

(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2010-537639

(P2010-537639A)

(43) 公表日 平成22年12月9日 (2010.12.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/113 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A G	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
<b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/12	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-523120 (P2010-523120)	(71) 出願人	510055334
(86) (22) 出願日	平成20年8月27日 (2008.8.27)		ボストン バイオメディカル, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月23日 (2010.4.23)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02062, ノーウッド, プロビデンス
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/074528		ハイウェイ 333
(87) 国際公開番号	W02009/029688	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成21年3月5日 (2009.3.5)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/968,257	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成19年8月27日 (2007.8.27)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/029,753		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成20年2月19日 (2008.2.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/038,954		
(32) 優先日	平成20年3月24日 (2008.3.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非対称性干渉RNAの組成物およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、配列特異的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能な、非対称性二重鎖RNA分子を提供する。該RNA分子は、第1鎖および第2鎖を含む。該第1鎖は該第2鎖よりも長い。該RNA分子は、該第1鎖および該第2鎖により形成される二本鎖領域と、5'突出、3'突出、および平滑末端からなる群から独立に選択される2つの末端とを含む。本発明のRNA分子は、研究用ツールおよび/または治療薬として用いることができる。

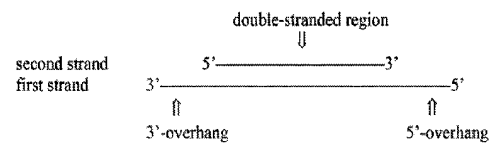


Figure 1A

RÉGION DOUBLE BRIN  
SECOND BRIN  
PREMIER BRIN  
DÉBORDANT EN 3'  
DÉBORDANT EN 5'

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

18～23ヌクレオチドの長さを有する第1鎖と12～17ヌクレオチドの長さを有する第2鎖とを含み、

前記第2鎖が前記第1鎖と実質的に相補的であり、前記第1鎖と二本鎖領域を形成し、前記第1鎖が1～9ヌクレオチドの3'突出と0～8ヌクレオチドの5'突出とを有し、

真核生物細胞内における選択的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能な二重鎖RNA分子。

**【請求項 2】**

前記第1鎖が、標的mRNA配列と少なくとも70%相補的な配列を含む、請求項1に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 3】**

前記5'突出の少なくとも1つのヌクレオチドが、A、U、およびdTからなる群から選択される、請求項1に記載のRNA分子。

**【請求項 4】**

前記二本鎖領域のGC含量が30%～70%である、請求項1に記載のRNA分子。

**【請求項 5】**

前記第1鎖が19～23ヌクレオチドの長さを有する、請求項1に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 6】**

前記第1鎖が21ヌクレオチドの長さを有する、請求項1に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 7】**

前記第2鎖が14～16ヌクレオチドの長さを有する、請求項6に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 8】**

前記第2鎖が15ヌクレオチドの長さを有する、請求項6に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 9】**

前記第1鎖が2～4ヌクレオチドの3'突出を有する、請求項8に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 10】**

前記第1鎖が3ヌクレオチドの3'突出を有する、請求項8に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 11】**

少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体を含む、請求項1に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 12】**

前記少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体が、糖修飾リボヌクレオチド、骨格修飾リボヌクレオチド、および/または塩基修飾リボヌクレオチドである、請求項11に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 13】**

前記骨格修飾リボヌクレオチドが、別のリボヌクレオチドとのホスホジエステル結合において修飾を有する、請求項12に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 14】**

前記ホスホジエステル結合が、少なくとも1つの窒素のヘテロ原子または硫黄のヘテロ原子を含むように修飾される、請求項13に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 15】**

前記少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体が、非天然塩基または修飾塩基である、請求項11に記載の二重鎖RNA分子。

**【請求項 16】**

前記少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体が、イノシンまたはトリチル化塩基を含む、請求項11に記載の二重鎖RNA分子。

【請求項17】

前記ヌクレオチド類似体が糖修飾リボヌクレオチドであり、その2'-OH基がH、OR、R、ハロ、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、またはCNから選択される基により置換され、各Rが独立にC1～C6のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、ハロがF、Cl、Br、またはIである、請求項11に記載の二重鎖RNA分子。

【請求項18】

前記ヌクレオチド類似体が、ホスホチオエート基を含有する骨格修飾リボヌクレオチドである、請求項11に記載の二重鎖RNA分子。

10

【請求項19】

前記第1鎖が、少なくとも1つのデオキシヌクレオチドを含む、請求項11に記載の二重鎖RNA分子。

【請求項20】

前記少なくとも1つのデオキシヌクレオチドが、3'突出、5'突出、および二本鎖領域からなる群から選択される1つまたは複数の領域内にある、請求項19に記載の二重鎖RNA分子。

【請求項21】

前記第2鎖が、少なくとも1つのデオキシヌクレオチドを含む、請求項11に記載の二重鎖RNA分子。

20

【請求項22】

前記真核生物細胞が、哺乳動物細胞または鳥類細胞である、請求項1に記載のRNA分子。

【請求項23】

細胞または生物における遺伝子発現を調節する方法であって、

選択的な遺伝子サイレンシングを行うことができる条件下において、前記細胞または前記生物を請求項1に記載の二重鎖RNA分子と接触させるステップと、

前記二本鎖RNAに実質的に対応する配列部分を有する標的遺伝子、核酸に対して前記二重鎖RNA分子により実施される選択的な遺伝子サイレンシングを媒介するステップとを含む方法。

30

【請求項24】

前記接触させるステップが、選択的な遺伝子サイレンシングを行うことができる培養物中または生物内の標的細胞へと前記二重鎖RNA分子を導入するステップを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記導入するステップが、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、感染、注射、経口投与、吸入、局所投与、または局所(regional)投与からなる群から選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記導入するステップが、医薬担体、正電荷担体、リボソーム、タンパク質担体、ポリマー、ナノ粒子、ナノエマルジョン、脂質、およびリポイドからなる群から選択される、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤の使用を含む、請求項24に記載の方法。

40

【請求項27】

細胞または生物における遺伝子の機能または有用性を決定するための、請求項23に記載の方法の使用。

【請求項28】

疾患または望ましくない状態を治療または予防するための、請求項23に記載の方法の使用。

【請求項29】

50

前記標的遺伝子が、哺乳動物における疾患、病理学的状態、または望ましくない状態と関連する、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 3 0】

前記標的遺伝子が病原性微生物の遺伝子である、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 3 1】

前記標的遺伝子がウイルス遺伝子である、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 3 2】

前記標的遺伝子が腫瘍関連遺伝子である、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 3 3】

前記標的遺伝子が、自己免疫疾患、炎症性疾患、変性疾患、感染性疾患、増殖性疾患、代謝性疾患、免疫媒介性障害、アレルギー性疾患、皮膚疾患、悪性疾患、消化管障害、呼吸器障害、心血管障害、腎障害、リウマチ障害、神経障害、内分泌障害、および老化からなる群から選択される疾患と関連する遺伝子である、請求項 2 3 に記載の使用。

10

【請求項 3 4】

請求項 1 に記載の二重鎖 RNA 分子を含む試薬。

【請求項 3 5】

1 8 ~ 2 3 ヌクレオチドの長さを有する第 1 の RNA 鎖と 1 2 ~ 1 7 ヌクレオチドの長さを有する第 2 の RNA 鎖とを含み、

前記第 2 鎖が前記第 1 鎖と実質的に相補的であり、前記第 1 鎖と二重鎖 RNA 分子を形成することが可能であり、

20

前記二重鎖 RNA 分子が 1 ~ 9 ヌクレオチドの 3' 突出と 0 ~ 8 ヌクレオチドの 5' 突出とを有し、

前記二重鎖 RNA 分子が真核生物細胞内における配列特異的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能なキット。

【請求項 3 6】

請求項 1 に記載の二重鎖 RNA 分子を調製する方法であって、

前記第 1 鎖および前記第 2 鎖を合成するステップと、

前記二重鎖 RNA 分子が形成され、これにより、配列特異的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能となる条件下で、その合成された鎖を組み合わせるステップとを含む方法。

30

【請求項 3 7】

前記合成するステップの間、前記合成するステップの後から前記組み合わせるステップの前において、または前記組み合わせるステップの後において、前記二重鎖 RNA 分子内に少なくとも 1 種の修飾ヌクレオチドまたはその類似体を導入するステップをさらに含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記 RNA 鎖が、化学合成されるか、または生物学的に合成される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

少なくとも 1 つの発現制御配列に作動可能に連結された請求項 1 に記載の二重鎖 RNA 分子をコードする 1 つまたは複数の核酸を含む発現ベクター。

40

【請求項 4 0】

第 1 の発現制御配列に作動可能に連結された、前記第 1 鎖をコードする第 1 の核酸と、第 2 の発現制御配列に作動可能に連結された、前記第 2 鎖をコードする第 2 の核酸とを含む、請求項 3 9 に記載の発現ベクター。

【請求項 4 1】

請求項 3 9 に記載の発現ベクターは、ウイルスの発現ベクター、真核生物の発現ベクター、または細菌の発現ベクターである。

【請求項 4 2】

請求項 3 9 に記載のベクターを含む細胞。

50

## 【請求項 4 3】

請求項 1 に記載の二重鎖 R N A 分子を含む細胞。

## 【請求項 4 4】

哺乳動物の細胞、鳥類の細胞、または細菌の細胞である、請求項 4 3 に記載の細胞。

## 【請求項 4 5】

第 1 鎖および第 2 鎖を含み、

前記第 1 鎖が前記第 2 鎖よりも長く、

前記第 2 鎖が前記第 1 鎖と実質的に相補的であり、前記第 1 鎖と二本鎖領域を形成し、真核生物細胞内における選択的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能である、二重鎖 R N A 分子。

10

## 【請求項 4 6】

前記二重鎖 R N A 分子の 2 つの末端が、1 ~ 10ヌクレオチドの 3' 突出、0 ~ 10ヌクレオチドの 5' 突出、および平滑末端からなる群から独立に選択される、請求項 4 5 に記載の二重鎖 R N A 分子。

## 【請求項 4 7】

前記第 1 鎖が標的 m R N A 配列と実質的に相補的である、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

## 【請求項 4 8】

前記第 1 鎖が、1 ~ 8ヌクレオチドの 3' 突出と 1 ~ 8ヌクレオチドの 5' 突出とを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

20

## 【請求項 4 9】

前記第 1 鎖が、1 ~ 10ヌクレオチドの 3' 突出と平滑末端とを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

## 【請求項 5 0】

前記第 1 鎖が、1 ~ 10ヌクレオチドの 5' 突出と平滑末端とを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

## 【請求項 5 1】

前記 R N A 二重鎖が、1 ~ 8ヌクレオチドの 2 つの 5' 突出を有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

## 【請求項 5 2】

前記 R N A 二重鎖が、1 ~ 10ヌクレオチドの 2 つの 3' 突出を有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

30

## 【請求項 5 3】

前記第 1 鎖が 12 ~ 100ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

## 【請求項 5 4】

前記第 1 鎖が 12 ~ 30ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

## 【請求項 5 5】

前記第 1 鎖が 18 ~ 23ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

40

## 【請求項 5 6】

前記第 1 鎖が 19 ~ 25ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

## 【請求項 5 7】

前記第 1 鎖が 21ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

## 【請求項 5 8】

前記第 2 鎖が 5 ~ 30ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

## 【請求項 5 9】

前記第 2 鎖が 12 ~ 22ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子

50

。

【請求項 6 0】

前記第 2 鎖が 1 2 ~ 1 7 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子

。

【請求項 6 1】

前記第 2 鎖が 1 5 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

【請求項 6 2】

前記二本鎖領域が 2 7 b p である場合、前記 R N A 分子の両末端における突出が独立に 3 ' 突出または 5 ' 突出であるとの条件つきで、前記第 1 鎖が 1 2 ~ 3 0 ヌクレオチドの長さを有し、前記第 2 鎖が 1 0 ~ 2 9 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

10

【請求項 6 3】

前記第 1 鎖が 1 8 ~ 2 3 ヌクレオチドの長さを有し、前記第 2 鎖が 1 2 ~ 1 7 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

【請求項 6 4】

前記第 1 鎖が 1 9 ~ 2 5 ヌクレオチドの長さを有し、前記第 2 鎖が 1 2 ~ 1 7 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

【請求項 6 5】

前記第 1 鎖が

【化 4】

20

5'-UUCGAAGUAUUCGCGUACGU

5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGUG または

5'-CGAAGUAUUCGCGUACGUGA

であり、

前記第 2 鎖が最長で 1 7 ヌクレオチドの長さを有するか、または前記第 1 鎖との少なくとも 1 つのミスマッチを含有するか、または少なくとも 1 つの修飾を含有するとの条件つきで、

前記第 1 鎖が 1 9 ~ 2 5 ヌクレオチドの長さを有し、前記第 2 鎖が 1 8 ~ 2 4 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

30

【請求項 6 6】

前記第 1 鎖が 2 1 ヌクレオチドの長さを有し、前記第 2 鎖が 1 2 ~ 1 7 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

【請求項 6 7】

前記第 1 鎖が 2 1 ヌクレオチドの長さを有し、前記第 2 鎖が 1 4 ~ 1 6 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

【請求項 6 8】

前記第 1 鎖が前記第 2 鎖よりも 1 ~ 1 0 ヌクレオチド長い、請求項 4 5 に記載の R N A 分子。

【請求項 6 9】

40

前記 3 ' 突出が 2 ~ 6 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 6 に記載の R N A 分子。

【請求項 7 0】

前記 5 ' 突出が 0 ~ 5 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 4 6 に記載の R N A 分子。

【請求項 7 1】

前記遺伝子サイレンシングが、R N A 干渉、翻訳の調節、および D N A のエピジェネティック調節の 1 もしくは 2 つ、または全てを含む、請求項 4 5 に記載の二重鎖 R N A 分子

。

【請求項 7 2】

前記第 1 鎖および前記第 2 鎖の少なくとも 1 つにおいてニックをさらに含む、請求項 4 5 に記載の二重鎖 R N A 分子。

50

## 【請求項 7 3】

前記二本鎖領域が 1 つまたは複数のヌクレオチドのギャップを含む、請求項 4 5 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 7 4】

5' 突出の少なくとも 1 つのヌクレオチドが、前記標的 mRNA 配列と相補的ではない、請求項 4 7 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 7 5】

5' 突出の少なくとも 1 つのヌクレオチドが、A、U、および d T からなる群から選択される、請求項 4 5 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 7 6】

ペプチド、抗体、ポリマー、脂質、オリゴヌクレオチド、コレステロール、およびアプタマーからなる群から選択される実体とコンジュゲートしている、請求項 4 5 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 7 7】

マッチしないかまたはミスマッチする少なくとも 1 つのヌクレオチドをさらに含む、請求項 4 5 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 7 8】

前記二本鎖領域の GC 含量が 20 ~ 70 % である、請求項 4 5 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 7 9】

3' 突出および / または 5' 突出が、分解に対して安定化される、請求項 4 5 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 8 0】

少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体を含む、請求項 4 5 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 8 1】

前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体が、糖修飾リボヌクレオチド、骨格修飾リボヌクレオチド、および / または塩基修飾リボヌクレオチドである、請求項 8 0 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 8 2】

前記骨格修飾リボヌクレオチドが、別のリボヌクレオチドとのホスホジエステル結合において修飾を有する、請求項 8 1 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 8 3】

前記ホスホジエステル結合が、少なくとも 1 つの窒素のヘテロ原子または硫黄のヘテロ原子を含むように修飾される、請求項 8 2 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 8 4】

前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体が、非天然塩基または修飾塩基を含む、請求項 8 0 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 8 5】

前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体が、イノシンまたはトリチル化塩基を含む、請求項 8 0 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 8 6】

前記ヌクレオチド類似体が糖修飾リボヌクレオチドであり、その 2' - OH 基が H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、または CN から選択される基により置換され、各 R が独立に C1 ~ C6 のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、ハロが F、Cl、Br、または I である、請求項 8 0 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 8 7】

前記ヌクレオチド類似体が、ホスホチオエート基を含む骨格修飾リボヌクレオチドである、請求項 8 0 に記載の二重鎖 RNA 分子。

## 【請求項 8 8】

前記第 1 鎖が少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドを含む、請求項 8 0 に記載の二重

10

20

30

40

50

鎖 R N A 分子。

【請求項 8 9】

前記少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドが、3' 突出、5' 突出、および前記第 1 鎖の 5' 端に近接する二本鎖領域からなる群から選択される 1 つまたは複数の領域内にある、請求項 8 8 に記載の二重鎖 R N A 分子。

【請求項 9 0】

前記第 2 鎖が少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドを含む、請求項 8 0 に記載の二重鎖 R N A 分子。

【請求項 9 1】

前記真核生物細胞が哺乳動物細胞または鳥類細胞である、請求項 4 5 に記載の二重鎖 R N A 分子。

10

【請求項 9 2】

前記二重鎖 R N A 分子が単離二重鎖 R N A 分子である、請求項 4 5 に記載の二重鎖 R N A 分子。

【請求項 9 3】

細胞または生物における遺伝子発現を調節する方法であって、  
選択的な遺伝子サイレンシングを行うことができる条件下において、前記細胞または前記生物を請求項 1 に記載の二重鎖 R N A 分子と接触させるステップと、  
前記二本鎖 R N A に実質的に対応する配列部分を有する標的遺伝子または核酸に対して前記二本鎖 R N A 分子により実施される選択的な遺伝子サイレンシングを媒介するステップとを含む方法。

20

【請求項 9 4】

前記接触させるステップが、選択的な遺伝子サイレンシングを行うことができる培養物中または生物内の標的細胞へと前記二重鎖 R N A 分子を導入するステップを含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記導入するステップが、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、感染、注射、経口投与、吸入、局所投与、および局所 ( r e g i o n a l ) 投与からなる群から選択される、請求項 9 4 に記載の方法。

30

【請求項 9 6】

前記導入するステップが、医薬担体、正電荷担体、リボソーム、タンパク質担体、ポリマー、ナノ粒子、ナノエマルジョン、脂質、およびリポイドからなる群から選択される、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤の使用を含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 7】

細胞または生物における遺伝子の発現を調節するための、請求項 9 3 に記載の方法の使用。

【請求項 9 8】

疾患または望ましくない状態を治療または予防するための、請求項 9 3 に記載の方法の使用。

40

【請求項 1 0 0】

前記標的遺伝子がヒトの疾患または動物の疾患と関連する遺伝子である、請求項 9 3 に記載の使用。

【請求項 1 0 1】

前記標的遺伝子が病原性微生物の遺伝子である、請求項 9 3 に記載の使用。

【請求項 1 0 2】

前記標的遺伝子がウイルス遺伝子である、請求項 9 3 に記載の使用。

【請求項 1 0 3】

前記標的遺伝子が腫瘍関連遺伝子である、請求項 9 3 に記載の使用。

50



## 【請求項 104】

前記標的遺伝子が、自己免疫疾患、炎症性疾患、変性疾患、感染性疾患、増殖性疾患、代謝性疾患、免疫媒介性障害、アレルギー性疾患、皮膚疾患、悪性疾患、消化管障害、呼吸器障害、心血管障害、腎障害、リウマチ障害、神経障害、内分泌障害、および老化からなる群から選択される疾患と関連する遺伝子である、請求項 93 に記載の使用。

## 【請求項 105】

*in vitro* または *in vivo* における薬剤標的の研究のための、請求項 93 に記載の方法の使用。

## 【請求項 106】

請求項 1 に記載の二重鎖 RNA 分子を含む試薬。

10

## 【請求項 107】

第 1 の RNA 鎖および第 2 の RNA 鎖を含み、

前記第 1 鎖が前記第 2 鎖よりも長く、

前記第 2 鎖が前記第 1 鎖と実質的に相補的であり、前記第 1 鎖と二重鎖 RNA 分子を形成することが可能であり、

前記二重鎖 RNA 分子が真核生物細胞内における配列特異的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能なキット。

## 【請求項 108】

請求項 1 に記載の二重鎖 RNA 分子を調製する方法であって、

前記第 1 鎖および前記第 2 鎖を合成するステップと、

20

前記二重鎖 RNA 分子が形成され、これにより、配列特異的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能となる条件下で、その合成された鎖を組み合わせるステップとを含む方法。

## 【請求項 109】

前記合成するステップの間、前記合成するステップの後から前記組み合わせるステップの前において、または前記組み合わせるステップの後において、前記二重鎖 RNA 分子内に少なくとも 1 種の修飾ヌクレオチドまたはその類似体を導入するステップをさらに含む、請求項 108 に記載の方法。

## 【請求項 110】

前記 RNA 鎖が化学的に合成されるか、または生物学的に合成される、請求項 108 に記載の方法。

30

## 【請求項 111】

前記第 1 鎖および前記第 2 鎖が、個々にまたは同時に合成される、請求項 108 に記載の方法。

## 【請求項 112】

活性作用物質としての、少なくとも 1 種の請求項 1 に記載の二重鎖 RNA 分子と、医薬担体、正電荷担体、リポソーム、タンパク質担体、ポリマー、ナノ粒子、コレステロール、脂質、およびリポイドからなる群から選択される 1 種または複数種の担体とを含む医薬組成物。

## 【請求項 113】

有効量の請求項 112 に記載の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む治療法。

40

## 【請求項 114】

前記医薬組成物が、静脈内投与、経口投与、皮下投与、筋肉内投与、吸入投与、局所投与、および局所 (regional) 投与からなる群から選択される経路を介して投与される、請求項 113 に記載の方法。

## 【請求項 115】

前記第 1 鎖が、発生遺伝子、癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、および酵素遺伝子、ならびに接着分子、サイクリンキナーゼ阻害剤、Wnt ファミリーメンバー、Pax ファミリーメンバー、ウイングドヘリックスファミリーメンバー、Hox ファミリーメンバー、サイト

50

カイン/リンホカインまたはその受容体、成長/分化因子またはその受容体、神経伝達物質またはその受容体、キナーゼ、シグナル伝達物質の遺伝子、ウイルス遺伝子、感染性疾患の遺伝子、ABL1、BCL1、BCL2、BCL6、CBFA2、CBL、CSF1R、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、ETS1、ETV6、FGR、FOS、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、およびYES、APC、BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NF1、NF2、RB1、TP53、WT1、ACPデサチュラーゼもしくはヒドロキシラーゼ、ADP-グルコースピロホリラーゼ、ATPアーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アミラーゼ、アミログルコシダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、シクロオキシゲナーゼ、デカルボキシラーゼ、デキストリナーゼ、DNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコースオキシダーゼ、GTPアーゼ、ヘリカーゼ、ヘミセルラーゼ、インテグラーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ラクターゼ、リパーゼ、リボキシゲナーゼ、リゾチーム、ペクチンエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、ホスホリラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテイナーゼもしくはペプチダーゼ (peptidase)、プラナーゼ、リコンビナーゼ、逆転写酵素、トポイソメラーゼ、キシラナーゼ、k-RAS、-カテニン、Rsk1、PCNA、p70S6K、サバイビン、mTOR、PTEN、Parp1、またはp21からなる群から選択される遺伝子の標的mRNA配列と実質的に相補的な配列を含む、請求項1に記載の二重鎖RNA分子。

10

20

【請求項116】

【表6-1】

aiNbs1	5'-AUGCUGUGUUAACUG UAGUACGACACAAUUGACGAA-5'
aiEF2	5'-CCUCUUAUGAUGUAU CCGGGAGAAUACUACAUUAA-5'

【表 6 - 2】

aiStat3-A	5'-AGCAAAGAAUCACAU CGGUCCGUUUCUAGUGUACAA-5'
aiStat3-B	5'-GAAUCUCAACUUCAG CGUCUUAGAGUUGAAGUCUAA-5'
aiPTEN	5'-UAAAGGUGAAGAUUU UCGAUUUCCACUUCUAUAUAA-5'
aip70S6K	5'-UGUUUGAUUUGGAUU GGCACAAACUAAACCUGAAAA-5'
aimTOR	5'-GAAUUGUCAAGGGAU CGUCUUAACAGUUCCCUAUAA-5'
aiRsk1	5'-AAUUGGAACACAGUU CCUUUAACCUUGUGUCAAAAA-5'
aiPCNA	5'-AGAUGCUGUUGUAAU ACCUCUACGACAACAUUAAAA-5'
aiParp1	5'-GCGAAGAAGAAAUCU CACCGCUUCUUCUUAGAUAA-5'
ai サバイピン	5'-AGGAGAUCAACAUUU dTdTUCCUCUAGUUGUAAAAGU-5'
aiNQO1	5'-GCAGACCUUGUGAU CGGCGUCUGGAACACUAUAAA-5'
aip21-A	5'-CCCGCUCUACAUCUU UCCGGGCGAGAUUGAAGAA-5'
aip21-B	5'-GGCGGUUGAAUGAGA GAUCCGCCAACUACUCUCAA-5'
aik-Ras	5'-GGAGCUGUUGGCGUA CAACCUCGACAACCGCAUCAA-5'
aiβ-カテニン-1	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-2	5'-GAUUAUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-4	5'-CUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-5	5'-AGCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-8	5'-UAGCUGAUUUGAUG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-9	5'-UGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-10	5'-GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-11	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAAA-5'
aiβ-カテニン-18	5'-GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-34	5'-GCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-35	5'-AGCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-36	5'-AGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'

10

20

30

40

【表 6 - 3】

aiβ-カテニン-37	5'-AGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-38	5'-UAGCUGAUUAUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-39	5'-GCUGAUUAUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-40	5'-AGCUGAUUAUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-42	5'-UAGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-43	5'-UAGCUGAUUAUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-44	5'-GUAGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-45	5'-GCUGAUUAUUGAAGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-46	5'-GCUGAUUAUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGUC-5'
aiβ-カテニン-47	5'-GCUGAUUAUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'
aiβ-カテニン-48	5'-GCUGAUUAUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-52	5'-gcUGAUUAUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-53	5'-GCUGAUUAUUGAUGGa CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-57	5'-gcUGAUUAUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-59	5'-GCUGAUUAUUGAUGGa catCGACUAUAACUACCUGAA-5' および
aiβ-カテニン-62	5'-UAGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'

10

20

30

40

50

【表中、A、U、G、およびCはヌクレオチドであり、a、t、g、およびcはデオキシヌクレオチドである。】

からなる群から選択される、二重鎖RNA分子。

【請求項117】

二本鎖領域を形成するアンチセンス鎖およびセンス鎖を有する第1の二重鎖RNA分子を修飾する方法であって、前記アンチセンス鎖が1～8ヌクレオチドの3'突出と0～8ヌクレオチドの5'突出とを有するように、前記センス鎖の長さを短くするステップと、第2の二重鎖RNA分子を形成するステップとを含み、

前記第1の二重鎖RNA分子の少なくとも1つの特性が改善される方法。

【請求項118】

前記第2の二重鎖RNA分子が形成される条件下で、前記アンチセンス鎖とその短くしたセンス鎖とを組み合わせるステップをさらに含む、請求項117に記載の方法。

【請求項119】

前記第1の二重鎖RNA分子がsiRNAであるか、またはdicer基質siRNAであるか、またはsiRNA前駆体である、請求項117に記載の方法。

【請求項120】

少なくとも1つの発現制御配列に作動可能に連結された請求項1に記載の二重鎖RNA分子をコードする1つまたは複数の核酸を含む発現ベクター。

【請求項121】

第1の発現制御配列に作動可能に連結された、前記第1鎖をコードする第1の核酸と、第2の発現制御配列に作動可能に連結された、前記第2鎖をコードする第2の核酸とを含む、請求項120に記載の発現ベクター。

## 【請求項 1 2 2】

請求項 1 2 0 に記載の発現ベクターは、ウイルスの発現ベクター、真核生物の発現ベクター、または細菌の発現ベクターである。

## 【請求項 1 2 3】

請求項 1 2 0 に記載の発現ベクターを含む細胞。

## 【請求項 1 2 4】

請求項 1 に記載の二重鎖 RNA 分子を含む細胞。

## 【請求項 1 2 5】

請求項 1 2 4 に記載の細胞は、哺乳動物の細胞、鳥類の細胞、または細菌の細胞である。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願への相互参照)

本願は、2007年8月27日に出願された米国仮特許出願第60/968,257号、2008年2月19日に出願された米国仮特許出願第61/029,753号、および2008年3月24日に出願された米国仮特許出願第61/038,954号の利益を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

## 【背景技術】

## 【0002】

低分子または短鎖の干渉RNA ( siRNA ) を用いる RNA i ( RNA 干渉 ) による遺伝子サイレンシングは、分子生物学の強力なツールとして出現し、治療目的に用いられる潜在力を保持している ( de Fougere 等、2007年 ; Kim および Rossi、2007年 ) 。

20

## 【0003】

理論的には、RNA i を用いて、任意の疾患遺伝子の特異的かつ強力にノックダウンまたはサイレンシングすることができる。疾患原因遺伝子が同定される場合、治療目的に対する RNA i の可能な適用は広範にわたり、遺伝疾患、エピジェネティック疾患、および感染性疾患を含む。

## 【0004】

しかし、顕著な送達の問題以外に、RNA i ベースの薬剤の開発は、siRNA の限られた効力、インターフェロン様反応およびセンス鎖を介するオフターゲット遺伝子のサイレンシングなど、siRNA の非特異的な効果、ならびに siRNA 合成の法外であるかまたは高額な経費といった難題に直面している。siRNA による遺伝子サイレンシングの効力は、哺乳動物細胞内の大半の遺伝子について、約50%以下に限定されている。これらの分子の製造は高価 ( アンチセンスのデオキシヌクレオチドの製造よりもはるかに高価 ) であり、不十分であり、化学修飾を必要とする。最後に、合成 siRNA の細胞外投与がインターフェロン様反応を誘発するという観察により、RNA i ベースの研究および RNA i ベースの治療薬開発に対する障壁がさらに重大なものとなっている。

30

## 【0005】

RNA i は、合成短鎖干渉RNA ( siRNA ) またはリボヌクレアーゼ III 様酵素である Dicer により後に siRNA へと切断される短鎖ヘアピン RNA ( shRNA ) をコードする遺伝子エレメントにより選択的に誘発される。遺伝子サイレンシングの生化学的機構は、未だ完全には理解されているわけではないが、マルチタンパク質 RNA 誘導サイレンシング複合体 ( RISC ) を伴うと考えられる。RISC は、アンチセンスの siRNA 鎖に結合し、これを巻き戻し、組み込み、次いで、完全に相補的な mRNA を認識し標的にしてこれを切断し、これにより、遺伝子発現を低下させる。強力な遺伝子サイレンシング ( 1 ~ 10 日間 ) は、RISC 複合体の触媒特性に起因する。RNA i の威力は、達成されうる絶妙な特異性から生じる。しかし、オフターゲットの RNA i 効果が生じることが知られている。別の主要な副作用は、siRNA によるインターフェロン様反

40

50

応の活性化であり、これは、*dsRNA* 依存性タンパク質キナーゼ (*PKR*) および *Toll* 様受容体 (*TLR*) により媒介される。*siRNA* がインターフェロン様反応を誘導する能力は、おもに、その長さにより決定される (同上)。

#### 【0006】

哺乳動物細胞における遺伝子サイレンシングの場合、当技術分野の教示によれば、哺乳動物細胞内において有効であり、細胞の生来の「抗ウイルス」反応を回避する *siRNA* 構造は、19 ~ 21ヌクレオチドの長さで両末端における3'突出とを有する、対称な二本鎖 *RNA* である (同上)。その分野では、この「最適な」構造でもなおインターフェロン応答を誘発し、*RNAi* ベースの研究および *RNAi* ベースの治療薬の開発に対して重大な難題を提起しうることがいまや十分に確立されている (*Sledz* ら、2003年)

10

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

より良好な効力および効能、迅速な作用の発現、より良好な持続性、およびより短い *RNA* 二重鎖の長さを有する新規の *siRNA* の設計により、非特異的なインターフェロン様反応を回避し、*RNAi* 治療薬の研究および医薬開発のための合成経費を軽減する、哺乳動物細胞における有効な *RNAi* への新たな手法を開発する必要性が存在する。

#### 【0008】

本明細書で引用される参考文献は、優先権が主張される本発明に対する先行技術として容認されるわけではない。

20

#### 【0009】

本発明は、哺乳動物細胞における強力な遺伝子サイレンシングを誘導することが可能であり、本明細書では非対称性干渉 *RNA* (*aiRNA*) と称する、新たなクラスの低分子二重鎖 *RNA* の驚くべき発見についての発明である。この新たなクラスの *RNAi* 誘導剤の特徴は、2本の *RNA* 鎖の長さの非対称性である。このような新たな構造設計は、遺伝子サイレンシングを実施するのに機能的に強力であるだけでなく、現在の技術水準で最新の *siRNA* を上回る複数の利点ももたらす。*aiRNA* は、現行の *siRNA* よりもはるかに短い長さの *RNA* 二重鎖構造を有することが可能であり、これにより、合成の経費が軽減され、長さに依存する非特異的なインターフェロン様反応の誘発が除去/軽減されるという利点がある。加えて、*aiRNA* 構造の非対称性により、センス鎖を介するオフターゲット効果が除去/軽減される。さらに、*aiRNA* は、遺伝子サイレンシングの誘導において、*siRNA* よりも有効であり、強力であり、発現が迅速であり、持続性である。*aiRNA* は、生物学研究、バイオテクノロジー産業および製薬産業における *R&D* 研究、ならびに *RNAi* ベースの治療を含む、現行の *siRNA* または *shRNA* が適用されているかまたは用いられることが意図されるすべての領域において用いることができる。

30

#### 【0010】

本発明は、二重鎖 *RNA* 分子を提供する。二重鎖 *RNA* 分子は、18 ~ 23ヌクレオチドの長さを有する第1鎖と12 ~ 17ヌクレオチドの長さを有する第2鎖とを含み、該第2鎖が該第1鎖と実質的に相補的であり、該第1鎖と二本鎖領域を形成し、該第1鎖が1 ~ 9ヌクレオチドの3'突出と0 ~ 8ヌクレオチドの5'突出とを有し、前記二重鎖 *RNA* 分子は、真核生物細胞内における選択的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能である。一実施形態において、該第1鎖は標的 *mRNA* 配列と実質的に相補的な配列を含む。さらなる実施形態において、該第1鎖は標的 *mRNA* 配列と少なくとも70%相補的な配列を含む。別の実施形態において、該真核生物細胞は、哺乳動物細胞または鳥類細胞である。

40

#### 【0011】

一実施形態において、該5'突出配列の少なくとも1つのヌクレオチドは、A、U、および dT からなる群から選択される。

50

## 【 0 0 1 2 】

一実施形態において、該二本鎖領域の G C 含量は 2 0 % ~ 7 0 % である。

## 【 0 0 1 3 】

一実施形態において、該第 1 鎖は 1 9 ~ 2 2 ヌクレオチドの長さを有する。

## 【 0 0 1 4 】

一実施形態において、該第 1 鎖は 2 1 ヌクレオチドの長さを有する。さらなる実施形態において、該第 2 鎖は 1 4 ~ 1 6 ヌクレオチドの長さを有する。

## 【 0 0 1 5 】

一実施形態において、該第 1 鎖は 2 1 ヌクレオチドの長さを有し、該第 2 鎖は 1 5 ヌクレオチドの長さを有する。さらなる実施形態において、該第 1 鎖は 2 ~ 4 ヌクレオチドの 3 ' 突出を有する。またさらなる実施形態において、該第 1 鎖は 3 ヌクレオチドの 3 ' 突出を有する。

## 【 0 0 1 6 】

一実施形態において、二重鎖 R N A 分子は、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体を含む。さらなる実施形態において、該少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体は、糖修飾リボヌクレオチド、骨格修飾リボヌクレオチド、および / または塩基修飾リボヌクレオチドである。またさらなる実施形態において、該骨格修飾リボヌクレオチドは、別のリボヌクレオチドとのホスホジエステル結合において修飾を有する。一実施形態において、該ホスホジエステル結合は、少なくとも 1 つの窒素のヘテロ原子または硫黄のヘテロ原子を含むように修飾される。別の実施形態において、該ヌクレオチド類似体は、ホスホチオエート基を含む骨格修飾リボヌクレオチドである。

## 【 0 0 1 7 】

一実施形態において、該少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体は、非天然塩基または修飾塩基である。別の実施形態において、該少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体は、イノシンまたはトリチル化塩基を含む。

## 【 0 0 1 8 】

さらなる実施形態において、該ヌクレオチド類似体は、2 ' - O H 基が H、O R、R、ハロ、S H、S R、N H<sub>2</sub>、N H R、N R<sub>2</sub>、または C N から選択される基により置換され、各 R が独立に C 1 ~ C 6 のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、ハロが F、C l、B r、または I である、糖修飾リボヌクレオチドである。

## 【 0 0 1 9 】

一実施形態において、該第 1 鎖は、少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドを含む。さらなる実施形態において、該少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドは、3 ' 突出、5 ' 突出、および二本鎖領域からなる群から選択される 1 つまたは複数の領域内にある。別の実施形態において、該第 2 鎖は、少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドを含む。

## 【 0 0 2 0 】

本発明はまた、細胞または生物における遺伝子発現を調節する方法であって、選択的な遺伝子サイレンシングを行うことができる条件下において、前記細胞または生物を請求項 1 に記載の二重鎖 R N A 分子と接触させるステップと、該二本鎖 R N A に実質的に対応する配列部分を有する標的の遺伝子または核酸に対して該二重鎖 R N A 分子により実施される選択的な遺伝子サイレンシングを媒介するステップとを含む方法も提供する。さらなる実施形態において、前記接触させるステップは、選択的な遺伝子サイレンシングを行うことができる培養物中または生物内の標的細胞へと前記二重鎖 R N A 分子を導入するステップを含む。またさらなる実施形態において、導入するステップは、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、感染、注射、経口投与、吸入、局所 ( t o p i c a l ) 投与、または局所 ( r e g i o n a l ) 投与からなる群から選択される。別の実施形態において、導入するステップは、医薬担体、正電荷担体、リボソーム、タンパク質担体、ポリマー、ナノ粒子、ナノエマルジョン、脂質、およびリポイドからなる群から選択される、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤の使用を含む。

## 【 0 0 2 1 】

一実施形態において、該調節する方法は、細胞または生物における遺伝子の機能または有用性を決定するのに用いられる。

【0022】

一実施形態において、該調節する方法は、疾患または望ましくない状態を治療または予防するのに用いられる。

【0023】

一実施形態において、該標的遺伝子は、哺乳動物における疾患、病理学的状態、または望ましくない状態と関連する。さらなる実施形態において、該標的遺伝子は病原性微生物の遺伝子である。またさらなる実施形態において、該標的遺伝子はウイルス遺伝子である。別の実施形態において、該標的遺伝子は腫瘍関連遺伝子である。さらに別の実施形態において、該標的遺伝子は、自己免疫疾患、炎症性疾患、変性疾患、感染性疾患、増殖性疾患、代謝性疾患、免疫媒介性障害、アレルギー性疾患、皮膚疾患、悪性疾患、消化管障害、呼吸器障害、心血管障害、腎障害、リウマチ障害、神経障害、内分泌障害、および老化からなる群から選択される疾患と関連する遺伝子である。

【0024】

本発明は、研究用試薬を提供する。該試薬は、二重鎖RNA分子を含む。

【0025】

本発明は、キットをさらに提供する。該キットは、18~23ヌクレオチドの長さを有する第1のRNA鎖と12~17ヌクレオチドの長さを有する第2のRNA鎖とを含み、該第2鎖が該第1鎖と実質的に相補的であり、該第1鎖と二重鎖RNA分子を形成することが可能であり、該二重鎖RNA分子が1~9ヌクレオチドの3'突出と0~8ヌクレオチドの5'突出とを有し、前記二重鎖RNA分子は、真核生物細胞内における配列特異的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能である。

【0026】

本発明はまた、二重鎖RNA分子を調製する方法も提供する。該方法は、該第1鎖および該第2鎖を合成するステップと、該二重鎖RNA分子が形成され、これにより、配列特異的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能となる条件下で、合成された鎖を組み合わせるステップとを含む。一実施形態において、請求項35に記載の方法は、合成するステップの間、合成するステップの後から組み合わせるステップの前において、または組み合わせるステップの後において、該二重鎖RNA分子内に少なくとも1種の修飾ヌクレオチドまたはその類似体を導入するステップをさらに含む。別の実施形態において、該RNA鎖は、化学合成されるか、または生物学的に合成される。

【0027】

本発明は、発現ベクターを提供する。該ベクターは、少なくとも1つの発現制御配列に作動可能に連結された二重鎖RNA分子をコードする1つまたは複数の核酸を含む。一実施形態において、ベクターは、第1の発現制御配列に作動可能に連結された、第1鎖をコードする第1の核酸と、第2の発現制御配列に作動可能に連結された、第2鎖をコードする第2の核酸とを含む。別の実施形態において、ベクターは、ウイルスの発現ベクター、真核生物の発現ベクター、または細菌の発現ベクターである。

【0028】

本発明はまた、細胞も提供する。一実施形態において、細胞はベクターを含む。別の実施形態において、細胞は二重鎖RNA分子を含む。さらなる実施形態において、細胞は、哺乳動物、鳥類、または細菌の細胞である。

【0029】

本発明は、二重鎖RNA分子を提供する。該二重鎖RNA分子は、第1鎖および第2鎖を含み、該第1鎖が該第2鎖よりも長く、該第2鎖が該第1鎖と実質的に相補的であり、該第1鎖と二本鎖領域を形成し、前記二重鎖RNA分子は、真核生物細胞内における選択的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能である。一実施形態において、該二重鎖RNA分子の該2つの末端は、1~10ヌクレオチドの3'突出、0~10ヌクレオチドの5'突出、および平滑末端からなる群から独立に選択される。別の実施形態において、



該第 1 鎖は標的 m R N A 配列と実質的に相補的である。代替的な実施形態において、該第 2 鎖は標的 m R N A 配列と実質的に相補的である。一実施形態において、該真核生物細胞は、哺乳動物細胞または鳥類細胞である。別の実施形態において、該二重鎖 R N A 分子は、単離二重鎖 R N A 分子である。

【 0 0 3 0 】

一実施形態において、該第 1 鎖は、1 ~ 8 ヌクレオチドの 3 ' 突出と 1 ~ 8 ヌクレオチドの 5 ' 突出とを有する。

【 0 0 3 1 】

別の実施形態において、該第 1 鎖は、1 ~ 1 0 ヌクレオチドの 3 ' 突出と平滑末端とを有する。

【 0 0 3 2 】

さらに別の実施形態において、該第 1 鎖は、1 ~ 1 0 ヌクレオチドの 5 ' 突出と平滑末端とを有する。

【 0 0 3 3 】

代替的な実施形態において、該 R N A 二重鎖は、1 ~ 8 ヌクレオチドの 2 つの 5 ' 突出、または 1 ~ 1 0 ヌクレオチドの 2 つの 3 ' 突出を有する。

【 0 0 3 4 】

一実施形態において、該第 1 鎖は、1 2 ~ 1 0 0 ヌクレオチド、1 2 ~ 3 0 ヌクレオチド、1 8 ~ 2 3 ヌクレオチド、1 9 ~ 2 5 ヌクレオチドの長さを有する。さらなる実施形態において、該第 1 鎖は、2 1 ヌクレオチドの長さを有する。

【 0 0 3 5 】

別の実施形態において、該第 2 鎖は、5 ~ 3 0 ヌクレオチド、1 2 ~ 2 2 ヌクレオチド、1 2 ~ 1 7 ヌクレオチドの長さを有する。さらなる実施形態において、該第 2 鎖は、1 5 ヌクレオチドの長さを有する。

【 0 0 3 6 】

一実施形態において、該二本鎖領域が 2 7 b p である場合、該 R N A 分子の両末端が独立に 3 ' 突出または 5 ' 突出であるとの条件つきで、該第 1 鎖は 1 2 ~ 3 0 ヌクレオチドの長さを有し、該第 2 鎖は 1 0 ~ 2 9 ヌクレオチドの長さを有する。さらなる実施形態において、該第 1 鎖は 1 8 ~ 2 3 ヌクレオチドの長さを有し、該第 2 鎖は 1 2 ~ 1 7 ヌクレオチドの長さを有する。

【 0 0 3 7 】

別の実施形態において、該第 1 鎖は 1 9 ~ 2 5 ヌクレオチドの長さを有し、該第 2 鎖は 1 2 ~ 1 7 ヌクレオチドの長さを有する。

【 0 0 3 8 】

代替的な実施形態において、

該第 1 鎖が

【 0 0 3 9 】

【 化 1 】

5' -UUCGAAGUAUUCGCGUACGU

5' -UCGAAGUAUUCGCGUACGUG または

5' -CGAAGUAUUCGCGUACGUGA

であり、

該第 2 鎖が最長で 1 7 ヌクレオチドの長さを有するか、または該第 1 鎖との少なくとも 1 つのミスマッチを含有するか、または少なくとも 1 つの修飾を含有するとの条件つきで、  
該第 1 鎖は 1 9 ~ 2 5 ヌクレオチドの長さを有し、該第 2 鎖は 1 8 ~ 2 4 ヌクレオチドの長さを有する。

【 0 0 4 0 】

一実施形態において、該第 1 鎖は 2 1 ヌクレオチドの長さを有し、該第 2 鎖は 1 2 ~ 1

10

20

30

40

50

7ヌクレオチドまたは14～16ヌクレオチドの長さを有する。

【0041】

一実施形態において、該第1鎖は、該第2鎖よりも1～10ヌクレオチド長い。

【0042】

一実施形態において、該3'突出は、2～6ヌクレオチドの長さを有する。

【0043】

別の実施形態において、該5'突出は、0～5ヌクレオチドの長さを有する。

【0044】

一実施形態において、該遺伝子サイレンシングは、RNA干渉、翻訳の調節、およびDNAのエピジェネティック調節の1もしくは2つ、または全てを含む。

10

【0045】

一実施形態において、該二重鎖RNA分子は、前記第1鎖および第2鎖の少なくとも1つにおいてニックをさらに含む。

【0046】

別の実施形態において、該二本鎖領域は、1つまたは複数のヌクレオチドのギャップを含む。

【0047】

一実施形態において、5'突出の少なくとも1つのヌクレオチドは、該標的mRNA配列と相補的ではない。

【0048】

20

別の実施形態において、該5'突出の少なくとも1つのヌクレオチドは、A、U、およびdTからなる群から選択される。

【0049】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、ペプチド、抗体、ポリマー、脂質、オリゴヌクレオチド、コレステロール、およびアプタマーからなる群から選択される実体とコンジュゲートしている。

【0050】

一実施形態において、RNA分子は、マッチしないかまたはミスマッチする少なくとも1つのヌクレオチドをさらに含む。

【0051】

30

別の実施形態において、該二本鎖領域のGC含量は20～70%である。

【0052】

一実施形態において、3'突出および/または5'突出は、分解に対して安定化される。

【0053】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体を含む。さらなる実施形態において、該少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体は、糖修飾リボヌクレオチド、骨格修飾リボヌクレオチド、および/または塩基修飾リボヌクレオチドである。さらなる実施形態において、該骨格修飾リボヌクレオチドは、別のリボヌクレオチドとのホスホジエステル結合において修飾を有する。別の実施形態において、該ホスホジエステル結合は、少なくとも1つの窒素のヘテロ原子または硫黄のヘテロ原子を含むように修飾される。さらに別の実施形態において、該ヌクレオチド類似体は、ホスホチオエート基を含む骨格修飾リボヌクレオチドである。

40

【0054】

一実施形態において、該少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体は、非天然塩基または修飾塩基を含む。別の実施形態において、該少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体は、イノシンまたはトリチル化塩基を含む。

【0055】

さらなる実施形態において、該ヌクレオチド類似体は糖修飾リボヌクレオチドであり、2'-OH基はH、OR、R、ハロ、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、またはCN

50

から選択される基により置換され、各 R は独立に C 1 ~ C 6 のアルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、ハロは F、C l、B r、または I である。

【0056】

一実施形態において、該第 1 鎖は、少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドを含む。さらなる実施形態において、該少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドは、3' 突出、5' 突出、および該第 1 鎖の 5' 端に近接する二本鎖領域からなる群から選択される 1 つまたは複数の領域内にある。別の実施形態において、該第 2 鎖は、少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチドを含む。

【0057】

本発明はまた、細胞または生物における遺伝子発現を調節する方法を提供する。該方法は、選択的な遺伝子サイレンシングを行うことができる条件下において、前記細胞または生物を請求項 1 に記載の二重鎖 RNA 分子と接触させるステップと、該二本鎖 RNA に実質的に対応する配列部分を有する標的核酸に対して該二本鎖 RNA により実施される選択的な遺伝子サイレンシングを媒介するステップとを含む。さらなる実施形態において、前記接触させるステップは、選択的な遺伝子サイレンシングを行うことができる培養物中または生物内の標的細胞へと前記二重鎖 RNA 分子を導入するステップを含む。またさらなる実施形態において、導入するステップは、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、感染、注射、経口投与、吸入、局所 (t o p i c a l) 投与、または局所 (r e g i o n a l) 投与からなる群から選択される。別の実施形態において、導入するステップは、医薬担体、正電荷担体、リボソーム、タンパク質担体、ポリマー、ナノ粒子、ナノエマルジョン、脂質、およびリポイドからなる群から選択される、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤の使用を含む。一実施形態において、該調節する方法は、細胞または生物における遺伝子の発現を調節するのに用いられる。

10

20

【0058】

別の実施形態において、該調節する方法は、疾患または望ましくない状態を治療または予防するのに用いられる。

【0059】

一実施形態において、該標的遺伝子は、ヒトまたは動物の疾患と関連する遺伝子である。さらなる実施形態において、該遺伝子は病原性微生物の遺伝子である。またさらなる実施形態において、該標的遺伝子はウイルス遺伝子である。別の実施形態において、該遺伝子は腫瘍関連遺伝子である。

30

【0060】

さらに別の実施形態において、標的遺伝子は、自己免疫疾患、炎症性疾患、変性疾患、感染性疾患、増殖性疾患、代謝性疾患、免疫媒介性障害、アレルギー性疾患、皮膚疾患、悪性疾患、消化管障害、呼吸器障害、心血管障害、腎障害、リウマチ障害、神経障害、内分泌障害、および老化からなる群から選択される疾患と関連する遺伝子である。

【0061】

該調節する方法はまた、in vitro または in vivo における薬物標的を研究するのに用いられる。

【0062】

本発明は、二重鎖 RNA 分子を含む試薬を提供する。

40

【0063】

本発明は、キットをさらに提供する。該キットは、第 1 の RNA 鎖および第 2 の RNA 鎖を含み、該第 1 鎖が該第 2 鎖よりも長く、該第 2 鎖が該第 1 鎖と実質的に相補的であり、該第 1 鎖と二重鎖 RNA 分子を形成することが可能であり、前記二重鎖 RNA 分子が真核生物細胞内における配列特異的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能である。

【0064】

本発明はまた、請求項 1 に記載の二重鎖 RNA 分子を調製する方法であって、該第 1 鎖および該第 2 鎖を合成するステップと、二重鎖 RNA 分子が形成され、これにより、配列特異的な遺伝子サイレンシングを実施することが可能となる条件下で、合成された鎖を組

50

み合わせるステップとを含む方法も提供する。一実施形態において、それらのRNA鎖は、化学合成されるか、または生物学的に合成される。別の実施形態において、該第1鎖および該第2鎖は、個々にまたは同時に合成される。

#### 【0065】

一実施形態において、該方法は、合成するステップの間、合成するステップの後から組み合わせるステップの前において、または組み合わせるステップの後において、該二重鎖RNA分子内に少なくとも1種の修飾ヌクレオチドまたはその類似体を導入するステップをさらに含む。

#### 【0066】

本発明は、医薬組成物をさらに提供する。医薬組成物は、活性作用物質としての、少なくとも1種の二重鎖RNA分子と、医薬担体、正電荷担体、リボソーム、タンパク質担体、ポリマー、ナノ粒子、コレステロール、脂質、およびリポイドからなる群から選択される1種または複数種の担体とを含む。

10

#### 【0067】

本発明はまた、治療法も提供する。該方法は、有効量の本発明の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。一実施形態において、該医薬組成物は、静脈内投与、皮下投与、吸入投与、局所投与、経口投与、および局所投与からなる群から選択される経路を介して投与される。

#### 【0068】

一実施形態において、該第1鎖は、発生遺伝子、癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、および酵素遺伝子、ならびに接着分子、サイクリンキナーゼ阻害剤、Wntファミリーメンバー、Paxファミリーメンバー、ウイングドヘリックスファミリーメンバー、Hoxファミリーメンバー、サイトカイン/リンホカインまたはその受容体、成長/分化因子またはその受容体、神経伝達物質またはその受容体、キナーゼ、シグナル伝達物質の遺伝子、ウイルス遺伝子、感染性疾患の遺伝子、ABL1、BCL1、BCL2、BCL6、CBFA2、CBL、CSF1R、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、ETS1、ETV6、FGR、FOS、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、およびYES、APC、BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NF1、NF2、RB1、TP53、WT1、ACPデサチユラーゼもしくはヒドロキシラーゼ、ADP-グルコースピロホリラーゼ、ATPアーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アミラーゼ、アミログルコシダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、シクロオキシゲナーゼ、デカルボキシラーゼ、デキストリナーゼ、DNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコースオキシダーゼ、GTPアーゼ、ヘリカーゼ、ヘミセルラーゼ、インテグラーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ラクターゼ、リパーゼ、リボキシゲナーゼ、リゾチーム、ペクチンエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、ホスホリラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテイナーゼもしくはペプチダーゼ、ブラナーゼ、リコンビナーゼ、逆転写酵素、トポイソメラーゼ、キシラナーゼ、k-RAS、-カテニン、Rsk1、PCNA、p70S6K、サバイビン、mTOR、PTEN、Parp1、またはp21からなる群から選択される遺伝子の標的mRNA配列と実質的に相補的な配列を含む。

20

30

40

#### 【0069】

別の実施形態において、二重鎖RNA分子は、

#### 【0070】

【表 5 - 1】

aiNbs1	5' -AUGCUGUGUUAACUG UAGUACGACACAAUUGACGAA-5'
aiEF2	5' -CCUCUUUUGAUGUAU CCGGGAGAAUACUACAUUAA-5'
aiStat3-A	5' -AGCAAAGAAUCACAU CGGUCGUUUCUUAGUGUACAA-5'
aiStat3-B	5' -GAAUCUCAACUUCAG CGUCUUAGAGUUGAAGUCUAA-5'
aiPTEN	5' -UAAAGGUGAAGAUU UCGAUUUCCACUUCUUAUAA-5'
aip70S6K	5' -UGUUUGAUUUGGAUU GGCACAAACUAAACCUAAAAA-5'
aimTOR	5' -GAAUUGUCAAGGGAU CGUCUUAACAGUUCCCUAUA-5'
aiRsk1	5' -AAUUGGAACACAGUU CCUUUAACCUUGUGUAAAAA-5'
aiPCNA	5' -AGAUGCUGUUGUAAU ACCUUCUACGACAACAUAAAAA-5'
aiParp1	5' -GCGAAGAAGAAAUCU CACCGCUUCUUCUUUAGAUAA-5'
aiサバイビン	5' -AGGAGAUCAACAUUU dTdTUCCUCUAGUUGUAAAAGU-5'

10

20

【 0 0 7 1 】

【表 5 - 2】

aiNQ01	5' - GCAGACCUUGUGAUA CGGCGUCUGGAACACUAUAAA - 5'
aip21-A	5' - CCCGCUUACAUCUU UCCGGGCGAGAUGUAGAAGAA - 5'
aip21-B	5' - GGCGGUUGAAUGAGA GAUCCGCCAACUUACUCUCAA - 5'
aik-Ras	5' - GGAGCUGUUGGCGUA CAACCUCGACAACCGCAUCAA - 5'
aiβ-カテニン-1	5' - GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-2	5' - GAUAIUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-4	5' - CUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-5	5' - AGCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-8	5' - UAGCUGAUUUGAUG CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-9	5' - UGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-10	5' - GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-11	5' - GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAAA - 5'
aiβ-カテニン-18	5' - GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-34	5' - GCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-35	5' - AGCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-36	5' - AGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-37	5' - AGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-38	5' - UAGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-39	5' - GCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-40	5' - AGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-42	5' - UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-43	5' - UAGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-44	5' - GUAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-45	5' - GCUGAUUUGAAGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-カテニン-46	5' - GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGUC - 5'

10

20

30

40

【 0 0 7 2 】

【表 5 - 3】

aiβ-カテニン-47	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'
aiβ-カテニン-48	5'-GCUGAUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-52	5'-gCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-53	5'-GCUGAUUUGAUGGa CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-57	5'-gCUGAUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
aiβ-カテニン-59	5'-GCUGAUUUGAUGGa catCGACUAUAACUACCUGAA-5' および
aiβ-カテニン-62	5'-UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'

10

【表中、A、U、G、およびCはヌクレオチドであり、a、t、g、およびcはデオキシヌクレオチドである。】

からなる群から選択される。

## 【0073】

本発明は、二本鎖領域を形成するアンチセンス鎖およびセンス鎖を有する第1の二重鎖RNA分子を修飾する方法を提供する。該方法は、該アンチセンス鎖が1～8ヌクレオチドの3'突出と0～8ヌクレオチドの5'突出とを有するように、センス鎖の長さを短くするステップと、第2の二重鎖RNA分子を形成するステップとを含み、第1の二重鎖RNA分子の少なくとも1つの特性が改善される。一実施形態において、該特性は、サイズ、効力、効能、発現速度、持続性、合成経費、オフターゲット効果、インターフェロン応答、および送達からなる群から選択される。別の実施形態において、該方法は、該第2の二重鎖RNA分子が形成される条件下で、該アンチセンス鎖と該短くしたセンス鎖とを組み合わせるステップをさらに含む。さらなる実施形態において、該第1の二重鎖RNA分子は、siRNAであるか、またはdicer基質siRNAであるか、またはsiRNA前駆体である。

20

## 【0074】

本発明は、発現ベクターを提供する。該ベクターは、少なくとも1つの発現制御配列に作動可能に連結された請求項1に記載の二重鎖RNA分子をコードする1つまたは複数の核酸を含む。一実施形態において、該発現ベクターは、第1の発現制御配列に作動可能に連結された、該第1鎖をコードする第1の核酸と、第2の発現制御配列に作動可能に連結された、該第2鎖をコードする第2の核酸とを含む。別の実施形態において、該発現ベクターは、ウイルスの発現ベクター、真核生物の発現ベクターであるか、または細菌の発現ベクターである。

30

## 【0075】

本発明はまた、細胞も提供する。一実施形態において、細胞は発現ベクターを含む。別の実施形態において、細胞は二重鎖RNA分子を含む。さらに別の実施形態において、細胞は、哺乳動物細胞、鳥類細胞、または細菌細胞である。

40

## 【0076】

本発明の他の特徴および利点は、異なる例を含む、本明細書で提供されるさらなる説明から明らかである。提示される例は、本発明を実施するのに有用な、異なる成分および方法を例示する。該例は、優先権が主張される本発明を制限するものではない。本開示に基づき、当業者は、本発明を実施するのに有用な他の成分および方法を同定し、用いることができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0077】

【図1】図1Aは、第1鎖上に3'突出と5'突出の両方を有する二重鎖RNA分子の構造を示す図である。図1Bは、第1鎖上に3'突出と5'突出の両方を有する二重鎖RNA

50

A分子の構造、および二重鎖中のニックを示す図である。図1Cは、第1鎖上に3'突出と5'突出の両方を有する二重鎖RNA分子の構造、および第2鎖中のギャップを示す図である。

【図2】図2Aは、第1鎖上に平滑末端、および5'突出を有する二重鎖RNA分子の構造を示す図である。図2Bは、第1鎖上に平滑末端、および3'突出を有する二重鎖RNA分子の構造を示す図である。図2Cは、二重鎖の両末端上に3'突出を有し、かつ第1鎖が第2鎖より長い、二重鎖RNA分子の構造を示す図である。図2Dは、二重鎖の両末端上に5'突出を有し、かつ第1鎖が第2鎖より長い、二重鎖RNA分子の構造を示す図である。

【図3】a i RNA（非対称性干渉RNA）による - カテニンの遺伝子サイレンシングの誘導を示す図である。図3Aはオリゴの確認を示す図である。アニーリング後、オリゴを20%ポリアクリルアミドゲルによって確認した。レーン1、21nt / 21nt；レーン2、12nt (a) / 21nt；レーン3、12nt (b) / 21nt；レーン4、13nt / 13nt；レーン5、13nt / 21nt；レーン6、14nt / 14nt；レーン7、14nt (a) / 21nt；レーン8、14nt (b) / 21nt；レーン9、15nt / 15nt；レーン10、15nt / 21nt。

【0078】

図3Bは、遺伝子サイレンシングにおけるオリゴの影響を示す図である。HeLa細胞を200,000細胞/ウェルで6ウェル培養プレートに平板培養した。24時間後、それらをスクランブルs i RNA（レーン1）、21-bps i RNA 標的化E2F1（レーン2、特異性の対照として）または - カテニンを標的とする21-bps i RNA（レーン3、陽性対照として）、または異なる長さの混合物：12nt (a) / 21nt（レーン4）；12nt (b) / 21nt（レーン5）；13nt / 21nt（レーン6）；14nt (a) / 21nt（レーン7）；14nt (b) / 21nt（レーン8）；15nt / 21nt（レーン9）の同じ濃度のa i RNAでトランスフェクトした。細胞はトランスフェクション後48時間で採取した。 - カテニンの発現はウエスタンブロットによって決定した。E2F1およびアクチンは対照として使用する。

【図4】遺伝子サイレンシングの媒介における、塩基置換有りまたは無しのa i RNAオリゴの構造 - 活性関係を示す図である。HeLa細胞は示したa i RNAでトランスフェクトした。細胞を採取し、トランスフェクション後48時間で溶解物を生成した。ウエスタンブロットを実施して - カテニンおよびアクチンのレベルを検出した。s i は - カテニンs i RNAオリゴヌクレオチドを表す。それぞれのレーン上の数値ラベルは表3中のa i RNAオリゴに対応する。

【図5】遺伝子サイレンシングの媒介における、塩基置換有りまたは無しのa i RNAオリゴの構造 - 活性関係を示す図である。HeLa細胞は示したa i RNAでトランスフェクトした。細胞を採取し、トランスフェクション後48時間で溶解物を生成した。ウエスタンブロットを実施して - カテニンおよびアクチンのレベルを検出した。s i は - カテニンs i RNAオリゴヌクレオチドを表す。それぞれのレーン上の数値ラベルは表3中のa i RNAオリゴに対応する。

【図6-1】a i RNAによって誘発される遺伝子サイレンシングのメカニズムの分析を示す図である。

【0079】

図6aは、示した日数でa i RNAまたはs i RNAでトランスフェクトした細胞における、 - カテニンmRNAレベルのノーザンブロット分析を示す図である。

【0080】

図6bは、mRNAの切断および予想PCR産物を示す、 - カテニンの5' - RACE - PCRの概略を示す図である。

【0081】

図6cは、a i RNAによって媒介された - カテニン切断産物を、4または8時間a i RNAでトランスフェクトした細胞から5' - RACE - PCRによって増幅したこと

10

20

30

40

50



を示す図である。

【図 6 - 2】 a i R N A によって誘発される遺伝子サイレンシングのメカニズムの分析を示す図である。

【 0 0 8 2 】

図 6 d は、5' - R A C E - P C R 断片を配列決定することによって確認した - カテニン m R N A 切断部位の概略を示す図である。

【 0 0 8 3 】

図 6 e は、a i R N A と s i R N A の差次的 R I S C ローディング効率を示す図である。p C M V - A g o 2 を用いたトランスフェクション後 4 8 時間で H e l a 細胞に a i R N A または s i R N A 二重鎖をトランスフェクトした。A g o 2 は a i R N A または s i R N A のトランスフェクション後に示した時間時点で免疫沈降させ、ノーザンブロット分析を実施して A g o 2 / R I S C 結合小 R N A のレベルを決定した。(以下に示す) A g o 2 のレベルは I P 後にウエスタンブロットによって決定した。

【 0 0 8 4 】

図 6 f は、a i R N A および s i R N A の遺伝子サイレンシング活性に対する A g o 2 または D i c e r のノックダウンの影響を示す図である。細胞はスクランブル a i R N A ( C o n ) または a i R N A 標的化 S t a t 3 ( a i ) を用いたトランスフェクションの 2 4 時間前に、スクランブル s i R N A ( s i C o n )、または s i R N A 標的化 A g o 2 ( s i A g o 2 )、または D i c e r ( s i D i c e r ) でトランスフェクトした。細胞を採取し、a i S t a t 3 トランスフェクション後 4 8 時間でウエスタンブロット分析を実施した。

【図 7】 s i R N A と比較した R I S C への a i R N A の取り込みの利点を示す図である。

【 0 0 8 5 】

図 7 A は、a i R N A は s i R N A より良い効率で R I S C に進入することを示す図である。A g o 2 発現プラスミドでトランスフェクトした細胞を、示した時間 a i R N A または s i R N A でトランスフェクトした。細胞溶解後、A g o 2 を免疫沈降させ、R N A を免疫沈降物から抽出し、15%アクリルアミドゲル上で分離した。移動後、膜をプローブとハイブリダイズさせて a i R N A または s i R N A の 2 1 m e r アンチセンス鎖を検出した。I g G 対照レーンは、A g o 2 免疫沈降物と比較したシグナルの欠如を示す。

【 0 0 8 6 】

図 7 B は、a i R N A のセンス鎖は R I S C 中に存在しないことを示す図である。( A ) からの膜を剥離し、再度プローブ処理してトランスフェクトしたオリゴのセンス鎖を検出した。( A ) および ( B ) 中の絵図は、膜上のセンス鎖 ( 上側の鎖 )、アンチセンス鎖 ( 下側の鎖 )、または二重鎖の位置を示す。

【図 8】 a i R N A による R I S C ローディングのメカニズムの図である。

【 0 0 8 7 】

図 8 A は、a i R N A または s i R N A および A g o 2 の異なる鎖間の相互作用の免疫沈降分析を示す図である。過剰発現 A g o 2 を含有する H e l a S - 1 0 溶解物を、<sup>32</sup>P 末端標識センス鎖またはアンチセンス鎖を含有する示した a i R N A または s i R N A 二重鎖とインキュベートした。( \* ) は標識の位置を示す。A g o 2 免疫沈降後、R N A を単離し、15%アクリルアミドゲル上で分離し、フィルムに感光させた。A g o 2 結合 R N A はベレット画分中に示され、一方非 A g o 2 結合 R N A は上清 ( S u p ) 中に残る。

【 0 0 8 8 】

図 8 B は、a i R N A 活性におけるセンス鎖切断の役割を示す図である。細胞は a i R N A で、または位置 8 ( 予想される A g o 2 切断部位 ) が 2' - O - メチルであるセンス鎖を有する a i R N A で、または対照として位置 9 が 2' - O - メチルであるセンス鎖を有する a i R N A でトランスフェクトした。R N A をトランスフェクション後 4 時間で回収し、q R T - P C R を実施して残りの - カテニン m R N A の相対的レベルを決定した

。

【図 9】 a i R N A と s i R N A の競合分析を示す図である。

【 0 0 8 9 】

図 9 A は、 $^{32}$ P 末端標識アンチセンス鎖を含有する s i R N A 二重鎖および a i R N A 二重鎖を示す図である。( \* ) は標識の位置を示す。

【 0 0 9 0 】

図 9 B は、非放射能の a i R N A は A g o 2 に関して標識 s i R N A と競合しないことを示す図である。過剰発現 A g o 2 を含有する H e l a S - 1 0 溶解物は、A g o 2 の免疫沈降前に  $^{32}$ P 末端標識 s i R N A および非放射能の a i R N A 二重鎖または非放射能の s i R N A 二重鎖とインキュベートした。次いで R N A を単離し、15%アクリルアミドゲル上で分析した。

10

【 0 0 9 1 】

図 9 C は、非放射能の s i R N A は A g o 2 に関して標識 a i R N A と競合しないことを示す図である。B 中で使用したのと同じ S - 1 0 溶解物を、A g o 2 の免疫沈降前に  $^{32}$ P 末端標識 a i R N A および非放射能の a i R N A 二重鎖または非放射能の s i R N A 二重鎖とインキュベートした。次いで R N A を単離し、15%アクリルアミドゲル上で分析した。

【図 10】 R I S C ローディングおよび成熟 R I S C の生成において観察した差を示す、a i R N A および s i R N A のモデルを示す図である。

【図 11 - 1】 アンチセンス突出を有する 14 ~ 15 b p の非対称性 R N A 二重鎖 ( a i R N A ) が、強力、有効、迅速、および持続的遺伝子サイレンシングを誘導したことを示す図である。

20

【 0 0 9 2 】

図 11 A は、 $\beta$ -カテニンを標的とする s i R N A および  $\beta$ -カテニンを標的とする a i R N A の配列および設計を示すダイアグラムを示す図である。

【 0 0 9 3 】

図 11 B は、様々な長さの a i R N A による遺伝子サイレンシングの誘導を示す図である。 $\beta$ -カテニタンパク質レベルを、示した a i R N A で 48 時間トランスフェクトした細胞においてウエスタンブロットによって分析した。

【図 11 - 2】 アンチセンス突出を有する 14 ~ 15 b p の非対称性 R N A 二重鎖 ( a i R N A ) が、強力、有効、迅速、および持続的遺伝子サイレンシングを誘導したことを示す図である。

30

【 0 0 9 4 】

図 11 C は、a i R N A が  $\beta$ -カテニタンパク質欠乏の誘導において s i R N A より強力かつ有効であることを示す図である。H e l a 細胞は示した濃度で  $\beta$ -カテニンを標的とする a i R N A または  $\beta$ -カテニンを標的とする s i R N A を用いてトランスフェクトした。トランスフェクション後 48 時間で、細胞溶解物を作製し、ウエスタンブロット分析を行った。

【 0 0 9 5 】

図 11 D は、a i R N A が  $\beta$ -カテニン R N A レベルの低減において s i R N A より有効、迅速、および持続的であることを示す図である。細胞はノーザンブロット分析前に示した日数 10 n M の 15 b p の a i R N A または 21 - m e r の s i R N A でトランスフェクトした。

40

【図 12 - 1】 a i R N A が迅速かつ強力なサイレンシングを媒介することを示す図である。

【 0 0 9 6 】

図 12 A は、 $\beta$ -カテニンを標的化するために使用した a i R N A および s i R N A の配列および構造を示す図である。

【 0 0 9 7 】

図 12 B は、対照 a i R N A または  $\beta$ -カテニンを標的とする a i R N A でトランスフ

50

エクトした細胞由来の  $\beta$ -カテニン mRNA レベルの RT-PCR を示す図である。RNA はトランスフェクション後の示した時間で回収した。

【図 12 - 2】 aiRNA が迅速かつ強力なサイレンシングを媒介することを示す図である。

【0098】

図 12 C は、示した時間数の、対照、aiRNA、または siRNA でトランスフェクトした細胞における  $\beta$ -カテニン mRNA レベルの定量的リアルタイム RT-PCR を示す図である。

【0099】

図 12 D は、示した時間の、対照、aiRNA、または siRNA でトランスフェクトした細胞における  $\beta$ -カテニンタンパク質レベルのウエスタンブロット分析を示す図である。

【図 13 - 1】複数の標的に対する遺伝子サイレンシングの効力および持続性における siRNA と aiRNA の比較を示す図である。HeLa 細胞は (a)  $\beta$ -カテニン、10 nM、(b) Stat3、(c) EF2、または (d) NQO1、20 nM を標的化するスクランブル siRNA (c)、aiRNA (ai)、または siRNA (si) でトランスフェクトした。RNA およびタンパク質を示した時間時点で精製し、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) によって mRNA レベルに関して分析し、タンパク質レベルはウエスタンブロットによって分析した。qRT-PCR データは si Control トランスフェクト細胞に正規化する。

【図 13 - 2】複数の標的に対する遺伝子サイレンシングの効力および持続性における siRNA と aiRNA の比較を示す図である。HeLa 細胞は (a)  $\beta$ -カテニン、10 nM、(b) Stat3、(c) EF2、または (d) NQO1、20 nM を標的化するスクランブル siRNA (c)、aiRNA (ai)、または siRNA (si) でトランスフェクトした。RNA およびタンパク質を示した時間時点で精製し、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) によって mRNA レベルに関して分析し、タンパク質レベルはウエスタンブロットによって分析した。qRT-PCR データは si Control トランスフェクト細胞に正規化する。

【図 14 - 1】 aiRNA 媒介遺伝子サイレンシングは、複数の細胞系中の様々な遺伝子に対して有効であることを示す図である。

【0100】

図 14 a は、aiRNA 二重鎖は、異なる哺乳動物細胞系中の  $\beta$ -カテニンの標的化において siRNA より有効であることを示す図である。

【0101】

図 14 b は、48 時間 20 nM の示した aiRNA または siRNA でトランスフェクトした細胞由来の Nbs1、サバイビン、Parp1、p21 のウエスタンブロット分析を示す図である。

【図 14 - 2】 aiRNA 媒介遺伝子サイレンシングは、複数の細胞系中の様々な遺伝子に対して有効であることを示す図である。

【0102】

図 14 c は、48 時間 20 nM の示した aiRNA または siRNA でトランスフェクトした細胞由来の Rsk1、PCNA、p70S6K、mTOR、および PTEN のウエスタンブロット分析を示す図である。

【0103】

図 14 d は、aiRNA による k-Ras の対立遺伝子特異的遺伝子サイレンシングを示す図である。ウエスタンブロット分析によって、野生型 k-Ras を標的化する aiRNA を、k-Ras 野生型 (DL D1) と k-Ras 突然変異体 (SW480) 細胞系の両方において k-Ras のサイレンシングに関して試験した。

【図 15 - 1】 センス鎖、免疫刺激によるオフターゲット遺伝子サイレンシングの欠如、および aiRNA の血清中安定性を示す図である。

10

20

30

40

50

## 【0104】

図15aは、モック処理したPBM Cまたは16時間 - カテニンの siRNA 二重鎖または - カテニンの aiRNA 二重鎖でインキュベートしたPBM Cにおける、インターフェロン誘導性遺伝子の発現の RT - PCR 分析を示す図である。

## 【0105】

図15bは、モックトランスフェクトしたHeLa細胞または24時間EF2の aiRNA またはEF2の siRNA でトランスフェクトしたHeLa細胞または24時間サバイビンの aiRNA またはサバイビンの siRNA でトランスフェクトしたHeLa細胞における、インターフェロン誘導性遺伝子の発現の RT - PCR 分析を示す図である。

## 【0106】

図15cは、既知のインターフェロン応答関連遺伝子の発現の変化に関するマイクロアレイ分析を示す図である。aiRNA でトランスフェクトしたHeLa細胞および siRNA でトランスフェクトしたHeLa細胞から単離した全てのRNAを、マイクロアレイによって分析した。

【図15-2】センス鎖、免疫刺激によるオフターゲット遺伝子サイレンシングの欠如、および aiRNA の血清中安定性を示す図である。

## 【0107】

図15dは、センス鎖媒介のオフターゲット遺伝子サイレンシングが aiRNA に関して検出されないことを示す図である。細胞は aiRNA または siRNA と St at 3 (センスRNA) を発現するプラスミドまたはアンチセンス St at 3 (アンチセンスRNA) を発現するプラスミドのいずれかとコトランスフェクトした。細胞を採取し、トランスフェクション後24時間でRNAを回収し、St at 3 センスRNA または St at 3 アンチセンスRNAの相対的レベルは、定量的リアルタイムPCRまたは RT - PCR によって決定した(挿入図)。

## 【0108】

図15eは、ヒト血清中での aiRNA および siRNA 二重鎖の安定性を示す図である。aiRNA および siRNA 二重鎖は、ゲル電気泳動前に示した量の時間37で10%ヒト血清中においてインキュベートした。残存する二重鎖(対照の%)を示している。

【図15-3】センス鎖、免疫刺激によるオフターゲット遺伝子サイレンシングの欠如、および aiRNA の血清中安定性を示す図である。

## 【0109】

図15fは、aiRNA 二重鎖によって媒介される遺伝子特異的サイレンシングに関して提案されるモデルを示す図である。

【図16】SW480ヒト結腸異種移植マウスモデルにおける - カテニンに対する aiRNA の強力な抗腫瘍活性を示す図である。樹立皮下SW480ヒト結腸癌を有する免疫抑制マウスに、毎日0.6nmolのPEI複合 - カテニン siRNA、PEI複合 - カテニン aiRNA または陰性対照としてPEI複合無関連 siRNA を静脈内(iv)に与えた。腫瘍の大きさを治療中定期的に評価した。それぞれの時点は6個の腫瘍の平均値 ± SEMを表す。

【図17】HT29ヒト結腸異種移植マウスモデルにおける - カテニンに対する aiRNA の強力な抗腫瘍活性を示す図である。樹立皮下HT29ヒト結腸癌を有する免疫抑制マウスに、1日おきに0.6nmolのPEI複合 - カテニン siRNA、PEI複合 - カテニン aiRNA または陰性対照としてPEI複合無関連 siRNA を静脈内(iv)に与えた。腫瘍の大きさを治療中定期的に評価した。それぞれの時点は5個の腫瘍の平均値 ± SEMを表す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0110】

本発明は、真核生物細胞における選択的遺伝子サイレンシングをもたらすことができる非対称性二重鎖RNA分子に関する。一実施形態において、二重鎖RNA分子は第1鎖お

10

20

30

40

50

よび第2鎖を含む。第1鎖は第2鎖よりも長い。第2鎖は第1鎖と実質的に相補的であり、第1鎖と二本鎖領域を形成する。

【0111】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、1～8ヌクレオチドの3'突出および1～8ヌクレオチドの5'突出、1～10ヌクレオチドの3'突出および平滑末端、または1～10ヌクレオチドの5'突出および平滑末端を有する。別の実施形態において、二重鎖RNA分子は、1～8ヌクレオチドの2つの5'突出または1～10ヌクレオチドの2つの3'突出を有する。さらなる実施形態において、第1鎖は、1～8ヌクレオチドの3'突出および1～8ヌクレオチドの5'突出を有する。なおさらなる実施形態において、二重鎖RNA分子は、単離された二重鎖RNA分子である。

10

【0112】

一実施形態において、第1鎖は、1～10ヌクレオチドの3'突出、および1～10ヌクレオチドの5'突出または5'-平滑末端を有する。別の実施形態において、第1鎖は、1～10ヌクレオチドの3'突出、および1～10ヌクレオチドの5'突出を有する。代替の実施形態において、第1鎖は、1～10ヌクレオチドの3'突出、および5'-平滑末端を有する。

【0113】

一実施形態において、第1鎖は、5～100ヌクレオチド、12～30ヌクレオチド、15～28ヌクレオチド、18～27ヌクレオチド、19～23ヌクレオチド、20～22ヌクレオチド、または21ヌクレオチドの長さを有する。

20

【0114】

別の実施形態において、第2鎖は、3～30ヌクレオチド、12～26ヌクレオチド、13～20ヌクレオチド、14～23ヌクレオチド、14または15ヌクレオチドの長さを有する。

【0115】

一実施形態において、第1鎖は5～100ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は3～30ヌクレオチドの長さを有する；または、第1鎖は10～30ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は3～29ヌクレオチドの長さを有する；または、第1鎖は12～30ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は10～26ヌクレオチドの長さを有する；または、第1鎖は15～28ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は12～26ヌクレオチドの長さを有する；または、第1鎖は19～27ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は14～23ヌクレオチドの長さを有する；または、第1鎖は20～22ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は14～15ヌクレオチドの長さを有する。さらなる実施形態において、第1鎖は21ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は13～20ヌクレオチド、14～19ヌクレオチド、14～17ヌクレオチド、14または15ヌクレオチドの長さを有する。

30

【0116】

一実施形態において、第1鎖は、第2鎖と比較して、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長い。

【0117】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、1～10個のマッチしないかまたはミスマッチするヌクレオチドをさらに含む。さらなる実施形態において、マッチしないかまたはミスマッチするヌクレオチドは、3' 陥凹(recessed)末端にあるかまたはその近くにある。代替の実施形態において、マッチしないかまたはミスマッチするヌクレオチドは、5' 陥凹末端にあるかまたはその近くにある。代替の実施形態において、マッチしないかまたはミスマッチするヌクレオチドは二本鎖領域にある。別の実施形態において、マッチしないかまたはミスマッチするヌクレオチド配列は1～5ヌクレオチドの長さを有する。なおさらなる実施形態において、マッチしないかまたはミスマッチするヌクレオチドはループ構造を形成する。

40

【0118】

一実施形態において、第1鎖または第2鎖は、少なくとも1つのニックを含み、または

50

2つのヌクレオチド断片によって形成される。

【0119】

一実施形態において、遺伝子サイレンシングは、RNA干渉、翻訳の調節、およびDNAのエピジェネティック調節のうちの1もしくは2つ、または全てを介して達成される。

【0120】

本明細書および特許請求の範囲において使用するとき、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」には、文脈から明らかに他に指示がない限り、複数の対象を含む。例えば、用語「細胞」には、細胞の混合物を含む複数の細胞が含まれる。

【0121】

本明細書中で使用するとき、「二本鎖RNA」、「二重鎖RNA」または「RNA二重鎖」とは、2つの鎖であって、少なくとも1つの二本鎖領域を有するRNAを指し、二本鎖領域内または2つの隣接する二本鎖領域間のいずれかに少なくとも1つのギャップ、ニック、バルジ、および/またはパブルを有するRNA分子が含まれる。1つの鎖が2つの二本鎖領域間にギャップまたはマッチしないヌクレオチドの一本鎖領域を有する場合、その鎖は、複数の断片を有する鎖であると考えられる。本明細書で使用される二本鎖RNAは、末端または両末端のいずれかに末端突出を有することができる。いくつかの実施形態において、二重鎖RNAの2つの鎖は、ある種の化学的リンカーを介して連結され得る。

【0122】

本明細書および特許請求の範囲で使用する場合、単数形の「a」、「an」、および「the」は、脈絡により明らかに別段に指示されていない限り、複数の参照を含む。例えば、用語「a cell」は、その混合物を含めた複数の細胞を含む。

【0123】

本明細書で使用する場合、「二本鎖RNA」、「二重鎖RNA」、または「RNA二重鎖」は、2本の鎖のRNA、および少なくとも1つの二本鎖領域を有するRNAを指し、二本鎖領域内、または2つの隣接する二本鎖領域の間に、少なくとも1つのギャップ、ニック、バルジ、および/またはパブルを有するRNA分子を含む。1本の鎖が、2つの二本鎖領域の間にギャップまたは非対応ヌクレオチドの一本鎖領域を有する場合、その鎖は、複数の断片を有するとみなされる。二本鎖RNAは、ここで使用する場合、いずれかの末端または両末端に末端突出を有することができる。いくつかの実施形態において、二重鎖RNAの2本の鎖は、ある特定の化学リンカーを介して連結することができる。

【0124】

本明細書で使用する場合、「アンチセンス鎖」は、標的メッセンジャーRNAに対して実質的な配列相補性を有するRNA鎖を指す。アンチセンス鎖は、siRNA分子の一部、miRNA/miRNA\*二重鎖の一部、または一本鎖の成熟miRNAでありうる。

【0125】

用語「単離された」または「精製された」は、本明細書で使用する場合、その天然の状態に通常付随する成分を実質的または本質的に含まない物質を指す。純度および均一性は、一般に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技法を使用して求められる。

【0126】

本明細書で使用する場合、「調節すること」およびその文法的な等価用語は、増大させること、または減少させること(例えば、サイレンシング)、言い換えれば、上方制御すること、または下方制御することを指す。本明細書中で使用するとき、「遺伝子サイレンシング」とは、遺伝子発現の減少を指し、標的遺伝子の約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または95%の遺伝子発現の減少を指してもよい。

【0127】

本明細書で使用する場合、用語「対象」は、それだけに限らないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類などを含めた任意の動物(例えば、哺乳動物)を指し、これは、特定の治療のレシピエントとなる。一般に、用語「対象」および「患者」は、ヒト対象に関して、本

10

20

30

40

50

明細書で互換的に使用される。

【0128】

「治療すること」、または「治療」、または「治療すること」、または「軽減すること」、または「軽減するため」などの用語は、本明細書で使用する場合、(1) 診断された病的状態または障害の症状を治癒、減速し、和らげ、および/または診断された病的状態または障害の進行を停止する治療手段、ならびに(2) 標的にされる病的状態または障害の発症を予防し、または遅らせる予防(prophylactic)または予防(preventative)手段の両方を指す。したがって、治療を必要とするものには、既に障害を有しているもの、障害を有しやすいもの、および障害が予防されるべきものが含まれる。患者が、以下のうちの1つまたは複数を示す場合、対象は、本発明の方法によって順調に「治療」される：癌細胞の数の低減、または完全な欠如；腫瘍サイズの低減；軟部組織および骨への癌の伝播を含めた、周辺臓器への癌細胞浸潤の障害または欠如；腫瘍転移の障害または欠如；腫瘍増殖の障害または欠如；特定の癌に関連する1つまたは複数の症状の軽減；罹患率および死亡率の低減；ならびに生活の質の改善。

10

【0129】

本明細書で使用する場合、用語「阻害すること」、「阻害すること」、およびこれらの文法的な等価用語は、生物活性の脈絡において使用されるとき、生物活性の下方制御を指し、これは、タンパク質の産生、または分子のリン酸化などの標的にされる機能を低減、または排除することができる。特定の実施形態において、阻害は、標的にされる活性の約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または95%の低減を指す。障害または疾患の脈絡において使用されるとき、この用語は、症状の発症の予防、症状の軽減、または疾患、病状もしくは障害の排除における成功を指す。

20

【0130】

本明細書で使用する場合、用語「実質的に相補性」は、2つの核酸の間であって、2つの二本鎖領域の間の末端突出またはギャップ領域などのいずれの一本鎖領域でもない、塩基対形成した二本鎖領域における相補性を指す。相補性は、完全である必要はなく、例えば、2つの核酸の間で任意の数の塩基対ミスマッチが存在し得る。しかし、ミスマッチの数が多すぎて、最低のストリンジェントのハイブリダイゼーション条件下でさえ、まったくハイブリダイゼーションが起こり得ない場合、この配列は、実質的に相補性の配列ではない。2つの配列が、本明細書で「実質的に相補性」と呼ばれるとき、これらの配列は、選択された反応条件下でハイブリダイズするために、互いに十分に相補的であることを意味する。特異性を実現するのに十分な、核酸の相補性とハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの関係は、当技術分野で周知である。2本の実質的に相補性の鎖は、例えば、完全に相補的でありえ、またはハイブリダイゼーション条件が、例えば、対形成配列と非対形成配列の間の識別を可能にするのに十分である限り、1つから多くのミスマッチを含むことができる。したがって、実質的に相補性の配列は、二本鎖領域において、100%、95%、90%、80%、75%、70%、60%、50パーセントもしくはそれ未満、またはその間の任意の数値の塩基対の相補性を有する配列を指すことができる。

30

【0131】

本明細書で使用する場合、antagomirはmiRNA阻害剤であり、内因性miRNAのサイレンシングにおいて使用することができる。本明細書で使用する場合、模倣剤または模倣体は、miRNAアゴニストであり、機能等価物として内因性のmiRNAを置換するために使用することができ、それによってそのような内因性のmiRNAによって影響される経路を上方制御する。

40

【0132】

1. RNA干渉

RNA干渉(RNAiと省略される)は、二本鎖RNA(dsRNA)によって誘導される一本鎖RNA(ssRNA)の標的破壊に関する細胞プロセスである。ssRNAは、メッセンジャーRNA(mRNA)などの遺伝子転写物である。RNAiは、dsRNAが、dsRNAに相補的である配列を有する遺伝子の発現に特異的に干渉することがで

50

きる転写後の遺伝子サイレンシングの形態である。dsRNA 標的のアンチセンスRNA 鎖は、リボヌクレアーゼによる切断に関するメッセンジャーRNA (mRNA) などの相補的遺伝子転写物を標的にする。

#### 【0133】

RNAi プロセスにおいて、長鎖dsRNA は、リボヌクレアーゼタンパク質である Dicer によって、低分子干渉RNA (siRNA) と呼ばれる短鎖形態に加工される。siRNA は、ガイド (またはアンチセンス) 鎖とパッセンジャー (またはセンス) 鎖に分離される。ガイド鎖は、リボヌクレアーゼを含む多タンパク質複合体である RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) に組み込まれる。次に、複合体は、破壊のための相補的遺伝子転写物を特異的に標的にする。

10

#### 【0134】

RNAi は、多くの真核生物に共通した細胞プロセスであることが示されている。RISC、および Dicer は、真核生物ドメインの全体で保存されている。RNAi は、ウイルスおよび他の外来遺伝物質への免疫反応において役割を果たすと考えられている。

#### 【0135】

低分子干渉RNA (siRNA) は、生物学において様々な役割を果たす短鎖二本鎖RNA (dsRNA) 分子の一種である。最も顕著には、低分子干渉RNA は、siRNA が特定の遺伝子の発現に干渉するRNA干渉 (RNAi) 経路に関与する。さらに、siRNA はまた、抗ウイルス機構またはゲノムのクロマチン構造の形成などのプロセスにおいて役割を果たす。一実施形態において、siRNA は、5' - リン酸末端および3' - ヒドロキシル末端に2 ~ 3ヌクレオチドの3' 突出を含む短い (19 ~ 21 nt) 二本鎖RNA (dsRNA) 領域を有する。

20

#### 【0136】

マイクロRNA (miRNA) は、30% 程度の哺乳動物遺伝子を制御する、内因性の、一本鎖または二本鎖の約22ヌクレオチド長のRNA分子の一種である (Czech、2006年; Eulalioら、2008年; Mack、2007年)。miRNA は、翻訳をブロックするかまたは転写的分解を引き起こすことによってタンパク質産生を抑制する。miRNA は、250 ~ 500個の異なるmRNAを標的にする場合がある。miRNA は、一次miRNA (pri-miRNA) の産物である、pre-miRNA の Dicer 消化の産物である。

30

#### 【0137】

本明細書中で使用するとき、antagomir は、miRNA 阻害剤であり、内因性miRNA のサイレンシングに用いることができる。本明細書中で使用するとき、模倣体はmiRNA アゴニストであり、模倣体を用いてmiRNA を置換し、mRNA をダウンレギュレートすることができる。

#### 【0138】

Dicer は、RNase III リボヌクレアーゼファミリーのメンバーである。Dicer は、長鎖二本鎖RNA (dsRNA)、pre-マイクロRNA (miRNA)、および短鎖ヘアピンRNA (shRNA) を、通常、3' 末端に2塩基の突出を有する約20 ~ 25ヌクレオチドの長さの低分子干渉RNA (siRNA) と呼ばれる短鎖二本鎖RNA断片に切断する。Dicer は、RNA干渉経路の第1段階を触媒し、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) の形成を開始し、その触媒成分である argonaute は、配列がsiRNA ガイド鎖の配列に相補的であるメッセンジャーRNA (mRNA) を分解することができるエンドヌクレアーゼである。

40

#### 【0139】

本明細書中で使用するとき、有効なsiRNA 配列は、RNAi を誘発して、標的遺伝子の転写物の分解に効果的であるsiRNA である。標的遺伝子に相補的なsiRNA の全てが、RNAi を誘発して、遺伝子の転写物の分解に効果的であるとは限らない。実際に、時間消費のスクリーニングは、通常、有効なsiRNA 配列を特定することを必要とする。一実施形態において、有効なsiRNA 配列は、90% を超えて、80% を超えて

50



【 0 1 4 0 】

【 0 1 4 1 】

【 0 1 4 2 】

【 0 1 4 3 】

**表 1**

B	C	D
5' - CGUACGCGGAAUACUUCG UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCG GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCG AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC- 5'
5' - CGUACGCGGAAUACUUCGA UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGA GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGA AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC- 5'
5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAA UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAA GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAA AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC- 5'
5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAA UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAA GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAA AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC- 5'
5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC- 5'
5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC- 5'
5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC- 5'
5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC UGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU- 5'	5' - CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC- 5'

子は、選択的遺伝子サイレンシング（上記）をもたらすことができない。

## 【0144】

本発明は、配列特異的な遺伝子サイレンシングをもたらすことができる非対称性二重鎖RNA分子に関する。一実施形態において、本発明のRNA分子は、第1鎖および第2鎖を含み、ここで、第2鎖は、第1鎖と実質的に相補的であり、第1鎖を含む二本鎖領域を形成し、第1鎖は第2鎖よりも長い；ただし、Elbashir (Elbashirら、2001c) に開示された非対称性二重鎖RNA分子、具体的には表1に列挙された非対称性二重鎖RNA分子を除く。このRNA分子は、二本鎖領域と、5'突出、3'突出、および平滑末端からなる群から独立に選択される2つの末端とを含む。RNA鎖は、マッチしないかまたは不完全にマッチしたヌクレオチドを有することができる。

## 【0145】

一実施形態において、第1鎖は、第2鎖よりも少なくとも1 nt 長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖よりも、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20 nt 長い。別の実施形態において、第1鎖は、第2鎖よりも20～100 nt 長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖よりも2～12 nt 長い。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖よりも3～10 nt 長い。

## 【0146】

一実施形態において、二本鎖領域は3～98 bp の長さを有する。さらなる実施形態において、二本鎖領域は5～28 bp の長さを有する。なおさらなる実施形態において、二本鎖領域は10～19 bp の長さを有する。二本鎖領域の長さは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30 bp であり得る。

## 【0147】

一実施形態において、RNA分子の二本鎖領域は、いずれのミスマッチおよびバルジも含まない。別の実施形態において、RNA分子の二本鎖領域は、ミスマッチおよび/またはバルジを含む。

## 【0148】

一実施形態において、第1鎖は、

## 【0149】

## 【化2】

5'-UUCGAAGUAUUCGCGUACGU

5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGUG または

5'-CGAAGUAUUCGCGUACGUGA,

であり、第2鎖は最長で17ヌクレオチドの長さを有するか、または第1鎖と少なくとも1つのミスマッチを含むか、または少なくとも1つの修飾を含む。

## 【0150】

代替の実施形態において、第1鎖は、

## 【0151】

## 【化3】

5'-UUCGAAGUAUUCGCGUACGU

5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGUG または

5'-CGAAGUAUUCGCGUACGUGA.

ではない。

## 【0152】

一実施形態において、第1鎖は標的mRNA配列と実質的に相補的である配列を含む。別の実施形態において、第2鎖は標的mRNA配列と実質的に相補的である配列を含む。

## 【0153】

本発明は、遺伝子サイレンシングをもたらすことができる非対称性二本鎖RNA分子に

10

20

30

40

50

関する。一実施形態において、本発明のRNA分子は、第1鎖および第2鎖を含み、ここで、第2鎖は、第1鎖と実質的に相補的であるか、または部分的に相補的であり、第1鎖および第2鎖は少なくとも1つの二本鎖領域を形成し、第1鎖は第2鎖よりも長い（長さの非対称性）。本発明のRNA分子は、少なくとも1つの二本鎖領域と、5'突出、3'突出、および平滑末端からなる群から独立に選択される2つの末端とを有する（例えば、図1A、2A～2Dを参照されたい）。

【0154】

1個のヌクレオチドの変更、付加および欠失が分子の機能性に非常に影響を与え得る低分子RNA調節因子を作製する分野において（Elbashirら、2001c）、aiRNA足場は、各々の鎖およびそれぞれの3'突出において対称である21ntの二本鎖RNAの古典的なsiRNA構造とは区別される構造プラットフォームを提供する。さらに、本発明のaiRNAは、以下の実施例に含まれるデータによって示されるように、RNAiベースの調査および薬剤開発において現在直面している支障を克服することができる新しい種類の低分子調節因子の設計に切望される新しいアプローチを提供する。例えば、siRNAを構造的に模倣するaiRNAのデータは、aiRNAが、遺伝子サイレンシングの誘導において、siRNAよりも効果的であり、強力であり、速やかに発現し、耐久性があり、および特異的であることを示す。

10

【0155】

本発明のRNA分子の任意の一本鎖領域は、2つの二本鎖領域間に任意の末端突出およびギャップを含み、化学的な修飾または二次構造のいずれかを介して、分解に対して安定化し得る。RNA鎖は、マッチしないかまたは不完全にマッチしたヌクレオチドを有することができる。各鎖は、1つまたは複数のニック（核酸骨格中の切断、例えば図1Bを参照）、ギャップ（1つまたは複数の欠けているヌクレオチドを含む断片化された鎖、例えば図1Cを参照）、および修飾されたヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を有してもよい。単にRNA分子における任意または全てのヌクレオチドは化学的に修飾され得るだけでなく、各鎖は、その機能性を高めるために1つまたは複数の部分、例えば1つまたは複数のペプチド、抗体、抗体断片、アプタマー、ポリマーなどとコンジュゲートされてもよい。

20

【0156】

一実施形態において、第1鎖は、第2鎖より少なくとも1nt長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20nt長い。別の実施形態において、第1鎖は、第2鎖より20～100nt長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より2～12nt長い。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より3～10nt長い。

30

【0157】

一実施形態において、第1鎖、または長い鎖は、5～100nt、または好ましくは10～30ntもしくは12～30nt、またはより好ましくは15～28ntの長さを有する。一実施形態において、第1鎖は、長さが21ヌクレオチドである。一実施形態において、第2鎖、または短い鎖は、3～30nt、または好ましくは3～29ntもしくは10～26nt、またはより好ましくは12～26ntの長さを有する。一実施形態において、第2鎖は、15ヌクレオチドの長さを有する。

40

【0158】

一実施形態において、二本鎖領域は、3～98bpの長さを有する。さらなる実施形態において、二本鎖領域は、5～28bpの長さを有する。なおさらなる実施形態において、二本鎖領域は、10～19bpの長さを有する。二本鎖領域の長さは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30bpとすることができる。

【0159】

50

一実施形態において、RNA分子の二本鎖領域は、いずれのミスマッチまたはバルジも含まず、2本の鎖は、二本鎖領域内で互いに完全に相補的である。別の実施形態において、RNA分子の二本鎖領域は、ミスマッチおよび/またはバルジを含む。

【0160】

一実施形態において、末端突出は1~10ヌクレオチドである。さらなる実施形態において、末端突出は1~8ヌクレオチドである。別の実施形態において、末端突出は3ntである。

【0161】

2.1. 5'突出および3'突出の両方を有する二重鎖RNA分子

図1Aを参照すると、本発明の一実施形態において、二本鎖RNA分子は、第1鎖上に5'突出および3'突出の両方を有する。RNA分子は、第1鎖および第2鎖を含み、第1鎖と第2鎖は、実質的に相補性の配列を有する少なくとも1つの二本鎖領域を形成し、第1鎖は、第2鎖より長い。第1鎖上で、二本鎖領域に隣接して、5'末端および3'末端の両方上に非対応の突出が存在する。

【0162】

一実施形態において、第1鎖は、第2鎖より少なくとも2nt長い。さらなる実施形態において、第1鎖は第2鎖より少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20nt長い。別の実施形態において、第1鎖は、第2鎖より20~100nt長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より2~12nt長い。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より3~10nt長い。

【0163】

一実施形態において、第1鎖は、5~100ntの長さを有する。さらなる実施形態において、第1鎖は、5~100ntの長さを有し、第2鎖は、3~30ヌクレオチドの長さを有する。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、5~100ntの長さを有し、第2鎖は、3~18ヌクレオチドの長さを有する。

【0164】

一実施形態において、第1鎖は、10~30ヌクレオチドの長さを有する。さらなる実施形態において、第1鎖は、10~30ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は、3~28ヌクレオチドの長さを有する。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、10~30ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は、3~19ヌクレオチドの長さを有する。

【0165】

一実施形態において、第1鎖は、12~26ヌクレオチドの長さを有する。さらなる実施形態において、第1鎖は、12~26ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は、10~24ヌクレオチドの長さを有する。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、12~26ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は、10~19ヌクレオチドの長さを有する。

【0166】

一実施形態において、第1鎖は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ntの長さを有する。別の実施形態において、第2鎖は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28ntの長さを有する。

【0167】

一実施形態において、第1鎖は、21ntの長さを有し、第2鎖は、15ntの長さを有する。

【0168】

一実施形態において、3'突出は、1~10ntの長さを有する。さらなる実施形態において、3'突出は、1~8ntの長さを有する。なおさらなる実施形態において、3'突出は、2~6ntの長さを有する。一実施形態において、3'突出は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ntの長さを有する。

## 【0169】

一実施形態において、5'突出は、1~10 ntの長さを有する。さらなる実施形態において、5'突出は、1~6 ntの長さを有する。なおさらなる実施形態において、5'突出は、2~4 ntの長さを有する。一実施形態において、5'突出は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 ntの長さを有する。

## 【0170】

一実施形態において、3'突出の長さは、5'突出の長さに等しい。別の実施形態において、3'突出は、5'突出より長い。代替の実施形態において、3'突出は、5'突出より短い。

## 【0171】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、約15 ntの実質的に相補性の配列の二本鎖領域、3 ntの3'突出、および3 ntの5'突出を含む。第1鎖は21 ntであり、第2鎖は15 ntである。一特徴では、様々な実施形態の二本鎖領域は、完全に相補性の配列からなる。代替の特徴では、二本鎖領域は、少なくとも1つのニック(図1B)、ギャップ(図1C)、および/またはミスマッチ(バルジもしくはループ)を含む。

## 【0172】

一実施形態において、二本鎖領域は、3~98 bpの長さを有する。さらなる実施形態において、二本鎖領域は、5~28 bpの長さを有する。なおさらなる実施形態において、二本鎖領域は、10~19 bpの長さを有する。二本鎖領域の長さは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30 bpとすることができる。2つ以上の二本鎖領域が存在することができる。

## 【0173】

一実施形態において、第1鎖はアンチセンス鎖であり、これは、切断によるかまたは翻訳抑制による遺伝子サイレンシングのために、メッセンジャーRNA(mRNA)などの実質的に相補性の遺伝子転写物を標的にすることができる。

## 【0174】

また、本発明は、18~23ヌクレオチドの長さを有する第1鎖、および12~17ヌクレオチドの長さを有する第2鎖を含む二重鎖RNA分子を提供し、ここで、第2鎖は、第1鎖と実質的に相補的であり、第1鎖とともに二本鎖領域を形成し、第1鎖は、1~9ヌクレオチドの3'突出、1~8ヌクレオチドの5'突出を有し、前記二重鎖RNA分子は、真核生物細胞において選択的遺伝子サイレンシングをもたらすことができる。一実施形態において、第1鎖は、標的mRNA配列と実質的に相補的である配列を含む。

## 【0175】

一実施形態において、第1鎖は、長さが20、21、または22ヌクレオチドである。別の実施形態において、第2鎖は、長さが14、15、または16ヌクレオチドである。

## 【0176】

一実施形態において、第1鎖は、長さが21ヌクレオチドであり、第2鎖は、長さが15ヌクレオチドである。さらなる実施形態において、第1鎖は、1、2、3、4、5、または6ヌクレオチドの3'突出を有する。なおさらなる実施形態において、第1鎖は3ヌクレオチドの3'突出を有する。

## 【0177】

2.2. 第一鎖に平滑末端、および5'突出または3'突出を有する二重鎖RNA分子

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、二本鎖領域、平滑末端、および5'突出または3'突出を含む(例えば、図2Aおよび2Bを参照されたい)。このRNA分子は、第1鎖および第2鎖を含み、第1鎖と第2鎖は、二本鎖領域を形成し、第1鎖は、第2鎖より長い。

## 【0178】

一実施形態において、二本鎖領域は、3~98 bpの長さを有する。さらなる実施形態

10

20

30

40

50

において、二本鎖領域は、5 ~ 28 b p の長さを有する。なおさらなる実施形態において、二本鎖領域は、10 ~ 18 b p の長さを有する。二本鎖領域の長さは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30 b p とすることができる。この二本鎖領域は、他の実施形態に関して記載したものと同様の特徴を有することができ、必ずしもここで繰り返されない。例えば、二本鎖領域は、完全に相補性の配列からなり、または少なくとも1つのニック、ギャップ、および/またはミスマッチ（バルジまたはループ）を含むことができる。

#### 【0179】

一実施形態において、第1鎖は、第2鎖より少なくとも1 n t 長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20 n t 長い。別の実施形態において、第1鎖は、第2鎖より20 ~ 100 n t 長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より2 ~ 12 n t 長い。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より4 ~ 10 n t 長い。

10

#### 【0180】

一実施形態において、第1鎖は、5 ~ 100 n t の長さを有する。さらなる実施形態において、第1鎖は、5 ~ 100 n t の長さを有し、第2鎖は、3 ~ 30ヌクレオチドの長さを有する。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、10 ~ 30 n t の長さを有し、第2鎖は、3 ~ 19ヌクレオチドの長さを有する。別の実施形態において、第1鎖は、12 ~ 26ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は、10 ~ 19ヌクレオチドの長さを有する。

20

#### 【0181】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、二本鎖領域、平滑末端、および3'突出を含む（例えば、図2Bを参照されたい）。

#### 【0182】

一実施形態において、3'突出は、1 ~ 10 n t の長さを有する。さらなる実施形態において、3'突出は、1 ~ 8 n t の長さを有する。なおさらなる実施形態において、3'突出は、2 ~ 6 n t の長さを有する。一実施形態において、3'突出は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 n t の長さを有する。

30

#### 【0183】

代替の実施形態において、二重鎖RNA分子は、二本鎖領域、平滑末端、および5'突出を含む（例えば、図2Aを参照されたい）。

#### 【0184】

一実施形態において、5'突出は、1 ~ 10 n t の長さを有する。さらなる実施形態において、5'突出は、1 ~ 6 n t の長さを有する。なおさらなる実施形態において、5'突出は、2 ~ 4 n t の長さを有する。一実施形態において、5'突出は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 n t の長さを有する。

#### 【0185】

2. 3. 2つの5'突出、または2つの3'突出を有する二重鎖RNA分子

40

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、二本鎖領域、および2つの3'突出、または2つの5'突出を含む（例えば、図2Cおよび2Dを参照されたい）。RNA分子は、第1鎖および第2鎖を含み、第1鎖と第2鎖は、二本鎖領域を形成し、第1鎖は、第2鎖より長い。

#### 【0186】

一実施形態において、二本鎖領域は、3 ~ 98 b p の長さを有する。さらなる実施形態において、二本鎖領域は、5 ~ 28 b p の長さを有する。なおさらなる実施形態において、二本鎖領域は、10 ~ 18 b p の長さを有する。二本鎖領域の長さは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30 b p とすることができる。

50

## 【0187】

一実施形態において、第1鎖は、第2鎖より少なくとも1 nt 長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20 nt 長い。別の実施形態において、第1鎖は、第2鎖より20～100 nt 長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より2～12 nt 長い。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖より4～10 nt 長い。

## 【0188】

一実施形態において、第1鎖は、5～100 nt の長さを有する。さらなる実施形態において、第1鎖は、5～100 nt の長さを有し、第2鎖は、3～30ヌクレオチドの長さを有する。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、10～30 nt の長さを有し、第2鎖は、3～18ヌクレオチドの長さを有する。別の実施形態において、第1鎖は、12～26ヌクレオチドの長さを有し、第2鎖は、10～16ヌクレオチドの長さを有する。

10

## 【0189】

代替の実施形態において、二重鎖RNA分子は、二本鎖領域、および2つの3'突出を含む（例えば、図2Cを参照されたい）。この二本鎖領域は、他の実施形態に関して記載したのと同様の特徴を有する。

## 【0190】

一実施形態において、3'突出は、1～10 nt の長さを有する。さらなる実施形態において、3'突出は、1～6 nt の長さを有する。なおさらなる実施形態において、3'突出は、2～4 nt の長さを有する。一実施形態において、3'突出は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 nt の長さを有する。

20

## 【0191】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、二本鎖領域、および2つの5'突出を含む（例えば、図2Dを参照されたい）。

## 【0192】

一実施形態において、5'突出は、1～10 nt の長さを有する。さらなる実施形態において、5'突出は、1～6 nt の長さを有する。なおさらなる実施形態において、5'突出は、2～4 nt の長さを有する。一実施形態において、3'突出は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 nt の長さを有する。

30

## 【0193】

## 3. aiRNA の設計

siRNA および miRNA は、研究手段として広く使用され、薬剤候補として開発される。（例えば、Dykxhoorn、Novina & Sharp、Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4巻：457～467頁（2003年）；Kim & Rossi、Nature Rev. Genet. 8巻：173～184頁（2007年）；de Fougereollesら Nature Rev. Drug Discov. 6巻：443～453頁（2007年）；Czech、NEJM 354巻：1194～1195頁（2006年）；およびMack、Nature Biotech. 25巻：631～638頁（2007年）を参照されたい）。本発明の二重鎖RNA分子、すなわち、aiRNA は、当分野で既知のsiRNA および miRNA から導出することができる。

40

## 【0194】

本発明は、siRNA または miRNA を変換して aiRNA にする方法を提供する。この変換は、最初の分子と比較して改善された、少なくとも1つの特性を有する、新しい二重鎖RNA分子をもたらす。この特性は、サイズ、効力（efficacy）、効能（potency）、開始速度、耐久性、合成費用、オフターゲット効果、インターフェロン応答、または送達とすることができる。

## 【0195】

50

一実施形態において、最初の分子は、*siRNA*などの二重鎖RNA分子である。二重鎖RNA分子は、少なくとも1つの二本鎖領域を形成する、アンチセンス鎖（例えば、ガイド鎖）およびセンス鎖（例えば、パッセンジャー鎖）を含む。この方法は、アンチセンス鎖がセンス鎖より長いように一方または両方の鎖の長さを変更するステップを含む。一実施形態において、センスパッセンジャー鎖が短縮される。別の実施形態において、アンチセンスガイド鎖が伸長される。なおさらなる実施形態において、センス鎖が短縮され、アンチ鎖が伸長される。無傷またはサイズが変更されたアンチセンスおよびセンスRNA鎖は、合成し、*aiRNA*分子が形成される条件下で組み合わせることができる。

【0196】

さらなる実施形態において、この方法は、二重鎖RNA分子が、1～6ヌクレオチドの3'突出、および1～6ヌクレオチドの5'突出のうちの少なくとも1つを有して形成されるように、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖の長さを変更するステップを含む。

【0197】

あるいは、本発明の二重鎖RNA分子は、新規に設計することができる。本発明の二重鎖RNA分子は、遺伝子ウォークの方法などの、*siRNA*および*miRNA*のための設計方法を利用して設計することができる。

【0198】

本発明のRNA分子は、バイオインフォマティクス手法を用いて設計し、次いで*in vitro*および*in vivo*で試験することによって、標的遺伝子に対するその調節効力、および任意のオフターゲット効果の存在を判定することができる。これらの研究に基づいて、次いでRNA分子の配列を選択し、修飾することによって、標的遺伝子に対する調節効力を改善し、オフターゲット効果を最小限にすることができる。（例えば、*Patzel, Drug Discovery Today* 12巻：139～148頁（2007年）を参照されたい）。

【0199】

3.1. 二重鎖RNA分子中の非対応領域またはミスマッチ領域

*aiRNA*二重鎖の2つの一本鎖は、例えば、1つまたは複数のミスマッチを含む、少なくとも1つの非対応の領域、または不完全に対応した領域を有することができる。一実施形態において、非対応の、または不完全に対応した領域は、平滑末端を有する末端領域、3'-凹部または5'突出を有する末端領域、および5'凹部または3'突出を有する末端領域を含めた、RNA分子の少なくとも1つの末端領域である。本明細書で使用する場合、末端領域は、1つの末端および隣接する範囲を含む、RNA分子の領域である。

【0200】

一実施形態において、非対応の領域、または不完全に対応した領域は、*aiRNA*分子の二本鎖領域内にある。さらなる実施形態において、非対称性RNA二重鎖は、非対応のバルジまたはループ構造を有する。

【0201】

3.2. 二重鎖RNA分子内の配列モチーフ

本発明の*aiRNA*分子の設計において、総GC含量は変化し得る。一実施形態において、二本鎖領域のGC含量は、20～70%である。さらなる実施形態において、G-C対形成は、A-U対形成より強いので、鎖の分離をより容易にするために、二本鎖領域のGC含量は、50%未満、または好ましくは30～50%である。

【0202】

末端の突出でのヌクレオチド配列、いくつかの実施形態において、例えば、5'末端は、任意の鑄型配列（例えば、標的mRNA配列）から独立に設計することができ、すなわち、標的mRNA（*siRNA*または*miRNA*模倣剤の場合）、または標的*miRNA*（*miRNA*阻害剤の場合）と実質的に相補的である必要はない。一実施形態において、より長い鎖またはアンチセンス鎖の、例えば5'または3'での突出は、「AA」、「UU」または「dTdT」モチーフを有し、これは、いくつかの他のモチーフと比較して、効力の増大を示した。一実施形態において、より長い鎖またはアンチセンス鎖の5'突出



は、「AA」モチーフを有する。別の実施形態において、より長い鎖またはアンチセンス鎖の3'突出は、「UU」モチーフを有する。

【0203】

3.3.ヌクレオチド置換

本発明のRNA分子内のヌクレオチドの1つまたは複数は、デオキシヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と置換することができる。置換は、RNA分子内のどこにおいても、例えば、一方もしくは両方の突出領域、および/または二本鎖領域で起こり得る。場合によっては、置換により、RNA分子の物理的特性、例えば、鎖親和性、溶解度、およびRNAse劣化に対する抵抗力、または別の方法で増強された安定性が増強される。

10

【0204】

一実施形態において、修飾ヌクレオチドまたは類似体は、糖修飾リボヌクレオチド、骨格修飾リボヌクレオチド、および/または塩基修飾リボヌクレオチドである。骨格修飾リボヌクレオチドは、別のリボヌクレオチドとのホスホジエステル結合内の修飾を有することができる。一実施形態において、RNA分子内のホスホジエステル結合は、修飾されることによって、少なくとも1個の窒素ヘテロ原子および/または硫黄ヘテロ原子を含む。一実施形態において、修飾ヌクレオチドまたは類似体は、非天然(unusual)塩基または修飾塩基である。一実施形態において、修飾ヌクレオチドまたは類似体は、イノシン、またはトリチル化塩基である。

20

【0205】

さらなる実施形態において、ヌクレオチド類似体は、糖修飾リボヌクレオチドであり、この中で2'-OH基は、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、およびCNからなる群から選択される基によって置換され、各Rは、C1~C6アルキル、アルケニルおよびアルキニルからなる群から独立に選択され、ハロは、F、Cl、Br、およびIからなる群から選択される。

【0206】

一実施形態において、ヌクレオチド類似体は、ホスホチオエート基を含む骨格修飾リボヌクレオチドである。

【0207】

4.有用性

30

また、本発明は、細胞または生物における遺伝子発現を調節する方法を提供する(サイレンシング法)。この方法は、選択的遺伝子サイレンシングを行うことができる条件下で前記細胞または生物を二重鎖RNA分子と接触させるステップ、二本鎖RNAに実質的に対応する配列部分を有する標的核酸に対して、前記二重鎖RNA分子により実施される選択的遺伝子サイレンシングを媒介するステップとを含む。

【0208】

一実施形態において、接触するステップは、選択的遺伝子サイレンシングを行うことができる培養物または生物中の標的細胞に前記二本鎖RNA分子を導入するステップを含む。さらなる実施形態において、導入するステップは、トランスフェクション、リポフェクション、感染、エレクトロポレーション、または他の送達技術を含む。

40

【0209】

一実施形態において、サイレンシング法は、細胞または生物の遺伝子の機能または有用性を決定するために用いられる。

【0210】

サイレンシング法は、細胞または生物における遺伝子の発現を調節するために用いることができる。一実施形態において、その遺伝子は、疾患、例えばヒト疾患もしくは動物疾患、病態、または望ましくない状態と関係する。さらなる実施形態において、その遺伝子は、病原微生物の遺伝子である。なおさらなる実施形態において、その遺伝子はウイルス遺伝子である。別の実施形態において、その遺伝子は腫瘍関連遺伝子である。

【0211】

50

代替の実施形態において、遺伝子は、自己免疫疾患、炎症性疾患、変性疾患、感染性疾患、増殖性疾患、代謝性疾患、免疫媒介性障害、アレルギー性疾患、皮膚疾患、悪性疾患、消化管障害、呼吸器障害、心血管障害、腎障害、リウマチ障害、神経障害、内分泌障害、および老化と関連する遺伝子である。

#### 【0212】

##### 4.1 研究手段

本発明のRNA分子は、遺伝子機能を発見するための遺伝子操作されたノックアウトモデルとは対照的に、動物モデルにおける遺伝子の「ノックダウン」を作るために用いることができる。また、この方法は、*in vitro*において遺伝子をサイレンシングするために用いることができる。例えば、*aiRNA*を細胞にトランスフェクトすることができる。*aiRNA*は、薬剤研究および開発における、薬物標的/経路同定および検証、ならびに他の生物医学研究における研究ツールとして1に用いることができる。

10

#### 【0213】

##### 4.2 治療的使用

本発明のRNA分子は、(Czech、2006年；de Fougèresら、2007年；Dykxhoornら、2003年；KimおよびRossi、2007年；MacK、2007年)に要約された疾患を含む様々な疾患または望ましくない状態の治療およびまたは予防のために用いることができる。

#### 【0214】

一実施形態において、本発明は、癌治療として、または癌を予防するために用いることができる。本発明のRNA分子を用いて、細胞増殖または他の癌表現型と関連した遺伝子をサイレンシングするかまたはノックダウンさせることができる。これらの遺伝子の例は、*k-Ras*、*p53*-カテニン、*Nbs1*、*EF2*、*Stat3*、*PTEN*、*p70S6K*、*mTOR*、*Rsk1*、*PCNA*、*Parp1*、*サバイビン*、*NQO1*、および*p21*である。具体的には、*k-Ras*および*p53*-カテニンは、結腸癌の治療遺伝子である。これらの癌遺伝子は活性であり、多数の臨床症例に関係している。

20

#### 【0215】

また、これらのRNA分子を用いて、非癌遺伝子標的をサイレンシングするかまたはノックダウンさせることができる。また、本発明のRNA分子は、眼疾患(例えば、加齢黄斑変性(*AMD*)および糖尿病性網膜症(*DR*))；感染症(例えば、*HIV/AIDS*、*B型肝炎ウイルス(HBV)*、*C型肝炎ウイルス(HCV)*、*ヒトパピローマウイルス(HPV)*、*単純疱疹ウイルス(HSV)*、*RCV*、*サイトメガロウイルス(CMV)*、*デング熱*、*ウェストナイルウイルス*)；呼吸器疾患(例えば、呼吸器合胞体ウイルス(*RSV*)、*喘息*、*嚢胞性線維症*)；神経系疾患(例えば、*ハンチントン病(HD)*、*筋萎縮性側索硬化症(ALS)*、*脊髄損傷*、*パーキンソン病*、*アルツハイマー病*、*疼痛*)；心血管疾患；代謝性疾患(例えば、*糖尿病*)；遺伝病；ならびに炎症状態(例えば、*炎症性腸疾患(IBD)*、*関節炎*、*リウマチ様疾患*、*自己免疫障害*)、皮膚疾患を治療または予防するために用いることができる。

30

#### 【0216】

様々な遺伝子は、本発明の非対称性二重鎖RNA分子を用いてサイレンシングすることができる。一実施形態において、第1鎖は、発生遺伝子、癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、および酵素遺伝子、ならびに接着分子、サイクリンキナーゼインヒビター、*Wnt*ファミリーメンバー、*Pax*ファミリーメンバー、*ウイングドヘリックスファミリーメンバー*、*Hox*ファミリーメンバー、*サイトカイン/リンホカイン*またはその受容体、*成長/分化因子*またはその受容体、*神経伝達物質*またはその受容体、*ABL1*、*BCL1*、*BCL2*、*BCL6*、*CBFA2*、*CBL*、*CSF1R*、*ERBA*、*ERBB*、*EBRB2*、*ETS1*、*ETS2*、*ETV6*、*FGR*、*FOS*、*FYN*、*HCR*、*HRAS*、*JUN*、*KRAS*、*LCK*、*LYN*、*MDM2*、*MLL*、*MYB*、*MYC*、*MYCL1*、*MYCN*、*NRAS*、*PIM1*、*PML*、*RET*、*SRC*、*TAL1*、*TCL3*および*YES*)(例えば、*APC*、*BRC A1*、*BRC A2*、*MADH4*、*MCC*、*NF1*、*NF2*、*RB1*、*T*

40

50

P 5 3、W T 1、A C P デサチュラーゼまたはヒドロキシラーゼ、A D P - グルコースピロホリラーゼ、A T a s e、アルコールデヒドロゲナーゼ、アミラーゼ、アミログルコシダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、シクロオキシゲナーゼ、デカルボキシラーゼ、デキストリナーゼ、D N A もしくは R N A ポリメラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコースオキシダーゼ、G T P a s e、ヘリカーゼ、ヘミセルラーゼ、インテグラーゼ、インペルターゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ラクターゼ、リパーゼ、リボキシゲナーゼ、リゾチーム、ペクチンエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、ホスホリラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテインナーゼまたはペプチダーゼ、プルラーナーゼ、リコンビナーゼ、逆転写酵素、トポイソメラーゼ、キシラナーゼ、k - R A S、- カテニン、R s k 1、P C N A、p 7 0 S 6 K、サバイビン、m T O R、P T E N、P a r p 1、または p 2 1 の遺伝子からなる群から選択される遺伝子の標的 m R N A 配列と実質的に相補的である配列を含む。

#### 【 0 2 1 7 】

本発明は、疾患または望ましくない状態を治療するための方法を提供する。この方法は、疾患または望ましくない状態と関連した遺伝子の遺伝子サイレンシングをもたらすための非対称性二重鎖 R N A 分子を用いることを含む。

#### 【 0 2 1 8 】

##### 4 . 3 薬剤への R N A 分子 ( a i R N A ) の変換

##### 4 . 3 . 1 R N A 分子の修飾

裸の R N A 分子は、相対的に不安定であり、i n v i v o では相対的に速やかに分解され得る。化学的修飾は、本発明の R N A 分子に導入され、R N A 分子の半減期を改善し、さらには、R N A 分子の生物活性を低下させずに遺伝子標的化の非特異的な作用のリスクを低下させることができる。

#### 【 0 2 1 9 】

R N A 分子の修飾は、アンチセンス R N A、リボザイム、アプタマー、および R N A i を含む様々な R N A 分子の安定性を改善するために調査されている ( C h i u および R a n a、2 0 0 3 年；C z a u d e r n a ら、2 0 0 3 年；d e F o u g e r o l l e s ら、2 0 0 7 年；K i m および R o s s i、2 0 0 7 年；M a c k、2 0 0 7 年；Z h a n g ら、2 0 0 6 年；ならびに S c h m i d t、N a t u r e B i o t e c h .、2 5 巻：2 7 3 ~ 2 7 5 頁 ( 2 0 0 7 年 ) ) 。

#### 【 0 2 2 0 】

当業者に既知の任意の安定化修飾を使用することによって、本発明の R N A 分子の安定性を改善することができる。本発明の R N A 分子内で、化学修飾は、リン酸骨格 ( 例えば、ホスホロチオエート連結 )、リボース ( 例えば、ロックされた核酸、2 ' - デオキシ - 2 ' - フルオロウリジン、2 ' - O - メチル ( m t h y l ) )、および / または塩基 ( 例えば、2 ' - フルオロピリミジン ) に導入することができる。そのような化学修飾のいくつかの例を以下に要約する。

#### 【 0 2 2 1 】

血清中でエンドヌクレアーゼ活性に対する抵抗力を増大させる、2 ' - O - メチルプリンおよび 2 ' - フルオロピリミジンなどの、リボースの 2 ' 位での化学修飾を採用することによって、本発明の R N A 分子を安定化することができる。修飾を導入するための位置は、R N A 分子のサイレンシング効力を著しく低減することを回避するために、慎重に選択されるべきである。例えば、ガイド鎖の 5 ' 末端上の修飾は、サイレンシング活性を低減し得る。一方、2 ' - O - メチル修飾を、二本鎖領域での 2 本の R N A 鎖の間に交互に配置することによって、遺伝子サイレンシング効力を保存しながら安定性を改善することができる。2 ' - O - メチル修飾は、インターフェロンの誘発を排除または低減することもできる。

#### 【 0 2 2 2 】

別の安定化修飾は、ホスホロチオエート ( P = S ) 連結である。例えば、3 ' 突出での、R N A 分子中へのホスホロチオエート ( P = S ) 連結の導入は、エキソヌクレアーゼに

10

20

30

40

50

対する保護を提供することができる。

【0223】

RNA分子中へのデオキシリボヌクレオチドの導入も、製造費用を低減し、安定性を増大させることができる。

【0224】

一実施形態において、3'突出、5'突出、またはその両方が、劣化に対して安定化される。一実施形態において、RNA分子は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドまたはその類似体を含む。さらなる実施形態において、修飾リボヌクレオチドは、その糖、骨格、塩基、またはこの3つの任意の組合せにおいて修飾される。

【0225】

一実施形態において、ヌクレオチド類似体は、糖修飾リボヌクレオチドである。さらなる実施形態において、ヌクレオチド類似体の2'-OH基は、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、またはCNから選択される基によって置換され、各Rは独立に、C1~C6アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、ハロは、F、Cl、BrまたはIである。

【0226】

代替の実施形態において、ヌクレオチド類似体は、ホスホチオエート基を含む骨格修飾リボヌクレオチドである。

【0227】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、少なくとも1つのデオキシヌクレオチドを含む。さらなる実施形態において、第1鎖は、1~6つのデオキシヌクレオチドを含む。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、1~3つのデオキシヌクレオチドを含む。別の実施形態において、3'突出は、1~3つのデオキシヌクレオチドを含む。さらなる実施形態において、5'突出は、1~3つのデオキシヌクレオチドを含む。代替の実施形態において、第2鎖は1~5つのデオキシヌクレオチドを含む。

【0228】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、少なくとも1つのデオキシヌクレオチドを含む3'突出または5'突出を含む。別の実施形態において、RNAの3'突出および/または5'突出は、デオキシヌクレオチドからなる。

【0229】

一実施形態において、二重鎖RNA分子は、実体とコンジュゲートしている。さらなる実施形態において、実体は、ペプチド、抗体、ポリマー、脂質、オリゴヌクレオチド、およびアプタマーからなる群から選択される。

【0230】

別の実施形態において、第1鎖と第2鎖は、化学リンカーによって結合されている。

【0231】

4.4. RNA分子の*in vivo*送達

RNAiの治療用途にとっての1つの主な障害は、標的細胞への*siRNA*の送達である(ZamoreおよびAronin(2003年))。様々な手法が、RNA分子、特に*siRNA*分子の送達のために開発された(例えば、(de Fougères et al., 2007; Dykxhoorn et al., 2003年; Kim and Rossi, 2007年)。当業者に既知の任意の送達手法を、本発明のRNA分子の送達のために使用することができる。

【0232】

送達における主な問題点として、血清中の不安定性、非特異的な分布、組織障壁、および非特異的なインターフェロン応答が挙げられる(Lu & Woodlee, Methods in Mol Biology 437巻: 93~107頁(2008年))。その*siRNA*および*miRNA*対応物と比較して、*aiRNA*分子はいくつかの利点を有し、これは、より広い範囲の方法を送達目的のために利用可能にするはずである。第1に、*aiRNA*は、その*siRNA*および*miRNA*対応物より小さいように設計すること

10

20

30

40

50

ができ、したがって、任意のインターフェロン応答を低減または排除することができる。第2に、*a i R N A*は、より強力であり、より速く開始し、より有効であり、より長く持続し、したがって、治療目的を実現するのに、より少ない量/投与量の*a i R N A*を必要とする。第3に、*a i R N A*は二本鎖であり、一本鎖のアンチセンスオリゴおよび*m i R N A*より安定であり、これらは、化学的にさらに修飾されることによって、安定性を増強することができる。したがって、本発明の*R N A*分子は、様々な全身的または局所的な送達経路を介して対象中に送達することができる。いくつかの実施形態において、本発明の分子は、静脈内（*I . V .*）および腹腔内（*i p*）を含む全身送達経路を介して送達される。他の実施形態において、本発明の分子は、局所的な送達経路、例えば、鼻腔内、硝子体内、気管内、脳内、筋肉内、関節内、および腫瘍内を介して送達される。

10

#### 【0233】

送達技術の例として、裸の*R N A*分子の直接注射、コレステロールなどの天然リガンドへの*R N A*分子の結合、またはアプタマー、リボソーム調合送達、および抗体-プロタミン融合タンパク質への非共有結合が挙げられる。他の担体の選択肢には、正に帯電した担体（例えば、陽イオン性の脂質およびポリマー）ならびに様々なタンパク質担体が含まれる。一実施形態において、本発明の分子の送達は、陽イオン性リボソーム複合体またはポリマー複合体系に基づくりガンド標的送達系を使用する（*Woodleら J Cont rol Release* 74巻：309～311頁；*Songら Nat Biote ch nol .* 23巻（6号）：709～717頁（2005年）；*Morrisseyら Nat Biote ch nol .* 23巻（8号）：1002～1007頁（2005年））。

20

#### 【0234】

一実施形態において、本発明の分子は、*i n v i v o*送達のために、コラーゲン担体、例えば、アテロコラーゲンと製剤化される。アテロコラーゲンは、*s i R N A*を*R N a s e*によって消化されることから保護し、徐放を可能にすることが報告されている（*Minakuchiら Nucleic Acids Res .* 32巻：e109頁（2004年）；*Takeiら Cancer Res .* 64巻：3365～3370頁（2004年））。別の実施形態において、本発明の分子は、ナノ粒子と製剤化され、またはナノエマルジョン、例えば、*R G D*ペプチドリガンド標的ナノ粒子を形成する。異なる*s i R N A*オリゴを、同じ*R G D*リガンド標的ナノ粒子中で混合することによって、いくつかの遺伝子を同時に標的にすることができることが示された（*Woodleら Mate r i a l s Today* 8巻（補遺1）：34～41頁（2005年））。

30

#### 【0235】

ウイルスベクターも、本発明の*R N A*分子の送達のために使用することができる。一実施形態において、レンチウイルスベクターが、安定な発現のためにゲノムに組み込む*R N A*分子導入遺伝子を送達するために使用される。別の実施形態において、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス（*A A V*）が、ゲノムに組み込まれないで、エピソーム発現を有する*R N A*分子導入遺伝子を送達するために使用される。

#### 【0236】

さらに、本発明の*R N A*分子の送達のために、細菌を使用することができる。（*Xiangら、*（2006年））。

40

#### 【0237】

##### 5. 医薬組成物および製剤

本発明は、医薬組成物をさらに提供した。医薬組成物は、活性薬剤として、少なくとも1つの非対称性二重鎖*R N A*分子と、医薬的担体、正電荷担体、リボソーム、タンパク質担体、ポリマー、ナノ粒子、ナノ乳剤、脂質、およびリポイドからなる群から選択される1つまたは複数の担体とを含む。一実施形態において、この組成物は、診断的適用、または治療的適用のためのものである。

#### 【0238】

本発明の医薬組成物および製剤は、*R N A*成分を除いて、*s i R N A*、*m i R N A*、お

50

よびアンチセンスRNAに対して開発された医薬組成物および製剤と同じであるか、同様であってもよい(de Fougères et al., 2007年; Kim and Rossi, 2007年)。医薬組成物および製剤中のsiRNA、miRNA、およびアンチセンスRNAは、本情報の二重鎖RNA分子によって置換することができる。医薬組成物および製剤は、さらに改変することによって、本情報の二重鎖RNA分子に適応させることもできる。

#### 【0239】

開示された二重鎖RNA分子の「薬学的に許容される塩」または「塩」は、イオン結合を含む開示された二重鎖RNA分子の生成物であり、一般に、開示された二重鎖RNA分子を、対象に投与するのに適した酸または塩基と反応させることによって生成される。薬学的に許容される塩として、それだけに限らないが、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、アルキルスルホン酸塩、アリールスルホン酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、乳酸塩、および酒石酸塩を含めた酸付加塩; Na、K、Liなどのアルカリ金属陽イオン、MgまたはCaなどのアルカリ土類金属塩、または有機アミン塩を挙げることができる。

#### 【0240】

「医薬組成物」は、対象への投与に適した形態での、開示された二重鎖RNA分子を含む製剤である。一実施形態において、医薬組成物は、バルクまたは単位剤形である。単位剤形は、例えば、カプセル、IVバッグ、錠剤、エアロゾル吸入器上の単一ポンプ、またはバイアルを含めた様々な形態のいずれかである。単位用量の組成物中の活性成分(例えば、開示された二重鎖RNA分子またはその塩の製剤)の量は、有効量であり、関与する特定の治療によって変化する。当業者は、患者の年齢および状態に応じて、投与量に対して日常の変更を行うことが時折必要であることを理解するであろう。投与量は、投与経路にも依存する。様々な経路は、経口、肺性、直腸、非経口、経皮、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内などを含めて企図されている。本発明の二重鎖RNA分子の局所または経皮投与のための剤形として、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション剤、ゲル、溶液、パッチ、および吸入剤が挙げられる。一実施形態において、活性な二重鎖RNA分子は、滅菌条件下で、薬学的に許容される担体、および必要とされる任意の保存剤、緩衝液、または噴霧剤と混合される。

#### 【0241】

本発明は、必要としている対象に有効量の医薬組成物を投与するステップを含む治療方法を提供する。一実施形態において、医薬組成物は、iv、sc、局所、po、およびipからなる群から選択される経路を介して投与される。別の実施形態において、有効量は、1日あたり1ng~1g、1日あたり100ng~1g、または1日あたり1μg~1mgである。

#### 【0242】

本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤または担体と組み合わせた、本発明の二重鎖RNA分子を含む医薬製剤も提供する。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される賦形剤」または「薬学的に許容される担体」は、薬剤投与に適合性である、任意の、およびすべての溶媒、分散媒質、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれることが意図されている。適当な担体は、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy、20版」、Lippincott Williams & Wilkins、Philadelphia、PAに記載されており、これは、参照により本明細書に組み込まれている。そのような担体または希釈剤の例として、それだけに限らないが、水、食塩水、リンガー液、デキストロース溶液、および5%のヒト血清アルブミンが挙げられる。リポソームおよび固定油などの非水性のビヒクルも使用することができる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒質および作用剤の使用は、当技術分野で周知である。任意の従来の媒質または作用剤が、活性な二重鎖RNA分子と不適合である場合を除いて、組成物中のこれらの使用は企図されている。追加の活性な二重鎖RNA分子も、組成物中に組み込

むことができる。

【0243】

製剤のための方法は、PCT国際出願PCT/US02/24262(WO03/011224)、米国特許出願公開第2003/0091639号、および米国特許出願公開第2004/0071775号に開示されており、そのそれぞれは、本明細書に参照により組み込まれている。

【0244】

本発明の二重鎖RNA分子は、治療有効量（例えば、腫瘍増殖の阻害、腫瘍細胞の死滅、細胞増殖性障害の治療または予防などによる所望の治療効果を実現するのに十分な有効なレベル）の本発明の二重鎖RNA分子（活性成分として）を、従来の手順によって標準的な医薬担体または希釈剤と組み合わせることによって（すなわち、本発明の医薬組成物を製造することによって）調製された適当な剤形で投与される。これらの手順は、所望の製剤を得るために、適切な場合、成分の混合、顆粒化、および圧縮または溶解を伴う場合がある。別の実施形態において、治療有効量の本発明の二重鎖RNA分子は、標準的な医薬担体または希釈剤を含まない適当な剤形で投与される。

10

【0245】

薬学的に許容される担体として、固体担体、例えば、ラクトース、テラアルバ、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸などが挙げられる。例示的な液体担体として、シロップ、ラッカセイ油、オリーブ油、水などが挙げられる。同様に、担体または希釈剤として、当技術分野で既知の時間遅延物質、例えば、単独の、またはワックスを含むモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルメタクリレートなどを挙げることができる。他の充填剤、賦形剤、香味剤、および当技術分野で既知のものなどの他の添加剤も、本発明による医薬組成物中に含めることができる。

20

【0246】

本発明の活性な二重鎖RNA分子を含む医薬組成物は、一般に既知の様式で、例えば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣丸作製、湿式混合、乳化、カプセル封入、エントラッピング、または凍結乾燥プロセスによって製造することができる。医薬組成物は、活性な二重鎖RNA分子の薬学的に使用することができる製剤への加工を促進する賦形剤および/または助剤を含む、1つまたは複数の生理的に許容される担体を使用して、従来の様式で製剤化することができる。もちろん、適切な製剤は、選択される投与経路に依存する。

30

【0247】

本発明の二重鎖RNA分子または医薬組成物は、化学療法剤治療に対して現在使用されている、多くの周知の方法で対象に投与することができる。例えば、癌の治療のために、本発明の二重鎖RNA分子は、腫瘍中に直接注射し、血流もしくは体腔中に注射し、または経口服用し、またはパッチを用いて皮膚を介して適用することができる。乾癬状態の治療については、全身投与（例えば、経口投与）、または皮膚の患部への局所投与は、好適な投与経路である。選択される用量は、有効な治療となるのに十分であるが、容認できない副作用を生じるほど高くあるべきでない。患者の病状（例えば、癌、乾癬など）および健康は、治療の間、および治療後の妥当な期間密接にモニターされるべきである。

40

【実施例】

【0248】

本発明の様々な特徴をさらに例示するために、いくつかの実施例を以下に示す。これらの実施例は、本発明を実施するのに有用な方法も例示する。これらの実施例は、特許請求する本発明を制限しない。

【0249】

RNA干渉(RNAi)は真核生物における遺伝子特異的サイレンシングの触媒機構であり、生物学および医学に関して深い意味がある(Fireら、1998年)、12。RNAiは、3'突出を有する19~21塩基対(bp)の低分子干渉RNA(siRNA

50

)、RISCに進入しRNAiを媒介することが知られている最小RNA二重鎖(Elbashirら、2001a; Elbashirら、2001b; Elbashirら、2001c; Fireら、1998年; Zamoreら、2000年)を組み込む際に、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)によって媒介される(Hammondら、2000年、MartinezおよびTuschl、2004年; Rana、2007年)。RISC酵素複合体の天然基質として、siRNAをその様々な前駆体のDicer触媒的プロセッシングによって化学的に合成または作製することができる(DonzeおよびPicard、2002年; Hammondら、2000年; Kimら、2005年; Paddisonら、2002年)。遺伝子サイレンシングに広く使用されているが、siRNAは遺伝子サイレンシングにおいて哺乳動物細胞中の多数の遺伝子に対してサイレンシング効力が低く能力は限られている(de Fougereollesら、2007年; Iornsら、2007年)。ここで本発明者らは、哺乳動物細胞中の有効なRNAiメディエーターに関する構造的足場の要件を調べる。本発明者らが驚いたことに、本発明者らは、二重アンチセンス突出を有する14~15bpの非対称性RNA二重鎖は、哺乳動物細胞中の強力で有効な遺伝子サイレンシングを媒介することを発見した。3'および5'アンチセンス突出を有する14~15bpの二重鎖RNAによって構造的に特徴付けられる非対称性干渉RNA(aiRNA)を、siRNAより高い効率でRISCに組み込んだ。aiRNAは、哺乳動物細胞においてmRNAの配列特異的切断および標的遺伝子サイレンシングを引き起こした。 - カテニンのmRNAの同一配列を標的化したとき、aiRNAは、in vitroでの遺伝子サイレンシングの媒介において、siRNAより有効(ほぼ100%)、強力(ピコM)、急激な発生(24時間以内)および持続的(1週間まで)であった。これらの結果は、aiRNAが、RISCに組み込まれた最小RNA二重鎖足場であって、かつ哺乳動物細胞においてsiRNAより良い効率で遺伝子をサイレンシングする非siRNA型のRNAiメディエーターであることを示唆する。したがって、aiRNAは広範囲のRNAiの適用例に有意な可能性を有し得る。

#### 【0250】

方法および材料

細胞培養および試薬

HeLa、SW480、DLD1、HT29、およびH1299細胞をATCCから入手し、10%のウシ胎児血清(FBS)、100単位/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシンおよび2mMのL-グルタミン(Invitrogen)を含有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で培養した。新鮮な末梢血単核細胞(PBMC)はAllCells LLCから得て、10%FBSおよびペニシリン/ストレプトマイシンを含有するRPMI-1640培地(Invitrogen)中に維持した。この試験中に記載する小RNAはDharmacon、Qiagen、またはIntegrated DNA技術(表2)によって合成され、製造者の説明書に従いアニーリングした(図3a)。ヒトAgO2を標的とするsiRNA、およびDicer(Ambion)は100nMで使用した。RNAのトランスフェクションは示した濃度でDharmaFECT1(Dharmacon)を使用して実施した。ヒトArgonaut 2(Ago2)発現ベクター(Origene)は、リポフェクタミン2000(Invitrogen)を使用してトランスフェクトした。血清中安定性は、示した時間量のaiRNA二重鎖またはsiRNA二重鎖を10%ヒト血清(Sigma)とともにインキュベーション、次に非変性TBE-アクリルアミドゲル電気泳動および臭化エチジウム染色によって決定した。

#### 【0251】

ノーザンブロット分析。

#### 【0252】

- カテニンのレベルを決定するために、様々な時間時点でsiRNAまたはaiRNAトランスフェクトHeLa細胞からTRIzol(Invitrogen)を用いて全RNAを抽出した。20μgの全細胞RNAを変性アガロースゲルのそれぞれのレーンに



載せた。電気泳動後、RNAはHybond-XLナイロン膜(Amersham Biosciences)に移し、UV架橋させ、30分間80℃で焼いた。β-カテニンおよびアクチンmRNAを検出するプローブを、β-カテニンcDNA断片(1~568 nt)およびアクチンcDNA断片(1~500 nt)から、Prime-It IIランダムプライマー標識キット(Stratagene)を使用して調製した。小RNAのRISCローディングを分析するために、pCMV-Ago2を用いたトランスフェクション後48時間でsiRNAまたはaiRNAをHeLa細胞にトランスフェクトした。細胞は示した時間時点で溶かし、Ago2抗体を用いて免疫沈降させた。免疫沈降物を洗浄し、RNAはTRIzol抽出によって複合体から単離し、15%TBE-尿素PAGEゲル(Bio-Rad)に載せた。電気泳動後、RNAはHybond-XLナイロン膜に移した。mirVana miRNAプローブキット(Ambion)を使用して5' <sup>32</sup>P標識RNAプローブを作製した。アンチセンスプローブ(5'-GUAGCUGAU AUUGAUGGACUU-3')。センスプローブ(5'-UCCAUCAAU AU CAGC-3')

10

in vitroでのAgo2-RISCローディング。

#### 【0253】

aiRNAまたはsiRNAセンスおよびアンチセンス鎖を、T4キナーゼ(Promega)を使用して<sup>32</sup>P末端標識した。末端標識RNAはフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールによって精製し、EtOHで沈殿させ、水中に再懸濁した。次いで標識RNAを、記載したようにsiRNAまたはaiRNAアンチセンス鎖とアニーリングさせた。in vitro溶解物用に、HeLa細胞をヒトAgo2発現ベクターで24時間トランスフェクトし、S10溶解物をほぼ記載したように生成した(Dignamら、1983年)。5'センス鎖またはアンチセンス鎖標識二重鎖aiRNAまたはsiRNAを、次いでAgo2-S10溶解物に加えた。37℃で5分間のインキュベーション後、Ago2を記載したように免疫沈降させ、Ago2結合(ペレット)と非Ago2結合(上清)画分を20%TBE-アクリルアミドゲル上で分離し、ゲルをフィルムに感光させてセンス鎖-Ago2結合を検出した。aiRNAとsiRNAの競合実験用に、100倍までの非放射能のaiRNAおよびsiRNAを使用して、<sup>32</sup>P標識aiRNAまたはsiRNAと競合させRISCをローディングした。簡単に言うと、S10溶解物を記載したようにAgo2発現ベクターでトランスフェクトしたHeLa細胞から生成した。次いで標識aiRNAまたはsiRNAをS10溶解物に加え、次いで直後に非標識aiRNAまたはsiRNAを加えた。反応物は5分間37℃でインキュベートし、上に記載したように処理した。

20

30

#### 【0254】

##### qRT-PCR

示したaiRNA、siRNAでトランスフェクトした細胞を、トランスフェクション後に示した時間時点で採取した。RNAはTRIzolで単離し、qRT-PCRを、TaqManワンステップRT-PCR試薬および示したmRNA用のプライマープローブセット(Applied Biosystems)を使用して実施した。データは対照トランスフェクト細胞に対して表し、それぞれの試料はアクチンmRNAレベルに正規化する。図14d中の実験用に、HindIII-XhoI部位でのpcDNA3.1<sup>+</sup>またはpcDNA3.1<sup>-</sup>のいずれかへのStat3c DNA(Origene)のクローニングによってStat3構築物を作製した。次いでStat3順方向または逆方向発現ベクターを、24時間aiStat3またはsiStat3を用いてHeLa細胞にコトランスフェクトした。次いで細胞を採取し、TRIzolによってRNAを単離し、TaqManワンステップRT-PCR試薬およびStat3またはアクチン用のプライマープローブセット(Applied Biosystems)を使用してqRT-PCRを実施した。RT-PCRは、Superscript ワンステップ RT-PCRキット(Invitrogen)およびStat3順方向(5'-GGATCTAGAAATCAGCTACAGCAGC-3')およびStat3逆方向(5'-TCCTCTAGAA

40

50

GGGCAATCTCCATTG - 3') プライマーおよびアクチン順方向 (5' - CCATGGATGATGATATCGCC - 3') およびアクチン逆方向 (5' - TAGAAGCATTTGCGGTGGAC - 3') プライマーを使用して同じRNA試料で実施した。

#### 【0255】

##### RT-PCR

全RNAはTRIzolを使用して調製し、cDNAはランダムプライマーおよびThermoscript RT-PCR System (Invitrogen) を使用して合成した。PCRはPfxポリメラーゼを使用して20サイクルで実施した。プライマー: アクチン - 1、5' CCATGGATGATGATATCGCC - 3'; アクチン - 2、5' - TAGAAGCATTTGCGGTGGAC - 3'; - カテニン - 1、5' - GACAATGGCTACTCAAGCTG - 3'; - カテニン - 2、5' - CAGGTCAGTATCAAACCAAGG - 3'。

10

#### 【0256】

##### ウェスタンブロット

細胞を氷冷リン酸塩緩衝化食塩水で二回洗浄し、溶解バッファー (50 mMのHEPES、pH 7.5、0.5%のNonidet P-40、150 mMのNaCl、1 mMのEDTA、1 mMのEGTA、1 mMのオルトバナジウム酸ナトリウム、1 mMのジチオスレイトール、1 mMのNaF、2 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド、および10 µg/mlのそれぞれのペプスタチン、リユーペプチン、およびアプロチニン) 中で溶解した。20 µgの可溶性タンパク質をSDS-PAGEによって分離し、PVDF膜に移した。- カテニン、Nbs1、サバイビン、p21、Rsk1、k-Ras、Stat3、PCNA、NQO1、アクチン (Santa Cruz)、EF2、p70S6K、mTOR、PTEN (Cell Signaling Technology)、Ago2 (Wako)、Dicer (Novus)、およびParp1 (EMD Biosciences) に対する一次抗体をこの試験中で使用した。抗原-抗体複合体は増強化学発光 (GE Biosciences) によって目に見える状態にした。

20

#### 【0257】

##### 5' - RACE 分析

非サイレンシング aiRNA または aiRNA で処理した HeLa 細胞由来の全 RNA (5 µg) を、任意の事前処理なしで GeneRacer (商標) RNA アダプター (Invitrogen、5' - CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA - 3') と連結させた。連結 RNA はランダムプライマーを使用して cDNA に逆転写した。切断産物を検出するために、RNA アダプターと相補的なプライマー (GeneRacer (商標) 5' ネステッドプライマー: 5' - GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA - 3') および - カテニン特異的プライマー (GSP: 5' - CGCATGATAGCGTGTCTGGAAAGCTT - 3') を使用して PCR を実施した。増幅断片は 1.4% アガロースゲルで分けて、1 - kb の Plus DNA ラダー (Invitrogen) を使用して分子量を決めた。特異的切断部位を DNA 配列決定によってさらに確認した。

30

40

#### 【0258】

インターフェロン応答の検出。

#### 【0259】

図 15 a 中の実験用に、PBMc を 100 nM の - カテニン siRNA または aiRNA と直接インキュベートした。全ての RNA は TRIzol を使用して 16 時間で精製し、インターフェロン応答遺伝子の発現のレベルは、製造者 (System Biosciences) によって記載されたように RT-PCR によって決定した。図 15 b 中の実験用に、HeLa 細胞をモックトランスフェクトしたかまたは 24 時間 100 nM の示した aiRNA または siRNA でトランスフェクトした。全ての RNA は TRIzol を使用して精製し、インターフェロン応答遺伝子の発現のレベルは RT-PCR によって

50

決定した。マイクロアレイ分析用に、H e l l a細胞を100nMのa i r N Aまたはs i R N Aでトランスフェクトした。全てのR N AはT R I Z O Lを使用して24時間で精製し、R N Aは製造者のプロトコル（E x p r e s s i o n A n a l y s i s、I n c.）に従いヒトゲノムU133 P l u s 2.0遺伝子チップ（A f f y m e t r i x）とのハイブリダイゼーションに使用した。D h a r m a F E C T 1処理細胞由来のR N Aを対照として使用した。転写産物の発現値を計算するために、マイクロアレイS u i t e 5.0をクオンタイル正規化で使用し、存在すると言われる（P）十分なハイブリダイゼーションシグナルを有する転写産物をこの試験中で使用した。

**【 0 2 6 0 】**

a i R N A 配列および s i R N A 配列

10

aiRNA二重鎖およびsiRNA二重鎖の配列および構造を表2中に挙げる。点突然変異の位置をk-Ras aiRNAにおいて枠で囲む。

【 0 2 6 1 】

【表 2】

表2

[illegible]

20

30

## 寿命評価

それぞれの動物の健康状態の毎日の検査も実施した。体重を3日毎に調べた。食餌および水は動物飼育施設の手順に従い毎日供給した。20%を超える死亡率およびまたは20%を超える正味体重の減少をもたらした治療は毒性であると考えた。結果は平均腫瘍体積( $\text{mm}^3$ ) $\pm$ SEとして表す。0.05未満のP値は統計上関連があると考えた。

40

【 0 2 6 2 】

## 動物飼育

オスまたはメスの無胸腺ヌードマウス4～5週齢(Charles River Laboratories、Wilmington、MA.)を、試験開始前に少なくとも1週間動物飼育施設に順応させた。使用した全ての実験手順はAmerican Physiology SocietyおよびGuide for the Care and Use of Laboratory Animalsによって概説されたガイドラインと一致し、これらはInstitutional Animal Care and U

50

se Committee of Boston Biomedical Inc. によっても承認された。動物は制御温度（68 ° F ~ 72 ° F）、光（12時間明 - 暗サイクル）、および湿度（45 ~ 55 %）を有する室内で、木材チップを敷き詰めたケージにおいて4群で飼育した。実験中、動物は水および食餌に自由にアクセスさせた。

#### 【0263】

（実施例1.）

非対称性干渉RNA（aiRNA）は、哺乳動物細胞において遺伝子特異的サイレンシングを引き起こす。

#### 【0264】

siRNAの構造的足場は、RISC中に組み込みRNAiを媒介するのに必要な形状であると考えられる（Elbashirら、2001a；Elbashirら、2001b；Elbashirら、2001c；Rana、2007年；Zamoreら、2000年）。しかしながら、RISCの組み込みおよび遺伝子サイレンシングに関するRNA二重鎖足場の要件についてはほとんど知られていない。有効なRNAiメディエーターおよびRISC基質に関する構造的足場の要件を調べるために、本発明者らは最初に、siRNAより短いRNA二重鎖が遺伝子サイレンシングを媒介することができたかどうか決定した。二本鎖（ds）RNAの長さは、タンパク質キナーゼR（PKR）媒介非特異的インターフェロン応答の活性化、合成コストの増大、および送達問題における、その傾向の重要な決定因子である（Elbashirら、2001b；Sledzら、2003年）。本発明者らは、異なる哺乳動物の遺伝子を標的化する2ヌクレオチド3'突出または平滑末端を有する12 ~ 21bpの範囲に一連の短いdsRNAを設計した。長さが19bp未満に低減した後に遺伝子サイレンシングは検出せず（データ示さず）、これはDrosophila Melanogasterの細胞溶解物における以前の報告（Elbashirら、2001b）、および19 ~ 21bpがRNAiを媒介する最も短いsiRNA二重鎖であるという概念と一致する（Elbashirら、2001a；Elbashirら、2001b；Elbashirら、2001c；Rana、2007年；Zamoreら、2000年）。

#### 【0265】

次に本発明者らは、突出の非対称性構造を有する非siRNA足場のRNA二重鎖が、遺伝子サイレンシングを媒介することができるかどうか試験した。siRNA二重鎖は対称センス鎖およびアンチセンス鎖を含有する。3'突出を含有する二重鎖siRNA構造はRISC複合体中への取り込みに必要とされるが、センス鎖のArgonaute（Ago）媒介切断後、アンチセンス鎖は標的mRNAの切断を誘導する（Hammondら、2001年；Matrangolaら、2005年；Tabaraら、1999年）。本発明者らは、アンチセンス鎖の3'末端および5'末端に突出を有する様々な長さの非対称性RNA二重鎖を作製しようと努めた。

#### 【0266】

表3中に示す配列を有するオリゴを、アニーリング後20%ポリアクリルアミドゲルによって確認した。図3A中に示すように、それぞれのレーンには以下のように載せた：レーン1、21nt / 21nt；レーン2、12nt（a） / 21nt；レーン3、12nt（b） / 21nt；レーン4、13nt / 13nt；レーン5、13nt / 21nt；レーン6、14nt / 14nt；レーン7、14nt（a） / 21nt；レーン8、14nt（b） / 21nt；レーン9、15nt / 15nt；レーン10、15nt / 21nt。

#### 【0267】

【表 3】

表3

オリゴ	配列	配列番号
21nt/21nt	5'-GUAGCUGAUUAUUGAUGGACTT-3'	1
	3'-TTCAUCGACUAUAACUACCUG-5'	2
12nt/21nt (a)	5'-UGAUUAUUGAUGG-3'	3
	3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	4
12nt/21nt (b)	5'-CUGAUUAUUGAUG-3'	5
	3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	4
13nt/21nt	5'-CUGAUUAUUGAUGG-3'	6
	3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	4
14nt/21nt (a)	5'-GCUGAUUAUUGAUGG-3'	7
	3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	4
14nt/21nt (b)	5'-CUGAUUAUUGAUGGA-3'	8
	3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	4
15nt/21nt	5'-GCUGAUUAUUGAUGGA-3'	9
	3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	4

10

20

HeLa細胞を200,000細胞/ウエルで6ウエル培養プレートに平板培養した。図3B中に示すように、24時間後、それらをスクランブルsiRNA（レーン1）、E2F1標的化21-bp siRNA（レーン2、特異性の対照として）または-カテニン標的化21-bp siRNA（レーン3、陽性対照として）、または異なる長さの混合物：12nt（a）/21nt（レーン4）；12nt（b）/21nt（レーン5）；13nt/21nt（レーン6）；14nt（a）/21nt（レーン7）；14nt（b）/21nt（レーン8）；15nt/21nt（レーン9）の同じ濃度のaiRNAでトランスフェクトした。細胞はトランスフェクション後48時間で採取した。-カテニンの発現はウエスタンブロットによって決定した。E2F1およびアクチンは対照として使用した。これらの結果は、非対称性干渉RNA（aiRNA）は哺乳動物細胞において遺伝子特異的サイレンシングを引き起こすことを実証する。

30

40

50

## 【0268】

aiRNAの機能において重要なaiRNAの構造特徴を決定するために、本発明者らは、コア15/21二重アンチセンス突出構造の修飾に基づいて、複数のaiRNAオリゴヌクレオチドを作製した（表4）。表4中に要約したaiRNAは、センスおよびアンチセンス鎖の長さ、センスおよびアンチセンス突出の程度、およびRNA-DNAハイブリッドオリゴヌクレオチドだけには限られないが、これらを含めた修飾を含有していた。

## 【0269】

親15/21aiRNA構造に対する修飾は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の改変によって行った（表4）。修飾aiRNA二重鎖を、50nMで48時間HeLa細胞にトランスフェクトした。-カテニンおよびアクチンに関するウエスタンブロットを使用して、親15/21aiRNAと従来のsiRNA構造と比較した遺伝子サイレンシングの程度を調べた。二重センス鎖突出を含有するaiRNA修飾体も試験した。これらのオリゴヌクレオチドは、異なる長さのアンチセンス鎖と対形成する21塩基のセンス鎖を含有する。さらに、本発明者らは、DNA塩基で修飾したaiRNAオリゴヌクレオチドの活性も調べた。DNA置換はアンチセンス鎖とセンス鎖の両方で行った（表3）。

試験したRNA-DNAハイブリッドオリゴヌクレオチドは、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれか中に1つまたは複数のDNA置換を含有しており、または示した長さのDNAセンス鎖と対形成する21塩基のアンチセンスRNAを含有していた。これらの様々なaiRNAの遺伝子サイレンシングの結果は図4および5中に示した。

【0270】

まとめると、これらのデータはaiRNA機能に対する構造的な手掛かりを与える。

【0271】

センス鎖に関して、本発明者らのデータは、15塩基の長さは十分働き、一方14塩基と19塩基の間の長さは依然機能的であることを示す。アンチセンス突出の法則に見合うという条件で、センス鎖はアンチセンス鎖の任意の部分に適合し得る。センス鎖の5'末端または3'末端のいずれかにおけるDNAと1つのRNA塩基の交換は許容され、活性の増大をさらにもたらす可能性がある。

10

【0272】

アンチセンス鎖の長さに関しては、21塩基の長さは十分働き、19~22塩基は活性を保持し、および長さが19塩基未満に低減するまたは22塩基を超えて増大するとき、活性は低下する。アンチセンス鎖の3'末端は1~5塩基の突出を必要とし、2~3塩基の突出が好ましく、平滑末端は活性の低下を示す。標的RNA配列と対形成する塩基が好ましく、3塩基までのDNA塩基の交換が同時の5' DNA塩基の交換なしで許容される。アンチセンス鎖の5'末端は0~4塩基の突出を好み、活性状態を保つために突出を必要としない。アンチセンス鎖の5'末端は標的RNA配列に適合しない2塩基を許容することができ、3塩基までのDNA塩基の交換を同時の3' DNA塩基の交換なしで許容することができる。

20

【0273】

ミスマッチまたは化学的に修飾した塩基に関して、本発明者らは、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれか中のミスマッチと1つまたは複数の化学的に修飾した塩基の両方が、aiRNA構造によって許容されることを発見している。

【0274】

【表 4 - 1】

表4: 図4~5に関して使用したaiRNA配列

aiRNA番号	一般構造	配列
1	15-21 (NNN---NNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
2	15-21a (NNNNNN---平滑)	5'-GAUUAUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
3	15-21b (平滑---NNNNNN)	5'-GUAGCUGAUUUGAU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
4	15-21c (NNNN---NN)	5'-CUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
5	15-21d (NN---NNNN)	5'-AGCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
7	15-18b (平滑に切断された3' ---NNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA CGACUAUAACUACCUGAA-5'
8	15-21d (N---NNNN)	5'-UAGCUGAUUUGAUG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
9	15-21e (NNNN---N)	5'-UGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
10	15-22a (NNNN---NNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
11	15-22b (NNN---NNNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAAA-5'
13	15-24a (NNNN---NNNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA UUCAUCGACUAUAACUACCUGUAA-5'
14	15-24b (NNNN---NNNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUGUCAA-5'
15	15-27 (NNNNNN---NNNNNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA GUUCAUCGACUAUAACUACCUGUCAUA- 5'
16	15-20a (NNN---NN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGA-5'
17	15-20b (NNNN---N)	5'-GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUG- 5'
18	15-20c (NN---NNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
21	15-19c (NNNN-平滑)	5'-GCUGAUUUGAUGGA

10

20

30

40

【表 4 - 2】

		UCAUCGACUAUAACUACCU-5'
22	15-18a (NN---N)	5'-GCUGAUUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCU-5'
23	15-18b (NNN-平滑)	5'-GCUGAUUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCU-5'
24	15-18c (平滑---NNN)	5'-GCUGAUUUUGAUGGA CGACUAUAACUACCUGAA-5'
25	15-17a (NN---平滑)	5'-GCUGAUUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCU-5'
26	15-17b (平滑---NN)	5'-GCUGAUUUUGAUGGA CGACUAUAACUACCUGA-5'
29	14-20 (NNN---NNN)	5'-GCUGAUUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUGA-5'
30	14-19a (NNN---NN)	5'-GCUGAUUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCU-5'
31	14-19b (NN---NNN)	5'-GCUGAUUUUGAUGG AUCGACUAUAACUACCUGA-5'
33	14-18b (NNN---N)	5'-GCUGAUUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCU-5'
34	16-21a (NNN---NN)	5'-GCUGAUUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
35	16-21b (NN---NNN)	5'-AGCUGAUUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
36	17-21 (NN---NN)	5'-AGCUGAUUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
37	18-21a (NN---N)	5'-AGCUGAUUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
38	18-21b (N---NN)	5'-UAGCUGAUUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
39	18-21c (NNN---平滑)	5'-GCUGAUUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
40	19-21a (NN---平滑)	5'-AGCUGAUUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
41	18-21b (平滑---NNN)	5'-GUAGCUGAUUUUGAUGGA CAUCGUCUAUAACUACCUGAA-5'
42	19-21c (N---N)	5'-UAGCUGAUUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
43	20-21a (N---平滑)	5'-UAGCUGAUUUUGAUGGACUU

10

20

30

40



【表 4 - 3】

		CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
44	20-21b (平滑---N)	5'-GUAGCUGAUUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
45	ミスマッチおよびmiRNA	5'-GCUGAUUUUGA <u>A</u> GGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
46	標的と相対な5'末端	5'-GCUGAUUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGUC-5'
47	NNNNNNNNNNNNNNNN 3' NNNNNNNNNNNNNNNNNDD-5'	5'-GCUGAUUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'
48	NNNNNNNNNNNNNNNN 3' DDDNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-GCUGAUUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
49	NNNNNNNNNNNNNNNN 3' DDDNNNNNNNNNNNNNNDD-5'	5'-GCUGAUUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGaa-5'
51	DNDNNNNNNNDNDND 3' NNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-gCtGAU <u>U</u> GaUgGa CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
52	DNNNNNNNNNNNNNNNN 3' NNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-gCUGAUUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
53	NNNNNNNNNNNNNNND 3' NNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-GCUGAUUUUGAUGGa CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
54		5'-UAGCUGAUUUUGAUG UUCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
55		5'-GUAGCUGAUUUUGAUGGA UUCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
56		5'-AGCUGAUUUUGAUGGA UUCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
57	DNNNNNNNNNNNNNNNN 3' DDDNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-gCUGAUUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
58	DNNNNNNNNNNNNNNNN 3' NNNNNNNNNNNNNNNND-5'	5'-gCUGAUUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'
59	NNNNNNNNNNNNNNND 3' DDDNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-GCUGAUUUUGAUGGa catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
60	NNNNNNNNNNNNNNND 3' NNNNNNNNNNNNNNNDD-5'	5'-GCUGAUUUUGAUGGa CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'
61	NNNNNNNNNNNNNNNN 3' DDDNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-UAGCUGAUUUUGAUGGACU catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
62	NNNNNNNNNNNNNNNN 3' NNNNNNNNNNNNNNNDD-5'	5'-UAGCUGAUUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'

10

20

30

40

表 4 中、A、U、G、C はヌクレオチドを表し、一方 a、t、g、c はデオキシヌクレオ

50

チドを表す。

【0277】

(実施例2.)

aiRNAによって誘発される遺伝子サイレンシングのメカニズム。

【0278】

aiRNAによって誘導される遺伝子ノックダウンのメカニズムを調べるために、本発明者らは最初に、aiRNAによる遺伝子サイレンシングが翻訳レベルまたはmRNAレベルで起こるかどうか決定した。10nMの15bp aiRNAでトランスフェクトした細胞におけるβ-カテニンのノーザンブロット分析は、aiRNAはmRNAレベルを24時間以内に95%を超えて低下させ、かつその低下は4日を超えて続いたことを示し(図6a)、aiRNAがmRNAレベルで遺伝子サイレンシングを媒介することを示唆した。aiRNAによって誘導されるβ-カテニンmRNAの低減は、siRNAによる誘導より実質的により迅速、有効および持続的であった(図6a)。本発明者らはさらに、15bp aiRNAがβ-カテニンmRNAの部位特異的切断を触媒したかどうか決定した。15bp aiRNAでトランスフェクトした細胞から単離した全てのRNAを、cDNA末端(5'-RACE)の迅速な増幅およびβ-カテニンmRNA切断断片の存在に関するPCRによって調べた(図6b)。本発明者らは、aiRNAトランスフェクション後4および8時間でβ-カテニン切断断片を検出した(図6c)。配列分析は、aiRNAアンチセンス鎖の5'末端に対してaiRNA標的配列内、塩基10と塩基11の間で切断が起こっていたことを示した(図6d)。スクランブルaiRNAを用いたトランスフェクション後、このような切断断片は観察しなかった(図6c)。これらの結果は、aiRNAは標的mRNAの配列特異的切断によって、強力かつ有効な遺伝子サイレンシングを誘導したことを実証する。

10

20

【0279】

次に本発明者らは、非対称性aiRNAの新規の足場をRISC中に取り込ませることが可能であるかどうか決定した。複合体の触媒単位としてのArgonauteタンパク質(Ago)とのRISC酵素複合体によってRNAiが触媒される(Liuら、2004年; Matrangolaら、2005年)。aiRNAがAgo/RISC複合体中に取り込まれるかどうか決定するために、本発明者らは、細胞をaiRNAでトランスフェクトした後、mycタグ化Ago1(Siolasら、2005年)を発現する細胞由来のmycタグ化ヒトAgo1を免疫沈降させた。RISC複合体と結合した小RNAは、Ago免疫沈降物のノーザンブロットイングによって検出した。ノーザンブロット分析は、aiRNAは高い効率でRISC複合体に進入することを明らかにした(図6e)。これらのデータは、非対称性aiRNAの新規の足場を効率良くRISC中に取り込ませることが可能であることを示唆する。

30

【0280】

aiRNAはsiRNAより効率良く遺伝子サイレンシングを誘導したので、本発明者らは、aiRNAがsiRNAより効率良くRISC複合体を生成することができるかどうか試験した。図6e中に示すように、aiRNA-Ago2/RISC複合体がsiRNA-Ago2/RISC複合体より速くより効率良く形成され、対応するsiRNAより多くのaiRNAがRISC複合体中に含有されていた(図6eおよび図7A)。注目すべきことに、siRNAはsiRNAによる二次構造の形成と一致する典型的なパターン(21)を示した(図6eおよび図7)。対照的に、aiRNAは1つのバンドを示し、短い長さのaiRNAはsiRNAで起こる二次構造形成を低減または除去する可能性があることが示唆された。

40

【0281】

さらに、aiRNAの非対称性構造はアンチセンス鎖を有する活性RISCの形成を容易にし、センス鎖で形成される無効なRISCを低減する可能性がある(Ref. 16)。本発明者らのデータは、図7B中に示すようにこれは真実であり、センス鎖はRISC複合体において検出することができないことを証明した。図8Aも、aiRNAのアンチ

50

センス鎖は Ago2 と強く結合するが、センス鎖はしないことを実証する。対照的に、siRNA のアンチセンス鎖とセンス鎖の両方が Ago2 と結合する。これらのデータは、aiRNA が細胞中での RISC の形成において siRNA より高い効率を有することを示唆し、これが aiRNA の優れた遺伝子サイレンシング効率の根底にある可能性がある。

#### 【0282】

さらに、siRNA のセンス鎖は、機能的であるために切断されることが必要であることが示されている。したがって本発明者らは、同じ要件が aiRNA に当てはまるかどうか試験した。それを実施するために、aiRNA センス鎖の位置 8 または 9 におけるヌクレオチドを 2' - O - メチルで修飾してそれを切断不能にした。本発明者らの結果は、切断不能なセンス鎖を有する aiRNA は依然機能的であることを示し (図 8B)、それらのメカニズムの点で aiRNA は siRNA と全く異なることを実証する。

10

#### 【0283】

さらに本発明者らは、aiRNA および siRNA に関する何らかの異なるローディングポケットが存在するかどうか調べた。本発明者らは非放射能の aiRNA または siRNA を使用して、RISC 複合体に関して放射標識 siRNA または aiRNA と競合させた (図 9)。驚くことに、これらの結果は、非放射能の aiRNA は RISC 複合体に関して siRNA と競合しないこと (図 9B)、および非放射能の siRNA は RISC 複合体に関して aiRNA と競合しないこと (図 9C) も示す。これらのデータは、aiRNA および siRNA を RISC 複合体の異なるポケットに充填することが可能であることを示す。

20

#### 【0284】

まとめると、前述のデータは、aiRNA は RISC 中に組み込まれる第 1 の非 siRNA 足場を示し、RISC と相互作用する新規な構造足場を与えることを示唆する。aiRNA および siRNA の RISC ローディングの差は、図 10 中に示す本発明者らのモデル中で例示する。簡単に言うと、非対称性の性質のために、アンチセンス鎖のみが選択されて RISC 複合体中に存在し、鎖選択において 100% の効率をもたらす。対照的に、siRNA は構造上対称性である。siRNA のアンチセンス鎖とセンス鎖の両方が、選択されて RISC 複合体中に存在する可能性を有し、したがって siRNA は無効な鎖選択を有し、同時にセンス鎖 RISC 複合体のために非特異的遺伝子サイレンシングを引き起こす可能性がある。

30

#### 【0285】

(実施例 3.)

aiRNA は、siRNA より迅速、強力、有効、および持続的な遺伝子サイレンシングを媒介する。

#### 【0286】

遺伝子サイレンシングの性質において siRNA と aiRNA を比較するために、本発明者らは最初に、遺伝子サイレンシングに最適な aiRNA 構造を決定した。

#### 【0287】

siRNA 二重鎖は、対称性のセンス鎖およびアンチセンス鎖を含有する。3' 突出を含有する二重鎖 siRNA 構造は、センス鎖の Argonaute (Ago) 媒介切断後に、RISC 複合体中への組込みに必要とされる一方で、アンチセンス鎖は標的 mRNA の切断を誘導する (Hammond ら、2001 年; Matranga ら、2005 年; Tabara ら、1999 年)。本発明者らは、アンチセンス鎖の 3' 末端および 5' 末端に突出を有する様々な長さの非対称性 RNA 二重鎖を作製しようと努めた。本発明者らは、3' および 5' アンチセンス突出を有する 12 ~ 15 bp の一組のこのような非対称性 RNA 二重鎖を設計して、 $\beta$ -カテニン (図 11A)、癌細胞および幹細胞に関係する内因性遺伝子 (Clevers、2006 年) を標的化した。標準構造の最適 siRNA を設計して、RNAi を誘発するために  $\beta$ -カテニンを標的化した (Xiang ら、2006 年)。 $\beta$ -カテニンに対する全ての aiRNA は、siRNA によって標的化した同

40

50

じ配列内に設計した(図11A)。これらの結果は、最適な遺伝子サイレンシングは15bpの*aiRNA*で得たことを示した(図11B)。したがって、本発明者らは15bpの*aiRNA*を使用して、後の実験中で21-merの*siRNA*二重鎖と比較した。

#### 【0288】

本発明者らが驚いたことに、本発明者らは、*aiRNA*は、非標的対照遺伝子アクチンを維持しながら、 $\beta$ -カテニタンパク質の強力かつ非常に有効な低減を誘導したことを発見した(図11C)。

#### 【0289】

次に本発明者らは、 $\beta$ -カテニンを標的化する*aiRNA*および*siRNA*による遺伝子サイレンシングの発生を調べた。使用した*aiRNA*および*siRNA*の配列は図11A中に示す。図12中に示すように、*aiRNA*にはより迅速な発生(図12CおよびD)、およびより良い効力(図12BおよびD)もある。

#### 【0290】

本発明者らは、様々な標的および複数のヒト細胞系に対する、*aiRNA*および*siRNA*の遺伝子サイレンシングの影響も比較した。複数の*aiRNA*を設計して、低い効率で*siRNA*によって標的化した同じ配列で、Stat3(図13b)、NQO1(図12d)、延長因子2(EF2)(図13c)、Nbs1(図14b)、サバイビン(図14b)、Parp1(図14b)、p21(図14b)、Rsk1(図14c)、PCNA(図14c)、p70S6K(図14c)、mTOR(図14c)、およびPTEN(図14c)、および $\beta$ -カテニン(図13a)を含めた異なる機能範囲の遺伝子を標的化した(Rogoffら、2004年)。図13および14中に示すように、*aiRNA*はStat3、 $\beta$ -カテニン、Rsk1、p70S6K、Nbs1、mTOR、およびEF2を抑制する際に*siRNA*より有効であり、NQO1、PCNA、サバイビン、PTEN、Parp1、およびp21をサイレンシングする際に*siRNA*と同程度有効である。標的配列は*siRNA*の最適化に基づいて選択したので、*aiRNA*の効力および効能を、*aiRNA*用に最適化した部位を標的化することによってさらに増大することが可能であると考えられる。さらに、本発明者らのデータは、Hela(図13a)、H1299(図14a、左図)およびDld1(図14a、右図)を含めた複数の細胞系において、*aiRNA*は $\beta$ -カテニンに対して*siRNA*より有効であることも示す。

#### 【0291】

まとめると、これらのデータは、*aiRNA*は、哺乳動物細胞中で遺伝子サイレンシングを媒介する際に*siRNA*より有効、強力、発生が迅速、および持続的であることを実証する。

#### 【0292】

(実施例4.)

*aiRNA*によって媒介される遺伝子サイレンシングの特異性

次に本発明者らは、*aiRNA*によって媒介される遺伝子サイレンシングの特異性を調べた。本発明者らは最初に、野生型k-Ras対立遺伝子を標的化する*aiRNA*を分析した。DLD1細胞は野生型k-Rasを含有し、一方SW480細胞は1つの塩基対置換を有する突然変異体k-Rasを含有する(図14d)。野生型k-Rasを標的化する*aiRNA*でのDLD1細胞のトランスフェクションは有効なサイレンシングを示したが、SW480細胞において突然変異体k-Rasのサイレンシングは観察しなかった。これらのデータは、*aiRNA*が対立遺伝子特異的遺伝子サイレンシングを媒介することを実証する。

#### 【0293】

インターフェロン様応答の活性化は、遺伝子サイレンシングの主な非特異的メカニズムである。遺伝子サイレンシングに*siRNA*を使用する主な理由は、30bpより短いdsRNAが、哺乳動物細胞中でインターフェロン様応答を活性化する低い能力を有することである(Bernsteinら、2001年; MartinezおよびTuschl、2004年; Sledzら、2003年)。本発明者らは、*aiRNA*が哺乳動物細胞中

でインターフェロン様応答を活性化する何らかの兆候を示したかどうか試験した。 - カテニンに対する *a i R N A* でトランスフェクトした *P B M C* 細胞および *E F 2* または *サバイビン* に対する *a i R N A* でトランスフェクトした *H e l a* 細胞から回収した *R N A* を、インターフェロン誘導性遺伝子に関する *R T - P C R* によって分析した。本発明者らは、*a i R N A* トランスフェクションは、試験した任意のインターフェロン誘導性遺伝子の *R T - P C R* により如何なる増大も示さず、一方標的化 *m R N A* のレベルは対照トランスフェクト細胞に比べ低減したことを発見した (図 15 a および b)。マイクロアレイ分析も実施して、*a i R N A* および *m i R N A* によって誘導された既知のインターフェロン応答関連遺伝子の発現の変化を比較した。図 15 c 中に示すように、*s i R N A* と比較して *a i R N A* に関するはるかに少ない変化を観察した。

10

#### 【0294】

さらに、前述のように、センス鎖 - *R I S C* 複合体は非特異的遺伝子サイレンシングを引き起こし得る。センス鎖 - *R I S C* 複合体によって媒介される非特異的遺伝子サイレンシングにおいて *a i R N A* と *s i R N A* を比較するために、細胞は *a i R N A* または *s i R N A* および *S t a t 3* (センス *R N A*) を発現するプラスミドまたはアンチセンス *S t a t 3* (アンチセンス *R N A*) を発現するプラスミドのいずれかとコトランスフェクトした。細胞を採取し、トランスフェクション後 24 時間で *R N A* を回収し、*S t a t 3* センスまたはアンチセンス *R N A* の相対的レベルは、定量的リアルタイム *P C R* または *R T - P C R* によって決定した (挿入図)。結果は、*a i R N A* はアンチセンス *S t a t 3 m R N A* に対して影響がなく、一方 *s i R N A* は影響があることを示す (図 15 d)。この結果は、*a i R N A* は、センス鎖 - *R I S C* 複合体によって媒介される望ましくない非特異的遺伝子サイレンシングを完全に無効することを実証する。

20

#### 【0295】

要約すると、本発明者らは、*a i R N A* が新規なクラスの遺伝子サイレンシングインデューサーであること、*R I S C* 基質および *R N A i* メディエーターの非 *s i R N A* 型および最小構造足場を示した (図 15 f)。本発明者らのデータは、*a i R N A* が *R I S C*、細胞の *R N A i* 機構中で働くことを示唆する。*R I S C* 中への組込み後、*a i R N A* は *a i R N A* アンチセンス鎖の 5' 末端に対して塩基 10 と塩基 11 の間の *m R N A* の配列特異的切断を媒介する。非対称構造の *a i R N A* は、*s i R N A* より効率良く *R I S C* と相互作用することができる。高い *R I S C* 結合効率と一致して、*a i R N A* は、本発明者らの実験中で試験した遺伝子に対する遺伝子特異的サイレンシングを媒介する際に *s i R N A* より強力、有効、発生が迅速、および持続的である。以前の実験は有効な *R I S C* 形成を容易にする際の *D i c e r* の役割を示しているが、本発明者らのデータは、*a i R N A* は *D i c e r* 媒介プロセッシングとは無関係に高い効率で活性 *R I S C* 複合体を生成することができることを示唆する。

30

#### 【0296】

この新規な *R N A* 二重鎖足場の重要な特徴は、3' および 5' 末端のアンチセンス突出である。12 ~ 15 b p の *a i R N A* は、*R N A i* を誘導することが知られている最も短い *R N A* 二重鎖である。長い *d s R N A* は *C . e l e g a n s* および *D r o s o p h i l a M e l a n o g a s t e r* において強力な遺伝子サイレンシングを誘発したが、哺乳動物細胞における遺伝子特異的サイレンシングは、*s i R N A* 二重鎖を使用するまで可能ではなかった。*D i c e r* 消化によって画定する *s i R N A* 足場は、19 ~ 21 b p の鎖の長さ部分および 3' 突出中の対称性によって特徴付けられ (*B e r n s t e i n* ら、2001 年)、これは *R N A i* を媒介するための *R I S C* 中への組込みに必要な構造であると考えられている。したがって、*R N A i* インデューサーの最適化努力は、*s i R N A* より常に大きい *s i R N A* 前駆体に焦点を当てている (*S o u t s c h e k* ら、2004 年; *Z h a n g* および *F a r w e l l*、2007 年)。本発明者らのデータは、*s i R N A* は *R N A i* を媒介するための *R I S C* 中への組込みに必要な足場ではないことを示唆する。異なる長さの *a i R N A* は一連の遺伝子サイレンシング効力および *R I S C* 組込み効率を示し、*R I S C* の組込みおよび活性化のメカニズムを理解するまたとない機会を与える

40

50

。RISCの組み込みおよびRNAiの誘導におけるaiRNAの構造-活性関係をさらに理解するために研究が必要とされ、これは標的配列の選択、長さ、構造、化学組成、および様々なRNAi用途の変更に際してaiRNAを最適化するための合理的根拠を確立するのを手助けするはずである。

【0297】

(実施例5.)

aiRNAはin vivoにおいてsiRNAより有効である

aiRNAがin vivoにおいて有効であるかどうか調べるため、およびそれをsiRNAと比較するため、本発明者らは、ヒト結腸癌異種移植モデルにおけるaiRNAおよびsiRNAの影響を試験した。

10

【0298】

ヒト結腸癌は、米国では癌による死亡原因の第2位である。Wnt - カテニンシグナル伝達経路は厳重に制御されており、発生、組織の恒常性、および再生において重要な機能を有する。Wnt / - カテニンシグナル伝達の規制解除は様々なヒトの癌において頻繁に見られる。80パーセントの結腸直腸癌のみが、腫瘍抑制遺伝子大腸腺腫性ポリポーシスの不活性化、またはプロト発癌遺伝子 - カテニンの突然変異のいずれかによって、この経路の活性化を明らかにする。

【0299】

Wnt / - カテニンシグナル伝達の活性化は、異なる組織の癌の発症と進行の両方に重要であることが分かっている。したがって、Wnt / - カテニンシグナル伝達の標的化阻害は、様々な起源の癌の治療用の合理的で有望な新しい手法である。

20

【0300】

in vitroにおいて、本発明者らは、リボザイム標的化によって、ヒト結腸癌SW480細胞における - カテニン発現の低減および関連する細胞死の誘導を実証しており、 - カテニン発現はin vitroでは腫瘍増殖に対して律速的であることを示す。

【0301】

SW480ヒト結腸癌細胞をメスの無胸腺ヌードマウスに皮下接種し( $8 \times 10^6$ 個の細胞/マウス)、放置して触診可能な腫瘍を形成した。この試験では、腫瘍が約120 mm<sup>3</sup>に達したときに投薬を開始した。動物は、毎日0.6 nmolのPEI複合化 - カテニンsiRNA、PEI複合化 - カテニンaiRNAまたは陰性対照としてPEI複合化無関連siRNAで静脈内(iv)治療した。動物にはsiRNA、aiRNAまたは対照を合計10用量投与した。腫瘍は治療全体で測定した。図16中に示すように、0.6 nmol mg/kgでの単剤治療としてsiRNAおよびaiRNAを用いた静脈内治療は、腫瘍増殖を有意に阻害した。siRNAのT/C%値は、0.0286のp値で48.8%であると計算した。しかしながら、 - カテニン特異的aiRNAを用いた治療は、腫瘍増殖のはるかに一層大幅な低減をもたらした。T/C%値は、0.0024のp値で9.9%であると計算した。siRNA、aiRNAまたは対照の静脈内投与が原因の体重の有意な変化はなかった。これらのデータは、 - カテニンの標的化によるPEI複合体形成を介したaiRNAのin vivo全身施用は、結腸癌を有する患者の治療用途の、非常に有効、特異的および安全な作用物質を開発するための手段を与えることを示唆する。

30

40

【0302】

さらに、本発明者らは、HT29ヒト結腸癌異種移植モデルにおけるaiRNAおよびsiRNAの影響も試験した。HT29ヒト結腸癌細胞をメスの無胸腺ヌードマウスに皮下接種し( $6 \times 10^6$ 個の細胞/マウス)、放置して触診可能な腫瘍を形成した。この試験では、腫瘍が約200 mm<sup>3</sup>に達したときに投薬を開始した。動物は、1日おきに0.6 nmolのPEI複合化 - カテニンsiRNA、PEI複合化 - カテニンaiRNAまたは陰性対照としてPEI複合化無関連siRNAで静脈内(iv)治療した。動物にはsiRNA、aiRNAまたは対照を合計8用量投与した。腫瘍は治療全体で測定し

50

た。図17中に示すように、 $0.6 \text{ nmol mg/kg}$ での単剤治療としてsiRNAおよびaiRNAを用いた静脈内治療は、腫瘍増殖を有意に阻害した。siRNAのT/C%値は、0.21のp値で78%であると計算した。ここでも、 $\beta$ -カテニン特異的aiRNAを用いた治療は、腫瘍増殖のはるかに一層大幅な低減をもたらした。T/C%値は、0.016のp値で41%であると計算した。siRNA、aiRNAまたは対照の静脈内投与が原因の体重の有意な変化はなかった。これらのデータは、 $\beta$ -カテニンの標的化によるPEI複合体形成を介したaiRNAのin vivo全身施用は、結腸癌を有する患者の治療用途の、非常に有効、特異的および安全な作用物質を開発するための手段を与えることを支持する。

#### 【0303】

10

まとめると、aiRNAは広範囲のRNAi用途を有意に改善することができる。siRNAベースの治療は、限られた効力、送達の難点、インターフェロン様応答および製造コストを含めた課題に対応している(de Fougereollesら、2007年; Iornsら、2007年; Rana、2007年)。改善された効力、効能、持続性、および小さなサイズのaiRNAはこれらの課題を手助けまたは克服することができる。aiRNAはより小さく、その送達により少ない物質を必要とし得るからである。したがってaiRNAは、遺伝子機能試験およびRNAiベースの治療における広範囲のRNAi用途に関する相当な可能性を有する、哺乳動物細胞においてsiRNAより良い効力、効能、作用発現、および持続性の、RISCに進入し遺伝子サイレンシングを媒介する新しい小さなRNA二重鎖となる。

20

#### 【0304】

他の実施形態が以下の特許請求の範囲内に存在する。いくつかの実施形態を示し記載してきた一方で、本発明の精神および範囲から逸脱せずに様々な変更形態を作成することができる。

#### 【0305】

参考文献

#### 【0306】

## 【 数 1 】

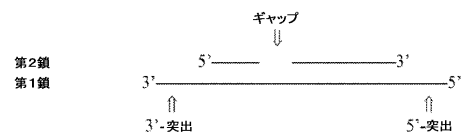
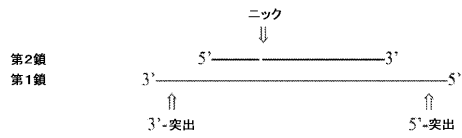
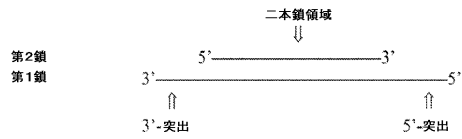
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Chiu, Y.L., and Rana, T.M. (2003). siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* (New York, NY 9, 1034-1048.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.
- Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G.J., Giese, K., and Kaufmann, J. (2003). Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic acids research* 31, 2705-2716.
- Czech, M.P. (2006). MicroRNAs as therapeutic targets. *The New England journal of medicine* 354, 1194-1195. 10
- de Fougères, A., Vornlocher, H.P., Maraganore, J., and Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6, 443-453.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic acids research* 11, 1475-1489.
- Donze, O., and Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 30, e46.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 457-467.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498. 20
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-6888.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9-14.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811. 30
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146-1150.
- Iorns, E., Lord, C.J., Turner, N., and Ashworth, A. (2007). Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nature reviews* 6, 556-568.
- Kim, D.H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S., and Rossi, J.J. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23, 222-226.
- Kim, D.H., and Rossi, J.J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature reviews* 8, 173-184. 40



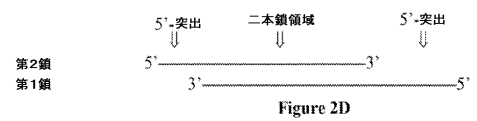
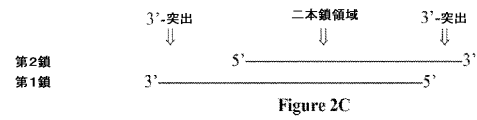
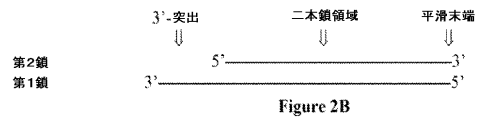
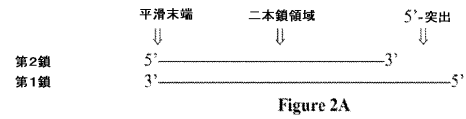
## 【 数 2 】

- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
- Mack, G.S. (2007). MicroRNA gets down to business. *Nature biotechnology* 25, 631-638.
- Martinez, J., and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 18, 975-980.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., and Conklin, D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-958. 10
- Patzel, V. (2007). In silico selection of active siRNA. *Drug discovery today* 12, 139-148.
- Rana, T.M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 23-36.
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Frame, F.M., Debatis, M.E., Sanchez, Y., Jones, S., and Kowalik, T.F. (2004). Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2. *Mol Cell Biol* 24, 2968-2977.
- Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P.S., Paddison, P.J., Hannon, G.J., and Cleary, M.A. (2005). Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 23, 227-231. 20
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5, 834-839.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., *et al.* (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C.C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123-132.
- Xiang, S., Fruehauf, J., and Li, C.J. (2006). Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. *Nature biotechnology* 24, 697-702.
- Zamore, P.D., and Aronin, N. (2003). siRNAs knock down hepatitis. *Nature medicine* 9, 266-267. 30
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zhang, B., and Farwell, M.A. (2007). microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med*.
- Zhang, H.Y., Du, Q., Wahlestedt, C., and Liang, Z. (2006). RNA Interference with chemically modified siRNA. *Current topics in medicinal chemistry* 6, 893-900.

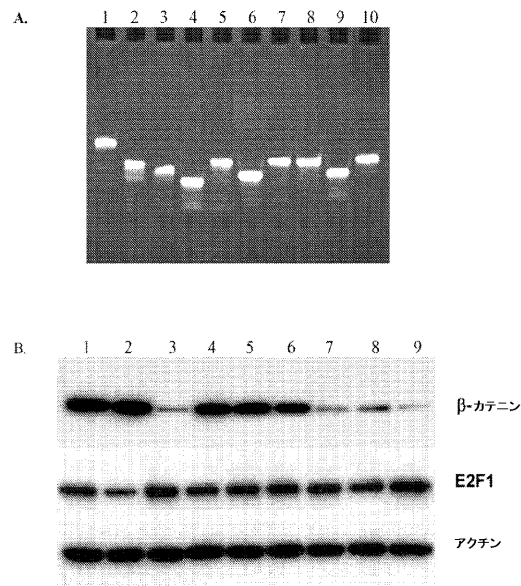
【 図 1 】



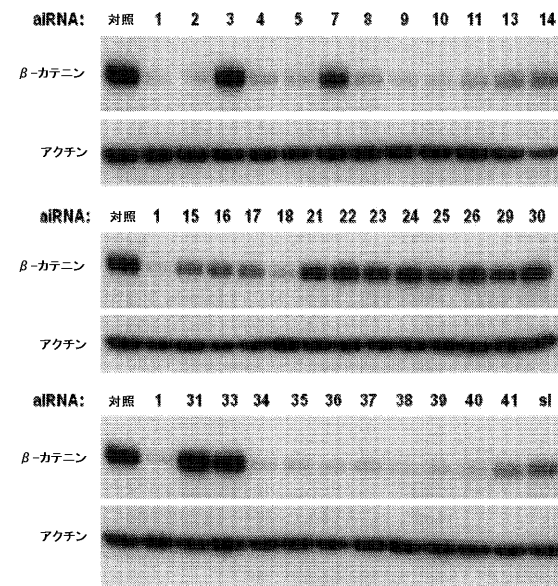
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

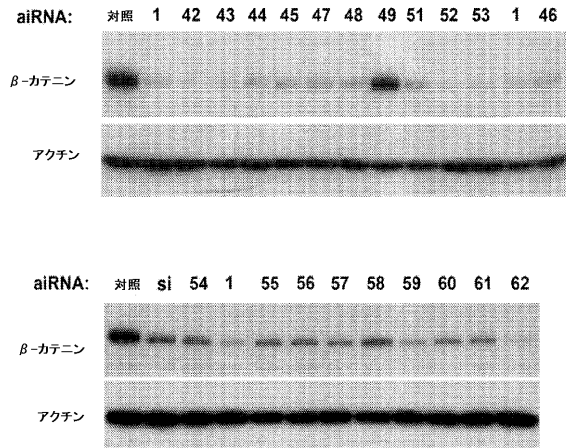
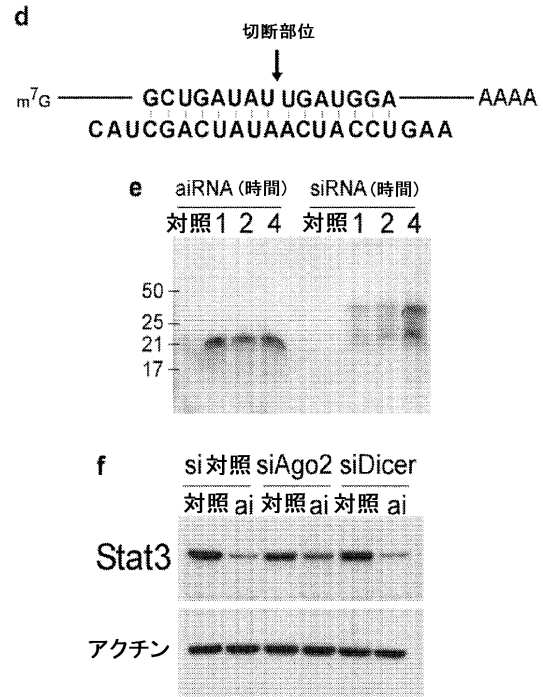


Figure 5

【 図 6 - 2 】



Figures 6d-6f

【 図 7 】

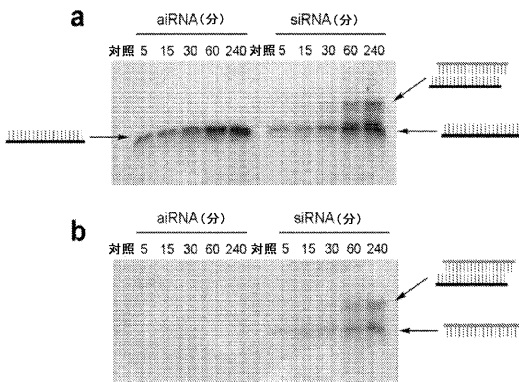


Figure 7

【 図 8 】

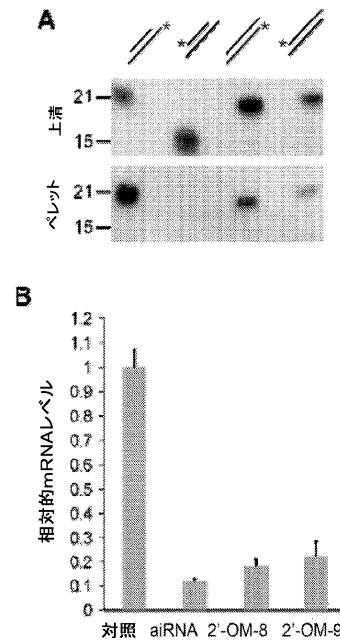


Figure 8

【図 9】

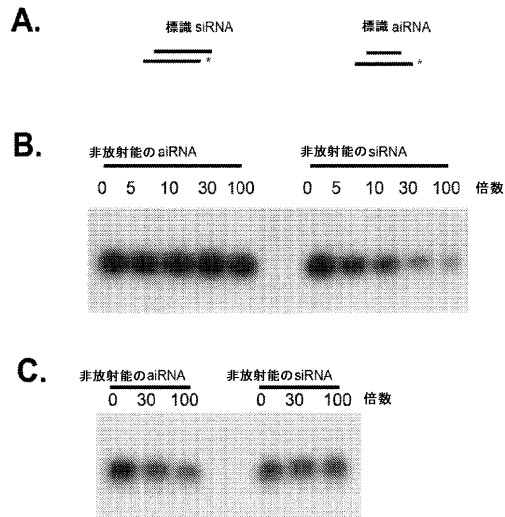


Figure 9

【図 10】

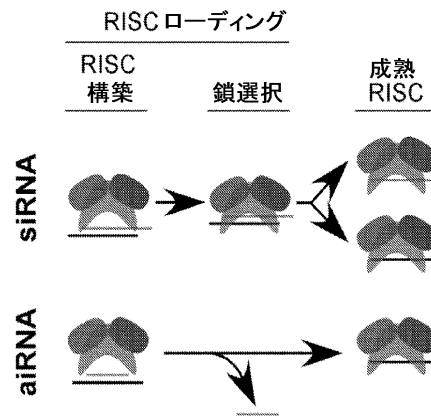
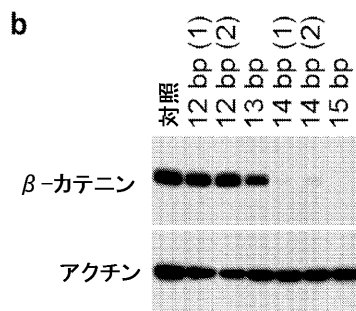
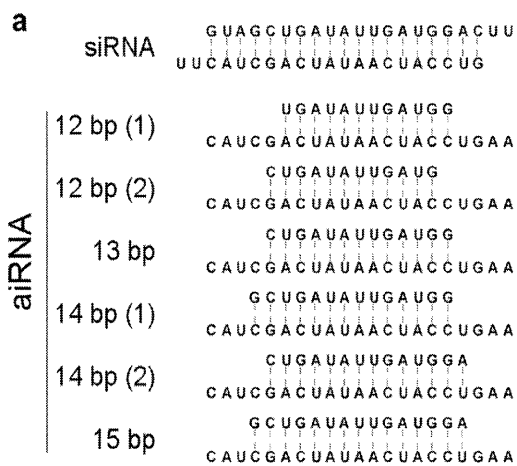


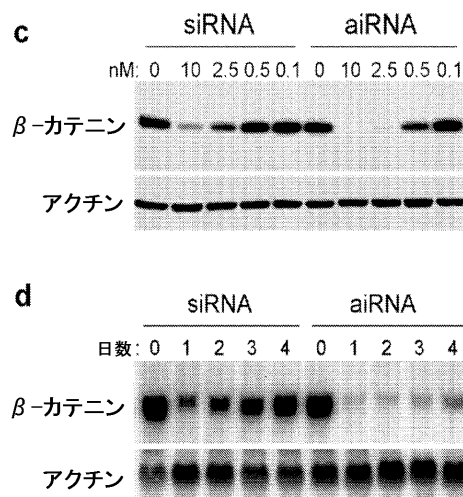
Figure 10

【図 11 - 1】



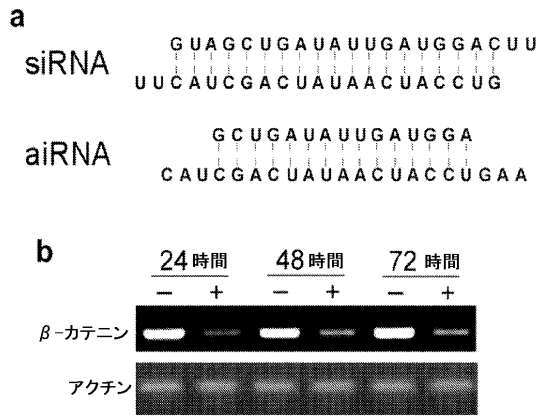
Figures 11A-11B

【図 11 - 2】



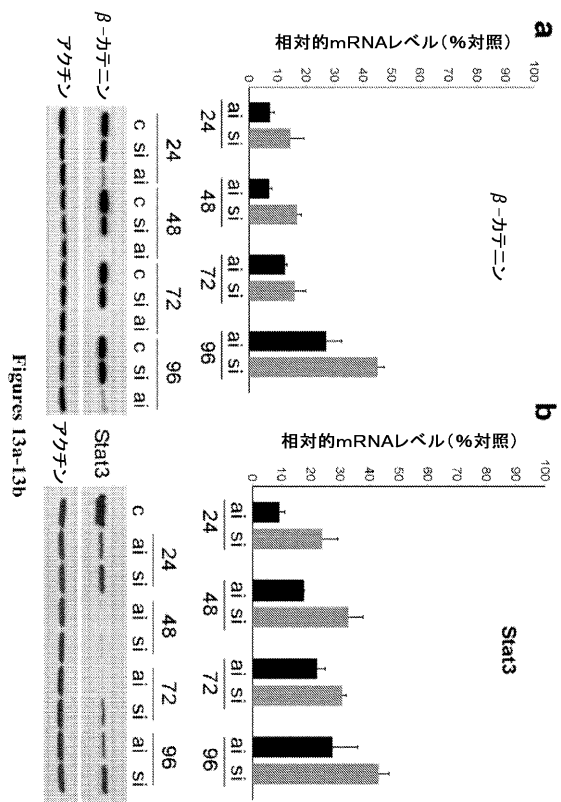
Figures 11C-11D

【図 12 - 1】

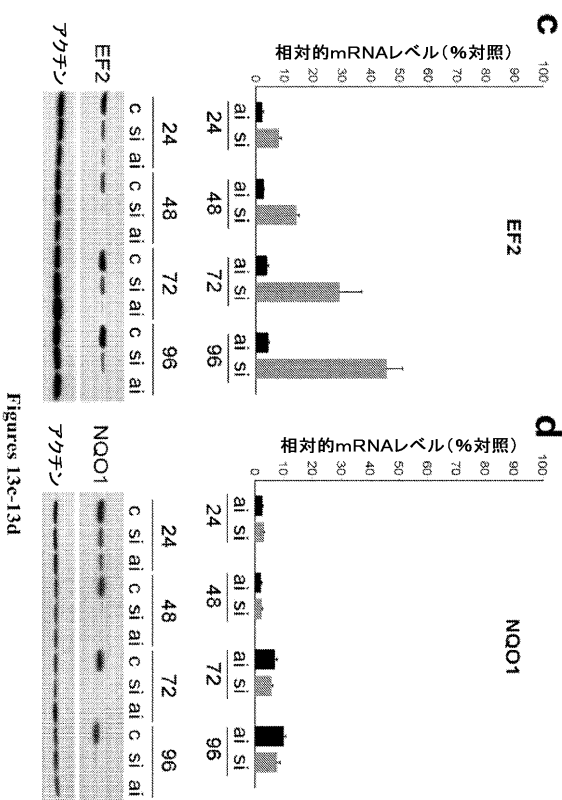


Figures 12A-12B

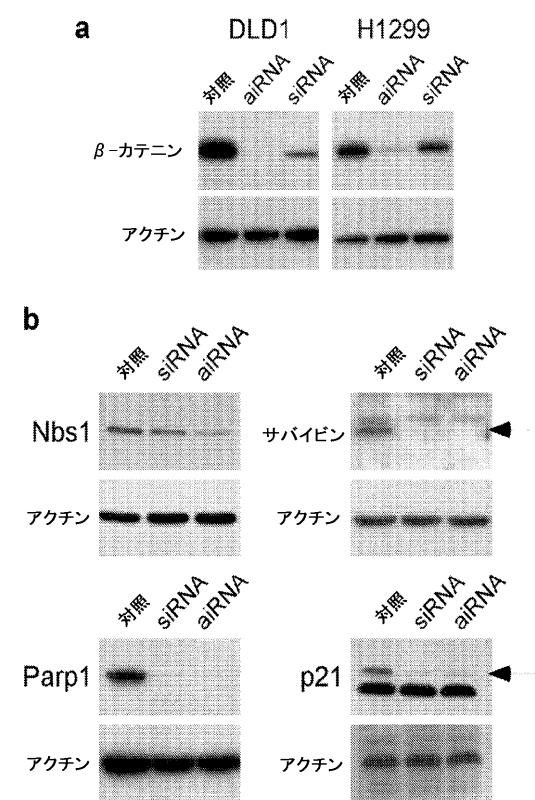
【図 13 - 1】



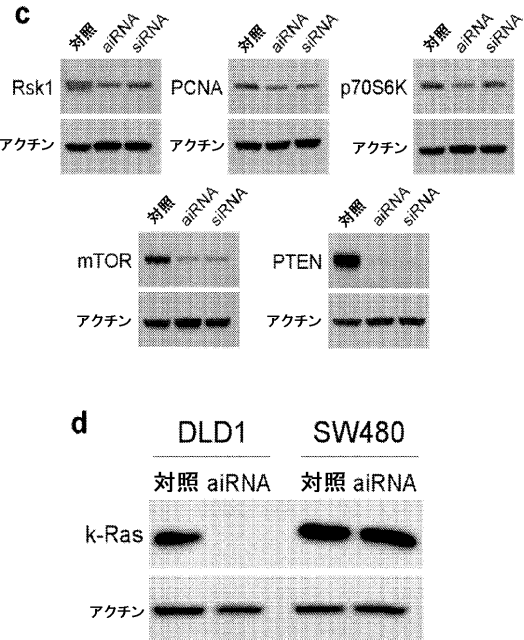
【図 13 - 2】



【図 14 - 1】

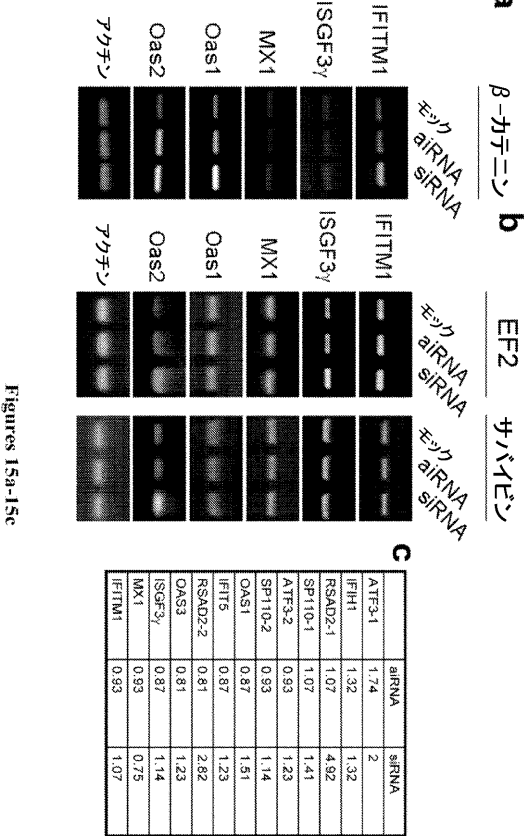


【 図 1 4 - 2 】



Figures 14c-14d

【 図 1 5 - 1 】



Figures 15a-15c

【 図 1 5 - 3 】

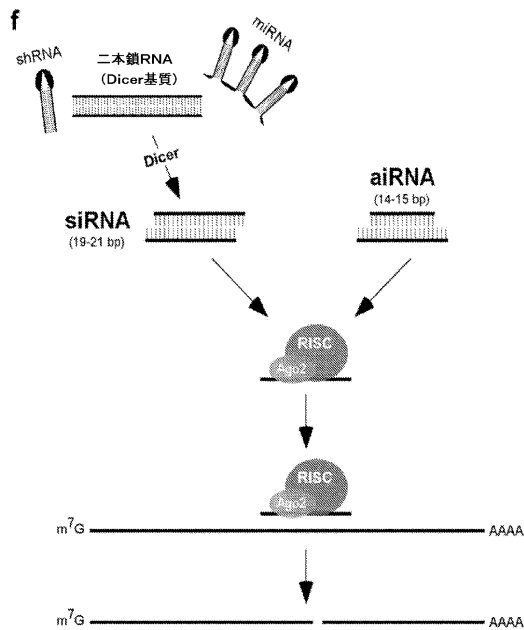


Figure 15f

【 図 1 6 】

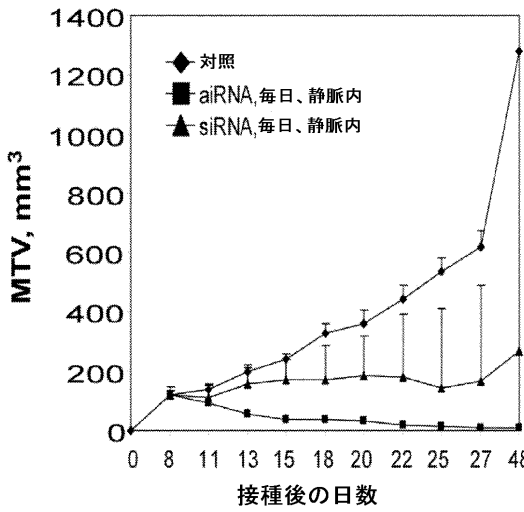


Figure 16

【 図 1 7 】

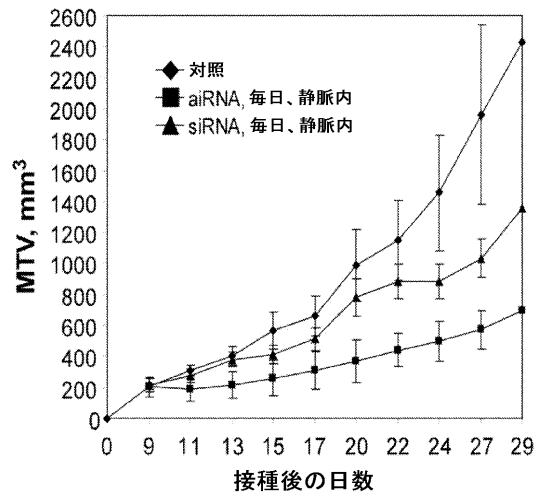
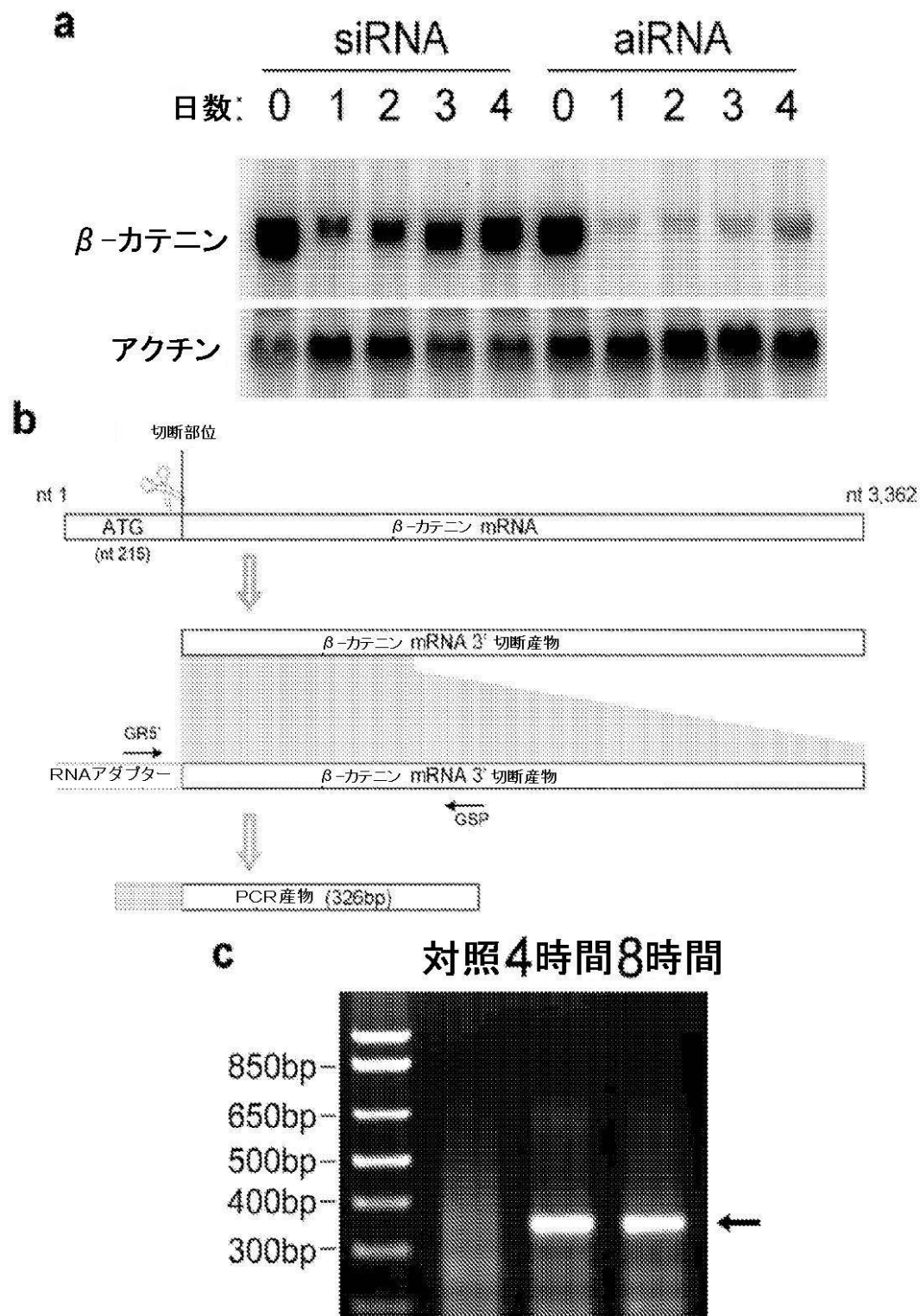


Figure 17

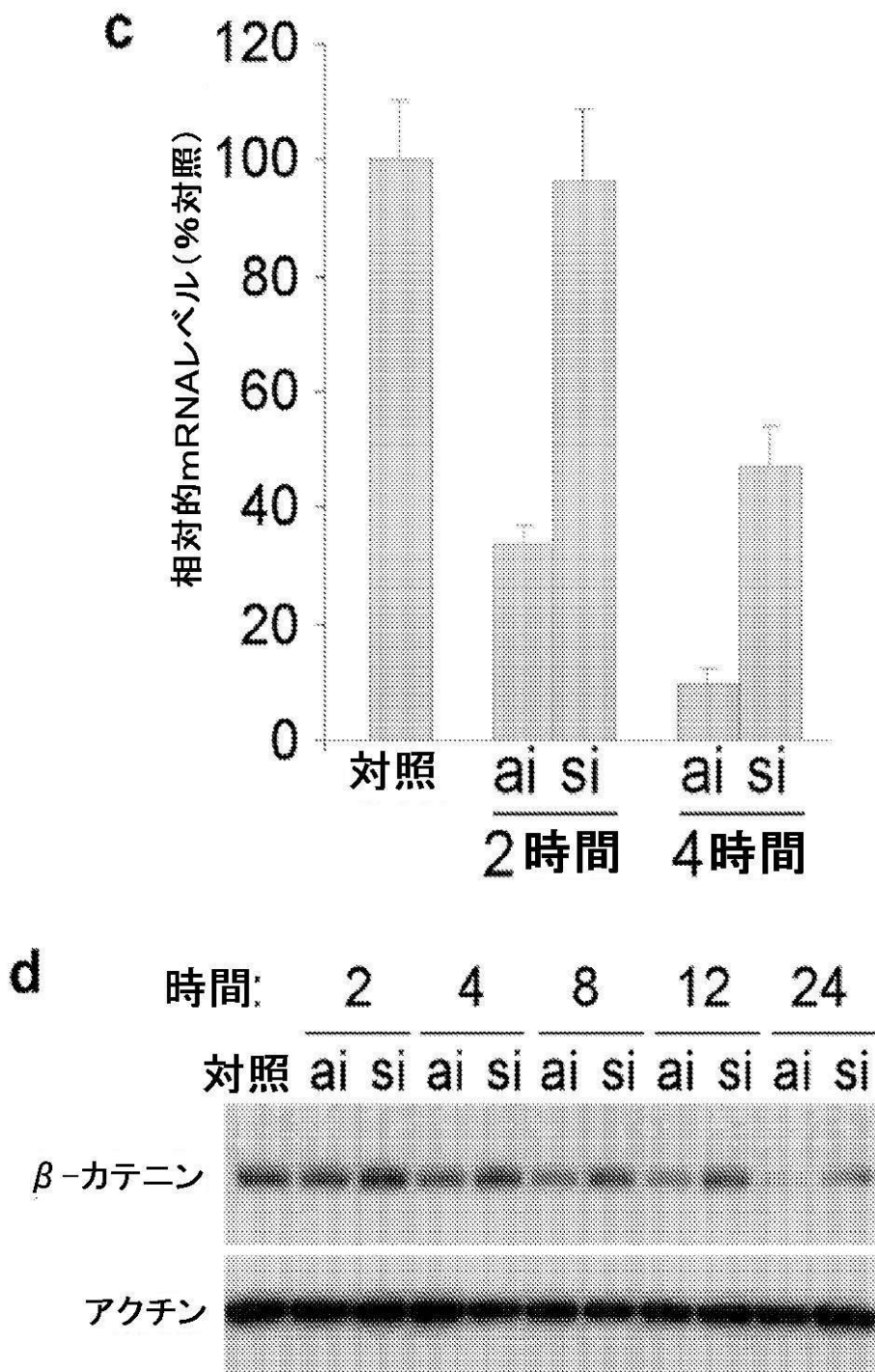
【図 6 - 1】



Figures 6a-6c

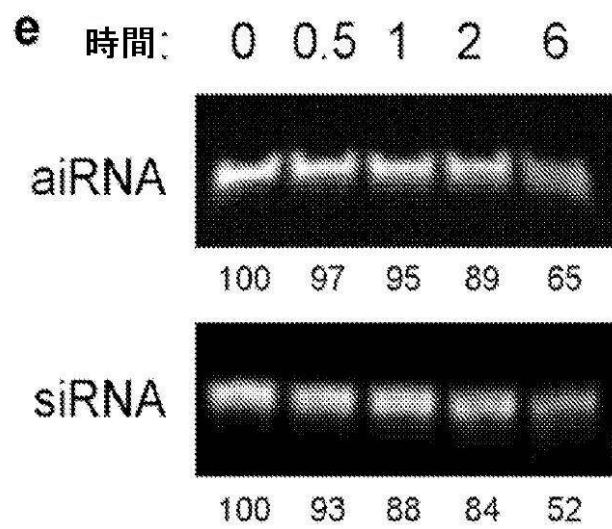
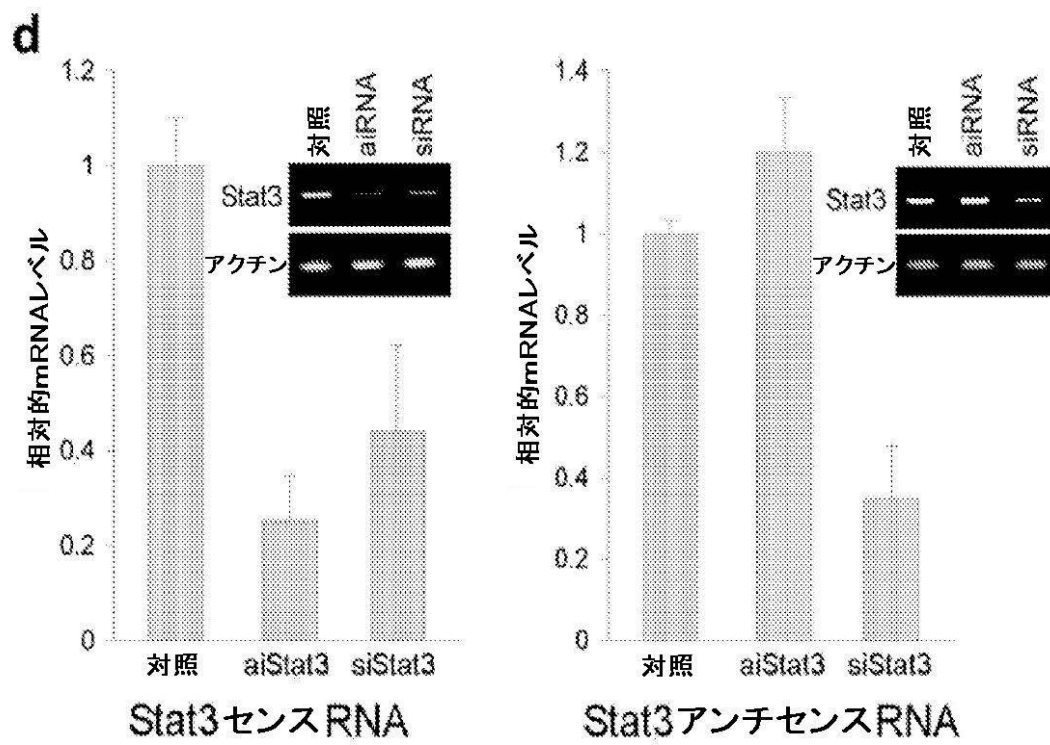


【図 12 - 2】



Figures 12C-12D

【図15-2】



Figures 15d-15e

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 08/74528

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07H 21/04 (2009.01) USPC - 536/24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8)-C07H 21/04 (2009.01) USPC-536/24.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC-536/23.4, 25.1, 435/440, 445 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar nick or nicked or gapped or segmented, phosphothioate, modified base, assymetric, duplex near3 rna, gene silencing, phosphodiester, duplex RNA, nucleotide, siRNA		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0229266 A1 (TUSCHL et al.) 18 November 2004 (18.11.2004) (para [0002], [0006]-[0033], [0040], [0075]-[0078], [0091], [0109], [0149])	45-59, 62, 68-71, 74-92, and 107
Y		1-44, 60, 61, 63, 64, 66, 67, 72, 73, 93-98, 100-106, 108-115, and 120-125
Y	US 2006/0142228 A1 (Ford et al.) 29 June 2006 (29.06.2006) para [0023]; [0026]	1-44, 60, 61, 63, 64, 66, 67, 93-98, 100-106, 108-115, and 120-125
Y	US 2005/0203047 A1 (THOMANN et al.) 15 September 2005 (15.09.2005)(para [0015], [0016], [0033], [0056], [0059], [0060])	39-42 and 120-123
Y	(BRAMSEN et al.) Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs 588675897 Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 17 Published online 28 July 2007 (abstract; pg 5887 para 1)(pg 5892 para 5-5893 para 1)	72, and 73
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 21 April 2009 (21.04.2009)		Date of mailing of the international search report 04 MAY 2009
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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/74528

*Continuation of Box No. III Lack of Unity:*

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-64, 66-98, 100-115, and 120-125 are drawn to duplex RNA molecule, methods of using such, or methods of preparing such.

Group II: Claims 117-119 are drawn to a method of modifying a first duplex RNA molecule with an antisense strand and a sense strand that form a double-stranded region.

The groups listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons.

The technical feature that links the listed Groups is an RNA duplex, wherein the first strand is longer than the second strand, wherein the second strand is substantially complementary to the first strand, and forms a double-stranded region with the first strand, wherein said duplex RNA molecule is capable of effecting selective gene silencing in a eukaryotic cell. However, this does not represent an improvement over the prior art of US 2006/0142228 A1 (Ford et al.) which teaches an RNA duplex (dsRNA; para [0015]), wherein the first strand is longer than the second strand (comprises both 3' and 5' overhangs; para [0026]), wherein the second strand is substantially complementary to the first strand, and forms a double-stranded region with the first strand, wherein said duplex RNA molecule is capable of effecting selective gene silencing (para [0015]) in a eukaryotic cell (para [0023]).

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13.2 because the groups do not share a same or corresponding special technical feature providing a contribution over the prior art.

Continuation of item 4 of the first sheet (unsearchable claims): Claims 65 and 116 have been held unsearchable because they are drawn to sequences of ten or more nucleotides but to not provide sequence identifiers as required by Annex C of the Administrative Instructions.

NOTE: Claim 99 is missing from the claim set

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/74528

**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.: 65 and 116  
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:

Claims 65 and 116 have been held unsearchable because they are drawn to sequences of ten or more nucleotides but to not provide sequence identifiers as required by Annex C of the Administrative Instructions.

3. ☐ Claims Nos.:  
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:

-----See Extra Sheet-----

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.: 1-64, 66-98, 100-115, and 120-125

**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 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 5/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
	C 1 2 N 1/21	

(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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,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,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 リー, チャン チア  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 1, ケンブリッジ, ミュージアム ウェイ 8  
, ユニット 1 6 0 6

(72)発明者 サン, シャンガオ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 5, ブルックリン, キャメロン ストリート  
2 0, ユニット 3 0 2

(72)発明者 ロゴフ, ハリー  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 8, ノーウッド, プロビデンス ハイウェイ  
3 3 3

(72)発明者 リー, ユーチャー  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 9 0, ウェストウッド, ウッドリッジ ロード  
3 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11 CA12 DA02  
DA05 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA18 GA19 HA08 HA09  
HA12 HA14 HA17  
4B065 AA01X AA26X AA90X AA93X AB01 AC20 BA02 BA24 CA44  
4C084 AA13 NA14 ZA012 ZA362 ZA592 ZA662 ZA812 ZA892 ZB072 ZB112  
ZB132 ZB152 ZB222 ZB262 ZB322 ZB332 ZC012 ZC212 ZC522