

(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2006-522158

(P2006-522158A)

(43) 公表日 平成18年9月28日(2006.9.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C O 8 4
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	4 C O 8 6
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 194 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-509745 (P2006-509745)	(71) 出願人	505369158
(86) (22) 出願日	平成16年4月5日 (2004.4.5)		アルナイラム ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月31日 (2005.10.31)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/010586		ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.
(87) 国際公開番号	W02004/090108		アメリカ合衆国 オ 2 1 4 2 マサチュー
(87) 国際公開日	平成16年10月21日 (2004.10.21)		セッツ州 ケンブリッジ サード ストリ
(31) 優先権主張番号	60/460, 783		ート 300
(32) 優先日	平成15年4月3日 (2003.4.3)	(74) 代理人	100068755
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 恩田 博宣
(31) 優先権主張番号	60/462, 894	(74) 代理人	100105957
(32) 優先日	平成15年4月14日 (2003.4.14)		弁理士 恩田 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/463, 772		
(32) 優先日	平成15年4月17日 (2003.4.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 iRNA複合体

(57) 【要約】

治療用 sRNA 剤ならびに製造法および使用法が含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

センス配列およびアンチセンス配列を含んでなる iRNA 剤であって、安定化するための修飾を含み、アンチセンス配列が腎臓で発現された RNA を標的とすることを特徴とする iRNA 剤。

【請求項 2】

安定化するための修飾はカチオン基である、請求項 1 に記載の iRNA 剤。

【請求項 3】

安定化するための修飾は、2'-O-アルキルアミン、2'-O-アルコキシアルキルアミン、ポリアミン、C5-カチオン修飾ピリミジン、カチオンペプチド、グアニジニウム基、アミジニニウム基またはカチオン性アミノ酸である、請求項 1 に記載の iRNA 剤。

【請求項 4】

腎臓に優先的となるように iRNA 剤の分布を変化させる修飾をさらに含む、請求項 1 に記載の iRNA 剤。

【請求項 5】

修飾が、カチオン基、糖質、酵素もしくは酵素基質、葉酸、タンパク質、水溶性の分子、RGD ペプチドまたはその誘導体もしくは類似体、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンを標的とする合成分子、のうちの 1 つまたは複数である、請求項 4 に記載の iRNA 剤。

【請求項 6】

iRNA 剤は $\alpha v \beta 3$ インテグリンに結合する、請求項 5 に記載の iRNA 剤。

【請求項 7】

センス配列は、非対称的な 2'-O-アルキルアミン修飾を 1 つまたは複数含む、請求項 1 に記載の iRNA 剤。

【請求項 8】

アンチセンス配列は、非対称的なホスホロチオエート修飾を 1 つまたは複数含む、請求項 1 に記載の iRNA 剤。

【請求項 9】

2'-O-アルキルアミン修飾のうち少なくとも 1 つは、2'-O-プロピルアミン修飾または 2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)修飾である、請求項 7 に記載の iRNA 剤。

【請求項 10】

核酸塩基修飾を有する、請求項 1 に記載の iRNA 剤。

【請求項 11】

核酸塩基修飾は、C-5 ピリミジン修飾、N-2 プリン修飾、N-7 プリン修飾、および N-6 プリン修飾から選択される、請求項 10 に記載の iRNA 剤。

【請求項 12】

カチオン基または双性イオン基を含む修飾を有する、請求項 1 または 11 に記載の iRNA 剤。

【請求項 13】

前記修飾は末端に位置する、請求項 12 に記載の iRNA 剤。

【請求項 14】

糖の 2' 位、糖の 3' 位、ピリミジンの C-5 位、プリン N-2 位、プリン N-7 位、またはプリン N-6 位に、1 つまたは複数のカチオン基または双性イオン基を含むように修飾されている、請求項 1 に記載の iRNA 剤。

【請求項 15】

糖の 2' 位、糖の 3' 位、ピリミジンの C-5 位、プリン N-2 位、プリン N-7 位、またはプリン N-6 位にグアニジニウム基を含むように修飾されている、請求項 1 に記載の iRNA 剤。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

センス配列は、少なくとも2つの非対称的な2'-O-アルキルアミン修飾を有する、請求項1に記載のiRNA剤。

【請求項17】

センス配列は、少なくとも4つの非対称的な2'-O-アルキルアミン修飾を有する、請求項1に記載のiRNA剤。

【請求項18】

非対称的な修飾は2'-OMe修飾である、請求項17に記載のiRNA剤。

【請求項19】

センス配列は、少なくとも6つの非対称的な2'-O-アルキルアミン修飾を有する、請求項1に記載のiRNA剤。

10

【請求項20】

非対称的な修飾は2'-OMe修飾である、請求項19に記載のiRNA剤。

【請求項21】

センス配列は、少なくとも8つの非対称的な2'-O-アルキルアミン修飾を有する、請求項1に記載のiRNA剤。

【請求項22】

非対称的な修飾は2'-OMe修飾である、請求項21に記載のiRNA剤。

【請求項23】

センス配列のサブユニット全てが非対称的な2'-O-アルキルアミン修飾を有する、請求項1に記載のiRNA剤。

20

【請求項24】

非対称的な修飾は2'-OMe修飾である、請求項23に記載のiRNA剤。

【請求項25】

アンチセンス配列は、少なくとも2つの非対称的なホスホロチオエート修飾を有する、請求項1に記載のiRNA剤。

【請求項26】

アンチセンス配列は、少なくとも4つの非対称的なホスホロチオエート修飾を有する、請求項1に記載のiRNA剤。

【請求項27】

アンチセンス配列は、少なくとも6つの非対称的なホスホロチオエート修飾を有する、請求項1に記載のiRNA剤。

30

【請求項28】

アンチセンス配列は、少なくとも8つの非対称的なホスホロチオエート修飾を有する、請求項1に記載のiRNA剤。

【請求項29】

腎臓に障害を有する、または腎臓に障害を有する危険性のある対象者を治療する方法であって、腎臓で発現されるRNAを標的とし、腎臓に優先的となるように分布を変化させる修飾が施されているiRNA剤を対象者に投与することからなる方法

【請求項30】

iRNA剤は、カチオン基、糖質、酵素もしくは酵素基質、葉酸、タンパク質、水溶性の分子、RGDペプチドまたはその誘導体もしくは類似体、のうちの1つまたは複数と複合体化されている、請求項29に記載の方法。

40

【請求項31】

iRNA剤は少なくとも21ヌクレオチド長であり、同iRNA剤の二本鎖領域が約19ヌクレオチド長である、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

iRNA剤はセンス配列およびアンチセンス配列を含んでなり、センス配列は非対称的な2'-O-アルキルアミン修飾を1つまたは複数有し、アンチセンス配列は非対称的なホスホロチオエート修飾を1つまたは複数有する、請求項29に記載の方法。

【請求項33】

50

前記 2' - O - アルキルアミン修飾のうち少なくとも 1 つは 2' - OMe 修飾である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

センス配列は、少なくとも 2 つの非対称的な 2' - O - アルキルアミン修飾を有する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

非対称的な修飾は 2' - OMe 修飾である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

センス配列は、少なくとも 4 つの非対称的な 2' - O - アルキルアミン修飾を有する、請求項 32 に記載の方法。

10

【請求項 37】

非対称的な修飾は 2' - OMe 修飾である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

センス配列は、少なくとも 6 つの非対称的な 2' - O - アルキルアミン修飾を有する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 39】

非対称的な修飾は 2' - OMe 修飾である、請求項 38 に記載の iRNA 剤。

【請求項 40】

センス配列は、少なくとも 8 つの非対称的な 2' - O - アルキルアミン修飾を有する、請求項 32 に記載の方法。

20

【請求項 41】

非対称的な修飾は 2' - OMe 修飾である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

センス配列のサブユニット全てが非対称的な 2' - O - アルキルアミン修飾を有する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 43】

非対称的な修飾は 2' - OMe 修飾である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

アンチセンス配列は、少なくとも 2 つの非対称的なホスホロチオエート修飾を有する、請求項 32 に記載の方法。

30

【請求項 45】

アンチセンス配列は、少なくとも 4 つの非対称的なホスホロチオエート修飾を有する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 46】

アンチセンス配列は、少なくとも 6 つの非対称的なホスホロチオエート修飾を有する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 47】

アンチセンス配列は、少なくとも 8 つの非対称的なホスホロチオエート修飾を有する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 48】

iRNA 剤は、ケモカイン、補体因子、成長因子、成長因子受容体、サイトカイン、または血管作動性タンパク質のうち 1 つをコードする核酸を標的とする、請求項 29 に記載の方法。

40

【請求項 49】

iRNA 剤は、MCP1、オステオポンチン、RANTES、TGF β 、TNF α 、PDGF、IGF-1、IGF-2、VEGF、IL-1 α 、ET1、アンジオテンシン I I、PPAR α 、PPAR β/δ 、PPAR γ 、B7-1、B7-2、ICOS、CD40、または CD154 のうち 1 つを標的とする、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 50】

腎臓の障害は、尿管閉塞、糖尿病、タンパク尿、腎臓がん、ファンコニ症候群、および

50

パーター症候群からなる群のうちの1つである、請求項29に記載の方法。

【請求項51】

iRNA剤がショック状態にある対象者に投与される、請求項29に記載の方法。

【請求項52】

iRNA剤が、腎臓移植の前、腎臓移植の間、または腎臓移植後に対象者に投与される、請求項29に記載の方法。

【請求項53】

腎臓で発現されたRNAを標的とするiRNA剤の調製物であって、該iRNA剤は、腎臓に優先的となるように分布を変化させる修飾が施されていることを特徴とする調製物。

10

【請求項54】

iRNA剤は、カチオン基、糖質、酵素もしくは酵素基質、葉酸、タンパク質、水溶性の分子、RGDペプチドまたはその誘導体もしくは類似体、のうちの1つまたは複数と複合体化されている、請求項53に記載の調製物。

【請求項55】

iRNA剤は少なくとも21ヌクレオチド長であり、同iRNA剤の二本鎖領域が約19ヌクレオチド長である、請求項53に記載の調製物。

【請求項56】

iRNA剤は、ケモカイン、補体因子、成長因子、成長因子受容体、サイトカイン、または血管作動性タンパク質のうち1つをコードする核酸を標的とする、請求項53に記載の調製物。

20

【請求項57】

iRNA剤は、MCP1、オステオポンチン、RANTES、TGFβ、TNFα、PDGF、IGF-1、IGF-2、VEGF、IL-1α、ET1、アンジオテンシンI、PPARα、PPARβ/δ、PPARγ、B7-1、B7-2、ICOS、CD40、またはCD154のうち1つを標的とする、請求項53に記載の調製物。

【請求項58】

iRNA剤は、腎臓の近位尿細管細胞に優先的となるように分布を変化させる修飾が施されている、請求項53に記載の調製物。

【請求項59】

iRNA剤は、腎臓の糸球体に優先的となるように分布を変化させる修飾が施されている、請求項53に記載の調製物。

30

【請求項60】

iRNA剤は、腎臓の糸球体上皮細胞、糸球体内皮細胞、またはメサンギウム細胞に優先的となるように分布を変化させる修飾が施されている、請求項59に記載の調製物。

【請求項61】

腎臓で発現されたRNAを標的とするiRNA剤を含んでなる医薬調製物であって、該iRNA剤は、腎臓に優先的となるように分布を変化させる修飾が施されていることを特徴とする医薬調製物。

【請求項62】

iRNA剤と、ヒト血清タンパク質に結合するリガンドとを含んでなる組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、RNAiおよび関連する方法、例えば、iRNA剤を作製および使用方法に関する。本発明は、腎臓で発現される遺伝子をサイレンシングするための方法および組成物、ならびに腎臓または腎臓以外の部位にiRNA剤を方向付けるための方法および組成物を含む。

【背景技術】

【0002】

50

本願は、2003年4月3日に出願された米国仮出願第60/460,783号；2003年9月15日に
出願された米国仮出願第60/503,414号；2003年4月14日に
出願された米国仮出願第60/462,894号；2003年4月25日に
出願された米国仮出願第60/465,665号；2003年4月17日に
出願された米国仮出願第60/463,772号；2003年4月25日に
出願された米国仮出願第60/465,802号；2003年8月8日に
出願された米国仮出願第60/493,986号；2003年8月11日に
出願された米国仮出願第60/494,597号；2003年9月26日に
出願された米国仮出願第60/506,341号；2003年11月7日に
出願された米国仮出願第60/518,453号；2003年5月9日に
出願された米国仮出願第60/469,612号；2003年10月9日に
出願された米国仮出願第60/510,246号；2003年10月10日に
出願された米国仮出願第60/510,318号；および2004年3月8日に
出願された国際出願番号PCT/US04/07070の利益を主張する。これらの出願の内容はその全体が本願明細書に援用する。

10

【0003】

RNA干渉または「RNAi」は、二本鎖RNA(dsRNA)が線虫に導入されたときに、該二本鎖RNAが遺伝子発現を阻害することが可能であるという観察を説明するために、ファイア(Fire)および共同研究者らによって最初に作られた用語である(非特許文献1)。短いdsRNAは、脊椎動物を含む多くの生物において遺伝子特異的に転写後サイレンシングを為し、遺伝子の機能を研究するための新規なツールを提供してきた。RNAiはmRNA分解を含むことが可能である。

20

【0004】

米国国立健康統計センター(National Center for Health Statistics)からの1996年の見積もりに基づくと、腎臓疾患(感染、腎臓結石、癌、および腎臓の喪失を含む)は255万人の米国市民に影響を与えている(Current Estimates from the National Health Interview Survey、1996)。およそ40万人が1999年に末期腎疾患に罹患した。これらのうちで、150,000例が糖尿病の結果として、100,000例が高血圧の結果として、および62,000例が糸球体腎炎(腎臓の膜組織の炎症)から生じた(U.S.R.D.S.2001年間データ報告(Annual Data Report)、2001)。ビジネスコミュニケーションカンパニー・インコーポレイティッド社(Business Communications Company, Inc.)による調査によると、2001年において、糖尿病薬全体の市場は117億ドルであった。

30

【非特許文献1】ファイアラ(Fire et al.)、1998年、Nature 第391巻、p.806~811

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

腎臓は遺伝子発現の重要な部位である。本発明の態様は、腎臓において発現される遺伝子のサイレンシングに関する。したがって、本発明は、腎臓にiRNA剤を送達するための組成物および方法を含む。本発明はまた、腎臓へのiRNAの送達を最小にするための組成物または方法も含む。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の態様は、例えば、腎臓の障害または腎臓に関連する障害を治療するために、腎臓において発現される遺伝子をサイレンシングするための組成物および方法に関する。本発明のiRNA剤組成物は、腎臓に優先的となるように分布を変化させるように修飾されたものであり得る。本発明の組成物には、iRNA剤(例えば、本明細書中に記載されるiRNA剤またはsRNA剤)が含まれる。

【0007】

50

本発明の1つの態様は、腎臓の障害を有するか、または腎臓の障害を有する危険性があるヒトを治療するための方法を提供する。この治療方法は、ヒトにiRNA剤を投与することを含み、ここでiRNA剤は、核酸（例えば、腎臓において発現されるRNA）を標的とする。1つの態様において、腎臓の障害を有するか、または腎臓の障害を有する危険性があるヒトは、核酸の発現上昇またはさもなくば望ましくない核酸の発現（例えば、腎臓における遺伝子発現レベルの上昇またはRNAレベルの上昇）によって特徴付けられる障害に罹患している。望ましくない発現レベルは、RANTES、MCP1、またはオステオポンチンなどのケモカインをコードする遺伝子；または補体因子もしくは増殖因子（例えば、トランスフォーミング増殖因子β（TGFβ）、血小板由来増殖因子（PDGF）、IGF-1、IGF-2、もしくは血管内皮増殖因子（VEGF））をコードする遺伝子に相当し得る。別の実施形態において、遺伝子は、炎症性サイトカイン（例えば、IL1αもしくはTNFαなど）；線維形成性サイトカイン；血管作用性タンパク質（例えば、アンジオテンシンIIもしくはET1）；または増殖因子レセプター（例えば、KDR（VEGFレセプター）、上皮増殖因子レセプター、もしくは線維芽細胞増殖因子レセプターなど）をコードし得る。

10

【0008】

1つの実施形態において、ヒトは腎臓血管の高血圧、尿管閉塞症、糖尿病、糖尿病性腎症、糸球体硬化症、糸球体腎炎、全身性エリテマトーデス、HIV-関連腎症、腎線維症、タンパク尿、腎癌、ファンconi症候群、もしくはバーター症候群を有するか、またはこれらを有する危険性がある。

20

【0009】

別の実施形態において、腎臓を標的とするiRNA剤はショック状態にある対象者に投与することが可能であってもよく、このiRNA剤は腎臓移植の前、その間、および／もしくはその後で投与することが可能であってもよい。

【0010】

1つの実施形態において、iRNA剤は、TGFβなどの増殖因子または増殖因子レセプターを標的とし、かつヒトは糖尿病性腎症、進行性腎疾患、慢性組織損傷、または糸球体硬化症を有するかまたはこれらを有する危険性がある。1つの実施形態において、iRNA剤はTGFβなどの増殖因子を標的とし、かつヒトは腎臓移植を受けたかもしくは腎臓移植を受ける予定があるか、または腎臓移植の候補として確認されている。

30

【0011】

1つの実施形態において、iRNA剤はPDGFを標的とし、かつヒトは腎臓移植を受けたかもしくは腎臓移植を受ける予定があるか、または腎臓移植の候補として確認されている。

【0012】

1つの実施形態において、iRNA剤はアンジオテンシンIIなどの血管収縮因子またはアンジオテンシンIIレセプターなどの血管収縮因子レセプターを標的とし、かつヒトはアンジオテンシンII依存性高血圧またはII型糖尿病を有するか、もしくはこれらを有する危険性があり、またはヒトは高血糖状態にある。

【0013】

1つの実施形態において、iRNA剤はエンドセリン-1（ET-1）などの血管収縮因子、またはETAもしくはETBなどのET-1レセプターを標的とし、かつヒトは常染色体優性多発性嚢胞腎疾患および慢性腎疾患のうち少なくともいずれかを有するか、またはこれらの疾患を有する危険性がある。例えば、ヒトは、常染色体優性多発性嚢胞腎疾患を有していてもよく、1つの実施形態において、患者の状態は慢性腎疾患に向かって進行している。

40

【0014】

1つの実施形態において、iRNA剤はリガンド活性化転写因子などの転写因子（例えば、核ホルモンレセプターペルオキソソーム増殖因子活性化レセプター（PPAR））を標的とし、かつヒトは糖尿病性腎症、腎臓癌、または糸球体硬化症を有するか、またはこ

50

れらを有する危険性がある。1つの実施形態において、iRNA剤はPPAR- α 、PPAR β/δ 、またはPPAR γ を標的とする。

【0015】

1つの態様において、iRNA剤は、IGFレセプター（例えば、IGFR1）、VEGFレセプターKDR、上皮増殖因子レセプター、または線維芽細胞増殖因子レセプターなどの増殖因子レセプターを標的とし、かつヒトは腎臓細胞癌、糖尿病性腎症、腎臓肥大、糸球体腫大、尿中アルブミン排出の増加、および／または糖尿病を有するか、またはこれらを有する危険性がある。

【0016】

1つの実施形態において、iRNA剤は、補助シグナル（costimulatory）分子（例えば、B7-1、B7-2、ICOS、CD40、および／またはCD154）を標的とし、かつヒトは自己免疫疾患または移植拒絶を有するか、またはこれらを有する危険性がある。 10

【0017】

1つの実施形態において、iRNA剤は、ケモカイン（例えば、MCP-1、RANTES、および／またはオステオポンチンなど）を標的とし、かつヒトは全身性高血圧、腎実質損傷、急性もしくは慢性の腎臓同種移植片の拒絶、または慢性低酸素症誘導性高血圧を有するか、またはこれらを有する危険性がある。

【0018】

1つの実施形態において、iRNA剤はナトリウム-グルコーストランスポーター（ナトリウム-グルコーストランスポーター2（SGLT2）、SGLT3、またはSGLT1など）を標的とする。1つの実施形態において、iRNA剤はSGLT2（例えば、ヒトの溶質担体（solute carrier）ファミリー5、メンバー2（SLC5A2））（図6を参照されたい）を標的とし、かつ例えば、ヒトは腎臓疾患（例えば、初期段階の腎臓疾患）を有するか、またはこれを有する危険性がある。1つの実施形態において、iRNA剤はヒトSLC5A2核酸を標的とし、かつ表1に示される配列を含む鎖を有する。 20

【0019】

【表 1】

表1. SLC5A2 mRNAを標的とするsiRNAオリゴヌクレオチドの例

部位 ¹	SLC5A2転写物の領域	siRNAの配列	siRNAのGC含量
148	コード領域	CCATGTGCAGAACCAACAG (配列番号2)	53%
499	コード領域	TCTCCGGAGCTGTATTCAT (配列番号3)	47%
859	コード領域	TCCTCGGACTCACAATCGT (配列番号4)	53%
1311	コード領域	GTGTTTCATCGTGGTAGTGT (配列番号5)	47%
1701	コード領域	TTCAGTCTCCGGCATAGCA (配列番号6)	53%

¹配列番号1(図6を参照)を基準とした、siRNA配列の最初のヌクレオチドの部位

【0020】

本発明の1つの態様は、補体成分（例えば、補体因子C3、C4、C5、またはB）を標的とするiRNA剤を提供する。補体成分を標的とするiRNAは、例えば、免疫応答を阻害するために望ましいものであり得る。

【0021】

1つの実施形態において、iRNA剤は少なくとも21ヌクレオチド長であり、iRNAの二本鎖領域は約19ヌクレオチド長である。

1つの態様において、本発明は、対象者（例えば、マウスまたはヒトなどの哺乳動物対象）の腎臓にiRNA剤を送達する方法を提供する。1つの態様において、iRNA剤は腎臓の糸球体の細胞（例えば、糸球体内皮細胞、糸球体上皮細胞、メサンギウム細胞など）に送達されることが可能であり；および／またはiRNA剤は腎臓の近位尿細管細胞に

10

20

30

40

50

送達されることが可能である。例えば、iRNA剤はショック、尿管閉塞、糖尿病、タンパク尿、腎臓がん、または尿細管欠損疾患（例えば、ファンconi症候群またはバーター症候群）の治療のために腎臓の近位尿細管細胞に送達されることが可能である。腎臓移植患者の治療と対象としたiRNA剤もまた、腎臓の近位尿細管細胞に向けられることが可能である。1つの実施形態において、腎臓の近位の尿細管に向けられたiRNAは間質または他の下流の細胞にさらに送達される。iRNA剤は腎臓内の標的部位で標的遺伝子をサイレンシングすることが好ましい。

【0022】

腎臓、例えば腎臓の近位尿細管細胞に送達されるiRNA剤は、修飾されていないiRNA剤であり得る。1つの実施形態において、iRNA剤はホスホジエステル結合で安定化されることが可能である。別の実施形態において、iRNA剤のセンス鎖またはアンチセンス鎖またはその両方の3'末端はカチオン基（例えば、アルキルアミン（2'-O-アルキルアミンなど）、ポリアミン、カチオン性ペプチド、またはカチオン性アミノ酸）によって修飾することが可能である。修飾は、外部または末端のカチオン性残基であり得る。別の実施形態において、iRNA剤のセンス鎖またはアンチセンス鎖またはその両方は、糖（例えば、複合糖質またはアルキルグルコシド成分（例えば、グルコース、マンノース、2-デオキシグルコース、またはそのアナログ））で修飾することが可能である。別の実施形態において、iRNA剤は酵素基質（例えば、身体の他の組織における酵素レベルと比較して、関連する酵素が高い量で存在する基質）に複合体化することが可能である。例えば、iRNA剤は、 γ -グルタミルトランスフェラーゼまたはn-アセチル- γ -グルタミルトランスフェラーゼの基質に複合体化することが可能である。

10

20

【0023】

1つの実施形態において、iRNA剤は、葉酸または葉酸誘導体（例えば、 γ -葉酸、 α -葉酸、5-メチルトetraヒドロ葉酸、プテリジンアナログ、またはその代替的アナログ）に複合体化することが可能である。

【0024】

1つの実施形態において、本発明のiRNA剤は、全身的に投与したとき、腎臓に蓄積するタンパク質と複合体化することが可能である。例えば、iRNA剤は、リゾチーム、シトクロムc、またはアプロチニンタンパク質に複合体化することが可能である。1つの実施形態において、iRNA剤はタンパク質のリジン残基に複合体化することが可能である。

30

【0025】

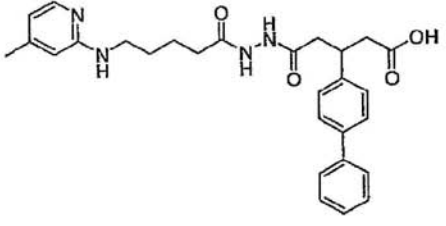
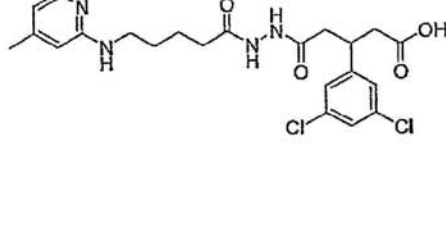
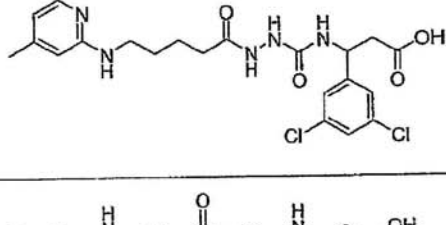
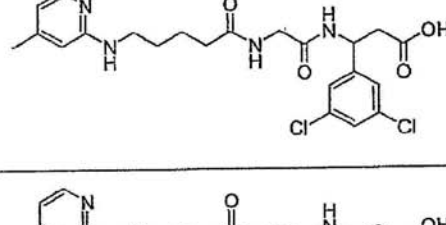
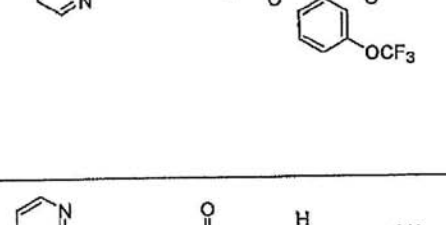
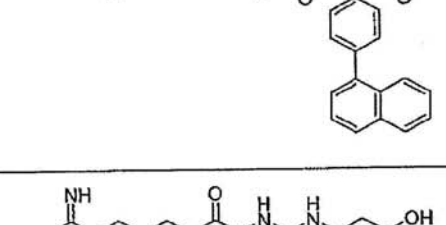
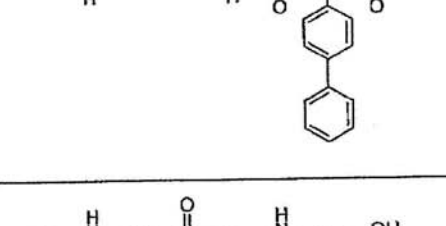
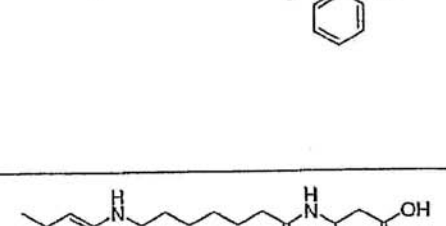
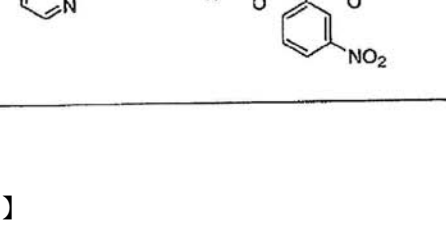
1つの実施形態において、腎臓を標的としたiRNA剤は、低分子量ポリエチレングリコール（PEG）分子またはグアニジウム基に複合体化することが可能であり、別の実施形態において、iRNA剤はRGDペプチド、ペプチドアナログ、またはペプチド模倣物、またはこれらの誘導体に複合体化することが可能である。RGDペプチド、ペプチドアナログ、またはペプチド模倣物に複合体化されたiRNAは $\alpha v \beta 3$ インテグリンに結合することが可能である。他の例示的なインテグリン阻害剤は以下の表2および3に示される。

【0026】

40

【表 2】

表2. グッドマン(Goodman)ら、J. Med. Chem. 45:1045-1051, 2002に記載されている
合成インテグリン阻害剤

10

20

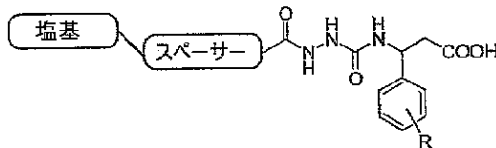
30

【 0 0 2 7 】

【表 3】

表3. サルヨーク(Sulyok)ら、J. Med. Chem. 44:1938-1950, 2001に記載されている合成インテグリン阻害剤

R	塩基	スパーサー
(カルボキサミド) ^a	グアニジン	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -
なし	グアニジン	ω -C ₄ H ₈ -
なし	グアニジン	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -
4-F	グアニジン	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -
4-Cl	グアニジン	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -
4-Br	グアニジン	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -
4-OCH ₃	グアニジン	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -
4-OCF ₃	グアニジン	グアニジン
(1-ナフチル) ^a	グアニジン	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -
3-Cl,5-Cl	グアニジン	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -
(H) ^a	2-NH ₂ - ピリジン	ω -C ₄ H ₈ -
なし	2-NH ₂ - ピリジン	ω -C ₄ H ₈ -
4-F	2-NH ₂ - ピリジン	ω -C ₄ H ₈ -
4-Cl	2-NH ₂ - ピリジン	ω -C ₄ H ₈ -
4-Br	2-NH ₂ - ピリジン	ω -C ₄ H ₈ -
4-OCH ₃	2-NH ₂ - ピリジン	ω -C ₄ H ₈ -



	4-OCF ₃	2-NH ₂ - ピリジン	ω-C ₄ H ₈ -
	(1-ナフチル) ^a	2-NH ₂ - ピリジン	ω-C ₄ H ₈ -
	3-Cl,5-Cl	2-NH ₂ - ピリジン	ω-C ₄ H ₈ -

10

^a 置換フェニル環の代わり

参照: Sulyok, G. A. G.; Gibson, C.; Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Wiesner, M.;

Kessler H. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1938-1950

【0029】

好ましい実施形態において、対象に投与される iRNA 剤の少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上が首尾よく腎臓を標的とする。好ましい実施形態において、対象に投与される iRNA 剤の 30~90%、40~80%、または 50~70%、50~80%、または 50~90% が首尾よく腎臓を標的とする。

20

【0030】

上記の実施形態のいずれかにおいて、iRNA 剤/複合体はさらなる修飾（例えば、安定化修飾）を有し得る。例えば、リンカー分子は、タンパク質、PEG、または RGD ペプチドを iRNA 剤に連結し得る。例示的なリンカーは以下に記載され、これにはアミノリンカー（例えば、アミノオキシリンカー）、チオールリンカー、カルボキシルリンカー、アルデヒドリンカー、ハロアセチルリンカーなどが含まれ得る。

【0031】

別の実施形態において、本発明は iRNA 複合体を特徴とする。この複合体は、例えば、リガンドまたは治療剤につながれた（例えば、結合された）iRNA 剤を含む。この iRNA 剤は、任意選択で、リンカー（例えば、ペプチドリンカーまたは本明細書中に記載される他のリンカー）によってリガンドまたは治療剤に結合される。リガンドは、例えば、体内の iRNA 剤の分布に影響を与えるように、および/または iRNA 剤が特定の組織もしくは細胞を標的とするように機能することが可能である。

30

【0032】

リガンドは、iRNA 剤の末端、好ましくは iRNA 剤の RNA 鎖の 3' 末端に配置することが可能である。このリガンドはまた、iRNA 剤の 5' 末端または iRNA 剤の中間部に配置することが可能である。ある態様において、複数のリガンドが iRNA 剤に結合されることが可能である。例えば、リガンドが、iRNA 鎖の 2 つの鎖の各々の 3' 末端に結合されることが可能である；リガンドが iRNA 剤の 1 つの鎖の末端（例えば、3' 末端）およびその中間部に結合されることが可能である；リガンドが、iRNA 剤の 2 つの鎖の一方または両方の 3' 末端および 5' 末端に結合されることが可能である。

40

【0033】

1 つの態様において、リガンドは脂質または脂質に基づく分子である。このような脂質または脂質に基づく分子は、好ましくは、血清タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA））に結合する。HSA 結合リガンドは、標的組織（例えば、身体の実質細胞を含む）への複合体の分布を可能にする。例えば、標的組織は肝臓（肝臓の実質細胞を含むがこれに限定されない）であり得る。HSA を結合し得る他の分子もまた、リガンドとし

50

て使用されることが可能である。例えば、ネプロキシンまたはアスピリンが使用されることが可能である。脂質または脂質に基づくリガンドは、(a)複合体の分解に対する耐性を増加させる、(b)標的細胞もしくは細胞膜への標的指向性もしくは輸送を増加する、および／または(c)血清タンパク質(例えば、HSA)への結合を調整するために使用されることが可能である。

【0034】

脂質に基づくリガンドは、例えば、標的組織への複合体の結合を調節(例えば、制御)するために使用されることが可能である。例えば、より強力にHSAに結合する脂質または脂質に基づくリガンドは、腎臓に対して標的化されにくく、それゆえに、より身体から除去されにくい。より弱くHSAに結合する脂質または脂質に基づくリガンドは、複合体を腎臓に対して標的化するために使用されることが可能である。

10

【0035】

好ましい実施形態において、脂質に基づくリガンドはHSAを結合する。好ましくは、該リガンドは、複合体が非腎臓組織に優先的に分布するように十分な親和性でHSAを結合する。しかし、親和性がさほど強くなくHSA-リガンド結合が不可逆的でないことが好ましい。

【0036】

別の好ましい実施形態において、複合体が腎臓に優先的に分布するように、脂質に基づくリガンドはHSAを弱く結合するかまたはまったく結合しない。腎臓細胞に対して標的化される他の構成部分もまた、脂質に基づくリガンドの代わりに、またはそれに加えて使用されることが可能である。

20

【0037】

好ましい実施形態において、脂質または脂質に基づくリガンドはホスホロチオエートである。この実施形態において、ホスホロチオエート上の硫黄の数がさほど多くなく、これらが血清タンパク質(例えば、HSA)への結合を妨害することが好ましい。

【0038】

別の実施形態において、リガンドはペプチドまたはペプトイドである。ペプトイド、特にアンテナペディア(Antennapedia)またはtatなどの両親媒性の分子種が好ましい。

【0039】

別の実施形態において、リガンドはポリエチレングリコール(PEG)またはその誘導体である。PEGは、例えば、循環中に薬剤を保持することを可能にする。PEGは本質的に両親媒性であり、特にiRNA剤の3'末端で結合した場合に安定性を促進することが可能である。

30

【0040】

別の実施形態において、リガンドは、電荷を有する基または部分、例えば、ポリアミンまたはカチオン性の基もしくは部分である。例えば、その電荷(例えば、その負電荷)によるこの型のリンカー部分は、細胞へのiRNA剤の侵入抵抗性を克服する補助となることが可能である。好ましくは、これらのリンカー部分は3'末端に複合体化されるが、しかしリンカー部分は、iRNA分子の5'末端または中間部にあってもよい。例示的なポリアミンには、ポリアルギニン、ポリリジン、ポリヒスチジン、ポリプレプロジン、またはポリモルホリノ、ポリオルニチンが含まれる。

40

【0041】

別の実施形態において、リガンドは、標的細胞(例えば、増殖している細胞)によって取り込まれるビタミンまたは他の構成部分である。これらは、例えば、悪性型または非悪性型の望ましくない細胞増殖(例えば、がん細胞)によって特徴付けられる障害を治療するために特に有用である。例示的なビタミンは、ビタミンB、例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサル、またはがん細胞によって取り込まれる他のビタミンもしくは栄養成分である。HSAおよび低密度リポタンパク質(LDL)もまた含まれる。

50

【0042】

別の実施形態において、リガンドは、細胞浸透剤、好ましくは、ヘリックス状の細胞浸透剤である。好ましくは、この薬剤は両親媒性である。例示的な薬剤は、tatまたはアンテノペディアなどのペプチドである。薬剤がペプチドである場合、これは修飾されることが可能であり、修飾には、ペプチジル模倣物、インバートマー (invertomer)、非ペプチド結合もしくは偽ペプチド結合、およびDアミノ酸の使用が含まれる。ヘリックス状の薬剤は、好ましくは、親油性または親油性でない相を有する α ヘリックス薬剤である。

【0043】

リガンドまたは標的指向性の薬剤は標的化剤であり得る。標的化剤は糖、ペプチド（例えば、RGD含有ペプチド）であり得る。

10

別の有用な標的化剤は、糖（例えば、ガラクトースおよび／またはそのアナログ）を組み込むものである。これらは、これらが肝臓、特に肝臓の実質細胞を標的とするので有用である。好ましい実施形態において、標的化部分は、1つより多くの、好ましくは2つまたは3つのガラクトース部分を含む。好ましくは、標的化部分は、例えば、互いに約15オングストローム間隔の開いた3つのガラクトース部分を含む。標的化部分はラクトースであり得る。ラクトースは、ガラクトースに結合したグルコースである。好ましくは、標的化部分は3つのラクトースを含む。標的化部分はまた、N-アセチル-ガラクトサミン、N-Ac-グルコサミンであり得る。マンノース、またはマンノース-6-リン酸の標的化部分は、マクロファージ標的化のために使用可能である。

【0044】

20

増殖している細胞中で富化されたマーカーを標的とするペプチドが使用されることが可能である。例えば、RGD含有ペプチドおよびペプチド模倣物は、がん細胞、特に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを提示する細胞を標的とすることが可能である。したがって、RGDペプチド、RGDを含有する環状ペプチド、Dアミノ酸を含むRGDペプチド、ならびに合成RGD模倣物を使用することができる。RGDに加えて、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを標的とする他の構成部分を使用することが可能である。一般的に、このようなりガンドは、増殖している細胞および血管形成を制御するために使用されることが可能である。この型の好ましい複合体は、PECAM-1、VEGF、または他のがん遺伝子（例えば、本明細書中に記載されるがん遺伝子）を標的とするiRNA剤を含む。

【0045】

30

1つの実施形態において、iRNA剤は、標的化剤（例えば、本明細書中に記載される標的化剤）に結合される（例えば、直接的に結合される（例えば、共有結合的にまたは非共有結合的に結合される））。これは、「複合体化 (conjugation)」アプローチと呼ばれる。別の実施形態において、標的化剤（例えば、同じ標的化剤）は単にiRNA剤と混合される。これは、「複合化 (complexing)」アプローチと呼ばれる。複合化アプローチにおいて、iRNA剤は、例えば、カチオン性分子（例えば、カチオン性脂質）とともに、例えば、標的指向性の基を伴ってまたは伴わずに、例えば、糖または本明細書に記載されるRGD構築物を伴ってまたは伴わずに、混合されることが可能である。ある実施形態において、iRNA剤は、ポリマーに基づく系と、例えば、標的指向性の基を伴ってまたは伴わずに、混合される。他の実施形態において、iRNA剤はナノ粒子と混合される。

40

【0046】

本明細書中に記載されるiRNA複合体は、所望の標的細胞または標的組織に対してiRNA剤を標的化する標的化剤を含むことが可能である。標的細胞または標的組織は、がん細胞、血管系（例えば、腫瘍の血管系）の細胞、血管形成細胞（例えば、腫瘍の血管形成細胞）、またはエンドソームであり得る。好ましい標的は腎臓である。別の実施形態において、肝臓（例えば、肝臓の実質細胞）が好ましい標的である。

【0047】

本発明の方法および組成物（例えば、本明細書中に記載される複合体）は、本明細書に記載される任意のiRNA剤とともに使用されることが可能である。さらに、本発明の方

50

法および組成物は、本明細書中に記載される任意の疾患または障害の治療のため、および任意の対象（例えば、任意の動物、任意のヒトなどの任意の哺乳動物）の治療のために使用されることが可能である。

【0048】

本発明の方法および組成物（例えば、本明細書中に記載される複合体）は、本明細書に記載される任意の投薬量および／または製剤、ならびに本明細書中に記載される任意の投与経路を用いて使用されることが可能である。

【0049】

本明細書中で使用される場合、「複合体化」は、2つの実体が、例えば、その2つの実体間が結合することによる治療的利点の実現される十分な親和性で結合されることを意味する。複合体化は、共有結合または非共有結合ならびに他の形式の結合（例えば、1つの実体が他の実体上もしくは他の実体内に包接されること、または2つの実体のいずれかもしくは両方が第3の実体上もしくは第3の実体内に包接されることなど、例えば、ミセルなど）を含むことが可能である。特に好ましい形式の複合体化は、共有結合（例えば、本明細書中に記載されるもの）による。実体が、iRNA剤に、例えば、いずれかの鎖の3'もしくは5'末端、または内部において複合体化されることが可能である。実体は、アンチセンス鎖がサイレンシングを仲介する能力を保持するような方法でiRNA剤に複合体化されることが好ましい。

【0050】

他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。材料、方法、および実施例は単なる例示であり、限定であることを意図しない。本明細書中に記載されるのと同様または等価である方法および材料が本発明の実施または試験において使用可能であるが、有用な方法および材料が以下に記載される。本発明の他の特徴および利点は、添付の図面および説明から、ならびに特許請求の範囲から明らかである。本願を通して引用されるすべての参考文献、係属中の特許出願、および公開特許の内容は、明示的に本願明細書に援用する。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0051】

二本鎖（dsRNA）は、RNA干渉（RNAi）として知られるプロセスを通してmRNAを配列特異的にサイレンシングする。このプロセスは、哺乳動物および他の脊椎動物を含む広範な種々の生物において起こる。

【0052】

dsRNAの21～23ヌクレオチドのフラグメントが、例えば、RNA分解を引き起こすことによるRNAサイレンシングの配列特異的メディエータであることが実証されている。理論に束縛されることを望まないが、これらの21～23ヌクレオチドフラグメント中に存在する、単に特定の長さのフラグメントであるにすぎない分子シグナルが、RNAiを仲介する細胞因子をリクルートするというものである。これらの21～23ヌクレオチドフラグメント、および他のiRNA剤を調製および投与するための方法、ならびに遺伝子の機能を特異的に不活性化するためのそれらの使用が本明細書中に記載される。iRNA剤（または同じかもしくは類似の性質の組換え生産もしくは化学合成されたオリゴヌクレオチド）の使用は、哺乳動物細胞におけるサイレンシングのための特異的mRNAの標的化を可能にする。さらに、より長いdsRNA剤フラグメントもまた、例えば、以下に記載されるように使用されることが可能である。

【0053】

哺乳動物細胞において、長いdsRNAは、有害であることの多いインターフェロン応答を誘導することが可能であるが、sRNAは、少なくとも細胞および宿主に対して有害である程度まではインターフェロン応答を誘発しない。特に、sRNA剤中のiRNA剤の鎖の長さは、例えば、有害なインターフェロン応答の誘発を回避するために十分に短い

10

20

30

40

50

、31、30、28、25、または23ヌクレオチド未満であり得る。したがって、sRNA剤の組成物（例えば、本明細書中に記載されるように処方される）の哺乳動物細胞への投与は、インターフェロン応答を回避しながら標的遺伝子の発現を抑制するために使用されることが可能である。さらに、個々のiRNA剤の使用は、例えば、対立遺伝子についてヘテロ接合である対象において、標的遺伝子の1つの対立遺伝子を選択的に標的とするために使用されることが可能である。

【0054】

さらに、1つの実施形態において、哺乳動物細胞は、インターフェロン応答の構成成分（例えば、二本鎖RNA（dsRNA）活性化プロテインキナーゼPKR）に影響を与えるiRNA剤で処理される。このような細胞は、標的RNAに対して相補的な配列を含み、その他の点ではインターフェロン応答を誘発する可能性のある長さを有する第2のiRNA剤で処理されることが可能である。

10

【0055】

代表的な実施形態において、対象は、ウシ、ウマ、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギ、または霊長類などの哺乳動物である。この対象は酪農用動物（例えば、ウシまたはヤギ）または他の農業用動物（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ヒツジ、ブタ、魚類、エビ）であり得る。はるかに好ましい実施形態において、この対象はヒトであり、例えば、正常な個人、あるいは疾患もしくは障害を有するか、これらを有すると診断されているか、またはそれらを有すると予測される個人である。

【0056】

さらに、iRNA剤により仲介されるサイレンシングはiRNA剤組成物を投与した後で数日間の間持続するので、多くの場合において、1日あたり1回未満、またはある例としては、治療計画全体について1回のみの頻度で、組成物を投与することが可能である。例えば、あるがん細胞の治療は、単回のボーラス投与によって行われることが可能であるのに対して、慢性ウイルス感染は規則的な投与、例えば、週に1回または1カ月に1回を必要とする可能性がある。

20

【0057】

対象にiRNA剤を投与するために使用されることが可能である多数の例示的な送達の経路が記載される。さらに、iRNA剤は、本明細書中に記載される例示的な方法に従って製剤化されることが可能である。

30

【0058】

腎臓へのiRNA剤の標的化

腎臓へのiRNAの送達は、例えば、腎臓の疾患の治療のために好ましい可能性がある。腎臓に標的化されるiRNA剤は腎臓の特定の種類の細胞に、およびさらに腎臓の特定の遺伝子標的に対して送達されることが可能である。例えば、本発明のiRNA剤は、腎臓の糸球体の細胞（例えば、糸球体内皮細胞、糸球体上皮細胞、またはメサングウム細胞）または近位尿細管細胞に対して指向させることが可能である。腎臓の近位尿細管細胞に送達されたiRNA剤は、間質および他の下流の細胞にさらに分配される（分布する）ことが可能である。

【0059】

本発明は、腎臓にiRNA剤を分布させるための種々の方法を含む。iRNAの分布は、ホスホジエステルのバックボーンの組み込みによって腎臓に標的化することが可能である。例えば、腎臓に標的化されるiRNA剤は、バックボーンに組み込まれた少なくとも約10個、15個、20個、25個、または30個またはそれ以上のホスホジエステル結合を有することが可能である。このホスホジエステルのバックボーンは、腎臓の近位尿細管細胞へのiRNA剤の送達の際に特に有効である。iRNA剤の送達は、iRNA分子のセンス鎖またはアンチセンス鎖、またはその両方の、少なくとも一方の末端または内部に、カチオン性基などの修飾が取り付けられることによって増強されることが可能である。好ましい取り付け部位は、例えば、センス鎖の5'末端、センス鎖の3'末端、またはアンチセンス鎖の3'末端である。例示的なカチオン基には、アルキルアミン、ポリアミン、

40

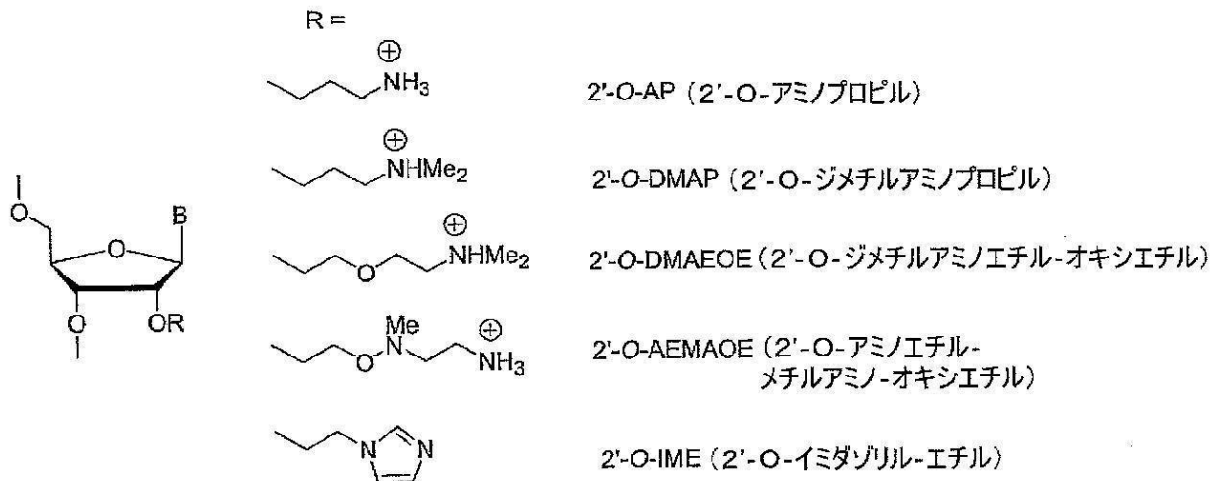
50

カチオン性ペプチド、およびカチオン性アミノ酸（例えば、アルギニン、リジン、またはオルニチン）が含まれる。1つの代替例において、カチオン基修飾は iRNA 剤の 3' 末端に取り付けられることが可能である。別の代替例において、カチオン基は、例えば、本明細書中に記載される方法のいずれかによって、iRNA 剤の内部に複合体化される。外側の複合体化がセンス鎖上になされることが好ましい。例示的なカチオン性修飾は以下に示される。

【0060】

【化1】

2'カチオン性修飾



10

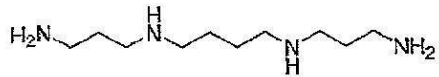
20

生理学的pHにおいてプロトン化された形態のカチオン性2'修飾体

【0061】

【化 2】

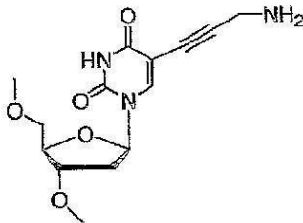
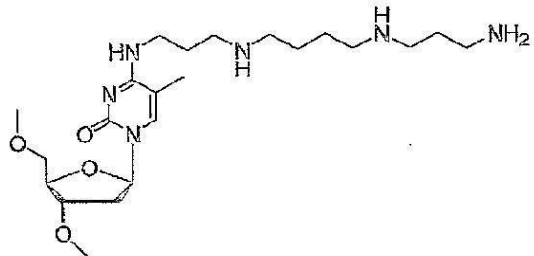
カチオン基



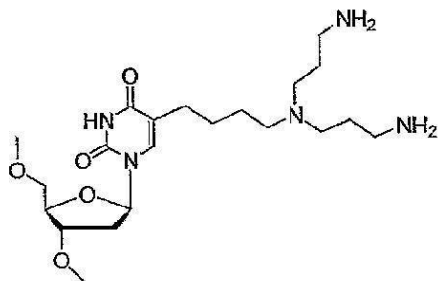
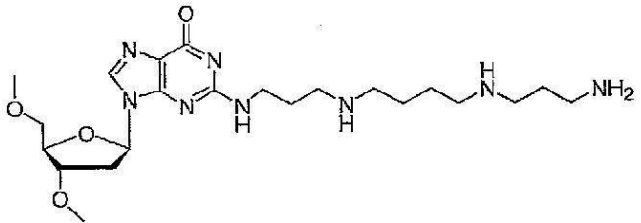
スペルミン



スペルミジン

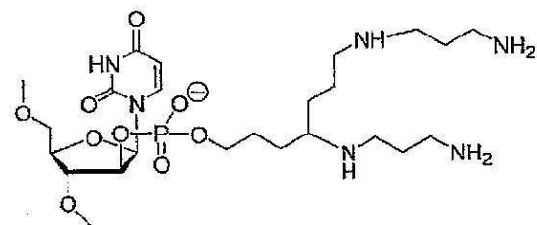
5-(3-アミノ-1-プロピニル)-2'-
デオキシウリジン残基5-メチル-2-オキソ-4-スペルミン-1-
(2-デオキシリボース)ピリミジン残基

10

5-(4-[N, N-ビス-(3-アミノプロピル)アミノ]ブチル)-
2'-デオキシウリジン残基

2-スペルミン-2'-デオキシイノシン残基

20



Ara-ウリジン-2'-(スペルミンプロピル)ホスフェート残基

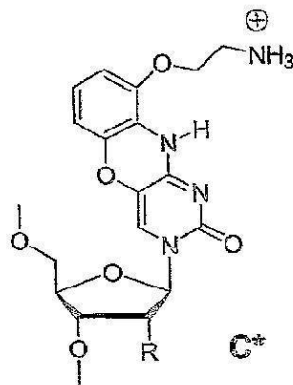
30

40

【 0 0 6 2 】

【化 3】

カチオン性塩基修飾



Gクランブ

10

【0063】

iRNA 剤は、例えば、図 13 において示されるように、iRNA 剤への糖部分の複合
 体化によって腎臓に対して標的化可能である。例示的な糖分子には、グルコース、マンノ
 ース、および 2-デオキシグルコース、および各々のアナログが含まれる。これらの特
 定の糖およびその他は腎臓において特異的レセプターを有し、それゆえに、腎臓への iRNA
 剤の送達のために有用である。糖部分は、アノマー炭素に結合された疎水基（例えば
 、アルキル基）を含むことが可能である。例えば、疎水基は、炭素原子、硫黄原子、酸素
 原子、または窒素原子、例えば、アミノ基を介して結合されることが可能である。糖部分
 は、例えば、カルバメートリンカーによって、または本明細書中に記載される方法のいづ
 れかによって、iRNA 剤に結合されることが可能である。

20

【0064】

iRNA 剤は、腎臓選択性酵素、例えば、主に腎臓において発現されるかまたは活性を
 示す酵素の活用によって、腎臓に送達されることが可能である。iRNA 剤は、腎臓にお
 いて見出される酵素、好ましくは腎臓に豊富であるか、または腎臓に局在化する酵素のた
 めの基質に複合体化されることが可能である。例えば、γ-グルタミルトランスぺプチダ
 ーゼ酵素、γ-グルタミルトランスフェラーゼ酵素、および n-アセタール-γ-グルタ
 ミル酵素は、いくつかの他の組織よりも、腎臓の近位尿細管細胞においてより豊富である
 。それゆえに、グルタチオンまたは γ-グルタミルアミノ酸に複合体化された iRNA 剤
 は、γ-グルタミルサイクルの酵素が集中している腎臓近位尿細管細胞に輸送され、かつ
 集結することになる。

30

【0065】

腎臓はまた、高親和性葉酸結合タンパク質 (FBP) を含み、FBP もまた近位尿細管
 細胞に集中している (クリステンセンら (Christensen et al.), I
 nt. Rev. Cytol. 180: 237~284, 1998)。それゆえに、iRNA
 剤は、葉酸分子への iRNA 剤の複合体化によって腎臓に標的化されることが可能であ
 る。この送達方法は、腎臓へのアンチセンスメッセンジャー RNA を首尾よく送達するこ
 とが示されている。例示的な葉酸複合体には、γ-葉酸、α-葉酸、5-メチルテトラヒ
 ドロ葉酸、プテリジンアナログ、および他の葉酸アナログが含まれる。

40

【0066】

特定の低分子量タンパク質（例えば、リゾチーム、シトクロム c、またはアプロチニン）
 は、全身的に投与された場合に腎臓に迅速に蓄積し、腎臓でこれらのタンパク質は、再
 吸収メカニズムを通して近位尿細管細胞中に集中する。iRNA 剤は、例えば、これらの
 タンパク質のリジン残基を介して、これらのタンパク質の 1 つに複合体化されることが可

50

能である。例えば、リンカー部分（以下を参照のこと）は、リジン残基に iRNA 剤を連結することが可能である。iRNA-タンパク質複合体は、ある場合において、iRNA 剤単独よりもヌクレアーゼに対する耐性が高い。近位尿細管への iRNA-タンパク質複合体の送達後、リソソームのプロテアーゼは、場合により、該タンパク質複合体から iRNA 剤を遊離させることが可能であり、それによって、iRNA 剤を遊離させてその標的核酸にアニーリングさせる。1つの実施形態において、複合体の融合誘導成分、例えば、iRNA-タンパク質複合体に複合体化された融合誘導因子は、リソソームまたはエンドソームからの iRNA 剤の放出を容易にすることが可能である。

【0067】

iRNA 剤は、例えば、1つの構成部分（例えば、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）））への複合体化によってもたらされることが可能である広範な水和に依存する方法を使用して、腎臓に標的化されることが可能である。例えば、iRNA 剤は、水溶性ポリマー（例えば、腎臓に siRNA を輸送する低分子量 PEG 分子）に融合されることが可能である。この PEG 分子は、約 500、600、900、1000、2000、10000、25000、50000、または 100,000 の分子量を有し得る。好ましくは、PEG は、約 500 と 100000 の間、2000 と 50000 の間の分子量を有する。より好ましくは、PEG は約 5000 と 40000 の間の分子量を有する。

【0068】

本発明の iRNA は、1つ以上の Arg-Gly-Asp (RGD) モチーフを含むペプチドの複合体化によって腎臓のメサングウム細胞に標的化されることが可能である。RGD モチーフは腎臓のメサングウム細胞のインテグリンと相互作用する。例えば、iRNA-RGD 複合体は、 $\alpha V-\beta 3$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 5$ 、または $\alpha 5-\beta 1$ インテグリンに、または腎臓のメサングウム細胞に集中している他のインテグリンに結合することが可能である。他の代替例において、本発明の iRNA 剤は、RGD アナログまたは RGD 模倣物に複合体化されることが可能である。

【0069】

iRNA 剤は、腎臓に関連する疾患または障害を有するか、またはこれらを有する危険性があるヒトを治療するために使用され得る。例えば、本発明の iRNA は、腎臓血管の高血圧、糖尿病（または糖尿病性腎症などの糖尿病の徴候）、糸球体硬化症、糸球体腎炎、全身性エリテマトーデス、HIV-関連腎症、腎臓がん、腎線維症、または最終的に腎移植を必要とする可能性がある炎症性疾患を治療するために投与されることが可能である。

【0070】

腎臓関連障害の治療のために有用な例示的な種々の遺伝子標的が存在する。例えば、本発明の iRNA 剤は、サイトカインまたは増殖因子（例えば、TGF β 、PDGF、IGF-1、IGF-2、または VEGF）をコードする核酸を標的とすることが可能である。iRNA 剤は、例えば進行性糖尿病性腎症に寄与することが示されている増殖因子 TGF β を標的とすることが可能である（リーブス (Reeves) およびアンドレオリ (Andreoli)、Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 7667~7669、2000）。TGF β はまた、進行性腎疾患および他の形態の慢性組織損傷における細胞外マトリックス産生ならびに沈着の主たるメディエータとしても明らかになってきた（チェン (Cheng) およびグランデ (Grande)、Exp. Biol. Med. 227: 943~956、2002）。TGF β 活性の阻害により、例えば、2型糖尿病の患者において、腎不全および糸球体硬化症を予防することが可能である。別の例において、本発明の iRNA は PDGF を標的とすることが可能である。慢性同種移植片腎症は、腎臓移植における後期の同種移植片損失の主要な原因であり、移植片拒絶を予防するための方法として移植患者に PDGF の阻害が施されることが可能である（例えば、サヴィッコラ (Savikko et al.)、Transplantation 27: 1147~1153、2003を参照のこと）。

【0071】

iRNA剤は、血管収縮因子または血管収縮因子レセプターを標的とすることが可能である。例えば、iRNA剤はアンギオテンシンIIまたはAGT1レセプターを標的とするために使用されることが可能である。これらの遺伝子または遺伝子産物のいずれかの阻害剤は、アンジオテンシンII-依存性高血圧の治療のために投与されることが可能である。さらに、アンギオテンシンレセプターの阻害剤は、例えば、2型糖尿病の患者において腎症の進行を遅延させることが可能である（ルイス（Lewis）、Am. J. Hypertens. 15:123S~128S、2002）。アンギオテンシンIIまたはAGT1レセプターを標的とするiRNA剤は、腎血漿流量を増加させるために高血糖状態の患者に投与されることが可能である（ホレンバーグ（Hollenberg）、Am. J. Hypertens. 14:237S~241S、2001）。iRNA剤は、血管収縮因子ET-1、またはそのレセプターであるETAもしくはETBの1つ以上を標的とすることが可能である。ET-1またはET-1レセプターを標的とするiRNA剤は、常染色体優性多発性嚢胞腎疾患を有する患者に投与されることが可能である。この疾患の治療は、患者が慢性腎疾患を発症した後で開始または継続することが可能である。

【0072】

本明細書中に開示される遺伝子をサイレンシングするiRNA剤は、好ましくは腎臓に優先的に分布するように修飾されるが、場合によっては、十分な効力を有しており修飾を必要としない。

【0073】

腎臓に対して指向化されるiRNA剤は、核ホルモンレセプター（例えば、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター（PPAR））などの、リガンドで活性化される転写因子を標的とすることが可能である。PPARの3つのアイソフォーム（ α 、 β/δ 、および γ ）は腎臓において差示的に発現され、いずれかのアイソフォーム（または2つまたは3つすべて）が、腎疾患（例えば、糸球体硬化症、糖尿病性腎症、または腎腫瘍）の治療のために投与されるiRNA剤の標的であり得る（コワン（Guan）、Minerva Urol. Nefrol. 54:65~79、2002）。

【0074】

iRNA剤は、腎細胞がん（RCC）などの腎障害の治療のために成長ホルモンレセプターを標的とすることが可能である。例えば、RCCの治療のための例示的なホルモンレセプター標的には、KDR、EGFレセプター、FGFレセプター、およびIGFレセプター（例えば、IGFR1またはIGFR2）が含まれるがこれらに限定されない。これらの成長ホルモンレセプターのいずれかの標的化はまた、糖尿病の治療としても有用である可能性がある。

【0075】

iRNA剤は、補助シグナル分子（例えば、B7-1、B7-2、ICOS、CD40、CD154など）などの免疫系の成分を標的とするために使用されることが可能である。自然に生じる補助シグナルによる相互作用の妨害は、自己免疫疾患および移植拒絶の予防および治療において有効であり得る（ビアンコーネら（Biancone et al.）、Nephrol. 15:7~16、2002）。

【0076】

iRNA剤は、RANTES、MCP-1、またはオステオポンチンなどのケモカインを標的とするために使用されることが可能である。例えば、RANTESまたはMCP-1を標的とするiRNA剤は、例えば全身性高血圧の場合に起こることがある腎臓への単球およびマクロファージのリクルートを阻害することが可能であり、そして結果として、これらのiRNA剤の投与は、腎臓実質細胞の損傷を阻害または予防することが可能である。MCP-1を標的とするiRNA剤は、腎臓同種移植片の急性および慢性の拒絶を阻害するために投与されることが可能である（ラッツェーリ（Lazzeri）、G. Ital. Nefrol. 19:641~649、2002）。オステオポンチンを標的とするiRNA剤は高血圧を治療するために投与されることが可能である。

【0077】

iRNA剤は、補体成分（例えば、補体因子C3、C4、C5、またはB）を標的とするために使用されることが可能である。補体因子に対して指向化されたiRNA剤は、腎症および／または糸球体腎炎を治療または予防するために患者に投与されることが可能である（ハナフサら（Hanafusa et al.）、Nephrol. Dial. Transplant. 17、補遺9：34～36、2002；およびウェルチ（Welch）、Nephron 88：199～204、2001を参照のこと）。

【0078】

腎臓移植を受けた、または腎臓移植の候補として同定されている患者は、腎臓を標的とするiRNAで治療されることが可能である。腎臓移植とは、同種移植を意味しても異種移植を意味してもよく、同種移植は、HLAが一致したドナーの腎臓を用いてもHLA不一致のドナーの腎臓を利用してもよい。iRNA剤は、移植の前、移植と同時に、または移植の後で投与されることが可能である。腎臓に標的化されたiRNA剤は、広範なスペクトルの免疫抑制剤（例えば、シクロスポリンA、タクロリムス（FK506）、シロリムス（ラパマイシン））；抗T細胞抗体（例えば、OKT3治療、抗CD3、抗CTLA4、もしくは抗CD28）；または放射線治療などの他の治療法と組み合わせられることが可能である。

【0079】

iRNA剤の構造

RNAiを仲介する単離iRNA剤（例えば、RNA分子（二本鎖；一本鎖））が本明細書中に記載される。このiRNA剤は、対象者の内在性遺伝子または病原体の遺伝子に関連してRNAiを好適に仲介する。

【0080】

「RNA剤」は、本明細書中で使用される場合、非修飾RNA、修飾RNA、またはヌクレオシド代用物であり、これらのすべてが本明細書中で定義される（例えば、以下のRNA剤という表題の節を参照されたい）。多数の修飾RNAおよびヌクレオシド代用物が記載されるが、好ましい例には、非修飾RNAよりもヌクレアーゼ分解に対する抵抗性の高いものが含まれる。好ましい例には、2'糖修飾、一本鎖突出部（好ましくは3'一本鎖突出部）における修飾、または、特に一本鎖の場合、1つ以上のリン酸基もしくは1つ以上のリン酸基アナログを含む5'修飾を有するものが含まれる。

【0081】

「iRNA剤」は、本明細書中で使用される場合、標的遺伝子、好ましくは内在性または病原体の標的RNAの発現をダウンレギュレートすることが可能であるRNA剤へと切断されることが可能であるRNA剤である。理論によって束縛されることを望まないが、iRNA剤は、当該分野においてRNAiと呼ばれることもある標的mRNAの転写後切断、または転写前もしくは翻訳前のメカニズムを含む多数のメカニズムの1つ以上によって作用することが可能である。iRNA剤は、一本鎖を含むことも、または一本以上の鎖を含むことも可能であり、例えば、iRNA剤は、二本鎖iRNA剤であり得る。iRNA剤が一本鎖である場合、1つ以上のリン酸基または1つ以上のリン酸基のアナログを含む5'修飾を含むことが特に好ましい。

【0082】

iRNA剤は、該iRNA剤またはそのフラグメントが標的遺伝子のダウンレギュレーションを仲介することが可能であるように、標的遺伝子に対して十分な相同性の領域を含み、かつヌクレオチドの長さが十分であるべきである。（説明を簡略化するために、本明細書中では、用語ヌクレオチドまたはリボヌクレオチドは、RNA剤の1つ以上のモノマーサブユニットを指すために使用されることがある。本明細書中において、用語「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」を使用するとき、修飾RNAまたはヌクレオチド代用物の場合においては、修飾ヌクレオチド、または1つ以上の位置での代用物で置換した部分をも意味し得ることが本明細書中で理解されよう。）したがって、iRNA剤は、少なくとも部分的に、およびある実施形態においては完全に、標的RNAに相補的な領域で

あるか、またはその領域を含む。iRNA 剤と標的との間の完全な相補性が存在することは必ずしも必要ではないが、その一致は、iRNA 剤またはその切断産物が、例えば、標的RNA（例えば、mRNA）のRNAi切断によって、配列特異的に発現を抑制することを可能にするために十分でなくてはならない。

【0083】

標的鎖との相補性、または相同性の程度は、アンチセンス鎖において最も重大である。特に、アンチセンス鎖における完全な相補性が望ましいことが多いが、ある実施形態は、特にアンチセンス鎖において、1つ以上であるが好ましくは6個、5個、4個、3個、2個、またはそれより少ないミスマッチ（標的RNAに関して）を含むことが可能である。特にアンチセンス鎖におけるミスマッチは、末端領域において最も寛容性が高く、存在する場合、好ましくは末端領域において、例えば、5'末端および／または3'末端の6ヌクレオチド以内、5ヌクレオチド以内、4ヌクレオチド以内、または3ヌクレオチド以内である。センス鎖は、該分子の二本鎖全体の性質を維持するために十分なだけのアンチセンス鎖との相補性があればよい。

【0084】

本明細書中の他の箇所で議論されるように、iRNA 剤は、しばしば修飾されるかまたはRRMSに加えてヌクレオシド代用物を含む。iRNA 剤の一本鎖領域は、しばしば、修飾されるかまたはヌクレオシド代用物を含み、例えば、ヘアピン構造の対合していない領域（例えば、2つの相補性領域をつなぐ領域）は、修飾またはヌクレオシド代用物を有し得る。iRNA 剤の1つ以上の3'末端もしくは5'末端を、例えば、エキソヌクレアーゼに対して安定化するための修飾、またはアンチセンスsRNA 剤をRISCに優先的に入れるための修飾もまた、好ましい。修飾は、C3（またはC6、C7、C12）アミノリンカー、チオールリンカー、カルボキシリンカー、非ヌクレオチド性スパーサー（C3、C6、C9、C12、無塩基、トリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール）、特殊なデオチン、あるいは、ホスホルアミダイトとして提供され、かつ別のDMT保護されたヒドロキシル基を有し、RNA合成の際に複数のカップリングを可能にするフルオレセイン試薬を含むことが可能である。

【0085】

iRNA 剤には以下のものが含まれる：インターフェロン応答を誘発するために十分に長い分子（これはダイサー（Dicer、ベルンシュタインら（Bernstein et al.）、2001. Nature、409：363～366）によって切断され、RISC（RNAi誘導性サイレンシング複合体）に入る）；およびインターフェロン応答を誘発しないために十分に短い分子（この分子もまたDicerによって切断されることが可能であり、かつ／またはRISCに入る）、例えば、RISCに入ることを可能にするサイズである分子、例えば、Dicer切断産物に類似する分子。インターフェロン応答を誘発しない十分に短い分子は、本明細書中では、sRNA 剤または短いiRNA 剤と呼ばれる。「sRNA 剤または短いiRNA 剤」は、本明細書中で使用される場合、iRNA 剤、例えば、ヒト細胞において有害なインターフェロン応答を誘導しない十分に短い二本鎖RNA 剤または一本鎖RNA 剤をいい、例えば、同RNA 剤は、60ヌクレオチド対未満、しかし好ましくは、50、40、または30ヌクレオチド対未満の二本鎖領域を有する。このsRNA 剤またはその切断産物は、例えば、標的RNA（好ましくは、内在性または病原性の標的RNA）に関してRNAiを誘導することによって、標的遺伝子をダウンレギュレートすることが可能である。

【0086】

sRNA 剤の各々の鎖は、30、25、24、23、22、21、または20ヌクレオチド長以下であり得る。鎖は、好ましくは、少なくとも19ヌクレオチド長である。例えば、各々の鎖は21から25の間のヌクレオチド長であり得る。好ましいsRNA 剤は、17、18、19、29、21、22、23、24、または25ヌクレオチド対の二本鎖、および1つ以上の突出部、好ましくは2～3ヌクレオチドの1つまたは2つの3'突出部を有する。

【0087】

標的RNAに対する相溶性および標的遺伝子をダウンレギュレートする能力に加えて、iRNA剤は好ましくは以下の特性の1つ以上を有する：

- (1) 以下の「RNA剤」の節において示される式1、2、3、または4のものである；
- (2) 一本鎖である場合、1つ以上のリン酸基または1つ以上のリン酸基アナログを含む5'修飾を有する；
- (3) 非常に多数またはすべてのヌクレオシドが修飾されているにもかかわらず、正確な塩基対を形成可能であり、例えば標的RNAの切断によって標的のダウンレギュレーションを可能にするために十分な、相同な標的RNAとの二本鎖構造を形成することが可能なように、正しい三次元構造にある塩基（または修飾塩基）を提供することが可能なアンチセンス鎖を有する；
- (4) 非常に多数またはすべてのヌクレオシドが修飾されているにもかかわらず、なお「RNA様の」特性を有する。すなわち、リボヌクレオチドに基づく含量では独占的でなく、または部分的でさえあるにも関わらず、RNA分子の全体的な構造、化学的特性および物理的特性を有する。例えば、iRNA剤は、例えば、すべてのヌクレオチド糖が2'ヒドロキシルの代わりに例えば2'フルオロを含むセンス鎖および／またはアンチセンス鎖を含むことが可能である。このデオキシリボヌクレオチド含有剤は、なおRNA様の特性を示すことが予測されうる。理論によって束縛されることを望まないが、電気的に陰性のフッ素は、リボースのC2'位に結合されたときに軸方向に配向する傾向がある。このフッ素の空間的な優先傾向は、ひいては、糖のC3'内部にくぼみを形成させる。これは、RNA分子中で観察されるのと同じくぼみ形成様式であり、RNAに特徴的なAファミリー型ヘリックスを生じる。さらに、フッ素は良好な水素結合のアクセプターであるので、RNA構造を安定化させることが知られている水分子と同じ水素結合相互作用に関与することが可能である。一般的には、糖の2'位で修飾された部分は、デオキシリボヌクレオチドのH部分よりも、リボヌクレオチドのOH部分により特徴的であるH結合に入ることができることが好ましい。好ましいiRNA剤は：その糖の全体、またはその糖の少なくとも50、75、80、85、90、または95%において、C3'内部にくぼみを示し；iRNA剤の十分量の糖においてC3'内部のくぼみを示し、RNAに特徴的なAファミリー型ヘリックスを生じることが可能であり；C3'内部のくぼみ構造ではない20個、10個、5個、4個、3個、2個、または1個以下の糖を有する。これらの制限はアンチセンス鎖において特に好ましい；
- (5) 修飾の性質にかかわらず、およびRNA剤が、特に突出部または他の一本鎖領域内にデオキシヌクレオチドまたは修飾デオキシヌクレオチドを含むことが可能であるとしても、DNA分子、あるいは、分子中のヌクレオチドの50、60、もしくは70%より多く、または二本鎖領域のヌクレオチドの50、60、または70%より多くがデオキシリボヌクレオチド、あるいは2'位がデオキシである修飾デオキシリボヌクレオチドである任意の分子は、RNA剤の定義から除外することが好ましい。

【0088】

「一本鎖iRNA剤」は、本明細書中で使用される場合、単一の分子から作られているiRNA剤である。これは、鎖内の対合によって形成される二本鎖領域を含んでもよく、例えば、該領域はヘアピン構造またはパンーハンドル構造であってもよいし、これを含んでもよい。一本鎖iRNA剤は、標的分子に関してアンチセンスであることが好ましい。好ましい実施形態において、一本鎖iRNA剤は5'がリン酸化されるか、または5'プライム末端にホスホリルアナログを含む。5'リン酸修飾は、RISCが仲介する遺伝子サイレンシングと適合性であるものを含む。適切な修飾には以下が含まれる：5'一リン酸（(HO)2(O)P-O-5'）；5'二リン酸（(HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'）；5'三リン酸（(HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'）；5'グアノシンキャップ（7-メチル化または非メチル化）（7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(H

$O) (O) - O - 5'$); 5' アデノシンキャップ (A p p p)、および任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造 ($N - O - 5' - (HO) (O) P - O - (HO) (O) P - O - P (HO) (O) - O - 5'$); 5' ーチオリン酸 (ホスホロチオエート; $(HO) 2 (S) P - O - 5'$); 5' ージチオリン酸 (ホスホロジチオエート; $(HO) (HS) (S) P - O - 5'$); 5' ホスホロチオール酸 ($(HO) 2 (O) P - S - 5'$); 酸素/硫黄置換ーリン酸、ニリン酸、および三リン酸の任意のさらなる組合せ (例えば、5' ー α ーチオ三リン酸、5' ー γ ーチオ三リン酸など)、5' ホスホルアミデート ($(HO) 2 (O) P - NH - 5'$ 、 $(HO) (NH 2) (O) P - O - 5'$); 5' アルキルホスホン酸 ($R = \text{アルキル} = \text{メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、} RP(OH)(O) - O - 5' -$ 、 $(OH) 2 (O) P - 5' - CH 2$)、5' アルキルエーテルホスホン酸 ($R = \text{アルキルエーテル} = \text{メトキシメチル (MeOCH 2 -)}$ 、エトキシメチルなど、例えば、 $RP(OH)(O) - O - 5' -$)。 (これらの修飾はまた、二本鎖 i RNA のアンチセンス鎖とともに使用されることも可能である。)

一本鎖 i RNA 剤は、それが RISC に入ることが可能であり、かつ RISC の仲介による標的 mRNA の切断に関与することが可能であるように、十分に長くあるべきである。一本鎖 i RNA 剤は、少なくとも 14 ヌクレオチド長、およびより好ましくは、少なくとも 15、20、25、29、35、40、または 50 ヌクレオチド長である。一本鎖 i RNA 剤は好ましくは、200、100、または 60 ヌクレオチド長未満である。

【0089】

ヘアピン i RNA 剤は、17、18、19、29、21、22、23、24、または 25 ヌクレオチド対に等しいか、または少なくとも 17、18、19、29、21、22、23、24、または 25 ヌクレオチド対の二本鎖領域を有する。この二本鎖領域の長さは、好ましくは、200、100、または 50 ヌクレオチド対以下である。二本鎖領域の好ましい範囲は、15~30、17~23、19~23、および 19~21 ヌクレオチド対長である。ヘアピンは、好ましくは、一本鎖突出部または末端 (好ましくはヘアピンのアンチセンス側の好ましくは 3' 末端) の非対合領域を有する。好ましい突出部は 2~3 ヌクレオチド長である。

【0090】

「二本鎖 (ds) i RNA 剤」は、本明細書中で使用される場合、鎖間のハイブリダイゼーションにより二本鎖構造を形成することが可能である、1本より多くの鎖、好ましくは 2本の鎖を含む i RNA 剤である。

【0091】

二本鎖 i RNA 剤のアンチセンス鎖は、14、15、16、17、18、19、25、29、40、または 60 ヌクレオチド長に等しいか、または少なくとも 14、15、16、17、18、19、25、29、40、または 60 ヌクレオチド長であるべきである。これは、200、100、または 50 ヌクレオチド長以下であるべきである。好ましい範囲は、17~25、19~23、および 19~21 ヌクレオチド長である。

【0092】

二本鎖 i RNA 剤のセンス鎖は、14、15、16、17、18、19、25、29、40、または 60 ヌクレオチド長に等しいか、または少なくとも 14、15、16、17、18、19、25、29、40、または 60 ヌクレオチド長であるべきである。これは、200、100、または 50 ヌクレオチド長以下であるべきである。好ましい範囲は、17~25、19~23、および 19~21 ヌクレオチド長である。

【0093】

二本鎖 i RNA 剤の二本鎖部分は、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、29、40、または 60 ヌクレオチド対長に等しいか、または少なくとも 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、29、40、または 60 ヌクレオチド対長であるべきである。これは、200、100、または 50 ヌクレオチド対長以下であるべきである。好ましい範囲は、15~30、17~23、19~23、および 19~21 ヌクレオチド対長である。

【0094】

多くの実施形態において、ds iRNA 剤は、内在性分子によって（例えば、Dic er によって）切断されてより小さな ds iRNA 剤（例えば、sRNA 剤）を生じることが可能であるように十分に大きい。

【0095】

二本鎖 iRNA 剤のアンチセンス鎖およびセンス鎖の一方または両方を修飾することが望ましい可能性がある。ある場合において、これらの鎖は同じ修飾または同じクラスの修飾を有するが、他の場合において、センス鎖およびアンチセンス鎖は異なる修飾を有し、例えば、ある場合において、センス鎖のみが修飾されることが望ましい。センス鎖のみを、例えばセンス鎖を不活性化するために修飾することが望ましい可能性があり、例えば、10
センス鎖は、センス鎖を不活性化し、かつ活性な sRNA / タンパク質または RISC の形成を妨害するために修飾されることが可能である。これは、センス鎖の 5'リン酸化を妨害する修飾によって、例えば、5'-O-メチルリボヌクレオチドを用いる修飾によって達成されることが可能である（ニーケネンら（Nykaenen et al.）、（2001）「ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway.」Cell 107、309~321を参照のこと）。例えば、単に 5'OH を O-Me ではなく H によって置換する、リン酸化を妨害する他の修飾もまた使用可能である。代替例として、大きなかさ高い基が 5'リン酸基に付加され、これがホスホジエステル結合に転換されてもよいが、これは、ホスホジエステラーゼがこのような結合を切断し、かつ機能的 sRNA 5'末端を遊離することが可能であるので、より望ましくなくない可能性がある。アンチセンス鎖修飾は、5'リン酸化ならびに本明細書中で議論される他の 5'修飾のいずれか、特に単鎖 iRNA 分子に関する節において上記に議論された 5'修飾を含む。

【0096】

ds iRNA 剤が分子の一方または両方の末端で一本鎖領域または不對合領域を含むように、センス鎖およびアンチセンス鎖が選択されることが好ましい。したがって、ds iRNA 剤は、好ましくは突出部（例えば、1つまたは2つの5'または3'突出部であるが好ましくは2~3ヌクレオチドの3'突出）を含むように対合したセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。多くの実施形態は3'突出部を有する。好ましい sRNA 剤は一本鎖突出部、好ましくは、各々の末端に1ヌクレオチド長または好ましくは2もしくは3 30
ヌクレオチド長の3'突出部を有する。この突出部は、ある鎖が他の鎖よりも長い結果であってもよいし、または、ずれを有する同じ長さの2つの鎖の結果であってもよい。5'末端は好ましくはリン酸化される。

【0097】

二本鎖領域についての好ましい長さは、例えば、上記に議論した sRNA 剤の範囲において、15から30の間のヌクレオチド長、最も好ましくは18、19、20、21、22、および23ヌクレオチド長である。sRNA 剤は、長さおよび構造が、長い dsRNA からの天然の Dic er 処理産物に類似する可能性がある。sRNA 剤の2つの鎖が結合される（例えば、共有結合される）実施形態もまた含まれる。ヘアピン、または必要とされる二本鎖領域を提供する他の一本鎖構造物、および好ましくは3'突出部もまた、本発明の範囲内にある。

【0098】

ds iRNA 剤および sRNA 剤を含む、本明細書に記載される単離 iRNA 剤は、標的 RNA、例えば、mRNA、例えば、タンパク質をコードする遺伝子の転写物のサイレンシングを仲介することが可能である。便宜上、このような mRNA は、本明細書中ではサイレンシングされる mRNA とも呼ばれる。このような遺伝子はまた、標的遺伝子ともいわれる。一般的に、サイレンシングされる RNA は内在性遺伝子または病原体遺伝子である。さらに、mRNA 以外の RNA、例えば、tRNA およびウイルス RNA を標的とすることも可能である。

【0099】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用される場合、語句「RNAiを仲介する」とは、配列特異的な様式で、標的RNAをサイレンシングする能力をいう。理論によって束縛されることを望まないが、サイレンシングは、RNAiの機構またはプロセスおよびガイドRNA（例えば、21～23ヌクレオチドのsiRNA剤）を使用すると考えられる。

【0100】

本明細書中で使用される場合、「特異的にハイブリダイズ可能である」および「相補的」は、安定かつ特異的な結合が本発明の化合物と標的RNA分子の間に起こるような、十分な程度の相補性を示すために使用される用語である。特異的結合は、特異的結合が望ましい条件下で、すなわち、インビボアッセイもしくは治療的処置の場合においては生理学的条件下で、またはインビトロアッセイの場合においてはそのアッセイが実行される条件下で、オリゴマー化合物の非標的配列への非特異的結合を回避するために十分な程度の相補性を必要とする。非標的配列は、一般的には、少なくとも5ヌクレオチド異なる。

10

【0101】

1つの実施形態において、iRNA剤は、iRNA剤が標的mRNAによってコードされるタンパク質の産生をサイレンシングするように、標的RNA（例えば、標的mRNA）に「十分に相補的」である。別の実施形態において、iRNA剤は、標的RNAに対して「厳密に相補的」であり（RRMS含有サブユニットを除外する）、例えば、標的RNAおよびiRNA剤は、好ましくは、厳密に相補的な領域におけるワトソン-クリック塩基対から独占的に構成されるハイブリッドを形成するようにアニールする。「十分に相補的な」標的RNAは、標的RNAに厳密に相補的である内部領域（例えば、少なくとも10ヌクレオチドの領域）を含み得る。さらに、ある実施形態において、iRNA剤は、単一ヌクレオチドの違いを特異的に区別する。この場合において、iRNA剤は、厳密な相補性が単一ヌクレオチドの違いの領域（例えば、7ヌクレオチド以内の領域）において見出される場合のみにRNAiを仲介する。

20

【0102】

本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、核酸分子（RNAまたはDNA）、好ましくは、100、200、300、または400未満の長さのヌクレオチドをいう。

【0103】

本明細書中で議論されるRNA剤は、その他の点では未修飾のRNA、ならびに、例えば、効力を改善するために修飾されたRNA、およびヌクレオシド代用物のポリマーを含む。未修飾のRNAとは、核酸の成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸の部分が、天然に存在する、好ましくは人体において天然に存在するのと同じかまたは実質的に同じである分子をいう。当該分野では、修飾RNAのような、まれなまたは一般的でないが天然に存在するRNAについて言及されており、例えば、リンバックら（Limbach et al.）、（1994）Summary: the modified nucleosides of RNA、Nucleic Acids Res. 22:2183～2196を参照されたい。しばしば修飾RNAと呼ばれる（明らかに一般的には転写後修飾の結果によるからである）、このようなまれなまたは一般的でないRNAは、本明細書中で使用される場合には用語「非修飾RNA」の範囲内にある。修飾RNAは、本明細書中で使用される場合、1つ以上の核酸の成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸の部分が、天然に存在するものと異なる、好ましくは人体において存在するものと異なる分子をいう。これらは修飾「RNA」と呼ばれるが、当然、修飾されているのでRNAではない分子を含むことになる。ヌクレオシド代用物は、リボリン酸バックボーンが、塩基が正しい空間的関連において提示されることを可能にする非リボリン酸構築物で置き換えられている分子であり、その結果、ハイブリダイゼーションは、リボリン酸バックボーンの場合に見られるのと同様である（例えば、リボリン酸バックボーンの非荷電模倣物）。上記のすべての例が本明細書中で議論される。

30

40

【0104】

以下の議論の多くが一本鎖分子に言及する。本発明の多くの実施形態において、二本鎖

50

iRNA 剤（例えば、部分的に二本鎖の iRNA 剤）が必要とされるかまたは好ましい。したがって、以下に記載される一本鎖構造から作られる二本鎖構造（例えば、2つの別々の分子が接触して二本鎖領域を形成する場合、または二本鎖領域が分子内対合（例えば、ヘアピン構造）によって形成される場合）は本発明の範囲内に含まれることが理解される。好ましい長さは本明細書中の他の箇所に記載される。

【0105】

核酸は、サブユニットまたはモノマーのポリマーであるので、以下に記載される修飾の多くが核酸内で反復される位置に存在する（例えば、塩基、またはリン酸部分、またはリン酸部分の非結合 O の修飾）。ある場合において、修飾は、核酸中の対象の位置のすべてに存在するが、しかし、多くの場合および実際上大部分においてはそうではない。例として、修飾は、3' または 5' 末端にのみ存在する可能性があり、末端領域（例えば、末端ヌクレオチドの位置または鎖の最後の 2、3、4、5、もしくは 10 ヌクレオチド）にのみ存在する可能性がある。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、または両方において存在する可能性がある。修飾は、RNA の二本鎖領域中にのみ存在する可能性もあるし、または RNA の一本鎖領域にのみ存在する可能性もある。例えば、非結合 O 位置のホスホロチオエート修飾が、一方の末端にのみもしくは両方の末端に存在してもよいし、末端領域（例えば、末端ヌクレオチド上の位置に、または鎖の最後の 2、3、4、5、もしくは 10 ヌクレオチド）にのみ存在してもよいし、または二本鎖および一本鎖の領域、特に末端に存在することも可能である。5' 末端（一方または両方）がリン酸化されることも可能である。

10

20

【0106】

ある実施形態において、一本鎖突出部（例えば、5' もしくは 3' 突出部、もしくはその両方）において、例えば、安定性を増強すること、突出部に特定の塩基を含ませること、または修飾ヌクレオチドもしくはヌクレオチド代用物を含めることが特に好ましい。例えば、突出部にプリンヌクレオチドを含めることが望ましいことがあり得る。ある実施形態において、3' または 5' の突出部における塩基のすべてまたはいくつかの塩基が、例えば、本明細書中に記載される修飾を用いて修飾される。修飾は、例えば、リボース糖の 2' OH 基での修飾の使用、例えば、リボヌクレオチドの代わりとしてのデオキシリボヌクレオチド（例えば、デオキシチミジン）の使用、およびリン酸基中での修飾（例えば、ホスホチオエート修飾）が含まれる。突出部は、標的配列と相同である必要はない。

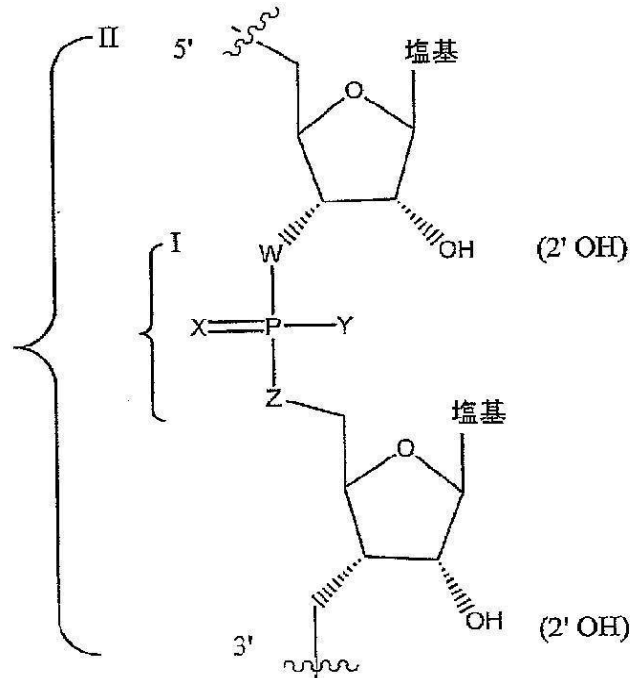
30

【0107】

修飾およびヌクレオチド代用物は以下に議論される。

【0108】

【化 4】



式1

【0109】

式1において上記に提示されるバックボーンはリボ核酸の部分を表す。基本成分はリボース糖、塩基、末端リン酸、およびヌクレオチド間リン酸リンカーである。塩基は天然に存在する塩基（例えば、アデニン、ウラシル、グアニン、またはシトシン）であり、糖は非修飾2'ヒドロキシルリボース糖（示されているとおり）、およびW、X、およびZはすべてOであり、式1は天然に存在する非修飾オリゴリボヌクレオチドを表す。

【0110】

非修飾オリゴリボヌクレオチドは、ある適用においては最適には満たない可能性があり、例えば、非修飾オリゴリボヌクレオチドは、例えば、細胞ヌクレアーゼによる分解を受ける傾向があり得る。ヌクレアーゼは核酸のホスホジエステル結合を加水分解することが可能である。しかし、上記のRNA成分の1つ以上への化学修飾は改善された特性を付与することが可能であり、例えば、オリゴリボヌクレオチドをヌクレアーゼに対してより安定性にすることが可能である。未修飾のオリゴリボヌクレオチドはまた、iRNA剤にリガンドまたは他の部分を結合するためのつなぎ止め部分を提供するという観点で最適に満たない可能性がある。

【0111】

修飾核酸およびヌクレオチド代用物は、以下の1つ以上を含むことが可能である：

(i) 変化、例えば、非結合リン酸酸素（XおよびY）の一方もしくは両方の置換、および／または結合リン酸酸素（WおよびZ）の1つ以上の置換（リン酸が末端位置にある場合、位置WまたはZの1つは、天然に存在するリボ核酸中ではさらなるエレメントにリン酸を結合しない。しかし、用語の単純化のために、他に注記される場合以外は、核酸の5'末端のW位置および核酸の3'末端のZ位置は、本明細書中で使用される用語「結合リン酸酸素」の範囲内にある）；

(ii) 変化、例えば、リボース糖の構成成分（例えば、リボース糖上の2'ヒドロキシル）の置換、またはリボース糖の、リボース以外の構造（例えば、本明細書中に記載されるようなもの）による大規模置換；

(iii) リン酸部分（括弧I）の、「リンを含まない（dephospho）」リンカーによる大規模置換；

(iv) 天然に存在する塩基の修飾または置換；

10

20

30

40

50

(v) リボースーリン酸バックボーン (括弧 I I) の置換または修飾 ;

(v i) R N A の 3 ' 末端または 5 ' 末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または構成部分の結合 (例えば、R N A の 3 ' 末端または 5 ' 末端のいずれかへの蛍光標識部分の結合) 。

【0112】

用語「置換」、「修飾」、「変化」などは、この文脈で使用される場合、任意の工程の限定を意味するものではなく、例えば、修飾とは、標準のまたは天然に存在するリボ核酸を用いて開始しかつそれを修飾して修飾リボ核酸を産生しなくてはならないことを意味するものではなく、「修飾された」とは、単に天然に存在する分子との違いを意味する。

【0113】

当然のことであるが、ある化学的実体の実際の電子的構造を、たった 1 つの標準的な型 (すなわち、ルイス構造) によって十分に表すことは可能ではない。理論によって束縛されることを望まないが、実際の構造は、その代わりに、共鳴型または共鳴構造として集合的に知られる、2 つ以上の標準的な型のある混合物または加重平均であり得る。共鳴構造は、個別の化学的実体ではなく、紙の上でのみ存在する。これらは、特定の化学的実体についての結合電子および非結合電子の配置または「局在」においてのみ、互いに異なる。1 つの共鳴構造が他よりもより高い程度でハイブリッドに寄与することが可能であり得る。したがって、本発明の実施形態について記載かつ図示される説明は、特定の種類の実体についての主要な共鳴型として当該分野で認識されているものに関してなされる。例えば、任意のホスホロアミデート (非結合酸素の窒素による置換) が、上記の図においては $X = O$ および $Y = N$ によって表される。

10

20

【0114】

特定の修飾は以下により詳細に議論される。

リン酸基

リン酸基は負に荷電した基である。電荷は、2 つの非結合酸素原子 (すなわち、上記の式 1 の X および Y) にわたって均一に分布している。しかし、リン酸基は、1 つの酸素を異なる置換基に置換することによって修飾することが可能である。R N A リン酸バックボーンへのこのような修飾の 1 つの結果は、ヌクレアーゼ分解に対するオリゴリボヌクレオチドの耐性の増加であり得る。したがって、理論によって束縛されることを望まないが、ある態様において、荷電していないリンカー、または非対称型の電荷分布を有する荷電したリンカーのいずれかを生じる変化を導入することが望ましい可能性がある。

30

【0115】

修飾リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、ホスホネート水素、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステルが含まれる。ホスホロジチオエートは、両方の非結合酸素が硫黄で置換されている。 X または Y の 1 つのみが変化している状況と異なり、ホスホロジチオエートにおけるリン中心はアキラルであり、アキラルはオリゴリボヌクレオチドのジアステレオマーの形成を妨害する。ジアステレオマー形成により、個々のジアステレオマーがヌクレアーゼに対する種々の耐性を示す調製物を生じることが可能である。さらに、キラルリン酸基を含む R N A のハイブリダイゼーション親和性は、対応する未修飾の R N A 種と比較して低い可能性がある。したがって、理論によって束縛されることを望まないが、キラル中心を除去する X および Y の両方に対する修飾 (例えば、ホスホロジチオエート形成) は、該修飾がジアステレオマー混合物を産生することが可能でないという意味で、望ましい可能性がある。したがって、 X は、 S 、 Se 、 B 、 C 、 H 、 N 、または OR (R はアルキルまたはアリールである) のいずれか 1 つであり得る。したがって、 Y は、 S 、 Se 、 B 、 C 、 H 、 N 、または OR (R はアルキルまたはアリールである) のいずれか 1 つであり得る。 X および Y のうち少なくともいずれかの硫黄での置換が好ましい。

40

【0116】

リン酸リンカーが、結合している酸素 (すなわち、式 1 における W または Z) の、窒素

50

(架橋ホスホロアミデート)、硫黄(架橋ホスホロチオエート)、および炭素(架橋メチレンホスホネート)での置換によって修飾されることも可能である。この置換は、末端の酸素(位置W(3'))または位置Z(5'))で起こり得る。Wの炭素による置換またはZの窒素による置換が好ましい。

【0117】

候補剤は、以下に記載されるような適合性について評価されることが可能である。

糖基

修飾DNAは、リボ核酸の糖基のすべてまたはいくつかの修飾を含むことが可能である。例えば、2'ヒドロキシル基(OH)は、多数の異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で修飾または置換されることが可能である。理論によって束縛されるものではないが、ヒドロキシルがもはや脱プロトン化されて2'アルコキシドを形成することが可能でないで、安定性の増強が予測される。2'アルコキシドは、リンカーのリン原子上への分子内求核攻撃による分解を触媒することが可能である。再び、理論によって束縛されることを望まないが、2'位におけるアルコキシド形成が可能でない変化を導入することが、ある実施形態に対して望ましい可能性がある。

10

【0118】

「オキシ」-2'ヒドロキシル基修飾の例には以下が含まれる：アルコキシまたはアリーロキシ(OR、例えば、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラールキル、ヘテロアリール、または糖)；ポリエチレングリコール(PEG)、O(CH₂CH₂)_nCH₂CH₂OR；2'ヒドロキシルが、例えばメチレン架橋によって同じリボース糖の4'炭素に接続されている「ロックト(固定化された)」核酸(LNA)；O-AMINE(AMINE=NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)およびアミノアルコキシ、O(CH₂)_nAMINE、(例えば、AMINE=NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)。メトキシエチル基(MOE)、(OCH₂CH₂OCH₃、PEG誘導体)のみを含むオリゴヌクレオチドが堅固なホスホロチオエート修飾で修飾されたものに匹敵するヌクレアーゼ安定性を示すことは注目すべきことである。

20

30

【0119】

「デオキシ」修飾には以下が含まれる：水素(すなわち、デオキシリボース糖、これは、部分的にdsのRNAの突出部に特に関連する)；ハロ(例えば、フルオロ)；アミノ(例えば、NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸)；NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINE(AMINE=NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ)、NHC(O)R(R=アルキル、シクロアルキル、アリール、アラールキル、ヘテロアリール、または糖)、シアノ；メルカプト；アルキルチオールアルキル；チオアルコキシ；およびアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル、およびアルキニル(これらは場合により、例えば、アミノ官能基で置換されてもよい)。好ましい置換基は、2'-メトキシエチル、2'-OCH₃、2'-O-アリル、2'-C-アリル、および2'-フルオロである。

40

【0120】

糖基は、リボース中の対応する炭素の立体化学的配置とは反対の立体化学的配置を有する1つ以上の炭素を含むことも可能である。したがって、修飾RNAは、例えば、糖としてアラビノースを含むヌクレオチドを含むことが可能である。

【0121】

修飾RNAは、C-1'に核酸塩基を欠く「無塩基」糖を含むことも可能である。これらの無塩基糖はまた、構成成分である糖の1つ以上の原子においてさらに修飾を含むこと

50

が可能である。

【0122】

ヌクレアーゼ耐性を最大化するために、上記2'修飾が、1つ以上のリン酸リンカー修飾（例えば、ホスホロチオエート）と組み合わせて使用されることが可能である。いわゆる「キメラ」オリゴヌクレオチドは、2つ以上の異なる修飾を含むものである。

【0123】

修飾はまた、iRNA剤の1つ以上の部位においてリボース構造の別の実体による大規模置換を伴い得る。これらの修飾は、RRMSのためのリボース置換という表題の節において記載されている。

【0124】

候補修飾は以下に記載されるように評価されることが可能である。

リン酸基の置換

リン酸基は、リン酸以外のものを含む接続部によって置換されることが可能である（上記の式1中の括弧Iを参照のこと）。理論によって束縛されることを望まないが、荷電したホスホジエステル基はヌクレアーゼ分解における反応中心なので、この基を中性の構造模倣物で置換することは、ヌクレアーゼ安定性の増強を付与するはずであると考えられている。この場合も理論によって束縛されることを望まないが、ある態様において、荷電したリン酸基が中性部分によって置換される変化を導入することが望ましい可能性がある。

【0125】

リン酸基を置換することが可能である部分の例には以下が含まれる：シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキサイドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノ。好ましい置換には、メチレンカルボニルアミノ基およびメチレンメチルイミノ基が含まれる。

【0126】

候補修飾は以下のように評価されることが可能である。

リボリン酸バックボーンの置換

リン酸リンカーおよびリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性のヌクレオシドまたはヌクレオチドの代用物によって置換されるオリゴヌクレオチド模倣バックボーンを構築することも可能である（上記の式1の括弧IIを参照のこと）。理論によって束縛されることを望まないが、反復して荷電したバックボーンが存在しなければ、ポリアニオンを認識するタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ）への結合が減少すると考えられている。再度、理論によって束縛されることを望まないが、ある態様において、塩基が中性の代用バックボーンによって連結される変化を導入することが望ましい可能性がある。

【0127】

例には、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（PNA）などのヌクレオシド代用物が含まれる。好ましい代用物はPNA代用物である。

候補修飾は以下に記載されるように評価されることが可能である。

【0128】

末端修飾

オリゴヌクレオチドの3'末端および5'末端が修飾されることが可能である。このような修飾は、分子の3'末端、5'末端、または両方の末端においてなされ得る。該修飾は、末端のリン酸全体または末端リン酸基の1つ以上の原子の修飾または置換を含むことが可能である。例えば、オリゴヌクレオチドの3'末端および5'末端が、他の機能的分子実体、例えば標識部分（例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3色素もしくはCy5色素などの蛍光団）または保護基（例えば、硫黄、ケイ素、ホウ素、もしくはエステルを含む基など）に複合体化することが可能である。前記機能的分子実体は、リン酸基および／またはスペーサーを介して糖に結合することが可能である。スペーサーの末端原子は、リン酸基の結合原子または糖のC-3'もしくはC-5'のO、N、S、も

10

20

30

40

50

しくはC基を接続または置換することが可能である。代替的には、スペーサーは、ヌクレオチド代用物（例えば、PNA）の末端原子を接続または置換することが可能である。これらのスペーサーまたはリンカーは、例えば、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ （例えば、 $n=3$ または6）、無塩基糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシイミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、またはモルホリノなど、またはビオチン試薬およびフルオレセイン試薬を含み得る。「スペーサー／リン酸-機能的分子実体-スペーサーリン酸」という配列構造が、iRNA剤の2つの鎖の間に介在するとき、この配列構造は、ヘアピン型RNA剤中のヘアピンRNAループの代わりに機能することが可能である。3'末端は-OH基であり得る。理論に束縛されることを望まないが、特定の部分の複合体化は、輸送、ハイブリダイゼーションおよび特異性についての特性を改善することが可能であると考えられている。再度、理論に束縛されることを望まないが、ヌクレアーゼ耐性を改善する末端の変化を導入することが望ましい可能性がある。末端修飾の他の例には、色素、インターカレート剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、EDTA）、親油性担体（例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コール酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）およびペプチド複合体（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、 $[MPEG]_2$ 、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射線標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送／吸収促進剤（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール複合体、テトラアザマクロ環のEu³⁺複合体）が含まれる。

【0129】

末端修飾は、本明細書中の他の箇所で議論される理由を含む多くの理由のために、活性を調節するために、または分解に対する耐性を調節するために、加えられることが可能である。活性を調節するために有用である末端修飾には、リン酸またはリン酸アナログによる5'末端の修飾が含まれる。例えば、好ましい態様において、iRNA剤、とりわけアンチセンス鎖は、5'リン酸化されてもよいし、または5'プライム末端にリン酸基アナログを含んでもよい。5'リン酸修飾には、RISC介在性の遺伝子サイレンシングと適合可能であるものが含まれる。適切な修飾には以下が含まれる：5'-リン酸（ $(HO)2(O)P-O-5'$ ）；5'-二リン酸（ $(HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5'-三リン酸（ $(HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)(O)-O-5'$ ）；5'-グアノシンキャップ（7-メチル化または非メチル化）（ $7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5'-アデノシンキャップ（Appp）、および任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造（ $N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5'-チオリン酸（ホスホロチオエート； $(HO)2(S)P-O-5'$ ）；5'-ジチオリン酸（ホスホロジチオエート； $(HO)(HS)(S)P-O-5'$ ）、5'-ホスホロチオール酸（ $(HO)2(O)P-S-5'$ ）；酸素／硫黄置換-リン酸、二リン酸、および三リン酸の任意のさらなる組合せ（例えば、5'- α -チオ三リン酸、5'- γ -チオ三リン酸など）、5'-ホスホルアミデート（ $(HO)2(O)P-NH-5'$ 、 $(HO)(NH2)(O)P-O-5'$ ）、5'-アルキルホスホン酸（R=アルキル=メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、 $RP(OH)(O)-O-5'$ 、 $(OH)2(O)P-5'-CH2$ ）、5'-ア

ルキルエーテルホスホン酸（R＝アルキルエーテル＝メトキシメチル（MeOCH₂）、エトキシメチルなど、例えば、RP（OH）（O）－O－5'）。

【0130】

末端修飾はまた、分布をモニターするためにも有用でありうるが、このような場合において、付加される好ましい基には、蛍光団（例えば、フルオレセイン）またはAlexa色素（例えば、Alexa 488）が含まれる。末端修飾はまた、取り込みを増強するために有用でありうるが、このために有用な修飾にはコレステロールが含まれる。末端修飾はまた、RNA剤を別の部分に架橋するために有用でありうるが、このための有用な修飾にはマイトマイシンCが含まれる。

【0131】

候補修飾は、以下に記載されるように評価されることが可能である。

塩基

アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシルはRNAにおいて見出される最も一般的な塩基である。これらの塩基は、改善された特性を有するRNAを提供するために修飾または置換されることが可能である。例えば、ヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチドは、これらの塩基を用いて、または合成もしくは天然の核酸塩基（例えば、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌバラリン（nubularine）、イソグアニシン（isoguanisine）、またはツベルシジン（tubercidine））および上記の修飾のいずれか1つを用いて調製されることが可能である。代替的には、上記のうち任意の塩基の置換アナログまたは修飾アナログ、例えば、「一般的でない塩基」および「汎用的な塩基」が利用されることも可能である。例としては、非限定的に以下が含まれる：2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、5-ハロウラシルおよび5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、および6-アゾチミン、5-ウラシル（プソイドウラシル）、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-（2-アミノプロピル）ウラシル、5-アミノアリルウラシル、8-ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシル、および他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、およびN-2，N-6，およびO-6置換プリン（2-アミノプロピルアデニンを含む）、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3-デアザ-5-アザシトシン、2-アミノプリン、5-アルキルウラシル、7-アルキルグアニン、5-アルキルシトシン、7-デアザアデニン、N6，N6-ジメチルアデニン、2，6-ジアミノプリン、5-アミノ-アリル-ウラシル、N3-メチルウラシル、置換1，2，4-トリアゾール、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-カルボキシプロピル）ウラシル、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁴-アセチルシトシン、2-チオシトシン、N6-メチルアデニン、N6-イソペンチルアデニン、2-メチルチオ-N6-イソペンチルアデニン、N-メチルグアニン、またはO-アルキル化塩基。さらなるプリンおよびピリミジンは、米国特許第3，687，808号に開示されるもの、「Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering」、858～859頁、クロシュビッツ ジェー アイ（Kroschwitz J. I.）編、John Wiley & Sons、1990に開示されるもの、およびイングリッシュ（Englisch et al.）、Angewandte Chemie, International Edition、1991、30巻、p. 613によって開示されるものが含まれる。

【0132】

一般的には、塩基の変化は、安定性を促進するためには好ましくないが、他の理由のため

10

20

30

40

50

めに有用である可能性がある。例えば、いくつかの2, 6-ジアミノプリンおよび2アミノプリンは蛍光性である。修飾塩基により標的特異性が減少する可能性がある。このことは、iRNA剤の設計において考慮されるべきである。

【0133】

候補修飾は以下に記載されるように評価されることが可能である。

候補RNAの評価

候補RNA剤（例えば、修飾RNA）を、そのRNA剤または修飾分子および対照分子を適切な条件に曝露すること、ならびに選択された特性の存在について評価することによって、選択された特性について評価することが可能である。例えば、分解剤に対する耐性は以下のようにして評価されることが可能である。候補修飾RNA（および好ましくは対照分子、通常は非修飾型）は、分解的な条件、例えば、分解剤（例えば、ヌクレアーゼ）を含む環境に曝露されることが可能である。例えば、生物学的試料を使用することが可能であり、該試料は、例えば、治療的使用、例えば、血液または細胞画分（例えば、無細胞ホモジネートまたは破碎された細胞）において遭遇しうる環境と類似の生物学的試料である。次いで、候補および対照を、多数のアプローチのいずれかによって、分解に対する耐性について評価することが可能である。例えば、候補および対照を、例えば、放射性標識もしくは酵素標識または蛍光標識（例えば、Cy3もしくはCy5など）を用いて、好ましくは、曝露の前に標識することが可能である。対照RNAおよび修飾されたRNAを、分解剤、および場合によっては対照（例えば、不活化された（例えば、熱不活化された）分解剤）とともにインキュベートすることが可能である。次いで、物理学的パラメータ（例えば、修飾分子および対照分子のサイズ）を決定する。これらは、物理学的方法によって（例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動またはサイズ分画カラムによって）、その分子がその元々の長さを維持していたかを評価するために決定してもよいし、または機能的に評価することも可能である。代替的には、ノーザンブロット分析を使用して、未標識の修飾分子の長さをアッセイすることが可能である。

10

20

【0134】

機能的アッセイもまた、候補剤を評価するために使用することが可能である。機能的アッセイは、修飾が、遺伝子発現をサイレンシングする分子の能力を変化させるか否かを決定するために、最初に、または初期の非機能的アッセイ（例えば、分解に対する耐性についてのアッセイ）の後で適用することが可能である。例えば、細胞（例えば、マウスまたはヒトの細胞などの哺乳動物細胞）を、蛍光タンパク質（例えば、GFP）を発現するプラスミドおよびその蛍光タンパク質をコードする転写物に相同である候補RNA剤で同時トランスフェクトすることが可能である（例えば、国際公開公報第00/44914号パンフレットを参照されたい）。例えば、GFP mRNAに相同である修飾dsRNAは、トランスフェクションに候補dsRNAを含めなかった対照細胞（例えば、RNA剤を加えられなかった対照、および／または非修飾RNAを加えられなかった対照）と比較して、細胞の蛍光の減少についてモニターすることによって、GFP発現を阻害する能力についてアッセイすることが可能である。遺伝子発現に対する候補剤の効力は、修飾dsRNA剤および非修飾dsRNA剤の存在下での細胞の蛍光を比較することによって評価可能である。

30

40

【0135】

代替的な機能的アッセイにおいて、内在性マウス遺伝子（好ましくは、c-mosなどの母方で発現される遺伝子）に相同な候補dsRNA剤が、インビボで遺伝子発現を阻害するRNA剤の能力を評価するために、未成熟のマウス卵母細胞に注入されてもよい（例えば、国際公開公報第01/36646号パンフレットを参照されたい）。卵母細胞の表現型（例えば、中期IIにおける停止を維持する能力）を、RNA剤が発現を阻害する指標としてモニター可能である。例えば、dsRNA剤によるc-mos mRNAの切断は、卵母細胞が中期における停止を抜け出て単為生殖的発生を開始することを引き起こす（カレッジら（College et al.）、Nature 370:65~68、1994；ハシモトラ（Hashimoto et al.）、Nature、370

50

：68～71、1994）。標的RNAレベルに対する修飾RNA剤の効果は、陰性対照と比較して、標的mRNAのレベルの減少についてアッセイするためのノーザンブロットによって、または標的タンパク質のレベルの減少についてアッセイするためのウェスタンブロット分析によって確認可能である。対照は、RNA剤が添加されない細胞、および／または非修飾RNAが添加される細胞を含むことが可能である。

【0136】

参考文献

一般的参考文献

本発明に従って使用されるオリゴリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオシドは、固相合成を用いて可能であり、例えば、以下を参照されたい：「Oligonucleotides synthesis, a practical approach」、エムジェー ガイト (M. J. Gait) 編、IRL Press、1984；「Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach」エフ エックスタイン (F. Eckstein) 編、IRL Press、1991（とりわけ、第1章「Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis」、第2章「Oligoribonucleotide synthesis」、第3章「2'-O-Methyloligoribonucleotide-synthesis and applications」、第4章「Phosphorothioate oligonucleotides」、第5章「Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates」、第6章「Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates」、および第7章「Oligodeoxy nucleotides containing modified bases」）。他の特に有用な合成手順、試薬、ブロック基、および反応条件は、マーティン ピー (Martin, P.)、Helv. Chim. Acta. 1995、78、486～504；ボカジュ エス エル (Beaucage, S. L.) およびアイヤル アール ピー (Iyer, R. P.)、Tetrahedron、1992、48、2223～2311ならびにボカジュ エス エル (Beaucage, S. L.) およびアイヤル アール ピー (Iyer, R. P.)、Tetrahedron、1993、49、6123～6194、またはそこに引用される参考文献に記載されている。

【0137】

国際公開公報第00/44895号パンフレット、国際公開公報第01/75164号パンフレット、または国際公開公報第02/44321号パンフレットに記載される修飾は、本明細書中で使用されることが可能である。

【0138】

本明細書中で列挙されるすべての刊行物、特許、および公開特許出願の開示は、本願明細書に援用される。

リン酸基の参考文献

ホスフィン酸オリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,508,270号に記載される。アルキルホスホン酸オリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第4,469,863号に記載される。ホスホルアミダイトオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,256,775号または米国特許第5,366,878号に記載される。ホスホトリエステルオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,023,243号に記載される。ボラノリン酸オリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,130,302号および米国特許第5,177,198号に記載される。3'-デオキシ-3'-アミノホスホルアミデートリボオリゴヌクレオチドの調製は、米国特許第5,476,925号に記載されている。3'-デオキシ-3'-メチレンホスホネートオリゴリボヌクレオチドは、アン (An), H. J. Org. Chem. 2001、66、2789～2801に記載されている。硫黄架橋ヌクレオチドの調製は、スプロートら (Sproat et al.)、J. Am. Chem. Soc. 1997、119、10000～10006に記載されている。

al.)、Nucleosides Nucleotides 1988、7、651
 およびクロスティックら (Crosstick et al.)、Tetrahedron
 Lett. 1989、30、4693に記載されている。

【0139】

糖基の参考文献

2'修飾に対する改変は、フェルマ (Verma), S. ら、Annu. Rev. Biochem. 1998、67、99~134および同文献内のすべての参考文献において見出されることが可能である。リボースに対する特異的修飾は以下の参考文献において見出されることが可能である：2'-フルオロ (カワサキら (Kawasaki et al.)、J. Med. Chem.、1993、36、831~841)、2'-MOE (マーティン ピー (Martin, P.) Helv. Chim. Acta 1996、79、1930~1938)、「LNA」(ウェンゲル (Wengel)、J. Acc Chem. Res. 1999、32、301~310)。

10

【0140】

リン酸基の置換に関する参考文献

メチレンメチルイミノ結合オリゴリボヌクレオシド (本明細書中では、MMI 結合オリゴリボヌクレオシドとしても同定される)、メチレンジメチルヒドラゾ結合オリゴリボヌクレオシド (本明細書中では、MDH 結合オリゴリボヌクレオシドとしても同定される)、およびメチレンカルボニルアミノ結合オリゴヌクレオシド (本明細書中では、アミド-3 結合オリゴリボヌクレオシドとしても同定される)、およびメチレンアミノカルボニル結合オリゴヌクレオシド (本明細書中では、アミド-4 結合オリゴリボヌクレオシドとしても同定される)、ならびに混合バックボーン化合物 (例えば、交互に MMI および PO または PS 結合を有する) は、米国特許第 5, 378, 825 号、同第 5, 386, 023 号、同第 5, 489, 677 号、ならびに公開された PCT 出願 PCT/US92/04294 号および PCT/US92/04305 号 (それぞれ、国際公開公報第 92/20822 号および国際公開公報第 92/20823 号パンフレットとして公開されている) に記載されるように調製されることが可能である。ホルムアセタールおよびチオホルムアセタール結合オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第 5, 264, 562 号および米国特許第 5, 264, 564 号に記載されるように調製されることが可能である。エチレンオキサイド結合オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第 5, 223, 618 号に記載されるように調製されることが可能である。シロキサン置換については、コーミア ジェーエフら (Cormier, J. F. et al)、Nucleic Acids Res. 1988、16、4583に記載されている。カーボネート置換は、ティテンサー ジェー アール (Tittensor, J. R.)、J. Chem. Soc. Cl971、1933に記載されている。カルボキシメチル置換は、エッジ エム ディーら (Edge, M. D.)、J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1972、1991に記載されている。カルバメート置換は、スターチャク イー ピー (Stirchak, E. P.)、Nucleic Acids Res. 1989、17、6129に記載されている。

20

30

【0141】

リン酸-リボースバックボーンの置換に関する参考文献

糖代用品のシクロブチル化合物は、米国特許第 5, 359, 044 号に記載されるように調製されることが可能である。ピロリジン糖代用物は、米国特許第 5, 519, 134 号に記載されるように調製されることが可能である。モルホリノ糖代用物は、米国特許第 5, 142, 047 号および米国特許第 5, 235, 033 号、ならびに他の関連する特許の開示に記載されるように調製されることが可能である。ペプチド核酸 (PNA) はそれ自体公知であり、「Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications」、Bioorganic & Medicinal Chemistry、1996、4、5~23において引用される種々の手順のいずれかに従って調製されること

40

50

が可能である。これらはまた、米国特許第 5, 539, 083 号に従って調製されることが可能である。

【0142】

末端修飾の文献

末端修飾は、マノハラン エムら (Manoharan, M. et al.)、Antisense and Nucleic Acid Drug Development 12、103～128 (2002) および同文献中の引用文献に記載されている。

【0143】

塩基の参考文献

N-2 置換プリンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第 5, 459, 255 号に記載されるように調製されることが可能である。3-デアザプリンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第 5, 457, 191 号に記載されるように調製されることが可能である。5, 6-置換ピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第 5, 614, 617 号に記載されるように調製されることが可能である。5-プロピニルピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第 5, 484, 908 号に記載されるように調製されることが可能である。さらなる参考文献は、塩基修飾についての上記の節に開示されることが可能である。

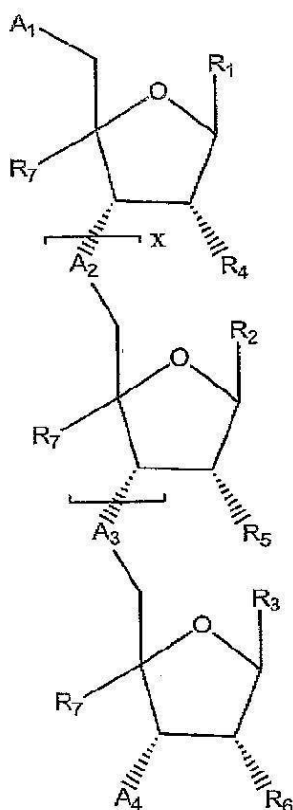
【0144】

好ましい iRNA 剤

好ましい RNA 剤は以下の構造を有する (以下の式 2 を参照のこと) :

【0145】

【化 5】



式2

【0146】

上記の式 2 を参照すると、 R^1 、 R^2 、および R^3 は、各々独立して、H (すなわち、脱塩基ヌクレオチド)、アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシル、イノシン、チ

ミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌバラリン、ツベルシジン、イソグアニシン、2-
 アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデ
 ニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、5-ハロウラシルおよび
 5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、6-アゾウ
 ラシル、6-アゾシトシン、および6-アゾチミン、5-ウラシル（プソイドウラシル）
 、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-（2-アミノプロピル）ウラシル、5-ア
 ミノアリルウラシル、8-ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシル、およ
 び他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウ
 ラシルおよびシトシン、7-メチルグアニン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン
 およびN-2, N-6, およびO-6置換プリン（2-アミノプロピルアデニンを含む）
 、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3-デア
 ザー5-アザシトシン、2-アミノプリン、5-アルキルウラシル、7-アルキルグアニ
 ン、5-アルキルシトシン、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、N6, N6-ジ
 メチルアデニン、2, 6-ジアミノプリン、5-アミノ-アリル-ウラシル、N3-メチ
 ルウラシル、置換1, 2, 4-トリアゾール、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、
 3-ニトロピロール、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メトキシ
 カルボニルメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメ
 チル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル、3-（3-アミ
 ノ-3-カルボキシプロピル）ウラシル、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N
 4-アセチルシトシン、2-チオシトシン、N6-メチルアデニン、N6-イソペンチル
 アデニン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、N-メチルグアニン、また
 はO-アルキル化塩基である。

10

20

30

40

【0147】

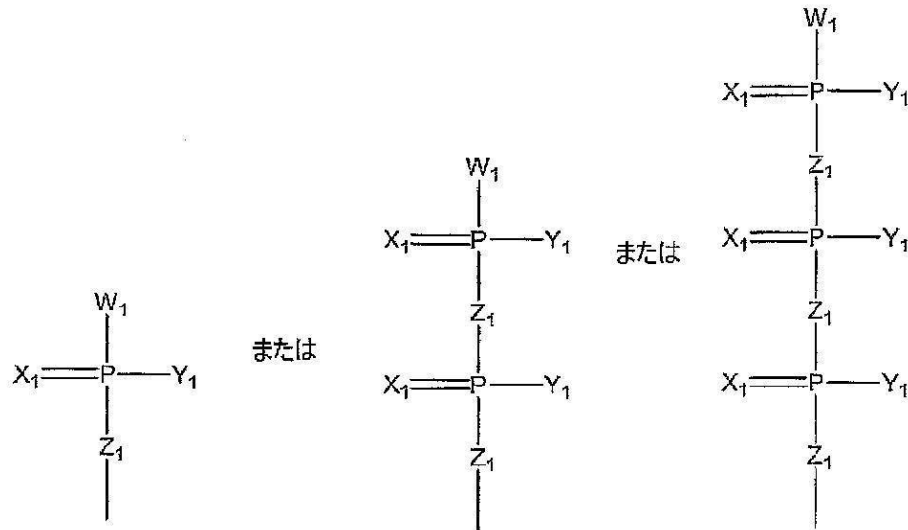
R^4 、 R^5 、および R^6 は、各々独立して、 OR^8 、 $O(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2OR^8$ ； $O(CH_2)_nR^9$ ； $O(CH_2)_nOR^9$ 、H；ハロ； NH_2 ； NHR^8 ； $N(R^8)_2$ ； $NH(CH_2CH_2NH)_mCH_2CH_2NHR^9$ ； $NHC(O)R^8$ ；シアノ；メルカプト； SR^8 ；アルキル-チオ-アルキル；アルキル、アラキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルケニル、アルキニル（これらの各々は、
 場合により、ハロ、ヒドロキシ、オキソ、ニトロ、ハロアルキル、アルキル、アルカリル、
 アリール、アラキル、アルコキシ、アリールオキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジア
 ルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールア
 ミノ、ジヘテロアリールアミノ、アシルアミノ、アルキルカルバモイル、アリールカルバ
 モイル、アミノアルキル、アルコキシカルボニル、カルボキシ、ヒドロキシアルキル、ア
 ルカンスルホンル、アルカンスルホンアミド、アレンスルホンアミド、アラキルスルホ
 ンアミド、アルキルカルボニル、アシルオキシ、シアノ、またはウレイドで置換されても
 よい）であるか；または、 R^4 、 R^5 、および R^6 は、 R^7 と一緒に組み合わせさせて、糖
 の2'炭素と4'炭素の間の $[-O-CH_2-]$ 共有結合架橋を形成する。

【0148】

A^1 は

【0149】

【化 6】



10

【0150】

；H；OH；OCH₃；W₁；脱塩基ヌクレオチドであるか；または存在せず、
 （好ましいA1は、とりわけアンチセンス鎖に関して、以下の：5'-リン酸（（HO）₂（O）P-O-5'）；5'-ニリン酸（（HO）₂（O）P-O-P（HO）（O）-O-5'）；5'-三リン酸（（HO）₂（O）P-O-（HO）（O）P-O-P（HO）（O）-O-5'）；5'-グアノシンキャップ（7-メチル化または非メチル化）（7m-G-O-5'-（HO）（O）P-O-（HO）（O）P-O-P（HO）（O）-O-5'）；5'-アデノシンキャップ（A p p p）、および任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造（N-O-5'-（HO）（O）P-O-（HO）（O）P-O-P（HO）（O）-O-5'）；5'-チオリン酸（ホスホロチオエート；（HO）₂（S）P-O-5'）、5'-ジチオリン酸（ホスホロジチオエート；（HO）（HS）（S）P-O-5'）、5'-ホスホロチオール酸（（HO）₂（O）P-S-5'）；酸素／硫黄置換一リン酸、ニリン酸、および三リン酸の任意のさらなる組合せ（例えば、5'-α-チオ三リン酸、5'-γ-チオ三リン酸など）、5'-ホスホルアミデート（（HO）₂（O）P-NH-5'、（HO）（NH₂）（O）P-O-5'）、5'-アルキルホスホン酸（R=アルキル=メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、RP（OH）（O）-O-5'-、（OH）₂（O）P-5'-CH₂）、5'-アルキルエーテルホスホン酸（R=アルキルエーテル=メトキシメチル（MeOCH₂-）、エトキシメチルなど、例えば、RP（OH）（O）-O-5'-）から選択される）。

20

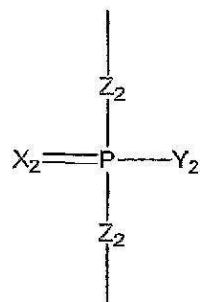
30

【0151】

A₂は

【0152】

【化 7】



40

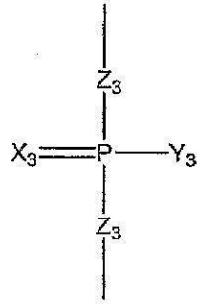
【0153】

50

であり、 A_3 は

【0154】

【化8】



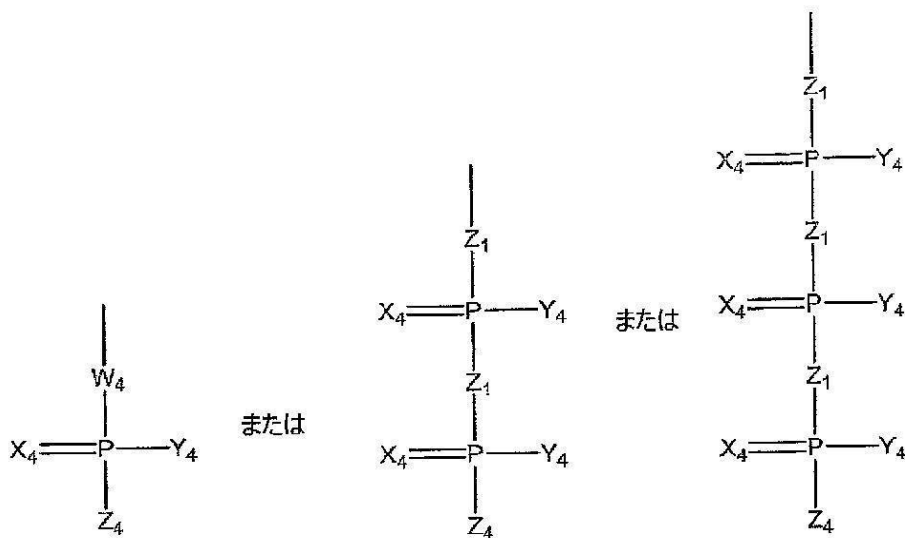
10

【0155】

であり；かつ A_4 は

【0156】

【化9】



20

30

【0157】

； H ； Z^4 ；逆向きのヌクレオチド；脱塩基ヌクレオチドであるか；または存在しない。

W^1 は、 OH 、 $(CH_2)_n R^{10}$ 、 $(CH_2)_n NHR^{10}$ 、 $(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $(CH_2)_n SR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n R^{10}$ 、 $O(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n NR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n SR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n SS(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n C(O)OR^{10}$ 、 $NH(CH_2)_n R^{10}$ ； $NH(CH_2)_n NR^{10}$ ； $NH(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $NH(CH_2)_n SR^{10}$ ； $S(CH_2)_n R^{10}$ 、 $S(CH_2)_n NR^{10}$ 、 $S(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $S(CH_2)_n SR^{10}$ 、 $O(CH_2 CH_2 O)_m CH_2 CH_2 OR^{10}$ ； $O(CH_2 CH_2 O)_m CH_2 CH_2 NHR^{10}$ ； $NH(CH_2 CH_2 NH)_m CH_2 CH_2 NHR^{10}$ ； $Q-R^{10}$ 、 $O-Q-R^{10}$ 、 $N-Q-R^{10}$ 、 $S-Q-R^{10}$ 、または $-O-$ である。 W^4 は、 O 、 CH_2 、 NH 、または S である。

40

【0158】

X^1 、 X^2 、 X^3 、および X^4 は、各々独立して、 O または S である。

Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、および Y^4 は、各々独立して、 OH 、 O^- 、 OR^8 、 S 、 Se 、 BH_3^- 、 H 、 NHR^9 、 $N(R^9)_2$ 、アルキル、シクロアルキル、アラキル、アリール、またはヘテロアリールであり、これらの各々が場合によっては置換されてもよい。

【0159】

50

Z^1 、 Z^2 、および Z^3 は、各々独立して、 O 、 CH_2 、 NH 、または S である。 Z^4 は、 OH 、 $(CH_2)_n R^{10}$ 、 $(CH_2)_n NHR^{10}$ 、 $(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $(CH_2)_n SR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n R^{10}$ 、 $O(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n NR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n SR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n SS(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $O(CH_2)_n C(O)OR^{10}$ 、 $NH(CH_2)_n R^{10}$ ； $NH(CH_2)_n NR^{10}$ ； $NH(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $NH(CH_2)_n SR^{10}$ ； $S(CH_2)_n R^{10}$ 、 $S(CH_2)_n NR^{10}$ 、 $S(CH_2)_n OR^{10}$ 、 $S(CH_2)_n SR^{10}$ 、 $O(CH_2 CH_2 O)_m CH_2 CH_2 OR^{10}$ ； $O(CH_2 CH_2 O)_m CH_2 CH_2 NHR^{10}$ ； $NH(CH_2 CH_2 NH)_m CH_2 CH_2 NHR^{10}$ ； $Q-R^{10}$ 、 $O-Q-R^{10}$ 、 $N-Q-R^{10}$ 、 $S-Q-R^{10}$ である。

10

【0160】

x は、本明細書中に記載されるRNA剤の長さを満足するように選択され、5～100である。

R^7 はHであるか、または R^4 、 R^5 、または R^6 と一緒に組み合わさって糖の2'炭素と4'炭素の間に $[-O-CH_2-]$ 共有結合架橋を形成する。

【0161】

R^8 は、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アミノ酸、または糖であり； R^9 は、 NH_2 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり；および R^{10} はH；蛍光団（例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3色素もしくはCy5色素）；硫黄、ケイ素、ホウ素、もしくはエステル保護基；インターカレート剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サッフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、EDTA）、親油性担体（コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コール酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）およびペプチド複合体（例えば、アンテナペペディンペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、 $[MPEG]_2$ 、ポリアミノ；アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール；放射線標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送／吸収促進剤（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール複合体、テトラアザマクロ環のEu3+複合体）；またはRNA剤である。 m は0～1,000,000であり、かつ n は0～20である。 Q は、脱塩基性の糖（*abasic sugar*）、アミド、カルボキシ、オキシアミン、オキシイミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミドもしくはモルホリノ、ビオチン、またはフルオレセイン試薬からなる群より選択されるスペーサーである。

20

30

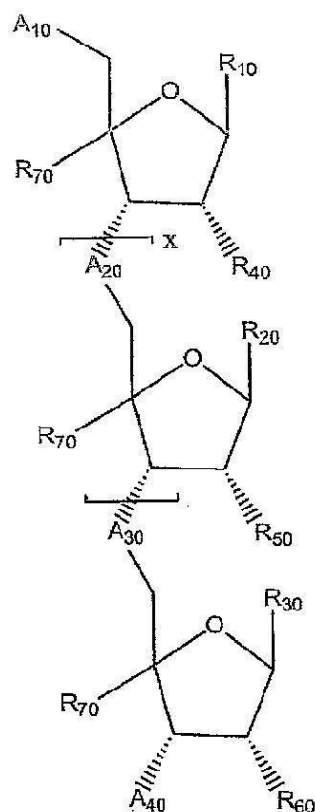
40

【0162】

リン酸基全体が置換されている好ましいRNA剤は以下の構造を有する（以下の式3を参照のこと）：

【0163】

【化 10】



式3

【0164】

式3を参照すると、 $A^{10} - A^{40}$ はL-G-Lであり； A^{10} および A^{40} のうち少なくともいずれかは存在しなくてもよい。ここでLはリンカーであり、一方または両方のLは存在していても存在していなくてもよく、かつ CH_2 (CH_2)_g；N (CH_2)_g；O (CH_2)_g；S (CH_2)_gからなる群より選択される。Gは、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキサイドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノからなる群より選択される官能基である。

【0165】

R^{10} 、 R^{20} 、および R^{30} は、各々独立して、H（すなわち、脱塩基ヌクレオチド）、アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシル、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌバラリン、ツベルシジン、イソグアニシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、5-ハロウラシルおよび5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、および6-アゾチミン、5-ウラシル（プソイドウラシル）、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-（2-アミノプロピル）ウラシル、5-アミノアリルウラシル、8-ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシル、および他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、およびN-2，N

ー6、およびOー6置換プリン（2ーアミノプロピルアデニンを含む）、5ープロピニル
 ウラシルおよび5ープロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3ーデアザー5ーアザシト
 シン、2ーアミノプリン、5ーアルキルウラシル、7ーアルキルグアニン、5ーアルキル
 シトシン、7ーデアザアデニン、7ーデアザグアニン、N6，N6ージメチルアデニン、
 2，6ージアミノプリン、5ーアミノーアリルーウラシル、N3ーメチルウラシル置換1
 ，2，4ートリアゾール、2ーピリジノン、5ーニトロインドール、3ーニトロピロール
 、5ーメトキシウラシル、ウラシルー5ーオキシ酢酸、5ーメトキシカルボニルメチルウ
 ラシル、5ーメチルー2ーチオウラシル、5ーメトキシカルボニルメチルー2ーチオウラ
 シル、5ーメチルアミノメチルー2ーチオウラシル、3ー（3ーアミノー3ーカルボキシ
 プロピル）ウラシル、3ーメチルシトシン、5ーメチルシトシン、N⁴ーアセチルシトシ
 ン、2ーチオシトシン、N6ーメチルアデニン、N6ーイソペンチルアデニン、2ーメチ
 ルチオーN6ーイソペンテニルアデニン、Nーメチルグアニン、またはOーアルキル化塩
 基である。

【0166】

R^{4 0}、R^{5 0}、およびR^{6 0}は、各々独立して、OR⁸、O（CH₂CH₂O）_mCH₂CH₂OR⁸；O（CH₂）_nR⁹；O（CH₂）_nOR⁹、H；ハロ；NH₂；NHR⁸；N（R⁸）₂；NH（CH₂CH₂NH）_mCH₂CH₂R⁹；NHC（O）R⁸；；シアノ；メルカプト；SR⁷；アルキルーチオーアルキル；アルキル、アラキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルケニル、アルキニル（これらの各々は、場合により、ハロ、ヒドロキシ、オキソ、ニトロ、ハロアルキル、アルキル、アルカリル、アリール、アラキル、アルコキシ、アリールオキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アシルアミノ、アルキルカルバモイル、アリールカルバモイル、アミノアルキル、アルコキシカルボニル、カルボキシ、ヒドロキシアルキル、アルカンスルホニル、アルカンスルホンアミド、アレンスルホンアミド、アラキルスルホンアミド、アルキルカルボニル、アシルオキシ、シアノ、またはウレイド基で置換されてもよい）であり；または、R^{4 0}、R^{5 0}、およびR^{6 0}は、R^{7 0}と一緒に組み合わさって、糖の2'炭素と4'炭素の間の〔ーOーCH₂ー〕共有結合架橋を形成する。

【0167】

xは、本明細書中に記載されるRNA剤の長さを満足するように選択され、5～100である。

R^{7 0}はHであるか、またはR^{4 0}、R^{5 0}、またはR^{6 0}と一緒に組み合わさって、糖の2'炭素と4'炭素の間の〔ーOーCH₂ー〕共有結合架橋を形成する。

【0168】

R⁸は、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アミノ酸、または糖であり；R⁹は、NH₂、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸である、mは0～1，000，000であり、nは0～20であり、かつgは0～2である。

【0169】

好ましいヌクレオシド代用物は以下の構造を有する（以下の式4を参照のこと）：

【0170】

【化11】



式4

【0171】

Sは、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸からなる群より選

択される。Lはリンカーであり、かつ $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_g$ ； $\text{N}(\text{CH}_2)_g$ ； $\text{O}(\text{CH}_2)_g$ ； $\text{S}(\text{CH}_2)_g$ ； $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n-$ からなる群より選択されるか、または存在していなくてもよい。Mは、アミド結合；スルホンアミド；スルフィン酸；リン酸基；本明細書中に記載されるような修飾リン酸基であるか；または存在していなくてもよい。

【0172】

R^{100} 、 R^{200} 、および R^{300} は、各々独立して、H（すなわち、脱塩基ヌクレオチド）、アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシル、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌバラリン、ツベルシジン、イソグアニシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、5-ハロウラシルおよび5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、および6-アゾチミン、5-ウラシル（プソイドウラシル）、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-（2-アミノプロピル）ウラシル、5-アミノアリルウラシル、8-ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシル、および他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンおよびN-2，N-6，およびO-6置換プリン（2-アミノプロピルアデニンを含む）、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3-デアザ-5-アザシトシン、2-アミノプリン、5-アルキルウラシル、7-アルキルグアニン、5-アルキルシトシン、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、N6，N6-ジメチルアデニン、2，6-ジアミノプリン、5-アミノ-アリル-ウラシル、N3-メチルウラシル置換1，2，4-トリアゾール、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-カルボキシプロピル）ウラシル、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁴-アセチルシトシン、2-チオシトシン、N6-メチルアデニン、N6-イソペンチルアデニン、2-メチルチオ-N6-イソペンチルアデニン、N-メチルグアニン、またはO-アルキル化塩基である。

【0173】

xは、本明細書中に記載されるRNA剤の長さを満足するように選択され、5～100であり；gは0～2である。

ヌクレアーゼ耐性モノマー

RNA、例えばiRNA剤に、本明細書に記載されるような、さらに同時係属中の共同所有される2003年5月9日に申請された米国仮特許出願第60/469,612号および国際出願番号PCT/US04/07070号（いずれも本願出願書に援用する）に記載されるようなヌクレアーゼ耐性モノマー（NRM）を組み入れることが可能である。

【0174】

さらに、本発明はNRMおよび本明細書に記載の他の要素を有するiRNA剤を含む。例えば、本発明は、本明細書に記載のiRNA剤、例えばパリンドローム構造のiRNA剤、非標準的な対合を有するiRNA剤、本明細書に記載の遺伝子、例えば腎臓において活性を示す遺伝子を標的とするiRNA剤、本明細書に記載の構成様式もしくは構造を有するiRNA剤、本明細書に記載の両親媒性送達剤と結合したiRNA剤、本明細書に記載の薬剤送達モジュールと結合したiRNA剤、本明細書に記載のように投与されるiRNA剤、または本明細書に記載のように製剤化されたiRNA剤であって、NRMも取り込むiRNA剤を含む。

【0175】

iRNA剤は、例えば、対象の体内に見られるヌクレアーゼ（例えばエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ）による分解を阻害するように修飾されたモノマーを含みう

る。これらのモノマーをここではNRM、またはヌクレアーゼ耐性促進モノマーもしくはヌクレアーゼ耐性促進修飾体と称する。多くの場合、これらの修飾は、iRNA剤の他の特性、例えばタンパク質（例えば輸送タンパク質（例えば血清アルブミン））もしくはRISC（RNA誘導サイレンシング複合体）の構成メンバーと相互作用する能力、または最初の配列と2番目の配列が相互に二本鎖を形成もしくは別の配列、例えば標的分子と二本鎖を形成する能力という特性も同様に調節する。

【0176】

理論に縛られることは望まないが、iRNA剤の糖、塩基および／またはリン酸バックボーンの修飾体は、エンドヌクレアーゼ耐性およびエキソヌクレアーゼ耐性を増強し、さらに輸送タンパク質およびRISC複合体の1つまたは複数の機能的要素との相互作用を亢進すると考えられる。好ましい修飾体は、エキソヌクレアーゼ耐性およびエンドヌクレアーゼ耐性を高め、したがって、RISC複合体と相互作用する前のiRNA剤の半減期を延長するが、同時に、RISC複合体におけるエンドヌクレアーゼの活性に対してはiRNA剤を耐性にしない修飾体である。繰り返すが、いかなる理論にも縛られることは望まないが、上記修飾をアンチセンス鎖の3'末端および／もしくは5'末端またはこれらの近くに配置することにより、上記に描写される好ましいヌクレアーゼ耐性の基準を満たすiRNA剤が生じると考えられる。やはり繰り返すが、いかなる理論にも縛られることは望まないが、修飾を、例えばセンス鎖の中央に配置することにより、オフターゲットの可能性が比較的低いiRNA剤が作製可能と考えられる。

10

【0177】

本明細書に記載の修飾を、例えばiRNA剤などの、本明細書に記載の任意の二本鎖RNAおよびRNA様分子へ組み込むことが可能である。iRNA剤はハイブリッド形成したセンス鎖およびアンチセンス鎖からなる二本鎖を含むことができ、この場合アンチセンス鎖および／またはセンス鎖は、本明細書に記載される1つまたは複数の修飾を含むことが可能である。アンチセンス鎖は、3'末端および／もしくは5'末端、ならびに／または鎖のいずれかの末端から1～6ヌクレオチド、例えば1～5、1～4、1～3、1～2ヌクレオチドにある1つもしくは複数の位置に修飾を含むことが可能である。センス鎖は、3'末端および／もしくは5'末端、ならびに／または鎖の両末端の間にある介入位置のいずれか1つに修飾を含むことが可能である。また、iRNA剤は、ハイブリッド形成した2つのアンチセンス鎖からなる二本鎖を含むことが可能である。第1および／または第2のアンチセンス鎖は、本明細書に記載の1つまたは複数の修飾を含むことが可能である。したがって、1つおよび／または両方のアンチセンス鎖は、3'末端および／もしくは5'末端、ならびに／または鎖のいずれかの末端から1～6ヌクレオチド、例えば1～5、1～4、1～3、1～2ヌクレオチドにある1つもしくは複数の位置に修飾を含むことが可能である。以降に特定の構造について述べる。

20

30

【0178】

上記により描写される好ましいヌクレアーゼ耐性の基準を満たすiRNA剤を作製するために有用と考えられる修飾は、以下に記すような、糖、塩基および／またはリン酸バックボーンについての1つまたは複数の化学的および／または立体化学的修飾を含むことが可能である：

40

(i) キラル(Sp)チオエート。したがって、好ましいNRMは、通常は酸素によって占められる非架橋位置、例えば位置XのSpまたはRpにヘテロ原子を含む特定のキラル型の修飾リン酸基について富化された、または前記修飾リン酸基について純粋なヌクレオチド二量体を含む。また、Xの原子にはS、Se、Nr₂またはBr₃が考えられる。XがSならば、富化された、またはキラル型について純粋なSpとの結合が好ましい。富化とは好ましい型が少なくとも70、80、90、95または99%であることを意味する。そのようなNRMについては以下により詳細に記載する；

(ii) 糖、塩基および／またはリン酸バックボーン部分もしくは修飾リン酸バックボーン部分のリン原子への1つまたは複数のカチオン基の結合。したがって、好ましいNRMは、末端にカチオン基で誘導体化されたモノマーを含む。アンチセンス配列の5'末端

50

は、末端-OHまたはリン酸基を有する必要があるので、前記のNRMは、アンチセンス配列の5'末端では使用されないことが好ましい。このカチオン基は、水素結合形成およびハイブリッド形成との干渉を最少化する塩基上の位置、例えばもう一方の鎖の相補的塩基と相互作用する面から離れた位置（例えばピリミジンの5'位またはプリン7位）で結合しなければならない。これらについては以下により詳細に述べる；

(iii) 末端での非リン酸結合。したがって、好ましいNRMは、例えば切断に対する耐性がリン酸結合よりも大きくなる4原子の結合などの、非リン酸結合を含む。例として、3'-CH₂-NCH₃-O-CH₂-5'および3'-CH₂-NH-(O=)-CH₂-5'が挙げられる。

【0179】

10

(iv) 3'架橋チオリン酸塩および5'架橋チオリン酸塩。したがって、好ましいNRMは前記の構造を含むことが可能である。

(v) L-RNA、2'-5'結合、逆向きの結合、α-ヌクレオシド。したがって、他の好ましいNRMに含まれるものは、LヌクレオシドおよびL-ヌクレオシド由来のヌクレオチド二量体；2'-5'リン酸塩、非リン酸塩および修飾リン酸塩の結合、例えばチオリン酸塩、ホスホルアミデートおよびホウ素化リン酸塩；逆向きの結合、例えば3'-3'または5'-5'結合を有する二量体；糖の1'位にα結合を有するモノマー、例えば本明細書に記載のα結合を有する構造が挙げられる；

(vi) 結合基。したがって、好ましいNRMは、例えば標的結合部分、または、例えば糖、塩基もしくはバックボーンを通してモノマーと結合する、本明細書に記載の結合リガンドを含むことが可能である。

20

【0180】

(vi) 脱塩基結合。したがって、好ましいNRMは、例えば本明細書に記載されるような脱塩基モノマー（例えば核酸塩基のないモノマー）、本明細書に記載されるような芳香族モノマーもしくは複素環式モノマー、または多複素環式芳香族モノマーを含むことが可能である；

(vii) 5'-ホスホネートおよび5'-ホスフェート型プロドラッグ。したがって、好ましいNRMは、好ましくは末端部位（例えば5'位）に、リン酸基の1つまたは複数の原子が保護基により誘導体化されているモノマーを含み、この1つまたは複数の保護基は、対象の体内成分、例えばカルボキシエステラーゼまたは対象の体内に存在する酵素の作用により除去される。例えば、カルボキシエステラーゼが保護分子を切断する結果チオエートアニオンが生じ、チオエートアニオンがリン酸塩のOに隣接する炭素を攻撃する結果として保護されていないリン酸塩が生じるリン酸プロドラッグ。

30

【0181】

1つまたは複数の異なるNRM修飾をiRNA剤またはiRNA剤の配列中に導入することが可能である。NRM修飾は、配列またはiRNA剤に2回以上使用することが可能である。一部のNRMはハイブリッド形成を妨げるので、取り込む総数は、許容可能なレベルのiRNA剤の二本鎖形成が維持されるものでなければならない。

【0182】

一部の実施形態において、NRM修飾は、対象の所望の配列または遺伝子を標的としな

40

い配列（センス鎖またはセンス配列）の末端切断部位または切断領域へ導入される。このことによりオフターゲットによるサイレンシングを低減しうる。

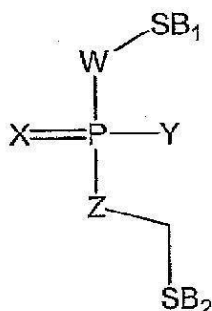
【0183】

キラルSpチオエート

修飾は、1つもしくは両方の非結合(XおよびY)リン酸酸素および/または1つもしくは複数の結合(WおよびZ)リン酸酸素の変更(例えば置換)を含みうる。下記の式Xは2つの糖/糖代用物-塩基部分(SB₁およびSB₂)が結合しているリン酸塩部分を表す。

【0184】

【化 1 2】



式X

10

【0185】

特定の実施形態において、リン酸バックボーン部分の非結合リン酸酸素（XおよびY）の1つは次のいずれか1つ：S、Se、BR₃（Rは水素、アルキル、アリールなど）、C（すなわち、アルキル基、アリール基など）、H、NR₂（Rは水素、アルキル、アリールなど）、またはOR（Rはアルキルまたはアリール）と置換可能である。非修飾リン酸基のリン原子はアキラルである。しかし、非結合酸素の1つを上記の原子または原子群の1つと置換することにより、リン原子がキラル化される。いいかえれば、このように修飾されたリン酸基内のリン酸原子は立体中心である。立体中心のリン原子は「R」配置（ここではRp）または「S」配置（ここではSp）を有することが可能である。したがって、立体中心のリン原子の60%がRp配置を有するとき、残る40%の立体中心のリン原子はSp配置を有することになる。

20

【0186】

一部の実施形態において、リン酸非結合酸素が他の原子または原子群で置換されているリン酸基を有するiRNA剤は、立体中心の原子の少なくとも約50%（例えば立体中心の原子の少なくとも約60%、同原子の少なくとも約70%、同原子の少なくとも約80%、同原子の少なくとも約90%、同原子の少なくとも約95%、同原子の少なくとも約98%、同原子の少なくとも約99%）がSp配置を有する立体中心リン原子の集団を含むことが可能である。あるいは、リン酸非結合酸素が他の原子または原子群で置換されているリン酸基を有するiRNA剤は、立体中心の原子の少なくとも約50%（例えば立体中心の原子の少なくとも約60%、同原子の少なくとも約70%、同原子の少なくとも約80%、同原子の少なくとも約90%、同原子の少なくとも約95%、同原子の少なくとも約98%、同原子の少なくとも約99%）がRp配置を有する立体中心リン原子の集団を含むことが可能である。他の実施形態において、立体中心リン原子の集団がSp配置を有し、かつRp配置を有する立体中心リン原子を実質的に含まないことが可能である。さらに他の実施形態において、立体中心リン原子の集団がRp配置を有し、かつSp配置を有する立体中心リン原子を実質的に含まないことが可能である。本明細書では、「Rp配置を有する立体中心リン原子を実質的に含まない」という句は、Rp配置を有する立体中心リン原子を含む部分が当技術分野で公知の従来の方法（キラルHPLC、キラルシフト試薬を使用した¹H NMR分析など）により検出できないことを意味する。本明細書では、「Sp配置を有する立体中心リン原子を実質的に含まない」という句は、Sp配置を有する立体中心リン原子を含む部分が当技術分野で公知の従来の方法（キラルHPLC、キラルシフト試薬を使用した¹H NMR分析など）により検出できないことを意味する。

30

40

【0187】

好ましい実施形態において、修飾iRNA剤はホスホロチオエート基、すなわちリン酸の非結合酸素がイオウ原子と置換されているリン酸基を含む。特に好ましい実施形態において、ホスホロチオエートの立体中心リン原子の集団はSp配置を有し、かつRp配置を

50

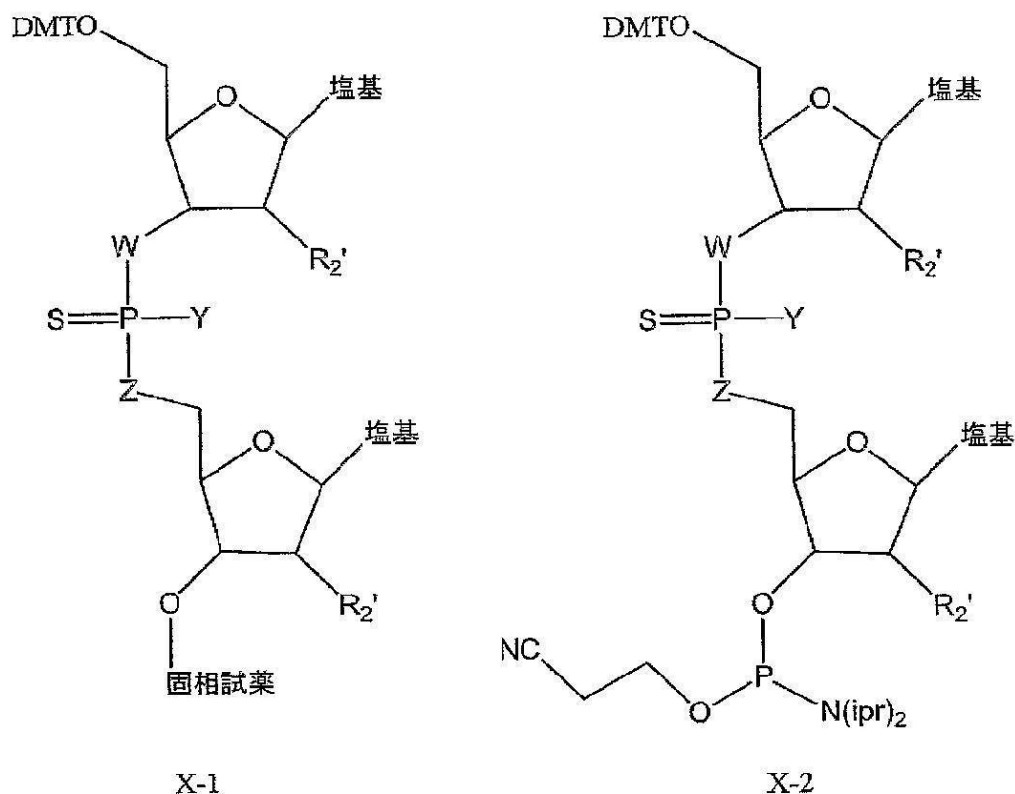
有する立体中心リン原子を実質的に含まないことが可能である。

【0188】

ホスホロチオエートを、二量体（例えば式 X-1 および式 X-2）

【0189】

【化13】



10

20

【0190】

を使用して iRNA 剤に組み込むことが可能である。前者は、鎖の 3' 末端にホスホロチオエートを導入するために使用することができ、後者は鎖の 5' 末端または例えばいずれかの末端から 1、2、3、4、5 または 6 つ目のヌクレオチドの位置に修飾を導入するために使用する。上記の式で、Y は 2-シアノエトキシでよく、W および Z は O でよく、R₂' は、例えば糖に C-3 末端構造を付与しうる置換基、例えば OH、F、OCH₃ でよく、DMT はジメトキシトリチルであり、「塩基」は天然の塩基でも、通常でない塩基でも、または普遍的な塩基でもよい。

30

【0191】

X-1 および X-2 は、キラル試薬を使用して、または基本的に R_p 配置だけを有する（すなわち、実質的に S_p 配置を含まない）もしくは S_p 配置だけを有する（すなわち、実質的に R_p 配置を含まない）立体中心リン原子の集団を有するホスホロチオエート含有二量体を生じさせることが可能な配位性制御基を使用して調製可能である。あるいは、二量体が、約 50% が R_p 配置を有し、原子の約 50% が S_p 配置を有する立体中心リン原子の集団を有するように調整することが可能である。R_p 配置の立体中心リン原子を有する二量体を特定し、例えば酵素的分解および／または通常のカロマトグラフィ法を使用して S_p 配置の立体中心リン構造を有する二量体から分離することが可能である。

40

【0192】

カチオン基

また、修飾は、糖、塩基および／またはリン酸バックボーン部分もしくは修飾リン酸バックボーン部分のリン原子への 1 つまたは複数のカチオン基の結合を含むことも可能である。カチオン基は、天然の塩基、通常でない塩基または普遍的な塩基上で置換可能な任意の原子に結合可能である。好ましい位置は、ハイブリッド形成を妨げない、すなわち塩基

50

対形成に必要な水素結合の相互作用を妨げない位置である。カチオン基は、例えば糖の C 2' 位、または環状もしくは非環状の糖代用物中の類似の位置を介して結合することが可能である。カチオン基は、例えば O-AMINE (AMINE = NH₂ ; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテルシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノまたはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ) 由来のプロトン化アミノ基、例えば O(CH₂)_n AMINE (例えば AMINE = NH₂ ; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテルシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノまたはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノなど) のアミノアルコキシ、アミノ (例えば NH₂ ; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテルシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノまたはアミノ酸)、または NH(CH₂CH₂NH)_n CH₂CH₂-AMINE (例えば AMINE = NH₂ ; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテルシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノまたはジヘテロアリールアミノ) を含むことが可能である。

【0193】

非リン酸結合

また、修飾は鎖の 5' 末端および 3' 末端のうち少なくともいずれかに非リン酸結合を組み込むことが可能である。リン酸基を置換することが可能な非リン酸結合の例には、メチルホスホン酸、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、炭酸、カルボキシメチル、カルバミン酸、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホン酸、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾおよびメチレンオキシメチルイミノを含む。好ましい置換体は、メチルホスホン酸基およびヒドロキシルアミノ基を含む。

【0194】

3' 架橋チオリン酸および 5' 架橋チオリン酸塩; ロックト RNA、2' - 5' 結合、逆向きの結合、α-ヌクレオシド; 結合基; 脱塩基結合; ならびに 5' ホスホン酸および 5' リン酸プロドラッグ

上記の式 X について言及すると、修飾はリン酸バックボーン部分の架橋または結合リン酸酸素 (W および Z) のうちの 1 つの置換体を含むことが可能である。X または Y のうち 1 つだけを変更する状況とは違い、ホスホロジチオエートのリン原子の中心はアキラルであり立体中心リン原子を含む iRNA 剤の形成を妨げる。

【0195】

また、修飾は、1 番目の糖の 2' 位と 2 番目の糖の 5' 位を経るリン酸基または修飾リン酸基を介して 2 つの糖を結合することを含むことが可能である。同様に考えられるのは、1 番目の糖と 2 番目の糖がそれぞれの 3' 位を通してそれぞれ結合する逆向きの結合である。また、修飾 RNA は、C-1' で核酸塩基を欠く「脱塩基性の」糖を含むことも可能である。糖基は、リボースにおける対応する炭素とは反対の立体化学的配置を有する炭素を 1 つまたは複数含むことも可能である。したがって、修飾 iRNA 剤は、糖として、例えばアラビノースを含むヌクレオチドを含むことが可能である。上記修飾のもう 1 つのサブセットでは、天然の塩基、通常でない塩基または普遍的な塩基は α-配置を有することが可能である。また、修飾体は、L-RNA を含むことが可能である。

【0196】

また、修飾は例えば P(O)(O⁻)₂-X-C^{5'}-糖 (X = CH₂、CF₂、CHF など) の 5' -ホスホン酸および例えば P(O)[OCH₂CH₂SC(O)R]₂CH₂C^{5'}-糖などの 5' ホスホン酸プロドラッグを含むことが可能である。後者の場合、プロドラッグ基は、最初にカルボキシエステラーゼで始まる作用を介して分解される可能性がある。分子内 S_N2 置換を介した残るエチルチオレート基は、エピスルフィドとして分離され、非誘導体化リン酸基を生じることが可能である。

【0197】

また、修飾は、本明細書の他の場所に記載した結合基を追加することも含むことが可能であり、結合基は結合可能な任意のアミノ基を介して iRNA 剤へ結合されることが好ましい。

【0198】

ヌクレアーゼ耐性の修飾には、末端のみに配置することが可能な修飾といかなる位置でも配置可能な修飾とがある。通常、ハイブリッド形成を抑制することが可能な修飾は、末端領域でのみ使用することが好ましく、対象の配列または遺伝子を標的とする配列の切断部位または切断領域では使用しないことが好ましい。iRNA 剤の 2 つの配列間で十分なハイブリッド形成が維持されるという条件であれば、センス配列のどの位置においても使用することが可能である。一部の実施形態では、オフターゲットのサイレンシングを最小化することが可能なため、対象の配列または遺伝子を標的としない配列の切断位置または切断領域に NRM を配することが望ましい。

10

【0199】

さらに、本明細書に記載の iRNA 剤は、iRNA 剤の他方の配列と二本鎖構造を形成しない突出部を有することが可能である。これは突出部ではあるが、それ自体と、または iRNA 剤のもう一方の配列以外の別の核酸と、ハイブリッド形成する。

【0200】

ほとんどの場合、ヌクレアーゼ耐性促進修飾は、その配列が対象の配列を標的にするか（多くの場合、アンチセンス配列と呼ばれる）、対象の配列を標的にしないか（多くの場合、センス配列と呼ばれる）により配置が異なる。配列が対象の配列を標的にするならば、エンドヌクレアーゼによる切断を妨害または阻害する修飾は、RISC の仲介による切断を受ける領域、例えば切断部位または切断領域に挿入すべきではない。（エルバッシュら [Elbashir et al.], 2001 年, Genes and Dev. 15:188 [参照により本願に援用] に記載されるように、標的の切断は、およそ 20 もしくは 21 nt のガイド RNA のほぼ中央またはガイド配列に相補的な最初のヌクレオチドの 10 もしくは 11 ヌクレオチド上流で起きる。本明細書では、切断部位とは、標的上または標的とハイブリッド形成する iRNA 剤の鎖上の、切断部位の両側のヌクレオチドを指す。切断領域は、切断部位のヌクレオチドとその両方向の 1、2 または 3 ヌクレオチドを意味する）。

20

【0201】

そのような修飾は、対象の配列を標的とする配列または標的としない配列の末端領域、例えば末端、または末端の 2、3、4 もしくは 5 位の位置へ導入することが可能である。

30

iRNA 剤は以下から選択した第 1 鎖および第 2 鎖を有することが可能である。

【0202】

配列を標的とせず、かつ 3' 末端から 1、2、3、4、5 もしくは 6 位の位置または 1、2、3、4、5 もしくは 6 位以内の位置に NRM 修飾を有する第 1 鎖、

配列を標的とせず、かつ 5' 末端から 1、2、3、4、5 もしくは 6 位の位置または 1、2、3、4、5 もしくは 6 位以内の位置に NRM 修飾を有する第 1 鎖、

配列を標的とせず、かつ 3' 末端から 1、2、3、4、5 もしくは 6 位の位置または 1、2、3、4、5 もしくは 6 位以内の位置に NRM 修飾を有し、さらに 5' 末端から 1、2、3、4、5 もしくは 6 位の位置または 1、2、3、4、5 もしくは 6 位以内の位置に NRM 修飾を有する第 1 鎖、

40

配列を標的とせず、切断部位または切断領域に NRM 修飾を有する第 1 鎖、

配列を標的とせず、切断部位または切断領域に NRM 修飾を有し、かつ、3' 末端から 1、2、3、4、5 もしくは 6 位の位置または 1、2、3、4、5 もしくは 6 位以内の位置の NRM 修飾と、5' 末端から 1、2、3、4、5 もしくは 6 位の位置または 1、2、3、4、5 もしくは 6 位以内の位置の NRM 修飾と、あるいは 3' 末端および 5' 末端の両方から 1、2、3、4、5 もしくは 6 位の位置または 1、2、3、4、5 もしくは 6 位以内の位置の NRM 修飾とのうち 1 つまたは複数有する第 1 鎖と、

配列を標的とし、3' 末端から 1、2、3、4、5 もしくは 6 位の位置または 1、2、

50

3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有する第2鎖、

配列を標的とし、5'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有する第2鎖（5'末端の修飾は、末端よりむしろアンチセンス鎖の5'末端から1、2、3、4、5または6位離れた位置が好ましい）、

配列を標的とし、3'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有し、さらに5'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有する第2鎖、

配列を標的とし、好ましくは切断部位または切断領域にNRM修飾が存在しない第2鎖 10

、
配列を標的とし、切断部位または切断領域のNRM修飾、ならびに、3'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置のNRM修飾、5'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置のNRM修飾、あるいは3'末端および5'末端の両方から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置のNRM修飾のうち1つまたは複数が存在しない第2鎖（5'末端の修飾は、末端よりむしろアンチセンス鎖の5'末端から1、2、3、4、5または6位離れた位置が好ましい）。

【0203】

20

また、iRNA剤は2つの配列を標的とすることも可能であり、次から選択される第1鎖および第2鎖を有することが可能である。

配列を標的とし、3'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有する第1鎖、

配列を標的とし、5'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有する第1鎖（5'末端の修飾は、末端よりむしろアンチセンス鎖の5'末端から1、2、3、4、5または6位離れた位置が好ましい）、

配列を標的とし、3'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有し、さらに5'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有する第1鎖、 30

配列を標的とし、好ましくは切断部位または切断領域にNRM修飾が存在しない第1鎖、

、
配列を標的とし、切断部位または切断領域のNRM修飾、ならびに、3'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置のNRM修飾、5'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置のNRM修飾、あるいは3'末端および5'末端の両方から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置のNRM修飾のうち1つまたは複数が存在しない第1鎖（5'末端の修飾は、末端よりむしろアンチセンス鎖の5'末端から1、2、3、4、5または6位離れた位置が好ましい）と、 40

配列を標的とし、3'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有する第2鎖、

配列を標的とし、5'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有する第2鎖（5'末端の修飾は、末端よりむしろアンチセンス鎖の5'末端から1、2、3、4、5または6位離れた位置が好ましい）、

配列を標的とし、3'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にNRM修飾を有し、さらに5'末端から1、2、3 50

、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置にN R M修飾を有する第2鎖、

配列を標的とし、好ましくは切断部位または切断領域にN R M修飾が存在しない第2鎖、

配列を標的にし、切断部位または切断領域のN R M修飾、ならびに、3'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置のN R M修飾、5'末端から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置のN R M修飾、あるいは3'末端および5'末端の両方から1、2、3、4、5もしくは6位の位置または1、2、3、4、5もしくは6位以内の位置のN R M修飾のうち1つまたは複数が存在しない第2鎖（5'末端の修飾は、末端よりむしろアンチセンス鎖の5'末端から1、2、3、4、5または6位離れた位置が好ましい）。

10

【0204】

リボース模倣体

R N A、例えばi R N A剤は、リボース模倣体、例えば本願明細書に記載するリボース模倣体、ならびにいずれも本願明細書に援用する、2003年3月13日に出願された同時係属で共同所有の米国仮出願第60/454,962号、および国際出願No. P C T / U S 0 4 / 0 7 0 7 0中に記載されたリボース模倣体などを取り込むことが可能である。

【0205】

20

さらに本発明は、リボース模倣体および本願明細書に記載する他の構成要素を有するi R N A剤を含む。例えば本発明は、本願明細書に記載するi R N A剤、例えばパリンドローム構造のi R N A剤、非標準的な対合を有するi R N A剤、本願明細書に記載する遺伝子、例えば腎臓中で活性がある遺伝子を標的とするi R N A剤、本願明細書に記載する構成様式または構造を有するi R N A剤、本願明細書に記載する両親媒性送達物質と結合したi R N A、本願明細書に記載する薬剤送達モジュールと結合したi R N A、本願明細書に記載するように投与されるi R N A剤、または本願明細書に記載するように製剤化されたi R N A剤であって、リボース模倣体も取り込むi R N A剤を含む。

【0206】

したがって、本発明の1態様は、効率を増大させ、かつ／あるいはi R N A剤にヌクレアーゼ耐性を与えることが可能である、第2ヒドロキシル基を含むi R N A剤を特徴とする。ヌクレアーゼ、例えば細胞ヌクレアーゼは、核酸のホスホジエステル結合を加水分解し、核酸の部分的または完全な分解をもたらすことが可能である。第2ヒドロキシル基は、この修飾を欠くi R N Aと比べて、i R N A剤がヌクレアーゼ分解を受ける傾向を低下させることによって、i R N A剤にヌクレアーゼ耐性を与える。理論によって縛られることは望まないが、i R N A剤上の第2ヒドロキシル基の存在が3'リボースのヒドロキシル基の構造上の模倣体として働くことによって、i R N A剤が分解を受けにくくなると考えられる。

30

【0207】

第2ヒドロキシル基は、2つの他の炭素および水素によって置換された炭素原子と結合している「OH」基を指す。上記のようにヌクレアーゼ耐性を与える第2ヒドロキシル基は、任意の非環式炭素含有基の一部であってもよい。ヒドロキシル基は、任意の環式炭素含有基の一部であってもよく、以下の条件、すなわち（1）ヒドロキシル基と末端リン酸基の間にリボース部分が存在しないこと、または（2）該ヒドロキシル基は塩基と結合した糖部分には存在しないこと、のうち1つまたは複数に見合うことが好ましい。ヒドロキシル基は、i R N A剤の末端リン酸基のリンから、少なくとも2結合（化学結合2個）の位置にある（例えば、少なくとも3結合離れて、少なくとも4結合離れて、少なくとも5結合離れて、少なくとも6結合離れて、少なくとも7結合離れて、少なくとも8結合離れて、少なくとも9結合離れて、少なくとも10結合離れている）。好ましい実施形態では、末端リン酸基のリンと第2ヒドロキシル基の間に5つの介在結合が存在する。

40

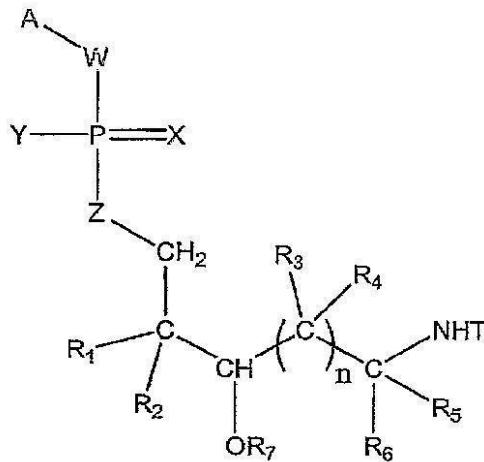
50

【0208】

末端リン酸基のリンと第2ヒドロキシル基の間に5つの介在結合を有する、好ましい iRNA 剤送達モジュールは、以下の構造を有する（以下の式 Y を参照）：

【0209】

【化14】



10

20

(Y)

【0210】

式 Y に言及すると、A は iRNA 剤であり、本明細書に記載する任意の iRNA 剤を含む。iRNA 剤は、リン酸基の「W」と直接的あるいは間接的に（例えばスパーサーまたはリンカーを介して）結合することが可能である。これらのスパーサーまたはリンカーは、例えば $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ （例えば、 $n=3$ または 6 ）、脱塩基性の糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシイミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、もしくはモルホリノ、またはビオチン試薬およびフルオレセイン試薬を含むことが可能である。

30

【0211】

iRNA 剤は、非修飾状態（例えば、W、X、Y、および Z が O である）の末端リン酸基または修飾されている末端リン酸基を有し得る。修飾されているリン酸基では、W および Z は独立に NH、O または S であってよく；X および Y は独立に S、Se、 BH_3^- 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、H、O、 O^- 、アルコキシまたはアミノ（アルキルアミノ、アリールアミノなどを含む）であってよい。W、X および Z が O であり、Y が S であることが好ましい。

40

【0212】

R_1 および R_3 はそれぞれ独立に、水素；または $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであり、 $C_1 \sim C_{100}$ アルキルは任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されており、かつ／あるいは任意選択で N、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されていてもよい。

【0213】

R_2 は水素；または $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであり、 $C_1 \sim C_{100}$ アルキルは任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されており、かつ／あるいは任意選択で N、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されていてもよく；あるいは n が 1 であるとき、 R_2 が R_4 または R_6 と合わさって 5～12 原子の環を形成しても

50

よい。

【0214】

R_4 は水素；または $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであり、 $C_1 \sim C_{100}$ アルキルは任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されており、かつ／あるいは任意選択で N、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されていてもよく；あるいは n が 1 であるとき、 R_4 が R_2 または R_5 と合わさって 5～12 原子の環を形成してもよい。

【0215】

R_5 は水素、または $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであり、 $C_1 \sim C_{100}$ アルキルは任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されており、かつ／あるいは任意選択で N、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されていてもよく；あるいは n が 1 であるとき、 R_5 が R_4 と合わさって 5～12 原子の環を形成してもよい。

【0216】

R_6 は水素、または $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであり、 $C_1 \sim C_{100}$ アルキルは任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されており、かつ／あるいは任意選択で N、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されていてもよく、あるいは n が 1 であるとき、 R_6 が R_2 と合わさって 6～10 原子の環を形成してもよい。

【0217】

R_7 は水素、 $C_1 \sim C_{100}$ アルキル、または $C(O)(CH_2)_q C(O)NHR_9$ であり； T は水素または官能基であり； n および q はそれぞれ独立に 1～100 であり； R_8 は $C_1 \sim C_{10}$ アルキルまたは $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり；かつ R_9 は水素、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールまたは固形支持体物質である。

【0218】

好ましい実施形態は、以下の iRNA 剤送達モジュールのサブセットの 1 つまたは複数を含むことが可能である。

RNA i 剤送達モジュールの 1 つのサブセットでは、 A は該 RNA 剤の末端 3' または 5' リボース糖の炭素を介して、直接的あるいは間接的に結合することが可能である。

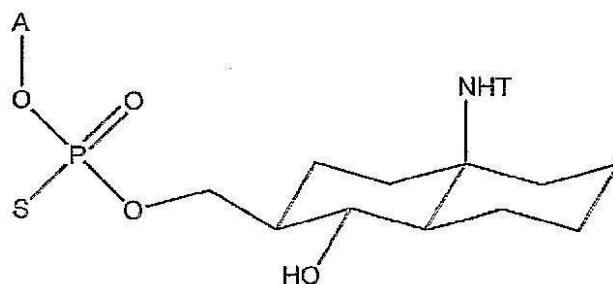
【0219】

RNA i 剤送達モジュールの他のサブセットでは、 X 、 W および Z が O であり、 Y が S である。

RNA i 剤送達モジュールのさらに他のサブセットでは、 n は 1 であり、 R_2 と R_6 が合わさって 6 原子を含む環を形成し、 R_4 と R_5 が合わさって 6 原子を含む環を形成する。環系はトランス-デカリンであることが好ましい。例えば、このサブセットの RNA i 剤送達モジュールは、式 (Y-1) の化合物を含むことが可能である：

【0220】

【化15】



【0221】

官能基は例えば、標的化（ターゲティング）基（例えばステロイドまたは糖質）、レポーター基（例えばフルオロフォア）、または標識（同位元素で標識された部分）であってよい。標的化基は、タンパク質結合物質、内皮細胞標的化基（例えば RGD ペプチドおよ

び模倣体)、癌細胞標的化基(例えば葉酸ビタミンB12、ビオチン)、骨細胞標的化基(例えばビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸)、多価マンノース(例えばマクロファージ試験用)、ラクトース、ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、モノクローナル抗体、糖タンパク質、レクチン、メラノトロピン、またはチロトロピンをさらに含むことが可能である。

【0222】

当業者によって理解され得るように、本明細書中の式の化合物を合成する方法は当業者には明らかであろう。合成した化合物を反応混合物から分離し、カラム・クロマトグラフィ、高速液体クロマトグラフィ、または再結晶化などの方法によってさらに精製することが可能である。さらに、様々な合成工程を他の順序または順番で行って、所望の化合物を与えることも可能である。本明細書に記載した化合物を合成する際に有用な、合成化学変換および保護基に関する方法(保護および脱保護)は当分野で知られており、例えばアール ラロック(R. Larock)、「Comprehensive Organic Transformations」、VCH Publishers(1989);ティードブリュー グリーン(T. W. Greene)およびピー エム ジー ワッツ(P. G. M. Wuts)、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第2版、John Wiley and Sons(1991);エル ファイザー(L. Fieser)およびエル ファイザー(M. Fieser)、「Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis」、John Wiley and Sons(1994);およびエル パクエッテ(L. Paquette)、ed.、「Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis」、John Wiley and Sons(1995)、ならびにその後続版に記載されたものなどを含む。

【0223】

リボース置換モノマーサブユニット

iRNA剤の1つまたは複数の特性を最適化することが可能ないくつかの方法で、iRNA剤を修飾することが可能である。RNA物質、例えばiRNA剤はリボース置換モノマーサブユニット(RRMS)、例えば本明細書中に記載されたRRMSならびに本願明細書に援用する2003年8月8日出願された米国仮出願第60/493,986号;本願明細書に援用する2003年8月11日出願された米国仮出願第60/494,597号;本願明細書に援用する2003年9月26日出願された米国仮出願第60/506,341号;本願明細書に援用する2003年11月7日出願された米国仮出願第60/158,453号;および本願明細書に援用する2004年3月8日出願された国際出願No. PCT/US04/07070のうち1つまたは複数中に記載されたRRMSなどを含むことが可能である。

【0224】

さらに本発明は、RRMSおよび本願明細書に記載する他の構成要素を有するiRNA剤を含む。例えば本発明は、本願明細書に記載のiRNA剤、例えばパリンドローム構造のiRNA剤、非標準的な対合を有するiRNA剤、本願明細書に記載の遺伝子、例えば腎臓中で活性がある遺伝子を標的とするiRNA剤、本願明細書に記載の構成様式または構造を有するiRNA剤、本願明細書に記載の両親媒性送達物質と結合したiRNA、本願明細書に記載の薬剤送達モジュールと結合したiRNA、本願明細書に記載のように投与されるiRNA剤、または本願明細書に記載のように製剤化されるiRNA剤であって、RRMSも取り込むiRNA剤、を含む。

【0225】

iRNA剤の1つまたは複数のリボスクレオチド・サブユニットのリボース糖は、他の構成部分、例えば非糖質の(好ましくは環式の)担体で置換することが可能である。サブユニットのリボース糖がこのように置換されているリボスクレオチド・サブユニットを、本願明細書ではリボース置換修飾サブユニット(RRMS)と呼ぶ。環式担体は炭素環系

(すなわち、すべての環原子が炭素原子)であってもよいし、あるいはヘテロ環系(すなわち、1つまたは複数の環原子がヘテロ原子、例えば窒素、酸素、イオウ)であってもよい。環式担体は単環系であってよく、あるいは2つ以上の環、例えば縮合環を含むことも可能である。環式担体は完全に飽和な環系であってよく、あるいはそれは1つまたは複数の二重結合を含むことも可能である。

【0226】

担体はさらに、(i)少なくとも2つの「バックボーン結合点」および(ii)少なくとも1つの「連結部結合点」を含む。本願明細書で使用する「バックボーン結合点」は、官能基、例えばヒドロキシル基、または一般的に、バックボーン(例えばリボ核酸のリン酸バックボーンまたはイオウを含むなどの修飾リン酸バックボーン)への担体の取り込み10に利用可能かつ好適な結合を指す。本願明細書で使用する「連結部結合点」は、環式担体の構成環原子、例えば炭素原子またはヘテロ原子(バックボーン結合点を提供する原子とは異なるもの)であって、選択した構成部分と結合する原子を指す。選択した構成部分は、例えばリガンド(例えば標的化部分または送達成分)、またはiRNA剤の物理的性質(例えば親油性)を変える構成部分であってよい。場合によっては、選択した成分は、介在する連結部によって環式担体と結合する。したがって選択した成分は、官能基(例えばアミノ基)を含むか、または一般的に、他の化学的実体(例えば該構成環に対するリガンド)の取り込みまたは連結に適した結合を与えることになる。

【0227】

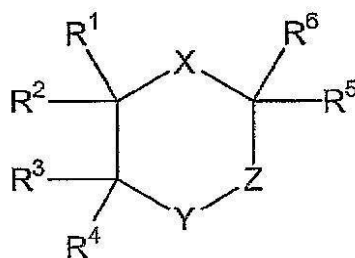
本願明細書に記載する1つまたは複数のRRMSを、iRNA剤(例えばiRNA剤)中20へ取り込むことによって、特に適切な実体と連結された場合、1つまたは複数の新しい性質を該iRNA剤に与え、かつ/あるいは該iRNA分子の1つまたは複数の既存の性質を変化させ、高め、あるいは調節することが可能である。例えば、親油性またはヌクレアーゼ耐性のうち1つまたは複数を変化させることが可能である。本願明細書に記載する1つまたは複数のRRMSをiRNA剤中へ取り込むことによって、特にRRMSが適切な実体と連結された場合、標的mRNAに対するiRNA剤の結合親和性を調節する(例えば増大させる)ことが可能であり、iRNA剤の二重らせん形の形状を変化させることが可能であり、分布を変化させることや、iRNA剤を身体の特定期間部分に向けることが可能であり、あるいは(例えばRISC形成時および鎖の分離時の)核酸結合タンパク質との相互作用を改変することが可能である。30

【0228】

したがって、1態様では、本発明は、好ましくは第1鎖および第2鎖を含むiRNA剤であって、式(R-1)を有する少なくとも1つのサブユニットが前記鎖のうち少なくとも1つの中に取り込まれているiRNA剤を特徴とする。

【0229】

【化16】



(R-1)

【0230】

式(R-1)を参照すると、XはN(CO)R⁷、NR⁷またはCH₂であり；YはN 50

R^8 、O、S、 CR^9R^{10} であるかまたは存在せず、かつZは $CR^{11}R^{12}$ であるかまたは存在しない。

【0231】

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 、および R^{10} のそれぞれは独立にH、 OR^a 、 OR^b 、 $(CH_2)_nOR^a$ 、または $(CH_2)_nOR^b$ である、ただし、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 、および R^{10} の少なくとも1つは OR^a または OR^b であり、かつ R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 、および R^{10} の少なくとも1つは $(CH_2)_nOR^a$ 、または $(CH_2)_nOR^b$ であり(RRMSが末端に存在するとき、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 、および R^{10} の1つは R^a を含み、かつ1つは R^b を含み；RRMSが内部に存在するとき、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 、および R^{10} のうち2つがそれぞれ R^b を含む)；さらに、 OR^a は $(CH_2)_nOR^b$ とともにのみ存在し、 $(CH_2)_nOR^a$ は OR^b とともにのみ存在することが好ましいものとする。

10

【0232】

R^5 、 R^6 、 R^{11} 、および R^{12} のそれぞれは独立にH、任意選択で1～3個の R^{13} で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、または $C(O)NHR^7$ であり；あるいは、 R^5 および R^{11} が一体となって、任意選択で R^{14} により置換された $C_3 \sim C_8$ シクロアルキルをなす。

【0233】

R^7 は NR^cR^d で置換された $C_1 \sim C_{20}$ アルキルであり； R^8 は $C_1 \sim C_6$ アルキルであり； R^{13} はヒドロキシ、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ、またはハロであり；かつ R^{14} は NR^cR^7 である。

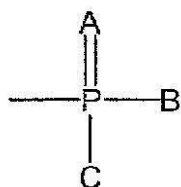
20

【0234】

R^a は

【0235】

【化17】



30

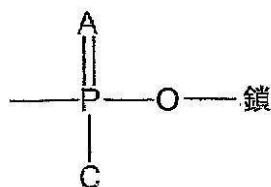
【0236】

であり；かつ

R^b は

【0237】

【化18】



40

【0238】

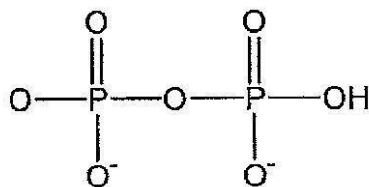
である。

AとCのそれぞれは独立にOまたはSである。

BはOH、 O^- 、または

【0239】

【化 19】



【0240】

である。

10

R^c はHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり； R^d はHまたはリガンドであり； n は1～4である。

【0241】

好ましい実施形態では、リボースはピロリン骨格で置換され、かつXは $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、Yは CR^9R^{10} であり、かつZは存在しない。

他の好ましい実施形態では、リボースはピペリジン骨格で置換され、かつXは $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、Yは CR^9R^{10} であり、かつZは $CR^{11}R^{12}$ である。

【0242】

他の好ましい実施形態では、リボースはピペラジン骨格で置換され、かつXは $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、Yは NR^8 であり、かつZは $CR^{11}R^{12}$ である。

20

他の好ましい実施形態では、リボースはモルホリノ骨格で置換され、かつXは $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、YはOであり、かつZは $CR^{11}R^{12}$ である。

【0243】

他の好ましい実施形態では、リボースはデカリン骨格で置換され、かつXは CH_2 であり；Yは CR^9R^{10} であり；かつZは $CR^{11}R^{12}$ であり；かつ R^5 および R^{11} は一体となって C^6 シクロアルキルをなす。

【0244】

他の好ましい実施形態では、リボースはデカリン／インダン骨格で置換され、かつXは CH_2 であり；Yは CR^9R^{10} であり；かつZは $CR^{11}R^{12}$ であり；かつ R^5 および R^{11} は一体となって C^5 シクロアルキルをなす。

30

【0245】

他の好ましい実施形態では、リボースはヒドロキシプロリン骨格で置換される。

本願明細書に記載するRRMSは、本願明細書に記載する任意の二本鎖RNA様分子、例えばiRNA剤に取り込ませることが可能である。iRNA剤は、ハイブリダイズしたセンス鎖とアンチセンス鎖とからなる二本鎖を含むことが可能であり、このときアンチセンス鎖および／またはセンス鎖は、本願明細書に記載する1つまたは複数のRRMSを含むことが可能である。RRMSは、二本鎖iRNA剤の一方または両方の鎖の中の1つまたは複数の個所に導入することが可能である。RRMSは、センス鎖の3'端または5'端またはその近く（1、2、または3位以内）に配置されてもよいし、あるいはアンチセンス鎖の3'端またはその近く（2または3位以内）に配置されてもよい。いくつかの実施形態では、RRMSはアンチセンス鎖の5'端またはその近く（1、2、または3位以内）にはないことが好ましい。RRMSは内部に存在してもよく、アンチセンスが標的と結合するのに重要ではない領域中に位置することが好ましいであろう。

40

【0246】

1実施形態では、iRNA剤は、アンチセンス鎖の3'端（または3'端から1、2、もしくは3位以内）にRRMSを有することが可能である。1実施形態では、iRNA剤は、アンチセンス鎖の3'端（または3'端から1、2、もしくは3位以内）およびセンス鎖の3'端（または3'端から1、2、もしくは3位以内）に、RRMSを有することが可能である。1実施形態では、iRNA剤は、アンチセンス鎖の3'端（または3'端から1、2、または3位以内）にRRMSを、およびセンス鎖の5'端にRRMSを有す

50

ることが可能であり、この場合両方のリガンドが iRNA 剤の同じ端に位置する。

【0247】

いくつかの実施形態では、2つのリガンドが連結され、好ましくは、それぞれの鎖上のリガンドは疎水性の構成部分である。理論によって縛られることは望まないが、疎水性リガンドが対になることにより、分子間のファンデルワールス相互作用によって、iRNA 剤を安定化させることが可能であると考えられる。

【0248】

1 実施形態では、iRNA 剤は、アンチセンス鎖の 3' 端（または 3' 端から 1、2、または 3 位以内）に RRMS を、かつセンス鎖の 5' 端に RRMS を有することが可能であり、この場合両方の RRMS が、各 RRMS とリガンド上の別々の位置との結合によって、同じリガンド（例えばコール酸）を共有することが可能である。2つの隣接する RRMS 間で共有されるリガンドを、本願明細書では「ヘアピン・リガンド」と呼ぶ。

【0249】

他の実施形態では、iRNA 剤は、センス鎖の 3' 端に RRMS を、かつセンス鎖の内部位置に RRMS を有することが可能である。iRNA 剤は、センス鎖の内部位置に RRMS を有することが可能であり；あるいはアンチセンス鎖の内部位置に RRMS を有することが可能であり；あるいはセンス鎖の内部位置に RRMS を、かつアンチセンス鎖の内部位置に RRMS を有することも可能である。

【0250】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は第 1 配列および第 2 配列を含み、該配列は同じ鎖上に位置する 2つの配列ではなく 2つの別個の分子であり、例えば生理的条件下、例えばヘリカーゼまたは他の巻き戻し酵素と接触しない生理的条件下でハイブリダイズする（およびそれによって二本鎖領域を形成する）ために互いに十分な相補性を有することが好ましい。

【0251】

ds iRNA 剤が分子の一端または両端に一本鎖領域または非対合領域を含むように、第 1 配列および第 2 配列を選択することが好ましい。したがって、ds iRNA 剤は、好ましくは突出部を含むように対合した第 1 配列および第 2 配列を含み、該突出部は例えば 1つまたは 2つの 5' または 3' 突出部であり、ただし好ましくは 2～3ヌクレオチドの 3' 突出部である。大部分の実施形態は 3' 突出部を有する。好ましい sRNA 剤は、それぞれの端に 1ヌクレオチド長あるいは好ましくは 2または 3ヌクレオチド長の一本鎖突出部、好ましくは 3' 突出部を有する。これらの突出部は、1本の鎖が他方より長い結果でもよいし、あるいは同じ長さの 2本の鎖がずれた結果でもよい。5' 端はリン酸化されていることが好ましい。

【0252】

好ましい（ただし限定するものではない）RRMS を含む RNA 剤、例えば iRNA 剤を、式 (R-2) として図 4 に表す。担体は、2つの「バックボーン結合点」（ヒドロキシル基）、1つの「連結部結合点」、および介在する連結部によって担体と間接的に結合した 1つのリガンドを含む。RRMS は RNA 分子の 5' または 3' 末端サブユニットであってもよく、すなわち、2つの「W」基の 1つはヒドロキシル基であってよく、もう 1つの「W」基は、2つ以上の非修飾または修飾リボヌクレオチドの鎖であってよい。あるいは RRMS が内部位置を占めてもよく、2つの「W」基がいずれも 1つまたは複数の非修飾または修飾リボヌクレオチドであってよい。2つ以上の RRMS が RNA 分子、例えば iRNA 剤中に存在してよい。

【0253】

式 (R-2) の修飾 RNA 分子は、当分野で知られているオリゴヌクレオチド合成法を使用して得ることが可能である。好ましい実施形態では、式 (I I) の修飾 RNA 分子は、例えばホスホアミダイト法または H-ホスホネート結合法を使用して、1つまたは複数の対応する RRMS モノマー化合物（RRMS モノマー、例えば図 4 中の A、B、および C を参照）を、伸長中のセンス鎖またはアンチセンス鎖に取り込ませることによって調製

10

20

30

40

50

することが可能である。

【0254】

R R M Sモノマーは一般に、担体分子（例えば図4中のAを参照）と結合した2つの異なる官能化ヒドロキシル基（図4のO F G¹ およびO F G²）、および連結部結合点を含む。本願明細書で使用する、用語「官能化ヒドロキシル基」は、ヒドロキシル基のプロトンが他の置換基に置換されていることを意味する。代表的構造BおよびCに示すように、担体上の1つのヒドロキシル基（O F G¹）は、保護基（P G）によって官能化されている。もう1つのヒドロキシル基（O F G²）は、（1）Bのように、液相または固相の合成支持試薬（中実円）でリンカーLを介して直接的または間接的に、あるいは（2）Cのように、リンを含有する構成部分（例えばホスホアミダイト）によって、官能化することが可能である。伸長中のセンス鎖またはアンチセンス鎖中にモノマーを取り込ませるとき、連結部結合点を、水素原子、連結部、または連結部に連結されたリガンドと結合することが可能である（スキーム1のRを参照）。連結部に連結されたリガンドは、伸長中の鎖にモノマーを取り込ませるときにモノマーと結合させることが可能であるが、必ずしもそうする必要はない。いくつかの実施形態では、連結部、リガンドまたは連結部に連結されたリガンドを、「前駆体」R R M Sモノマーを鎖に取り込ませた後に、「前駆体」R R M Sと結合させることが可能である。

【0255】

例えばティー ダブリュー グリーン（T. W. Greene）およびピー エム ジー ワッツ（P. G. M. Wuts）、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第2版、John Wiley and Sons（1991）から、（O F G¹）保護基を所望に応じて選択することが可能である。保護基は、アミダイト合成条件、保存条件、およびオリゴヌクレオチド合成条件下で安定であることが好ましい。ヒドロキシル基、-OHは求核基（すなわちルイス塩基）であり、酸素を介して求電子剤（すなわちルイス酸）と反応する。水素が保護基、例えばトリアルキルメチル基またはトリアルキルシリル基に置換されているヒドロキシル基は、置換反応では求電子剤としてほとんど反応性がない。したがって、保護ヒドロキシル基は、例えばオリゴヌクレオチド合成中に構造Cによって例示される化合物のホモ結合を防ぐ際に有用である。好ましい保護基は、ジメトキシトリチル基である。

【0256】

BのO F G²が、可溶性または不溶性の支持試薬と結合したリンカー、例えば長鎖の有機リンカーを含む場合は、ひとたびO F G¹が脱保護され、求電子基（例えばアミダイト基）を含む他のヌクレオシドまたはモノマーと求核剤として自由に反応できるようになると、溶液相または固相合成技法を使用して、天然および／または修飾リボヌクレオチドの鎖を構築することが可能である。あるいは、天然もしくは修飾リボヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチド鎖を、O F G²のアミダイト基またはH-ホスホネート基を介してモノマーCと結合させることが可能である。この操作の後に、O F G¹を脱ブロック化することが可能であり、回復した求核性ヒドロキシル基は、求電子基を含む他のヌクレオシドまたはモノマーと反応することが可能である（図1を参照）。R'は置換または非置換アルキルまたはアルケニルであってよい。好ましい実施形態では、R'はメチル、アリルまたは2-シアノエチルである。R''はC₁～C₁₀アルキル基であってよく、R''は3個以上の炭素を含む分岐基、例えばイソプロピルであることが好ましい。

【0257】

BのO F G²は、リンカーを用いてヒドロキシルを官能化し、該リンカーが次にリンカーのもう一方の末端に液体または固体相合成支持試薬を含むことも可能である。支持試薬は、本願明細書に記載するモノマーを支持することが可能な任意の支持媒体であってよい。リンカーLを介してモノマーを不溶性支持体と結合させることによって、該支持体が置かれている溶媒中でモノマー（および伸長中の鎖）を可溶化することが可能である。可溶化しているが依然固定されているモノマーは、周囲の溶媒中で試薬と反応することが可能であり；未反応試薬および可溶性副産物は、モノマーまたはモノマー由来の生成物が結合

している固形支持体から、容易に洗浄除去することが可能である。あるいは、モノマーを可溶性支持体成分、例えばポリエチレングリコール（P E G）と結合させることも可能であり、液相合成技法を使用して鎖を構築することが可能である。リンカーおよび支持媒体の選択は、当分野の技術内にある。一般にリンカーは、 $-C(O)(CH_2)_qC(O)-$ 、または $-C(O)(CH_2)_qS-$ であってよく、オキサリル、スクニルまたはチオグリコリルであることが好ましい。標準的な細孔性ガラスの固相合成支持体を、フッ化物に対して不安定な5'シリル保護基とともに使用することは可能ではない。何故なら、ガラスがフッ化物によって分解され、完全長の生成物の量が大幅に減少するからである。フッ化物に対して安定なポリスチレン系支持体、またはP E Gが好ましい。

【0258】

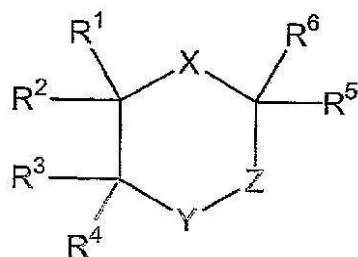
10

好ましい担体は、以下に与える一般式（R-3）を有する。（該構造中、好ましいバックボーン結合点は、 R^1 または R^2 ; R^3 または R^4 ; あるいは Y が CR^9R^{10} である場合は R^9 および R^{10} から選択することが可能である（2つの位置を選択して、2つのバックボーン結合点、例えば R^1 および R^4 、あるいは R^4 および R^9 とする）。好ましい連結部結合点は R^7 ; X が CH_2 であるときは R^5 または R^6 を含む。これらの担体は、鎖中に取り込ませることが可能な実体として以下に記載される。したがって、当然ながら、これらの構造は、1つ（末端位置の場合）あるいは2つ（内部位置の場合）の結合点、例えば R^1 または R^2 ; R^3 または R^4 ; あるいは R^9 および R^{10} （Y が CR^9R^{10} であるとき）が、リン酸、または修飾リン酸、例えばイオウ含有バックボーンと結合する状態も含む。例えば、前述の R 基の1つは $-CH_2-$ であってよく、この場合1つの結合は担体と結合しており、1つの結合はバックボーン原子、例えば結合酸素または中心のリン原子と結合している。

20

【0259】

【化20】



30

(R-3)

【0260】

X は $N(CO)R^7$ 、 NR^7 または CH_2 であり ; Y は NR^8 、O、S、 CR^9R^{10} であり ; かつ Z は $CR^{11}R^{12}$ であるか、あるいは存在しない。

40

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 、および R^{10} のそれぞれは独立に、H、 OR^a 、または $(CH_2)_nOR^b$ である、ただし、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 、および R^{10} のうち少なくとも2つは OR^a および / または $(CH_2)_nOR^b$ である。

【0261】

R^5 、 R^6 、 R^{11} 、および R^{12} のそれぞれは独立に、リガンド、H、任意選択で1~3個の R^{13} で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、または $C(O)NHR^7$ であり ; あるいは、 R^5 および R^{11} が一体となって、任意選択で R^{14} により置換された $C_3 \sim C_8$ シクロアルキルをなす。

【0262】

50

R^7 はH、リガンド、または $NR^c R^d$ で置換された $C_1 \sim C_{20}$ アルキルであり； R^8 はHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり； R^{13} はヒドロキシ、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ、またはハロであり； R^{14} は $NR^c R^7$ であり； R^{15} は任意選択でシアノにより置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、または $C_2 \sim C_6$ アルケニルであり； R^{16} は $C_1 \sim C_{10}$ アルキルであり；かつ R^{17} は液相または固相の支持試薬である。

【0263】

L は $-C(O)(CH_2)_q C(O)-$ 、または $-C(O)(CH_2)_q S-$ であり； R^a は CAr_3 であり； R^b は $P(O)(O^-)H$ 、 $P(OR^{15})N(R^{16})_2$ または $L-R^{17}$ であり； R^c はHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；かつ R^d はHまたはリガンドである。

10

【0264】

それぞれの Ar は独立に、任意選択で $C_1 \sim C_4$ アルコキシによって置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり； n は1～4であり；かつ q は0～4である。

代表的な担体には、例えば X が $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、 Y が $CR^9 R^{10}$ であり、かつ Z が存在しない担体；または X が $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、 Y が $CR^9 R^{10}$ であり、かつ Z が $CR^{11} R^{12}$ である担体；または X が $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、 Y が NR^8 であり、かつ Z が $CR^{11} R^{12}$ である担体；または X が $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、 Y が O であり、かつ Z が $CR^{11} R^{12}$ である担体；または X が CH_2 であり、 Y が $CR^9 R^{10}$ であり、 Z が $CR^{11} R^{12}$ であり、かつ R^5 と R^{11} が一体となって C_6 シクロアルキル（式H、 $z=2$ ）を形成する担体、またはインダン環系、例えば X が CH_2 であり、 Y が $CR^9 R^{10}$ であり、 Z が $CR^{11} R^{12}$ であり、かつ R^5 と R^{11} が一体となって C_5 シクロアルキル（式H、 $z=1$ ）を形成する担体がある。

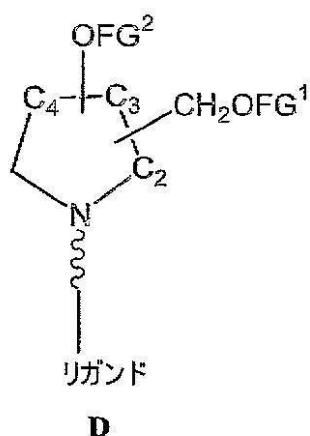
20

【0265】

いくつかの実施形態では、担体は、ピロリン環系または3-ヒドロキシピロリン環系、例えば X が $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、 Y が $CR^9 R^{10}$ であり、かつ Z が存在しないものに基づいてよい（式D）。

【0266】

【化21】



30

【0267】

OFG^1 は5員環中の炭素の1つと結合した第1級炭素、例えば環外アルキレン基、例えばメチレン基と結合することが好ましい（式D中の $-CH_2 OFG^1$ ）。 OFG^2 は、5員環中の炭素の1つと直接結合することが好ましい（式D中の $-OFG^2$ ）。ピロリン系担体に関しては、 $-CH_2 OFG^1$ はC-2と結合し、かつ OFG^2 はC-3と結合することが可能であり；あるいは $-CH_2 OFG^1$ はC-3と結合し、かつ OFG^2 はC-4と結合することが可能である。いくつかの実施形態では、 $CH_2 OFG^1$ および OFG^2 は、前述の炭素の1つとジェミナル位で置換されていてよい。3-ヒドロキシピロリン系担体に関しては、 $-CH_2 OFG^1$ はC-2と結合し、かつ OFG^2 はC-4と結合する

50

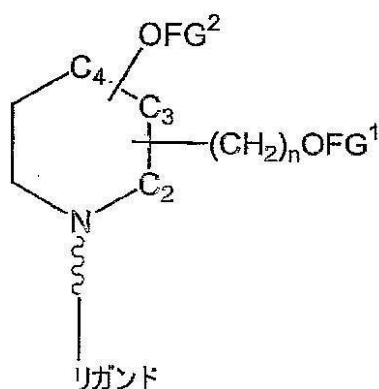
ことが可能である。したがって、ピロリン系および3-ヒドロキシピロリン系モノマーは、結合（例えば炭素-炭素結合）を含むことが可能であり、このとき結合の回転はその個々の結合について制限される（例えば環の存在が原因の制限）。したがって、 CH_2OFG^1 および OFG^2 は、前述のあらゆる対において互いにシスでもトランスでもよい。したがって、すべてのシス/トランス異性体が明白に含まれる。モノマーは1つまたは複数の不斉中心を含むことが可能であり、したがってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一のエナンチオマー、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として存在することも可能である。すべてのこのようなモノマー異性体が明白に含まれる。連結部結合点は窒素であることが好ましい。

【0268】

いくつかの実施形態では、担体はピペリジン環系（式E）、例えばXが $\text{N}(\text{CO})\text{R}^7$ または NR^7 であり、Yが CR^9R^{10} であり、かつZが $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$ であるものに基づいてよい。

【0269】

【化22】



E

【0270】

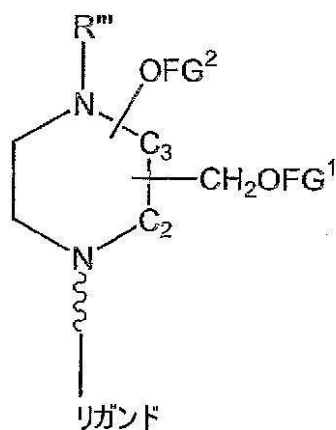
OFG^1 は6員環中の炭素の1つと結合した第1級炭素、例えば環外アルキレン基、例えばメチレン基（ $n=1$ ）またはエチレン基（ $n=2$ ）と結合することが好ましい〔式E中の $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ 〕。 OFG^2 は、6員環中の炭素の1つと直接結合することが好ましい（式E中の $-\text{OFG}^2$ ）。 $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ および OFG^2 は環上でジェミナル位に配置していてもよい、すなわち、2つの基が同じ炭素、例えばC-2、C-3、またはC-4に結合することが可能である。あるいは、 $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ および OFG^2 は環上でビシナル位に配置していてもよい、すなわち、2つの基は環の隣接する炭素原子と結合することが可能であり、例えば、 $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ はC-2と結合し、かつ OFG^2 はC-3と結合することが可能であり； $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ はC-3と結合し、かつ OFG^2 はC-2と結合することが可能であり； $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ はC-3と結合し、かつ OFG^2 はC-4と結合することが可能であり；あるいは $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ はC-4と結合し、かつ OFG^2 はC-3と結合することが可能である。ピペリジン系モノマーは、したがって結合（例えば炭素-炭素結合）を含むことが可能であり、このとき結合の回転はその個々の結合について制限される（例えば環の存在が原因の制限）。したがって、 $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ および OFG^2 は、前述のあらゆる対において互いにシスでもトランスでもよい。したがって、すべてのシス/トランス異性体が明白に含まれる。モノマーは1つまたは複数の不斉中心を含むことが可能であり、したがってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一のエナンチオマー、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として存在することも可能である。すべてのこのようなモノマー異性体が明白に含まれる。連結部結合点は窒素であることが好ましい。

【0271】

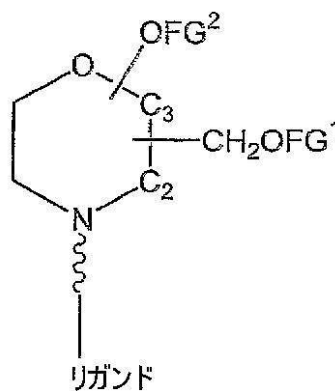
いくつかの実施形態では、担体は、例えばXが $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、Yが NR^8 であり、かつZが $CR^{11}R^{12}$ であるピペラジン環系（式F）、または例えばXが $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、YがOであり、かつZが $CR^{11}R^{12}$ であるモルホリン環系（式G）に基づいていてもよい。

【0272】

【化23】



F



G

10

20

【0273】

OFG¹は6員環中の炭素の1つと結合した第1級炭素、例えば環外アルキレン基、例えばメチレン基と結合することが好ましい（式Fまたは式G中の $-CH_2OFG^1$ ）。OFG²は、6員環中の炭素の1つと直接結合することが好ましい（式Fまたは式G中の $-OFG^2$ ）。FおよびGに関しては、 $-CH_2OFG^1$ はC-2と結合し、かつOFG²はC-3と結合してもよいし；あるいは逆も然りである。いくつかの実施形態では、 CH_2OFG^1 およびOFG²は、前述の炭素の1つとジェミナル位で置換されていてよい。ピペラジン系およびモルホリン系モノマーは、したがって結合（例えば炭素-炭素結合）を含むことが可能であり、このとき結合の回転はその個々の結合について制限される（例えば環の存在が原因の制限）。したがって、 CH_2OFG^1 およびOFG²は、前述のあらゆる対において互いにシスでもトランスでもよい。したがって、すべてのシス/トランス異性体が明白に含まれる。モノマーは1つまたは複数の不斉中心を含むことが可能であり、したがってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一のエナンチオマー、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として存在することも可能である。すべてのこのようなモノマー異性体が明白に含まれる。R'は例えばC₁～C₆アルキル、好ましくはCH₃であってよい。式Fおよび式Gのいずれにおいても、連結部結合点は窒素であることが好ましい。

30

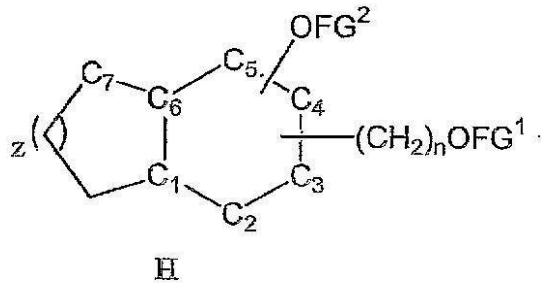
【0274】

いくつかの実施形態では、担体は、例えばXがCH₂であり、Yが CR^9R^{10} であり、Zが $CR^{11}R^{12}$ であり、およびR⁵とR¹¹が一体となってC₆シクロアルキルを形成するデカリン環系（式H、z=2）、または例えばXがCH₂であり、Yが CR^9R^{10} であり、Zが $CR^{11}R^{12}$ であり、およびR⁵とR¹¹が一体となってC₅シクロアルキルを形成するインダン環系（式H、z=1）に基づいていてもよい。

40

【0275】

【化 2 4】



10

【0 2 7 6】

OFG¹ は C-2、C-3、C-4、または C-5 の 1 つと結合した第 1 級炭素、例えば、環外メチレン基 (n=1) またはエチレン基 (n=2) と結合することが好ましい [式 H 中の $-(CH_2)_n OFG^1$]。OFG² は、C-2、C-3、C-4、または C-5 の 1 つと直接結合することが好ましい (式 H 中の $-OFG^2$)。 $-(CH_2)_n OFG^1$ および OFG² は環上でジェミナル位に配置していてもよい、すなわち、2 つの基が同じ炭素、例えば C-2、C-3、C-4、または C-5 と結合していてもよい。あるいは、 $-(CH_2)_n OFG^1$ および OFG² は環上でビシナル位に配置していてもよい、すなわち、2 つの基は環の隣接する炭素原子と結合することが可能であり、例えば、 $-(CH_2)_n OFG^1$ は C-2 と結合し、かつ OFG² は C-3 と結合することが可能であり； $-(CH_2)_n OFG^1$ は C-3 と結合し、かつ OFG² は C-2 と結合することが可能であり； $-(CH_2)_n OFG^1$ は C-3 と結合し、かつ OFG² は C-4 と結合することが可能であり；あるいは $-(CH_2)_n OFG^1$ は C-4 と結合し、かつ OFG² は C-3 と結合することが可能であり； $-(CH_2)_n OFG^1$ は C-4 と結合し、かつ OFG² は C-5 と結合することが可能であり；あるいは $-(CH_2)_n OFG^1$ は C-5 と結合し、かつ OFG² は C-4 と結合することが可能である。デカリン系またはインダン系モノマーは、したがって結合 (例えば炭素-炭素結合) を含むことが可能であり、このとき結合の回転はその個々の結合について制限される (例えば環の存在が原因の制限)。したがって、 $-(CH_2)_n OFG^1$ および OFG² は、前述のあらゆる対において互いにシスでもトランスでもよい。したがって、すべてのシス/トランス異性体が明白に含まれる。モノマーは 1 つまたは複数の不斉中心を含むことが可能であり、したがってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一のエナンチオマー、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として存在することも可能である。すべてのこのようなモノマー異性体が明白に含まれる。好ましい実施形態では、C-1 および C-6 における置換は、互いにトランスである。連結部結合点は C-6 または C-7 であることが好ましい。

20

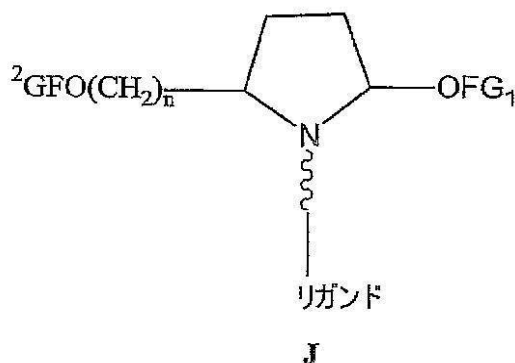
30

【0 2 7 7】

他の担体は、3-ヒドロキシプロリンに基づく担体を含み得る (式 J)。

【0 2 7 8】

【化 2 5】



40

50

【0279】

したがって、 $-(CH_2)_n OFG^1$ および OFG^2 は、互いにシスでもトランスでもありうる。したがって、すべてのシス／トランス異性体が明白に含まれる。モノマーは1つまたは複数の不斉中心を含み、したがってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一のエナンチオマー、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として存在することも可能である。すべてのこのようなモノマー異性体が明白に含まれる。連結部結合点は窒素であることが好ましい。

【0280】

代表的な担体を図5に示す。

いくつかの実施形態では、ある構成部分、例えばリガンドを、介在する連結部の仲介によって、担体に間接的に結合させることが可能である。連結部は担体と連結部結合点 (TAP) において結合し、好ましくは少なくとも1つの窒素原子を有する任意の $C_1 \sim C_{100}$ 炭素含有構成部分 (例えば $C_1 \sim C_{75}$ 、 $C_1 \sim C_{50}$ 、 $C_1 \sim C_{20}$ 、 $C_1 \sim C_{10}$ 、 $C_1 \sim C_6$) を含むことが可能である。好ましい実施形態では、該窒素原子は連結部上の末端アミノ基の一部を形成し、リガンドとの結合点として働くことが可能である。好ましい連結部 (下線部) としては、 $TAP-(CH_2)_n NH_2$ ； $TAP-C(O)(CH_2)_n NH_2$ ；または $TAP-NR''''(CH_2)_n NH_2$ が挙げられるが、ここで n は1～6であり、 R'''' は $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 R^d は水素またはリガンドである。他の実施形態では、窒素が末端オキシアミノ基、例えば $-ONH_2$ 、またはヒドラジノ基、 $-NHNH_2$ の一部を形成することが可能である。連結部は任意選択で例えばヒドロキシ、アルコキシ、ベルハロアルキルで置換されてもよいし、かつ／あるいは任意選択で1つまたは複数の追加のヘテロ原子、例えばN、O、またはSが挿入されてもよい。好ましい連結部に連結されたリガンドには、例えば

$TAP-(CH_2)_n NH$ (リガンド)、
 $TAP-C(O)(CH_2)_n NH$ (リガンド)、または $TAP-NR''''(CH_2)_n NH$ (リガンド)；
 $TAP-(CH_2)_n ONH$ (リガンド)、 $TAP-C(O)(CH_2)_n ONH$ (リガンド)、または
 $TAP-NR''''(CH_2)_n ONH$ (リガンド)； $TAP-(CH_2)_n NHNH_2$ (リガンド)、
 $TAP-C(O)(CH_2)_n NHNH_2$ (リガンド)、または $TAP-NR''''(CH_2)_n NHNH_2$ (リガンド)

が挙げられる。

【0281】

他の実施形態では、連結部は、好ましくは該連結部の末端位置に、求電子基を含むことが可能である。好ましい求電子基には、例えばアルデヒド、ハロゲン化アルキル、メシレート、トシレート、ノシレート、またはプロシレート、あるいは活性化カルボン酸エステル、例えば NHS エステル、またはペンタフルオロフェニルエステルがある。好ましい連結部 (下線部) には、 $TAP-(CH_2)_n CHO$ ； $TAP-C(O)(CH_2)_n CHO$ ；または $TAP-NR''''(CH_2)_n CHO$ (n は1～6であり、 R'''' は $C_1 \sim C_6$ アルキルである)；
あるいは $TAP-(CH_2)_n C(O)ONHS$ ； $TAP-C(O)(CH_2)_n C(O)ONHS$ ；または $TAP-NR''''(CH_2)_n C(O)ONHS$ (n は1～6であり、 R'''' は $C_1 \sim C_6$ アルキルである)；
 $TAP-(CH_2)_n C(O)OC_6F_5$ ； $TAP-C(O)(CH_2)_n C(O)OC_6F_5$ ；または $TAP-NR''''(CH_2)_n C(O)OC_6F_5$ (n は1～6であり、 R'''' は $C_1 \sim C_6$ アルキルである)；
あるいは $-(CH_2)_n CH_2 LG$ ； $TAP-C(O)(CH_2)_n CH_2 LG$ ；または $TAP-NR''''(CH_2)_n CH_2 LG$ (n は1～6であり、 R'''' は $C_1 \sim C_6$ アルキルである) (LG は脱離基、例えばハロゲン化物、メシレート、トシレート、

ノシレート、プロシレートであってよい)が挙げられる。リガンドの求核基、例えばチオールまたはアミノ基と、連結部上の求電子基とのカップリングによって、連結を行うことが可能である。

【0282】

連結されるもの

広く様々なもの(実体)を、iRNA剤に、例えばRRMSの担体に連結させることが可能である。以下にRRMSと関連付けて実施例を記載するが、該RRMSは単に好ましいものであるにすぎず、実体は他の地点においてiRNA剤に結合させることも可能である。好ましい実体は、腎臓を標的とする実体、および腎臓以外の組織を特異的に標的とする実体である。

10

【0283】

好ましい構成部分はリガンドであり、リガンドはRRMSの担体と、好ましくは共有結合により、直接的あるいは介在する連結部を介して間接的に結合される。好ましい実施形態では、リガンドは介在する連結部を介して担体に結合される。前に論じたように、リガンドまたは連結部に連結されたリガンドは、RRMSモノマーが伸長する鎖に取り込まれるときにRRMSモノマー上に存在していてもよい。いくつかの実施形態では、「前駆体」RRMSモノマーを伸長する鎖に取り込ませた後に、「前駆体」RRMSにリガンドを取り込ませることが可能である。例を挙げれば、例えばアミノ末端を有する連結部を備えた(すなわちリガンドが結合していない)RRMSモノマー、例えば $\text{TAPE}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ を、伸長するセンスまたはアンチセンス鎖に取り込ませることが可能である。後の操作において、すなわち前駆体モノマーを鎖に取り込ませた後、続いて、求電子基(例えばペンタフルオロフェニルエステルまたはアルデヒド基)を有するリガンドを、リガンドの求電子基と前駆体RRMSの連結部の末端求核基とのカップリングによって、前駆体RRMSと結合させることが可能である。

20

【0284】

好ましい実施形態では、リガンドは、同リガンドが取り込まれたiRNA剤の分布、標的指向性または寿命を変化させる。好ましい実施形態では、リガンドは、例えばこのようなリガンドが存在しない分子種と比較して、選択された標的、例えば分子、細胞または細胞種、コンパートメント、例えば細胞または器官のコンパートメント、組織、器官または身体の領域に関する高い親和性をもたらす。好ましいリガンドは、二本鎖の核酸における二本鎖の対合には関与しないであろう。

30

【0285】

好ましいリガンドは、輸送、ハイブリダイゼーション、および特異性を向上させることが可能であり、生成する天然または修飾オリゴリボヌクレオチド、または本願明細書に記載するモノマーおよび/または天然もしくは修飾リボヌクレオチドの任意の組合せを含んでなるポリマー分子の、ヌクレアーゼ耐性を向上させることも可能である。

【0286】

一般的なリガンドとしては、例えば取り込みを増大させるための治療用調節物質;例えば分布を調べるための診断用化合物またはレポーター基;架橋剤;およびヌクレアーゼ耐性を与える構成部分が挙げられる。一般例には、脂質、ステロイド、ビタミン、糖、タンパク質、ペプチド、ポリアミン、およびペプチド模倣体がある。

40

【0287】

リガンドには、天然に存在する物質、例えばタンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、低密度リポタンパク質(LDL)、またはグロブリン);糖質(例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリンまたはヒアルロン酸);または脂質などが挙げられる。リガンドは、合成ポリマー、例えば合成ポリアミノ酸などの、組換え分子または合成分子であってもよい。ポリアミノ酸の例には、ポリリシン(PLL)、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ(L-ラクチド-コグリコリド)コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコ

50

ポリマー（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-アクリル酸エチル）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、またはポリホスファジンがある。ポリアミンの例には、ポリエチレンジイミン、ポリリシン（PLL）、スベルミン、スベルミジン、ポリアミン、プソイドペプチドポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩、またはαらせん状ペプチドがある。

【0288】

リガンドは、標的化基、例えば細胞または組織を標的とする物質、例えばレクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質、例えば腎臓細胞などの特定の細胞種と結合する抗体も含み得る。標的化基は、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質A、ムチン、糖質、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビオチン、あるいはRGDペプチドまたはRGDペプチド模倣体であってよい。

10

【0289】

リガンドの他の例には、染料、インターカレート剤（例えばアクリジン）、架橋剤（例えばソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えばEDTA）、親油性分子、例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メンソール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コール酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）、およびペプチド複合体（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、PEG（例えばPEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射標識マーカー、酵素、ハプテン（例えばビオチン）、輸送/吸収促進物質（例えばアスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール複合体、テトラアザマクロ環のEu3+複合体）、ジニトロフェニル、HRP、またはAPがある。

20

30

【0290】

リガンドはタンパク質（例えば糖タンパク質）またはペプチド、例えば共通のリガンドに関する特異的親和性を有する分子、または抗体（例えば癌細胞、内皮細胞、または骨細胞などの特定の細胞種と結合する抗体）であってよい。リガンドは、ホルモンおよびホルモン受容体も含み得る。リガンドは、脂質、レクチン、糖質、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノース、または多価フコースなどの、非ペプチドの分子種も含み得る。リガンドは、例えばリボ多糖、p38MAPキナーゼの活性化剤、またはNF-κBの活性化剤であってよい。

40

【0291】

リガンドは、例えば細胞の細胞骨格を破壊することによって、例えば細胞の微小管、マイクロフィラメント、および/または中間径フィラメントを破壊することによって、細胞内へのiRNA剤の取り込みを増大させることが可能な物質、例えば薬物であってよい。薬物は例えば、タキソン（taxon）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノライド（japlakinolide）、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホライドA、インダノシン（indanocine）、

50

またはミオセルビン (myoservin) であってよい。

【0292】

リガンドは、例えば炎症応答を活性化させることによって、細胞内への iRNA 剤の取り込みを増大させることが可能である。このような効果を有すると思われる例示的なリガンドには、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターロイキン-1 β 、または γ インターフェロンがある。

【0293】

1 態様では、リガンドは脂質または脂質系分子である。このような脂質または脂質系分子は、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン (HSA) と結合することが好ましい。HSA 結合リガンドは、身体の標的組織、例えば非腎臓標的組織に、本発明の複合体を分布させることが可能である。例えば標的組織は、肝臓の実質細胞を含めた肝臓であってよい。HSA と結合することが可能である他の分子も、リガンドとして使用することが可能である。例えば、ネプロキシンまたはアスピリンを使用することが可能である。脂質または脂質系リガンドは、(a) 複合体の分解に対する耐性を増大させること、(b) 標的細胞または細胞膜への標的指向性または輸送を増大させることが可能であり、かつ／あるいは (c) 血清タンパク質、例えば HSA との結合を調節するために使用することが可能である。

10

【0294】

脂質系リガンドを使用して、本発明の複合体と標的組織の結合を調節する、例えば制御することが可能である。例えば、HSA とさらに強く結合する脂質または脂質系リガンドは、腎臓に対する標的指向性が低くなると思われ、したがって身体から除去されにくくなると思われる。HSA とさらに弱く結合する脂質または脂質系リガンドを使用して、本発明の複合体を腎臓に向けることが可能である。

20

【0295】

好ましい実施形態では、脂質系リガンドは HSA と結合する。リガンドは、本発明の複合体が好ましくは非腎臓組織に分布するような十分な親和性で、HSA と結合することが好ましい。しかしながら、その親和性は、HSA とリガンドとの結合が不可逆的であるほど強くはないことが好ましい。

【0296】

他の好ましい実施形態では、本発明の複合体が好ましくは腎臓に分布するように、脂質系リガンドが HSA と弱く結合するか、あるいはまったく結合しない。腎臓細胞を標的とする他の構成部分を、脂質系リガンドの代わりに、あるいは脂質系リガンドに加えて、使用することも可能である。

30

【0297】

他の態様では、リガンドは、標的細胞、例えば増殖細胞によって取り込まれる構成部分、例えばビタミンである。これらのリガンドは、望ましくない細胞増殖、例えば悪性または非悪性型の細胞増殖、例えば癌細胞の増殖によって特徴付けられる疾患を治療するのに非常に有用である。例示的なビタミンには、ビタミン A、E、および K がある。他の例示的なビタミンには、B ビタミン、例えば葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサール、あるいは癌細胞によって取り込まれるその他のビタミンまたは栄養素がある。HSA および低密度リポタンパク質 (LDL) も含まれる。

40

【0298】

他の態様では、リガンドは、細胞透過性物質、好ましくはらせん状の細胞透過性物質である。該物質は両親媒性であることが好ましい。例示的な物質は、tat またはアンテナペディアなどのペプチドである。該物質がペプチドである場合、ペプチジル模倣体、インバートマー、非ペプチド結合または偽ペプチド結合、および D-アミノ酸の使用を含めて、該ペプチドを改変することが可能である。らせん状物質は、親油性および撥油性の相を好ましくは有する、 α らせん状物質であることが好ましい。

【0299】

リガンドは、ペプチドまたはペプチド模倣体であってよい。ペプチド模倣体 (本願明細

50

書ではオリゴペプチド模倣体とも呼ぶ)は、天然のペプチドと類似した一定の3次元構造にフォールディング可能な分子である。ペプチドおよびペプチド模倣体と、iRNA剤が結合することによって、細胞の認識および吸収を高めることなどにより、iRNAの薬物動態学的分布に影響を与えることが可能である。ペプチドまたはペプチド模倣体の構成部分は、約5～50アミノ酸長、例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50アミノ酸長であってよい(例えば表4を参照)。

【0300】

【表4】

表4. 細胞透過性ペプチドの例

細胞透過性 ペプチド	アミノ酸配列	参考文献
ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK (配列番号7)	Derossi <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Tat断片 (48-60)	GRKKRRQRRPPQC (配列番号8)	Vives <i>et al.</i> , J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
シグナル配列系 ペプチド	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (配列番号9)	Chaloin <i>et al.</i> , Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIKQAHAAHSK (配列番号10)	Elmqvist <i>et al.</i> , Exp. Cell Res., 269:237, 2001
トランスポータン	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL (配列番号11)	Pooga <i>et al.</i> , FASEB J., 12:67, 1998

【0301】

10

20

30

40

両親媒性 モデルペプチド	KLALKLALKALKAALKLA (配列番号12)	Oehlke <i>et al.</i> , Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR (配列番号13)	Mitchell <i>et al.</i> , J. Pept. Res., 56:318, 2000
細菌細胞壁 透過性	KFFKFFKFFK (配列番号14)	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN LVPRTES (配列番号15)	
セクロピンP1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGLAIAIQGGP R (配列番号16)	
α -ディフェンシン	ACYCRIPACIAGERRYGTCTYQGRLWAF C (配列番号17)	
b-ディフェンシン	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYR GKAKCCK (配列番号18)	
バクテニン	RKCRIVVIRVCR (配列番号19)	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPP RFPPRFPGKR-NH ₂ (配列番号20)	
インドリシテイン	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂ (配列番号21)	

10

20

30

40

50

【0302】

ペプチドまたはペプチド模倣体は、例えば細胞透過性ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、または疎水性ペプチド（例えば、主に Tyr、Trp または Phe から構成される）であってよい。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、制約型 (constrained) ペプチドまたは架橋ペプチドであってよい。ペプチド部分は、L-ペプチドでもD-ペプチドでもよい。他の代替例では、ペプチド部分は、疎水性の膜移行配列 (MTS) を含むことが可能である。例示的な疎水性 MTS 含有ペプチドは、アミノ酸

配列 A A V A L L P A V L L A L L A P (配列番号 22) を有する R F G F である。疎水性 M T S を含む R F G F 類似体 (例えば、アミノ酸配列 A A L L P V L L A A P (配列番号 23)) も、標的化部分であり得る。ペプチド部分は、ペプチド、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質を含めた大きな極性分子を、細胞膜を横切って運ぶことができる「送達」ペプチドであってよい。例えば、H I V T a t タンパク質由来の配列 (G R K K R R Q R R R P P Q (配列番号 24))、およびショウジョウバエのアンテナペディアル・タンパク質由来の配列 (R Q I K I W F Q N R R M K W K K (配列番号 25)) は、送達ペプチドとして機能しうることが見出されている。ペプチドまたはペプチド模倣体は、ファージ・ディスプレイ・ライブラリー、または 1 ビーズ 1 化合物 (O B O C) コンビナトリアル・ライブラリーから同定されたペプチドなど、DNA のランダムな配列によってコードされてもよい (ラムら (L a m e t a l .)、N a t u r e、354:82~84、1991)。取り込まれたモノマーユニットを介して i R N A 剤と連結したペプチドまたはペプチド模倣体は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (R G D) ペプチド、または R G D 模倣体などの、細胞標的化ペプチドであることが好ましい。ペプチド部分の長さは、約 5 アミノ酸~約 40 アミノ酸の範囲であってよい。ペプチド部分は、安定性を増大させるため、あるいは立体構造上の特性を得るためなどの、構造的改変を有し得る。以下に記載する任意の構造的改変を、使用することが可能である。

【0303】

R G D ペプチド部分を使用して、内皮腫瘍細胞または乳癌腫瘍細胞などの、腫瘍細胞を標的とすることが可能である (ジッツマンら (Z i t z m a n n e t a l .)、C a n c e r R e s .、62:5139~43、2002)。R G D ペプチドは、肺、腎臓、脾臓、または肝臓を含めた様々な他の組織の腫瘍を標的とした i R N A 剤の指向性を促進し得る (アオキら (A o k i e t a l .)、C a n c e r G e n e T h e r a p y 8:783~787、2001)。R G D ペプチドは、腎臓に対する i R N A 剤の標的指向性を促進することが好ましい。R G D ペプチドは直鎖状でも環状でもよく、これらを修飾、例えばグリコシル化またはメチル化して、特定の組織を標的とした指向性を促進することが可能である。例えば、グリコシル化 R G D ペプチドは、 $\alpha_v \beta_3$ を発現する腫瘍細胞に i R N A 剤を送達することが可能である (ハウブナーら (H a u b n e r e t a l .)、J o u r . N u c l . M e d .、42:326~336、2001)。

【0304】

増殖する細胞中に豊富なマーカーを標的とするペプチドを、使用することが可能である。例えば、R G D を含有するペプチドおよびペプチド模倣体は、がん細胞、特に $\alpha_v \beta_3$ インテグリンを提示する細胞を標的とすることが可能である。したがって、R G D ペプチド、R G D を含む環状ペプチド、D-アミノ酸を含む R G D ペプチド、および合成 R G D 模倣体を使用することが可能であると思われる。R G D 以外に、 $\alpha_v \beta_3$ インテグリン・リガンドを標的とする他の構成部分を使用することが可能である。一般に、このようなりガンドを使用して、増殖している細胞および血管新生を制御することが可能である。この型の好ましい複合体には、P E C A M-1、V E G F、または他のがん遺伝子、例えば本願明細書に記載するがん遺伝子を標的とする i R N A 剤がある。

【0305】

「細胞透過性ペプチド」は、細胞、例えば細菌または真菌細胞などの微生物細胞、またはヒト細胞などの哺乳動物細胞を透過することが可能である。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば α -らせん状直鎖ペプチド (例えば L L-37 または セロピン P1)、ジスルフィド結合含有ペプチド (例えば、 α -ディフェンシン、 β -ディフェンシンまたは バクテネシン)、またはわずか 1 種または 2 種の アミノ酸を主に含むペプチド (例えば P R-39 または インドリシディン) であってよい。細胞透過性ペプチドは、核局在化シグナル (N L S) をも含み得る。例えば、細胞透過性ペプチドは、H I V-1 g p 41 の融合ペプチドドメインと S V 40 大型 T 抗原の N L S とに由来する M P G などの、2 部分の両親媒性ペプチドであってよい (シメオニら (S i m e o n i e t a l .)、N u c l . A c i d s R e s . 31:2717~2724、2003)。

【0306】

1 実施形態では、R R M Sに連結される標的化ペプチドは、両親媒性の α らせん状ペプチドであってよい。例示的な両親媒性の α らせん状ペプチドには、セクロピン、ライコトキシン、パラダキシン、プフォリン、C P F、ボンビニン様ペプチド(B L P)、カテリシディン、セラトトキシン、S. c l a v aペプチド、メクラウナギ腸管の抗菌性ペプチド(H F I A P)、マガイニン、プレビニン-2、ダーマセプチン、メリチン、プレウロシディン、H₂ Aペプチド、アフリカツメガエルのペプチド、エスカレンチン-1、およびカエリンがあるが、これらだけには限られない。らせんの安定性を完全に保つために、いくつかの要因を考慮することが好ましいであろう。例えば、らせん安定化残基を最大数使用し(例えばl e u、a l a、またはl y s)、らせん不安定化残基を最小数とする(例えばプロリン、または環状モノマーユニット)。キャップ構造の残基も考えられる(例えば、G l yはNキャップ構造残基の例であり、かつ/あるいはC末端アミド化を使用して、らせんを安定化させるための特別なH結合を与えることが可能である)。i ± 3、あるいはi ± 4位離れた、正反対の電荷を有する残基間の塩架橋の形成によって、安定性をもたらす可能性がある。例えば、リシン、アルギニン、ホモアルギニン、オルニチンまたはヒスチジンなどのカチオン性残基は、アニオン性の残基、グルタミン酸またはアスパラギン酸と、塩架橋を形成することが可能である。

10

【0307】

ペプチドおよびペプチド模倣体のリガンドには、天然または修飾ペプチド、例えばDまたはLペプチド； α 、 β 、または γ ペプチド；N-メチルペプチド；アザペプチド；1つまたは複数のアミドを有するペプチド、すなわち1つまたは複数の尿素、チオ尿素、カルバメート、またはスルホニル尿素結合で置換されたペプチド結合；または環状ペプチドを有するリガンドがある。

20

【0308】

i R N A剤を作製するための方法

i R N A剤は、修飾塩基または非天然塩基、例えば本願明細書に援用する、2003年4月17日に出願された同時係属かつ共同所有の米国仮出願第60/463, 772号明細書に、および/または本願明細書に援用する、2003年4月25日に出願された同時係属かつ共同所有の米国仮出願第60/465, 802号明細書に記載された塩基を含むことが可能である。このような塩基を含むモノマーおよびi R N A剤は、2003年4月17日に出願された米国仮出願第60/463, 772号明細書、および/または2003年4月25日に出願された米国仮出願第60/465, 802号明細書に見られる方法によって作製することが可能である。

30

【0309】

さらに本発明は、修飾または非天然塩基および本願明細書に記載する他の要素を有するi R N A剤を含む。例えば本発明は、本願明細書に記載するi R N A剤、例えばパリンドローム構造のi R N A剤、非標準的な対合を有するi R N A剤、本願明細書に記載する遺伝子、例えば腎臓中で活性がある遺伝子を標的とするi R N A剤、本願明細書に記載する構成様式または構造を有するi R N A剤、本願明細書に記載する両親媒性送達物質と結合したi R N A、本願明細書に記載する薬剤送達モジュールと結合したi R N A、本願明細書に記載するように投与されるi R N A剤、または本願明細書に記載するように製剤化されるi R N A剤であって、修飾または非天然塩基も取り込むi R N A剤を含む。

40

【0310】

オリゴヌクレオチドペプチド複合体の合成および精製は、確立されている方法によって実施することが可能である。例えば、テュルーフェルトら(Trufert et al.)、Tetrahedron、52:3005、1996；およびManoharan、「Oligonucleotide Conjugates in Antisense Technology」、Antisense Drug Technology、ed中、エスティークルーク、マルセルデッカー、インコーポレイティッド社(S. T. Crooke、Marcel Dekker, Inc.)、2001を参照のこと

50

。

【0311】

本発明の1実施形態では、ペプチド模倣体を修飾して、明確で特異的な好ましい立体構造をとる制約型ペプチドを作製することが可能であり、該立体構造によってペプチドの効力および選択性を増大させることが可能である。例えば、制約型ペプチドはアザペプチドであってよい (Gante、Synthesis、405～413、1989)。アミノ酸側鎖の構造を変えずに、アミノ酸の α -炭素を窒素原子で置換することによって、アザペプチドが合成される。例えば、ヒドラジンを「カルボニル・ドナー」、例えばクロロギ酸フェニルと反応させることなどによって、伝統的なペプチド合成カップリング法においてヒドラジンを使用することによって、アザペプチドを合成することが可能である。

10

【0312】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、RRMSに連結されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、N-メチルペプチドであってよい。N-メチルペプチドはN-メチル・アミノ酸から構成されるが、N-メチル・アミノ酸はペプチドのバックボーン中に追加のメチル基を与えることによってタンパク質分解酵素による切断に対する他の耐性手段を与える可能性がある。N-メチルペプチドは、当分野で知られている方法によって合成することが可能である (例えば、リンドグレンら (Lindgren et al.)、Trends Pharmacol. Sci. 21:99、2000; Cell Penetrating Peptides: Processes and Applications、Langel, ed.、CRC Press、Boca Raton、FL、2002; フィッシャーら (Fische et al.)、Bioconjugate Chem. 12:825、2001; ワンダーら (Wander et al.)、J. Am. Chem. Soc.、124:13382、2002を参照)。例えば、AntペプチドまたはTatペプチドが、N-メチルペプチドであってもよい。

20

。

【0313】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、RRMSに連結されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、 β -ペプチドであってよい。 β -ペプチドは、溶液中でらせん、プリーツ・シート、ターンおよびヘアピンなどの安定した2次構造を形成する。 β -ペプチドの環状誘導体は、固体状態で折りたたまれてナノチューブになりうる。 β -ペプチドは、タンパク質分解酵素による分解に対して耐性がある。 β -ペプチドは、当分野で知られている方法によって合成することが可能である。例えば、AntペプチドまたはTatペプチドは、 β -ペプチドであってもよい。

30

【0314】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、RRMSに連結されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、オリゴカルバメートであってよい。オリゴカルバメートペプチドは、カルバメートトランスポーターによって促進される輸送経路により細胞内に内在化する。例えば、AntペプチドまたはTatペプチドが、オリゴカルバメートであってもよい。

【0315】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、RRMSに連結されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、ペプチド模倣体のアミド結合が尿素部分で置換されているオリゴ尿素複合体 (またはオリゴチオ尿素複合体) であってよい。アミド結合の置換によって、タンパク質分解酵素、例えば胃腸間内でのタンパク質分解酵素による分解に対する高い耐性が与えられる。1実施形態では、オリゴ尿素複合体を、経口送達において使用するためにiRNA剤と連結させる。オリゴ尿素ペプチド模倣体のそれぞれの繰り返しユニット中のバックボーンは、天然アミノ酸と比較して1炭素原子だけ広がる可能性がある。1炭素原子の広がりによって、例えばペプチドの安定性および親油性が増大する可能性がある。したがってオリゴ尿素ペプチドは、iRNA剤が細菌細胞壁の通過を目的とするとき、あるいは神経障害の治療などのためにiRNA剤が血液-脳関門を横断し

40

50

なければならないときに、有利である可能性がある。1実施形態では、受容体との高い親和性を生み出すために、水素結合ユニットをオリゴ尿素ペプチドに結合させる。例えば、AntペプチドまたはTatペプチドが、オリゴ尿素複合体（またはオリゴチオ尿素複合体）であってもよい。

【0316】

本発明のsiRNAペプチド複合体は、iRNA剤上の様々な位置に存在するRRMSと関連付ける、例えば連結させることが可能である。例えばペプチドを、センス鎖上またはアンチセンス鎖上のいずれかにおいて末端に結合させてもよいし、ペプチドをビス結合（1つのペプチドが各端で連結され、一端がセンス鎖に結合し、一端がアンチセンス鎖に結合する）。他の選択肢では、ペプチドは、短いヘアピン構造のiRNA剤のループ中など、内部に結合し得る。さらに他の選択肢では、ペプチドはペプチド-担体複合体などの複合体と関連付けられてもよい。

10

【0317】

ペプチド-担体複合体は、（生体系および／または細胞に送達するためなどの）1つまたは複数のiRNA剤を内包しうる少なくとも1つの担体分子と、担体複合体を特定の組織または細胞種に対して指向させるためなどの、前記担体分子の外側に連結されたペプチド部分とから構成される。担体複合体は、該複合体の外側に追加の標的化分子、または細胞への送達を助ける細胞融合剤を担持することも可能である。担体内に被包される1つまたは複数のiRNA剤を、担体の内部への物質の送達を助けることが可能な親油性分子と結合させてもよい。

20

【0318】

担体分子または担体構造物は、例えばミセル、リポソーム（例えばカチオン性リポソーム）、ナノ粒子、ミクロスフェア、または生分解性ポリマーであってよい。ペプチド部分は、ジスルフィド結合、酸不安定結合、ペプチド系結合、オキシアミノ結合またはヒドラジン結合などの様々な結合によって、担体分子と連結することが可能である。例えば、ペプチド系結合はGFLGペプチドであってよい。いくつかの結合は個々の利点を有し、その利点（または欠点）を、標的組織または目的とする用途に応じて考慮することが可能である。例えば、ペプチド系結合は血流中では安定性があるが、リソソーム中では酵素による切断を受けやすい。

【0319】

標的化

本発明のiRNA剤は、腎臓を標的とするときに特に有用である。腎臓を標的とするリガンドを含むRRMSを取り込ませることによって、iRNA剤を腎臓に対して標的化することが可能である。

30

【0320】

糖、例えばガラクトースおよび／またはその類似体を取り込む標的化剤は、有用である可能性がある。これらの標的化剤は、例えば肝臓の実質細胞を標的とする。例えば標的化部分は、互いに約15オングストローム隔てられた、2つ以上の、好ましくは2つまたは3つのガラクトース部分を含んでいてもよい。あるいは標的化部分は、ガラクトースと結合したグルコースである、ラクトース（例えば3つのラクトース部分）であってよい。標的化部分は、N-アセチル-ガラクトサミン、N-Ac-グルコサミンであってもよい。マンノースまたはマンノース-6-リン酸の標的化部分は、マクロファージを標的とするために使用することが可能である。

40

【0321】

iRNA剤とヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン（SA）との結合を使用して、iRNA剤を、肝臓などの非腎臓組織に向けることも可能である。

本願明細書に記載するRRMS標的化部分によって腎臓を標的とするiRNA剤は、腎臓中で発現される遺伝子を標的とすることが可能である。

【0322】

RRMS上のリガンドは、葉酸、グルコース、コレステロール、コール酸、ビタミンE

50

、ビタミンK、またはビタミンAを含み得る。

定義

用語「ハロ」は、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素の任意の基を指す。

【0323】

用語「アルキル」は、示した数の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を指す。例えば、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルとは、該基が1個～12個の炭素原子をその中に有することが可能であることを示す。用語「ハロアルキル」は、1つまたは複数の水素原子がハロによって置換されているアルキルを指し、すべての水素がハロによって置換されているアルキル部分（例えばペルフルオロアルキル）を含む。アルキルおよびハロアルキル基は、任意選択でO、N、またはSが挿入されていてもよい。用語「アラルキル」は、アルキル水素原子がアリール基によって置換されているアルキル部分を指す。アラルキルは、2つ以上の水素原子がアリール基によって置換されている基を含む。「アラルキル」の例には、ベンジル、9-フルオレニル、ベンズヒドリル、およびトリチル基がある。

10

【0324】

用語「アルケニル」は、2～8個の炭素原子を含み1つまたは複数の二重結合を有することを特徴とする、直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を指す。典型的なアルケニルの例には、アリル、プロペニル、2-ブテニル、3-ヘキセニルおよび3-オクテニル基があるが、これらだけには限られない。用語「アルキニル」は、2～8個の炭素原子を含み1つまたは複数の三重結合を有することを特徴とする、直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を指す。典型的なアルキニルのいくつかの例は、エチニル、2-プロピニル、および3-メチルブチニル、およびプロパルギルである。 sp^2 および sp^3 炭素が、任意選択で、それぞれアルケニル基およびアルキニル基の結合点として作用してもよい。

20

【0325】

用語「アルコキシ」は、 $-O-$ アルキル基を指す。用語「アミノアルキル」は、アミノで置換されたアルキルを指す。用語「メルカプト」は、 $-SH$ 基を指す。用語「チオアルコキシ」は、 $-S-$ アルキル基を指す。

【0326】

用語「アルキレン」は、2価アルキル（すなわち $-R-$ ）、例えば $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、および $-CH_2CH_2CH_2-$ を指す。用語「アルキレンジオキソ」は、構造 $-O-R-O-$ （Rはアルキレンを表す）の2価の分子種を指す。

30

【0327】

用語「アリール」は、置換可能な任意の環原子を置換基によって置換することが可能な、芳香族単環、2環、または3環炭化水素環系を指す。アリール部分の例には、フェニル、ナフチル、およびアントラセニルがあるが、これらだけには限られない。

【0328】

本願明細書で使用する用語「シクロアルキル」は、置換可能な任意の環原子を置換基によって置換することが可能な、3～12個の炭素を有する飽和環状、2環、3環、または多環炭化水素基を含む。本願明細書に記載するシクロアルキル基は、縮合環も含み得る。縮合環は、共通の炭素-炭素結合を共有する環である。シクロアルキル部分の例には、シクロヘキシル、アダマンチル、およびノルボルニルがあるが、これらだけには限られない。

40

【0329】

用語「ヘテロシクリル」は、非芳香族3～10員の単環、8～12員の2環、または11～14員の3環の環系であって、単環の場合1～3個のヘテロ原子、2環の場合1～6個のヘテロ原子、または3環の場合1～9個のヘテロ原子を有し、前記ヘテロ原子がO、N、またはSから選択されることを特徴とする環系（例えば炭素原子と、単環、2環、または3環である場合、N、OまたはSのヘテロ原子それぞれ1～3個、1～6個、または1～9個）であり、置換可能な任意の環原子を置換基によって置換することが可能な環系を指す。本願明細書に記載するヘテロシクリル基は、縮合環も含み得る。縮合環は、共通の炭素-炭素結合を共有する環である。ヘテロシクリルの例には、テトラヒドロフラン

50

、テトラヒドロピラニル、ピペリジニル、モルホリノ、ピロリニルおよびピロリジニルがあるが、これらだけには限られない。

【0330】

用語「ヘテロアリール」は、芳香族5～8員の単環、8～12員の2環、または11～14員の3環の環系であって、単環の場合1～3個のヘテロ原子、2環の場合1～6個のヘテロ原子、または3環の場合1～9個のヘテロ原子を有し、前記ヘテロ原子がO、N、またはSから選択されることを特徴とする環系（例えば炭素原子と、単環、2環、または3環である場合、N、OまたはSのヘテロ原子それぞれ1～3個、1～6個、または1～9個）であり、置換可能な任意の環原子を置換基によって置換することが可能な環系を指す。

10

【0331】

用語「オキソ」は、炭素と結合している場合はカルボニルを形成し、窒素と結合している場合はN-オキシドを形成し、イオウと結合している場合はスルホキシドまたはスルホン形成する酸素原子を指す。

【0332】

用語「アシル」は、いずれも置換基によってさらに置換することが可能な、アルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロシクリルカルボニル、またはヘテロアリールカルボニル置換基を指す。

【0333】

用語「置換基」は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクロアルケニル、シクロアルケニル、アリール、またはヘテロアリール基上で該基の任意の原子について「置換された」基を指す。適切な置換基には、制限を設けるものではないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ハロ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アミノ、 SO_3H 、硫酸、リン酸、ペルフルオロアルキル、ペルフルオロアルコキシ、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ、カルボキシル、オキソ、チオオキソ、イミノ（アルキル、アリール、アラルキル）、 $\text{S}(\text{O})_n$ アルキル（ n は0～2）、 $\text{S}(\text{O})_n$ アリール（ n は0～2）、 $\text{S}(\text{O})_n$ ヘテロアリール（ n は0～2）、 $\text{S}(\text{O})_n$ ヘテロシクリル（ n は0～2）、アミン（モノー、ジー、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、およびこれらの組合せ）、エステル（アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル）、アミド（モノー、ジー、アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、およびこれらの組合せ）、スルホンアミド（モノー、ジー、アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、およびこれらの組合せ）、非置換アリール、非置換ヘテロアリール、非置換ヘテロシクリル、および非置換シクロアルキルがある。1態様では、基上の置換基は独立に、前述の置換基のいずれか1つ、またはいずれかのサブセットである。

20

30

【0334】

用語「アデニニル、シトシニル、グアニニル、チミニル、およびウラシリル」などは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、およびウラシルの基を指す。

本願明細書で使用する「通常でない」核酸塩基は、以下のいずれか1つを含むことが可能である：

- 2-メチルアデニニル、
- N6-メチルアデニニル、
- 2-メチルチオ-N6-メチルアデニニル、
- N6-イソペンテニルアデニニル、
- 2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニニル、
- N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデニニル、
- 2-メチルチオ-N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデニニル、
- N6-グリシニルカルバモイルアデニニル、
- N6-トレオニルカルバモイルアデニニル、
- 2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデニニル、
- N6-メチル-N6-トレオニルカルバモイルアデニニル、

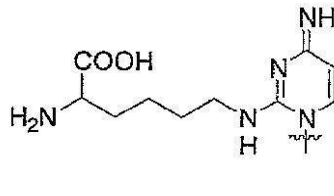
40

50

N 6－ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデニル、
 2－メチルチオ－N 6－ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデニル、
 N 6，N 6－ジメチルアデニル、
 3－メチルシトシニル、
 5－メチルシトシニル、
 2－チオシトシニル、
 5－ホルミルシトシニル、

【0335】

【化26】



10

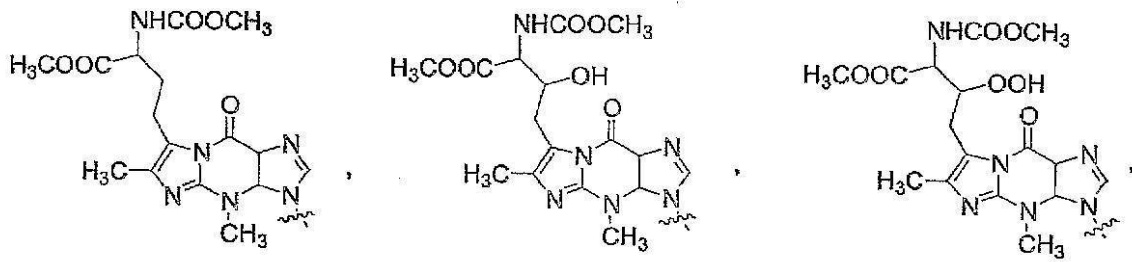
【0336】

N 4－メチルシトシニル、
 5－ヒドロキシメチルシトシニル、
 1－メチルグアニル、
 N 2－メチルグアニル、
 7－メチルグアニル、
 N 2，N 2－ジメチルグアニル、

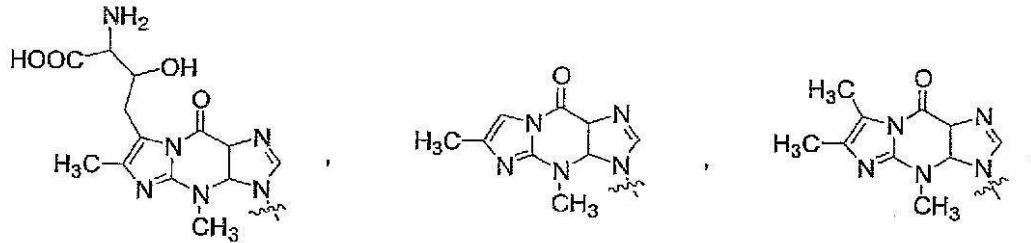
【0337】

20

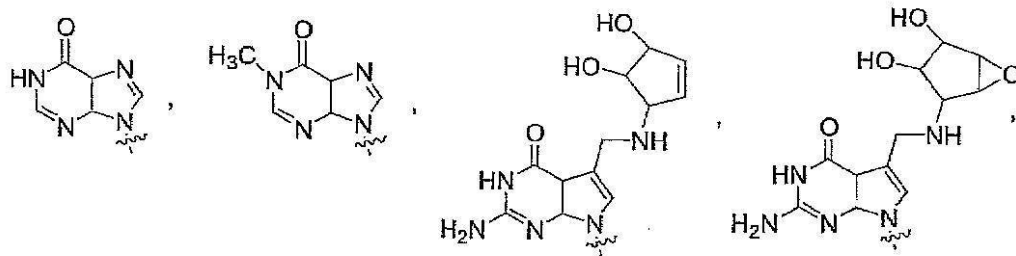
【化 2 7】



10



20



30



【0338】

40

N 2 , 7 - ジメチルグアニニル、
 N 2 , N 2 , 7 - トリメチルグアニニル、
 1 - メチルグアニニル、
 7 - シアノ - 7 - デアザグアニニル、
 7 - アミノメチル - 7 - デアザグアニニル、
 プソイドウラシル、
 ジヒドロウラシル、
 5 - メチルウラシル、
 1 - メチルプソイドウラシル、
 2 - チオウラシル、

50

4-チオウラシリル、
 2-チオチミニル
 5-メチル-2-チオウラシリル、
 3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウラシリル、
 5-ヒドロキシウラシリル、
 5-メトキシウラシリル、
 ウラシリル5-オキシ酢酸、
 ウラシリル5-オキシ酢酸メチルエステル、
 5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシリル、
 5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシリルメチルエステル、
 5-メトキシカルボニルメチルウラシリル、
 5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシリル、
 5-アミノメチル-2-チオウラシリル、
 5-メチルアミノメチルウラシリル、
 5-メチルアミノメチル-2-チオウラシリル、
 5-メチルアミノメチル-2-セレノウラシリル、
 5-カルバモイルメチルウラシリル、
 5-カルボキシメチルアミノメチルウラシリル、
 5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシリル、
 3-メチルウラシリル、
 1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイドウラシリル、
 5-カルボキシメチルウラシリル、
 5-メチルジヒドロウラシリル、または
 3-メチルプソイドウラシリル。

10

20

30

40

50

【0339】

パリンドローム

RNA、例えばiRNA剤は、本願明細書に記載するパリンドローム構造、およびいず
 れも本願明細書に援用する、2003年3月7日に出願された米国仮出願第60/452
 , 682号; 2003年4月14日に出願された米国仮出願第60/462, 894号;
 および2004年3月8日に出願された国際出願No. PCT/US04/07070の
 1つまたは複数中に記載されたものを有することが可能である。本発明のiRNA剤は、
 2つ以上のRNA領域を標的とすることが可能である。例えばiRNA剤は、互いにハイ
 ブリダイズするのに十分相補的な第1配列および第2配列を含むことが可能である。第1
 配列は第1の標的RNA領域と相補的であってよく、第2配列は第2の標的RNA領域と
 相補的であってよい。iRNA剤の第1配列および第2配列が異なるRNA鎖上にあり、
 かつ第1配列と第2配列の間のミスマッチを、50%、40%、30%、20%、10%
 、5%、または1%未満とすることができる。iRNA剤の第1配列および第2配列が同
 じRNA鎖上にあり、かつ関連実施形態では、該iRNA剤の50%、60%、70%、
 80%、90%、95%より多く、あるいは1%が、2分子の形態であってもよい。iRNA
 剤の第1配列と第2配列が、互いに完全に相補的であってもよい。

【0340】

第1の標的RNA領域が第1の遺伝子によってコードされ、かつ第2の標的RNA領域
 が第2の遺伝子によってコードされてもよいし、あるいは第1の標的RNA領域と第2の
 標的RNA領域が、1つの遺伝子由来のRNAの異なる領域であってよい。第1配列と第
 2配列は、少なくとも1ヌクレオチド異なる可能性がある。

【0341】

第1の標的RNA領域と第2の標的RNA領域は、第1配列および第2配列の変異体、
 例えば1つの遺伝子の第1および第2の対立遺伝子によってコードされる転写物上に存在
 してもよい。配列の変異は、例えば突然変異、または多型性であってよい。第1の標的RNA
 領域が、第2の標的RNA領域と比べてヌクレオチドの置換、挿入、または欠失を含

むことも可能であり、あるいは第2の標的RNA領域が、第1の標的領域の突然変異体または変異体であることも可能である。

【0342】

第1の標的RNA領域と第2の標的RNA領域は、ウイルスまたはヒトのRNA領域を含むことが可能である。第1の標的RNA領域と第2の標的RNA領域は、がん遺伝子の変異体転写物上に存在することも可能であるし、あるいは腫瘍抑制遺伝子の転写物の異なる突然変異を含むことも可能である。さらに、第1の標的RNA領域と第2の標的RNA領域は、遺伝的変異のホット・スポットに相当していてもよい。

【0343】

本発明の組成物は、iRNA剤分子の混合物を含むことが可能である。例えば、1つのiRNA剤は、互いにハイブリダイズするのに十分相補的な第1配列および第2配列を含むことが可能であり、さらに第1配列は第1の標的RNA領域と相補的であり、第2配列は第2の標的RNA領域と相補的である。この混合物は、互いにハイブリダイズするのに十分相補的な第3配列および第4配列を含む、少なくとも1つの他の種類のiRNA剤を含むことも可能であり、この場合第3配列は第3の標的RNA領域と相補的であり、第4配列は第4の標的RNA領域と相補的である。さらに、第1配列または第2配列は、第3配列または第4配列と、互いにハイブリダイズすることが可能であるほど十分相補的であってもよい。第1配列と第2配列は同じRNA鎖上に存在しても異なるRNA鎖上に存在してもよく、第3配列と第4配列は同じRNA鎖上に存在しても異なるRNA鎖上に存在してもよい。

【0344】

標的RNA領域は、ウイルスRNAまたはヒトRNAの変異体配列であってもよく、いくつの実施形態では、少なくとも2つの標的RNA領域が、がん遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の変異体転写物上に存在しうる。標的RNA領域は、遺伝的ホット・スポットに相当してもよい。

【0345】

iRNA剤組成物を作製する方法は、標的遺伝子（例えばウイルス遺伝子またはヒト遺伝子、あるいはがん遺伝子または腫瘍抑制遺伝子、例えばp53）のRNA領域であって、（例えばヒトにおける）高度の多様性または突然変異頻度を有する領域についての情報を入手することまたは提供することを含み得る。さらに、該領域内の複数のRNA標的についての情報を入手または提供することが可能であり、この場合それぞれのRNA標的が該遺伝子の異なる変異体または突然変異体に対応する（例えば、p53 248Qおよび／またはp53 249Sをコードするコドンを含む領域）。第1配列が複数の変異体RNA標的のうちの第1の標的（例えば249Qをコードする標的）と相補的であり、第2配列が複数の変異体RNA標的のうちの第2の標的（例えば249Sをコードする標的）と相補的であり、かつ第1配列と第2配列がハイブリダイズするのに十分相補的であり得るように、iRNA剤を構築することが可能である。

【0346】

例えば標的遺伝子中の共通の突然変異を同定するために、配列分析を使用して、高度の多様性または突然変異頻度を有する標的遺伝子の領域を同定することが可能である。高度の多様性または突然変異頻度を有する標的遺伝子の領域は、個体群由来の標的遺伝子についての遺伝子型情報を入手または提供することによって、同定することが可能である。

【0347】

互いにハイブリダイズするほど十分相補的な第1配列および第2配列を有するiRNA剤を提供することによって、標的遺伝子の発現を調節する、例えば下方制御またはサイレンシングすることが可能である。さらに、第1配列が第1の標的RNA領域と相補的であり、かつ第2配列が第2の標的RNA領域と相補的であってもよい。

【0348】

iRNA剤は、第1の変異体RNA標的領域と相補的な第1配列、および第2の変異体RNA標的領域と相補的な第2配列を含むことが可能である。この第1および第2の変異

10

20

30

40

50

体RNA標的領域は、標的遺伝子、例えばウイルス遺伝子、腫瘍抑制遺伝子またはがん遺伝子の第1および第2の変異体または突然変異体に対応するものでもよい。第1および第2の変異体RNA標的領域は、標的遺伝子の対立遺伝子変異、突然変異（例えば点突然変異）、または多型を含んでいてもよい。第1および第2の変異体RNA標的領域は、遺伝的ホット・スポットに対応していてもよい。

【0349】

複数のiRNA剤（例えばパネルまたはバンク）を提供することも可能である。

標準的なワトソン・クリック以外の二本鎖構造

RNA、例えばiRNA剤は、別のモノマー、例えば別の鎖上のモノマーと標準的なワトソン・クリック以外の対合を形成することができるモノマー（例えば、本明細書中に記載するもの、ならびに2003年4月25日付けで出願された米国仮出願第60/465,665号及び2004年3月8日付けで出願された国際出願第PCT/US04/07070号（これらはともに、参照により本明細書に援用される）に記載されるもの）を包含することができる。

【0350】

二本鎖のモノマー間の「標準的なワトソン・クリック以外の対合」の使用は、二本鎖のすべて又は一部の融解を制御（多くの場合は促進）するのに使用することができる。iRNA剤は、選択された位置又は制約された位置にモノマーを包含することができ、その結果、iRNA剤二本鎖における（例えば、二本鎖iRNA剤の2つの別個の分子間での）第1のレベルの安定性、及びiRNA剤の配列と別の配列分子（例えば、対象者における標的配列又はオフターゲット（標的ではない）配列）との間の二本鎖における第2のレベルの安定性をもたらす。場合によっては、第2の二本鎖は、例えばiRNA剤のアンチセンス配列と標的mRNAとの間の二本鎖において、比較的高いレベルの安定性を有する。この場合、1つ又はそれ以上のモノマー、iRNA剤におけるモノマーの位置、及び標的配列（本明細書中では、選択パラメータ又は制約パラメータと称することもある）の選択は、iRNA剤二本鎖が比較的低い会合の自由エネルギーを有する（メカニズム又は理論により拘束されることを望まないが、このことはRISCに関しては二本鎖iRNA剤の解離を促進することにより有効性に寄与すると考えられる）一方で、標的指向性のアンチセンス配列とその標的配列との間で形成される二本鎖が、比較的高い会合の自由エネルギーを有する（メカニズム又は理論により拘束されることを望まないが、このことはアンチセンス配列と標的RNAとの会合を促進することにより有効性に寄与すると考えられる）ようになされる。

【0351】

他の場合では、第2の二本鎖は、例えばiRNA剤のセンス配列とオフターゲットmRNAとの間の二本鎖において、比較的低いレベルの安定性を有する。この場合、1つ又はそれ以上のモノマー、iRNA剤におけるモノマーの位置、及びオフターゲット配列の選択は、iRNA剤二本鎖が比較的高い会合の自由エネルギーを有する一方で、標的指向性のセンス配列とそのオフターゲット配列との間で形成される二本鎖が、比較的低い会合の自由エネルギーを有する（メカニズム又は理論により拘束されることを望まないが、センス鎖とオフターゲット配列から形成される二本鎖の解離を促進することにより有効性に寄与し、オフターゲット配列をサイレンシングするレベルを低減すると考えられる）ようになされる。

【0352】

したがって、iRNA剤内の二本鎖に関する第1の安定性、ならびにiRNA剤由来の配列と別のRNA、例えば標的mRNAとの間で形成される二本鎖に関する第2の安定性を有するという特性は、iRNA剤の構造において固有のものである。上述のように、この特性は、選択された位置又は制約された位置の1つ又はそれ以上のモノマーの慎重な選択、選択された位置又は制約された位置を設定するための二本鎖における位置の選択、及び標的配列の配列（例えば、標的とされるべき標的遺伝子の特定の領域）の選択により達成され得る。これらの要件を満たすiRNA剤配列は、本明細書中では制約配列と称する

こともある。制約パラメータ又は選択パラメータは、例えば、検査により、あるいはコンピュータ支援方法により達成することができる。パラメータの使用により、例えば二本鎖の安定性又は相対安定性に関して所望の結果が得られるように、標的配列及び特定のモノマーを選択することができる。

【0353】

したがって、別の態様では、本発明は、第1の標的領域を標的とする第1の配列及び第2の標的領域を標的とする第2の配列を包含する iRNA 剤を特徴とする。第1の配列及び第2の配列は、例えば生理学的条件下で（例えば、生理学的条件下であるが、ヘリカーゼ又は他の巻き戻し酵素とは接触しない条件下で）互いにハイブリダイズするのに十分な相補性を有する。iRNA 剤の二本鎖領域では、選択された位置又は制約された位置で、第1の標的領域が第1のモノマーを有し、第2の標的領域が第2のモノマーを有する。第1のモノマー及び第2のモノマーは、相補的位置又は対応する位置を占める。一方のモノマー、及び好ましくは両方のモノマーが、第1の配列と第2の配列との間での二本鎖に寄与するモノマーの対合の安定性が、第1の配列又は第2の配列と標的配列との間での対合の安定性と異なるように選択される。

10

【0354】

通常、モノマーは、iRNA 剤配列と標的RNA二本鎖との間の二本鎖におけるモノマーとその相補的モノマーとの対合により保有されるであろう解離の自由エネルギー及び T_m よりも、低い解離の自由エネルギー及び低い T_m を有する iRNA 剤二本鎖における対合をモノマーが形成するように選択される（標的配列の選択も同様に要求され得る）。

20

【0355】

モノマーに与えられる制約は、選択部位に、あるいは2個以上の選択部位に適用され得る。例えば、iRNA 剤二本鎖において、2個以上であるが、3個未満、4個未満、5個未満、6個未満又は7個未満の部位に制約が適用され得る。

【0356】

制約部位又は選択部位は、iRNA 剤二本鎖の多数の位置に存在することができる。例えば、制約部位又は選択部位は、二本鎖の配列の3'末端又は5'末端の一方から3位、4位、5位又は6位以内の位置に存在することができる。制約部位又は選択部位は、二本鎖領域の中央に存在することもでき、例えば、制約部位又は選択部位は、二本鎖の領域の末端から4位以上、5位以上、6位以上又は7位以上の位置であり得る。

30

【0357】

幾つかの実施形態では、iRNA 剤の二本鎖領域は、選択部位又は制約部位（単数又は複数）のほかに、ミスマッチを有する。好ましくは、iRNA 剤の二本鎖領域は、標準的なワトソン-クリック対を形成しないか、又はハイブリダイズしない1個以下、2個以下、3個以下、4個以下又は5個以下の塩基を有する。突出部については、本明細書中の他の箇所で詳述しているが、好ましくは約2ヌクレオチド長である。突出部は、標的とされる遺伝子配列に対して相補的であってもよいし、又は他の配列でもよい。TTは、突出部の好ましい配列である。第1のiRNA 剤配列及び第2のiRNA 剤配列はまた、例えばヘアピンを形成するための追加の塩基により、あるいは他の非塩基リンカーにより連結させることもできる。

40

【0358】

モノマーは、第1のモノマー及び第2のモノマーが天然に存在するリボヌクレオチド又は天然に存在する塩基を有する修飾リボヌクレオチドであるように、かつ、相補的部位を占有する場合、対合もせず実質的レベルのH結合も有さないか、又は非標準的なワトソン-クリック対合を形成して非標準的なH結合のパターンを形成する（通常、標準的なワトソン-クリック対合で見られるよりも低い解離の自由エネルギーを有するか、あるいはそうでなければ予め選択した値の会合の自由エネルギー未満であるか、例えば標準的な対合の会合の自由エネルギーよりも低い会合の自由エネルギーとなるように対合する）ように選択することができる。iRNA 剤の配列の一方（又は両方）が標的と二本鎖を形成する場合、第1の（又は第2の）モノマーは、標的上の相補的位置にある塩基と標準的なワトソ

50

ンークリック対合を形成するか、あるいは iRNA 剤における対合で見られるよりも高い解離の自由エネルギー及び高い T_m を有する非標準的なワトソンークリック対を形成する。古典的なワトソンークリック対は、以下の通りである：A-T、G-C 及び A-U。非標準的なワトソンークリック対合は、当該技術分野で既知であり、U-U、G-G、G-A_{トランス}、G-A_{シス} 及び G-U を挙げることができる。

【0359】

配列の一方又は両方におけるモノマーの選択は、モノマーが対合をしないか、あるいは他方の配列の対応するモノマーとの対を形成し、その対が安定性を最小限にする（例えば、一方の配列の選択部位のモノマーと他方の配列の対応する部位のモノマーとの間で形成される H 結合は、一方（又は両方）の配列のモノマーと各々の標的配列とにより形成される H 結合よりも安定性が劣る）ようになされる。一方又は両方の鎖におけるモノマーの選択はまた、鎖とその標的配列により作製される二本鎖の一方又は両方における安定性を促進するように為される。例えば、1 つ又はそれ以上のモノマー及び標的配列の選択は、選択位置又は制約位置で、iRNA 剤二本鎖中で H 結合が形成されないか、もしくは非標準的な対合が形成されるか、あるいはそうでなければ予め選択した値の会合の自由エネルギー未満であるか、又は例えば標準的な対合の会合の自由エネルギーよりも低い会合の自由エネルギーを付与するように対合するが、一方（又は両方の）配列が各々の標的と二本鎖を形成する場合は、選択部位又は制約部位での対合は標準的なワトソンークリック対であるようにすることができる。

10

【0360】

このようなモノマーを含むことにより、以下の 1 つ又はそれ以上の効果、すなわち：iRNA 剤二本鎖を不安定化すること、センス配列と意図されない標的配列（オフターゲット配列と称することもある）との間の相互作用を不安定化すること、配列と意図される標的との間の相互作用は不安定化されないこと、を有することになる。

20

【0361】

例を挙げる。

第 1 の配列の選択部位のモノマーは、A（又は T と対合する修飾塩基）を含み、第 2 の配列の選択位置のモノマーは、対合しないか、又は非標準的な対合を形成するモノマー（例えば、G）から選ばれる。これらは、第 1 の配列の標的配列が選択位置に T を有する場合の用途において有用である。標的二本鎖がともに安定化される実施形態では、第 2 の鎖の標的配列が、第 2 の鎖の選択位置に関して選択されるモノマーと標準的なワトソンークリック対を形成するモノマーを有する場合に有用である。

30

【0362】

第 1 の配列の選択部位のモノマーは、U（又は A と対合する修飾塩基）を含み、第 2 の配列の選択位置のモノマーは、対合しないか、又は非標準的な対合を形成するモノマー（例えば、U 又は G）から選ばれる。これらは、第 1 の配列の標的配列が選択位置に T を有する場合の用途において有用である。標的二本鎖がともに安定化される実施形態では、第 2 の鎖の標的配列が、第 2 の鎖の選択位置に関して選択されるモノマーと標準的なワトソンークリック対を形成するモノマーを有する場合に有用である。

【0363】

第 1 の配列の選択部位のモノマーは、G（又は C と対合する修飾塩基）を含み、第 2 の配列の選択位置のモノマーは、対合しないか、又は非標準的な対合を形成するモノマー（例えば、G、A_{シス}、A_{トランス}、又は U）から選ばれる。これらは、第 1 の配列の標的配列が選択位置に T を有する場合の用途において有用である。標的二本鎖がともに安定化される実施形態では、第 2 の鎖に関する標的配列が、第 2 の鎖の選択位置に関して選択されるモノマーと標準的なワトソンークリック対を形成するモノマーを有する場合に有用である。

40

【0364】

第 1 の配列の選択部位のモノマーは、C（又は G と対合する修飾塩基）を含み、第 2 の配列の選択位置のモノマーは、対合しないか、又は非標準的な対合を形成するモノマーか

50

ら選ばれる。これらは、第1の配列の標的配列が選択位置にTを有する場合の用途において有用である。標的二本鎖がともに安定化される実施形態では、第2の鎖に関する標的配列が、第2の鎖の選択位置に関して選択されるモノマーと標準的なワトソン・クリック対を形成するモノマーを有する場合に有用である。

【0365】

天然に存在しないモノマー又は修飾モノマー（単数又は複数）の選択は、天然に存在しないモノマー又は修飾モノマーがiRNA剤の選択位置又は制約位置に配置される場合は第1の解離の自由エネルギーを示し、かつそれらの一方（又は両方）が天然に存在するモノマーと対合する場合は、対が第2の解離の自由エネルギーを示す（通常、第2の解離の自由エネルギーは、第1のモノマーと第2のモノマーの対合の解離の自由エネルギーよりも高い）ように実施することができる。例えば、第1のモノマー及び第2のモノマーが相補的位置を占める場合、第1のモノマー及び第2のモノマーは、対合もせず、実質的レベルのH結合も有さないか、又は、該モノマーの一方が天然に存在するモノマーと形成するよりも弱い結合を形成して、その二本鎖の安定性を低減するが、その二本鎖が解離すると、少なくとも一方の鎖は標的と二本鎖を形成し、標的との二本鎖においては、選択モノマーは安定性を促進する（例えばモノマーは、標的配列中の天然に存在するモノマーと、iRNA剤において形成される対合よりも安定な対を形成する）。

10

【0366】

このような対の例は、2-アミノA、及びU又はTの2-チオピリミジン類縁体のいずれかである。

20

iRNA剤の相補的位置に配置される場合、これらのモノマーはほとんど対合せず、安定性は最小限となる。しかしながら、2-アミノAと天然に存在する標的のUとの間で二本鎖が形成されるか、あるいは、2-チオUと天然に存在する標的のAとの間、又は2-チオTと天然に存在する標的のAとの間で二本鎖が形成され、比較的高い解離の自由エネルギーを有し、かつより安定となる。これを、図1に示す。

【0367】

図1に示す対（2-アミノAならびに2-sU及びT）は例示的なものである。別の実施形態では、センス鎖の選択位置のモノマーは、普遍的に対合する構成部分であり得る。普遍的に対合する物質は、2個以上、好ましくはすべての天然に存在するモノマーとある程度のレベルのH結合を形成する。普遍的に対合する部分の例は、3-ニトロピロールを含むモノマーである。（普遍的な塩基類縁体の他の候補は、例えばロックス（Loakes）、2001年、NAR 29:2437~2447ページ（参照により本明細書に援用される）に見出すことができる。例はまた、以下の普遍的塩基に関するセクションに見出すことができる。）これらの場合、アンチセンス鎖の対応する位置のモノマーは、標的と二本鎖を形成するその能力に応じて選ぶことができ、例えばA、U、G又はCを挙げることができる。

30

【0368】

本発明のiRNA剤は、以下のものを包含することができる：

好ましくは対象中に存在する配列を標的としないセンス配列、及び対象中の標的遺伝子を標的とするアンチセンス配列。センス配列及びアンチセンス配列は、例えば生理学的条件下で（例えば生理学的条件下であるが、ヘリカーゼ又は他の巻き戻し酵素とは接触しない条件下で）互いにハイブリダイズするのに十分な相補性を有する。iRNA剤の二本鎖領域では、選択位置又は制約位置について、モノマーは以下を満たすように選択される：

40

センス配列のモノマーは、該モノマーが対合しないか、あるいはアンチセンス鎖の対応するモノマーと安定性を最小限にするような対を形成する（例えば、センス配列における選択部位のモノマーとアンチセンス鎖の対応する部位のモノマーとの間で形成されるH結合は、アンチセンス配列のモノマーとその標準的なワトソン・クリックパートナー（アンチセンス鎖中のモノマーが修飾塩基を含む場合には、該修飾塩基の天然型類縁体とその標準的なワトソン・クリックパートナー）により形成されるH結合よりも安定性が劣る）ように選択されること；

50

アンチセンス鎖の対応する位置のモノマーは、該モノマーが標的配列とともに形成する二本鎖の安定性を最大限にすること、例えば、該モノマーが標的鎖上の対応する位置のモノマーと標準的なワトソンクリック対を形成するように選択されること；

任意選択で、センス配列のモノマーは、該モノマーが対合しないか、あるいはアンチセンス鎖の対応するモノマーと、オフターゲット配列との安定性を最小限にするような対を形成すること。

【0369】

このようなモノマーを含むことにより、以下の1つ又はそれ以上の効果、すなわち、iRNA剤二本鎖を不安定化すること、センス配列と意図されない標的配列（オフターゲット配列と称することもある）との間の相互作用を不安定化すること、アンチセンス配列と意図される標的との間の二本鎖相互作用は不安定化されないこと、を有することになる。

【0370】

モノマーに与えられる制約は、選択部位に、あるいは2個以上の選択部位に適用され得る。例えば、iRNA剤二本鎖において、2個以上であるが、3個未満、4個未満、5個未満、6個未満又は7個未満の部位に制約が適用され得る。

【0371】

制約部位又は選択部位は、iRNA剤二本鎖の多数の位置に存在することができる。例えば、制約部位又は選択部位は、二本鎖の配列の3'末端又は5'末端の一方から3位、4位、5位又は6位以内の位置に存在することができる。制約部位又は選択部位は、二本鎖領域の中央に存在することも可能であり、例えば、制約部位又は選択部位は、二本鎖領域の末端から4位以上、5位以上、6位以上又は7位以上の位置であり得る。

【0372】

幾つかの実施形態では、iRNA剤の二本鎖領域は、選択部位又は制約部位（単数又は複数）のほかに、ミスマッチを有する。好ましくは、iRNA剤の二本鎖領域は、標準的なワトソンクリック対を形成しないか、又はハイブリダイズしない1個以下、2個以下、3個以下、4個以下又は5個以下の塩基を有する。突出部については、本明細書中の他の箇所でも詳述しているが、好ましくは約2ヌクレオチド長である。突出部は、標的とされる遺伝子配列に対して相補的であってもよいし、又は他の配列でもよい。TTは、突出部の好ましい配列である。第1のiRNA剤配列及び第2のiRNA剤配列はまた、例えばヘアピンを形成するための追加の塩基により、あるいは他の非塩基リンカーにより連結させることができる。

【0373】

モノマーは、第1のモノマー及び第2のモノマーが天然に存在するリボヌクレオチド又は天然に存在する塩基を有する修飾リボヌクレオチドであるように、かつ、相補的部位を占有する場合、対合もせず実質的レベルのH結合も有さないか、又は非標準的なワトソンクリック対合を形成して非標準的なH結合のパターンを形成する（通常、標準的なワトソンクリック対合で見られるよりも低い解離の自由エネルギーを有するか、あるいはそうでなければ予め選択した値の会合の自由エネルギー未満であるか、例えば標準的な対合の会合の自由エネルギーよりも低い会合の自由エネルギーとなるように対合する）ように選択することができる。iRNA剤の配列の一方（又は両方）が標的と二本鎖を形成する場合、第1の（又は第2の）モノマーは、標的上の相補的位置にある塩基と標準的なワトソンクリック対合を形成するか、あるいはiRNA剤における対合で見られるよりも高い解離の自由エネルギー及び高いT_mを有する非標準的なワトソンクリック対を形成する。古典的なワトソンクリック対は、以下の通りである：A-T、G-C及びA-U。非標準的なワトソンクリック対合は、当該技術分野で既知であり、U-U、G-G、G-A_{トランス}、G-A_{シス}及びG-Uを挙げることができる。

【0374】

配列の一方又は両方におけるモノマーの選択は、モノマーが対合をしないか、あるいは他方の配列の対応するモノマーとの対を形成し、その対が安定性を最小限にする（例えば、一方の配列の選択部位のモノマーと他方の配列の対応する部位のモノマーとの間で形成

されるH結合は、一方（又は両方）の配列のモノマーと各々の標的配列とにより形成されるH結合よりも安定性が劣る）ようになされる。一方又は両方の鎖におけるモノマーの選択はまた、鎖とその標的配列により作製される二本鎖の一方又は両方における安定性を促進するように為される。例えば、1つ又はそれ以上のモノマー及び標的配列の選択は、選択位置又は制約位置で、iRNA剤二本鎖中でH結合が形成されないか、もしくは非標準的な対合が形成されるか、あるいはそうでなければ予め選択した値の会合の自由エネルギー未満であるか、又は例えば標準的な対合の会合の自由エネルギーよりも低い会合の自由エネルギーを付与するように対合するが、一方（又は両方の）配列が各々の標的と二本鎖を形成する場合は、選択部位又は制約部位での対合は標準的なワトソンクリック対であるようにすることができる。

10

【0375】

このようなモノマーを含むことにより、以下の1つ又はそれ以上の効果、すなわち：iRNA剤二本鎖を不安定化すること、センス配列と意図されない標的配列（オフターゲット配列と称することもある）との間の相互作用を不安定化すること、配列と意図される標的との間の相互作用は不安定化されないこと、を有することになる。

【0376】

例を挙げる。

第1の配列の選択部位のモノマーは、A（又はTと対合する修飾塩基）を含み、第2の配列の選択位置のモノマーは、対合しないか、又は非標準的な対合を形成するモノマー（例えば、G）から選ばれる。これらは、第1の配列の標的配列が選択位置にTを有する場合の用途において有用である。標的二本鎖がともに安定化される実施形態では、第2の鎖の標的配列が、第2の鎖の選択位置に関して選択されるモノマーと標準的なワトソンクリック対を形成するモノマーを有する場合に有用である。

20

【0377】

第1の配列の選択部位のモノマーは、U（又はAと対合する修飾塩基）を含み、第2の配列の選択位置のモノマーは、対合しないか、又は非標準的な対合を形成するモノマー（例えば、U又はG）から選ばれる。これらは、第1の配列の標的配列が選択位置にTを有する場合の用途において有用である。標的二本鎖がともに安定化される実施形態では、第2の鎖の標的配列が、第2の鎖の選択位置に関して選択されるモノマーと標準的なワトソンクリック対を形成するモノマーを有する場合に有用である。

30

【0378】

第1の配列の選択部位のモノマーは、G（又はCと対合する修飾塩基）を含み、第2の配列の選択位置のモノマーは、対合しないか、又は非標準的な対合を形成するモノマー（例えば、G、A_{シス}、A_{トランス}、又はU）から選ばれる。これらは、第1の配列の標的配列が選択位置にTを有する場合の用途において有用である。標的二本鎖がともに安定化される実施形態では、第2の鎖に関する標的配列が、第2の鎖の選択位置に関して選択されるモノマーと標準的なワトソンクリック対を形成するモノマーを有する場合に有用である。

【0379】

第1の配列の選択部位のモノマーは、C（又はGと対合する修飾塩基）を含み、第2の配列の選択位置のモノマーは、対合しないか、又は非標準的な対合を形成するモノマーから選ばれる。これらは、第1の配列の標的配列が選択位置にTを有する場合の用途において有用である。標的二本鎖がともに安定化される実施形態では、第2の鎖に関する標的配列が、第2の鎖の選択位置に関して選択されるモノマーと標準的なワトソンクリック対を形成するモノマーを有する場合に有用である。

40

【0380】

天然に存在しないモノマー又は修飾モノマー（単数又は複数）の選択は、天然に存在しないモノマー又は修飾モノマーがiRNA剤の選択位置又は制約位置に配置される場合は第1の解離の自由エネルギーを示し、かつそれらの一方（又は両方）が天然に存在するモノマーと対合する場合は、対が第2の解離の自由エネルギーを示す（通常、第2の解離の

50

自由エネルギーは、第1のモノマーと第2のモノマーの対合の解離の自由エネルギーよりも高い)ように実施することができる。例えば、第1のモノマー及び第2のモノマーが相補的位置を占める場合、第1のモノマー及び第2のモノマーは、対合もせず、実質的レベルのH結合も有さないか、又は、該モノマーの一方が天然に存在するモノマーと形成するよりも弱い結合を形成して、その二本鎖の安定性を低減するが、その二本鎖が解離すると、少なくとも一方の鎖は標的と二本鎖を形成し、標的との二本鎖においては、選択モノマーは安定性を促進する(例えばモノマーは、標的配列中の天然に存在するモノマーと、iRNA剤において形成される対合よりも安定な対を形成する)。

【0381】

このような対の例は、2-アミノA、及びU又はTの2-チオピリミジン類縁体のいずれかである。 10

iRNA剤の相補的位置に配置される場合、これらのモノマーはほとんど対合せず、安定性は最小限となる。しかしながら、2-アミノAと天然に存在する標的のUとの間で二本鎖が形成されるか、あるいは、2-チオUと天然に存在する標的のAとの間、又は2-チオTと天然に存在する標的のAとの間で二本鎖が形成され、比較的高い解離の自由エネルギーを有し、かつより安定となる。

【0382】

センス鎖の選択位置のモノマーは、普遍的に対合する構成部分であり得る。普遍的に対合する物質は、2個以上、好ましくはすべての天然に存在するモノマーとある程度のレベルのH結合を形成する。普遍的に対合する部分の例は、3-ニトロピロールを含むモノマーである。(普遍的な塩基類縁体の他の候補は、例えばロックス(L o a k e s)、2001年、NAR 29:2437~2447ページ(参照により本明細書に援用される)に見出すことができる。例はまた、以下の普遍的塩基に関するセクションに見出すことができる。)これらの場合、アンチセンス鎖の対応する位置のモノマーは、標的と二本鎖を形成するその能力に応じて選ぶことができ、例えばA、U、G又はCを挙げることができる。 20

【0383】

本発明のiRNA剤は、以下のものを包含することができる：

好ましくは対象中に存在する配列を標的としないセンス配列、及び対象中の標的遺伝子を標的とするアンチセンス配列。センス配列及びアンチセンス配列は、例えば生理学的条件下で(例えば生理学的条件下であるが、ヘリカーゼ又は他の巻き戻し酵素とは接触しない条件下で)互いにハイブリダイズするのに十分な相補性を有する。iRNA剤の二本鎖領域では、選択位置又は制約位置について、モノマーは以下を満たすように選択される： 30

センス配列のモノマーは、該モノマーが対合しないか、あるいはアンチセンス鎖の対応するモノマーと安定性を最小限にするような対を形成する(例えば、センス配列における選択部位のモノマーとアンチセンス鎖の対応する部位のモノマーとの間で形成されるH結合は、アンチセンス配列のモノマーとその標準的なワトソンクリックパートナー(アンチセンス鎖中のモノマーが修飾塩基を含む場合には、該修飾塩基の天然型類縁体とその標準的なワトソンクリックパートナー)により形成されるH結合よりも安定性が劣る)ように選択されること； 40

アンチセンス鎖の対応する位置のモノマーは、該モノマーが標的配列とともに形成する二本鎖の安定性を最大限にすること、例えば、該モノマーが標的鎖上の対応する位置のモノマーと標準的なワトソンクリック対を形成するように選択されること；

任意選択で、センス配列のモノマーは、該モノマーが対合しないか、あるいはアンチセンス鎖の対応するモノマーと、オフターゲット配列との安定性を最小限にするような対を形成すること。

【0384】

このようなモノマーを含むことにより、以下の1つ又はそれ以上の効果、すなわち、iRNA剤二本鎖を不安定化すること、センス配列と意図されない標的配列(オフターゲット配列と称することもある)との間の相互作用を不安定化すること、アンチセンス配列と 50

意図される標的との間の二本鎖相互作用は不安定化されないこと、を有することになる。

【0385】

モノマーに与えられる制約は、選択部位に、あるいは2個以上の選択部位に適用され得る。例えば、iRNA剤二本鎖において、2個以上であるが、3個未満、4個未満、5個未満、6個未満又は7個未満の部位に制約が適用され得る。

【0386】

制約部位又は選択部位は、iRNA剤二本鎖の多数の位置に存在することができる。例えば、制約部位又は選択部位は、二本鎖の配列の3'末端又は5'末端の一方から3位、4位、5位又は6位以内の位置に存在することができる。制約部位又は選択部位は、二本鎖領域の中央に存在することも可能であり、例えば、制約部位又は選択部位は、二本鎖領域の末端から4位以上、5位以上、6位以上又は7位以上の位置であり得る。

10

【0387】

iRNA剤は、本明細書中に記載する遺伝子のいずれかを含む広範囲の遺伝子を標的とするように選択することができる。

好ましい実施形態では、iRNA剤は、本明細書中に記載する構成様式を有する（構成様式とは、全体の長さ、二本鎖領域の長さ、突出部の存在、数、位置又は長さ、二本鎖の形態に対する単鎖の形態のうち、1つ又はそれ以上を指す）。

【0388】

例えば、iRNA剤は、30ヌクレオチド長未満、例えば21～23ヌクレオチド長であり得る。好ましくは、iRNAは21ヌクレオチド長であり、約19対の二本鎖領域が存在する。一実施形態では、iRNAは、21ヌクレオチド長であり、iRNAの二本鎖領域は19ヌクレオチド長である。別の実施形態では、iRNAは30ヌクレオチド長を上回る。

20

【0389】

幾つかの実施形態では、iRNA剤の二本鎖領域は、選択部位又は制約部位（単数又は複数）のほかに、ミスマッチを有する。好ましくは、iRNA剤の二本鎖領域は、標準的なワトソンクリック対を形成しないか、又はハイブリダイズしない1個以下、2個以下、3個以下、4個以下又は5個以下の塩基を有する。突出部については、本明細書中の他の箇所でも詳述しているが、好ましくは約2ヌクレオチド長である。突出部は、標的とされる遺伝子配列に対して相補的であってもよいし、又は他の配列でもよい。TTは、突出部の好ましい配列である。第1のiRNA剤配列及び第2のiRNA剤配列はまた、例えばヘアピンを形成するための追加の塩基により、あるいは他の非塩基リンカーにより連結させることができる。

30

【0390】

1つ又はそれ以上の選択パートナー又は制約パートナーは、センス配列及びアンチセンス配列の選択部位のモノマーがいずれも天然に存在するリボヌクレオチド又は天然に存在する塩基を有する修飾リボヌクレオチドであり、かつiRNA剤二本鎖において相補的部位を占める場合、対合もせず、実質的レベルのH結合も有さないか、又は非標準的ワトソンクリック対を形成して非標準的なパターンのH結合を形成する（この非標準的ワトソンクリック対は通常、ワトソンクリック対合で見られるよりも低い解離の自由エネルギーを有するか、あるいはそうでなければ予め選択した値の会合の自由エネルギー未満であるか、又は例えば標準的な対合の会合の自由エネルギーよりも低い会合の自由エネルギーを付与するように対合する）ように使用することができる。iRNA剤の配列のうちの一方、通常アンチセンス配列が、別の配列、通常は対象中に存在する配列、及び一般に標的配列と二本鎖を形成する場合、モノマーは、標的上の相補的位置の塩基と古典的なワトソンクリック対を形成するか、あるいはiRNA剤における対合で見られるよりも高い解離の自由エネルギー及び高いT_mを有する非標準的なワトソンクリック対を形成する。任意選択で、iRNA剤の他方の配列、通常センス配列が、別の配列、通常は対象中に存在する配列、及び一般にオフターゲット配列と二本鎖を形成する場合、モノマーは、オフターゲット配列上の相補的位置の塩基と標準的なワトソンクリック対を形成すること

40

50

ができず、例えば、モノマーは、より低い解離の自由エネルギー及びより低い T_m を有する非標準的なワトソン・クリック対を形成する。

【0391】

例を挙げる。

アンチセンス鎖における選択部位のモノマーはA（又はTと対合する修飾塩基）を含み、標的における対応するモノマーはTであり、センス鎖は、対合しないか、又は非標準的な対を形成する塩基から選ばれる（例えば、G）；

アンチセンス鎖における選択部位のモノマーはU（又はAと対合する修飾塩基）を含み、標的における対応するモノマーはAであり、センス鎖は、対合しないか、又は非標準的な対を形成する塩基から選ばれる（例えば、U又はG）；

アンチセンス鎖における選択部位のモノマーはC（又はGと対合する修飾塩基）を含み、標的における対応するモノマーはGであり、センス鎖は、対合しないか、又は非標準的な対を形成する塩基から選ばれる（例えば、G、A_{シス}、A_{トランス}又はU）；または、

アンチセンス鎖における選択部位のモノマーはG（又はCと対合する修飾塩基）を含み、標的における対応するモノマーはCであり、センス鎖は、対合しないか、又は非標準的な対を形成する塩基から選ばれる。

【0392】

別の実施形態では、天然に存在しないモノマー又は修飾モノマー（単数又は複数）は、該モノマーがiRNA剤における相補的な位置を占める場合は第1の解離の自由エネルギーを示し、かつそれらの一方（又は両方）が天然に存在するモノマーと対合する場合は、その対は第2の解離の自由エネルギーを示す（通常、第2の解離の自由エネルギーは、第1のモノマーと第2のモノマーの対合の解離の自由エネルギーよりも高い）ように選ばれる。例えば、第1のモノマー及び第2のモノマーが相補的な位置を占める場合、第1のモノマー及び第2のモノマーは、対合もせず、実質的レベルのH結合も有さないか、又は該モノマーの一方が天然に存在するモノマーと形成するよりも弱い結合を形成して、その二本鎖の安定性を低減するが、二本鎖が解離すると、少なくとも1つの鎖は標的と二本鎖を形成し、標的との二本鎖においては選択モノマーが安定性を促進する（例えばモノマーは、標的配列中の天然に存在するモノマーとともに、iRNA剤において形成される対合よりも安定な対を形成する）。

【0393】

このような対の例は、2-アミノA、及びUもしくはTの2-チオピリミジン類縁体のいずれかである。上述のように、iRNA剤の相補的な位置に配置される場合、これらのモノマーは、ほとんど対合せず、安定性は最小限となる。しかしながら、二本鎖は、2-アミノAと天然に存在する標的のUとの間で形成されるか、あるいは二本鎖は、2-チオUと天然に存在する標的のAとの間、又は2-チオTと天然に存在する標的のAとの間で形成され、比較的高い解離の自由エネルギーを有し、かつより安定である。

【0394】

センス鎖の選択位置のモノマーは、普遍的に対合する構成部分であり得る。普遍的に対合する物質は、2個以上、好ましくはすべての天然に存在するモノマーとある程度のレベルのH結合を形成する。普遍的に対合する部分の例は、3-ニトロピロールを含むモノマーである。普遍的な塩基類縁体の他の候補は、例えばロックス（Loakes）、2001年、NAR 29:2437~2447ページ（参照により本明細書に援用される）に見出すことができる。これらの場合、アンチセンス鎖の対応する位置のモノマーは、標的と二本鎖を形成するその能力に応じて選ぶことができ、例えばA、U、G又はCを挙げることができる。

【0395】

別の態様では、本発明は、以下のものを包含するiRNA剤を特徴とする：

好ましくは対象者中に存在する配列を標的としないセンス配列、及び対象者中の複数の標的遺伝子を標的とするアンチセンス配列（ここで、標的の配列は、1位のみ又は少数、例えば5個以下、4個以下、3個以下又は2個以下の位置で異なっている）。該センス配

10

20

30

40

50

列及びアンチセンス配列は、例えば生理学的条件下で（例えば生理学的条件下であるが、ヘリカーゼ又は他の巻き戻し酵素とは接触しない条件下で）互いにハイブリダイズするのに十分な相補性を有する。iRNA剤のアンチセンス鎖の配列は、標的配列間で配列が異なる位置に相当する位置のうち1つ、幾つか又はすべてについて、アンチセンス鎖が、少なくとも2つの異なる標的配列とH結合を形成するモノマーを含むように選択される。好ましい例では、アンチセンス配列は、普遍的モノマー又は無差別に対合するモノマー、例えば5-ニトロピロール、2-アミノA、2-チオU又は2-チオT、あるいは本明細書中で言及する他の普遍的塩基を包含するモノマーを含む。

【0396】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、単一の遺伝子、複数の遺伝子又はウイルスゲノム（例えば、HCVゲノム）中の反復配列（互いに1部位のみ又は少数の部位が異なる反復配列）を標的とする。

【0397】

一実施形態を図2及び図3に示す。

別の態様では、本発明は、例えば測定又は計算により、iRNA剤二本鎖における選択位置又は制約位置のモノマーの間の対合の安定性を決定すること、かつ好ましくは、iRNA剤由来の配列と別のRNA（例えば、標的配列）との間の二本鎖における対応する対合の安定性を決定することの特徴とする。決定の結果を、比較することができる。したがって、分析したiRNA剤を、さらに修飾したRNA剤の開発に使用することもできるし、あるいは対象に投与することもできる。このような分析は、最適化されたiRNA剤を洗練又は設計するために引き続いて実施することができる。

【0398】

別の態様では、本発明は、1つ又はそれ以上の本明細書中以下に記載するiRNAと、該iRNA剤が封入される滅菌容器と、使用に関する説明書とを含むキットを特徴とする。

【0399】

別の態様では、本明細書中に記載する方法により作製される制約配列を含有するiRNA剤を特徴とする。該iRNA剤は、本明細書中で言及する1つ又はそれ以上の遺伝子を標的とすることができる。

【0400】

例えば本明細書中に記載するような制約部位又は選択部位を有するiRNA剤は、本明細書中に記載する任意の方法で使用することができる。したがって、例えば本明細書中に記載するような制約部位又は選択部位を有するiRNA剤は、例えば本明細書中に記載する方法のいずれかにおいて標的をサイレンシングするために、また本明細書中に記載する遺伝子のいずれかを標的とするために、あるいは本明細書中に記載する障害のいずれかを治療するために使用することができる。例えば本明細書中に記載するような制約部位又は選択部位を有するiRNA剤は、任意の製剤又は調製物、例えば本明細書中に記載する医薬品又は滅菌調製物に組み込むことができる。例えば本明細書中に記載する制約部位又は選択部位を有するiRNA剤は、本明細書中に記載する投与経路のいずれかにより投与することができる。

【0401】

「標準的なワトソン-クリック以外の対合」という用語は、本明細書中で使用する場合は、二本鎖の第1の配列の第1のモノマーと第2の配列の対応する位置の第2のモノマーとの間での対合であって、下記のうち1つまたはそれ以上が事実であるものを指す：（1）該2つのモノマーの間に本質的に対合が存在しない、例えばモノマー間に有意なレベルのH結合が存在しないか、あるいはモノマー間の結合が二本鎖の安定性に対していかなる有意な寄与もしていない、（2）該モノマーが、天然に存在する塩基を有する非標準的なモノマー対である、すなわち、A-T、A-U又はG-C以外であり、かつ該モノマーは、モノマー間のH結合を形成するが、概して形成されるH結合パターンは、標準的な対合により形成される結合よりも弱い、あるいは（3）該モノマーの少なくとも1つは天然に存

10

20

30

40

50

在しない塩基を包含し、かつモノマー間で形成されるH結合は、好ましくは、標準的な対合すなわちA-T、A-U、G-Cのうち1つ又はそれ以上により形成される結合よりも弱い。

【0402】

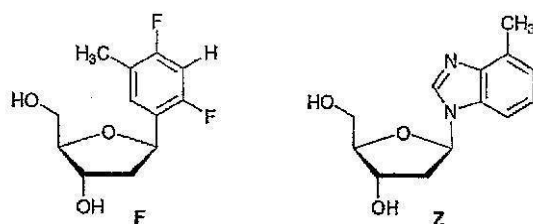
「オフターゲット」という用語は、本明細書中で使用する場合、サイレンシングされるべき配列以外の配列を指す。

普遍的塩基：「ワイルドカード」；形状に基づいた相補性

（「ジフルオロトルエンとアデニンとの間の塩基対の、二本鎖の多重部位における複製：「逆」シーケンシングによる確認 (Bi-stranded, multisite replication of a base pair between difluorotoluene and adenine: confirmation by 'inverse' sequencing.)」、リウ、ディー；モラン、エス；クール、イー．ティー (Liu, D. ; Moran, S ; Kool, E. T.)、Chem. Biol.、1997年、第4巻、919～926ページ)

【0403】

【化28】



20

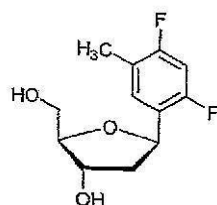
【0404】

（「DNAポリメラーゼIのクレノウ断片による3'末端プルーフリーディングにおける末端塩基対水素結合の重要性 (Importance of terminal base pair hydrogen-bonding in 3'-end proofreading by the Klenow fragment of DNA polymerase I.)」、モラレス、ジェー．シー；クール、イー．ティー (Morales, J. C ; Kool, E. T.)、Biochemistry、2000年、第39巻、2626～2632ページ)

（「水素結合を伴わない選択的かつ安定なDNA塩基対合 (Selective and stable DNA base pairing without hydrogen bonds.)」、マトレイ、ティー、ジェー；クール、イー、ティー (Matray, T. J ; Kool, E. T.)、J. Am. Chem. Soc.、1998年、第120巻、6191～6192ページ)

【0405】

【化29】



40

【0406】

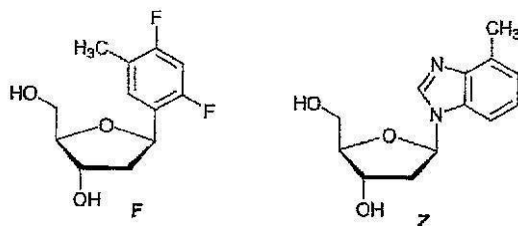
（「チミンに関する無極性同配体であるジフルオロトルエンは、DNA複製において特異的かつ効率的にアデニンをコードする (Difluorotoluene, a nonpolar isostere for thymine, codes specifically and efficiently for adenine in DNA replication.)」、モラン、S；レン、アール．エックス．ーエフ；ラムネイ アイブイ、エス；クール、イー．ティー (Moran, S. Ren, R. X. -F ; Rumney IV, S ; Kool, E. T.)、J. Am. Chem. Soc.、1997年、第119巻、2056～2057ページ)

（「デオキシアデノシンに関する複製可能な無極性同配体の構造及び塩基対特性 (Stru 50

cture and base pairing properties of replicable nonpolar isostere for deoxyadenosine.)」、グクキアン、ケー．エム；モラレス、イー．ティー（Guckian, K. M. ; Morales, J. C. ; Kool, E. T. ）、Org. Chem. 、1998年、第63巻9653～9656ページ）

【0407】

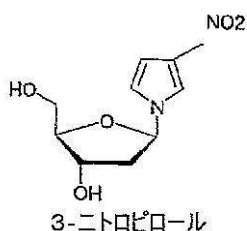
【化30】



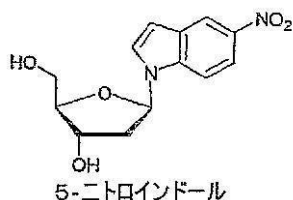
10

【0408】

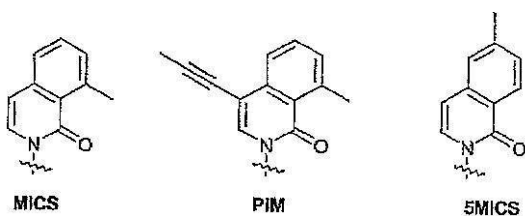
【化31】



20



30



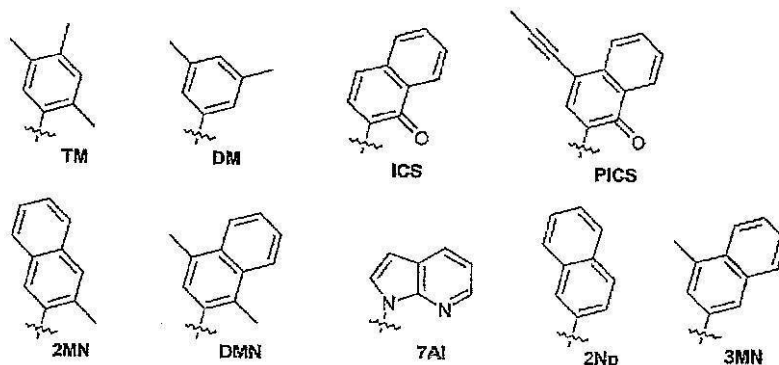
【0409】

（「ハイブリダイゼーション、複製及び鎖終結用の普遍的塩基（Universal bases for hybridization, replication and chain termination.）」、バーガー、エム；ウー．ワイ．；オガワ、エー．ケー．；マクミン、ディー．エル．；シュルツ、ピー．ジー．；ロメスベルグ、エフ．イー．（Berger, M. ; Wu, Y. ; Ogawa, A. K. ; McMin, D. L. ; Schultz, P. G. ; Romesberg, F. E. ）、Nucleic Acids Res. 、2000年、第28巻、2911～2914ページ）

40

【0410】

【化 3 2】



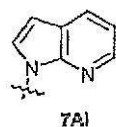
10

【0 4 1 1】

(1. 「遺伝子アルファベットの拡大に対する取り組み：非天然の疎水性塩基対による情報保存及び複製 (Efforts toward expansion of the genetic alphabet: Information storage and replication with unnatural hydrophobic base pairs.)」、オガワ、エー. ケー. ; ウー. ワイ. ; マクミン、ディー. エル. ; リウ、ジェー. ; シュルツ、ピー. ジー. ; ロメスベルグ、エフ. イー. (Ogawa, A. K. ; Wu. Y. ; McMinn, D. L. ; Liu, J. ; Schultz, P. G. ; Romesberg, F. E.)、J. Am. Chem. Soc.、2000年、第122巻、3274~3287
20
ページ。2. 「動力的選択性の増大による非天然塩基対の合理的設計 (Rational design of an unnatural base pair with increased kinetic selectivity.)」、オガワ、エー. ケー. ; ウー. ワイ. ; バーガー、エム ; シュルツ、ピー. ジー. ; ロメスベルグ、エフ. イー. (Ogawa, A. K. ; Wu. Y. ; Berger, M. ; Schultz, P. G. ; Romesberg, F. E.)、J. Am. Chem. Soc.、2000年、第122巻、8803~8804ページ)

【0 4 1 2】

【化 3 3】



30

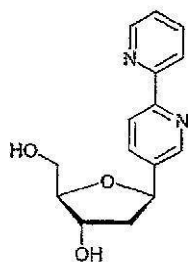
【0 4 1 3】

(「遺伝子アルファベットの拡大に対する取り組み：3つの塩基対によるDNAの複製 (Efforts toward expansion of the genetic alphabet: replication of DNA with three base pairs.)」、タエ、イー. エル. ; ウー. ワイ. ; キシア、ジー. ; シュルツ、ピー. ジー. ; ロメスベルグ、エフ. イー. (Tae, E. L. ; Wu. Y. ; Xia, G. ; Schultz, P. G. ; Romesberg, F. E.)、J. Am. Chem. Soc.、2001年、第123巻、7439~7440ページ)

40

【0 4 1 4】

【化 3 4】



10

【0 4 1 5】

(1. 「遺伝子アルファベットの拡大に対する取り組み：塩基間疎水性相互作用の最適化 (Efforts toward expansion of the genetic alphabet: Optimization of interbase hydrophobic interactions.)」、ウー. ワイ. ; オガワ、エー. ケー. ; バーガー、エム ; マクミン、ディー. エル. ; シュルツ、ピー. ジー. ; ロメスベルグ、エフ. イー. (Wu. Y. ; Ogawa, A. K. ; Berger, M. ; McMinnn, D. L. ; Schultz, P. G. ; Romesberg, F. E.)、J. Am. Chem. Soc.、2000年、第122巻、7621~7632ページ。2. 「遺伝子アルファベットの拡大に対する取り組み：非常に安定な自己対合疎水性塩基のDNAポリメラーゼ認識 (Efforts toward expansion of the genetic alphabet: DNA polymerase recognition of a highly stable, self-pairing hydrophobic base.)」、マクミン、ディー. エル. ; オガワ、エー. ケー. ; ウー. ワイ. ; リウ、ジェー. ; シュルツ、ピー. ジー. ; ロメスベルグ、エフ. イー. (McMinnn, D. L. ; Ogawa, A. K. ; Wu. Y. ; Liu, J. ; Schultz, P. G. ; Romesberg, F. E.)、J. Am. Chem. Soc.、1999年、第121巻、11585~11586ページ)

20

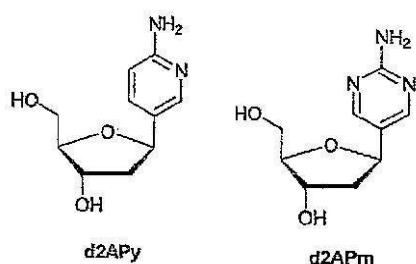
(「非水素結合及び非形状相補的塩基対を含有する安定なDNA二本鎖：安定性決定因子としての鎖間スタッキング (A stable DNA duplex containing a non-hydrogen-bonding and non-shape complementary base couple: Interstrand stacking as the stability determining factor.)」、ボロットチー、シー. ; ハベルリー、エー. ; ロイマン、シー (Brotschi, C. ; Harberli, A. ; Leumann, C. J.)、Angew. Chem. Int. Ed.、2001年、第40巻、3012~3014ページ)

30

(「2, 2'-ビピリジンリガンドシド：二本鎖内金属錯体によりDNAを修飾するための新規構成単位 (2,2'-Bipyridine Ligandocside: A novel building block for modifying DNA with intra-duplex metal complexes.)」、ワイツマン、エイチ. ; トル、ワイ (Weizmann, H. ; Tor, Y.)、J. Am. Chem. Soc.、2001年、第123巻、3375~3376ページ)

【0 4 1 6】

【化 3 5】



40

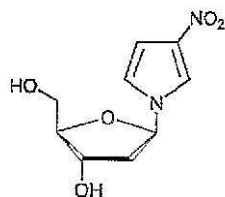
【0 4 1 7】

50

(「副溝の水和は、DNA二本鎖の安定性に重要である (Minor groove hydration is critical to the stability of DNA duplexes.)」、ラン、ティー.; マクロウグリン、エル. ダブリュ (Lan, T.; McLaughlin, L. W.), J. Am. Chem. Soc., 2000年、第122巻、6512~6513ページ)

【0418】

【化36】



10

【0419】

(「隣接天然塩基の選択性に対する普遍的塩基である3-ニトロピロールの影響 (Effects of the Universal base 3-nitropyrrole on the selectivity of neighboring natural bases.)」、オリバー、ジェー. エス.; パーカー、ケー. エー.; サグス、ジェー. ダブリュ. (Oliver, J. S.; Parker, K. A.; Suggs, J. W.), Organic Lett., 2001年、第3巻、1977~1980ページ。

2. 「DNA二本鎖及び三本鎖の安定性に対する1-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-3-ニトロピロール残基の影響 (Effects of the 1-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrol residue on the stability of DNA duplexes and triplexes.)」、アモソバ、オー.; ジョージ、ジェー.; フレスコ、ジェー. アール. (Amosova, O.; George J.; Fresco, J. R.), Nucleic Acids Res., 1997年、第25巻、1930~1934ページ。

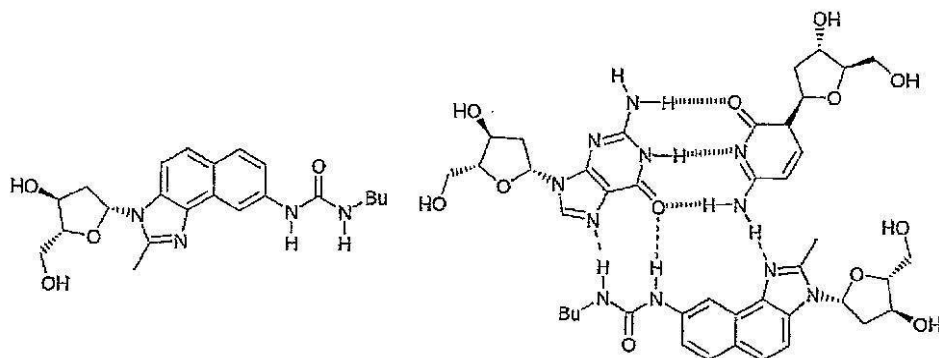
3. 「普遍的ヌクレオシド：1-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-3-ニトロピロールによる合成、構造及びデオキシリボ核酸シーケンシング (Synthesis, structure and deoxyribonucleic acid sequencing with a universal nucleosides: 1-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrol.)」、バークストロム、ディー. イー.; ツァング、ピー.; トマ、ピー. エイチ.; アンドリュース、ピー. シー.; ニコルズ、アール. (Bergstorm, D. E.; Zhang, P.; Toma, P. H.; Andrews, P. C.; Nichols, R.), J. Am. Chem. Soc., 1995年、第117巻、1201~1209ページ)

20

30

【0420】

【化37】



40

【0421】

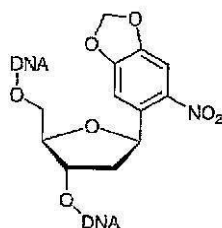
(「一般的な三本鎖DNA認識スキームを対象とするモデル研究：有機溶媒中でCG塩基対を結合する新規DNA塩基 (Model studies directed toward a general triplex DNA recognition scheme: a novel DNA base that binds a CG base-pair in an organic s

50

olvent.)」、ジーママン、エス. シー. ; シュミット、ピー. (Zimmerman, S. C. ; Schmitt, P.)、J. Am. Chem. Soc. 、1995年、第117巻、10769～10770ページ)

【0422】

【化38】



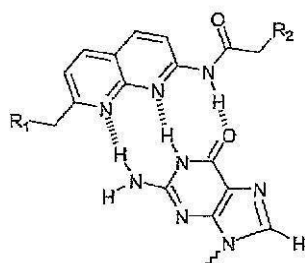
10

【0423】

(「普遍的光切断DNA塩基：ニトロピペロニル2'-デオキシリボシド (A universal, photocleavable DNA base: nitropiperonyl 2'-deoxyriboside.)」、J. Org. Chem. 、2001年、第66巻、2067～2071ページ)

【0424】

【化39】



20

【0425】

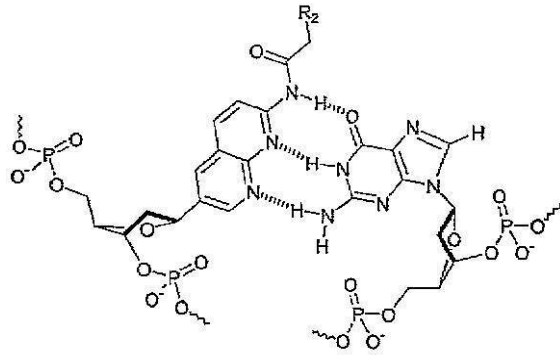
(「2-アシルアミノ-1, 8-ナフチリジンによる単一グアニンバルジの認識 (Recognition of a single guanine bulge by 2-acylamino-1,8-naphthyridine.)」、ナカタニ、ケー. ; サンド、エス. ; サイトー、アイ. (Nakatani, K. ; Sando, S. ; Saito, I.)、J. Am. Chem. Soc. 、2000年、第122巻、2172～2177ページ。b. 「GCダブルットの光酸化により明らかであるような単一グアニンバルジへの2-アミノ-1, 8-ナフチリジンの特異的結合 (Specific binding of 2-amino-1,8-naphthyridine into single guanine bulge as evidenced by photooxidation of GC doublet.)」、ナカタニ、ケー. ; サンド、エス. ; ヨシダ、ケー. ; サイトー、アイ. (Nakatani, K. ; Sando, S. ; Yoshida, K. ; Saito, I.)、Bioorg. Med. Chem. Lett. 、2001年、第11巻、335～337ページ)

30

【0426】

40

【化 4 0】



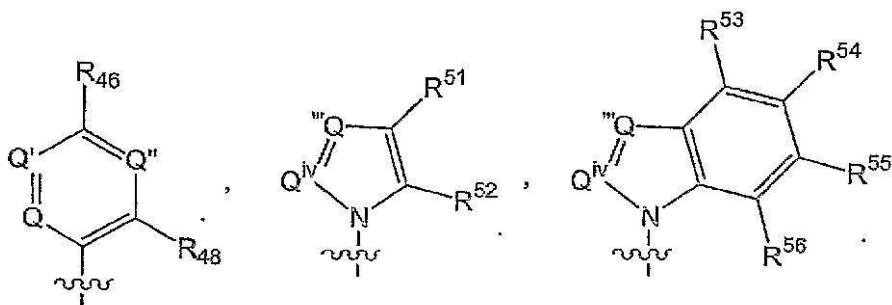
10

【 0 4 2 7】

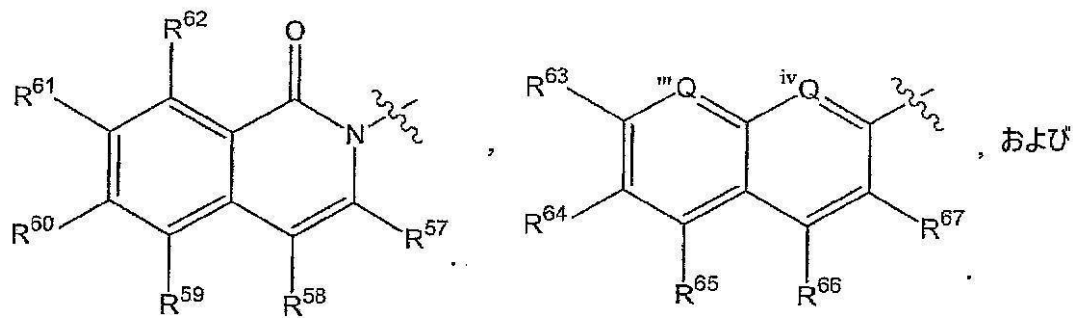
他の普遍的塩基は、下記式を有することができる：

【 0 4 2 8】

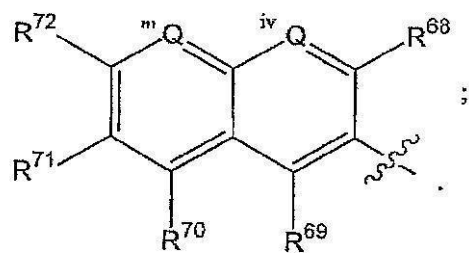
【化 4 1】



20



30



40

【 0 4 2 9】

(式中、

Qは、N又はC R^{4 4}であり、

50

Q' は、N又は CR^{45} であり、

Q'' は、N又は CR^{47} であり、

Q''' は、N又は CR^{49} であり、

Q^{iv} は、N又は CR^{50} であり、

R^{44} は、水素、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、保護ヒドロキシ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリルであるか、あるいは R^{45} と一体となって $-OCH_2O-$ を形成し、

R^{45} は、水素、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、保護ヒドロキシ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリルであるか、あるいは R^{44} 又は R^{46} と一体となって $-OCH_2O-$ を形成し、

R^{46} は、水素、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、保護ヒドロキシ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリルであるか、あるいは R^{45} 又は R^{47} と一体となって $-OCH_2O-$ を形成し、

R^{47} は、水素、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、保護ヒドロキシ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリルであるか、あるいは R^{46} 又は R^{48} と一体となって $-OCH_2O-$ を形成し、

R^{48} は、水素、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、保護ヒドロキシ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリルであるか、あるいは R^{47} と一体となって $-OCH_2O-$ を形成し、

R^{49} 、 R^{50} 、 R^{51} 、 R^{52} 、 R^{53} 、 R^{54} 、 R^{57} 、 R^{58} 、 R^{59} 、 R^{60} 、 R^{61} 、 R^{62} 、 R^{63} 、 R^{64} 、 R^{65} 、 R^{66} 、 R^{67} 、 R^{68} 、 R^{69} 、 R^{70} 、 R^{71} 及び R^{72} はそれぞれ独立して、水素、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、保護ヒドロキシ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリル、 $NC(O)R^{17}$ 、又は $NC(O)R^0$ から選択され、

R^{55} は、水素、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、保護ヒドロキシ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリル、 $NC(O)R^{17}$ 、又は $NC(O)R^0$ であるか、あるいは R^{56} と一体となって縮合芳香環を形成し、該縮合芳香環は任意選択で置換されていてもよく、

R^{56} は、水素、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、保護ヒドロキシ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリル、 $NC(O)R^{17}$ 、又は $NC(O)R^0$ であるか、あるいは R^{55} と一体となって縮合芳香環を形成し、該縮合芳香環は任意選択で置換されていてもよく、

R^{17} は、ハロ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c であり、

R^b は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル又は窒素保護基であり、

R^c は、 $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^0 は、任意選択でハロ、ヒドロキシ、ニトロ、保護ヒドロキシ、 NH_2 、 NHR^b 、又は NR^bR^c 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリル、 $NC(O)R^{17}$ 、又は $NC(O)R^0$ で置換されたアルキルである。))

普遍的塩基の例として以下のものが挙げられる：

[0430]

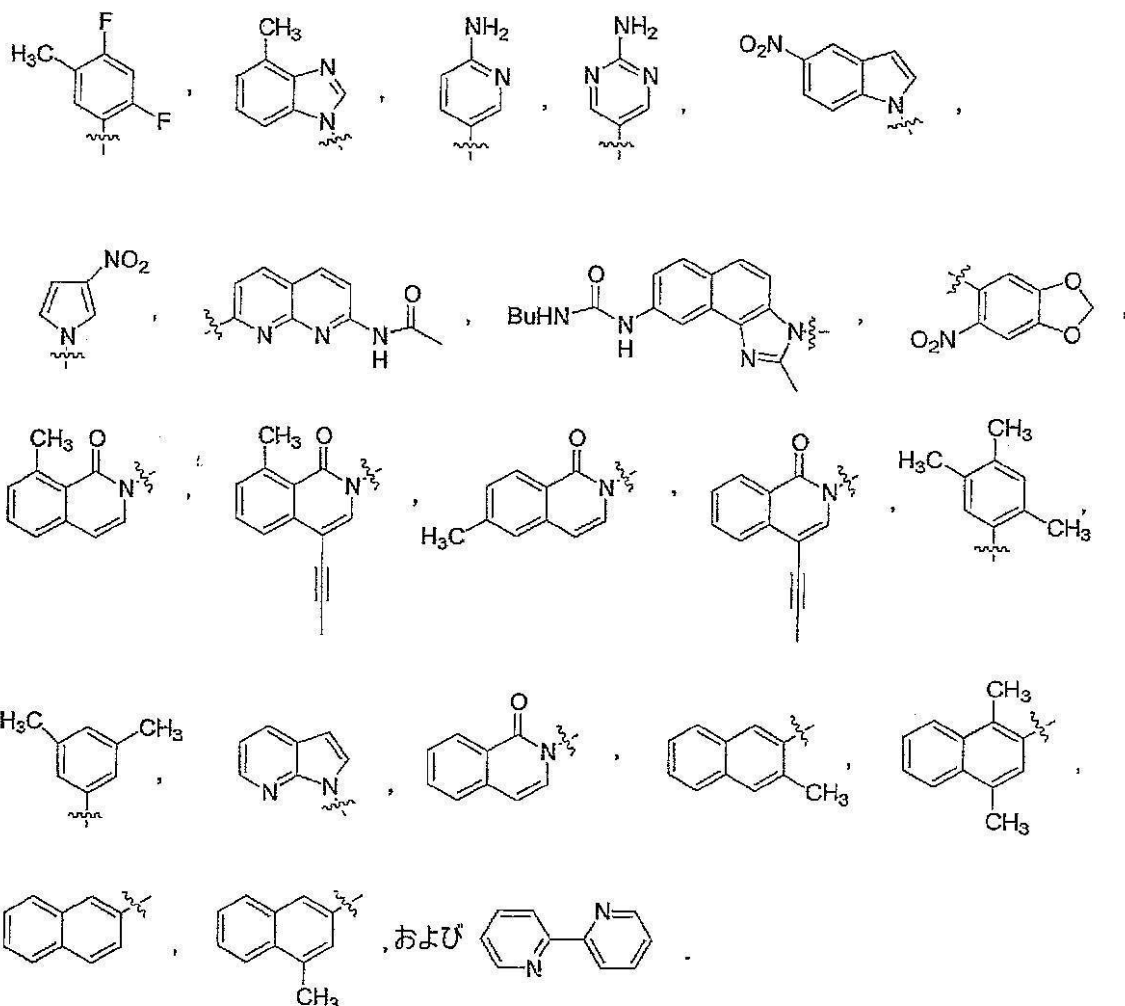
10

20

30

40

【化 4 2】



10

20

30

【 0 4 3 1 】

非対称的な修飾

RNA、例えばiRNA剤は、本明細書中に記載するように、かつ2004年3月8日付けで出願された国際出願第PCT/US04/07070号（これは、参照により本明細書に援用される）に記載されるように、非対称的に修飾することができる。

【 0 4 3 2 】

さらに、本発明は、非対称的な修飾及び本明細書中に記載する別の構成要素を有する iRNA 剤を包含する。例えば、本発明は、本明細書中に記載する iRNA 剤、例えば、パリンドローム構造の iRNA 剤、非標準的な対合を有する iRNA 剤、本明細書中に記載する遺伝子（例えば、腎臓で活性な遺伝子）を標的とする iRNA 剤、本明細書中に記載する構成様式又は構造を有する iRNA 剤、本明細書中に記載する薬物送達モジュールと結合された iRNA、本明細書中に記載するように投与される iRNA 剤、又は本明細書中に記載するように製剤化される iRNA 剤であって、非対称的な修飾も取り入れる iRNA 剤を包含する。

【 0 4 3 3 】

非対称的に修飾された iRNA 剤とは、鎖が他方の鎖上に存在しない修飾を有する iRNA 剤である。非対称的な修飾とは、一方の鎖上に見られるが、他方の鎖上には見られない修飾である。任意の修飾、例えば本明細書中に記載する任意の修飾は、非対称的な修飾

として存在し得る。非対称的な修飾により、修飾に伴う任意の望ましい特性、例えば本明細書中で論述した特性を付与することができる。例えば、非対称的な修飾は、分解に対する耐性、半減期の変更をもたらすこともできるし、iRNA剤に特定の標的（例えば、特定の組織）を指向させることもできるし、鎖のその相補体又は標的配列に対する親和性を調節（例えば、増大又は低減）することもできるし、あるいは末端部分の修飾（例えば、キナーゼ又はRISC機構の経路に関与する他の酵素による修飾）を妨害又は促進することもできる。ある修飾について1つの特性を有するものとして指定しても、該修飾が他の特性を有していないことを意味するわけではない（例えば、安定化を促進する修飾として言及される修飾が、標的化も増強することもありうる）。

【0434】

理論又はいかなる特定の機構モデルによっても拘束されることは望まないが、非対称的な修飾は、iRNA剤をセンス鎖及びアンチセンス鎖の異なるすなわち「非対称的」機能という観点で最適化させることが可能であると考えられる。例えば、両方の鎖がヌクレアーゼ耐性を増大するように修飾されてもよいが、変更によってはRISC活性が阻害され得るため、これらの変更をセンス鎖に関して選択してもよい。さらに、一部の修飾、例えば標的化部分は、例えばRISC複合体の切断活性を妨害しうる大きな嵩高い基を付加することができるので、そのような修飾はセンス鎖に配置されることが好ましい。したがって、標的化部分、特に嵩高い標的化部分（例えば、コレステロール）は、センス鎖に優先的に付加される。一実施形態では、バックボーンのリン酸をSで置換する非対称的修飾、例えばホスホロチオエート修飾がアンチセンス鎖に存在し、かつ2'修飾、例えば2'OMeがセンス鎖に存在する。標的化部分は、iRNA剤のセンス鎖の5'又は3'末端のいずれか（又は両方）に存在し得る。好ましい例では、アンチセンス鎖においてはバックボーンのPがSで置き換えられ、2'OMeがセンス鎖に存在し、標的化部分がiRNA剤のセンス鎖の5'又は3'末端のいずれかに付加される。

【0435】

好ましい実施形態では、非対称的に修飾されたiRNA剤は、アンチセンス鎖上では見られない修飾をセンス鎖上に有し、アンチセンス鎖は、センス鎖上では見られない修飾を有する。

【0436】

鎖はそれぞれ、1つ又はそれ以上の非対称的修飾を包含し得る。例を挙げると、一方の鎖は、iRNA剤に対して第1の特性を付与する第1の非対称的修飾を包含することができる。他方の鎖は、iRNA剤に対して第2に特性を付与する第2の非対称的修飾を有することができる。例えば、一方の鎖、例えばセンス鎖は、iRNA剤が組織を標的とするような修飾を有することができる。他方の鎖、例えばアンチセンス鎖は、標的遺伝子配列とのハイブリダイゼーションを促進する修飾を有する。

【0437】

幾つかの実施形態では、両方の鎖が同じ特性を最適化するように、例えば核酸分解に対する耐性を増大させるように修飾することができるが、例えば修飾がさらに他の特性に影響を及ぼすという理由で、センス鎖及びアンチセンス鎖に関して異なる修飾が選ばれる。例えば、一部の変更は、RISC活性に影響を及ぼし得るため、これらの修飾はセンス鎖について選ばれる。

【0438】

ある実施形態では、一方の鎖は、非対称的な2'修飾、例えば2'OMe修飾を有し、他方の鎖は、リン酸バックボーンの非対称的修飾、例えばホスホロチオエート修飾を有する。したがって、一実施形態では、アンチセンス鎖が非対称的な2'OMe修飾を有し、センス鎖が非対称的なホスホロチオエート修飾を有する（あるいは、その逆でもよい）。特に好ましい実施形態では、本発明のiRNA剤は、センス鎖上に非対称的な2'-Oアルキル、好ましくは2'-OMe修飾を、アンチセンス鎖には非対称的なバックボーンのP修飾、好ましくはホスホロチオエート修飾を有する。1つ又は多数の2'-OMe修飾が存在することができ、例えば、センス鎖の少なくとも2個、3個、4個、5個又は6個

10

20

30

40

50

のサブユニットを2'-OMe修飾することができる。1つ又は多数のホスホロチオエート修飾が存在することができ、例えば、アンチセンス鎖の少なくとも2個、3個、4個、5個又は6個のサブユニットをホスホロチオエート修飾することができる。センス鎖上に多数の2'-OMe修飾及びアンチセンス鎖上に多数のホスホロチオエート修飾が存在するiRNA剤を有することが好ましい。一方又は両方の鎖上のすべてのサブユニットを前記のように修飾することもできる。両方の鎖上の多数の非対称的修飾の特に好ましい実施形態は、長さが約20~21サブユニット、好ましくは19サブユニットの二本鎖領域、及び長さが約2サブユニットの1個又は2個の3'突出部を有する。

【0439】

非対称的な修飾は、ヌクレアーゼ、例えばエンドヌクレアーゼによる分解に対する耐性を促進するのに有用である。iRNA剤は、分解に対する耐性を促進する1つ又はそれ以上の非対称的修飾を包含することができる。好ましい実施形態では、アンチセンス鎖上の修飾は、標的のサイレンシングを妨害しない修飾、例えば標的の切断を妨害しない修飾である。鎖上のすべてではないにしても、ほとんどの部位が、エンドヌクレアーゼによる分解に対してある程度弱い。相対的に弱い部位を特定し、分解を阻害する非対称的修飾を挿入することができる。多くの場合、iRNA剤におけるUA部位の非対称的修飾を提供することが望ましく、場合によっては、両方の鎖上のUA配列に非対称的修飾を提供することが望ましい。エンドヌクレアーゼによる分解を阻害する修飾の例は、本明細書中に見出すことができる。特に好適な修飾としては、2'位修飾（例えば特にセンス鎖上のUへの2'OMe部分の付与）、バックボーンの修飾（例えば、特にアンチセンス鎖上のU若しくはA又はその両方についてリン酸バックボーンのOをSで置き換えること（例えば、ホスホロチオエート修飾の提供）による修飾）、UをC5アミノリンカーで置き換えること、AをGで置き換えること（配列の変更は、センス鎖上に位置し、アンチセンス鎖上には位置しないことが好ましい）、及び2'、6'、7'又は8'位の修飾が挙げられる。好ましい実施形態は、1つ又はそれ以上のこれらの修飾がセンス鎖上に存在するが、アンチセンス鎖上には存在しない実施形態、あるいはアンチセンス鎖のほうがこのような修飾の数が少ない実施形態である。

【0440】

非対称的な修飾は、エキソヌクレアーゼによる分解を阻害するために使用することができる。非対称的な修飾としては、一方の鎖のみが修飾されるもの、ならびに両方が修飾されるものを挙げることができる。好ましい実施形態では、アンチセンス鎖上の修飾は、標的のサイレンシングを妨害しない修飾、例えば標的の切断を妨害しない修飾である。幾つかの実施形態は、センス鎖上、例えば3'突出部の例えば3'末端に、及びアンチセンス鎖上、例えば3'突出部の例えば3'末端に、非対称的修飾を有する。修飾により異なるサイズの構成部分が導入される場合、大きいほうがセンス鎖上に存在することが好ましい。修飾により異なる電荷の構成部分が導入される場合、より大きな電荷を有する部分がセンス鎖上に存在することが好ましい。

【0441】

エキソヌクレアーゼによる分解を阻害する修飾の例は、本明細書中に見出すことができる。特に好適な修飾としては、2'位修飾（例えば3'突出部の例えば3'末端への2'OMe部分の提供（3'末端とは、文脈により示されるように、分子の3'位の原子、又は最も3'側の構成部分、例えば最も3'側のP又は2'位を意味する））、例えばPをSで置き換えること（例えば、ホスホロチオエート修飾の提供）もしくは3'突出部の例えば3'末端におけるメチル化Pの使用によるバックボーンの修飾、2'位修飾の組合せ（例えば、2'OMe部分の提供と、例えばPをSで置き換えること（例えば、ホスホロチオエート修飾の提供）もしくは3'突出部の例えば3'末端におけるメチル化Pの使用によるバックボーンの修飾との組合せ）、3'アルキルによる修飾、3'突出部の例えば3'末端における脱塩基ピロリジンによる修飾、ナプロキセン、イブプロフェン又はその他の分解を阻害する構成部分による3'末端の修飾が挙げられる。好ましい実施形態は、1つ又はそれ以上のこれらの修飾がセンス鎖上に存在するが、アンチセンス鎖上には存在

しないもの、あるいはアンチセンス鎖のほうがこのような修飾の数が少ない実施形態である。

【0442】

標的化に影響を及ぼす修飾、例えば本明細書中に記載する修飾を、非対称的修飾として提供することが可能である。例えば標的の切断を阻害することにより、サイレンシングを阻害し得る標的化修飾は、センス鎖の非対称的修飾として提供され得る。体内分布を変化させる構成部分（例えばコレステロール）は、センス鎖における1つ又はそれ以上（例えば、2つ）の非対称的修飾として提供され得る。比較的大きな分子量（例えば400、500又は1,000ダルトンを上回る分子量）を有する構成部分を導入する標的化修飾、あるいは電荷を有する構成部分（例えば、2つ以上の正電荷又は1つの負電荷を有する構成部分）を導入する標的化修飾は、センス鎖上に配置させることができる。

10

【0443】

鎖のその相補体又は標的に対する親和性を調節する（例えば、増大又は低下させる）修飾、例えば本明細書中に記載する修飾は、非対称的修飾として提供され得る。これらの修飾としては、5メチルU、5メチルC、プソイドウリジン、ロックト核酸、2チオU及び2-アミノ-Aが挙げられる。幾つかの実施形態では、これらの1つ又はそれ以上がアンチセンス鎖上に提供される。

【0444】

iRNA剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を有する規定構造を有し、多くの場合例えば2又は3ヌクレオチドの短い一本鎖の突出部が、一方又は両方の3'末端に存在する。非対称的な修飾を、例えばiRNA内に選択的に位置させることにより、このような構造の活性を最適化するのに使用することができる。例えば、センス鎖の5'末端及びアンチセンス鎖の3'末端により規定されるiRNA剤の末端領域は、機能にとって重要である。この領域は、末端の2個、3個又は4個のヌクレオチド対と任意の3'突出部とを含むことができる。好ましい実施形態では、以下、すなわち：センス鎖のキナーゼ活性化を阻害するセンス鎖5'末端の修飾（例えば、キナーゼ分子を標的とする複合体の結合、又は5'エキソヌクレアーゼによる分解に対して保護的に作用する修飾の使用など）、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合を増強することにより分子のこの末端にある「緊密な」構造を促進する、いずれか一方の鎖、好ましくはセンス鎖の修飾、のうち1つ又はそれ以上をもたらず非対称的修飾が使用される。

20

30

【0445】

センス鎖の3'末端及びアンチセンス鎖の5'末端により規定されるiRNA剤の末端領域もまた機能にとって重要である。この領域は、末端の2個、3個又は4個のヌクレオチド対と任意の3'突出部とを含むことができる。好ましい実施形態は、センス鎖とアンチセンス鎖との間の結合を減少させることにより分子のこの末端にある「開放的な」構造を促進する、いずれか一方の鎖、好ましくはセンス鎖の非対称的修飾を包含する。このような修飾としては、分子を標的とする複合体を配置すること、あるいはセンス鎖のこの領域におけるヌクレアーゼ耐性を促進する修飾が挙げられる。キナーゼ活性化を阻害するアンチセンス鎖の修飾は、好ましい実施形態では回避される。

【0446】

40

センス鎖に非対称的に配置される例示的な修飾としては、以下のものが挙げられる。

(a) バックボーン修飾（例えば、バックボーンのPの修飾）であって、PをSで置き換えること、又はアルキル若しくはアリル（例えば、Me）で置換されたP、及びジチオエート（ $S-P=S$ ）を含む；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するのに使用することができる；

(b) 2'-Oアルキル（例えば、2'-OMe）、3'-Oアルキル（例えば、3'-OMe）（末端及び内部位置の少なくともいずれかを修飾）；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を増強するために使用することができる、3'位修飾は、RISCによるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の5'末端で使用することができる；

50

(c) 2' ~ 5' 結合 (2'-H、2'-OH 及び 2'-OMe によるもの、及び P=O 又は P=S によるもの) ; これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を阻害するために使用することもできるし、あるいは RISC によるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端で使用することもできる ;

(d) L 糖 (例えば、2'-H、2'-OH 及び 2'-OMe を有する 2' L-リボース、L-アラビノース) ; これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を阻害するために使用することもできるし、あるいは RISC によるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端で使用することもできる ;

(e) 修飾糖 (例えば、ロックト核酸 (LNA)、ヘキソース核酸 (HNA) 及びシクロヘキセン核酸 (CeNA)) ; これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を阻害するために使用することもできるし、あるいは RISC によるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端で使用することもできる ;

(f) 核酸塩基修飾 (例えば、C-5 修飾ピリミジン、N-2 修飾プリン、N-7 修飾プリン、N-6 修飾プリン) ; これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するために、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を促進するために使用することができる ;

(g) カチオン基及び双性イオン基 (末端にあることが好ましい) ; これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するために使用することができる ;

(h) 複合体基 (末端位置にあることが好ましい)、例えば、ナプロキセン、ビオチン、コレステロール、イブプロフェン、葉酸、ペプチド及び糖質 ; これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又は分子を標的化するために使用することもできるし、あるいは RISC によるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端で使用することもできる。

【0447】

アンチセンス鎖に非対称的に配置される例示的な修飾としては、以下のものが挙げられる :

(a) バックボーン修飾 (例えば、バックボーンの P の修飾) であって、P を S で置き換えること、又はアルキル若しくはアリル (例えば、Me) で置換された P、及びジチオエート (S-P=S) を含む ;

(b) 2'-Oアルキル (例えば、2'-OMe) (末端位置を修飾) ;

(c) 2' ~ 5' 結合 (2'-H、2'-OH 及び 2'-OMe によるもの (例えば、3' 末端での末端修飾) ; P=O 又は P=S による好ましくは 3' 末端の修飾) ; これらの修飾は、キナーゼ活性のような RISC 酵素活性を妨害し得るため、5' 末端領域からは排除されることが好ましい ;

(d) L 糖 (例えば、2'-H、2'-OH 及び 2'-OMe を有する L-リボース、L-アラビノース) ; 例えば、3' 末端での末端修飾 ; 例えば P=O 又は P=S による好ましくは 3' 末端の修飾 ; これらの修飾は、キナーゼ活性を妨害し得るため、5' 末端領域から排除されることが好ましい ;

(e) 修飾糖 (例えば、LNA、HNA 及び CeNA) ; これらの修飾は、センス鎖とアンチセンス鎖との間の対合の望ましくない増強に寄与し得るが、多くの場合は 5' 領域において「緩い」構造を有することが好ましいので、さらに該修飾はキナーゼ活性を妨害し得るので、5' 末端領域からは排除されることが好ましい ;

(f) 核酸塩基修飾 (例えば、C-5 修飾ピリミジン、N-2 修飾プリン、N-7 修飾プリン、N-6 修飾プリン) ;

(g) カチオン基及び双性イオン基 (末端にあることが好ましい) ;

糖の 2' 位、糖の 3' 位にあるカチオン基及び双性イオン基 ; 核酸塩基修飾 (例えば、C-5 修飾ピリミジン、N-2 修飾プリン、N-7 修飾プリン、N-6 修飾プリン) としてのカチオン基及び双性イオン基 ;

10

20

30

40

50

複合体基（末端位置にあることが好ましい）、例えば、ナプロキセン、ビオチン、コレステロール、イブプロフェン、葉酸、ペプチド及び糖質であって、但し、嵩高い基又は概してRISC活性を阻害する基はあまり好ましくないはずである。

【0448】

アンチセンス鎖の5'-OHは、活性を促進するように遊離型に保たれるべきである。幾つかの好ましい実施形態では、ヌクレアーゼ耐性を促進する修飾は、3'末端、特に3'突出部に包含されるべきである。

【0449】

別の態様では、本発明は、iRNA剤を最適化する方法、例えば安定化する方法を特徴とする。該方法は、活性を有する配列を選択すること、該配列に1つ又はそれ以上の非対称的な修飾を導入することを包含し、非対称的な修飾の導入によりiRNA剤の特性が最適化されるが、活性の減少はもたらされない。

10

【0450】

活性の減少とは、予め選択されたレベルの減少よりも小さい減少とすることができる。好ましい実施形態では、活性の減少とは、修飾が導入されないこと以外は同じiRNAと比較した場合に、5%、10%、20%、40%又は50%未満の減少であることを意味する。活性は、例えば、*in vivo*又は*in vitro*で測定することができ、いずれにおける結果も、所要の活性維持を実証するのに十分である。

【0451】

最適化される特性は、本明細書中に記載する任意の特性、特に本明細書中の非対称的な修飾に関するセクションで論述する特性であり得る。修飾は、任意の非対称的な修飾、例えば、本明細書中の非対称的な修飾に関するセクションに記載する非対称的な修飾であり得る。特に好ましい非対称的な修飾は、特にセンス配列における2'-Oアルキル修飾（例えば2'-OMe修飾）、及びアンチセンス鎖におけるバックボーンのOの修飾、特にホスホロチオエート修飾である。

20

【0452】

好ましい実施形態では、センス配列が選択されて非対称的な修飾が付与される一方で、他の実施形態ではアンチセンス配列が選択されて非対称的な修飾が付与される。幾つかの実施形態では、センス配列及びアンチセンス配列がともに選択され、それぞれ1つ又はそれ以上の非対称的な修飾が付与される。

30

【0453】

多数の非対称的な修飾が、センス配列及びアンチセンス配列の一方又は両方に導入され得る。配列は、少なくとも2個、4個、6個、8個又はそれ以上の修飾を有することができ、配列のすべてのモノマー又は実質的にすべてのモノマーを修飾することができる。

【0454】

表5は、選択された修飾を有する鎖I及び選択された修飾を有する鎖IIを有する例を示す。

【0455】

【表 5】

表5. 鎖Iおよび鎖IIの修飾の例

鎖I	鎖II
ヌクレアーゼ耐性(例えば2'-OMe)	生体内分布(例えば P=S)
生体内分布複合体 (例えば親油性)	タンパク質結合機能 (例えばナプロキセン)
組織分布機能 (例えば炭水化物)	細胞標的化機能 (例えばがん細胞に対する葉酸)
組織分布機能 (例えば腎臓細胞標的化部分)	融合機能 (例えばポリエチレンイミン)
がん細胞標的化 (例えばRGDペプチドおよびイミン)	融合機能(例えばペプチド)
ヌクレアーゼ耐性(例えば2'-OMe)	結合親和性の増大(5-Me-C、5-Me-U、 2-チオ-U、2-アミノ-A、Gクランプ、LNA)
組織分布機能	RISC活性増強機能
らせん構造改変機能	組織分布機能 (P=S; 親油性、炭水化物)

10

20

30

40

【0456】

Z-X-Y 構成様式

RNA、例えば iRNA 剤は、本明細書中に記載するものならびに 2003 年 10 月 9 日付けで出願された同時係属中の共同所有されている米国仮出願第 60/510,246 号(これは、参照により本明細書中に援用される)、2003 年 10 月 10 日付けで出願された同時係属中の共同所有されている米国仮出願第 60/510,318 号(これは、参照により本明細書中に援用される)及び 2004 年 3 月 8 日付けで出願された同時係属

50

出願中の共同所有されている国際出願第 P C T / U S 0 4 / 0 7 0 7 0 号に記載されているもののような Z - X - Y 構成様式又は構造を有することができる。

【0457】

さらに、本発明は、Z - X - Y 構造及び本明細書中に記載する別の構成要素を有する i R N A 剤を包含する。例えば、本発明は、本明細書中に記載する i R N A 剤、例えばパリンドローム構造の i R N A 剤、非標準的な対合を有する i R N A 剤、本明細書中に記載する遺伝子（例えば、腎臓で活性な遺伝子）を標的とする i R N A 剤、本明細書中に記載する両親媒性送達剤と結合された i R N A、本明細書中に記載する薬物送達モジュールと結合された i R N A、本明細書中に記載するように投与される i R N A 剤、又は本明細書中に記載するように製剤化される i R N A 剤であって、Z - X - Y 構築様式も取り入れる i R N A 剤を包含する。

10

【0458】

したがって、i R N A 剤は、第 1 のセグメントである Z 領域、第 2 のセグメントである X 領域、及び任意選択で第 3 の領域である Y 領域：

Z - X - Y

を有することができる。

【0459】

一方では Z 及び／又は Y の一方又は両方、かつ他方では X におけるサブユニットを修飾することが望ましい場合がある。場合によっては、サブユニットは、同じ修飾又は同じ種類の修飾を有するが、Z 及び／又は Y において施される修飾は、X において施される修飾と異なる場合のほうが多い。

20

【0460】

Z 領域は通常、i R N A 剤の末端を包含する。Z 領域の長さは多様であり得るが、通常 2 ～ 14 個、より好ましくは 2 ～ 10 個のサブユニットの長さである。通常、Z 領域は一本鎖状である（すなわち Z 領域は、別の鎖の塩基と塩基対合しない）が、幾つかの実施形態では、自己会合して、例えばループ構造を形成し得る。このような構造は、鎖の末端が折り返して鎖内二本鎖を形成することにより形成され得る。例えば、通常 2 個又はそれ以上の対合しないサブユニットでできた折り返し領域又は接続領域を有する 2 個、3 個、4 個、5 個又はそれ以上の鎖内塩基対が生じ得る。これは、鎖の一方の末端で生じててもよいし両末端で生じててもよい。Z 領域の典型的な実施形態は、一本鎖突出部、例えば本明細書の他の箇所に記載する長さの突出部である。したがって、Z 領域は、3' 又は 5' 末端の一本鎖でもよいし、又は 3' 又は 5' 末端の一本鎖を包含していてもよい。Z 領域はセンス鎖でもアンチセンス鎖でもよいが、アンチセンスである場合には、領域は 3' 突出部であることが好ましい。Z 領域における典型的なサブユニット間結合としては、P = O、P = S、S - P = S、P - N R₂ 及び P - B R₂ が挙げられる。キラル P = X（式中、X は、S、N 又は B である）のサブユニット間結合もまた存在することができる（これらのサブユニット間結合は、本明細書中の他の箇所でより詳細に論述している）。他の好ましい Z 領域サブユニット修飾（同様に本明細書中の他の箇所で論述）としては、3' - O R、3' S R、2' - O M e、3' - O M e 及び 2' O H 修飾ならびに構成部分、α 立体配置の塩基、ならびに 2' アラビノ修飾を挙げることができる。

30

40

【0461】

X 領域は多くの場合、一本鎖 i R N A 剤の場合には一本鎖の対応する領域とともに、あるいは二本鎖の i R N A 剤の場合には他方の鎖の対応する領域とともに、二本鎖状をなしている。X 領域の長さは多様であり得るが、通常 10 ～ 45 個、より好ましくは 15 ～ 35 個のサブユニットである。特に好ましい領域 X は、17 個、18 個、19 個、29 個、21 個、22 個、23 個、24 個又は 25 個のヌクレオチド対を包含するが、他の適切な長さは、本明細書中の他の箇所で記載されており、それらを使用することができる。典型的な X 領域のサブユニットとしては、2' - O H サブユニットが挙げられる。典型的な実施形態では、サブユニット間リン酸結合が好ましい一方で、ホスホロチオエート又は非リン酸結合は存在しない。X 領域において好ましい他の修飾としては、結合を改善するため

50

の修飾（例えば、核酸塩基修飾）、カチオン性核酸塩基修飾、及び C-5 修飾ピリミジン（例えば、アシルアミン）が挙げられる。幾つかの実施形態は、4 個又はそれ以上の連続した 2' OH サブユニットを有する。ホスホロチオエートの使用は好ましくないこともあるが、4 個未満の連続した 2' OH サブユニットを結合する場合に使用することもできる。

【0462】

Y 領域は概して、Z 領域に関して記載されたパラメータに準ずる。しかしながら、X 領域及び Z 領域は同じである必要はなく、異なる種類及び異なる数の修飾が存在することができ、実際、一方は通常 3' 突出部であり、一方は通常 5' 突出部である。

【0463】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は、2' OH が例えば 2'-OMe 又は他のアルキルで置換されたリボヌクレオシドをそれぞれが有する Y 及び／又は Z 領域、ならびに 2'-OH が非置換のままである少なくとも 4 個の連続したリボヌクレオシドサブユニットを含む X 領域を有する。

【0464】

iRNA 剤のサブユニット結合（サブユニット間の結合）は、例えば分解に対する耐性を促進するために修飾されてもよい。このような修飾の数多くの例が本明細書中に開示されており、その一例がホスホロチオエート結合である。これらの修飾は、領域 X、Y 及び Z のいずれかのサブユニット間に付与することができる。しかしながら、それらの修飾は最小限に抑えられることが好ましく、特に連続した修飾結合は回避されることが好ましい。

【0465】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は、2' OH が例えば 2'-OMe で置換されたリボヌクレオシドをそれぞれが有する Y 及び Z 領域、ならびに 2'-OH が非置換のままである少なくとも 4 個の連続したサブユニット（例えば、リボヌクレオシドサブユニット）を含む X 領域を有する。

【0466】

上述のように、iRNA 剤のサブユニット結合は、例えば分解に対する耐性を促進するために修飾されてもよい。これらの修飾は、領域 Y、X 及び Z のいずれかのサブユニット間に付与することができる。しかしながら、修飾は最小限に抑えられることが好ましく、特に連続した修飾結合は回避されることが好ましい。

【0467】

したがって、好ましい実施形態では、iRNA 剤のサブユニット結合のすべてが修飾されるわけではなく、より好ましくは、ホスホジエステル結合以外の結合により連結された連続サブユニットの最大数は、2 個、3 個又は 4 個である。特に好ましい iRNA 剤は、サブユニットがそれぞれ修飾結合（すなわち RNA 及び DNA で天然に見られるホスホジエステル結合と比較した場合に分解に対して結合を安定化するように修飾された結合）により結合された 4 個又はそれ以上の連続したサブユニット、例えば 2'-ヒドロキシルリボヌクレオシドサブユニットを持たない。

【0468】

領域 X における上記修飾を最小限に抑えることが特に好ましい。したがって、好ましい実施形態では、X におけるヌクレオシドサブユニット結合のそれぞれがホスホジエステル結合であるか、あるいは領域 X のサブユニット結合が修飾される場合、このような修飾は最小限に抑えられる。例えば、Y 及び／又は Z 領域は、分解に対して安定化されたサブユニット間結合を包含することができるが、このような修飾は X 領域では最小限に抑えられ、特に連続した修飾は最小限に抑えられる。したがって、好ましい実施形態ではホスホジエステル結合以外で結合される連続したサブユニットの最大数は、2 個、3 個又は 4 個である。特に好ましい X 領域は、サブユニットがそれぞれ修飾結合（すなわち RNA 及び DNA で天然に見られるホスホジエステル結合と比較した場合に分解に対して結合を安定化するように修飾された結合）により結合された 4 個又はそれ以上の連続したサブユニット

10

20

30

40

50

、例えば 2' - ヒドロキシリボヌクレオシドサブユニットを持たない。

【0469】

好ましい実施形態では、Y 及び／又は Z は、ホスホロチオエート結合を含まないが、一方又は両方が他の修飾、例えばサブユニット結合の他の修飾を含有してもよい。

好ましい実施形態では、領域 X、あるいは場合によっては全 iRNA 剤が、同一の 2' 部分を有する 3 個以下又は 4 個以下のサブユニットを有する。

【0470】

好ましい実施形態では、領域 X、あるいは場合によっては全 iRNA 剤が、同一のサブユニット結合を有する 3 個以下又は 4 個以下のサブユニットを有する。

好ましい実施形態では、1 つ又はそれ以上のホスホロチオエート結合（又はサブユニット結合の他の修飾）が Y 及び／又は Z 中に存在するが、このような修飾結合は、2' 位修飾（例えば、2' - オールキル部分）を有する隣接した 2 つのサブユニット（例えばヌクレオシド）を結合しない。例えば、Y 及び／又は Z におけるすべての隣接した 2' - オールキル部分は、ホスホロチオエート結合以外の結合により接続される。

10

【0471】

好ましい実施形態では、Y 及び／又は Z のそれぞれが独立して、2' 位修飾を有する隣接したヌクレオシドなどのサブユニット（例えば、2' - オールキルヌクレオシド）の間に 1 つだけホスホロチオエート結合を有する。Y 及び／又は Z において、2' 修飾を有する隣接したヌクレオシドなどのサブユニット（例えば、2' - オールキルヌクレオシド）がもう 1 組存在する場合、この第 2 の組は、ホスホロチオエート結合以外の結合、例えばホスホロチオエート結合以外の修飾結合により接続される。

20

【0472】

好ましい実施形態では、Y 及び／又は Z のそれぞれが独立して、2' 位修飾を有するヌクレオシドなどのサブユニット（例えば、2' - オールキルヌクレオシド）の隣接した対を結合する 2 個以上のホスホロチオエート結合を有するが、2' 位修飾を有するヌクレオシドなどのサブユニット（例えば、2' - オールキルヌクレオシド）の隣接したサブユニットのうち少なくとも 1 対は、ホスホロチオエート以外の結合、例えばホスホロチオエート結合以外の修飾結合により結合される。

【0473】

好ましい実施形態では、Y 及び／又は Z における隣接したサブユニットに関する上述の制限の 1 つが、X におけるサブユニットに関する制限と組み合わせられる。例えば、1 つ又はそれ以上のホスホロチオエート結合（又はサブユニット結合の他の修飾）が Y 及び／又は Z 中に存在するが、このような修飾結合は、2' 修飾（例えば、2' - オールキル部分）を有するヌクレオシドなど、2 つの隣接したサブユニットを結合しない。例えば、Y 及び／又は Z のあらゆる隣接した 2' - オールキル部分は、ホスホロチオエート結合以外の結合により接続される。さらに、X 領域は、3 個以下又は 4 個以下の同一のサブユニット（例えば同一の 2' 部分を有するサブユニット）を有するか、あるいは X 領域は、3 個以下又は 4 個以下の同一のサブユニット結合を有するサブユニットを有する。

30

【0474】

Y 領域及び／又は Z 領域は、少なくとも 1 個、好ましくは 2 個、3 個又は 4 個の本明細書中に開示する修飾を包含することができる。このような修飾は、独立して、本明細書中に記載する任意の修飾（例えば、ヌクレアーゼ耐性サブユニット、修飾塩基を有するサブユニット、修飾サブユニット間結合を有するサブユニット、修飾糖を有するサブユニット、及び別の構成部分（例えば、標的化部分）に連結されたサブユニット）から選ぶことができる。好ましい実施形態では、2 個以上のこのようなサブユニットが存在し得るが、幾つかの実施形態では、1 個以下、2 個以下、3 個以下又は 4 個以下のこのような修飾が行われるか、又は連続して行われることが好ましい。好ましい実施形態では、修飾の頻度は、Y 及び／又は Z と X との間で異なり、例えば、修飾は、Y 及び／又は Z と X とのうち一方に存在し、他方には存在しない。

40

【0475】

50

X領域は、本明細書中に開示する少なくとも1個、好ましくは2個、3個又は4個の修飾を包含することができる。このような修飾は、独立して、本明細書中に記載する任意の修飾から（例えば、ヌクレアーゼ耐性サブユニット、修飾塩基を有するサブユニット、修飾サブユニット間結合を有するサブユニット、修飾糖を有するサブユニット、及び別の構成部分（例えば、標的化部分）に連結されたサブユニットから）選ぶことができる。好ましい実施形態では、2個以上のこのようなサブユニットが存在し得るが、幾つかの実施形態では、1個以下、2個以下、3個以下又は4個以下のこのような修飾が行われるか、又は連続して行われることが好ましい。

【0476】

RRMS（本明細書中の他の箇所に記載する）は、二本鎖のiRNA剤の一方又は両方の鎖の1つ又はそれ以上の部位に導入することができる。RRMSは、Y及び／又はZ領域においては、センス鎖の3'若しくは5'末端又はその付近（末端から1、2又は3位以内）に、あるいはアンチセンス鎖の3'末端又はその付近（末端から2又は3位以内）に配置させることができる。幾つかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端又はその付近（5'末端から1、2又は3位以内）にRRMSを有していないことが好ましい。RRMSをX領域に配置することも可能であり、好ましくはセンス鎖に、あるいは標的に対するアンチセンス鎖の結合に重要でないアンチセンス鎖の領域に配置されることになる。

10

【0477】

末端における二本鎖の安定性の差次的修飾

一態様では、本発明は、末端における二本鎖の安定性の差次的修飾（DMTDS）を有することができるiRNA剤を特徴とする。

20

【0478】

さらに、本発明は、DMTDS及び本明細書中に記載する別の構成要素を有するiRNA剤を包含する。例えば、本発明は、本明細書中に記載するiRNA剤、例えば、パリンδροーム構造のiRNA剤、非標準的な対合を有するiRNA剤、本明細書中に記載する遺伝子（例えば、腎臓で活性な遺伝子）を標的とするiRNA剤、本明細書中に記載する構成様式又は構造を有するiRNA剤、本明細書中に記載する両親媒性送達剤と結合されたiRNA、本明細書中に記載する薬物送達モジュールと結合されたiRNA、本明細書中に記載するように投与されるiRNA剤、又は本明細書中に記載するように製剤化されるiRNA剤であって、DMTDSも取り入れるiRNA剤を包含する。

30

【0479】

iRNA剤は、アンチセンス鎖二本鎖の5'末端の領域において、該二本鎖が解離又は融解する傾向を増大させること（二本鎖の会合の自由エネルギーを減少させること）により最適化することができる。このことは、例えば、アンチセンス鎖の5'末端の領域に、二本鎖が解離又は融解する傾向を増大させるサブユニットを含めることにより達成することができる。また、5'末端の領域に、二本鎖が解離又は融解する傾向を増大させるリガンドを結合することにより達成することもできる。理論により拘束されることを望まないが、その効果は、ヘリカーゼのような酵素の作用を促進すること、例えばアンチセンス鎖の5'末端に近接した酵素の作用を促進することに起因し得る。

【0480】

40

本発明者等はまた、アンチセンス鎖二本鎖の3'末端の領域において、該二本鎖が解離又は融解する傾向を減少させること（二本鎖の会合の自由エネルギーを増大させること）により最適化することができることも発見した。このことは、例えばアンチセンス鎖の3'末端の領域に、二本鎖が解離又は融解する傾向を減少させるサブユニットを含めることにより達成することができる。また、5'末端の領域に、二本鎖が解離又は融解する傾向を減少させるリガンドを結合することにより達成することもできる。

【0481】

二本鎖の5'末端が解離する傾向を増大させる修飾は、単独で、あるいは本明細書中に記載する他の修飾と、例えば二本鎖の3'末端が解離する傾向を減少させる修飾と併用して使用することができる。同様に、二本鎖の3'末端が解離する傾向を減少させる修飾は

50

、単独で、あるいは本明細書中に記載する他の修飾と、例えば二本鎖の 5' 末端が解離する傾向を増大させる修飾と併用して使用することができる。

【0482】

二本鎖の AS 5' 末端の安定性の減少

サブユニット対は、解離又は融解を促進するそれらの傾向に基づいて順位付けすることができる（例えば、特定の対の会合又は解離の自由エネルギーに関して、最も簡単なアプローチは、個々の対ごとに対を検査することであるが、次の同類又は同様の分析もまた使用することができる）。解離を促進するという観点では、

A : U は、G : C よりも好ましく、

G : U は、G : C よりも好ましく、

I : C は、G : C よりも好ましく（I = イノシン）；

ミスマッチ、例えば非標準的な対合すなわち標準的対合以外の対合（本明細書中の他の箇所に記載するようなもの）は、標準的な（A : T、A : U、G : C）対よりも好ましく；

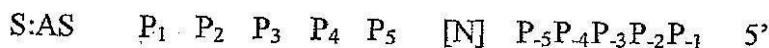
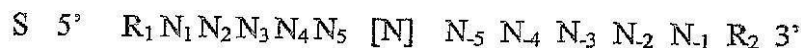
普遍的塩基を含む対合は、標準的な対合よりも好ましい。

【0483】

典型的な dsRNA 剤は、以下の通りに図示することができる：

【0484】

【化43】



【0485】

S はセンス鎖を示し、AS はアンチセンス鎖を示し、 R_1 は任意選択の（かつ好ましくない）5' センス鎖突出部を示し、 R_2 は任意選択の（しかし、好ましい）3' センス突出部を示し、 R_3 は任意選択の（しかし、好ましい）3' アンチセンス突出部を示し、 R_4 は任意選択の（かつ好ましくない）5' アンチセンス突出部を示し、N はサブユニットを示し、[N] は、さらなるサブユニット対が存在し得ることを示し、 P_x は、センス鎖の N_x とアンチセンス鎖の N_x との対を示す。突出部は、P 図では示していない。幾つかの実施形態では、本明細書中の他の箇所に記載するように、3' AS 突出部は領域 Z に相当し、二本鎖領域は領域 X に相当し、3' S 鎖突出部は領域 Y に相当する。（図は、最大又は最小の長さを暗に示すことを意味するものではなく、長さに関するガイダンスは、本明細書中の他の箇所に提供される）。

【0486】

二本鎖を形成する傾向を減少させる対合が、AS 鎖の 5' 末端で二本鎖の 1 個又はそれ以上の位置において使用されることが好ましい。末端の対（AS 鎖に関しては最も 5' 側の対）は、 P_{-1} と称され、それに続く二本鎖内の対合の位置（AS 鎖から見ると 3' 方向に向かっていく）は、 P_{-2} 、 P_{-3} 、 P_{-4} 、 P_{-5} 等と称される。二本鎖形成を調節する修飾を施すための好ましい領域は、 $P_{-5} \sim P_{-1}$ 、より好ましくは $P_{-4} \sim P_{-1}$ 、さらに好ましくは $P_{-3} \sim P_{-1}$ である。 P_{-1} の修飾は特に好ましく、単独でも、あるいは他の位置（複数可）（例えば、上記に同定された位置のいずれか）の修飾（複数可）との併用でもよい。上述の領域の 1 つに存在する少なくとも 1 個、より好ましくは 2 個、3 個、4 個又は 5 個の対は、独立に、以下の群：

A : U

G : U

10

20

30

40

50

I : C

ミスマッチな対、例えば非標準的な対、すなわち標準的な対以外の対、あるいは普遍的塩基を含む対合から選ばれることが好ましい。

【0487】

好ましい実施形態では、解離を促進する対合を達成するのに必要とされるサブユニットの変更はセンス鎖で行われるが、幾つかの実施形態では、該変更がアンチセンス鎖で行われる。

【0488】

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも2個又は3個の対が、解離を促進する対である。 10

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも2個又は3個の対は、A : Uである。

【0489】

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも2個又は3個の対は、G : Uである。

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも2個又は3個の対は、I : Cである。

【0490】

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも2個又は3個の対は、ミスマッチな対、例えば、非標準的な対、すなわち標準的な対以外の対である。 20

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも2個又は3個の対は、普遍的塩基を含む対である。

【0491】

二本鎖のAS 3'末端の安定性の増大

サブユニット対は、安定性を促進し、かつ解離又は融解を阻害するそれらの傾向に基づいて順位付けすることができる（例えば、特定の対合の会合又は解離の自由エネルギーに関して、最も簡単な手法は、個々の対ごとに対を検査することであるが、次の同類又は同様の分析もまた使用することができる）。二本鎖の安定性を促進するという観点では、

G : Cは、A : Uよりも好ましく、 30

ワトソン-クリックの対合（A : T、A : U、G : C）は、非標準的な対合、すなわち標準的な対合以外の対合よりも好ましく、

安定性を増大させる類縁体は、ワトソン-クリックの対合（A : T、A : U、G : C）よりも好ましく、

2-アミノ-A : Uは、A : Uよりも好ましく、

2-チオU又は5 Me-チオU : Aは、U : Aよりも好ましく、

G-クランプ（4個の水素結合を有するCの類縁体） : Gは、C : Gよりも好ましく、

グアナジニウム-G-クランプ : Gは、C : Gよりも好ましく、

プソイドウリジン : Aは、U : Aよりも好ましく、

結合を増強する糖修飾、例えば2'位修飾（例えば、2' F、ENA又はLNA）は、非修飾部分よりも好ましく、二本鎖の安定性を増強するために一方又は両方の鎖上に存在することができる。二本鎖を形成する傾向を増大させる対合が、二本鎖の1つ又はそれ以上の位置でAS鎖の3'末端で使用されることが好ましい。末端の対（AS鎖から見て最も3'側の対）は、 P_1 と称され、これに続く二本鎖の対合の位置（AS鎖から見て5'方向に向かっていく）は、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 等と称される。二本鎖形成を調節する修飾を施すための好ましい領域は、 $P_5 \sim P_1$ 、より好ましくは $P_4 \sim P_1$ 、さらに好ましくは $P_3 \sim P_1$ である。 P_1 での修飾は特に好ましく、単独でも、あるいは他の位置（複数可）（例えば、上記に同定された位置のいずれか）の修飾（複数可）と併用されてもよい。上述の領域に存在する少なくとも1個、より好ましくは2個、3個、4個又は5個の対は、独立して、以下の群： 40

G : C

ワトソン-クリックの対合 (A : T、A : U、G : C) を上回って安定性を増大させる類縁体を有する対

2-アミノ-A : U

2-チオU又は5Me-チオ-U : A

G-クランプ (4個の水素結合を有するCの類縁体) : G

グアニジニウム-G-クランプ : G

プソイドウリジン : A

一方又は両方のサブユニットが、結合を増強する糖修飾、例えば2'位修飾 (例えば、2' F、ENA又はLNA) を有する対から選ばれることが好ましい。

10

【0492】

好ましい実施形態では、 $P_1 \sim P_4$ における少なくとも2個又は3個の対は、二本鎖の安定性を促進する対である。

好ましい実施形態では、 $P_1 \sim P_4$ における少なくとも2個又は3個の対は、G : Cである。

【0493】

好ましい実施形態では、 $P_1 \sim P_4$ における少なくとも2個又は3個の対は、ワトソン-クリックの対合を上回って安定性を増大させる類縁体を有する対である。

好ましい実施形態では、 $P_1 \sim P_4$ における少なくとも2個又は3個の対は、2-アミノ-A : Uである。

20

【0494】

好ましい実施形態では、 $P_1 \sim P_4$ における少なくとも2個又は3個の対は、2-チオU又は5Me-チオ-U : Aである。

好ましい実施形態では、 $P_1 \sim P_4$ における少なくとも2個又は3個の対は、G-クランプ : Gである。

【0495】

好ましい実施形態では、 $P_1 \sim P_4$ における少なくとも2個又は3個の対は、グアニジニウム-G-クランプ : Gである。

好ましい実施形態では、 $P_1 \sim P_4$ における少なくとも2個又は3個の対は、プソイドウリジン : Aである。

30

【0496】

好ましい実施形態では、 $P_1 \sim P_4$ における少なくとも2個又は3個の対は、一方又は両方のサブユニットが、結合を増強する糖修飾、例えば2'位修飾 (例えば、2' F、ENA又はLNA) を有する対である。

【0497】

G-クランプ及びグアニジニウムG-クランプについては、以下の参照文献で論述されている。ホルムズ及びガイト (Holmes and Gait)、「2'-O-メチルG-クランプ含有オリゴヌクレオチドの合成及びHIV-1 Tat-TAR相互作用のそれらの阻害(The Synthesis of 2'-O-Methyl G-Clamp Containing Oligonucleotides and Their Inhibition of the HIV-1 Tat-TAR Interaction)」、Nucleotides、Nucleotides & Nucleic Acids、第22巻：1259～1262ページ、2003年、ホルムズら (Holmes et al.)、「2'-O-メチルG-クランプリボヌクレオシド類縁体を含有するオリゴヌクレオチドによるin vitroでの及び細胞におけるヒト免疫不全ウイルス1型Tat依存性トランス活性化の立体阻害(Steric inhibition of human immunodeficiency virus type-1 Tat-dependent trans-activation in vitro and in cells by oligonucleotides containing 2'-O-methyl G-clamp ribonucleoside analogues)」、Nucleic Acids Research、第31巻：2759～2768ページ、2003年、ワイルズら (Wilds, et al.)、「合成三環式シトシン類縁体：グアニジニウムG-クランプによるグアニン

50

の認識に関する構造基盤 (Structural basis for recognition of guanosine by a synthetic tricyclic cytosine analogue: Guanidinium G-clamp)」、*Helvetica Chimica Acta*、第86巻：966～978ページ、2003年、ラジェエフら (Rajeev, et al.)、「三環式シトシン類縁体を含む高親和性ペプチド核酸オリゴマー (High-Affinity Peptide Nucleic Acid Oligomers Containing Tricyclic Cytosine Analogues)」、*Organic Letters*、第4巻：4395～4398ページ、2002年、アウシンら (Ausin, et al.)、「アミノー及びグアニジノーG-クランプPNAモノマーの合成 (Synthesis of Amino- and Guanidino-G-Clamp PNA Monomers)」、*Organic Letters*、第4巻：4073～4075ページ、2002年、マイヤーら (Maier et al.)、「三環式シトシン類縁体フェノキサジン及び9-(2-アミノエトキシ)フェノキサジン (「G-クランプ」) を含むオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性及びそれらのヌクレアーゼ耐性特性の由来 (Nuclease resistance of oligonucleotides containing the tricyclic cytosine analogues phenoxazine and 9-(2-aminoethoxy)-phenoxazine ("G-clamp") and origins of their nuclease resistance properties)」、*Biochemistry*、第41巻：1323～7ページ、2002年、フラナガンら (Flanagan, et al.)、「アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する増強された効力を付与するシトシン類縁体 (A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides)」、*Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*、第96巻：3513～8ページ、1999年。

【0498】

二本鎖のAS 5'末端の安定性の減少と二本鎖のAS 3'末端の安定性の増大とを同時に行うこと

上述のように、iRNA剤は、二本鎖のAS 5'末端の安定性を減少させ、かつ二本鎖のAS 3'末端の安定性を増大させるように修飾することができる。このことは、二本鎖のAS 5'末端における1つ又はそれ以上の安定性を減少させる修飾を、二本鎖のAS 3'末端における1つ又はそれ以上の安定性を増加させる修飾と組み合わせることにより達成することができる。したがって、好ましい実施形態は、 $P_{-5} \sim P_{-1}$ 、より好ましくは $P_{-4} \sim P_{-1}$ 、さらに好ましくは $P_{-3} \sim P_{-1}$ における修飾を包含する。 P_{-1} での修飾は特に好ましく、単独でも、あるいは他の位置 (例えば、上記に同定された位置) との併用でもよい。二本鎖領域のAS 5'末端の上述の領域の1つに存在する少なくとも1個、より好ましくは2個、3個、4個又は5個の対は、独立に、以下の群から選ばれることが好ましい：

A : U

G : C

I : U

ミスマッチな対、例えば非標準的な対合、すなわち標準的な対合以外の対合、あるいは普遍的塩基を含む対合、及び

$P_5 \sim P_1$ 、より好ましくは $P_4 \sim P_1$ 、さらに好ましくは $P_3 \sim P_1$ での修飾。 P_1 での修飾は特に好ましく、単独でも、あるいは他の位置 (例えば、上記に同定された位置) との併用でもよい。二本鎖領域のAS 3'末端の上述の領域の1つに存在する少なくとも1個、より好ましくは2個、3個、4個又は5個の対は、独立に、以下の群：

G : C

ワトソン-クリックの対合 (A : T、A : U、G : C) を上回って安定性を増大させる類縁体を有する対

2-アミノ-A : U

2-チオU又は5 Me-チオ-U : A

G-クランプ (4個の水素結合を有するCの類縁体) : G

グアナジニウム-G-クランプ : G

プソイドウリジン：A

一方又は両方のサブユニットが、結合を増強する糖修飾、例えば2'位修飾（例えば、2'F、ENA又はLNA）を有する対から選ばれることが好ましい。

【0499】

本発明はまた、DMTDSを有するiRNA剤を選択及び作製する方法を包含する。例えば、iRNA剤として使用するための候補配列に関して標的配列をスクリーニングする場合、本明細書中に記載するDMTDS特性を有する配列、及び、所望のレベルのDMTDSを付与するために好ましくはできる限り少ない変更で特にAS鎖に対して修飾を施すことができる配列を選択することができる。

10

【0500】

本発明はまた、iRNA剤候補配列を提供すること、ならびにDMTDS iRNA剤を提供するために、P₅～P₁における少なくとも1個のP及び／又はP₅～P₁における少なくとも1個のPを修飾することを包含する。

【0501】

DMTDS iRNA剤は、本明細書中に記載する任意の方法において、例えば本明細書中に開示する任意の遺伝子をサイレンシングするために、本明細書中に記載する任意の障害を治療するために、本明細書中に記載する任意の製剤中で、ならびに通常は本明細書中の他の箇所に記載する方法及び組成物において、または本明細書中の他の箇所に記載する方法及び組成物とともに使用することができる。DMTDS iRNA剤は、本明細書中に記載する他の修飾、例えば標的化剤を結合すること又は安定性を増強する修飾を含めること、例えばヌクレアーゼ耐性モノマーを含めることもしくは自己会合して鎖内二本鎖構造を形成する一本鎖突出部（例えば、3'AS突出部及び／又は3'S鎖突出部）を含めること、を取り入れることができる。

20

【0502】

好ましくは、これらのiRNA剤は、本明細書中に記載する構成様式を有する。

その他の実施形態

RNA、例えばiRNA剤は、例えば細胞へ送達される外来DNAの鋳型から、in vivoで細胞において産生され得る。例えば、該DNA鋳型をベクターに挿入して、遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターは、例えば静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号）により、あるいは定位注射（例えば、チェンら（Chen et al.）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第91巻：3054～3057ページ、1994年を参照）により対象へ送達することができる。遺伝子治療ベクターの医薬調製物は、許容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含むこともできるし、あるいは遺伝子送達ビヒクルが包埋される徐放性マトリックスを含むこともできる。例えば、DNA鋳型は、2つの転写ユニット（iRNA剤の鎖の上部を包含する転写物を産生するもの、及びiRNA剤の下部を包含する転写物を産生するもの）を包含することができる。鋳型が転写されると、iRNA剤が産生され、プロセッシングを受けて遺伝子サイレンシングを仲介するsRNA剤断片となる。

30

【0503】

in vivo送達

iRNA剤は、対象（例えば、ヒトのような哺乳類）へiRNA剤を効率的に送達するためのポリマーに結合、例えば非共有結合させることができる。iRNA剤は、例えばシクロデキストリンと複合体形成させることができる。シクロデキストリンは、治療用化合物の送達ビヒクルとして使用されている。シクロデキストリンは、シクロデキストリンの疎水性キャビティ内へ収まることが可能な薬物と包接複合体を形成することができる。他の例では、シクロデキストリンは、オリゴヌクレオチド及びそれらの誘導体のような他の生物学的に活性な分子と非共有結合を形成する。シクロデキストリンの使用により、水溶性の薬物送達複合体が創出され、該複合体は標的指向性の基又は他の官能基で修飾することができる。米国特許第5,691,316号（これは、参照により本明細書に援用され

40

50

る)に記載されるオリゴヌクレオチド用のシクロデキストリン細胞送達系は、本発明の方法における使用に適している。この系では、オリゴヌクレオチドはシクロデキストリンと非共有結合的に複合体形成されるか、あるいはオリゴヌクレオチドがアダマンチンに共有結合され、続いてアダマンチンがシクロデキストリンと非共有結合的に結合される。

【0504】

送達分子には、線状シクロデキストリンコポリマー又は線状酸化シクロデキストリンコポリマーであってシクロデキストリンコポリマーに少なくとも1つのリガンドが結合されたものを挙げることができる。米国特許第6,509,323号(参照により本明細書に援用される)に記載されるような送達系は、本発明における使用に適している。iRNA剤は、線状シクロデキストリンコポリマー及び／又は線状酸化シクロデキストリンコポリマーに結合させることができる。シクロデキストリンコポリマー又は酸化シクロデキストリンコポリマーの一方又は両方を、別のポリマーに架橋させることもでき、かつ／又はリガンドに結合させることもできる。

10

【0505】

iRNA送達用組成物は、付加物の特徴的な構造を有する分子化合物である「包接複合体」を使用することができる。この構造では、「ホスト分子」が、送達ビヒクル中の別の化合物の少なくとも1部を空間的に封入する。封入される化合物(「ゲスト分子」)は、ホスト分子のフレームワーク構造に影響を及ぼすことなくホスト分子のキャビティに配置される。「ホスト」は、好ましくはデキストリンであるが、米国特許公報第2003/0008818号(参照により本明細書に援用される)で提唱される任意の分子であり得る。

20

【0506】

シクロデキストリンは、各種のイオン及び分子と相互作用することができ、生じた包接化合物は、「ホスト-ゲスト」複合体の種類に属する。ホスト-ゲストの関係内で、ホスト分子及びゲスト分子の結合部位は、立体電子的意味合いで相補的であるべきである。本発明の組成物は、少なくとも1つのポリマー及び少なくとも1つの治療薬を、通常はポリマー及び治療薬(例えば、iRNA剤)の粒子状複合体の形態で含有することができる。iRNA剤は、1つ又はそれ以上の複合化剤を含有することができる。粒子状複合体の少なくとも1つのポリマーは、ホスト-ゲスト又はゲスト-ホスト相互作用で複合化剤と相互作用して、ポリマーと複合化剤との間で包接複合体を形成することができる。より具体的には、ポリマー及び複合化剤は、組成物に機能性を導入するのに使用することができる。例えば、粒子状複合体の少なくとも1つのポリマーはホスト機能を有し、ゲスト機能を有する複合化剤と包接複合体を形成する。別例として、粒子状複合体の少なくとも1つのポリマーはゲスト機能を有し、ホスト機能を有する複合化剤と包接複合体を形成する。粒子状複合体のポリマーはまた、ホスト機能及びゲスト機能の両方を含有し、ゲストの複合化剤及びホストの複合化剤と包接複合体を形成することもできる。機能性を有するポリマーは、例えば細胞標的化及び／又は細胞との接触(例えば、腎臓細胞に対する標的化又は腎臓細胞との接触)、細胞間輸送、ならびに細胞への流入及び細胞からの放出のうち少なくともいずれか)を促進することができる。

30

【0507】

粒子状複合体を形成する際、iRNA剤は、その生物学的又は治療的活性を維持してもよいし、あるいは維持しなくてもよい。治療用組成物から、具体的には粒子状複合体のポリマーから放出されると、iRNA剤の活性は回復する。したがって、粒子状複合体は好適には、例えば分解に起因する活性の損失からiRNA剤を保護し、生物学的利用性を増強する。したがって、組成物は、iRNA剤又は任意の活性な化学物質に安定性、特に貯蔵中又は溶液中の安定性を提供するのに使用することができる。iRNA剤は、粒子状複合体又は治療用組成物を形成する前又は後に、リガンドでさらに修飾されてもよい。リガンドは、さらなる機能性を提供することができる。例えば、リガンドは、標的化部分であり得る。

40

【0508】

50

生理学的影響

本明細書中に記載する iRNA 剤は、治療上の毒性の決定が、該 iRNA 剤と、ヒト配列および非ヒト動物配列の両方との相補性によってより容易になされるように設計することができる。これらの方法では、RNA 剤は、ヒト由来の核酸配列 及び 少なくとも 1 種類の非ヒト動物、例えば非ヒト哺乳類（例えば、げっ歯類、反すう類又は霊長類）由来の核酸配列に完全に相補的である配列から構成され得る。例えば、非ヒト哺乳類は、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、サル、ピグミーチンパンジー、ナミチンパンジー、アカゲザル又はカニクイザルであり得る。iRNA 剤の配列は、非ヒト哺乳類及びヒトの相同遺伝子、例えば発がん遺伝子又は腫瘍抑制遺伝子内の配列に相補的であり得る。非ヒト哺乳類における iRNA 剤の毒性を決定することにより、ヒトにおける iRNA 剤の毒性を推定することができる。より厳しい毒性試験のためには、iRNA 剤を、ヒト及び 2 種類以上（例えば 2 種類又は 3 種類又はそれ以上）の非ヒト動物に対して相補的とすることができる。

10

【0509】

本明細書中に記載する方法は、ヒトに対する iRNA 剤の任意の生理学的作用、例えば毒性作用のような任意の望ましくない作用、又は任意の好ましい作用、すなわち所望の作用と相関させるのに使用することができる。

【0510】

送達モジュール

RNA、例えば本明細書中に記載する iRNA 剤は、薬物送達複合体又はモジュール（例えば、本明細書中に記載するもの及び同時係属中の共同所有されている 2003 年 3 月 12 日付けで出願された米国特許仮出願第 60/454,265 号及び 2004 年 3 月 8 日付けで出願された国際出願第 PCT/US04/07070 号（これらはともに、参照により本明細書に援用される）に記載されるもの）とともに使用することができる。

20

【0511】

さらに、本発明は、このような薬物送達複合体又はモジュールと組み合わせられ、結合され、かつ送達される本明細書中に記載する iRNA 剤、例えば、パリンドローム構造の iRNA 剤、非標準的な対合を有する iRNA 剤、本明細書中に記載する遺伝子（例えば、腎臓で活性な遺伝子）を標的とする iRNA 剤、本発明に記載する化学修飾（例えば、分解に対する耐性を増強する修飾）を有する iRNA 剤、本明細書中に記載する構成様式又は構造を有する iRNA 剤、本明細書中に記載するように投与される iRNA 剤、又は本明細書中に記載するように製剤化される iRNA 剤を包含する。

30

【0512】

iRNA 剤は、モジュラー複合体を特徴とする送達剤に複合体形成させることができる。複合体は、(a) 縮合剤（例えば、核酸を例えばイオン相互作用又は静電相互作用により誘引（例えば、結合）することが可能な作用物質）、(b) 融合剤（例えば、細胞膜（例えば、エンドソーム膜）と融合すること、及び／又は該膜を通過して輸送されることが可能な作用物質）、及び (c) 標的化基、例えば、細胞又は組織を標的とする物質（例えば、腎臓細胞のような特定の細胞種に結合するレクチン、糖タンパク質、脂質又はタンパク質（例えば抗体）、のうち 1 つ又はそれ以上（好ましくは 2 つ又はそれ以上、より好ましくは 3 つすべて）に連結させた担体物質を包含することができる。

40

【0513】

iRNA 剤、例えば本明細書中に記載する iRNA 剤又は sRNA 剤は、モジュラー複合体に連結（例えばカップリング又は結合）させることができる。iRNA 剤は、複合体の縮合剤と相互作用することができ、複合体は、例えば *in vitro* 又は *in vivo* で、iRNA 剤を細胞へ送達するのに使用することができる。例えば、複合体は、iRNA 剤の送達を必要とする対象へ iRNA 剤を送達するために、例えば障害（例えば、腎臓の疾患又は障害のような本明細書中に記載する障害）を有する対象へ iRNA 剤を送達するために使用することができる。

【0514】

50

融合剤及び縮合剤は、異なる作用物質であってもよいし、又は1つの同じ作用物質であってもよい。例えば、ポリアミノ鎖、例えばポリエチレンイミン（PEI）は、融合剤及び／又は縮合剤であり得る。

【0515】

送達剤は、モジュラー複合体であり得る。例えば、複合体は、以下の：

（a）縮合剤（例えば、核酸を例えばイオン相互作用により誘引（例えば、結合）することが可能な作用物質）、

（b）融合剤（例えば、細胞膜（例えば、エンドソーム膜）と融合すること及び／又は該膜を通過して輸送されることが可能な作用物質）、及び

（c）標的化基、例えば、細胞又は組織を標的とする物質（例えば、腎臓細胞のような特定の細胞種に結合するレクチン、糖タンパク質、脂質又はタンパク質（例えば抗体）のうち1つ又はそれ以上（好ましくは2つ又はそれ以上の、より好ましくは3つすべて）に連結させた担体物質を包含することができる。標的化基は、甲状腺刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントプロテインA、ムチン糖質、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸塩、ビタミンB12、ビオチン、ネプロキシ（Neproxin）、又はRGDペプチド若しくはRDGペプチド擬似体であり得る。

10

20

【0516】

担体物質

本明細書中に記載するモジュラー複合体の担体物質は、縮合剤、融合剤及び標的化基のうち1つ又はそれ以上を結合するための基剤であり得る。担体物質は内因性の酵素活性を欠いていることが好ましい。担体物質は好ましくは、生体分子、好ましくは高分子である。高分子の生物学的担体が好ましい。担体分子は生分解性であることもまた好ましい。

【0517】

担体物質は、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リポタンパク質（LDL）又はグロブリン）、糖質（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン又はヒアルロン酸）、又は脂質のような天然に存在する物質であり得る。担体分子はまた、合成ポリマー（例えば、合成ポリアミノ酸）のような組換え分子又は合成分子であり得る。ポリアミノ酸の例としては、ポリリシン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物コポリマー、ポリ（L-ラクチド-コグリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル-マレイン酸無水物コポリマー、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、又はポリホスファジン（polyphosphazene）が挙げられる。他の有用な担体分子は、日常的な方法により同定することができる。

30

【0518】

担体物質は、（a）サイズが少なくとも1Daであること、（b）少なくとも5個の荷電基、好ましくは5～5,000個の荷電基を有すること、（c）少なくとも1：1の担体物質対融合剤の比で複合体中に存在すること、（d）少なくとも1：1の担体物質対縮合剤の比で複合体中に存在すること、（e）少なくとも1：1の担体物質対標的化剤の比で複合体中に存在すること、のうち1つ又はそれ以上を特徴とすることができる。

40

【0519】

融合剤

本明細書中に記載するモジュラー複合体の融合剤は、pH環境に応答性である、例えばpH環境に応じて電荷を変化させる作用物質であり得る。エンドソームのpHに遭遇すると、融合剤は、物理的变化、例えばエンドソーム膜を崩壊するか、又はエンドソーム膜の

50

浸透性を増大する浸透圧特性の変化を引き起こすことができる。好ましくは、融合剤は、生理学的範囲未満のpHで、電荷を変化させる（例えば、プロトン化されるようになる）。例えば、融合剤は、pH 4.5～6.5でプロトン化されるようになり得る。融合剤は、複合体が例えばエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれた後、細胞の細胞質へiRNA剤を放出するように作用することにより、細胞内のiRNA剤の細胞内濃度を増大させることができる。

【0520】

一実施形態では、融合剤は、特定のpH範囲に暴露されると、例えば電荷の変化（例えばプロトン化）を受ける構成部分（例えば、アミノ基）を有することができる。融合剤の電荷の変化は、小胞、例えば細胞内小胞（例えば、エンドソーム）の変化（例えば、浸透圧変化）を誘発することができる。例えば、融合剤は、エンドソームのpH環境に暴露されると、エンドソーム膜の多孔性を増大するのに（好ましくは、破裂させるのに）実質的に十分な溶解性又は浸透圧変化を引き起こす。

10

【0521】

融合剤は、ポリマー、好ましくはポリアミノ鎖（例えば、ポリエチレンジアミン（PEI））であり得る。PEIは、直鎖状でも、分岐状でも、合成でも天然でもよい。PEIは、例えばアルキル置換されたPEIでもよいし脂質置換されたPEIでもよい。

【0522】

他の実施形態では、融合剤は、ポリヒスチジン、ポリイミダゾール、ポリピリジン、ポリプロピレンジアミン、メリチン又はポリアセタール物質（例えば、カチオン性ポリアセタール）であり得る。幾つかの実施形態では、融合剤は、 α らせん構造を有することができる。融合剤は、膜崩壊剤（例えばメリチン）であり得る。

20

【0523】

融合剤は、1つ又はそれ以上の以下の特徴を有することができる：（a）サイズが少なくとも1Daであること、（b）少なくとも10個の荷電基、好ましくは10～5,000個の荷電基、より好ましくは50～1,000個の荷電基を有すること、（c）少なくとも1:1の融合剤対担体物質の比で複合体中に存在すること、（d）少なくとも1:1の融合剤対縮合剤の比で複合体中に存在すること、（e）少なくとも1:1の融合剤対標的化剤の比で複合体中に存在すること。

【0524】

他の適切な融合剤は、専門家により試験及び同定され得る。化合物の、pH環境に応答する（例えば、pH環境に応じて電荷を変化させる）能力は、日常的な方法により、例えば細胞アッセイにおいて試験することができる。例えば、試験化合物を細胞と組み合わせるか、又は細胞と接触させて、例えばエンドサイトーシスにより細胞に試験化合物を取り込ませる。続いて、接触させた細胞からエンドソーム調製物を作製することができ、該エンドソーム調製物を対照細胞由来のエンドソーム調製物と比較することができる。接触処理した細胞由来のエンドソーム画分の対照細胞に対する変化（例えば、減少）は試験化合物が融合剤として機能することができることを示す。あるいは、接触処理した細胞及び対照細胞を、例えば顕微鏡法により（例えば、光学顕微鏡法又は電子顕微鏡法により）評価して、細胞におけるエンドソーム集団の差を決定することができる。試験化合物を標識してもよい。別のタイプのアッセイでは、本明細書中に記載するモジュラー複合体は、1つ又はそれ以上の試験融合剤又は推定融合剤を用いて構築される。モジュラー複合体は、iRNAの代わりに標識された核酸を用いて構築することもできる。融合剤の、pH環境に応答する（例えば、pH環境に応じて電荷を変化させる）能力は、モジュラー複合体がいったん細胞により取り込まれれば、上述のように、例えばエンドソーム調製物の調製により、あるいは顕微鏡技法により評価することができる。2工程アッセイもまた実施することができる。該アッセイでは、第1のアッセイが試験化合物単独のpH環境に応答する（例えば、pH環境に応じて電荷を変化させる）能力を評価し、第2のアッセイが、試験化合物を含むモジュラー複合体のpH環境に応答する（例えば、pH環境に応じて電荷を変化させる）能力を評価する。

30

40

50

【0525】

縮合剤

本明細書中に記載するモジュラー複合体の縮合剤は、iRNA剤と相互作用（例えば、iRNA剤を誘引、保持又はiRNA剤に結合）することができ、（a）iRNA剤を縮合（例えば、iRNA剤のサイズ又は電荷を低減）させ、かつ／又は（b）iRNA剤を保護（例えば、分解に対してiRNA剤を保護）するように作用することができる。縮合剤は、例えばイオン性相互作用により、核酸（例えば、iRNA剤）と相互作用することができる構成部分（例えば、荷電基）を包含することができる。縮合剤は好ましくは、荷電ポリマー（例えば、ポリカチオン鎖）である。縮合剤は、ポリリシン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、プソイドペプチドポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩又はαらせん状ペプチドであり得る。

10

【0526】

縮合剤は、以下の特徴を有することができる：（a）サイズが少なくとも1Daであること、（b）少なくとも2個の荷電基、好ましくは2～100個の荷電基を有すること、（c）少なくとも1：1の縮合剤対担体物質の比で複合体中に存在すること、（d）少なくとも1：1の縮合剤対融合剤の比で複合体中に存在すること、（e）少なくとも1：1の縮合剤対標的化剤の比で複合体中に存在すること。

【0527】

その他の適切な縮合剤は、専門家により、例えば、核酸（例えば、iRNA剤）と相互作用する試験剤の能力を評価することにより、試験及び同定され得る。試験剤の、核酸（例えば、iRNA剤）と相互作用する（例えば、iRNA剤を縮合又は保護する）能力は、日常的な技法により評価することができる。1つのアッセイでは、試験剤を核酸と接触させて、接触させた核酸のサイズ及び／又は電荷を、分子の質量及び／又は電荷の変化を検出するのに適した技法により評価する。このような技法としては、非変性ゲル電気泳動、免疫学的方法（例えば、免疫沈降）、ゲル濾過、イオン相互作用クロマトグラフィ等が挙げられる。試験剤は、対照と比較して、接触させた核酸の質量及び／又は電荷（好ましくは、両方）を変化させる場合に、縮合剤として同定される。2工程アッセイもまた実施することができ、該2工程アッセイでは、第1のアッセイが試験化合物単独の核酸と相互作用する（例えば、核酸に結合する（例えば、核酸の電荷及び／又は質量を縮合する））能力を評価し、第2のアッセイが、試験化合物を含むモジュラー複合体の、核酸と相互作用する（例えば、核酸に結合する（例えば、核酸の電荷及び／又は質量を縮合する））能力を評価する。

20

30

【0528】

両親媒性送達剤

RNA、例えば本明細書中に記載するiRNA剤は、本明細書中に記載する、ならびに係属中の共同所有されている2003年3月13日付けで出願された米国仮出願第60/455,050号及び2004年3月8日付けで出願された国際出願第PCT/US04/07070号（本願に援用する）に記載されるような、両親媒性送達複合体又はモジュールとともに使用することができる。

40

【0529】

さらに、本発明は、このような両親媒性送達複合体と組み合わせられ、結合され、かつこのような両親媒性送達複合体により送達される、本明細書中に記載するiRNA剤、例えば、パリンドローム構造のiRNA剤、非標準的な対合を有するiRNA剤、本明細書中に記載する遺伝子（例えば、腎臓で活性な遺伝子）を標的とするiRNA剤、本明細書中に記載する化学修飾（例えば、分解に対する耐性を増強する修飾）を有するiRNA剤、本明細書中に記載する構成様式又は構造を有するiRNA剤、本明細書中に記載するように投与されるiRNA剤、又は本明細書中に記載するように製剤化されるiRNA剤を包含する。

【0530】

50

両親媒性分子は、疎水性領域及び親水性領域を有する分子である。このような分子は、脂質（例えば、細胞の脂質二重層）と相互作用する（例えば、浸透又は破壊する）ことができる。したがって、両親媒性分子は、会合された（例えば、結合された）iRNA（例えば、本明細書中に記載するiRNA又はsRNA）の送達剤として作用することができる。本明細書中に記載する組成物（例えば、本明細書中に記載する両親媒性iRNA構築物）で使用されるべき好ましい両親媒性分子は、ポリマーである。該ポリマーは、二次構造、例えば反復性の二次構造を有し得る。

【0531】

両親媒性ポリマーの一例は、両親媒性ポリペプチド、例えばポリペプチドが親水面及び疎水面を有するような二次構造を有するポリペプチドである。両親媒性ペプチド構造（例えば、 α らせん状ポリペプチド）の設計は、当業者には日常的である。例えば、以下の参考文献にガイダンスが提供されている：グレルら（Grell et al.）（2001年）「タンパク質設計及びフォールディング：自己集合したらせん状の束の鋳型トラッピング(Protein design and folding: template trapping of self-assembled helical bundles)」、J Pept Sci 第7（3）巻：146～51ページ；チェンら（Chen et al.）（2002年）、「両親媒性 α -らせんにおけるアミノ酸側鎖の立体化学安定性係数の決定(Determination of stereochemistry stability coefficients of amino acid side-chains in an amphipathic α -helix)」 J Pept Res 第59（1）巻：18～33ページ；イワタラ（Iwata et al.）（1994年）「両親媒性3（10）-らせんペプチドの設計及び合成、ならびにそれらのリン脂質二重層との相互作用及びイオンチャネル形成(Design and synthesis of amphipathic 3(10)-helical peptides and their interactions with phospholipid bilayers and ion channel formation)」 J Biol Chem 第269（7）巻：4928～33ページ；コーナットら（Cornut et al.）（1994年）「両親媒性 α -らせん概念。メリチンの溶血活性よりも高い溶血活性を有する理論上両親媒性のLeu、Lysペプチドの新規の設計への適用(The amphipathic α -helix concept. Application to the de novo design of ideally amphipathic Leu, Lys peptides with hemolytic activity higher than that of melittin)」 FEBS Lett 第349（1）巻：29～33ページ；ネグレートら（Negrete et al.）（1998年）「タンパク質に関する構造上のコードの解読：ドメインクラスでのヘリックスの傾向及び α -らせんにおける統計学的多重残基情報(Deciphering the structural code for proteins: helical propensities in domain classes and statistical multi-residue information in α -helices)」 Protein Sci 第7（6）巻：1368～79ページ。

【0532】

両親媒性ポリマーの別の例は、2つ又はそれ以上の両親媒性サブユニット、例えば環状部分（例えば、1つ又はそれ以上の親水性基及び1つ又はそれ以上の疎水性基を有する環状部分）を含有する2つ又はそれ以上のサブユニットから構成されるポリマーである。例えば、サブユニットは、ステロイド（例えばコル酸）又は芳香族部分を含有してもよい。このような構成部分は、それらがポリマー構造中にある場合、対向する親水面及び疎水面を形成することができるように、アトロプ異性を示すことができることが好ましい。

【0533】

推定上の両親媒性分子の、脂質膜（例えば、細胞膜）と相互作用する能力は、日常的方法により、例えば無細胞アッセイ又は細胞アッセイにおいて試験することができる。例えば、試験化合物を、合成脂質二重層、細胞膜分画又は細胞と組み合わせるか、あるいは接触させて、試験化合物が、脂質二重層、細胞膜又は細胞と相互作用し、細胞膜又は細胞に浸透し、あるいは細胞膜又は細胞を破壊するその能力に関して評価する。試験化合物を、脂質二重層、細胞膜又は細胞との相互作用を検出するために標識することもできる。別のタイプのアッセイでは、試験化合物をレポーター分子又はiRNA剤（例えば、本明細書中に記載するiRNA又はsRNA）に連結させて、レポーター分子又はiRNA剤が

脂質二重層、細胞膜又は細胞に浸透する能力を評価する。2工程アッセイもまた実施することができ、該2工程アッセイでは、第1のアッセイが、試験化合物単独の、脂質二重層、細胞膜又は細胞と相互作用する能力を評価し、第2のアッセイが、試験化合物及びレポーター又はiRNA剤を含む構築物（例えば、本明細書中に記載する構築物）の、脂質二重層、細胞膜又は細胞と相互作用する能力を評価する。

【0534】

本明細書中に記載する組成物において有用な両親媒性ポリマーは、少なくとも2個、好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも10個、25個、50個、100個、200個、500個、1,000個、2,000個、50,000個又はそれ以上のサブユニット（例えば、アミノ酸又は環状サブユニット）を有する。1つの両親媒性ポリマーを、1つ又はそれ以上、例えば2個、3個、5個、10個又はそれ以上のiRNA剤（例えば、本明細書中に記載するiRNA又はsRNA剤）に連結させることができる。幾つかの実施形態では、両親媒性ポリマーは、アミノ酸及び環状サブユニット（例えば、芳香族サブユニット）の両方を含有することができる。

10

【0535】

本発明は、両親媒性分子と関係付けられたiRNA剤（例えば、本明細書中に記載するiRNA又はsRNA）を包含する組成物を特徴とする。このような組成物は、本明細書中では「両親媒性iRNA構築物」とも呼ばれる。このような組成物及び構築物は、iRNA剤の送達又は標的化、例えばiRNA剤を細胞へ送達又は標的化するのに有用である。理論により拘束されることを望まないが、このような組成物及び構築物は、例えばiRNA剤の細胞への進入が可能となるように、脂質（例えば、細胞の脂質二重層）の多孔性を増大させる（例えば、浸透又は崩壊させる）ことができる。

20

【0536】

一態様では、本発明は、両親媒性分子に連結されたiRNA剤（例えば、本明細書中に記載するiRNA剤又はsRNA剤）を含む組成物に関する。iRNA剤及び両親媒性分子は、共有結合又は非共有結合のいずれかにより、互いに持続的に接触した状態に保持されていてもよい。

【0537】

該組成物又は構築物の両親媒性分子は、リン脂質以外、例えばミセル、膜又は膜断片以外であることが好ましい。

30

組成物又は構築物の両親媒性分子は、好ましくはポリマーである。該ポリマーは、2つ又はそれ以上の両親媒性サブユニットを含んでもよい。1つ又はそれ以上の親水性基及び1つ又はそれ以上の疎水性基がポリマー上に存在してもよい。ポリマーは、反復性の二次構造ならびに第1の面及び第2の面を有してもよい。反復性の二次構造に沿った親水性基及び疎水性基の分布は、ポリマーの一方の面が親水面であり、かつポリマーの他方の面が疎水面であるような分布であり得る。

【0538】

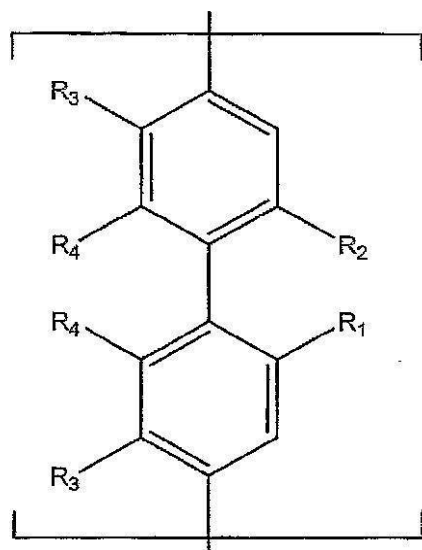
両親媒性分子は、ポリペプチド、例えばその二次構造として α -らせん構造を含むポリペプチドであり得る。

一実施形態では、両親媒性ポリマーは、1つ又はそれ以上の環状部分（例えば、1つ又はそれ以上の親水性基及び／又は1つ又はそれ以上の疎水性基を有する環状部分）を含有する1つ又はそれ以上のサブユニットを包含する。一実施形態では、ポリマーは、環状部分が交互に疎水性基及び親水性基を有するように環状部分を有するポリマーである。例えば、サブユニットは、ステロイド（例えば、コル酸）を含有してもよい。別の例では、サブユニットは、芳香族部分を含有してもよい。芳香族部分は、アトロプ異性を示すことができるもの、例えば2,2'-ビス（置換）-1,1'-ビナフチル又は2,2'-ビス（置換）ビフェニルであり得る。サブユニットは、式（M）：

40

【0539】

【化 4 4】



(M)

10

20

【0540】

を有する芳香族部分を含んでもよい。

本発明は、両親媒性分子と関連付けられた iRNA 剤（例えば、本明細書中に記載する iRNA 又は sRNA）を包含する組成物を特徴とする。このような組成物は、本明細書中では「両親媒性 iRNA 構築物」と称し得る。このような組成物及び構築物は、iRNA 剤の送達又は標的化、例えば細胞への iRNA 剤の送達又は標的化において有用である。理論により拘束されることを望まないが、このような組成物及び構築物は、例えば iRNA 剤の細胞への進入が可能となるように、脂質（例えば、細胞の脂質二重層）の多孔性を増大させる（例えば浸透又は破壊する）ことができる。

30

【0541】

一態様では、本発明は、両親媒性分子に連結された iRNA 剤（例えば、本明細書中に記載する iRNA 剤又は sRNA 剤）を含む組成物に関する。iRNA 剤及び両親媒性分子は、共有結合又は非共有結合のいずれかにより、互いに持続的に接触した状態に保持されていてもよい。

【0542】

組成物又は構築物の両親媒性分子は、リン脂質以外、例えばミセル、膜又は膜断片以外であることが好ましい。

組成物又は構築物の両親媒性分子は、好ましくはポリマーである。ポリマーは、2つ又はそれ以上の両親媒性サブユニットを含んでもよい。1つ又はそれ以上の親水性基及び1つ又はそれ以上の疎水性基がポリマー上に存在してもよい。ポリマーは、反復性の二次構造ならびに第1の面及び第2の面を有してもよい。反復性の二次構造に沿った親水性基及び疎水性基の分布は、ポリマーの一方の面が親水面であり、かつポリマーの他方の面が疎水面であるような分布であり得る。

40

【0543】

両親媒性分子は、ポリペプチド、例えばその二次構造として α -らせん構造を含むポリペプチドであり得る。

一実施形態では、両親媒性ポリマーは、1つ又はそれ以上の環状部分（例えば、1つ又はそれ以上の親水性基及び／又は1つ又はそれ以上の疎水性基を有する環状部分）を含有する1つ又はそれ以上のサブユニットを包含する。一実施形態では、ポリマーは、環状部

50

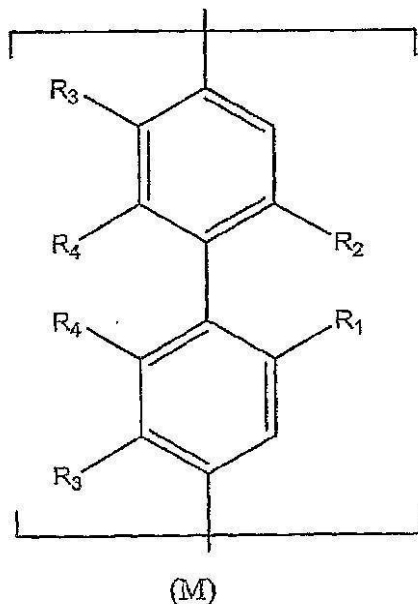
分が交互に疎水性基及び親水性基を有するように環状部分を有するポリマーである。例えば、サブユニットは、ステロイド（例えば、コール酸）を含有してもよい。別の例では、サブユニットは、芳香族部分を含有してもよい。芳香族部分は、アトロプ異性を示すことができるもの、例えば 2, 2'-ビス（置換）-1, 1'-ビナフチル又は 2, 2'-ビス（置換）ビフェニルであり得る。

【0544】

サブユニットは、式（M）：

【0545】

【化45】



10

20

【0546】

を有する芳香族部分を含んでもよい。

式Mに関して、R₁は、任意選択でアリール、アルケニル、アルキニル、アルコキシ又はハロで置換されるか、かつ／又は任意選択でO、S、アルケニル又はアルキニルが挿入されるC₁～C₁₀₀アルキル、C₁～C₁₀₀ペルフルオロアルキル、又はOR₅である。

30

【0547】

R₂は、ヒドロキシ、ニトロ、サルフェート、リン酸、リン酸エステル、スルホン酸、OR₆、又は任意選択でヒドロキシ、ハロ、ニトロ、アリールスルフィニル若しくはアルキルスルフィニル、アリールスルホニル若しくはアルキルスルホニル、サルフェート、スルホン酸、リン酸、リン酸エステル、置換若しくは非置換アリール、カルボキシル、カルボン酸、アミノカルボニル又はアルコシカルボニルで置換されるか、かつ／又は任意選択でO、NH、S、S(O)、SO₂、アルケニル又はアルキニルが挿入されるC₁～C₁₀₀アルキルである。

40

【0548】

R₃は、水素であるか、又はR₄と一体となって融合フェニル環を形成する。

R₄は、水素であるか、又はR₃と一体となって融合フェニル環を形成する。

R₅は、任意選択でアリール、アルケニル、アルキニル、アルコキシ又はハロで置換されるか、かつ／又は任意選択でO、S、アルケニル又はアルキニルが挿入されるC₁～C₁₀₀アルキル、あるいはC₁～C₁₀₀ペルフルオロアルキルであり、R₆は、任意選択でヒドロキシ、ハロ、ニトロ、アリールスルフィニル若しくはアルキルスルフィニル、アリールスルホニル若しくはアルキルスルホニル、サルフェート、スルホン酸、リン酸、リン酸エステル、置換若しくは非置換アリール、カルボキシル、カルボン酸、アミノカルボニル又はアルコシカルボニルで置換されるか、かつ／又は任意選択でO、NH、S、

50

S (O)、S O₂、アルケニル又はアルキニルが挿入される C₁ ~ C₁₀₀ アルキルである。

【0549】

d s RNA の細胞取り込みの増大

本発明の方法は、i RNA 剤、ならびに i RNA 剤の細胞への取り込みに影響を及ぼす薬物の投与を包含し得る。該薬物は、i RNA 剤が投与される前に、i RNA 剤が投与された後に、あるいは i RNA 剤が投与されると同時に投与され得る。薬物は i RNA 剤と共有結合され得る。薬物は、例えば、リポ多糖、p 38 MAP キナーゼの活性化因子、又は NF- κ B の活性化因子であり得る。薬物は、細胞に対する一過性の影響を有し得る。

【0550】

薬物は、例えば細胞の細胞骨格を崩壊させることにより、例えば細胞の微小管、ミクロフィラメント及び／又は中間フィラメントを崩壊させることにより、i RNA 剤の細胞への取り込みを増大させることができる。薬物は、例えば、タキソン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャプラキノライド (japlakinolide)、ラトランクリン A、ファロイジン、スウィンホライド (swinholidide) A、インダノシン (indanocine) 又はミオセルビン (myoservin) であり得る。

10

【0551】

薬物はまた、例えば、炎症性応答を活性化することにより、i RNA 剤の細胞内への取り込みを増大させることができる。このような作用を有する例示的な薬物としては、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターロイキン-1 β 又は γ インターフェロンが挙げられる。

20

【0552】

i RNA 複合体

i RNA 剤は、第 2 の作用物質にカップリング (例えば、共有結合) させることができる。例えば、特定の障害を治療するのに使用される i RNA 剤は、第 2 の治療薬、例えば i RNA 剤以外の作用物質にカップリングさせることができる。第 2 の治療薬は、同じ障害の治療を対象とするものであり得る。例えば、望ましくない細胞増殖 (例えば、がん) を特徴とする障害を治療するのに使用される i RNA の場合では、i RNA 剤は、抗がん作用を有する第 2 の作用物質にカップリングさせることができる。例えば、i RNA 剤は、免疫系を刺激する作用物質 (例えば、CpG モチーフ)、あるいはより一般的には toll-like 受容体を活性化し、かつ／又は γ インターフェロンの産生を増大させる作用物質にカップリングさせることができる。

30

【0553】

i RNA の生産

i RNA は、例えば大量に、各種方法により生産することができる。例示的な方法としては、有機合成及び RNA 切断 (例えば、in vitro での切断) が挙げられる。

【0554】

有機合成

i RNA は、二本鎖の RNA 分子の各々の鎖を別個に合成することにより作製することができる。次に、構成成分の鎖をアニーリングさせることができる。

40

【0555】

大きなバイオリアクター (例えば、ファルマシア バイオテック AB (Pharmacia Biotech AB) (スウェーデンウプサラ (Uppsala) 所在) の Oligo Pilot (商標) II) を用いて、所定の i RNA 用の特定の RNA 鎖を大量に生産することができる。Oligo Pilot II リアクターは、1.5 M 過剰のホスホロアミダイトヌクレオチドのみを使用して、効率的にヌクレオチドをカップリングすることができる。RNA 鎖を作製するためには、リボヌクレオチドアミダイトが使用される。標準的なモノマー添加サイクルを使用して、i RNA 用の 21 ~ 23 ヌクレオチド鎖を合成することができる。通常、2つの相補的な鎖を別個に生産した後、例えば固体支持体からの放出及び脱保護の後にアニーリングさせる。

50

【0556】

有機合成を使用して、別個の iRNA 種を生産することができる。特定の標的遺伝子に対する該 iRNA 種の相補性を、正確に指定することができる。例えば、該 iRNA 種は、多型、例えば一塩基多型を含む領域に相補的であり得る。さらに、多型の位置は、正確に規定され得る。幾つかの実施形態では、多型は、内部領域、例えば末端の一方又は両方から少なくとも 4、5、7 又は 9 ヌクレオチドの位置にある。

【0557】

dsRNA 切断

iRNA はまた、より大きな ds iRNA を切断することにより作製することができる。切断は、in vitro 又は in vivo で実現され得る。例えば、in vitro での切断により iRNA を生産するために、以下の方法を使用することができる： 10

in vitro 転写。 dsRNA は、両方向に核酸 (DNA) セグメントを転写することにより生産される。例えば、HiScribe (商標) RNAi 転写キット (ニュー イングランド バイオラプス (New England Biolabs)) は、ベクターと、両側に T7 プロモーターが隣接する位置で該ベクターにクローニングされた核酸セグメントに関して dsRNA を生産する方法とを提供する。別個の鋳型が、dsRNA 用の 2 つの相補鎖の T7 転写用に生成される。該鋳型は、T7 RNA ポリメラーゼの添加により in vitro で転写され、dsRNA が生産される。PCR 及び／又は他の RNA ポリメラーゼ (例えば、T3 ポリメラーゼ又は SP6 ポリメラーゼ) を用いた同様の方法もまた使用することができる。一実施形態では、この方法により生成される RNA は、組換え酵素の調製物に混入し得るエンドトキシンを除去するように慎重に精製される。 20

【0558】

in vitro 切断。 dsRNA は、例えば Dicer 又は匹敵する RNAアーゼ III ベースの活性を用いて、in vitro で切断されて iRNA となる。例えば、dsRNA は、ショウジョウバエ由来の in vitro 抽出物中で、あるいは精製された成分 (例えば、精製 RNAアーゼ又は RISC 複合体 (RNA 誘導性サイレンシング複合体)) を用いてインキュベートすることができる。例えば、ケッティングら (Ketting et al.) Genes Dev 2001 年 10 月 15 日、第 15 (20) 巻：2654～9 ページ及びハモンド (Hammond) Science 2001 年 8 月 10 日；第 293 (5532) 巻：1146～50 ページを参照されたい。 30

【0559】

dsRNA の切断により、概して複数の iRNA 種が生産され、それぞれがもとの dsRNA 分子の特定の 21～23 nt フラグメントである。例えば、もとの dsRNA 分子のオーバーラッピング領域及び隣接領域に相補的な配列を含む iRNA が存在し得る。

【0560】

合成方法にかかわらず、iRNA 調製物は、製剤化に適した溶液 (例えば、水溶液及び／又は有機溶液) 中で調製することができる。例えば、iRNA 調製物は、純粋な二重に蒸留した蒸留水中で沈殿及び再溶解され、凍結乾燥され得る。続いて、乾燥させた iRNA は、意図される製剤化プロセスに適した溶液中に再懸濁させることができる。 40

【0561】

修飾 iRNA 剤及びヌクレオチド代用物の iRNA 剤の合成は後述する。

製剤化

本明細書中に記載する iRNA 剤は、対象への投与用に製剤化することができる。

【0562】

説明を簡略化するために、本項での製剤、組成物及び方法は、主として非修飾 iRNA 剤に関して論述する。しかしながら、これらの製剤、組成物及び方法は、他の iRNA 剤、例えば修飾 iRNA 剤で実施することができ、かつそのような実施は本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。

【0563】

製剤化された iRNA 組成物は、様々な状態であると仮定することができる。幾つかの例では、組成物は、少なくとも部分的に結晶性、一様に結晶性、かつ／又は無水（例えば、水分が 80%未満、50%未満、30%未満、20%未満又は 10%未満）である。別の例では、iRNA は、水相中に、例えば水を含む溶液中に存在する。

【0564】

水相組成物又は結晶性組成物は、例えば送達ビヒクル、例えばリポソーム（特に水相に関して）又は粒子（例えば、結晶性組成物に関して適切であり得るような微粒子）に組み込むことができる。概して、iRNA 組成物は、意図される投与方法と適合性の様式で製剤化される（以下を参照）。

【0565】

特定の実施形態では、組成物は、以下の方法：噴霧乾燥、凍結乾燥、真空乾燥、蒸発、流動床乾燥（fluid bed drying）又はこれらの技法の組合せ、あるいは液体を用いた超音波処理、フリーズドライ、凝縮及び他の自己集合、の少なくとも 1 つにより調製される。

【0566】

iRNA 調製物は、別の作用物質、例えば別の治療薬又は iRNA を安定化する作用物質（例えば、iRNA と複合体形成して iRNP を形成するためのタンパク質）と組み合わせて製剤化することができる。さらに別の作用物質としては、例えば EDTA などのキレート化剤（例えば、 Mg^{2+} のような二価カチオンを除去するため）、塩、RNA アーゼ阻害剤（例えば、RNAsin のような広域特異性の RNA アーゼ阻害剤）等が挙げられる。

【0567】

一実施形態では、iRNA 調製物は、別の iRNA 剤、例えば第 2 の遺伝子に関して、あるいは同じ遺伝子に関して、RNAi を仲介することができる第 2 の iRNA を包含する。さらに別の調製物は、少なくとも 3 個、5 個、10 個、20 個、50 個若しくは 100 個又はそれ以上の異なる iRNA 種を包含することができる。このような iRNA は、同様の数の異なる遺伝子に関して RNAi を仲介することができる。

【0568】

一実施形態では、iRNA 調製物は、少なくとも第 2 の治療薬（例えば、RNA 又は DNA 以外の作用物質）を包含する。例えば、ウイルス疾患（例えば、HIV）の治療用の iRNA 組成物は、既知の抗ウイルス剤（例えば、プロテアーゼ阻害剤又は逆転写酵素阻害剤）を含んでもよい。別の例では、がんの治療用の iRNA 組成物は、化学療法剤をさらに含んでもよい。

【0569】

例示的な製剤を以下に論述する。

リポソーム

説明を簡略化するために、本項での製剤、組成物及び方法は、主として非修飾 iRNA 剤に関して論述する。しかしながら、これらの製剤、組成物及び方法は、他の iRNA 剤、例えば修飾 iRNA 剤で実施することができ、かつそのような実施は本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。iRNA 剤、例えば二本鎖の iRNA 剤又は sRNA 剤（例えば、前駆体、例えばより大きな iRNA 剤であって sRNA 剤へプロセッシングされ得るもの、あるいは DNA であって例えば二本鎖の iRNA 剤などの iRNA 剤若しくは sRNA 剤、又はそれらの前駆体をコードする DNA）の調製物は、膜状分子集合体（例えば、リポソーム又はミセル）中で送達されるように製剤化することができる。本明細書中で使用する場合、「リポソーム」という用語は、少なくとも 1 つの二重層、例えば 1 つの二重層又は複数の二重層に配置構成された両親媒性脂質から構成されるビヒクルを指す。リポソームとしては、親油性物質と水性の内部とから形成される膜を有する単層及び多重層ビヒクルを包含する。水性部分は、iRNA 組成物を含有する。親油性物質は、水性の外部から水性の内部を分離し、通常 iRNA 組成物を含まないが、幾つかの例では、iRNA 組成物を含んでもよい。リポソームは、作用部位への有効成分の移動及び送達に有用である。リポソーム膜は、構造的に生体膜に類似しているため、リポソームが組織に

10

20

30

40

50

適用されると、リボソーム二重層は、細胞膜の二重層と融合する。リボソーム及び細胞の融合が進行するにつれ、iRNAを含む内部の水性内容物が細胞に送達され、該細胞でiRNAは標的RNAに特異的に結合することができ、RNAiを仲介することができる。場合によっては、リボソームはまた、例えば、本明細書中に記載されるような特定の細胞種へ（例えば、腎臓の細胞へ）iRNAを誘導するように、特異的に標的化される。

【0570】

iRNAを含有するリボソームは、各種方法により調製することができる。

一例では、リボソームの脂質成分を洗浄剤中に溶解して、脂質成分によりミセルを形成させる。例えば、脂質成分は、両親媒性カチオン脂質又は脂質複合体であり得る。洗浄剤は、高い臨界ミセル濃度を有することができ、非イオン性であり得る。例示的な洗浄剤としては、コール酸塩、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコール酸塩及びラウロイルサルコシンが挙げられる。続いて、iRNA調製物を、脂質成分を含むミセルに添加する。脂質上のカチオン基は、iRNAと相互作用し、iRNAの周囲で凝縮して、リボソームを形成する。凝縮後、洗浄剤を、例えば透析により除去して、iRNAのリボソーム調製物を得る。

【0571】

必要であれば、凝縮を助長する担体化合物を、例えば制御された添加により、凝縮反応中に添加することができる。例えば、担体化合物は、核酸以外のポリマー（例えば、スペルミン又はスペルミジン）であり得る。凝縮を助けるためにpHを調節することもできる。

【0572】

送達ビヒクルの構造的成分としてポリヌクレオチド／カチオン脂質複合体を取り入れる安定なポリヌクレオチド送達ビヒクルを生産する方法のさらなる説明は、例えば、国際公開公報第96／37194号に記載されている。リボソーム形成はまた、フェルグナー、P. L. ら（Felgner, P. L. et al.）、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 第8巻：7413～7417ページ、1987年；米国特許第4,897,355号；米国特許第5,171,678号、バングハムら（Bangham, et al.）M. Mol. Biol. 第23巻：238ページ、1965年；オルソンら（Olson, et al.）Biochim. Biophys. Acta 第557巻：9ページ、1979年；スゾカら（Szoka, et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. 第75巻：4194ページ、1978年；メイヒューら（Mayhew, et al.）Biochim. Biophys. Acta 775巻：169ページ、1984年；キムら（Kim, et al.）Biochim. Biophys. Acta 第728巻：339ページ、1983年及びフクナガラ（Fukunaga, et al.）Endocrinol. 第115巻：757ページ、1984年に記載される例示的な方法の1つ又はそれ以上の態様を包含することができる。送達ビヒクルとして使用するための適切なサイズを有する脂質凝集体を調製するための、一般的に使用されている技法としては、超音波処理及び凍結融解と押出しが挙げられる（例えば、マイヤーら（Mayer, et al.）Biochim. Biophys. Acta 第858巻：161ページ、1986年を参照）。微小流体操作は、一貫して小さく（50～200nm）かつ比較的一様な凝集体が望ましい場合に使用することができる（メイヒューら（Mayhew, et al.）Biochim. Biophys. Acta 第775巻：169ページ、1984年）。これらの方法は、iRNA調製物をリボソームにパッケージングするように容易に適応される。

【0573】

pH感受性の又は負に帯電したリボソームは、核酸分子と複合体形成するのではなく、核酸分子を捕捉する。核酸分子及び脂質の両方が同様に帯電しているため、複合体形成ではなく反発が起きる。それにもかからず、幾つかの核酸分子は、これらのリボソームの水性内部内に捕捉される。pH感受性のリボソームは、培養において細胞単層にチミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを送達するのに使用されている。外来遺伝子の発現が標

10

20

30

40

50

的細胞で検出された（チョウら（Zhou et al.） Journal of Controlled Release、第19巻、（1992年） 269～274ページ）。

【0574】

リポソーム組成物の主要なタイプの1つとして、天然に由来するホスファチジルコリン以外のリン脂質が挙げられる。例えば、中性のリポソーム組成物は、ジミリスチルホスファチジルコリン（DMPC）またはジパルミチルホスファチジルコリン（DPPC）から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は概して、ジミリスチルホスファチジルグリセロールから形成されるのに対して、アニオン性融合性リポソームは、主としてジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）から形成される。別のタイプのリポソーム組成物は、例えばダイズPCおよび卵PCのようなホスファチジルコリン（PC）から形成される。別のタイプは、リン脂質および／またはホスファチジルコリンおよび／またはコレステロールの混合物から形成される。

10

【0575】

リポソームを *in vitro* および *in vivo* で細胞に導入する他の方法の例としては、米国特許第5,283,185号；米国特許第5,171,678号；国際公開公報第94/00569号；国際公開公報第93/24640号；国際公開公報第91/16024号；フェルグナー（Felgner）、J. Biol. Chem. 第269巻：2550ページ、1994年；ナベル（Nabel）、Proc. Natl. Acad. Sci. 第90巻：11307ページ、1993年；ナベル（Nabel）、Human Gene Ther. 第3巻：649ページ、1992年；ゲルション（Gershon）、Biochem. 第32巻：7143ページ、1993年およびストラウス（Strauss）、EMBO J. 第11巻：417ページ、1992年が挙げられる。

20

【0576】

一実施形態では、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームは、細胞膜に融合することが可能であるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、原形質膜とは効率的に融合することは可能でないが、*in vivo* でマクロファージにより取り込まれ、iRNAをマクロファージに送達するのに使用することができる。

【0577】

リポソームのさらなる利点としては、天然リン脂質から得られるリポソームは、生体適合性かつ生分解性であること、リポソームは、広範囲の水溶性および脂溶性薬物を取り込むことができること、リポソームが、リポソーム内部のコンパートメント中に被包されたiRNAを代謝および分解から保護することが挙げられる（ロゾッフ（Rosoff）、「薬学的投薬形態（Pharmaceutical Dosage Forms）」より、リーベルマン、リーガーおよびバンカー（Lieberman、RiegerおよびBanker）（編）、1988年、第1巻、p245）。リポソーム製剤の調製における重要な考慮事項は、リポソームの脂質表面電荷、ビヒクルサイズおよび水性容量である。

30

【0578】

正に帯電した合成カチオン性脂質であるN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）は、核酸と自発的に相互作用して、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合し、その結果iRNAの送達をもたらすことができる脂質-核酸複合体を形成する小リポソームを形成するのに使用することができる（例えば、DOTMAおよびDNAとのその使用の説明に関して、フェルグナー、ピー、エルら（Felgner, P. L. et al.）、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 第8巻：7413～7417ページ、1987年および米国特許第4,897,355号を参照）。

40

【0579】

DOTMA類縁体である1,2-ビス（オレオイルオキシ）-3-（トリメチルアンモニア）プロパン（DOTAP）は、リン脂質と組み合わせて使用して、DNAと複合体形成するビヒクルを形成することができる。Lipofectin（商標）（ベテスダ リ

50

サーチ ラボラトリーズ (Bethesda Research Laboratories)、米国メリーランド州ゲイサースバーグ (Gaithersburg) 所在) は、負に帯電したポリヌクレオチドと自発的に相互作用して複合体を形成する、正に帯電した DOTMA リポソームを含んでなる、高度にカチオン性の核酸を生体組織培養細胞内に送達するための有効な作用物質である。十分に正に帯電したリポソームが使用されると、得られた複合体上の正味の電荷もまた正である。このようにして調製される正に帯電した複合体は、負に帯電した細胞表面に自発的に結合して、原形質膜と融合し、例えば組織培養細胞へ機能的核酸を効率的に送達する。別の市販のカチオン性脂質である、1, 2-ビス (オレオイルオキシ) -3, 3-(トリメチルアンモニウム) プロパン (「DOTAP」) (ベーリングー マンハイム (Boehringer Mannheim)、米国インディアナ州インディアナポリス (Indianapolis) 所在) は、オレオイル部分がエーテル結合ではなくエステルにより連結されるという点で DOTMA と異なる。

10

【0580】

他の報告されているカチオン性脂質成分としては、例えば2種類の脂質のうちの1つに結合されており、5-カルボキシスベルミルグリシンジオクタオレオイルアミド (「DOGS」) (Transfectam (商標)、プロメガ (Promega)、米国ウィスコンシン州マディソン (Madison) 所在) およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスベルミルアミド (「DPPEs」) のような化合物を包含するカルボキシスベルミンを含む様々な部分に結合されているものが挙げられる (例えば、米国特許第5, 171, 678号を参照)。

20

【0581】

別のカチオン性脂質複合体としては、DOPEと組み合わせてリポソーム内に製剤化されているコレステロールによる脂質の誘導体化 (「DC-Chol」) が挙げられる (ガオ、X. およびフアング、エル. (Gao, X. and Huang, L.)、Biochim. Biophys. Res. Commun. 第179巻: 280ページ、1991年を参照)。DOPEにポリリシンを結合させることにより作製されるリポポリリシンは、血清の存在下でのトランスフェクションに有効であることが報告されている (チョウ、エックスら (Zhou, X. et al.)、Biochim. Biophys. Acta 第1065巻: 8ページ、1991年)。ある特定の細胞株に関して、カチオン性脂質が結合されたこれらのリポソームは、DOTMA含有組成物よりも低毒性を示し、かつより効率的なトランスフェクションを提供すると言われている。他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIEおよびDMRIE-HP (バイカル (Vical)、米国カリフォルニア州ラホーヤ (La Jolla) 所在) およびリポフェクタミン (DOSPA) (ライフ テクノロジー インコーポレイテッド社 (Life Technology, Inc.)、米国メリーランド州ゲイサースバーグ (Gaithersburg) 所在) が挙げられる。オリゴヌクレオチドの送達に適した他のカチオン性脂質は、国際公開公報第98/39359号および国際公開公報第96/37194号に記載されている。

30

【0582】

リポソーム製剤は、局所投与に特に適しており、リポソームは、他の製剤を上回る幾つかの利点を提示する。かかる利点としては、投与された薬物の高い全身吸収に関連した副作用の低減、投与された薬物の所望の標的における蓄積の増大および皮膚へiRNAを投与する能力が挙げられる。幾つかの実施形態では、リポソームは、上皮細胞へiRNAを送達するのに、また真皮組織への (例えば、皮膚への) iRNAの浸透を増強するのに使用される。例えば、リポソームは、局所的に塗布することができる。リポソームとして製剤化された薬物の皮膚への局所送達については、実証されている (例えば、ウェイナーら (Weiner et al.)、Journal of Drug Targeting、1992年、第2巻、405~410ページおよびドゥ プレシスら (du Plessis et al.)、Antiviral Research、第18巻、1992年、259~265ページ; マンニノ、アール. ジェイ. およびフォウルドーフォゲライト、S. (Mannino, R. J. and Fould-Forgerrite, S

40

50

.)、B i o t e c h n i q u e s 第6巻：682～690ページ、1988年；イタニ、ティーら (I t a n i, T. e t a l.) G e n e 第56巻：267～276ページ、1987年；ニコラウ、シーら (N i c o l a u, C. e t a l.) M e t h. E n z. 第149巻：157～176ページ、1987年；ストラウビンガー、アール. エム. およびパパハジヨポウロス、ディー. (S t r a u b i n g e r, R. M. a n d P a p a h a d j o p o u l o s, D.) M e t h. E n z. 第101巻：512～527ページ、1983年；ワング、シー. ワイ. およびフアング、エル. (W a n g, C. Y. a n d H u a n g, L.) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 第84巻：7851～7855ページ、1987年を参照)。

【0583】

非イオン性リポソーム系もまた、特に非イオン性界面活性剤およびコレステロールを含む系において、薬物の皮膚への送達における該リポソーム系の有用性を決定するために検査されている。N o v a s o m e (登録商標) I (グリセリルジラウレート／コレステロール／ポリオキシエチレンー10ーステアリルエーテル) およびN o v a s o m e (登録商標) I I (グリセリルジステアレート／コレステロール／ポリオキシエチレンー10ーステアリルエーテル) を含む非イオン性リポソーム製剤は、マウス皮膚の真皮へ薬物を送達するのに使用された。i R N Aを含むかかる製剤は、皮膚科の障害を治療するのに有用である。

【0584】

i R N Aを包含するリポソームは、高度に変形可能とすることができる。かかる変形能は、リポソームが、リポソームの平均半径より小さな孔を通して浸透することを可能とすることができる。例えば、トランスフェロゾーム (transfersome、登録商標) は、変形可能なリポソームの一種である。トランスフェロゾームは、表面縁活性化因子、通常は界面活性剤を標準的なリポソーム組成物に添加することにより作製することができる。i R N Aを含むトランスフェロゾームは、例えば皮膚中のケラチノサイトへi R N Aを送達するために皮下注射により送達することができる。無傷の哺乳類皮膚を通過するためには、脂質ビヒクルは、適切な経皮勾配の影響下で、それぞれが直径50nm未満の一連の微細孔を通して通過しなければならない。さらに、脂質の特性に起因して、これらのトランスフェロゾームは、自己最適化性 (例えば皮膚の中の孔の形状に適応可能)、自己修復性であり得るとともに、多くの場合断片化することなく標的に到達することができ、自己装填性であり得ることが多い。i R N A剤は、リポソームとの会合を改善する部分に連結されたR R M Sを包含することができる。

【0585】

界面活性剤

説明を簡略化するために、本項での製剤、組成物および方法は、主として非修飾i R N A剤に関して論述する。しかしながら、これらの製剤、組成物および方法は、他のi R N A剤、例えば修飾i R N A剤で実施することができ、かつかかる実施は本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。界面活性剤は、エマルジョン (マイクロエマルジョンを含む) およびリポソーム (上記を参照) のような製剤中で広く適用される。i R N A (または前駆体、例えばプロセシングされてi R N Aになり得るより大きなd s R N A、あるいはi R N Aまたは前駆体をコードするD N A) の組成物が、界面活性剤を包含することができる。一実施形態では、i R N Aは、界面活性剤を含むエマルジョンとして製剤化される。多くの異なるタイプの界面活性剤 (天然および合成の両方) の特性を分類およびランク付けする最も一般的な方法は、親水性／親油性バランス (H L B) の使用によるものである。親水性基の性質は、製剤に使用される種々の界面活性剤を類別するための最も有用な手段を提供する (リーガー (R i e g e r)、「薬学的投薬形態 (Pharmaceutical Dosage Forms)」内、マーセル デッカー インコーポレイテッド社 (M a r c e l D e k k e r, I n c.)、米国ニューヨーク州ニューヨーク (N e w Y o r k) 所在、1988年、p 285)。

【0586】

界面活性剤分子がイオン化されない場合は、非イオン性界面活性剤として分類される。非イオン性界面活性剤は、薬学的製品において広く適用されており、広範囲のpH値にわたって使用可能である。一般的に、それらのHLB値は、それらの構造に応じて、2～約18の範囲である。非イオン性界面活性剤としては、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステルおよびエトキシ化エステルのような非イオン性エステルが挙げられる。非イオン性アルカノールアミドおよびエーテル（例えば、脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコールおよびエトキシ化／プロポキシ化ブロックポリマー）もまた、この種類に含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤類のうち最も一般的なものである。

10

【0587】

界面活性剤分子が負の電荷を保有する場合、水中に溶解または分散されるときはアニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤としては、石鹼のようなカルボキシレート、アシルラクチレート、アミノ酸のアシルアミド、アルキルサルフェートおよびエトキシ化アルキルサルフェートのような硫酸のエステル、アルキルベンゼンスルホネートのようスルホン酸塩、アシルイセチオネート (acyl isethionate)、アシルタウレートおよびスルホスクシネート、ならびにホスフェートが挙げられる。アニオン性界面活性剤類のうち最も重要なものは、アルキルサルフェートおよび石鹼である。

【0588】

界面活性剤分子が正の電荷を保有する場合、水中に溶解または分散されるときはカチオン性として分類される。カチオン性界面活性剤としては、第四級アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが挙げられる。第四級アンモニウム塩は、この種類のうちで最もよく使用されるものである。

20

【0589】

界面活性剤分子が正または負の電荷のいずれかを保有する能力を有する場合、該界面活性剤は両性として分類される。両性界面活性剤としては、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルピタインおよびホスファチドが挙げられる。

【0590】

薬物製品中、製剤中およびエマルジョン中での界面活性剤の使用は概説されている（リーガー (Rieger)、「薬学的投薬形態 (Pharmaceutical Dosage Forms)」、マーセル デッカー インコーポレイテッド社 (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク (New York) 所在、1988年、p285)。

30

【0591】

ミセルおよび他の膜状製剤

説明を簡略化するために、本項でのミセルおよび他の製剤、組成物および方法は、主として非修飾iRNA剤に関して論述する。しかしながら、これらのミセルおよび他の製剤、組成物および方法は、他のiRNA剤、例えば修飾iRNA剤で実施することができ、かつかかる実施は本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。iRNA剤、例えば二本鎖のiRNA剤またはsRNA剤（例えば前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖iRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤、またはそれらの前駆体をコードするDNA）の組成物は、ミセル製剤として提供され得る。「ミセル」は、本明細書中では、両親媒性分子が、同分子の疎水性部分すべてが内側に向き、親水性部分が周囲の水相と接触するように球状構造に配置構成される、特定の種類の分子集合体として定義される。反対の配置構成は、環境が疎水性である場合に存在する。

40

【0592】

経皮膜を通過しての送達に適した混合ミセル製剤は、iRNA組成物の水溶液と、アルカリ金属C₈～C₂₂アルカリサルフェートと、ミセル形成化合物とを混合することにより調製され得る。ミセル形成化合物の例としては、レシチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸の薬学的に許容可能な塩、グリコール酸、乳酸、カモミール抽出物、キュウリ抽出物、オ

50

レイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノオレイン、モノオレエート、モノラウレート、ルリヂサ油、月見草油、メントール、トリヒドロキシオキソコラニルグリシンおよびそれらの薬学的に許容可能な塩、グリセリン、ポリグリセリン、リシン、ポリリシン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテルおよびそれらの類縁体、ポリドカノールアルキルエーテルおよびそれらの類縁体、ケノデオキシコレート、デオキシコレート、ならびにそれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物は、アルカリ金属アルキルサルフェートの添加と同時に、あるいは添加後に添加され得る。混合ミセルは、成分の実質的に任意の種類の混合処理により形成するが、より小さなサイズのミセルを提供するためには強力な混合が好ましい。

【0593】

10

1つの方法では、iRNA組成物および少なくともアルカリ金属アルキルサルフェートを含有する第1のミセル組成物が調製される。次に、この第1のミセル組成物を、少なくとも3つのミセル形成化合物と混合して、混合ミセル組成物を形成する。別の方法では、ミセル混合物は、iRNA組成物、アルカリ金属アルキルサルフェートおよび少なくとも1つのミセル形成化合物を混合し、続いて強力に混合しながら、残りのミセル形成化合物を添加することにより調製される。

【0594】

フェノールおよび／またはm-クレゾールを混合ミセル組成物に添加して、製剤を安定化し、かつ細菌増殖に対して保護してもよい。あるいは、フェノールおよび／またはm-クレゾールをミセル形成成分と混合してもよい。グリセリンのような等張剤もまた、混合ミセル組成物の形成後に添加してもよい。

20

【0595】

ミセル製剤をスプレーとして送達するために、製剤をエーロゾルディスペンサーに入れることができ、該ディスペンサーを噴射剤で充満させる。加圧下にある噴射剤は、ディスペンサー中では液体形態である。成分の比は、水相および噴射剤相が1つになるように、すなわち1つの相が存在するように調節される。2つの相が存在する場合、例えば定量弁により内容物の一部を投薬する前に、ディスペンサーを振とうする必要がある。医薬品の投薬用量は、微細スプレーで定量弁から噴射される。

【0596】

好ましい噴射剤は、水素含有クロロフルオロカーボン、水素含有フルオロカーボン、ジメチルエーテルおよびジエチルエーテルである。HFA 134a (1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン) がより一層好ましい。

30

【0597】

必須成分の特定濃度は、比較的直接的な実験により決定することができる。口腔による吸収のためには、投与量を注射による投与または胃腸管を介した投与に関する投与量の少なくとも2倍または3倍に増大させることが望ましい場合が多い。

【0598】

iRNA剤は、ミセルまたは他の膜状製剤との会合を改善する構成部分に連結されたRMSを包含することができる。

粒子

40

説明を簡略化するために、本項での粒子、製剤、組成物および方法は、主として非修飾iRNA剤に関して論述する。しかしながら、これらの粒子、製剤、組成物および方法は、他のiRNA剤、例えば修飾iRNA剤で実施することができ、かつかかる実施は本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。別の実施形態では、iRNA剤、例えば二本鎖のiRNA剤またはsRNA剤（例えば前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）の調製物は、粒子（例えば、微粒子）に組み込まれ得る。微粒子は、噴霧乾燥により生産することができるが、凍結乾燥、蒸発、流動床乾燥、真空乾燥またはこれらの技法の組合せを含む他の方法により生産してもよい。さらなる説明は以下を参照されたい。

50

【0599】

持続放出性製剤。本明細書中に記載する iRNA 剤、例えば二本鎖の iRNA 剤または sRNA 剤（例えば前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤またはそれらの前駆体をコードする DNA）は、制御された放出（例えば、徐放）用に製剤化することができる。制御放出は、その放出を遅らせる構造または物質内に iRNA を配することにより達成することができる。例えば、iRNA は、多孔質マトリックス内に、あるいは浸食性マトリックス中に配置させることができ、これらのいずれも長期間にわたる iRNA の放出を可能にする。

【0600】

10

高分子粒子、例えば高分子微粒子は、生分解により微粒子から放出されたときのみ細胞により取り込まれる、iRNA の持続放出性リザーバとして使用することができる。したがって、この実施形態の高分子粒子は、食作用を防止するのに十分大きく（例えば、10 μm より大きい、好ましくは 20 μm より大きく）あるべきである。かかる粒子は、より小さな粒子を作製するのと同じ方法であるが、第 1 のエマルジョンおよび第 2 のエマルジョンの混合はあまり強力でない方法により生産することができる。すなわち、均質化速度、ボルテックス混合速度、または超音波処理設定をより低くして、10 μm ではなく直径およそ 100 μm の粒子を得ることができる。混合の時間もまた変更することができる。

【0601】

より大きな微粒子は、筋肉内、皮下、皮内、静脈内または腹腔内注射により、吸入により（鼻内または肺内）、経口的にあるいは移植により送達されるように、懸濁液、粉末または移植可能な固体として製剤化することができる。これらの粒子は、比較的長期間にわたる徐放が望ましい場合に、任意の iRNA の送達に有用である。分解速度、したがって放出速度は、高分子製剤により多様である。

20

【0602】

微粒子は好ましくは、液体懸濁液の媒質が粒子境界を自由に浸透または灌流する孔、空隙、くぼみ、欠損部または他の間質腔を包含する。例えば、有孔の微細構造を用いて、くぼみを有する多孔質噴霧乾燥ミクロスフェアを形成することができる。

【0603】

iRNA（例えば、sRNA）を含有する高分子粒子は、例えば二重エマルジョン技法を用いて作製することができる。まず、ポリマーを有機溶媒中に溶解させる。好ましいポリマーは、乳酸／グリコール酸の重量比が 65：35、50：50 または 75：25 の乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）である。次に、水溶液中に懸濁させた核酸の試料を該ポリマー溶液に添加して 2 つの溶液を混合し、第 1 のエマルジョンを形成する。これらの溶液は、ボルテックス混合または振とうにより混合することができ、好ましい方法では、混合物を超音波処理することができる。最も好ましいのは、核酸が受けるニック形成、剪断または分解の形態の損傷が最少量である一方、依然として適切なエマルジョンの形成を可能にする、任意の方法である。例えば、許容可能な結果は、0.3175 センチメートル（3.2 mm（1/8 インチ））マイクロチッププローブを備えた Vibra-cell（商標）モデル VC-250 ソニケーターにより、設定 No. 3 で得ることができる。

30

40

【0604】

噴霧乾燥。iRNA 剤、例えば二本鎖の iRNA 剤または sRNA 剤（例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤またはそれらの前駆体をコードする DNA）は、噴霧乾燥により調製することができる。噴霧乾燥した iRNA を、対象に投与しもよいし、あるいはさらなる製剤化に供してもよい。iRNA の医薬組成物は、分散可能な粉末組成物（例えば、医薬組成物）を提供するのに十分な条件下で、iRNA を包含する均質水性混合物を噴霧乾燥することにより調製することができる。噴霧乾燥用の材料はまた、1 つまたはそれ以上の薬学的に許容可能な賦形剤あるいは分散性を増強する

50

量の生理学的に許容可能な水溶性タンパク質を包含することができる。噴霧乾燥した製品は、iRNAを包含する分散可能な粉末であり得る。

【0605】

噴霧乾燥は、液体またはスラリー材料を乾燥した粒子形態に変換する処理工程である。噴霧乾燥は、吸入を含む様々な投与経路用の粉末材料を提供するのに使用することができる。例えば、エム．サッチェッティおよびエム．エム．ファン オルト (M. S a c c h e t t i a n d M. M. V a n O o r t)、「吸入エアロゾル：療法に関する物理的および生物学的基盤 (Inhalation Aerosols: Physical and Biological Basis for Therapy)」内、エイ．ジェー．ヒッキー (A. J. H i c k e y) 編、マーセル デッカー (M a r c e l D e k k a r)、ニューヨーク、1996年を参照されたい。

10

【0606】

噴霧乾燥は、液滴の微細ミストを形成するために溶液、エマルジョンまたは懸濁液を噴霧化すること、および液滴を乾燥させることを包含することができる。該ミストを乾燥用チャンバ（例えば、容器、タンク、チューブまたはコイル）内へ発射し、該チャンバ内でミストを乾燥用ガスに接触させることができる。ミストは、固体または液体の細孔形成剤を包含することができる。媒質および細孔形成剤は、液滴から乾燥用ガスへと蒸発して、液滴を固化させ、同時に該固化物（固体）全体にわたって細孔を形成する。続いて、この固体（通常は粉末状粒子形態）を乾燥用ガスから分離および回収する。

【0607】

噴霧乾燥は、高度に分散された液体および十分容量の空気（例えば、熱空気）を一緒にして、液体小滴の蒸発および乾燥をもたらすことを包含する。噴霧乾燥されるべき調製物は、任意の溶液、当然、懸濁液、スラリー、コロイド分散液、または選択した噴霧乾燥装置を用いて噴霧化され得るペーストであり得る。通常、該供給物は、媒質を蒸発させて乾燥産物を回収器に運搬するろ過された温気流中に噴霧される。次に、使用済み空気は媒質とともに排出される。幾つかの異なるタイプの装置を用いて、所望の産物を提供してもよい。例えば、ブッチ株式会社 (B u c h i L t d.) またはニプロコーポレーション (N i p r o C o r p.) により製造される市販の噴霧乾燥機は、所望のサイズの粒子を効率的に生産することができる。

20

【0608】

噴霧乾燥した粉末粒子は、形状がほぼ球状であり、サイズがほぼ均一であり、多くの場合くぼみがあり得る。組み込まれる薬物および噴霧乾燥条件に応じて、ある程度の不規則性が存在し得る。多くの場合、噴霧乾燥したミクロスフェアの分散安定性は、該ミクロスフェアの生産において膨張剤（または発泡剤）を使用するとより有効であるようである。特に好ましい実施形態は、分散相または連続相（他方の相は、事実上水性である）として膨張剤を有するエマルジョンを含み得る。膨張剤は好ましくは、界面活性剤溶液を用いて、例えば約34～103Pa（5,000～15,000psi）の圧力で市販の微小流動化装置を用いて分散させる。この処理工程により、通常水性連続相中に分散させた水不混和性発泡剤のサブミクロンの小滴を含む、好ましくは組み込まれた界面活性剤により安定化されたエマルジョンが形成される。この技法および他の技法を用いたかかる分散液の形成は、一般的であり、当業者に既知である。発泡剤は、噴霧乾燥処理中に気化して、一般的にくぼんだ多孔質の空力的に軽いミクロスフェアが残るフッ素化合物（例えば、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロオクチルブロミド、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロブチルエタン）であることが好ましい。以下により詳細に論述するように、他の適切な発泡剤としては、クロロホルム、フレオンおよび炭化水素が挙げられる。窒素ガスおよび二酸化炭素もまた、適切な発泡剤として意図される。

30

40

【0609】

有孔の微細構造は、上述のように発泡剤を用いて形成されることが好ましいが、当然のことながら、場合によっては、発泡剤を必要とせず、薬物および界面活性剤（複数可）の水性分散液が直接噴霧乾燥される。かかる場合では、製剤は、くぼみを有する比較的多孔質の微粒子の形成を概して導くような処理工程条件（例えば、温度の上昇）に修正可能で

50

ある。さらに、薬物は、かかる技法における使用に特に適切な特殊な物理化学的特性（例えば、高い結晶性、高い融解温度、界面活性等）を保有し得る。

【0610】

有孔の微細構造は、任意選択で1つまたはそれ以上の界面活性剤を伴っても、あるいは含んでもよい。さらに、混和性界面活性剤を、任意選択で懸濁液の媒質液体相と組み合わせてもよい。界面活性剤の使用は、さらに分散安定性を増大し得るか、製剤化の手順を簡素化し得るか、あるいは投与時の生物学的利用能を増大させ得ることが当業者に理解されよう。当然のことながら、液体相中で1つまたはそれ以上の界面活性剤を使用し、かつ有孔の微細構造に関連させて1つまたはそれ以上の界面活性剤を使用することを含む、界面活性剤の組合せは、本発明の範囲内であると意図される。「を伴って、あるいは含んで」とは、構造マトリックスまたは有孔の微細構造が、界面活性剤を組み込み得るか、界面活性剤を吸着し得るか、界面活性剤を吸収し得るか、界面活性剤でコーティングされ得るか、あるいは界面活性剤により形成され得ることを意味する。

10

【0611】

使用に適した界面活性剤としては、構造マトリックスと懸濁媒質との間の界面で層を形成することにより、安定化された呼吸器用分散液の形成および維持を助長する任意の化合物または組成物が挙げられる。界面活性剤は、単一の化合物でもよいし任意の化合物の組合せ（例えばコサーファクタントの場合）を含んでもよい。特に好ましい界面活性剤は、噴射剤中に実質的に不溶であり、フッ素化されておらず、飽和脂質および不飽和脂質、非イオン性洗剤、非イオン性ブロックコポリマー、イオン性界面活性剤、ならびにかかる作用物質の組合せから成る群より選択される。上述の界面活性剤のほかに、適切な（すなわち、生体適合性の）フッ素化界面活性剤は、本明細書中の技法と適合性であり、所望の安定化された調製物を提供するのに使用され得ることは強調されるべきである。

20

【0612】

天然および合成の供給源の両方に由来するリン脂質を含む脂質は、様々な濃度で使用されて、構造的マトリックスを形成し得る。概して、適合性の脂質とは、ゲルから液晶への相転移が約40℃より高いものを含む。好ましくは、組み込まれる脂質は、比較的長い鎖（すなわち、 $C_6 \sim C_{22}$ ）の飽和脂質であり、より好ましくはリン脂質を含む。開示する安定化された調製物において有用なリン脂質の例は、卵ホスファチジルコリン、ジラウリルホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステロイルホスファチジルコリン、短鎖ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイノシトール、糖脂質、ガングリオシドGM1、スフィンゴミエリン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、脂質を含むポリマー鎖（例えば、ポリエチレングリコール、キチン、ヒアルロン酸またはポリビニルピロリドン）、脂質を含むスルホン化単糖、二糖および多糖、脂肪酸（例えば、パルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸）、コレステロール、コレステロールエステルおよびコレステロールヘミスクシネートが挙げられる。それらの優れた生体適合性に起因して、リン脂質、ならびにリン脂質およびポロキサマーの組合せは、本明細書中に開示する安定化された分散物における使用に特に適している。

30

40

【0613】

適合性の非イオン性洗剤は、ソルビタントリオレート（Spans（商標）85）、ソルビタンセスキオレート、ソルビタンモノオレート、ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートおよびポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレートを含有するソルビタンエステル、オレイルポリオキシエチレン（2）エーテル、ステアリルポリオキシエチレン（2）エーテル、ラウリルポリオキシエチレン（4）エーテル、グリセロールエステル、ならびにスクロースエステルを含む。他の適切な非イオン性洗剤は、「McCutcheon's Emulsifiers and Detergents」（マックパブリッシング社（McPublishing Co.）、米国ニュージャージー州グレンロック（Glen Rock）所在）を用いて

50

容易に同定することができる。好ましいブロックコポリマーとしては、ポリオキシエチレンおよびポリオキシプロピレンのジブロックコポリマーおよびトリブロックコポリマー（ポロキサマー 188（Pluronic, RTM, F68）、ポロキサマー 407（Pluronic, RTM, F-127）およびポロキサマー 338を含む）が挙げられる。スルホコハク酸ナトリウムのようなイオン性界面活性剤および脂肪酸石鹼もまた利用することができる。好ましい実施形態では、微細構造は、オレイン酸またはそのアルカリ塩を含んでもよい。

【0614】

上述の界面活性剤のほかに、カチオン性界面活性剤または脂質は、iRNA 剤、例えば二本鎖の iRNA 剤または sRNA 剤（例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤またはそれらの前駆体をコードする DNA）の送達の場合に特に好ましい。適切なカチオン性脂質の例としては、DOTMA、すなわち N-[-(2,3)-ジオレイルオキシ]プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、DOTAP、すなわち 1,2-ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン、および DOTB、すなわち 1,2-ジオレイル-3-(4'-トリメチルアンモニオ)ブタノイル-sn-グリセロールが挙げられる。ポリリシンのようなポリカチオン性アミノ酸、およびポリアルギニンもまた意図される。

10

【0615】

噴霧処理工程に関して、回転噴霧化、圧力噴霧化および二液噴霧化のような噴霧方法を使用することができる。これらの処理工程で使用される装置の例としては、ヤマトケミカル社（Yamato Chemical Co.）製造の「パルビスミニスプレー GA-32」および「パルビススプレードライヤ DL-41」が挙げられるし、あるいは大川原化工機株式会社製の「スプレードライヤ CL-8」、「スプレードライヤ L-8」、「スプレードライヤ FL-12」、「スプレードライヤ FL-16」または「スプレードライヤ FL-20」を、回転円板噴霧器を用いた噴霧方法に関して使用することができる。

20

【0616】

噴霧された材料を乾燥させるのに使用するガスに関して、特に制限は課せられないが、空気、窒素または不活性ガスを使用することが推奨される。噴霧された材料を乾燥させるのに使用するガスの入口温度は、噴霧された材料の熱失活を引き起こさないような温度である。その温度範囲は、約 50℃～約 200℃、好ましくは約 50℃～100℃に及び得る。噴霧された材料を乾燥させるのに使用されるガスの出口の温度は、約 0℃～約 150℃、好ましくは 0℃～90℃、さらに好ましくは 0℃～60℃であり得る。

30

【0617】

噴霧乾燥は、呼吸に適切な粒子サイズ、低水分含有量およびエーロゾル化の準備が可能である流動特性を有する、均質構成の実質的に非晶質の粉末を生じる条件下でなされる。得られる粉末の粒子サイズは、約 98%を上回る質量が約 10 μm 以下の直径を有する粒子であり、質量の約 90%が、5 μm 未満の直径を有する粒子となることが好ましい。別例として、質量の約 95%は直径 10 μm 未満の粒子を有し、粒子の質量の約 80%は 5 μm 未満の直径を有する。

40

【0618】

iRNA 調製物を包含する分散性の医薬品ベースの乾燥粉末は、呼吸器投与および肺投与に適切な薬学的担体または賦形剤と任意に組み合わせてもよい。かかる担体は、患者に送達される粉末中の iRNA 濃度を低減させることが望ましい場合には単に増量剤としての役割を果たし得るが、iRNA のより効率的かつ再現性のある送達を提供し、かつ製造および粉末充填を容易にするための流動性および粘稠度のような iRNA の取り扱い上の特性を改善するように、iRNA 組成物の安定性を増強し、かつ粉末分散デバイス内の粉末の分散性を改善する役割を果たしてもよい。

【0619】

50

かかる担体材料は、噴霧乾燥前に、すなわち精製バルク溶液に担体材料を添加することにより、薬物と組み合わせてもよい。そのようにして、担体粒子が薬物粒子とともに同時に形成されて、均質な粉末を生じる。あるいは、担体を別個に乾燥粉末形態に調製して、ブレンドすることにより乾燥粉末薬物と組み合わせてもよい。粉末担体は、通常結晶であるが（水吸収を回避するため）、場合によっては、非晶質又は結晶と非晶質の混合物であってよい。担体粒子の大きさは、薬物粉末の流動性を改善するように選択してもよく、通常 $25\text{ }\mu\text{m}\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ の範囲である。好ましい担体材料は、上述の範囲のサイズを有する結晶性ラクトースである。

【0620】

上述の方法のいずれかにより調製された粉末は、その後の使用のために従来の様式で噴霧乾燥機から回収される。医薬品および他の目的として使用するために、篩い分けまたは他の従来の技法により、形成された全ての凝集物を崩壊させることが望ましいことが多い。医薬品用途に関しては、乾燥粉末製剤は、通常測り取って単回用量とされ、この単回用量がパッケージに密封される。かかるパッケージは、以下に詳述するように、乾燥粉末吸入器中での分散に特に有用である。あるいは、粉末は、多数回用量用の容器中にパッケージングされてもよい。

【0621】

疎水性およびその他の薬物および成分を噴霧乾燥させる方法は、米国特許第5,000,888号、同第5,026,550号、同第4,670,419号、同第4,540,602号および同第4,486,435号に記載されている。ブロッチおよびスペイソン（Bloch and Speison）（1983年）Pharm. Acta. Helv 第58巻：14～22ページは、ジオキサノール水および2-エトキシエタノール水の共沸溶媒中でのヒドロクロチアジドおよびクロルタリドン（親油性薬物）および親水性補助薬（ペンタエリスリトール）の噴霧乾燥を教示している。JP第806766号、JP第7242568号、JP第7101884号、JP第7101883号、JP第71018982号、JP第7101881号およびJP第4036233号を含む多数の日本国特許出願抄録が、親水性-疎水性産物の組合せの噴霧乾燥に関するものである。親水性-疎水性生成物の組合せを噴霧乾燥させることに関連した他の外国特許出願としては、FR第2594693号、DE第2209477号および国際公開公報第88/07870号が挙げられる。

【0622】

凍結乾燥

iRNA剤、例えば二本鎖のiRNA剤またはsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）の調製物は、凍結乾燥させることにより作製することができる。凍結乾燥は、組成物を凍結させた後に組成物から水を昇華させるフリーズドライ処理工程である。凍結乾燥処理工程に関連した特定の利点は、水溶液中で比較的不安定な生物製剤および医薬品を、温度上昇を伴わずに乾燥させることができ（それにより、有害な熱的影響を排除する）、続いて安定性の問題があまりみられない乾燥状態で保管することができることである。本発明に関して、かかる技法は、生理活性を弱めることなく核酸を有孔の微細構造に組込むことと特に適合性を有する。凍結乾燥した粒子状物質を提供する方法は当該技術分野で既知であり、本明細書中の教示にしたがって分散適合性の微細構造を提供するのに過度の実験を要さないことは明らかであろう。したがって、所望の多孔性およびサイズを有する微細構造を提供するように凍結乾燥処理工程が使用され得る限りは、凍結乾燥処理工程は本明細書中の教示と適合し、明らかに本発明の範囲内であると意図される。

【0623】

標的化

説明を簡略化するために、本項での製剤、組成物および方法は、主として非修飾iRNA剤に関して論述する。しかしながら、これらの製剤、組成物および方法は、他のiRNA

10

20

30

40

50

A 剤、例えば修飾 i R N A 剤で実施することができ、かつかかる実施は本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。

【0624】

幾つかの実施形態では、i R N A 剤、例えば二本鎖の i R N A 剤または s R N A 剤（例えば、前駆体、例えば s R N A 剤へプロセシングされ得るより大きな i R N A 剤、あるいは、例えば二本鎖の i R N A 剤もしくは s R N A 剤などの i R N A 剤またはそれらの前駆体をコードする D N A）は、特定の細胞を標的とする。例えば、i R N A を包含するリボソームもしくは粒子または他の構造は、標的細胞上の特定の分子を認識する標的化部分を包含することもできる。標的化部分は、標的細胞に関して特異的な親和性を有する分子であり得る。標的化部分には、標的細胞の表面上に見られるタンパク質に対する抗体、あるいは標的細胞の表面上に見られる分子に関するリガンドまたはリガンドの受容体結合部分を挙げることができる。例えば、標的化部分は、腎臓のがん特異的抗原（例えば、G 2 5 0、C A 1 5 - 3、C A 1 9 - 9、C E A または H E R 2 / n e u）またはウイルス抗原を認識することができ、したがってがん細胞またはウイルス感染細胞へ i R N A を送達する。標的化部分の例としては、抗体（例えば、I g M、I g G、I g A、I g D 等、またはそれらの機能的部分）、細胞表面受容体に関するリガンド（例えば、それらの外部ドメイン）が挙げられる。

10

【0625】

表 6 は、例えば腎臓以外の組織に対する i R N A 剤の標的化が望ましい場合に、選択された細胞に対して i R N A を標的化するのに使用することができる多数の抗原を提供する。

20

【0626】

【表 6】

表6. 標的化抗原

抗原	腫瘍組織の例	
CEA(がん胎児性抗原)	大腸、乳房、肺	
PSA(前立腺特異抗原)	前立腺がん	10
CA-125	卵巣がん	
CA 15-3	乳がん	
CA 19-9	乳がん	20
HER2/neu	乳がん	
α -フェトプロテイン	精巣がん、肝臓がん	
β -HCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)	精巣がん、絨毛がん	
MUC-1	乳がん	30
エストロゲン受容体	乳がん、子宮がん	
プロゲステロン受容体	乳がん、子宮がん	
EGFr(上皮細胞成長因子受容体)	膀胱がん	40

【0627】

一実施形態では、標的化部分はリポソームに結合される。例えば、米国特許第6,245,427号は、タンパク質またはペプチドを用いてリポソームを標的化する方法について記載している。別の例では、リポソームのカチオン性脂質成分が、標的化部分で誘導体化される。例えば、国際公開公報第96/37194号は、N-グルタリルジオレオイルホスファチジルエタノールアミンをN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルに変換することについて記載している。該生成物は続いてRGDペプチドにカップリングされた。

【0628】

遺伝子および疾患

一態様では、本発明は、望ましくない細胞増殖、例えば悪性または非悪性の細胞増殖の危険性があるか、あるいは悪性または非悪性細胞増殖に罹患した対象を治療する方法を特徴とする。該方法は、以下の：

iRNA剤、例えば本明細書中に記載のsRNAまたはiRNA剤（例えば、本明細書中に記載の構造を有するiRNA）を提供することと、該iRNAは、望ましくない細胞増殖を促進する遺伝子に相同であり、同遺伝子を例えば切断によりサイレンシングすることができることを特徴とすることと、

iRNA剤（例えば、本明細書中に記載するsRNAまたはiRNA剤）を対象、好ましくはヒト対象に投与することと、

それにより対象を治療することと
を包含する。

【0629】

好ましい実施形態では、遺伝子は、成長因子遺伝子または成長因子受容体遺伝子、キナーゼ（例えば、タンパク質チロシン、セリンまたはスレオニンキナーゼ）遺伝子、アダプタータンパク質遺伝子、Gタンパク質スーパーファミリー分子をコードする遺伝子、または転写因子をコードする遺伝子である。

【0630】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、PDGFβ遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないPDGFβ発現を特徴とする障害（例えば、精巣がんおよび肺がん）を有するか、またはその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0631】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、ErbB遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないErbB発現を特徴とする障害（例えば、乳がん）を有するか、またはその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0632】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、Src遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないSrc発現を特徴とする障害（例えば、大腸がん）を有するか、またはその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0633】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、CRK遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないCRK発現を特徴とする障害（例えば、大腸がん及び肺がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0634】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、GRB2遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないGRB2発現を特徴とする障害（例えば、扁平上皮細胞がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0635】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、RAS遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないRAS発現を特徴とする障害（例えば、膵臓がん、大腸がん及び肺がん、ならびに慢性白血病）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0636】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、MEKK遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないMEKK発現を特徴とする障害（例えば、扁平上皮細胞がん、黒色腫又は白血病）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0637】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、JNK遺伝子をサイレンシングし、したがって

、望ましくない J N K 発現を特徴とする障害（例えば、膵臓がん又は乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0638】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、R A F 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない R A F 発現を特徴とする障害（例えば、肺がん又は白血病）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0639】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、E r k 1 / 2 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない E r k 1 / 2 発現を特徴とする障害（例えば、肺がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

10

【0640】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、P C N A (p 2 1) 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない P C N A 発現を特徴とする障害（例えば、肺がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0641】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、M Y B 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない M Y B 発現を特徴とする障害（例えば、大腸がん又は慢性ミエロイド性白血病）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0642】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、c - M Y C 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない c - M Y C 発現を特徴とする障害（例えば、バーキットリンパ腫又は神経芽細胞腫）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

20

【0643】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、J U N 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない J U N 発現を特徴とする障害（例えば、卵巣がん、前立腺がん又は乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0644】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、F O S 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない F O S 発現を特徴とする障害（例えば、皮膚がん又は前立腺がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

30

【0645】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、B C L - 2 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない B C L - 2 発現を特徴とする障害（例えば、肺がん、前立腺がん又は非ホジキンリンパ腫）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0646】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、サイクリン D 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないサイクリン D 発現を特徴とする障害（例えば、食道がん及び大腸がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

40

【0647】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、V E G F 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない V E G F 発現を特徴とする障害（例えば、食道がん及び大腸がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0648】

好ましい実施形態では、i R N A 剤は、E G F R 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない E G F R 発現を特徴とする障害（例えば、乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0649】

別の好ましい実施形態では、i R N A 剤は、サイクリン A 遺伝子をサイレンシングし、

50

したがって、望ましくないサイクリンA発現を特徴とする障害（例えば、肺がん及び子宮頸がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0650】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、サイクリンE遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないサイクリンE発現を特徴とする障害（例えば、肺がん及び乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0651】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、WNT-1遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないWNT-1発現を特徴とする障害（例えば、基底細胞がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

10

【0652】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、 β -カテニン遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない β -カテニン発現を特徴とする障害（例えば、腺がん又は肝細胞がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0653】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、c-MET遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないc-MET発現を特徴とする障害（例えば、肝細胞がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0654】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、PKC遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないPKC発現を特徴とする障害（例えば、乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

20

【0655】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、NF κ B遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないNF κ B発現を特徴とする障害（例えば、乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0656】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、STAT3遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないSTAT3発現を特徴とする障害（例えば、前立腺がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

30

【0657】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、サバイピン遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないサバイピン発現を特徴とする障害（例えば、子宮頸がん又は膵臓がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0658】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、Her2/Neu遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないHer2/Neu発現を特徴とする障害（例えば、乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0659】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、トポイソメラーゼI遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないトポイソメラーゼI発現を特徴とする障害（例えば、卵巣がん及び大腸がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

40

【0660】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、トポイソメラーゼII α 遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないトポイソメラーゼII α 発現を特徴とする障害（例えば、乳がん及び大腸がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0661】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、p73遺伝子の突然変異をサイレンシングし、

50

したがって、望ましくない p 7 3 発現を特徴とする障害（例えば、結腸直腸腺がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0662】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は、p 2 1 (WAF1/CIP1) 遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、望ましくない p 2 1 (WAF1/CIP1) 発現を特徴とする障害（例えば、肝臓がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0663】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は、p 2 7 (KIP1) 遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、望ましくない p 2 7 (KIP1) 発現を特徴とする障害（例えば、肝臓がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0664】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は、PPMID 遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、望ましくない PPMID 発現を特徴とする障害（例えば、乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0665】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は、RAS 遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、望ましくない RAS 発現を特徴とする障害（例えば、乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0666】

別の好ましい実施形態では、iRNA 剤は、カベオリン I 遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、望ましくないカベオリン I 発現を特徴とする障害（例えば、食道扁平上皮細胞がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0667】

別の好ましい実施形態では、iRNA 剤は、MIB I 遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、望ましくない MIB I 発現を特徴とする障害（例えば、男性の乳がん (MBC)）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0668】

別の好ましい実施形態では、iRNA 剤は、MTA I 遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、望ましくない MTA I 発現を特徴とする障害（例えば、卵巣がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0669】

別の実施形態では、iRNA 剤は、M68 遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、望ましくない M68 発現を特徴とする障害（例えば、食道、胃、大腸及び直腸のヒト腺がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0670】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は、腫瘍抑制遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、化学療法剤と組み合わせて、アポトーシス活性を促進する方法として使用することができる。

【0671】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は、p 5 3 腫瘍抑制遺伝子における突然変異をサイレンシングし、したがって、望ましくない p 5 3 発現を特徴とする障害（例えば、胆嚢がん、膵臓がん及び肺がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0672】

好ましい実施形態では、iRNA 剤は、p 5 3 ファミリーの一員である DN-p 6 3 を

サイレンシングし、したがって、望ましくないDN-p63発現を特徴とする障害（例えば、扁平上皮細胞がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0673】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、pRb腫瘍抑制遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないpRb発現を特徴とする障害（例えば、口腔扁平上皮細胞がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0674】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、APC1腫瘍抑制遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないAPC1発現を特徴とする障害（例えば、大腸がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。 10

【0675】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、BRCA1腫瘍抑制遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないBRCA1発現を特徴とする障害（例えば、乳がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0676】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、PTEN腫瘍抑制遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないPTEN発現を特徴とする障害（例えば、過誤腫、グリア細胞腫、前立腺がん及び子宮内膜がん）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。 20

【0677】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、MLL融合遺伝子、例えばMLL-AF9をサイレンシングし、したがって、望ましくないMLL融合遺伝子発現を特徴とする障害（例えば、急性白血病）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0678】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、BCR/ABL融合遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないBCR/ABL融合遺伝子発現を特徴とする障害（例えば、急性及び慢性白血病）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。 30

【0679】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、TEL/AML1融合遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないTEL/AML1融合遺伝子発現を特徴とする障害（例えば、小児期急性白血病）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0680】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、EWS/FLI1融合遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないEWS/FLI1融合遺伝子発現を特徴とする障害（例えば、ユーイング肉腫）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。 40

【0681】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、TLS/FUS1融合遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないTLS/FUS1融合遺伝子発現を特徴とする障害（例えば、粘液脂肪肉腫）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0682】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、PAX3/FKHR融合遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないPAX3/FKHR融合遺伝子発現を特徴とする障害（例えば、粘液脂肪肉腫）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。 50

【0683】

別の好ましい実施形態では、iRNA剤は、AML1/ETO融合遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないAML1/ETO融合遺伝子発現を特徴とする障害（例えば、急性白血病）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0684】

別の態様では、本発明は、血管新生阻害が有益でありうる疾患又は障害（例えば、がん）の危険性があるか、該疾患又は障害に罹患した対象（例えば、ヒト）を治療する方法を特徴とする。該方法は、以下の：

iRNA剤、例えば本明細書中に記載の構造を有するiRNA剤を提供することと、該iRNA剤は、血管新生を仲介する遺伝子に相同であり、かつ同遺伝子を例えば切断によりサイレンシングすることができることと、

iRNA剤を対象に投与することと、
それにより対象を治療することと
を包含する。

【0685】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、 α v-インテグリン遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくない α v-インテグリン発現を特徴とする障害（例えば、脳腫瘍又は上皮を起原とする腫瘍）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0686】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、Flt-1受容体遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないFlt-1受容体発現を特徴とする障害（例えば、がん及びリウマチ関節炎）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0687】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、チューブリン遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないチューブリン発現を特徴とする障害（例えば、がん及び網膜新血管新生）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0688】

好ましい実施形態では、iRNA剤は、チューブリン遺伝子をサイレンシングし、したがって、望ましくないチューブリン発現を特徴とする障害（例えば、がん及び網膜新血管新生）を有するか、又はその危険性がある対象を治療するのに使用することができる。

【0689】

別の態様では、本発明は、ウイルスに感染した対象、あるいはウイルス感染に関連した障害若しくは疾患の危険性があるか、又は該障害若しくは疾患に罹患した対象を治療する方法を特徴とする。該方法は、以下の：

iRNA剤、例えば本明細書中に記載の構造を有するiRNA剤を提供することと、該iRNA剤は、ウイルス遺伝子またはウイルスの機能（例えば、侵入又は増殖）を媒介する細胞遺伝子に相同であり、かつ同遺伝子を例えば切断によりサイレンシングすることができることと、

iRNA剤を対象（好ましくは、ヒト対象）に投与することと、
それにより対象を治療することと
を包含する。

【0690】

したがって、本発明は、ヒトパピローマウイルス（HPV）に感染した患者、あるいはHPVにより媒介される障害（例えば、子宮頸がん）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を提供する。HPVは、子宮頸がんの95%に関係し、したがって抗ウイルス療法は、これらのがん及びウイルス感染の他の症状を治療するための魅力的な方法である。

10

20

30

40

50

【0691】

好ましい実施形態では、H P V遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、H P V遺伝子は、E 2、E 6又はE 7の群のうちの1つである。

好ましい実施形態では、H P V複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0692】

本発明はまた、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染した患者、あるいはH I Vにより媒介される障害（例えば、後天性免疫不全症候群（A I D S））の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を提供する。

【0693】

好ましい実施形態では、H I V遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、H I V遺伝子は、C C R 5、G a g又はR e vである。 10

好ましい実施形態では、H I V複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、遺伝子はC D 4又はT s g 1 0 1である。

【0694】

本発明はまた、B型肝炎ウイルス（H B V）に感染した患者、あるいはH B Vにより媒介される障害（例えば、肝硬変及び肝細胞がん）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を提供する。

【0695】

好ましい実施形態では、H B V遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、標的とされるH B V遺伝子は、H B Vコアタンパク質のテール領域、p r e - c r e g i o u s（p r e - c）領域、又はc r e g i o u s（c）領域の群のうちの1つをコードする。別の好ましい実施形態では、標的とされるH B V - R N A配列は、ポリ（A）テールを含んで構成される。 20

【0696】

好ましい実施形態では、H B V複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明はまた、A型肝炎ウイルス（H A V）に感染した患者、あるいはH A Vにより媒介される障害の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を提供する。

【0697】

好ましい実施形態では、H A V複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明はまた、C型肝炎ウイルス（H C V）に感染した患者、あるいはH C Vにより媒介される障害（例えば、肝硬変）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を提供する。 30

【0698】

好ましい実施形態では、H C V遺伝子の発現が低減される。

別の好ましい実施形態では、H C V複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0699】

本発明はまた、D型、E型、F型、G型又はH型を含む肝炎ウイルス株の群のいずれかに感染した患者、あるいはこれらの肝炎株のいずれかにより媒介される障害の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を提供する。 40

【0700】

好ましい実施形態では、D型、E型、F型、G型又はH型肝炎ウイルス遺伝子の発現が低減される。

別の好ましい実施形態では、D型、E型、F型、G型又はH型肝炎ウイルスの複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0701】

本発明の方法はまた、呼吸器合胞体ウイルス（R S V）に感染した患者、あるいはR S Vにより媒介される障害（例えば、乳児における下気道感染及び小児喘息、例えば高齢者における肺炎及び他の合併症）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0702】

好ましい実施形態では、R S V 遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、標的とされるH B V 遺伝子は、遺伝子N、L又はPの群のうちの1つをコードする。

好ましい実施形態では、R S V 複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0703】

本発明の方法は、単純ヘルペスウイルス（H S V）に感染した患者、あるいはH S Vにより媒介される障害（例えば、陰部ヘルペス及び単純ヘルペスならびに主として免疫不全状態の患者における生命にかかわる疾患又は視覚障害をもたらす疾患）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0704】

好ましい実施形態では、H S V 遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、標的とされるH S V 遺伝子は、D N A ポリメラーゼ又はD N A ヘリカーゼプライマーゼをコードする。

【0705】

好ましい実施形態では、H S V 複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明はまた、ヘルペスサイトメガロウイルス（C M V）に感染した患者、あるいはC M Vにより媒介される障害（例えば、先天性ウイルス感染及び免疫不全状態の患者における病的状態）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を提供する。

【0706】

好ましい実施形態では、C M V 遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、C M V 複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明の方法はまた、ヘルペスエプスタイン・バーウイルス（E B V）に感染した患者、あるいはE B Vにより媒介される障害（例えば、N K / T-細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫及びホジキン病）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を提供する。

【0707】

好ましい実施形態では、E B V 遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、E B V 複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明の方法はまた、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（K S H V）（ヒトヘルペスウイルス8型とも呼ばれる）に感染した患者、あるいはK S H Vにより媒介される障害（例えば、カポジ肉腫、多中心性キャッスルマン病及びA I D S 関連原発性滲出液リンパ腫）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0708】

好ましい実施形態では、K S H V 遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、K S H V 複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明はまた、J C ウイルス（J C V）に感染した患者、あるいはこのウイルスに関連した疾患又は障害（例えば、進行性多病巣性白質脳症（P M L））を治療する方法を包含する。

【0709】

好ましい実施形態では、J C V 遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、J C V 複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明の方法はまた、ミクソウイルスに感染した患者、あるいはミクソウイルスにより媒介される障害（例えば、インフルエンザ）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0710】

好ましい実施形態では、ミクソウイルス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、ミクソウイルス複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0711】

本発明の方法はまた、ライノウイルスに感染した患者、あるいはライノウイルスにより

10

20

30

40

50

媒介される障害（例えば、風邪）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0712】

好ましい実施形態では、ライノウイルス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、ライノウイルス複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0713】

本発明の方法はまた、コロナウイルスに感染した患者、あるいはコロナウイルスにより媒介される障害（例えば、風邪）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

10

【0714】

好ましい実施形態では、コロナウイルス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、コロナウイルス複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0715】

本発明の方法はまた、フラビウイルスである西ナイルウイルスに感染した患者、あるいは西ナイルウイルスにより媒介される障害の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0716】

好ましい実施形態では、西ナイルウイルス遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、西ナイルウイルス遺伝子は、E、NS3又はNS5を含む群のうちの1つである。

20

【0717】

好ましい実施形態では、西ナイルウイルスの複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明の方法はまた、フラビウイルスであるセントルイス脳炎ウイルスに感染した患者、あるいはこのウイルスに関連した障害若しくは疾患（例えば、ウイルス性出血熱又は神経系疾患）の危険性があるか、又は該障害若しくは疾患に罹患した患者を治療することを提供する。

【0718】

30

好ましい実施形態では、セントルイス脳炎ウイルス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、セントルイス脳炎ウイルスの複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0719】

本発明の方法はまた、ダニ媒介性脳炎フラビウイルスにより感染されたか、あるいはダニ媒介性脳炎ウイルスにより媒介される障害（例えば、ウイルス性出血熱及び神経系疾患）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0720】

好ましい実施形態では、ダニ媒介性脳炎ウイルス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、ダニ媒介性脳炎ウイルスの複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

40

【0721】

本発明の方法はまた、通常ウイルス性出血熱及び神経系疾患をもたらすマレー溪谷脳炎フラビウイルスに感染した患者を治療する方法を提供する。

好ましい実施形態では、マレー溪谷脳炎ウイルス遺伝子の発現が低減される。

【0722】

好ましい実施形態では、マレー溪谷脳炎ウイルス複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明はまた、デング熱フラビウイルスに感染した患者、あるいはこのウイルスに関連した疾患又は障害（例えば、デング熱出血性熱）を治療する方法を包含する。

50

【0723】

好ましい実施形態では、デング熱ウイルス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、デング熱ウイルスの複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0724】

本発明の方法はまた、シミアンウイルス40（SV40）に感染した患者、あるいはSV40により媒介される障害（例えば、腫瘍形成）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0725】

好ましい実施形態では、SV40遺伝子の発現が低減される。

10

好ましい実施形態では、SV40複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明はまた、ヒトT細胞白血球ウイルス（HTLV）に感染した患者、あるいはこのウイルスに関連した疾患又は障害（例えば、白血病及びミエロパシー）を治療する方法を包含する。

【0726】

好ましい実施形態では、HTLV遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、HTLV1遺伝子は、Tax転写活性化因子である。

好ましい実施形態では、HTLV複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0727】

本発明の方法はまた、モロニー Maus 白血病ウイルス（Mo-MuLV）に感染した患者、あるいはMo-MuLVにより媒介される障害（例えば、T細胞白血病）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

20

【0728】

好ましい実施形態では、Mo-MuLV遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、Mo-MuLV複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0729】

本発明の方法はまた、脳心筋炎ウイルス（EMCV）に感染した患者、あるいはEMCVにより媒介される障害（例えば、心筋炎）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。EMCVは、マウスおよびブタにおいて心筋炎を引き起こし、ヒト心筋細胞に感染することができる。したがって、このウイルスは、異種移植を受けた患者に関する問題事項である。

30

【0730】

好ましい実施形態では、EMCV遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、EMCV複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明はまた、麻疹ウイルス（MV）に感染した患者、MVにより媒介される障害（例えば、麻疹）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を包含する。

【0731】

好ましい実施形態では、MV遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、MV複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

40

本発明はまた、水痘-帯状疱疹ウイルス（VZV）に感染した患者、あるいはVZVにより媒介される障害（例えば、水疱瘡又は帯状ヘルペス（帯状疱疹とも呼ばれる））の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を包含する。

【0732】

好ましい実施形態では、VZV遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、VZV複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

本発明はまた、アデノウイルスに感染した患者、あるいはアデノウイルスにより媒介される障害（例えば、気道感染）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を包含する。

【0733】

50

好ましい実施形態では、アデノウイルス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、アデノウイルス複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0734】

本発明はまた、黄熱病ウイルス（Y F V）に感染した患者、あるいはY F Vにより媒介される障害（例えば、気道感染）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療する方法を包含する。

【0735】

好ましい実施形態では、Y F V遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、好ましい遺伝子は、E、N S 2 A又はN S 3遺伝子を包含する群のうちの1つである。

10

好ましい実施形態では、Y F V複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0736】

本発明の方法はまた、ポリオウイルスに感染した患者、あるいはポリオウイルスにより媒介される障害（例えば、ポリオ）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0737】

好ましい実施形態では、ポリオウイルス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、ポリオウイルス複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0738】

20

本発明の方法はまた、ポックスウイルスに感染した患者、あるいはポックスウイルスにより媒介される障害（例えば、天然痘）の危険性があるか、又は該障害に罹患した患者を治療することを提供する。

【0739】

好ましい実施形態では、ポックスウイルス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、ポックスウイルス複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0740】

別の態様では、本発明は、病原体（例えば、細菌、アメーバ、寄生生物又は真菌などの病原体）に感染した対象を治療する方法を特徴とする。上記方法は、以下の：

30

i R N A剤、例えば本明細書中に記載の構造を有するs i R N A剤を提供することと、s i R N A剤は、病原体遺伝子に相同であり、かつ例えば病原体遺伝子の切断により同遺伝子をサイレンシングすることができることと、

i R N A剤を対象（好ましくは、ヒト対象）に投与することと、

それにより対象を治療することとを包含する。

【0741】

標的遺伝子は、増殖、細胞壁合成、タンパク質合成、転写、エネルギー代謝（例えばクレブス回路）又は毒素産生に關与するものであり得る。

したがって、本発明は、マラリアを引き起こすマラリア原虫に感染した患者を治療する方法を提供する。

40

【0742】

好ましい実施形態では、マラリア原虫遺伝子の発現が低減される。別の好ましい実施形態では、該遺伝子は、頂端膜抗原1（A M A 1）である。

好ましい実施形態では、マラリア原虫の複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0743】

本発明はまた、マイコバクテリウム・ウルセランス（M y c o b a c t e r i u m u l c e r a n s）に感染した患者、あるいはこの病原体に関連した疾患又は障害（例えば、ブルーリ潰瘍）を治療する方法を包含する。

50

【0744】

好ましい実施形態では、マイコバクテリウム・ウルセランス遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、マイコバクテリウム・ウルセランスの複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0745】

本発明はまた、ヒト結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) に感染した患者、あるいはこの病原体に関連した疾患又は障害（例えば、結核）を治療する方法を包含する。

【0746】

好ましい実施形態では、ヒト結核菌遺伝子の発現が低減される。
好ましい実施形態では、ヒト結核菌の複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0747】

本発明はまた、らい菌 (*Mycobacterium leprae*) に感染した患者、あるいはこの病原体に関連した疾患又は障害（例えば、らい病）を治療する方法を包含する。

【0748】

好ましい実施形態では、らい菌遺伝子の発現が低減される。
好ましい実施形態では、らい菌の複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。
本発明はまた、細菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に感染した患者、あるいはこの病原体に関連した疾患又は障害（例えば、皮膚及び粘膜の感染）を治療する方法を包含する。

【0749】

好ましい実施形態では、黄色ブドウ球菌遺伝子の発現が低減される。
好ましい実施形態では、黄色ブドウ球菌の複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0750】

本発明はまた、細菌の肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に感染した患者、あるいはこの病原体に関連した疾患又は障害（例えば、肺炎又は小児期下気道感染）を治療する方法を包含する。

【0751】

好ましい実施形態では、肺炎連鎖球菌遺伝子の発現が低減される。
好ましい実施形態では、肺炎連鎖球菌の複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0752】

本発明はまた、細菌の化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) に感染した患者、あるいはこの病原体に関連した疾患又は障害（例えば、連鎖球菌性咽頭炎又は猩紅熱）を治療する方法を包含する。

【0753】

好ましい実施形態では、化膿連鎖球菌遺伝子の発現が低減される。
好ましい実施形態では、化膿連鎖球菌の複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0754】

本発明はまた、細菌の肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*) に感染した患者、あるいはこの病原体に関連した疾患又は障害（例えば、肺炎又は小児期下気道感染）を治療する方法を包含する。

【0755】

好ましい実施形態では、肺炎クラミジア遺伝子の発現が低減される。
好ましい実施形態では、肺炎クラミジアの複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減

10

20

30

40

50

される。

【0756】

本発明はまた、細菌の肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) に感染した患者、あるいはこの病原体に関連した疾患又は障害 (例えば、肺炎又は小児期下気道感染) を治療する方法を包含する。

【0757】

好ましい実施形態では、肺炎マイコプラズマ遺伝子の発現が低減される。

好ましい実施形態では、肺炎マイコプラズマの複製に必要とされるヒト遺伝子の発現が低減される。

【0758】

一態様では、本発明は、望ましくない免疫応答を特徴とする疾患又は障害 (例えば、炎症性の疾患又は障害、あるいは自己免疫性の疾患又は障害) の危険性があるか、あるいは該疾患又は障害に罹患した対象 (例えば、ヒト) を治療する方法を特徴とする。該方法は、以下の：

iRNA 剤、例えば本明細書中に記載の構造を有する iRNA 剤を提供することと、該 iRNA 剤は、望ましくない免疫応答を媒介する遺伝子に相同であり、かつ該遺伝子を例えば切断によりサイレンシングすることができることと、

iRNA 剤を対象に投与することと、

それにより対象を治療することと

を包含する。

【0759】

好ましい実施形態では、疾患又は障害は、虚血又は再灌流傷害、例えば、急性心筋梗塞、不安定狭心症、心肺バイパス、外科的介入 (例えば、血管形成術 (例えば、経皮的経管的冠状動脈形成術))、移植された臓器若しくは組織 (例えば、移植された心臓組織又は血管組織) に対する応答、又は血栓溶解に関連した虚血あるいは再灌流傷害である。

【0760】

好ましい実施形態では、疾患又は障害は、再狭窄、例えば、外科的介入 (例えば、血管形成術 (例えば、経皮的経管的冠状動脈形成術)) に関連した再狭窄である。

好ましい実施形態では、疾患又は障害は、炎症性腸疾患、例えばクローン病又は潰瘍性大腸炎である。

【0761】

好ましい実施形態では、疾患又は障害は、感染又は傷害に関連した炎症である。

好ましい実施形態では、疾患又は障害は、喘息、狼瘡、多発性硬化症、糖尿病 (例えば、2 型糖尿病)、関節炎 (例えば、関節リウマチ又は乾癬性関節炎) である。

【0762】

特に好ましい実施形態では、iRNA 剤は、インテグリン又はインテグリンの共通リガンド (co-ligand)、例えば VLA4、VCAM、ICAM をサイレンシングする。

特に好ましい実施形態では、iRNA 剤は、セレクトイン又はセレクトインの共通リガンド、例えば P-セレクトイン、E-セレクトイン (ELAM)、I-セレクトイン、P-セレクトイン糖タンパク質-1 (PSGL-1) をサイレンシングする。

【0763】

特に好ましい実施形態では、iRNA 剤は、補体系の構成成分、例えば C3、C5、C3aR、C5aR、C3 コンバーターゼ、C5 コンバーターゼをサイレンシングする。

特に好ましい実施形態では、iRNA 剤は、ケモカイン又はケモカイン受容体、例えば TNFI、TNFJ、IL-1I、IL-1J、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-6、IL-8、TNFRI、TNFRII、IGE、SCYA11、CCR3 をサイレンシングする。

【0764】

他の実施形態では、iRNA 剤は、GCSF、Gro1、Gro2、Gro3、PF4、MIG、プロ血小板塩基性タンパク質 (PPBP)、MIP-1I、MIP-1J、R

10

20

30

40

50

A N T E S、M C P-1、M C P-2、M C P-3、C M B K R 1、C M B K R 2、C M B K R 3、C M B K R 5、A I F-1、I-309をサイレンシングする。

【0765】

一態様では、本発明は、急性疼痛又は慢性疼痛の危険性があるか、あるいは急性疼痛又は慢性疼痛に罹患した対象（例えば、ヒト）を治療する方法を特徴とする。該方法は、以下の：

i R N A 剤を提供することと、該 i R N A は、疼痛の過程を媒介する遺伝子に相同であり、かつ該遺伝子を例えば切断によりサイレンシングすることができることと、

i R N A 剤を対象に投与することと、

それにより対象を治療することと

を包含する。

10

【0766】

特に好ましい実施形態では、i R N A 剤は、イオンチャネルの構成成分をサイレンシングする。

特に好ましい実施形態では、i R N A 剤は、神経伝達物質の受容体又はリガンドをサイレンシングする。

【0767】

一態様では、本発明は、神経系の疾患又は障害の危険性があるか、あるいは神経系の疾患又は障害に罹患した対象（例えば、ヒト）を治療する方法を特徴とする。該方法は、以下の：

20

i R N A 剤を提供することと、該 i R N A は、神経系の疾患又は障害を媒介する遺伝子に相同であり、かつ該遺伝子を例えば切断によりサイレンシングすることができることと、

、

i R N A 剤を対象に投与することと、

それにより対象を治療することと

を包含する。

【0768】

好ましい実施形態では、疾患又は障害は、アルツハイマー病又はパーキンソン病である。

特に好ましい実施形態では、i R N A 剤は、アミロイドファミリー遺伝子（例えば A P P）、プレセニリン遺伝子（例えば、P S E N 1 及び P S E N 2）又は I-シヌクレインをサイレンシングする。

30

【0769】

好ましい実施形態では、疾患又は障害は、神経変性疾患のトリヌクレオチドリピート病、例えばハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症又は脊髄小脳失調、例えば S C A 1、S C A 2、S C A 3（マシャド・ジョセフ病）、S C A 7 又は S C A 8 である。

【0770】

特に好ましい実施形態では、i R N A 剤は、H D、D R P L A、S C A 1、S C A 2、M J D 1、C A C N L 1 A 4、S C A 7、S C A 8をサイレンシングする。

ヘテロ接合性の喪失（L O H）は、L O H 領域において配列、例えば遺伝子にヘミ接合性をもたらし得る。これは正常細胞と疾患状態の細胞（例えばがん細胞）との間に重大な遺伝的差異をもたらす可能性があり、正常細胞と疾患状態の細胞（例えばがん細胞）との間の有用な差異を提供する。この差異は、遺伝子又はその他の配列が正倍数体細胞ではヘテロ接合体であるが、L O H を有する細胞ではヘミ接合体であるために生じ得る。L O H の領域は、多くの場合、喪失すると好ましくない増殖を促進する遺伝子、例えば腫瘍抑制遺伝子、及び例えば別の遺伝子（場合によっては正常に機能（例えば、増殖）するのに必須の遺伝子）を含有する別の配列を含む。本発明の方法は、一部には、必須遺伝子の1つの対立遺伝子を本発明の i R N A 剤で特異的に切断又はサイレンシングすることによる。上記 i R N A 剤は、該 i R N A 剤が、L O H を有する細胞に見出される必須遺伝子の1つの対立遺伝子を標的にするが、L O H を示さない細胞に存在する別の対立遺伝子はサイレ

40

50

ンシングしないように選択される。実質的に、iRNA剤は2つの対立遺伝子を区別し、選択された対立遺伝子を選択的にサイレンシングする。実質的には、多型、例えばLOHにより影響を受ける必須遺伝子のSNPsは、LOHを有する細胞、例えばLOHを有するがん細胞を特徴とする疾患用の標的として使用される。

【0771】

例えば、当業者は、腫瘍抑制遺伝子に近接し、且つ腫瘍抑制遺伝子を含むLOH領域内にある必須遺伝子を同定することができる。ヒトRNAポリメラーゼII (POLR2A)の大サブユニットをコードする遺伝子、腫瘍抑制遺伝子p53に近接して位置する遺伝子は、このような遺伝子である。このような遺伝子は、がん細胞ではLOHの領域内に多く存在する。LOH領域内に存在し、且つ多くのがん細胞種では欠けているその他の遺伝子は、複製タンパク質A70kDaサブユニット、複製タンパク質A32-kDa、リボヌクレオチドレダクターゼ、チミジル酸合成酵素、TATA関連因子2H、リボソームタンパク質S14、真核生物の開始因子5A、アラニルトRNAシントターゼ、システイニルトRNAシントターゼ、NaKATPアーゼ、α-1サブユニット及びトランスフェリン受容体を含む群を包含する。

10

【0772】

したがって、本発明は、LOHを特徴とする障害、例えばがんを治療する方法を特徴とする。該方法は：

任意選択で、LOH領域の遺伝子の対立遺伝子の遺伝子型を決定することと、好ましくは、正常細胞における該遺伝子の両対立遺伝子の遺伝子型を決定することと、

20

LOH細胞に見出される対立遺伝子を選択的に切断又はサイレンシングするiRNA剤を提供することと、

対象にiRNAを投与すること、

それにより疾患を治療することと

を包含する。

【0773】

本発明はまた、本明細書中で開示されるiRNA剤、例えば多型遺伝子の1つの対立遺伝子を選択的にサイレンシング（例えば切断）することができるiRNA剤を包含する。

別の態様では、本発明は、2つ以上の遺伝子をiRNA剤で切断又はサイレンシングする方法を提供する。これらの実施形態では、上記iRNA剤は、2つ以上の遺伝子に見出される配列に十分な相同性を有するように選択される。例えば、配列AAGCTGGCCCTGGACATGGAGAT（配列番号55）は、マウスのラミンB1、ラミンB2、ケラチン複合体2-遺伝子1及びラミンA/C間で保存されている。したがって、この配列を標的とするiRNA剤は、該遺伝子集団全体を効率的にサイレンシングするであろう。

30

【0774】

本発明はまた、2つ以上の遺伝子をサイレンシングすることができる、本明細書中で開示されるiRNA剤を包含する。

送達経路

説明を簡略化するために、本項の製剤、組成物及び方法は、主として非修飾iRNA剤に関して論述される。しかしながら、これらの製剤、組成物及び方法は、別のiRNA剤、例えば、修飾iRNA剤に関して実施可能であり、且つかかる実施は本発明の範囲内にあることは理解されるべきである。iRNAを包含する組成物は種々の経路で対象に送達され得る。典型的な経路は、静脈内、局所、経直腸、経肛門、経膣、経鼻、経肺及び経眼経路を包含する。

40

【0775】

本発明のiRNA分子は、投与に好適な医薬組成物中に組み込まれることが可能である。かかる組成物は、通常、1種類または複数種類のiRNAと医薬として許容可能な担体とを包含する。本明細書中で使用する場合、「医薬として許容可能な担体」という用語は、医薬品の投与と適合する任意かつすべての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤及び

50

抗真菌剤、等張な吸収遅延剤等を包含することを意図する。医薬としての活性を有する物質に関するこのような媒体および試薬を使用することは、当該技術分野で周知である。いかなる従来の媒体および試薬も該活性化化合物と適合しない場合を除き、組成物に従来の媒体および試薬を使用することが想定される。また、補助的な活性化化合物が組成物に包含されることも可能である。

【0776】

本発明の医薬組成物は、局所治療又は全身治療のどちらが所望されるかによって、且つ治療されるべき領域によって、多様な方法で投与され得る。投与は、局所（経眼、経膈、経直腸、経鼻、経皮を含む）、経口又は非経口であってよい。非経口投与は、静脈内点滴投与、皮下投与、腹腔内注射又は筋肉内注射、又は鞘内投与若しくは脳室内投与を包含する。

10

【0777】

投与の経路及び部位は標的指向性を増大するように選択してもよい。例えば、筋細胞を標的とする場合、目的の筋肉に筋肉内注射することは、論理的な選択であろう。エアロゾル形態の iRNA を投与することにより肺細胞を標的とすることもできよう。バルーン・カテーテルを iRNA でコーティングすることにより、且つ機械的に DNA を導入することにより血管内皮細胞を標的とすることもできる。

【0778】

局所投与用の製剤には、経皮貼布剤、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴剤、坐剤、噴霧剤、液剤及び粉末剤を挙げることができる。従来の医薬担体、水溶性基剤、粉末状基剤又は油状基剤、増粘剤等が、必要又は望ましいものであり得る。コーティングされたコンドーム、グローブ等もまた有用であり得る。

20

【0779】

経口投与用の組成物には、粉剤又は顆粒剤、水中懸濁液又は水溶液、シロップ、エリキシル又は非水溶性媒体、錠剤、カプセル、薬用キャンディ、又はトローチが包含される。錠剤の場合、使用可能な担体は、ラクトース、クエン酸ナトリウム及びリン酸塩を含む。デンプン等の種々の錠剤分解物質、ならびに、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム及びタルク等の潤滑剤が、一般に錠剤に使用される。カプセル形態での経口投与については、有用な希釈剤は、ラクトース及び高分子量ポリエチレングリコールである。水溶性の懸濁液が経口使用に必要とされる場合、本発明の核酸組成物は、乳化剤及び懸濁剤と組み合わせることができる。所望により、ある種の甘味剤及び／又は香料剤を添加することができる。

30

【0780】

鞘内投与又は脳室内投与のための組成物は、緩衝剤、希釈剤及びその他の好適な添加剤も含有し得る殺菌水溶液を含み得る。

非経口投与のための製剤は、緩衝剤、希釈剤及びその他の好適な添加剤も含有し得る殺菌水溶液を含み得る。脳室内注射は、例えばリザーバに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易となり得る。脳室内で使用される場合、溶質の総濃度は、調製物が等張となるように制御されるべきである。

【0781】

経眼投与に関しては、軟膏又は滴下可能な液剤が、アプリケータ又は目薬用容器等の当業者には既知の眼球送達システムにより送達され得る。このような組成物は、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はポリ（ビニルアルコール）等の粘性剤（mucomimetics）、ソルビン酸、EDTA又は塩化ベンジルクロニウム等の防腐剤、及び通常量の希釈剤及び／又は担体を包含することができる。

40

【0782】

局所送達

説明を簡略化するために、本項の製剤、組成物及び方法は、主として非修飾 iRNA 剤に関して論述する。しかしながら、これらの製剤、組成物及び方法は、別の iRNA 剤、例えば、修飾 iRNA 剤に関して実施可能であり、且つかかる実施は本発明の範囲内にあ

50

ることは理解されるべきである。好ましい実施形態では、iRNA剤、例えば二本鎖iRNA剤、又はsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）は、局所投与を介して対象に送達される。「局所投与」とは、対象の表面に直接製剤を接触させることによって、該対象に送達することを言う。局所送達の最も一般的な形態は皮膚に対してであるが、本明細書中で開示される組成物は、体の別の表面、例えば目、粘膜、体腔の表面又は体内の表面に対して、直接適用することもできる。上記したように、最も一般的な局所送達は皮膚に対してである。この用語は、局所及び経皮を含むいくつかの投与経路を包含するが、これらに制限されない。これらの投与の形態は、通常、皮膚の透過障壁への浸透及び標的組織又は標的層への効率的な送達を含む。局所投与は、組成物が表皮及び真皮に浸透し、最終的に全身への送達を達成する手段として使用されることができる。また、局所投与は、対象の表皮又は真皮に、又はその特定の層に、又はその下の組織に、オリゴヌクレオチドを選択的に送達する手段として使用されることができる。

10

【0783】

本明細書中で用いる場合、「皮膚」という用語は、動物の表皮及び／又は真皮をいう。哺乳類の皮膚は、2つの主要かつ明確な層から構成されている。皮膚の外側の層は、表皮と呼ばれる。表皮は、角質層、顆粒層、有棘層、及び基底層から成り、角質層は皮膚の表面にあり、基底層は表皮の最も深い部分にある。表皮は、体の場所に応じて50 μ m～0.2 mmの厚さである。

20

【0784】

表皮の下に真皮があり、真皮は表皮よりもはるかに厚い。真皮は、主として繊維束状のコラーゲンから構成されている。このコラーゲン束は、とりわけ、血管、毛細リンパ管、腺、神経終末及び免疫学的に活性化細胞に対する支えを提供する。

【0785】

器官としての上記皮膚の主要な機能の1つは、体内への物質の侵入を制御することである。皮膚の主たる透過障壁は、種々な分化状態の多くの細胞の層から形成される角質層により提供される。角質層での細胞間の空隙は、皮膚透過障壁をさらに増大するように、密閉を提供する格子様の構造に配置構成された様々な脂質で満たされている。

【0786】

皮膚により提供される透過障壁は、約750 Daより大きい分子量を有する分子に対しては主として非透過性である。大きな分子が皮膚の透過障壁を通過するためには、通常の浸透現象以外の機構が使用されなければならない。

30

【0787】

いくつかの要因が、投与される物質に対する皮膚の透過性を決定付けている。これらの要因は、投与を受けた皮膚の特性、送達剤の特性、薬物と送達剤及び薬物と皮膚の両方の間の相互作用、投与された薬物の用量、治療の形態、治療後の措置を包含する。選択的に表皮及び真皮を標的とするために、薬物が予め選択された層へと浸透することを可能とする、1つ又はそれ以上の浸透促進剤を包含する組成物を配合することが可能なこともある。

40

【0788】

経皮送達は、脂質可溶性の治療剤の投与に有用な経路である。真皮は、表皮よりも透過性が高いため、擦過した皮膚、熱傷した皮膚又は剥離した皮膚を介すると吸収はより迅速となる。また、皮膚への血流を増加させる炎症及びその他の生理学的な条件も、経皮吸収を増大させる。この経路を介する吸収は、油状ビヒクル（塗擦剤）の使用により、又は1つ以上の浸透促進剤の使用により増大し得る。経皮経路を介して本明細書中で開示される組成物を送達する別の効率的な方法としては、皮膚の水分補給及び制御放出型の局所貼布剤の使用が挙げられる。経皮経路は、全身治療及び／又は局所治療のための、本明細書中で開示される組成物を送達する潜在的に効率的な手段を提供する。

【0789】

50

加えて、イオントフォレーシス（電場の影響下で生体膜を介してイオン性溶質を移動すること）（リーら（Lee et al）、「治療剤担体システムにおける評論総説（Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems）」、163ページ、1991年）、フォノフォレーシス又はソノフォレーシス（生体膜、特に皮膚及び角膜を横切る種々の治療剤の吸収を増大させるための超音波の使用）（リーら（Lee et al）、「治療剤担体システムにおける評論総説」、166ページ、1991年）、並びに、投薬の状態及び投与部位における保持力に応じたビヒクル特性の最適化（リーら（Lee et al）、「治療剤キャリアシステムにおける評論総説」、168ページ、1991年）は、皮膚及び粘膜部位を横切って局所投与される組成物の移送を増大させる有効な方法であり得る。

10

【0790】

提供された上記組成物及び方法は、種々のタンパク質及び遺伝子の機能を、培養又は保存された真皮組織において *in vitro* で、かつ動物において試験するために使用することもできる。したがって、本発明は、任意の遺伝子の機能を試験するために適用することができる。また、本発明の方法は、治療的に又は予防的に使用され得る。例えば、乾癬、扁平苔癬、中毒性表皮壊死症、多形性紅斑、基底細胞がん、有棘細胞がん、悪性黒色腫、パジェット病、カポジ肉腫、肺線維症、ライム病、ならびにウイルス、真菌及びバクテリアの皮膚感染等の疾患に罹患しているとわかっている動物又は該疾患への罹患が疑われる動物の治療のために使用されうる。

【0791】

20

肺送達

説明を簡略化するために、本項の製剤、組成物及び方法は、主として非修飾 *iRNA* 剤に関して論述する。しかしながら、これらの製剤、組成物及び方法は、別の *iRNA* 剤、例えば、修飾 *iRNA* 剤に関して実施可能であり、且つこのような実施は本発明の範囲内にあることは理解されるべきである。*iRNA* 剤、例えば二本鎖 *iRNA* 剤、又は *sRNA* 剤（例えば、前駆体、例えば *sRNA* 剤へプロセシングされ得るより大きな *iRNA* 剤、あるいは、例えば二本鎖の *iRNA* 剤もしくは *sRNA* 剤などの *iRNA* 剤またはそれらの前駆体をコードする *DNA*）を含む組成物は、肺送達により対象に投与されうる。肺送達組成物は、患者により分散剤が吸入され、該分散剤内の組成物、好ましくは *iRNA* が肺に到達して肺胞領域を介して直接血液循環へ容易に吸収され得るように、送達されることができ、肺送達は、肺の疾患を治療するために、全身送達及び局所送達の両方に有効であり得る。

30

【0792】

肺送達は、霧状の、エアロゾル化された、ミセル化された、かつ乾燥粉末ベースの製剤の使用など、様々な手法で達成可能である。送達は、液体ネブライザー、エアロゾル吸入器、および乾燥粉末散布デバイスを用いて達成されうる。定量式のデバイスが好ましい。アトマイザー又は吸入器を使用する利点の1つは、上記デバイスが内蔵型であるために雑菌混入の可能性が最小限となることである。乾燥粉末散布デバイスは、例えば、容易に乾燥粉末として製剤化され得る薬物を送達する。*iRNA* 組成物は、凍結乾燥粉末又は噴霧乾燥粉末として、単独又は好適な粉末担体との組み合わせとして安定に貯蔵され得る。吸入用の組成物の送達は、機器に組み込まれた時に、エアロゾル薬の投与期間中の、服用量の追跡、服用順守の監視、及び／又は患者に対する服用の誘発を可能にする、タイマー、投与量計測器、時間測定器、又は時間表示器などの服用時間計測要素を介して実施されてもよい。

40

【0793】

「粉末」という用語は、微小な分散固形粒子から成る組成物を意味し、上記粒子は自由に流動し、且つ吸入器内で容易に分散されうるとともに、続いて対象によって吸入されて肺へ到達し肺胞内に浸透可能となることを特徴とする。したがって、上記粉末は、「呼吸用」とであると言える。平均粒径は、直径が約 $10\ \mu\text{m}$ 未満であることが好ましく、比較的均一に球状の形状に分布していることが好ましい。直径が、約 $7.5\ \mu\text{m}$ 未満であること

50

がより好ましく、約 5.0 μm 未満であることが最も好ましい。通常、粒径分布は、直径が約 0.1 μm ～約 5 μm であり、特に約 0.3 μm ～約 5 μm であることが好ましい。

【0794】

「乾燥」という用語は、組成物が、約 10 重量% (%w) 未満の水分含有量、通常は、約 5 %w 未満、好ましくは約 3 %w 未満の水分含有量を有することを意味する。乾燥組成物は、上記粒子が吸入器内で容易に分散可能でエアロゾルを形成するようなものでありうる。

【0795】

「治療上有効な量」という用語は、期待される生理学的応答を得るために治療すべき対象に所望のレベルの薬物を提供するのに必要とされる、組成物中の存在量である。

10

「生理学的に有効な量」という用語は、所望の症状緩和効果又は治療効果を得るために対象に送達される量である。

【0796】

「医薬として許容可能な担体」という用語は、肺に対する重大な悪影響である毒性効果を伴わずに、肺に摂取させることができる担体を意味する。

担体として有用である医薬賦形剤の種類としては、ヒト血清アルブミン (HSA) 等の安定剤、糖質、アミノ酸及びポリペプチド等の充填剤、pH 調整剤又は緩衝剤、塩化ナトリウム等の塩等が挙げられる。これらの担体は、結晶形態でも非晶質の形態でもよく、又は該 2 つの形態の混合物であってもよい。

【0797】

20

特に有用である充填剤としては、適合性の糖質、ポリペプチド、アミノ酸又はそれらの組み合わせが挙げられる。好適な糖質としては、ガラクトース、D-マンノース、ソルボース等の単糖、ラクトース、トレハロース等の二糖、2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン等のシクロデキストリン、及びラフィノース、マルトデキストリン、デキストラン等の多糖、マンニトール、キシリトール等のアルジトール等が挙げられる。糖質の好ましい群としては、ラクトース、トレハロース、ラフィノース、マルトデキストリン及びマンニトールが挙げられる。好適なポリペプチドとしては、アスパルテームが挙げられる。アミノ酸としては、アラニン及びグリシンが挙げられ、グリシンが好ましい。

【0798】

本発明の組成物の微量成分である添加剤は、噴霧乾燥中の立体構造の安定性及び粉末の分散性の向上のために包含されてもよい。これらの添加剤は、トリプトファン、チロシン、ロイシン及びフェニルアラニン等の疎水性アミノ酸を含む。

30

【0799】

好適な pH 調整剤又は緩衝剤としては、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム等の、有機酸及び塩基から調製される有機塩が挙げられるが、クエン酸ナトリウムが好ましい。

【0800】

ミセル状 iRNA 製剤の経肺投与は、テトラフルオロエタン、ヘプタフルオロエタン、ジメチルフルオロプロパン、テトラフルオロプロパン、ブタン、イソブタン、ジメチルエーテル、およびその他の非 CFC 噴霧剤及び CFC 噴霧剤等の噴霧剤を用いて、定量噴霧器で達成され得る。

40

【0801】

経口又は経鼻送達

説明を簡略化するために、本項の製剤、組成物及び方法は、主として非修飾 iRNA 剤に関して論述する。しかしながら、これらの製剤、組成物及び方法は、別の iRNA 剤、例えば、修飾 iRNA 剤に関して実施可能であり、且つかかる実施は本発明の範囲内にあることは理解されるべきである。口腔及び鼻腔の膜はいずれも、別の投与経路と比べて有利な点を与える。例えば、これらの膜を介して投与された薬物は、急速に作用を開始し、薬効レベルの血漿中濃度を提供し、肝代謝の初回通過効果を回避し、不都合な胃腸 (GI) 環境への薬物の暴露を回避する。更なる利点は、上記膜部位に容易に接近することがで

50

きるので、薬物を簡単に投与し、局在させ、且つ除去することができることである。

【0802】

経口送達では、組成物が、口腔の表面に、例えば、舌下粘膜（舌の腹側表面の膜及び口底を含む）又は頬の内面を構成する頬粘膜を標的とすることが可能である。舌下粘膜は比較的透過性が高いため、迅速な吸収と、且つ多くの薬物に対する許容可能な生物学的利用性が得られる。さらに、舌下粘膜は、便利で、許容可能で、且つ容易に接触可能である。

【0803】

分子が口腔粘膜を介して透過する能力は、分子サイズ、脂質溶解度及びペプチドタンパク質のイオン化に関連すると思われる。1, 000ダルトン未満の小さい分子は、迅速に粘膜を通過すると思われる。分子サイズが増加するのに伴い、透過性は急速に減少する。脂質可溶性の化合物は、脂質可溶性でない分子よりも透過性が高い。分子がイオン化されていない、または電荷において中性である場合に、最大吸収が生じる。したがって、荷電分子は、口腔粘膜を介した吸収にとって最も大きな課題となる。

10

【0804】

また、iRNAの医薬組成物は、上述のような混合ミセル医薬製剤及び噴霧剤を、定量噴霧器から、吸入ではなくヒトの口腔内へ噴霧することにより、口腔に投与され得る。一実施形態では、上記噴霧器は、医薬製剤及び噴霧剤を口腔内へ噴霧する前にまず振とうされる。

20

【0805】

デバイス

説明を簡略化するために、本項のデバイス、製剤、組成物及び方法は、主として非修飾iRNA剤に関して論述される。しかしながら、これらのデバイス、製剤、組成物及び方法は、別のiRNA剤、例えば、修飾iRNA剤に関して実施可能であり、且つかかる実施は本発明の範囲内にあることは理解されるべきである。iRNA剤、例えば二本鎖iRNA剤、又はsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）は、例えば、対象へ移植するかまたは別の方法で対象に設置されるデバイス等のデバイス上又はデバイス内へ配置されることができる。典型的なデバイスとしては、血管系に導入されるデバイス（例えば血管組織の管腔内に挿入されるデバイス）、又はステント、カテーテル、心臓弁、及び別の血管用デバイスを含む、デバイス自体が血管の一部を形成するデバイスが挙げられる。これらのデバイス、例えばカテーテル又はステントは、肺、心臓又は足の血管に配置されることができる。

30

【0806】

別のデバイスとしては、血管用デバイス以外のデバイス、例えば腹膜、又は臓器又は腺組織に移植されるデバイス、例えば人工臓器が挙げられる。このデバイスは、iRNAに加えて治療物質を放出することが可能であり、例としては、デバイスはインスリンを放出することができる。

【0807】

その他のデバイスは、股関節等の人工関節、及び別の整形外科移植片を含む。

40

一実施形態では、iRNAを含む組成物の単位用量又は一定用量は、移植デバイスにより分配される。該デバイスは、対象の体内であるパラメータを監視するセンサーを包含することができる。例えば、該デバイスがポンプを備え、例えば任意選択で電子機器と連携されていてよい。

【0808】

組織、例えば腎臓等の細胞又は器官が、iRNA剤、例えば二本鎖のiRNA剤またはsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）を用いてex vivoで処理され、次に対象に

50

投与または移植されることも可能である。

【0809】

上記組織は、自己、同種、又は異種の組織であり得る。例えば、組織（例えば腎臓）は、移植片対宿主病を減少させるように処理可能である。別の実施形態では、組織は同種組織であり、該組織（腎臓等）における好ましくない遺伝子発現を特徴とする疾患を治療するために処理される。他の例では、造血性細胞を含有する組織、例えば骨髓造血性細胞は、好ましくない細胞増殖を阻害するように処理され得る。

【0810】

自己組織であれ移植組織であれ、処理された組織の導入は、別の治療と組み合わせることができる。

10

いくつかの実施では、iRNAで処理された細胞は、例えば該細胞が移植片から離れるのを阻止するが、体内の分子が該細胞に到達するのを可能にし、かつ該細胞により産生された分子が体内に侵入するのを可能にする半透過性多孔質障壁により、別の細胞から隔離される。一実施形態では、該多孔質障壁は、アルギン酸から形成される。

【0811】

一実施形態では、避妊具（避妊用デバイス）が、iRNA剤、例えば二本鎖のiRNA剤またはsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）でコーティングされるか、又は該iRNA剤を含有する。典型的なデバイスとしては、コンドーム、避妊ペッサリー、IUD（移植可能な子宮用デバイス）、スポンジ、膣コンドーム、及び産児制限器具が挙げられる。一実施形態では、iRNAは精子又は卵を不活性化するように選択される。他の実施形態では、iRNAは、ウイルス又は病原体RNA、例えばSTDのRNAに相補的であるように選択される。いくつかの例では、iRNA組成物は、殺精子剤を含むことができる。

20

【0812】

用量

一態様では、本発明は、対象（例えばヒト対象）に、iRNA剤、例えば二本鎖iRNA剤、又はsRNA剤を投与する方法を特徴とする。該方法は、iRNA剤、例えばsRNA剤、例えば二本鎖sRNA剤であって（a）二本鎖部分が19～25ヌクレオチド（nt）長、好ましくは21～23ntであり、（b）標的RNA（例えば、内在性標的RNA又は病原体標的RNA）に相補的であり、且つ任意選択で（c）少なくとも1つの3'突出部1～5ヌクレオチド長を含む二本鎖sRNA剤を単位用量投与することを包含する。一実施形態では、上記単位用量は、体重1kg当たり1.4mg未満、又は体重1kg当たり10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005又は0.00001mg未満、及び体重1kg当たり200nmol未満のRNA剤（例えば約 4.4×10^{16} コピー）、又は体重1kg当たり1,500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、0.075、0.015、0.0075、0.0015、0.00075、0.00015nmol未満のRNA剤である。

30

【0813】

規定された量は、疾患又は障害、例えば腎臓に存在するRNA等の標的RNAに関連する疾患又は障害を、治療又は抑制するのに効果的な量であり得る。単位用量は、例えば、注射（例えば、静脈内又は筋肉内）、吸入投与、又は局所投与により投与され得る。用量は、体重1kgあたり2、1又は0.1mg未満であることが特に好ましい。

40

【0814】

好ましい実施形態では、単位用量は、1日に1回未満の頻度、例えば、2、4、8又は30日毎よりも低い頻度で投与される。他の実施形態では、単位用量は、頻繁に投与されない（例えば、規則正しい頻度では投与されない）。例えば、単位用量が単回で投与されてもよい。

【0815】

50

一実施形態では、有効用量がその他の従来の治療様式で投与される。一実施形態では、対象がウイルス感染症であり、上記治療様式は、iRNA剤以外の抗ウイルス剤（例えば、二本鎖iRNA剤又はsRNA剤以外）である。他の実施形態では、対象がアテローム性動脈硬化症であり、有効用量のiRNA剤（例えば二本鎖iRNA剤又はsRNA剤）が、外科的介入と組み合わせて、例えば外科的介入（例えば血管形成術）の後に投与される。

【0816】

一実施形態では、対象に、初回用量及び1又はそれ以上の維持用量のiRNA剤、例えば二本鎖のiRNA剤またはsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤、またはそれらの前駆体をコードするDNA）が投与される。維持用量は、一般に初回用量より少ない（例えば、初回用量の1/2少ない）。維持投与計画は、対象を、1日に体重1kg当たり0.01μg～1.4mgの範囲、例えば1日に体重1kg当たり10、1、0.1、0.01、0.001、又は0.00001mgの用量で治療することを包含する。維持用量は、5、10、又は30日毎に1回以下で投与されるのが好ましい。さらに、治療投与計画は、個々の疾患の性質、該疾患の重症度及び患者の全体的な状態により変化し得る期間中は持続され得る。好ましい実施形態では、用量は、1日当たり1回以下、例えば24、36、48時間以上当たり1回以下、例えば5又は8日毎に1回以下で送達され得る。治療に続いて、患者の状態の変動及び疾患状態の症状の緩和について、患者をモニタリングしてもよい。患者が現在の用量レベルでは有意に応答しない場合には、化合物の用量は増加されてもよいし、又は疾患状態の症状の緩和が認められる場合、疾患状態が除去されている場合、又は望ましくない副作用が認められる場合には、用量を減らしてもよい。

【0817】

有効用量は、個別の状況の下で所望される、又は適切と考えられるように、単回投与で又は2回以上の投与で投与され得る。所望により、反復又は頻繁な注入を容易にするためには、送達デバイス（例えば、ポンプ、半永久ステント（例えば、静脈内、腹腔内、嚢内又は関節内））又はリザーバを移植することが望ましい。

【0818】

一実施形態では、iRNA剤医薬組成物は、複数の種類のiRNA剤を包含する。他の実施形態では、複数種類のiRNA剤が、天然に存在する標的配列に関して別の種類のiRNA剤と重複せずかつ隣接しない配列を有する。他の実施形態では、複数の種類のiRNA剤は、天然に存在する異なる標的遺伝子に特異的である。他の実施形態では、iRNA剤は対立遺伝子特異的である。

【0819】

場合によっては、患者は、iRNA剤を用いて別の治療様式と併せて治療される。例えば、初期腎疾患等の腎臓病を治療中の患者は、疾患の進行を増大することが知られている標的遺伝子に特異的なiRNA剤を、該標的遺伝子の産物の活性を阻害する既知の薬物と併せて投与されてもよい。例えば、初期腎疾患の患者は、SGLT2 RNAを標的とするiRNA剤を、ナトリウム-グルコース共輸送を遮断し、続いて単一ネフロン糸球体ろ過量を減少させることが知られている低分子フロリジンと併用して治療されてもよい。他の実施形態では、腎臓のがんを治療中の患者は、腫瘍細胞の増殖に必須な標的に特異的なiRNA剤を、化学療法と併用して投与されてもよい。

【0820】

治療の成功に続いて、病状の再発を予防するための維持療法を患者に施すことが望ましく、該療法では、本発明の化合物が、体重1kg当たり0.01μg～100gの維持用量で投与される（米国特許第6,107,094号を参照）。

【0821】

iRNA剤組成物の濃度は、疾患を治療又は抑制するのに、又はヒトにおける生理学的状態を調節するのに十分効果的な量である。投与されるiRNA剤の濃度又は量は、該i

R N A 剤及び投与方法（例えば、経鼻、経口、経肺）に対して決定されたパラメータに依存し得る。例えば、経鼻製剤は、鼻腔の刺激又は焼けつきを回避するために、いくつかの成分をかなり低濃度とする必要がある傾向にある。好適な経鼻製剤を提供するために、経口製剤を 10～100 倍に希釈するのが望ましいこともある。

【0822】

疾患又は障害の重症度、事前の治療、対象の通常健康状態及び／又は年齢、ならびに別の疾患の存在など（これらに限定されない）、ある種の要因が、対象を効果的に治療するのに必要とされる用量に影響を及ぼす可能性がある。さらに、治療上有効な量の i R N A 剤、例えば二本鎖の i R N A 剤または s R N A 剤（例えば、前駆体、例えば s R N A 剤へプロセシングされ得るより大きな i R N A 剤、あるいは、例えば二本鎖の i R N A 剤もしくは s R N A 剤などの i R N A 剤またはそれらの前駆体をコードする D N A）を用いた対象の治療は、単一の治療を包含することもできるし、又は、好ましくは一連の治療を包含することもできる。また、治療に使用される s R N A 剤等の i R N A 剤の有効用量を、個々の治療の経過により増やしても減らしてもよいことは当然のことである。用量を変化させることは可能であり、本明細書中で記載されるような診断アッセイの結果から明らかになり得る。例えば、対象は、i R N A 剤組成物の投与後にモニタリングされ得る。モニタリングの情報に基づいて、i R N A 剤組成物の追加量が投与され得る。

10

【0823】

数日間～数ヶ月間続く治療の経過とともに、又は治療が効果を上げるか若しくは疾患状態の減少が達成されるまで、投薬は治療されるべき病状の重症度及び応答性によって決まる。最適な投与計画は、患者の体内における薬物蓄積量の測定から算出され得る。当業者は、最適の用量、投与の手順及び反復頻度を容易に決定することができる。最適の用量は、個々の化合物の相対的な効能に依存して変化しうるものであり、通常、i n v i t r o 及び i n v i v o の動物モデルで効果的であることが見出された E C 50 を基に概算可能である。いくつかの実施形態では、上記動物モデルには、ヒト遺伝子、例えば、標的 R N A を産生する遺伝子を発現するトランスジェニック動物が挙げられる。トランスジェニック動物は、対応する内在の R N A を欠いているものであってもよい。他の実施形態では、試験用の組成物は、少なくとも内部領域においては、動物モデルの標的 R N A とヒトの標的 R N A との間で保存されている配列と相補的である i R N A 剤を包含する。

20

【0824】

本明細書中に記載の i R N A 剤が、数多くの方法で、哺乳類、特に大型哺乳類、例えばヒト以外の霊長類又はヒトに投与され得ることを、本発明者等は見出している。

30

一実施形態では、i R N A 剤（例えば二本鎖 i R N A 剤、又は s R N A 剤）組成物の投与は、非経口、例えば静脈内（例えばボラスとして又は拡散注入として）、皮内、腹腔内、筋肉内、鞘内、脳室内、頭蓋内、皮下、経粘膜的、口腔内、舌下、経内視鏡的、経直腸、経口、経膈、局所、経肺、鼻腔内、尿道又は経眼で実施される。投与は、対象者により、又は他の人（例えば医療提供者）により行われ得る。該薬剤は、一定用量で、又は一定量を送達する分配容器中に提供され得る。選択された送達様式については、以下により詳細に述べる。

【0825】

本発明は、本明細書中に記載の i R N A 剤を直腸投与又は直腸送達するための方法、組成物及びキットを提供する。

40

したがって、本明細書中に記載の i R N A 剤、例えば二本鎖 i R N A 剤、又は s R N A 剤（例えば、前駆体、例えば s R N A 剤へプロセシングされ得るより大きな i R N A 剤、あるいは、例えば二本鎖の i R N A 剤もしくは s R N A 剤などの i R N A 剤またはそれらの前駆体をコードする D N A）、例えば本明細書中に記載の治療上有効な量の i R N A 剤、例えば 40 ヌクレオチド未満、好ましくはヌクレオチド 30 未満の二本鎖領域を有し、1 つ又は 2 つの 1～3 ヌクレオチド長の 1 本鎖 3' 突出部を有する i R N A 剤は、直腸投与され得る（例えば、直腸を介して下方大腸又は上方大腸内へ導入され得る）。この手法は、炎症性疾患、好ましくない細胞増殖を特徴とする障害、例えばポリープ又は大腸がん

50

を治療する場合に、特に有用である。

【0826】

該薬剤は、分注用デバイス、例えば、大腸の検査又はポリープの除去に使用されるデバイスと類似した、可撓性の、カメラガイド付きデバイスであって、薬剤を送達する手段を備えたものを導入することにより、大腸内の部位に送達され得る。

【0827】

iRNA剤の直腸投与には、浣腸剤を用いる。浣腸剤のiRNA剤は、生理食塩水又は緩衝溶液に溶解され得る。また、直腸投与には坐剤を用いることも可能であり、坐剤は、別の成分、例えばココアバター又はヒドロプロピルメチルセルロース等の賦形剤を含み得る。

10

【0828】

本明細書中に記載の任意のiRNA剤は、例えば錠剤、カプセル、ゲルカプセル、薬用キャンディ、トローチ又は液状シロップの形状で経口投与され得る。さらに、該組成物は、口腔の表面に局所施用され得る。

【0829】

本明細書中に記載の任意のiRNA剤は、口腔投与されることができる。例えば、該薬剤は口腔内に噴霧されてもよいし、又は直接、例えば液状、固形またはゲル状で、口腔内の表面に施用されてもよい。このような投与は、口腔内（例えば、歯茎又は舌）の炎症の治療に特に望ましく、例えば一実施形態では、その口腔投与は、例えば吸入を伴わずに、分配容器、例えば医薬組成物及び噴霧剤を分配する定量噴霧容器から口腔内へ噴霧されることにより実施される。

20

【0830】

本明細書中に記載の任意のiRNA剤は、眼球組織に投与され得る。例えば、該薬剤は、眼又は隣接する組織（例えば、瞼の内側）に投与され得る。該薬剤は、例えば噴霧することにより、滴剤として、洗眼液として、又は軟膏として局所投与され得る。投与は、対象者により、又は他の人（例えば医療提供者）により実施され得る。該薬剤は、一定用量で、又は一定用量を送達する容器内で提供され得る。また、該薬剤は、眼の内側に投与されることも可能であり、選択された領域又は構造に対して該薬剤を導入することができる針又は別の送達デバイスにより導入され得る。眼球治療は、眼又は隣接する組織の炎症を治療するのに特に望ましい。

30

【0831】

本明細書中に記載の任意のiRNA剤は、皮膚へ直接投与され得る。例えば、該薬剤は、例えば、皮膚内に侵入するが、好ましくはその下にある筋組織には侵入しない極微針又は一連の極微針を使用することにより、皮膚層に局所投与又は送達され得る。iRNA剤組成物の投与は、局所的であり得る。局所投与は、例えば、対象の真皮又は表皮に上記組成物を送達することができる。局所投与は、経皮貼布剤、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴剤、坐剤、噴霧剤、液剤及び粉末剤の形態であり得る。局所投与用の組成物は、リポソーム、ミセル、乳化剤又は別の脂溶性分子集合体として製剤化され得る。経皮投与は、イオントフォレーシス、フォノフォレーシス又はソノフォレーシス等の少なくとも1つの浸透促進法を用いて投与され得る。

40

【0832】

本明細書中に記載の任意のiRNA剤は、肺器官系に投与され得る。経肺投与は、吸入により、又は肺器官系内へ送達デバイスを導入することにより、例えば該薬剤を分配することができる送達デバイスを導入することにより達成され得る。肺送達の好ましい方法には、吸入を用いる。該薬剤は、該薬剤（例えば湿った薬剤又は乾燥した薬剤であって、吸入可能なように十分に小さい形状の薬剤）を送達する容器中で提供され得る。該デバイスは、一定用量の薬剤を送達し得る。対象者でも他の人でも該薬剤を投与し得る。

【0833】

肺送達は、肺組織に直接影響する疾患だけでなく、別の組織に影響する疾患にも効果的である。

50

iRNA 剤は、液体または液体以外のもの（例えば粉末、結晶）、又は肺送達用のエアロゾルとして製剤化され得る。

【0834】

本明細書中に記載の任意の iRNA 剤は、経鼻投与され得る。経鼻投与は、送達デバイスを鼻内に導入することにより、例えば該薬剤を分配することができる送達デバイスを導入することにより達成され得る。経鼻送達の方法は、鼻腔の表面に、噴霧剤、エアロゾル、液剤を、例えば滴下により又は局所投与により投与することを包含する。該薬剤は、該薬剤（例えば湿った薬剤又は乾燥した薬剤であって、吸入可能なように十分に小さい形状の薬剤）を送達する容器中で提供され得る。該デバイスは、一定用量の薬剤を送達し得る。対象者でも他の人でも該薬剤を投与し得る。

10

【0835】

経鼻送達は、鼻組織に直接影響する疾患だけでなく、別の組織に影響する疾患にも効果的である。

iRNA 剤は、液体または液体以外のもの（例えば粉末、結晶）、又は経鼻送達用として製剤化され得る。

【0836】

iRNA 剤は、天然のウイルスキャプシド内にパッケージングされてもよいし、化学的若しくは酵素的に生産された人工キャプシド又はそれらに由来する構造内にパッケージングされてもよい。

【0837】

iRNA 剤を含む医薬組成物の用量は、疾患状態（例えばがん又は心疾患）の症状を緩和するために投与され得る。対象は、上記の任意の方法により、該医薬組成物を用いて治療され得る。

20

【0838】

対象における遺伝子発現は、iRNA 剤を含む医薬組成物を投与することにより調節され得る。

対象は、粉末形態、例えば結晶性粒子等の微粒子の集合体である一定量の iRNA 剤、例えば二本鎖の iRNA 剤または sRNA 剤（例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤）組成物を投与することにより治療され得る。該組成物は、複数の iRNA 剤、例えば、1つ又はそれ以上の異なる内在性標的 RNA に特異的な iRNA 剤を包含し得る。上記方法は、本明細書中に記載の別の特徴を包含し得る。

30

【0839】

対象は、噴霧乾燥を含む方法（すなわち溶液、乳化剤、又は懸濁液を噴霧し、直後にその液滴を乾燥ガスに暴露させ、得られた多孔質粉末粒子を回収すること）により調製された一定量の iRNA 剤組成物を投与することにより治療され得る。上記組成物は、複数の iRNA 剤、例えば、1つ又はそれ以上の異なる内在性標的 RNA に特異的な iRNA 剤を包含し得る。上記方法は、本明細書中に記載の別の特徴を包含し得る。

【0840】

iRNA 剤、例えば二本鎖 iRNA 剤、又は sRNA 剤（例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤またはそれらの前駆体をコードする DNA）は、粉末形態、結晶形態又はその他の微細に分割された形態で、担体、例えば吸入又は別の経肺送達に適したマイクロ粒子又はナノ粒子とともに、あるいは担体を伴わずに、提供され得る。このことは、エアロゾル調製物、例えばエアロゾル化した噴霧乾燥組成物を提供することを包含する。該エアロゾル組成物は、定量送達デバイス中に提供されるか、又は該デバイスにより分配されるかのうち少なくともいずれかでありうる。

40

【0841】

対象は、吸引により、例えば噴霧乾燥した iRNA 剤、例えば二本鎖 iRNA 剤、又は sRNA 剤（例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA

50

RNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤またはそれらの前駆体をコードする DNA) の組成物を、エアロゾル化し、且つ該エアロゾル化組成物を吸引することにより、治療可能な状態を治療され得る。iRNA 剤は sRNA であり得る。上記組成物は、複数の iRNA 剤、例えば、1 つ又はそれ以上の異なる内在性標的 RNA に特異的な iRNA 剤を包含し得る。上記方法は、本明細書中に記載の別の特徴を包含し得る。

【0842】

対象は、有効量／一定量の iRNA 剤、例えば、二本鎖 iRNA 剤、又は sRNA 剤（例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤、またはそれらの前駆体をコードする DNA) を含む組成物を投与することにより治療されることができ、該組成物は、噴霧乾燥、凍結乾燥、真空乾燥、蒸発、流動床乾燥、又はこれらの技法の組合せを含む方法により調製される。

10

【0843】

別の態様では、本発明は、対象の細胞における多量の転写産物に関連したパラメータを評価すること、参照値に対して評価されたパラメータを比較すること、及び評価されたパラメータが参照値に対して予め選択された相関を有する（例えば値が大きい）場合に iRNA 剤（又は、sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤等の前駆体、又は iRNA 剤又はその前駆体をコードする DNA) を該対象に投与することを包含する方法を特徴とする。一実施形態では、iRNA 剤は、評価される転写産物に相補的な配列を含む。例えば、パラメータは、転写レベルの直接的な測定、タンパク質レベルの測定、疾患又は障害の症状又は特徴（例えば細胞増殖速度及び／又は腫瘍質量、ウイルス負荷）の測定であり得る。

20

【0844】

別の態様では、本発明は、iRNA 剤、例えば二本鎖 iRNA 剤、又は sRNA 剤（例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤またはそれらの前駆体をコードする DNA) を含む第 1 の量の組成物であって該 iRNA 剤が標的核酸と実質的に相補的である鎖を含むことを特徴とする組成物を、対象に投与することと、標的核酸によりコードされたタンパク質と関連する活性を評価し、該評価を第 2 の量が投与されるべきかどうかを決定するために使用することを含む方法の特徴とする。好ましい実施形態では、上記方法は、第 2 の量の組成物を投与することを包含し、第 2 の量についての投与時間又は用量は、前記評価の関数である。上記方法は、本明細書中に記載の別の特徴を包含し得る。

30

【0845】

別の態様では、本発明は、二本鎖 iRNA 剤（ds iRNA 剤）の供給源を対象に投与する方法を特徴とする。該方法は、(a) 19～25ヌクレオチド長、好ましくは 21～23ヌクレオチドの二本鎖領域を含み、(b) 標的 RNA（例えば、内在性 RNA 又は病原体 RNA）に相補的であり、且つ任意選択で (c) 少なくとも 1 つの 3' 突出部 1～5 nt 長を含む ds iRNA 剤、例えば sRNA 剤の供給源を投与または移植することを包含する。一実施形態では、上記供給源は、長期にわたり ds iRNA 剤を放出し、例えば上記供給源は、制御放出又は遅延放出型の供給源であり、例えば ds iRNA 剤を徐々に放出する微粒子である。他の実施形態では、上記供給源は、ポンプ、例えばセンサーを含むポンプ、又は 1 つ又はそれ以上の単位用量を放出することができるポンプである。

40

【0846】

一態様では、本発明は、標的 RNA に相補的なヌクレオチド配列、例えば、実質的及び／又は正確に相補的なヌクレオチド配列を含む iRNA 剤、例えば二本鎖 iRNA 剤、又は sRNA 剤（例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤ま

50

たはそれらの前駆体をコードするDNA)を含む医薬組成物を特徴とする。標的RNAは、内在性のヒト遺伝子の転写産物であり得る。一実施形態では、iRNA剤は、(a) 19~25ヌクレオチド長、好ましくは21~23ヌクレオチドであり、(b) 内在性標的RNAに相補的であり、且つ任意選択で(c) 少なくとも1つの3'突出部1~5nt長を含む。一実施形態では、医薬組成物は、乳化剤、マイクロエマルジョン、クリーム、ゼリー又はリポソームであり得る。

【0847】

一例では、医薬組成物は、局所送達剤と混合されたiRNA剤を含む。局所送達剤は、複数の微小ビヒクルであり得る。微小ビヒクルは、リポソームであり得る。好ましい実施形態では、リポソームはカチオン性のリポソームである。

10

【0848】

別の態様では、医薬組成物は、局所浸透促進剤と混合されたiRNA剤、例えば二本鎖iRNA剤、又はsRNA剤(例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA)を含む。一実施形態では、上記局所浸透促進剤は、脂肪酸である。脂肪酸は、アラキドン酸、オレイン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1-モノカプリン酸、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、又はC₁₋₁₀アルキルエステル、モノグリセリド、ジグリセリド又は医薬として許容可能なその塩であり得る。

20

【0849】

別の実施形態では、局所浸透促進剤は、胆汁酸塩である。上記胆汁酸塩は、コール酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸、グリコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、タウロ-24, 25-ジヒドロフシジン酸ナトリウム、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル又は医薬として許容可能なその塩であり得る。

【0850】

別の実施形態では、浸透促進剤は、キレート剤である。該キレート剤は、EDTA、クエン酸、サリチル酸、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9、 β -ジケトンのN-アミノアシル誘導体又はその混合物であり得る。

30

【0851】

別の実施形態では、浸透促進剤は、界面活性剤、例えばイオン性又は非イオン性界面活性剤である。上記界面活性剤は、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテル、ペルフルオロ化合物の乳化剤又はその混合物であり得る。

【0852】

別の実施形態では、浸透促進剤は、不飽和環状尿素、1-アルキル-アルコン、1-アルケニルアザシクロアラカノン、ステロイド性の抗炎症剤及びそれらの混合物から成る群から選択され得る。さらに別の実施形態では、浸透促進剤は、グリコール、ピロール、アゾン(azone)又はテルペン類であり得る。

40

【0853】

一態様では、本発明は、経口送達に好適な形態の、iRNA剤、例えば二本鎖iRNA剤、又はsRNA剤(例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA)を含む医薬組成物を特徴とする。一実施形態では、経口送達は、胃腸管の細胞又は領域、例えば小腸、大腸(例えば、大腸がんを治療するため)などに対してiRNA剤組成物を送達するのに使用され得る。経口送達の形態は、錠剤、カプセル又はゲルカプセルであり得る。一実施形態では、医薬組成物のi

50

R N A 剤は、細胞接着タンパク質の発現を調節し、細胞の増殖速度を調節し、又は真核生物の病原体又はレトロウイルスに対抗する生物活性を有する。別の実施形態では、医薬組成物は、哺乳類の胃内で、錠剤、カプセル又はゲルカプセルが溶解するのを実質的に抑制する腸溶性材料を包含する。好ましい実施形態では、腸溶性材料はコーティング剤である。該コーティング剤は、酢酸フタル酸、プロピレングリコール、モノオレイン酸ソルビタン、トリメリト酸酢酸セルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース又は酢酸フタル酸セルロースであり得る。

【0854】

別の実施形態では、経口投薬形態の医薬組成物は、浸透促進剤を含む。該浸透促進剤は、胆汁酸塩又は脂肪酸であり得る。胆汁酸塩は、ウルソデオキシコール酸、ケノデオキシ

10

【0855】

別の実施形態では、経口投薬形態の医薬組成物は、賦形剤を含む。一例では、賦形剤はポリエチレングリコールである。他の例では、賦形剤は P r e c i r o l（登録商標）である。

【0856】

別の実施形態では、経口投薬形態の医薬組成物は、可塑剤を含む。可塑剤は、ジエチルフタル酸、トリアセチンセバシン酸ジブチル、ジブチルフタル酸又はトリエチルクエン酸

20

【0857】

一態様では、本発明は、i R N A 剤及び送達ビヒクルを包含する医薬組成物を特徴とする。一実施形態では、該 i R N A 剤は、（a）19～25ヌクレオチド長、好ましくは21～23ヌクレオチドであり、（b）内在性標的 R N A に相補的であり、且つ任意選択で（c）少なくとも1つの3'突出部1～5ヌクレオチド長を含む。

【0858】

一実施形態では、送達ビヒクルは、i R N A 剤、例えば二本鎖 i R N A 剤、又は s R N A 剤（例えば、前駆体、例えば s R N A 剤へプロセシングされ得るより大きな i R N A 剤、あるいは、例えば二本鎖の i R N A 剤もしくは s R N A 剤などの i R N A 剤またはそれらの前駆体をコードする D N A）を、局所の投与経路により細胞に送達し得る。送達ビヒクルは、微小ビヒクルであり得る。一例では、微小ビヒクルはリポソームである。好ましい実施形態では、リポソームはカチオン性リポソームである。他の例では、微小ビヒクルはミセルである。一態様では、本発明は、注射可能な投薬形態の、i R N A 剤、例えば二本鎖 i R N A 剤、又は s R N A 剤（例えば、前駆体、例えば s R N A 剤へプロセシングされ得るより大きな i R N A 剤、あるいは、例えば二本鎖の i R N A 剤もしくは s R N A 剤などの i R N A 剤またはそれらの前駆体をコードする D N A）を含む医薬組成物を特徴とする。一実施形態では、医薬組成物の注射可能な投薬形態は、殺菌水溶液又は分散液及び殺菌粉末を含む。好ましい実施形態では、上記殺菌溶液は、水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン又はプロピレングリコール等の希釈剤を含み得る。

30

【0859】

一態様では、本発明は、経口投薬形態の、i R N A 剤、例えば二本鎖 i R N A 剤、又は s R N A 剤（例えば、前駆体、例えば s R N A 剤へプロセシングされ得るより大きな i R N A 剤、あるいは、例えば二本鎖の i R N A 剤もしくは s R N A 剤などの i R N A 剤またはそれらの前駆体をコードする D N A）を含む医薬組成物を特徴とする。一実施形態では、経口投薬形態は、錠剤、カプセル及びゲルカプセルから成る群から選択される。別の実施形態では、医薬組成物は、哺乳類の胃内で、錠剤、カプセル又はゲルカプセルが溶解するのを実質的に抑制する腸溶性材料を含む。好ましい実施形態では、腸溶性材料はコーティング剤である。コーティング剤は、酢酸フタル酸、プロピレングリコール、モノオレイン酸ソルビタン、トリメリト酸酢酸セルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース又は酢酸フタル酸セルロースであり得る。一実施形態では、経口投薬形態の医薬組

40

50

成物は、浸透促進剤、例えば、本明細書中に記載の浸透促進剤を含む。

【0860】

一態様では、本発明は、直腸投薬形態の、iRNA剤、例えば二本鎖iRNA剤、又はsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）を含む医薬組成物を特徴とする。一実施形態では、直腸投薬形態は浣腸剤である。別の実施形態では、直腸投薬形態は坐剤である。

【0861】

一態様では、本発明は、腔内投薬形態の、iRNA剤、例えば二本鎖iRNA剤、又はsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）を含む医薬組成物を特徴とする。一実施形態では、腔内投薬形態は坐剤である。別の実施形態では、腔内投薬形態は、泡沫剤、クリーム又はゲルである。

10

【0862】

一態様では、本発明は、経肺又は経鼻投薬形態の、iRNA剤、例えば二本鎖iRNA剤、又はsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）を含む医薬組成物を特徴とする。一実施形態では、iRNA剤は、粒子、例えばミクロスフェア等のマイクロ粒子内に組み込まれ得る。上記粒子は、噴霧乾燥、凍結乾燥、蒸発、流動床乾燥、真空乾燥又はこれらの技法の組合せにより産生され得る。ミクロスフェアは、懸濁液、粉末又は移植可能な固形として製剤化され得る。

20

【0863】

一態様では、本発明は、対象が吸入するのに好適な、噴霧乾燥されたiRNA剤、例えば二本鎖iRNA剤、又はsRNA剤（例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいは、例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA）の組成物であって、（a）吸入によって対象の状態を治療するのに好適な治療上有効なiRNA剤の量、（b）糖質及びアミノ酸から成る群から選択される医薬として許容可能な賦形剤、及び（c）任意選択で、分散性を促進する量の生理学的に許容可能かつ水溶性のポリペプチド、を含む組成物を特徴とする。

30

【0864】

一実施形態では、賦形剤は糖質である。該糖質は、単糖、二糖、三糖及び多糖から成る群から選択され得る。好ましい実施形態では、糖質は、デキストロース、ガラクトース、マンニトール、D-マンノース、ソルビトール及びソルボースから成る群から選択される単糖である。他の好ましい実施形態では、糖質は、ラクトース、マルトース、スクロース及びトレハロースから成る群から選択される二糖である。

【0865】

別の実施形態では、賦形剤はアミノ酸である。一実施形態では、該アミノ酸は疎水性アミノ酸である。好ましい実施形態では、疎水性アミノ酸は、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン及びバリンから成る群から選択される。さらに別の実施形態では、アミノ酸は極性アミノ酸である。好ましい実施形態では、アミノ酸は、アルギニン、ヒスチジン、リシン、システイン、グリシン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択される。

40

【0866】

一実施形態では、分散性を促進するポリペプチドは、ヒト血清アルブミン、 α -ラクトアルブミン、トリプシノーゲン及びポリアラニンから成る群から選択される。

一実施形態では、噴霧乾燥されたiRNA剤組成物は、10 μ m（ミクロン）未満の質

50

量中央径 (MMD) を有する粒子を含む。別の実施形態では、噴霧乾燥された iRNA 剤組成物は、5 μm 未満の質量中央径を有する粒子を含む。さらに別の実施形態では、噴霧乾燥された iRNA 剤組成物は、5 μm 未満の空気力学的質量中央径 (MMAD) を有する粒子を含む。

【0867】

幾つかの他の態様では、本発明は、iRNA 剤、例えば二本鎖 iRNA 剤、又は sRNA 剤 (例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤またはそれらの前駆体をコードする DNA) の医薬製剤を収容している好適な容器を含むキットを提供する。ある実施形態では、該医薬製剤の個々の成分は、1つの容器内に提供され得る。別例として、医薬製剤の成分を別個に2つ又はそれ以上の容器、例えば iRNA 剤調製物の1つの容器、担体化合物用の少なくとももう1つの容器を提供するのが望ましい。上記キットは、単一ボックス内に入った1つ又はそれ以上の容器等の、多くの異なる構成で包装されてもよい。異なる成分が、例えばキットに付属の取り扱い説明書に従って併用されてもよい。上記成分は、例えば医薬組成物を調製して投与するために、本明細書中に記載の方法に従って組み合わせることが可能である。また、上記キットは送達デバイスも含み得る。

10

【0868】

別の態様では、本発明は、デバイス、例えば移植可能なデバイスの特徴とし、該デバイスは、iRNA 剤、例えば二本鎖 iRNA 剤、又は sRNA 剤 (例えば、前駆体、例えば sRNA 剤へプロセシングされ得るより大きな iRNA 剤、あるいは、例えば二本鎖の iRNA 剤もしくは sRNA 剤などの iRNA 剤またはそれらの前駆体をコードする DNA)、例えば内在性転写産物をサイレンシングする iRNA 剤を含む組成物を、分配又は投与することができる。一実施形態では、該デバイスは上記組成物でコーティングされる。別の実施形態では、iRNA 剤がデバイス内に配置される。別の実施形態では、デバイスは、単位用量の組成物を分配するための機構を備えている。別の実施形態では、デバイスは、例えば拡散により連続的に組成物を放出する。代表的なデバイスとしては、ステント、カテーテル、ポンプ、人工器官又は人工器官部品 (例えば、人工心臓、心臓弁等)、及び縫合糸が挙げられる。

20

【0869】

本明細書中で使用される場合、「結晶性」という用語は、結晶の構造又は特性を有する固体、すなわち、一定の角度で平坦な面が交差し、かつ規則的な内部構造を有する三次元構造の粒子を言う。本発明の組成物は、様々な結晶形状を有しうる。結晶形状は、例えば噴霧乾燥等を包含する種々の方法により調製され得る。

30

【0870】

本発明について以下の実施例によりさらに説明するが、該実施例によりさらに制限されると解釈されるべきではない。

【実施例1】

【0871】

[マウスにおける内在性 ApoM 遺伝子発現の阻害]

40

アポリポタンパク質 M (ApoM) は血漿中の高密度リポタンパク質 (HDL) 中に主に存在する、ヒトのアポリポタンパク質である。ApoM は肝臓および腎臓に限局して発現することが報告されている (シュー エヌ (Xu N) ら、Biochem J Biol Chem, 1999, Oct29; 274(44):31286-90)。マウスの ApoM は 21 kD の膜会合タンパク質であり、同タンパク質は血清中では HDL 粒子に会合している。ApoM 遺伝子の発現は転写因子である肝細胞核内因子 1α (Hnf-1α) によって制御される。このことは Hnf-1α^{-/-} マウスが ApoM 不全であるとおりである。ヒトにおいては、HNF-1α 遺伝子内の突然変異が若年性成人発症型糖尿病 (MODY) の一般的な原因となっている。

【0872】

マウスの ApoM 遺伝子を標的とするように、様々な試験用 iRNA を合成した。Apo

50

o M遺伝子を選んだ理由の一部は、同遺伝子が肝臓および腎臓において発現レベルが高く、かつ活性が肝臓および腎臓に局限されることである。

【0873】

3種の異なるクラスのdsRNA剤を合成し、各クラスが5'末端および3'末端に異なる修飾および特徴を有するようにした。表7を参照されたい。

【0874】

【表7】

表7

標的ORF

10

5 (23 mer): AAGTTTGGGCAGCTCTGCTCT (配列番号26)

19 (23 mer): AAGTGGACATACCGATTGACT (配列番号27)

25 (23 mer): AACTCAGAACTGAAGGGCGCC (配列番号28)

20

27 (23 mer): AAGGGCGCCCAGACATGAAAA (配列番号29)

3'-UTR

42: AAGATAGGAGCCCAGCTTCGA (配列番号30)

30

クラス

21ntのiRNA、tはデオキシチミジン、pはリン酸

40

pGUUUGGGCAGCUCUGCUCUtt (配列番号31) #1

pAGAGCAGAGCUGCCCAAACtt (配列番号32)

【0875】

pGUGGACAUACCGAUUGACUtt (配列番号33) #2

pAGUCAAUCCGUUUGUCCACtt (配列番号34)

pCUCAGAACUGAAGGGCGCCtt (配列番号35) #3

pGGCGCCCUUCAGUUCUGAGtt (配列番号36)

10

pGAUAGGAGCCCAGCUUCGAtt (配列番号37) #4

pUCGAAGCUGGGCUCCUAUctt (配列番号38)

クラスII

20

21ntのiRNA、tはデオキシチミジン、pはリン酸、psはチオリン酸

pGUUUGGGCAGCUCUGCUCpsUpstpst (配列番号39) #11

pAGAGCAGAGCUGCCCCAApsCpstpst (配列番号40)

30

pGUGGACAUACCGAUUGACpsUpstpst (配列番号41) #13

pAGUCAAUCCGUUUGUCCapsCpstpst (配列番号42)

pCUCAGAACUGAAGGGCGCpsCpstpst (配列番号43) #15

pGGCGCCCUUCAGUUCUGApsGpstpst (配列番号44)

40

pGAUAGGAGCCCAGCUUCGpsApstpst (配列番号45) #17

pUCGAAGCUGGGCUCCUAUpsCpstpst (配列番号46)

クラスIII

23ntアンチセンス鎖と21ntセンス鎖、5'平滑末端

GUUUGGGCAGCUCUGCUCUCU (配列番号47) #19

AGAGAGCAGAGCUGCCCAAACUU (配列番号48)

10

GUGGACAUACCGAUUGACUGA (配列番号49) #21

UCAGUCAAUCCGUUUGUCCACUU (配列番号50)

CUCAGAACUGAAGGGCGCCCA (配列番号51) #23

20

PUGGGCGCCCUUCAGUUCUGAGUU (配列番号52)

GAUAGGAGCCCAGCUUCGAGU (配列番号53) #25

ACUCGAAGCUGGGCUCCUAUCUU (配列番号54)

【0877】

30

クラスIのdsRNAは、21ヌクレオチド長のセンス鎖およびアンチセンス鎖対から構成されるものとした。センス鎖およびアンチセンス鎖それぞれの5'末端をリン酸化した。二本鎖領域を19ヌクレオチド長とし、リボヌクレオチドから構成されるものとした。各鎖の3'末端には、2つのデオキシリボヌクレオチドチミジンから構成される2ヌクレオチドの突出部を設けた。表7の構築物#1～4を参照されたい。

【0878】

クラスIIのdsRNAも21ヌクレオチド長であり、19ヌクレオチド長の二本鎖領域を備えるものとした。センス鎖およびアンチセンス鎖それぞれの5'末端をリン酸化した。センス鎖およびアンチセンス鎖の3'末端の3ヌクレオチドをホスホロチオエートデオキシリボヌクレオチドとし、この末端の2つのホスホロチオエートチミジンが対をなさないで該iRNA分子の各末端に3'の突出部が生じるようにした。表7の構築物11, 13, 15および17を参照されたい。

40

【0879】

クラスIIIのdsRNAには23リボヌクレオチドのアンチセンス鎖と21リボヌクレオチドのセンス鎖とを含め、5'平滑末端と3'突出部とを有する構築物を作製した。表7の構築物19, 21, 23および25を参照されたい。

【0880】

iRNAの上記3クラスそれぞれの中では、4つのdsRNA分子を、Apom転写物の異なる4領域を標的とするように設計した。dsRNA1, 11および19はオープンリーディングフレーム(ORF)の5'末端を標的とするものとした。dsRNA2, 1

50

3および21、ならびにdsRNA3, 15および23はORFの2つの内部領域（1つは5'近接領域で1つは3'近接領域）と標的とし、iRNA構築物4, 17および25はApoMのmRNAの3'非翻訳配列（3'UTS）の領域を標的とするものとした。これを表8に要約して示す。

【0881】

【表8】

表8. マウスApoMを標的とするiRNA分子

	ORFの5'末端を 標的とするiRNA	ORF中間部 (5'近接領域)を 標的とするiRNA	ORF中間部 (3'近接領域)を 標的とするiRNA	3'UTSを標的と するiRNA
クラスI	1	2	3	4
クラスII	11	13	15	17
クラスIII	19	21	23	25

10

20

【0882】

CD1マウス（6～8週齢、約35g）に、試験用iRNAのうちの1つをPBSに溶解して投与した。体重の10%に相当する容量の溶液とした200μgのiRNA（マウス1kgあたり約5.7mg iRNA）を高圧の尾静注法により10～20秒間かけて投与した。24時間の回復期の後、初回の注射と同じ用量および投与方法を用いて2回目の注射を実施し、さらに24時間後に3回目最終回の注射を、これも同じ用量および投与方法を用いて投与した。最後の24時間回復期の後、マウスを屠殺し、血清を採取し肝臓および腎臓を採取してApoM遺伝子発現への影響を調べた。発現は定量的RT-PCR分析およびウエスタンブロット分析によりモニターした。本実験は表7に列挙したiRNA各々について反復して実施した。

30

【0883】

定量的RT-PCRによって示されたように（図7Aおよび7B）、クラスIのiRNAはマウスにおけるApoMのRNAレベルを変化させなかった。このことは、HepG2培養細胞におけるこれらのiRNAの効果（図8）とは対照的である。CMVプロモーター下の外来ApoM RNAを発現するプラスミドとクラスIのiRNAとをコトランスフェクションした細胞は、対照のトランスフェクション群に比べてApoM RNA濃度が25%以上低下した。iRNA分子1, 2および3はそれぞれ外来ApoMのmRNAレベルを75%減少させた。

40

【0884】

クラスIIのiRNAは肝臓および腎臓のApoM mRNAレベルを約30～85%低下させた（図9Aおよび9B）。iRNA分子「13」はmRNAレベルを最も劇的に低下させ、定量的RT-PCRによって肝臓組織における約85%の減少が示された。ウエスタンブロット分析により実証されたように、血清のApoMタンパク質レベルも低下した。iRNA分子11, 13および15はタンパク質レベルを約50%低下させたが、iRNA分子17の効果は最も弱く、わずか約15～20%だけ低下させた（図10Aお

50

よび10B)。

【0885】

クラスIIIのiRNA(構築物19, 21および23)は血清のApomレベルを約40~50%低下させた(図11Aおよび11B)。

iRNAを介したApomの阻害に対する用量の効果を測定するために、上記の実験を50μgのiRNA「11」(マウス1kgあたり約1.4mg iRNA)を3回注射して再実施した。この低用量iRNAにより、血清のApomレベルが約50%低下した(図12Aおよび12B)。これは、血清中レベルを25~45%低下させた200μgの注射においてみられた低下に匹敵する。これらの結果から、低用量のiRNAが有効であることが示された。

10

【0886】

細胞によって取り込まれるiRNAを増加させる試みにおいて、iRNAを尾静注する前に予めリポフェクタミンとの複合体とした。iRNA「11」を注射したマウスでは、iRNA「11」をリポフェクタミンとともに予めインキュベートすると、Apomタンパク質レベルは野生型の約50%であったが、リポフェクタミンとの複合体にしなかったiRNA「11」をマウスに注射した場合も、Apomレベルは野生型の約50%であった(図12Aおよび12B)。

【0887】

これらの実験から、修飾iRNAによりRNAi仲介型の遺伝子サイレンシングに大きな影響を与えることが可能であること判明した。本明細書において実証されたように、ホスホロチオエートヌクレオチドなどの修飾は標的タンパク質のレベルを低下させるのに特に有効である。

20

【実施例2】

【0888】

[SGLT2を標的とするiRNAの設計]

腎臓におけるD-グルコースの主な再吸収機構には、低親和性で輸送能力の高いNa⁺/グルコーストランスポーター、ナトリウム-グルコーストランスポーター2(OMIM 182381)またはSGLT2が関与している。SGLT2および3は、D-ガラクトースや3-O-メチル-D-グルコースよりもD-グルコースを優先するという点でSGLT1よりも大きな制約を受けている。ライトの報告(Wright, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 280:F10-18, 2001)およびカナイらの報告(Kanai et al., J. Clin. Invest. 93:397-404, 1994)から、近位尿細管のS1セグメントにおける非常に高レベルのSGLT2のメッセージの存在が示された。このような高い発現レベルはノーザンブロット分析においても明らかであり、上記のグルコース輸送系の高い輸送能力に寄与していると思われる。

30

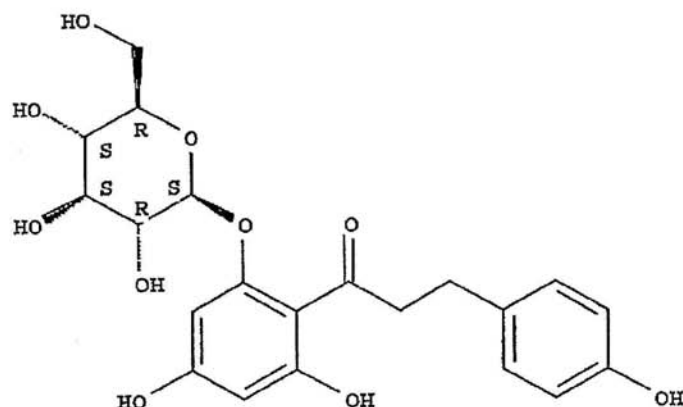
【0889】

初期の腎疾患患者における近位尿細管によるグルコースの再吸収の増大を阻害することにより、腎不全への進行を予防できる可能性がある。例えば、フロリジンはNa⁺/グルコーストランスポーターを阻害することが知られている小分子であり(下記の構造を参照のこと)、単一ネフロン糸球体濾過速度を低下させた。糸球体濾過速度は、初期の糖尿病の患者では、正常なボランティアに比べて顕著に増加する。SGLT2タンパク質産生を下方制御することにより、顕著な治療的改善がもたらされる可能性がある。

40

【0890】

【化 4 6】



フロリジン

10

【0891】

SGLT2 mRNAの配列を標的とする5つのsiRNAオリゴヌクレオチドを選択した(図6)。SGLT2のcDNAは、ウェルズ(Wells)らによって配列決定されている(Genomics 17:787-789, 1993)。この配列には、コード領域といくつかのUTR配列が含まれている。siRNA標的配列は、ダーマコン(Dharmacon)の選択ツール(米国コロラド州ラファイエット所在のダーマコン・インコーポレイテッド(Dharmacon, Inc.))を用いて選択したものであり、表1に示されている。ダーマコンの選択アルゴリズムでは、GC含量、開始配列、およびmRNA領域(すなわちcDNAのみ)などの特定のパラメータをユーザが選択することが可能である。このことにより、ヌクレオチドのトリプレットなどの特定の配列を排除することも可能である。オリゴヌクレオチドは、エルバシャー(Elbashir)らが開発したルール(Methods 26:199-213, 2002)に基づいて選択される。ダーマコンの選択アルゴリズムの、米国カリフォルニア州バレンシア所在のキアゲン(Qiagen, Inc.)、米国テキサス州オースティン所在のアンビオン(Ambion, Inc.)、およびSfold(ディン(Ding)およびローレンス(Lawrence)、Nucleic Acids Res. 29:1034-1046, 2001)によって提供される選択アルゴリズムに対する最大の利点は、選択した配列を、指定の生物種に関するGenBank内の配列に対して自動的にBLAST検索することである。この自動的なBLAST検索により相当の時間が節約され、選択されたオリゴヌクレオチドが別の既知遺伝子に対する有意な相同性を持たないことが保証される。

20

30

【0892】

[その他の実施形態]

本発明について、好ましい実施形態に関して具体的に示し説明してきたが、当業者には当然のことながら、添付の特許請求の範囲により包含される本発明の範囲を逸脱することなく本発明の形態および細部について種々の変更を施すことが可能である。

40

【図面の簡単な説明】

【0893】

【図1】偽相補性のsiRNA²における塩基対形成の構造を示す図。

【図2】HCVゲノムを標的とするように設計された二重標的化siRNAの模式図。

【図3】HCVゲノムを標的とするように設計された、偽相補性かつ二重機能性siRNAの模式図。

【図4】オリゴヌクレオチドにRRMSモノマーを組み込むための一般的な合成スキーム。

【図5】代表的なRRMS担体の表を示す図。パネル1はピロリン系のRRMSを示し；パネル2は3-ヒドロキシピロリン系のRRMSを示し；パネル3はピペリジン系のRR

50

M Sを示し；パネル4はモルホリンおよびピペラジン系のR R M Sを示し；パネル5はデカリン系のR R M Sを示す。R 1はコハク酸またはホスホロアミデートであり、R 2はHまたは複合体リガンドである。

【図6】ヒトの溶質担体ファミリー5（ナトリウム／グルコーストランスポーター）、メンバー2（S L C 5 A 2）m R N A（配列番号1）のヌクレオチド配列を示す図。5'または3' U T Rは斜字体で示されている。s i R N A標的領域の例には下線が付されている。

【図7A】定量的R T－P C R実験の結果を示すグラフ。クラスIのi R N Aがマウスに注射され、次いで肝臓および腎臓のA p o M R N Aレベルが定量的R T－P C Rによって測定された。「C 1」および「C 2」は対照マウスにおけるA p o M R N Aレベルを表す。 10

【図7B】定量的R T－P C R実験の結果を示すゲルの図。クラスIのi R N Aがマウスに注射され、次いで肝臓および腎臓のA p o M R N Aレベルが定量的R T－P C Rによって測定された。「C 1」および「C 2」は対照マウスにおけるA p o M R N Aレベルを表す。

【図8】C M Vプロモーター下で外来A p o M R N Aを発現するプラスミドおよびクラスIのi R N A（1、2、3、または4）で同時にトランスフェクションした後に、H e p G 2組織培養細胞中のA p o M R N Aを測定した定量的R T－P C R実験の結果を示すグラフ。「C」は対照H e p G 2組織培養細胞におけるA p o M R N Aレベルを表す。 20

【図9A】定量的R T－P C R実験の結果を示すグラフ。クラスI Iのi R N A（11、13、15、および17）がマウスに別々に注射された。次いで、肝臓および腎臓のA p o M R N Aレベルが定量的R T－P C Rによって測定された。「C」は対照マウス（クラスI I i R N Aが注射されていないマウス）におけるA p o M R N Aレベルを表す。 30

【図9B】定量的R T－P C R実験の結果を示すゲルの図。クラスI Iのi R N Aがマウスに注射され、次いで肝臓および腎臓のA p o M R N Aレベルが定量的R T－P C Rによって測定された。「C」は対照マウス（クラスI I i R N Aが注射されていないマウス）におけるA p o M R N Aレベルを表す。

【図10A】ホスホロチオエートを含むクラスI IのR N A i（11、13、15、および17）を注射した後のマウスにおける血清中A p o Mレベルを示すグラフ。「C」は対照マウス（クラスI I i R N Aが注射されていないマウス）における血清中A p o M R N Aレベルを表す。 40

【図10B】ホスホロチオエートを含むクラスI IのR N A iを注射した後のマウスにおける血清中A p o Mレベルを示すウエスタンブロット分析の図。「C」は対照マウス（クラスI I i R N Aが注射されていないマウス）における血清中A p o M R N Aレベルを表す。

【図11A】クラスI I IのR N A i分子（19、21、または23）の注射後のマウスにおける血清中A p o Mレベルを示すグラフ。「C」は対照マウス（クラスI I I i R N Aが注射されていないマウス）における血清中A p o M R N Aレベルを表す。 40

【図11B】クラスI I IのR N A i分子の注射後のマウスにおける血清中A p o Mレベルを示すウエスタンブロット分析の図。「C」は対照マウス（クラスI I I i R N Aが注射されていないマウス）における血清中A p o M R N Aレベルを表す。

【図12A】種々の濃度（「μ g」）のR N A iの注射後のマウスにおける血清中A p o Mレベルを示すグラフ。リポフェクタミン（「L i p o」）とのR N A iのプレインキュベーションの効果もまた、これらの実験において試験された。

【図12B】種々の濃度（「μ g」）のR N A iの注射後のマウスにおける血清中A p o Mレベルを示すウエスタンブロット分析の図。リポフェクタミン（「L i p o」）とのR N A iのプレインキュベーションの効果もまた、これらの実験において試験された。 50

【図13】 iRNA 剤（「s iRNA」として示されている）との複合体化に有用な糖部分を示す図。「X」はS、NH、NR、またはOであり得る。「R」はアルキル基であり得る。

【図5】

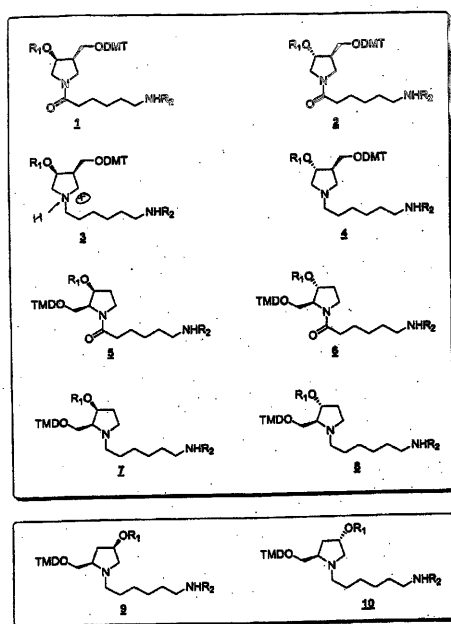


FIG. 5

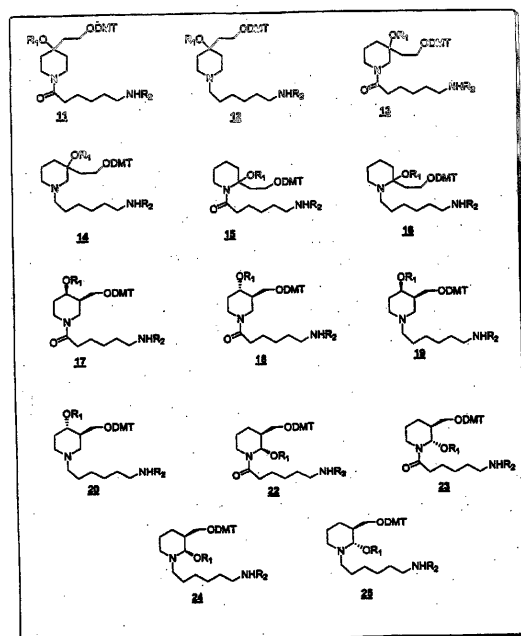


FIG. 5 (Cont'd)

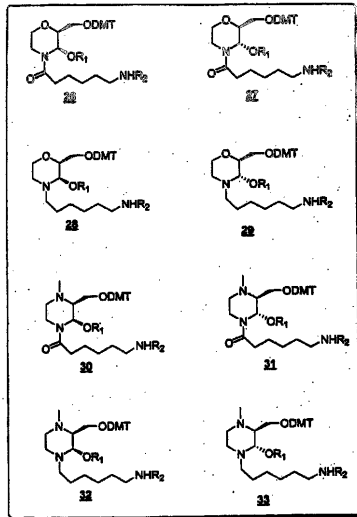


FIG. 5 (Cont'd)

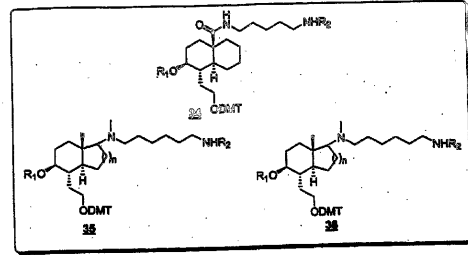


FIG. 5 (Cont'd)

【図 6】

1 gggggcagat cctggggaga atggaggagc acacagaggc aggtoggcca ccagagaggg
 61 gggccagaaa gggccgtgatt gacaatcctg ctgacatcct agtcattgct gcatatttcc
 121 tgcctgtcat tggcgttggc ttgtgtcca ttgtcagaaac caacagaggc actgtggggc
 181 gctacttct ggcaggagcc agcatggtgt ggtggccggt tggggcctct ctctggcca
 241 gcaacatcgg cagtggccac ttgtgggcc tggcaggagc tggcgctgca agtggcctgg
 301 ctgttctgg attcagtggt aatggcctct tctgtgtgt gctactgggc tggctgtttg
 361 caccctgta cctgacagcg ggggtcatca cgtacccaca gtactggcg aagcgcttcg
 421 gggccggcg cctcggcctc taccgtctg tgcctcctct ttctgtgac atctcacca
 481 agatcaggt ggcaggttgc tccggagctg tctcctcca gcaggctctg ggcgggaaca
 541 tctatcctc cgtcagcgc cttctggcca tcacatgat ttacaggttg acagagggcg
 601 tggccgctc gatgtacag gacacggtag agactcgtt catttgggg ggcgctgca
 661 tctcctggg ttacgcttc cagaggtgg ggggtattc ggtctcttc gacaaatacc
 721 tggagagcag gacttcgtg acggtgtcg aggtaccag cgtgggaac atctccagct
 781 tctgtatcg acccgccgc gactctacc acctgtcgc gcaccccggt acgggggac
 841 tgcgtggcc cggcgtgct ctcggagcca caatgtctc ggcgtgtac tgggtcagcg
 901 accaggtcat cgtgacagcg tgcctggcg ggaagagcct gacccacatc aaggcgggct
 961 gcatcctgtg tgggtacctg aagctgacgc ccatgtttct calgtgtatg ccaggcatga
 1021 tcagccgcat tctgtacca gacgaggtgg cgtgtgtgt gctgaggtg tgcaggcgcg
 1081 tgtcggcag gtaggtggcg tgcctcaaca tgcctacc gcggctgctc gtgaagctca
 1141 tggcccaacg tctgcggga ctatcgtcg cgtcctgct ggcgcgctc atgtctcgc
 1201 tggcctcatc ctcaacagc agcagcagc tctcaccat ggaactac acggcctcg
 1261 ggcacagcg cggcagcgc gactgtgc tggggagcg gcttgggtg gttgtatcg
 1321 tggtagtct ggtggcctcg cttccgtgg tggcaggcgg acaggcggg cagctcttcg
 1381 attacatcca ggcagctct agtacctgg caccggcgt gtcggcgctc tctgtctgg
 1441 cgtctctgt ggcgcgctg aatgacagg ggcgctctg gggactcac gggggcctgc
 1501 tgaaggcgt ggcacgctg atcccgagt tctcctcg ctcgggcagc tgtgtcagc
 1561 cctcggctg ccaagcttc cctcggcg tgcactact ctactgcc attgtgtgt
 1621 tctctgtc tggcctcct accctacgg tctcctgtg caccggccc atccacgaa
 1681 agcactcca cggcgtgtc ttactctcc ggcatacaca ggaagagcg gaggacctgg
 1741 atgctgatga gcagcaagg tctcactcc ctgtacagaa tgggtgcca gagagtcca
 1801 tggagatga tgaagccag gccccggcac caagctctt ccggcagtc ctgtctggt
 1861 ttgttgaat gacagaggt ggggtgggca gctctcgc cctacccag gaggagcag
 1921 cggcagcag caggcggctg gaggacatca ggaagacc gagctggcc cgtgtgtgca
 1981 acctcaatg cctgtctatg atggcagtg cgtgtctct cttgggttc tatgctaa
 2041 accaactgog ttggacacca taagccagc cctacagga agtgggggtg agggcctcg
 2101 ggtgtctccc agaaaaggg aaggggcagt ggggtgagaa ggtctgtgct cccctctcc
 2161 cggcctctct ctgctgggg cccactgcat ctgattgca gtaacttccc atgaggcgt
 2221 gggccaccgc ctgaggtgc cctaaggaaa aataaagctg ctttccct gta

FIG. 6

FIG. 7A

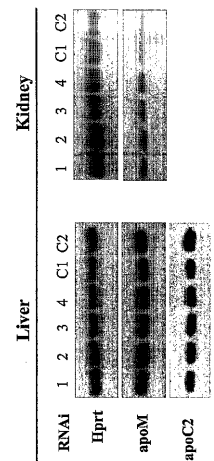
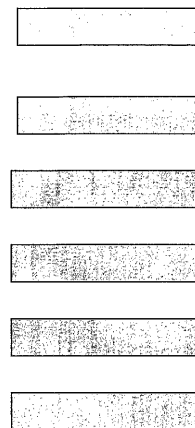
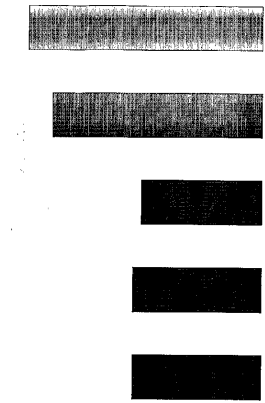


FIG. 7B

FIG. 10A



【図 8】

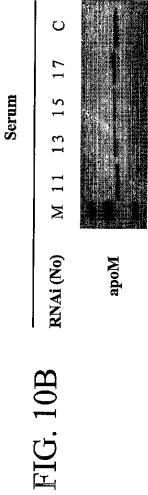
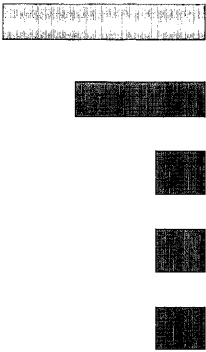


FIG. 8

FIG. 11A

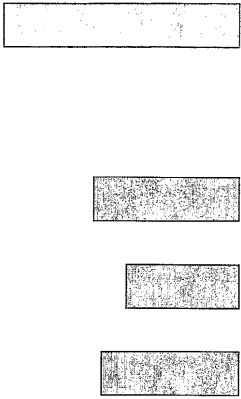


FIG. 9A

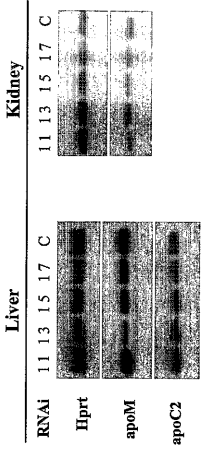
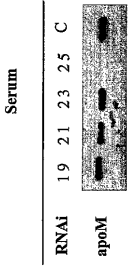
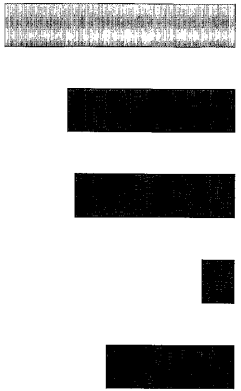


FIG. 9B

FIG. 12A

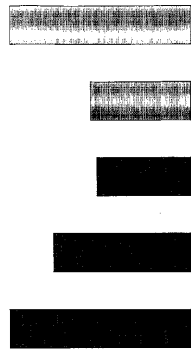
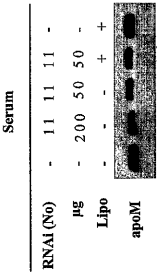
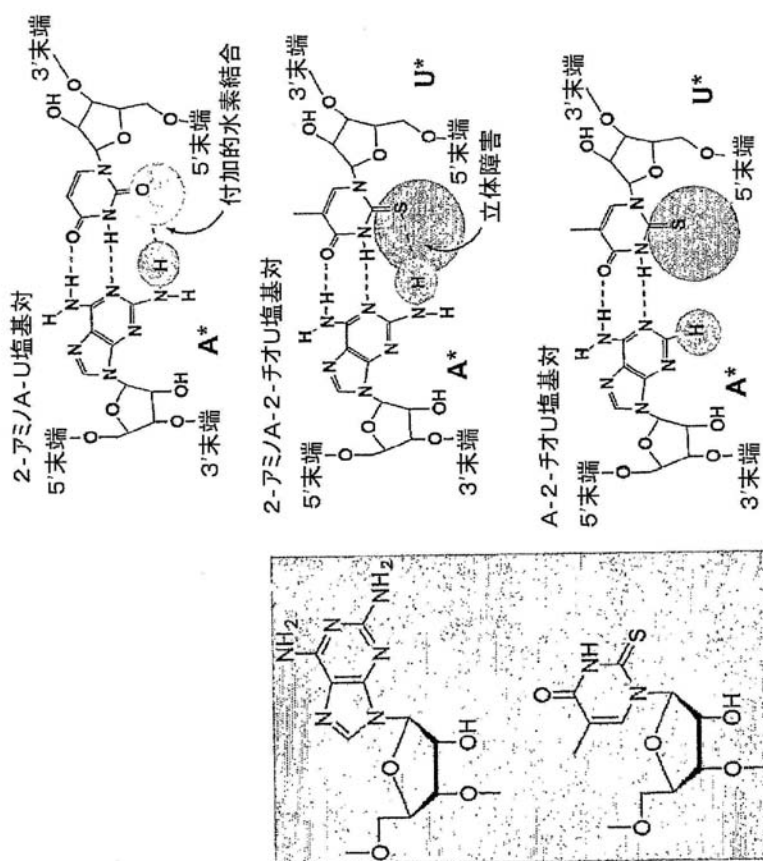


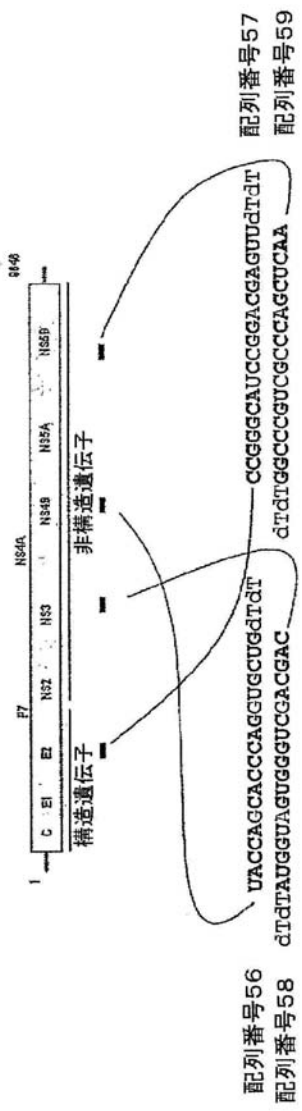
FIG. 12B



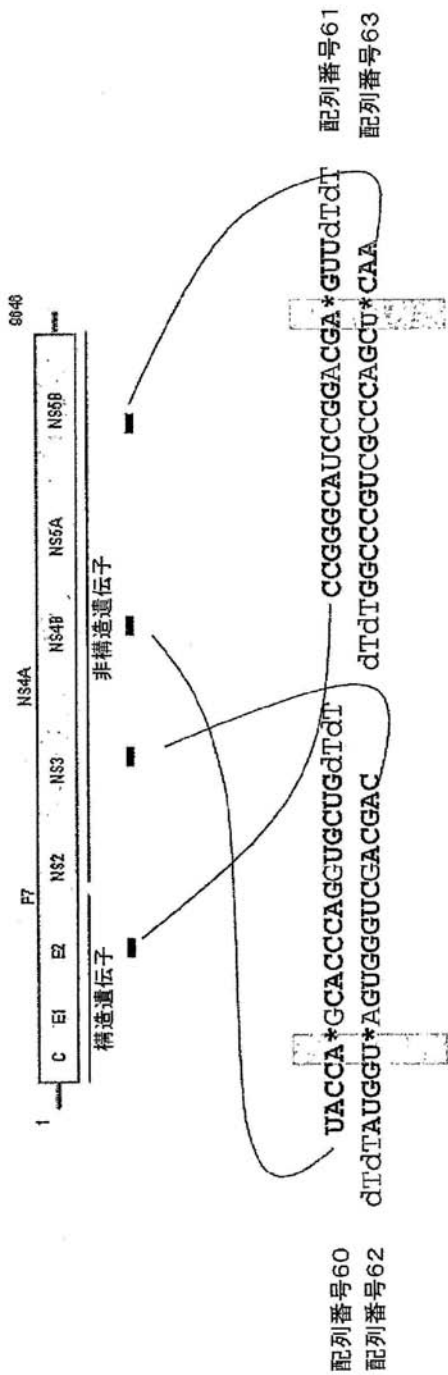
【図 1】



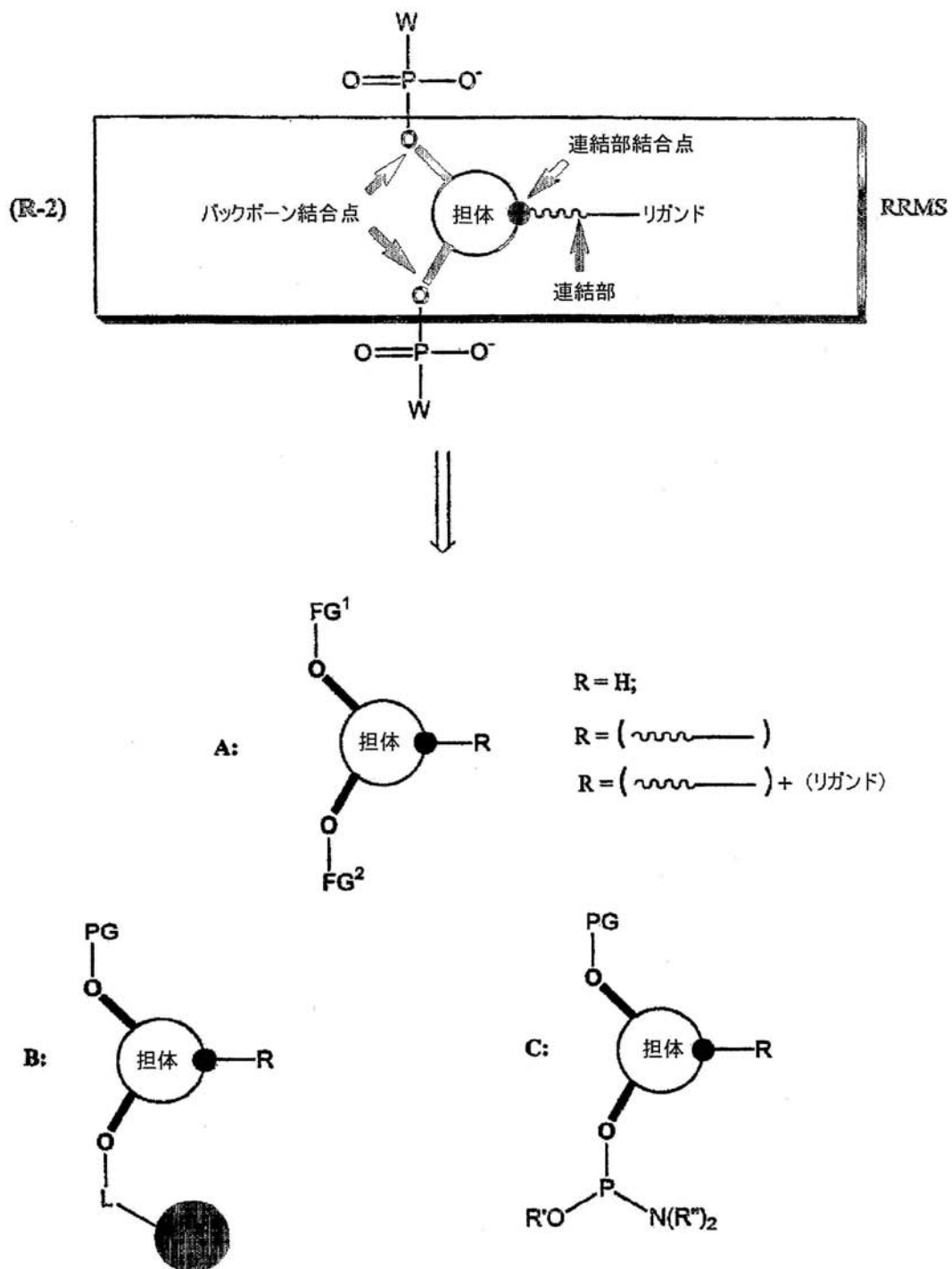
【図 2】



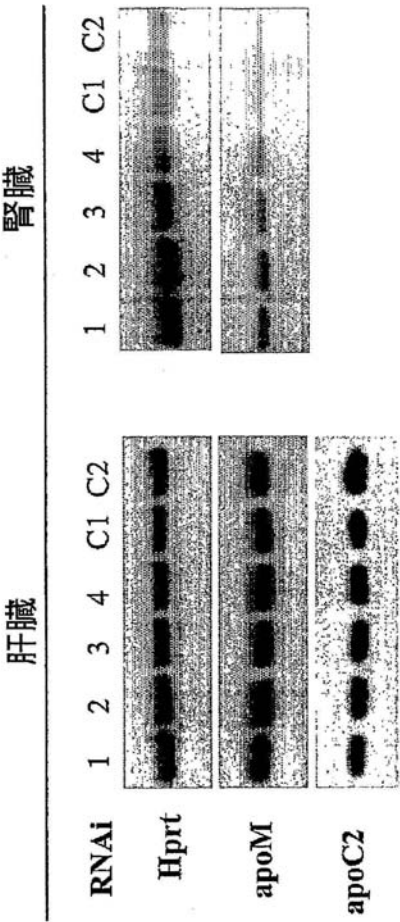
【図 3】



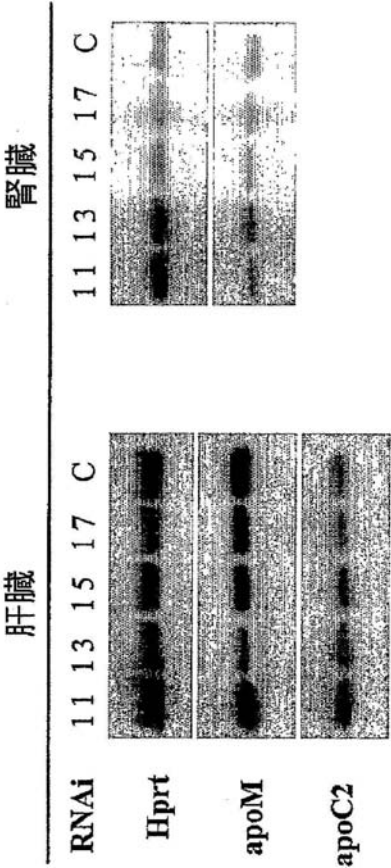
【図 4】



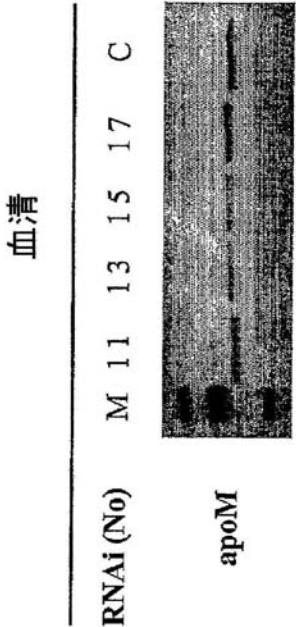
【図 7 B】



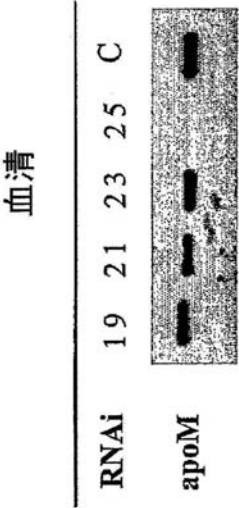
【図 9 B】



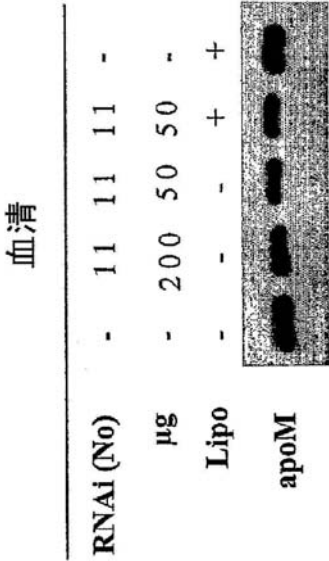
【図 10 B】



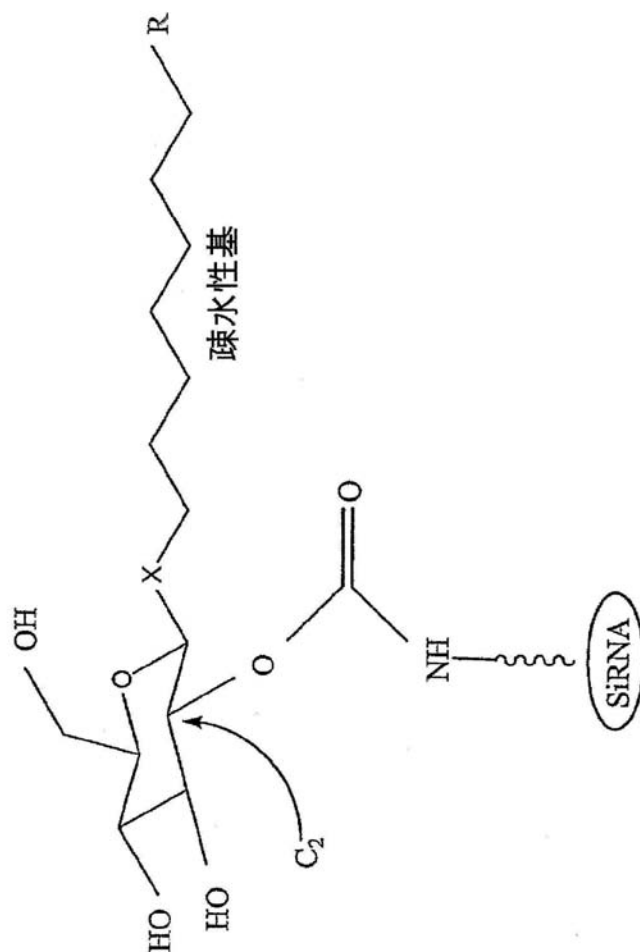
【図 1 1 B】



【図 1 2 B】



【図 1 3】



【配列表】

[2006522158000001.app](#)

【国際調査報告】

60600360274



1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/10586										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/04; A61K 48/00 US CL : 536/24.5; 514/44 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) U.S. : 536/24.5; 514/44 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, STN: RNAi, siRNA, modified siRNA, kidney												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	US 5,639,872 (ROBINSON et al.) 17 June 1997 (17.06.1997), see entire document	1-62										
Y	US 5,138,045 (COOK et al.) 11 August 1992 (11.08.1992) see entire document	1-62										
Y	HAMMOND et al. Post-Transcriptional Gene Silencing by Double-Stranded RNA Nature Genetics February 2001, Vol. 2, pages 110-119.	1-62										
Y	ELBASHIR et al. Functional Anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate The EMBO Journal 2001, Vol. 20, pages 6877-6888.	1-62										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 19 September 2005 (19.09.2005)		Date of mailing of the international search report 18 NOV 2005										
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: <i>Tracy Vivemore</i> Tracy Vivemore Telephone No. 571-272-1609 03. 4. 2006										

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 K 47/22	(2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/34	(2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A

- (31)優先権主張番号 60/465,665
 (32)優先日 平成15年4月25日(2003.4.25)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/465,802
 (32)優先日 平成15年4月25日(2003.4.25)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/469,612
 (32)優先日 平成15年5月9日(2003.5.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/493,986
 (32)優先日 平成15年8月8日(2003.8.8)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/494,597
 (32)優先日 平成15年8月11日(2003.8.11)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/503,414
 (32)優先日 平成15年9月15日(2003.9.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/506,341
 (32)優先日 平成15年9月26日(2003.9.26)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/510,246
 (32)優先日 平成15年10月9日(2003.10.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/510,318
 (32)優先日 平成15年10月10日(2003.10.10)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/518,453
 (32)優先日 平成15年11月7日(2003.11.7)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US04/07070
 (32)優先日 平成16年3月8日(2004.3.8)
 (33)優先権主張国 米国(US)

- (81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 マノハーラン、ムシア

アメリカ合衆国 0 2 4 9 3 マサチューセッツ州 ウェストン サークル ドライブ 2 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11

4C076 AA95 BB11 CC17 CC21 CC27 DD49Q DD51Q DD60Q DD67Q EE41Q

FF67 FF68

4C084 AA02 AA03 AA13 BA32 BA34 BA35 BA44 CA18 CA62 MA05

MA66 NA03 NA06 NA13 NA14 ZA812 ZB262 ZC212 ZC352

4C086 AA01 EA18 MA01 MA04 MA05 MA66 NA03 NA06 NA13 NA14

ZA81 ZB26 ZC21 ZC35