

(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 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/113 (2010.01)	C 12 N 15/00	Z N A G 4 B 0 2 4
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 B 0 6 5
A 61 P 31/00 (2006.01)	A 61 P 31/00	4 C 0 8 4
A 61 P 31/12 (2006.01)	A 61 P 31/12	
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 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 ボストン バイオメディカル, インコ ポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 062, ノーウッド, プロビデンス ハイウェイ 333
(86) (22) 出願日	平成20年8月27日 (2008.8.27)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月23日 (2010.4.23)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2008/074528	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02009/029688		
(87) 國際公開日	平成21年3月5日 (2009.3.5)		
(31) 優先権主張番号	60/968, 257		
(32) 優先日	平成19年8月27日 (2007.8.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/029, 753		
(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ン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。

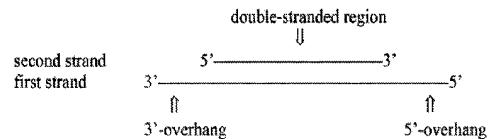


Figure 1A

RÉGION DOUBLE BRIN
SECOND BRIN
PREMIER BRIN
DEBORDANT EN 3'
DEBORDANT EN ,

【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有する、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】

10

20

30

40

50

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、NH₂、NHR、NR₂、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、リポソーム、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】

10

20

30

40

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23に記載の使用。

【請求項30】

前記標的遺伝子が病原性微生物の遺伝子である、請求項23に記載の使用。

【請求項31】

前記標的遺伝子がウイルス遺伝子である、請求項23に記載の使用。

【請求項32】

前記標的遺伝子が腫瘍関連遺伝子である、請求項23に記載の使用。

【請求項33】

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23に記載の使用。 10

【請求項34】

請求項1に記載の二重鎖RNA分子を含む試薬。

【請求項35】

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、

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36】

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37】

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36に記載の方法。

【請求項38】

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36に記載の方法。

【請求項39】

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40】

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39に記載の発現ベクター。

【請求項41】

請求項39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42】

請求項39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 ~ 1 0 ヌクレオチドの 3 ' 突出、0 ~ 1 0 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 ~ 1 0 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 ~ 1 0 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。

30

【請求項 5 2】

前記 R N A 二重鎖が、1 ~ 1 0 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。

【請求項 5 3】

前記第 1 鎖が 1 2 ~ 1 0 0 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 5 4】

前記第 1 鎖が 1 2 ~ 3 0 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 5】

前記第 1 鎖が 1 8 ~ 2 3 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 1 9 ~ 2 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。

40

【請求項 5 7】

前記第 1 鎖が 2 1 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 ~ 3 0 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 1 2 ~ 2 2 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12～17ヌクレオチドの長さを有する、請求項45に記載のRNA分子。

【請求項 6 1】

前記第2鎖が15ヌクレオチドの長さを有する、請求項45に記載のRNA分子。

【請求項 6 2】

前記二本鎖領域が27bpである場合、前記RNA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12～30ヌクレオチドの長さを有し、前記第2鎖が10～29ヌクレオチドの長さを有する、請求項45に記載のRNA分子。10

【請求項 6 3】

前記第1鎖が18～23ヌクレオチドの長さを有し、前記第2鎖が12～17ヌクレオチドの長さを有する、請求項45に記載のRNA分子。

【請求項 6 4】

前記第1鎖が19～25ヌクレオチドの長さを有し、前記第2鎖が12～17ヌクレオチドの長さを有する、請求項45に記載のRNA分子。

【請求項 6 5】

前記第1鎖が

【化4】

5'-UUCGAAGUAUUCGGCGUACGU

5'-UCGAAGUAUUCGGCGUACGUG または

5'-CGAAGUAUUCGGCGUACGUGA

であり、

前記第2鎖が最長で17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19～25ヌクレオチドの長さを有し、前記第2鎖が18～24ヌクレオチドの長さを有する、請求項45に記載のRNA分子。30

【請求項 6 6】

前記第1鎖が21ヌクレオチドの長さを有し、前記第2鎖が12～17ヌクレオチドの長さを有する、請求項45に記載のRNA分子。

【請求項 6 7】

前記第1鎖が21ヌクレオチドの長さを有し、前記第2鎖が14～16ヌクレオチドの長さを有する、請求項45に記載のRNA分子。

【請求項 6 8】

前記第1鎖が前記第2鎖よりも1～10ヌクレオチド長い、請求項45に記載のRNA分子。

【請求項 6 9】

前記3'突出が2～6ヌクレオチドの長さを有する、請求項46に記載のRNA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46に記載のRNA分子。

【請求項 7 1】

前記遺伝子サイレンシングが、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、請求項45に記載の二重鎖RNA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45に記載の二重鎖RNA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 dT 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有する、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、NH₂、NHR、NR₂、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有する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 20

を含む方法。

【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 (regional) 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、 リポソーム、 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 9 3 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 9 3 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 10 8 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 10 8 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 10 8 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 11 2 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 11 3 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、インペルターゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ラクターゼ、リバーゼ、リポキシゲナーゼ、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бин、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' - CCUCUUUAUGAUGUAU CCGGGAGAAUACUACAUUA - 5'

【表6-2】

aiStat3-A	5' - AGCAAAGAAUCACAU CGGUCGUUUCUUAGUGUACAA - 5'	
aiStat3-B	5' - GAAUCUCAACUUCAG CGUCUUAGAGUJUGAAGUCUAA - 5'	
aPTEN	5' - UAAAGGUGAAGAUUA UCGAUUUCCACUUUCUAAUAAA - 5'	10
aip70S6K	5' - UGUUUGAUUUGGAUU GGCACAAACUAAACCUAAAAA - 5'	
aimTOR	5' - GAAUJUGUCAAGGGAU CGUCUAAACAGUUCCUAUAA - 5'	
airsk1	5' - AAUJUGGAACACAGUU CCUUUAACCUUGUGUCAAAAA - 5'	
aiPCNA	5' - AGAUGCUGUUGUAAU ACCUCUACGACAACAUUAAA - 5'	
aiParpl	5' - GCGAAGAAGAAAUCU CACCGCUUCUUCUUUAGAUAA - 5'	
ai サバイビン	5' - AGGAGAUCAACAUUU dTd TUCCUCUAGUUGUAAAAGU - 5'	
ainQO1	5' - GCAGACCUUGUGAU CGGCGUCUGGAACACUAAA - 5'	
aip21-A	5' - CCCGCUCUACAUUU UCCGGGGCGAGAUGUAGAAGAA - 5'	20
aip21-B	5' - GCGGGUUGAAUGAGA GAUCCGCCAACUACUCUAA - 5'	
aik-Ras	5' - GGAGCUGUUGGCGUA CAACCUCGACAACCGCAUCAA - 5'	
aiβ-カテニン-1	5' - GCUGAUAUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	
aiβ-カテニン-2	5' - GAUAUUGAUGGACUU CAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	
aiβ-カテニン-4	5' - CUGAUAUUGAUGGAC CAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	
aiβ-カテニン-5	5' - AGCUGAUAUUGAUGG CAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	
aiβ-カテニン-8	5' - UAGCUGAUAUUCUAG CAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	30
aiβ-カテニン-9	5' - UGAUAUUGAUGGACU CAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	
aiβ-カテニン-10	5' - GCUGAUAUUGAUGGA UCAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	
aiβ-カテニン-11	5' - GCUGAUAUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACUGAAA - 5'	
aiβ-カテニン-18	5' - GCUGAUAUUGAUGGA AUCGACUUAACUACUGAA - 5'	
aiβ-カテニン-34	5' - GCUGAUAUUGAUGGAC CAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	
aiβ-カテニン-35	5' - AGCUGAUAUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	40
aiβ-カテニン-36	5' - AGCUGAUAUUGAUGGAC CAUCGACUUAACUACUGAA - 5'	

【表6-3】

ai β -カテニン-37	5'-AGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAACUACUACCUGAA-5'
ai β -カテニン-38	5'-UAGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAACUACUACCUGAA-5'
ai β -カテニン-39	5'-GCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAACUACUACCUGAA-5'
ai β -カテニン-40	5'-AGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAACUACUACCUGAA-5'
ai β -カテニン-42	5'-UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAACUACUACCUGAA-5'
ai β -カテニン-43	5'-UAGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAACUACUACCUGAA-5'
ai β -カテニン-44	5'-GUAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAACUACUACCUGAA-5'
ai β -カテニン-45	5'-GCUGAUUUGAAGGA CAUCGACUAACUACUACCUGAA-5'
ai β -カテニン-46	5'-GCUGAUUJUGAUGGA CAUCGACUAACUACUACCUGUC-5'
ai β -カテニン-47	5'-GCUGAUUJUGAUGGA CAUCGACUAACUACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-48	5'-GCUGAUUJUGAUGGA catCGACUAACUACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-52	5'-gCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAACUACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-53	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAACUACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-57	5'-gCUGAUUUGAUGGA catCGACUAACUACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-59	5'-GCUGAUUUGAUGGA catCGACUAACUACUACCUgaa-5' および
ai β -カテニン-62	5'-UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAACUACUACCUgaa-5'

[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。

10

20

30

40

50

【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】****【0 0 0 1】**

(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】**【0 0 0 2】**

低分子または短鎖の干渉 RNA (siRNA) を用いる RNAi (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 Fougerollesら、2007年; KimおよびRossi、2007年)。
20

【0 0 0 3】

理論的には、RNAi を用いて、任意の疾患遺伝子を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 RNAi 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。

【0 0 0 4】

しかし、顕著な送達の問題以外に、RNAi 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の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% 以下に限られている。これらの分子の製造は高価 (アンチセンスのデオキシリ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しうるという観察により、RNAi ベースの研究および RNAi 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

【0 0 0 5】

RNAi 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。RNAi 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 RNAi 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

応の活性化であり、これは、d s RNA 依存性タンパク質キナーゼ (PKR) およびT o 1 1 様受容体 (TLR) により媒介される。si RNA 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 si RNA 構造は、19 ~ 21 ヌクレオチドの長さと両末端における 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、RNA i ベースの研究および RNA i 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效能、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 si RNA 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、RNA i 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 RNA i への新たな手法を開発する必要が存在する。

【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 (ai RNA) 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 RNA i 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 si RNA を上回る複数の利点ももたらす。ai RNA は、現行の si RNA 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、ai RNA 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、ai RNA は、遺伝子サイレンシングの誘導において、si RNA 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。ai RNA 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 RNA i ベースの治療を含む、現行の si RNA または sh RNA 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 d T からなる群から選択される。

50

【0012】

一実施形態において、該二本鎖領域のG C含量は20%~70%である。

【0013】

一実施形態において、該第1鎖は19~22ヌクレオチドの長さを有する。

【0014】

一実施形態において、該第1鎖は21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14~16ヌクレオチドの長さを有する。

【0015】

一実施形態において、該第1鎖は21ヌクレオチドの長さを有し、該第2鎖は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、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。

10

【0016】

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有する。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有する骨格修飾リボヌクレオチドである。

20

【0017】

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。

【0018】

さらなる実施形態において、該ヌクレオチド類似体は、2'-OH基がH、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、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、糖修飾リボヌクレオチドである。

30

【0019】

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。

【0020】

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の遺伝子または核酸に対して該二重鎖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(topical)投与、または局所(regional)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、リポソーム、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。

40

【0021】

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、

50

該第1鎖は標的mRNA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mRNA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RNA分子は、単離二重鎖RNA分子である。

【0030】

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。

【0031】

別の実施形態において、該第1鎖は、1～10ヌクレオチドの3'突出と平滑末端とを有する。

10

【0032】

さらに別の実施形態において、該第1鎖は、1～10ヌクレオチドの5'突出と平滑末端とを有する。

【0033】

代替的な実施形態において、該RNA二重鎖は、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'突出とを有する。

【0034】

一実施形態において、該第1鎖は、12～100ヌクレオチド、12～30ヌクレオチド、18～23ヌクレオチド、19～25ヌクレオチドの長さとを有する。さらなる実施形態において、該第1鎖は、21ヌクレオチドの長さとを有する。

20

【0035】

別の実施形態において、該第2鎖は、5～30ヌクレオチド、12～22ヌクレオチド、12～17ヌクレオチドの長さとを有する。さらなる実施形態において、該第2鎖は、15ヌクレオチドの長さとを有する。

【0036】

一実施形態において、該二本鎖領域が27bpである場合、該RNA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12～30ヌクレオチドの長さとを有し、該第2鎖は10～29ヌクレオチドの長さとを有する。さらなる実施形態において、該第1鎖は18～23ヌクレオチドの長さとを有し、該第2鎖は12～17ヌクレオチドの長さとを有する。

30

【0037】

別の実施形態において、該第1鎖は19～25ヌクレオチドの長さとを有し、該第2鎖は12～17ヌクレオチドの長さとを有する。

【0038】

代替的な実施形態において、

該第1鎖が

【0039】

【化1】

5'-UUCGAAGUAUUCGGCGUACGU

40

5'-UCGAAGUAUUCGGCGUACGUG または

5'-CGAAGUAUUCGGCGUACGUGA

であり、

該第2鎖が最長で17ヌクレオチドの長さとを有するか、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19～25ヌクレオチドの長さとを有し、該第2鎖は18～24ヌクレオチドの長さとを有する。

【0040】

一実施形態において、該第1鎖は21ヌクレオチドの長さとを有し、該第2鎖は12～1

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】

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。

20

【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、およびアブ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】

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。

30

【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有する。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有する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、NH₂、NHR、NR₂、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 1、Br、または I である。

【 0 0 5 6 】

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。

【 0 0 5 7 】

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、エレクトロボレーション、感染、注射、経口投与、吸入、局所 (topical) 投与、または局所 (regional) 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、リポソーム、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

30

40

【 0 0 5 8 】

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。

【 0 0 5 9 】

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

【 0 0 6 0 】

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。

【 0 0 6 1 】

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。

【 0 0 6 2 】

本発明は、二重鎖 RNA 分子を含む試薬を提供する。

40

【 0 0 6 3 】

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。

【 0 0 6 4 】

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。

【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、PMEL、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、リバーゼ、リポキシゲナーゼ、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、ホスホリバーゼ、ホスホリラーゼ、ポリガラクツロナーゼ、プロテイナーゼもしくはペプチダーゼ、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。

【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' -CCUCUUAUGAUGUAU CCGGGAGAAUACUACAUUAUA- 5'
aiStat3-A	5' -AGCAAAGAAUCACAU CGGUCGUUCUUAGUGUACAA- 5'
aiStat3-B	5' -GAAUCUCAACUUCAG CGUCUUAGAGUUGAAGUCUAA- 5'
aiPTEN	5' -UAAAGGUGAAGAUAU UCGAUUUCCACUUCUAAUUA- 5'
aip70S6K	5' -UGUUUGAUUUGGAUU GGCACAAACUAACCUAAAAAA- 5'
aimTOR	5' -GAAUUGUCAAGGGAU CGUCUUAACAGUUCCCCUUAUA- 5'
aiRsk1	5' -AAUUGGAACACAGUU CCUUUAACCUUGUGUAAAAAA- 5'
aiPCNA	5' -AGAUGCUGUUGUAAU ACCUCUACGACAACAUUAAAA- 5'
aiParp1	5' -GCGAAGAAGAAAUCU CACCGCUUCUUCUUAGAUAA- 5'
aiサバイビン	5' -AGGAGAUCAACAUUU dTdTUUCCUCUAGUUGUAAAAGU- 5'

10

20

【0071】

【表5-2】

aiNQO1	5' -GCAGACCUUUGUGAUA CGGCGUCUGGAACACUAUAAA-5'
aip21-A	5' -CCCGCUCUACAUCUU UCCGGCGAGAUGUAGAAGAA-5'
aip21-B	5' -GGCGGUUGAAUGGAGA GAUCCGCCAACUUACUCUAA-5'
aik-Ras	5' -GGAGCUGUUGGGCGUA CAACCUCGACAACCGCAUCAA-5'
ai β -カテニン-1	5' -GCUGAUUAUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-2	5' -GAUAUJUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-4	5' -CUGAUUAUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-5	5' -AGCUGAUUAUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-8	5' -UAGCUGAUUAUUGAUG CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-9	5' -UGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-10	5' -GCUGAUUAUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-11	5' -GCUGAUUAUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-18	5' -GCUGAUUAUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-34	5' -GCUGAUUAUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-35	5' -AGCUGAUUAUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-36	5' -AGCUGAUUAUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-37	5' -AGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-38	5' -UAGCUGAUUAUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-39	5' -GCUGAUUAUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-40	5' -AGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-42	5' -UAGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-43	5' -UAGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-44	5' -GUAGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-45	5' -GCUGAUUAUUGAAGGA CAUCGACUAUAACUACCUUGAA-5'
ai β -カテニン-46	5' -GCUGAUUAUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUUGUC-5'

10

20

30

40

【0072】

【表5-3】

ai β -カテニン-47	5'-GCUGAUUAUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-48	5'-GCUGAUUAUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-52	5'-gCUGAUUAUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-53	5'-GCUGAUUAUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-57	5'-gCUGAUUAUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUgaa-5'
ai β -カテニン-59	5'-GCUGAUUAUUGAUGGa catCGACUAUAACUACCUgaa-5' および
ai β -カテニン-62	5'-UAGCUGAUUAUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUgaa-5'

[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。

【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。

【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。

【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RN

10

20

30

40

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 1 C 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 2 A 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 2 B 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 2 C 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 2 D 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】ai 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 3 A 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、21 nt / 21 nt；レーン 2、12 nt (a) / 21 nt；レーン 3、12 nt (b) / 21 nt；レーン 4、13 nt / 13 nt；レーン 5、13 nt / 21 nt；レーン 6、14 nt / 14 nt；レーン 7、14 nt (a) / 21 nt；レーン 8、14 nt (b) / 21 nt；レーン 9、15 nt / 15 nt；レーン 10、15 nt / 21 nt。

【0078】

図 3 B 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 / ウエルで 6 ウエ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 siRNA (レーン 1)、21-bps siRNA 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 siRNA (レーン 3、陽性対照として)、または異なる長さの混合物：12 nt (a) / 21 nt (レーン 4)；12 nt (b) / 21 nt (レーン 5)；13 nt / 21 nt (レーン 6)；14 nt (a) / 21 nt (レーン 7)；14 nt (b) / 21 nt (レーン 8)；15 nt / 21 nt (レーン 9) の同じ濃度の ai 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プ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 ai 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 ai 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。ウエスタンプロットを実施して - カテニンおよびアクチンのレベルを検出した。si は - カテニン siRNA 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 ai 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 ai 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 ai 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。ウエスタンプロットを実施して - カテニンおよびアクチンのレベルを検出した。si は - カテニン siRNA 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 ai RNA オリゴに対応する。

【図 6-1】ai 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 6 a は、示した日数で ai RNA または si RNA でトランスフェクトした細胞における、- カテニン mRNA レベルのノーザンプロット分析を示す図である。

【0080】

図 6 b 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 6 c は、ai 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 ai 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】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の分析を示す図である。

【0082】

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

【0083】

図6eは、aiRNAとsiRNAの差次のRISCローディング効率を示す図である。pCMV-Ago2を用いたトランスフェクション後48時間でHeLa細胞にaiRNAまたはsiRNA二重鎖をトランスフェクトした。Ago2はaiRNAまたはsiRNAのトランスフェクション後に示した時間点で免疫沈降させ、ノーザンプロット分析を実施して Ago2 / RISC結合小RNAのレベルを決定した。(以下に示す) Ago2のレベルはIP後にウエスタンプロットによって決定した。

【0084】

図6fは、aiRNAおよびsiRNAの遺伝子サイレンシング活性に対するAgo2またはDicer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aiRNA(Con)またはaiRNA標的化Stat3(ai)を用いたトランスフェクションの24時間前に、スクランブルsiRNA(siCon)、またはsiRNA標的化Ago2(siAgo2)、またはDicer(siDicer)でトランスフェクトした。細胞を採取し、aiStat3トランスフェクション後48時間でウエスタンプロット分析を実施した。

【図7】siRNAと比較したRISCへのaiRNAの取り込みの利点を示す図である。

【0085】

図7Aは、aiRNAはsiRNAより良い効率でRISCに進入することを示す図である。Ago2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aiRNAまたはsiRNAでトランスフェクトした。細胞溶解後、Ago2を免疫沈降させ、RNA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aiRNAまたはsiRNAの21merアンチセンス鎖を検出した。IgG対照レーンは、Ago2免疫沈降物と比較したシグナルの欠如を示す。

【0086】

図7Bは、aiRNAのセンス鎖はRISC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】aiRNAによるRISCローディングのメカニズムの図である。

【0087】

図8Aは、aiRNAまたはsiRNAおよびAgo2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Ago2を含有するHeLaS-10溶解物を、³²P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aiRNAまたはsiRNA二重鎖とインキュベートした。(*)は標識の位置を示す。Ago2免疫沈降後、RNA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。Ago2結合RNAはペレット画分中に示され、一方非Ago2結合RNAは上清(Sup)中に残る。

【0088】

図8Bは、aiRNA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aiRNAで、または位置8(予想されるAgo2切断部位)が2'-O-メチルであるセンス鎖を有するaiRNA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aiRNAでトランスフェクトした。RNAをトランスフェクション後4時間で回収し、qRT-PCRを実施して残りの - カテニンmRNAの相対的レベルを決定した

10

20

30

40

50

。

【図9】aiRNAとsiRNAの競合分析を示す図である。

【0089】

図9Aは、³²P末端標識アンチセンス鎖を含有するsiRNA二重鎖およびaiRNA二重鎖を示す図である。(*)は標識の位置を示す。

【0090】

図9Bは、非放射能のaiRNAはAgO2に関して標識siRNAと競合しないことを示す図である。過剰発現AgO2を含有するHeLaS-10溶解物は、AgO2の免疫沈降前に³²P末端標識siRNAおよび非放射能のaiRNA二重鎖または非放射能のsiRNA二重鎖とインキュベートした。次いでRNAを単離し、15%アクリルアミドゲル上で分析した。
10

【0091】

図9Cは、非放射能のsiRNAはAgO2に関して標識aiRNA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-10溶解物を、AgO2の免疫沈降前に³²P末端標識aiRNAおよび非放射能のaiRNA二重鎖または非放射能のsiRNA二重鎖とインキュベートした。次いでRNAを単離し、15%アクリルアミドゲル上で分析した。

【図10】RISCローディングおよび成熟RISCの生成において観察した差を示す、aiRNAおよびsiRNA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14～15bpの非対称性RNA二重鎖(aiRNA)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

【0092】

図11Aは、-カテニンを標的とするsiRNAおよび-カテニンを標的とするaiRNAの配列および設計を示すダイアグラムを示す図である。

【0093】

図11Bは、様々な長さのaiRNAによる遺伝子サイレンシングの誘導を示す図である。-カテニンタンパク質レベルを、示したaiRNA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プ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14～15bpの非対称性RNA二重鎖(aiRNA)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

【0094】

図11Cは、aiRNAが-カテニンタンパク質欠乏の誘導においてsiRNAより強力かつ有効であることを示す図である。HeLa細胞は示した濃度で-カテニンを標的とするaiRNAまたは-カテニンを標的とするsiRNA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、ウエスタンプロット分析を行った。

【0095】

図11Dは、aiRNAが-カテニンRNAレベルの低減においてsiRNAより有効、迅速、および持続的であることを示す図である。細胞はノーザンプロット分析前に示した日数10nMの15bpのaiRNAまたは21-merのsiRNAでトランスフェクトした。
40

【図12-1】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。

【0096】

図12Aは、-カテニンを標的化するために使用したaiRNAおよびsiRNAの配列および構造を示す図である。

【0097】

図12Bは、対照aiRNAまたは-カテニンを標的とするaiRNAでトランスフ
50

エクトした細胞由来の - 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12C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 - 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12D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 - カテニンタンパク質レベルのウエスタンプロット分析を示す図である。

【図13-1】複数の標的に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) - カテニン、10nM、(b)Stat3、(c)EF2、または(d)NQO1、20nM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プロットによって分析した。qRT-PCRデータはsiCon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) - カテニン、10nM、(b)Stat3、(c)EF2、または(d)NQO1、20nM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プロットによって分析した。qRT-PCRデータはsiCon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14aは、aiRNA二重鎖は、異なる哺乳動物細胞系中の - 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14bは、48時間20nM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のウエスタンプ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14cは、48時間20nM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のウエスタンプロット分析を示す図である。

【0103】

図14d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。ウエスタンプ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(DLD1)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Stat3(センスRNA)を発現するプラスミドまたはアンチセンスStat3(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、Stat3センスRNAまたはStat3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つい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

および第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に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/またはバブルを有する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つの鎖の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/またはバブルを有するRNA分子を含む。1つの鎖が、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つの鎖は、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阻害または欠如；腫瘍転移の阻害または欠如；腫瘍増殖の阻害または欠如；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、タンパク質の產生、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くて、最低のストリング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グエンシーの関係は、当技術分野で周知である。2つ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

50

きる転写後の遺伝子サイレンシングの形態である。d s R N A 標的のアンチセンス R N A 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 R N A (m R N A) などの相補的遺伝子転写物を標的にする。

【0133】

R N A i プロセスにおいて、長鎖 d s R N A 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 R N A (s i R N A) と呼ばれる短鎖形態に加工される。s i R N A 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 R N A 誘導サイレンシング複合体 (R I S C) 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】

R N A i 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。R I S C、および Dicer は、真核生物ドメインの全体で保存されている。R N A i 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 R N A (s i R N A) は、生物学において様々な役割を果たす短鎖二本鎖 R N A (d s R N A) 分子の一種である。最も顕著には、低分子干渉 R N A は、s i R N A が特定の遺伝子の発現に干渉する R N A 干渉 (R N A i) 経路に関与する。さらに、s i R N A 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、s i R N A 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 n t) 二本鎖 R N A (d s R N A) 領域を有する。

20

【0136】

マイクロ R N A (m i R N A) 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 R N A 分子の一種である (Czech, 2006 年; Eulalio ら, 2008 年; Mack, 2007 年)。m i R N A 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。m i R N A は、250 ~ 500 個の異なる m R N A を標的にする場合がある。m i R N A は、一次 m i R N A (pri-m i R N A) の産物である、p re-m i R N A 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、m i R N A 阻害剤であり、内因性 m i R N A 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 m i R N A アゴニストであり、模倣体を用いて m i R N A を置換し、m R N A をダウンリ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 R N A (d s R N A)、p re-マイクロ R N A (m i R N A)、および短鎖ヘアピン R N A (s h R N A) 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 R N A (s i R N A) と呼ばれる短鎖二本鎖 R N A 断片に切断する。Dicer は、R N A 干渉経路の第 1 段階を触媒し、R N A 誘導サイレンシング複合体 (R I S C) の形成を開始し、その触媒成分である argonaute は、配列が s i R N A ガイド鎖の配列に相補的であるメッセンジャー R N A (m R N A) 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 s i R N A 配列は、R N A i を誘発して、標的遺伝子の転写物の分解に効果的である s i R N A である。標的遺伝子に相補的な s i R N A の全てが、R N A i 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 s i R N A 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 s i R N A 配列は、90% を超えて、80% を超えて

50

、70%を超えて、60%を超えて、50%を超えて、40%を超えて、または30%を超えて標的遺伝子の発現を減少させることができる。

【0140】

本発明は、siRNA様の結果をもたらし、またmiRNA経路の活性を調節するため に用いることができる非対称性干渉RNA(aiRNA)と呼ばれる新規な構造足場を 提供する(詳細には、名称「Composition of Asymmetric RNA Duplex as MicroRNA Mimetic or Inhibitor」に基づく、本出願と同日に出願された共有に係るPCTおよび米国特許出願において 説明され、それらの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0141】

aiRNAの新規の構造的設計は、遺伝子調節を行うことにおいて機能的に強力である だけでなく、現況技術のRNAi調節因子(主にアンチセンス、siRNA)に対していくつかの利点も提供する。これらの利点の中で、aiRNAは、現在のsiRNAコンストラクトよりはるかに短い長さのRNA二重鎖構造を有することができ、これは、合成費用を低減し、宿主細胞からの非特異的インターフェロン様免疫応答の長さ依存性誘発を 阻止、または低減するはずである。aiRNA中のより短い長さのパッセンジャー鎖はまた、RISCにおけるパッセンジャー鎖の意図されない取り込みも排除または低減し、その 結果としてmiRNA媒介遺伝子サイレンシングにおいて観察されるオフターゲット効果を 低減するはずである。aiRNAは、バイオテクノロジー産業および医薬産業、ならびに miRNAに基づく診断および治療における生物学研究、R&Dを含めて、現在のmi- RNAに基づく技術が適用されているか、適用されることが企図されているすべての範 囲において使用することができる。

【0142】

2. aiRNA構造足場

Elbashirらは、いくつかの非対称性二重鎖RNA分子、ならびに対称性siRNA分子を試験した(Elbashirら、2001c)。非対称性二重鎖RNA分子は、対応するsiRNA分子とともに表1に列挙される。

【0143】

【表1】

表1

B	C	D
5'-CGUACGCGGAAUACUUUCG UGCAUGC GCCUUUAUGAAGCUU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUUCG GUGCAUGC GCCUUUAUGAAGCU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUUCG AGUGCAUGC GCCUUUAUGAAGC- 5'
5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA UGCAUGC GCCUUUAUGAAGCUU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA GUGCAUGC GCCUUUAUGAAGCU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA AGUGCAUGC GCCUUUAUGAAGC- 5'
5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAA UGCAUGC GCCUUUAUGAAGCUU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAA GUGCAUGC GCCUUUAUGAAGCU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAA AGUGCAUGC GCCUUUAUGAAGC- 5'
5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAA UGCAUGC GCCUUUAUGAAGCUU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAA GUGCAUGC GCCUUUAUGAAGCU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAA AGUGCAUGC GCCUUUAUGAAGC- 5'
5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU UGCAUGC GCCUUUAUGAAGCUU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU GUGCAUGC GCCUUUAUGAAGCU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU AGUGCAUGC GCCUUUAUGAAGC- 5'
5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG UGCAUGC GCCUUUAUGAAGCUU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG GUGCAUGC GCCUUUAUGAAGCU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG AGUGCAUGC GCCUUUAUGAAGC- 5'
5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU UGCAUGC GCCUUUAUGAAGCUU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU GUGCAUGC GCCUUUAUGAAGCU- 5'	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU AGUGCAUGC GCCUUUAUGAAGC- 5'
5'- CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC UGCAUGC GCCUUUAUGAAGCUU- 5'	5'- CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC GUGCAUGC GCCUUUAUGAAGCU- 5'	5'- CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC AGUGCAUGC GCCUUUAUGAAGC- 5'

しかしながら、対応する対称性siRNA分子と比較すると、非対称性二重鎖RNA分子は、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。

10

20

30

40

50

【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、Elba shir (Elba shir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。

10

【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1nt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20nt長い。別の実施形態において、第1鎖は、第2鎖よりも20～100nt長い。さらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖よりも2～12nt長い。なおさらなる実施形態において、第1鎖は、第2鎖よりも3～10nt長い。

20

【0146】

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、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30bpであり得る。

20

【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。

30

【0148】

一実施形態において、第1鎖は、

【0149】

【化2】

5'-UUCGAAGUAUUCCGCGUACGU

5'-UCGAAGUAUUCCGCGUACGUG または

5'-CGAAGUAUUCCGCGUACGUGA,

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。

30

【0150】

代替の実施形態において、第1鎖は、

【0151】

【化3】

5'-UUCGAAGUAUUCCGCGUACGU

5'-UCGAAGUAUUCCGCGUACGUG または

5'-CGAAGUAUUCCGCGUACGUGA.

40

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。

40

【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

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ホームを提供する。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。

【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。

【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。

【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。

【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】

10

20

30

40

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2～100nt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。

10

20

30

40

50

【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。

10

【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。

20

【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ます。

【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。

30

【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。

40

【0177】

2.2. 第1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

50

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、10～18bp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30bpとすることができます。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1、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4～10nt長い。

10

【0180】

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、10～30nt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、1～10nt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。

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、1～10ntの長さを有する。さらなる実施形態において、5'突出は、1～6nt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、2～4nt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10nt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、3～98bpの長さを含む。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、10～18bp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30bpとすることができます。

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 Fougerolles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ます。

【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、任意の鋳型配列（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

10

20

30

40

50

は、「A A」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、「U U」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、NH₂、NHR、NR₂、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 Fougerolles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。

20

【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、-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-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、囊胞性線維症)；神経系疾患(例えば、ハンチンドン病(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)；心臓血管疾患；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、ETS1、ETV6、FGR、FOS、FYNN、HCR、HRAS、JUN、KRA5、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3およびYES)(例えば、APC、BRCA1、BRCA2、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グナーゼ、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、リポキシゲナーゼ、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、ポリガラクトロナーゼ、プロテイナーゼまたはペプチダーゼ、ブルナーゼ、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бин、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。
10

【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。
20

【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 ; de F ougerol 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 卷 : 2 7 3 ~ 2 7 5 頁 (2 0 0 7 年)) 。
30

【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 - メチルブリンおよび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。
40

【0 2 2 2】

別の安定化修飾は、ホスホチオエート(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】

R N A 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、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、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、NH₂、NHR、NR₂、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、C1、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R N A 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R N A 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、R N A 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R N A 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. R N A 分子のin vivo送達

R N A i の治療用途にとっての1つの主な障害は、標的細胞へのsi R N A の送達である(ZamoreおよびAronin(2003年))。様々な手法が、R N A 分子、特にsi R N A 分子の送達のために開発された(例えば、(de Fougerolles 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R N A 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 & Woodle, Methods in Molecular Biology 437巻: 93~107頁(2008年))。そのsi R N A およびmi R N A 対応物と比較して、ai R N A 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、ai R N A は、そのsi R N A およびmi R N A 対応物より小さいように設計すること

10

20

30

40

50

ができる、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 RNA*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 RNA*を必要とする。第3に、*a i RNA*は二本鎖であり、一本鎖のアンチセンスオリゴおよび*mi RNA*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RNA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(IV.)および腹腔内(ip)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RNA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RNA分子の結合、またはアプタマー、リポソーム調合送達、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、正に帶電した担体(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、陽イオン性リポ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 Control Release 74巻:309~311頁; SongらNat Biotechnol. 23巻(6号):709~717頁(2005年); MorrisseyらNat Biotechnol. 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、*in vivo*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、*siRNA*をRNAse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、RGDペプチドリガンド標的ナノ粒子を形成する。異なる*siRNA*オリゴを、同じRGD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ますが示された(WoodleらMaterials 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RNA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RNA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(AAV)が、ゲノムに組み込まれないで、エピソーム発現を有するRNA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RNA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RNA分子と、医薬的担体、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、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、RNA成分を除いて、*siRNA*、*miRNA*、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 Fougerolles 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。

10

【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。

20

【0241】

30

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疗方法を提供する。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 1 ng ~ 1 g、1 日あたり 100 ng ~ 1 g、または 1 日あたり 1 μg ~ 1 mg である。

【0242】

40

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、リンガーリー液、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

50

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、シリップ、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

）、R I S Cに進入しR N A iを媒介することが知られている最小R N A二重鎖（E l b a s h i r ら、2 0 0 1 a；E l b a s h i r ら、2 0 0 1 b；E l b a s h i r ら、2 0 0 1 c；F i r e ら、1 9 9 8 年；Z a m o r e ら、2 0 0 0 年）を組み込む際に、R N A誘導サイレンシング複合体（R I S C）によって媒介される（H a m m o n d ら、2 0 0 0 年、M a r t i n e z およびT u s c h l 、2 0 0 4 年；R a n a 、2 0 0 7 年）。R I S C酵素複合体の天然基質として、s i R N Aをその様々な前駆体のD i c e r触媒的プロセ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（D o n z e およびP i c a r d 、2 0 0 2 年；H a m m o n d ら、2 0 0 0 年；K i m ら、2 0 0 5 年；P a d d i s o n ら、2 0 0 2 年）。遺伝子サイレンシングに広く使用されているが、s i R N A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（d e F o u g e r o l l e s ら、2 0 0 7 年；I o r n s ら、2 0 0 7 年）。ここで本発明者らは、哺乳動物細胞中の有効なR N A i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1 4 ~ 1 5 b pの非対称性R N A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1 4 ~ 1 5 b pの二重鎖R N Aによって構造的に特徴付けられる非対称性干渉R N A（a i R N A）を、s i R N Aより高い効率でR I S Cに組み込んだ。a i R N Aは、哺乳動物細胞においてm R N A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m R N Aの同一配列を標的化したとき、a i R N Aは、i n v i t r oでの遺伝子サイレンシングの媒介において、s i R N Aより有効（ほぼ1 0 0 %）、強力（ピコM）、急激な発生（2 4 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、a i R N Aが、R I S Cに組み込まれた最小R N A二重鎖足場であって、かつ哺乳動物細胞においてs i R N Aより良い効率で遺伝子をサイレンシングする非s i R N A型のR N A iメディエーターであることを示唆する。したがって、a i R N Aは広範囲のR N A iの適用例に有意な可能性を有し得る。

【 0 2 5 0 】

方法および材料

細胞培養および試薬

HeLa、SW480、DL1D1、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、100 µg/mlのストレプトマイシンおよび2 mMのL-グルタミン(Invitrogen)を含有するダルベッコ変形イーグル培地(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ンーリングした(図3a)。ヒト Ago2を標的とする siRNA、およびDicer(Ambion)は100 nM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 Argonaute2(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 siRNA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工チジウム染色によって決定した。

【 0 2 5 1 】

ノーザンプロット分析。

【 0 2 5 2 】

- 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 antiRNA トランスクレプト HeLa 細胞から TRIZOL (Invitrogen) を用いて全 RNA を抽出した。20 μg 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度焼いた。-カテニンおよびアクチンmRNAを検出するプローブを、-カテニンcDNA断片(1~568nt)およびアクチンcDNA断片(1~500nt)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³²P標識RNAプローブを作製した。アンチセンスプローブ(5'-GUAGCUGAUAUUUGAUGGACUU-3')。センスプローブ(5'-UCCAUCAAAUACAGC-3')

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³²P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度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、³²P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度インキュベートし、上に記載したように処理した。

【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ワントップ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-Xho1部位でのpcDNA3.1⁺またはpcDNA3.1⁻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ワントップ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'-GGATCTAGAACGCTACAGCAGC-3')およびStat3逆方向(5'-TCCTCTAGAACGCTACAGCAGC-3')

10

20

30

40

50

G G G C A A T C T C C A T T G - 3') プライマーおよびアクチン順方向 (5' - C C A T G G A T G A T G A T A T C G C C - 3') およびアクチン逆方向 (5' - T A G A A G C A T T T G C G G T G G A C - 3') プライマーを使用して同じ RNA 試料で実施した。

【 0 2 5 5 】

R T - P C R

全 RNA は T R I Z O L を使用して調製し、 c D N A はランダムプライマーおよび Th e r m o s c r i p t R T - P C R S y s t e m (I n v i t r o g e n) を使用して合成した。 P C R は P f x 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' C C A T G G A T G A T G A T A T C G C C - 3' ； アクチン - 2 、 5' - T A G A A G C A T T T G C G G T G G A C - 3' ； - カテニン - 1 、 5' - G A C A A T G G C T A C T C A A G C T G - 3' ； - カテニン - 2 、 5' - C A G G T C A G T A T C A A A C C A G G - 3' 。

10

【 0 2 5 6 】

ウエスタンプロット

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 (5 0 m M の H E P E S 、 pH 7 . 5 、 0 . 5 % の N o n i d e t P - 4 0 、 1 5 0 m M の N a C l 、 1 m M の E D T A 、 1 m M の E G T A 、 1 m M のオルトバナジウム酸ナトリウム、 1 m M のジチオスレイトール、 1 m M の N a F 、 2 m M のフェニルメチルスルホニルフルオリド、および 1 0 μ g / m l のそれぞれのペプスタチン、リューペプチド、およびアプロチニン) 中で溶解した。 2 0 μ g の可溶性タンパク質を S D S - P A G E によって分離し、 P V D F 膜に移した。 - カテニン、 N b s 1 、サバイビン、 p 2 1 、 R s k 1 、 k - R a s 、 S t a t 3 、 P C N A 、 N Q O 1 、アクチン (S a n t a C r u z) 、 E F 2 、 p 7 0 S 6 K 、 m T O R 、 P T E N (C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y) 、 A g o 2 (W a k o) 、 D i c e r (N o v u s) 、および P a r p 1 (E M D B i o s c i e n c e s) 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 (G E B i o s c i e n c e s) によって目に見える状態にした。

20

【 0 2 5 7 】

5' - R A C E 分析

非サイレンシング a i R N A または a i R N A で処理した H e l a 細胞由来の全 RNA (5 μ g) を、任意の事前処理なしで G e n e R a c e r (商標) R N A アダプター (I n v i t r o g e n 、 5' - C G A C U G G A G C A C G A G G A C A C U G A C A U G G A C U G A A G G A G U A G A A A - 3') と連結させた。連結 R N A はランダムプライマーを使用して c D N A に逆転写した。 切断産物を検出するために、 R N A アダプターと相補的なプライマー (G e n e R a c e r (商標) 5' ネステッドプライマー : 5' - G G A C A C T G A C A T G G A C T G A A G G A G T A - 3') および - カテニン特異的プライマー (G S P : 5' - C G C A T G A T A G C G T G T C T G G A A G C T T - 3') を使用して P C R を実施した。 増幅断片は 1 . 4 % アガロースゲルで分けて、 1 - k b の P l u s D N A ラダー (I n v i t r o g e n) を使用して分子量を決めた。 特異的切断部位を D N A 配列決定によってさらに確認した。

30

【 0 2 5 8 】

インターフェロン応答の検出。

【 0 2 5 9 】

図 1 5 a 中の実験用に、 P B M C を 1 0 0 n M の - カテニン s i R N A または a i R N A と直接インキュベートした。 全ての R N A は T R I Z O L を使用して 1 6 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 (S y s t e m B i o s c i e n c e s) によって記載されたように R T - P C R によって決定した。 図 1 5 b 中の実験用に、 H e l a 細胞をモックトランスフェクトしたかまたは 2 4 時間 1 0 0 n M の示した 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 を使用して精製し、インターフェロン応答遺伝子の発現のレベルは R T - P C R によって

40

50

決定した。マイクロアレイ分析用に、HeLa細胞を100nMの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24時間で精製し、RNAは製造者のプロトコル(Expression Analysis, Inc.)に従いヒトゲノムU133 Plus 2.0遺伝子チップ(Affymetrix)とのハイブリダイゼーションに使用した。DharmaFECT1処理細胞由来のRNA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Suite5.0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。

【0260】

aiRNA配列およびsiRNA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。

【0261】

【表2】

表2

siβ-カテニン	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	siRsk1	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
aiβ-カテニン	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	aiRsk1	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
siNbs1	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	siPCNA	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
aiNbs1	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	aiPCNA	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
siEF2	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	siParp1	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
aiEF2	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	aiParp1	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	20
siStat3	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	siサバイビン	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
aiStat3	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	aiサバイビン	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
siPTEN	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	siNQO1	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
aiPTEN	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	aiNQO1	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	30
sip70S6K	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	siP21	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
aiP70S6K	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	aiP21	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
simTOR	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	alk-Ras	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	
aimTOR	9999999999999999999999999999999 uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu			

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(mm^3) $\pm \text{SE}$ として表す。0.05未満のP値は統計上関連があると考える。

40

【0262】

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(Argo)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; Matrangaら、2005年; Tabarara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】

10

20

30

40

【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

30

40

50

H e L a 細胞を 2 0 0 , 0 0 0 細胞 / ウエルで 6 ウエル培養プレートに平板培養した。図 3 B 中に示すように、24時間後、それらをスクランブル si RNA (レーン 1)、E 2 F 1 標的化 21 - bp si RNA (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 si 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 ai 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プロットによって決定した。E 2 F 1 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 (ai RNA) 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。

【0268】

ai RNA の機能において重要な ai RNA 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 ai RNA オリゴヌクレオチドを作製した(表 4)。表 4 中に要約した ai RNA 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 / 21 ai RNA 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 ai RNA 二重鎖を、50 nM で 48 時間 H e l a 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プロットを使用して、親 15 / 21 ai RNA と従来の si RNA 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 ai RNA 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 ai RNA 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 R N A - D N A 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 D N A 置換を含有しており、または示した長さの D N A センス鎖と対形成する 2 1 塩基のアンチセンス R N A を含有していた。これらの様々な a i R N A 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。

【 0 2 7 0 】

まとめるに、これらのデータは a i R N A 機能に対する構造的手掛けを与える。

【 0 2 7 1 】

センス鎖に関して、本発明者らのデータは、1 5 塩基の長さは十分働き、一方 1 4 塩基と 1 9 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 D N A と 1 つの R N A 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

【 0 2 7 2 】

アンチセンス鎖の長さに関しては、2 1 塩基の長さは十分働き、1 9 ~ 2 2 塩基は活性を保持し、および長さが 1 9 塩基未満に低減するまたは 2 2 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 R N A 配列と対形成する塩基が好ましく、3 塩基までの D N A 塩基の交換が同時の 5 ' D N A 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 R N A 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 D N A 塩基の交換を同時の 3 ' D N A 塩基の交換なしで許容することができる。
20

【 0 2 7 3 】

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、 a i R N A 構造によって許容されることを発見している。

【 0 2 7 4 】

【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' -GCUGAUUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'	
2	15-21a (NNNNNN---平滑)	5' -GAUAUUGAUGGACUU CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'	10
3	15-21b (平滑---NNNNNN)	5' -GUAGCUGAUUUUGAU CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'	
4	15-21c (NNNN---NN)	5' -CUGAUUUUGAUGGAC CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'	
5	15-21d (NN---NNNN)	5' -AGCUGAUUUUGAUGG CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'	
7	15-18b (平滑に切断された3' ---NNN)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA CGACUUAACUACCUGAA-5'	20
8	15-21d (N---NNNNN)	5' -UAGCUGAUUUUGAUG CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'	
9	15-21e (NNNNN---N)	5' -UGAUUUUGAUGGACU CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'	
10	15-22a (NNNN---NNN)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA UCAUCGACUUAACUACCUGAA-5'	
11	15-22b (NNN---NNNN)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGAAA-5'	30
13	15-24a (NNNNN---NNNN)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA UUCAUCGACUUAACUACCUGUAA-5'	
14	15-24b (NNNN---NNNNN)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA UCAUCGACUUAACUACCUGUCAA-5'	
15	15-27 (NNNNNN---NNNNNN)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA GUUCAUCGACUUAACUACCUGUCAA-	
16	15-20a (NNN---NN)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGA-5'	40
17	15-20b (NNNN---N)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA UCAUCGACUUAACUACCUG- 5'	
18	15-20c (NN---NNN)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA AUCGACUUAACUACCUGAA-5'	
21	15-19c (NNNN-平滑)	5' -GCUGAUUUUGAUGGA	

【表4-2】

		UCAUCGACUAUAACUACCU-5'
22	15-18a (NN---N)	5' -GCUGAUUAUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCU-5'
23	15-18b (NNN-平滑)	5' -GCUGAUUAUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCU-5'
24	15-18c (平滑---NNN)	5' -GCUGAUUAUGAUGGA CGACUUAACUACCU-5'
25	15-17a (NN---平滑)	5' -GCUGAUUAUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCU-5'
26	15-17b (平滑---NN)	5' -GCUGAUUAUGAUGGA CGACUUAACUACCU-5'
29	14-20 (NNN---NNN)	5' -GCUGAUUAUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCU-5'
30	14-19a (NNN---NN)	5' -GCUGAUUAUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCU-5'
31	14-19b (NN---NNN)	5' -GCUGAUUAUGAUGG AUCGACUAUAACUACCU-5'
33	14-18b (NNN---N)	5' -GCUGAUUAUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCU-5'
34	16-21a (NNN---NN)	5' -GCUGAUUAUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCU-5'
35	16-21b (NN---NNN)	5' -AGCUGAUUAUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCU-5'
36	17-21 (NN---NN)	5' -AGCUGAUUAUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCU-5'
37	18-21a (NN---N)	5' -AGCUGAUUAUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCU-5'
38	18-21b (N---NN)	5' -UAGCUGAUUAUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCU-5'
39	18-21c (NNN---平滑)	5' -GCUGAUUAUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCU-5'
40	19-21a (NN---平滑)	5' -AGCUGAUUAUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCU-5'
41	18-21b (平滑---NNN)	5' -GUAGCUGAUUAUGAUGGA CAUCGUCUAUAACUACCU-5'
42	19-21c (N---N)	5' -UAGCUGAUUAUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCU-5'
43	20-21a (N---平滑)	5' -UAGCUGAUUAUGAUGGACUU

【表4-3】

		CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'
44	20-21b(平滑---N)	5'-GUAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'
45	ミスマッチおよびmiRNA	5'-GCUGAUUUGA <u>A</u> GGA CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'
46	標的と相同な5'末端	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGUC-5'
47	NNNNNNNNNNNNNN 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNNDD-5'	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGaa-5'
48	NNNNNNNNNNNNNN 3'DDDNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-GCUGAUUUGAUGGA catCGACUUAACUACCUGAA-5'
49	NNNNNNNNNNNNNN 3'DDDNNNNNNNNNNNNNNDD-5'	5'-GCUGAUUUGAUGGA catCGACUUAACUACCUGaa-5'
51	DNDNNNNNNNDND 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-gCtGAUAUUGaUgGa CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'
52	DNNNNNNNNNNNN 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-gCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'
53	NNNNNNNNNNNNND 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-GCUGAUUUGAUGGa CAUCGACUUAACUACCUGAA-5'
54		5'-UAGCUGAUUUGAUG UUCAUCGACUUAACUACCUG-5'
55		5'-GUAGCUGAUUUGAUGGA UUCAUCGACUUAACUACCUG-5'
56		5'-AGCUGAUUUGAUGGA UUCAUCGACUUAACUACCUG-5'
57	DNNNNNNNNNNNN 3'DDDNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-gCUGAUUUGAUGGA catCGACUUAACUACCUGAA-5'
58	DNNNNNNNNNNNN 3'NNNNNNNNNNNNNNNNDD-5'	5'-gCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGaa-5'
59	NNNNNNNNNNNNND 3'DDDNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-GCUGAUUUGAUGGa catCGACUUAACUACCUGAA-5'
60	NNNNNNNNNNNNND 3'NNNNNNNNNNNNNNDD-5'	5'-GCUGAUUUGAUGGa CAUCGACUUAACUACCUGaa-5'
61	NNNNNNNNNNNNNNNN 3'DDDNNNNNNNNNNNNNN-5'	5'-UAGCUGAUUUGAUGGACU catCGACUUAACUACCUGAA-5'
62	NNNNNNNNNNNNNNNN 3'NNNNNNNNNNNNNNDD-5'	5'-UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUUAACUACCUGaa-5'

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.)

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。

【0278】

a i R N A 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、a i R N A による遺伝子サイレンシングが翻訳レベルまたはm R N A レベルで起こるかどうか決定した。10 n M の 15 b p a i R N A でトランスフェクトした細胞における - カテニンのノーザンプロット分析は、a i R N A は m R N A 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 6 a)、a i R N A が m R N A 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。a i R N A によって誘導される - カテニン m R N A の低減は、s i R N A 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 6 a)。本発明者らはさらに、15 b p a i R N A が - カテニン m R N A の部位特異的切断を触媒したかどうか決定した。15 b p a i R N A でトランスフェクトした細胞から単離した全ての R N A を、c D N A 末端(5' - R A C E)の迅速な增幅および - カテニン m R N A 切断断片の存在に関する P C R によって調べた(図 6 b)。本発明者らは、a i R N A トランスフェクション後 4 および 8 時間で - カテニン切断断片を検出した(図 6 c)。配列分析は、a i R N A アンチセンス鎖の 5' 末端に対して a i R N A 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 6 d)。スクランブル a i R N A 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 6 c)。これらの結果は、a i R N A は標的 m R N A 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

20

30

【0279】

次に本発明者らは、非対称性 a i R N A の新規の足場を R I S C 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 R I S C 酵素複合体によって R N A i が触媒される(Liuら、2004年; Matrangaら、2005年)。a i R N A が Ago / R I S C 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 a i R N A でトランスフェクトした後、myc タグ化 Ago 1(Siolasら、2005年)を発現する細胞由来の myc タグ化ヒト Ago 1 を免疫沈降させた。R I S C 複合体と結合した小 R N A は、Ago 免疫沈降物のノーザンプロッティングによって検出した。ノーザンプロット分析は、a i R N A は高い効率で R I S C 複合体に進入することを明らかにした(図 6 e)。これらのデータは、非対称性 a i R N A の新規の足場を効率良く R I S C 中に取り込ませることが可能であることを示唆する。

【0280】

a i R N A は s i R N A 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、a i R N A が s i R N A より効率良く R I S C 複合体を生成することができるかどうか試験した。図 6 e 中に示すように、a i R N A - Ago 2 / R I S C 複合体が s i R N A - Ago 2 / R I S C 複合体より速くより効率良く形成され、対応する s i R N A より多くの a i R N A が R I S C 複合体中に含有されていた(図 6 e および図 7 A)。注目すべきことに、s i R N A は s i R N A 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 6 e および図 7)。対照的に、a i R N A は 1 つのバンドを示し、短い長さの a i R N A は s i R N A 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、a i R N A の非対称性構造はアンチセンス鎖を有する活性 R I S C の形成を容易にし、センス鎖で形成される無効な R I S C を低減する可能性がある(Ref. 16)。本発明者らのデータは、図 7 B 中に示すようにこれは真実であり、センス鎖は R I S C 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 8 A も、a i R N A のアンチ

50

センス鎖は Ago 2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 Ago 2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; Tabarara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12~15bpの一組のこのような非対称性RNA二重鎖を設計して、-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 -カテニンを標的化した(Xiangら、2006年)。-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、-カテニン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、-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。

10

【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)、Nb1(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-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、-カテニン、Rsk1、p70S6K、Nb1、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の効力および效能を、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b-カテニンに対してsiRNAより有効であることも示す。

20

【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。

30

【0292】

(実施例4.)

a i RNA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。

40

【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

50

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

【 0 2 9 4 】

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 2 4 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

【 0 2 9 5 】

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 1 0 と塩基 1 1 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

【 0 2 9 6 】

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。 1 2 ~ 1 5 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、 1 9 ~ 2 1 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、 2 0 0 1 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、 2 0 0 4 年; Z h a n g より F a r w e l l 、 2 0 0 7 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

。R I S C の組込みおよび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用途の変更に関して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(8×10^6 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120mm³に達したときに投薬を開始した。動物は、毎日0.6nmol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、0.6nmol 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

【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(6×10^6 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200mm³に達したときに投薬を開始した。動物は、1日おきに0.6nmol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

40

50

た。図17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、0.21のp値で78%であると計算した。ここでも、-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、-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】

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 Fougerolles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。

10

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., Klippe, 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 Fougerolles, 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

【0307】

【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.
- 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.
- 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.
- 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.

10

20

30

【図1】

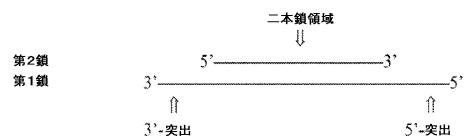


Figure 1A

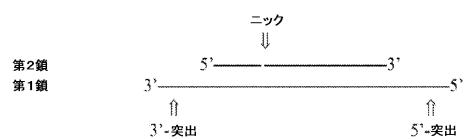


Figure 1B

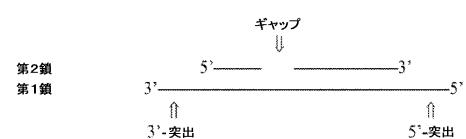


Figure 1C

【図2】

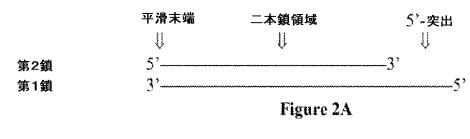


Figure 2A

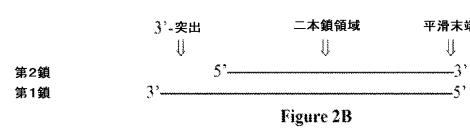


Figure 2B

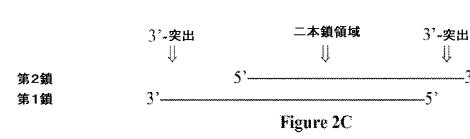


Figure 2C

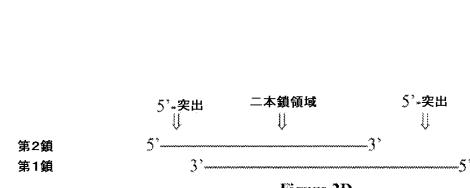


Figure 2D

【図3】

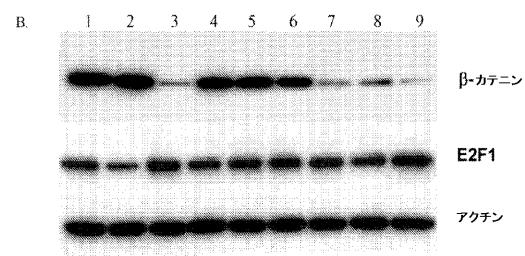
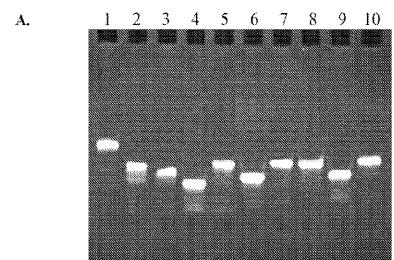


Figure 3

【図4】

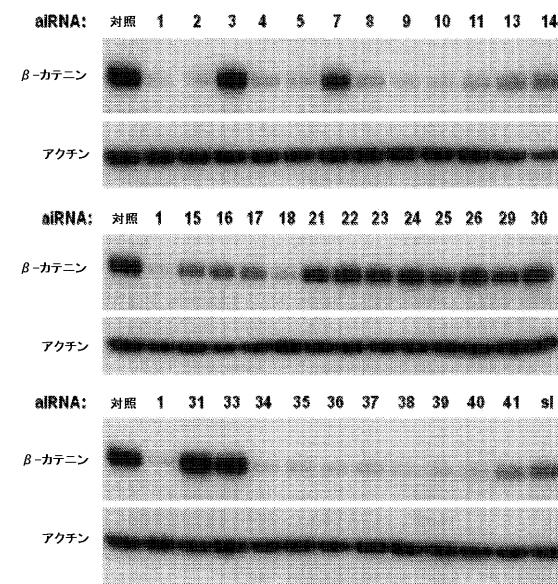


Figure 4

【図5】

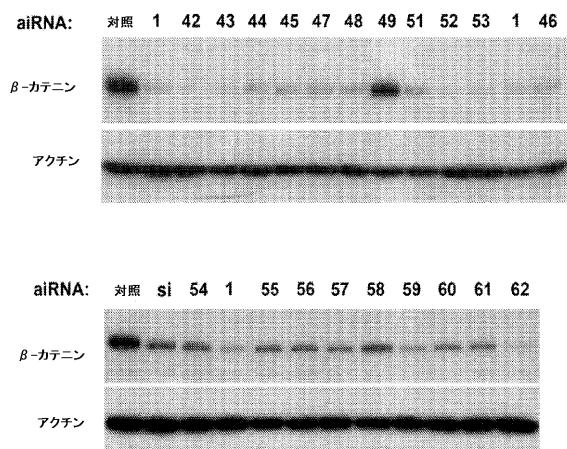
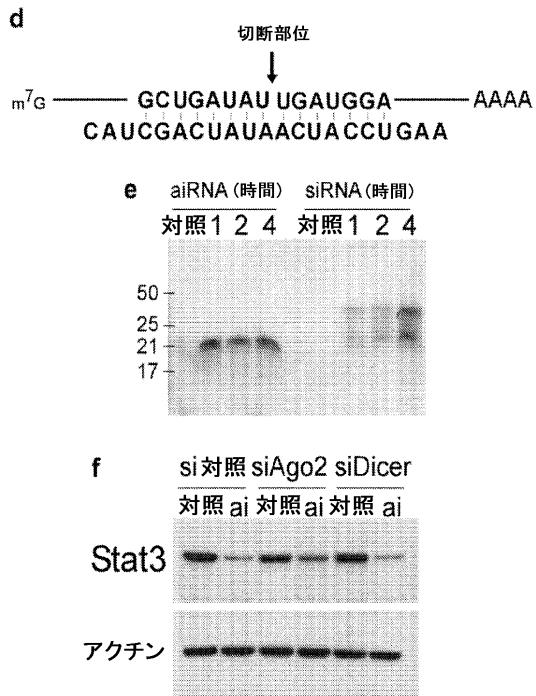


Figure 5

【図6-2】



Figures 6d-6f

【図7】

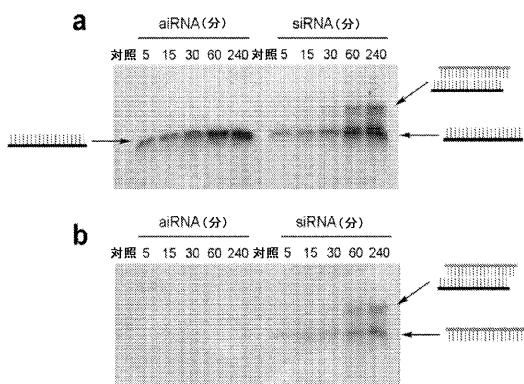


Figure 7

【図8】

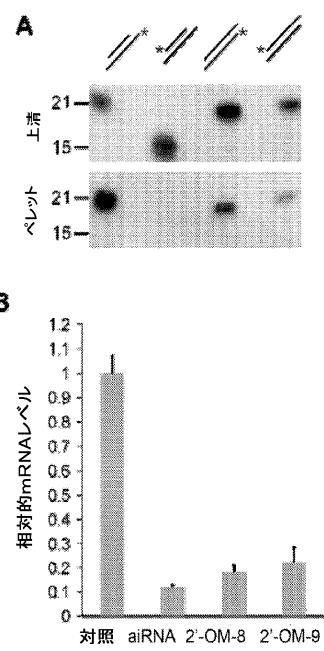


Figure 8

【図9】

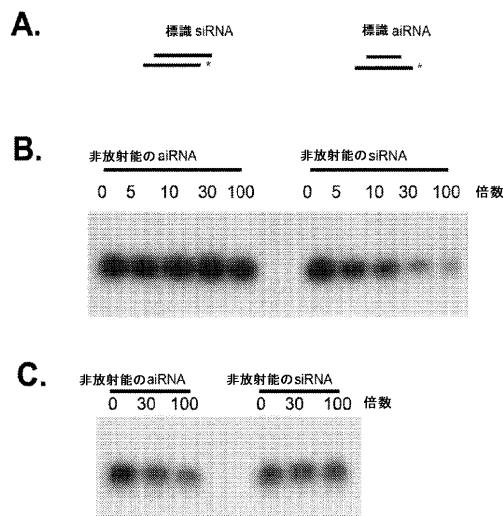


Figure 9

【図10】

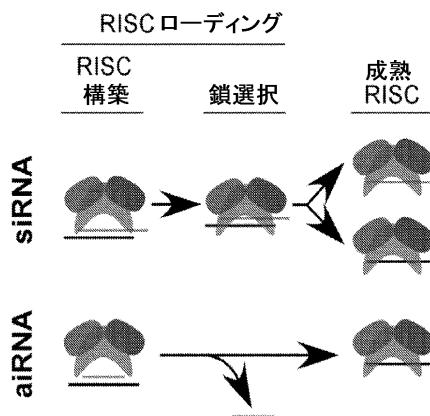
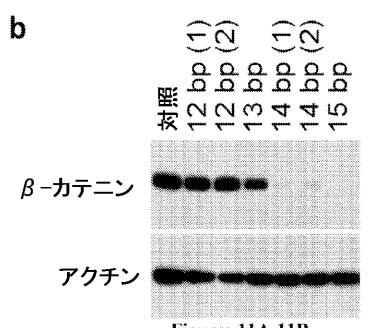
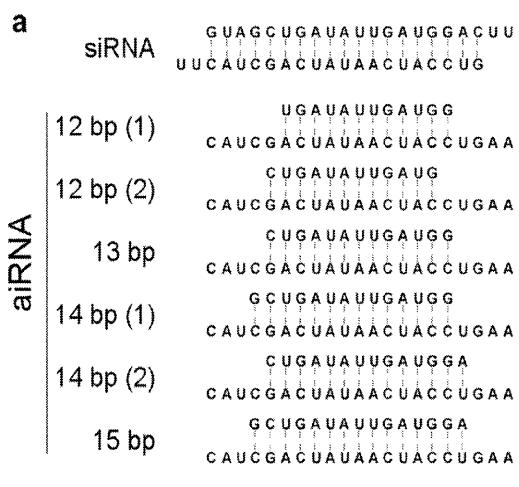


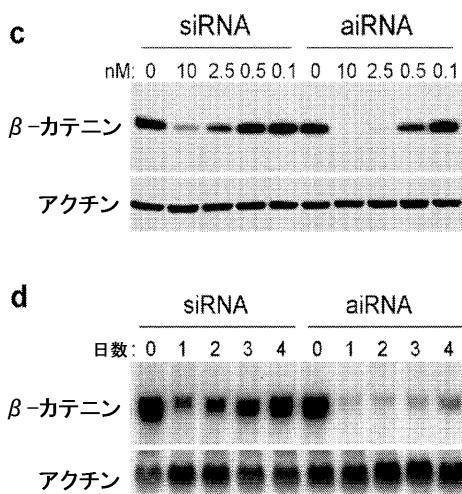
Figure 10

【図11-1】



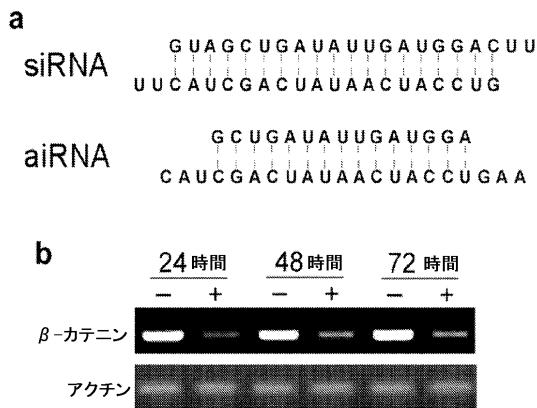
Figures 11A-11B

【図11-2】



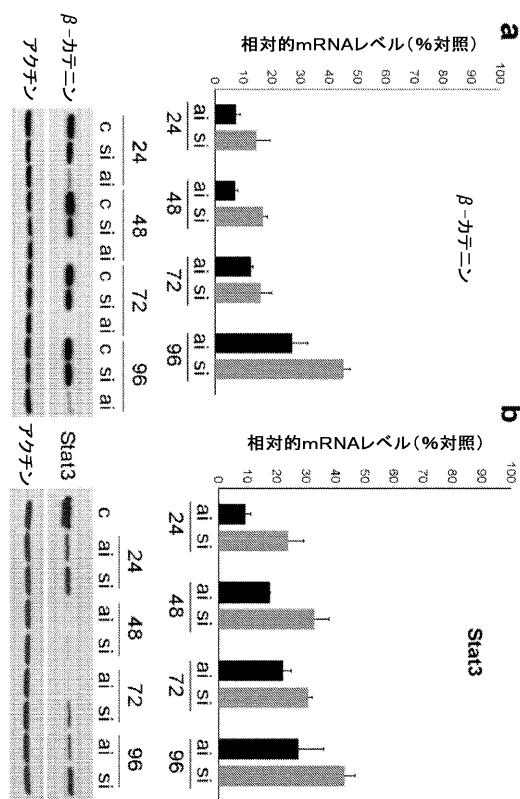
Figures 11C-11D

【図 12 - 1】



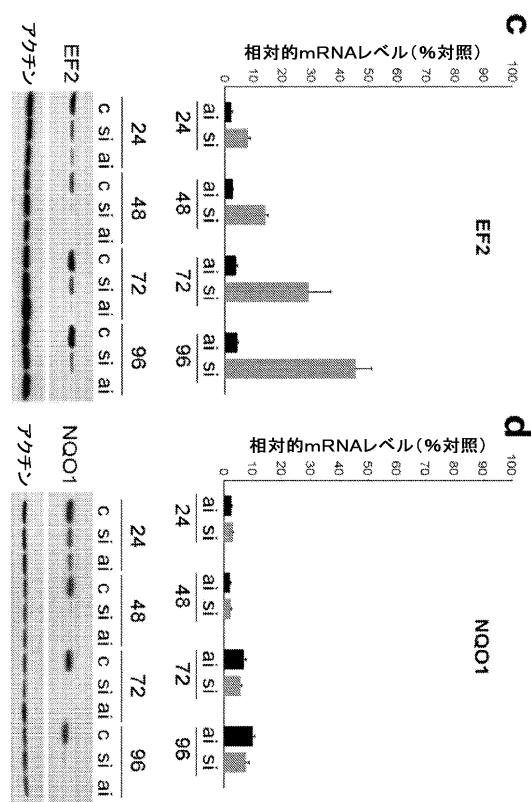
Figures 12A-12B

【図 13 - 1】



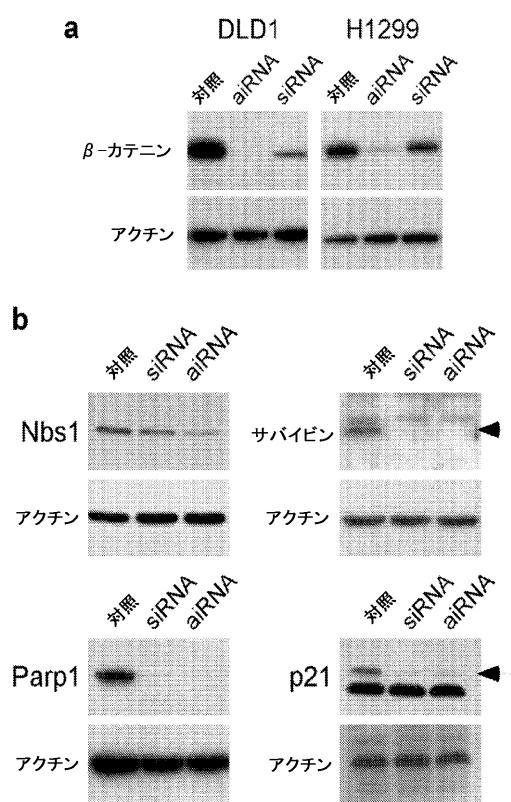
Figures 13a-13b

【図 13 - 2】



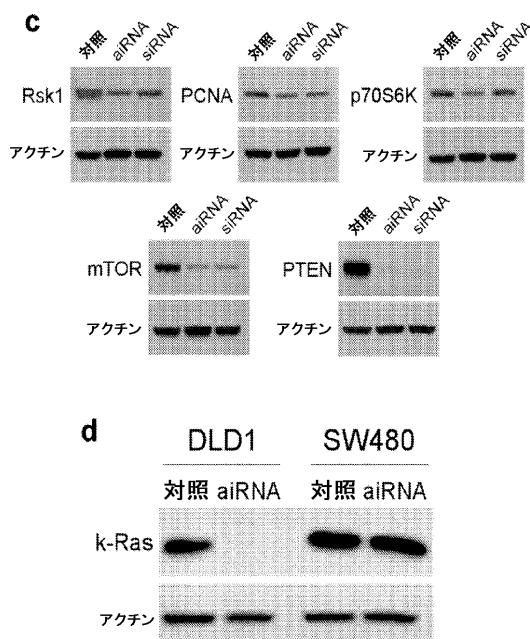
Figures 13c-13d

【図 14 - 1】



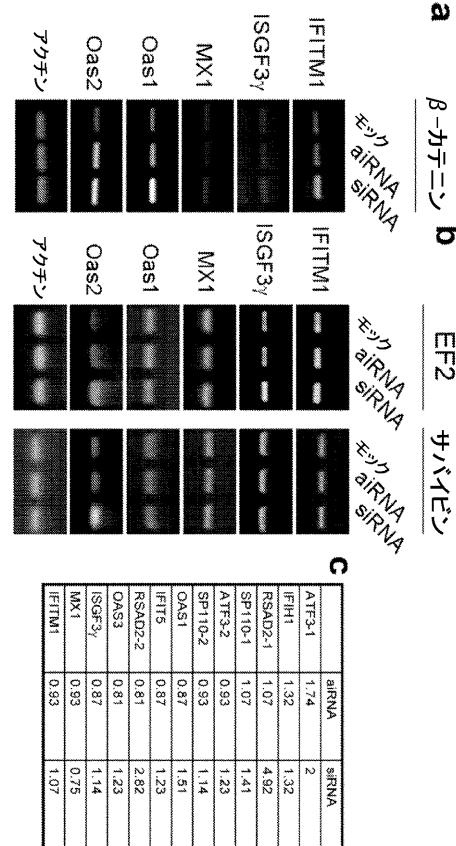
Figures 14a-14b

【図 14 - 2】



Figures 14c-14d

【図 15 - 1】



Figures 15a-15c

【図 15 - 3】

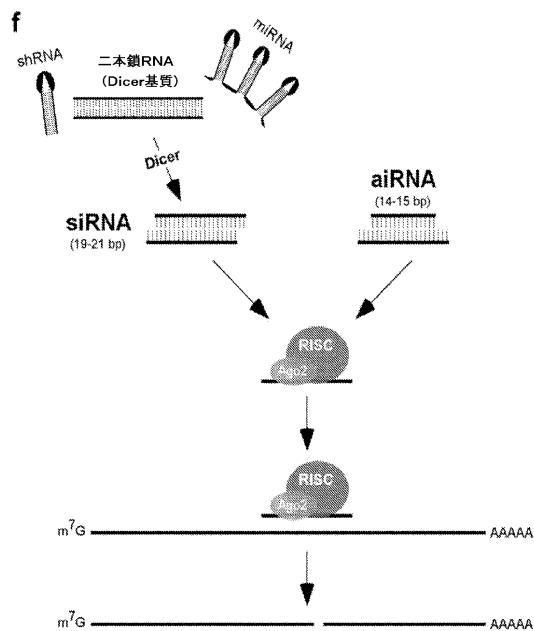


Figure 15f

【図 16】

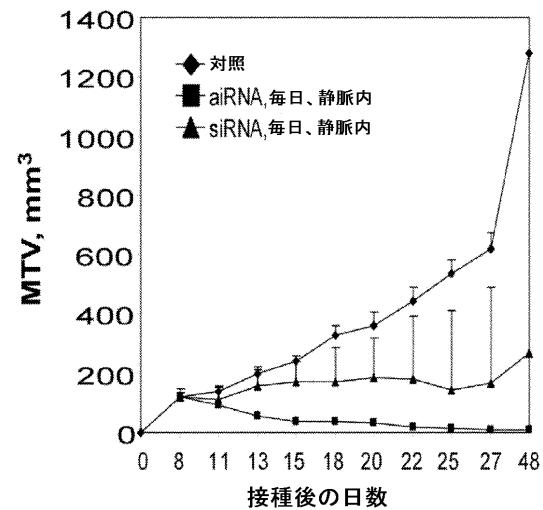


Figure 16

【図17】

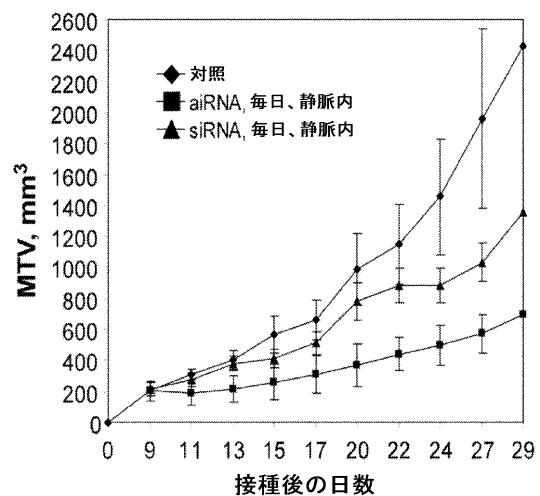
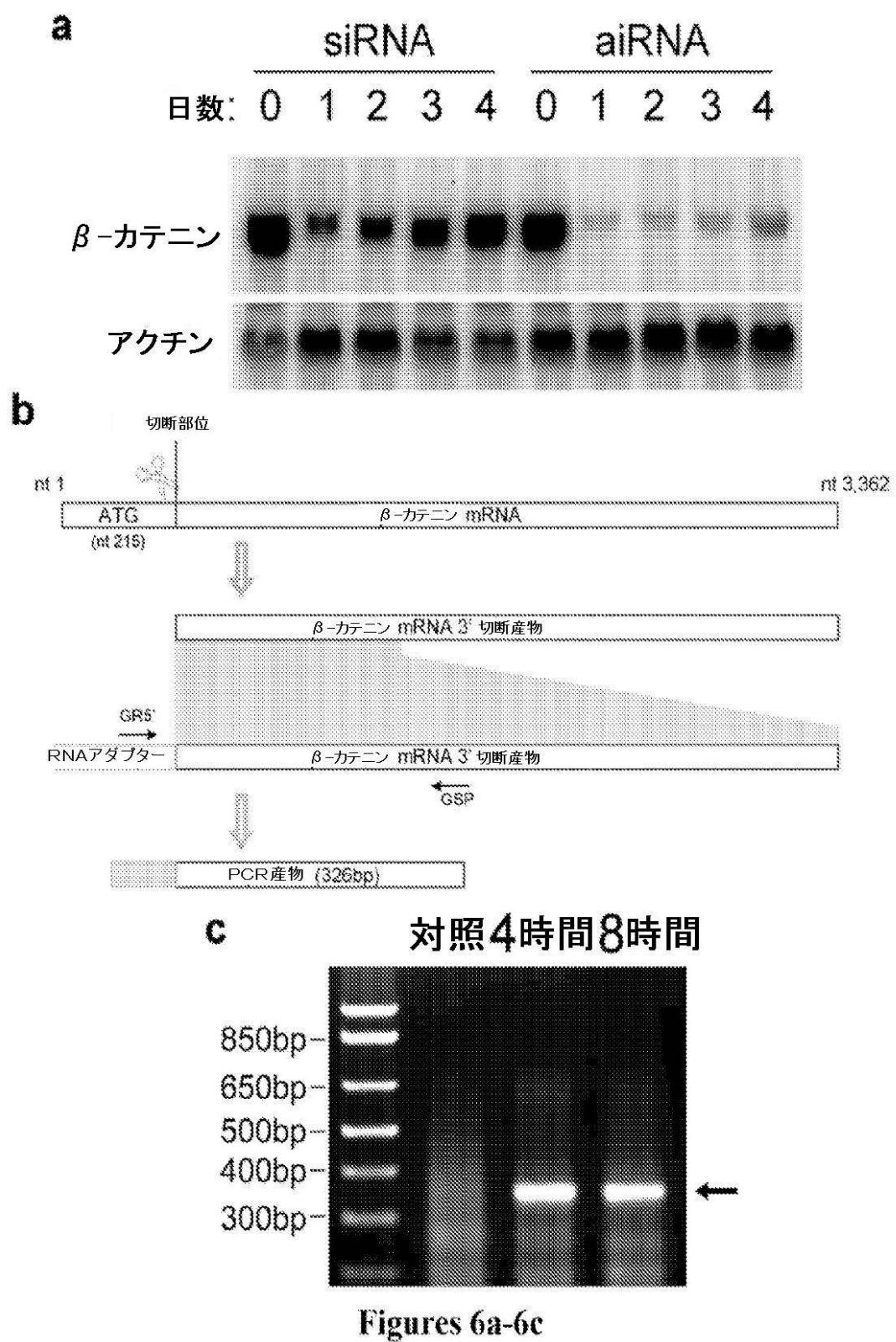


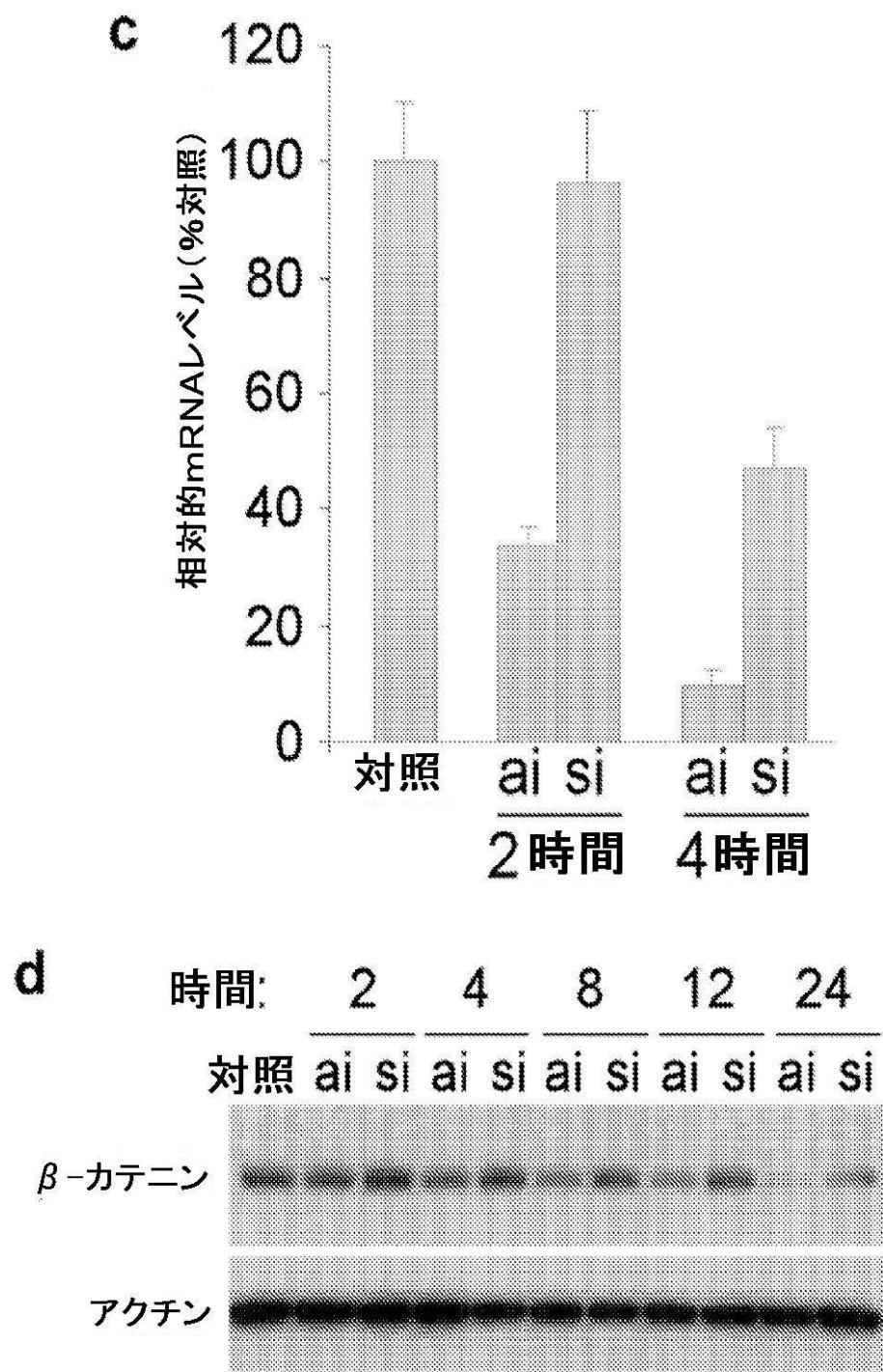
Figure 17

【図 6 - 1】



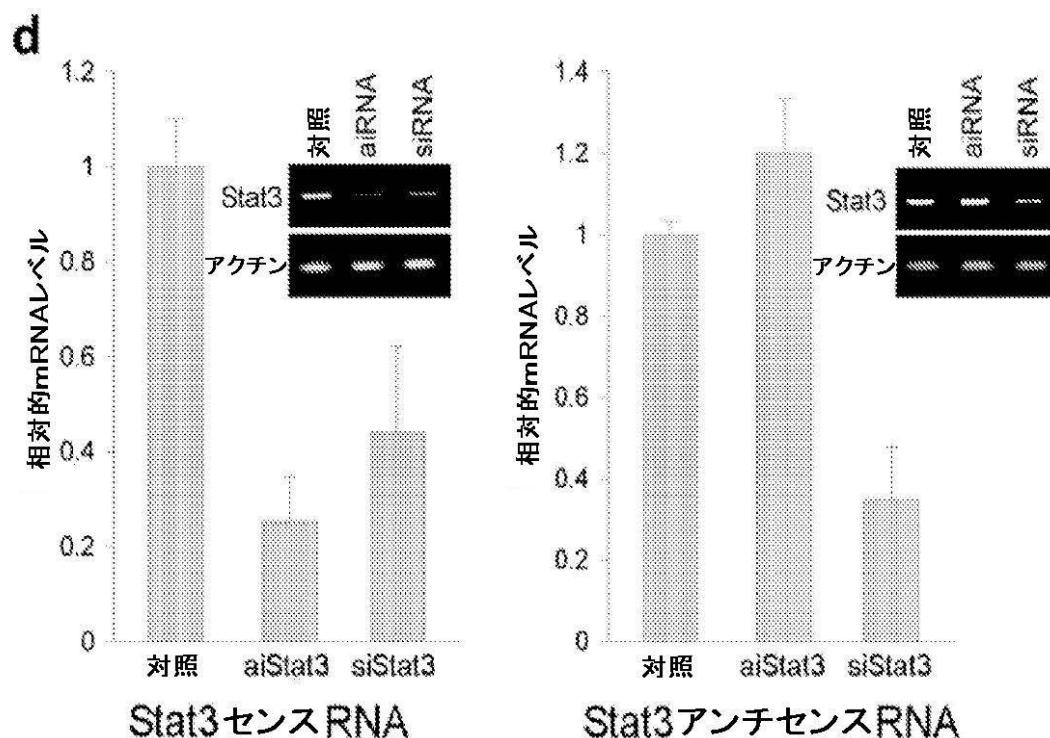
Figures 6a-6c

【図 12 - 2】

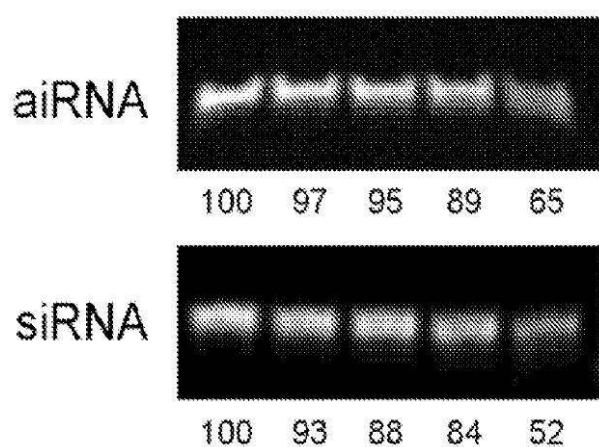


Figures 12C-12D

【図 15 - 2】



e 時間: 0 0.5 1 2 6



Figures 15d-15e

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/74828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 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. FIELDS SEARCHED 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, asymmetric, duplex near3'ra, gene silencing, phosphodlester, duplex RNA, nucleotide, siRNA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0229268 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	US 2006/0142228 A1 (Ford et al.) 29 June 2006 (29.06.2006) para [0023]; [0026]	1-44, 60, 61, 63, 64, 66, 67, 72, 73, 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])	1-44, 60, 61, 63, 64, 66, 67, 93-98, 100-106, 108-115, and 120-125
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)	39-42 and 120-123
		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 <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

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)		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input checked="" type="checkbox"/> 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 do not provide sequence identifiers as required by Annex C of the Administrative Instructions. 3. <input type="checkbox"/> 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)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>-----See Extra Sheet-----</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> 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. <input checked="" type="checkbox"/> 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	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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,T
R),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,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,K
G,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, ユーチー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 9 0 , ウエストウッド, 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