S c a r i n g e らの米

国特許 5,889,136; 6,008,400; および 6,111,086 (その全体を本明細書の一部としてここに引用する)の教示を含む。

【0119】

1つの態様においては、本発明は BCL2 に対する RNAi を媒介する siNA コンストラクトを特徴とし、siNA コンストラクトは、siNA コンストラクトのヌクレアーゼ耐性を増加させる 1 またはそれ以上の化学的修飾、例えば、式 I-VII のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する 1 またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0120】

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

10

【0121】

1つの態様においては、本発明は BCL2 に対する RNAi を媒介する siNA コンストラクトを特徴とし、siNA コンストラクトは、siNA コンストラクトのセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性を調節する、1 またはそれ以上の本明細書に記載される化学的修飾を含む。

【0122】

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

20

【0123】

1つの態様においては、本発明は、BCL2 に対する RNAi を媒介する siNA コンストラクトを特徴とし、siNA コンストラクトは、siNA コンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的標的 RNA 配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載される 1 またはそれ以上の化学的修飾を含む。

30

【0124】

1つの態様においては、本発明は、BCL2 に対する RNAi を媒介する siNA コンストラクトを特徴とし、siNA コンストラクトは、siNA コンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的標的 DNA 配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載される 1 またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0125】

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

40

【0126】

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

【0127】

50

1つの態様においては、本発明は、BCL2に対するRNAiを媒介するsiNAコンストラクトを特徴とし、siNAコンストラクトは、化学的に修飾されたsiNAコンストラクトに対する配列ホモロジーを有する追加の内因性siNA分子を生成しうる細胞性ポリメラーゼのポリメラーゼ活性を調節する、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0128】

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

10

【0129】

1つの態様においては、本発明は、細胞においてBCL2に対するRNAiを媒介する化学的に修飾されたsiNAコンストラクトを特徴とし、ここで、化学的修飾は、そのようなsiNAコンストラクトにより媒介されるRNAiの効率を低下させるような様式で、siNAと標的RNA分子、DNA分子および/または蛋白質またはRNAiに必須の他の因子との相互作用に有意に影響を与えない。

20

【0130】

別の態様においては、本発明は、BCL2に対する改良されたRNAi活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをsiNA分子に導入し、そして(b)改良されたRNAi活性を有するsiNA分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0131】

さらに別の態様においては、本発明は、BCL2標的RNAに対する改良されたRNAi活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをsiNA分子に導入し、そして(b)標的RNAに対する改良されたRNAi活性を有するsiNA分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

30

【0132】

さらに別の態様においては、本発明は、BCL2標的DNAに対する改良されたRNAi活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをsiNA分子に導入し、そして(b)標的DNAに対する改良されたRNAi活性を有するsiNA分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0133】

1つの態様においては、本発明は、BCL2に対するRNAiを媒介するsiNAコンストラクトを特徴とし、ここで、siNAコンストラクトは、siNAコンストラクトの細胞取り込みを調節する本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

40

【0134】

別の態様においては、本発明は、改良された細胞取り込みを有する、BCL2に対するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをsiNA分子に導入し、そして(b)改良された細胞取り込みを有するsiNA分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0135】

1つの態様においては、本発明は、BCL2に対するRNAiを媒介するsiNAコン

50

ストラクトを特徴とし、ここで、s i N A コンストラクトは、例えば、s i N A コンストラクトの薬物動態学を改良するポリエチレングリコールまたは同等のコンジュゲート等のポリマー性コンジュゲートを結合させることにより、またはインビボで特定の組織のタイプまたは細胞のタイプにターゲティングするコンジュゲートを結合させることにより、s i N A コンストラクトの生物利用性を増加させる、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。そのようなコンジュゲートの非限定的例は、V a r g e e s e e t a l . , 米国特許出願10/201,394(本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

【0136】

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

【0137】

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

【0138】

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

【0139】

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

【0140】

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

【0141】

本明細書において用いる場合、"短干渉核酸"、"s i N A"、"短干渉R N A"、"s i R N A"、"短干渉核酸分子"、"短干渉オリゴヌクレオチド分子"、または"化学的に修飾された短干渉核酸分子"との用語は、配列特異的様式でR N A干渉"R N A i"または遺伝子サイレンシングを媒介しうる任意の核酸分子を表す(例えば、B a s s , 2001, N a t u r e , 411, 428 - 429; E l b a s h i r e t a l . , 2001, N a t u r e , 411, 494 - 498; およびK r e u t z e r e t a l . , 国際公開W O 00/44895; Z e r n i c k a - G o e t z e t a l . , 国際公開W O 01/36646; F i r e , 国際公開W O 99/32619; P l a e t i n c k e t

a l . , 国際公開 W O 0 0 / 0 1 8 4 6 ; M e l l o a n d F i r e , 国際公開 W O 0 1 / 2 9 0 5 8 ; D e s c h a m p s - D e p a i l l e t t e , 国際公開 W O 9 9 / 0 7 4 0 9 ; および L i e t a l . , 国際公開 W O 0 0 / 4 4 9 1 4 ; A l l s h i r e , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 1 8 1 8 - 1 8 1 9 ; V o l p e e t a l . , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 1 8 3 3 - 1 8 3 7 ; J e n u w e i n , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 2 2 1 5 - 2 2 1 8 ; および H a l l e t a l . , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 2 2 3 2 - 2 2 3 7 ; H u t v a g n e r a n d Z a m o r e , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 2 0 5 6 - 6 0 ; M c M a n u s e t a l . , 2 0 0 2 , R N A , 8 , 8 4 2 - 8 5 0 ; R e i n h a r t e t a l . , 2 0 0 2 , G e n e & D e v . , 1 6 , 1 6 1 6 - 1 6 2 6 ; および R e i n h a r t & B a r t e l , 2 0 0 2 , S c i e n c e , 2 9 7 , 1 8 3 1 を参照)。本発明の *s i N A* 分子の非限定的例は、図 4 - 6 および本明細書の表 I I , I I I および I V に示される。例えば、*s i N A* は、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であってもよく、ここで、アンチセンス領域は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。*s i N A* は 2 つの別々のオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、ここで一方の鎖はセンス鎖であり、他方はアンチセンス鎖であり、アンチセンス鎖およびセンス鎖は自己相補的であり（すなわち、各鎖は、他方の鎖中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む）；アンチセンス鎖は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を含む。あるいは、*s i N A* は単一のオリゴヌクレオチドから組み立ててもよく、ここで、*s i N A* の自己相補的センス領域およびアンチセンス領域は、核酸系または非核酸系のリンカーにより連結されている。*s i N A* は、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は別の標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。*s i N A* は 2 またはそれ以上のループ構造および自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を含むステムを有する環状一本鎖ポリヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、インピボまたはインピトロでプロセシングされて、RNAi を媒介しうる活性な *s i N A* 分子を生ずることができる。*s i N A* はまた、標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含んでいてもよく（例えば、そのような *s i N A* 分子が *s i N A* 分子中に標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列の存在を必要としない場合）、ここで、一本鎖ポリヌクレオチドはさらに末端リン酸基、例えば 5' - リン酸（例えば、Martinez et al. , 2002, Cell. , 110, 563 - 574 および Schwarz et al. , 2002, Molecular Cell , 10, 537 - 568 を参照）、または 5' , 3' - ニリン酸を含んでいてもよい。

ある態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、標的遺伝子の発現の阻害が引き起こされるように、標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用する。本明細書において用いる場合、*s i N A* 分子は RNA のみを含む分子に限定される必要はなく、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドも包含する。ある態様においては、本発明の短干渉核酸分子は 2' - ヒドロキシ（2' - OH）含有ヌクレオチドを欠失している。本出願人は、ある態様において、RNAi を媒介するために 2' - ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない短干渉核酸を記載する。すなわち、本発明の短干渉核酸分子は、任意にリボヌクレオチド（例えば、2' - OH 基を有するヌクレオチド）を含まなくてもよい。しかし、RNAi を支持するために *s i N A* 分子中にリ

ボヌクレオチドの存在を必要としないそのような *siNA* 分子は、2'-OH基を有する1またはそれ以上のヌクレオチドを含む、結合したリンカーまたは他の結合しているかまたは会合している基、成分、または鎖を有することができる。任意に、*siNA* 分子は、ヌクレオチド位置の約5、10、20、30、40、または50%にリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の修飾短干渉核酸分子はまた、短干渉修飾オリゴヌクレオチド "*siMON*" と称される。本明細書において用いる場合、*siNA* との用語は、配列特異的RNA *i* を媒介しうる核酸分子を記述するために用いられる他の用語、例えば、短干渉RNA (*siRNA*)、二本鎖RNA (*dsRNA*)、マイクロRNA (*miRNA*)、短ヘアピンRNA (*shRNA*)、短干渉オリゴヌクレオチド、短干渉核酸、短干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学的に修飾された *siRNA*、転写後遺伝子サイレンシングRNA (*ptgsRNA*)、および他のものと同であることを意味する。さらに、本明細書において用いる場合、RNA *i* との用語は、配列特異的RNA干渉を記述する他の用語、例えば転写後遺伝子サイレンシング、または後成遺伝学 (*epigenetics*) と同等であることを意味する。例えば、本発明の *siNA* 分子を用いて、転写後レベルまたは転写前レベルの両方で後成的に遺伝子をサイレンシングさせることができる。非限定的例においては、本発明の *siNA* 分子による遺伝子発現の後成的制御は、クロマチン構造の *siNA* 媒介性修飾により生じて遺伝子発現を変化させることができる (例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwain, 2002, Science, 297, 2215-2218; および Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237 を参照)。

#### 【0142】

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

#### 【0143】

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

#### 【0144】

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

#### 【0145】

本明細書において用いる場合、"BCL2"とは、BCL2またはBCL2ファミリー (例えば、BCL2、BCL-XL、BCL2-L1、MCL-1、CED-9、BAG-1、E1B-194またはA1) の活性を有するか、またはBCL2の転座により生成した任意の蛋白質、ペプチド、ポリペプチド、および/またはポリヌクレオチドを意味する。非限定的例においては、BCL2は、表IのGenbank受託番号により参照される

ポリヌクレオチドまたは他の任意の B C L 2 がコードする核酸配列を記述するために用いることができる。

【0146】

"B C L 2 蛋白質"とは、ペプチドまたは蛋白質が B C L 2 遺伝子によりコードされているか B C L 2 活性を有する任意の B C L 2 または B C L 2 ファミリーペプチドまたは蛋白質またはそれらの成分を意味する。

【0147】

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

10

【0148】

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

【0149】

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

【0150】

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

20

【0151】

"相補性"とは、核酸が、伝統的なワトソン - クリックまたは他の非伝統的なタイプのいずれかにより、別の核酸配列と水素結合を形成しうることを意味する。本発明の核酸分子に関して、核酸分子とその相補的配列との結合自由エネルギーは、核酸の適切な機能、例えば、R N A i 活性を進行させるのに十分なものである。核酸分子についての結合自由エネルギーの決定は当該技術分野においてよく知られている（例えば、Turner et al., 1987, C S H Symp. Quant. Biol. LI pp. 123 - 133; Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 83: 9373 - 9377; Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109: 3783 - 3785 を参照）。相補性のパーセンテージは、核酸分子中の、第 2 の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン - クリック塩基対形成）を形成しうる連続する残基のパーセンテージを示す（例えば、10 塩基中の 5, 6, 7, 8, 9, 10 塩基は、50%, 60%, 70%, 80%, 90%, および 100% の相補性である）。"完全な相補性"とは、核酸配列の連続する残基がすべて第 2 の核酸配列中の同じ数の連続する残基と水素結合するであろうことを意味する。

30

【0152】

本発明の s i R N A 分子は、単独でまたは他の療法と組み合わせて、種々の病理学的適応症または他の健康状態、例えば、癌、例えば、限定されないが、卵巣癌、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、非小細胞肺癌、前立腺癌、例えば、悪性血液疾患、例えばリンパ腫（例えば、非ホジキンおよびホジキンリンパ腫、およびマントル細胞リンパ腫）白血病（例えば、慢性骨髄性白血病、C M L；急性骨髄性白血病、A M L；続発性白血病、急性リンパ芽球性白血病、A L L；慢性リンパ性白血病；C L L）、真性赤血球増加症、特発性骨髄線維症、本態性血小板血症、脊髄形成異常症候群、自己免疫疾病（例えば、多発性硬化症、狼瘡、慢性関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、脳炎、ラスムッセン脳炎、甲状腺炎、クローン病、繊維性筋痛、グレーヴズ病、ギャンバレー症候群、慢性疲労症候群、自己免疫肝炎、メニエール病、重症筋無力症、心筋症、多発性筋痛、乾癬、潰瘍性大腸炎等）、ウイルス感染（例えば、H I V, H C V, H B V, R S V, C M V, H S V, インフルエンザ、ライノウイルス等）、および細胞または組織における B C L 2 のレベルに関連する他の任意の疾病または健康状態を治療するための新規な治療法である。B C L 2 の発現

40

50

(特に B C L 2 R N A のレベル)の減少,したがってそれぞれの蛋白質のレベルの減少は,疾病または病気の症状をある程度軽減する。

【0153】

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

10

【0154】

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

20

【0155】

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

30

【0156】

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

【0157】

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

40

50

## 【0158】

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

## 【0159】

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

10

## 【0160】

本明細書において用いる場合、"万能塩基"との用語は、天然のDNA/RNA塩基のそれぞれと、これらをほとんど区別せずに塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を表す。万能塩基の非限定的例としては、当該技術分野において知られるように（例えば、Loakes, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437-2447を参照）、C-フェニル、C-ナフチルおよび他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、およびニトロアゾール誘導体、例えば、3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、および6-ニトロインドールが挙げられる。

## 【0161】

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

20

## 【0162】

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

30

## 【0163】

さらに別の態様においては、siNA分子を他の既知の治療法と組み合わせて用いて、上述の健康状態または疾病を治療することができる。例えば、本明細書に記載される分子を1またはそれ以上の既知の治療剤と組み合わせて用いて、疾病または健康状態を治療することができる。本発明のsiNA分子と容易に組み合わせることができる他の治療剤の非限定的例は、酵素的核酸分子、アロステリック核酸分子、アンチセンス、デコイ、またはアプタマー核酸分子、抗体、例えばモノクローナル抗体、小分子、および他の有機および/または無機化合物、例えば金属、塩およびイオンである。

## 【0164】

1つの態様においては、本発明は、本発明の少なくとも1つのsiNA分子をコードする核酸配列を、そのsiNA分子の発現を可能とするように含む発現ベクターを特徴とする。例えば、ベクターは、デュープレックスを含むsiNA分子の両方の鎖をコードする配列を含むことができる。ベクターはまた、自己相補的でありしたがってsiNA分子を形成する1つの核酸分子をコードする配列を含むことができる。そのような発現ベクターの非限定的例は、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500; および Novina et al., 2002, Nature Medicine, advance onli

40

50

ne publication doi:10.1038/nm725に記載されている。

【0165】

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

【0166】

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

【0167】

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

【0168】

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

【0169】

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

【0170】

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

【発明を実施するための最良の形態】

【0171】

図面の簡単な説明

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

【0172】

図2は、本発明の方法により合成された精製siNAデュプレックスのMALDI-TOV質量分析を示す。示される2つのピークは、別々のsiNA配列鎖の推定質量に対

10

20

30

40

50

応する。この結果は、タンデム合成から生成された *s i N A* デュープレックスを、単純なトリチルオン精製方法論を用いて単一物質として精製しうることを示す。

【0173】

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

10

【0174】

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

【0175】

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

20

30

【0176】

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

40

【0177】

図4C：センス鎖は5'末端キャップ成分および3'末端キャップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化

50

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

【0178】

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

10

20

【0179】

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

30

【0180】

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

40

【0181】

50

図 5 A - F は、本発明の化学的に修飾された特定の s i N A 配列の非限定的例を示す。A - F は、図 4 A - F に示される化学的修飾を B C L 2 s i N A 配列に適用したものである。

【 0 1 8 2 】

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

【 0 1 8 3 】

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

【 0 1 8 4 】

図 7 A : 5' - 制限部位 ( R 1 ) 配列、次に予め決定された B C L 2 標的配列と同一の配列を有する領域 ( s i N A のセンス領域 ) を含むように D N A オリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約 19, 20, 21, または 22 ヌクレオチド ( N ) の長さを有し、その後例えば約 3 - 約 10 ヌクレオチドを含む規定された配列 ( X ) のループ配列を有する。

【 0 1 8 5 】

7 B : 次に、合成コンストラクトを D N A ポリメラーゼにより伸長して、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成し、このことにより、B C L 2 標的配列に対する特異性を有し、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有する s i N A 転写産物が得られる。

【 0 1 8 6 】

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

【 0 1 8 7 】

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

【 0 1 8 8 】

図 8 A : 5' - 制限 ( R 1 ) 部位配列、次に予め決定された B C L 2 標的配列と同一の配列を有する領域 ( s i N A のセンス領域 ) を有するように、D N A オリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約 19, 20, 21, または 22 ヌクレオチド ( N ) の長さを含み、その後規定された配列 ( X ) のループ配列に隣接する 3' - 制限部位

( R 2 ) を有する。

【 0 1 8 9 】

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

【 0 1 9 0 】

図 8 C : コンストラクトを R 1 および R 2 に特異的な制限酵素で処理して二本鎖 D N A を生成し , 次にこれを細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。U 6 プロモーター領域が d s D N A の両側を挟むように転写カセットを設計し , このことにより s i N A の別々のセンス鎖およびアンチセンス鎖が生ずる。ポリ T 末端配列をコンストラクトに付加して , 得られる転写産物中に U オーバーハングを生成することができる。

10

【 0 1 9 1 】

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

【 0 1 9 2 】

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

【 0 1 9 3 】

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

20

【 0 1 9 4 】

図 9 D : 標的核酸配列の調節に伴う表現型の変化に基づいて細胞を分類する。

【 0 1 9 5 】

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

【 0 1 9 6 】

図 1 0 は , 例えば , 本発明の s i N A 配列の 3 ' 末端を安定化させるために用いることができる , 種々の安定化化学 ( 1 - 1 0 ) の非限定的例を示す : ( 1 ) [ 3 - 3 ' ] - 反転デオキシリボース ; ( 2 ) デオキシリボヌクレオチド ; ( 3 ) [ 5 ' - 3 ' ] - 3 ' - デオキシリボヌクレオチド ; ( 4 ) [ 5 ' - 3 ' ] - リボヌクレオチド ; ( 5 ) [ 5 ' - 3 ' ] - 3 ' - O - メチルリボヌクレオチド ; ( 6 ) 3 ' - グリセリル ; ( 7 ) [ 3 ' - 5 ' ] - 3 ' - デオキシリボヌクレオチド ; ( 8 ) [ 3 ' - 3 ' ] - デオキシリボヌクレオチド ; ( 9 ) [ 5 ' - 2 ' ] - デオキシリボヌクレオチド ; および ( 1 0 ) [ 5 - 3 ' ] - ジデオキシリボヌクレオチド。図面に示されている修飾および非修飾の骨格化学に加えて , これらの化学を本明細書に記載されるような別の骨格修飾 , 例えば , 式 I を有する骨格修飾と組み合わせることができる。さらに , 示される末端修飾の 5 ' 側に示される 2 ' - デオキシリボヌクレオチドは , 本明細書に記載される別の修飾または非修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド , 例えば , 式 I - V I I またはそれらの任意の組み合わせを有する修飾であってもよい。

30

【 0 1 9 7 】

図 1 1 は , ヌクレアーゼに耐性であるが R N A i 活性を媒介する能力を保持している本発明の化学的に修飾された s i N A コンストラクトを同定するために用いられる戦略の非限定的例を示す。経験に基づく設計パラメータ ( 例えば , 2 ' - 修飾 , 塩基修飾 , 骨格修飾 , 末端キャップ修飾等の導入 ) に基づいて s i N A コンストラクトに化学修飾を導入する。修飾されたコンストラクトを適当な系 ( 例えば , 示されるようにヌクレアーゼ耐性についてはヒト血清 , または P K / デリバリーパラメータについては動物モデル ) で試験する。平行して , 例えば , 細胞培養系において , 例えばルシフェラーゼレポーターアッセイにより , R N A i 活性について s i N A コンストラクトを試験する。次に , 特定の特徴を有するが R N A i 活性を保持しているリード s i N A コンストラクトを同定し , これをさらに修飾し , 再びアッセイする。この同じ方法を用いて , 改良された薬物動態学的プロフ

40

50

ァイル, デリバリー, および RNAi 活性を有する siNA-コンジュゲート分子を同定することができる。

【0198】

図12は, A549細胞における, BCL2 mRNAを標的とする化学的に修飾された siNAsにより媒介される BCL2 mRNAの減少の非限定的例を示す。A549細胞を25 nMの siNAと複合体化した0.25 µg/ウエルの脂質でトランスフェクトした。リボヌクレオチドおよび3'-末端ジチミジンキャップを含む siNAコンストラクト(RPI#30998/31074)を, 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドおよびプリンリボヌクレオチドを含み, siNAのセンス鎖が5'および3'-末端反転デオキシ無塩基キャップでさらに修飾されており, アンチセンス鎖が3'-末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む, 化学的に修飾された siNAコンストラクト(RPI#31368/31369)とともに試験した。これはまた, マッチした化学的反転対照(RPI#31370/31371), および2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンおよび2'-デオキシ-2'-フルオロプリンヌクレオチドを含み, siNAのセンス鎖が5'および3'-末端反転デオキシ無塩基キャップでさらに修飾されており, アンチセンス鎖が3'-末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む化学的に修飾された siNAコンストラクト(RPI#31372/31373)とも比較した。また, マッチした化学的反転対照(RPI#31374/31375)とも比較した。さらに, siNAコンストラクトは, 未処理細胞, 脂質およびスクランブル化 siNAコンストラクトでトランスフェクションした細胞(Scram1およびScram2), および脂質のみでトランスフェクションした細胞(トランスフェクション対照)とも比較した。図に示されるように, siNAコンストラクトは, スクランブル化, 未処理, およびトランスフェクション対照と比較して, BCL2 RNA発現の有意な低下を示す。

【0199】

発明の詳細な説明

本発明の核酸分子の作用のメカニズム

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

【0200】

RNA干渉とは, 動物において短干渉RNA(siRNA)により媒介される配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを表す(Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物における対応するプロセスは一般に転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと称され, 真菌においてはクエリングとも称される。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは, 外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御メカニズムであると考えられており, 異なる叢および門が共通して有している(Fire et al., 1999, Trends Genet., 15, 358)。そのような外来遺伝子発現からの防御は, ウイルス感染また

は宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素のランダムインテグレーションから生ずる二本鎖RNA (dsRNA) の生成にตอบสนองして、相同的一本鎖RNAまたはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答により進化してきたのであろう。細胞におけるdsRNAの存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼPKRおよび2', 5'-オリゴアデニレートシンターゼのdsRNA媒介性活性化の結果、リボヌクレアーゼLによるmRNAの非特異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

#### 【0201】

細胞中に長いdsRNAが存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼIII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNAをプロセシングして短干渉RNA (siRNA) として知られる短い断片のdsRNAとすることに関与している (Bernstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干渉RNAは、典型的には約21-23ヌクレオチドの長さであり、約19塩基対のデュプレックスを含む。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示唆されている保存された構造の前駆体RNAから21および22ヌクレオチドの小さな一時的RNA (stRNA) を切り出すことに関与することが示唆されている (Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi応答はまた、一般にRNA誘導性サイレンシング複合体 (RISC) と称される、siRNAを含むエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これはsiRNAと相同な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAの切断は、siRNAデュプレックスのガイド配列に相補的な領域の中央部で生ずる (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。さらに、RNA干渉には、小さいRNA (例えば、マイクロRNAまたはmiRNA) に媒介される遺伝子サイレンシングが関与する場合もある。これはおそらく、クロマチン構造を制御する細胞性メカニズムによるものであり、このことにより標的遺伝子配列の転写が妨害される (例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; およびHall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237を参照)。このように、本発明のsiNA分子は、RNA転写産物との相互作用を介して、あるいは特定の遺伝子配列との相互作用により、遺伝子サイレンシングを媒介するために用いることができ、そのような相互作用により転写レベルまたは転写後レベルのいずれかで遺伝子サイレンシングが生ずる。

#### 【0202】

RNAiは種々の系で研究されてきた。Fireら (1998, Nature, 391, 806) は、C. Elegansにおいて最初にRNAiを観察した。WiannyおよびGoetz (1999, Nature Cell Biol., 2, 70) は、マウス胚においてdsRNAにより媒介されるRNAiを記載する。Hammondら (2000, Nature, 404, 293) は、dsRNAでトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記載する。Elbashirら (2001, Nature, 411, 494) は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞において、合成の21ヌクレオチドRNAのデュプレックスを導入することにより誘導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsiRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsiRNAデュプレックスは2つの2ヌクレオチド3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsiRNA鎖を2'-デオキシまたは2'-O-メチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が破壊されるが、3'末端siRNAヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換することは許容されることが示された。siRNAデュプレックスの中心におけるミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおけ

る切断部位の位置は siRNA ガイド配列の 3' 末端ではなくガイド配列の 5' 末端により規定されることを示した (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究は, siRNA デュープレックスの標的相補鎖の 5' - リン酸が siRNA 活性に必要であり, siRNA の 5' - リン酸成分を維持するために ATP が用いられることを示した (Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。しかし, 5' - リン酸を欠失した siRNA 分子は, 外的に導入したときに活性であり, このことは, インビボで siRNA コンストラクトの 5' - リン酸化が生じているかもしれないことを示唆する。

#### 【0203】

##### 核酸分子の合成

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

#### 【0204】

オリゴヌクレオチド (例えば, ある種の修飾オリゴヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを欠失しているオリゴヌクレオチドの一部) は, 例えば, Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19, Thompson et al., 国際公開99/54459, Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684, Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59, Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng., 61, 33-45, および Brennan, 米国特許6,001,311に記載されるような, 当該技術分野において知られるプロトコルを用いて合成する (これらの文献はすべて本明細書の一部としてここに引用する)。オリゴヌクレオチドの合成は, 一般の核酸保護基およびカップリング基, 例えば5'末端にジメトキシトリチル, および3'末端にホスホルアミダイトを用いて行う。非限定的例においては, 394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で, 0.2 μmol スケールのプロトコルで, 2'-O-メチル化ヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程, および2'-デオキシヌクレオチドまたは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドについては45秒間のカップリング工程で, 小スケールの合成を行う。表Vは, 合成サイクルで用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは, 0.2 μmol スケールでの合成は, 96ウエルプレート合成機, 例えば, Protogene (Palo Alto, CA) により製造される装置で, サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-O-メチル残基の各カップリングサイクルにおいては, ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して33倍過剰 (60 μL の 0.11 M = 6.6 μmol) の2'-O-メチルホスホルアミダイトおよび105倍過剰のS-エチルテトラゾール (60 μL の 0.25 M = 15 μmol) を用いることができる。デオキシ残基の各カップリングサイクルにおいては, ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して22倍過剰 (40 μL の 0.11 M = 4.4 μmol) のデオキシホスホルアミダイトおよび70倍過剰のS-エチルテトラゾール (40 μL の 0.25 M = 10 μmol) を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング収率は, トリチル画分の比色定量により決定して, 典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである: 脱トリチル化溶液は塩化メチレン中3% TCA (ABI) であり; キャッピングは, THF 中16% N-メチルイミダゾール (ABI) およびTHF 中10

10

20

30

40

50

%無水酢酸 / 10% 2,6-ルチジン (ABI) 中で行い; 酸化溶液は, THF 中 16.9 mM  $I_2$ , 49 mM ピリジン, 9% 水 (PERSEPTIVE (登録商標)) である。Burdick & Jackson 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルテトラゾール溶液 (アセトニトリル中 0.25 M) は, American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは, ホスホロチオエート結合の導入のためには, ボーケージ試薬 (3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン 1, 1-ジオキシド, アセトニトリル中 0.05 M) を用いる。

#### 【0205】

DNA系オリゴヌクレオチドの脱保護は以下のように行う: ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを 4 mL のガラスねじ蓋バイアルに移し, 40% 水性メチルアミン (1 mL) の溶液中で 65 °C で 10 分間懸濁する。-20 °C に冷却した後, 上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を 1.0 mL の EtOH: MeCN: H<sub>2</sub>O / 3: 1: 1 で 3 回洗浄し, ボルテックスし, 次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して, 白色粉末を得る。

#### 【0206】

本発明のある種の siNA 分子を含む RNA について用いられる合成方法は, Usmanら (1987 J. Am. Chem. Soc., 109, 7845), Scaringeら (1990 Nucleic Acids Res., 18, 5433) および Wincottら (1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684), Wincottら (1997, Methods Mol. Bio., 74, 59) に記載の方法にしたがい, 慣用の核酸保護基およびカップリング基, 例えば, 5' 末端にジメトキシトリチル, および 3' 末端にホスホルアミダイトを用いて行う。非限定的例においては, 小スケールの合成は, 394 Applied Biosystems, Inc. 合成機で, 改変した 0.2  $\mu$ mol スケールのプロトコルを用いて, アルキルシリル保護ヌクレオチドについては 7.5 分間のカップリング工程を, 2'-O-メチル化ヌクレオチドについては 2.5 分間のカップリング工程を行う。表 V は, 合成サイクルにおいて用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは, 0.2  $\mu$ mol スケールでの合成は, 96 ウエルプレート合成機, 例えば, Protogene (Palo Alto, CA) により製造される装置で, サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-O-メチル残基の各カップリングサイクルにおいては, ポリマー結合 5'-ヒドロキシルに対して 33 倍過剰 (60  $\mu$ L の 0.11 M = 6.6  $\mu$ mol) の 2'-O-メチルホスホルアミダイトおよび 75 倍過剰の S-エチルテトラゾール (60  $\mu$ L の 0.25 M = 15  $\mu$ mol) を用いることができる。リボ残基の各カップリングサイクルにおいては, ポリマー結合 5'-ヒドロキシルに対して 66 倍過剰 (120  $\mu$ L の 0.11 M = 13.2  $\mu$ mol) のアルキルシリル (リボ) 保護ホスホルアミダイトおよび 150 倍過剰の S-エチルテトラゾール (120  $\mu$ L の 0.25 M = 30  $\mu$ mol) を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング収率は, トリチル画分の比色定量により決定して, 典型的には 97.5 - 99% である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである: 脱トリチル化溶液は塩化メチレン中 3% TCA (ABI) であり; キャッピングは, THF 中 16% N-メチルイミダゾール (ABI) および THF 中 10% 無水酢酸 / 10% 2,6-ルチジン (ABI) 中で行い; 酸化溶液は, THF 中 16.9 mM  $I_2$ , 49 mM ピリジン, 9% 水 (PERSEPTIVE (登録商標)) である。Burdick & Jackson 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルテトラゾール溶液 (アセトニトリル中 0.25 M) は, American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは, ホスホロチオエート結合の導入のためには, ボーケージ試薬 (3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン 1, 1-ジオキシド, アセトニトリル中 0.05 M) を用いる。

## 【0207】

RNAの脱保護は、2ポットプロトコルまたは1ポットプロトコルのいずれかを用いて行う。2ポットプロトコルについては、ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4 mLのガラスねじ蓋バイアルに移し、40%水性メチルアミン(1 mL)の溶液中で65 で10分間懸濁する。-20 に冷却した後、上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を1.0 mLのEtOH:MeCN:H<sub>2</sub>O/3:1:1で3回洗浄し、ボルテックスし、次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して、白色粉末を得る。塩基脱保護オリゴリボヌクレオチドを無水TEA/HF/NMP溶液(1.5 mL N-メチルピロリジノン, 750 μL TEAおよび1.0 mL TEA・3HFの溶液300 μL, HF濃度1.4 M)に再懸濁し、65 に加熱する。1.5時間後、オリゴマーを1.5 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>で反応を停止させる。 10

## 【0208】

あるいは、1ポットプロトコルのためには、ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4 mLのガラスねじ蓋バイアルに移し、33%エタノール性メチルアミン/DMSO:1/1(0.8 mL)の溶液中で、65 で15分間懸濁する。バイアルを室温にする。TEA・3HF(0.1 mL)を加え、バイアルを65 で15分間加熱する。試料を-20 に冷却し、次に1.5 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>で反応を停止させる。

## 【0209】

トリチルオンオリゴマーの精製のためには、停止したNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液を、アセトニトリル、続いて50 mM TEAで予備洗浄したC-18含有カートリッジに負荷する。負荷したカートリッジを水で洗浄した後、RNAを0.5% TFAで13分間脱トリチル化する。次にカートリッジを水で再び洗浄し、1 M NaClで塩交換し、再び水で洗浄する。次に、30%アセトニトリルでオリゴヌクレオチドを溶出する。 20

## 【0210】

平均段階カップリング収率は、典型的には>98%である(Wincott et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684)。当業者は、合成のスケールは、上述の例より大きくまたは小さく、例えば、限定されないが、96ウエルのフォーマットに適合させることができること認識するであろう。

## 【0211】

あるいは、本発明の核酸分子は、別々に合成して、合成後に例えばライゲーションにより(Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al. 国際公開WO93/23569; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204)、または合成および/または脱保護の後にハイブリダイゼーションにより、一緒につなげてよい。 30

## 【0212】

本発明のsiNA分子はまた、本明細書の実施例1に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方のsiNA鎖を、切断可能なリンカーにより分離された単一の連続するオリゴヌクレオチドフラグメントまたは鎖として合成し、次にこれを切断して別々のsiNAフラグメントまたは鎖を生成し、これはハイブリダイズしてsiNAデュープレックスの精製を可能とする。リンカーはポリヌクレオチドリリンカーであっても非ヌクレオチドリリンカーであってもよい。本明細書に記載されるsiNAのタンデム合成は、マルチウエル/マルチプレート合成プラットフォーム、例えば96ウエルまたは同様のより大きなマルチウエルプラットフォームのいずれにも容易に適合させることができる。本明細書に記載されるsiNAのタンデム合成はまた、バッチリアクター、合成カラムなどを用いる大規模合成プラットフォームにも容易に適合させることができる。 40

## 【0213】

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

## 【0214】

本発明の核酸分子は、広範囲に修飾して、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、2'-アミノ、2'-C-アシル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-Hによる修飾により安定性を高めることができる(概説として、Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163を参照)。siNAコンストラクトは、一般的な方法を用いてゲル電気泳動により精製するか、または高速液体クロマトグラフィー(HPLC; Wincott et al., (上掲)を参照、その全体を本明細書の一部としてここに引用する)により精製し、水に再懸濁する。

10

## 【0215】

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

20

## 【0216】

本発明の核酸分子の活性の最適化

修飾(塩基、糖および/またはリン酸)を有する化学的に合成した核酸分子は、血清リポヌクレアーゼによる分解を防止ことができ、このことによりその抗力を高めることができる(例えば、Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Perrault et al., 1990 Nature 344, 565; Pieken et al., 1991 Science 253, 314; Usman and Cedergren, 1992 Trends in Biochem. Sci. 17, 334; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Rossi et al., 国際公開WO91/03162; Sproat, 米国特許5,334,711; Gold et al., US6,300,074およびBurgin et al., (上掲)を参照(これらはすべて本明細書の一部としてここに引用する)。上述の参考文献はすべて、本明細書に記載される核酸分子の塩基、リン酸および/または糖成分になしうる種々の化学修飾を記載する。細胞中におけるその抗力を増強するよう修飾し、およびオリゴヌクレオチドの合成時間を短縮し化学物質の必要性を減少するために核酸分子から塩基を除去することが望ましい。

30

## 【0217】

当該技術分野には、そのヌクレアーゼ安定性および効力を有意に増強することができる、核酸分子中に導入することができる糖、塩基およびリン酸修飾を記述するいくつかの例がある。例えば、オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、2'-アミノ、2'-C-アシル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-アシル、2'-H等のヌクレオチド塩基修飾で修飾することにより、安定性を高め、および/または生物学的活性を増強するために修飾される(総説については、Usman and Cedergren, 1992 TIBS 17, 34; Usman et al., 1994 Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163; Burgin et al., 1996 Biochemistry 35, 14090を参照)。核酸分子の糖修飾は、当該技術分野において広く記載されている(Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Perrault et al. Nature 1990, 344, 565-568; Pieken et al. Science 1991, 25

40

50

3, 314 - 317; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 1992, 17, 334 - 339; Usman et al. 国際公開WO93/15187; Sproat, 米国特許5, 334, 711, Beigelman et al., 1995 J. Biol. Chem. 270, 25702; Beigelman et al., 国際公開WO97/26270; Beigelman et al., 米国特許5, 716, 824; Usman et al., 米国特許5, 627, 053; Woolf et al., 国際公開WO98/13526; Thompson et al., 米国特許出願60/082, 404 (1998年4月20日出願); Karpeisky et al., 1998, Tetrahedron Lett., 39, 1131; Earnshaw and Gait, 1998, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences), 48, 39 - 55; Verma and Eckstein, 1998, Annu. Rev. Biochem., 67, 99 - 134; および Burlina et al., 1997, Bioorg. Med. Chem., 5, 1999 - 2010を参照, これらの参考文献はすべて, その全体を本明細書の一部としてここに引用する)。これらの刊行物は, 触媒活性を変更することなく, 糖, 塩基および/またはリン酸修飾等を核酸分子中に組み込む位置を決定する一般的方法および戦略を記載しており, 本明細書の一部としてここに引用する。このような教示の観点から, siNAが細胞においてRNAiを促進する能力が有意に阻害されない限り, 本明細書に記載されるように, 同様の修飾を用いて本発明のsiNA核酸分子を修飾することができる。

#### 【0218】

ホスホロチオエート, ホスホロジチオエート, および/または5'-メチルホスホネート結合によるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合の化学修飾は安定性を改良するが, 過剰な修飾はある種の毒性または活性の低下を引き起こしうる。したがって, 核酸分子を設計する場合, これらのヌクレオチド間結合の量は最小にすべきである。これらの結合の濃度を減少させると, 毒性が低下し, これらの分子の効力が増加し特異性が高くなるはずである。

#### 【0219】

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

#### 【0220】

1つの態様においては, 本発明の核酸分子は, 1またはそれ以上(例えば, 約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)のGクランプヌクレオチドを含む。Gクランプヌクレオチドは, 修飾シトシン類似体であり, ここで, 修飾は, デュープレックス中の相補的グアニンのワトソン・クリックおよびフーグスティーン面の両方の水素結合の能力を与える。例えば, Lin and Matteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc., 120, 8531 - 8532を参照。オリゴヌクレオチド中の単一のGクランプ類似体置換により, 相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたときのらせん熱安定性およびミスマッチ識別性を実質的に増強することができる。そのようなヌクレオチドを本発明の核酸分子中に取り込ませることにより, 核酸標的の相補的配列

またはテンプレート鎖に対する親和性および特異性の両方が増強される。別の態様においては、本発明の核酸分子は1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）のLNA"ロック核酸"ヌクレオチド、例えば、2', 4'-Cメチレンビスクロヌクレオチドを含む（例えば、Wengel et al., 国際公開WO00/66604およびWO99/14226を参照）。

#### 【0221】

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

#### 【0222】

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

#### 【0223】

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

#### 【0224】

本明細書において用いる場合、"生物学的に活性な分子"との用語は、システムにおいて生物学的応答を導き出すかまたは調節することができる化合物または分子を表す。本発明により単独または他の分子との組み合わせで企図される生物学的に活性なsiNA分子の非限定的例としては、治療上活性な分子、例えば、抗体、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、蛋白質、化学療法剤、小分子、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素的核酸、アンチセンス核酸、トリプレックス形成オリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチド，2，5-Aキメラ，s i N A，d s R N A，アロザイム，アプタマー，デコイおよびこれらの類似体が含まれる。本発明の生物学的に活性な分子には，他の生物学的に活性な分子の薬物動態学および/または薬力学を調節することができる分子，例えば，脂質およびポリマー，例えば，ポリアミン，ポリアミド，ポリエチレングリコールおよび他のポリエーテルも含まれる。

【0225】

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

10

【0226】

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

【0227】

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

20

【0228】

本発明の核酸系分子の使用は，組み合わせ療法の可能性を提供することにより，疾病の進行のよりよい治療につながるであろう（例えば，異なる遺伝子を標的とする多数のs i N A分子，既知の小分子阻害剤とカップリングさせた核酸分子，または分子（異なる酵素的核酸分子モチーフを含む）および/または他の化学的または生物学的分子の組み合わせによる間欠的治療）。s i N A分子を用いる被験者の治療にはまた，異なる種類の核酸分子，例えば，酵素的核酸分子（リボザイム），アロザイム，アンチセンス，2，5-Aオリゴアデニレート，デコイ，およびアプタマーの組み合わせが含まれる。

30

【0229】

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

【0230】

"キャップ構造"とは，オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれている化学的修飾を意味する（例えば，A d a m i c e t a l .，米国特許5，998，203（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。これらの末端修飾は，核酸分子をエキソヌクレアーゼ分解から保護し，デリバリーおよび/または細胞中の局在化を助けるであろう。キャップは5'末端（5'-キャップ）に存在してもよく，または3'末端（3'-キャップ）に存在してもよく，両方の末端に存在してもよい。非限定的例においては，5'-キャップは，グリセリル，反転デオキシ無塩基残基（成分）；4'，5'-メチレンヌクレオチド；1-（ベータ-D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド，4'-チオヌクレオチド；炭素環式ヌクレオチド；1，5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート結合；スレオ-ペントフラノシルヌクレオチド；非環状3'，4'-セコヌクレオチド；非環状3，4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；非環状3，5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド，3'-3'-反転ヌクレオチド成分；3'-3'-反転無塩基成分；3'-2'-反転ヌクレオチド成分；3'-2'-反転無塩基成分；1，4-ブタンジオールリン酸；3'-ホスホルアミデート；ヘキシルリン酸；アミノヘキシルリン酸；3'-

40

50

リン酸；3'-ホスホロチオエート；ホスホロジチオエート；または架橋または非架橋メチルホスホネート成分からなる群より選択される。

【0231】

非限定的例においては，3'-キャップは，例えば，グリセリル，反転デオキシ無塩基残基（成分），4'，5'-メチレンヌクレオチド；1-（ベータ-D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド；4'-チオヌクレオチド，炭素環式ヌクレオチド；5'-アミノアルキルリン酸；1，3-ジアミノ-2-プロピルリン酸；3-アミノプロピルリン酸；6-アミノヘキシルリン酸；1，2-アミノドデシルリン酸；ヒドロキシプロピルリン酸；1，5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート；スレオペンタフラノシルヌクレオチド；非環状3'，4'セコヌクレオチド；3，4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；3，5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド，5'-5'-反転ヌクレオチド成分；5'-5'-反転無塩基成分；5'-ホスホルアミデート；5'-ホスホロチオエート；1，4-ブタンジオールリン酸；5'-アミノ；架橋および/または非架橋5'-ホスホルアミデート，ホスホロチオエートおよび/またはホスホロジチオエート，架橋または非架橋メチルホスホネートおよび5'-メルカプト成分からなる群より選択される（より詳細には，Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。

【0232】

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

【0233】

"アルキル"基とは，飽和脂肪族炭化水素を表し，直鎖，分枝鎖，および環状アルキル基が含まれる。好ましくは，アルキル基は1-12個の炭素を有する。より好ましくは，これは1-7個の炭素，より好ましくは1-4個の炭素を有する低級アルキルである。アルキルは置換されていてもされていなくてもよい。置換されている場合，置換基は，好ましくは，ヒドロキシル，シアノ，アルコキシ，=O，=S，NO<sub>2</sub>またはN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>，アミノ，またはSHである。この用語は，また，少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む不飽和炭化水素基であるアルケニル基を含み，直鎖，分枝鎖，および環状基を含む。好ましくは，アルケニル基は1-12個の炭素を有する。より好ましくは，これは1-7個の炭素原子，より好ましくは1-4個の炭素原子の低級アルケニルである。アルケニル基は置換されていてもされていなくてもよい。置換されている場合，置換基は，好ましくは，ヒドロキシル，シアノ，アルコキシ，=O，=S，NO<sub>2</sub>，ハロゲン，N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>，アミノ，またはSHから選択される。"アルキル"との用語はまた，少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む不飽和の炭化水素基を有するアルキニル基を含み，直鎖，分枝鎖，および環状基を含む。好ましくは，アルキニル基は1-12個の炭素を有する。より好ましくは，これは1-7個の炭素，より好ましくは1-4個の炭素を有する低級アルキニルである。アルキニル基は，置換されていてもされていなくてもよい。置換されている場合，置換基は，好ましくは，ヒドロキシル，シアノ，アルコキシ，=O，=S，NO<sub>2</sub>またはN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>，アミノまたはSHである。

【0234】

そのようなアルキル基はまた，アリール，アルキルアリール，炭素環式アリール，複素環アリール，アミドおよびエステル基を含むことができる。"アリール"基とは，共役したパイ電子系を有する少なくとも1つの環を有する芳香族基を表し，炭素環式アリール，複素環アリールおよび二アリール基が含まれる。これらはすべて任意に置換されていてもよい。アリール基の好ましい置換基は，ハロゲン，トリハロメチル，ヒドロキシル，SH，

10

20

30

40

50

OH, シアノ, アルコキシ, アルキル, アルケニル, アルキニル, およびアミノ基である。"アルキルアリール"基は, アリール基(上述)に共有結合したアルキル基(上述)を表す。炭素環式アリール基は, 芳香族環の環原子がすべて炭素原子である基である。炭素原子は任意に置換されていてもよい。複素環アリール基は, 芳香族環中の環原子として1-3個の複素原子を有し, 環原子の残りが炭素原子である基である。適当な複素原子には, 酸素, イオウ, および窒素が含まれ, 例えば, フラニル, チエニル, ピリジル, ピロリル, N-低級アルキルピロロ, ピリミジル, ピラジニル, イミダゾリル等が挙げられる。これらはすべて任意に置換されていてもよい。"アミド"とは,  $-C(O)-NH-R$  (式中, Rはアルキル, アリール, アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。"エステル"とは,  $-C(O)-OR'$  (式中, Rはアルキル, アリール, アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。

#### 【0235】

本明細書において用いる場合, "ヌクレオチド"は, 当該技術分野においては, 天然塩基(標準的), および当該技術分野においてよく知られる修飾塩基を含むと認識されている。そのような塩基は, 一般にヌクレオチド糖成分の1'位に位置する。ヌクレオチドは一般に, 塩基, 糖およびリン酸基を含む。ヌクレオチドは, 糖, リン酸および/または塩基成分において修飾されていてもされていなくてもよい(互換的に, ヌクレオチド類似体, 修飾ヌクレオチド, 非天然ヌクレオチド, 非標準的ヌクレオチド等とも称される。例えば, Usman and McSwiggen (上掲); Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Uhlman & Peyman, (上掲)(すべて本明細書の一部としてここに引用する)を参照)。当該技術分野において知られる修飾核酸塩基のいくつかの例があり, Limbach et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183にまとめられている。核酸中に導入することができる塩基修飾のいくつかの非限定的例としては, 例えば, イノシン, プリン, ピリジン-4-オン, ピリジン-2-オン, フェニル, シュードウラシル, 2, 4, 6-トリメトキシベンゼン, 3-メチルウラシル, ジヒドロウリジン, ナフチル, アミノフェニル, 5-アルキルシチジン(例えば5-メチルシチジン), 5-アルキルウリジン(例えばリボチミジン), 5-ハロウリジン(例えば5-プロモウリジン)または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン(例えば6-メチルウリジン), プロピンおよびその他のものが挙げられる(Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, 上掲)。この観点において, "修飾塩基"とは, 1'位におけるアデニン, グアニン, シトシンおよびウラシル以外のヌクレオチド塩基またはそれらの同等物を意味する。

#### 【0236】

1つの態様においては, 本発明はリン酸骨格修飾を有する修飾されたsiNA分子を特徴とし, これは1またはそれ以上のホスホロチオエート, ホスホロジチオエート, メチルホスホネート, ホスホトリエステル, モルホリノ, アミデート, カルバメート, カルボキシメチル, アセトアミデート, ポリアミド, スルホネート, スルホンアミド, スルファミート, ホルムアセタール, チオホルムアセタール, および/またはアルキルシリル置換を含む。オリゴヌクレオチド骨格修飾の概説については, Hunziker and Lemmann, 1995, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, Modern Synthetic Methods, VCH, 331-417, および Mesmaeker et al., 1994, Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, 24-39を参照されたい。

#### 【0237】

"無塩基"とは, 1'位において塩基を欠失しているか, または塩基の代わりに他の化学基を有する糖成分を意味する(例えば, Adamic et al., 米国特許5, 99

8, 203を参照)。

【0238】

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

【0239】

"修飾ヌクレオシド"とは、非修飾ヌクレオチドの塩基、糖および/またはリン酸の化学構造中に修飾を含む任意のヌクレオチド塩基を意味する。修飾ヌクレオチドの非限定的例は式I-VIIに示されるか、および/または本明細書に記載される他の修飾である。

【0240】

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

【0241】

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

【0242】

核酸分子の投与

本発明のsiNA分子は、単独で、または他の療法と組み合わせて、癌、例えば、限定されないが、卵巣癌、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、非小細胞肺癌、前立腺癌、例えば、悪性血液疾患、例えばリンパ腫(例えば、非ホジキンおよびホジキンリンパ腫、およびマンツル細胞リンパ腫)白血病(例えば、慢性骨髄性白血病、CML;急性骨髄性白血病、AML;続発性白血病、急性リンパ芽球性白血病、ALL;慢性リンパ性白血病;CLL)、真性赤血球増加症、特発性骨髄線維症、本態性血小板血症、脊髄形成異常症候群、自己免疫疾病(例えば、多発性硬化症、狼瘡、慢性関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、脳炎、ラスムッセン脳炎、甲状腺炎、クローン病、繊維性筋痛、グレーヴズ病、ギャンバレー症候群、慢性疲労症候群、自己免疫肝炎、メニエール病、重症筋無力症、心筋症、多発性筋痛、乾癬、潰瘍性大腸炎等)、ウイルス感染(例えば、HIV、HCV、HBV、RSV、CMV、HSV、インフルエンザ、ライノウイルス等、および細胞または組織におけるBCL2のレベルに関連する他の任意の疾病または健康状態の治療に用いるために適合させることができる。例えば、siNA分子は、被験者に投与するためのリポソーム等のデリバリーベヒクル、担体および希釈剤、およびそれらの塩を含むことができ、および/または薬学的に許容しうる処方中に存在することができる。核酸分子のデリバリーの方法は、Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Maurer et al., 1999, Mol. Membr. Biol., 16, 129-140; Hofland and Huang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137, 165-192; および Lee et al., 2000, ACS Symp. Ser., 752, 184-192(いずれも本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。Beigelman et al., 米国特許6,395,713およびSullivan et al., PCT WO94/02595は、さらに、核酸分子をデリバリーするための一般的な方法を記載する。これらのプロトコルを用いて、事実上いかなる核酸分子もデリバリーすることができる。核酸分子は当業者に知られる種々の方法によって細胞に投与ことができ、これには、限定されないが、リポソームへの封入、イオントホレシス、または他のベヒクル、例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン(例えば、Gonzalez et al., 1999, B

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

#### 【0243】

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

#### 【0244】

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

#### 【0245】

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

#### 【0246】

"全身投与"とは, インビボでの全身吸収, または血流中における薬剤の蓄積の後に全身に分配されることを意味する。全身的吸収をもたらす投与経路には, 限定されないが, 静脈内, 皮下, 腹腔内, 吸入, 経口, 肺内および筋肉内が含まれる。これらの投与経路のそれぞれは, 本発明のsiNA分子をアクセス可能な疾患組織に暴露する。薬剤が循環中に入る速度は, 分子量またはサイズの間数であることが示されている。本発明の化合物を含むリポソームまたは他の薬剤担体を使用することにより, 薬剤を, 例えば, あるタイプの組織(例えば網状内皮系(RES)の組織)に局在化させることが可能である。薬剤と細胞(例えば白血球およびマクロファージ)の表面との会合を容易にすることができるリポソーム処方もまた有用である。この方法は, マクロファージおよび白血球による異常な細胞(例えば過剰のBCL2を産生する細胞)の免疫認識の特異性を利用することにより, 薬剤の標的細胞への輸送を増強するであろう。

#### 【0247】

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

の薬剤の侵入を促進することができるP-糖蛋白質阻害剤(Pluronic P85等)(Jolliet-Riant and Tillement, 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 16-26); 大脳内移植後の徐放輸送用の生分解性ポリマー, 例えばポリ(DL-ラクチド-co-グリコリド)微小球(Emerich, DF et al, 1999, *Cell Transplant*, 8, 47-58)(Alkermes, Inc. Cambridge, MA); および薬剤を脳血管関門を越えて輸送することができ, 神経の取り込みメカニズムを変更しうる, 例えばポリブチルシアノアクリレートから作成される充填されたナノ粒子(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999)。本発明の核酸分子のデリバリー戦略の他の非限定的例には, Boado et al., 1998, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1308-1315; Tyler et al., 1999, *FEBS Lett.*, 421, 280-284; Pardridge et al., 1995, *PNAS USA.*, 92, 5592-5596; Boado, 1995, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 15, 73-107; Aldrian-Herrada et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4910-4916; およびTyler et al., 1999, *PNAS USA.*, 96, 7053-7058に記載される物質が含まれる。

#### 【0248】

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

#### 【0249】

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

#### 【0250】

10

20

30

40

50

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

#### 【0251】

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

#### 【0252】

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

#### 【0253】

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

#### 【0254】

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

10

20

30

40

50

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

【0255】

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

【0256】

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

【0257】

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

【0258】

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

【0259】

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

【0260】

本発明の核酸分子は，滅菌媒体中で非経口的に投与することができる。薬剤は，使用するベヒクルおよび濃度に応じて，ベヒクル中に懸濁されていてもよく，溶解されていてもよい。アジュバント，例えば局所麻酔剤，保存剤および緩衝剤をベヒクル中に溶解することも有利である。

【0261】

上述した健康状態の治療には，体重1キログラムあたり1日あたり約0.1mg - 約140mgのオーダーの投与量レベルが有用である（被験者あたり1日あたり約0.5mg

10

20

30

40

50

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

#### 【0262】

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

#### 【0263】

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

#### 【0264】

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

#### 【0265】

1 つの態様においては、本発明は、特定の細胞タイプに本発明の核酸分子を投与するのに適した組成物を含む。例えば、アシアロ糖蛋白質レセプター (ASGPR) (Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262, 4429 - 4432) は、肝細胞に独特であり、分枝鎖ガラクトース末端糖蛋白質、例えばアシアロオロソムコイド (ASOR) に結合する。別の例においては、多くの癌細胞中で葉酸レセプターが過剰発現されている。そのような糖蛋白質、合成グリココンジュゲート、または葉酸のレセプターへの結合は、オリゴサッカライド鎖の分枝の程度に強く依存する親和性で生ずる。例えば、三触角構造は、二触角または一触角鎖より高い親和性で結合する (Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611 - 620; Connolly et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 939 - 945)。Lee and Lee (1987, Glycoconjugate J., 4, 317 - 328) は、ガラクトースと比較してレセプターに対してより高い親和性を有する N - アセチル - D - ガラクトースアミンを炭水化物成分として用いることによりこの高い特異性を得た。この "クラスターリング効果" はまた、マンノシル末端糖蛋白質またはグリココンジュゲートの結合および取込についても記載されている (Ponpipom et al., 1981, J. Med. Client., 24, 1388 - 1395)。ガラクトース、ガラクトースアミンまたは葉酸に基づくコンジュゲートを使用して外来性化合物を細胞膜を超えて輸送することにより、例えば、肝疾患、肝臓の癌、または他の癌の治療に標的化デリバリー法を提供することができる。また、バイオコンジュゲートの使用により、治療に必要な治療用化合物の必要用量を低下させることができる。さらに、本発明の核酸バイオコンジュゲートを使用することにより、治療薬の生物利用性、薬力学、および薬物動態学的パラメータを調節することができる。そのようなバイオコンジュゲートの非限定的例は、Vargeese et al., 米国特許出願 10 / 201, 394, (2001 年 8 月 13 日出願); および Matulic - Adamic et al., 米国特許出願 60 / 362, 016 (2002 年 3 月 6 日出願) に記載されている。

#### 【0266】

あるいは、本発明のある種の siNA 分子は、細胞中で真核生物プロモーターから発現させることができる (例えば、Izant and Weintraub, 1985 Science 229, 345; McGarry and Lindquist, 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 399; Scanlon et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591 - 5; Kashani - Sabet et al., 1992 Antise

10

20

30

40

50

nse Res. Dev., 2, 3-15; Dropulich et al., 1992 J. Virol 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991 J. Virol, 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10802-6; Chen et al., 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarver et al., 1990 Science 247, 1222-1225; Thompson et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2259; Good et al., 1997, Gene Therapy, 4, 45)。当業者は、真核生物細胞中で任意の核酸を適当なDNA/RNAベクターから発現させることができることを認識するであろう。そのような核酸の活性は、酵素的核酸によりそれらを一次転写産物から放出させることにより増大させることができる(Draper et al., PCT WO93/23569, Sullivan et al., PCT WO94/02595; Ohkawa et al., 1992 Nucleic Acids Symp. Ser., 27, 15-6; Taira et al., 1991, Nucleic Acids Res., 19, 5125-30; Ventura et al., 1993 Nucleic Acids Res., 21, 3249-55; Chowrira et al., 1994 J. Biol. Chem. 269, 25856)。

#### 【0267】

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

#### 【0268】

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

#### 【0269】

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

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

【0270】

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

【0271】

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

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

【 0 2 7 2 】

別の態様においては , 発現ベクターは , a ) 転写開始領域 ; b ) 転写終止領域 ; c ) オープンリーディングフレーム ; および d ) s i N A 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み , この配列は , オープンリーディングフレームの 3 ' - 末端に動作可能なように連結されており , 配列は , s i N A 分子の発現および / またはデリバリーを可能とする様式で , 開始領域 , オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されている。さらに別の態様においては , 発現ベクターは , a ) 転写開始領域 ; b ) 転写終止領域 ; c ) イントロン ; および d ) 少なくとも 1 つの s i N A 分子をコードする核酸配列を含み ; この配列は , 核酸分子の発現および / またはデリバリーを可能とする様式で , 開始領域 , イントロンおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

10

【 0 2 7 3 】

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

20

【 0 2 7 4 】

B C L 2 の生物学および生化学

B C L 2 ファミリーは , プロアポトーシス性およびアンチアポトーシス性のメンバーの両方を含む。アポトーシス性アンタゴニストには , B C L 2 , B c l - X L , M c l - 1 および A 1 が含まれ , 一方 , B a x , B a k , B a d , B c l - X s B c l - X - ベータ および B i k はプロアポトーシス性のメンバーである。B C L 2 ファミリーのメンバーは , B C L 2 相同ドメインとして知られる 4 つの保存モチーフ ( B H 1 から B H 4 ) の少なくとも 1 つを有することができる。これらの蛋白質は , 膜結合性であると考えられており , これらがホモダイマー形成およびヘテロダイマー形成の両方を行うことができることにより , アポトーシスが制御されると提唱されている。

30

【 0 2 7 5 】

B C L 2 遺伝子は , 第 1 8 染色体の B C L 2 座と第 1 4 染色体のイムノグロブリン重鎖座との間の t ( 1 4 ; 1 8 ) ( q 3 2 ; q 2 1 ) 染色体再配列のため , 濾胞性リンパ腫の約 8 5 % およびびまん性リンパ腫の約 2 0 % で異常に発現されている ( Y u n i s e t a l . , 3 1 6 N . E n g l . J . M e d . 7 9 , 1 9 8 7 ) 。 この染色体再配列は , ヒトのリンパ性悪性疾患において最も一般的に見いだされる。B C L 2 / I g H 融合メッセージが発現される。しかし , 主要なブレークポイント領域は B C L 2 転写産物の 3 ' 非翻訳領域中に存在するため , B C L 2 蛋白質のコーディング領域は中断されない ( C l e a r y e t a l . , 4 7 C e l l 1 9 , 1 9 8 6 ) 。 B C L 2 遺伝子は , 細胞老化を阻害するミトコンドリア蛋白質をコードする点において新しい形のプロトオンコジンであり ( H o c k e n b e r y e t a l . , 3 4 8 N a t u r e 3 3 4 , 1 9 9 0 ) , この遺伝子でトランスフェクションした B 細胞の生存を延長する ( N u n e z e t a l . , 8 6 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 4 5 8 9 , 1 9 8 9 ) 。 さらに , B C L 2 の過剰発現は常に t ( 1 4 ; 1 8 ) により引き起こされるわけではない。これは , B C L 2 の再配列を有しないリンパ腫においてもしばしば検出されるためである。最近の研究により , B C L 2 の発現の増加はびまん性大 B - 細胞リンパ腫における B C L 2 遺伝子の増幅からも生じうることが示された。同様に , オープンリーディングフレームの変異は , B C L 2 と他の蛋白質との相互作用に影響を及ぼすことにより B C L 2 の発現の増加を引き起こすかもしれないことが推測されている。B C L 2 の過剰発現は , いくつかの癌 , 例えば , 卵巣癌 , 悪性黒色腫 , 多発性骨髄腫 , 非小細胞肺癌 , 前立腺癌 , 例えば , 悪性血液疾患 , 例えばリンパ腫 ( 例えば , 非ホジキンおよびホジキンリン

40

50

パ腫，およびマントル細胞リンパ腫)，白血病（例えば，慢性骨髄性白血病，CML；急性骨髄性白血病，AML；続発性白血病，急性リンパ芽球性白血病，ALL；慢性リンパ性白血病；CLL），真性赤血球増加症，特発性骨髄線維症，本態性血小板血症，および脊髄形成異常症候群における関与が示唆されている。

【0276】

選択的スプライシングおよびプロモーター利用により異なる少なくとも3つの異なる形のBCL2 mRNAが前B細胞およびT細胞において認められている。2つの異なる蛋白質，すなわち21kDおよび26kDのペプチドが産生され，これらはカルボキシ末端において異なる。いずれの形も遺伝子のエクソン2によりコードされる同一のN末端を有する。したがって，この領域および他の領域は，siRNA媒介性RNA干渉に適切な標的を与えるであろう。

10

【0277】

BCL2を標的とする小干渉核酸分子の使用は，癌またはBCL2遺伝子の調節に応答する他の任意の疾病または健康状態の診断および治療において用いることができる一群の新規な治療薬を提供する。

【実施例1】

【0278】

以下は本発明の核酸の選択，単離，合成および活性を示す非限定的例である。

【0279】

実施例1：siNAコンストラクトのタンデム合成

20

本発明の例示的siNA分子は，切断可能なリンカー，例えば，スクシニル系リンカーを用いて，タンデムで合成する。本明細書に記載されるタンデム合成の後に，1段階精製プロセスを行って，RNAi分子を高収率で得る。この方法はハイスループットRNAiスクリーニングを支えるsiNA合成に非常に適しており，マルチカラムまたはマルチウエルの合成プラットフォームに容易に適合させることができる。

【0280】

5'末端ジメトキシトリチル(5'-O-DMT)基がそのまま残るsiNAオリゴおよびその相補鎖のタンデム合成(トリチルオン合成)が完了した後，オリゴヌクレオチドを上述のようにして脱保護する。脱保護の後，siNA配列鎖を自発的にハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーションにより，一方の鎖が5'-O-DMT基を保持し，相補鎖が末端5'-ヒドロキシルを含むデュプレックスが得られる。新たに形成されたデュプレックスは，1つの分子のみがジメトキシトリチル基を有するにもかかわらず，日常的な固相抽出精製(トリチルオン精製)の間，単一の分子として振る舞う。これらの鎖は安定なデュプレックスを形成するため，オリゴの対を例えばC18カートリッジを用いて精製するためには，このジメトキシトリチル基(または同等の基，例えば他のトリチル基または他の疎水性成分)のみが必要である。

30

【0281】

タンデムリンカー，例えば反転デオキシ無塩基スクシネートまたはグリセリルスクシネートリンカー(図1を参照)または同等の切断可能なリンカーを導入する時点までは，標準的なホスホルアミダイト合成化学を用いる。用いることができるリンカー結合条件の非限定的例には，活性化剤，例えばプロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸(PyBrOP)の存在下で，妨害塩基，例えばジソプロピルエチルアミン(DIPEA)および/またはDMAEを使用することが含まれる。リンカーを結合させた後，標準的な合成化学を用いて第2の配列の合成を完了し，末端の5'-O-DMTはそのまま残す。合成後，得られたオリゴヌクレオチドを本明細書に記載される方法にしたがって脱保護し，適当な緩衝液，例えば，50mM NaOAcまたは1.5M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で反応を停止させる。

40

【0282】

siNAデュプレックスの精製は，固相抽出，例えば，1カラム容量(CV)のアセトニトリル，2CVのH<sub>2</sub>O，および2CVの50mM NaOAcで調整したWater

50

rs C18 Sep Pak lgカートリッジを用いて、容易に行うことができる。サンプルを負荷し、1 CVのH<sub>2</sub>Oまたは50 mM NaOAcで洗浄する。失敗配列は1 CVの14% ACN（水性；50 mM NaOAcおよび50 mM NaClを含む）で溶出する。次にカラムを1 CVのH<sub>2</sub>O等で洗浄し、例えば、1 CVの1%水性トリフルオロ酢酸（TFA）をカラムに通し、次にさらに1 CVの1%水性TFAをカラムに加えて約10分間放置することにより、カラム上で脱トリチル化を行う。残りのTFA溶液を除去し、カラムをH<sub>2</sub>Oで、次に1 CVの1 M NaClおよび再度のH<sub>2</sub>Oで洗浄する。次に、siNAデュープレックス生成物を、例えば、1 CVの20%水性CANを用いて溶出する。

#### 【0283】

図2は、精製したsiNAコンストラクトのMALDI-TOF質量分析の例を示し、ここで、各ピークはsiNAデュープレックスの個々のsiNA鎖の計算質量に対応する。同じ精製siNAは、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）で分析したときに3つのピークを与える。1つのピークはおそらくデュープレックスsiNAに対応し、2つのピークはおそらく個々のsiNA配列鎖に対応する。同じsiNAコンストラクトのイオン交換HPLC分析では単一のピークしか示されない。以下に記載されるルシフェラーゼレポーターアッセイを用いる精製siNAコンストラクトの試験は、別々に合成したオリゴヌクレオチド配列鎖から生成したsiNAコンストラクトと比較して、RNAi活性が同じであることを示した。

#### 【0284】

##### 実施例2：任意のRNA配列中の潜在的siNA標的部位の同定

目的とするRNA標的、例えばウイルスまたはヒトmRNA転写産物の配列を、例えばコンピュータフォールディングアルゴリズムを用いることにより、標的部位についてスクリーニングする。非限定的例においては、Genbank等のデータベースから得られる遺伝子またはRNA遺伝子転写産物の配列を用いて、標的に対して相補性を有するsiNA標的を生成する。そのような配列は、データベースから得ることができるか、または当該技術分野において知られるように実験的に決定することができる。既知の標的部位、例えば、リボザイムまたはアンチセンス等の他の核酸分子を用いた研究に基づいて有効な標的部位であると決定されている標的部位、または疾病または健康状態と関連していることが知られている標的、例えば変異または欠失を含む部位を用いて、これらの部位を標的とするsiNA分子を設計することができる。種々のパラメータを用いて、標的RNA配列中でいずれの部位が最も適当な標的部位であるかを判定することができる。これらのパラメータには、限定されないが、二次または三次RNA構造、標的配列のヌクレオチド塩基組成、標的配列の種々の領域間のホモロジーの程度、またはRNA転写産物中の標的配列の相対的位置が含まれる。これらの判定に基づいて、RNA転写産物中の任意の数の標的部位を選択して、例えば、インビトロRNA切断アッセイ、培養細胞、または動物モデルを用いることにより、効力についてsiNA分子をスクリーニングすることができる。非限定的例においては、用いるべきsiNAコンストラクトのサイズに基づいて、転写産物中のいずれかの位置の1-1000個の標的部位を選択する。当該技術分野において知られる方法、例えば標的遺伝子発現の有効な減少を判定するマルチウエルまたはマルチプレートアッセイを用いて、siNA分子をスクリーニングするためのハイスループットスクリーニングアッセイを開発することができる。

#### 【0285】

##### 実施例3：RNA中のsiNA分子標的部位の選択

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

#### 【0286】

1. 標的配列をインシリコで解析して、標的配列中に含まれる特定の長さのすべてのフラグメントまたはサブ配列、例えば23ヌクレオチドフラグメントのリストを作成する。この工程は、典型的にはあつらえのPerlスクリプトを用いて行うが、市販の配列分析

10

20

30

40

50

プログラム, 例えば, O l i g o , M a c V e c t o r , または t h e G C G W i s c o n s i n P a c k a g e も同様に用いることができる。

【0287】

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

10

【0288】

3. 場合によっては, s i N A のサブ配列は, 1 またはそれ以上の配列中には存在しないが, 所望の標的配列中に存在する。これは, s i N A が標的とされないままでいるべきパラログファミリーのメンバーを有する遺伝子を標的とする場合に生じうる。上述のケース 2 におけるように, それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し, 次にリストを比較して, 標的遺伝子中に存在するが標的ではないパラログ中には存在しない配列を見いだす。

20

【0289】

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

【0290】

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

【0291】

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

30

【0292】

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

40

【0293】

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

50

## 【0294】

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

## 【0295】

別の方法においては、BCL2標的配列に特異的なsiNAコンストラクトのプールを用いて、BCL2 RNAを発現する細胞、例えば、T24、NHDF、HEK、HuVEC、3t3-L1、またはA549細胞において標的部位をスクリーニングする。この方法において用いられる一般的戦略は図9に示される。そのようなプールの非限定的例は、配列番号1-414、829-836、841-844および849-852を含むセンス配列、およびそれぞれ配列番号415-828、837-840、845-848および853-856を含むアンチセンス配列を有する配列を含むプールである。BCL2を発現する細胞（例えばA549）をsiNAコンストラクトのプールでトランスフェクトし、BCL2の阻害に伴う表現型を示す細胞を分類する。siNAコンストラクトのプールは、適当なベクター中に挿入した転写カセットから発現させることができる（例えば、図7および図8を参照）。ポジティブの表現型変化（例えば、増殖の低下、BCL2 mRNAレベルの低下またはBCL2蛋白質発現の低下）を示す細胞からのsiNAをシークエンスして、標的BCL2 RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。

10

## 【0296】

## 実施例4：BCL2を標的とするsiNAの設計

20

siNAの標的部位は、実施例3に記載されるsiNA分子のライブラリを用いて、あるいは本明細書の実施例6に記載されるようなインビトロsiNAシステムを用いて、BCL2 RNA標的の配列を分析し、任意にフォールディング（siNAの標的へのアクセス可能性を判定するために分析される任意の所与の配列の構造）に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、選択した。siNA分子は、それぞれの標的に結合することができるように設計し、任意に個々にコンピュータフォールディングにより分析して、siNA分子が標的配列と相互作用しうるか否かを評価した。種々の長さのsiNA分子を選択して、活性を最適化することができる。一般に、標的RNAと結合するかさもなければこれと相互作用する十分な数の相補的ヌクレオチド塩基が選択されるが、種々の長さまたは塩基組成のsiNAデュプレックスに適應させるように、相補性の程度を調節

30

## 【0297】

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

40

## 【0298】

50

### 実施例 5 : s i N A の化学合成および精製

s i N A 分子は、R N A メッセージ中の種々の部位、例えば、本明細書に記載される R N A 配列中の標的配列と相互作用するよう設計することができる。s i N A 分子の一方の鎖の配列は、上述した標的配列に相補的である。s i N A 分子は、本明細書に記載される方法を用いて化学的に合成することができる。対照配列として用いられる不活性 s i N A 分子は、s i N A 分子の配列を標的配列に相補的ではないようにスクランブル化することにより、合成することができる。一般に、s i N A コンストラクトは、本明細書に記載されるように、固相オリゴヌクレオチド合成方法を用いて合成することができる（例えば、U s m a n e t a l . , 米国特許 5 , 8 0 4 , 6 8 3 ; 5 , 8 3 1 , 0 7 1 ; 5 , 9 9 8 , 2 0 3 ; 6 , 1 1 7 , 6 5 7 ; 6 , 3 5 3 , 0 9 8 ; 6 , 3 6 2 , 3 2 3 ; 6 , 4 3 7 , 1 1 7 ; 6 , 4 6 9 , 1 5 8 ; S c a r i n g e e t a l . , 米国特許 6 , 1 1 1 , 0 8 6 ; 6 , 0 0 8 , 4 0 0 ; 6 , 1 1 1 , 0 8 6 を参照（いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する））。

10

#### 【 0 2 9 9 】

非限定的例においては、R N A オリゴヌクレオチドは、当該技術分野において知られるように、ホスホルアミダイト化学を用いて段階的様式で合成する。標準的なホスホルアミダイト化学においては、5' - O - ジメトキシトリチル、2' - O - tert - ブチルジメチルシリル、3' - O - 2 - シアノエチル N , N - ジイソプロピルホスホルアミダイト基、および環外アミン保護基（例えば、N 6 - ベンゾイルアデノシン、N 4 - アセチルシチジン、および N 2 - イソブチリルグアノシン）のいずれかを含むヌクレオチドを使用する。あるいは、S c a r i n g e（上掲）により記載されるように、R N A の合成において 2' - O - シリルエーテルを酸不安定性 2' - O - オルトエステル保護基と組み合わせて用いてもよい。異なる 2' 化学は異なる保護基を必要とし、例えば、U s m a n e t a l . , 米国特許 5 , 6 3 1 , 3 6 0（その全体を本明細書の一部としてここに引用する）に記載されるように、2' - デオキシ - 2' - アミノヌクレオチドには N - フタロイル保護を用いることができる。

20

#### 【 0 3 0 0 】

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

30

#### 【 0 3 0 1 】

合成条件を改変して、例えば、合成すべき s i N A の特定の化学組成に応じて、異なるカップリング時間、異なる試薬 / ホスホルアミダイト濃度、異なる接触時間、異なる固体支持体および固体支持体リンカー化学を用いることにより、カップリング効率を最適化することができる。s i N A の脱保護および精製は、一般に記載されているようにして行うことができる（S c a r i n g e（上掲）、U s m a n e t a l . , 米国特許 5 , 8 3 1 , 0 7 1 , 米国特許 6 , 3 5 3 , 0 9 8 , 米国特許 6 , 4 3 7 , 1 1 7 , および B e l l o n e t a l . , 米国特許 6 , 0 5 4 , 5 7 6 , 米国特許 6 , 1 6 2 , 9 0 9 , 米国特許 6 , 3 0 3 , 7 7 3（その全体を本明細書の一部としてここに引用する））。さらに、脱保護条件を改変して、可能な限り最高の収量および純度の s i N A コンストラクトを得る。例えば、本出願人は、2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは不適切な脱保護条件下で分解しうることを見いだした。そのようなオ

40

50

リボヌクレオチドは、水性メチルアミンを用いて約35℃で30分間脱保護する。2'-デオキシ-2'-フルオロ含有オリゴヌクレオチドがリボヌクレオチドをも含む場合には、水性メチルアミンで約35℃で30分間脱保護した後、TEA-HFを加え、反応液をさらに15分間約65℃に維持する。

#### 【0302】

##### 実施例6：siNA活性を評価するためのRNAiインビトロアッセイ

RNAiを無細胞システムにおいて再現するインビトロアッセイを用いて、BCL2 RNA標的を標的とするsiNAコンストラクトを評価する。アッセイは、Tuschliら(1999, *Genes and Development*, 13, 3191-3197)およびZamoreら(2000, *Cell*, 101, 25-33)に記載され、BCL2標的RNA用に適合させた系を含む。シンシウム胚盤葉に由来するショウジョウバエ抽出物を用いてインビトロでRNAi活性を再構築する。標的RNAは、BCL2を発現する適当なプラスミドからT7RNAポリメラーゼを用いてインビトロ転写することにより、または本明細書に記載されるように化学合成により作製する。センスおよびアンチセンスsiNA鎖(例えば各20μM)は、緩衝液(例えば、100mM酢酸カリウム、30mM HEPES-KOH, pH7.4, 2mM酢酸マグネシウム)中で90℃で1分間、次に37℃で1時間インキュベートすることによりアニーリングさせ、次に溶解緩衝液(例えば100mM酢酸カリウム、30mM HEPES-KOH (pH7.4), 2mM酢酸マグネシウム)で希釈する。アニーリングは、アガロースゲルを用いてTBE緩衝液でゲル電気泳動し、臭化エチジウムで染色することによりモニターすることができる。ショウジョウバエの溶解物は、OregonR八工からの0-2時間齢の胚を用いて調製し、酵母糖蜜寒天上に回収し、絨毛膜を除去し溶解する。溶解物を遠心分離し、上清を単離する。アッセイは、50%溶解物[vol/vol]、RNA(10-50pMの最終濃度)、およびsiNA(10nMの最終濃度)を含む10%[vol/vol]溶解緩衝液を含有する反応混合物を含む。反応混合物はまた、10mMのクレアチンリン酸、10μg/mlのクレアチンホスホキナーゼ、100μMのGTP、100μMのUTP、100μMのCTP、500μMのATP、5mMのDTT、0.1U/μLのRNasin(Promega)、および100μMの各アミノ酸を含む。酢酸カリウムの最終濃度は100mMに調節する。反応は氷上で予め組立て、25℃で10分間プレインキュベートした後にRNAを加え、25℃でさらに60分間インキュベートする。4倍容量の1.25x Passive Lysis Buffer(Promega)で反応を停止させる。標的RNAの切断は、RT-PCR分析または当該技術分野において知られる他の方法によりアッセイし、反応からsiNAが省略されている対照反応と比較する。

#### 【0303】

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

#### 【0304】

1つの態様においては、このアッセイを用いて、siNA媒介性RNAi切断のためのBCL2 RNA標的の標的部位を決定する。すなわち、例えば、標識した標的RNAの電気泳動によりアッセイ反応を分析することにより、またはノザンプロットにより、ならびに当該技術分野において知られる他の方法論により、複数のsiNAコンストラクトをBCL2 RNA標的のRNAi媒介性切断についてスクリーニングする。

## 【0305】

実施例7：BCL2標的RNAのインビボでの核酸阻害

上述したようにして、ヒトBCL2 RNAを標的とするsiNA分子を設計し、合成する。これらの核酸分子は、例えば以下の方法を用いることにより、インビボで切断活性について試験することができる。BCL2 RNA中の標的配列およびヌクレオチドの位置は表IIおよびIIIに示される。

## 【0306】

2つのフォーマットを用いて、BCL2を標的とするsiNAの効力を試験する。第1に、例えば、T24, NHDF, HEK, HUVEC, 3t3-L1, またはA549細胞を用いて、細胞培養において試薬を試験して、RNAおよび蛋白質の阻害の程度を決定する。本明細書に記載されるように、siNA試薬(例えば、表IIおよびIIIを参照)をBCL2標的に対して選択する。これらの試薬を適当なトランスフェクション試薬により、例えば、T24, NHDF, HEK, HUVEC, 3t3-L1, またはA549細胞にデリバリーした後、RNA阻害を測定する。増幅のリアルタイムPCRモニタリング(例えば、ABI7700 Taqman(登録商標))を用いて、アクチンに対する標的RNAの相対量を測定する。無関係標的に対して、または同じ全体の長さおよび化学を有するがそれぞれの位置でランダムに置換されているランダム化siNA対照に対して作製したオリゴヌクレオチド配列の混合物に対して、比較を行う。標的に対して一次および二次のリード試薬を選択し、最適化を行う。最適なトランスフェクション試薬濃度を選択した後、リードsiNA分子を用いてRNAの阻害の経時変化を測定する。さらに、細胞播種フォーマットを用いて、RNA阻害を判定することができる。

## 【0307】

siNAの細胞へのデリバリー

細胞(例えば、T24, NHDF, HEK, HUVEC, 3t3-L1, またはA549細胞)は、トランスフェクションの前日に、例えば、EGM-2(BioWhittaker)中で $1 \times 10^5$ 細胞/ウエルで6-ウエルディッシュに播種する。siNA(例えば最終濃度20nM)およびカチオン性脂質(例えば最終濃度2 $\mu$ g/ml)を、ポリスチレン管でEGM基礎培地(BioWhittaker)中で、37 $^{\circ}$ Cで30分間複合体化させる。ボルテックスした後、複合体化したsiNAを各ウエルに加え、示される時間インキュベートする。最初の最適化実験のためには、細胞を例えば、 $1 \times 10^3$ で96ウエルプレートに播種し、記載されるようにしてsiNA複合体を加える。siNAの細胞へのデリバリーの効率は、脂質と複合体化した蛍光siNAを用いて決定する。6ウエルディッシュ中の細胞をsiNAとともに24時間インキュベートし、PBSですすぎ、2%パラホルムアルデヒド中で室温で15分間固定する。siNAの取り込みは蛍光顕微鏡を用いて可視化する。

## 【0308】

Taqmanおよび光サイクラーによるmRNAの定量

siNAのデリバリーの後、例えば、6ウエル用にはQiagen RNA精製キットを、または96ウエルアッセイ用にはRneasy抽出キットを用いて、細胞から総RNAを調製する。Taqman分析のためには、5'末端に共有結合させたレポーター染料(FAMまたはJOE)および3'末端にコンジュゲート化したクエンチャー染料TAMRAを有する二重標識プローブを合成する。1段階RT-PCR増幅は、例えば、ABI PRISM 7700 Sequence Detectorで、10 $\mu$ lの総RNA, 100nMのフォワードプライマー, 900nMのリバースプライマー, 100nMのプローブ, 1XTaqMan PCR反応緩衝液(PE-Applied Biosystems), 5.5mM MgCl<sub>2</sub>, 300 $\mu$ Mの各dATP, dCTP, dGTP, およびdTTP, 10UのRNase阻害剤(Promega), 1.25UのAmpliTaqGold(PE-Applied Biosystems)および10UのM-MLVリバーストランスクリプターゼ(Promega)から構成される50 $\mu$ lの反応液を用いて行う。熱サイクリング条件は、48 $^{\circ}$ Cで30分間, 95 $^{\circ}$ Cで10分間, 次に95

で15秒間および60 で1分間を40サイクルからなるものでありうる。mRNAレベルの定量は、段階的に希釈した総細胞RNA(300, 100, 33, 11 ng/rxn)から生成した標準に対して行い、平行してTaqMan反応で測定した - アクチンまたはGAPDH mRNAに対して標準化する。目的とする各遺伝子について、上側プライマーおよび下側プライマー、および蛍光標識したプローブを設計する。特定のPCR産物中へのSYBR Green I染料のリアルタイム取り込みは、ガラスキャピラリー管で光サイクラーを用いて測定することができる。対照cRNAを用いて、各プライマー対について標準曲線を作成する。値は、各サンプルにおいてGAPDHに対する相対的発現として表す。

【0309】

10

#### ウエスタンブロッティング

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

20

【0310】

#### 実施例8: BCL2遺伝子発現のダウンレギュレーションを評価するのに有用なモデル細胞培養

BCL2レベルの減少を直接的にまたは下流の影響を測定することにより間接的に分析するために用いることができる多数の細胞培養系が存在する。例えば、細胞培養実験においてT24, NHDF, HEK, HuVEC, 3t3-L1, またはA549細胞を用いて、本発明の核酸分子の効力を評価することができる。すなわち、BCL2 RNAを標的とする本発明の核酸分子(例えばsiNA)で処理したT24, NHDF, HEK, HuVEC, 3t3-L1, またはA549細胞は、スクランブル化または不活性配列を有するマッチした対照核酸分子と比較して、BCL2を発現する能力が低下していると予測される。非限定的例においては、細胞を培養し、例えば、時間分解免疫蛍光アッセイによりBCL2発現を定量する。BCL2のメッセンジャーRNAの発現は、培養細胞中でRT-PCRを用いて定量する。未処理細胞を、適当な試薬、例えば、リポフェクタミン等のカチオン性脂質とともにトランスフェクションし、siNA分子で処理した細胞と比較して、BCL2蛋白質およびRNAのレベルを定量する。次に、用量応答アッセイを行って、BCL2発現の用量依存的阻害を確立する。

30

【0311】

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

40

【0312】

siRNA化合物が標的核酸の発現に及ぼす影響は、標的核酸が測定可能なレベルで存

50

在する限り、種々のタイプの細胞のいずれにおいても試験することができる。これは、例えば、PCRまたはノザンプロット分析を用いることにより日常的に判定することができる。以下の6種類の細胞を例示の目的のために示すが、選択された細胞タイプにおいて標的が発現されている限り、他のタイプの細胞も日常的に用いることができる。これは、当該技術分野において知られる方法、例えば、ノザンプロット分析、リボヌクレアーゼ保護アッセイ、および/またはRT-PCRにより容易に測定することができる。

#### 【0313】

##### T-24細胞

ヒト移行上皮膀胱癌細胞株であるT-24は、American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va.) から入手する。T-24細胞は、10%ウシ胎児血清、ペニシリン100ユニット/mL、およびストレプトマイシン100 $\mu$ g/mLを補充した完全マッコイ5A基本培地で日常的に培養する。細胞は、90%コンフルエンスに達したときにトリプシン処理および希釈することにより日常的に継代する。RT-PCR分析において用いるためには、細胞を約7000細胞/ウエルの密度で96ウエルプレートに播種する。ノザンプロット分析および他の分析のためには、細胞を100mmまたは他の標準的な組織培養プレートに播種し、適当な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを用いて同様に処理することができる。

#### 【0314】

##### A549細胞

ヒト肺癌細胞株であるA549は、American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va.) から入手する。A549細胞は、10%ウシ胎児血清、ペニシリン100ユニット/mL、およびストレプトマイシン100 $\mu$ g/mLを補充したDMEM基本培地で日常的に培養する。細胞は、90%コンフルエンスに達したときにトリプシン処理および希釈することにより日常的に継代する。

#### 【0315】

##### NHDF細胞

ヒト新生児皮膚線維芽細胞(NHDF)は、Clonetics Corporation (Walkersville, Md.) から入手する。NHDFは、線維芽細胞成長培地中で日常的に維持する。培地には供給元の推奨にしたがって補充物を加える。細胞は供給元の推奨にしたがって10代まで維持する。

#### 【0316】

##### HEK細胞

ヒト胚性ケラチノサイト(HEK)は、Clonetics Corporation (Walkersville, Md.) から入手する。HEKは、供給元の推奨にしたがってケラチノサイト成長培地中で日常的に維持する。細胞は供給元の推奨にしたがって10代まで維持する。

#### 【0317】

##### HuVEC細胞

ヒト臍帯静脈内皮細胞株であるHuVECは、American Type Culture Collection (Manassas, Va.) から入手する。HuVEC細胞は、Single Quots 補充物を補充したEBMで日常的に培養する。細胞は、90%コンフルエンスに達したときにトリプシン処理および希釈することにより日常的に継代する。細胞は15代まで維持する。RT-PCR分析において用いるためには、細胞を96ウエルプレートに約10000細胞/ウエルの密度で播種する。ノザンプロット分析または他の分析のためには、細胞を100mmまたは他の標準的な組織培養プレートに播種し、適当な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを用いて同様に処理することができる。

#### 【0318】

##### 3T3-L1細胞

10

20

30

40

50

マウス胚性脂肪細胞様細胞株である3T3-L1は、American Type Culture Collection (Manassas, Va.) から入手する。3T3-L1細胞は、10%ウシ胎児血清を補充した高グルコースのDMEMで日常的に培養する。細胞は、80%コンフルエンスに達したときにトリプシン処理および希釈することにより日常的に継代する。RT-PCR分析において用いるためには、細胞を96ウエルプレートに約4000細胞/ウエルの密度で播種する。ノザンプロットングまたは他の分析のためには、細胞を100mmまたは他の標準的な組織培養プレートに播種し、適当な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを用いて同様に処理することができる。

#### 【0319】

##### 動物モデル

動物モデルにおける抗BCL2剤の効力の評価は、ヒト臨床試験の前に欠くことのできない重要な要件である。細胞培養モデルにおけるように、最もBCL2に感受性の高いマウス腫瘍異種移植片は、高レベルのBCL2蛋白質を発現するヒト癌細胞に由来するものである。

#### 【0320】

研究者らにより、ヒト腎臓細胞癌腫(RCC)異種移植片を有するヌードマウスが抗BCL2アンチセンス化合物に感受性であり、腫瘍成長が部分的に退行したことが示されている(Uchida et al., 2001, Molecular Urology, 5, 71-78)。5種類のRCC細胞株(ACHN, Caki-1, RCZ, RCW, およびOS-RC-2)におけるBCL2 mRNAの発現がリバーストランスクリプターゼ-ポリメラーゼ連鎖反応により分析されている。ヒトBCL2センスおよびBCL2アンチセンス配列を含むsiRNA(アニーリングし脂質とともにトランスフェクションする)が、樹立されたヒトRCC細胞株の培養物の増殖および生存に及ぼす影響は、MTSアッセイにより測定することができる。siRNA処理後のACHN腫瘍細胞におけるBCL2蛋白質の発現は、ウエスタンブロット分析により評価することができ、これらの細胞におけるアポトーシスの程度は、蛍光活性化細胞ソーター(FACS)分析により決定することができる。nu/nuマウス中のACHN異種移植片における抗腫瘍活性は、処理マウスおよび対照マウスの腫瘍重量の相違を測定することによりモニターすることができる。

#### 【0321】

##### 動物モデルの開発

腫瘍細胞株(ACHN, Caki-1, RCZ, RCW, およびOS-RC-2)を特性決定して、マウスにおけるこれらの成長曲線を確立する。これらの細胞株をヌードマウスおよびSCIDマウスの両方に移植し、原発性腫瘍の体積を週に3回測定する。マトリゲル移植フォーマットを用いるこれらの腫瘍株の成長特性も確立することができる。記載される実験においては、高レベルのBCL2を発現するよう加工された他の細胞株を用いることもできる。最も矛盾なくかつ信頼性のある腫瘍成長を支持する腫瘍細胞株および移植法を、リードBCL2核酸を試験する動物実験において用いる。腫瘍移植の3日後から始めて、実験期間の間連続して、核酸を毎日皮下注射またはAlzetミニ浸透圧ポンプからの連続皮下注入により投与する。少なくとも10匹の動物のサイズの群を用いる。効力は、核酸処理動物の腫瘍体積を食塩水のみで処理した対照群の動物と統計学的に比較することにより決定する。これらの腫瘍の成長は一般に遅いため(45-60日間)、最初のエンドポイントは、核酸処理の存在または非存在において、容易に測定可能な原発性腫瘍(すなわち50-100mm<sup>3</sup>)を確立するのに要した時間である。

#### 【0322】

##### 患者スクリーニングのための、および可能性のあるエンドポイントとしてのBCL2蛋白質レベル

いくつかの癌において上昇したBCL2レベルを検出することができるため、抗BCL2核酸を試験する最初の臨床試験に入る前に、癌患者をBCL2の上昇について予めスクリーニングすることができる。初期BCL2レベルは腫瘍生検または切除した腫瘍サン

10

20

30

40

50

ルから決定することができる (ELISAにより)。臨床試験の間、循環 BCL2 蛋白質を ELISA によりモニターすることが可能である。抗 BCL2 核酸で処理する期間にわたる連続的な血液 / 血清サンプルの評価は、効力の兆候を初期に決定するのに有用であろう。

#### 【0323】

##### 実施例 9 : BCL2 RNA 発現の RNAi 媒介性阻害

siNA コンストラクト (表 III) を、例えば A549 細胞において、BCL2 RNA 発現を低下させる効力について試験する。トランスフェクションの約 24 時間前に、トランスフェクションの時点で細胞が 70 - 90% コンフルエントとなるように、細胞を 96 ウエルプレートに 5,000 - 7,500 細胞 / ウエルで 100  $\mu$ l / ウエルで播種する。トランスフェクションのためには、アニーリングした siNA s を 50  $\mu$ l / ウエルの容量でトランスフェクション試薬 (リポフェクタミン 2000, Invitrogen) と混合し、室温で 20 分間インキュベートする。siNA トランスフェクション混合物を細胞に加えて、150  $\mu$ l の容量中最終 siNA 濃度を 25 nM とする。各 siNA トランスフェクション混合物を 3 重の siNA 処理用に 3 つのウエルに加える。siNA トランスフェクション混合物の連続的存在下で細胞を 37  $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートする。24 時間の時点で、処理細胞の各ウエルから RNA を調製する。最初にトランスフェクション混合物を含む上清を除去して廃棄し、次に細胞を溶解させて各ウエルから RNA を調製する。処理後の標的遺伝子発現は、標的遺伝子および標準化のために対照遺伝子 (36B4, RNA ポリメラーゼサブユニット) についての RT-PCR により評価する。3 回の実験のデータを平均し、各処理について標準偏差を求める。標準化したデータをグラフで表し、活性な siNA による標的 mRNA のパーセント減少をそれぞれの反転対照 siNA と比較して決定する。

#### 【0324】

非限定的例においては、A549 細胞を、25 nM の siNA と複合体化した脂質で 0.25  $\mu$ g / ウエルでトランスフェクションした。リボヌクレオチドおよび 3' - 末端ジチミンキャップを含む siNA コンストラクト (RPI # 30998 / 31074) を、2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドおよびプリンリボヌクレオチドを含み、siNA のセンス鎖が 5' および 3' - 末端反転デオキシ無塩基キャップでさらに修飾されており、アンチセンス鎖が 3' - 末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む化学的に修飾された siNA コンストラクト (RPI # 31368 / 31369) とともに試験した。これはまた、マッチした化学的反転対照 (RPI # 31370 / 31371)、および 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンおよび 2' - デオキシ - 2' - フルオロプリンヌクレオチドを含み、siNA のセンス鎖が 5' および 3' - 末端反転デオキシ無塩基キャップでさらに修飾されており、アンチセンス鎖が 3' - 末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む化学的に修飾された siNA コンストラクト (RPI # 31372 / 31373) とも比較した。また、マッチした化学的反転対照 (RPI # 31374 / 31375) とも比較した。さらに、siNA コンストラクトは、未処理細胞、脂質およびスクランブル化 siNA コンストラクトでトランスフェクションした細胞 (Scram1 および Scram2)、および脂質のみでトランスフェクションした細胞 (トランスフェクション対照) とも比較した。図 12 に示されるように、siNA コンストラクトは、スクランブル化、未処理およびトランスフェクション対照と比較して、BCL2 RNA 発現の有意な減少を示す。表 IV に示される追加の安定化化学も、同様に活性についてアッセイする。

#### 【0325】

##### 実施例 10 : 適応症

BCL2 発現の調節に関連する可能性のある特定の変性性および疾病状態には、限定されないが、癌、例えば、悪性血液疾患、例えばリンパ腫 (例えば、非ホジキンおよびホジキンリンパ腫)、白血病 (例えば、慢性骨髄性白血病, CML; 急性骨髄性白血病, AML; 続発性白血病, 急性リンパ芽球性白血病, ALL; 慢性リンパ性白血病; CLL),

真性赤血球増加症，特発性骨髄線維症，本態性血小板血症，脊髄形成異常症候群，自己免疫疾病（例えば，多発性硬化症，狼瘡，慢性関節リウマチ，インスリン依存性糖尿病，脳炎，ラスムッセン脳炎，甲状腺炎，クローン病，繊維性筋痛，グレーヴズ病，ギャンバレー症候群，慢性疲労症候群，自己免疫肝炎，メニエール病，重症筋無力症，心筋症，多発性筋痛，乾癬，潰瘍性大腸炎等），ウイルス感染（例えば，HIV，HCV，HBV，RSV，CMV，HSV，インフルエンザ，ライノウイルス等）および細胞または組織におけるBCL2のレベルに関連する他の任意の疾病または病気が含まれ，単独でも他の療法との組み合わせでもよい。BCL2発現（例えばBCL2 RNAのレベル）の減少，したがってそれぞれの蛋白質のレベルの減少は，疾病または病気の症状をある程度軽減する。

10

### 【0326】

放射線治療および化学療法，例えばゲムシタピンおよびシクロホスファミドの使用は，本発明の核酸分子（例えばsiNA分子）と組み合わせるかまたは併用することができる化学療法剤の非限定的例である。当業者は，他の抗癌化合物および療法も同様に本発明の核酸分子（例えばsiNA分子）と容易に組み合わせることができ，したがって，本発明の範囲内であることを理解するであろう。そのような化合物および療法は当該技術分野においてよく知られており（例えば，Cancer: Principles and Practice of Oncology, Volumes 1 and 2, eds Devita, V. T., Hellman, S., and Rosenberg, S. A., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, USA（本明細書の一部としてここに引用する）を参照），例えば，限定されないが，葉酸，抗葉酸，ピリミジン類似体，フルオロピリミジン，プリン類似体，アデノシン類似体，トポイソメラーゼI阻害剤，アントラピラゾール，レチノイド，抗生物質，antha BCL2，白金類似体，アルキル化剤，ニトロソウレア，植物由来化合物，例えば，ピンカアルカロイド，エピドフィロトキシン，チロシンキナーゼ阻害剤，タキソール，放射線療法，外科手術，栄養補充，遺伝子治療，放射線治療，例えば3D-CRT，イムノトキシン療法，例えばリシン，およびモノクローナル抗体が含まれる。本発明の核酸分子と組み合わせるまたは併用することができる化学療法化合物の特定の例には，限定されないが，パクリタキセル；ドセタキセル；メトトレキセート；ドキソルビン；エダトレキセー；ピノレルピン；トマキシフェン；ロイコポリン；5-フルオロウリジン（5-FU）；イリノテカン；シスプラチン；カルボプラチン；アムサクリン；シタラピン；プレオマイシン；マイトマイシンC；ダクチノマイシン；ミトラマイシン；ヘキサメチルメラミン；ダカルバジン；L-アスパラギナーゼ；ナイトロジェンマスタード；メルファラン，クロラムブシル；ブスルファン；イフォスファミド；4-ヒドロペルオキシシクロホスファミド，チオテパ；イリノテカン（CAMPTOSAR（登録商標），CPT-11，カンプトテシン-11，カンプト）タモキシフェン，ハーセプチン；IMCC225；ABX-EGF；およびこれらの組み合わせが含まれる。上述のリストは，本発明の核酸分子（例えばsiNA）と組み合わせるまたは併用することができる化合物および/または方法の非限定的例を提供する。当業者は，他の薬剤化合物および療法を同様に本発明の核酸分子（例えばsiNA分子）と組み合わせることができ，したがって本発明の範囲内であることを理解するであろう。

20

30

40

### 【0327】

#### 実施例11：診断用途

本発明のsiNA分子は，種々の応用において，例えば，臨床，工業，環境，農業および/または研究の設定において，種々の診断用途，例えば分子標的（例えばRNA）の同定に用いることができる。そのようなsiNA分子の診断における使用は，再構成されたRNAi系，例えば，細胞溶解物または部分的に精製された細胞溶解物を利用することを含む。本発明のsiNA分子を診断手段として使用し，疾病に罹患した細胞内の遺伝的浮動および変異を検査するか，または細胞において内因性のまたは外来の（例えばウイルス）RNAの存在を検出することができる。siNA活性と標的RNAの構造との間の密接

50

な関係により、分子のいずれの領域においても、標的RNAの塩基対形成および3次元構造を変更する変異を検出することができる。本発明に記載されるsiNA分子を複数使用することにより、インピトロならびに細胞および組織におけるRNAの構造および機能に重要なヌクレオチド変化をマッピングすることができる。siNA分子による標的RNAの切断を使用して、遺伝子の発現を阻害し、疾病または感染の進行における特定の遺伝子産物の役割を明らかにすることができる。このようにして、他の遺伝子標的を疾病の重要な介在物として明らかにすることができる。これらの実験は、組み合わせ療法の可能性を提供することにより、疾病進行のよりよい治療につながるであろう（例えば、異なる遺伝子を標的とする多数のsiNA分子、既知の小分子阻害剤と組み合わせたsiNA分子、siNA分子および/または他の化学的または生物学的分子と組み合わせた間欠的治療）  
。本発明のsiNA分子の他のインピトロにおける使用は当該技術分野においてよく知られており、これには、疾病、感染または関連する健康状態に伴うmRNAの存在の検出が含まれる。そのようなRNAは、siNA分子で処理した後、標準的な方法論、例えば蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を使用して切断産物の存在を判定することにより検出する。

10

20

30

40

50

#### 【0328】

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

#### 【0329】

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

#### 【0330】

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

#### 【0331】

当業者は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して種々の置換および改変をなすことが可能であることを容易に理解するであろう。すなわち、そのような追加の態様は、本発明および特許請求の範囲の範囲内である。本

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

【0332】

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

10

【0333】

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

20

【0334】

【表 1】

表 1: BCL2 受託番号

LOCUS	BCL2	6030 bp	mRNA	linear	PRI 03-FEB-2001
DEFINITION	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant alpha, mRNA.				
ACCESSION	NM_000633				
LOCUS	BCL2	911 bp	mRNA	linear	PRI 03-FEB-2001
DEFINITION	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant beta, mRNA.				
ACCESSION	NM_000657				
LOCUS	AF401211	137 bp	mRNA	linear	PRI 13-SEP-2001
DEFINITION	Homo sapiens BCL2 protein mRNA, partial cds.				
ACCESSION	AF401211				
LOCUS	BC027258	2704 bp	mRNA	linear	PRI 08-APR-2002
DEFINITION	Homo sapiens, B-cell CLL/lymphoma 2, clone MGC:21366 IMAGE:4511027, mRNA, complete cds.				
ACCESSION	BC027258				
LOCUS	HUMBCL2A	5086 bp	mRNA	linear	PRI 31-OCT-1994
DEFINITION	Human B-cell leukemia/lymphoma 2 (bcl-2) proto-oncogene mRNA encoding bcl-2-alpha protein, complete cds.				
ACCESSION	M13994				
LOCUS	HUMBCL2B	911 bp	mRNA	linear	PRI 31-OCT-1994
DEFINITION	Human B-cell leukemia/lymphoma 2 (bcl-2) proto-oncogene mRNA encoding bcl-2-beta protein, complete cds.				
ACCESSION	M13995				

【 0 3 3 5 】

10

20

30

40

【表 2】

LOCUS	HUMBCL2C	6030 bp	mRNA	linear	PRI 27-APR-1993
DEFINITION	Human bcl1-2 mRNA.				
ACCESSION	M14745				
LOCUS	HSBCL2IG	1846 bp	mRNA	linear	PRI 26-MAR-1993
DEFINITION	H.sapiens mRNA for bcl2-Ig fusion gene.				
ACCESSION	X06487				
LOCUS	BCL2L1	2575 bp	mRNA	linear	PRI 15-JAN-2003
DEFINITION	Homo sapiens BCL2-like 1 (BCL2L1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA.				
ACCESSION	NM_138578				
LOCUS	BCL2L1	2386 bp	mRNA	linear	PRI 15-JAN-2003
DEFINITION	Homo sapiens BCL2-like 1 (BCL2L1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2, mRNA.				
ACCESSION	NM_001191				
LOCUS	AF203373	816 bp	mRNA	linear	PRI 20-AUG-2000
DEFINITION	Homo sapiens myeloid cell leukemia-1 short protein (MCL1) mRNA, complete cds.				
ACCESSION	AF203373				
LOCUS	BCL2L11	223 bp	mRNA	linear	PRI 05-NOV-2002
DEFINITION	Homo sapiens BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) (BCL2L11), transcript variant 8, mRNA.				
ACCESSION	NM_138627				
LOCUS	ced-9Co	843 bp	mRNA	linear	INV 22-NOV-2002
DEFINITION	Caenorhabditis elegans essential cytochrome CYT-1, cell death				

【 0 3 3 6 】

10

20

30

40

【表 3】

abnormality CED-9, abnormal Methyl Viologen sensitivity MEV-1 (31.8 kD) (ced-9Co), alternative variant b, mRNA.

ACCESSION NM\_066883

LOCUS BAG1 1311 bp mRNA linear PRI 01-NOV-2000  
 DEFINITION Homo sapiens BCL2-associated athanogene (BAG1), mRNA.  
 ACCESSION NM\_004323

LOCUS AK094541 3107 bp mRNA linear PRI 15-JUL-2002  
 DEFINITION Homo sapiens cDNA FLJ37222 fis, clone BRAMY1000130, highly similar to Homo sapiens MAGE-E1b mRNA.  
 ACCESSION AK094541

LOCUS BC016281 829 bp mRNA linear PRI 05-NOV-2001  
 DEFINITION Homo sapiens, BCL2-related protein A1, clone MGC:8991 IMAGE:3920808, mRNA, complete cds.  
 ACCESSION BC016281

【 0 3 3 7 】

10

20

30

40

【表 4】

表 II: BCL2 s1NA および標的配列

BCL2 = NM\_000633

位置	標的配列	配列番号	上側位置	上側配列	配列番号	下側位置	下側配列	配列番号
3	GCCCGCCUCCGCGCCGC	1	3	GCCCGCCUCCGCGCCGC	1	25	GCGCGCGGAGGGCGGGC	415
21	CCUGCCCGCCCGCCCGC	2	21	CCUGCCCGCCCGCCCGC	2	41	CGCGCGCGGGCGGGCAGG	416
39	GCGUCCCGCCCGCCCGC	3	39	GCGUCCCGCCCGCCCGC	3	59	GAGCGCGGGCGGGAGCGC	417
57	CUCGUGGCCCGCCCGCG	4	57	CUCGUGGCCCGCCCGCG	4	77	GCGCGCGGGCGCCACGGAG	418
75	CUGCCCGCCCGCCCGC	5	75	CUGCCCGCCCGCCCGC	5	95	GCAGCGCGGGCGGGCGAG	419
93	CCAGCGAAGGUGCCGGGC	6	93	CCAGCGAAGGUGCCGGGC	6	113	GCCCCGGACCUJCGCUGG	420
111	CUCGGGCCUCCUJCGCC	7	111	CUCGGGCCUCCUJCGCC	7	131	CGCAGGGAGGGCCCGGAG	421
129	GGCGCCGUCAGCGCUCGG	8	129	GGCGCCGUCAGCGCUCGG	8	149	CCGAGCGUCAGCGCCGCC	422
147	GAGCGAACUGCGGACGGG	9	147	GAGCGAACUGCGGACGGG	9	167	CCGUCGCGGAGUUCGCUC	423
165	GAGUCCGGGAGGCGACCG	10	165	GAGUCCGGGAGGCGACCG	10	185	CGGUCGCCUCCCGGACCCU	424
183	GUAGUCGCGCCCGCGCA	11	183	GUAGUCGCGCCCGCGCA	11	203	UGC CGCGCGGGCGGACUAC	425
201	AGGACGAGGAGGAGAA	12	201	AGGACGAGGAGGAGAA	12	221	UUCUCCUCCUCCUGGUCCU	426
219	AAGGGUGCGAGCCCGGAG	13	219	AAGGGUGCGAGCCCGGAG	13	239	CUCGGGCGUCGCGACCCU	427
237	GGCGGGUGCCCGGUGGG	14	237	GGCGGGUGCCCGGUGGG	14	257	CCCACCGCGCACCCCGCC	428
255	GGUCAGCGGAAGAGGGGG	15	255	GGUCAGCGGAAGAGGGGG	15	275	CCCCUUCUCCCGUCGACC	429
273	GUCCAGGGGGAGAACUUC	16	273	GUCCAGGGGGAGAACUUC	16	293	GAAGUUCUCCCGCUGGAC	430
291	CGUAGCAGUACUCCUUUU	17	291	CGUAGCAGUACUCCUUUU	17	311	AAAAAGGAGUACUJCUACG	431
309	UAGGAAAAGAGGAAAAA	18	309	UAGGAAAAGAGGAAAAA	18	329	UUUUUCCUCCUUUUCCUA	432
327	AUAAAACCCUCCCAACCA	19	327	AUAAAACCCUCCCAACCA	19	347	UGGUGGGGAGGGUUUUU	433
345	ACCUCCUUCUCCCAACCC	20	345	ACCUCCUUCUCCCAACCC	20	365	GGGUGGGGAGGAGGAGGU	434
363	CUCGCCGACCCACACAG	21	363	CUCGCCGACCCACACAG	21	383	CUGUGUGUGGUGCGGGGAG	435
381	GCGCGGGUUCUAGCGCUC	22	381	GCGCGGGUUCUAGCGCUC	22	401	GAGCGCUAGAACCCCGCGC	436
399	CGGCACCGGGGCGCCAGGC	23	399	CGGCACCGGGGCGCCAGGC	23	419	GCCUGGCCCGCGGUGCCCG	437
417	CGCGUCCUGCCUUCAUUUA	24	417	CGCGUCCUGCCUUCAUUUA	24	437	UAAUUGAAGGCAGGACCGG	438
435	AUCCAGCAGCUUUUCGGAA	25	435	AUCCAGCAGCUUUUCGGAA	25	455	UUCGAAAAGCUGCUGGAAU	439
453	AAUUGCAUJUGCUGUCCGG	26	453	AAUUGCAUJUGCUGUCCGG	26	473	CCGAACAGCAAAUGCAUUU	440
471	GAGUUUAUCAGAAAGACGA	27	471	GAGUUUAUCAGAAAGACGA	27	491	UCGUCUUCUGAUJAAACUC	441
489	AUUCUCCUCCUCCCG	28	489	AUUCUCCUCCUCCCG	28	509	CGGGACGGGAGGCGGAAU	442
507	GGCUCCUUCUCCUCCCAU	29	507	GGCUCCUUCUCCUCCCAU	29	527	AUGGGACGAUGAAGGAGCC	443

【表 5】

525	UCUCCCCUGUCUCUCUCU	30	525	UCUCCCCUGUCUCUCUCU	30	545	AGGAGAGACACAGGGGAGA	444
543	UGGGAGGGCGUGAAGCGGU	31	543	UGGGAGGGCGUGAAGCGGU	31	563	ACCGUUCACGGCCUCCCCA	445
561	UCCCGUGGAUAGAGAUCA	32	561	UCCCGUGGAUAGAGAUCA	32	581	UGAAUCUUAUCCACGGGA	446
579	AUGCCUGUCCCGCGGUG	33	579	AUGCCUGUCCCGCGGUG	33	599	CACGCGGACACACAGGCAU	447
597	GUGUGCGCGGUAAAUUU	34	597	GUGUGCGCGGUAAAUUU	34	617	AAUUUAACGCGCGCACAC	448
615	UGCCGAGAAGGGGAAACA	35	615	UGCCGAGAAGGGGAAACA	35	635	UGUUUCCCCUUCUCGGCA	449
633	AUCACAGGACUUCUGCGAA	36	633	AUCACAGGACUUCUGCGAA	36	653	UUCGCAGAAAGUCCUGUGAU	450
651	AUACCGGACUGAAAAUUGU	37	651	AUACCGGACUGAAAAUUGU	37	671	ACAAUUUCAGUCCGGUUAU	451
669	UAAUUCUUCUGCCCGCGCC	38	669	UAAUUCUUCUGCCCGCGCC	38	689	GGCGGGCAGAUAAUUA	452
687	CGCUGCCAAAAAAAACUC	39	687	CGCUGCCAAAAAAAACUC	39	707	GAGUUUUUUUUGGCAGCG	453
705	CGAGCUCUUGAGAUUCGG	40	705	CGAGCUCUUGAGAUUCGG	40	725	CGGAGAUUCAAGAGCUCG	454
723	GGUUGGGAUUCUUGCGGAU	41	723	GGUUGGGAUUCUUGCGGAU	41	743	AUCCGCAGAAUCCCAACC	455
741	UUGACAUUUCUGUAAGCA	42	741	UUGACAUUUCUGUAAGCA	42	761	UGCUCACAGAAAUUGUCA	456
759	AGAAGUCUGGGAAUCGAUC	43	759	AGAAGUCUGGGAAUCGAUC	43	779	GAUCGAUCCCAGACUUCU	457
777	CUGGAAUUCUCCUAAUUU	44	777	CUGGAAUUCUCCUAAUUU	44	797	AAAUAGGAGGAUUUCCAG	458
795	UUUACUCCUUCUCCCGCG	45	795	UUUACUCCUUCUCCCGCG	45	815	CGGGGGGAGGGGAGUAAA	459
813	GACUCCUGAUUCAUUGGGA	46	813	GACUCCUGAUUCAUUGGGA	46	833	UCCCAAUGAAUCAGGAGUC	460
831	AAGUUUCAAUUCAGCUAUA	47	831	AAGUUUCAAUUCAGCUAUA	47	851	UAUAGCUGAUUUGAAACUJU	461
849	AACUGGAGAGUCUGAAGA	48	849	AACUGGAGAGUCUGAAGA	48	869	UCUUCAGCACUCUCCAGUU	462
867	AUUGAUGGGAUCGUUGCCU	49	867	AUUGAUGGGAUCGUUGCCU	49	887	AGGCAACGAUCCCAUCAAU	463
885	UUAUGCAUUGUUUUGGUU	50	885	UUAUGCAUUGUUUUGGUU	50	905	AACCAAAACAUAUGCAUAA	464
903	UUUACAAAAAGGAACUUG	51	903	UUUACAAAAAGGAACUUG	51	923	CAAGUUCCUUUUUUGUAAA	465
921	GACAGAGGAUCAUGCUGUA	52	921	GACAGAGGAUCAUGCUGUA	52	941	UACAGCAUGAUCUCCUGUC	466
939	ACUUAAAAAUACAAGUAA	53	939	ACUUAAAAAUACAAGUAA	53	959	UUACUUUAUUUUUUUUAAGU	467
957	AGUCUCGCACAGGAAUUG	54	957	AGUCUCGCACAGGAAUUG	54	977	CAUUUCCUGUGCGGAGACU	468
975	GGUUAAUUGUAACUUUCAA	55	975	GGUUAAUUGUAACUUUCAA	55	995	UUGAAAAGUUACAUAUAAACC	469
993	AUGGAAACCUUUGAGAUUU	56	993	AUGGAAACCUUUGAGAUUU	56	1013	AAUUCUCAAAGGUUUUCCAU	470
1011	UUUUACUUAAAGUGCAUUC	57	1011	UUUUACUUAAAGUGCAUUC	57	1031	GAUUGCACUUUAAGUAAAA	471
1029	CGAGUAAAUUAAUUUCCA	58	1029	CGAGUAAAUUAAUUUCCA	58	1049	UGGAAAUUAAAUUUACUJCG	472
1047	AGGCAGCUAAUACAUIUG	59	1047	AGGCAGCUAAUACAUIUG	59	1067	ACAUGUAUUUAAGCUGCCU	473
1065	UUUUAGCCGUGUUACUUG	60	1065	UUUUAGCCGUGUUACUUG	60	1085	CAAGUAACACGGCUAAAA	474
1083	GUAGUGUUAUGCCUUGCU	61	1083	GUAGUGUUAUGCCUUGCU	61	1103	AGCAGGGCAUACACACUAC	475
1101	UUUCACUCAGUGUGUACAG	62	1101	UUUCACUCAGUGUGUACAG	62	1121	CUGUACACACUGAGUGAAA	476
1119	GGGAAACGCCUUGAUUUU	63	1119	GGGAAACGCCUUGAUUUU	63	1139	AAAAUCAGGUGCGUUUCC	477
1137	UUUACUUUAUAGUUUUGUU	64	1137	UUUACUUUAUAGUUUUGUU	64	1157	AAACAAACUAAUUAAGUAAA	478
1155	UUUUCUUUAACCUUUCAGC	65	1155	UUUUCUUUAACCUUUCAGC	65	1175	GCUGAAAGGUUAAAAGAAA	479

【 0 3 3 9 】

【表 6】

1173	CAUCACAGAGGAAGUAGAC	66	1173	CAUCACAGAGGAAGUAGAC	66	1193	GUCUACUUCUUCUGUGAUG	480
1191	CUGAUUUUAACAUAUCUUA	67	1191	CUGAUUUUAACAUAUCUUA	67	1211	UAAGUUAUUGUUAUAUCAG	481
1209	ACUAAUUAUACGUGCCUC	68	1209	ACUAAUUAUACGUGCCUC	68	1229	GAGGCACGUUAUUAUAGU	482
1227	CAUGAAUUAAGAUCCGAA	69	1227	CAUGAAUUAAGAUCCGAA	69	1247	UUCGGAUUUUAUUAUUCAG	483
1245	AAGGAUUUGAAUAAAAU	70	1245	AAGGAUUUGAAUAAAAU	70	1265	AUUUUUAUUCCAAUUCUU	484
1263	UUUCCUGCUCUCAUGCCA	71	1263	UUUCCUGCUCUCAUGCCA	71	1283	UGGCAUGAGACGCAGGAAA	485
1281	AAGAGGAAACACCAGAAU	72	1281	AAGAGGAAACACCAGAAU	72	1301	AUUCUGGUGUUUCCUCUU	486
1299	UCAAGUUCUCCGCGUGAUU	73	1299	UCAAGUUCUCCGCGUGAUU	73	1319	AAUCACGCGGAACACUUGA	487
1317	UGAAGACACCCUUCGUCC	74	1317	UGAAGACACCCUUCGUCC	74	1337	GGACGAGGGGUGUCUUA	488
1335	CAAGAAUGCAAAGCACAU	75	1335	CAAGAAUGCAAAGCACAU	75	1355	GAUGUGCUUUGCAUUCUUG	489
1353	CCAAUAAAUAJAGCUGGAU	76	1353	CCAAUAAAUAJAGCUGGAU	76	1373	AAUCCAGCUAUUUUAUUGG	490
1371	UAUAACUCCUUCUUCUUCU	77	1371	UAUAACUCCUUCUUCUUCU	77	1391	AGAAAGAAGAGGAGUUAUA	491
1389	UCUGGGGCCGUGGGGUGG	78	1389	UCUGGGGCCGUGGGGUGG	78	1409	CCACCCACGGCCCCCAGA	492
1407	GGAGCUGGGCGAGAGGUG	79	1407	GGAGCUGGGCGAGAGGUG	79	1427	CACCUUCGCCCCAGCUC	493
1425	GCCGUUGGCCUUCUUCU	80	1425	GCCGUUGGCCUUCUUCU	80	1445	AGCAAAGGGGGCCAAACGGC	494
1443	UUUUCUUCUGGGAAGGAUG	81	1443	UUUUCUUCUGGGAAGGAUG	81	1463	CAUCCUUCUCCAGAGGAAAA	495
1461	GGCGCACGUCGGGAGAACG	82	1461	GGCGCACGUCGGGAGAACG	82	1481	CGUUCUCCACGCGUGCGCC	496
1479	GGGUACGACAACCGGGAG	83	1479	GGGUACGACAACCGGGAG	83	1499	CUCCCGUUCUUCGUACCCC	497
1497	GAUAGUGAUGAAGUAUC	84	1497	GAUAGUGAUGAAGUAUC	84	1517	GAUGUACUUCAUACUUC	498
1515	CCAUUAUAAGCUCGCGAG	85	1515	CCAUUAUAAGCUCGCGAG	85	1535	CUGCGACAGCUUAUAUUGG	499
1533	GAGGGCUACGAGUGGGAU	86	1533	GAGGGCUACGAGUGGGAU	86	1553	AUCCACUCUAGCCCCUC	500
1551	UGC GGAGAUUGGGCGCC	87	1551	UGC GGAGAUUGGGCGCC	87	1571	GGCGCCACAUUCUCCGCA	501
1569	CGGCCCCCGGGGGCGCC	88	1569	CGGCCCCCGGGGGCGCC	88	1589	GGCGCCCCCGGGGGCGG	502
1587	CCCCGACCGGCAUCUUC	89	1587	CCCCGACCGGCAUCUUC	89	1607	GAAUUGCCCGGUGCGGGG	503
1605	CUCCUCCAGCCCGGCGAC	90	1605	CUCCUCCAGCCCGGCGAC	90	1625	GUGCCGGGCGUGGGAGGAG	504
1623	CACGCCCAUCCAGCCGCA	91	1623	CACGCCCAUCCAGCCGCA	91	1643	UGCGGCUUGAUUGGGCGUG	505
1641	AUCCCGGACCCGUGCGCC	92	1641	AUCCCGGACCCGUGCGCC	92	1661	GGCGACCGGUCGCGGGAU	506
1659	CAGGACUCCGCGUGCAG	93	1659	CAGGACUCCGCGUGCAG	93	1679	CUGCAGCGGCGAGUCCUG	507
1677	GACCCGGCUGCCCCGGC	94	1677	GACCCGGCUGCCCCGGC	94	1697	GCCGGGGCAGCCGGGGUC	508
1695	CGCCGCGCGGGGCGUJCG	95	1695	CGCCGCGCGGGGCGUJCG	95	1715	CGCAGGCCCGCGCGGGCG	509
1713	GCUCAGCCCGGUGCCACCU	96	1713	GCUCAGCCCGGUGCCACCU	96	1733	AGGUGGCACCGGGCUGAGC	510
1731	UGUGUCCACCUUGGCCUUC	97	1731	UGUGUCCACCUUGGCCUUC	97	1751	GAGGCCAGGUGGACCACA	511
1749	CCGCCAAGCCGCGACGAC	98	1749	CCGCCAAGCCGCGACGAC	98	1769	GUCGUCGCCGCUUGGCGG	512
1767	CUUCUCCCGCCUACCGC	99	1767	CUUCUCCCGCCUACCGC	99	1787	GCGGUAGCGGGGAGGAAAG	513
1785	CGGCGACUUCGCGGAGAU	100	1785	CGGCGACUUCGCGGAGAU	100	1805	CAUCUCGGCGAAGUCGCCG	514
1803	GUCCAGCCAGCUGCACCUG	101	1803	GUCCAGCCAGCUGCACCUG	101	1823	CAGGUGCAGCUGGCGUGGAC	515

【 0 3 4 0 】

【表 7】

1821	GACGCCUUCACCGCGCGG	102	1821	GACGCCUUCACCGCGCGG	102	1841	CCGGCGGUGAAGGGCGUC	516
1839	GGGACGCUUUGCCACGGUG	103	1839	GGGACGCUUUGCCACGGUG	103	1859	CACCGUGGCAAAGCGUCCC	517
1857	GGUGGAGGAGCUCUUCAGG	104	1857	GGUGGAGGAGCUCUUCAGG	104	1877	CCUGAAGAGCUCUCCACC	518
1875	GGACGGGUGAACUGGGGG	105	1875	GGACGGGUGAACUGGGGG	105	1895	CCCCAGUUCACCCCGUCC	519
1893	GAGGAUUGGGCCUUCUUU	106	1893	GAGGAUUGGGCCUUCUUU	106	1913	AAAGAAAGCCACAUAUCCUC	520
1911	UGAUUCGGUGGGGUCAUU	107	1911	UGAUUCGGUGGGGUCAUU	107	1931	CAUACCCACCCGAACUCA	521
1929	GUGUGGAGAGCGUCAAC	108	1929	GUGUGGAGAGCGUCAAC	108	1949	GUUGACGCUCUCCACACAC	522
1947	CCGGGAGAUUCGCCCCUG	109	1947	CCGGGAGAUUCGCCCCUG	109	1967	CAGGGCGACAUUCGCCCGG	523
1965	GGUGGACAAUCAUCGCCCCUG	110	1965	GGUGGACAAUCAUCGCCCCUG	110	1985	CAGGGCGAUGUUGUCCACC	524
1983	GUGGAUGACUGAGUACCUG	111	1983	GUGGAUGACUGAGUACCUG	111	2003	CAGGUACUCAGUCAUCCAC	525
2001	GAACCGCACCCUGCACACC	112	2001	GAACCGCACCCUGCACACC	112	2021	GGUGUGCAGGUGCCGGUUC	526
2019	CUGGAUCCAGGAUAACGGA	113	2019	CUGGAUCCAGGAUAACGGA	113	2039	UCCGUUAUCCUGGAUCCAG	527
2037	AGGCUGGGAUGCCUUGUG	114	2037	AGGCUGGGAUGCCUUGUG	114	2057	CACAAAGGCAUCCCGAGCCU	528
2055	GGAACUGUACGGCCCCAGC	115	2055	GGAACUGUACGGCCCCAGC	115	2075	GCUGGGCCGUACAGUUC	529
2073	CAUGCGGCCUCUGUUUGAU	116	2073	CAUGCGGCCUCUGUUUGAU	116	2093	AUCAAACAGAGCCCGCAUG	530
2091	UUUCUCCUGGCUGUCUCUG	117	2091	UUUCUCCUGGCUGUCUCUG	117	2111	CAGAGACAGCCAGGAGAAA	531
2109	GAAGACUCUGCUCAGUUUG	118	2109	GAAGACUCUGCUCAGUUUG	118	2129	CAAACUGAGCAGAGUCUUC	532
2127	GGCCUGGUGGGAGCUUUGC	119	2127	GGCCUGGUGGGAGCUUUGC	119	2147	GCAAGCUCGCCACCCAGGGCC	533
2145	CAUCACCCUGGGUGCCUUAU	120	2145	CAUCACCCUGGGUGCCUUAU	120	2165	AUAGGCACCCAGGGUGAUG	534
2163	UCUGAGCCACAAGUGAAGU	121	2163	UCUGAGCCACAAGUGAAGU	121	2183	ACUUCACUUGUGGCUCAGA	535
2181	UCAACAUCCUGCCCCAAA	122	2181	UCAACAUCCUGCCCCAAA	122	2201	UUUGGGCAGGCAUUGUUA	536
2199	ACAAUUAUGCAAAAAGGUUC	123	2199	ACAAUUAUGCAAAAAGGUUC	123	2219	GAACCUUUUGCAUUAUUUGU	537
2217	CACUAAAGCAGUAGAAAUA	124	2217	CACUAAAGCAGUAGAAAUA	124	2237	UAUUUCUACUGCUUUAGUG	538
2235	AAUAUGCAUUGUCAGUGAU	125	2235	AAUAUGCAUUGUCAGUGAU	125	2255	AUCACUGACAUAUGCAUUAU	539
2253	UGUACCAUGAAAACAAGCU	126	2253	UGUACCAUGAAAACAAGCU	126	2273	AGCUUUUUUCAUGGUACA	540
2271	UGCAGGCUGUUUAAGAAAA	127	2271	UGCAGGCUGUUUAAGAAAA	127	2291	UUUUUCUAAAACAGCCUGCA	541
2289	AAUAACACACAUUAUAAAC	128	2289	AAUAACACACAUUAUAAAC	128	2309	GUUUUAUUGUGUUAUUU	542
2307	CAUCACACACACAGACAGA	129	2307	CAUCACACACACAGACAGA	129	2327	UCUGUCUGUGUGUGUGAUG	543
2325	ACACACACACACACAACAA	130	2325	ACACACACACACACAACAA	130	2345	UUGUUGUGUGUGUGUGUUGU	544
2343	AUUAACAGUCUUCAGGCAA	131	2343	AUUAACAGUCUUCAGGCAA	131	2363	UUGCCUGAAGACUGUUAU	545
2361	AAACGUCGAAUACAGCUAUU	132	2361	AAACGUCGAAUACAGCUAUU	132	2381	AAUAGCUGAUUCGCGUUAU	546
2379	UUACUGCCAAAAGGAAAUA	133	2379	UUACUGCCAAAAGGAAAUA	133	2399	UAUUUUUUUUUGGCAGUAA	547
2397	AUCAUUUUUUUUUJACAUU	134	2397	AUCAUUUUUUUUUJACAUU	134	2417	AAUGUAAAAAAUAAUUAU	548
2415	UAUUAAAGAAAAAGAUUUA	135	2415	UAUUAAAGAAAAAGAUUUA	135	2435	UAAAUUUUUUUUUUUAUUA	549
2433	AUUUAUUUAAGACAGUCCC	136	2433	AUUUAUUUAAGACAGUCCC	136	2453	GGGACUGUCUUAUUAAUUAU	550
2451	CAUCAAAACUCCGUCUUUG	137	2451	CAUCAAAACUCCGUCUUUG	137	2471	CAAAGACGGAGUUUUUGAUG	551

【 0 3 4 1 】

【 8 0 3 4 2 1 】

2469	GGAAUCCGACCACUAAUU	138	2469	GGAAUCCGACCACUAAUU	138	2489	AAUJAGUGGUCGGAUUUCC	552
2487	UGCCAAACACCGUUCGUG	139	2487	UGCCAAACACCGUUCGUG	139	2507	CACGAAGCGGUGUUUGGCA	553
2505	GUGGCUCCACCGUGGAUGU	140	2505	GUGGCUCCACCGUGGAUGU	140	2525	AACAUCAGGUGGAGCCAC	554
2523	UCUGUGCCUGUAAACAUAG	141	2523	UCUGUGCCUGUAAACAUAG	141	2543	CUAUGUUUACAGGCACAGA	555
2541	GAUUCGCUUCCAUUGUUGU	142	2541	GAUUCGCUUCCAUUGUUGU	142	2561	ACAACAUGGAAAGCGGAUUC	556
2559	UUGCCGGGAUCACCAUCUG	143	2559	UUGCCGGGAUCACCAUCUG	143	2579	CAGAUUGGUAUCCGGCCAA	557
2577	GAAGAGCAGACGGAUUGGAA	144	2577	GAAGAGCAGACGGAUUGGAA	144	2597	UJCCAUCGUCUJGCUUUC	558
2595	AAAAGGACCUGAUCAUUJGG	145	2595	AAAAGGACCUGAUCAUUJGG	145	2615	CCAUAUAUCAGGUCCUUUU	559
2613	GGGAAGCUGGCUUUCUJGGC	146	2613	GGGAAGCUGGCUUUCUJGGC	146	2633	GCCAGAAAGCCAGCUUCC	560
2631	CUGCUGGAGGCCUGGGGAGA	147	2631	CUGCUGGAGGCCUGGGGAGA	147	2651	UCUCCCCAGCCUCCAGCAG	561
2649	AAGGUGUUCAUUCACUUGC	148	2649	AAGGUGUUCAUUCACUUGC	148	2669	GCAAGUGAAUUAACACCUU	562
2667	CAUUUCUUUGCCUUGGGGG	149	2667	CAUUUCUUUGCCUUGGGGG	149	2687	CCCCAGGGCAAGAAUUG	563
2685	GCGUGAUUUUAACAGAGGG	150	2685	GCGUGAUUUUAACAGAGGG	150	2705	CCUCUGUUAAUAUCACGC	564
2703	GAGGGUCCCGUGGGGGGA	151	2703	GAGGGUCCCGUGGGGGGA	151	2723	UCCCCCACGGGAACCCUC	565
2721	AAGUCCAUJCCUCCUJGGC	152	2721	AAGUCCAUJCCUCCUJGGC	152	2741	GCCAGGGAGGCAUJGACUU	566
2739	CCUGAAGAAGAGACUCUUU	153	2739	CCUGAAGAAGAGACUCUUU	153	2759	AAAGAGUCUCUUCUJGAGG	567
2757	UGCAUJAGACUCACAUAGAU	154	2757	UGCAUJAGACUCACAUAGAU	154	2777	AUCAUGUGAGUCAUJGCA	568
2775	UGCAUJACCUJGGUGGGAGGA	155	2775	UGCAUJACCUJGGUGGGAGGA	155	2795	UCCUCCCCACCGAUJGCA	569
2793	AAAAGAGUJGGGAACUJCA	156	2793	AAAAGAGUJGGGAACUJCA	156	2813	UGAAGUUCCCAACUCUUUU	570
2811	AGAUGGACCUJAGUACCCAC	157	2811	AGAUGGACCUJAGUACCCAC	157	2831	GUGGGUACUAGGUCCAUCU	571
2829	CUGAGAUUUCACGCGCGAA	158	2829	CUGAGAUUUCACGCGCGAA	158	2849	UUCGGCGUGGAAAUUCUCAG	572
2847	AGGACAGCGAUJGGGAAAAA	159	2847	AGGACAGCGAUJGGGAAAAA	159	2867	UUUUUCCCCAUCGCGUGCCU	573
2865	AUGCCUUAAAUAUCAUAGGA	160	2865	AUGCCUUAAAUAUCAUAGGA	160	2885	UCCUAUGAUUUAAAGGGCAU	574
2883	AAAGUAUUUUUUUAAGCUA	161	2883	AAAGUAUUUUUUUAAGCUA	161	2903	UAGCUUAAAATAAAUAUCUUU	575
2901	ACCAAUUGUGCCGAGAAAA	162	2901	ACCAAUUGUGCCGAGAAAA	162	2921	UUUUCUCGGCACAAUJGGU	576
2919	AGCAUUUUJAGCAUUUUUA	163	2919	AGCAUUUUJAGCAUUUUUA	163	2939	UAUAAAUIUGCUAAAAGUCU	577
2937	ACAAUAUCAUCCAGUACCU	164	2937	ACAAUAUCAUCCAGUACCU	164	2957	AGGUACUGGAUGAUUUGU	578
2955	UAAAACCCUJAGUUGUUAU	165	2955	UAAAACCCUJAGUUGUUAU	165	2975	AUACACAUCAGGGUUUJAA	579
2973	UAUUCAUUAUUUUUGGAUA	166	2973	UAUUCAUUAUUUUUGGAUA	166	2993	UAUCCAAAUAUUAUGAAUA	580
2991	ACGCACCCUCCACUCCCA	167	2991	ACGCACCCUCCACUCCCA	167	3011	UGGGAGUUGGGGGGUGCGU	581
3009	AAUACUGGCUCUGUCUGAG	168	3009	AAUACUGGCUCUGUCUGAG	168	3029	CUCAGACAGAGCCAGUUAU	582
3027	GUAAGAAAACAGAAUCCUCU	169	3027	GUAAGAAAACAGAAUCCUCU	169	3047	AGAGGAUUCUGUUUCUJAC	583
3045	UGGAACUUJAGGAAGUGAA	170	3045	UGGAACUUJAGGAAGUGAA	170	3065	UUCACUJCCUCAAGUJCCA	584
3063	ACAUUCGGUJGACUUCCGA	171	3063	ACAUUCGGUJGACUUCCGA	171	3083	UCGGAAGUCACCCGAAUUGU	585
3081	AUCAGGAAGGCUJAGAGUUA	172	3081	AUCAGGAAGGCUJAGAGUUA	172	3101	UAACUCUJAGCCUUCUUGAU	586
3099	ACCCAGAGCAUCAGGGCCGC	173	3099	ACCCAGAGCAUCAGGGCCGC	173	3119	GCGGCCUUGAUGCUCUUGGGU	587

【 0 3 4 2 1 】

【 9 冊 】

3117	CCACAAGUGCCUGCUUUUA	174	3117	CCACAAGUGCCUGCUUUUA	174	3137	UAAAAGCAGGCACUUGUGG	588
3135	AGGAGACCGAAGUCCGCAG	175	3135	AGGAGACCGAAGUCCGCAG	175	3155	CUGCGGACUUCGGUCUCU	589
3153	GAACCUACCUUGUCCCCAG	176	3153	GAACCUACCUUGUCCCCAG	176	3173	CUGGGACACAGGUAGGUUC	590
3171	GCUUGGAGGCCUGGUCCUG	177	3171	GCUUGGAGGCCUGGUCCUG	177	3191	CAGGACCAGGCCUCCAAGC	591
3189	GGAACUGAGCCGGCCUC	178	3189	GGAACUGAGCCGGCCUC	178	3209	GAGGGCCCGGCUAGUJCC	592
3207	CACUGCCUCCUCCAGGGA	179	3207	CACUGCCUCCUCCAGGGA	179	3227	UCCUUGGAGGAGGCCAGUG	593
3225	AUGAUAACAGGGUAGUGU	180	3225	AUGAUAACAGGGUAGUGU	180	3245	ACACUACCCUUGUUAUCAU	594
3243	UGGUCUCCGAAUUCUGGA	181	3243	UGGUCUCCGAAUUCUGGA	181	3263	UCCAGACAUCCGGAGACCA	595
3261	AAGCUGAUGGAGGAGCUC	182	3261	AAGCUGAUGGAGGAGCUC	182	3281	GAGCUCCAUCUACAGCUU	596
3279	CAGAAUCCACUGUCAAGA	183	3279	CAGAAUCCACUGUCAAGA	183	3299	UCUUGACAGUGGAAUUCUG	597
3297	AAAGAGCAGUAGGGGUG	184	3297	AAAGAGCAGUAGGGGUG	184	3317	CACCCUUCUACUUCUCUUU	598
3315	GUGGCGCCUCCAGGACCC	185	3315	GUGGCGCCUCCAGGACCC	185	3335	GGGUGACAGGCCCCAGCCAC	599
3333	CUGGGCCUCCAGGUAGG	186	3333	CUGGGCCUCCAGGUAGG	186	3353	CCUACCUUGGAGGCCCCAG	600
3351	GCCCGUUUCACGUGGAGC	187	3351	GCCCGUUUCACGUGGAGC	187	3371	GCUCCACGUGAAAACGGGC	601
3369	CAUAGGAGCCACGACCCUU	188	3369	CAUAGGAGCCACGACCCUU	188	3389	AAGGGUCUGGGUCUUAUG	602
3387	UCUUAAAGACAUUAUCACU	189	3387	UCUUAAAGACAUUAUCACU	189	3407	AGUGAUACAUGUCUUAAGA	603
3405	UGUAGAGGGAAGAACAGA	190	3405	UGUAGAGGGAAGAACAGA	190	3425	UCUGUUCCUUCUUAACA	604
3423	AGGCCUUGGCCUUCUUAU	191	3423	AGGCCUUGGCCUUCUUAU	191	3443	AUAGGAAGGCCAGGGCCU	605
3441	UCAGAAGGACAUUGGUGAAG	192	3441	UCAGAAGGACAUUGGUGAAG	192	3461	CUUACCAUGUCCUUCUGA	606
3459	GGCUGGGAACGUGAGGAGA	193	3459	GGCUGGGAACGUGAGGAGA	193	3479	UCUCCUCACGUAUCCAGCC	607
3477	AGGCAUUGGCCACGGCCCA	194	3477	AGGCAUUGGCCACGGCCCA	194	3497	UGGGCCGUGGCCAUUUGCU	608
3495	AUUUUGGCUUAGCACAUG	195	3495	AUUUUGGCUUAGCACAUG	195	3515	CAUGUGCUACAGCCAAAUA	609
3513	GGCACGUUGGCUUGUGGC	196	3513	GGCACGUUGGCUUGUGGC	196	3533	GCCACACAGCCAACGUGCC	610
3531	CCUJGGCCACCUJGAGUU	197	3531	CCUJGGCCACCUJGAGUU	197	3551	AACUCACAGGUGGCCAAGG	611
3549	UUAAAGCAAGGCUUUAAA	198	3549	UUAAAGCAAGGCUUUAAA	198	3569	AUUAAAAGCCUUGCUUAAA	612
3567	UGACUUUGGAGAGGGUCAC	199	3567	UGACUUUGGAGAGGGUCAC	199	3587	GUGACCCUCCCAAAGUCA	613
3585	CAAUCCUAAAAGAGCAU	200	3585	CAAUCCUAAAAGAGCAU	200	3605	AUGCUUCUUUJAGGAUUUG	614
3603	UUGAAGUGAGGUGUCAUGG	201	3603	UUGAAGUGAGGUGUCAUGG	201	3623	CCAUAGACACCUCACUJCAA	615
3621	GAUUAAUUGACCCUUGUCU	202	3621	GAUUAAUUGACCCUUGUCU	202	3641	AGACAGGGGCUCAAUUAUC	616
3639	UAUGGAAUUACAUGUAAAA	203	3639	UAUGGAAUUACAUGUAAAA	203	3659	UUUUACAUGUAUJCCAUA	617
3657	ACAUUAUCUUGUCACUGUA	204	3657	ACAUUAUCUUGUCACUGUA	204	3677	UACAGUGACAAGAUJAAUGU	618
3675	AGUUUGGUUUUJUUUGAAA	205	3675	AGUUUGGUUUUJUUUGAAA	205	3695	UUUJAAAUAJAAAACCAACU	619
3693	AACCUGACAAAAAAAAGU	206	3693	AACCUGACAAAAAAAAGU	206	3713	ACUUUUUUUUJUGCAGGUU	620
3711	UUCCAGGUGUGGAAUJUGG	207	3711	UUCCAGGUGUGGAAUJUGG	207	3731	CCAUUUUCCACACCUGGAA	621
3729	GGGUUAUCUJGUAUCUCCU	208	3729	GGGUUAUCUJGUAUCUCCU	208	3749	AGGAUGUACAGAUJAAACCC	622
3747	UGGGGCAUUJAAAAAAAUA	209	3747	UGGGGCAUUJAAAAAAAUA	209	3767	AUUUUUUUUUUAUJGCCCCA	623

【 0 3 4 3 】

【表 10】

3765	UCAUUGGUGGGGAACUAUA	210	3765	UCAUUGGUGGGGAACUAUA	210	3785	UAUAGUUCCCCACCAUUGA	624
3783	AAAGAAGUAACAAAAGAAG	211	3783	AAAGAAGUAACAAAAGAAG	211	3803	CUUCUUUUGUJACUUCUUU	625
3801	GUGACAUUCUUCAGCAAUA	212	3801	GUGACAUUCUUCAGCAAUA	212	3821	UAUUUGCUGAAGAUGUCAC	626
3819	AAACUAGGAAUUUUUUUU	213	3819	AAACUAGGAAUUUUUUUU	213	3839	AAAAAAUUUCCUAGUUU	627
3837	UUUUCCAGUUUAGAAUCA	214	3837	UUUUCCAGUUUAGAAUCA	214	3857	UGAUUCUAAACUGGAAGAA	628
3855	AGCCUUGAAACAUUGAUGG	215	3855	AGCCUUGAAACAUUGAUGG	215	3875	CCAUCAAUGUUUCAAGGCU	629
3873	GAUAAACUCUGUGGCAUUA	216	3873	GAUAAACUCUGUGGCAUUA	216	3893	UAUUGCCACAGAGUUUJUC	630
3891	AUUGCAUUUAUUAACCAUUU	217	3891	AUUGCAUUUAUUAACCAUUU	217	3911	AAUUGGUUAUUAUUGCAAU	631
3909	UAUCUGUAUUAAACUUUGGA	218	3909	UAUCUGUAUUAAACUUUGGA	218	3929	UCCAAAGUUAUAJACAGAU	632
3927	AAUGUACUCUGUUCAAUGU	219	3927	AAUGUACUCUGUUCAAUGU	219	3947	ACAUUGAACAGAGUJACAU	633
3945	UUUAAUGCUGUGGUJUGAU	220	3945	UUUAAUGCUGUGGUJUGAU	220	3965	UAUCAACCACAGCAUJAAA	634
3963	AUUUCGAAAGCUGCUUJAA	221	3963	AUUUCGAAAGCUGCUUJAA	221	3983	UUAAGCAGCUUUCGAAAU	635
3981	AAAAAUACAUGCAUCUCA	222	3981	AAAAAUACAUGCAUCUCA	222	4001	UGAGAUUGCAUGUUAUUUUU	636
3999	AGCGUUUUUUUGUUUUJAA	223	3999	AGCGUUUUUUUGUUUUJAA	223	4019	UUAAAAACAAAAAACCGCU	637
4017	AUUGUAUUUAGUUUUGGCC	224	4017	AUUGUAUUUAGUUUUGGCC	224	4037	GGCCAUAAACUAAAUAACAAU	638
4035	CUAUACACAUUUUGUGAGC	225	4035	CUAUACACAUUUUGUGAGC	225	4055	GCUCACAAAUAUGUUAUJAG	639
4053	CAAAGGUGAUCGUUUUCUG	226	4053	CAAAGGUGAUCGUUUUCUG	226	4073	CAGAAAACGAUCACCUUUG	640
4071	GUUUGAGAUUUUAUCUCU	227	4071	GUUUGAGAUUUUAUCUCU	227	4091	AGAGAUAAAAAUUCJCAAAC	641
4089	UUGAUUCUCAAAGCAUU	228	4089	UUGAUUCUCAAAGCAUU	228	4109	AAUGCUUUUGAAGAUAUCA	642
4107	UCUGAGAAAGGUGAGAUAG	229	4107	UCUGAGAAAGGUGAGAUAG	229	4127	CUUAUCACCCUUCUCAGA	643
4125	GCCUUGAGUCUCAGCUACC	230	4125	GCCUUGAGUCUCAGCUACC	230	4145	GGUAGCUGAGACUCAGGGC	644
4143	CUAAGAAAACCCUGGAUGU	231	4143	CUAAGAAAACCCUGGAUGU	231	4163	ACAUCCAGGUUUUUUCUJAG	645
4161	UCACUGGCCACUGAGGAGC	232	4161	UCACUGGCCACUGAGGAGC	232	4181	GCUCCUCAGUGGCCAGUGA	646
4179	CUUUUUUAACCAAGUCA	233	4179	CUUUUUUAACCAAGUCA	233	4199	UGACUUGGUUGAACAACAAG	647
4197	AUGUGCAUUUCCACGUCAA	234	4197	AUGUGCAUUUCCACGUCAA	234	4217	UUGACGUGGAAAUGCACAU	648
4215	ACAGAAUUUUUAUUGUGA	235	4215	ACAGAAUUUUUAUUGUGA	235	4235	UCACAUAUAAACAUAUCUGU	649
4233	ACAGUUUAUUCUGUUGUCC	236	4233	ACAGUUUAUUCUGUUGUCC	236	4253	GGACAACAGAUUAUAACUGU	650
4251	CCUUUGACCUUUGUUUCUUG	237	4251	CCUUUGACCUUUGUUUCUUG	237	4271	CAAGAAACAAGGUCAAAAGG	651
4269	GAAGGUUUCCUCGUCUCCUG	238	4269	GAAGGUUUCCUCGUCUCCUG	238	4289	CAGGGACGAGGAAAACCUUC	652
4287	GGCAAUUCCGCAUUUJAAU	239	4287	GGCAAUUCCGCAUUUJAAU	239	4307	AUUAAUUGCGGAAUJGCCC	653
4305	UUCAUUGUAUUCAGGAUUA	240	4305	UUCAUUGUAUUCAGGAUUA	240	4325	UAUCCUGAAUJACCAUGAA	654
4323	ACAUUGAUUUUGGUUJAAA	241	4323	ACAUUGAUUUUGGUUJAAA	241	4343	UUUAACCAACAUGCAUGU	655
4341	ACCAUGAGAUUCAUUCAG	242	4341	ACCAUGAGAUUCAUUCAG	242	4361	CUGAAUGAAUCUCAUGGGU	656
4359	GUUAAAAUCCAGAUUGGCG	243	4359	GUUAAAAUCCAGAUUGGCG	243	4379	CGCCAUUCUGGAUUUUJAAAC	657
4377	GAUAGACCAGCAGAUUCA	244	4377	GAUAGACCAGCAGAUUCA	244	4397	UUGAAUCUGCUGGUJCAUUC	658
4395	AAUCUUGGUGGUUUUGACC	245	4395	AAUCUUGGUGGUUUUGACC	245	4415	GGUCAAAACCAACAUAJAGAU	659

【 表 1 1 】

4413	CUUUAGAGAGUUGCUUUUAC	246	4413	CUUUAGAGAGUUGCUUUUAC	246	4433	GUAAAACAACUCUCUAAAAG	660
4431	CGUGGCCUGUUUUAACACACA	247	4431	CGUGGCCUGUUUUAACACACA	247	4451	UGUGUUUUAACACAGGCCACG	661
4449	AGACCCACCCAGAGCCUCUC	248	4449	AGACCCACCCAGAGCCUCUC	248	4469	GAGGGUCUCUGGGUGGGUCUC	662
4467	CCUGCCUCUCUCCGCGGG	249	4467	CCUGCCUCUCUCCGCGGG	249	4487	CCCGGGAAGGAGGGCAGG	663
4485	GGGCUUUCUUAUGGUCUGUC	250	4485	GGGCUUUCUUAUGGUCUGUC	250	4505	GACAGCCAUUGAGAAAGCCC	664
4503	CCUUCAGGGUCUCCUGAA	251	4503	CCUUCAGGGUCUCCUGAA	251	4523	UUCAGGAAGACCCUGAAGG	665
4521	AAUGCAGUGGUCGUUACGC	252	4521	AAUGCAGUGGUCGUUACGC	252	4541	GCGUAAACGACCCACUGCAUU	666
4539	CUCCACCAAGAAAGCAGGA	253	4539	CUCCACCAAGAAAGCAGGA	253	4559	UCCUGCUUUUUGGUGGAG	667
4557	AAACCUUGGUAUGAAGCC	254	4557	AAACCUUGGUAUGAAGCC	254	4577	GGCUUCAUACCCACAGGUUU	668
4575	CAGACCUCCCGCGGGCC	255	4575	CAGACCUCCCGCGGGCC	255	4595	GGCCCGCCGGGGAGGUCUG	669
4593	CUCAGGGAAACAGAAUGAUC	256	4593	CUCAGGGAAACAGAAUGAUC	256	4613	GAUCAUUCUGUUCUCCUGAG	670
4611	CAGACCUUUGAAUGAUUCU	257	4611	CAGACCUUUGAAUGAUUCU	257	4631	AGAAUCAUUCAAAGGUCUCG	671
4629	UAAUUUUUAAGCAAAAUU	258	4629	UAAUUUUUAAGCAAAAUU	258	4649	AUAUUUUGCUUAAAAUUUA	672
4647	UUAUUUUUAAGAAAGGUUUA	259	4647	UUAUUUUUAAGAAAGGUUUA	259	4667	UAAACCUUUCUAAAAUUUA	673
4665	ACAUUGUCAAAUGUAUGAA	260	4665	ACAUUGUCAAAUGUAUGAA	260	4685	UUCAUCACUUAUGACAAUGU	674
4683	AUAUGGAAUUAUCCAUCCU	261	4683	AUAUGGAAUUAUCCAUCCU	261	4703	AGGAUUGGAUUAUCCAUU	675
4701	UGUGCUGCUAUCCUGCCAA	262	4701	UGUGCUGCUAUCCUGCCAA	262	4721	UUGGCAGGAUAGCAGCACA	676
4719	AAUCAUUUUUAUUGGAGUC	263	4719	AAUCAUUUUUAUUGGAGUC	263	4739	GACUCCAUUAAAAUUGAUUU	677
4737	CAGUUUGCAGUAUGCUCCA	264	4737	CAGUUUGCAGUAUGCUCCA	264	4757	UGGAGCAUACUGCAAAACUG	678
4755	ACGUGGUAAGAUCCUCCAA	265	4755	ACGUGGUAAGAUCCUCCAA	265	4775	UUGGAGGAUUCUACCACGU	679
4773	AGCUGCUUUAGAAGUAACA	266	4773	AGCUGCUUUAGAAGUAACA	266	4793	UGUUACUUAUAAAGCAGCU	680
4791	AAUGAAGAACGUGGACGUU	267	4791	AAUGAAGAACGUGGACGUU	267	4811	AACGUCCACGUCUUCUUAU	681
4809	UUUUAAUUAUAAAGCCUGUU	268	4809	UUUUAAUUAUAAAGCCUGUU	268	4829	AACAGGCUUUUAUUAAAA	682
4827	UUUGUCUUUUUUGUUGUU	269	4827	UUUGUCUUUUUUGUUGUU	269	4847	AACAACAACAAAAGACAAA	683
4845	UCAACGGGAUUCACAGAG	270	4845	UCAACGGGAUUCACAGAG	270	4865	CUCUGGAUCCCGUUUUGA	684
4863	GUUUUGAAAAAUUGUAUU	271	4863	GUUUUGAAAAAUUGUAUU	271	4883	AUAUACAUUUUUUCAAAUAC	685
4881	UAUAUUAAGAGGUCACGGG	272	4881	UAUAUUAAGAGGUCACGGG	272	4901	CCCGUGACCUCUUUAUUUA	686
4899	GGGCUAAUUGCUAGCUGGC	273	4899	GGGCUAAUUGCUAGCUGGC	273	4919	GCCAGCUAGCAUUAAGCCC	687
4917	CUGCCUUUUGCUGUGGGGU	274	4917	CUGCCUUUUGCUGUGGGGU	274	4937	ACCCACAGCAAAAAGGCAG	688
4935	UUUUGUUACCUUGGUUUUA	275	4935	UUUUGUUACCUUGGUUUUA	275	4955	UUAAAAACCAGGUACAAAA	689
4953	AUAACAGUAAUUGGCCCA	276	4953	AUAACAGUAAUUGGCCCA	276	4973	UGGGCACAUUUAUCUGUUU	690
4971	AGCCUCUUGGCCCCAGAAC	277	4971	AGCCUCUUGGCCCCAGAAC	277	4991	GUUCUGGGCCCAAGAGGCU	691
4989	CUGUACAGUAAUUGGCCUG	278	4989	CUGUACAGUAAUUGGCCUG	278	5009	CAGCCACAAUACUGUACAG	692
5007	GCACUUGCUCUAAAGAGUAG	279	5007	GCACUUGCUCUAAAGAGUAG	279	5027	CUACUCUUAGAGCAAGUGC	693
5025	GUUGAUUGCAUUUUCCU	280	5025	GUUGAUUGCAUUUUCCU	280	5045	AGGAAAAUUGCAACAUCAAC	694
5043	UUUUUUUUAAAAACAUGUU	281	5043	UUUUUUUUAAAAACAUGUU	281	5063	AACAUGUUUUUUAAAAUUUA	695

【 0 3 4 5 】

【表 1 2】

5061	UAGAAGCAAUGAAUGUAUA	282	5061	UAGAAGCAAUGAAUGUAUA	282	5081	UAUACAUUCAUUGCUUCUA	696
5079	AUAAAAGCCUCUACUAGUC	283	5079	AUAAAAGCCUCUACUAGUC	283	5099	GACUAGUUGAGGCUUUUAU	697
5097	CAUUUUUUUCUCCUCUUCU	284	5097	CAUUUUUUUCUCCUCUUCU	284	5117	AGAAGAGGAGAAAAAAAUUG	698
5115	UUUUUUUUCAUUUAUUCUA	285	5115	UUUUUUUUCAUUUAUUCUA	285	5135	UAGAUUAUAUGAAAAAAAU	699
5133	AAUUAAUUUUGCAGUUGGGC	286	5133	AAUUAAUUUUGCAGUUGGGC	286	5153	GCCCAACUGCAAAAUAAUU	700
5151	CAACAGAGAACCACUCCUA	287	5151	CAACAGAGAACCACUCCUA	287	5171	UAGGGUUGGUUCUCUGUUG	701
5169	AUUUUGUAUUGAAGAGGGA	288	5169	AUUUUGUAUUGAAGAGGGA	288	5189	UCCUCUUCAAUACAAAAU	702
5187	AUUCACAUUCGCAUCUJAA	289	5187	AUUCACAUUCGCAUCUJAA	289	5207	UUAAGAUGCAGAUUGUAU	703
5205	ACUGCUCUUUAUGAAUGAA	290	5205	ACUGCUCUUUAUGAAUGAA	290	5225	UUCAUUCAUAAAGAGCAGU	704
5223	AAAAACAGUCCUCUGUAUG	291	5223	AAAAACAGUCCUCUGUAUG	291	5243	CAUACAGAGGACUGUUUUU	705
5241	GUACUCCUCUUACACUGG	292	5241	GUACUCCUCUUACACUGG	292	5261	CCAGUGUAAGAGGAGUAC	706
5259	GCCAGGGUCAGAGUUAAAU	293	5259	GCCAGGGUCAGAGUUAAAU	293	5279	AUUUAACUCUGACCCUGGC	707
5277	UAGAGUAUUGCACUUUCC	294	5277	UAGAGUAUUGCACUUUCC	294	5297	GGAAGUGCAUAUACUCUA	708
5295	CAAAUUGGGACAAAGGGCU	295	5295	CAAAUUGGGACAAAGGGCU	295	5315	AGCCCUUGUCCCAAUUUG	709
5313	UCUAAAAAAGCCCAAAA	296	5313	UCUAAAAAAGCCCAAAA	296	5333	UUUUGGGCUUUUUUUAAGA	710
5331	AGGAGAAGAACAUCUGAGA	297	5331	AGGAGAAGAACAUCUGAGA	297	5351	UCUCAGAUUUCUUCUCU	711
5349	AACUCCUCGGCCUCCCA	298	5349	AACUCCUCGGCCUCCCA	298	5369	UGGGAGGCGGAGGAGGU	712
5367	AGUCCUCGUCACAAAU	299	5367	AGUCCUCGUCACAAAU	299	5387	AUUUGCAGCGAGGGACU	713
5385	UACUCCGCAAGAGAGGCCA	300	5385	UACUCCGCAAGAGAGGCCA	300	5405	UGCCUCUCUUGCGGAGUA	714
5403	AGAAUGACAGCUGACAGGG	301	5403	AGAAUGACAGCUGACAGGG	301	5423	CCUGUCAGCUGUCAUUCU	715
5421	GUCUUGGCCAUCCGGUUCG	302	5421	GUCUUGGCCAUCCGGUUCG	302	5441	CGACCCGAUGGCCAUJAGAC	716
5439	GUCUCCGAAGAUUUUGGCAG	303	5439	GUCUCCGAAGAUUUUGGCAG	303	5459	CUGCCAAUUCUUCGGAGAC	717
5457	GGGCAGAAAACUCUGGCA	304	5457	GGGCAGAAAACUCUGGCA	304	5477	UGCCAGAGUUUUCUGCCCC	718
5475	AGGCUUAAGAUUUUGGAAUA	305	5475	AGGCUUAAGAUUUUGGAAUA	305	5495	UAUUCCAAUCUUAAGCCU	719
5493	AAAGUCACAGAAUCAAGGA	306	5493	AAAGUCACAGAAUCAAGGA	306	5513	UCCUUGAUUCUGUGACUUU	720
5511	AAGCACCUCAAUUJAGUUC	307	5511	AAGCACCUCAAUUJAGUUC	307	5531	GAACUAAAUUGAGGUGCUU	721
5529	CAAAACAAGACGCCAACAUU	308	5529	CAAAACAAGACGCCAACAUU	308	5549	AAUGUUGGGUCUUGUUUG	722
5547	UCUCUCCACAGCUCACUUA	309	5547	UCUCUCCACAGCUCACUUA	309	5567	UAAGUUGAGCUGUGGAGAGA	723
5565	ACCUCUCUGUGUUCAGAUJ	310	5565	ACCUCUCUGUGUUCAGAUJ	310	5585	CAUCUGAACACAGAGAGGU	724
5583	GUGGCCUUCCAUUUAUJAG	311	5583	GUGGCCUUCCAUUUAUJAG	311	5603	CAUUAUUUGGAAAGGCCAC	725
5601	GUGAUCUUUGUUUUUAUJAG	312	5601	GUGAUCUUUGUUUUUAUJAG	312	5621	CUAAUAAAACAAGAUACAC	726
5619	GUAAAUGCUUAUCAUCUAA	313	5619	GUAAAUGCUUAUCAUCUAA	313	5639	UUAGAUGUAAGCAUUAUAC	727
5637	AAGAUUAGCUCUGGCCCA	314	5637	AAGAUUAGCUCUGGCCCA	314	5657	UGGGCCAGAGCUACAUCUU	728
5655	AGUGGGAUAAUJAGGAAG	315	5655	AGUGGGAUAAUJAGGAAG	315	5675	CUUCCUAAUUUUUCCACU	729
5673	GUGAUUAUAAUUCGAGAGG	316	5673	GUGAUUAUAAUUCGAGAGG	316	5693	CCUCUCGAUUUAUUAUCAC	730
5691	GAGUUUAUAAUUAUCAAGAU	317	5691	GAGUUUAUAAUUAUCAAGAU	317	5711	AUCUUGAUUAUUAUAACUC	731

【 表 1 3 】

5709	UUAAAUGUAAAUAUCAGG	318	5709	UUAAAUGUAAAUAUCAGG	318	5729	CCUGAUUUUUACAUUUAA	732
5727	GGCAAUCCCAACACAUUGUC	319	5727	GGCAAUCCCAACACAUUGUC	319	5747	GACAUUGUUGGGAUUGCC	733
5745	CUAGCUUUCACCUCCAGGA	320	5745	CUAGCUUUCACCUCCAGGA	320	5765	UCCUGGAGGUGAAAAGCUAG	734
5763	AUCUAAUUGAGUGAACAGAA	321	5763	AUCUAAUUGAGUGAACAGAA	321	5783	UUCUGUUCACUCAAUAGAU	735
5781	AUUGCAAAUAGUCUCUAUU	322	5781	AUUGCAAAUAGUCUCUAUU	322	5801	AAUAGAGACUAAUUGCAAU	736
5799	UUUAUUUGAACUUAUCCU	323	5799	UUUAUUUGAACUUAUCCU	323	5819	AGGAUAAUUAUUAUACAA	737
5817	UAAAACAUAUAGUUUAUA	324	5817	UAAAACAUAUAGUUUAUA	324	5837	UUUAAAACUUAUUGUUUA	738
5835	AUUGUAAAUUAACUCUA	325	5835	AUUGUAAAUUAACUCUA	325	5855	UAGAGUUUAAGUUCACAUU	739
5853	AAUUAUUCCAACUGUACU	326	5853	AAUUAUUCCAACUGUACU	326	5873	AGUACAGUUGGAUUUAUU	740
5871	UUUAAGGCAGUGGCUGUU	327	5871	UUUAAGGCAGUGGCUGUU	327	5891	AACAGCCACUGCCUUAAAA	741
5889	UUUAAGACUUUCUAUCAC	328	5889	UUUAAGACUUUCUAUCAC	328	5909	GUGAUAAAGAAAGUCUAAAA	742
5907	CUUAUAGUUAGUAUUGUAC	329	5907	CUUAUAGUUAGUAUUGUAC	329	5927	GUACAUUACUAAACUAUAAAG	743
5925	CACCUACUCUAUCAGAGAA	330	5925	CACCUACUCUAUCAGAGAA	330	5945	UUCUCUGAUAGAGUAGGUG	744
5943	AAAACAGGAAAGGCUCGAA	331	5943	AAAACAGGAAAGGCUCGAA	331	5963	UUCGAGCCUUCUCCUGUUUU	745
5961	AAUACAAGCCAUUCUJAAGG	332	5961	AAUACAAGCCAUUCUJAAGG	332	5981	CCUUAAGAUUGGCUUGUAUU	746
5979	GAAUUAGGGAGUCAGUUG	333	5979	GAAUUAGGGAGUCAGUUG	333	5999	CAACUGACUCCCUAAUUUC	747
5997	GAAUUUCUUAUCUGAUCUU	334	5997	GAAUUUCUUAUCUGAUCUU	334	6017	AAGAUACAGAAUAGAAUUUC	748
6015	UAUUCUGUGGUCUUUUUG	335	6015	UAUUCUGUGGUCUUUUUG	335	6035	CAAAAGACACCACAGAAUA	749
6033	GCAGCCCAGACAAUUGUGG	336	6033	GCAGCCCAGACAAUUGUGG	336	6053	CCACAUUUGUCUGGCGUCG	750
6051	GUUACACACUUUUUAAGAA	337	6051	GUUACACACUUUUUAAGAA	337	6071	UUCUUAAAAAGUGUGUAAC	751
6069	AAUACA AUUCUAUCAUUGUC	338	6069	AAUACA AUUCUAUCAUUGUC	338	6089	GACAAUGUAGAAUUUGUAUU	752
6087	CAAGCUUAUUGAAGGUUCCA	339	6087	CAAGCUUAUUGAAGGUUCCA	339	6107	UGGAAACCUUCAUAAAGCUUG	753
6105	AAUCAGAUUUUAUUGUUA	340	6105	AAUCAGAUUUUAUUGUUA	340	6125	UAACA AUUAAGAUUCUGAUUU	754
6123	AUJCAAUUUUGAUUCUUA	341	6123	AUJCAAUUUUGAUUCUUA	341	6143	UGAAAAGAUCCAAAUUGAAU	755
6141	AGGGAUUUUUUUUUUAUU	342	6141	AGGGAUUUUUUUUUUAUU	342	6161	AUUUAAAAAUAUUUUUUUUUU	756
6159	UUUUUUUGGACAAAGGAC	343	6159	UUUUUUUGGACAAAGGAC	343	6179	GUCCUUUGUCCCAUUAUUA	757
6177	CAUUUUGUUGAGGGGUGGG	344	6177	CAUUUUGUUGAGGGGUGGG	344	6197	CCCACCCUCCCAACAAUUG	758
6195	GAGGGAGGAACA AUUUUUA	345	6195	GAGGGAGGAACA AUUUUUA	345	6215	UAAAAUUUUGUUCUCCUCCUC	759
6213	AAAUUAAAACA AUUCUCCAA	346	6213	AAAUUAAAACA AUUCUCCAA	346	6233	UUGGGAUUGUUUUUAUUAUUU	760
6231	AGUUUGAUUCAGGGAGUUG	347	6231	AGUUUGAUUCAGGGAGUUG	347	6251	CAACUCCUUGAUUCUCCAAACU	761
6249	GGAAGUUUUCAGAAUAACC	348	6249	GGAAGUUUUCAGAAUAACC	348	6269	GGUUUAUUCUGAAAACUUCUCC	762
6267	CAGAACUAAGGGUUAUGAAG	349	6267	CAGAACUAAGGGUUAUGAAG	349	6287	CUUCAUACCCUJAGUUCUG	763
6285	GGACCUUAUUUGGGUUCGA	350	6285	GGACCUUAUUUGGGUUCGA	350	6305	UCGACCCCAUJACAGGUCUCC	764
6303	AUGUGAUGCCUUCUGCGAAG	351	6303	AUGUGAUGCCUUCUGCGAAG	351	6323	CUUCGCAGAGGCAUCACAU	765
6321	GAACCUUGUGUGACAAUUG	352	6321	GAACCUUGUGUGACAAUUG	352	6341	CAUUUUGCACACAAGGUUC	766
6339	GAGAAACA AUUUUGAAGUUU	353	6339	GAGAAACA AUUUUGAAGUUU	353	6359	AAACUUCAAAAUGUUUCUC	767

【 0 3 4 7 】

【 表 1 4 】

6357	UGUGGUACGACCCUUUAGAU	354	6357	UGUGGUACGACCCUUUAGAU	354	6377	AUCUAAAGGUJCGUACCACA	768
6375	UUCAGAGACAUACAGCAUG	355	6375	UUCAGAGACAUACAGCAUG	355	6395	CAUGCUGAUGUCUCUGGAA	769
6393	GGUCUCAAAGUCAGCUCCG	356	6393	GGUCUCAAAGUCAGCUCCG	356	6413	CGGAGCUGCACUUGAGCC	770
6411	GUUJGGCAGUGCAAUGGUA	357	6411	GUUJGGCAGUGCAAUGGUA	357	6431	UACCAUUGCACUGCCAAAC	771
6429	AUAAAUUJCAAGCUGGUA	358	6429	AUAAAUUJCAAGCUGGUA	358	6449	UAUCCAGCUJGAAAUUUU	772
6447	AUGUCUAAUGGGUAAUUA	359	6447	AUGUCUAAUGGGUAAUUA	359	6467	UUAAAUACCCAUUJAGACAU	773
6465	AACAUAUAAUGUGCAGUUU	360	6465	AACAUAUAAUGUGCAGUUU	360	6485	AAACUGGCACAUUUUUGUU	774
6483	UUAACUAACAGGAUUAUUA	361	6483	UUAACUAACAGGAUUAUUA	361	6503	UAAAUUCCUGUUUAGUUA	775
6501	AAUGACAACCUUCUGGUUG	362	6501	AAUGACAACCUUCUGGUUG	362	6521	CAACCAGAAGGUJGUCAUU	776
6519	GGUJGGCACAUCUGUUCU	363	6519	GGUJGGCACAUCUGUUCU	363	6539	AGAAACAGAUJGCCCCUACC	777
6537	UAAAUJGUUUAUUAUGUACA	364	6537	UAAAUJGUUUAUUAUGUACA	364	6557	UGUACAUAAUAAACAUUUA	778
6555	AAUACAGAAAAAAUUUUA	365	6555	AAUACAGAAAAAAUUUUA	365	6575	UAAAAUUUUUUUCUGUAAU	779
6573	AUAAAAUJAAAGCAAUGUGA	366	6573	AUAAAAUJAAAGCAAUGUGA	366	6593	UCACAUUGCUUAAUUUUU	780
6591	AAACUGAAUJGGAGAGUGA	367	6591	AAACUGAAUJGGAGAGUGA	367	6611	UCACUCUCCAUAUCAGUUU	781
6609	AUAUAACAAGUCCUUUAGU	368	6609	AUAUAACAAGUCCUUUAGU	368	6629	ACUAAAGGACUUUGUAAU	782
6627	UCUUACCCAGUGAAUCAU	369	6627	UCUUACCCAGUGAAUCAU	369	6647	AAUGAUUCACUGGGUAAGA	783
6645	UCUGUUCCAUUCUUUUGGA	370	6645	UCUGUUCCAUUCUUUUGGA	370	6665	UCCAAAGACAUUGGAACAGA	784
6663	ACAACCAUGACCUUGGACA	371	6663	ACAACCAUGACCUUGGACA	371	6683	UGUCCAAGGUCAUGGUUGU	785
6681	AAUCAUGAAAUUUGCAUCU	372	6681	AAUCAUGAAAUUUGCAUCU	372	6701	AGAUGCAUUAUJCAUGAUU	786
6699	UCACUGGAUGCAAAGAAAA	373	6699	UCACUGGAUGCAAAGAAAA	373	6719	UUUUUUUUUGCAUCCAGUGA	787
6717	AUCAGAUJGGAGCAUGAAUG	374	6717	AUCAGAUJGGAGCAUGAAUG	374	6737	CAUUAUGCUCCAUUCUGAU	788
6735	GGUACUGUACCGGUUCAUC	375	6735	GGUACUGUACCGGUUCAUC	375	6755	GAUGAACCGGUACAGUACC	789
6753	CUGGACUGCCCCAGAAAA	376	6753	CUGGACUGCCCCAGAAAA	376	6773	UUUUUCUGGGCAGUCCAG	790
6771	AUAACUUAAGCAAACAUC	377	6771	AUAACUUAAGCAAACAUC	377	6791	GAUGUUUGCUUGAAGUUU	791
6789	CCUAUCAACAACAAGGUUG	378	6789	CCUAUCAACAACAAGGUUG	378	6809	CAACCUUGUUUGUUGAUAGG	792
6807	GUUCUGCAUACCAAGCUGA	379	6807	GUUCUGCAUACCAAGCUGA	379	6827	UCAGCUJGGUJGUAJGCAAGC	793
6825	AGCACAGAAAGUJGGAAACA	380	6825	AGCACAGAAAGUJGGAAACA	380	6845	UGUJCCCAUCUUCUGUGCU	794
6843	ACUJGGUGGAGGAUGGAAAG	381	6843	ACUJGGUGGAGGAUGGAAAG	381	6863	CUUJCCAUCUCCACCAGU	795
6861	GGUCJGCUCAAUCAAGAAA	382	6861	GGUCJGCUCAAUCAAGAAA	382	6881	UUUCUJGUAUUGAGCGAGCC	796
6879	AUUUCJGAGACUUAUUAUA	383	6879	AUUUCJGAGACUUAUUAUA	383	6899	UAUUAAUJAGUCUCAGAAU	797
6897	AAUAAGACUJGAGUGUAG	384	6897	AAUAAGACUJGAGUGUAG	384	6917	CUACACUACAGUCUUAUUU	798
6915	GAUACUGAGUAAAUCCAU	385	6915	GAUACUGAGUAAAUCCAU	385	6935	CAUGGAUUUACUCAGUAUC	799
6933	GCACCUAAACCUUUUGGAA	386	6933	GCACCUAAACCUUUUGGAA	386	6953	UUCCAAAGGUUUUAGGUGC	800
6951	AAUCUGCCGUGGGCCUUC	387	6951	AAUCUGCCGUGGGCCUUC	387	6971	GAGGGCCACGGCAGAUUU	801
6969	CCAGAUAGCUCAUUUUCAU	388	6969	CCAGAUAGCUCAUUUUCAU	388	6989	AAUGAAUUGAGCUAUCUGG	802
6987	UAAGUUUUUCCCUCCAAGG	389	6987	UAAGUUUUUCCCUCCAAGG	389	7007	CCUJGGAGGGAAAAACUUA	803

【 0 3 4 8 】

【表 1 5】

7005	GUAGAAUUUGCAAGAGUGA	390	7005	GUAGAAUUUGCAAGAGUGA	390	7025	UCACUCUUUGCAAAUUCUAC	804
7023	ACAGUGGAAUUGCAUUCUU	391	7023	ACAGUGGAAUUGCAUUCUU	391	7043	AAGAAUUGCAAUCCACUGU	805
7041	UUUGGGGAAGCUUCUUUU	392	7041	UUUGGGGAAGCUUCUUUU	392	7061	AAAAGAAAGCUUCGCCAAA	806
7059	UGGUGUUUUGUUUUUUUU	393	7059	UGGUGUUUUGUUUUUUUU	393	7079	AUAAUAAACAAAACCACCA	807
7077	UACCUUCUUAAGUUUUCAA	394	7077	UACCUUCUUAAGUUUUCAA	394	7097	UUGAAAACUUUAAAGAGGUA	808
7095	ACCAAGUUUGUUUUUGUU	395	7095	ACCAAGUUUGUUUUUGUU	395	7115	AACAAAAGCAAAACCUUGGU	809
7113	UUUGAGUUACUGGGUUUU	396	7113	UUUGAGUUACUGGGUUUU	396	7133	AUAACCCAGUAACUCAAA	810
7131	UUUUUGUUUAAAUAAAAA	397	7131	UUUUUGUUUAAAUAAAAA	397	7151	UUUUUUUUUUAAAAACAAA	811
7149	AUAAGUGUACAAUAAAGUGU	398	7149	AUAAGUGUACAAUAAAGUGU	398	7169	ACACUUUUUGUACACUUUU	812
7167	UUUUUGUUUUGAAAGCUUU	399	7167	UUUUUGUUUUGAAAGCUUU	399	7187	AAAGCUUUUCAUUAACAAAA	813
7185	UUGUUUACAAGAUUUUCAU	400	7185	UUGUUUACAAGAUUUUCAU	400	7205	AUGAAAUCUUUGAUAAACAA	814
7203	UACUUUUACCUUCCAUUGC	401	7203	UACUUUUACCUUCCAUUGC	401	7223	GCCAUUGGAAGGUAAAAAGUA	815
7221	CUCUUUUAAAGAUUGUAC	402	7221	CUCUUUUAAAGAUUGUAC	402	7241	GUUCAAUCUUUAAAAAGAG	816
7239	CUUUUAAAGAGGUGGUGAU	403	7239	CUUUUAAAGAGGUGGUGAU	403	7259	AUCAGCCACCUCUUUAAAAAG	817
7257	UAUUCUGCAACACUGUACA	404	7257	UAUUCUGCAACACUGUACA	404	7277	UGUACAGUGUUUGCAGAAUA	818
7275	ACAUAAAAAUACGGUAAAG	405	7275	ACAUAAAAAUACGGUAAAG	405	7295	CUUACCGUAUUUUUUUUUGU	819
7293	GGUACUUUACAUGGUUAA	406	7293	GGUACUUUACAUGGUUAA	406	7313	UUAAACCAUGUAAAAAGUAUCC	820
7311	AGGUAAAAGUAAGUCUCAG	407	7311	AGGUAAAAGUAAGUCUCAG	407	7331	CUGGAGACUUACUUUACCUCU	821
7329	GUUGGCCACCAUUUAGCUAU	408	7329	GUUGGCCACCAUUUAGCUAU	408	7349	AUAGCUAAUUGGUGGCCAAC	822
7347	UAAUGGCACUUUUGUUUGUG	409	7347	UAAUGGCACUUUUGUUUGUG	409	7367	CACAAACAAAAGUGCCAUUA	823
7365	GUUGUUUGGAAAAAGUCACA	410	7365	GUUGUUUGGAAAAAGUCACA	410	7385	UGUGACUUUUUCCAAACAAC	824
7383	AUUGCCAUUAAACUUUCCU	411	7383	AUUGCCAUUAAACUUUCCU	411	7403	AGGAAAGUUUAAUUGGCAAU	825
7401	UUUCUCUGUCUAGUUAAUUAU	412	7401	UUUCUCUGUCUAGUUAAUUAU	412	7421	AUAUUAAACUAGACAGACAAA	826
7419	UUUGAAGAAAAAUAAAGU	413	7419	UUUGAAGAAAAAUAAAGU	413	7439	ACUUUUUUUUUUCUUCACAA	827
7433	AAAGUACAGUGUGAGAUAC	414	7433	AAAGUACAGUGUGAGAUAC	414	7453	GUUUCUCACACUCUGUACUUU	828

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

【表 16】

表 III: BCL2 合成修飾 siRNA コンストラクト

標的位置	標的	配列番号	RPI番号	別名	配列	配列番号
2098	UGGCUUCUCUGAAGACUCUCUGCU	829	30997	BCL2:2100U21 siRNA sense	GCUGUCUCUGAAGACUCUCUGTT	833
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	30998	BCL2:3222U21 siRNA sense	GGGAUGAUCACACAGGGUAGTT	834
4426	CUUUACGUGGCCUGUUUCAACAC	831	30999	BCL2:4428U21 siRNA sense	UUACGUGGCCUGUUUCAACTT	835
6231	AGUUUGGAUCAGGGAGUUUGGAAG	832	31000	BCL2:6233U21 siRNA sense	UUUGGAUCAGGGAGUUUGGATT	836
2098	UGGCUUCUCUGAAGACUCUCUGCU	829	31073	BCL2:2118L21 siRNA (2100C) antisense	CAGAGUCUUCAGAGACAGCTT	837
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	31074	BCL2:3240L21 siRNA (3222C) antisense	CUACCCUGUUGAUCAUCCCTT	838
4426	CUUUACGUGGCCUGUUUCAACAC	831	31075	BCL2:4446L21 siRNA (4428C) antisense	GUUGAAACAGGCCACGUAATT	839
6231	AGUUUGGAUCAGGGAGUUUGGAAG	832	31076	BCL2:6251L21 siRNA (6233C) antisense	UCCAACUCCUGAUCUCCAAATT	840
2098	UGGCUUCUCUGAAGACUCUCUGCU	829	30737	BCL2:2100U21 siRNA stab04 sense	B GcuGucucucUGAAGAcucucGTT B	841
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	31368	BCL2:3222U21 siRNA stab04 sense	B GGGAuGAucAAcAGGGGuAGTT B	842
4426	CUUUACGUGGCCUGUUUCAACAC	831	30739	BCL2:4428U21 siRNA stab04 sense	B uuAcGuGGccuGuuuAcAcTT B	843
6231	AGUUUGGAUCAGGGAGUUUGGAAG	832	30740	BCL2:6233U21 siRNA stab04 sense	B uuUGGAucAGGGAGuuGGATT B	844
2098	UGGCUUCUCUGAAGACUCUCUGCU	829	30741	BCL2:2118L21 siRNA (2100C) stab05 antisense	cAGAGucuuAcAGAGAcAGcTsT	845
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	31369	BCL2:3240L21 siRNA (3222C) stab05 antisense	cuAcccuGuuGAucAuuccTsT	846
4426	CUUUACGUGGCCUGUUUCAACAC	831	30743	BCL2:4446L21 siRNA (4428C) stab05 antisense	GuuGAAAcAGGccAcGuAAATsT	847
6231	AGUUUGGAUCAGGGAGUUUGGAAG	832	30744	BCL2:6251L21 siRNA (6233C) stab05 antisense	uccAAcucccuGAuccAAATsT	848
2098	UGGCUUCUCUGAAGACUCUCUGCU	829		BCL2:2100U21 siRNA stab07 sense	B GcuGucucucUGAAGAcucucGTT B	849
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	31372	BCL2:3222U21 siRNA stab07 sense	B GGGAuGAucAAcAGGGGuAGTT B	850
4426	CUUUACGUGGCCUGUUUCAACAC	831		BCL2:4428U21 siRNA stab07 sense	B uuAcGuGGccuGuuuAcAcTT B	851
6231	AGUUUGGAUCAGGGAGUUUGGAAG	832		BCL2:6233U21 siRNA stab07 sense	B uuUGGAucAGGGAGuuGGATT B	852
2098	UGGCUUCUCUGAAGACUCUCUGCU	829		BCL2:2118L21 siRNA (2100C) stab11 antisense	cAGAGucuuAcAGAGAcAGcTsT	853
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	31373	BCL2:3240L21 siRNA (3222C) stab11 antisense	cuAcccuGuuGAucAuuccTsT	854
4426	CUUUACGUGGCCUGUUUCAACAC	831		BCL2:4446L21 siRNA (4428C) stab11 antisense	GuuGAAAcAGGccAcGuAAATsT	855
6231	AGUUUGGAUCAGGGAGUUUGGAAG	832		BCL2:6251L21 siRNA (6233C) stab11 antisense	uccAAcucccuGAuccAAATsT	856
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	31370	BCL2:3222U21 siRNA inv stab04	B GAUGGGGAcAAcAGuAGGGGTT B	857
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	31371	BCL2:3240L21 siRNA (3222C) inv stab05	cccuAcuAGuuGucccAucTsT	858
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	31374	BCL2:3222U21 siRNA inv stab07	B GAUGGGGAcAAcAGuAGGGGTT B	859
3220	CAGGGAUGAUCACACAGGGUAGUG	830	31375	BCL2:3240L21 siRNA (3222C) inv stab11	cccuAcuAGuuGucccAucTsT	860

大文字 = リボスクレオチド

u,c = 2'-デオキシ-2-フルオロ U,C

T = チミン

B = 反転デオキシ無塩基

s = ホスホロチオエート結合

A = デオキシアデニン

G = デオキシグアニン

表IV

化学的に修飾されたsiNA構築物用の安定化化学の非限定的例

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

Cap = 任意の末端キャップ, 例えば, 図 10 を参照。

Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミン(T) 残基を含むことができる。

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

S = センズ鎖

AS = アンチセンス鎖

【表 18】

## 表 V

A. 2.5  $\mu$ mol 合成サイクル ABI 394 装置

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

10

B. 0.2  $\mu$ mol 合成サイクル ABI 394 装置

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

20

C. 0.2  $\mu$ mol 合成サイクル 96 ウェル装置

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

30

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

40

【図面の簡単な説明】

【0352】

【図1】図1は、s i N A 分子を合成するスキームの例を示す。

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

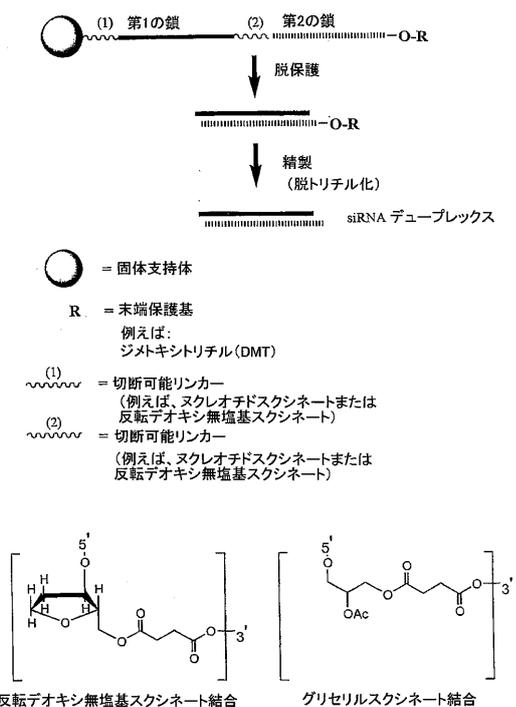
【図3】図3は、R N A i に関する標的 R N A 分解の提唱されるメカニズムの例を示す図である。

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

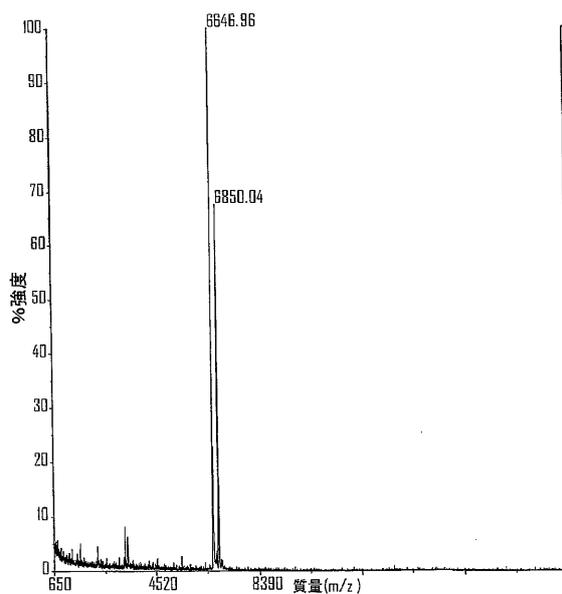
50

- 【図5】図5は、化学的に修飾された特定の siNA 配列の例を示す。
- 【図6】図6は、種々 siNA コンストラクトの例を示す。
- 【図7】図7は、siNA ヘアピンコンストラクトを生成するための発現カセットを作製するために用いられるスキームの概略図である。
- 【図8】図8は、発現カセットを作製して二本鎖 siNA コンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。
- 【図9】図9は、特定の標的核酸配列を決定するために用いられる方法の概略図である。
- 【図10】図10は、siNA 配列の 3' 末端を安定化させるために用いられることができる、種々の安定化化学の例を示す。
- 【図11】図11は、化学的に修飾された siNA コンストラクトを同定するために用いられる戦略の例を示す。
- 【図12】図12は、BCL2 mRNA を標的とする siNA により媒介される BCL2 mRNA の減少の例を示す。

【図1】



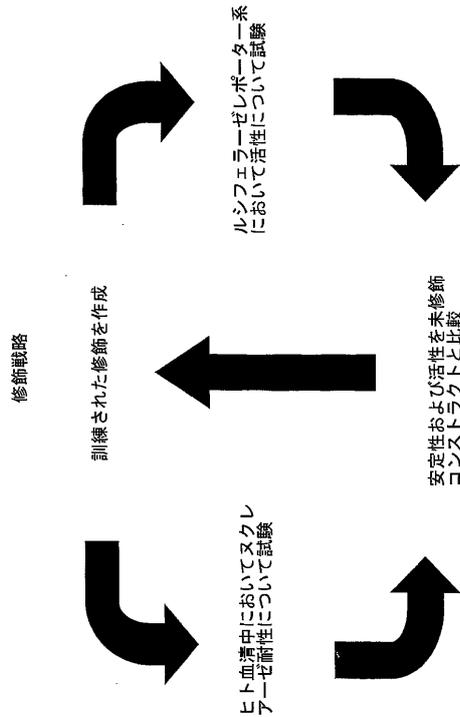
【図2】



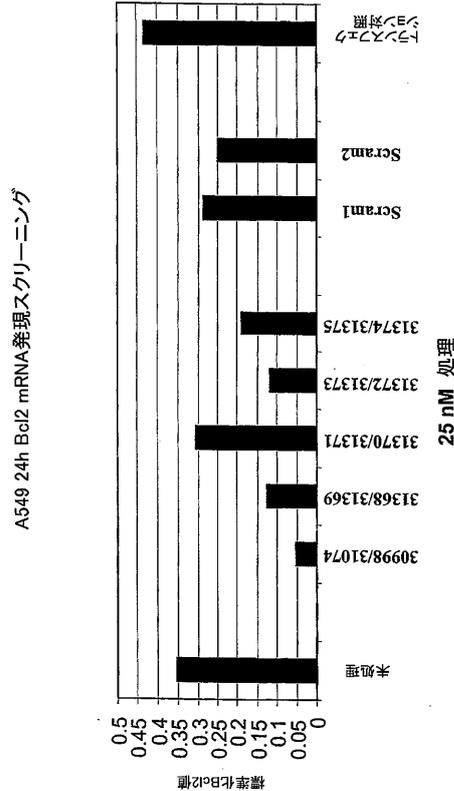




【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 手続 補正書 】

【 提出日 】 平成16年10月5日 (2004.10.5)

【 手続 補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

RNA 干渉により BCL2 RNA の切断を指示する化学的に合成された二本鎖短干渉核酸 ( siNA ) 分子であって、

- a . 前記 siNA 分子の各鎖は約 19 - 約 23 ヌクレオチドの長さであり；
  - b . 前記 siNA 分子の一方の鎖は前記 BCL2 RNA に対して siNA 分子が RNA 干渉により BCL2 RNA の切断を指示するのに十分な相補性を有するヌクレオチド配列を含み；および
  - c . 前記 siNA 分子は RNA 干渉を媒介するために 2' - ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない、
- ことを特徴とする siNA 分子。

【 請求項 2 】

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

【 請求項 3 】

前記 siNA 分子がリボヌクレオチドを含む、請求項 1 記載の siNA 分子。

【 請求項 4 】

前記二本鎖 siNA 分子の一方の鎖は BCL2 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、前記二本鎖 siNA 分子の第 2 の鎖は前記 BCL2

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

【請求項 5】

s i N A 分子の各鎖は約 19 - 約 23 ヌクレオチドを含み，各鎖は他方の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約 19 ヌクレオチドを含む，請求項 4 記載の s i N A 分子。

【請求項 6】

前記 s i N A 分子は B C L 2 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含み，前記 s i N A はさらにセンス領域を含み，前記センス領域は前記 B C L 2 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と実質的に類似するヌクレオチド配列を含む，請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 7】

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

【請求項 8】

前記 s i N A 分子はセンス領域およびアンチセンス領域を含み，前記アンチセンス領域は B C L 2 遺伝子によりコードされる R N A のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み，および前記センス領域は前記アンチセンス領域に相補的なヌクレオチド配列を含む，請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 9】

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

【請求項 10】

前記センス領域がリンカー分子を介してアンチセンス領域と連結されている，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 11】

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

【請求項 12】

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

【請求項 13】

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

【請求項 14】

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

【請求項 15】

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

【請求項 16】

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

【請求項 17】

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

【請求項 18】

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

【請求項 19】

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

【請求項 20】

前記アンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドが 2' - デオキシ - プリンヌクレオチドを含む，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 21】

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

【請求項 22】

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

【請求項 23】

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

【請求項 24】

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

【請求項 25】

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

【請求項 26】

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

【請求項 27】

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

【請求項 28】

アンチセンス領域の約 19 ヌクレオチドが B C L 2 遺伝子によりコードされる R N A のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している，請求項 23 記載の s i N A 分子。

【請求項 29】

アンチセンス領域の 21 ヌクレオチドが B C L 2 遺伝子によりコードされる R N A のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している，請求項 23 記載の s i N A 分子。

【請求項 30】

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

【請求項 31】

許容可能な担体または希釈剤中に請求項 1 記載の s i N A 分子を含む医薬組成物。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US03/04808

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C12N 15/63; C07H 21/02, 21/04; A01N 43/04 US CL : 435/6, 91.1, 91.31, 455; 514/44; 536/23.1, 24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.1, 91.31, 455; 514/44; 536/23.1, 24.5		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) West, Dialog		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	US 6,414,134 B1 (REED, J) 02 July 2002 (02.07.2002), see entire document, especially figures 2, 7, 8, 13; co. 6-9; claims 1-3.	1-32
Y	FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in <i>Caenorhabditis elegans</i> , Nature, 19 February 1998, Vol. 391, pages 806-811, see especially table 1 on page 807; figure 1 on page 808.	1-32
Y	NYKANEN, A. et al. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway, Cell, 2 November 2001, Vol. 107, pages 309-321, entire document, especially figure 6 on page 316.	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"G" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 08 SEPTEMBER 2003	Date of mailing of the international search report 20 OCT 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-9230	Authorized officer <i>Delicia D. Roberts for</i> Jane Zera Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US03/04908

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim
Y	US 5,877,309 A (MCKAY et al) 02 March 1999 (02.03.1999), see especially col. 6-15.	1-32

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/02	
	A 6 1 P 37/02	

- (31)優先権主張番号 60/396,905  
(32)優先日 平成14年7月18日(2002.7.18)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/406,784  
(32)優先日 平成14年8月29日(2002.8.29)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/408,378  
(32)優先日 平成14年9月5日(2002.9.5)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/409,293  
(32)優先日 平成14年9月9日(2002.9.9)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/440,129  
(32)優先日 平成15年1月15日(2003.1.15)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (74)代理人 100114465  
弁理士 北野 健  
(72)発明者 マクスウィゲン, ジェームズ  
アメリカ合衆国 8 0 3 0 1 コロラド州 ボールダー, フランクリン ドライブ 4 8 6 6  
(72)発明者 ベージェルマン, レオニド  
アメリカ合衆国 8 0 5 0 3 コロラド州 ロングモント, コルト ドライブ 5 5 3 0  
Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA80 CA01 CA04 CA11 DA02 GA11 HA14  
4C084 AA13 NA14 ZA022 ZA362 ZA682 ZA892 ZA942 ZB072 ZB112 ZB152  
ZB262 ZB272 ZB332 ZC352