

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97117329

C12N15/11 (2006.01)

※ 申請日期：97.5.9

※IPC 分類：~~C12N~~

A61K 48/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

單股環狀RNA及其製造方法

SINGLE-CHAIN CIRCULAR RNA AND METHOD OF PRODUCING
THE SAME

二、申請人：(共 3 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 獨立行政法人理化學研究所
RIKEN
2. 日商大塚製藥股份有限公司
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
3. 日商林化成股份有限公司
HAYASHI KASEI CO., LTD.

代表人：(中文/英文)

1. 野依 良治
NOYORI, RYOJI
2. 通口 達夫
HIGUCHI, TATSUO
3. 林 久二
HAYASHI, HISATSUGU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 日本國埼玉縣和光市廣澤2番1號
2-1, HIROSAWA, WAKO-SHI, SAITAMA 351-0198, JAPAN
2. 日本國東京都千代田區神田司町2-9
2-9, KANDA-TSUKASAMACHI, CHIYODA-KU, TOKYO
101-8535, JAPAN

3. 日本國大阪府大阪市北區天神橋一丁目2番7號
2-7, TENJINBASHI 1-CHOME, KITA-KU, OSAKA-SHI, OSAKA
530-0041, JAPAN

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 JAPAN
2. 日本 JAPAN
3. 日本 JAPAN

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 阿部 洋
ABE, HIROSHI
2. 伊藤 嘉浩
ITO, YOSHIHIRO
3. 阿部 奈保子
ABE, NAOKO
4. 豐福 秀一
TOYOBUKU, HIDEKAZU

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 JAPAN
2. 日本 JAPAN
3. 日本 JAPAN
4. 日本 JAPAN

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本；2007年05月09日；特願2007-125045

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種單股環狀RNA，其製造方法以及使用單股環狀RNA之醫藥組合物。

【先前技術】

目前為止之RNA干擾法，大致可劃分為使用化學合成之雙股RNA之方法、以及使用質體載體之方法。後者之使用質體載體之RNA干擾技術，通常作為生物技術而使用，主要用於基礎生物學實驗。然而，將RNA干擾技術應用於醫藥品開發時，使用質體載體之方法對人體的安全性造成問題，因此較理想的是前者之使用化學合成之雙股RNA的方法。

然而，化學合成之雙股RNA存在如下問題：在生物體內不穩定，即，由於細胞內之酶(核酸酶)作用而易於分解。因此，為了提高細胞內的雙股RNA之穩定性，而開發出導入有非天然核酸之RNA股，從而穩定性得到提高，但出現生物活性下降之問題。進而，非天然核酸所產生之毒性亦未知，因此難以應用於醫藥品。

RNA干擾法中所使用之雙股RNA之形態有如下：具有平滑末端或突出末端之雙股RNA，具有雙股RNA末端的一端成環狀之髮夾結構之RNA(專利文獻1)，具有約19個鹼基對與2個環，且具有任意化學修飾聚核苷酸之環狀核酸(專利文獻2)等。但，該環狀核酸，於RNA干擾效應方面未經試驗。

又，揭示有RNA-DNA嵌合體之啞鈴型核酸(專利文獻3)，該核酸並非用於RNA干擾，而是於細胞內啞鈴型核酸之RNA部分藉由酶而被切割，從而阻礙反義DNA部分結合於細胞內之mRNA上。專利文獻3中揭示：由於核酸具有啞鈴型結構，故對細胞內的核酸分解酶之耐性高，並於核糖核酸酶H發揮作用之前穩定地存在於細胞內，藉由核糖核酸酶H之作用而切除互補RNA部分，首次，含有反義DNA部分之單股寡核苷酸游離於細胞內，因此一般認為單位投予量之反義效果會提高。

又，關於啞鈴型結構之環狀核酸之合成方法，例如揭示如下：將寡核苷酸合成為線狀，形成莖部分與髮夾環部分，而獲得目標環狀啞鈴型寡核苷酸之1個部位(上述髮夾環部分之相對側的末端)未被結合之鏈裂的啞鈴型寡核苷酸，其5'末端藉由連接酶而接合，藉此而製備環狀啞鈴型環狀核酸(專利文獻3)。

專利文獻1 日本專利特表2003-502012號公報

專利文獻2 日本專利特開2006-271387號公報

專利文獻3 日本專利特開平11-137260號公報

【發明內容】

本發明之目的在於提供一種單股環狀RNA以及其製造方法。

本發明者等人發現，藉由分別合成於兩端具有不形成互補股之鹼基序列之義股與反義股，使連接酶同時作用於兩端之鹼基，而可意外獲得高產率之單股環狀RNA；並且發

現，所獲得之單股環狀RNA持續地、緩釋地發揮RNA干擾作用；從而完成本發明。

即，本發明包含以下之發明。

- (1) 一種具有持續性或緩釋性RNA干擾作用之單股環狀RNA，其特徵在於：含有義股序列、與該義股序列互補之反義股序列、於該義股與該反義股之間結合二者之相同或不同的2個環序列，且該義股與該反義股配對而形成莖。
- (2) 如(1)中所揭示之單股環狀RNA，其中將對照細胞中之標靶RNA之表現設為1時，導入至真核細胞24小時後之標靶RNA之表現顯示為0.4以下。
- (3) 如(1)或(2)中所揭示之單股環狀RNA，其係於人類血清中經過8小時之時、保持70%以上。
- (4) 一種如(1)~(3)中任一項所揭示之單股環狀RNA之製造方法，其包括：分別合成在5'末端以及3'末端具有不形成互補股之鹼基序列之義股以及反義股，義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之5'末端的鹼基、與反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之3'末端的鹼基，以及義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之3'末端的鹼基、與反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之5'末端的鹼基，藉由連接酶同時連接，

此時，義股於5'末端所具有的不形成互補股之鹼基序列、與反義股於3'末端所具有的不形成互補股之鹼基序列相互結合而形成環，義股於3'末端所具有的不形成互補股之鹼基序列、與反義股於5'末端所具有的不形成互補股之

鹼基序列相互結合而形成環，以及義股與反義股配對而形成莖。

(5) 如(4)中所揭示之製造方法，其中進而包括：將義股所具有的不形成互補股之鹼基序列、以及反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之5'末端進行磷酸化。

(6) 如(4)或(5)中所揭示之製造方法，其中上述環之序列相互相同或不同。

(7) 如(4)至(6)中任一項所揭示之製造方法，其中上述環之長度為2~20個鹼基。

(8) 如(4)至(7)中任一項所揭示之製造方法，其中上述莖之長度為19~31個鹼基。

(9) 一種於體外抑制編碼該蛋白質之基因的表現之方法，其包括：將如(1)~(3)中任一項所揭示之單股環狀RNA導入至來自於人類之細胞後，使標靶RNA失去功能而持續地阻礙其轉譯為蛋白質。

(10) 一種抑制編碼該蛋白質之基因的表現之方法，其包括：將如(1)~(3)中任一項所揭示之單股環狀RNA導入至非人類動物、植物或該等之細胞後，使標靶RNA失去功能而持續地阻礙其轉譯為蛋白質。

(11) 一種醫藥組合物，其含有如(1)~(3)中任一項所揭示之單股環狀RNA作為有效成分。

本說明書中，單股環狀RNA亦稱為啞鈴型RNA。所謂啞鈴型RNA，係指義股與反義股互補配對而形成莖，於莖之兩側由不形成互補股之鹼基序列形成環，單股環狀RNA之

整體形狀成為啞鈴狀。

本說明書包含作為本申請案之優先權基礎的日本國專利申請案 2007-125045 號之說明書及 / 或圖式上所記載之內容。

【實施方式】

本發明之單股環狀 RNA 包含：與標靶 RNA 之鹼基序列或者其一部分同源之義股序列、以及與該義股序列互補且可配對之反義股序列，及於義股與反義股之間不形成互補股之環序列。

義股與反義股配對而形成莖。莖之長度並無特別限定，根據標靶 RNA 之種類或結構決定長度即可，例如含有 19~31 個鹼基對，較好的是 21~25 個鹼基對，更好的是 22~24 個鹼基對，特別好的是 23 個鹼基對。

不形成互補股之鹼基序列，位於義股與反義股各自之 5' 末端與 3' 末端上，義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之 5' 末端的鹼基、與反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之 3' 末端的鹼基連結而形成環，義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之 3' 末端的鹼基、與反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之 5' 末端的鹼基連結而形成環。環之長度較好的是含有 2~20 個鹼基，更好的是含有 6~12 個鹼基。因此，整個單股環狀 RNA 較好的是由 42~102 個鹼基形成。

若將義股之 5' 末端之不形成互補股之鹼基序列設為 A，將反義股之 3' 末端之不形成互補股之鹼基序列設為 B，將

義股之3'末端之不形成互補股之鹼基序列設為C，將反義股之5'末端之不形成互補股之鹼基序列設為D，則例如環之長度為20個鹼基時，A具有1~19個鹼基之長度，B具有19~1個鹼基之長度，C具有19~1個鹼基之長度，D具有1~19個鹼基之長度，A之5'末端之鹼基與B之3'末端之鹼基連結而形成20個鹼基之環，C之3'末端之鹼基與D之5'末端之鹼基連結而形成20個鹼基之環。

較好的是，不形成互補股之序列於A與B之間、C與D之間，長度相差例如1個鹼基，2個鹼基或3個鹼基，或者長度相同。因此，例如環之長度為8個鹼基時，較好的是A之長度為3~5個鹼基，B之長度為5~3個鹼基，C之長度為5~3個鹼基，D之長度為3~5個鹼基。環之長度為9個鹼基時，較好的是A之長度為3~6個鹼基，B之長度為6~3個鹼基，C之長度為6~3個鹼基，D之長度為3~6個鹼基。環之長度為10個鹼基時，較好的是A之長度為4~6個鹼基，B之長度為6~4個鹼基，C之長度為6~4個鹼基，D之長度為4~6鹼基。

再者，由A、B所形成之環與由C、D所形成之環的鹼基序列既可相同，亦可不同。

本發明之單股環狀RNA可用於RNA干擾法。

所謂RNA干擾，亦稱為RNA interference (RNAi)，係具有與標靶RNA互補之序列的小RNA分子與標靶RNA結合，並將其分解或抑制轉譯的現象。

啞鈴型RNA之反義股，具有與成為標靶之RNA(例如mRNA或其前驅物RNA)互補之序列。又，不形成互補股之

鹼基序列並無特別限定，例如可列舉：UUCAAGAGA、或UGUGCUGUC (M. Miyagishi等人，Oligonucleotides 2003, 13:1-7)等。

進而，啞鈴型RNA之環可進行化學修飾，例如若藉由分子量約為2000~5000之聚乙二醇修飾，則可提昇啞鈴型RNA於生物體內之穩定性。因於細胞內藉由Dicer酶等酶而切割並去除啞鈴型RNA之環，故莖作為siRNA或miRNA而發揮RNA干擾作用時，可認為聚乙二醇幾乎不產生影響。

至於本發明之啞鈴型RNA，較好的是將對照細胞(未導入啞鈴型RNA)中之標靶RNA之表現設為1時，導入有該啞鈴型RNA之細胞中的細胞導入24小時後之標靶RNA之表現顯示為0.4以下。本發明中，細胞為真核細胞，較好的是動物細胞以及植物細胞。

至於標靶RNA之表現，例如使報告基因(螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶、綠色螢光蛋白(green fluorescence protein, GFP)等)於細胞內轉形，將報告基因之mRNA作為標靶RNA，而該標靶RNA之表現在多大程度上受到啞鈴型RNA的阻礙，可藉由測定來源於報告基因之蛋白質的發色及螢光來確認。

進而，本發明之啞鈴型RNA具有如下特徵：於人類血清中經過8小時之時70%以上未被分解而得以保持。例如可於人類血清中培養啞鈴型RNA，藉由電泳等測定分子量來確認其是否經時分解。

至於本發明之啞鈴型單股環狀RNA之製造方法，包括：分別合成於5'末端以及3'末端具有不形成互補股之鹼基序列的義股以及反義股，義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之5'末端的鹼基、與反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之3'末端的鹼基，以及義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之3'末端的鹼基、與反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之5'末端的鹼基，藉由連接酶同時連結。

為了可抑制成為標靶之基因，而根據標靶基因之鹼基序列設計義股以及反義股。至於設計，係可製作多個義股以及反義股並分別確認抑制效率，例如可利用根據siRNA設計用演算法等之設計（參照文獻：J. A. Jaeger等人，Methods in Enzymology (1989) 183:281-306; D. H. Mathews等人，J. Mol. Biol. (1999) 288:911-940）。設計時，較理想的是不用抑制具有與標靶基因類似之序列的、標靶基因以外的基因之表現（脫靶(off target)效應）。義股以及反義股並無特別限定，設計之長度例如為19~31個鹼基，較好的是21~25個鹼基，更好的是22~24個鹼基，特別好的是23個鹼基。

標靶基因並無特別限定，例如可列舉：白血病之abl/bcr基因，老年性黃斑部病變之VEGF基因，肝炎之HCV基因。

其後將形成環之序列，例如上述序列UUCAAGAGA於任意部位切割成2組，而獲得不形成互補股之鹼基序列（該序

列為9個鹼基，切割成2組時，較好的是如上所述，長度相差1~3個鹼基之範圍)，並設計成將一組連結於反義股之3'末端，將另一組連結於義股之5'末端的序列，以相同之方式，設計成將一組連結於義股之3'末端，將另一組連結於反義股之5'末端的序列。分別分開合成所設計之該等2個序列之單股核酸。此時，較好的是使用化學性磷酸化試劑對5'末端進行磷酸化。再者，較好的是將形成環時之長度設計成例如2~20個鹼基，較好的是6~12個鹼基。

核酸合成方法有如下各種方法：體外轉錄合成方法，使用質體、病毒載體之方法，藉由PCR盒之方法等，並無特別限定，就純度之高低，能否大量合成，於體內之使用安全性之高低，能否化學修飾等方面而言，較好的是化學合成方法。化學合成方法有膦酸氫法，亞磷醯胺法等，並無特別限定，可使用市售之自動核酸合成機。

位於義股以及反義股之兩端的不形成互補股之鹼基序列之末端，藉由連接酶(例如T4 RNA連接酶，T4 DNA連接酶等)連結，同時形成2個環。至於反應條件，例如於含有聚乙二醇(PEG)，牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)等之緩衝液中於低溫下培養20小時即可。所合成之啞鈴型單股環狀RNA，可用通常之方法進行回收·純化(例如高效液相層析法，PAGE法等)。

進而，可藉由聚乙二醇(PEG)等對單股環狀RNA進行化學修飾，較好的是對環部分進行化學修飾。為了結合，而改變PEG之兩末端，並導入例如甲醯基、N-羥基琥珀醯亞

胺酯基等與鹼基之胺基具有反應性之官能基。

以下，就使用由上述方法製造的啞鈴型RNA之RNA干擾法進行說明。

根據本發明，可將本發明之單股環狀RNA導入至細胞，使標靶RNA失去功能而持續阻礙其轉譯為蛋白質，上述細胞可使用人類細胞或非人類細胞。

於體外進行RNA干擾法時，藉由例如電穿孔法，顯微注射法，脂轉染法，磷酸鈣法等將啞鈴型RNA導入至細胞。

於體內進行RNA干擾法時，首先對含有啞鈴型RNA之試料進行透析、調節pH值等，而調整成適合於生物體。將試料導入至動物或植物之方法並無特別限定，例如可列舉：局部投予，靜脈內投予，使用基因槍之方法等，應用於人類時，就安全性方面而言，較好的是不使用微生物等之方法。

導入至細胞內之啞鈴型RNA，於細胞內藉由Dicer酶而被切割並於細胞內產生具有RNA干擾作用之RNA雙股(siRNA)(圖1)。siRNA之末端可為平滑末端或突出末端。siRNA變成單股，形成RNA-核酸酶複合體(RNA誘導沉默複合體(RISC))，識別並分解與siRNA互補之序列的標靶mRNA，從而抑制標靶基因之表現。

本發明之單股環狀RNA，可用於植物、動物(包括例如人類、寵物、家畜之哺乳動物等)、該等之細胞之任一種，特別期待於醫學、農學領域中得到廣泛應用。為了弄清例如植物或動物水平、植物或動物細胞水平下之特定基

因或蛋白質的功能，弄清例如藉由剔除法所得基因之功能等各種目的，可使用本發明之單股環狀RNA。

又，本發明包括醫藥組合物，該醫藥組合物含有單股環狀RNA作為有效成分。

單股環狀RNA於醫藥組合物之調配量，可根據組合物之種類或目的進行調整，相對於組合物之總量，例如為1重量%、3重量%、5重量%、10重量%、20重量%、30重量%、40重量%、50重量%、60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、100重量%，但並不限定於該等。

作為本發明之醫藥組合物之劑形，例如可列舉：液體製劑(溶液劑、懸浮劑、乳濁劑等)、固體製劑(使用時製備之冷凍乾燥劑等)、脂質體(較好的是陽離子性脂質體)封裝製劑等，又，作為投予途徑，較好的是非經口投予，例如包括：直接投予至患部之局所投予、經肺投予、經鼻投予等經黏膜投予以及靜脈內投予等。

本發明之醫藥組合物根據製劑化，劑形等，可含有賦形劑(生理鹽水、滅菌水、林葛爾氏溶液等)、緩衝劑、等張劑、穩定劑等。

又，本發明之醫藥組合物之投予量可根據病人之性別、體重、年齡、嚴重程度、症狀等進行變更。

本發明之醫藥組合物之應用並無特別限定，例如可列舉：治療癌症等疾病，例如抑制癌細胞中異常表現之基因或蛋白質之功能等。

以下，藉由實施例更具體說明本發明，但該等實施例並

不限定本發明。

實施例 1

啞鈴型 RNA 之製作

成為啞鈴型 RNA 之原料的 5'磷酸化 RNA，係完全基於亞磷醯胺法，藉由 DNA 合成機 (GeneWorld H8-SE) 合成。RNA 亞磷醯胺係使用 TBDMS 保護體 (Proligo 公司)，5'磷酸化係使用化學磷酸化試劑 (Chemical Phosphorylation Reagent)(Glen Research 公司)。脫保護係根據常法進行 PAGE 純化。將所合成之 RNA 序列、序列編號 1(義股 28 mer)，序列編號 2(反義股 28 mer)、序列編號 3 (56 mer) 示於圖 2。再者，圖 2 之 RNA 序列中，有下劃線之序列係形成啞鈴型 RNA 之環部的序列。

繼而，以 2 μ M 之 RNA 雙股 (RNA double strand)、2.0 units/ μ l 之 T4 RNA 連接酶、0.006% 之 BSA、25% 之 PEG6000、50 mM 之 Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM 之 $MgCl_2$ 、10 mM 之 DTT、1 mM 之 ATP 的組成，於反應規模 25 μ l 中進行酶反應。

具體而言，首先，將 5'磷酸化 RNA 雙股溶解於含有 100 mM 之 Tris-HCl (pH 7.5)、20 mM 之 $MgCl_2$ 、20 mM 之 DTT、2 mM 之 ATP 的緩衝液 (2x 緩衝液) 12.5 μ l 中，以使 5'磷酸化 RNA 雙股達到 4 μ M，於 65°C 下加熱 5 分鐘後，慢慢冷卻至室溫。其後，添加 BSA 水溶液、PEG6000 水溶液、T4 RNA 連接酶 (TAKARA BIO 公司)，以使達到上述組成與反應規模，於 11°C 下培養 20 小時。藉由乙醇沈澱，使用 PAGE 解

析所回收之RNA。

圖2之PAGE之各區帶的樣品如下所示。

區帶1：28個鹼基之義股以及28個鹼基之反義股的混合物(標記物)

區帶2：57個鹼基之RNA(標記物)

區帶3：由28個鹼基之義股與28個鹼基之反義股所形成之啞鈴型RNA

區帶4：由56個鹼基(單股)所形成之啞鈴型RNA

區帶5：藉由RNA連接酶處理之28個鹼基之義股(參考)

區帶6：藉由RNA連接酶處理之28個鹼基之反義股(參考)

至於區帶4之啞鈴型RNA，係藉由如下方式製作：合成序列編號3之56個鹼基之單股並形成莖部分以及髮夾環部分，藉由T4連接酶結合最前之鹼基與最後之鹼基。

區帶3之圓圈所圈起之帶係藉由本發明之方法製作而成之啞鈴型RNA，其產率約為80%。區帶4之啞鈴型RNA之產率約為5%以下。

實施例2

啞鈴型RNA之莖之長度的研究

藉由上述DNA合成機合成序列編號4~13所示之RNA。序列編號4與5形成含有18個鹼基對之雙股RNA (siRNA-1)，序列編號6與7形成莖之長度為19個鹼基之啞鈴型RNA (Db-19)，序列編號8與9形成莖之長度為23個鹼基之啞鈴型RNA (Db-23)，序列編號10與11形成莖之長度為27個鹼基

之啞鈴型 RNA (Db-27)，序列編號 12 與 13 形成莖之長度為 31 個鹼基之啞鈴型 RNA (Db-31)(圖 3)。

以 2 μ M 之 RNA 雙股、1.0 units/ μ l 之 T4 RNA 連接酶、0.006% 之 BSA、25% 之 PEG6000、50 mM 之 Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM 之 $MgCl_2$ 、10 mM 之 DTT、1 mM 之 ATP 之組成，於反應規模 1.5~2.5 ml 下進行酶反應。

具體而言，將 5' 磷酸化 RNA 雙股溶解於含有 100 mM 之 Tris-HCl (pH 7.5)、20 mM 之 $MgCl_2$ 、20 mM 之 DTT、2 mM 之 ATP 的緩衝液(2x 緩衝液，最終反應液量的一半)中，於 65°C 下加熱 5 分鐘後，慢慢冷卻至室溫，以使 5' 磷酸化 RNA 雙股達到 4 μ M。其後，添加 BSA 水溶液、PEG6000 水溶液、T4 RNA 連接酶(TAKARA BIO 公司)，以使達到上述組成與反應規模，於 11°C 下培養 20 個小時。

藉由乙醇沈澱自反應液中回收 RNA，使用 PAGE 離析環化體。藉由 UV shadowing 法使含有目標物之帶可視化並切出，粉碎成細小狀態後，以溶析緩衝液(0.2 M 之 NaCl、1 mM 之 EDTA (pH 8.0)) 4 ml 萃取 3 次。使用 Sep-Pak 濾筒進行脫鹽(以 50% 乙腈水 6 ml 進行溶析)，並使用離心蒸發器進行濃縮，進而於醋酸銨存在下進行乙醇沈澱。測定 UV 光譜，從而將所獲得之目標物定量。

於上述各啞鈴型 RNA 2 μ g 中添加含有 20 mM 之 Tris-HCl (pH 8.5)、150 mM 之 NaCl、2.5 mM 之 $MgCl_2$ 之緩衝液中的 ColdShock-DICER 酶(TAKARA BIO 公司) 2 units(反應液量 20 μ l)，並於 37°C 下進行培養。於 1、6、18 個小時後對反

應液取樣 3 μ l，與 120 mM 之 EDTA 水溶液 2 μ l 混合，並停止酶反應。藉由未變性 PAGE (10% PAGE、1x TBE) 對其進行解析 (藉由 1x SYBR Green I 染色後，用 BioRad Molecular Imager FX 進行圖像化·定量)。

圖 4 係表示各啞鈴型 RNA 之 PAGE。作為對照，亦同樣研究以啞鈴化反應前之雙股 RNA 為基質的切割反應。其結果，Db-19 之切割反應於 1 小時後進行了約 5%，從而可確認生成 20 個鹼基長度的雙股 RNA。Db-19 之 20 個鹼基前後之切割片段於 6、18 個小時後維持幾乎同樣程度的濃度。另一方面，對照之 19 個鹼基之直股 (Liner)，於 1 小時後幾乎 100% 被切割而觀察到 20 個鹼基長度之 RNA 雙股。其後，隨著時間推移該產物之 RNA 雙股分解並消失。Db-23 於 1 小時後約 8% 被切割而生成 20 個鹼基長度之雙股。隨著莖之長度變長，可確認 Db-27，Db-31 於 1 小時後之切割速度分別增速 10%，20%。18 個小時後，Db-19 之原料剩下約 75%，相對於此，Db-31 之原料完全消失。由此可明確莖之長度較短，則其對酶較穩定。

實施例 3

啞鈴型 RNA 之 RNA 干擾效應

藉由螢火蟲螢光素酶報告基因 pGL3 之表現阻礙實驗，來評價上述啞鈴型 RNA (Db-19、Db-23、Db-27、Db-31) 之 RNA 干擾效應。

於含有 10% FCS 之 DMEM (GIBCO 公司) 培養基中，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 之條件下，培養 NIH 3T3 細胞 (RIKEN CELL

BANK)，於96孔培養盤中，每孔分注100 μl ，以使達到 1.6×10^4 細胞/孔。進而於37°C、5% CO_2 之條件下培養39小時，於約70%融合之狀態下，使用轉染試劑之GeneSilencer (Genlantis公司)，並根據轉染試劑所附之操作說明，對2種質體載體(pGL3-對照，pRL-TK(內部標準用)，皆為Promega公司生產)與各種RNA進行轉染。轉染時之濃度條件如下所示。

0.2 μg 之pGL3-對照/0.02 μg 之pRL-TK/25 nM之RNA(最終量100 μl)

GeneSilencer	1 μl
DMEM培養基	25 μl
siRNA稀釋液	2.5 μl
DMEM培養基	15 μl
RNA (5 pmol/ μl)	0.5 μl
pGL3-對照(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.2 μl
pRL-TK (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.2 μl
	44.4 μl

轉染後，於37°C、5% CO_2 之條件下培養4小時，將含有20%血清之DMEM培養基100 μl 添加至各個孔中。於37°C下進一步培養20小時後，使用雙螢光素酶報告檢測系統(Dual-luciferase Reporter Assay System)(Promega公司)，根據所附之操作說明使細胞可溶化，而定量螢光素酶表現量(條件：試劑量為30 μl ，延遲時間為2秒鐘，讀取時間為10秒鐘。機器為Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter)，作為比較，於僅為緩衝液(對照)之條件下同樣地進行評價。至於螢火蟲螢光素酶之發光強度，係根據作

為內部標準之海腎螢光素酶之發光強度進行校正。其結果示於圖5。24小時後，啞鈴型RNA中，Db-23之活性最高，阻礙效果顯示至0.24。根據該結果，將最合適之雙股長度設為23個鹼基。

實施例4

RNA干擾效應之持續性

就Db-23與siRNA-1之RNA干擾效應之持續性進行比較。

於含有10%小牛血清(FCS、Invitro/Gibco公司)之杜貝可氏改良伊格爾氏培養基(Dulbeco's modified Eagle's medium, DMEM, Gibco公司)中，於5% CO₂加濕室中培養NIH 3T3細胞。於約70%融合之狀態之轉染的40個小時前，於96孔培養盤中，每孔分注細胞100 μ l，以使達到 1.6×10^4 細胞/孔。使用GeneSilencer(基因治療系統(Gene Therapy Systems))，並根據NIH 3T3細胞之製造者所作的說明對報告質體與RNA進行轉染。與實施例3相比，於孔中使用100 μ l之用轉染試劑稀釋10倍而得的16 ng/ml之pGL3-對照(Promega公司)、1.6 ng/ml之pRL-TK (Promega公司)以及25 nM之RNA。培養4小時後，添加100 μ l之含有20% FCS之DMEM。進而培養3日以上，隨時交換培養基。使用雙螢光素酶報告檢測系統(Promega公司)，並根據Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer公司)所附之說明書，分別於24個小時、72個小時、120個小時後監測螢光素酶之表現(圖6)。將不含有RNA者作為對照。

至於螢光素酶之活性，於24小時後Db-23與siRNA-1顯示出幾乎相同之活性，於120小時後，Db-23顯示出更高的基因表現抑制作用。由此顯示啞鈴型RNA之緩釋作用及長期活性效果。

實施例5

人類血清中之啞鈴型RNA之穩定性

就Db-23與siRNA於人類血清中之穩定性進行比較。

於退火緩衝液(100 mM之醋酸鉀、30 mM之HEPES-KOH (pH 7.4)、2 mM之醋酸鎂)中，添加退火前之dsRNA (siRNA-1、20 μ M)或啞鈴型RNA (Db-23、20 μ M)，將所得之溶液4 μ l與32 μ l之PBS、以及正常人類血清(Chemicon International公司)4 μ l混合，並於37°C下培養。於0.5、1、1.5、3、8以及20個小時後採集等分試樣5 μ l，用15%之未變性PAGE，並以SYBR Green I染色，使用Molecular Imager FX (BioRad公司)進行分析。

其結果，siRNA於3小時後分解至50%，相對於此，Db-23依然存在80%以上，即便於8小時後亦存在70%以上。因此，可期待Db-23於生物體內具有高穩定性。

產業上之可利用性

根據本發明，可高效率地製作穩定性，持續性以及緩釋性優異之啞鈴型合成RNA。

特別是用於RNA干擾法之啞鈴型RNA，藉由環化雙股RNA而製作，並且兩端閉合成環狀，因此RNA末端消失，於細胞內，除Dicer酶等特異性酶以外，難以成為分解酶

外切核酸酶(RNase)等的基質，因此難以藉由酶分解，從而於細胞內之穩定性飛躍增長。因此，無須使用用以提高穩定性之非天然型核酸。

又，啞鈴型RNA於細胞內可被生物體內Dicer酶等特異性識別，並切割兩側之環部而成為天然型RNA雙股(圖1)，因此可保持與雙股RNA相同之活性，又，與由先前之雙股RNA而產生之RNA干擾作用相比，亦具有持續性，緩釋性之效果。

本發明之啞鈴型RNA與先前之雙股RNA相比，於人類血清中較穩定，且可用作可應用於生物體之核酸分子。

本說明書所引用之全部的出版物、專利以及專利申請案直接作為參考列入本說明書。

【圖式簡單說明】

圖1係模式性表示本發明之啞鈴型RNA。

圖2係表示RNA之結構以及各種RNA之電泳圖。

圖3係表示siRNA以及啞鈴型RNA之結構。

圖4係表示藉由Dicer酶切割之啞鈴型RNA以及雙股RNA(Liner)之電泳圖。

圖5係表示轉染24小時後之各啞鈴型RNA之干擾效應。

圖6係表示啞鈴型RNA之持續性RNA干擾效應。

圖7係表示啞鈴型RNA於人類血清中之穩定性。

序列表

<110> 獨立行政法人理化學研究所
日商大塚製藥股份有限公司
日商林化成股份有限公司

<120> 單股環狀RNA及其製造方法

<130> PH-3542PCT

<140> 097117329

<141> 2008-05-09

<150> 2007-125045

<151> 2007-05-09

<160> 13

<170> PatentIn第3.4版

<210> 1

<211> 28

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 1

gagacuuacg cugaguacuu cgauucaa

28

<210> 2

<211> 28

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 2

gagaucgaag uacucagcgu aaguucaa

28

<210> 3

<211> 56
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 3
gagacuuacg cugaguacuu cgauucaaga gaucgaagua cucagcguaa guucaa 56

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 4
gugcgcugcu ggugccaacu u 21

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 5
guuggcacca gcagcgcacu u 21

<210> 6
<211> 28
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 6

gagagugcgc ugcuggugcc aacuucaa

28

<210> 7

<211> 28

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 7

gagaguuggc accagcagcg cacuucaa

28

<210> 8

<211> 32

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 8

gagaagugcg cugcuggugc caaccuuuc aa

32

<210> 9

<211> 32

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 9

gagaaggug ggcaccagca gcgcacuuuc aa

32

<210> 10

<211> 36
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 10
gagaaaagug cgcugcuggu gccaaccua uuucua

36

<210> 11
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 11
gagaauaggg uuggcaccag cagcgcacuu uuucua

36

<210> 12
<211> 40
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 12
gagaucaaag ugcgcugcug gugccaacc uuucuucaa

40

<210> 13
<211> 40
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 13

gagagaauag gguuggcacc agcagcgcac uuugauuca

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種具有持續性或緩釋性RNA干擾作用之單股環狀RNA，其特徵在於：含有義股序列、與該義股序列互補之反義股序列、於該義股與該反義股之間結合二者之相同或不同的2個環序列，且該義股與該反義股配對而形成莖。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種具有持續性或緩釋性RNA干擾作用之單股環狀RNA，其特徵在於：含有義股序列、與該義股序列互補之反義股序列、於該義股與該反義股之間結合二者之相同或不同的2個環序列，且該義股與該反義股配對而形成莖。
2. 如請求項1之單股環狀RNA，其中將對照細胞中之標靶RNA之表現設為1時，導入至真核細胞24小時後之標靶RNA之表現顯示為0.4以下。
3. 如請求項1或2之單股環狀RNA，其係於人類血清中經過8小時之時、保持70%以上。
4. 一種如請求項1至3中任一項之單股環狀RNA之製造方法，其包括：分別合成在5'末端以及3'末端具有不形成互補股之鹼基序列的義股以及反義股，義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之5'末端的鹼基、與反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之3'末端的鹼基，以及義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之3'末端的鹼基、與反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之5'末端的鹼基，藉由連接酶同時連接；

此時，義股於5'末端所具有的不形成互補股之鹼基序列、與反義股於3'末端所具有的不形成互補股之鹼基序列相互結合而形成環，義股於3'末端所具有的不形成互補股之鹼基序列、與反義股於5'末端所具有的不形成互補股之鹼基序列相互結合而形成環，以及義股與反義股

配對而形成莖。

5. 如請求項4之製造方法，其中進而包括：將義股所具有的不形成互補股之鹼基序列、以及反義股所具有的不形成互補股之鹼基序列之5'末端進行磷酸化。
6. 如請求項4或5之製造方法，其中上述環之序列相互相同或不同。
7. 如請求項4至6中任一項之製造方法，其中上述環之長度為2~20個鹼基。
8. 如請求項4至7中任一項之製造方法，其中上述莖之長度為19~31個鹼基。
9. 一種於體外抑制編碼該蛋白質之基因的表現之方法，其包括：將如請求項1~3中任一項之單股環狀RNA導入至來自於人類之細胞後，使標靶RNA失去功能而持續地阻礙其轉譯為蛋白質。
10. 一種抑制編碼該蛋白質之基因的表現之方法，其包括：將如請求項1~3中任一項之單股環狀RNA導入至非人類動物、植物或該等之細胞後，使標靶RNA失去功能而持續地阻礙其轉譯為蛋白質。
11. 一種醫藥組合物，其含有如請求項1至3中任一項之單股環狀RNA作為有效成分。

十一、圖式：

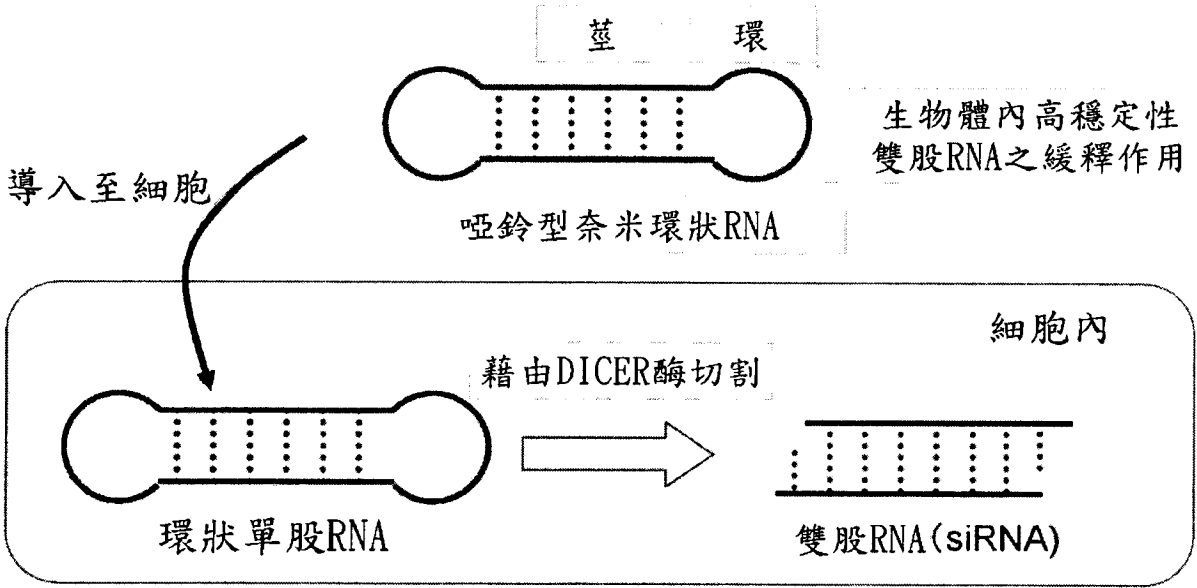
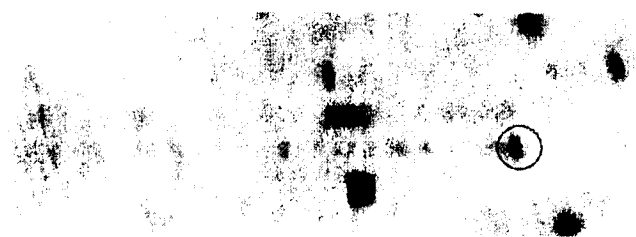


圖1

區帶 1 2 3 4 5 6



56個鹼基

5'-p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U A
 3'- AACU U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A G A C A

28個鹼基 (上：義股，下：反義股)

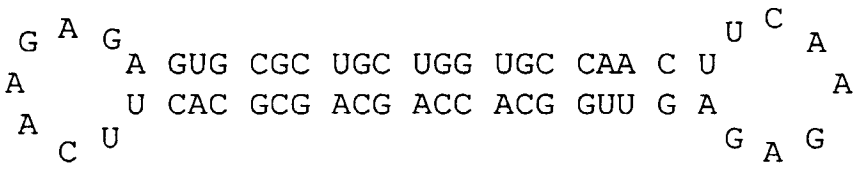
5'-p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U UCAA -3'
 3'- AACU U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A GAG -p- 5'

圖2

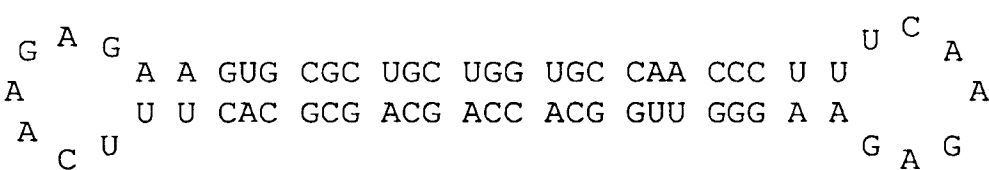
siRNA-1

5' - GUG CGC UGC UGG UGC CAA CUU
UU CAC GCG ACG ACC ACG GUU G -5'

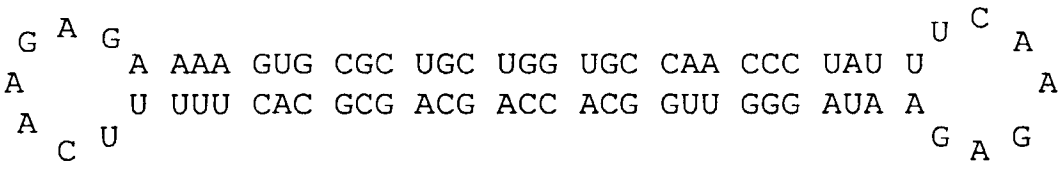
Db-19



Db-23



Db-27



Db-31

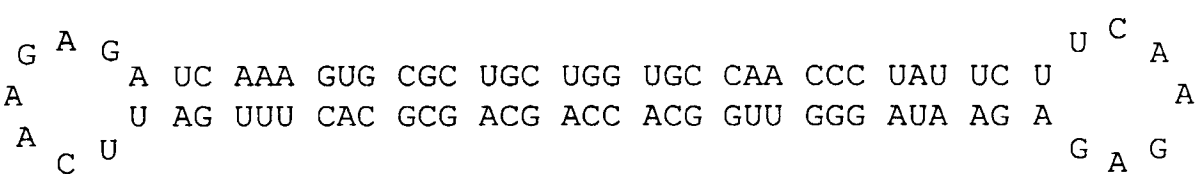


圖3

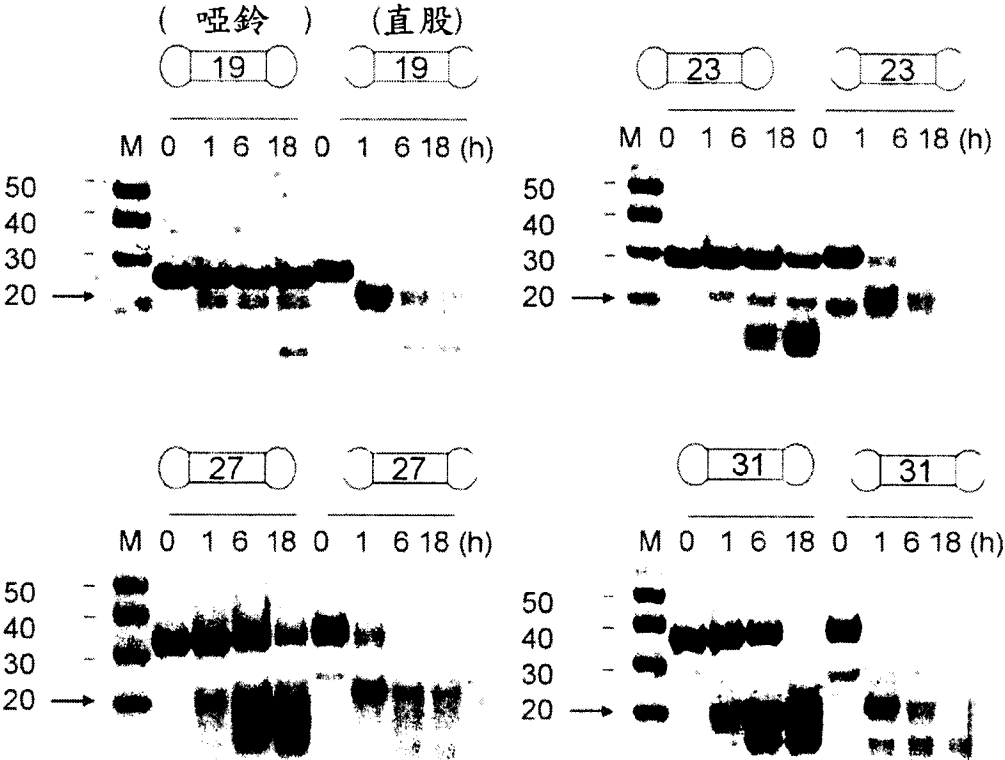


圖4

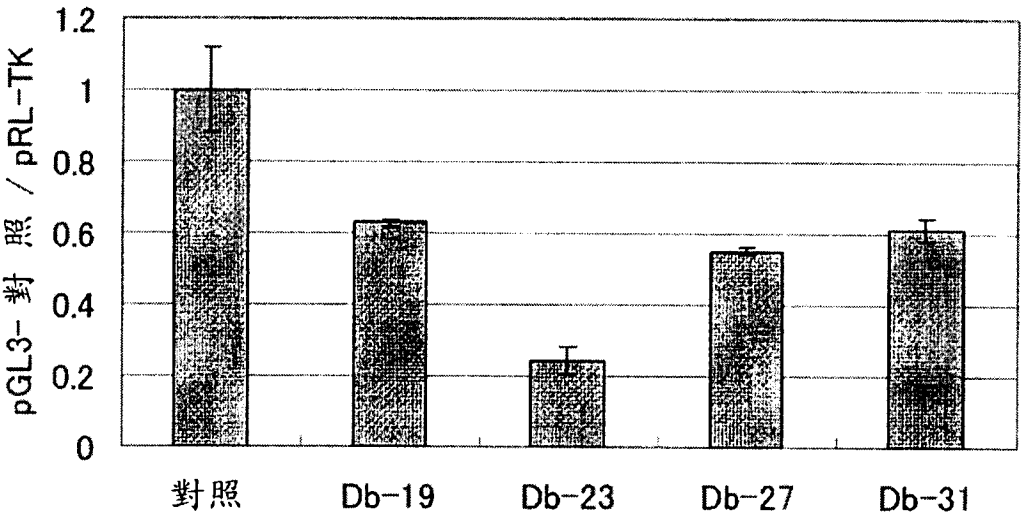


圖5

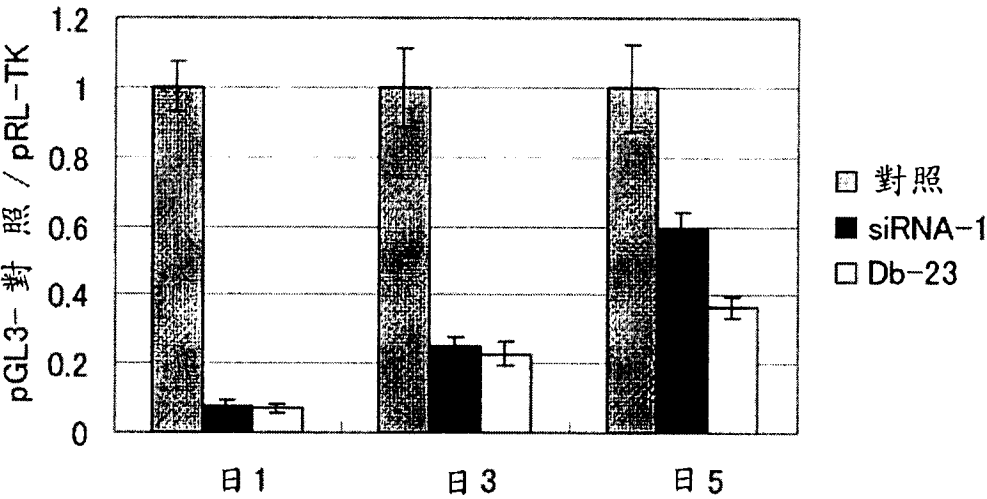


圖6

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)