



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：200927177

(43) 公開日：中華民國98(2009)年7月1日

(21) 申請案號：097140644

(22) 申請日：中華民國97(2008)年10月23日

(51) Int. Cl. : **A61K48/00 (2006.01)**
C12Q1/06 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

(30) 優先權主張：2007/10/24

日本

2007-276985

(71) 申請人：獨立行政法人產業技術總合研究所 NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

日本

大塚製藥股份有限公司 OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

日本

(72) 發明人：久保貴紀 KUBO, TAKANORI；大庭英樹 OHBA, HIDEKI；豐福秀一 TOYOBUKU, HIDEKAZU；林宏剛 HAYASHI, HIROTAKE

(72) 代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：10 共 64 頁

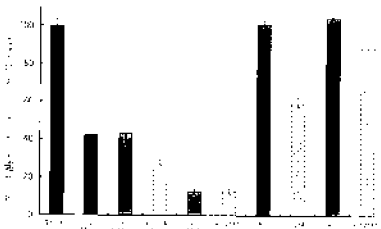
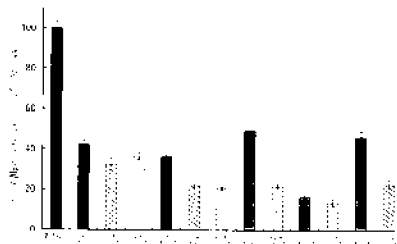
(54) 名稱

具有有效RNA干擾作用之經脂質修飾的雙股RNA

LIPID-MODIFIED DOUBLE-STRANDED RNA HAVING POTENT RNA INTERFERENCE EFFECT

(57) 摘要

本發明的一目標係提供一種具有高核酸酶抗性與高細胞攝取效率之新穎雙股RNA，及其可產生極佳的RNA干擾作用。本發明提供一種經脂質修飾的雙股RNA，其包括具有與一標的序列互補的一核苷酸序列之訊息股，及具有與該訊息股互補的一核苷酸序列之反訊息股，該雙股RNA可抑制標的基因之表現，該訊息股具有與5' 終端側的第一至第六個核苷酸中之至少一者直接或經由一連接子連接之一脂質。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：200927177

(43)公開日：中華民國98(2009)年7月1日

(21)申請案號：097140644

(22)申請日：中華民國97(2008)年10月23日

(51)Int. Cl. : **A61K48/00 (2006.01)**
C12Q1/06 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

(30)優先權主張：2007/10/24

日本

2007-276985

(71)申請人：獨立行政法人產業技術總合研究所 NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

日本

大塚製藥股份有限公司 OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

日本

(72)發明人：久保貴紀 KUBO, TAKANORI；大庭英樹 OHBA, HIDEKI；豐福秀一 TOYOBUKU, HIDEKAZU；林宏剛 HAYASHI, HIROTAKE

(72)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：10 共 64 頁

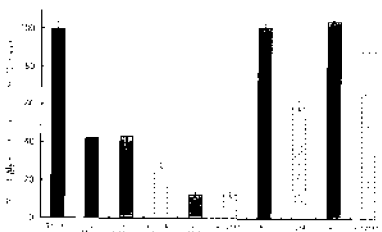
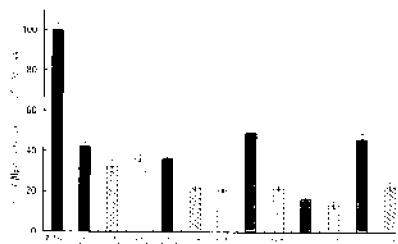
(54)名稱

具有有效RNA干擾作用之經脂質修飾的雙股RNA

LIPID-MODIFIED DOUBLE-STRANDED RNA HAVING POTENT RNA INTERFERENCE EFFECT

(57)摘要

本發明的一目標係提供一種具有高核酸酶抗性與高細胞攝取效率之新穎雙股RNA，及其可產生極佳的RNA干擾作用。本發明提供一種經脂質修飾的雙股RNA，其包括具有與一標的序列互補的一核苷酸序列之訊息股，及具有與該訊息股互補的一核苷酸序列之反訊息股，該雙股RNA可抑制標的基因之表現，該訊息股具有與5' 終端側的第一至第六個核苷酸中之至少一者直接或經由一連接子連接之一脂質。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明係關於一種經脂質修飾的雙股RNA，其可有效
5 抑制一標的基因之表現。更詳細地，本發明係關於一種經
脂質修飾的雙股RNA，其具有高核酸酶抗性及其高細胞攝取
效率，及產生極佳的RNA干擾作用。

【先前技術】

發明背景

10 研發用於有效治療棘手疾病諸如癌症與AIDS之藥
物，係生命科學領域所欲達成之重要目標。達成該目標之
一種可能方法，係使用僅作用於特定基因的基因藥物。特
別是使用一個具21鹼基長度的短雙股RNA(小型干擾
RNA：siRNA)之RNA干擾(RNAi)方法，最近在作為基因藥
15 物方面深受矚目。該RNAi方法最先由Fire等人於1998年提
出(見第1項非專利文件)。依據Fire等人的報告，當與欲抑
制其功能之一基因之一特定區域同源之一個約100鹼基對
的雙股RNA被導入細胞內時，該雙股RNA經Dicer的作用而
分解為約20至25鹼基對的片段，然後與多種蛋白質複合而
20 形成一種RNA/蛋白質複合體(該複合體稱作RISC：RNA誘
導型沈默化複合體)，其與標的基因所產生之mRNA的一同
源位址結合，及藉此有效地抑制基因表現。然而，據報導
當在哺乳動物細胞中導入約30鹼基對或更長的長雙股RNA
時，會誘發一種抗病毒反應的干擾素反應，因而造成細胞

凋亡現象。因此，認為難以將RNAi方法應用到哺乳動物。Tuschl等人因而以化學方式合成在3'端均具有懸擺端之一個具21個鹼基長度的雙股RNA，及據報導當將該雙股RNA直接導入哺乳動物細胞時，該雙股RNA能以具序列專一性的方式有效地抑制基因表現，同時避免干擾素反應(見第2項非專利文件)。Tuschl等人進一步合成包含一個19鹼基對的雙股區域及在3'或5'端具有不同長度的懸擺端之短雙股RNA。結果，觀察顯示在3'端均具有一個2鹼基的懸擺端之具21個鹼基長度的siRNA展現非常強效的RNA干擾作用，同時並無其他類型的短雙股RNA展現顯著的RNA干擾作用。基於該報告，一般所採用的RNA干擾方法，係使用在3'端均具有一個2鹼基的懸擺端之具21個鹼基長度的雙股RNA。使用一個具21個鹼基長度的短雙股RNA以抑制一標的基因表現之方法，在此稱作“siRNA方法”，以與RNAi方法區別。

因為siRNA方法使用合成的RNA，試樣的製備作用相對簡單，其處理也容易；而且，可產生非常有效的作用。因此，該siRNA方法不僅在生命科學領域深受矚目，在生物科技產業亦受到注意。

然而，該極佳的siRNA方法亦存在待解決的問題。如上述，siRNA係由隨時可被核酸酶的作用分解之一RNA分子所組成。相較於單股RNA，雙股RNA區域對於存在於基質及/一細胞中的核酸酶具有較高的抗性。然而，含有19鹼基對的雙股RNA鮮少產生該已知的RNA干擾作用。因此，曾

有報告指出當合成的siRNA被導入含有一標的基因序列的細胞中時，雖然在約2至4天的期間產生有效的基因表現抑制作用，之後其RNA干擾作用急劇降低，及在約7天內幾乎完全喪失。

- 5 最近曾有報告提出各種經化學修飾的siRNAs，以提供具有增進的細胞攝取效率及較久與高度有效的RNA干擾作用之合成siRNA。例如，為增進對核酸外切酶分解作用的抗性，已合成出在siRNA終端經一胺基、一硫醇基或一脫鹼基位點修飾之siRNA。然而，曾有報告指出，大部分具有21
10 個鹼基長度之經終端修飾的siRNA，具有明顯降低的RNA干擾作用。

最近幾年，J. Rossi等人的報告指出具有27個鹼基對長度的雙股RNA所產生之RNA干擾作用，比具有21個鹼基長度的雙股RNA高約100倍(見第3項非專利文件)。其可能因為
15 在具有27個鹼基對長度的RNA被RNase III類型的酵素、Dicer切成具有21個鹼基長度的siRNA之後，該蛋白質複合體RISC認得該siRNA，因此能以高效率產生siRNA的作用。

如上述，因為具有27個鹼基長度的RNA可產生極佳的RNA干擾作用，對於使用該RNA作為一基因藥物之期望與
20 日俱增。然而，對於具有27個鹼基長度的RNA而言，得以有效增進其RNA干擾作用之技術方法，迄今完全未知。此外，對於本身具有RNA干擾作用之短於或長於27個鹼基長度的雙股RNA而言，亦不清楚用於增進其RNA干擾作用之技術方法。

具有RNA干擾作用的雙股RNA，其構形一般具有一懸擺端。亦曾研究不具有懸擺端的RNA(亦即具有平整端)之RNA干擾作用。然而，結果顯示具有平整的訊息股5'端之雙股RNA，其RNA干擾作用實質上相同於或低於在訊息股5'端具有一懸擺端之雙股RNA(見第4項非專利文件)。

脂質的細胞膜滲透力高，及已知適用於將藥物輸送至細胞內。將該一脂質與具有RNA干擾作用的雙股RNA連接，預期可增加細胞攝取效率，及藉此產生更有效的RNA干擾作用。然而，已知若僅將一脂質與具有RNA干擾作用的雙股RNA連接，該RNA干擾作用將急劇降低。在習知技藝中，尚未建構出同時具有極佳的RNA干擾作用及基於一脂質的有用效應之一種經脂質修飾的雙股RNA。

第1項非專利文件：Fire等人於Nature第391期第806-811頁(1998年)乙文。

第2項非專利文件：Tuschl等人於EMBO期刊第20期第6877-6888頁(2001年)乙文。

第3項非專利文件：J. Rossi等人於Nature Biotech.第23期第222-226頁(2005年)乙文。

第4項非專利文件：J. T. Marques等人於Nature Biotech.第24期第559-565頁(2005年)乙文。

【發明內容】

發明概要

本發明欲解決之問題

本發明的一目標係提供一種具有高核酸酶抗性與高細

胞攝取效率之新穎雙股RNA，及其可產生極佳的RNA干擾作用。本發明的另一目標係提供一種含有該新穎雙股RNA之藥學組成物。本發明的另一目標係提供一種抑制一標的基因表現之方法，其包括將新穎的雙股RNA導入細胞內，

5 以抑制該標的基因之表現。

解決問題之方式

為達成上述目標，本案發明者進行廣泛的研究，及發現當一脂質直接或經由一連接子與雙股RNA之訊息股5'端的第一至第六個核苷酸中之至少一者連接，其中該訊息股

10 所具有的一核苷酸序列與一標的基因中之一標的序列互補，及一個反訊息股所具有的一核苷酸序列與該訊息股互補，此時該雙股RNA可抑制該標的基因之表現，依此方式所建構的雙股RNA具有高核酸酶抗性與高細胞攝取效率，及產生極佳的RNA干擾作用。本發明之完成，係以此項發

15 現為基礎而進一步研究之結果。

更詳細地，本發明提供下列經脂質修飾的雙股RNA、含有新穎雙股RNA的藥學組成物、抑制一標的基因表現之方法等。

第1項：一種經脂質修飾的雙股RNA，其包括具有與一

20 標的基因中之一標的序列互補的一核苷酸序列之訊息股，及具有與該訊息股互補的一核苷酸序列之反訊息股，該雙股RNA可抑制標的基因之表現，及該訊息股具有與5'端的第一至第六個核苷酸中之至少一者直接或經由一連接子連接之一脂質。

第2項：如第1項之一種經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'終端側為平整端，而訊息股的3'終端側為平整端或具有一懸擺端。

第3項：如第1項之一種經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'與3'終端側均具有懸擺端。

第4項：如第1至第3項中任一項之一種經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股具有21至27個核苷酸。

第5項：如第2項之一種經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'與3'終端側均為平整端，及其中各訊息股與反訊息股具有27個核苷酸。

第6項：如第2項之一種經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'與3'終端側均為平整端，及其中各訊息股與反訊息股具有23個核苷酸。

第7項：如第2項之一種經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'終端側為平整端，訊息股具有25個核苷酸，而反訊息股具有23個核苷酸。

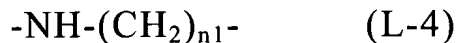
第8項：如第3項之一種經脂質修飾的雙股RNA，其中各訊息股與反訊息股具有21個核苷酸。

第9項：如第1至第8項中任一項之一種經脂質修飾的雙股RNA，其中該脂質係具有6至50個碳原子的脂肪酸。

第10項：如第1至第9項中任一項之一種經脂質修飾的雙股RNA，其中該脂質為十二烷酸、十八烷酸、十四烷酸或十六烷酸。

第11項：如第1至第10項中任一項之一種經脂質修飾的

雙股RNA，其中該脂質係經由一連接子而與訊息股5'端的第一至第六個核苷酸中之至少一者連接，該連接子係由下列構造式所代表：



5 其中n1為1至40之一整數。

第12項：一種藥學組成物，其包括如第1至第10項中任一項之一種經脂質修飾的雙股RNA，及一種藥學上可接受的主劑。

10 第13項：如第1至第10項中任一項之經脂質修飾的雙股RNA，其在製造用以抑制一標的基因表現之一種藥學組成物之用途。

第14項：一種抑制一標的基因表現之方法，其包括將如第1至第10項中任一項之經脂質修飾的雙股RNA導入細胞內，以抑制該標的基因之表現。

15 本發明之效用

本發明之經脂質修飾的雙股RNA，係以一脂質修飾訊息股的5'端，藉此產生顯著增加的RNA干擾作用。更詳細地，經脂質修飾的雙股RNA具有與RNA的一特定位點連接之一脂質，及因而具有顯著增進的核酸酶抗性及細胞攝取效率，且不損及Dicer的作用或RNA與RISC的結合，因而對於醫藥用途大有幫助。

即使單獨使用，本發明之經脂質修飾的雙股RNA具有極佳的細胞內輸送力。因而，毋需使用任一已知的基因轉染試劑，或以一較低量使用任一已知的基因轉染試劑，即

可將經脂質修飾的雙股RNA導入細胞內。因此，本發明之經脂質修飾的雙股RNA，可抑制因使用已知的基因轉染試劑時所擔憂之細胞毒性表現，藉此確保臨床應用的高度安全性。

- 5 因而，藉由使用本發明之藥學組成物，或藉由使用如本發明之抑制一標的基因表現之方法，可有效抑制或減弱該標的基因之表現。

【實施方式】

實施本發明之最佳模式

- 10 在本說明書中，“平整端”或“具平整端的”係指雙股RNA的終端構造，其中一訊息股終端區域中的鹼基係與跟該訊息股互補之反訊息股的終端區域中的鹼基配對，而不形成一個單股。“懸擺端”係指其中以單股存在而不形成雙股之一核苷酸序列的終端部份，其係因為在雙股RNA之訊息股的終端區域或者在與訊息股互補之反訊息股的終端區域，不存在互補鹼基。

本發明之經脂質修飾的雙股RNA包括一訊息股，其所具有之一核苷酸序列係與一標的基因中的一標的序列互補。

- 20 該標的基因在此係指其表現為RNA干擾作用所欲抑制者之一基因。對於本發明之經脂質修飾的雙股RNA之標的基因，並無特定限制，及可依據經脂質修飾的雙股RNA之所欲用途，而適宜地加以選擇。

對於標的基因中之標的序列並無特定限制，只要該基

因的表現可被該RNA干擾作用抑制即可。可依據已知方法，例如使用NCBI BLAST搜尋等，而適宜地決定標的序列。例如，標的序列可為包括該標的基因編碼區域(ORF)的啟始密碼往下游50至100個鹼基之外顯子區域“AA”鹼基

5 之後的19至30個鹼基的一區域，及其GC含量約為50%。在該領域中由經驗得知，使用與該一標的序列互補之一股，可獲致極佳的RNA干擾作用。例如，依據IDT的說明(整合DNA科技公司(Integrated DNA Technologies, Inc.)；Dicer受質RNAi之設計(Dicer Substrate RNAi Design)乙書)，可決

10 定標的序列。最近的一報告揭露，具有高RNA干擾作用的雙股RNA之製造，可藉由建構具有下列各者之雙股RNA而完成：(i)在反訊息股的5'端具有一個A/U對；(ii)在訊息股的5'端具有一個G/C對；及(iii)在反訊息股的5'端約有5個A/U對；及(iv)不具有9或更多個G/C對(Ui-Tei等人於Nucleic

15 Acids Res.第32期第936-948頁(2004年)乙文)。

當本發明之經脂質修飾的雙股RNA之訊息股不具有懸擺端時，該訊息股包含與該標的序列互補之一核苷酸序列。當訊息股在5'端及/或3'端具有一懸擺端時，該訊息股所包含之一核苷酸序列具有與該標的序列互補之一核苷酸

20 序列，及該懸擺端的一核苷酸序列與該互補的核苷酸序列之5'端及/或3'端連接。

只要可達成RNA干擾作用，對於構成本發明之經脂質修飾的雙股RNA的訊息股之核苷酸數目，並無特定限制，及可依據該雙股RNA的所欲構造而適宜地決定之。核苷酸

的數目通常為21至27個，較佳為21、23、25或27個，及更佳為21、23或27個。當訊息股不具有一個懸擺端時，構成訊息股的核苷酸數目，在此係指構成與標的序列互補之核苷酸序列的核苷酸總數。當訊息股具有一個懸擺端時，構成
5 成訊息股的核苷酸數目，係指構成該懸擺端的核苷酸數目及構成與標的序列互補之核苷酸序列的核苷酸數目之總和。本發明之經脂質修飾的雙股RNA包括一個反訊息股，其具有與訊息股互補的一核苷酸序列。

當本發明之經脂質修飾的雙股RNA之反訊息股不具有一個懸擺端時，該反訊息股所包括之一核苷酸序列係與訊息股之“與一標的序列互補的核苷酸序列”之一部份或全部互補。當反訊息股在5'端及/或3'端具有一個懸擺端時，該反訊息股所包括之一核苷酸序列係與訊息股之“與一標的序列互補的核苷酸序列”之一部份或全部互補；及與該反訊
10 息股的互補核苷酸序列之5'端及/或3'端連接之連接子的一核苷酸序列。只要可達成RNA干擾作用，對於構成本發明之經脂質修飾的雙股RNA的反訊息股之核苷酸數目，並無特定限制，及可依據該雙股RNA的所欲構造而適宜地決定之。核苷酸的數目通常為21至27個，較佳為21、23、25或
15 27個，及更佳為21、23或27個。當反訊息股不具有一個懸擺端時，構成反訊息股的核苷酸數目，係指構成與標的序列互補之核苷酸序列的核苷酸總數。當反訊息股具有一個懸擺端時，構成反訊息股的核苷酸數目，係指構成該懸擺端的核苷酸數目及構成與標的序列互補之核苷酸序列的核
20

苷酸數目之總和。

構成本發明之經脂質修飾的雙股RNA之訊息股與反訊息股的核苷酸，基本上為核糖核酸。為增進對於酵素分解作用的抗性，該RNA序列可含有各種經化學修飾的核苷酸，諸如經2'-氧-甲基修飾的核苷酸、經2'-氟修飾的核苷酸、LNA(鎖核酸)核苷酸、去氧核糖核酸等。特別地，當本發明之經脂質修飾的雙股RNA具有一個懸擺端時，訊息股及/或反訊息RNA的懸擺端可由去氧核糖核酸所組成。該等經化學修飾的核苷酸之實例包括：經磷酸鹽主鏈修飾的核苷酸，諸如經硫代磷酸鹽修飾的DNA/RNA與經硼烷磷酸鹽修飾的DNA/RNA；2'-修飾的核苷酸諸如經2'-氧甲基修飾的RNA及經2'-氟修飾的RNA；藉由將核苷酸的糖分子交聯而製得之修飾型核苷酸，諸如LNA(鎖核酸)與ENA(2'-氧、4'-碳-乙烯-橋接型核酸)；具有不同主鏈之修飾型核苷酸，諸如PNA(肽核酸)與嗎啉-核苷酸；鹼基修飾型核苷酸諸如5-氟尿嘧啶核苷與5-丙基尿嘧啶核苷等。

本發明之經脂質修飾的雙股RNA在構造上並無特定限制，只要訊息股與反訊息股可以雜交成為一個雙股即可。例如，經脂質修飾的雙股RNA較佳具有下列構造：構造(A)其中該雙股RNA在訊息股的5'終端側為平整的(亦即具有一個平整端)，及在訊息股的3'終端側為平整的或具有一個懸擺端(單股區域)；構造(B)其中該雙股RNA在訊息股的5'與3'終端側具有懸擺端。其中該雙股RNA在訊息股的3'終端側具有一個懸擺端之構造，係包括當訊息股的3'終端區域形

成一懸擺端之情況及當反訊息股的5'終端區域形成一懸擺端之情況。其中該雙股RNA在訊息股的5'終端側具有一個懸擺端之構造，係包括其中訊息股的5'終端區域形成一懸擺端之情況及其中反訊息股的3'終端區域形成一懸擺端之情況。

為進一步增進RNA干擾作用，可用於形成本發明之經脂質修飾的雙股RNA之雙股RNA，在該等具有上述(A)構造者之中，係以具有下列所示(A-1)至(A-3)構造的雙股RNA為特佳者，而在該等具有上述(B)構造者之中，係以具有下列所示(B-1)構造的雙股RNA為特佳者。(A-1)構造：其中雙股RNA之訊息股的5'與3'終端側均為平整端，及訊息與反訊息股各含有27個核苷酸；(A-2)構造：其中雙股RNA之訊息股的5'與3'終端側均為平整端，及訊息與反訊息股分別各含有23個核苷酸；(A-3)構造：其中雙股RNA之訊息股的5'終端側為平整端，訊息股含有25個核苷酸，而反訊息股含有23個核苷酸；及(B-1)構造：其中雙股RNA在訊息股的3'端與反訊息股的3'端均具有各含有2個核苷酸之一懸擺端，及訊息與反訊息股各含有21個核苷酸。

更詳細地，在(A-1)與(A-2)構造中，訊息與反訊息股雜交，及在其終端並無懸擺端形成。在(A-3)構造中，訊息與反訊息股雜交，藉此雙股RNA的訊息股5'端為平整端，而訊息股3'端的第一與第二個核苷酸形成一懸擺端。在(A-3)構造中，訊息股5'端的第一至第十九個核苷酸與反訊息股3'端的第三至第廿一個核苷酸雜交，藉此訊息股3'端的第一

與第二個核苷酸及反訊息股3'端的第一與第二個核苷酸分別形成懸擺端。

本發明之經脂質修飾的雙股RNA具有與訊息股5'端的第一至第六個核苷酸中之至少一者連接之至少一個脂質。

- 5 除了訊息股的5'終端區域之外，本發明之經脂質修飾的雙股RNA在其他任一位置並無取代基。更詳細地，在訊息股的5'終端區域以外的其他任一地區及在反訊息股中，並無取代基存在，及該等地區含有核苷酸。僅在訊息股的5'終端區域連接脂質，可增進細胞攝取效率及提供極佳的RNA
- 10 干擾作用。

對於與本發明之經脂質修飾的雙股RNA的訊息股連接之脂質，並無特定限制，及其實例包括單脂(脂肪酸與各種醇之酯類)；複合脂類諸如磷脂類與醣脂類；衍生脂類諸如

- 15 為增進細胞攝取效率與RNA干擾作用，所用的脂質較佳為一種衍生脂類，較佳為具有6至50個碳原子之脂肪酸，更佳為具有10至22個碳原子之脂肪酸，特佳為具有12至18個碳原子之脂肪酸，尤其更佳為十二烷酸、十八烷酸、十四烷酸或十六烷酸，及最佳為十六烷酸。

- 20 對於將脂質連接至訊息股而形成本發明之經脂質修飾的雙股RNA之方式，並無特定限制。脂質可直接或經由連接子而與訊息股連接。在本發明中，脂質藉而與訊息股連接之連接子，並非含有核酸之連接子。該連接子並無特定限制，只要脂質與訊息股可藉而連接即可。例如，具有下

列構造的連接子，可作為連接子：

	-O-CO-O-	(L-1)
	-NH-CO-O-	(L-2)
	-NH-CO-NH-	(L-3)
5	-NH-(CH ₂) _{n1} -	(L-4)
	-S-(CH ₂) _{n1} -	(L-5)
	-CO-(CH ₂) _{n1} -CO-	(L-6)
	-CO-(CH ₂) _{n1} -NH-	(L-7)
	-NH-(CH ₂) _{n1} -NH-	(L-8)
10	-CO-NH-(CH ₂) _{n1} -NH-CO-	(L-9)
	-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -NH-CO-	(L-10)
	-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -NH-C-(=S)-	(L-11)
	-CO-O-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-12)
	-C(=S)-O-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-13)
15	-C(=S)-O-(CH ₂) _{n1} -O-C-(=S)-	(L-14)
	-CO-NH-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-15)
	-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-16)
	-C(=S)-NH-(CH ₂) ₁ -O-C-(=S)-	(L-17)
	-CO-NH-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-18)
20	-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -CO-	(L-19)
	-C(=S)-O-(CH ₂) _{n1} -NH-CO-	(L-20)
	-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -O-C-(=S)-	(L-21)
	-NH-(CH ₂ CH ₂ O) _{n2} -CH(CH ₂ OH)-	(L-22)
	-NH-(CH ₂ CH ₂ O) _{n2} -CH ₂ -	(L-23)

在上述化學式(L-4)至(L-21)中， n_1 為1至40之一整數，較佳為2至20之一整數，及更佳為2至12之一整數。

在上述化學式(L-22)與(L-23)中， n_2 為1至40之一整數，較佳為1至10之一整數，及更佳為1至6之一整數。

- 5 具化學式(L-4)至(L-23)之連接子，可在左側或右側連接訊息股。較佳，訊息股的特定位點(或核酸綴合物的核酸)連接在具化學式(L-4)至(L-23)之連接子的右側，而一脂質連接在其左側。

可依據所用之脂質與連接子的類型，而適宜地選擇該脂質與連接子的連接位點。例如，當使用一脂肪酸作為脂質時，其可經由一酯鍵、一醯胺鍵或在該脂肪酸的羧基與連接子之間形成的類似鍵而連接。更詳細地，當使用一脂肪酸作為脂質時，較佳以連接子取代該脂肪酸之羧基的-OH，而連接該脂質。

- 15 依據所連接的脂質類型，而適宜地選擇連接子。當使用一脂肪酸作為脂質時，較佳使用由化學式(L-4)所代表的連接子。

除了上的連接子之外，亦可使用其他的連接子。其實例包括雙官能型連接子(含有二個官能基的連接子)，諸如
20 N-琥珀醯亞胺基=3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯、N-4-馬來醯亞胺丁酸、S-(2-吡啶基二硫代)巰基乙胺、碘乙醯氧基琥珀醯亞胺、N-(4-馬來醯亞胺丁基氧)琥珀醯亞胺、N-[5-(3'-馬來醯亞胺丙基醯胺)-1-羧戊基]亞胺二乙酸、N-(5-胺基戊基)-亞胺二乙酸等。在訊息股中，對於與脂質或與用以連接

脂質的连接子连接之核苷酸，並無特定限制，只要是訊息股5'端的第一至第六個核苷酸中之至少一者即可，較佳為5'端的第一至第四個核苷酸中之至少一者，更佳為5'端的第一及/或第二個核苷酸，及特佳為位於5'端的核苷酸(5'端的第一個核苷酸)。

對於訊息股與脂質或與用以连接脂質的连接子之连接位點，並無特定限制。較佳藉由取代該訊息股的一特定核苷酸之磷酸部份的羥基中之氫原子，而予以连接。

對於與本發明之經脂質修飾的雙股RNA连接的脂質數目，並無特定限制。例如，可连接1至3個脂質，較佳1至2個脂質，及更佳1個脂質。

可藉由分別合成其上连接至少一個脂質之一訊息股及一反訊息股，及依據已知方法將訊息股與反訊息股雜交，而產生本發明之經脂質修飾的雙股。亦可依據已知的合成方法，產生其上连接一脂質之訊息股。

可將本發明之經修飾的雙股RNA導入細胞內，以抑制或減弱一標的基因之表現，及因而可作為用於抑制或減弱一標的基因表現之一藥物或用於基因療法之一組成物，亦即一種藥學組成物。本發明的藥學組成物可配製成不同的劑型。本發明的藥學組成物之劑型類型包括液態製劑諸如液體(諸如糖漿)、滴劑及注射劑；固態製劑諸如錠劑、藥丸、粉末、顆粒及膠囊(諸如軟式膠囊)等。當本發明的藥學組成物為一液態製劑時，該組成物可在藉由冷凍乾燥除去水之後，加以低溫貯藏或保存。經冷凍乾燥的製劑或無水糖漿

等，可藉由添加注射用蒸餾水或無菌水等，而以溶液形式使用。當本發明的藥學組成物為一固態製劑時，該組成物可藉由添加注射用蒸餾水或無菌水等，而以溶液形式使用。

該藥學組成物可僅含有一種經脂質修飾的雙股RNA，
5 或者若需要的話，進一步含有一種藥學上可接受的載劑。對於所用的載劑並無特定限制，只要其不損及本發明之經修飾的雙股RNA對於標的基因表現之抑制作用即可，及可依據劑型而適宜地加以選擇。適用的載劑實例包括純水、糖的水溶液、緩衝液、生理食鹽水、聚合物的水溶液、不
10 含核醣核酸酶的水等。當本發明的藥學組成物含有載劑時，對於組成物中的組份比例並無特定限制，只要其不損及本發明之經修飾的雙股RNA對於標的基因表現之抑制與減弱作用即可，及可依據劑型而適宜地加以選擇。

例如，本發明的藥學組成物所含有之經修飾的雙股
15 RNA量可為0.001至50，更佳0.01至10，及更佳0.1至1。本發明的藥學組成物所含有的載劑量可為50至99.99重量%，較佳90至99.99重量%，及更佳99至99.9重量%，以組成物總重為基礎。

對於本發明的藥學組成物所針對之標的基因與疾病，
20 並無特定限制。已知標的基因與疾病之間的關係。對於本發明的藥學組成物所導入之細胞類型並無限制。所用的細胞可為人類衍生細胞或非人類的動物衍生細胞。本發明的藥學組成物可用於試管中或活體內。

將本發明之經脂質修飾的雙股RNA導入細胞內之量與

方法，係與習知的siRNA方法相同。例如，當本發明的藥學組成物係用於將經脂質修飾的雙股RNA導入試管中的細胞時，可使用在一適宜量的藥學組成物存在下培養細胞之一種方法。當本發明的藥學組成物係用於將經脂質修飾的雙股RNA導入經培養的細胞或試管中之自活體抽出的細胞時，本發明之經脂質修飾的雙股RNA可在血清存在下導入。當本發明的藥學組成物係用於將經脂質修飾的雙股RNA導入活體內的細胞時，可採用下列方法：將藥學組成物直接注射至組織中；靜脈內、皮下、肌肉、腹膜間、眼內、胃腸或口腔注射；至鼻腔、口腔、肺等之吸入性投藥作用；口服投藥；經由皮膚之經皮投藥作用；經由口腔黏膜、陰道黏膜、眼精黏膜、直腸黏膜及子宮黏膜之經黏膜投藥作用；及類似方法。

當使用本發明的藥學組成物時，可選擇性地一起使用一種用於將siRNA轉染進入細胞內之已知的基因轉染試劑。任擇地，本發明的藥學組成物可含有一種基因轉染試劑。本發明的藥學組成物所含有之經脂質修飾的雙股RNA，即使單獨使用時，亦具有極佳的細胞轉染能力。因此，毋需使用一種用於將siRNA輸送至細胞內之已知的基因轉染試劑或以一較低量使用一種基因轉染試劑，即可將經脂質修飾的雙股RNA導入細胞內。

能以一有效量使用本發明的藥學組成物，例如，該量使得導入各細胞之經脂質修飾的雙股RNA量為0.001至10 pM，較佳0.001至1 pM，及更佳0.01至0.1 pM。

本發明的藥學組成物可抑制或減弱一標的基因之表現，藉此預防、改善或治療因該標的基因之表現所引發的一疾病。

本發明進一步提供一種抑制一標的基因表現之方法。

- 5 該抑制一標的基因表現之方法，包括將經脂質修飾的雙股RNA轉染進入細胞內。

對於標的基因或疾病並無特定限制，及如上述已知該標的基因與疾病之間的關係。對於本發明之經脂質修飾的雙股RNA所導入之細胞類型並無限制。所用的細胞可為人類衍生細胞或非人類的動物衍生細胞。本發明之經脂質修飾的雙股RNA可用於試管中或活體內。

在本發明之抑制一標的基因表現之方法中，將本發明之經脂質修飾的雙股RNA導入細胞內之量與方法，係與習知的siRNA方法相同，及可適宜地加以選擇。例如，在本發明之抑制一標的基因表現之方法中，為將本發明之經脂質修飾的雙股RNA導入試管中的細胞，可採用在一適宜量之經脂質修飾的雙股RNA存在下培養細胞之一步驟。在本發明之抑制一標的基因表現之方法中，為將經脂質修飾的雙股RNA導入經培養的細胞或試管中之自活體抽出的細胞時，可採用在血清存在下將本發明之經脂質修飾的雙股RNA導入細胞內之一步驟。在本發明之抑制一標的基因表現之方法中，為將經脂質修飾的雙股RNA導入活體內的細胞時，可採用如下列所述之一步驟：將本發明之經脂質修飾的雙股RNA直接注射至組織中；靜脈內、皮下、肌肉、

腹膜間、眼內、胃腸或口腔等之注射；至鼻腔、口腔、肺等之吸入性投藥作用；口服投藥；經由皮膚之經皮投藥作用；經由口腔黏膜、陰道黏膜、眼精黏膜、直腸黏膜及子宮黏膜之經黏膜投藥作用；及類似步驟。藉由使細胞與一有效量之經脂質修飾的雙股RNA接觸，可將本發明之經脂質修飾的雙股RNA導入細胞中。例如，經脂質修飾的雙股RNA係以每細胞0.001至10 pM，較佳0.001至1 pM，及更佳0.01至0.1 pM之一量投藥。

本發明之經脂質修飾的雙股RNA，即使單獨使用時，亦具有極佳的細胞轉染能力。因此，毋需使用一種已知的基因轉染試劑或以一較低量使用一種基因轉染試劑，即可將經脂質修飾的雙股RNA導入細胞內。

如本發明之抑制一標的基因表現之方法，可抑制或減弱一標的基因之表現，藉此預防、改善或治療因該標的基因之表現所引發的一疾病。

實例

參照下列實例，詳細地說明本發明；然而，本發明並非受限於該等實例。

第1例：5'經脂質修飾的雙股RNA對於螢光素酶基因表現之抑制作用

1. 標定螢光素酶基因之經脂質修飾的雙股RNA之合成作用

1-1. 訊息股與反訊息股之序列

含有具21至27個鹼基長度的訊息股及具21至27個鹼基長度的反訊息股之雙股RNA，係設計具有與海參螢光素酶

同源的一序列及可抑制海參螢光素酶基因之表現。依反訊息股與訊息股的組合而定，該雙股RNA可產生不同的雙股形式。下列名稱係用來指稱該等雙股RNA。“DS(雙股)RNA”：不含有一懸擺端(單股區域)之完全雙股RNA(亦即在

5 訊息股的5'與3'終端側均具有平整端之雙股RNA)；“SiRNA”：在其二個終端側均具有懸擺端(突出端)之雙股RNA；及“RO(右突出端)RNA”：當訊息股的5'終端側顯示在左側時，僅在右側具有一懸擺端之雙股RNA。該等不同的雙股RNA名稱之區別，係將訊息股指定為“A”(“A1”或

10 “A2”)及反訊息股指定為“B”，及顯示各單股RNA亦即訊息股與反訊息股之鹼基數目。因為設計出二種類型的訊息股，其等各被指定為“A1”與“A2”，以加以分類。就在訊息股的5'終端區域以一脂質加以修飾之雙股RNA而言，在各訊息股的名稱之後加上符號“Cx (x= 16或12)”。所用的RNA

15 序列如下：

訊息股：

27nt 27A1: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC -3'

(序列辨識編號：1)

25nt 25A1: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGC-3'

20 (序列辨識編號：2)

23nt 23A1: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGA-3' (序列辨識編號：3)

21nt 21A1: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUAC-3' (序列辨識編號：4)

21nt 21A2: 5'-GGCCUUUCACUACUCCUACGA-3' (序列辨識編號：5)

反訊息股：

27nt 27B: 5'-GUGCUCGUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG -3'

5 (序列辨識編號：6)

25nt 27B: 5'-GCUCGUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3'

(序列辨識編號：7)

23nt 27B: 5'-UCGUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3' (序列辨識編號：8)

10 21nt 27B: 5'-GUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3' (序列辨識編號：9)

1-2. 標定螢光素酶基因之未經脂質修飾的雙股RNA之合成作用

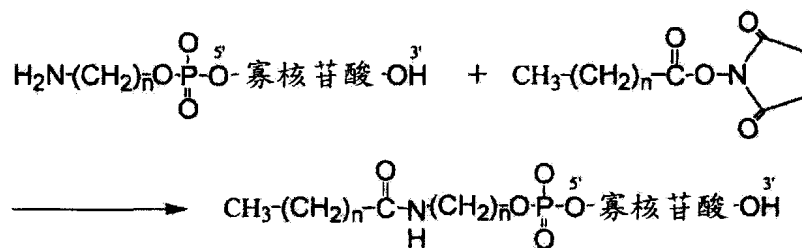
15 使用上述的訊息股與反訊息股，製備各種雙股RNA。藉由在一通用緩衝液(Hayashi Kasei股份有限公司)中，混合等莫耳量的一訊息股與一反訊息股，在92°C加熱該混合物2分鐘，然後將溫度逐漸地降至4°C，而製備各雙股RNA。所得的各種雙股RNA，在20%聚丙烯醯胺凝膠上以250伏特進行電泳60分鐘，然後藉由一個銀染色套組(GE Health Care Bioscience公司)之染色作用而予以確認。第1圖顯示該未經修飾的雙股RNA之構造。

1-3. 標定螢光素酶基因之經脂質修飾的雙股RNA之合成作用

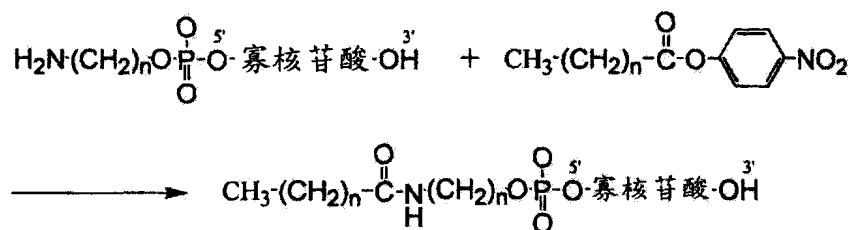
合成經脂質修飾的訊息股，其中在可抑制螢光素酶基

因表現之雙股RNA的訊息股5'端連接一脂質。在該等經脂質修飾的訊息股中，該脂質經由一胺基烷基(胺基修飾劑C6; Glen Research公司)而以共價方式連接至上述訊息股的5'端。藉由在一液相中，將含有一活性酯基的一脂質化合物(此後稱作含活性酯基的脂質化合物)與藉由5'端胺化作用而予以修飾之訊息股反應，而合成經脂質修飾的訊息股(第1與2反應流程圖)。

第1反應流程圖



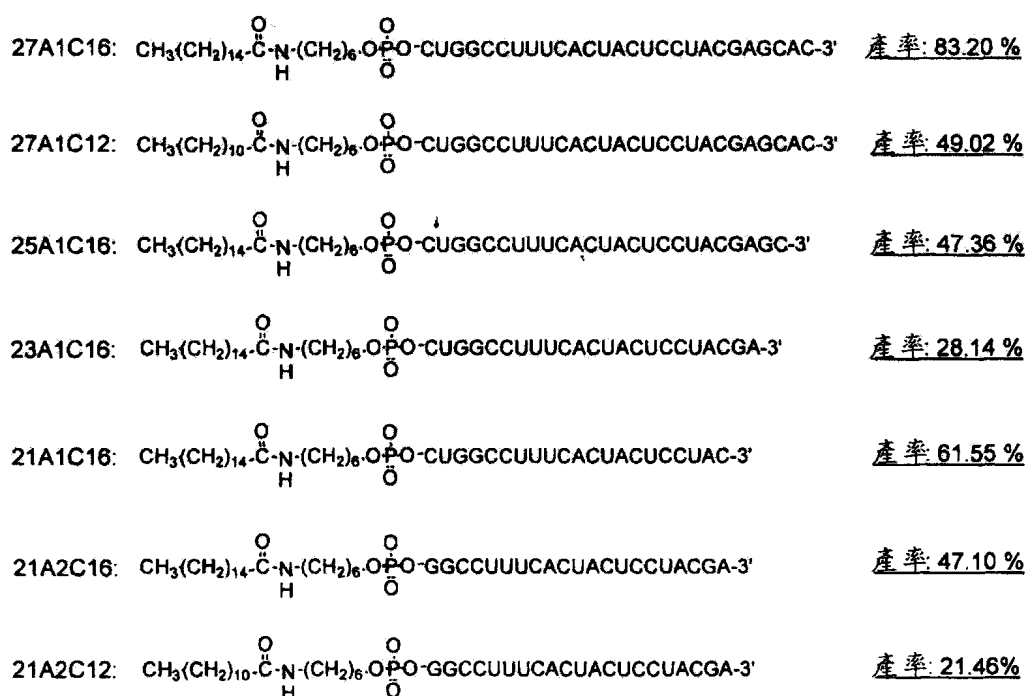
10 第2反應流程圖



如下說明一種特定的合成方法。為胺化訊息股的5'端，可進行一習知方法(亞磷醯胺合成方法)，在RNA固相合成作用上使用5'-胺基修飾劑C6(Glen Research公司)，藉此合成在5'端經一胺基烷基修飾的訊息股(長度為21 鹼基)。已藉由HPLC純化及進行MALDI-TOF MS分析之在5'端經一胺基烷基修飾的訊息股，係購自Hayashi Kasei股份有限公司。所得之在5'端經一胺基烷基修飾的訊息股，具有與5'端(自5'端的第一個核苷酸的磷酸鹽基)連接之

$-(\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2$ 。藉由使用紫外線光譜儀，測量260 nm的吸光度，而測定所產生的單股RNA濃度。在縮合作用條件下，經胺基烷基修飾的單股RNA與溶於DMF(N,N-二甲基甲醯胺)中之一種含活性酯基的脂質化合物(十六烷酸N-羥基琥珀醯亞胺(Sigma-Aldrich公司)或十二烷酸-4-硝基苯基酯(TCI))混合，而合成一種經脂質修飾的訊息股。在反應之後，藉由HPLC純化反應溶液，而自含有經脂質修飾的訊息股之反應溶液中除去不需要的試劑。在50分鐘的期間，以10-100%緩衝液B的線性梯度，使用緩衝液A:100%的20 mM TEAA (pH 7.0)與緩衝液B:70% $\text{CH}_3\text{CN}/20$ mM TEAA (pH 7.0)，進行HPLC純化作用。使用CAP CELL (4.6 x 150毫米，5微米；Shiseido公司)作為純化管柱。第2圖顯示例示性HPLC分析結果。藉由HPLC純化之經脂質修飾的訊息股進行冷凍乾燥，及溶於純水中，之後藉由紫外線光譜分析測定其濃度與合成產率。

所得之經脂質修飾的訊息股之構造模式與產率如下。



將所得之經脂質修飾的訊息股與反訊息股配對，以產生經脂質修飾的雙股RNA。依據上述的相同方法，形成經脂質修飾的雙股RNA，及藉由20%聚丙烯醯胺凝膠電泳加以確認。第1B圖顯示經脂質修飾的雙股RNA之構造。在第1B圖中，當連接十六烷酸衍生物時，X為16；當連接十二

5 1B圖中，當連接十六烷酸衍生物時，X為16；當連接十二
烷酸衍生物時，X為12。

2. 經脂質修飾的雙股RNA之降解酵素抗性

評估經脂質修飾的27nt dsRNA (Ds 27A1C16/27B)之核酸酶抗性。首先，將在訊息股5'端經一脂質修飾之27nt

10 dsRNA的最終濃度調整至2 μ M，在含有10% FBS(Sanko Junyaku股份有限公司)之RPMI-1640基質(Invitrogen公司)(最終體積110微升)中，於37°C培養。在0小時、0.5小時、1

15 小時、2小時、4小時、6小時、8小時、12小時、24小時及48小時之後，各取10微升的試樣量，及置入一個含有2微升

加料染劑之試管中。之後為終止該降解反應，將所取的試樣迅速地

在液態氮中冷凍乾燥，及於-20°C貯存。所得的試樣產物在20%聚丙烯醯胺凝膠上，以250伏特進行電泳70分鐘。該產物然後以一個銀染色套組(GE Health Care Bioscience公司)進行染色，及於ChemiImager 4000(Alpha

20 Innotech Corporation公司)上進行凝膠分析。為進行比較，以類似方式評估一般被廣泛使用之具21個鹼基長度的21siRNA (si 21A2/21B)及未經修飾的27nt dsRNA (Ds 27A1/27B)的核酸酶抗性。第3圖顯示凝膠電泳的結果。

結果，21siRNA在含有血清的基質中快速地被降解，

及經確認其在約1至2小時內消失。另一方面，未經修飾的27nt dsRNA及經脂質修飾的27nt dsRNA，具有遠高於21siRNA的核酸酶抗性，及該等雙股RNA即使在48小時之後仍然存在。該等結果導出一個新發現，亦即經脂質修飾的雙股RNA所具有之活體內安定性，顯著高於一般被廣泛的21siRNA。

3. 藉由Dicer處理標定螢光素酶基因之經脂質修飾的雙股RNA

評估重組型Dicer對於合成的雙股RNA與經脂質修飾的雙股RNA之處理作用。如下進行Dicer剪切實驗。在試管中製備位於20 mM Tris-氯化氫(pH 8.0)、15 mM氯化鈉及2.5 mM氯化鎂溶液中之10微升的0.5U重組型Dicer (Gene Therapy Systems公司)與未經修飾的雙股RNA或經脂質修飾的雙股RNA，將其最終濃度調整至2 μ M；該試樣然後在37°C的培養箱中培養12小時。之後為終止Dicer剪切反應，在反應溶液中添加2微升的Dicer終止溶液(Gene Therapy Systems公司)，接著添加2微升的加料染劑。所得的試樣產物在20%聚丙烯醯胺凝膠上，以250伏特進行電泳70分鐘。該產物然後以一個銀染色套組(GE Health Care Bioscience公司)(染色條件請見產品說明書)進行染色，及於ChemiImager 4000 (Alpha Innotech Corporation公司)上進行凝膠分析。作為對照組之未經修飾的21siRNA (si21A2/ 21B)亦進行凝膠電泳分析。結果示於第4圖。

結果顯示，在其中Ds RNA(Ds 27A1/27B、Ds 25A1/

25B、Ds 23A1/23B及Ds 21A1/21B)的訊息股經一脂質修飾之該等雙股RNA中，藉由重組型Dicer的作用，Ds 27A1C16/27B與Ds 27A1C12/27B在與未經修飾的21siRNA相近之位置觀察到帶狀，因而強力顯示Dicer剪切作用所產生之具21
5 個鹼基長度的siRNA含有一個具2鹼基的懸擺端。同時就Ds 25A1C16/25B與Ds 23A1C16/23B而言，在Dicer存在下，在與21siRNA相近之位置觀察到新的帶狀，顯示其等經歷Dicer之處理。另一方面，就Ds 20 21A1C16/21B而言，在Dicer存在下並未觀察到顯著變化，顯示其未經Dicer之處
10 理。

除此之外，對於其中RO RNA(RO 27A1/25B、RO 25A1/23B、RO 23A1/21B及RO 21A1/19B)的訊息股在訊息股的3'終端區域各含有一個具2鹼基的懸擺端及經一脂質修飾之該等雙股RNA，以類似方式評估其藉由Dicer的處理作用。
15 結果，就三種類型亦即RO 27A1C16/25B、RO 25A1C16/23B及RO23A1C16/21B而言，在Dicer存在下，在與21siRNA相近之位置觀察到帶狀，顯示其等經歷Dicer之處理。尤其是RO 27A1C16/25B與RO 25A1C16/23B，展現經由Dicer之顯著處理效應。另一方面，就相對較短的RO 21A1C16/19B而言，在雙股RNA中未觀察到變化，即使在Dicer存在下亦然，顯示其未經Dicer之處理。
20

此外，對於其中RO RNA(RO 27A1/23B與RO 25A1/21B)的訊息股在訊息股的3'終端區域含有一個具4鹼基的懸擺端及經一脂質修飾之該等雙股RNA，以及對於其中RO

RNA(RO 27A1/21B)的訊息股在訊息股的3'終端區域含有一個具6鹼基的懸擺端及經一脂質修飾之該等雙股RNA，評估其藉由Dicer的處理作用。結果顯示，所有的前述RO RNA皆經歷Dicer之處理，及在與21nt siRNA相同之位置觀察到

5 帶狀。

而且，對於其中RO RNA(RO 25A1/27B、RO 23A1/25B及RO 23A1/27B)的訊息股在反訊息股的5'終端區域含有一個懸擺端及經一脂質修飾之該等雙股RNA，以類似方式評估其藉由Dicer的處理作用。結果，就一些在反訊息股的5'

10 終端區域含有一懸擺端之經脂質修飾的RO RNA而言，因為Dicer的處理作用，而觀察到新的帶狀；然而，該等帶狀係與Dicer不存在下所觀察到的帶狀之時間相同及位置相近，顯示Dicer之處理速率低於其對於Ds RNA及其他RO RNA之處理速率。

15 4. 經脂質修飾的雙股RNA對於螢光素酶基因表現之抑制作用

使用海參螢光素酶作為一標的，評估所合成之未經修飾的雙股RNA與經脂質修飾的雙股RNA之RNA干擾作用。在實驗之前，將希拉(HeLa)細胞(人類子宮頸癌細胞；

20 日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)調整至 1×10^5 細胞/毫升，以每槽100微升的量植入一個96槽的平皿中，及於37°C培養過夜。第二天，移除槽中的舊培養基，以每槽80微升的量添加新的無抗生素培養基，及在含有希拉(HeLa)細胞的各槽中，添加10微升之由表現螢火蟲與海參

螢光素酶的一載體(ψCHECKTM-2載體；Promega公司)與 LipofectamineTM 2000 (商品名；Invitrogen公司)所組成的一複合溶液。將表現載體調整為每槽0.02微克，而 LipofectamineTM 2000調整為每槽0.2微升，及使用OptiMem

5 (Invitrogen公司)以將體積調整至所需程度。為形成一複合體，使用OptiMem將表現載體與LipofectamineTM 2000混合，然後在室溫中培養該混合物30分鐘。在添加複合溶液之後，細胞在5%的二氧化碳存在下，於37°C培養4小時。在培養之後，未經修飾的雙股RNA與在終端經一脂質修飾

10 的雙股RNA，其含有與海參螢光素酶的基因序列同源之一個反訊息序列，以0 nM、0.2 nM、0.5 nM、1 nM、2 nM、5 nM及10 nM之最終濃度與LipofectamineTM 2000 (Invitrogen公司)複合，所得的複合溶液各取10微升，添加至希拉(HeLa)細胞，藉此將表現載體導入。每槽的最終體積為100微升。

15 藉由將每槽5微升的RNA水溶液及每槽5微升之LipofectamineTM 2000 (0.2微升)與OptiMem的一溶液混合，及於室溫中培養該混合物30分鐘，而製備各RNA與LipofectamineTM 2000之複合溶液。在導入RNA之後，培養細胞48小時，及使用Dual-GloTM螢光素酶分析系統(Promega

20 公司)與光度計(MicroLumat LB96p；Berthold公司)，分析螢火蟲與海參螢光素酶表現的程度，以作為對照組的螢火蟲螢光素酶表現程度為基礎，測定對於海參螢光素酶的表現之抑制作用。

第5圖顯示，當未經修飾的雙股RNA與經脂質修飾的雙

股RNA的濃度為0.2 nM時，獲致對於基因表現之抑制作用。結果，發現當在訊息股的5'端具有一平整端之雙股RNA諸如Ds RNAs與RO RNA經一脂質修飾時，該等雙股RNA所展現的RNA干擾作用，顯著優於具有相同構造但未經一脂質修飾之雙股RNA所提供者。亦發現相較於具有相同構造之未經修飾的RO RNA，藉由以一脂質修飾訊息股5'端所獲致之較高的RNA干擾作用，係與RO RNA的股長度或懸擺端的位置無關。該等結果導出一個新的發現，在訊息股5'端含有一平整端之RNA干擾分子諸如DS RNA與RO RNA，可藉由以一脂質修飾訊息股5'端，而大幅地增進RNA干擾作用。而且，亦發現其中21nt siRNA的訊息股5'端經一脂質修飾而得之si 21A2C16/21B與si 21A2C12/21B所展現的RNA干擾作用，高於未經修飾的21nt siRNA所提供之作用。

15 5. 標定螢光素酶基因之經脂質修飾的雙股RNA之RNA干擾作用(未使用基因轉染試劑)

在未使用基因轉染試劑諸如Lipofectamine™ 2000之情況下，將經脂質修飾的雙股RNA單獨轉染進入細胞中，及評估其等是否展現RNA干擾作用。

20 在實驗之前，將希拉(HeLa)細胞(人類子宮頸癌細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)調整至 1×10^5 細胞/毫升，以每槽100微升的量植入一個96槽的平皿中，及於37°C培養過夜。第二天，移除槽中的舊培養基，以每槽80微升的量添加新的無抗生素培養基，及在含有希拉(HeLa)

細胞的各槽中，添加10微升之由表現螢火蟲與海參螢光素酶的一載體 (psiCHECK™-2 載體； Promega 公司) 與 Lipofectamine™ 2000 (商品名； Invitrogen公司) 所組成的一複合溶液。將表現載體調整為每槽 0.02 微克，而

5 Lipofectamine™ 2000調整為每槽0.2微升，及使用OptiMem (Invitrogen公司)以將體積調整至所需程度。為形成一複合體，使用OptiMem將表現載體與Lipofectamine™ 2000混合，然後在室溫中培養該混合物30分鐘。在添加複合溶液之後，細胞在5%的二氧化碳存在下，於37°C培養4小時。

10 各槽以100微升的培養基清洗三次，以自槽中除去Lipofectamine™ 2000。之後，在細胞中添加含有90微升的抗生素之一培養基，未經修飾的雙股RNA與經脂質修飾的雙股RNA，其含有與海參螢光素酶的基因序列同源之一個反訊息序列，以OptiMem調整而製備最終濃度為0 nM、25

15 nM、50 nM、100 nM、200 nM、400 nM、600 nM、800 nM及1 μM之試樣，各取10微升的所得試樣及添加至細胞，然後在37°C培養48小時。使用Dual-Glo™螢光素酶分析系統(Promega公司)與光度計(MicroLumat LB96p； Berthold公司)，分析螢火蟲與海參螢光素酶表現的程度。作為比較之用，亦在上述相同條件下，評估未經修飾的21nt siRNA (si 21A2/21B)與27nt dsRNA (Ds 27A1/27B)之RNA干擾作用。

以作為對照組的螢火蟲螢光素酶表現程度為基礎，藉由評估海參螢光素酶的表現程度，而測定RNA干擾作用。

第6A圖顯示當最終濃度為50 nM至1 μ M時之si 21A2/21B、Ds 27A1/27B及Ds 27A1C16/27B的結果。第6B圖顯示當最終濃度為25 nM至800 nM時之Ds 23A1/23B與Ds 23A1C16/23B的結果。結果顯示，在訊息股的5'終端區域經十六烷酸修飾之Ds 27A1C16/27B與Ds 23A1C16/23B，以依雙股RNA濃度而定之方式，抑制海參螢光素酶的表現；因而，該等雙股RNA因為經十六烷酸修飾，而可單獨地轉染進入細胞內，藉此產生RNA干擾反應。另一方面，即使在高濃度，未經修飾的雙股RNA(si 21A2/21B、Ds 27A1/27B及Ds 23A1/23B)並未對於基因表現展現顯著的抑制作用。其進一步確認，經十六烷酸修飾的雙股RNA具有顯著較佳的細胞攝取效率，及在未使用基因轉染試劑之情況下，展現抑制基因表現之極佳能力。

6. 評估經脂質修飾的雙股RNA之細胞攝取效率

在實驗之前，將希拉(HeLa)細胞(人類子宮頸癌細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)、A549細胞(人類肺癌細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)及SH10-TC細胞(人類胃癌細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)調整至 1×10^5 細胞/毫升；及在實驗之前，將卓凱(Jurkat)細胞(急性淋巴性白血病細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)與K-562細胞(慢性淋巴性白血病細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)調整至 2×10^5 細胞/毫升；以每槽1毫升的量植入一個24槽的平皿中，細胞在含有10%胎牛血清(FBS；Sanko Junyaku有限公

司)與抗生素的一培養基中，在5%二氧化碳存在下，於37
°C培養。就在此所用的抗生素與培養基而言，用於所有細
胞的抗生素是一種鏈黴素，用於希拉(HeLa)細胞的培養基
為MEM培養基(Invitrogen公司)，而用於其他細胞的培養基
5 為RPMI-1640(Invitrogen公司)培養基。在經螢光標記的寡核
苷酸之轉染作用之前，以一種不含抗生素的培養基(450微
升)替換該等培養基。使用在27nt反訊息股的5'終端區域以
6-FAM標記之寡核苷酸，作為經螢光標記的寡核苷酸；及
該寡核苷酸與未經修飾的27nt訊息股或與在其5'終端區域
10 以一脂質修飾的27nt訊息股配對，而形成雙股。如下進行
細胞攝取效率實驗。為形成經螢光標記的寡核苷酸與
Lipofectamine™ 2000(Invitrogen公司)之一複合體，將由10
微升的10μM經螢光標記的寡核苷酸水溶液與15微升的
OptiMem溶液所組成之一混合溶液25微升及由2微升的
15 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen公司)溶液與23微升的
OptiMem溶液所組成之一混合溶液25微升，混合製得50微
升的一混合溶液，及於室溫中培養30分鐘。當未使用
Lipofectamine™ 2000(Invitrogen公司)(第7圖；-LF2000)
時，以OptiMem溶液取代在上述形成一複合體條件下所用
20 的2微升Lipofectamine™ 2000溶液，及依據上述相同方法製
備試樣。將所得之經螢光標記的寡核苷酸複合體50微升，
添加至450微升之上述製備的細胞(雙股RNA的最終濃度為
200 nM)，及於5%的二氧化碳存在下，在37°C培養4小時。
之後，細胞以PBS(-)或培養基清洗三次，及使用共焦式螢

光雷射顯微鏡及流式細胞技術，評估雙股RNA的細胞攝取效率。

在以共焦式螢光雷射顯微鏡進行的評估中，使用Radiance 2000系統(Bio Rad公司)，及以氫雷射觀察螢光。

- 5 在流式細胞技術中，使用細胞計數儀的EPICS XL細胞儀(Beckman細胞計數儀公司)，測量每10,000個細胞數的細胞攝取效率。在流式細胞分析中，使用XL EXPO32™軟體(Beckman細胞計數儀公司)。

結果示於第7-1至7-3圖。第7-3圖中的F部份(-LF2000)顯示當未使用Lipofectamine™ 2000時之結果；而第7-1至7-3中的A至E部份(+LF2000)顯示當使用Lipofectamine™ 2000作為基因轉染試劑時之結果。第7-1圖的A部份所顯示的結果，係在使用Lipofectamine™ 2000作為基因轉染試劑之情況下，各種雙股RNA進入希拉(HeLa)細胞之細胞攝取效率；第7-1圖的B部份顯示A549細胞的結果；第7-2圖的C部份顯示SH10-TC細胞的結果；第7-2圖的D部份顯示K-562細胞的結果；及第7-3圖的E部份顯示卓凱(Jurkat)細胞的結果。第7-3圖的F部份所顯示的結果，係在未使用商品可取得的基因轉染試劑之情況下，各種雙股RNA進入希拉(HeLa)細胞之細胞攝取效率。結果，未經修飾的雙股RNA與經脂質修飾的雙股RNA進入所有細胞(希拉(HeLa)細胞、A549細胞、SH10-TC細胞、Jurkat細胞及K-562細胞)之轉染作用，在Lipofectamine™ 2000存在下獲得確認。尤其，相較於未經修飾的雙股RNA與經十二烷酸修飾的雙股RNA而

言，在訊息股的5'端經十六烷酸修飾之Ds 27A1C16/27B，以共焦式螢光雷射顯微鏡與流式細胞儀觀察到非常高的細胞攝取效率。此外，共焦式螢光雷射顯微鏡的觀察顯示，經十六烷酸修飾之雙股RNA活躍地集中於細胞的細胞質中。尤其在附著型細胞(希拉(HeLa)細胞、A549細胞及SH10-TC細胞)中，該攝取效率格外地明顯。而且，經流式細胞儀分析確認，在Lipofectamine™ 2000的存在下，經十六烷酸修飾的雙股RNA所展現之細胞攝取效率，亦高於未經修飾的雙股RNA。該等結果導出一新發現，當雙股RNA在訊息股的5'終端區域與一脂質諸如十六烷酸等共價連接時，該雙股RNA可展現顯著增進的細胞攝取效率，及可集中於細胞的細胞質中。

第2例：5'經脂質修飾的雙股RNA對於VEGF基因表現之抑制作用

15 1. 標定VEGF基因之經脂質修飾的雙股RNA之合成作用

1-1. 訊息股與反訊息股之序列

含有具27或21個鹼基長度的訊息股及具27或21個鹼基長度的反訊息股之雙股RNA，係設計具有與VEGF(血管內皮生長因子)同源的一序列及可抑制VEGF基因之表現。下列實驗係以該等雙股RNA進行之。27nt dsRNA是一個不含有一懸擺端(單股區域)之完全雙股RNA(亦即一個在訊息股的5'與3'終端側均具有平整端之雙股RNA)；而21siRNA是一個在其訊息與反訊息股的3'端均具有含2個鹼基的懸擺端之雙股RNA。27nt dsRNA與21siRNA的序列如下。

27nt dsRNA :

訊息股: v27A: 5'-CUUCCUACAGCACAACAAAUGUGAA
UG-3' (序列辨識編號: 10)

反訊息股: v27B: 3'-GAAGGAUGUCGUGUUGUUUACAC
5 UUAC-5' (序列辨識編號: 11)

21siRNA :

訊息股: v21A: 5'-UCCUACAGCACAACAAAUGUG-3' (序
列辨識編號: 12)

反訊息股: v21B: 3'-GAAGGAUGUCGUGUUGUUUAC-5'
10 (序列辨識編號: 13)

1-2. 標定VEGF基因之未經脂質修飾的雙股RNA之合成作用

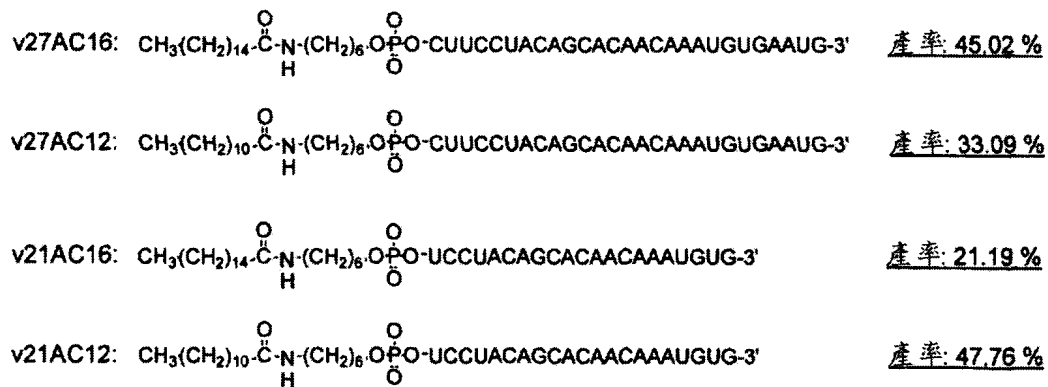
以第1例的相同方式，將上述的訊息股與反訊息股黏合
形成雙股，藉此產生未經脂質修飾的雙股RNA。依據第1
15 例所述的相同方法，藉由20%丙烯醯胺凝膠的電泳分析，
確認雙股之形成。

1-3. 標定VEGF基因之經脂質修飾的雙股RNA之合成作用

合成經脂質修飾的雙股RNA，其中在可抑制VEGF基因
表現之上述雙股RNA的訊息股5'端連接一脂質。在經脂質
20 修飾的雙股RNA中，該脂質經由一胺基烷基(胺基修飾劑
C6; Glen Research公司)而以共價方式連接至上述訊息股的
5'端。依據第1例所述的相同方法，合成經脂質修飾的單股
RNA(訊息股)。

標定VEGF基因之經脂質修飾的RNA之構造模式與產

率如下。



將所得之經脂質修飾的訊息股與反訊息股配對，以產生經脂質修飾的雙股RNA。依據第1例的相同方法，藉由20%丙烯醯胺凝膠的電泳分析，確認雙股之形成。第8圖顯示經脂質修飾的雙股RNA之構造。在標定VEGF基因之經脂質修飾的RNA中，其洗提時間實質上亦與第1例相同。

2. 藉由Dicer處理標定VEGF基因之經脂質修飾的雙股RNA

評估重組型Dicer對於所合成之未經脂質修飾的雙股RNA與經脂質修飾的雙股RNA之處理作用。依據第1例的相同方法，進行Dicer剪切實驗。結果示於第9圖。

結果顯示，對於Ds v27AC16/v27B與Ds v27AC12/v27B而言，藉由重組型Dicer的作用，觀察到帶狀，因而強力顯示Dicer剪切作用所產生之具21個鹼基長度的siRNA含有一個具2個鹼基的懸擺端。該等結果證實，在27nt dsRNA之訊息股5'端連接一脂質，並不會妨礙Dicer的處理作用。另一方面，就si v21AC16/v21B與si v21AC12/v21B而言，相較於當Dicer不存在之情況，即使Dicer存在，也未觀察到有所變化，顯示其等未經Dicer之處理。

3. 經脂質修飾的雙股RNA對於VEGF基因表現之抑制作用

使用希拉(HeLa)細胞(人類子宮頸癌細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)、A549細胞(人類肺癌細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)、SH10-TC細胞
5 (人類胃癌細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)、卓凱(Jurkat)細胞(急性淋巴性白血病細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)及K-562細胞(慢性淋巴性
10 白血病細胞；日本東北大學之發育、老化及癌症研究所)，評估具有未經修飾的終端之21nt siRNA、具有未經修飾的
15 終端之27nt dsRNA、在訊息股的5'端經一脂質修飾之27nt dsRNA(在終端經一脂質修飾的27nt dsRNA)及在訊息股的
5'端經一脂質修飾之21nt siRNA(在終端經一脂質修飾的21nt siRNA)對於VEGF基因表現之抑制作用。此外，未具有
與VEGF基因同源的一基因序列之雙股RNA(27nt dsRNA
15 (隨機)與21nt siRNA(隨機))，以及其中一脂質與雙股RNA
的訊息股5'端連接之該等經脂質修飾的雙股RNA，亦以類似
方式加以評估。

依據下列方法進行實驗。在實驗之前，將希拉(HeLa)細胞、A549細胞及SH10-TC細胞調整至 1×10^5 細胞/毫升；及
20 在實驗之前，將卓凱(Jurkat)細胞與K-562細胞調整至 2×10^5 細胞/毫升；以每槽500微升的量植入24槽的平皿中，及於
37°C培養過夜。第二天，移除槽中的舊培養基，以每槽450微升的量添加新的無抗生素培養基。希拉(HeLa)細胞使用MEM培養基，而其他細胞使用PRMI-1640培養基。含有與

VEGF基因序列同源的一個反訊息序列之未經修飾或經脂質修飾的雙股RNA(25微升)，與Lipofectamine™ 2000溶液(Invitrogen公司)(25微升)形成一複合體，然後在450微升的上述細胞中，添加50微升的各雙股RNA溶液。每槽的最終

5 體積為500微升。將每槽25微升的RNA水溶液及每槽25微升之由Lipofectamine™ 2000(2微升)與OptiMem所組成之一溶液，混合製得各RNA與Lipofectamine™ 2000溶液之一複合溶液，及於室溫中培養該混合物30分鐘。在RNA導入作用之後，細胞在5%的二氧化碳存在下，於37°C培養48小時。

10 在培養之後，細胞以PBS(-)清洗三次，及使用RNeasy Plus迷你套組(Qiagen公司)，將細胞中的全部RNA抽出。之後進行RT-PCR反應，以測量VEGF中的mRNA量。使用Qiagen單步驟RT-PCR套組(Qiagen公司)，進行RT-PCR反應；及使用5'-CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT-3'(序列辨識

15 編號：14)與5'-ACC GCC TCG GCT TGT CAC-3'(序列辨識編號：15)，作為VEGF的PCT引子。依據相同方法測量GAPDH基因，以作為對照組。使用5'-GGAAAGCTGTGGC GTGATG-3'(序列辨識編號：16)與5'-CTGTTGCTGTAGCC GTATTC-3'(序列辨識編號：17)，作為GAPDH的引子。如

20 下進行RT-PCR反應。RT(逆轉錄)反應於50°C進行30分鐘，而PCR反應涉及重複25至28回合(依所用的細胞而定)之於92°C進行30秒的雙股分離反應、於55°C進行30秒的黏合反應及於68°C進行45秒的延伸反應。最後，在68°C培養10分鐘，將溫度降至4°C，及完成反應。依據Qiagen單步驟RT-PCR

套組(Qiagen公司)的反應條件，製備用於RT-PCR中的試劑、總RNA、引子等。在RT-PCR反應之後，添加2微升的加料染劑，及藉由2%瓊脂凝膠確認自VEGF與GAPDH的mRNA所衍生的RT-PCR產物。藉由測量該雙股RNA(未經修飾與經修飾者)轉染進入的細胞中之VEGF表現程度，而評估對於基因表現的抑制作用，假設VEGF基因在對照組細胞(未經雙股RNA轉染進入的細胞)中的表現程度為100%。以對照組基因(GAPDH)的基因表現程度為基礎，修正細胞間之表現程度的誤差。

10 第10-1至10-3圖顯示，當標定VEGF及雙股RNA的濃度為200 nM時，未經修飾的雙股RNA與經脂質修飾的雙股RNA之RNA干擾作用的結果。第10-1圖的A圖顯示在希拉(HeLa)細胞中，未經修飾的雙股RNA與經脂質修飾的雙股RNA對於VEGF基因表現的抑制作用；第10-2圖的B圖顯示

15 A549細胞的結果；第10-2圖的C圖顯示SH10-TC細胞的結果；第10-3圖的D圖顯示卓凱(Jurkat)細胞的結果；及第10-3圖的E圖顯示K-562細胞的結果。該等結果顯示，相較於未經修飾的雙股RNA(si v21A/21B與Ds v27A/v27B)，各藉由以一脂質修飾具27個鹼基長度的雙股RNA(Ds v27A/v27B)

20 之訊息股的5'端所製得的Ds v27AC16/v27B與Ds v27AC12/v27B，以及各藉由以一脂質修飾具21個鹼基長度的雙股RNA(si v21A/v21B)之訊息股的5'端所製得的si v21AC16/v21B與si v21AC12/v21B，對於VEGF基因表現具有非常高的抑制作用。尤其，相較於未經修飾的雙股RNA(si v21A/

21B與Ds v27A/v27B), 經十六烷酸修飾的Ds v27AC16/v27B
在所有的細胞(希拉(HeLa)細胞、A549細胞、SH10-TC細
胞、卓凱(Jurkat)細胞及K-562細胞)中, 展現顯著較高的基
因表現抑制作用。其確認藉由以一脂質諸如十六烷酸等修
5 飾雙股RNA, 可顯著地增進RNA干擾作用。對於不具有與
VEGF基因同源的一基因序列之未經修飾的雙股RNA及經
脂質修飾的雙股RNA, 亦以類似方式評估其等對於基因表
現之抑制作用; 但該等雙股RNA中並無一者對於VEGF基因
展現任何顯著的抑制作用。該等結果揭示, 在此所用之標
10 定VEGF基因的雙股RNA, 以具高度序列專一性的方式, 抑
制該標的基因的表現; 同時亦顯示, 藉由在雙股RNA上連
接一脂質, 可降低對於細胞的副作用。

【圖式簡單說明】

第1圖顯示第1例所合成之未經修飾與經脂質修飾的雙
15 股RNA之構造。

第2圖顯示第1例對於經脂質修飾的單股RNA所進行之
HPLC分析結果。

第3圖顯示在5'端經一脂質修飾的雙股RNA之核酸酶
抗性, 其係於第1例中測量。

20 第4圖顯示藉由Dicer處理第1例之各個經脂質修飾的雙
股RNA之評估結果。

第5圖顯示第1例之經脂質修飾的27nt dsRNAs於0.2
nM濃度之RNA干擾作用的評估結果。

第6圖顯示第1例之在5'端經一脂質修飾的雙股RNA之

RNA干擾作用(未使用一基因轉染劑)的評估結果。

第7-1圖顯示第1例之經脂質修飾的雙股RNA進入希拉(HeLa)細胞與A549細胞之細胞攝取的評估結果；其中”FL”係指以螢光顯微鏡所攝得的影像；”Trans”係指在與FL影像相同的視野，以相差顯微鏡所攝得的影像；及”疊合”係指其中FL影像與Trans影像重疊之影像。

第7-2圖顯示第1例之經脂質修飾的雙股RNA進入SH10-TC30與K562細胞之細胞攝取的評估結果；其中”FL”係指以螢光顯微鏡所攝得的影像；”Trans”係指在與FL影像相同的視野，以相差顯微鏡所攝得的影像；及”疊合”係指其中FL影像與Trans影像重疊之影像。

第7-3圖顯示第1例之經脂質修飾的雙股RNA進入卓凱(Jurkat)與希拉(HeLa)細胞之細胞攝取的評估結果；其中”FL”係指以螢光顯微鏡所攝得的影像；”Trans”係指在與FL影像相同的視野，以相差顯微鏡所攝得的影像；及”疊合”係指其中FL影像與Trans影像重疊之影像。

第8圖顯示第2例所合成之未經修飾與經脂質修飾的雙股RNA之構造。

第9圖顯示藉由Dicer處理第2例之各個經脂質修飾的雙股RNA之評估結果。

第10-1圖顯示第2例之經脂質修飾的雙股RNA在希拉(HeLa)細胞中對於VEGF基因的RNA干擾作用之評估結果。

第10-2圖顯示第2例之經脂質修飾的雙股RNA在A549與SH10-TC細胞中對於VEGF基因的RNA干擾作用之評估

結果。

第10-3圖顯示第2例之經脂質修飾的雙股RNA在卓凱(Jurkat)與K567細胞中對於VEGF基因的RNA干擾作用之評估結果。

5 **【主要元件符號說明】**

(無)

序列清單

- <110> 國立先進產業科學與技術研究所與大塚(OTSUKA)製藥股份有限公司
- <120> 具有有效 RNA 干擾作用之經脂質修飾的雙股 RNA
- <130> 2008C4/TW
- <160> 17
- <170> 專利版本 3.1
- <210> 1
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> 人造
- <220>
 <223> 27nt 27A1 的序列
- <400> 1
 cuggccuuc acuacuccua cgagcac 27
- <210> 2
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> 人造
- <220>
 <223> 25nt 25A1 的序列
- <400> 2
 cuggccuuc acuacuccua cgagc 25
- <210> 3
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> 人造
- <220>
 <223> 23nt 23A1 的序列
- <400> 3
 cuggccuuc acuacuccua cga 23
- <210> 4
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人造

<220>

<223> 21nt 21A1 的序列

<400> 4

cuggccuuuc acuacuccua c

21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> 人造

<220>

<223> 21nt 21A2 的序列

<400> 5

ggccuuucac uacuccuacg a

21

<210> 6

<211> 27

<212> RNA

<213> 人造

<220>

<223> 27nt 27B 的序列

<400> 6

gugcucguag gaguagugaa aggccag

27

<210> 7

<211> 25

<212> RNA

<213> 人造

<220>

<223> 25nt 27B 的序列

<400> 7

gcucguagga guagugaaag gccag

25

<210> 8

<211> 23

<212> RNA

<213> 人造

<220>

<223> 23nt 27B 的序列

<400> 8

ucguaggagu agugaaagc cag

23

<210>	9	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	21nt 27B 的序列	
<400>	9	
	guaggaguag ugaaaggcca g	21
<210>	10	
<211>	27	
<212>	RNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	v27A 的序列	
<400>	10	
	cuuccuacag cacaacaaau gugaaug	27
<210>	11	
<211>	27	
<212>	RNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	v27B 的序列	
<400>	11	
	gaaggauguc guguuguua cacuuac	27
<210>	12	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	v21A 的序列	
<400>	12	
	uccuacagca caacaaugu g	21
<210>	13	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人造	

<220>		
<223>	v21B 的序列	
<400>	13	
	gaaggauguc guguuguuuu c	21
<210>	14	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	用於 VEGF 的 PCR 引子-1	
<400>	14	
	ccctgatgag atcgagtaca tctt	24
<210>	15	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	用於 VEGF 的 PCR 引子-2	
<400>	15	
	accgcctcgg cttgtcac	18
<210>	16	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	用於 GAPDH 的 PCR 引子-1	
<400>	16	
	ggaaagctgt ggcgtgatg	19
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	用於 GAPDH 的 PCR 引子-1	
<400>	17	
	ctgttgctgt agccgtattc	20

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97140644

A61K 48/00 (2006.01)

※ 申請日：97.10.23

※IPC 分類：

C12N 15/11 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C12Q 1/66 (2006.01)

具有有效RNA干擾作用之經脂質修飾的雙股RNA
LIPID-MODIFIED DOUBLE-STRANDED RNA HAVING POTENT
RNA INTERFERENCE EFFECT

二、中文發明摘要：

本發明之一目標係提供一種具有高核酸酶抗性與高細胞攝取效率之新穎雙股RNA，及其可產生極佳的RNA干擾作用。本發明提供一種經脂質修飾的雙股RNA，其包括具有與一標的序列互補的一核苷酸序列之訊息股，及具有與該訊息股互補的一核苷酸序列之反訊息股，該雙股RNA可抑制標的基因之表現，該訊息股具有與5'終端側的第一至第六個核苷酸中之至少一者直接或經由一連接子連接之一脂質。

三、英文發明摘要：

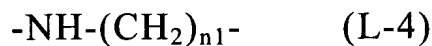
An object of the present invention is to provide a novel double-stranded RNA that has high nuclease resistance and high cellular uptake efficiency, and that is capable of producing an excellent RNA interference effect. The present invention provides a lipid-modified double-stranded RNA comprising a sense strand having a nucleotide sequence complementary to a target sequence, and an antisense strand having a nucleotide sequence complementary to the sense strand, the double-stranded RNA being capable of inhibiting the expression of the target gene, the sense strand having a lipid linked to at least one of the first to sixth nucleotides from the 5' end side directly or via a linker.

七、申請專利範圍：

1. 一種經脂質修飾的雙股RNA，其包括具有與一標的基因中之一標的序列互補的一核苷酸序列之一訊息股，及具有與該訊息股互補的一核苷酸序列之一反訊息股，該雙股RNA可抑制標的基因之表現，及該訊息股具有與5'端的第一至第六個核苷酸中之至少一者直接或經由一連接子連接之一脂質。
2. 如申請專利範圍第1項之經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'終端側為平整端，而反訊息股的3'終端側為平整端或具有一懸擺端。
3. 如申請專利範圍第1項之經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'與3'終端側均具有懸擺端。
4. 如申請專利範圍第1至第3項中任一項之經脂質修飾的雙股RNA，其中該訊息股具有21至27個核苷酸。
5. 如申請專利範圍第2項之經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'與3'終端側均為平整端，及其中各訊息股與反訊息股具有27個核苷酸。
6. 如申請專利範圍第2項之經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'與3'終端側均為平整端，及其中各訊息股與反訊息股具有23個核苷酸。
7. 如申請專利範圍第2項之經脂質修飾的雙股RNA，其訊息股的5'終端側為平整端，該訊息股具有25個核苷酸，而該反訊息股具有23個核苷酸。
8. 如申請專利範圍第3項之經脂質修飾的雙股RNA，其中

各訊息股與反訊息股具有21個核苷酸。

9. 如申請專利範圍第1至第8項中任一項之經脂質修飾的雙股RNA，其中該脂質係具有6至50個碳原子的脂肪酸。
10. 如申請專利範圍第1至第9項中任一項之經脂質修飾的雙股RNA，其中該脂質為十二烷酸、十八烷酸、十四烷酸或十六烷酸。
11. 如申請專利範圍第1至第10項中任一項之經脂質修飾的雙股RNA，其中該脂質係經由一連接子而與訊息股5'端的第一至第六個核苷酸中之至少一者連接，該連接子係由下列構造式所代表：



其中n1為1至40之一整數。

12. 一種藥學組成物，其包括如申請專利範圍第1至第10項中任一項之經脂質修飾的雙股RNA，及一種藥學上可接受的主劑。
13. 如申請專利範圍第1至第10項中任一項之經脂質修飾的雙股RNA，其在製造用以抑制一標的基因表現之一種藥學組成物之用途。
14. 一種抑制一標的基因表現之方法，其包括將如申請專利範圍第1至第10項中任一項之經脂質修飾的雙股RNA導入細胞內，以抑制該標的基因之表現。

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (5) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：