

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成22年3月25日 (2010.3.25)

【公表番号】特表2010-503382(P2010-503382A)

【公表日】平成22年2月4日 (2010.2.4)

【年通号数】公開・登録公報2010-005

【出願番号】特願2009-520964(P2009-520964)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 P 3/06 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/12 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 3/04 (2006.01)

A 6 1 P 9/06 (2006.01)

A 6 1 P 9/04 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/713

A 6 1 K 9/127

A 6 1 P 3/06

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 9/12

A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 9/10 1 0 1

A 6 1 P 9/10 1 0 3

A 6 1 P 9/06

A 6 1 P 9/04

【手続補正書】

【提出日】平成22年1月6日 (2010.1.6)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】手続補正書

【補正対象項目名】手続補正 1 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 7 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 4 7 0 】

【図 1】図 1 は、*s i N A* 分子の合成のためのスキームに関する非限定的な例を示す。相補的 *s i N A* 配列鎖である鎖 1 及び鎖 2 は、直列で合成され、固体支持体上で固相合成のために使用される開裂可能なリンカーと同一又は別異であり得る、コハク酸ヌクレオチド又は脱塩基コハク酸塩等の開裂可能な連結によって接続される。合成は、固相又は液相の何れかであり得、示されている例において、合成は固相合成である。合成は、ジメトキシトリチル基等の保護基が直列型オリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチドにおいて変化しないままであるように実施される。オリゴヌクレオチドの開裂及び脱保護の際、2 つの *s i N A* 鎖は、*s i N A* 二本鎖を形成するように自発的にハイブリダイズし、これにより、末端保護基の特性を利用することによって、例えば末端保護基を有する二本鎖 / オリゴヌクレオチドのみが単離される精製法においてトリチルを適用することによって前記二本鎖を精製できる。

【図 2】図 2 は、本発明の方法によって合成される精製された *s i N A* 二本鎖の *M A L D I - T O F* 質量スペクトルを示す。示されている 2 つのピークは、個別の *s i N A* 配列鎖の推定質量に相当する。本結果は、直列型合成から生じた *s i N A* 二本鎖が、トリチルを適用する単純な精製法を使用して、単一の実体として精製できることを示す。

【図 3】図 3 は、*R N A i* に関する標的 *R N A* 分解に関する非限定的な提唱された機序の提示を示す。外来の一本鎖 *R N A*、例えばウイルス、トランスポゾン、又は他の外因性 *R N A* から *R N A* 依存的 *R N A* ポリメラーゼ (*R d R P*) によって生じる二本鎖 *R N A* (*d s R N A*) は、ダイサー酵素を活性化し、ダイサー酵素が次に *s i N A* 二本鎖を発生させる。あるいは、合成の又は発現された *s i N A* は、適切な手段によって細胞中へ直接導入することができる。標的 *R N A* を認識する活性型 *s i N A* 複合体が形成し、*R I S C* エンドヌクレアーゼ複合体による標的 *R N A* の分解又は *R N A* 依存的 *R N A* ポリメラーゼ (*R d R P*) による更なる *R N A* の合成を生じ、これがダイサーを活性化でき、更なる *s i N A* 分子を生じ、これにより *R N A i* 反応を増幅できる。

【図 4】図 4 A ないし F は、本発明の化学的に修飾された *s i N A* コンストラクトの非限定的な例を示す。前記図において、*N* は、何れかのヌクレオチド (アデノシン、グアノシン、シトシン、ウリジン、又は場合によってチミジン) を表し、例えばチミジンは、括弧付きの (*N N*) によって指定される突出領域において置換できる。多様な修飾が、*s i N A* コンストラクトのセンス鎖及びアンチセンス鎖に関して示されている。(*N N*) ヌクレオチド位置は、本明細書に記載のとおり化学的に修飾することができ (例えば、2' - *O* - メチル、2' - デオキシ - 2' - フルオロ等)、対応する標的核酸配列から誘導され得、又は誘導されえない (例えば、図 6 C を参照されたい。)。更に、図 4 に示されている配列は、場合によって、センス鎖の 5' 末端から 9 番目の位置に又はガイド鎖の 5' 末端にある 11 個のヌクレオチド位置を計数することによってガイド鎖の 5' 末端を基礎とした 11 番目の位置にリボヌクレオチドを含み得る (図 6 C 参照)。図 4 A : センス鎖は、21 個のヌクレオチドを含み、この中で、2 つの末端の 3' ヌクレオチドは、場合によって塩基対形成され、存在する全てのヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載の他の化学的修飾を含み得る (*N N*) ヌクレオチドを除くリボヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって、3' 末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、ここで、2 つの末端の 3' ヌクレオチドは場合によって標的 *R N A* 配列と相補的であり、存在する全てのヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載されている他の化学的修飾を含み得る (*N N*) ヌクレオチドを除くリボヌクレオチドである。「*s*」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載されている他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖において (*N N*) ヌクレオチドを場合によって接続する。図 4 B : センス鎖は、21 個のヌクレオチドを含み、ここで、2 つの末端 3' ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、2' デオキシ - 2' - フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載されて

いる他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く 2' - O - メチル修飾されたヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって 3' 末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、ここ中で、2つの末端の 3'ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載の他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く 2' - O - メチル修飾されたヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載された他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、センス鎖及びアンチセンス鎖において (N N)ヌクレオチドを場合によって接続する。

図 4 C : センス鎖は、5' 末端及び 3' 末端のキャップ部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端 3'ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載の他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く 2' - O - メチル又は 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾されたヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって 3' 末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、その中で、2つの末端の 3'ヌクレオチドは、場合によって標的 RNA 配列と相補的であり、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載の他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾されたヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載の他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖において (N N)ヌクレオチドを場合によって接続する。

図 4 D : センス鎖は、5' 末端及び 3' 末端のキャップ部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、その中で、2つの末端 3'ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載の他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、2' - デオキシヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって 3' 末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、その中で、2つの末端の 3'ヌクレオチドは場合によって標的 RNA 配列と相補的であり、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載の他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く 2' - O - メチル修飾されたヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載の他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖において (N N)ヌクレオチドを場合によって接続する。

図 4 E : センス鎖は、5' 末端及び 3' 末端のキャップ部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、その中で、2つの末端 3'ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載の他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾されたヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって 3' 末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、ここ中で、2つの末端の 3'ヌクレオチドは場合によって標的 RNA 配列と相補的であり、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載されている他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く 2' - O - メチル修飾されたヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載されている他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオ

チド間連結は、アンチセンス鎖において (N N)ヌクレオチドを場合によって接続する。図4 F:センス鎖は、5'末端及び3'末端のキャップ部分を有する21個のヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端3'ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載の他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって3'末端グリセリル部分を有する21個のヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端の3'ヌクレオチドは、場合によって標的RNA配列と相補的であり、1つの3'末端ホスホロチオアートヌクレオチド間連結を有し、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載の他の化学的修飾を含み得る (N N)ヌクレオチドを除く2'デオキシヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載されている他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖において (N N)ヌクレオチドを場合によって接続する。コンストラクトAないしFのアンチセンス鎖は、本発明の何れかの標的核酸配列と相補的な配列を含む。更に、グリセリル部分(L)が、図4 AないしFに示される何れかのコンストラクトのためのアンチセンス鎖の3'末端に存在するとき、修飾されたヌクレオチド間連結は場合によって存在する。

【図5】図5 AないしFは、本発明の化学的に修飾された具体的なs i N A配列の非限定的な例を示す。AないしFは、図4 AないしFに記載されている化学的修飾をP C S K 9 s i N A核酸配列に当てはまる。このような化学的修飾は、あらゆるP C S K 9配列及び/又はP C S K 9多型に対しても適用することができる。更に、図5に示される配列は、場合によって、センス鎖の5'末端から9番目の位置に又はガイド鎖の5'末端にある11個のヌクレオチド位置を計数することによってガイド鎖の5'末端を基礎とした11番目の位置にリボヌクレオチドを含み得る(図6 C参照)。更に、図5に示されている配列は、アンチセンス鎖の5'末端の最大約4個の位置における末端リボヌクレオチド(例えば、アンチセンス鎖の5'末端での約1、2、3、又は4個の末端リボヌクレオチド)及び/又は細胞標的配列を場合によって含み得る。

【図6 A】図6 AないしCは、本発明の異なるs i N Aコンストラクトの非限定的な例を示す。図6 Aに示されている例(コンストラクト1、2、及び3)は、19個の代表的な塩基対を有するが、本発明の別の実施形態は、本明細書に記載されている塩基対の何れかの数を含む。括弧の領域は、例えば長さ約1、2、3、又は4個のヌクレオチド、好ましくは約2個のヌクレオチドを含むヌクレオチドのオーバーハングを表す。コンストラクト1及び2は、RNA干渉活性のために独立して使用できる。コンストラクト2は、生分解性リンカーとして場合によって設計できるポリヌクレオチド又は非ヌクレオチドリナーを含み得る。ある実施形態において、コンストラクト2に示されているループ構造は、インビボ及び/又はインビトロでのコンストラクト1の形成をもたらす生分解性リンカーを含み得る。別の例において、コンストラクト3は、同一原理の下でコンストラクト2を作製するために使用することが可能であり、ここで、リンカーは、インビボ及び/又はインビトロでの活性型s i N Aコンストラクト2を作製するために使用され、前記コンストラクト2は、インビボ及び/又はインビトロで活性型s i N Aコンストラクト1を作製するために、別の生分解性リンカーを場合によって利用できる。このように、s i N Aコンストラクトの安定性及び/又は活性は、インビボ又はインビトロで及び/又はインビトロで使用するためのs i N Aコンストラクトの設計に基づいて調節できる。

【図6 B】図6 Bに示されている例は、マイクロRNA等の、突出部、バルジ、ループ及び部分的な相補性から生じるステムループを含み得る、本発明の二本鎖核酸分子の異なる変動を表す。バルジ、ループ、及びステムループを有するこのようなモチーフは一般的に、マイクロRNAの特徴である。バルジ、ループ及びステムループは、本発明の二本鎖核酸分

子の1つの鎖又は両方の鎖において約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれ以上のヌクレオチドのミスマッチ又はバルジ等の部分的な相補性の何れかの程度から生じ得る。

【図6C】図6Cに示される例は、ジヌクレオチド3'突出部を有する2つの21ヌクレオチド配列の19塩基対二本鎖を含む本発明のモデルの二本鎖核酸分子を表す。上の鎖(1)は、センス鎖(パッセンジャー鎖)を表し、中間の鎖(2)は、アンチセンス(ガイド鎖)を表し、下の鎖(3)は、標的ポリヌクレオチド配列を表す。ジヌクレオチド突出部(NN)は、標的ポリヌクレオチドから誘導された配列を含み得る。例えば、ガイド鎖中の3'-(NN)配列は、標的ポリヌクレオチドの5'-[NN]配列と相補的であり得る。更に、パッセンジャー鎖の5'-(NN)配列は、標的ポリヌクレオチド配列の5'-[NN]配列と同一の配列を含み得る。他の実施形態において、突出部(NN)は、例えばガイド鎖中の3'-(NN)配列が標的ポリヌクレオチドの5'-[NN]配列と相補的ではなく、パッセンジャー鎖の5'-(NN)配列が標的ポリヌクレオチド配列の5'-[NN]配列とは異なる配列を含み得る標的ポリヌクレオチド配列からは誘導されない。更なる実施形態において、全ての(NN)ヌクレオチドは、例えば2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び/又は本明細書の他の修飾のように化学的に修飾される。更に、パッセンジャー鎖は、パッセンジャー鎖のリボヌクレオチド位置Nを含み得る。示されている代表的な19塩基対21塩基長の二本鎖に関して、位置Nは、パッセンジャー鎖の3'末端からの9個のヌクレオチドであり得る。しかしながら、異なる長さの二本鎖において、位置Nは、ガイド鎖の5'末端から11個のヌクレオチド位置を計数し、パッセンジャー鎖中の対応する塩基対形成したヌクレオチドを選ぶことによって、ガイド鎖の5'末端をベースに決定される。Ago2による開裂は、矢印によって示されるように、位置10と位置11との間で生じる。更なる実施形態において、ガイド鎖の5'末端から10個及び11個のヌクレオチド位置を計数し、パッセンジャー鎖中の相当の塩基対形成したヌクレオチドを選ぶことによって、ガイド鎖の5'末端をベースにした位置10及び位置11にある2つのリボヌクレオチドNNが存在する。

【図7】図7AないしCは、siNAヘアピン状コンストラクトを作製するための発現カセットを作製する際に利用されるスキームの図を示したものである。図7A：5'制限部位(R1)配列の後に、所定の標的配列と同一の配列を有する領域(siNAのセンス領域)が続くDNAオリゴマーが合成され、ここで、センス領域は例えば、長さ約19、20、21、又は22個のヌクレオチド(N)を含み、その後例えば約3ないし約10個のヌクレオチドを含む所定の配列(X)のループ配列が続く。図7B：次に、合成コンストラクトはDNAポリメラーゼにより伸長され、標的配列に対する特異性を有し、自己相補的なセンス領域及びアンチセンス領域を有するsiNA転写産物を生じる自己相補的配列を有するヘアピン状構造を生じる。図7C：配列を直鎖化するためにコンストラクトは(例えば約95℃に)加熱し、これにより、プライマーを使用して、相補的な第二DNA鎖を第一鎖の3'制限配列へと伸長することが可能となる。二本鎖DNAは次に、細胞中での発現のために適切なベクター中に挿入される。コンストラクトは、3'末端ヌクレオチド突出部が、例えば制限部位を設計すること及び/又はPaul et al., 2002, Nature Biotechnology, 29, 505-508に記載されているとおりポリU末端領域を利用することによって転写から生じるように設計できる。

【図8】図8AないしCは、二本鎖siNAコンストラクトを作製するための発現カセットを作製する際に利用されるスキームの図を示したものである。図8A：5'制限(R1)部位配列の後に、所定の標的配列と同一の配列を有する領域(siNAのセンス領域)が続くDNAオリゴマーが合成され、ここでセンス領域は例えば、長さ約19、20、21、又は22個のヌクレオチド(N)を含み、その後規定された配列(X)のループ配列に隣接する3'制限部位(R2)が続く。図8B：次に、合成コンストラクトがDNAポリメラーゼによって伸長され、自己相補的配列を有するヘアピン状構造を生じる。

図8C：コンストラクトは、R1及びR2に特異的な制限酵素によって加工され、二本

鎖DNAを生じ、次に、前記DNAが細胞中での発現のために適切なベクター中に挿入される。転写カセットは、U6プロモーター領域が、siNAの個別のセンス鎖及びアンチセンス鎖を生じる二本鎖DNAの各側と隣接するように設計される。ポリT末端配列は、前記コンストラクトへ付加でき、得られた転写産物中にU字型突出部を生じ得る。

【図9】図9AないしEは、メッセンジャーRNA等の特定の標的核酸配列内でsiNAにより媒介されたRNA干渉のための標的部位を決定するために使用される方法の図を示したものである。図9A：siNAオリゴヌクレオチドのプールが合成され、ここで、siNAコンストラクトのアンチセンス領域は、標的核酸配列にわたって標的部位との相補性を有し、センス領域は、siNAのアンチセンス領域との配列相補性を含む。図9BからC：(図9B)配列はプールされ、細胞中へのベクターの形質移入がsiNAの発現を生じる(図9C)ように、ベクター中へと挿入される。図9D：細胞は、標的核酸配列の調節に関連した表現型の変化に基づいて選択される。図9E：siNAは、選択された細胞から単離され、標的核酸配列内での有効な標的部位を同定するために配列決定される。

【図10】図10は、例えば、(1)[3-3']逆方向デオキシリボース、(2)デオキシリボヌクレオチド、(3)[5'-3']-3'-デオキシリボヌクレオチド、(4)[5'-3']-リボヌクレオチド、(5)[5'-3']-3'-O-メチルリボヌクレオチド、(6)3'-グリセリル、(7)[3'-5']-3'-デオキシリボヌクレオチド、(8)[3'-3']-デオキシリボヌクレオチド、(9)[5'-2']-デオキシリボヌクレオチド、及び(10)[5-3']-ジデオキシリボヌクレオチドを含む、本発明のsiNA配列の3'末端を安定化させるために使用できる異なる安定化化学反応(1ないし10)の非限定的な例を示す。図に示されている修飾された及び修飾されていない主鎖の化学反応に加え、これらの化学反応は、本明細書に記載の異なる主鎖の修飾、例えば式Iを有する主鎖修飾と組み合わせられ得る。更に、示されている5'から示された末端の修飾までの2'-デオキシヌクレオチドは、本明細書に記載の、修飾された又は修飾されていない別のヌクレオチド又は非ヌクレオチドであり得、例えば式IないしVIIの何れか又はその何れかの組み合わせを有する修飾であり得る。

【図11】図11は、RNA干渉活性を媒介する能力を保存しながら、ヌクレアーゼ耐性を有する本発明の化学的に修飾されたsiNAコンストラクトを同定するために使用される戦略の非限定的な例を示す。化学的修飾は、教育された設計因子(例えば、2'-修飾を導入すること、塩基修飾、主鎖修飾、末端キャップ修飾等)をベースにしたsiNAコンストラクト中へ導入される。修飾したコンストラクトは、適切な系(例えば、示されているヌクレアーゼ耐性のためのヒト血清、又はPK/送達因子のための動物モデル)において検査される。並行して、siNAコンストラクトは、例えばルシフェラーゼリポーターアッセイ等の細胞培養系においてRNA干渉活性に関して検査される。次に、RNA干渉活性を維持しながら特定の特徴を有する先導siNAコンストラクトが同定され、更に修飾することができ、もう一度アッセイできる。この同一アプローチは、改善された薬物動態学的特性、送達、及びRNA干渉活性を有するsiNA-抱合体分子を同定するのに使用できる。

【図12】図12は、直鎖及び二本鎖コンストラクト及びその非対称性誘導体を含む、本発明のリン酸化されたsiNA分子の非限定的な例を示す。

【図13】図13は、本発明の化学的に修飾された末端リン酸基の非限定的な例を示す。

【図14A】図14Aは、標的核酸配列中に同定された回文構造核酸配列及び/又は反復核酸配列を利用する自己相補的なDFOコンストラクトを設計するのに使用される方法論の非限定的な例を示している。(i)回文構造配列又は反復配列は、核酸標的配列中で同定される。(ii)標的核酸配列及び回文構造配列と相補的な配列が設計される。(iii)相補的な配列の非回文構造部分/反復部分の逆方向の反復配列が、相補的な配列の3'末端に付加され、核酸標的と相補的な配列を含む自己相補的DFO分子を生じる。(iv)DFO分子は、自己重合して二本鎖オリゴヌクレオチドを形成できる。

【図14B】図14Bは、二本鎖を形成するオリゴヌクレオチド配列に関する非限定的な

代表例を示す。

【図 1 4 C】図 1 4 C は、二本鎖を形成する代表的なオリゴヌクレオチド配列の自己重合模式図の非限定的な例を示す。

【図 1 4 D】図 1 4 D は、二本鎖を形成する代表的なオリゴヌクレオチド配列の模式的な自己重合の後の、遺伝子発現の調節を生じる標的核酸配列との相互作用に関する非限定的な例を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、目的の何れかの標的核酸配列と相補的な配列を有する D F O コンストラクト中へ組み込まれる回文構造核酸配列及び / 又は反復核酸配列を利用する自己相補的な D F O コンストラクトのデザインに関する非限定的な例を示す。これらの回文構造配列 / 反復配列の組み込みによって、各鎖が、例えば R N A 干渉による標的遺伝子発現の調節を仲介できる二本鎖を、D F O コンストラクトのデザインが形成できる。第一に、標的配列が同定される。次に、相補的な配列が生じ、その中で、(X 又は Y として示される) ヌクレオチド又は非ヌクレオチド修飾が、(図中で X Y X Y X Y として示される) 人工的な回文構造を生じる相補的な配列中に導入される。非回文構造 / 反復相補的配列の逆方向の反復は、相補的な配列の 3 ' 末端へ付加され、核酸標的と相補的な配列を含む自己相補的な D F O を生じる。D F O は、自己重合して二本鎖オリゴヌクレオチドを形成できる。

【図 1 6】図 1 6 は、異なる標的核酸配列の R N A 干渉によって誘導される開裂を各々媒介することができる 2 つの個別のポリヌクレオチド配列を含む、本発明の多機能性 s i N A 分子の非限定的な例を示す。図 1 6 A は、第一標的核酸配列と相補的な第一領域 (相補性領域 1) 及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域 (相補性領域 2) を有する多機能性 s i N A 分子の非限定的な例を示し、ここで、第一及び第二相補性領域は、多機能性 s i N A 中の各ポリヌクレオチド配列の 3 ' 末端に配置されている。多機能性 s i N A コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、s i N A 二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。図 1 6 B は、第一標的核酸配列と相補的な第一領域 (相補性領域 1) 及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域 (相補性領域 2) を有する多機能性 s i N A 分子の非限定的な例を示し、ここで、第一及び第二相補性領域は、多機能性 s i N A 中の各ポリヌクレオチド配列の 5 ' 末端に配置される。多機能性 s i N A コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、s i N A 二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。

【図 1 7】図 1 7 は、異なる標的核酸配列の R N A 干渉によって誘導される開裂を各々媒介することができる別個の領域を含む単一ポリヌクレオチド配列を含む、本発明の多機能性 s i N A 分子の非限定的な例を示す。図 1 7 A は、第一標的核酸配列と相補的な第一領域 (相補性領域 1) 及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域 (相補性領域 2) を有する多機能性 s i N A 分子の非限定的な例を示し、ここで、第二相補性領域は、多機能性 s i N A 中のポリヌクレオチド配列の 3 ' 末端に配置されている。多機能性 s i N A コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、s i N A 二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。図 1 7 B は、第一標的核酸配列と相補的な第一領域 (相補性領域 1) 及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域 (相補性領域 2) を有する多機能性 s i N A 分子の非限定的な例を示し、ここで、第一相補性領域は、多機能性 s i N A 中のポリヌクレオチド配列の 5 ' 末端に配置される。多機能性 s i N A コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、s i N A 二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。ある実施形態において、これらの多機能性 s i N A コンストラクトは、インビボ又はインビトロで加工され、図 1 6 に示されているような多機能性 s i N A コンストラクトを生じる。

【図 1 8】図 1 8 は、異なる標的核酸配列の R N A 干渉によって誘導された開裂を各々媒介することができる 2 つの個別のポリヌクレオチド配列を含む、本発明の多機能性 s i N A 分子の非限定的な例を示し、ここで、多機能性 s i N A コンストラクトは更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含み、従って、より短い二機能性 s i N A コンストラクトが、異なる標的核酸配列に対する R N A 干渉を媒介することができる。図 1 8 A は、第一標的核酸配列と相補的な第一領域 (相補性領域 1) 及び第二標的核酸配列と

相補的な第二領域（相補性領域 2）を有する多機能性 *s i N A* 分子の非限定的な例を示し、ここで、第一及び第二相補性領域は、多機能性 *s i N A* 中の各ポリヌクレオチド配列の 3' 末端に配置されており、第一及び第二相補性領域は更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含む。多機能性 *s i N A* コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、*s i N A* 二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。図 18 B は、第一標的核酸配列と相補的な第一領域（相補性領域 1）及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域（相補性領域 2）を有する多機能性 *s i N A* 分子の非限定的な例を示し、ここで、第一及び第二相補性領域は、多機能性 *s i N A* 中の各ポリヌクレオチド配列の 5' 末端に配置され、第一及び第二相補性領域は更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含む。多機能性 *s i N A* コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、*s i N A* 二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性を有しない。

【図 19】図 19 は、異なる標的核酸配列の *R N A* 干渉によって誘導された開裂を各々媒介することができる別個の領域を含む単一ポリヌクレオチド配列を含む、本発明の多機能性 *s i N A* 分子の非限定的な例を示し、ここで、多機能性 *s i N A* コンストラクトは更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含み、従って、より短い二機能性 *s i N A* コンストラクトが、異なる標的核酸配列に対する *R N A* 干渉を媒介することができる。図 19 A は、第一標的核酸配列と相補的な第一領域（相補性領域 1）及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域（相補性領域 2）を有する多機能性 *s i N A* 分子の非限定的な例を示し、ここで、第二相補性領域は、多機能性 *s i N A* 中のポリヌクレオチド配列の 3' 末端に配置され、第一及び第二相補性領域は更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含む。多機能性 *s i N A* コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、*s i N A* 二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。図 19 B は、第一標的核酸配列と相補的な第一領域（相補性領域 1）及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域（相補性領域 2）を有する多機能性 *s i N A* 分子の非限定的な例を示し、ここで、第一相補性領域は、多機能性 *s i N A* 中のポリヌクレオチド配列の 5' 末端に配置され、第一及び第二相補性領域は更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含む。多機能性 *s i N A* コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、*s i N A* 二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。ある実施形態において、これらの多機能性 *s i N A* コンストラクトは、インビボ又はインビトロで加工され、図 18 に示されるような多機能性 *s i N A* コンストラクトを生じる。

【図 20】図 20 は、本発明の多機能性 *s i N A* 分子が、異なるタンパク質（例えば、本明細書の P C S K 9 標的の何れか）、例えばサイトカイン及びその対応する受容体、異なるウイルス系、ウイルス感染又は複製に関与するウイルス及び細胞内タンパク質、又は疾病の進行の持続に関与する共通の又は異なる生物学的経路に関与する異なるタンパク質をコードする個別の *R N A* 分子等の、2 つの個別の標的核酸分子をどのように標的化できるかに関する非限定的な例を示す。多機能性 *s i N A* コンストラクトの各鎖は、個別の標的核酸分子との相補性を有する領域を含む。多機能性 *s i N A* 分子は、*s i N A* の各鎖が *R I S C* によって利用され、その対応する標的の *R N A* 干渉によって媒介される開裂を開始できるように設計される。これらのデザイン因子は、*s i N A* コンストラクトの各末端の脱安定化を含み得る（例えば、Schwarz et al., 2003, Cell, 115, 199 - 208 を参照されたい。）。このような脱安定化は、例えばグアノシン-シチジン塩基対、代替的な塩基対（例えば、ゆらぎ）を使用することによって、又は本分野で公知のように末端ヌクレオチドの位置で化学的に修飾されたヌクレオチドを脱安定化することによって達成できる。

【図 21】図 21 は、本発明の多機能性 *s i N A* 分子が、*R N A* の別のコード領域、*R N A* のコード及び非コード領域、又は *R N A* の選択的スプライシング変異体領域等の、同一標的核酸分子内の 2 つの個別の標的核酸配列を標的化する方法に関する非限定的な例を示す。多機能性 *s i N A* コンストラクトの各鎖は、標的核酸分子の個別の領域との相補性を

有する領域を含む。多機能性 *s i N A* 分子は、*s i N A* の各鎖が *R N A* 誘導サイレンシング複合体によって利用され、その相当する標的領域の *R N A* 干渉により媒介される開裂を開始できるように設計される。これらのデザイン因子は、*s i N A* コンストラクトの各末端の脱安定化を含み得る（例えば、Schwarz et al., 2003, Cell, 115, 199-208 を参照されたい。）。このような脱安定化は、例えばグアノシン-シチジン塩基対、代替的な塩基対（例えば、ゆらぎ）を使用することによって、又は本分野で公知のように末端ヌクレオチドの位置で化学的に修飾されたヌクレオチドを脱安定化することによって達成できる。

【図 2 2 A - D】図 2 2 (A ないし H) は、本発明の繋ぎ止められた多機能性 *s i N A* コンストラクトの非限定的な例を示す。示されている例において、リンカー（例えば、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドリンカー）は、2 つの *s i N A* 領域（例えば、2 つのセンス領域、2 つのアンチセンス領域、あるいは 1 つのセンス領域及び 1 つのアンチセンス領域の両者）を接続する。第一標的配列及び第二標的配列に対応する個別のセンス（又はセンス及びアンチセンス）配列は、多機能性 *s i N A* 中のそれらの対応するセンス及び / 又はアンチセンス配列とハイブリダイズする。更に、多様な抱合体、リガンド、アプタマー、ポリマー又はリポーター分子は、選択的な又は改善された送達特性及び / 又は薬物動態学的特性のためのリンカー領域へ結合することができる。

【図 2 2 E - H】図 2 2 (A ないし H) は、本発明の繋ぎ止められた多機能性 *s i N A* コンストラクトの非限定的な例を示す。示されている例において、リンカー（例えば、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドリンカー）は、2 つの *s i N A* 領域（例えば、2 つのセンス領域、2 つのアンチセンス領域、あるいは 1 つのセンス領域及び 1 つのアンチセンス領域の両者）を接続する。第一標的配列及び第二標的配列に対応する個別のセンス（又はセンス及びアンチセンス）配列は、多機能性 *s i N A* 中のそれらの対応するセンス及び / 又はアンチセンス配列とハイブリダイズする。更に、多様な抱合体、リガンド、アプタマー、ポリマー又はリポーター分子は、選択的な又は改善された送達特性及び / 又は薬物動態学的特性のためのリンカー領域へ結合することができる。

【図 2 3】図 2 3 は、多様なデンドリマーベースの多機能性 *s i N A* デザインの非限定的な例を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、超分子の多様な多機能性 *s i N A* デザインの非限定的な例を示す。

【図 2 5】図 2 5 は、30ヌクレオチドの前駆体の *s i N A* コンストラクトを使用するダイサーにより可能となった多機能性 *s i N A* デザインの非限定的な例を示す。30塩基対の二本鎖は、ダイサーによって何れかの末端から22塩基対及び8塩基対の産物へと開裂される（8塩基対断片は示されていない。）。表示を簡単にするため、ダイサーによって生成された突出部は示されていないが、補うことができる。3つの標的化配列が示されている。必要とされる重なった配列同一性は、灰色の箱型によって示されている。親の30塩基対の *s i N A* の N は、これが安定化した化学反応において検査される場合、ダイサー開裂を可能にする 2' - OH 位置の示唆される部位である。ダイサー *R N a s e I I I* による30塩基長二本鎖の加工は、正確な22 + 8開裂を付与しないが、むしろ、密接に関連する一連の産物を生じる（22 + 8が一次的な部位である。）ことに留意されたい。それゆえ、ダイサーによる加工は、一連の活性型 *s i N A* を生じる。

【図 2 6】図 2 6 は、40ヌクレオチドの前駆体の *s i N A* コンストラクトを使用するダイサーにより可能となった多機能性 *s i N A* デザインの非限定的な例を示す。40塩基対の二本鎖は、ダイサーによって何れかの末端から20塩基対の産物へと開裂される。表示を簡単にするために、ダイサーによって生じたオーバーハングは示されていないが、補うことが可能である。4つの標的化配列が示されている。相同性を有する標的配列は、箱型によって囲まれている。このデザインフォーマットは、より大きな *R N A* へと拡張できる。化学的に安定化された *s i N A* がダイサーによって結合される場合、戦略的に配置されたりボヌクレオチド結合によって、多機能性デザインのより大規模なレパートリーを可能とするデザイナー開裂産物が可能となる。例えば、約22ヌクレオチドのダイサー標準物質に限定されない開裂産物によって、例えば約3ないし約15のヌクレオチドに及ぶ標的

配列同一性重複を有する多機能性 *siNA* コンストラクトが可能となる。

【図 27】図 27 は、本発明の更なる多機能性 *siNA* コンストラクトデザインの非限定的な例を示す。ある実施形態において、抱合体、リガンド、アプタマー、標識又は他の部分が、多機能性 *siNA* の一領域へ結合し、送達特性又は薬物動態学的特性を改善することができる。

【図 28】図 28 は、本発明の更なる多機能性 *siNA* コンストラクトデザインの非限定的な例を示す。ある実施形態において、抱合体、リガンド、アプタマー、標識又は他の部分が、多機能性 *siNA* の一領域へ結合し、送達特性又は薬物動態学的特性を改善することができる。

【図 29】図 29 は、本発明のコレステロールによって抱合された *siNA* 分子を合成するために使用できるコレステロールにより連結されたホスホラミダイトの非限定的な例を示す。コレステロール部分が *siNA* 分子のセンス鎖の 5' 末端へ連結された例が示されている。

【図 30】図 30 は、PCSK9 を安定に発現している細胞及び対照細胞株中での PCSK9 サイレンシングのウェスタンブロット分析の非限定的な例を示す。

【図 31】図 31 は、対照細胞株及び PCSK9 発現細胞株による diI-LDL 取り込み（蛍光標識された LDL 粒子）の非限定的な例を示す。

【図 32】図 32 は、Hepa1 から 6 細胞中での PCSK9 shRNA プラスミドのインビトロスクリーニングの非限定的な例を示す。

【図 33】図 33 は、Hepa1 から 6 細胞中でのマウス PCSK9 の Ad-PCSK9 shRNA 媒介性ノックダウンを確認するデータの非限定的な例を示す。

【図 34】図 34 A は、C57BL/6 マウスの肝臓中でのアデノウイルスによって媒介される PCSK9 の阻害の非限定的な例を示している。図 34 B は、血漿 LDL レベルに対する肝臓ノックダウンの非限定的な例を示している。

【図 35】図 35 は、体重に対する PCSK9 の肝臓ノックダウンの非限定的な例を示している。