

(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2009-509548

(P2009-509548A)

(43) 公表日 平成21年3月12日(2009.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-533785 (P2008-533785)
 (86) (22) 出願日 平成18年10月2日 (2006.10.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年5月13日 (2008.5.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/038704
 (87) 国際公開番号 W02007/044362
 (87) 国際公開日 平成19年4月19日 (2007.4.19)
 (31) 優先権主張番号 11/241, 873
 (32) 優先日 平成17年9月30日 (2005.9.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

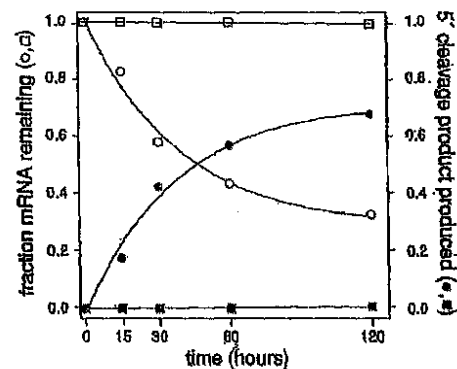
(71) 出願人 399093869
 ユニバーシティー オブ マサチューセツ
 ツ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 1 1 O ポストン フランクリン スト
 リート 2 2 5 トゥエルフス フロアー
 (74) 代理人 100136630
 弁理士 水野 祐啓
 (72) 発明者 シュー, ツオシャン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 1 5 3 6 ノース グラフトン アン ド
 ライブ 1 1
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA05 CA11 DA02
 GA11 HA17

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対立遺伝子特異的RNA干渉

(57) 【要約】

優性の機能獲得型遺伝子によって引き起こされる疾患は、1つの突然変異体と1つのその遺伝子の野生型コピーを有するヘテロ接合体に生じる。野生型遺伝子がしばしば重要な機能を果たす一方、突然変異遺伝子は毒性を有するので、あらゆる治療方法は、野生型遺伝子の発現を維持しつつ、突然変異を選択的に阻害するものでなければならない。本発明は、RNAiを用いて、共発現する野生型対立遺伝子の発現を保存しつつ、突然変異対立遺伝子の発現を特異的に阻害するための方法、優性の機能獲得型遺伝子突然変異に関連する疾患の治療方法を含む。本発明は、突然変異を選択的に抑制するが野生型に対してはしない、遺伝型筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こす銅亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)遺伝子の発現を抑制する、小干渉RNA(siRNA)および小ヘアピンRNA(shRNA)を含む。本発明はさらに、有効性と特異性を高め、RNAiを媒介する、非対称のsiRNAおよびshRNAをさらに提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

s h R N A が R N A 干渉 (R N A i) を媒介する能力を高めるための方法であって、
(i) 少なくとも 2 1 ヌクレオチド長のアンチセンスシステム部分と、センスシステム部分とを含む二本鎖システムを含む s h R N A を提供するステップと；

(i i) 前記 s h R N A が R N A i を媒介する能力を高めるように、前記システムの非対称性高めるステップと；

を含む、方法。

【請求項 2】

前記非対称性は、アンチセンス鎖部分の 5 ' 末端における塩基対と、センス鎖部分の 3 ' 末端の対応する塩基対と間の塩基対の力を弱めることによって高められる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

アンチセンス鎖部分の 5 ' 末端とセンス鎖部分の 3 ' 末端との間の G : C 塩基対が、アンチセンス鎖部分の 3 ' 末端とセンス鎖部分の 5 ' 末端との間より少ないために、前記塩基対の力は弱められる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

アンチセンス鎖部分の 5 ' 末端とセンス鎖部分の 3 ' 末端との間に、少なくとも 1 つのミスマッチの塩基対があるために、前記塩基対の力は弱められる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ミスマッチの塩基対は、アンチセンス鎖部分の 5 ' 末端から 3 位に導入されている、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ミスマッチの塩基対は、G : A、C : A、C : U、G : G、A : A、C : C、および U : U からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ミスマッチの塩基対は、G : A、C : A、C : U、G : G、A : A、C : C、および U : T からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

アンチセンス鎖部分の 5 ' 末端とセンス鎖部分の 3 ' 末端との間に、少なくとも 1 つのゆらぎ塩基対があるために、前記塩基対の力は弱められる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ゆらぎ塩基対は、アンチセンス鎖部分の 5 ' 末端から 3 位に導入されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ゆらぎ塩基対は G : U である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ゆらぎ塩基対は G : T である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

希少ヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの塩基対によって、前記塩基対の力は弱められる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

前記希少ヌクレオチドは、アンチセンス鎖部分の 5 ' 末端から 3 位に導入されている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記希少ヌクレオチドは、イノシン (I) である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記塩基対は、I : A、I : U、および I : C からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

修飾されたヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの塩基対のために、前記塩基対の力は弱められる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 17】

前記修飾されたヌクレオチドは、アンチセンス鎖部分の 5' 末端から 3 位に導入されている、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記修飾されたヌクレオチドは、2 - アミノ - G、2 - アミノ - A、2, 6 - ジアミノ - G、および 2, 6 - ジアミノ - A からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記 shRNA は、機能獲得型の突然変異対立遺伝子に標的化される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 20】

少なくとも 21 ヌクレオチド長のアンチセンスシステム部分と、センスシステム部分とを含む二本鎖システムを含む非対称 shRNA であって、アンチセンス鎖部分の 5' 末端における塩基対が、センス鎖部分の 3' 末端の対応する塩基対と間の塩基対の力より弱い、非対称 shRNA。

【請求項 21】

アンチセンス鎖部分の 5' 末端とセンス鎖部分の 3' 末端との間の G : C 塩基対が、アンチセンス鎖部分の 3' 末端とセンス鎖部分の 5' 末端との間より少ないために、前記塩基対の力は弱められ、

20

前記非対称性は、アンチセンス鎖部分の 5' 末端における塩基対と、センス鎖部分の 3' 末端の対応する塩基対と間の塩基対の力を弱めることによって高められる、請求項 20 に記載の shRNA。

【請求項 22】

アンチセンス鎖部分の 5' 末端とセンス鎖部分の 3' 末端との間に、少なくとも 1 つのミスマッチの塩基対があるために、前記塩基対の力は弱められる、請求項 21 に記載の shRNA。

【請求項 23】

前記ミスマッチの塩基対は、アンチセンス鎖部分の 5' 末端から 3 位に導入されている、請求項 22 に記載の shRNA。

30

【請求項 24】

前記ミスマッチの塩基対は、G : A、C : A、C : U、G : G、A : A、C : C、および U : U からなる群から選択される、請求項 22 に記載の shRNA。

【請求項 25】

前記ミスマッチの塩基対は、G : A、C : A、C : U、G : G、A : A、C : C、および U : T からなる群から選択される、請求項 22 に記載の shRNA。

【請求項 26】

アンチセンス鎖部分の 5' 末端とセンス鎖部分の 3' 末端との間に、少なくとも 1 つのゆらぎ塩基対があるために、前記塩基対の力は弱められる、請求項 21 に記載の shRNA。

40

【請求項 27】

前記ゆらぎ塩基対は、アンチセンス鎖部分の 5' 末端から 3 位に導入されている、請求項 26 に記載の shRNA。

【請求項 28】

前記ゆらぎ塩基対は G : U である、請求項 26 に記載の shRNA。

【請求項 29】

前記ゆらぎ塩基対は G : T である、請求項 26 に記載の shRNA。

【請求項 30】

50

希少ヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの塩基対によって、前記塩基対の力は弱められる、請求項 2 1 に記載の s h R N A。

【請求項 3 1】

前記希少ヌクレオチドは、アンチセンス鎖部分の 5' 末端から 3 位に導入されている、請求項 3 0 に記載の s h R N A。

【請求項 3 2】

前記希少ヌクレオチドは、イノシン (I) である、請求項 3 0 に記載の s h R N A。

【請求項 3 3】

前記塩基対は、 I : A、I : U、および I : C からなる群から選択される、請求項 3 0 に記載の s h R N A。

10

【請求項 3 4】

修飾されたヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの塩基対のために、前記塩基対の力は弱められる、請求項 2 1 に記載の s h R N A。

【請求項 3 5】

前記修飾されたヌクレオチドは、アンチセンス鎖部分の 5' 末端から 3 位に導入されている、請求項 3 4 に記載の s h R N A。

【請求項 3 6】

前記修飾されたヌクレオチドは、2 - アミノ - G、2 - アミノ - A、2 , 6 - ジアミノ - G、および 2 , 6 - ジアミノ - A からなる群から選択される、請求項 3 4 に記載の s h R N A。

20

【請求項 3 7】

前記 s h R N A は、機能獲得型の突然変異対立遺伝子に標的化される、請求項 2 1 乃至 3 6 のいずれかに記載の s h R N A。

【請求項 3 8】

前記対立遺伝子は、優性の機能獲得型突然変異に関連する障害と相関している、請求項 3 7 に記載の s h R N A。

【請求項 3 9】

前記障害が、筋萎縮性側策硬化症、ハンチントン病、アルツハイマー病、およびパーキンソン病からなる群から選択される、請求項 3 8 に記載の s h R N A。

【請求項 4 0】

前記疾患が、筋萎縮性側策硬化症である、請求項 3 9 に記載の s h R N A。

30

【請求項 4 1】

前記対立遺伝子は、S O D 1 である、請求項 4 0 に記載の s h R N A。

【請求項 4 2】

前記突然変異対立遺伝子は、点突然変異である、請求項 4 1 に記載の s h R N A。

【請求項 4 3】

前記点突然変異は、グアニン : シトシン突然変異である、請求項 4 2 に記載の s h R N A。

【請求項 4 4】

前記突然変異は G 2 5 6 C である、請求項 4 2 に記載の s h R N A。

40

【請求項 4 5】

前記突然変異は G 2 8 1 C である、請求項 4 2 に記載の s h R N A。

【請求項 4 6】

前記 s h R N A は、S 1 - 2 1、S 2 - 2 1、S 3 - 2 1、および S 4 - 2 1 からなる群から選択される、図 1 4 に記載の配列を含む、s h R N A。

【請求項 4 7】

前記 s h R N A が S 3 - 2 1 である、請求項 4 6 に記載の s h R N A。

【請求項 4 8】

請求項 2 1 乃至 4 7 のいずれかに記載の s h R N A を含む、s h R N A の細胞への移行を促進するために作られた、組成物。

50

【請求項 49】

請求項 21 乃至 48 のいずれかに記載の shRNA をコードする、作製物。

【請求項 50】

請求項 21 乃至 48 のいずれかに記載の shRNA を含む、薬学的組成物。

【請求項 51】

遺伝子の少なくとも 2 つの異なる対立遺伝子を含む標的対立遺伝子の細胞中での発現を阻害する方法であって、前記方法は、該細胞に請求項 21 乃至 48 のいずれかに記載の shRNA を導入するステップを含む、方法。

【請求項 52】

前記 shRNA は、前記細胞中で作製物から発現される、請求項 51 に記載の方法。

10

【請求項 53】

前記細胞を前記 shRNA に接触させることによって、前記 shRNA は前記細胞に導入する、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

優性の機能獲得型突然変異の存在に 관련된 障害に罹患している被検体を治療する方法であって、前記方法は、前記被検体に対して、治療的有效量の、請求項 37 に記載の shRNA、または前記 shRNA をコードする作製物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 55】

前記障害が、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、アルツハイマー病、およびパーキンソン病からなる群から選択される、請求項 54 に記載の方法。

20

【請求項 56】

前記疾患が、筋萎縮性側索硬化症である、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

前記対立遺伝子は、SOD1 である、請求項 56 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願

本願明細書は、2002 年 11 月 4 日に出願された米国仮特許出願第 60 / 423, 507 号「Allele-Specific RNA Interference (対立遺伝子特異的 RNA 干渉)」および 2003 年 7 月 18 日に提出された米国仮特許出願第 60 / 488, 283 号「Allele-Specific RNA Interference (対立遺伝子特異的 RNA 干渉)」の部分継続出願である、2003 年 11 月 4 日に提出された共係属中の米国実用新案出願第 10 / 700, 816 号「Allele-Specific RNA Interference (対立遺伝子特異的 RNA 干渉)」の部分継続出願である、2005 年 9 月 30 日に提出された共係属中の米国実用新案出願第 11 / 241873 号「Allele-Specific RNA Interference (対立遺伝子特異的 RNA 干渉)」の継続出願である。参照された特許仮出願の内容全体は、引用をもって本願明細書に援用するものとする。

30

【0002】

40

連邦政府の資金による研究に関する記載

米国政府は、国立衛生研究所 (NIH) により授与された認可番号 GM62862 および GM53874、ならびに国立神経疾患・卒中研究所 (NINDS) により授与された認可番号 NS35750 および NS41739 - 01 にしたがった本願発明の一定の権利を有する可能性がある。

【0003】

背景

優性の機能獲得型遺伝子によって引き起こされる疾患は、1 つの突然変異体と、1 つのその遺伝子の野生型コピーを有するヘテロ接合体に生じる。この種の疾患で最も知られるものの一部は、共通の神経変性疾患で、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン

50

病、および筋萎縮性側索硬化症 (ALS; 「ルー・ゲーリック病」) が含まれる (Taylor et al., 2002)。これらの疾患では、突然変異タンパク質が細胞変性を引き起こす正確な経路は明らかになってはいないが、突然変異タンパク質となる細胞毒性の起源は知られている。

【0004】

SOD1における突然変異は運動ニューロンの変性をきたし、ALSを引き起こす。それは、前記突然変異タンパク質がいくらかの毒性を獲得したためである (Cleveland et al., 2001)。この毒性の性質も、最終的に運動ニューロンの変性に至る下流経路も、解明されていない。マウスでは、突然変異体SOD1の発現だけでなく、遺伝子ノックアウトによるSOD1の削除がALSを引き起こす。しかし、遺伝子ノックアウトマウスは、繁殖性の減少 (Matzuk et al., 1990)、運動軸索障害 (Shefner et al., 1999)、蝸牛有毛細胞の加齢に関連する喪失 (McFadden et al., 2001)、および神経筋接合部シナプス (Flood et al., 1999) を含む様々な異常、ならびに、CNSおよびその他の系への、興奮毒性、虚血、神経毒、および放射線照射など各種の有害な攻撃への高い感受性を生じる (Matz et al., 2000; Kondo et al., 1997; Kawase et al., 1999; Behndig et al., 2001)。突然変異種の毒性、および野生型タンパク質の機能的な重要性を考えると、この疾患のための理想的な治療法は、前記突然変異タンパク質の発現を選択的に阻害する一方で野生型の発現を維持することである。

10

【0005】

発明の概略

20

本発明は、優性の機能獲得型疾患を治療する新規の方法に関する。特に、本発明は、機能獲得型遺伝子から転写された突然変異mRNAを選択的に破壊し、それにより、そのような遺伝子によってコードされる突然変異タンパク質の産生を抑制する方法を提供する。本発明は、小干渉RNA (siRNA) および小ヘアピンRNA (shRNA) の両方が、例えば、G85R

SOD1またはG93A SOD1などの突然変異対立遺伝子の発現を選択的に阻害する一方で、単一ヌクレオチド特異性で前記野生型タンパク質の発現を阻害するようにデザインすることができるという発見に、部分的に基づいている。

【0006】

本願発明の方法は、例えば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関連する銅亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子にある点突然変位など、突然変異遺伝子における単一の対立遺伝子に生じる選択的な点変異に対して、RNA干渉技術 (RNAi) を用いる。RNAiは広範な真核生物の遺伝子発現を、標的遺伝子への配列類似性を有する短い二本鎖RNA (低分子干渉RNAまたはsiRNAとよばれる) を導入することによって配列選択的抑制を媒介する (Caplen et al., 2001; Elbashir et al. 2001c)。本発明の二本鎖siRNAまたはshRNA発現ベクターを用いて、例えば、SOD1突然変異タンパク質などの毒性突然変異遺伝子の発現を選択的にサイレンシングし、それにより野生型SOD1対立遺伝子を継続的に機能させることができる。

30

【0007】

本発明はまた、例えば、in vivoなどにおいて細胞で発現する場合、細胞自体のRNAi経路を用いて標的遺伝子の突然変異対立遺伝子を選択的にサイレンシングする標的siRNAを生じるように細胞によって処理された、新規の人為的操作RNA前駆体の発見に基づく。これらの操作されたRNA前駆体をコードする核酸分子を、in vivoにおいて適切な調節配列 (例えば、プラスミドなどのベクターにある導入遺伝子) を用いて細胞に導入することによって、操作されたRNA前駆体の発現は、時間的および空間的に、すなわち、特定の時間および/または特定の組織、器官、または細胞において選択的に制御することができる。

40

【0008】

ある局面では、本発明は、遺伝子の少なくとも2つの異なる対立遺伝子を含む、細胞中の標的対立遺伝子の発現を、前記標的対立遺伝子に特異的なsiRNAを前記細胞に投与

50

することによって阻害する方法を特徴とする。ある実施態様では、前記標的対立遺伝子は、優性の機能獲得型突然変異に関連する障害と相関する。別の実施態様では、前記障害は筋萎縮性軸索硬化症、ハンチントン病、アルツハイマー病、またはパーキンソン病である。

【 0 0 0 9 】

別の局面では、本発明は、優性の機能獲得型突然変異対立遺伝子の存在と相関する疾患を有する被験体を治療するための方法であって、当該方法は、前記突然変異対立遺伝子に特異的な s i R N A の治療的有効量を、前記被験体に投与するステップを含む方法の特徴とする。ある実施態様では、前記 s i R N A は機能獲得型突然変異を標的とする。別の実施態様では、前記障害は筋萎縮性軸索硬化症、ハンチントン病、アルツハイマー病、またはパーキンソン病である。

10

【 0 0 1 0 】

ある実施態様では、前記疾患は筋萎縮性軸索硬化症である。さらなる実施態様では、前記対立遺伝子は S O D 1 突然変異対立遺伝子である。

【 0 0 1 1 】

ある実施態様では、前記 s i R N A は突然変異 S O D 1 対立遺伝子（配列番号： 8 ）を標的とし、好ましくは P 1 0 （配列番号： 4 ） 、次に好ましくは P 9 （配列番号： 2 ） 、次に好ましくは P 1 1 （配列番号： 6 ）を有する図 1 A に記載の突然変異 s i R N A 配列を含む、またはそれから成る。

20

【 0 0 1 2 】

別の実施態様では、前記 s i R N A （例えば、制御 s i R N A ）は野生型 S O D 1 対立遺伝子を標的とし、好ましくは P 9 （配列番号： 1 4 ）または P 1 0 （配列番号： 1 2 ） 、次に好ましいのは P 1 1 （配列番号： 1 0 ）を有する図 1 A に記載の野生型 s i R N A 配列を含む、またはそれから成る。

【 0 0 1 3 】

別の局面では、本発明は、図 1 A に記載の配列を含む s i R N A を提供する。

【 0 0 1 4 】

別の局面では、本発明は、図 1 A に記載の配列（配列番号 4 ）を含む p 1 0 突然変異 s i R N A を提供する。

30

【 0 0 1 5 】

別の局面では、本発明は、図 1 A に記載の配列（配列番号： 2 ）を含む p 9 突然変異 s i R N A を提供する。

【 0 0 1 6 】

別の局面では、本発明は、図 3 A に記載の配列（配列番号： 1 6 ）を含む G 9 3 A S O D 1 s h R N A 、および本発明の s h R N A を含む発現作製物を提供する。

【 0 0 1 7 】

別の局面では、本発明は、本発明の s i R N A および / または s h R N A を含む治療用組成物、および薬学的に許容可能な担体を提供する。

【 0 0 1 8 】

別の局面では、本発明は、高い特異性および有効性で R N A i 干渉（例えば、対立遺伝子特異的 R N A 干渉）を媒介することが可能な非対称 R N A i 作用物質（例えば、非対称 s h R N A ）を提供する。

40

【 0 0 1 9 】

本発明のその他の特徴および利点は、以下の発明の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【 0 0 2 0 】

発明の詳細な説明

銅亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ（ S O D 1 ）遺伝子の突然変異は、筋萎縮性側索硬化症のサブセット、運動ニューロンの変性を来す神経変性疾患、麻痺および死を引き起こす（Brown and Robberecht, 2001; Siddique and Lalani, 2002）。突然変異 S O D

50

1 が毒性を獲得することによって運動ニューロン変性を引き起こすことは、既知である (Cleveland and Rothstein, 2001)。しかし、この毒性の分子基礎も、運動ニューロンの死滅を来す機序も、いずれも解明されていない。疾患の機序の理解が不十分なことから、合理的なデザインの治療法が着実に有効な転帰を生じたことがない。その一方で、運動ニューロンを死滅させる毒性が突然変異したタンパク質に起因することから (Cleveland and Rothstein, 2001)、突然変異タンパク質の減少によって、その疾患を緩和または予防できるはずである。RNA 干渉 (RNAi) 技術を用いてこの目的を達成することができる。

【0021】

本発明は、siRNA および shRNA が突然変異対立遺伝子の発現を選択的に阻害できるという発見であって、例えば、ALS と関連する SOD1 の突然変異など、特定の突然変異についてのケースに見られるとおり、突然変異 mRNA と野生型との違いが 1 ヌクレオチドだけの場合であっても阻害できるという発見に基づく。これらの方法は、ALS に限定しないがそれを含む、優性で機能獲得型の遺伝子突然変異によって生じる疾患の治療に適用することができる。本発明の siRNA は、1 ヌクレオチドの識別、およびその標的遺伝子の発現の選択的下方制御を可能にする。

【0022】

本発明の方法は、例えば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関連する銅亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子の中にある点突然変位など、突然変異遺伝子における単一の対立遺伝子に生じる選択的な点変異に対して、RNA 干渉技術 (RNAi) を用いる。RNAi は多様な真核生物の遺伝子発現を、標的遺伝子への配列相同性を有する短い二本鎖 RNA (低分子干渉 RNA または siRNA とよばれる) を導入することによって配列選択的に抑制するのを媒介する (Caplen et al., 2001; Elbashir et al. 2001c)。本発明の二本鎖 siRNA または shRNA 発現ベクターを用いて、例えば SOD1 突然変異タンパク質などの毒性突然変異遺伝子の発現を選択的にサイレンシングし、それにより野生型 SOD1 対立遺伝子を継続的に機能させることができる。

【0023】

遺伝子発現の配列選択的、転写後不活性化は、RNAi と呼ばれる現象である、標的遺伝子に相当する二本鎖 RNA の導入によって、多様な原核生物に実現させることが可能である (Hutvagner and Zamore, 2002; Hannon, G. J., 2002; McManus and Sharp, 2002)。RNAi の方法論は、培養哺乳動物細胞にも拡張されている (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001)。このアプローチは、RNAi 経路の中間体である siRNA が、当該 siRNA 配列に相当する mRNA の分解を引き起こすことがあるという発見を活用している。さらに、in vivo において転写された shRNA は、shRNA ステムの配列に相補的な標的 RNA の分解を引き起こすことがある。それは、細胞内で shRNA が siRNA に加工されるためである (Paul et al., 2002; Lee et al., 2002; Padison et al., 2002; Sui et al., 2002; Yu et al., 2002; McManus et al., 2002; Zeng et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002; Miyagishi et al., 2002; Jacque et al., 2002)。本願出願人は、siRNA 二本鎖または shRNA を発現するウイルスを用いて、突然変異体率遺伝子の発現を選択的に阻害しながら、同時に発現する野生型対立遺伝子の発現を保護することができることを実証する。

【0024】

ALS 関連 SOD1 突然変異の大半は、1 アミノ酸の変化を生じる 1 ヌクレオチド点変異である (ALS 遺伝子 (SOD1、ALS など) 突然変異の ALS オンラインデータベース)。したがって、突然変異体の発現だけを選択的にサイレンシングを生じさせ、野生型にはサイレンシングを生じさせないために、1 ヌクレオチド特異性が必要である。本願出願人は、哺乳動物細胞において 1 ヌクレオチドの認識が実現可能であることを証明している。

【0025】

10

20

30

40

50

本発明をより容易に理解するため、まず特定の用語を定義する。

【0026】

「単離された核酸分子または配列」は、由来する生物の天然のゲノムにおいて、（片方は5'末端でもう片方が3'末端に）ただちに連続するコード配列の両側に、ただちに連続しない核酸分子または配列である。したがって、当該用語には、例えば、ベクター、自己複製プラスミドもしくはウイルス、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれた、または他の配列からは独立した分離可能な分子（例えば、PCRまたは制限エンドヌクレアーゼ処理によって作製されたcDNAもしくはゲノムDNAフラグメント）として存在する組換えDNAまたはRNAが含まれる。また、さらなるポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部分である組換えDNAも含まれる。

10

【0027】

「ヌクレオシド」という用語は、リボースまたはデオキシリボース糖に共有結合したプリンまたはピリミジン塩基を有する分子を意味する。例示的なヌクレオシドには、アデノシン、グアシン、シチジン、ウリジン、およびチミジンが含まれる。さらなる例示的なヌクレオシドには、イノシン、1-メチルイノシン、シュードウリジン、5,6-ジヒドロウリジン、リボチミジン、2N-メチルグアノシン、および2,2N,N-ジメチルグアノシン（「稀少」ヌクレオシドともよばれる）が含まれる。「ヌクレオチド」という用語は、糖部分にエステル結合したリン酸基を1つ以上有するヌクレオシドを意味する。例示的なヌクレオチドには、1リン酸ヌクレオシド、2リン酸ヌクレオチド、および3リン酸ヌクレオチドが含まれる。「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」という用語は、本願明細書では交換可能に用いられ、5'および3'炭素原子の間のホスホジエステル結合によって結合したヌクレオシドのポリマーを意味する。

20

【0028】

「RNA」または「RNA分子」または「リボ核酸分子」という用語は、リボヌクレオチドのポリマーを意味する。「DNA」または「DNA分子」または「デオキシリボ核酸分子」という用語は、デオキシリボヌクレオチドのポリマーを意味する。DNAおよびRNAは自然に合成することができる（例えば、それぞれDNA複製またはDNAの転写によって）。RNAは転写後に修飾されることができる。DNAおよびRNAは化学的にも合成することができる。DNAおよびRNAは1本鎖であっても（すなわち、それぞれssRNAおよびssDNA）、または多重鎖（例えば二本鎖、すなわちそれぞれdsRNAおよびdsDNA）であってもよい。「mRNA」または「メッセンジャーRNA」は、1つ以上のポリペプチド鎖のアミノ酸配列を特定する1本鎖RNAである。この情報は、リボソームがmRNAに結合する際にタンパク質合成中に翻訳される。

30

【0029】

操作されたRNA前駆体、または操作された核酸分子の中などに使われる「操作された」という用語は、その前駆体または分子が天然には認められず、その前駆体または分子の核酸配列全体または一部分が人工的に作成された、または選択されたものであることを示す。一旦創製または選択されると、その配列は、細胞内のメカニズムによって複製、翻訳、転写やその他の処理を受けることができる。したがって、組換え核酸分子を含む導入遺伝子から細胞内で産生されたRNA前駆体は組換えRNA前駆体である。

40

【0030】

本願明細書に記載の「小干渉RNA」（「siRNA」）という用語（当業で「短干渉RNA」ともいう）は、RNA干渉を方向付けるまたは媒介する能力のある約10乃至50ヌクレオチドを含むRNA（またはRNA類似体）を意味する。好ましくは、siRNAは、約15乃至30ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体、さらに好ましくは約16乃至25ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）、よりさらに好ましくは約18乃至23ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）および、よりさらに好ましくは約19乃至22ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）（例えば、19、20、21、または22ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体）を含む。「短分子」siRNAとは、例えば19、20、21、または22ヌクレオチドなど、約21ヌクレオチド（またはヌクレ

50

オチド類似体)を含む、*s i R N A*を意味する。「長分子」*s i R N A*とは、例えば23、24、24、または26ヌクレオチドなど、約24乃至25ヌクレオチド(またはヌクレオチド類似体)を含む、*s i R N A*を意味する。短い*s i R N A*ほど*R N A i*を媒介する能力を維持しているとする、短分子*s i R N A*には、例えば16、17、または18ヌクレオチドなど、19ヌクレオチド未満が含まれてよい。同様に、長*s i R N A*は、短*s i R N A*に対して、例えば酵素的処理など、*R N A i*が不在のさらなる処理を媒介する能力を維持しているとする、ある場合には、長分子*s i R N A*には26ヌクレオチド超が含まれてもよい。

【0031】

「ヌクレオチド類似体」または「改変ヌクレオチド」または「修飾ヌクレオチド」という用語は、天然に存在しない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、標準的ではないヌクレオチドを意味する。好ましいヌクレオチド類似体は、任意の位置を修飾し、ヌクレオチドの特定の化学的特性を変えつつ、核酸類似体の目的の機能を実行する能力を維持できるようにする。誘導可能なヌクレオチドの位置の例には、例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-プロモウリジン、5-プロピンウリジン、5-プロベニルウリジンなどの5位、例えば、6-(2-アミノ)プロピルウリジンなどの6位、例えば、8-プロモグアノシン、8-クロログアノシン、8-フルオログアノシンなどのアデノシンおよび/またはグアノシンの8位が含まれる。ヌクレオチド類似体も、例えば7-デアザアデノシンなどのデアザヌクレオチド、O-およびN修飾(例えばアルカリ化、例えばN6-メチルアデノシン、またはその他の当業に知られる)ヌクレオチド、および例えばHerdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2000 Aug. 10(4):297-310に記載されているなどのその他の複素環修飾ヌクレオチド類似体も含まれる。

【0032】

ヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドの糖部分への修飾も含んでもよい。例えば、2' OH基はH、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、COOR、またはORであって、当該化学基においてRは置換または非置換C₁乃至C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールなどから選択される化学基と置換してもよい。その他の可能な修飾には、米国特許第5,858,988号および6,291,438号に記載されているものが含まれる。

【0033】

ヌクレオチドのリン酸基は、例えば、リン酸基の1つ以上の酸素を硫黄で置換する(例えば、ホスホロチオ酸)ことにより、またはヌクレオチドが、例えば、Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Apr. 10(2):117-21、Rusckowski et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Oct. 10(5):333-45、Stein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Oct. 11(5):317-25、Vorobjev et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Apr. 11(2):77-85、および米国特許第5,684,143号などに記載される目的の機能を実施できるようなその他の置換を行うことによって修飾してもよい。上に参照した修飾の一部は、好ましくは、例えば、*in vivo* または*in vitro*において前記類似体を含むポリヌクレオチドの加水分解速度を低減させる。

【0034】

本願明細書に記載の、例えば、*s i R N A*二本鎖または*s i R N A*配列のアンチセンス鎖など、*s i R N A*または*R N A i*剤の「アンチセンス鎖」という用語は、例えば、サイレンシングのターゲットである遺伝子の*m R N A*の約15乃至30、16乃至25、18乃至23または19乃至22ヌクレオチドなど、約10乃至50ヌクレオチドの部分に実質的に相補的な鎖を意味する。第1の鎖のアンチセンス鎖は、例えば、*R N A i*機構またはプロセスによる望ましい標的*m R N A*の破壊を引き起こすのに十分な相補性など、標的的特異的*R N A*干渉(*R N A i*)を方向付ける望ましい標的*m R N A*配列に十分相補的な配列を有する。例えば*s i R N A*二本鎖または*s i R N A*配列のアンチセンス鎖など、*s i R N A*または*R N A i*剤の「センス鎖」または「第2の鎖」という用語は、アンチセンス

鎖または第1の鎖に相補的な鎖を意味する。アンチセンスまたはセンス鎖は、第1鎖または第2鎖とも呼ばれ、標的配列に相補性を有する第1鎖または第2鎖、および前記第1鎖または第2鎖に相補性を有する第2鎖または第1鎖である。

【0035】

本願明細書に記載の「ガイド鎖」という用語は、例えば、*siRNA*二本鎖または*siRNA*配列のアンチセンス鎖など、*RNAi*剤の鎖であって、*RISC*複合体に進入し、標的*mRNA*の切断を方向付ける、鎖を意味する。

【0036】

本明細書において用いられている「非対称」という語は、*RNAi*剤（例えば、*shRNA*のステム）の二本鎖領域の非対称性におけるように、*RNAi*剤（例えば、第1の鎖もしくはステム部分上の末端ヌクレオチドと対抗する第2の鎖もしくはステム部分上の末端ヌクレオチドとの間）の末端間の結合力または塩基対の強度が等しくなく、二本鎖のうちの1つの鎖の5'末端は、相補鎖の5'末端と比べて、一時的に対になっていない、例えば、一本鎖中にある頻度がより高くなることを意味する。この構造的相違は、二本鎖中の1つの鎖が優先的に*RISC*複合体に組み込まれていることを示している。5'末端が相補鎖に対してしっかりと対をなしていない鎖が、*RISC*および媒介*RNAi*に組み込まれることになるであろう。

10

【0037】

本明細書において用いられている「結合力」または「塩基対の結合強度」は、オリゴヌクレオチド二本鎖（例えば、*siRNA*二本鎖）の対抗する鎖上の、主としてH結合、ファン・デル・ワールス相互作用などによるヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）間の相互作用の強度を意味する。

20

【0038】

本願明細書に記載のアンチセンス鎖の5'末端としての「5'末端」は、例えばアンチセンス鎖の5'末端における1乃至約5ヌクレオチドなどの5'末端ヌクレオチドを意味する。本願明細書に記載のセンス鎖の3'末端としての「3'末端」は、例えば相補的アンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチドに相補的な1乃至約5ヌクレオチドの領域などの、領域を意味する。

【0039】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドおよび/またはヌクレオチド類似体の短いポリマーを意味する。「*RNA*類似体」という用語は、相当する未改変または未修飾*RNA*と比較して少なくとも1つの改変または修飾ヌクレオチドを有するが、前記の相当する未改変または未修飾*RNA*と同一のまたは類似する性質または機能を保持する、ポリヌクレオチド（例えば、化学合成されたポリヌクレオチドなど）を意味する。上述の通り、前記オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合を有する*RNA*分子と比較して*RNA*類似体の加水分解が低速度になる結合で結合してよい。例えば、前記類似体のヌクレオチドは、メチレンジオール、エチレンジオール、オキシメチルチオ、オキシエチルチオ、オキシカルボニルオキシ、ホスホロジアミド酸、ホスホロアミド酸、および/またはホスホロチオ酸結合を含んでよい。好ましい*RNA*類似体には、糖および/または骨格修飾リボヌクレオチドおよび/またはデオキシリボヌクレオチドが含まれる。そのような改変または修飾にはさらに、*RNA*末端または内部などへの非ヌクレオチド物質の付加（*RNA*の1つ以上のヌクレオチド）が含まれる。*RNA*類似体は、*RNA*干渉を媒介する能力を有する天然の*RNA*に十分類似しているだけでよい。

30

40

【0040】

本願明細書ににおいて用いられている、「*RNA*干渉」（「*RNAi*」）という用語は、*RNA*の選択的な細胞内分解を意味する。*RNAi*は、細胞内で外来の*RNA*（例えば、ウイルス性*RNA*）を除去するため自然に生じる。天然の*RNAi*は、分解メカニズムをその他の同様の*RNA*配列に方向付ける遊離*dsRNA*から切断された断片によって進行する。別法として、*RNAi*は、例えば、標的遺伝子の発現をサイレンシングさせるなど、人工的に開始させることもできる。

50

【 0 0 4 1 】

「標的特異的RNA干渉(RNAi)を方向付ける望ましい標的mRNA配列に十分相補的な配列」である鎖を有するRNAi作用剤は、その鎖がRNAi機構またはプロセスによる、標的mRNAの破壊を惹起するのに十分な配列を有することを意味する。

【 0 0 4 2 】

本願明細書において用いられている「単離されたRNA」(例えば、「単離されたsiRNA」または「単離されたsiRNA前駆体」という用語は、組換え技術によって生成した場合には、他の細胞物質または培養培地を実質的に含まない、または化学的に合成された場合には、化学前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない、RNA分子を意味する。

10

【 0 0 4 3 】

「標的遺伝子」は、発現が選択的に阻害または「サイレンシング」されている遺伝子である。このサイレンシングは、細胞のRNAiシステムによって、操作されたRNAから創製されたsiRNAによる、標的遺伝子のmRNAの切断によって実現する。RNA前駆体の二本鎖ステムの一部分またはセグメントは、標的遺伝子のmRNAの約18乃至約40ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドの部分に、例えば完全に相補的など、相補的なアンチセンス鎖である。

【 0 0 4 4 】

本願明細書において用いられている「導入遺伝子」という用語は、細胞内に人為的に挿入した任意の核酸分子を意味する。そのような導入遺伝子には、トランスジェニック生物に部分的または完全に非相同的(すなわち外来性)である遺伝子を含むこともある。「導入遺伝子」という用語はまた、例えば、DNAなどの選択された1つ以上の核酸配列であって、その核酸配列は、例えば動物などのトランスジェニック生物に発現させるために1つ以上の操作されたRNA前駆体をコードする核酸配列であって、その生物は部分的または完全にトランスジェニック動物に非相同的または外来性であるか、またはトランスジェニック動物の内因性遺伝子に相同的であるが、天然遺伝子とは異なる部分にある前記動物のゲノムに挿入するようにデザインされたトランスジェニック生物である、核酸配列を意味する。導入遺伝子には、1つ以上のプロモーター、および特定の核酸配列の発現に必要なイントロンなどのその他の任意のDNAであって、すべて特定の配列に機能的に連結されているプロモーターまたはその他の任意のDNAが含まれ、およびエンハンサー配列が含まれてもよい。

20

30

【 0 0 4 5 】

疾患または障害に「関与する」遺伝子には、前記疾患または障害もしくは前記疾患または障害の少なくとも1つの症状に作用するまたはそれを生じる、正常なまたは異常な発現または機能の遺伝子が含まれる。

【 0 0 4 6 】

「発現の対立遺伝子特異的阻害」とは、例えば両方の対立遺伝子が同一の細胞に存在する場合など、1つの対立遺伝子の発現をもう1つの対立遺伝子の発現よりも著しく阻害する能力を意味する。例えば、その対立遺伝子は1、2、3またはそれ以上のヌクレオチドが異なってもよい。ある場合には、1つの対立遺伝子は、例えば、優性の機能獲得型突然変異に相関する疾患など、疾患の原因に関連する。

40

【 0 0 4 7 】

本願明細書において用いられている「機能獲得型突然変異」という用語は、遺伝子中の任意の突然変異であって、当該突然変異において、前記遺伝子によってコードされたタンパク質(つまり突然変異タンパク質)は、通常、タンパク質(つまり野生型タンパク質)に関連していない機能を獲得するか、または疾患もしくは障害を引き起こすまたはそれに寄与する機能を獲得する、突然変異を意味する。機能獲得型突然変異は、コードされたタンパク質の機能に変化を来たす、遺伝子中の1つ以上のヌクレオチドの欠失、付加、もしくは置換、またはヌクレオチドであってよい。ある実施態様では、機能獲得型突然変異は、前記突然変異の機能を変更するか、またはその他のタンパク質と相互作用を引き起こす

50

。別の実施態様では、機能獲得型突然変異は、例えば、改変した突然変異タンパク質と前記正常野生型タンパク質との相互作用によって、正常野生型タンパク質の減少、または除去を引き起こす。

【0048】

「細胞または有機体における遺伝子機能の検証」という文言は、そこから生じる発現、活性、機能、または表現型の検証または研究を意味する。

【0049】

本発明の様々な方法論には、本願明細書では「適切な対照」とも交換可能な意味である「好適な対照」と、価値、レベル、特色、特徴、性質などとの比較に關与するステップを含む。「好適な対照」または「適切な対照」は、比較の目的で有用な当業者が精通している任意の対照または標準である。ある実施態様では、「好適な対照」または「適切な対照」は、本願明細書に記載の通り、RNAi方法論を実行する前に決定する、価値、レベル、特色、特徴、性質などである。例えば、転写速度、mRNAレベル、翻訳速度、タンパク質レベル、生物学的活性、細胞の特徴または性質、ゲノタイプ、表現型などは、細胞または生物に本発明のRNAiを導入する前に決定することができる。別の実施態様では、「好適な対照」または「適切な対照」は、細胞、または例えば正常な形質を示す対象、または正常細胞もしくは生物などの生物において決定される価値、レベル、特色、特徴、性質などである。さらに別の実施態様では、「好適な対照」または「適切な対照」は、予め決定された価値、レベル、特色、特徴、性質などである。

10

【0050】

発他に定義のない限り、本願明細書に用いられたすべての技術および科学用語は、本発明が属する当業者によって普通に理解されるものと同じ意味を有する。本願明細書に記載のものに類似するまたはそれに相当する方法および材料は、本発明の実施またはテストに用いることができ、好適な方法および材料を以下に説明する。

20

本願明細書に引用されるすべての出版物、特許出願、特許、およびその他の参考文献は、その全体を引用によりここに援用する。紛争の場合、定義を含む本願明細書が支配するだろう。さらに、当該材料、方法、および例は、実例のみで、制限を意図しない。

【0051】

本発明のさまざまな局面は、以下のサブセクションでさらに詳細に説明する。

【0052】

30

I. 機能獲得型障害

機能獲得型障害は、機能獲得型突然変異によって特徴づけられる疾患または障害のクラスである。本明細書において用いられているところの用語「機能獲得型突然変異」は、前記遺伝子によってコードされたタンパク質（すなわち、突然変異タンパク質）が当該タンパク質（すなわち、野生型タンパク質）に正常に関連しない機能を獲得し、疾患もしくは障害を引き起こす、またはそれに寄与する、あらゆる突然変異を意味する。機能獲得型突然変異は、コードされたタンパク質の機能に変化を来たす、遺伝子中の1つ以上のヌクレオチドの欠失、付加、もしくは置換、またはヌクレオチドであってよい。ある実施態様では、機能獲得型突然変異は、前記突然変異の機能を変更するか、またはその他のタンパク質と相互作用を引き起こす。別の実施態様では、機能獲得型突然変異は、例えば、改変した突然変異タンパク質と前記正常野生型タンパク質との相互作用によって、正常野生型タンパク質の減少、または除去を引き起こす。さらに別の実施態様においては、本発明の疾患または障害は、機能獲得型突然変異によって引き起こされる神経変性疾患を含む。例えば、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、ハンチントン病、およびパーキンソン病がSOD1、アミロイド前駆体タンパク質、すなわち、APP (Ikezu et al, EMBO J., (1996), 15(10):2468-75を参照されたい)、ハンチントン、すなわち、htt (Rubinstein, Trends Genet., (2002), 18(4):202-9を参照されたい)、およびアルファシヌクレイン（例えば、Cuervo et al., Science, (2004), 305(5688):1292-5を参照されたい）をそれぞれコードする遺伝子中の機能獲得型突然変異に関連する。別の実施態様では、本発明の疾患または障害は、癌遺伝子中の機能獲得型突然変異によって引き起こ

40

50

される神経変性疾患、例えば、癌遺伝子（例えば、ret-1）中の突然変異によって引き起こされる癌、例えば、胃腸癌、内分泌腫瘍、延髄甲状腺腫瘍、副甲状腺ホルモン腫瘍、多発性内分泌腺腫瘍ⅠⅠ型、などが含まれる。特に好ましい実施態様においては、本発明の疾患または障害は、筋萎縮性側索硬化症である。

【0053】

A．筋萎縮性側索硬化症（ALS）

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、ルー・ゲーリック病としても知られ、大脳皮質、脳幹、および脊髄の運動ニューロンが関与する、進行性、致死性の神経変性障害である（Hirano, A., 1996, *Neurology* 47 (Suppl. 2), S63-S66）。この疾患は、例えばSOD1など、前記遺伝子の1つの突然変異種と1つの野生型コピーを有するヒトにおいて生じる、優性の機能獲得型遺伝子によって引き起こされる。SOD1突然変異を引き起こすALSは、前記タンパク質中の1つのアミノ酸を変化させる1ヌクレオチド点突然変異である。この疾患はさらに、進行性の運動ニューロン変性によって特徴づけられ、麻痺、運動神経および呼吸機能の完全喪失、および最終的には最初の臨床徴候の出現から2乃至8年（発症後の平均期間は3年）に死に至るALSは、患者の10%が遺伝子に由来しており、症例の90%が特発性である。染色体21

q22-1に位置する銅亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ（SOD1）をコードする遺伝子における点突然変異は、家族性の症例の20%の病変に関与している（Rosen et al., 突然変異s in Cu/Zn

superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature*, 362, 59-62, 1993, review in Rowland, *Amyotrophic lateral sclerosis: Human challenge for neuroscience*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1251-1253, 1995）。したがって、欠陥のあるSOD1は、運動ニューロン死に関連しており、家族性筋萎縮性側索硬化症の理解および可能な治療についての示唆を有する。

【0054】

i．SOD1遺伝子

SOD1は、銅原子1個、亜鉛原子1個を含む金属酵素で、ホモ二量体として細胞質の中に存在している。銅は酵素活性に必要であり、その一方で亜鉛はタンパク質の構造を安定化させる（Fridovich, 1986）。SOD1はすべての真核細胞で発現し、マンガン依存性ミトコンドリアSOD（SOD2）および銅／亜鉛細胞外（SOD3）を含む、3種類のSOD酵素のファミリーの1種類である（Fridovich, 1986, "Superoxide dismutases," *Advances in Enzymology* 58: 61-97）。SOD1の主な天然の機能は、スーパーオキシドジスムターゼで、スーパーオキシド（O₂⁻）が過酸化水素（H₂O₂）および酸素に転換する。下流酵素のカタラーゼおよびグルタチオンペルオキシダーゼ（H₂O₂を水と酸素に転換する）とともに、SOD1は細胞のフリーラジカルを解毒する。この機能の重要性は、生殖性の減退（Matzuk et al., 1998）、運動軸索障害（Shefner et al., 1999）、蝸牛有毛細胞の加齢に関連する喪失（McFadden et al., 2001）、および神経筋接合部シナプス（Flood et al., 1999）を含む、SOD1遺伝子が欠損するマウスの様々な異常、ならびに、軸索損傷（Reaume et al., 1996）、虚血（Kondo et al., 1997; Kawase et al., 1999）、溶血血液の曝露（Matz et al., 2000）、および放射線照射（Behndig et al., 2001）など各種の有害な攻撃への高い感受性によって理解される。突然変異タンパク質の毒性、および野生型の機能的な重要性を考えると、ALSの理想的な治療法は、前記突然変異SOD1タンパク質の発現を選択的に阻害する一方で野生型SOD1タンパク質の発現を維持することである。

【0055】

本発明は、RNAiを用いた突然変異SOD1を標的とする。RNAiに用いる方法は、突然変異SOD1

mRNA内に点突然変異を含有する領域を補完する二本鎖RNA（siRNA）の1本鎖を含む。siRNAをニューロンに導入後、siRNAは部分的に巻き戻され、部位特異的にSOD1 mRNA内に点突然変異を含む領域に結合し、mRNAヌクレアーゼを活

性化する。このヌクレアーゼはSOD1 mRNAを切断し、突然変異SOD1の翻訳を中断させる。細胞は、部分的に切断されたmRNAを切り離し、その結果、翻訳を妨げるか、または細胞は部分的に翻訳されたタンパク質を切断する。ニューロンは野生型SOD1（正常対立遺伝子の）上で生存するため、このアプローチは、突然変異SOD1の産生物を除外することによって、突然変異SOD1の破壊を防ぐ。

【0056】

ヒト野生型SOD1タンパク質のアミノ酸配列は、図1（配列番号：18）に記載されている。ヒト野生型SOD1遺伝子のコンセンサスヌクレオチド配列（cDNA）は、図2（配列番号：17）に記載されている。

【0057】

i i . SOD - 1 突然変異体遺伝子

100を超えるSOD1突然変異が同定されている。これらの突然変異の大半が、アミノ酸のスーパーオキシドジスムターゼの酵素鎖において1アミノ酸の置換を生じる。最も頻発する置換は、アミノ酸鎖の4位で生じるバリンによるアルギニンの置換（Arg4Valとも書く）であって、1型筋萎縮性側索硬化症を罹患するアメリカ人患者の50%に生じる。

【0058】

SOD1突然変異は、1型筋萎縮性側索硬化症の症状が始まる年齢、および疾患の進行の速さに影響を与える。例えば、Arg4Val突然変異は、生存期間が疾患の発症から2年間未満という、侵襲性の障害を生じる。37位におけるグリシンのアルギニンへの置換（Gly37Arg）は、疾患の発症は早期だが生存期間は長い。さらに、その他の因子がSOD1突然変異と組み合わせると、1型筋萎縮性側索硬化症の経過が変化する。例えば、SOD1遺伝子とCNTFとして知られる遺伝子の両方に生じる突然変異は、前記疾患の発症を早めるようである。CNTF突然変異だけでは病的影響はないが、SOD1突然変異と組み合わせると、疾患の症状は他の影響を受けたファミリーメンバーと比較すると何十年も早まるようである。

【0059】

SOD1突然変異が、筋肉の運動を制御する働きに特化した脳および脊髄の神経細胞である運動ニューロンに、選択的死滅を引き起こす機序は明らかではない。スーパーオキシドジスムターゼ酵素が、SOD1遺伝子において生じた変化が原因で、新しい（しかし、まだ同定されていない）毒性機能を獲得すると考えられている。機能が異常な酵素は、有害なスーパーオキシドラジカルの蓄積、他の種類の有毒ラジカルの異常産生、細胞死（アポトーシス）の促進、前記酵素とその他の細胞タンパク質との凝集、または消耗と死滅を引き起こすような運動ニューロンへの連続的な刺激によって運動ニューロンの死滅を引き起こすこともある（興奮毒性）。

【0060】

10

20

30

【表 1】

SOD1突然変異

位置	nt	aa			
エキソン 1	93	4	<u>Ala4Ser</u>	<u>Ala4Thr</u>	<u>Ala4Val</u>
エキソン 1	99	6	<u>Cys6Gly</u>	<u>Cys6Phe</u>	
エキソン 1	103	7	<u>Val7Glu</u>		
エキソン 1	105	8	<u>Leu8Val</u>	<u>Leu8Gln</u>	
エキソン 1	112	10	<u>Gly10Val</u>	<u>Gly10Gly</u>	
エキソン 1	117	12	<u>Gly12Arg</u>		
エキソン 1	123	14	<u>Val14Met</u>	<u>Val14Gly</u>	
エキソン 1	129	16	<u>Gly16Ser</u>	<u>Gly16Ala</u>	
エキソン 1	142	20	<u>Phe20Cys</u>		
エキソン 1	144	21	<u>Glu21Lys</u>	<u>Glu21Gly</u>	
エキソン 1	148	22	<u>Gln22Leu</u>		
イントロン 1	319		<u>319t>a</u>		
エキソン 2	466	37	<u>Gly37Arg</u>		
エキソン 2	469	38	<u>Leu38Val</u>	<u>Leu38Arg</u>	

10

20

エキソン 2	478	41	<u>Gly41Ser</u>	<u>Gly41Asp</u>
エキソン 2	485	43	<u>His43Arg</u>	
エキソン 2	491	45	<u>Phe45Cys</u>	
エキソン 2	494	46	<u>His46Arg</u>	
エキソン 2	496	47	<u>Val47Phe</u>	
エキソン 2	500	48	<u>His48Arg</u>	<u>His48Gln</u>
エキソン 2	502	49	<u>Glu49Lys</u>	
エキソン 2	518	54	<u>Thr54Arg</u>	
エキソン 3	645	59	<u>Ser59Ile</u>	<u>Ser59Ser</u>
エキソン 3	663	65	<u>Asn65Ser</u>	
エキソン 3	669	67	<u>Leu67Arg</u>	
エキソン 3	683	72	<u>Gly72Cys</u>	<u>Gly72Ser</u>
エキソン 3	695	76	<u>Asp76Tyr</u>	<u>Asp76Val</u>
エキソン 4	1048	80	<u>His80Arg</u>	
エキソン 4	1059	84	<u>Leu84Val</u>	<u>Leu84Phe</u>
エキソン 4	1062	85	<u>Gly85Arg</u>	
エキソン 4	1066	86	<u>Asn86Ser</u>	
エキソン 4	1068	87	<u>Val87Met</u>	<u>Val87Ala</u>
エキソン 4	1071	88	Thr88delACTGCT GAC	
エキソン 4	1074	89	<u>Ala89Thr</u>	<u>Ala89Val</u>
エキソン 4	1078	90	<u>Asp90Ala</u>	<u>Asp90Val</u>
エキソン 4	1086	93	<u>Gly93Cys</u>	<u>Gly93Arg</u> <u>Gly93Ser</u>
			<u>Gly93Asp</u>	<u>Gly93Ala</u> <u>Gly93Val</u>
エキソン 4	1092	95	<u>Ala95Thr</u>	
エキソン 4	1095	96	<u>Asp96Asn</u>	
エキソン 4	1098	97	<u>Val97Met</u>	
エキソン 4	1107	100	<u>Glu100Lys</u>	<u>Glu100Gly</u>
エキソン 4	1110	101	<u>Asp101Asn</u>	<u>Asp101Gly</u>
エキソン 4	1119	104	<u>Ile104Phe</u>	
エキソン 4	1122	105	Ser105delTCACTC	<u>Ser105Leu</u>
エキソン 4	1125	106	<u>Leu106Val</u>	
エキソン 4	1132	108	<u>Gly108Val</u>	

10

20

30

40

エキソン 4	1144	112	<u>Ile112Thr</u>	<u>Ile112Met</u>
エキソン 4	1146	113	<u>Ile113Phe</u>	<u>Ile113Thr</u>
エキソン 4	1150	114	<u>Gly114Ala</u>	
エキソン 4	1152	115	<u>Arg115Gly</u>	
エキソン 4	1161	118	<u>Val118Leu</u>	<u>Val118insA</u> AAAC
イントロン 4	1415		<u>1415t>g</u>	
エキソン 5	1441	124	<u>Asp124Gly</u>	<u>Asp124Val</u>
エキソン 5	1443	125	<u>Asp125His</u>	
エキソン 5	1446	126	<u>Leu26delTT</u>	<u>Leu26STOP</u> <u>Leu26Ser</u>
エキソン 5	1450	127	<u>Gly127insTGGG</u>	
エキソン 5	1465	132	<u>Glu132insTT</u>	
エキソン 5	1467	133	<u>Glu133del</u>	
エキソン 5	1471	134	<u>Ser134Asn</u>	
エキソン 5	1487	139	<u>Asn139Asn</u>	<u>Asn139Lys</u>
エキソン 5	1489	140	<u>Ala140Gly</u>	<u>Ala140Ala</u>
エキソン 5	1491	141	<u>Gly141STOP</u>	
エキソン 5	1501	144	<u>Leu144Ser</u>	<u>Leu144Phe</u>
エキソン 5	1503	145	<u>Ala145Thr</u>	<u>Ala145Gly</u>
エキソン 5	1506	146	<u>Cys146Arg</u>	
エキソン 5	1509	147	<u>Gly147Arg</u>	
エキソン 5	1512	148	<u>Val148Ile</u>	<u>Val148Gly</u>
エキソン 5	1516	149	<u>Ile149Thr</u>	
エキソン 5	1522	151	<u>Ile151Thr</u>	<u>Ile151Ser</u>
エキソン 5	1529	153	<u>Gln153Gln</u>	

10

20

30

【 0 0 6 1 】

I V . R N A 干渉

本発明は、タンパク質（例えば、機能獲得型の突然変異タンパク質）の発現を抑制またはノックダウンする方法を特徴とする。本発明の方法は、RNA干渉（Hutvagner et al., 2002）などの配列特異的RNAサイレンシングメカニズムを用いた機能獲得型遺伝子（例えば、SOD1）の突然変異対立遺伝子を選択的に標的化する新規なRNAi剤を採用している。RNAi剤を細胞に導入した後、該作用物質を標的部位の配列に部位特異的やり方で（例えば、RNAiによって）結合し、それによって、標的遺伝子の両方の形態の発現を停止する。

40

【 0 0 6 2 】

RNAiは二本鎖RNA（dsRNA）が動物および植物細胞において相対的なmRNAの配列特異的分解を誘発する著しく有効なプロセスである（Hutvagner and Zamore (2002), Curr. Opin. Genet. Dev., 12, 225-232; Sharp (2001), Genes Dev.,

50

15, 485-490)。哺乳動物細胞では、RNAiは、低分子干渉RNA (siRNA) の21ヌクレオチド (nt) 二本鎖 (Chiu et al. (2002), Mol. Cell., 10, 549-561; Elbashir et al. (2001), Nature, 411, 494-498)、またはDNAテンプレートを用いてRNAポリメラーゼIIIプロモーターとともにin vivoで発現するその他のdsRNA (Zeng et al. (2002), Mol. Cell, 9, 1327-1333; Paddison et al. (2002), Genes Dev., 16, 948-958; Lee et al. (2002), Nature Biotechnol., 20, 500-505; Paul et al. (2002), Nature Biotechnol., 20, 505-508; Tuschl, T. (2002), Nature Biotechnol., 20, 440-448; Yu et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 (9), 6047-6052; McManus et al. (2002), RNA, 8, 842-850; Sui et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 (6), 5515-5520.) によって引き起こすことができる。

【0063】

RNAiの分子メカニズムは、真核生物において著明に観察される。RNAi剤のdsRNAまたはヘアピンRNA構造が認識され、RNase IIIファミリーの酵素であるダイサーで処理され、21 - 25個のヌクレオチド小干渉RNA (siRNA) となる。siRNAは、細胞タンパク質ダイサーおよびR2D2と干渉し、複合体を形成し (RISC - ローディング複合体またはRLC)、結果として、RISC (RNA誘導性サイレンシング複合体) と称されるsiRNA / マルチタンパク質複合体の形成を容易にする。その後、RLCは、添加された、AGO2を含めた他のタンパク質と相互作用し、ガイド鎖と呼ばれる2つのsiRNA鎖のうちの1つを含有する活性RISCを形成する。活性RISC複合体は、ガイド鎖を持つワトソン・クリック塩基対を介して、標的RNAを認識することができる。その後、RISC複合体は、標的RNAを分割し、その後放出される。それによって、新たなサイクルの標的認識および分割に自由に触媒作用を及ぼすRISC複合体を再生する (Tomari & Zamore, 2005)。

【0064】

RNA干渉はまた、微小RNA (miRNA) によって引き起こすこともできる。miRNAは、RNAポリメラーゼII (BRACHT et al., 2004; CAI et al., 2004; Lee et al., 2004) によって合成されるpri-miRNAと呼ばれる長い転写物から生成される。Pri-miRNAは、RNase III酵素であるDroshaおよびそのパートナーPashaによって処理され、~70nt長のpre-miRNAを形成し、ヘアピン構造に折りたたむ (Lee et al., 2003; Denli et al., 2004)。その後Exportin5によって核から細胞質に移動され、そこで、ダイサーによってさらに処理され、一本鎖miRNAを形成する (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001)。このプロセッシングステップは、miRNAのRISCへの装填と密結合することができる。その後、標的RNAを、RNAiによって分割することができる (該標的が配列中のmRNAを完全に捕捉する場合)。または、標的RNAの翻訳サイレンシングを媒介することができる (miRNAが標的RNA中にミスマッチのマルチプル配列を有する場合)。このプロセスは、Pol IIIプロモーターまたはPol IIIプロモーターのいずれかから合成されたshRNAsによって模倣される (Xia et al., 2002; Shi, 2003; Zeng & Cullen, 2003; Zhou et al., 2005)。

【0065】

配列特異性ゆえに、RNAiは、重要な治療法になってきた。しかしながら、いくつかの例においては、RNAi剤の有効性は、準最適かもしれない (Khvorova et al., 2003; Hsieh et al., 2004; Reynolds et al., 2004)。または、その特異性は、完全ではないかもしれない (Jackson et al., 2003)。これは、対立遺伝子特異的RNAサイレンシングが望ましい機能獲得型障害の治療にとっては、問題であるかもしれない。これを達成するには、突然変異部位を標的とするRNAi剤を使用しなければならない

(Ding et

al., 2003; Miller et al., 2003)。したがって、十分な配列相補性を持つRNAi剤の数が限られているため、準最適な力価もしくは選択性を持つRNAi剤を使わざるを得ないのである。

【0066】

RNAi剤の有効性の減少について2つの原因が提案されている。1つは、標的領域への近づきにくさであり（近付きにくいこと、到達しにくいこと）、他の1つは、siRNAの好ましくない鎖の非対称性である（Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003）。鎖の非対称性は、以下のように定義される。生成されたそれぞれのsiRNAについて、2つの鎖の1つだけ、すなわち、ガイド鎖がRISCに入り、RNAiを実行する。10 パッセンジャー鎖と呼ばれる他方の鎖は、破壊される。siRNAの2つの末端の塩基対の熱力学的安定性は、鎖がガイド鎖またはパッセンジャー鎖となる可能性を予測する。その5'塩基対をもつ鎖は安定性に劣り、その3'塩基対のものはより、RISCに入る可能性が高く、逆も然りである。2つの末端の塩基対が類似した安定性を有している場合、2つの鎖は、同様の可能性を持って、RISCに入り、同様の力価でRNAiを媒介する。したがって、センス鎖（意図された標的に対して相補的なアンチセンス鎖の反対側）RISCに入ることを支持する末端塩基対の安定性をもつsiRNAは、RNAi有効性が悪い。したがって、好ましくない非対称性を持つことになる。

【0067】

鎖の非対称性は、RNAi特異性にも影響を及ぼす。RNAiは、意図していない標的に対しても、意図したものに比べたら程度は低いものの、サイレンス効果を及ぼす可能性がある。これはオフ標的効果と呼ばれる（Jackson et al., 2003）。RISCの標的RNA残基に対する重要な結合エネルギーがガイド鎖の5'末端の半分に存在するため（Haley & Zamore, 2004）、このガイド鎖領域と意図しないRNAの間の相同性は、オフ標的サイレンシングとなる（Jackson et al., 2003）。これは、siRNAの双方の鎖がRISCに入り、オフ標的サイレンシングの可能性が増加することを示唆するものである。したがって、いくつかの局面において、本発明は、前記作用物質から生成されるガイド鎖がRISCに優先的に組み込まれるように修正されたRNAi剤を提供する。本発明の修正RNAi剤は、したがって、RNAiにおいて有効性と特異性が向上している。

【0068】

V. RNAi剤

本発明は、RNAi剤（例えば、「siRNA」および「shRNA」）、前記RNAi剤を作製する方法、および前記RNAi剤を使用する方法（例えば、研究および/または治療方法）を特徴とする。本発明のRNAi剤は、センス鎖および相補的なアンチセンス鎖（または、その部分）からなる二本鎖分子（または二本鎖様構造をもつ分子）であって、アンチセンス鎖はRNAiを媒介するために十分な標的配列（例えば、標的mRNA）への相補性を有している。いくつかの実施態様においては、該標的配列は、対立遺伝子多型、または突然変異対立遺伝子に特異的な点突然変異かもしれない。他の実施態様においては、標的配列は、突然変異体と野生型対立遺伝子の双方に共有されている。

【0069】

a) siRNA分子

本発明のsiRNA分子は、センス鎖および相補的なアンチセンス鎖からなる二本鎖であって、アンチセンス鎖はRNAiを媒介するために十分な標的mRNAへの相補性を有している。好ましくは、siRNA分子は、約10乃至50またはそれを超えるヌクレオチドの長さを有し、つまり、各鎖が10乃至50ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を含む。含むより好ましくは、siRNA分子は、各鎖に、例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドなど約16乃至30の長さを有し、片方の鎖が標的領域に十分相補的である。好ましくは、前記鎖は、鎖がアニーリングされる時に二本鎖末端の片方または両方に1、2、または3残基のオーバーハングが生じるように、鎖末端に、アラインメントされ

ない（つまり相補的な塩基が反対側の鎖に生じない）少なくとも１、２、または３塩基があるようにアラインメントされる。好ましくは、前記 *siRNA* 分子は約１０乃至５０またはそれを超えるヌクレオチドの長さを有し、つまり、各鎖が１０乃至５０ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を含むより好ましくは、前記 *siRNA* 分子は、各鎖に例えば１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０ヌクレオチドなど約１６乃至３０の長さを有し、当該分子において片方の鎖が標的領域に実質的に例えば少なくとも８０％（またはそれを超える、例えば８５％、９０％、９５％、または１００％）相補的であって、例えば３、２、１または０のミスマッチヌクレオチドを有し、当該標的領域が野生型と突然変異の対立遺伝子の差が少なくとも１塩基対はある、例えば機能獲得型突然変異を含む標的領域などの標的領域であって、もう片方の鎖は第１の鎖と実質的に同一である。

10

【００７０】

一般的に、*siRNA* は当業に知られる任意の方法、例えば以下のプロトコルを用いることによってデザインすることができる。

【００７１】

１．*AUG* 開始コドンから始めて *AA* ジヌクレオチド配列を探す。各 *AA* および ３' 側に１６ヌクレオチド以上離れたところが、*siRNA* 標的の候補である。*siRNA* は機能獲得型突然変異を含む標的領域など、野生型と突然変異の対立遺伝子の差が少なくとも１塩基対の標的領域に特異的でなければならない。第１の鎖は、この配列に相補的でなければならない、その他の鎖は第１の鎖に同一であるか実質的に同一である。ある実施態様では、前記核酸分子は、例えば *SOD1* の配列など、開始コドンの少なくとも５０乃至１００ *nt* 下流から始まる標的対立遺伝子配列の領域から選択される。さらに、*G/C* 含有量が少ない *siRNA*（３５乃至５５％）は、*G/C* 含有量が５５％を超えるものよりも活性であることもある。したがってある実施態様では、前記発明には３５乃至５５％の *G/C* 含有量を有する核酸分子が含まれる。

20

【００７２】

２．*RNAi* のセンス鎖は、選択された標的部位の配列に基づいて設計される。好ましくは、該センス鎖は、１９乃至２５のヌクレオチド、例えば、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチドを含む。より好ましくは、該センス鎖は、２１、２２、または２３ヌクレオチドを含む。しかしながら、当業者は、１９ヌクレオチド未満または２５ヌクレオチドより大きい長さを持つ *siRNA* も *RNAi* を媒介する機能を持ちうることを理解するであろう。したがって、そのような長さの *siRNA* も、*RNAi* を媒介する能力を維持していれば、本発明の範囲に含まれる。より長い *RNAi* 剤は、哺乳動物細胞のいくつかにおいて、インターフェロンまたは *PKR* 反応を誘発することがわかっているが、それらが望ましくないかもしれない。好ましくは、本発明の *RNAi* 剤は、*PKR* 反応を誘発しない（すなわち、十分に長さが短い）。しかしながら、例えば、*PKR* 反応を生成することができない細胞タイプ、または *PKR* 反応が、別の手段でダウンレギュレーションされた、もしくは、減衰された状況においては、より長い *RNAi* 剤は有用かもしれない。

30

【００７３】

本発明の *siRNA* 分子は、*siRNA* が *RNAi* を媒介することができるように、標的部位と十分な相補性を有している。したがって、好ましい実施態様においては、*RNAi* のセンス鎖は、標的の一部と十分に同一性を有する配列を持つように設計される。例えば、ガイド鎖は、標的部位と１００％の同一性を有するかもしれない。しかしながら、１００％の同一性を有していなくてもよい。センス鎖と標的 *RNA* 配列の間には８０％の同一性、例えば、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、もしくはさらに１００％の同一性があることが好ましい。別の実施態様では、*RNAi* のセンス鎖は、標的部位と完全な同一性を有している。別の実施態様では、センス鎖は、標的領域、例えば、野生型と突然変異対立遺伝子の間の少なくとも１つの塩

40

50

基対が異なる標的領域、例えば、機能獲得型突然変異を含む標的領域に対して、4、3、2、1、または0のミスマッチヌクレオチドを有している。そしてもう一方の鎖は、第1の鎖と同一もしくはほぼ同一である。また、1もしくは2ヌクレオチドの小さな挿入もしくは欠失をもつ siRNA 配列は、RNAi を媒介するのに有効かもしれない。

【0074】

配列同一性は、当業で公知の配列比較やアライメントアルゴリズムによって決定してもよい。2つの核酸配列のパーセント同一性（または、アミノ酸配列）を決定するために、該配列を比較の目的で並べ（例えば、最適なアライメントのために第1または第2の配列にギャップを導入することができる。次いで、対応するヌクレオチド（またはアミノ酸残基）部分におけるヌクレオチド（またはアミノ酸残基）を比較する。第1の配列のある部分 10 は、第2の配列の対応する部分と同じ残基で占められており、その部分その分子は同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、該配列によって共有される同一位置の数の関数である（すなわち、%相同性 = 同一位置の # / 位置の合計 #、 $\times 100$ ）、導入されたギャップの数および / または導入されたギャップの長さゆえに、スコアを任意に不利にしてもよい。

【0075】

2つの配列間の配列の比較およびパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。ある実施態様では、アライメントは、十分な同一性をもつ、配列のいくつかの部分において生成されるが、同一性（すなわち、局所的アライメント）の程度の低い部分では生成されない。配列の比較に用いられる、限定されないが好ましい 20 局所的アライメントアルゴリズムとしては、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, modified as in Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77のアルゴリズムがある。そのようなアルゴリズムは、BLAST プログラム（バージョン 2.0）(Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10)。

【0076】

別の実施態様では、該アライメントは、適切なギャップを導入することによって最適化され、パーセント同一性は、アライメントされた配列の長さにわたって決定される（すなわち、ギャップ付きアライメント）。比較の目的で、ギャップ付きアライメントを得るためには、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17):3389-3402に記載さ 30 れているように、Gapped

BLASTを用いることができる。別の実施態様では、アライメントは、適切なギャップを導入することによって最適化され、パーセント同一性は、アライメントされた配列の長さ全体において決定される（すなわち、グローバルアライメント）。配列のグローバル比較に用いられる、限定されないが好ましい数学的アルゴリズムは、Myers and Miller, CABIOS (1989) のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG 配列アライメントソフトウェアパッケージの一部である ALIGN プログラム（バージョン 2.0）に組み込まれる。アミノ酸配列を比較するために ALIGN プログラムを用いた場合、PAM 1 20 の重さの残基テーブル、ペナルティー 12 のギャップ長、およびペナルティー 4 のギャップ長を用いることができる。 40

【0077】

3. siRNA のアンチセンスまたはガイド鎖は、センス鎖と常に同じ長さであり、相補ヌクレオチドを含む。ある実施態様では、ガイド鎖およびセンス鎖は完全に相補的である。すなわち、これらの鎖は、並べてアニーリングしたとき、末端が平滑化されている。別の実施態様では、siRNA の鎖は、例えば2ヌクレオチドなど、1乃至4ヌクレオチドの 3' オーバーハングを有するように対を形成させることができる。オーバーハングは、標的遺伝子配列（またはその相補体）に対応するヌクレオチドを含む（または、それによって構成される）ことができる。あるいは、オーバーハングは、デオキシリボヌクレオチド、例えば、dT_s、もしくはヌクレオチド類似体、もしくは他の好適な非ヌクレオチド物質を含む（または、それによって構成される）ことができる。したがって別の実施態 50

様では、前記核酸分子は T T などの 2 ヌクレオチドの 3' オーバーハングを有してもよい。前記のオーバーハングしているヌクレオチドは、RNA または DNA のいずれかである。上述のように、突然変異：野生型ミスマッチがプリン：プリンミスマッチである標的領域を選択することが望ましい。

【0078】

4. 当業に知られる任意の方法を用いて、標的候補と適切なゲノムデータベース（ヒト、マウス、ラットなど）を比較し、他のコード配列に顕著に相同性を有する任意の標的配列を考慮から除外する。そのような配列相同性の探索に使われる 1 つの方法は BLAST として知られ、国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトで入手することができる。

【0079】

5. 評価基準に合う 1 つ以上の配列を選択する。

さらに、siRNA のデザインおよび使用についての一般的な情報は、マックスプランク生物物理化学研究所のウェブサイトで見つけることもできる「The siRNA User Guide (siRNA ユーザーガイド)」の中に見つけることもできる。

【0080】

別法として、siRNA は、標的配列を用いてハイブリダイズする（例えば、400 mM の NaCl、40 mM の PIPES、pH 6.4、1 mM の EDTA、50 または 70 でハイブリダイゼーションを 12 ~ 16 時間行い、その後洗浄を行う）ことが可能なヌクレオチド配列（またはオリゴヌクレオチド配列）として機能的に定義してもよい。さらに好ましいハイブリダイゼーション条件としては、1x SSC 中で 70 または 1x SSC 中で 50、50%ホルムアミド、続いて 1x SSC 中で 70 のハイブリダイゼーション、または、4x SSC 中で 70 または 4x SSC 中で 50、50%ホルムアミド、続いて 1x SSC 中で 67 のハイブリダイゼーションがあげられる。50 塩基対長未満であると予測されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度 (T_m) より 5 - 10 低い温度とすべきである。 T_m は、以下の式によって求められる。塩基対長が 18 未満のハイブリッドについては、 $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (A \text{ の } \# + T \text{ 塩基}) + 4 (G \text{ の } \# + C \text{ 塩基})$ 。塩基対長が 18 乃至 49 のハイブリッドについては、 $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% G + C) - (600 / N)$ （但し、式中、N は、ハイブリッドなかの塩基数、 $[Na^+]$ は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である（1x SSC の $[Na^+] = 0.165 \text{ M}$ ）。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのためのストリンジェンシー条件のさらなる例は、Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, chapters 9 and 11, and Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4 に記載されている。その内容を本明細書において引用によって援用する。

【0081】

陰性対照 siRNA は、選択された siRNA と同一のヌクレオチド組成を有するべきだが、適切なゲノムに相補的な重要な配列は有さない。そのような陰性対照は、選択された siRNA のヌクレオチド配列をランダムにスクランブルしてデザインしてもよく、相同性探索は、前記陰性対照が適切なゲノムにおける任意のその他の遺伝子に対する相同性を欠失していることを確認するために行うことができる。さらに、陰性対照 siRNA は、前記配列に 1 つ以上の塩基ミスマッチを導入することによってデザインすることができる。

【0082】

1 ヌクレオチド特異性を有する siRNA は、以下の通りデザインすることができる。

【0083】

1. 標的 mRNA は、参照 mRNA 配列（例えば野生型対立遺伝子または mRNA 配列）と比較したミスマッチ（例えば、点突然変異などの 1 ヌクレオチドミスマッチなど）

10

20

30

40

50

を有するものが選択される（例えば、突然変異対立遺伝子またはmRNA）。

【0084】

2. siRNAは、1ヌクレオチドのところに、siRNAと標的mRNA（例えば、突然変異mRNA）の間に完全な相補性が存在し、したがって、siRNA（例えば、アライニングされた）を参照配列（例えば、野生型対立遺伝子またはmRNA配列）と比較する場合、ミスマッチが存在するようにデザインされる。好ましくは、前記siRNAは、1ヌクレオチド（例えば、点突然変異）が意図される切断部位、またはその近傍に存在するようにデザインされる。好ましくは、前記siRNAが、標的とされる1ヌクレオチド（例えば、点突然変異）が完全にまたは正確にsiRNA（例えばsiRNAのアンチセンス鎖）の中央に配置されるようにデザインされる。完全に中央に配置するという文
10
言は、前記1ヌクレオチド（例えば点突然変異）の両側に並んでいるヌクレオチドの数が同一であるが（つまり8、9、10、11、または12）、例えばdTdT末端など任意のオーバーハングは含まないことを意味する。例えば、2ヌクレオチドの3'オーバーハング（例えばアンチセンス鎖の3'末端にあるオーバーハング）を有する21ヌクレオチドsiRNAが選択される場合、前記1ヌクレオチド（例えば点突然変異）の両側には9ヌクレオチドが存在する。例えば、2ヌクレオチドの3'オーバーハング（例えばアンチ
20
センス鎖の3'末端にあるオーバーハング）を有する22ヌクレオチドsiRNAの場合、前記1ヌクレオチド（例えば点突然変異）の両側には9および10ヌクレオチドが存在する。23ヌクレオチドsiRNAの場合、前記1ヌクレオチド（例えば、点突然変異）の両側に10ヌクレオチドが存在する。24ヌクレオチドsiRNAの場合、前記1ヌクレオチド（例えば、点突然変異）の両側に10および11ヌクレオチドが存在する。例示した数は、2ヌクレオチド3'オーバーハングを有するsiRNAの場合であるが、より長いまたは短いオーバーハングを有するか、またはオーバーハングを有さないsiRNAにも容易に当てはめることができる。前記1ヌクレオチド（例えば、点突然変異）がsiRNAの中央に位置しないようなsiRNAをデザインする場合、siRNAによる切断の有効性が減少する場合もある。

【0085】

1ヌクレオチド特異性を有するsiRNAは、好ましくは、相当する参照（例えば、野生型）配列における塩基対の形成が生じにくいようにデザインされる。例えば、siRNAをプリン：プリン対形成が前記1ヌクレオチドの位置でsiRNAと野生型mRNAの
30
間に存在するようにデザインすると、1ヌクレオチド特異性が促進される。プリン：プリン対形成は、例えば、G：G、A：G、G：AおよびA：A対形成のグループから選択される。さらに、前記1ヌクレオチドの位置でのsiRNAと突然変異mRNAの間のプリン：ピリミジン対形成は、1ヌクレオチド特異性を促進する。プリン：ピリミジン対形成は、例えばG：C、C：G、A：U、U：A、C：A、A：C、U：AおよびA：Uのグループから選択される。

【0086】

いくつかの実施態様において、本発明のsiRNA分子は、上掲の表1に挙げた点突然変異のあらゆる点に相補的な配列を含んでもよい。本発明のsiRNA分子は、突然変異体siRNA
40

P11（配列番号：5、センス：配列番号：6、アンチセンスまたはガイド）、突然変異体siRNA 10（配列番号：3、センス：配列番号：4、アンチセンスまたはガイド）、突然変異体siRNA 9（配列番号：1、センス：配列番号：2、アンチセンスまたはガイド）、SOD1野生型標的（配列番号：7）、SOD1突然変異体標的（配列番号：8）、野生型siRNA

11（配列番号：9、センス；配列番号：10、アンチセンスまたはガイド）、野生型siRNA 10（配列番号：11、センス；配列番号：12、アンチセンスまたはガイド）、野生型siRNA P9（配列番号：13、セス；配列番号：14、アンチセンスまたはガイド）を含む図1A、G93A SOD1 siRNA（配列番号：16）およびそれらの対立遺伝子変形を含む図3Aに挙げた配列を含む、またはそれにより構成される。
50

【0087】

b) 短ヘアピンRNA (shRNA) 分子

いくつかの特徴的な実施形態において、本発明は、機能獲得型の標的mRNAのRNAiを媒介することが可能なshRNAを提供する。siRNAとは対照的に、shRNAは、天然のマイクロRNA (miRNA) の前駆体に類似しており、遺伝子サイレンシング経路の先端に入る。この理由から、shRNAは、天然の遺伝子サイレンシング経路を介して供給される遺伝子のサイレンシングをより効率的に媒介すると考えられている。

【0088】

miRNAは、植物および動物の成長中に転写後または転写レベルで遺伝子発現を制御することができる約22ヌクレオチドの非コードRNAの領域である。miRNAのある共通の性質は、おそらくダイサー、RNAse

10

III型酵素、またはその相同体によって、約70ヌクレオチドの前駆体RNAステム-ループからすべて切除されることである。天然に存在するmiRNA前駆体 (pre-miRNA) は、通常相補的である2つの部分を含む二本鎖ステム、およびステムの2つの部分を連結したループを形成する一本鎖を有する。典型的なpre-miRNAsにおいては、該ステムは、1以上の隆起部分、例えば、ステムの1部分に単一のヌクレオチド「ループ」を創製する余分なヌクレオチド、および/または、ステムの1つの部分のハイブリダイゼーション中にギャップを創製する1以上の非対ヌクレオチドを含む。本発明の短ヘアピンRNA、または、操作されたRNA前駆体は、天然に存在するpre-miRNAsに基づいているが、所望のRNAi剤 (例えば、本発明のsiRNA) を得るために操作された、人工的な作製物である。標的mRNAに相補的な配列を有するmiRNA前駆体のステム配列を置換することによって、shRNAが形成される。該shRNAは、細胞の遺伝子サイレンシング経路の全体によって処理され、それによって効率的にRNAiを媒介する。

20

【0089】

shRNA分子の必須の要素には、アニーリングもしくはハイブリダイズして、二本鎖もしくは二重鎖ステム部分を形成するのに十分な相補性を有する第1の部分および第2の部分が含まれる。該2つの部分は、十分にもしくは完全に相補的である必要はない。第1および第2の「ステム」部分は、他の部分のshRNAにアニーリングもしくはハイブリダイズするには十分ではない配列相補性を持つ部分によって結合される。この後の部分は、shRNA分子の「ループ」部分と呼ばれる。shRNA分子は処理されてsiRNAとなる。shRNAsはまた、1以上の隆起部分、すなわち、ステムの一部に小ヌクレオチド「ループ」を創製する余分なヌクレオチド、例えば、1、2、または3ヌクレオチドループをもつことができる。該ステム部分は、同じ長さを持つことができる。または、1つの部分は、例えば、1-5ヌクレオチドのオーバーハングを持つことができる。オーバーハングを有するヌクレオチドは、例えば、ウラシル (Us)、例えば、全てのUsである。そのようなUsは、転写の終了のシグナルであるshRNAコードDNAにおいてチミジン (Ts) によって顕著にコードされる。

30

【0090】

本発明のshRNAまたは操作された前駆体RNAにおいて、二本鎖ステムの一部は、標的mRNAに対して相補的な (またはアンチセンス) 核酸配列である。したがって、操作されたRNA前駆体は、2つの部分と2つのステム部分を結合するループを持つ二本鎖ステムを含む。該2つのステム部分は、約18もしくは19乃至約21、22、23、24、25、30、35、37、38、39、もしくは40以上のヌクレオチド長である。好ましい実施態様においては、該ステム部分の長さは、21ヌクレオチド以上とすべきである。哺乳動物細胞において用いられる場合、該ステム部分の長さは、約30ヌクレオチド未満として、インターフェロン経路のような非特異的応答を回避すべきである。非哺乳動物細胞においては、該ステムは、30ヌクレオチドより長い。実際、該ステムは、標的mRNAに対して相補的なより大きな部分を含むことができる (最大、mRNA全体を含む)。

40

50

【0091】

二本鎖システムの2つの部分は、ハイブリダイゼーションして、二本鎖システムを形成するのに十分相補的でなければならない。したがって、この2つの部分は、必ずしも必要ではないが、十分に、もしくは完全に相補的とすることができる。さらに、この2つのステム部分は、同じ長さとすることができるし、または、1つの部分が1、2、3、もしくは4ヌクレオチドのオーバーハングを含むこともできる。該オーバーハングしているヌクレオチドは、例えば、ウラシル(Us)、例えば、全てのUsを含むことができる。shRNAまたは操作されたRNA前駆体中のループは、ループ配列を修正して、対を形成したヌクレオチドを増加または減少させることによって、または、ループ配列の全ての部分をテトラループまたは他のループ配列と置換することによって、天然に存在するpre-miRNA配列とは異なるものとしてもよい。したがって、shRNAまたは操作されたRNA前駆体中のループは、2、3、4、5、6、7、8、9以上、例えば、15または20以上のヌクレオチド長とすることができる。

10

【0092】

shRNAのステム部分の1つの鎖はさらに、標的RNA(例えば、mRNA)配列に対して十分に相補的(例えば、アンチセンス)で、RNA干渉(RNAi)を介して前記標的RNAの分解もしくは切断を媒介する。アンチセンス部分は、前記ステムの5'末端または3'末端である。shRNAのステム部分は、好ましくは、約15乃至約50ヌクレオチド長である。好ましくは、該2つのステム部分は、18もしくは19乃至約25、30、35、37、38、39もしくは40ヌクレオチド長以上である。哺乳動物細胞において用いられる場合、該ステム部分の長さは、約30ヌクレオチド未満として、インターフェロン経路のような非特異的反応を回避すべきである。非哺乳動物細胞においては、該ステムは、30ヌクレオチドより長い。実際、該ステムは、標的mRNAに対して相補的なより大きな部分を含むことができる(最大、mRNA全体を含む)。二本鎖システムの2つの部分は、ハイブリダイゼーションして、二本鎖システムを形成するのに十分相補的でなければならない。したがって、この2つの部分は、必ずしも必要ではないが、十分に、もしくは完全に相補的とすることができる。

20

【0093】

shRNAまたは操作されたRNA前駆体中のループは、ループ配列を修正して、対を形成したヌクレオチドを増加または減少させることによって、または、ループ配列の全ての部分をテトラループまたは他のループ配列と置換することによって、天然に存在するpre-miRNA配列とは異なるものとしてもよい。したがって、shRNAまたは操作されたRNA前駆体中のループは、2、3、4、5、6、7、8、9以上、例えば、15または20以上のヌクレオチド長とすることができる。好ましいループは、「テトラループ」からなる、または、それを含む。テトラループ配列の例は、限定されないが、配列GNRAが挙げられる(但し、Nは、あらゆるヌクレオチドを表し、Rは、プリンヌクレオチド、GGGG、およびUUUUを表す)。

30

【0094】

いくつかの実施態様においては、本発明のshRNAは、上掲に記載された所望のsiRNA分子の配列を含む。別の実施態様において、shRNAのアンチセンス部分の配列は、上記のように本質的に、または、通常18、19、20、21ヌクレオチド長以上の配列を、標的RNA内の配列(例えば、SOD1mRNA)から、例えば、翻訳開始領域の100乃至200もしくは300ヌクレオチド上流もしくは下流から選択することによって設計することができる。通常、該配列は、前記部分が機能獲得型の突然変異部位から離れていれば、5'UTR(非翻訳領域)、コード配列、または3'UTRを含む標的RNA(例えば、mRNA)のあらゆる部分から選択することができる。該配列は、任意に2つの隣接AAヌクレオチドを含有する標的遺伝子の直ぐ後の領域とすることができる。ヌクレオチド配列の最後の2つのヌクレオチドはUUとして選択することができる。この約21ヌクレオチド配列を用いて、shRNA中の二本鎖ステムの一部を創製する。この配列は、野生型pre-miRNA配列のステム部分を、例えば、酵素的に、置換するこ

40

50

とができ、または、合成された完全な配列に含まれる。例えば、全体のステムループを操作されたRNA前駆体をコードするDNAオリゴヌクレオチド、または、前駆体の二本鎖ステムに導入された部分をコードするもの、および制限酵素を用いて操作されたRNA前駆体作製物、例えば、野生型 pre-miRNA からのもの、を合成することができる。

【0095】

いくつかの態様において、本発明の shRNA は、所望のRNAサイレンシング剤（例えば、siRNA または siRNA 様二本鎖）の配列を含む。所望のRNAサイレンシング二本鎖（例えば、siRNA または siRNA 様二本鎖）、したがって、操作されたRNA前駆体中の2つのステム部分の双方は、当業で公知の方法によって選択することができる。これらは、限定されないが、通常18、19、20、21ヌクレオチド長以上の配列を、標的遺伝子 mRNA 配列から、3'側の翻訳開始領域の100乃至200もしくは300ヌクレオチドの領域から選択することを含む。一般に、該配列は、5'UTR（非翻訳領域）、コード配列、または3'UTRを含む、標的遺伝子からのmRNAのあらゆる部分から選択することができる。該配列は、任意に2つの隣接AAヌクレオチドを含有する標的遺伝子の直ぐ後の領域とすることができる。この約21ヌクレオチド配列の最後の2つのヌクレオチドはUUとして選択することができる（その結果、アンチRNAiのセンス鎖は、UUで始まる）。この約21ヌクレオチド配列を用いて、操作されたRNA前駆体内の二本鎖ステムの一部を創製する。この配列は、野生型 pre-miRNA 配列のステム部分を、例えば、酵素的に、置換することができる、または、合成された完全な配列に含まれる。例えば、全体のステムループを操作されたRNA前駆体をコードするDNAオリゴヌクレオチド、または、前駆体の二本鎖ステムに導入された部分を単にコードするもの、および制限酵素を用いて操作されたRNA前駆体作製物、例えば、野生型 pre-miRNA からのもの、を合成することができる。

10

20

【0096】

操作されたRNA前駆体は、二本鎖中に、in vivoで作製されることが好ましい siRNA または siRNA 様二本鎖の約21乃至22ヌクレオチド配列を含む。したがって該操作されたRNA前駆体の該ステム部分は、発現が抑制または阻害された遺伝子のエキソン部分の配列に対応する少なくとも18または19ヌクレオチド対を含む。このステムの領域に隣接する2つの3'ヌクレオチドは、操作されたRNA前駆体からの siRNA の産生を最大にし、得られた siRNA の、in vivo および in vitroでのRNAiによる翻訳の抑圧または破壊のための対応するmRNAを標的化するときの有効性を最大にするよう選択されている。

30

【0097】

操作されたRNA前駆体は、二本鎖中に、in vivoで作製されることが好ましい siRNA または siRNA 様二本鎖の約21乃至22ヌクレオチド配列を含む。したがって該操作されたRNA前駆体の該ステム部分は、発現が抑制または阻害された遺伝子のエキソン部分の配列に対応する少なくとも18または19ヌクレオチド対を含む。このステムの領域に隣接する2つの3'ヌクレオチドは、操作されたRNA前駆体からの siRNA の産生を最大にし、得られた siRNA の、in vivo および in vitroでのRNAiによる翻訳の抑圧または破壊のための対応するmRNAを標的化するときの有効性を最大にするよう選択されている。

40

【0098】

いくつかの態様において、本発明の shRNA は、RISCへの移行を高めるために、miRNA 配列、任意に末端修飾されたmiRNA 配列を含む。miRNA 配列は、あらゆる天然に存在するmiRNAのそれに類似もしくは同一とすることができる（例えば、The miRNA Registry; Griffiths-Jones S, Nuc. Acids Res., 2004）。1000以上の天然のmiRNAがこれまでに確認されており、それらはあわせて、ゲノム中の予測されている全ての遺伝子の~1%を含むと考えられている。多くの天然のmiRNAは、pre-mRNAのイントロン中に群生しており、相同性に基づいた検索を用いてin silicoで、同

50

定することができる (Pasquinelli et al., 2000; Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001)。または、miRNA 遺伝子候補が pri-mRNA のステムループ構造を作製する可能性を予測するコンピュータアルゴリズム (例えば、MiRScan, MiRSeeker) を用いて同定することができる (Grad et al., Mol. Cell., 2003; Lim et al., Genes Dev., 2003; Lim et al., Science, 2003; Lai EC et al., Genome Bio., 2003)。全ての公開されている miRNA 配列の検索可能データベースがオンラインレジストリで提供される (The miRNA Registry at the Sanger Institute website; Griffiths-Jones S, Nuc. Acids Res., 2004)。天然の miRNA の例としては、lin-4、let-7、miR-10、mirR-15、miR-16、miR-168、miR-175、miR-196 およびそれらのホモログ、ならびに、ヒトおよび、キイロショウジョウバエ、エレガンス線虫、ゼブラフィッシュ、シロイヌナズナ、マウス、およびラットを含むいくつかのモデル生物からの他の天然の miRNA がある (PCT 国際公開第 03/029459 号参照)。

10

20

30

40

50

【0099】

天然に存在する miRNA は、内因性の遺伝子によって、in vivo で発現され、ヘアピンまたはステムループ前駆体 (pre-miRNA または pri-miRNA) から、ダイサーまたは他の RNase によって処理される (Lagos-Quintana et al., Science, 2001; Lau et al., Science, 2001; Lee and Ambros, Science, 2001; Lagos-Quintana et al., Curr. Biol., 2002; Mourelatos et al., Genes Dev., 2002; Reinhart et al., Science, 2002; Ambros et al., Curr. Biol., 2003; Brennecke et al., 2003; Lagos-Quintana et al., RNA, 2003; Lim et al., Genes Dev., 2003; Lim et al., Science, 2003)。miRNA は、in vivo で二本の鎖をもつ二本鎖として一過的に存在することができるが、一本鎖のみを遺伝子のサイレンシングを導く RISC 複合体によって獲得される。いくつかの miRNA、例えば、植物 miRNA は、それらの標的 mRNA に対して、完全またはほぼ完全な相補性を有する。したがって、標的 mRNA の分割を導く。他の miRNA は、それらの標的 mRNA に対して、あまり完全ではない相補性を有する。したがって、標的 mRNA の翻訳抑制を導く。miRNA とその標的 mRNA の間の相補性は、その行動メカニズムを決定すると考えられている。例えば、miRNA とその標的 mRNA の間の完全またはほぼ完全な相補性は、分割メカニズムを予測する (Yekta et al., Science, 2004)。一方、あまり完全でない相補性は、翻訳抑制メカニズムを予測する。特別な実施態様において、miRNA 配列は、天然に存在する miRNA 配列のものであり、その異常な発現または活性は、miRNA 障害と相関する。

【0100】

操作された RNA 前駆体の、別の限定的な特徴は、それらの長さ、配列、および/または構造の結果として、配列非特異的反応、例えば、インターフェロン反応またはアポトーシスの誘導などを誘発しないことである。または、それらは、翻訳後遺伝子サイレンシングを誘発する (例えば、RNAi) のに用いられてきた長二重鎖 RNA (>150 bp) より低いレベルの配列非特異的反応を誘発することである。例えば、インターフェロン反応は、30塩基対より長い dsRNA によって引き起こされる。

【0101】

ある実施態様では、本発明の siRNA 分子は、上掲表 1 に挙げた点突然変異の全てに十分な相補性を有する配列を含む。他の実施形態では、本発明の siRNA 分子は、突然変異 siRNA

P11 (配列番号: 5、センス; 配列番号: 6、アンチセンスまたはガイド)、突然変異 siRNA P10 (配列番号: 3、センス; 配列番号: 4、アンチセンス、またはガイド)、突然変異

siRNA P9 (配列番号: 1、センス; 配列番号: 2、アンチセンス、またはガイド

)、SOD1野生型標的(配列番号:7)、SOD1突然変異標的(配列番号:8)、野生型 siRNA

P11(配列番号:9、センス;配列番号:10、アンチセンス、またはガイド)、野生型 siRNA

P10(配列番号:11、センス;配列番号:12、アンチセンス、またはガイド)、野生型 siRNA P9(配列番号:13、センス;配列番号:14、アンチセンス、またはガイド)が含まれる図1に記載の配列、G93A SOD1

siRNA(配列番号:16)が含まれる図3に記載の配列、およびその対立遺伝子変異種などを生成することが可能である。

【0102】

c. 修飾RNAi剤

本発明のいくつかの局面において、上記したように、本発明のRNAi剤(または、その一部)は、作用薬の*in vivo*活性を、作用薬のRNAのサイレンシング活性を損なうことなく向上するように修飾してもよい。修飾は、一部では、作用薬の安定性を高めるため(例えば、分解を防止する)、細胞の取り込みを促進するため、標的効率を高めるため、(例えば、標的に対する)結合の有効性を向上させるため、患者の作用物質に対する忍容性を向上させるため、および/または毒性を減少させる機能を果たすことができる。

【0103】

1) 有効性および特異性を高めたRNAi剤

いくつかの態様において、本発明のRNAi剤は、非対称性デザインルールに基づいてRNAiを媒介する際の有効性および特異性の向上を促進するために改変されてきた(PCT国際公開第WO2005/001045号、米国特許出願第2005-0181382A1号参照)。そのような改変は、RNAiのアンチセンス鎖(例えば、本発明の方法を用いて設計された siRNA または shRNA から作製された siRNA)のRISCへの移行を促進し、アンチセンス鎖が優先的に切断または標的mRNAの翻訳抑制を導き、その結果標的の切断およびサイレンシングを上昇または向上させるようにしてセンス鎖に有利なようにする。好ましくは、RNAi剤の対称性は、RNAi剤のアンチセンス鎖5'末端(AS5')とセンス鎖3'末端(S3')間の塩基対強度を、前記RNAi剤のアンチセンス鎖3'末端(AS3')およびセンス鎖5'末端(S5')結合力または塩基対強度と比較して弱めることによって高められる。

【0104】

ある実施態様では、本発明のRNAi剤の非対称性を高めて、第1またはアンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖部分の3'末端との間のG:C塩基対が、第1またはアンチセンス鎖の3'末端とセンス鎖部分の5'末端との間のG:C塩基対より少なくなるようにしてもよい。別の実施態様では、本発明のRNAi剤の非対称性を高めて、第1またはアンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖部分の3'末端との間に少なくとも1つのミスマッチ塩基対が存在しうるようにしてもよい。ミスマッチ塩基対は、G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:CおよびU:Uからなる群から選択されることが好ましい。別の実施態様では、本発明のRNAi剤の非対称性を高めて、第1またはアンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖部分の3'末端との間に少なくとも1つのゆらぎ塩基対が存在しうるようにしてもよい。別の実施態様では、本発明のRNAi剤の非対称性を高めて、希少ヌクレオチドを含む塩基対、例えば、イノシン(I)が少なくとも1つ存在するようにしてもよい。該塩基対は、I:A、I:UおよびI:Cからなる群から選択されることが好ましい。さらに別の実施態様において、本発明のRNAi剤の非対称性を高めて、修飾されたヌクレオチドを含む塩基対が少なくとも1つ存在するようにしてもよい。好ましい実施態様においては、該修飾ヌクレオチドは、2-アミノ-G、2-アミノ-A、2,6-ジアミノ-G、および2,6-ジアミノ-Aからなる群から選択される。

【0105】

いくつかの特徴的な局面において、本発明は、修飾しない場合と比較して、RNAiの有効性と特異性を高めることが可能な修飾された非対称shRNAを提供する。修飾されたshRNAは、少なくとも21ヌクレオチド長（例えば、21、22、23、24、25、30、35、37、38、39、または40以上のヌクレオチド長）であるアンチセンスシステム部分を特徴とする（「21ntステムshRNA」）。非対称shRNAは、修飾されないshRNAと新たなshRNAからのサイレンシング二本鎖が、アンチセンス鎖または第1の鎖の5'末端とセンス鎖または第2の鎖の3'末端の間の塩基対の力がアンチセンス鎖または第1の鎖の3'末端とセンス鎖または第2の鎖の5'末端の間の塩基対の力より弱い点において異なる。

【0106】

ある好ましい実施態様では、本発明の修飾21ntステムshRNAは、アンチセンス鎖の5'末端から3位で塩基対力を有する。したがって、ある実施態様では、修飾21ntステムshRNAは、第1またはアンチセンス鎖の5'末端から3位とセンス鎖部分の3'末端にミスマッチの塩基対を有する。ミスマッチ塩基対は、G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:C、およびU:Uからなる群から選択されることが好ましい。別の実施態様では、修飾21ntステムshRNAは、ゆらぎ塩基対、例えば、G:Uを、第1またはアンチセンス鎖の5'末端から3位およびセンス鎖部分の3'末端に含む。別の実施態様では、修飾21ntステムshRNAは、希少ヌクレオチド、例えば、イノシン(I)を第1またはアンチセンス鎖の5'末端から3位およびセンス鎖部分の3'末端に含む。該塩基対は、I:A、I:UおよびI:Cからなる群から選択されることが好ましい。さらに別の実施態様において、修飾21ntステムshRNAは、第1またはアンチセンス鎖の5'末端から3位またはセンス鎖部分の3'末端に、修飾ヌクレオチドを持つ。好ましい実施態様においては、該修飾ヌクレオチドは、2-アミノ-G、2-アミノ-A、2,6-ジアミノ-G、および2,6-ジアミノ-Aからなる群から選択される。

【0107】

いくつかの例示的实施態様において、本発明の修飾shRNAは、突然変異siRNA P11（配列番号：5、センス；配列番号：6、アンチセンスまたはガイド）、突然変異siRNA P10（配列番号：3、センス；配列番号：4、アンチセンス、またはガイド）、突然変異

siRNA P9（配列番号：1、センス；配列番号：2、アンチセンス、またはガイド）、またはG93A

SOD1 siRNAを発現することができるshRNAの修飾された変形例である。前記修飾されたshRNAは、非対称である。なぜなら、前記修飾された変形例のアンチセンス鎖の5'末端の塩基力が、前記修飾された変形例のアンチセンス鎖の3'末端の塩基力より小さいからである。

【0108】

2) 安定性が高められたRNAi剤

本発明のRNAi剤を修飾して、血清中または細胞培養用の成長培地中での安定性を高めることができる。安定性を高めるために、3'-残基を、分解に対して安定性を持つようにしてもよい。例えば、それらを、プリンヌクレオチド、特にアデノシンまたはグアノシンヌクレオチドから成るように選択してもよい。別法として、ピリミジンヌクレオチドの修飾類似体での置換、例えば、ウリジンの2'-デオキシチミジンでの置換が許容でき、RNA干渉の効率に影響を及ぼさない。

【0109】

好ましい局面において、本発明は、第1および第2の鎖を含むRNAi剤を特徴とする。そこで、第2の鎖および/または第1の鎖は、対応する非修飾RNAi剤と比較してin vivo 安定性が高められるように、内部ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドで置換することによって修飾されている。本明細書において定義されているように、「内部」ヌクレオチドとは、核酸、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端以外のあらゆる位置で発生するものである。内部ヌクレオチドは、一本鎖分子中、また

は二本鎖の中の1つの鎖、または二本鎖分子であることができる。ある実施態様では、センス鎖および/またはアンチセンス鎖を、少なくとも1つの内部ヌクレオチドを置換することによって修飾する。別の実施態様では、センス鎖および/またはアンチセンス鎖を、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25以上の内部ヌクレオチドを置換することによって修飾する。別の実施態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖を、内部ヌクレオチドの少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上を置換することによって修飾する。さらに別の実施態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖を、内部ヌクレオチドの全てを置換することによって修飾する。

10

【0110】

本発明の好ましい実施態様においては、RNAi剤は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド類似体を含むことができる。該ヌクレオチド類似体は、標的特異的サイレンシング活性、例えば、RNAi媒介活性、または翻訳抑制が実質的に影響を受けない位置、例えば、siRNA分子の5'末端および/または3'末端に位置づけることができる。特に、末端は、修飾ヌクレオチド類似体を組み込むことで安定化してもよい。

【0111】

好ましいヌクレオチド類似体は、糖修飾および/または骨格修飾されたりボヌクレオチド(すなわち、リン酸-糖骨格への修飾を含む)。例えば、天然のRNAのホスホジエステル結合を修飾して、少なくとも1つのニトロゲンまたは硫黄ヘテロ原子を含むようにしてもよい。好ましい骨格修飾リボヌクレオチドでは、隣接しているリボヌクレオチドに接続しているリン酸エステル基を、修飾された基、例えば、ホスホチオエートで置換してもよい。好ましい糖修飾リボヌクレオチドでは、2'-OH-基は、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、またはONから選択される基で置換される。但し、Rは、C₁-C₆アルキル、アルケニルもしくはアルキニルであり、ハロはF、Cl、BrもしくはIである。

20

【0112】

特別な実施形態において、修飾は、2'-フルオロ、2'-アミノおよび/または2'-チオ修飾である。特に好ましい修飾は、2'-フルオロ-シチジン、2'-フルオロ-ウリジン、2'-フルオロ-アデノシン、2'-フルオロ-グアノシン、2'-アミノ-シチジン、2'-アミノ-ウリジン、2'-アミノ-アデノシン、2'-アミノ-グアノシン、2',6-ジアミノプリン、4-チオ-ウリジン、および/または5-アミノ-アルキル-ウリジンを含む。特別の実施形態において、該2'-フルオロリボヌクレオチドは、すべてのウリジンおよびシチジンである。修飾のさらなる例としては、5-プロモ-ウリジン、5-ヨード-ウリジン、5-メチル-シチジン、リボ-チミジン、2-アミノプリン、2'-アミノ-ブチリル-ピレン-ウリジン、5-フルオロ-シチジン、および5-フルオロ-ウリジンが含まれる。2'-deoxy-ヌクレオチド、および2'-Omeヌクレオチドは、本発明の修飾されたRNA-サイレンシング剤部分内で用いることもできる。さらなる修飾された残基には、デオキシアベーシック(原語: deoxy-abasic)、イノシン、N₃-メチル-ウリジン、N₆、N₆-ジメチル-アデノシン、シュードウリジン、プリンリボヌクレオチドおよびリパビリンが含まれる。特に好ましい実施形態では、該2'部分は、メチル基であり、結合部分が2'-O-メチルオリゴヌクレオチドとなるようにしている。

30

40

【0113】

ある実施形態においては、本発明のRNAサイレンシング剤は、ロックド核酸(Locked Nucleic Acids)(LNA)である。LNAは、ヌクレアーゼ活性に耐性のある糖修飾ヌクレオチド(非常に安定している)およびmRNAのために単一のヌクレオチド識別を有している(Elmen et al., Nucleic Acids Res., (2005), 33(1): 439-447; Braasch et al., (2003) Biochemistry

50

42:7967-7975, Petersen et al. (2003) Trends

Biotechnol 21:74-81)。これらの分子は、2' - O、4' - C - エチレン - 架橋核酸を、2' - デオキシ - 2" - フルオロウリジンなどの可能な修飾とともに有している。さらに L N A は、糖部分を 3' - エンドコンホーメーションに強制的に入れることによって、オリゴヌクレオチドに対する特異性を上昇させている。それによって、塩基対に対するヌクレオチドを予め組織化し、ヌクレオチドの融解温度を一塩基につき 10 も上昇させる。

【 0 1 1 4 】

別の実施態様において、本発明の R N A サイレンシング剤は、ペプチド核酸 (P N A) を含む。P N A は、ヌクレオチドの糖 - リン酸部分が、ヌクレアーゼ消化に対して高い耐性を示し、改良された結合特異性を分子に付与する、ポリアミド骨格を形成することが可能な中性の 2 - アミノエチルグリセリン部分で置換されている、修飾ヌクレオチドを含む (Nielsen, et al., Science, (2001), 254: 1497-1500)。

10

【 0 1 1 5 】

核酸塩基修飾リボヌクレオチド、すなわち、天然に存在する核酸塩基ではなく、非天然に存在する核酸塩基を少なくとも 1 つ含有するリボヌクレオチドも好ましい。塩基を修飾してアデノシンデアミナーゼの活性をブロックしてもよい。修飾された核酸塩基の例としては、限定されないが、ウリジンおよび / または 5 位が修飾されたシチジン、例えば、5 - (2 - アミノ) プロピルウリジン、5 - プロモウリジン; アデノシンおよび / または 8 位が修飾されたグアノシン、例えば、8 - プロモグアノシン; デアザヌクレオチド、例えば、7 - デアザ - アデノシン; O - および N - アルキル化ヌクレオチド、例えば、N 6 - メチルアデノシンが好適である。上記修飾は組み合わせてもよい。

20

【 0 1 1 6 】

別の実施態様において、架橋を採用して、R N A i 剤のファーマコキネティクスを変更する、例えば、体内での半減期を長くすることができる。したがって、本発明は、2 つの鎖が架橋している核酸の 2 つの相補鎖をもつ R N A i 剤を含む。本発明はまた、別の部分 (例えば、ペプチドなどの非核酸部分)、有機化合物 (例えば、色素) などに抱合または非抱合した (例えば、その 3' 末端にて) R N A i 剤も含む。このように s i R N A 誘導体を修飾することは、対応する s i R N A と比較して、細胞の取り込みを向上させ、または、得られた s i R N A 誘導体の細胞標的活性を高めるかもしれない、細胞内の s i R N A 誘導体を追跡するのに有用であり、または、対応する s i R N A と比較して、s i R N A 誘導体の安定性を高める。

30

【 0 1 1 7 】

抱合は、当業で公知の方法で、例えば、Lambert et al., Drug Deliv. Rev.:47 (1), 99-112 (2001) (ポリアルキルシアノアクリレート (P A C A) ナノ粒子に置かれた核酸について記載している); Fattal et al., J. Control Release 53 (1-3):137-43 (1998) (ナノ粒子に結合した核酸について記載している); Schwab et al., Ann. Oncol. 5 Suppl. 4:55-8 (1994) (挿入剤、疎水性基、ポリカチオンもしくは P A C A ナノ粒子に結合した核酸について記載している); および Godard et al., Eur. J. Biochem. 232 (2):404-10 (1995) (ナノ粒子に結合した核酸について記載している) に記載の方法で達成することができる。

40

【 0 1 1 8 】

本発明の R N A i 剤はさらに、当業で公知の方法を用いて標識化することができる。例えば、核酸組成物をフルオロフォア、例えば、Cy 3、フルオレセイン、またはローダミンで標識化することができる。標識化は、キット、例えば、S I L E N C E R (登録商標) s i R N A 標識キット (Ambion) を用いて行うことができる。さらに、該物質は、例えば、³H、³²P、また他の適切なアイソトープを用いて放射線標識を行うこともできる。

50

【0119】

d. RNAi剤の作製

RNAi剤（例えば、siRNA）は、酵素的に、または、部分的／全体的有機合成によって作製してもよい。

【0120】

ある実施態様では、RNAi剤は、化学的に調製される。RNA分子の合成方法は、当業で公知である。特にVerma and Eckstein（1998）Annul Rev. Biochem. 67:99-134に記載の化学合成方法により公知である。

【0121】

ある実施態様において、RNAi剤は酵素的に調製される。例えば、siRNA分子は、所望の標的mRNAに対して十分な相補性をもつ長dsRNAの酵素処理によって調製することができる。長dsRNAの処理は、in vitroで、例えば、適切な細胞ライセートを用いて達成することができ、続いてsiRNAは、ゲル電気泳動またはゲル濾過によって精製することができる。siRNAは、次に当該技術において認識されている方法によって変性することができる。ある実施形態において、RNAは、溶液または樹脂、沈澱、電気泳動、クロマトグラフィー、もしくはそれらの組み合わせを用いて抽出によって、混合物から、精製することができる。別法として、RNAは、サンプル処理による損失を回避するために、精製を行わないか、殆ど行わずに用いることもできる。別法として、RNAはまた、合成DNA鋳型もしくはDNAプラスミドからの酵素転写によって調製することもできる。典型的に、ファージRNAポリメラーゼ、例えば、T7、T3もしくはSP6 RNAポリメラーゼが用いられる（Milligan and Uhlenbeck（1989）Methods Enzymol. 180:51-62）。RNAは、乾燥させて保存しても良いし、水溶液中に溶解させてもよい。該溶液は、緩衝液または塩を含有しており、アニーリングを阻害し、および／または、単一の鎖の安定化を促進する。

【0122】

本発明のいくつかのRNAi剤、特に、本発明のsiRNA分子はさらに、in vivoで、所望の標的mRNAに対して十分な相補性をもつ長dsRNA（>30bp）の酵素処理によって調製することができる。長dsRNA分子のin vivoでの処理は、dsRNAに対するインターフェロン媒介性の炎症が起こらない、非哺乳動物細胞または哺乳動物細胞において行う。ある実施態様では、dsRNA酵素処理が可能な細胞は、生物内にあるかもしれない。dsRNA処理をin vivoで誘発し、標的遺伝子の遺伝子サイレンシングを生物内で引き起こす。別法として、dsRNA処理のための内因性機構（例えば、DICER）を含み、または異種遺伝子によって形質転換されdsRNA処理が可能とされた細胞（すなわち、宿主細胞）を培養して、in vitroでdsRNAを誘発してもよい。その後、サイレンシングすべき標的遺伝子を含む生物に投与するために、dsRNA処理に引き続いて、RNAサイレンシング剤を宿主細胞から精製することができる。

【0123】

別の実施態において、RNAiは、in vivo、in situ、またはin vitroで直接合成される。細胞中の内因性のRNAポリメラーゼは、RNAi剤の転写をin vivoもしくはin situで媒介し、またはクローニングされたRNAポリメラーゼは、in vivoまたはin vitroで、転写のために使用することができる。in vivo導入遺伝子または発現作製物からの転写のために、調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、スプライスドナー、アクセプター、ポリアデニル化）を用いて、RNAi剤（例えば、siRNAまたはshRNA）を転写してもよい。阻害を、臓器、組織、または細胞のタイプにおける特異的な転写、環境条件の刺激（例えば、感染、ストレス、温度、化学的誘導物質）、および／または開発段階もしくは年齢における光学処理的転写によって、標的化してもよい。RNAi剤（例えば、siRNAまたはshRNA）を発現する、該作製物を適切な生物に由来する接合体、胚性幹細胞、または他の多分化能細胞に導入することによって、トランスジェニック生物を組換え作製物から作製してもよい。

【0124】

e. RNAi 剤の検出

本発明のいくつかの局面において、RNAi 剤（例えば、siRNA および shRNA）、標的 mRNA、および/または前記標的 RNA にコードされた遺伝子産物の生成または発現を検出することがこのましかもしれない。本明細書に記載の検出方法には、例えば、クローニングおよびシーケンシング、オリゴヌクレオチドのライゲーション、ポリメラーゼ連鎖反応法の使用、およびそれらの変形（例えば、7-デアザGTP を用いた PCR）、単一ヌクレオチドプライマー誘導伸長アッセイ、所与のストリンジェントな条件下で相補配列に優先的に結合し得ることがわかっている標的特異的オリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション技術、およびサンドウィッチハイブリダイゼーション法が含まれる。

10

【0125】

シーケンシングは、標識されたプライマーもしくはターミネーターを用いた市販の自動シーケンサーを用いて行ってもよいし、またはシーケンシングゲルベース方法によって行ってもよい。標的 DNA または RNA 分子上で互いに近接するとすぐアニーリングを行うオリゴヌクレオチド配列のライゲーションに基づく方法によって配列分析を行うこともできる（Wu and Wallace, Genomics 4: 560-569 (1989); Landren et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 8923-8927 (1990); Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189-193 (1991)）。オリゴヌクレオチドが正確に塩基対を成したときにのみ、リガーゼによって媒介される共有結合が生じる。遅発型の糖尿病突然変異の座位を調べるのに、標的の増幅に熱安定性 Taq リガーゼを用いるリガーゼ鎖反応（LCR）が特に有用である。本能温度を上げることで、高ストリンジェント条件下で行われるライゲーション反応が可能になる（Barany, F., PCR Methods and Applications 1: 5-16 (1991)）。

20

【0126】

ハイブリダイゼーション反応は、標的核酸をニトロセルロースまたはナイロン膜状で固定化し、オリゴヌクレオチドプローブで調べる、フィルターベースのフォーマットで行ってもよい。サザンブロット、スロットブロット、「逆」ドットブロット、溶液ハイブリダイゼーション、固体サポートベースのサンドウィッチハイブリダイゼーション、ビーズベース、シリコンチップベース、およびマイクロタイターウェルベースのハイブリダイゼーションフォーマットを含めた公知のハイブリダイゼーションフォーマットのいずれを使ってもよい。

30

【0127】

検出オリゴヌクレオチドプローブの範囲は、10 - 1,000 塩基の大きさの範囲である。検出オリゴヌクレオチドプローブを用いて、必要な標的識別を取得するために、通常、ハイブリダイゼーション反応は、20 乃至 60 で行われる。最も好ましくは、30 乃至 50 で行われる。当業で公知のように、完全な二本鎖およびミスマッチしている二本鎖の間の最適な識別は、ストリンジェントの洗浄中でのホルムアミドの温度および/または塩濃度を操作することによって行われる。

【0128】

タンパク質の検出は、特異的な抗体、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、またはそのフラグメントを用いて行われる。

40

【0129】

好ましい検出試薬、例えば、蛍光剤によってクロモ-メトリカルに（coloro-metrically）またはラジオイソタイプカルに（radio-iso-typically）標識され、視覚化および/または定量を容易になる。

【0130】

IV. 作製物および宿主細胞

本発明の別の局面は、作製物、好ましくは、RNAi 剤（例えば、siRNA または shRNA）またはその部分をコードする発現作製物に関する。本発明の発現作製物には、適切な発現系に使用するのに好適な任意の作製物が含まれ、当業において公知のレトロウ

50

イルスベクター、直線状発現カセット、プラスミド、およびウイルスまたはウイルス由来ベクターがそれらに限定されずに含まれる。そのような発現作製物には、1つ以上の誘導プロモーター、U6

snRNAプロモーターもしくはH1 RNAポリメラーゼIIIプロモーターなどのRNA Pol IIIプロモーターシステム、または当業において公知のその他のプロモーターが含まれてよい。該作製物には、RNAi剤の1または両方の鎖を促進することを含むことができる。両方の鎖を発現する発現作製物には、両方の鎖を連結するループ構造が含まれてもよく、または各鎖は同一の作製物内の個別のプロモーターから別々に転写されてもよい。各鎖は個別の発現作製物から転写されてもよい(Tuschl (2002), 上掲)。

【0131】

10

ある実施態様では、該作製物は、導入遺伝子である。別の実施態において、該作製物はベクターである。本明細書において用いられているところの用語「ベクター」とは、連結された先の別の核酸を輸送できる核酸分子を言う。1つのタイプのベクターは、付加的なDNAセグメントをライゲーションできる環状の二本鎖DNAループを言う「プラスミド」である。別のタイプのベクターはウイルスベクターである。このベクターでは、付加的なDNAセグメントはウイルスゲノムにライゲーションできる。いくつかのベクターは、それらが導入された宿主細胞(例えば、バクテリア性複製起点をもつバクテリアベクターおよびエピソームの哺乳動物ベクター)において自律複製することができる。宿主細胞の導入時に、他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)を宿主細胞のゲノムに組み込み、それによって宿主のゲノムとともに複製することができる。さらにいくつかのベクターは、それらが作用可能に結合した遺伝子の発現を指向することができる。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技法に用いられる発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。プラスミドが最も一般的に用いられるベクターの形体であるので、本明細書においては「プラスミド」および「ベクター」は、互換可能に使用することができる。しかしながら、本発明は、そのような形体の他の形体の発現ベクター、例えば、同様の機能を発揮するウイルスベクター(例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)を含む。

20

【0132】

30

本明細書に記載されているベクターは、当業で公知の種々の方法によって細胞や組織に導入することができる。そのような方法は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1992)に記載されている。その内容を本明細書に引用によって援用する。また、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Hitt et al., "Construction and propagation of human adenovirus vectors," in Cell Biology: A Laboratory Handbook, Ed. J. E. Celis., Academic Press. 2.sup.nd Edition, Volume 1, pp: 500-512, 1998; Hitt et al., "Techniques for human adenovirus vector Construction and characterization," in Methods in Molecular Genetics, Ed. K. W. Adolph, Academic Press, Orlando, Fla., Volume 7B, pp:12-30, 1995; Hitt, et al., "Construction and propagation of human adenovirus vectors," in Cell Biology: A Laboratory Handbook," Ed. J. E. Celis. Academic Press. pp:479-490, 1994,も参照されたい。これらも本明細書に引用を持って援用する。該方法は、例えば、安定な、もしくは一過性のトランスフェクション、リポフェクション(例えば、カチオン性リポソームトランスフェクション)、エレクトロポレーション、および組換えウイルスベクターの感染を含む。

40

【0133】

いくつかの態様において、本発明の発現作製物は、1以上の調節配列(例えば、プロモーター配列)に作用可能に連結する核酸(DNAまたはRNA)含む。「作用可能に連結

50

する」というフレーズは、関心のあるヌクレオチド配列（例えば、RNAi 剤（例えば、shRNA）をコードする配列）を、ヌクレオチド配列（例えば、in vitro の転写 / 翻訳系の中、またはベクターを宿主細胞に導入した場合は宿主細胞中）が発現可能となるようなやり方で、調節配列に連結することを意味するものとされる。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および結合分子遺伝子鎖の転写または翻訳をコントロールする他の発現コントロールエレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図されている。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic

Press, San Diego, CA (1990) に記載されている。調節配列は、多くの種類の宿主細胞でのヌクレオチド配列の直接的な構成発現および、特定の宿主細胞のみでのヌクレオチド配列の直接的発現（例えば、組織特異的調節配列）を含む。

10

【0134】

特定の発現ベクターの設計に含まれる他のエレメントは、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどのファクターに依存することができる。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それによって、本明細書に記載の核酸によってコードされる、mRNA、融合タンパク質もしくはペプチドを含むタンパク質もしくはペプチドを産生させることができる。

【0135】

作製物は、当業で公知の組換えDNA技術によって構築することができる。RNAi 剤をコードする核酸配列は、公知の技法を用いて調製することができる。例えば、2つの合成DNAオリゴヌクレオチドを合成して、新規な全体的なRNAi 剤を創製することができる。クローニングのための「粘着性の末端」を残している、対を成すDNAオリゴヌクレオチドを、プロモーター配列（例えば、Pol I I I m a t a h a P o l I I I プロモーター）および適切なターミネーター配列 3' を操作されたRNA前駆体配列（例えば、SV40またはPol I I I ターミネーター配列からの切断およびポリアデニル化シグナル）に含有するプラスミドの制限部位に挿入することができる。

20

【0136】

本明細書に記載の作製物は、当業で公知の種々の方法のいずれかによって細胞や組織に導入することができる。そのような方法は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1992) に記載されている。その内容を本明細書において引用によって援用する。また、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley

30

and Sons, Baltimore, Md. (1989); Hitt et al, "Construction and propagation of human adenovirus vectors," in Cell Biology: A Laboratory Handbook, Ed. J. E. Celis., Academic Press. 2.sup.nd Edition, Volume 1, pp: 500-512, 1998; Hitt et al, "Techniques for human adenovirus vector

Construction and characterization," in Methods in Molecular Genetics, Ed.

K. W. Adolph, Academic Press, Orlando, Fla., Volume 7B, pp:12-30, 1995; Hitt, et al., " Construction and propagation of human adenovirus vectors,"

40

in Cell Biology: A Laboratory Handbook," Ed. J. E. Celis. Academic Press.

pp:479-490, 1994も参照されたい。これらも本明細書に引用を持って援用する。該方法は、例えば、安定な、もしくは一過性のトランスフェクション、リポフェクション（例えば、カチオン性リボソームトランスフェクション）、エレクトロポレーション、および組換えウイルスベクターの感染を含む。

【0137】

a . RNAi 剤発現作製物

いくつかの態様において、本発明は、本発明のRNAi 剤（例えば、siRNAおよびshRNA）の発現を促進するDNA発現作製物を提供する。

50

【0138】

標的mRNAの発現を抑制するのに十分なRNAi剤の細胞内濃度を達成するためには、例えば、そのような発現作製物には、1つ以上の誘導プロモーター、U6 snRNAプロモーターもしくはH1 RNAポリメラーゼIIIプロモーターなどのRNA Pol IIIプロモーターシステム、または当業で公知のその他のプロモーターが含まれてよい。そのような作製物を、標的細胞をin vitro またはin vivo でトランスフェクトすることによって、切断（すなわち、RNAi）のための十分な量のRNAi剤の転写が導かれる。例えば、ベクターは、細胞に取り込まれ、RNAi剤の転写を導くように、in

vivo で導入することができる。そのようなベクターは、エピソームを維持してもよいし、転写され、所望のstRNA前駆体を産生する限り、染色体に導入されてもよい。

10

【0139】

いくつかの態様において、本発明の発現作製物は、siRNAをコードする。該発現作製物は、好ましくは、siRNAの両方の鎖をコードする。両方の鎖を発現する発現作製物には、両方の鎖を連結するループ構造が含まれてもよい。別法として、各鎖は、同一の作製物内の別個のプロモーターから別々に転写されてもよい。各鎖は別個の発現作製物から転写されてもよい（Tuschl（2002），上掲）。

【0140】

ある局面では、RNAi剤を本願明細書に記載の例えばsiRNAまたはshRNAなどの干渉リボ核酸ではなく、前記RNAi剤は本願明細書に記載の例えばshRNAなどの干渉ヌクレアーゼをコードしてもよい。つまり、前記RNAi剤は、前記干渉リボ核酸の転写テンプレートであってもよい。したがって、本発明のRNAi剤には、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、およびshRNAを発現するためにつくられた発現作製物が含まれてよい。shRNAの転写は、ポリメラーゼIII（pol III）プロモーターから開始し、4 - 5チミン転写終了部位の2位で終了すると考えられている。発現後、shRNAは3' UUオーバーハングを有するステム-ループ構造に折り畳まれると考えられ、その後、これらのshRNAの末端が処理されて、shRNAが約21乃至23ヌクレオチドのsiRNA様分子に転換される。Brummelkamp et al., Science 296:550-553（2002）；Lee et al.,（2002）. 上掲；Miyagishi and Taira, Nature Biotechnol. 20:497-500（2002）；Paddison et al.（2002），上掲；Paul（2002），上掲；Sui（2002）上掲；Yu et al.（2002），上掲。そのようにして精製されたshRNAを適切な条件下で、RNAi機構によって処理して（例えば、適切なin vitro 反応または細胞中）（すなわち、ダイサーおよび/またはRISC複合体）、siRNAを生成する。shRNAは、外因的に合成することが可能であり、または、in vivo でRNAポリメラーゼ（例えば、Pol IIIもしくはPol IIIポリメラーゼ）から転写することもでき、所望の遺伝子サイレンシングが安定しており、また遺伝的である、連続的な細胞系列またはトランスジェニック動物を構築することを可能にする。

20

30

【0141】

単一の作製物は、RNAi剤（例えば、siRNA）をコードする多数の配列、例えば、突然変異体SOD1をコードし、同じ遺伝子または複数の遺伝子を標的化し、例えば、別個のPol IIIプロモーター部位によって駆動しうる遺伝子の多数の領域を含んでもよい。

40

【0142】

ウイルス媒介送達メカニズムを用いて、例えばRNA Pol IIIプロモーター転写制御下におけるsiRNAを有する組換えアデノウイルスの作製などによるsiRNAの発現を通して、標的遺伝子の特異的サイレンシングを誘導することができる（Xia et al.,（2002），上掲）。これらの組換えアデノウイルスによるHeLa細胞の感染によって、内因性標的遺伝子発現を低減することができる。siRNAの標的遺伝子を発現するトランスジェニックマウスに組換えアデノウイルスベクターを注射すると、in vivoにおいて標的遺伝子の発現が減少する。同文献。動物モデルにおいて、全胚電気穿孔は、合成si

50

R N A を効率的に移植後マウス胚合成 s i R N A に送達させることができる (Calegari e t a l., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (22):14236-40 (2002))。成体マウスにおいて、核酸物質の効率的な送達は、「高圧」送達技術によって実現することができる。これは溶液を含有する大量の核酸物質を、尾部静脈を介して動物体内へ迅速に (5 秒以内に) 注入する技術である。(Liu (1999), 上掲; McCaffrey (2002), 上掲; Lewis, Nature Genetics 32:107-108 (2002))。

【0143】

b. 宿主細胞

本発明の別の局面は、本発明の宿主作製物が導入された宿主細胞、すなわち、「組換え宿主細胞」に関する。用語「組換え宿主細胞」は、特定の被検細胞のみならず、そのような細胞の子孫を意味することも意図されている。突然変異や環境の影響によって後の世代において特定の变形が生じるかも知れず、そのような子孫は、実際、親細胞と同一ではないかもしれないが、それでもなお本明細書において用いられる用語「宿主細胞」の範囲に含むものとする。

【0144】

宿主細胞は、真核細胞の方が好ましいものの、原核細胞または真核細胞のいずれでもよい。真核細胞の例としては、哺乳動物細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞 (C H O) または C O S 細胞) が挙げられる。他の好適な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0145】

本発明の宿主細胞を用いて、非ヒトトランスジェニック動物を作製することもできる。非ヒトトランスジェニック動物は、作用物質もしくは化合物、例えば、障害、例えば、突然変異もしくは異常な遺伝子発現、機能獲得型の突然変異に関連した疾患や障害、および神経学的疾患や障害などの有害な徴候を寛解させることが可能な薬物、医薬品などを同定するために設計されたスクリーニングアッセイにおいて用いることができる。

【0146】

本発明はまた、限定されないが、本明細書において用いられる、細胞種や細胞系列の使用に関する。異なる組織、または異なる種 (ヒト、マウス、など) からの細胞もまた本発明において有用である。

【0147】

V. R N A i を誘導するための操作された前駆体の使用

本明細書において記載しているように、細胞または生物体全体に導入された操作された R N A 前駆体は、所望の s i R N A 分子を導く。そのような s i R N A 分子は、R N A i 経路の内因性のタンパク質成分と結合し、特異的な m R N A 配列を切断および破壊の標的とする。このようにして、操作された R N A 前駆体から生成された s i R N A によって標的とされた m R N A は、細胞または生物体から枯渇していき、細胞または生物体における m R N A によってコードされたタンパク質の濃度は減少する。

【0148】

V I. 核酸、ベクター、および宿主細胞を導入する方法

核酸を導入する物理的方法としては、核酸を含有する溶液の注入、核酸で被覆した粒子の照射、細胞もしくは生物体の核酸溶液への浸漬、または核酸の存在下での細胞膜のエレクトロポレーションがあげられる。ウイルス粒子にパッケージされたウイルス作製物は、発現作製物の細胞への効率的な導入および該発現作製物でコードされた R N A の転写の双方を達成することができるであろう。核酸を細胞へ導入するための、当業で公知の他の方法を用いてもよい。例えば、液体媒介性担体輸送、リン酸カルシウムなどの化学物質により媒介される輸送などがある。核酸は、細胞によって核酸の取り込みを高める活性、標的遺伝子の阻害を高める活性のうちの 1 以上を達成する他の成分とともに導入してもよい。

【0149】

核酸は、細胞に直接 (すなわち、細胞内に) 導入してもよいし、または細胞外的に腔や間質性の空間に導入してもよいし、生物体の血液循環中に導入してもよい。また、経口的に導入してもよいし、細胞もしくは生物体を、核酸を含有する溶液に浸すことによって導

10

20

30

40

50

入してもよい。血管もしくは血管外、血液もしくはリンパ系、および脳脊髄液が、核酸を導入する部位となる。

【0150】

該標的遺伝子を持つ細胞は、生殖細胞系列または体細胞、全能細胞または多分化能をもつ細胞、分裂型細胞または非分裂型細胞、実質細胞または上皮細胞、不死化された細胞または形質転換された細胞、などのいずれからのものでもよい。該細胞は幹細胞または分化細胞でよい。分化される細胞には、脂肪細胞、線維芽細胞、筋細胞、心筋細胞、内皮、神経細胞、グリア細胞、血液細胞、巨大核細胞、リンパ細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞、白血球、顆粒球、ケラチノサイト、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝実質細胞、および内分泌腺または外分泌腺の細胞が含まれる。

10

【0151】

特定の標的細胞および送達されるRNAi剤の投与量に依存して、このプロセスは、標的遺伝子の部分的または完全な機能の損失をもたらすかもしれない。遺伝子発現の減少もしくは損失は、例えば、標的とされる細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%以上である。遺伝子発現の阻害とは、標的遺伝子からのタンパク質および/またはmRNA生成物のレベルの欠如（もしくは観察可能な減少）を言う。いう。特異性とは、他の遺伝子の細胞に明らかな効果を及ぼすことなく標的遺伝子を阻害する能力を言う。阻害の結果は、細胞もしくは生物体（以下の例中に記載）の外向きの特性を調べることによって、または、RNA溶液ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、ノーザンハイブリダイゼーション、逆転写、マイクロアレイを用いた遺伝子発現のモニタリング、抗体結合、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ウエスタンブロッティング、ラジオイムノアッセイ（RIA）、他のイムノアッセイ、および蛍光標示式細胞分析（FACS）によって、確認することができる。

20

【0152】

細胞系列または生物体全体におけるRNA媒介性の阻害は、そのタンパク質産物を容易に調べられるレポーター遺伝子または薬剤耐性遺伝子を用いて好都合に調べられる。そのようなレポーター遺伝子には、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（AHS）、アルカリホスファターゼ（AP）、ベータガラクトシダーゼ（LacZ）、ベータグルコニダーゼ（原語；glucoronidase）（GUS）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）、ルシフェラーゼ（Luc）、ノバリンシンターゼ（NOS）、オクトピンシンターゼ（OCS）、およびそれらの誘導体がある。多数の選択可能なマーカーが入手可能であり、それらはアンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、フォスフィノスリシン、ピューロマイシン、およびテトラサイクリンに対して耐性を示すものである。アッセイによって、遺伝子発現を定量化して、本発明によって処理されていない細胞と比較して、阻害の程度が10%、33%、50%、90%、95%または99%より大きいものを決定することができる。注入する物質の用量を下げ、RNAi剤投与からの時間を長くすることによって、少量の細胞での阻害を得てもよい（例えば、標的細胞の10%、20%、50%、75%、90%、または95%）。細胞中での遺伝子発現の定量化によっても、標的mRNAの蓄積または標的タンパク質の翻訳のレベルにおいて、類似の阻害量を示すかもしれない。例として、阻害効率は、細胞中の遺伝子産物の量を評価することによって決定すればよく、mRNAは、阻害性二重鎖RNAに使用する領域の外部にヌクレオチド配列をもつハイブリダイゼーションによって阻害すればよい。または翻訳されたポリペプチドは、その領域のポリペプチド配列に対する抗体によって検出することができる。

30

40

【0153】

RNAi剤は、1細胞につき少なくとも1つのコピーを送達することができる量を導入すればよい。より高い容量（例えば、1細胞につき少なくとも5、10、100、500または1000コピー）の物質を用いれば、より高い阻害効率を得られるかもしれない。また、特異的適用のためには低用量が有用かもしれない。

50

【0154】

合成 *siRNA* は、カチオン性リポソームトランスフェクションおよびエレクトロポレーションをはじめとした、当業で公知の方法で細胞に送達することができる。しかしながら、外因性 *siRNA* は、一般的にサイレンシング効果の持続性が短い（培養細胞において4～5日）。このことは、特定の実施態様においてのみ有益かもしれない。標的遺伝子（すなわち、突然変異体遺伝子）の抑制効果を長くし、特定の条件下で、送達を容易にするためには、1以上の *siRNA* を、組換えDNA作製物由来の細胞内で発現させることができる。組換えDNA作製物由来の細胞内で *siRNA* 二本鎖を発現させて、長時間の標的遺伝子抑制を可能にするそのような方法は、当業で公知であり、機能的二本鎖 *siRNA* を発現することが可能な哺乳動物 *Pol*

10

III プロモーター系（例えば、*H1* または *U6* / *snRNA* プロモーター系（Tuschl（2002）、上掲）；（Bagella et al., J. Cell. Physiol. 177:206-213（1998）；Lee et al.（2002）、上掲；Miyagishi et al.（2002）、上掲；Paul et al.（2002）、上掲；Yu et al.（2002）、上掲；Sui et al.（2002）、上掲）などがある。*RNA*

Pol III による転写終了は、DNAテンプレート内の4つの連続したT残基で起こり、*siRNA* 転写を特異的な配列で停止するメカニズムを提供する。*siRNA* は、標的遺伝子内の配列に5' - 3' および3' - 5' 方向において相補的である。そして、*siRNA* の2つの鎖を同じ作製物または別個の作製物中で発現させることができる。*H1* または *U6* *snRNA* プロモーターによって動くヘアピン *siRNA* は、標的遺伝子の発現を阻害することができる（Bagella et al.（1998）、上掲；Lee et al.（2002）、上掲；Miyagishi et

20

al.（2002）、上掲；Paul et al.（2002）、上掲；Yu et al.（2002）、上掲；Sui et al.（2002）上掲）。T7 プロモーターの制御下で、*siRNA* 配列を含有する作製物もまた、T7

RNA ポリメラーゼを発現するベクターをもつ細胞中でコトランスフェクトされたとき、機能的 *siRNA* を作製する（Jacque（2002）、上掲）。単一の作製物は、*siRNA* をコードする多数の配列、例えば、突然変異体 *SOD1* をコードし、例えば、別個の *Pol III* プロモーター部位によって同じ遺伝子または多数の遺伝子を標的とする遺伝子の多数の領域を含んでもよい。

30

【0155】

動物細胞は、動物発育中の転写後または翻訳レベルでの遺伝子の発現を調節することができるマイクロRNA（*miRNA*）と称される約22ヌクレオチドの非コードRNAの範囲を発現する。*miRNA* の1つの共通の特徴は、約70ヌクレオチド前駆体RNAステムループから、おそらくダイサー、*RNase*

III 型酵素、もしくはその類似体によって、切断されているということである。*miRNA* 前駆体のステム配列を標的*mRNA* に相補的な配列で置換することによって、操作された前駆体を発現するベクター作製物を用いて、*siRNA* を作製し、哺乳動物細胞中で特異的な*mRNA* 標的に対する*RNAi*を開始することができる（Zeng（2002）、上掲）。ポリメラーゼ *III* プロモーターを含有するDNAベクターによって発現させたとき、ヘアピン状態に設計されたマイクロRNA

40

は、遺伝子発現をサイレンスにすることができる（McManus（2002）、上掲）。遺伝子多型を標的とするマイクロRNAも、*siRNA* 媒介性の遺伝子サイレンシングの不存在下で突然変異タンパク質の翻訳をブロックする際に有用である。そのような適用は、例えばデザインされた *siRNA* が野生型タンパク質の標的外サイレンシングを生じるような状況で有用である場合がある。

【0156】

ウイルス媒介送達メカニズムを用いて、例えば、*RNA Pol III* プロモーター転写制御下における *siRNA* を有する組換えアデノウイルスの作製などによる *siRNA* の発現を通して、標的遺伝子の特異的サイレンシングを誘導することができる（Xia et al.（2

50

002)、上掲)。これらの組換えアデノウイルスによるHeLa細胞の感染によって、内因性標的遺伝子発現を低減することができる。siRNAの標的遺伝子を発現するトランスジェニックマウスに組換えアデノウイルスベクターを注射すると、in vivoにおいて標的遺伝子の発現が減少する。同文献。動物モデルにおいて、全胚電気穿孔は、合成siRNAを効率的に移植後マウス胚合成siRNAに送達させることができる(Calegari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(22):14236-40 (2002))。成体マウスにおいて、siRNAの効率的な送達は、「高圧」送達技術によって実現することができる。これは溶液を含有する大量のsiRNAを、尾部静脈を介して動物体内へ迅速に(5秒以内に)注入する技術である(Liu (1999)、上掲; McCaffrey (2002)、上掲; Lewis, Nature Genetics 32:107-108 (2002))。ナノ粒子およびリボソームを用いて、siRNAを動物体内へ送達することもできる。

10

【0157】

本発明の核酸組成物には、非修飾siRNA、および架橋siRNA誘導体、または3'もしくは5'末端などに結合させた非ヌクレオチド部分を有する誘導体など、当業に知られる修飾RNAの両方が含まれる。このようなsiRNA誘導体の修飾は、細胞取り込みが改善するか、もしくは相当するsiRNAと比較して、得られたsiRNA誘導体の細胞の標的活性を促進するか、前記細胞のsiRNA誘導体を追跡するのに有用であるか、または相当するsiRNAと比較したsiRNA誘導体の安定性を向上することもある。

20

【0158】

本願明細書に記載の細胞または組織全体に導入された操作されたRNA前駆体によって、望ましいsiRNA分子の産生が引き起こされるだろう。そこで、そのようなsiRNA分子は、切断および破壊のための特異的なmRNA配列に結合し標的とするRNA経路の内因性タンパク質要素に関連するだろう。このようにすれば、操作されたRNA前駆体から作製されたsiRNAが標的とするmRNAは、前記細胞および生物体から大幅に減少し、前記細胞または組織中のmRNAによってコードされるタンパク質の濃度が減少するだろう。RNA前駆体は、典型的にはdsRNAの1本鎖を個別にコードするか、またはRNAヘアピンループ構造のヌクレオチド配列全体をコードする核酸分子である。

【0159】

本発明の核酸組成物は、例えば吸収、有効性、バイオアベイラビリティ、および/または半減期などの薬物動態学的パラメタなどの前記組成物の性質を向上させるナノ粒子などの別の部分と結合させることもでき、または結合させないでもよい。その結合は、例えば、Lambert et al., Drug Deliv. Rev.:47(1), 99-112 (2001) (ポリアルキルシアノアクリル酸(PACA)ナノ粒子に装着された核酸について記載)、Fattal et al., J. Control

30

Release 53(1-3):137-43 (1998) (ナノ粒子に結合させた核酸について記載)、Schwab et al., Ann. Oncol. 5 Suppl. 4:55-8 (1994) (挿入剤、疎水基、ポリカチオンPACAナノ粒子に結合させた核酸について記載)、およびGodard et al., Eur. J. Biochem. 232(2):404-10 (1995) (ナノ粒子に結合させた核酸について記載)の方法を用いるなど、当業に知られる方法によって実現することができる。

40

【0160】

本発明の核酸分子は、当業に知られる任意の方法を用いて標識することもでき、例えば、前記核酸分子組成物が例えばCy3、フルオレセイン、ローダミンなどのフルオロフォアで標識することができる。その標識は、例えばSILENCE R(登録商標)siRNAラベリングキット(アンピオン)など、キットを用いて行うことができる。さらに、前記siRNAは、例えば³H、³²Pまたはその他の適切な同位体などを用いて放射標識することができる。

【0161】

さらに、RNAiは、少なくとも1つの1本鎖RNA中間体を経る過程であると考えられるため、当業者は、ss-siRNA(例えばds-siRNAのアンチセンス鎖など

50

、本願明細書に記載のとおりデザイン（例えば化学合成用に）、作製（例えば酵素的に作製）または発現（例えば、ベクターまたはプラスミドから）することもでき、本願特許請求の範囲に述べられた方法論にしたがって利用することができるということは理解されよう。さらに、無脊椎動物では、RNAiは長いdsRNA（例えば長さが約100乃至1000ヌクレオチド、好ましくは約200乃至500であって、例えば、約250、300、350、400、または450ヌクレオチドのdsRNA）であって、RNAiのエフェクタ細胞として作用するRNAiは長いdsRNAによって効果的に引き起こすことができる。

【0162】

VII．薬学的組成物および投与方法

本発明のsiRNA分子は薬学的組成物に組み込むことができる。そのような組成物には、典型的には、核酸分子および薬学的に許容な担体が含まれる。本願明細書に記載の「薬学的に許容な担体」という用語は、薬学的投与に適合する、食塩水、溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、ならびに等張および吸収遅延剤などを意味する。補助的な活性化化合物も、当該組成物に組み込むことができる。

【0163】

薬学的組成物は、意図する投与経路と適合するように調剤される。投与経路の例には、例えば、静脈内、皮内、皮下、口腔内（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与などの非経口投与が含まれる。非経口、皮内、または皮下投与に使用する溶液または懸濁液には、以下の成分、注射用の水、食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、またはその他の合成溶媒などの滅菌希釈剤、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤、アスコルビン酸または亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸などおキレート剤、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などのバッファ、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張力調整剤などが含まれていてよい。pHは、塩酸や水酸化ナトリウムなどの、酸や塩基で調整することができる。非経口製剤は、アンプル、ガラスまたはプラスチック製の使い捨て用シリンジ、または複数の投与用バイアルの中に封入されていてよい。

【0164】

注射に使用するために好適な薬学的組成物には、滅菌水溶液（水溶性）、または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液の即時調整用滅菌粉末が含まれる。静脈内投与に好適な担体には、生理食塩水、静菌水、クレモホールEL（登録商標）（BASF、ニュージャージー州パシパニー）、またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が含まれる。すべての場合において、前記組成物は滅菌状態であって、注射容器への充填が容易な程度、流動的でなければならない。前記組成物は、製造および保存の条件下において安定でなければならない。細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。前記担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、ポリエチレングリコール、および液体状ポリエチレングリコールなど）、ならびにそれらの好適な混合物を含む溶媒又は分散媒であってよい。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合は所要の粒子サイズの維持、および表面活性剤の使用などによって維持することができる。微生物の作用は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの各種抗細菌剤および抗真菌剤によって防ぐことができる。多くの場合、例えば、糖、マニトールなどのポリアルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどの等張剤を前記化合物に含めることが望ましいだろう。注射可能な組成物の吸収を持続させるために、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収遅延剤を組成物に含ませてもよい。

【0165】

滅菌された注射可能な溶液は、適切な溶媒中に入れた必要量の前記活性化化合物を、必要に応じて上述の成分1つまたはそれらの組み合わせに組み入れてから過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、塩基性分散媒および上述の物質のうちの必要なその他の成分を含む滅菌担体に前記活性化化合物を組み入れて調製する。滅菌注射

10

20

30

40

50

用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、前記活性成分の粉末に加えて予め滅菌る過されたその溶液から得られた任意の追加の望ましい成分を得られる、真空乾燥および凍結乾燥である。

【0166】

経口組成物には一般に、不活性な希釈剤または食用担体が含まれる。治療用の経口投与の場合、前記活性化合物を賦形剤に組み込み、錠剤、トローチ、または例えばゼラチンカプセルなどのカプセルなどの形状で用いることができる。経口組成物はまた、洗口剤として用いられる液体担体を用いて調製することもできる。薬学的に適合な結合剤、および/またはアジュバント物質は、前記組成物の一部分として含めることもできる。前記錠剤、丸剤、カプセル、およびトローチなどは、以下の成分、もしくは同様の性質の化合物のいずれかを含むことができる。それは、微結晶性セルロース、ガムトラガカント、もしくはゼラチンなどの結合剤、デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、プリモゲル、もしくはトウモロコシデンプンなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムもしくはステロート (Sterote) などの潤滑剤、コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤、ショ糖もしくはサッカリンなどの甘味剤、またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ香味料などの香味剤である。

10

【0167】

吸入による投与の場合、前記化合物は、例えば二酸化炭素などの好適な高压ガスを含む加圧容器もしくはディスペンサー、またはネビュライザーからのエアロゾルスプレーの形状で送達する。そのような方法には、米国特許第6,468,798号に記載されるものが含まれる。

20

【0168】

全身投与はまた、経粘膜または経皮手段でもよい。経粘膜または経皮投与の場合、透過させようとする関門に適切な浸透剤を、前記製剤に用いる。そのような浸透剤は一般に当業に知られており、例えば、経粘膜投与の場合、界面活性剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、経鼻スプレーまたは坐剤の使用によって実施することができる。経皮投与の場合、前記活性化合物は、一般に当業に知られる軟膏 (ointment)、軟膏 (salve)、ゲル、またはクリームに調製する。

【0169】

前記化合物はまた、坐剤 (例えば、カカオバターおよびその他のグリセリドなどの従来の坐剤ベース) または直腸送達用の停留浣腸の形状に調製してもよい。

30

【0170】

前記化合物はまた、McCaffrey et

al. (2002), Nature, 418 (6893), 38-9 (流体力学トランスフェクション); Xia et al. (2002), Nature Biotechnol., 20 (10), 1006-10 (ウイルス媒介送達); またはPutnam (1996), Am. J. Health Syst. Pharm. 53 (2), 151-160, 誤字 Am. J. Health

Syst. Pharm. 53 (3), 325 (1996) に記載の方法が限定されずに含まれる、当業に知られる方法を用いてトランスフェクションまたはインフェクションによって投与することができる。

40

【0171】

前記化合物はまた、DNAワクチンなど、核酸剤の投与に好適な任意の方法によって投与することもできる。前記方法には、遺伝子銃、バイオ注射器、および皮膚用添付剤、ならびに米国特許第6,194,389号に開示されている微粒子DNAワクチン技術などの無針法、米国特許第6,168,587号に開示されるパウダー状ワクチンを有する哺乳動物経皮無心ワクチン投与が含まれる。さらに、とりわけHamajima et al. (1998), Clin. Immunol. Immunopathol., 88 (2), 205-10に記載されているものなど、経鼻送達も可能である。リポソーム (例えば米国特許第6,472,375号に記載されているなど) およびマイクロカプセル封入も使用することができる。生分解性標的化可能微粒子送達システムも使用することができる (例えば米国特許第6,471,996号に記載され

50

ているなど)。

【0172】

ある実施態様では、前記活性化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル封入送達システムを含む、制御放出製剤などの、体外への急速な排出から前記化合物を保護する担体とともに調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを用いることができる。そのような製剤の調製は、標準技術を用いて行うことができる。前記材料はアルザ社 (Alza Corporation) およびノバファーマシューティカルズ社 (Nova Pharmaceuticals, Inc) から購入することもできる。リポソーム懸濁液 (ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染細胞を狙ったりリポソームを含む) を薬学的に許容な担体として用

10

【0173】

当該化合物の毒性および治療上の有効性は、例えばLD50 (個体群の50%に致死的な投与量) およびED50 (個体群の50%に治療上有効な投与量) など、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的方法によって決定することができる。毒性作用および治療上有効な作用の投与量の比は治療指数であって、LD50/ED50の比で表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物を用いる場合、感染していない細胞に与える可能性のある損傷を最小にして副作用を減少するように、そのような化合物を罹患組織の部位に狙わせる送達システムをデザインするように、注

20

【0174】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のための用量の範囲を決定する際に用いることができる。そのような化合物の用量は、好ましくは毒性が小さいかまたは皆無のED50を含む循環濃度の範囲内にある。前記用量は、用いられた投与剤形および使用された投与経路によって、この範囲内で変化させてもよい。本発明の方法に用いられるいずれの化合物の場合も、治療上有効な投与量は、最初は細胞培養アッセイで推定することができる。1回投与量は、動物モデルにおいて、細胞培養物で決定したIC50 (すなわち、症状の最大半減抑制を達成する前記テスト化合物の濃度) を含む循環血漿濃度の範囲になるように調製してもよい。このような知見は、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定するために用いることができる。血漿濃度は、例えば高性能液体クロマトグラフィーによって測定することもできる。

30

【0175】

本願明細書に記載の、核酸分子の治療上有効な量 (すなわち有効投与量) は、選択された核酸による。例えば、shRNAをコードするプラスミドを選択する場合、単回投与量は、約1: g (原文) 乃至100 mgの範囲内で投与してもよく、ある実施態様では10、30、100または1000: g (原文) を投与することがある。ある実施態様では、1乃至5 gの前記組成物を投与することができる。前記組成物は、2日に1回など、1日1回乃至1回以上、または1週間に1回以上投与することができる。当業者は、特定の要因が、疾患またな障害の重篤度、治療歴、対象の全般的な健康状態、およびその他に罹患する疾患をそれらに限定せずを含む、前記対象を有効に治療するために必要な用量および時間に影響することもあるということを理解するであろう。さらに、被験体の治療上有効な量のタンパク質、ポリペプチド、または抗体での治療は、単回の治療を含んでもよく、または好ましくは、一連の治療を含んでもよい。

40

【0176】

本発明の核酸分子は、例えば、上述のXia et al., (2002) に記載の方法が限定されずに含まれる、当業に知られる方法を用いて、例えば、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、発現カセット、またはプラスミドウイルスベクターなどの発現作製物に挿入することができる。発現作製物は、例えば、吸入、経口、静脈内投与、局所投与 (米国特許第5,328,470号参照)、または定位固

50

定注射（例えばChen et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3054-3057参照）によって対照に送達することができる。前記輸送ベクターの薬学的調製には許容な希釈剤に入れたベクターが含まれてもよく、または輸送用賦形剤が埋め込まれた徐放性基質を含んでもよい。別法として、例えばレトロウイルスベクターなど、完全な輸送ベクターを組換え細胞から無傷で作製できる場合、前記薬学的調製物は遺伝子送達システムをつくる1つ以上の細胞を含むことができる。

【0177】

本発明の核酸分子には、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、およびshRNAを発現するためにつくられた発現作製物が含まれてよい。shRNAの転写は、ポリメラーゼIII (pol III) プロモーターから開始し、4 - 5チミン転写終了部位の2位で終了すると考えられている。発現後、shRNAは3' UUオーバーハングを有するステム-ループ構造に折り畳まれると考えられ、その後、これらのshRNAの末端が処理されて、shRNAが約21ヌクレオチドのsiRNA様分子に転換される。Brummelkamp et al. (2002), Science, 296, 550-553; Lee et al. (2002). supra; Miyagishi and Taira (2002), Nature Biotechnol., 20, 497-500; Paddison et al. (2002), supra; Paul (2002), supra; Sui (2002) supra; Yu et al. (2002)、上掲。

10

【0178】

前記発現作製物は、適切な発現システムに使用するのに好適な任意の作製物であってよく、当業に知られるレトロウイルスベクター、直線状発現カセット、プラスミドおよびウイルスまたはウイルス由来ベクターがそれらに限定されずに含まれる。そのような発現作製物には、1つ以上の誘導プロモーター、U6

20

snRNAプロモーターもしくはH1 RNAポリメラーゼIIIプロモーターなどのRNA Pol IIIプロモーターシステム、または当業に知られるその他のプロモーターが含まれてよい。該生成物は、siRNAの1つもしくは両方の鎖を含むことができる。両方の鎖を発現する発現作製物には、両方の鎖を連結するループ構造が含まれてもよく、または各鎖は同一の作製物内の個別のプロモーターから別々に転写されてもよい。各鎖は個別の発現作製物から転写されてもよい。上述のTuschl (2002)。

【0179】

薬学的組成物は、投与法の説明書とともに、容器、バック、またはディスペンサーに包含されていてよい。

30

【0180】

VIII. 治療方法

本発明は、機能獲得型突然変異タンパク質によって、全体的にまたは部分的に引き起こされた疾患または障害のリスクがある（または感受性がある）を治療するための予防および治療方法の両方を提供する。ある実施態様では、前記疾患または障害は優性の機能獲得型疾患である。好ましい実施態様では、前記疾患または障害はSOD1遺伝子の改変、特にSOD1突然変異対立遺伝子における点突然変異に関連する疾患であって、臨床徴候にはALS患者に認められるものが含まれるような、SOD1遺伝子（構造または機能）またはSOD1タンパク質（構造または機能または発現）に異常を引き起こす疾患である。

40

【0181】

本願明細書に記載の「治療」または「治療する」は、疾患もしくは障害、疾患または障害の症状、または疾患もしくは障害の素因を有する患者への治療用の物質（例えばRNA剤またはベクターまたはそれをコードする導入遺伝子）の適用もしくは投与、または前記患者から単離された組織または細胞株への治療用物質の適用もしくは投与であって、当該適用もしくは投与の目的が疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患の素因の治療、治癒、緩和、軽減、改変、改善、改良、向上、または作用である、適用もしくは投与として定義される。

【0182】

50

ある局面では、本発明は、被験体において、該被験体に治療剤（例えば、RNAi剤またはベクターまたはそれをコードする導入遺伝子）を投与することによって、上述の疾患または障害を予防する方法を提供する。前記疾患のリスクがある被験体は、例えば本願明細書に記載の任意のまたは組み合わせた診断アッセイまたは予後アッセイによって同定することができる。予防剤は、前記疾患または障害を予防、または代替的にはその進行を遅らせるように、前記疾患または障害に特徴的な症状の徴候の前に投与することができる。

【0183】

本発明の別の局面は、被験体を治療的に処理する、つまり前記疾患または障害の症状の発症を改変させる方法に関連する。ある例示的な実施態様では、本発明の調節方法は、機能獲得型突然変異を発現する細胞と、前記遺伝子の配列特異的な干渉を実現するような、前記遺伝子内の突然変異に特異的な治療剤（例えばRNAi剤またはベクターまたはそれをコードする導入遺伝子）と接触させるステップに関与する。これらの方法は、*in vitro*（例えば前記細胞を前記作用剤で培養するなど）または代替的には*in vivo*において（例えばその物質を被験体に「投与する」ステップによって）実行することができる。

10

【0184】

処置の予防的および治療的な方法の両方に関して、そのような処置は薬理ゲノム学分野から得られた知識を本に、特別にあつらえるか、または修正してもよい。本願明細書に記載の「薬理ゲノム学」は、臨床開発用および市販用薬物の遺伝子配列解析、統計学的遺伝子学、および遺伝子発現解析などのゲノミクス技術の適用を意味する。より具体的には、この用語は、患者の遺伝子が薬物に対する応答（例えば患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」など）をどのように決定するかを研究することを意味する。したがって、本発明の別の局面は、本発明の標的遺伝子分子、または個人の薬物応答遺伝子型にしたがった標的遺伝子モジュレータのいずれかによる、個人の予防的または治療的処置をあつらえる方法を提供する。薬理ゲノム学は、臨床医または医師が、予防的または治療的処置から最も利益を得るであろう患者のみを前記処置の対象にし、有毒な薬物関連の副作用を経験するであろう患者の治療を避けることを可能にする。

20

【0185】

治療剤は適切な動物モデルにおいてテストすることができる。例えば、本願明細書に記載のRNAi剤（または発現ベクターもしくはそれをコードする導入遺伝子）を動物モデルに用いて、前記薬剤での処置の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。別法として、治療剤を動物モデルに用い、そのような作用薬の作用機序を決定することができる。例えば、薬剤を動物モデルに用いて、前記薬剤での処置の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。別法として、薬剤を動物モデルに用い、そのような作用薬の作用機序を決定することができる。

30

【0186】

実施例

以下の材料、方法、および例は、具体例を示すのみで、制限を意図しない

【0187】

材料と方法

RNAおよびDNA作製物

1本鎖RNA（例えば、図1参照）は、ダーマコン・リサーチ社（Dharmacon Research）から購入し、製造者の指示に従って脱保護し、記載の通りアニーリングした（Nykanen et al., 2001）。

40

【0188】

野生型および突然変異SOD1-GFP融合タンパク質を作製するために、SOD1 wt（Genbank Accession No. ジェンバンク受入番号NP_000445；図7；配列番号：18）、SOD1 G85R、およびSOD1 G93A（配列番号：16）cDNAを、pCMV/myc/mito/GFP（インビトロゲン社（Invitrogen））のPmlIおよびPstI部位の間でPCRクローニングした。このクローニングステップによって、ミトコンドリア

50

標的配列が削除された。

【0189】

mycタグ付き野生型SOD1を作製するために、SOD1 wt cDNA（配列番号：17）をpCMV/myc/mito/GFPのPstIおよびXhoI部位の間でPCRクローニングした。ミトコンドリア標的配列は、BssHIIおよびPmlIで切断し、平滑末端化ライゲーションすることによって削除した。

【0190】

shRNAベクターを作製するために、合成DNAオリゴヌクレオチドの2つの鎖をアニリングし、RNAポリメラーゼIIIプロモーター（U6）駆動ベクターに、制限部位PmeIおよびPstIを用いてサブクローニングした（Sui et al. 2002）。DNA鎖は、9個のヌクレオチドループ（UUCAGAGA）によって連結されている19または21ntセンスおよびアンチセンス鎖（標的配列とマッチする）を含有していた。該センス鎖は、5個の連続するチミジン（TTTTT）で終了する。

10

【0191】

すべての作製物を、シーケンシングによって確認した。DsRed（pDsRed2-C1）は、クロンテック社（Clontech）（カリフォルニア州パロアルト）から購入した。U6-G93Aは上述の通り作製した（Sui et al., 2002）。3'ブロックsiRNAは標準技術によって合成された。

【0192】

In-vitro RNAi アッセイ

20

野生型または突然変異SOD1のいずれかをコードする配列を有する560ヌクレオチドヒトSOD1標的RNAを、既報の通り調製する（Zamore et al., 2000）。標的切断は、濃度約5nMのショウジョウバエ胚ライセートを含有する標準in vitro RNAi反応において25乃至100nM siRNAを有する5'3'2P-キャップ放射標識標的をインキュベートすることによって決定した。

【0193】

細胞培養およびトランスフェクション

HeLa細胞を、10%ウシ胎仔血清（FBS）、100ユニット/ml - 1ペニシリン、および100ug/ml - 1ストレプトマイシンをDMEMならびにDMEMおよびOpti-MEM（1：1）に入れたN2A細胞の両方ともに添加し、その中で培養した。トランスフェクションの24時間前、細胞（集密度70乃至90%）を倍散で脱離させ、6ウェルプレートに移して、抗生物質を含まない新鮮培地で培養した。トランスフェクションは、リポフェクタミン2000（登録商標）（インビトロゲン社（Invitrogen））を、製造者の指示に従って用いて行った。トランスフェクションに用いた作製物の量は、突然変異または野生型SOD1-GFPおよびDsRedプラスミドそれぞれ4μg、siRNAを4x10⁻¹¹または4x10⁻¹²モル、ならびにU6-G93Aを20または8μgである。

30

【0194】

In vivo トランスフェクション

40

6乃至8週齢のマウス24匹を3つのグループに分けた。第1のグループはshRNAベクターの投与を受けておらず、第2のグループは20μgの空ベクターの投与を受け、第3のグループはSOD1 G93A（配列番号：16）に対するU6-hpRNAベクター20μgを投与された。すべてのグループは、mycでタグしたヒト野生型SOD1（配列番号：7）20μg、およびGFPでタグしたSOD1、20μgの両方が投与された。前記ベクターを合計体積がマウス1匹あたり2.5mlになるように、リンガ液で希釈した。マウスをアバーチン（240mg/kg）で麻酔し、前記ベクターを、26ゲージ針を用いて10病末満で尾部静脈から注入する。注入から48時間後、肝臓から血液を除去するために、動物を5mlのPBSで灌流した。肝臓を切り取り、素速くドライアイス上で冷凍させた。サンプルを、1%SDS、1mMのDTT、1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド（PM

50

S F)、およびプロテアーゼ阻害物質カクテル(シグマ社 1 : 1 0 0 希釈)を含有する 2 5 m M の P B S バッファ(p H 7 . 2) 中に入れ、携帯用ボリトロン(プロサイエンティフィック社(Pro-scientific))を用いてホモジナイズした。

【 0 1 9 5 】

ウエスタンブロット分析法

タンパク質濃度は、B C A タンパク質アッセイキット(ピアース社(Pierce)、イリノイ州ロックビル)を用いて決定した。H e l a 細胞タンパク質 2 5 μ g、または 1 0 0 μ g 肝タンパク質を 1 5 % S D S - P A G E 上で分離し、ジーンスクリーン・プラス膜(Genescreen Plus membrane)(パーキンエルマー社)(Perkin Elmer)上に移動させた。ウサギ抗 S O D 1 (バイオデザイン社(Biodesign))またはヒツジ抗 S O D 1 は 1 次抗体、および H R P 標識ヤギ抗ウサギ I g G (アマシャム社(Amersham))またはロバ抗ヒツジ I g G は 2 次抗体だった。タンパク質のバンドの可視化には、スーパーシグナル・キット(ピアース社)(SuperSignal kit (Pierce))およびコダック・デジタルイメージステーション 4 4 0 C F (Kodak Digital Image Station 440CF)を用いた。そのバンドの強度の定量化には、コダック 1 D ソフトウェアを用いた。

10

【 0 1 9 6 】

実施例 X - X I

1 日目、9 6 - ウェルプレートにて、2 n M の s i R N A を H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクトした。2 日目、細胞をピペットによってゆっくりはがして、2 4 - ウェルプレートに移した。3 日目、第 2 のトランスフェクションを行い、4 日目、最終的に細胞を採集した。1 % S D S、1 m M の D T T、1 m M の P M S F およびプロテアーゼ阻害混液(Protease inhibitor cocktail)(シグマ社(Sigma))を含有する 2 5 m M リン酸緩衝液(p H 7 . 2) 中でホモジナイゼーションすることによってタンパク質を抽出し、その濃度を B C A アッセイ(ピアース社(Pierce))によって測定した。1 5 u g のタンパク質を 1 5 % S D S - P A G E ゲル上に載せた。ジーンスクリーン・プラス膜(Genescreen Plus membrane)(パーキンエルマー社)(Perkin Elmer)上に移動させた後、一次抗体としてウサギ抗 S O D 1 (バイオデザイン社(Biodesign))、二次抗体として H R P 標識ヤギ抗ウサギ I g G (アマシャム社(Amersham))を用いて S O D 1 を検出した。対照として、0 . 1 M グリシン(p H 3 . 0) を含有する緩衝液を用いて膜を除去し、G A P D H に対する抗体を用いて再び調べた。該タンパク質のバンドは、化学発光スーパーシグナル・キット(ピアース社)(Chemiluminescent SuperSignal kit (Pierce))を用いて可視化し、コダック・デジタルイメージステーション 4 4 0 C F (Kodak Digital Image Station 440CF)を用いて定量した。

20

30

【 0 1 9 7 】

二重ルシフェラーゼアッセイ

修飾された二重ルシフェラーゼシステム(プロメガ社(Promega))を用いて細胞培養中の R N A i 効率を定量した。この研究のための特異的なルシフェラーゼレポート標的を作成するために、2 つの制限部位(N d e I および S p e I) をホタルルシフェラーゼベクターの 3 ' U T R (p G L 2 対照ベクター、プロメガ)に組み込んだ。ヒト C u Z n スーパーオキシドジスムターゼ(s o d 1) 遺伝子の 3 9 n t フラグメント(センス鎖 5 ' - A G G C A T G T T G G A G A C T T G G G C A A T G T G A - C T G C T G A C A A A - 3 '、アンチセンス鎖 5 ' - T T T G T C A G C A G T C A C A T T G C C C A A G T C T - C C A A C A T G C C T - 3 ') を合成し、アニーリングし、N d e I および S p e I を用いてホタルルシフェラーゼベクターの 3 ' U T R 領域にクローニングした。このホタルルシフェラーゼベクターをウミシイタケ・ルシフェラーゼベクター(p R L - T K、プロメガ)と、s i R N A または s h R N A 合成ベクターを H E K 2 9 3 細胞に、9 6 ウェルプレート中でリポフェクタミン 2 0 0 0 (インビトロゲン社(Invitrogen))を用いて、コトランスフェクトした。トランスフェクションの 2 4 時間後、細胞を 2 0 u l の受動溶解緩衝液(Passive Lysis Buffer)(Promega)を用いて溶解した。各

40

50

ウェルから 10 u l のライセートをマイクロリットルストリップ (Thermo labsystems) のウェルに移し、ベリタスマイクロプレートミノメーター (ターナー・バイオシステム (Turner Biosystem)) を用いて測定した。RNA i の測定には、発光強度比率 (ホタルノウミシイタケルシフェラーゼ) を用いた。

【0198】

ノーザンブロット

1 u g ずつの sh RNA を、6 - ウェルプレート中の HEK 293 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの 24 時間後に細胞を回収し、トリ試薬 (Tri Reagent) (モレキュラーリサーチセンター (Molecular Research Center)) を用いて、全ての RNA を抽出した。合計 10 u g の RNA を 15 % ミニ変性ポリアクリルアミドゲル上に載せた。分離した RNA をブライトスター・プラス・ナイロン膜 (BrightStar-Plus nylon membrane) (アンピオン (Ambion)) に移動させ、UV と架橋結合させた。32 P 標識センスまたはアンチセンス 21 nt 合成 RNA を、相補的な RNA 鎖を検出するためのプローブとして用いた。放射活性 RNA バンドは、フジホスファーマイージングシステム (Fuji Phosphor Imaging system) FLA - 5000 (フジメディカルシステム社 (Fuji Medical Systems)) を用いて読み取った。

10

【0199】

実施例 1

例 I 乃至 V I I I は、si RNA が、まず si RNA 活性を、ショウジョウバエ胚ライセートを含む無細胞 RNA i 反応でテストし、次に培養哺乳動物細胞中の活性 1 ヌクレオチド選択性 si RNA を分析することによって、1 ヌクレオチド選択性を有するようにデザインされたことを明らかにする。結果は、2 つの mRNA の差が 1 ヌクレオチドしかなく同一の細胞に存在するとしても、21 ヌクレオチド si RNA および sh RNA の両方とも、選択的に突然変異 SOD1 (配列番号: 8) の発現を阻害するが、野生型 SOD1 (配列番号: 7) ではそのようなことがないようにデザインすることができることを示した。したがって、RNA i はとりわけ、優性機能獲得型突然変異によって生じる疾患の治療法として有用である。

20

【0200】

実施例 I I : si RNA 二本鎖は突然変異 SOD1 を区別することができる

それぞれ野生型または突然変異 mRNA のいずれかを狙う 3 つの si RNA の 2 セット (図 1 A、配列番号: 8) を、標的の切断部位またはその近傍のミスマッチが要求される A 型らせん形を乱しているかどうかをテストするように方向付けた。グアニン 256 (例えば、ジェンバンク受入番号 K00056 などの、翻訳開始に関連する G256) SOD1 の対立遺伝子がシトシンに突然変異し、グリシン - アルギニン突然変異 (G85R) を生じている SOD1 の対立遺伝子を選択した。突然変異したヌクレオチドは、SOD1 mRNA 切断の予測された部位の近傍、すなわち、si RNA のアンチセンス鎖の 5' 末端に対して 9 位 (P9)、10 位 (P10)、11 位 (P11) (図 1 A) に位置した。

30

SOD1

mRNA 切断のこの予測された部位は、前記 si RNA と RNA i エンドヌクレアーゼの活性部位の中または近傍の非同族標的 RNA との間にミスマッチを配置する。これらの si RNA のテストは、in vitro において RNA を再利用する、確立されたショウジョウバエ胚性ライセートで行った (Zamore et al., 2000; Tuschl et al., 1999)。予想通り、6 つの si RNA のそれぞれが相当する標的 RNA を切断したが、その有効性の差は劇的だった。例えば、P11 突然変異種および野生型 si RNA (配列番号: 6、10) は、それぞれの標的 RNA を効率的に切断できなかった。反対に、P10 突然変異種 si RNA (配列番号: 4) は前記突然変異種標的 RNA を効率的に切断した。完全長突然変異種 SOD1 標的 mRNA の切断は、対応する約 288 ヌクレオチドの 5' 切断産物の蓄積によって行われ、結果は、前記標的 mRNA の非特異的分解ではなく RNA i を示唆している。si RNA の欠如下、またはルシフェラーゼに対する si RNA の存在下において、前記突然変異標的 RNA (配列番号: 8) はショウジョウバエ胚性ライセート中で安定

40

50

だった（データは示していない）。標的RNAの切断および5'切断産生物の蓄積のデータは両方とも、1つの指数方程式に良くフィットし、この反応は擬1次動力学にしたがっていることを示している（図1B）。

【0201】

実施例III. siRNA二本鎖は野生型SOD1を区別することができる

6つのsiRNAの特異性を決定するために、突然変異SOD1配列（配列番号：8）に相当する各siRNAを、野生型SOD1

RNA（配列番号：7）を切断する能力についてテストし、各野生型siRNAについて突然変異RNAを切断する能力をテストした。すべてではないが一部のsiRNA二本鎖が、効率的に、完全にマッチする標的と1ヌクレオチドのミスマッチを有する標的を区別した。例えば、突然変異と野生型のsiRNA（配列番号：6、10）の両方のP11は、完全にマッチした標的RNAもミスマッチの標的RNAのいずれにも効率的な切断を惹起しなかった（図1A）。したがって、これらのsiRNA配列は本質的にRNAiを惹起する能力が乏しい。反対に、P9（配列番号：14）およびP10野生型（配列番号：12）siRNAは、対応する野生型標的の迅速な切断を惹起しただけでなく、突然変異RNAの著しい切断も生じた（図1A）。これらのsiRNAはRNAiを惹起する優れた能力があるが、乏しい選択性を示す。P10突然変異種siRNA（配列番号：4）が、突然変異種および野生型SOD1

RNA（配列番号：7、8）を効率的および堅固に識別し、突然変異RNAを野生型よりもはるかに効率的に切断することが示された。最も重要なのは、P10突然変異siRNA（配列番号：4）は、突然変異および野生型SOD1 mRNA標的を実質的に完全に識別することが示された（図1A）。このP10突然変異siRNAは、突然変異SOD1標的の切断を効率的に媒介したが、野生型SOD1 mRNAの切断はほとんど媒介せず（図1B）、このsiRNAは治療用途に理想的であることが示唆された。

【0202】

実施例IV：HeLa細胞における突然変異SOD1 G85R発現の選択的阻害

哺乳動物細胞において、無細胞反応が正確、効率的、および選択的にsiRNAを予想できるかどうかをテストするために、カルボキシ末端を融合させたGFPを有する野生型または突然変異種SOD1

G85Rを発現したプラスミド作製物を作製した。各作製物を、dsRed発現ベクターを用いてHeLa細胞にトランスフェクトし、トランスフェクション対照とした。突然変異または野生型のSOD1（配列番号：7、8）のいずれかの発現を、蛍光標示細胞分取法（FACS）で緑色および赤色細胞を定量することによって監視した。P9、P10およびP11

siRNAを相当する突然変異種または野生型標的でトランスフェクションしたところ、遺伝子発現を抑制したが、効率および選択性には差があった（図2）。反対に、ホタルルシフェラーゼに相補的なsiRNAによるコトランスフェクションでは、突然変異または野生型SOD1の発現のいずれも抑制しなかった（図2）。野生型に対するsiRNA p10以外のすべてのsiRNAは1ヌクレオチドミスマッチを有するmRNAを抑制しなかったが、野生型に対するsiRNA p10は野生型および突然変異SOD1の発現の両方を効率的に抑制した（図2）。この結果は全般的にin vitroデータ（図1）と一致しており、すべてではないが一部のsiRNAは1ヌクレオチドの差を有するmRNA標的を効率的に区別することができることを示唆した。

【0203】

実施例V. HeLa細胞におけるU6-G93Aベクターによる突然変異SOD1 G93A発現の選択的阻害

最近、shRNAがin vivoにおいてRNAiを惹起することができることが示された。突然変異種SOD1に対するshRNAが、選択的に野生型SOD1発現ではなく突然変異種SOD1の発現を阻害することができるかどうかをテストするために、別の疾患の

原因となる突然変異種 S O D 1

G 9 3 A に相同な s h R N A (ヌクレオチド 2 8 1 位の G を C に変え、s h R N A と野生型 S O D 1 G : G ミスマッチを配置するヌクレオチド交換 ; 配列番号 : 1 6) を、R N A ポリメラーゼ I I I (U 6) プロモーターの制御下において合成するプラスミドを作製した (S u i e t a l . , 2002) 。結果から、野生型または突然変異 S O D 1 - G F P プラスミドのいずれかとコトランスフェクトした場合、この作製物を用いて、培養細胞中の突然変異種 S O D 1 の 1 ヌクレオチド選択的 R N A i を惹起することができるということが示された (図 3) 。

【 0 2 0 4 】

実施例 V I : in vivo における s i R N A および U 6 - G 9 3 A ベクターによる突然変異 S O D 1 発現の選択的阻害

突然変異種の選択的阻害が神経細胞で実現するかどうかをテストするために、野生型および突然変異 S O D 1 - G F P 作製物を、S O D 1

G 8 5 R に対する s i R N A P 1 0、または S O D G 9 3 A (配列番号 : 1 6) に対する s h R N A 合成ベクターのいずれかを用いて、神経芽細胞腫細胞株 N 2 a にコトランスフェクトした。H e l a 細胞と同様に、合成 s i R N A および s h R N A 作製物が、N 2 a 細胞における突然変異 S O D 1 発現の選択的阻害を方向付けた (図 4 A、B) 。

【 0 2 0 5 】

実施例 V I I . in vivo における突然変異 S O D 1 G 8 5 R の選択的阻害

同一の細胞に突然変異および野生型 S O D 1 m R N A 1 が両方とも存在する場合、ヌクレオチド選択的 s i R N A がその突然変異および野生型 S O D 1 を識別できるかどうかを明らかにするために、H e l a 細胞に P 1 0

s i R N A および突然変異 S O D 1 G 8 5 R - G F P でトランスフェクトした。抗 S O D 1 抗体で免疫プロットすることによって、トランスフェクト融合 S O D 1 - G F P および内因性野生型ヒト S O D 1 の両方の検出が可能になった。内因性野生型 S O D 1 発現の約 5 0 % 阻害は、~ 5 0 % のトランスフェクション効率を反映した。P 1 0 野生型 s i R N A に対して、突然変異種に対する P 1 0

s i R N A は 2 種類の異なる用量において突然変異種の発現を阻害したが、内因性野生型 S O D 1 の発現には効果がなかった (図 5) 。

【 0 2 0 6 】

実施例 V I I I . in vivo における U 6 - G 9 3 A ベクターによる突然変異種 S O D 1 発現の選択的阻害

選択的阻害を in vivo で生じさせることができるかどうかをテストするために、S O D 1 レポーターおよび s h R N A プラスミドを、水力学的トランスフェクションプロトコルを用いてマウスにトランスフェクトした。突然変異 S O D 1

G 9 3 A - G F P プラスミドおよび m y c でタグした野生型ヒト S O D 1 (ゲル上においてトランスフェクトしたヒト S O D 1 を内因性マウス S O D 1 からよりよく分離することができる) を U 6 空ベクトルまたは U 6 - G 9 3 A ベクターでコトランスフェクトした。S O D 1

G 9 3 A - G F P および S O D 1 m y c の肝臓における発現を、ウエスタンプロットによって検証した。結果から、U 6 - G 9 3 A で選択的にコトランスフェクトする場合のみ、G 9 3 A 発現が減少することが示された (図 6) 。

【 0 2 0 7 】

実施例 I X : トランスジェニックマウスを用いた in vivo における突然変異 S O D 1 の s h R N A 抑制

突然変異 S O D 1 に対する s h R N A が in vivo において突然変異 S O D 1 の発現を抑制することができるかどうかを明らかにするために、R N A ポリメラーゼ I I I (P o l I I I) プロモーター U 6 の制御下における S O D 1 G 9 3 A に対する s h R N A を発現するトランスジェニックマウス (U 6 - G 9 3 A マウス) を、C 5 7 B L / 6 J および S J L のハイブリッド背景において作製した。

10

20

30

40

50

【0208】

マウスU6プロモーターの制御下におけるshRNA相同的突然変異SOD1G93A (shG93A)を合成するプラスミドは、公表されているプロトコルにしたがって作製した(Sui et al., 2002 Proc Natl Acad Sci USA 99:5515-5520)。前記マウスを作製するために、Kpn IおよびSac Iを用いた消化によって導入遺伝子を直線化し、精製して、マサチューセッツ大学医学部(University of Massachusetts Medical School)(UMMS)トランスジェニック・コアでマウスの有精卵に注入した。

【0209】

U6-G93Aトランスジェニックマウスをスクリーニングするために、前記導入遺伝子の配列を選択的に増幅するPCRプライマーをデザインし、前記トランスジェニックマウスの同定に用いた。合計7匹の第0世代(F0)が同定された。これらの第0世代を、FVB背景において、突然変異種SOD1G93A導入マウスと交雑させた。

10

【0210】

F1マウスを、既報のとおりザンプロット法を用いて導入遺伝子コピー数について解析した(Xu et al., 1993 Cell 73:23-33)。末端DNAをBam H1で消化し、388ヌクレオチドの導入遺伝子断片を作製した。内因性マウスU6プロモーターにはBamHI部位が1つしかないため、BamHI消化によって、内因性マウスU6遺伝子からより大きな断片を作製できた。前記U6プロモーター領域に相補的な32P標識RNAオリゴヌクレオチドプローブを、ハイブリダイゼーションに用いた。前記U6領域を標的として用いた。これは、前記内因性マウスU6バンドは同一プロット上で前記導入遺伝子とともに検出でき、導入遺伝子のコピー数を定量化するための参照として前記内因性バンドを用いることができるためである。

20

【0211】

ノーザンプロット法を用いて測定したとおり、前記U6-G93A shRNA作製物を、2種類の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスから採取した細胞に発現させた。ウエスタンプロット法を用いて測定した結果、前記U6-G93A shRNA作製物は、2種類の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおける突然変異種SOD1G93Aの発現(U6-G93A shRNA作製物および突然変異種SOD1G93Aを発現)をサイレンシングすることが明らかになった。

30

【0212】

実施例I乃至VIIの結果の考察

RNAiを用いた優性突然変異種ALS遺伝子を選択的にサイレンシングする可能性を調べた。野生型または突然変異種のSOD1のいずれかにマッチする複数のsiRNAを用いた結果、in vitroにおいて、突然変異種SOD1 G85Rに対するsiRNAは前記突然変異種を切断するが、野生型SOD1 RNAの切断は効率的ではないことが示された(図1)。さらに、同一の細胞に突然変異および野生型SOD1タンパク質の両方が存在する場合でも(図4)、これらのsiRNAは、哺乳動物細胞において突然変異SOD1タンパク質発現を選択的に阻害するが野生型については阻害しなかった(図2)。in vivoにおいてsiRNAに処理されたヘアピンを発現するベクターも、マウス肝において突然変異SOD1の発現を選択的に阻害するが、野生型SOD1の発現は阻害しなかった。これらの結果から、優性突然変異対立遺伝子の選択的阻害はRNAiを用いて実現することができ、in vitroまたはin vivoにおいて、前臨床スクリーニングによって最適化したsiRNAおよびshRNA配列を同定することができることが明らかになった。

40

【0213】

哺乳動物細胞においてSOD1-ヌクレオチドの識別を実現することはできるが、この識別は確実なものではない。一部のsiRNAは-ヌクレオチドの差を有する対立遺伝子間の識別が可能であるが、その他のsiRNAでは識別することができない。結果は、突然変異病対立遺伝子を標的とするようにデザインされたsiRNAに2種類の異なる欠陥があることを示している。第1に、標的に完全にマッチするsiRNAは、その標的を

50

切断し、前記標的遺伝子からのタンパク質発現を阻害することができるが、すべての *siRNA* が同一の効率でサイレンシングを生じるわけではない。例えば、前記野生型に対する *siRNA* の中で、*in vitro*において、P 9 および P 1 0 は P 1 1 よりも効率的に標的を切断した。P 1 0 はまた、哺乳動物細胞において、標的遺伝子発現を最も効率的に阻害した（図 2）。同様に、前記突然変異 *SOD1*

G 8 5 R に対する *siRNA* の中で、P 9 および P 1 0 は P 1 1 よりも効率的に突然変異 *RNA* を切断した。P 1 0 はまた、哺乳動物細胞において、突然変異 *SOD1* 発現の阻害について最も効率的だった（図 2）。前記標的に対する *siRNA* 配列の 1 ヌクレオチドのシフトの結果、サイレンシングの効率においてこのような顕著な変化を生じる。第 2 に、完全にマッチした標的 *RNA* と 1 ヌクレオチドのミスマッチを有する *RNA* の間の選択性の差が、使用された 6 つの *siRNA* の中で認められた。例えば、野生型 P 1 0

iRNA は乏しい選択性を付与した。野生型 P 1 0 は、無細胞アッセイにおいて野生型および突然変異 *SOD1 RNA* の両方を切断し、哺乳動物細胞の両方の対立遺伝子の発現を高い効率で阻害した（図 1、2、4、5）。一方、突然変異 *SOD1* に対して方向付けられた P 1 0

siRNA は最も高い選択性を付与した。それは突然変異 *SOD1 RNA* を切断し、無細胞アッセイにおいて突然変異 *SOD1* の発現を阻害し、哺乳動物細胞における突然変異 *SOD1* の発現は阻害したが野生型 *SOD1* は阻害しなかった（図 1 乃至 6）。

【0214】

突然変異と野生型の P 1 0 *siRNA* の選択性の差についての説明は、以下の通りである。突然変異種 P 1 0

siRNA と野生型 *SOD1 mRNA* の間のミスマッチが G : G 衝突をつくり出したが、野生型 P 1 0

siRNA と突然変異種 G 8 5 R *mRNA* の間のミスマッチは C : C 衝突を生じた（図 1 A 参照）。したがって、特定の配列の 1 つの対立遺伝子に選択的に作用する *siRNA* をデザインする場合、以下が考慮された。理論によって制限したいとは考えないが、プリン:プリンミスマッチは、*siRNA* のアンチセンス鎖とその *mRNA* 標的の間に要求される A 型らせんを妨げる（Chiu et al., 2002）。反対に、ピリミジン:ピリミジンミスマッチは A 型らせんの中に容易に収容することができる。したがって、*siRNA* と野生型標的 *RNA* の間の G : G 衝突は前記野生型標的を排除し、前記突然変異標的の選択性を高める。顕著なことに、突然変異種 *SOD1*

G 9 3 A について優れた選択性を示す、G 9 3 A に対する *siRNA* ヘアピンベクターも、野生型 *SOD1 mRNA* を有する G : G 衝突をつくり出した。これらの結果は、プリン:プリンミスマッチはピリジン:ピリジンミスマッチよりも大きな選択性を付与することを示唆した。ピリジン:ピリジンミスマッチを含有する本発明の方法に用いた *siRNA* のデザインに加えて、前記 *siRNA* は当業に知られる方法を用いてデザインされる。

【0215】

実施例 X : 設計された非対称性は、鎖の嗜好性を切り換え、所望の鎖の *RNAi* の有効性を高める

天然の *siRNA* は、望ましくない鎖の非対称性を有しているかもしれない。例えば、実施例 I 乃至 X に記載の 3 つの抗 *SOD1*

siRNA のうち、1 つの *siRNA* (P 1 0) は、その意図した *sod1 mRNA* 標的配列、*sod1*

mRNA 配列（本明細書において「センス鎖標的」または「コード鎖標的」（*ss* 標的）と称する）を、その逆の補体または「オフ標的」配列（本明細書において「アンチセンス鎖標的」または「非コード鎖標的」（*as* 標的）と称する）よりも、よくサイレンシングしている。他の 2 つの *siRNA* (P 9、P 1 1) は、実際に *as* 標的を *ss* 標的よりもよくサイレンシングしている（図 10）。予測されたように、*as* 標的を優先的にサイレンシングする *siRNA* は、*ss* 標的に対するサイレンシングが相対的に非効率的であり、*ss* 標的について、IC 50 は P 9 で 0 . 3 9 mM、P 1 1 で 0 . 7 5 mM であり、a

10

20

30

40

50

s 標的については、それぞれ 0.03 nM および 0.05 nM である。したがって、P 9 および P 11 は、天然の siRNA の候補として良好ではない。

【0216】

効率的でない siRNA を効率的なものに変換できるかどうかを決定するために、非効率的な siRNA、P 11 (図 11A) をテストケースとして用いた。非対称性の規則に基づいて、RNAi のアンチセンス鎖 (as-siRNA) の 5' 末端の塩基対を、A:U 対のミスマッチをその末端に配置することによって弱めた (図 11A、S 1 乃至 S 3)。P 11 は、自然に as 標的を好み (図 11B、P 11 を参照) にもかかわらず、as-siRNA の 5' 末端の塩基対が弱められたことにより、それはセンス標的を好むように変換された (図 11B、S 1 乃至 S 3)。対照的に、RNAi のセンス鎖 (ss-siRNA) の 5' 末端の塩基対が弱めると、非修飾 P 11

siRNA と比較して、as 標的を優先的サイレンシングが加速された (図 11B、A 1 乃至 A 3)。さらに、一方または他方の末端の G:C を I:C で置換することによって塩基対を弱めることによって、鎖の嗜好性は同様に変換された (図 11B、I A、I S)。両末端の G:C が I:C に変えられた場合、鎖の嗜好性は P 11 (図 11B、I S / I A) のパターンに戻った。これらの変化は、非対称性の規則から予測されたことに一致している。

【0217】

設計された非対称性の効果を定量的に特徴付けるために、異なる用量の siRNA をもつ ss 標的および as 標的をトランスフェクトした。もともとの P 11 は、as 標的を最高 81% サイレncing した。IC50 は 0.05 nM であった。対照的にそれは、センス標的を最高 61% サイレncing した。IC50 は 0.75 nM であった。as-siRNA の 5' 末端の塩基対を弱めることによって、siRNA は、as 標的のサイレンシングは最高でわずか 56% であった。siRNA が 2 nM のとき、最高のサイレンシングに到達する非典型用量反応曲線を示し、より高い濃度では弱いサイレンシングが示された。対照的に siRNA は、センス標的を最高で 78% サイレncing し、IC50 は 0.05 nM であった (図 12、S 2)。もともとの P 11 と比較して、有意に向上していた。したがって、もともとの P 11 と比較して、as-siRNA の 5' 末端の塩基対を弱めることによって、as 標的に対する RNAi 効率を減少させ、ss 標的に対する RNAi 効率を高めた。逆に、他の末端の塩基対を弱めることで、逆の効果が生じ、as 標的の最高のサイレンシングを上昇させ、一方、センス配列を完全に阻害した (図 12、A 2)。siRNA の両末端で塩基対を弱めると、標的のサイレンシングパターンは、もともとの P 11 に対して逆になった (図 12、S 2 / A 2)。これらの結果は、非対称性の規則による予測を確認するものであり、非対称性の規則が siRNA 標的部位のレパートリーを増加させることに適用可能であることを示すものである。

【0218】

実施例 XI: 非対称性の規則の shRNA への適用は、鎖の特異性およびその有効性を高める

非対称性の規則を shRNA の設計へ組み入れるための適切な方法を見つけるために、まず、19ヌクレオチドステムをもち (「19 nt ステム shRNA」)、さらに、shRNA ステムのそれぞれの末端の最初の 4 個のヌクレオチド内にミスマッチを含む shRNA をテストした (図 13A)。ステムの 2 つの鎖をもつ shRNA は、証明されている対照的なサイレンシング有効性と完全に一致した (図 13B、P 11 - 19)。センス鎖の 5' 末端の 1 位および 2 位のミスマッチ (図 13A、A 1 - 19、A 2 - 19) は、非対称性の規則により予測されたとおり、ss 標的のサイレンシングを穏やかに弱めながら、as 標的のサイレンシングを高めた (図 13B、A 1 - 19、A 2 - 19)。しかしながら、センス鎖の 5' 末端の 3 位および 4 位のミスマッチ (図 13A、A 3 - 19、A 4 - 19) は、ss 標的に対するサイレンシングの有効性を高めたが、as 標的に対するサイレンシングの有効性には変化はなかった (図 13B、A 3 - 19、A 4 - 19)。このことは、19 nt ステム shRNA のこれらの 2 つの位置のミスマッチは、非対称性の規

則に従わないことを示唆するものである。

【0219】

a s s h R N A ステムの 5' 末端から 1 つ目の位置のミスマッチ (図 13 A、S 1 - 19) も、非対称性の規則に従わない。それは、a s 標的のサイレンシングの有効性を変えないが、非対称性の規則から予測されることとは対照的に、実際には、s s 標的のサイレンシングを傷つけた (図 13 B、S 1 - 19)。a s s h R N A ステムの 5' 末端から 2 つ目および 3 つ目の位置のミスマッチ (図 13 A、S 2 - 19、S 3 - 19) は、s s 標的に対するサイレンシング有効性を高めなかったが、a s 標的に対するサイレンシング有効性を減少させた (図 13 B、S 2 - 19、S 3 - 19)。a s s h R N A ステムの 5' 末端から 4 つ目の位置のミスマッチ (図 13 A、S 4 - 19) は、s s 標的、a s 標的のいずれに対してもサイレンシングの有効性に影響を及ぼさなかった (図 13 B、S 4 - 19)。全体として、ステムの末端のいずれかに作製されたミスマッチの大半は、それらのサイレンシングの有効性に関して、非対称性の規則にあまり十分に従わない。

10

【0220】

s h R N A は、構造、プロセッシング、および機能の点で p r e - m i R N A に類似している。大半の p r e - m i R N A は、21 nt 長より長いステムを有している (Griffiths-Jones, 2004)。これらのステムから、非対称のものを含む m i R N A 二本鎖が生成される (Kim, 2005)。したがって、21 nt 以上のステムをもつ s h R N A は、非対称性の規則を組み込んだ後より、よく処理されるかもしれない。このことを調べるために、21 - nt ステムとステムの両末端の 1 ~ 4 位に弱められた塩基対をもつ s h R N A を設計した (図 13 A)。s h R N A を合成するこれらのプラスミドのそれぞれと、センスまたはアンチセンス標的を合成するプラスミドとをコトランスフェクトし、それらの R N A i 有効性を決定した。

20

【0221】

P 1 1 s h R N A は、P 1 1 s i R N A と類似の鎖の嗜好性を有しており、a s 標的を s s 標的よりよくサイレンシングした (図 14 B、P 1 1 - 21)。ミスマッチを有する塩基対は、s s - s h R N A の 5' 末端に位置しているとき、a s 標的に対する鎖の嗜好性は、1 位および 2 位において強調され (図 14 B、A 1 - 21、A 2 - 21) たが、3 位および 4 位においては減少した (図 14 B、A 3 - 21、A 4 - 21)。逆に、a s - s h R N A の 5' 末端の 1 - 4 位にミスマッチが位置する場合、鎖の嗜好性は、もともとの P 1 1 - 21 とは逆になった。すなわち、4 位においては、鎖の嗜好性は減少していたものの、s h R N A は、s s 標的を a s 標的よりよくサイレンシングした (図 14 B、S 1 - 21 乃至 S 4 - 21)。結論として、好ましい鎖の嗜好性を生成する最も弱い塩基対の位置は、センス鎖の 2 位 (A 2 を好むアンチセンス標的) およびアンチセンス鎖 3 位 (S 3 を好むセンス標的) である。これらの位置のミスマッチは、最も大きな鎖の非対称性を生成するためである。

30

【0222】

ショウジョウバエ胚抽出物でのこれまでの研究から、s i R N A における 2 つの鎖の運命は、R I S C を構築する間、異なっている。R 2 D 2 は、s i R N A 二本鎖の非対称性のセンサとして作用し、熱力学的敵に安定な末端に結合する。次いで、ダイサーが、塩基対に関してあまり安定でない他の末端に結合する (Tomari et al., 2004)。この結果、好ましい鎖が R I S C に組み込まれ、R N A i を媒介する。そして反対の鎖は破壊されることになる (Schwarz et al., 2003)。2 つの鎖の R N A i 有効性が s h R N A における鎖の非対称性に依存して切り換えられるということは、哺乳動物細胞においても同様であろうと示唆される (図 15 A)。このことを実験的にテストするために、s h R N A 発現ベクターによってトランスフェクトした細胞から抽出した R N A を用いてノーザンブロッティングを行った。3 つ全ての作製物によって s h R N A が作製されたことが検出された (図 15 B)。s h R N A をプロセッシングして、s i R N A とした。P 1 1 作製物からの s i R N A の両方の鎖が検出された。しかしながら、S 2 および A 3 作製物からは、好ましい鎖のみが検出された (図 15 B)。この結果は、ショウジョウバエ胚抽出物からのも

40

50

の一致している (Tomari et al., 2004)。s h R N A 対称性のセンサが何であるのかについては、いまだ明らかではないが、最近の実験によって、Drosophila, Loquacious (Loqs) が mi R N A に結合し、そしてこの結合は、mi R N A のダイサー 1 のプロセスを必要とするということが証明されている (Forstemann et al., 2005)。Loqs は、R 2 D 2 に類似するタンパク質と結合する ds R N A であり、したがって、mi R N A または s h R N A の非対称性センサとして作用することができるだろう。

【 0 2 2 3 】

s h R N A のセンス鎖の 2 位またはアンチセンス鎖の 3 位にミスマッチを配置することによって他の s h R N A にも好ましい鎖嗜好性を生じさせることができるだろうか？この質問に対する答えを出すために、さらに 3 種類の s h R N A を作製し、A 2 および A 3 の位置にミスマッチを配置した (図 1 6 A)。もともとの s h R N A は、アンチセンス鎖よりもセンス鎖をわずかによくサイレンシングした (図 1 6 B、O r)。A 2 の位置にミスマッチを配置することによって、a s 標的に対するサイレンシングの有効性を上昇させ、3 つの s h R N A において、s s 標的に対するサイレンシングの有効性を減少させたが、s h R N A s のうちの 2 つ、すなわち、s h s o d 1 a および s h s o d 1 c の対しては、この変化量は小さかった (図 1 6 B、A 2)。一方、S 3 の位置にミスマッチを配置することによって、s s 標的に対するサイレンシングの有効性を上昇させ、3 つの s h R N A において、a s 標的に対するサイレンシングの有効性を減少させた (図 1 6 B、S 3)。この結果に基づいて、S 3 の位置に配置されたミスマッチは、鎖特異性および R N A i 有効性を最も一貫して高めることがわかった。

【 0 2 2 4 】

引用文献

- 1 . Amarzguoui, M.,
Holen, T., Babaie, E., and Prydz, H. (2003). Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. Nucleic Acids Res 31, 589-595.
- 2 . Behndig, A.,
Karlsson, K., Reaume, A. G., Sentman, M. L. & Marklund, S. L. In vitro photochemical cataract in mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. Free Radic Biol Med 31, 738-44. (2001).
- 3 . Bohnsack, M.T.,
Czaplinski, K., Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA 10:185-191.
- 3 . Boutla, A.,
Delidakis, C., Livadaras, I., Tsagris, M.
& Tabler, M. Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in Drosophila. Curr Biol 11, 1776-80. (2001).
- 4 . Bracht, J., et al., (2004). Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. RNA 10:1586-1594.
- 5 . Brown, KM, Chu C-y, Rana TM. (2005). Target accessibility dictates the potency of human RISC. 12:469-470
- 6 . Brummelkamp, T. R.,
Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science 296, 550-3. (2002).
- 7 . Brummelkamp, T.,
Bernards, R. & Agami, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. Cancer Cell 2, 243. (2002).
- 8 . Cai, X, et al., (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated

10

20

30

40

50

transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10:1957-1966

- 9 . Caplen, N. J.,
Parrish, S., Imani, F., Fire, A. & Morgan, R. A. Specific inhibition of
gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate
systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9742-7. (2001) .
- 10 . Caplen, N. J. et
al. Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded
RNA-mediated RNA interference. *Hum Mol Genet* 11, 175-84. (2002) .
- 11 . Chalk, A.M., et
al., (2005) . siRNadb: a database of siRNA sequences. 10
Nucl Acids Res 33:D131-134.
- 12 . Chiu, Y.-L. &
Rana, T. M. RNAi in human cells: basic structural and functional features of
small interfering RNA. *Molecular Cell* 10, 549-561 (2002) .
- 13 . Cleveland, D. W.
& Rothstein, J. D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor
neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2, 806-19. (2001) .
- 14 . Denli AM, Tops BBJ,
Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. (2004) .
Processing of primary microRNAs by the 20
Microprocessor complex. 432:231-235.
- 15 . Devroe, E. &
Silver, P. A. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* 2, 15. (2002) .
- 16 . Ding H, Schwarz DS,
Keene A, Affar el B, Fenton L, Xia X, Shi Y, Zamore PD, Xu Z. (2003) . Selectiv
e silencing by RNAi of a dominant allele that causes
amyotrophic lateral sclerosis. *Aging Cell* 2:209-217.
- 17 . Elbashir, S. M.,
Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and
22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200. (2001) . 30
- 18 . Elbashir, S. M. et
al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured
mammalian cells. *Nature* 411, 494-8. (2001) .
- 19 . Elbashir, S. M.,
Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Functional anatomy
of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo
lysate. *Embo J* 20, 6877-88. (2001) .
- 20 . Flood, D. G. et al.
Hindlimb motor neurons require Cu/Zn superoxide dismutase for maintenance of
neuromuscular junctions. *Am J Pathol* 155, 663-72. (1999) . 40
- 21 . Forstemann K,
Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, Klattenhoff C, Theurkauf WE,
Zamore PD. (2005) . Normal microRNA Maturation and Germ-Line
Stem Cell Maintenance Requires Loquacious, a Double-Stranded RNA-Binding Domain
Protein. *PLoS Biology* 3.
- 22 . Griffiths-Jones S. (2004) . The microRNA Registry. *Nucl Acids Res* 32:
D109-111.
- 23 . Grishok A,
Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G,
Mello CC. (2001) . Genes and Mechanisms Related to RNA Interference 50

Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing. *Cell* 106:23-34.

2 4 . Haley B, Zamore PD.

(2004) . Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. 11:599-606.

2 5 . Hamilton, A. J.

& Baulcombe, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-2. (1999) .

2 6 . Hammond, S. M.,

Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-6. (2000) . 10

2 7 . Hannon, G. J. RNA

interference. *Nature* 418, 244-51. (2002) .

2 8 . Heale BSE, Soifer

HS, Bowers C, Rossi JJ. (2005) . siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucl Acids Res* 33:e30-.

2 9 . Hohjoh H. (2004) . Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. *FEBS Lett*

557:193-198. 20

3 0 . Hsieh AC, Bo R,

Manola J, Vazquez F, Bare O, Khvorova A, Scaringe S, Sellers WR. (2004) . A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucl Acids Res* 32:893-901.

3 1 . Hutvagner G,

McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. (2001) . A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the *let-7* Small Temporal RNA. *Science* 293:834-838

3 2 . Hutvagner, G. &

Zamore, P. D. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12, 225-32. (2002) . 30

3 3 . Jackson AL, Bartz

SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. (2003) . Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21:635-637.

3 4 . Jacque, J. M.,

Triques, K. & Stevenson, M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418, 435-8. (2002) .

3 5 . Kawase, M. et al. 40
Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with CuZn superoxide dismutase deficiency. *Stroke* 30, 1962-8. (1999) .

3 6 . Ketting RF, Fischer

SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA. (2001) . Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15:2654-2659.

3 7 . Khvorova A,

Reynolds A, Jayasena SD. (2003) . Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209-216.

3 8 . Kim VN. (2005) . MicroRNA BIOGENESIS: COORDINATED CROPPING AND DICING 50

. Nat Rev Mol

Cell Biol 6:376-385.

3 9 . Kondo, T. et al.

Reduction of CuZn-Superoxide Dismutase Activity Exacerbates Neuronal Cell Injury and Edema Formation after Transient Focal Cerebral Ischemia. Journal of Neuroscience 17, 4180-9 (1997) .

4 0 . Lee, N. S. et al.

Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. Nat Biotechnol 20, 500-5. (2002) .

4 1 . Lee Y, Ahn C, Han J,

Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. (2003) . The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 425:415-419.

4 2 . Lee Y, Kim M, Han

J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. (2004) . MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J 23:4051-4060. Epub 2004 Sep 4016.

4 3 . Lipardi, C., Wei,

Q. & Paterson, B. M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. Cell 107, 297-307. (2001) .

4 4 . Lund E, Guttinger

S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. (2004) . Nuclear Export of MicroRNA Precursors. Science 303:95-98.

4 5 . Matz, P. G., Copin,

J. C. & Chan, P. H. Cell death after exposure to subarachnoid hemolysate correlates inversely with expression of CuZn-superoxide dismutase. Stroke 31, 2450-9. (2000) .

4 6 . Matzuk, M. M.,

Dionne, L., Guo, Q., Kumar, T. R. & Lebovitz, R. M. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. Endocrinology 139, 4008-11. (1998) .

4 7 . McFadden, S. L.,

Ding, D. & Salvi, R. Anatomical, metabolic and genetic aspects of age-related hearing loss in mice. Audiology 40, 313-21. (2001) .

4 8 . McManus, M. T. &

Sharp, P. A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet 3, 737-47. (2002) .

4 9 . McManus, M. T.,

Petersen, C. P., Haines, B. B., Chen, J. & Sharp, P. A. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. Rna 8, 842-50. (2002) .

5 0 . Miller VM, Xia H,

Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL. (2003) . Allele-specific silencing of dominant disease genes. PNAS 100:7195-7200.

5 1 . Miyagishi, M. &

Taira, K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. Nat Biotechnol 20, 497-500. (2002) .

5 2 . Nykanen, A., Haley,

- B. & Zamore, P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-21. (2001) .
- 5 3 . Paddison, P. J.,
Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. & Conklin, D. S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-58. (2002) .
- 5 4 . Paul, C. P., Good,
P. D., Winer, I. & Engelke, D. R. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20, 505-8. (2002) .
- 5 5 . Reynolds A, Leake
D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. (2004) . Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22:326-330. 10
- 5 6 . Schwarz DS,
Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. (2003) . Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.
- 5 7 . Schwarz, D. S.,
Hutvagner, G., Haley, B. & Zamore, P. D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Molecular Cell* 10, 537-548 (2002) .
- 5 8 . Shefner, J. M. et
al. Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* 53, 1239-46. (1999) . 20
- 5 9 . Shi Y. (2003) . Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 19:9-12.
- 6 0 . Sui, G. et al. A
DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5515-20. (2002) .
- 6 1 . Taylor, J. P.,
Hardy, J. & Fischbeck, K. H. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296, 1991-5. (2002) .
- 6 2 . Tomari Y, Matranga
C, Haley B, Martinez N, Zamore PD. (2004) . A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* in press. 30
- 6 3 . Tomari Y, Zamore
PD. (2005) . Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19:517-529.
- 6 4 . Tuschl, T., Zamore,
P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. & Sharp, P. A. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13, 3191-7. (1999) .
- 6 5 . Xia, H., Mao, Q.,
Paulson, H. L. & Davidson, B. L. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 20, 1006-10. (2002) . 40
- 6 6 . Xu, P., Vernooy, S.
Y., Guo, M., and Hay, B. A. (2003) . The Drosophila MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. *Curr Biol* 13, 790-795.
- 6 7 . Yi R, Qin Y, Macara
IG, Cullen BR. (2003) . Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011-3016.
- 6 8 . Yu, J. Y.,
DeRuiter, S. L. & Turner, D. L. RNA interference by expression of 50

short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 6047-52. (2002).

69. Zamore, P. D.,

Tuschl, T., Sharp, P. A. & Bartel, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25-33. (2000).

70. Zeng, Y., Wagner,

E. J. & Cullen, B. R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. Mol Cell 9, 1327-33. (2002).

10

71. Zeng Y, Cullen BR. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. Rna 9:112-123.

72. Zeng Y, Cullen BR. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. Nucl Acids Res 32:4776-4785.

74. Zhou H, Xia XG, Xu

Z. (2005). An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. Nucl Acids Res 33:e62-.

20

【0225】

他の実施態様

本発明を、詳細な説明と組み合わせて説明してきたが、前述の説明は、例示の目的であって、添付の請求の範囲によって定義される、本発明の精神および範囲を限定することを意図するものではない。他の局面、利点、および変形が、続く請求の範囲に含まれるものとする。

【0226】

さらに、引用した全ての文献の内容の全体を引用によってここに援用する。

【図面の簡単な説明】

【0227】

30

【図1】 siRNA二本鎖は、in vitroにおいて突然変異および野生型のSOD1を区別することができる。(A) 突然変異 siRNA P11 (配列番号: 5、センス; 配列番号: 6、アンチセンスまたはガイド)、突然変異 siRNA P10 (配列番号: 3、センス; 配列番号: 4、アンチセンスまたはガイド)、突然変異 siRNA P9 (配列番号: 1、センス; 配列番号: 2 アンチセンスまたはガイド)、SOD1野生型標的 (配列番号: 7)、SOD1突然変異標的 (配列番号: 8)、野生型 siRNA P11 (配列番号: 9 センス; 配列番号: 10、アンチセンスまたはガイド)、野生型 siRNA P10 (配列番号: 11、センス; 配列番号: 12、アンチセンスまたはガイド)、野生型 siRNA P9 (配列番号: 13、センス; 配列番号: 14、アンチセンスまたはガイド) (B) 突然変異 siRNA p10は、野生型SOD1 mRNAではなく突然変異SOD1 mRNAをRNAi経路による破壊に方向付ける。

40

【図2】 HeLa細胞における siRNAによる突然変異SOD1 G85R発現の選択的阻害。SOD1 wt GFPまたはG85R - GFPを各種の siRNAとともにコトランスフェクトした。dsRedをトランスフェクション対照としてコトランスフェクトした。緑色および赤色蛍光細胞を、FACSを用いて定量した。(A) トランスフェクションにおける緑色 (黒線) および赤色細胞 (白線) の相対数 (n = 3)。エラーバーは標準偏差を示す。

【図3】 HeLa細胞におけるU6 - G93Aベクターによる突然変異SOD1 G93A発現の選択的阻害。(A) G93A shRNAのデザイン (配列番号: 16)、(B) SOD1 wt GFPまたはSOD1 G93A - GFPをU6空またはU6 - G93Aと

50

ともにコトランスフェクトした。d s R e d をトランスフェクション対照としてコトランスフェクトした。緑色および赤色傾向細胞を、F A C S を用いて定量した。4 回の実験の結果を平均した。エラーバーは標準偏差を示す。

【図 4】神経細胞芽腫 N 2 a 細胞における s i R N A および U 6 - G 9 3 A ベクターによる突然変異 S O D 1 発現の選択的阻害。(A) G 8 5 R に対する s i R N A (n = 4)、(B) U 6 - G 9 3 A ベクター (n = 3)。エラーバーは標準偏差を示す。

【図 5】同一の細胞における s i R N A による、野生型 S O D 1 ではなく、突然変異 S O D 1 G 8 5 R 発現の選択的阻害。(A) 突然変異 S O D 1 G 8 5 R - G F P を検出するトランスフェクト H e l a 細胞のタンパク質プロットから測定した、S O D 1 の相対的レベル (4 回のトランスフェクションの平均)。エラーバーは標準誤差を示す。

【図 6】in vivo における U 6 - G 9 3 A ベクターによる突然変異 S O D 1 発現の選択的阻害 (A) 水力学的トランスフェクション法を用い、マウスにおいて S O D 1 G 9 3 A - G F P を C 末端 m y c タグ付き野生型ヒト S O D 1 とともにコトランスフェクトした。S D A - P A G E 上の相対バンド強度を定量した。野生型 S O D 1 m y c に対する S O D 1 G 9 3 A - G F P の割合を示す。各グループにおいて 8 匹の動物を用いた。U 6 - G 9 3 A グループは、他の 2 つのグループとは有意に異なる (p < 0 . 0 5)。

【図 7】ヒト S O D - 1 タンパク質のジェンバンク登録。受入番号 N P _ 0 0 0 4 4 5。野生型 S O D - 1 (配列番号 : 1 8) の推定アミノ酸配列を示す。

【図 8】ヒト S O D - 1 m R N A のジェンバンク登録。受入番号 N M _ 0 0 0 4 5 4。野生型 S O D - 1 (配列番号 : 1 7) のヌクレオチド配列を示す。

【図 9】S O D 1 ゲノム配列 (配列番号 : 1 9) である。

【図 1 0】図 1 0 は、s o d 1 m R N A の同じ領域を標的とすることが可能な、非対称 s i R N A (P 9、P 1 0、および P 1 1) を示す図である。P 1 1 の配列を 1 1 A に示す。P 9 および P 1 0 は、s o d 1 m R N A の 5 ' 末端へ 2 および 1 ヌクレオチド長、それぞれ移動した s o d 1 配列を標的とする。3 つの s i R N A は、互いに 1 n t だけ離れた配列を標的としているにもかかわらず、それらの標準的な嗜好性は非常に異なっている。P 9 および P 1 1 は、アンチセンス鎖を標的とすることを好み、P 1 0 は、センス鎖を標的とすることを好んでいる。

【図 1 1】図 1 1 は、天然に存在する鎖を、R I S C に入ることが好ましい s i R N A 鎖の 5 ' 末端の位置にミスマッチを配置することによって、操作された非対称 s i R N A を示す図である。図 1 1 A は、s i R N A のいずれかの末端にミスマッチが置かれた状態で、センスおよびアンチセンス標的配列が、3 ' U T R (上、左)、P 1 1 s i R N A、およびその変形に挿入された様子を示す図である。図 1 1 B は、種々の s i R N A のサイレンス有効性を示す図である。R N A i のセンス鎖およびその対応する標的配列 (「アンチセンス標的」) を太字で示している。

【図 1 2】図 1 2 は、所望の鎖の R N A i の有効性を向上させ、望ましくない鎖 R N A i の有効性を悪化させる非対称 s i R N A の設計を示す図である。P 1 1、S 2、および A 2 のそれぞれの s i R N A の配列を図 1 1 A に示す。s i R N A A 2 / S 2 は、A 2 s i R N A のセンス鎖を S 2 s i R N A のアンチセンス鎖でアニーリングすることによって生成した (図 1 1 A 参照)。

【図 1 3】図 1 3 は、1 9 n t ステムをもつ s h R N A の鎖の嗜好性が非対称性の規則によって予測できないということを証明するデータを示す図である。図 1 3 A は、1 9 n t ステムをもつ s h R N A の配列を示す図である。該ステムのいずれかの鎖の 4 位にミスマッチが配置されている。s h R N A のセンス鎖およびその対応する標的配列 (「アンチセンス標的」) を太字で示している。図 1 3 B は、センスまたはアンチセンス標的に対する s h R N A の相対的サイレンシング有効性を調べるための二重ルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。センス鎖およびアンチセンス鎖の双方を含む全ての標的は、完全に s i R N A 鎖を補完している。

【図 1 4】図 1 4 は、2 1 n t をもつ s h R N A の鎖の嗜好性が非対称性の規則によって予測されるということを証明するデータを示す図である。図 1 4 A は、2 1 n t ステムを

10

20

30

40

50

もつ s h R N A の配列を示す図である。該システムのいずれかの鎖の 4 位にミスマッチが配置されている。s h R N A のセンス鎖およびその対応する標的配列（「アンチセンス標的」）を太字で示している。図 1 4 B は、センスまたはアンチセンス標的に対する s h R N A の相対的サイレンシング有効性を調べるための二重ルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。センス鎖およびアンチセンス鎖の双方を含む全ての標的は、完全に s i R N A 鎖を補完している。

【図 15】図 15 は、設計された非対称 s h R N A が非対称性の規則によって予測されるように処理されることを証明するデータを示す図である。図 15 A は、非対称性の規則によって予測されるように s h R N A の処理を行うことを模式的に示している。矢印の太さは、s i R N A 鎖を R I S C 複合体に組み込むための嗜好性の程度を示している。s h R N A のセンス鎖およびその対応する標的配列（「アンチセンス標的」）を太字で示している。図 15 B は、s h R N A の存在と処理された s i R N A 鎖のを示すのザンプロットを示している。各レーンには、指示された s h R N A 作製物によってトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞からの R N A の合計を載せている。センスまたはアンチセンス R N A プローブのいずれかを用いてプロットを検出した。

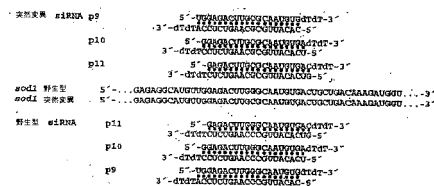
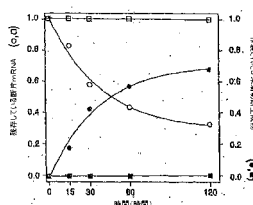
【図 16】図 16 は、s h R N A のループの遠位の鎖から 3 位のミスマッチが、好ましい鎖嗜好性をもつ最適化された s h R N A s を導くことを証明するデータを示す図である。図 16 A は、A 2 または S 3 位置にミスマッチを配置しない、あるいは配置した 3 セットの s h R N A の配列を示す。s h R N A のセンス鎖およびその対応する標的配列（「アンチセンス標的」）を太字で示している。図 16 B は、センスまたはアンチセンス標的に対する s h R N A の相対的サイレンシング有効性を調べるための二重ルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。センス鎖およびアンチセンス鎖の双方を含む全ての標的は、完全に s i R N A 鎖を補完している。

10

20

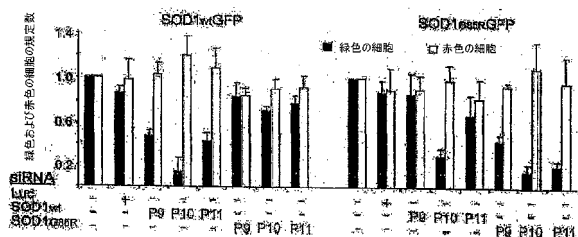
【 図 1 】

A

**B**

【 図 2 】

A

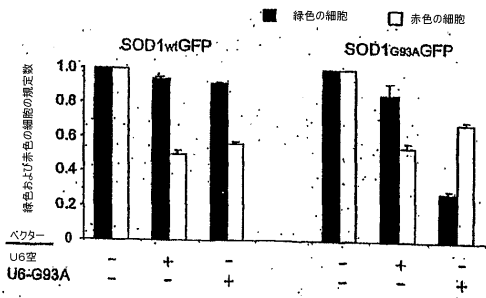


【図3】

A

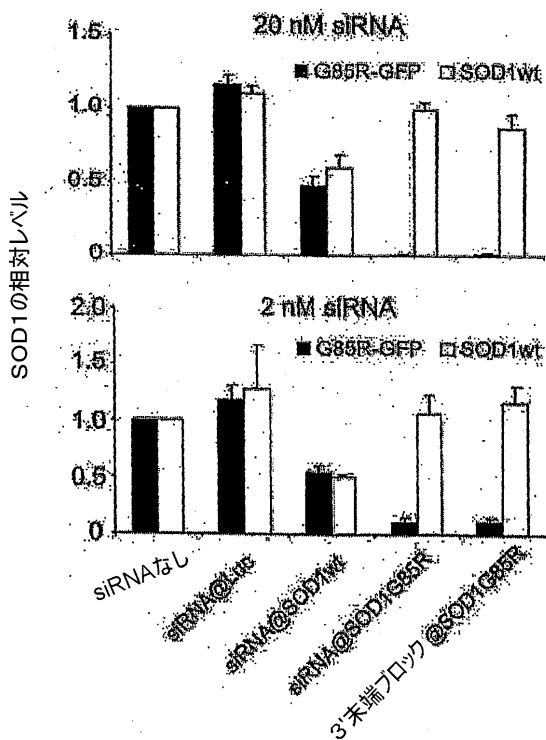
野生型 SOD1
5'...ACTGCTGACAAAGATGGTGTGGCCGATGTGTCTAT...-3'
G83A shRNA GACAAAGATGUCUGGGCCGATAAAG
UUUUCUUUUCUACGACACCGGCUAuuC

B



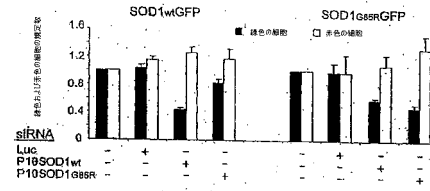
【図5】

A

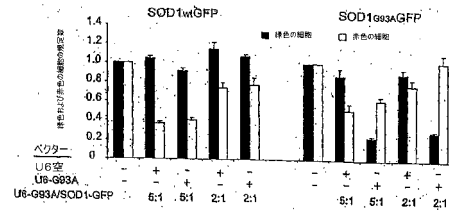


【図4】

A

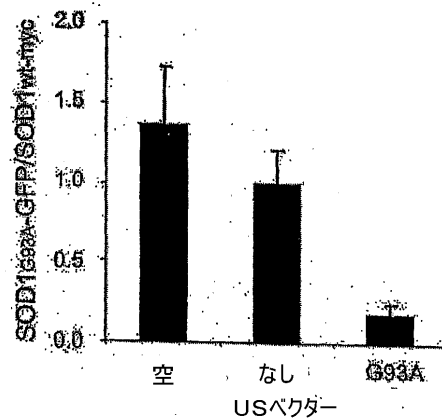


B

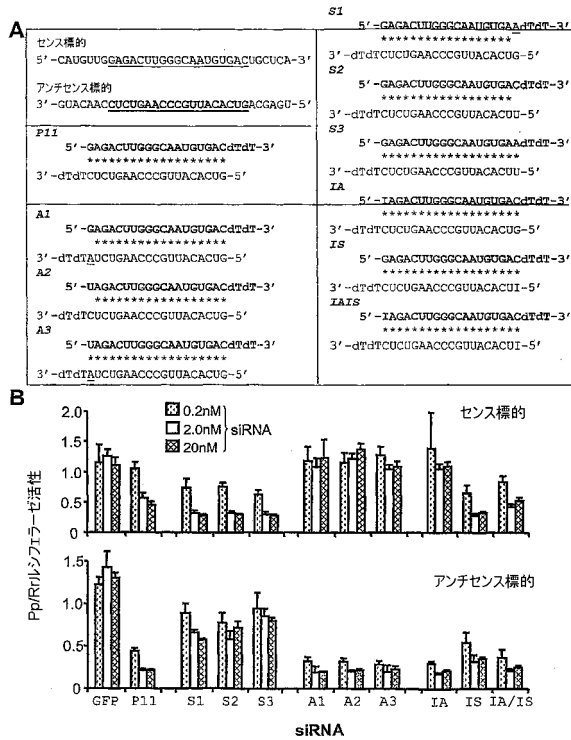


【図6】

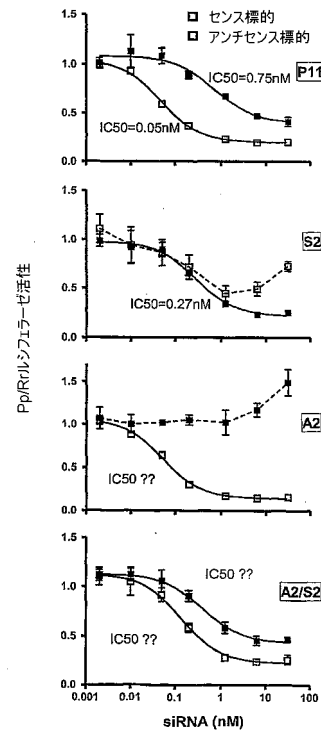
A



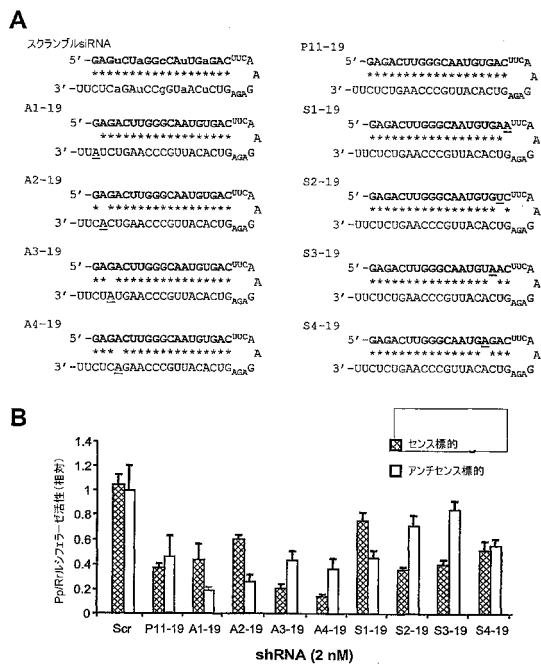
【図 1 1】



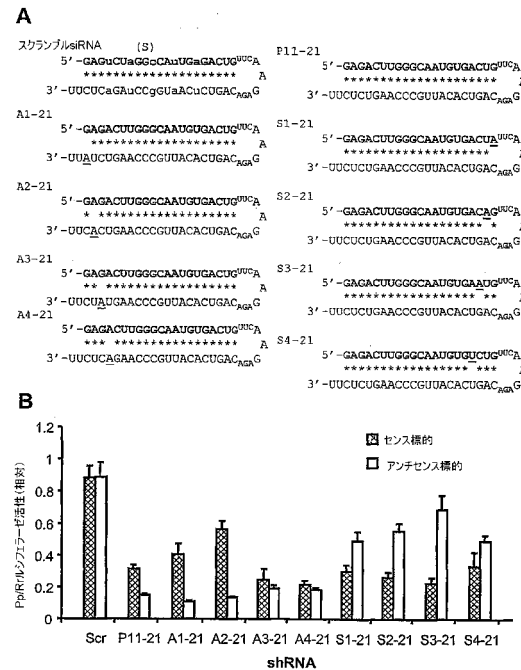
【図 1 2】



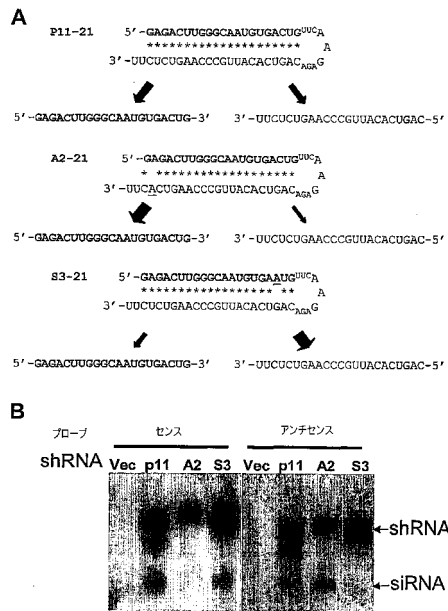
【図 1 3】



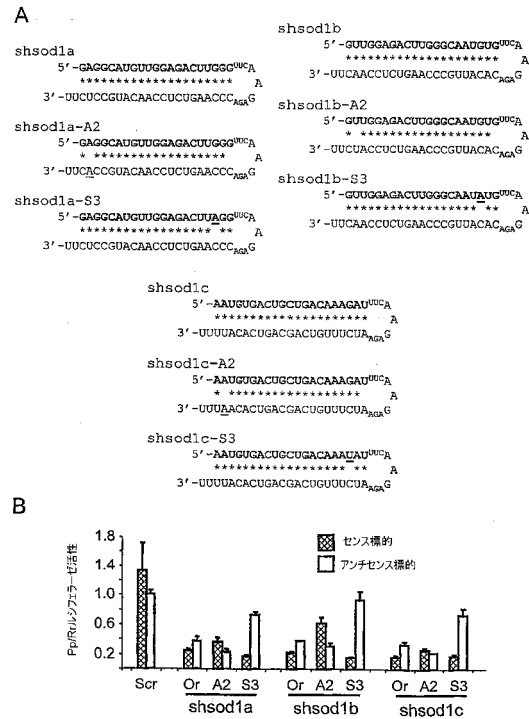
【図 1 4】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 配 列 表 】

2009509548000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/38704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07H 21/04 (2007.01) USPC - 536/23.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 536/23.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 514/44 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT, PGPB, EPAB, JPAB); Google Scholar. Search Terms: shRNA, RNAi, mismatch, and asymmetry		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0192629 A1 (XU et al.) 30 September 2004 (30.09.2004), para [0005], [0006], [0008], [0009], [0030], [0066], [0068], [0073], [0077], [0126], and [0129].	1-47, 54-57
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 April 2007 (30.04.2007)		Date of mailing of the international search report 02 AUG 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/38704

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 48-53
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/14 (2006.01)		A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)		A 6 1 P 25/16	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L C,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA13 NA14 ZA15 ZA16 ZA94
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA15 ZA16 ZA94