

(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2006-512906
(P2006-512906A)

(43) 公表日 平成18年4月20日(2006.4.20)

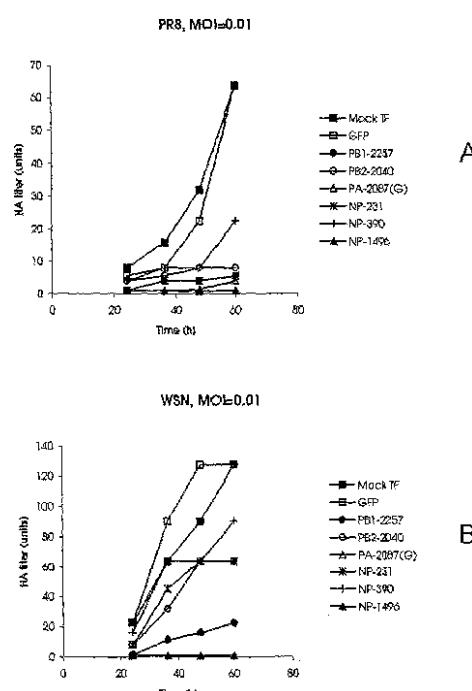
| (51) Int.C1. | F 1 | テーマコード (参考) |
|--|---------------------|-------------------|
| C 12 N 15/09 (2006.01) | C 12 N 15/00 | Z N A A 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 31/7105 (2006.01) | A 6 1 K 31/7105 | 4 B 0 6 3 |
| A 6 1 P 31/00 (2006.01) | A 6 1 P 31/00 | 4 B 0 6 5 |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 P 11/00 (2006.01) | A 6 1 P 11/00 | 4 C 0 8 4 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 143 頁) 最終頁に続く | | |
| (21) 出願番号 特願2004-540017 (P2004-540017) | (71) 出願人 504350142 | |
| (86) (22) 出願日 平成15年9月29日 (2003.9.29) | マサチューセッツ インスティチュート | |
| (85) 翻訳文提出日 平成17年5月25日 (2005.5.25) | オブ テクノロジー | |
| (86) 國際出願番号 PCT/US2003/030502 | アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 | |
| (87) 國際公開番号 WO2004/028471 | 142-1493, ケンブリッジ, フ | |
| (87) 國際公開日 平成16年4月8日 (2004.4.8) | アイブ ケンブリッジ センター | |
| (31) 優先権主張番号 60/414,457 | (74) 代理人 100078282 | |
| (32) 優先日 平成14年9月28日 (2002.9.28) | 弁理士 山本 秀策 | |
| (33) 優先権主張国 米国(US) | (74) 代理人 100062409 | |
| (31) 優先権主張番号 60/446,377 | 弁理士 安村 高明 | |
| (32) 優先日 平成15年2月10日 (2003.2.10) | (74) 代理人 100113413 | |
| (33) 優先権主張国 米国(US) | 弁理士 森下 夏樹 | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インフルエンザ治療剤

(57) 【要約】

本発明は、RNA干渉(RNAi)現象に基づいたインフルエンザ感染および/または複製のための方法および組成物ならびにインフルエンザウイルスの阻害のための有効なsiRNAおよびshRNAを同定するためのシステムおよびインフルエンザウイルス感染のメカニズムを研究するためのシステムを提供する。本発明はまた、他の感染性因子、特に体外から直接接近可能な細胞(例えば、皮膚細胞または粘膜細胞)に感染する感染性因子の感染、病原性、および/または複製の阻害のための方法および組成物を提供する。さらに、本発明は、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされたRNAi誘導性物質(例えば、siRNA、shRNA、またはRNAi誘導性ベクター)および任意の種々の送達因子を含む組成物を提供する。本発明は、さらに、インフルエンザ治療のための組成物の使用方法を含む。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的転写物にターゲティングされる s i R N A または s h R N A を含む組成物であって、該標的転写物が薬剤特異的転写物であり、該転写物が感染性因子による感染または複製に関与する、組成物。

【請求項 2】

前記感染性因子が、そのゲノムが複数の独立した核酸分子を含む因子である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記核酸分子が R N A である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 R N A 分子が一本鎖である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記感染性因子の複数の変異型が存在し、該因子が遺伝子再集合を受けることができる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記感染性因子の複数の変異型が存在し、前記 s i R N A または s h R N A が、そのアンチセンス鎖またはアンチセンス部分が標的 m R N A の一部と完全に相補的である二重鎖領域を含み、該部分が少なくとも 10 ヌクレオチド長であり、複数の変異型の間で高度に保存されている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記感染性因子の複数の変異型が存在し、前記 s i R N A または s h R N A が、そのアンチセンス鎖またはアンチセンス部分が標的 m R N A の一部と完全に相補的である二重鎖領域を含み、該部分が少なくとも 12 ヌクレオチド長であり、複数の変異型の間で高度に保存されている、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記感染性因子の複数の変異型が存在し、前記 s i R N A または s h R N A が、そのアンチセンス鎖またはアンチセンス部分が標的 m R N A の一部と完全に相補的である二重鎖領域を含み、該部分が少なくとも 15 ヌクレオチド長であり、複数の変異型の間で高度に保存されている、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記感染性因子の複数の変異型が存在し、前記 s i R N A または s h R N A が、そのアンチセンス鎖またはアンチセンス部分が標的 m R N A の一部と完全に相補的である二重鎖領域を含み、該部分が少なくとも 17 ヌクレオチド長であり、複数の変異型の間で高度に保存されている、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記感染性因子の複数の変異型が存在し、前記 s i R N A または s h R N A が、そのアンチセンス鎖またはアンチセンス部分が標的 m R N A の一部と完全に相補的である二重鎖領域を含み、該部分が少なくとも 19 ヌクレオチド長であり、複数の変異型の間で高度に保存されている、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 11】

異なる変異型の間で同一である場合に変異型間で一部分が高度に保存されている、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 12】

異なる変異型の間で多くとも 1 つのヌクレオチドが異なる場合に変異型間で一部分が高度に保存されている、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 13】

異なる変異型の間で多くとも 2 つのヌクレオチドが異なる場合に変異型間で一部分が高度に保存されている、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

少なくとも 5 個の変異型の間で前記部分が高度に保存されている、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 15】

少なくとも 10 個の変異型の間で前記部分が高度に保存されている、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 16】

少なくとも 15 個の変異型の間で前記部分が高度に保存されている、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 17】

少なくとも 20 個の変異型の間で前記部分が高度に保存されている、請求項 8 に記載の組成物。 10

【請求項 18】

前記感染性因子が気道上皮細胞に感染する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記感染性因子がインフルエンザウイルスである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記インフルエンザウイルスがインフルエンザ A ウィルスである、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記インフルエンザウイルスがインフルエンザ B ウィルスである、請求項 19 に記載の組成物。 20

【請求項 22】

前記感染性因子が宿主細胞 mRNA 翻訳を阻害する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記感染性因子が宿主細胞に感染し、前記 siRNA または shRNA が該宿主細胞による前記因子の産生を少なくとも約 2 倍阻害するのに十分なレベルで存在する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記感染性因子が宿主細胞に感染し、前記 siRNA または shRNA が該宿主細胞による前記因子の産生を少なくとも約 5 倍阻害するのに十分なレベルで存在する、請求項 1 に記載の組成物。 30

【請求項 25】

前記感染性因子が宿主細胞に感染し、前記 siRNA または shRNA が該宿主細胞による前記因子の産生を少なくとも約 10 倍阻害するのに十分なレベルで存在する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記感染性因子が宿主細胞に感染し、前記 siRNA または shRNA が該宿主細胞による前記因子の産生を少なくとも約 50 倍阻害するのに十分なレベルで存在する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記感染性因子が宿主細胞に感染し、前記 siRNA または shRNA が該宿主細胞による前記因子の産生を少なくとも約 100 倍阻害するのに十分なレベルで存在する、請求項 1 に記載の組成物。 40

【請求項 28】

前記感染性因子が宿主細胞に感染し、前記 siRNA または shRNA が該宿主細胞による前記因子の産生を少なくとも約 200 倍阻害するのに十分なレベルで存在する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記標的転写物がウイルス RNA ポリメラーゼのサブユニットをコードする、請求項 1 に記載の組成物。 50

【請求項 3 0】

前記標的転写物が血球凝集素またはノイラミニダーゼをコードする、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記感染性因子がインフルエンザウイルスであり、前記標的転写物が、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、膜タンパク質1、膜タンパク質2、非構造タンパク質1、非構造タンパク質2、ポリメラーゼタンパク質P B 1、ポリメラーゼタンパク質P B 2、ポリメラーゼタンパク質P A、ポリメラーゼタンパク質N P からなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記s i R N A またはs h R N A が前記感染性因子の複製を阻害するのに十分なレベルで存在する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記s i R N A またはs h R N A が少なくとも15ヌクレオチド長の塩基対合領域を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記s i R N A またはs h R N A が約19ヌクレオチド長の塩基対合領域を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記s i R N A またはs h R N A が少なくとも15ヌクレオチド長の塩基対合領域および少なくとも1つの一本鎖3プライム突出部を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記s i R N A またはs h R N A が前記標的転写物の一領域と完全に相補的な部分を含み、該部分が少なくとも15ヌクレオチド長である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記s i R N A またはs h R N A が多くとも1つのヌクレオチド以外は前記標的転写物の一領域と完全に相補的な部分を含み、該部分が少なくとも15ヌクレオチド長である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記s i R N A またはs h R N A が多くとも2つのヌクレオチド以外は前記標的転写物の一領域と完全に相補的な部分を含み、該部分が少なくとも15ヌクレオチド長である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記s i R N A またはs h R N A がコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも10個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記s i R N A またはs h R N A がコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも12個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記s i R N A またはs h R N A がコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも15個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記s i R N A またはs h R N A がコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも17個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記s i R N A またはs h R N A がコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス

10

20

30

40

50

鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも19個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項44】

前記s i RNAまたはs h RNAがコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも10個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該10個連続するヌクレオチドのうちの1つまたは2つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項1に記載の組成物。

【請求項45】

前記s i RNAまたはs h RNAがコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも12個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該12個連続するヌクレオチドのうちの1つまたは2つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項1に記載の組成物。

【請求項46】

前記s i RNAまたはs h RNAがコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも15個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該15個連続するヌクレオチドのうちの1つまたは2つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項1に記載の組成物。

【請求項47】

前記s i RNAまたはs h RNAがコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも17個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該17個連続するヌクレオチドのうちの1つまたは2つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項1に記載の組成物。

【請求項48】

前記s i RNAまたはs h RNAがコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号1～68のいずれかに記載の配列のヌクレオチド3～21に記載の少なくとも19個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該19個連続するヌクレオチドのうちの1つまたは2つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項1に記載の組成物。

【請求項49】

前記s i RNAまたはs h RNAがコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または268のいずれかに記載の配列のヌクレオチド1～19に記載の少なくとも10個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項50】

前記s i RNAまたはs h RNAがコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または268のいずれかに記載の配列のヌクレオチド1～19に記載の少なくとも12個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項51】

前記s i RNAまたはs h RNAがコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス

10

20

30

40

50

鎖または一部の配列が配列番号 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または268のいずれかに記載の配列のヌクレオチド1～19に記載の少なくとも15個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項52】

前記 siRNA または shRNA がコア二重鎖領域を含み、該コア二重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または268のいずれかに記載の配列のヌクレオチド1～19に記載の少なくとも17個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。
10

【請求項53】

前記 siRNA または shRNA がコア二重鎖領域を含み、該コア二重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または268のいずれかに記載の配列のヌクレオチド1～19に記載の少なくとも19個連続するヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。
20

【請求項54】

前記 siRNA または shRNA がコア二重鎖領域を含み、該コア二重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または268のいずれかに記載の配列のヌクレオチド1～19に記載の少なくとも10個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該10個連続するヌクレオチドのうちの1つまたは2つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項1に記載の組成物。
30

【請求項55】

前記 siRNA または shRNA がコア二重鎖領域を含み、該コア二重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または268のいずれかに記載の配列のヌクレオチド1～19に記載の少なくとも12個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該12個連続するヌクレオチドのうちの1つまたは2つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項1に記載の組成物。
40

【請求項56】

前記 siRNA または shRNA がコア二重鎖領域を含み、該コア二重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または268のいずれかに記載の配列のヌクレオチド1～19に記載の少なくとも15個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該15個連続するヌクレ
50

オチドのうちの 1 つまたは 2 つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5 7】

前記 s i R N A または s h R N A がコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または 268 のいずれかに記載の配列のヌクレオチド 1 ~ 19 に記載の少なくとも 17 個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該 17 個連続するヌクレオチドのうちの 1 つまたは 2 つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5 8】

前記 s i R N A または s h R N A がコアニ重鎖領域を含み、該コアニ重鎖領域のセンス鎖または一部の配列が配列番号 190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、252、254、256、258、260、262、264、266、または 268 のいずれかに記載の配列のヌクレオチド 1 ~ 19 に記載の少なくとも 19 個連続するヌクレオチドを含むが、ただし、該 19 個連続するヌクレオチドのうちの 1 つまたは 2 つのヌクレオチドが該配列と異なり得る、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5 9】

前記 s i R N A または s h R N A が、センス鎖およびアンチセンス鎖またはその一部を含み、該部分の配列がそれぞれ配列番号 77 および 78 のヌクレオチド 1 ~ 19 に記載の配列を含み、必要に応じて一方または両方の配列に 3' 突出部を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6 0】

前記 s i R N A または s h R N A が、センスおよびアンチセンスの一部を含み、該部分の配列がそれぞれ配列番号 71 および 72 のヌクレオチド 1 ~ 19 に記載の配列を含み、必要に応じて一方または両方の配列に 3' 突出部を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6 1】

前記 s i R N A または s h R N A が、センスおよびアンチセンスの一部を含み、該部分の配列がそれぞれ配列番号 83 および 84 のヌクレオチド 1 ~ 19 に記載の配列を含み、必要に応じて一方または両方の配列に 3' 突出部を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6 2】

前記 s i R N A または s h R N A が、センスおよびアンチセンスの一部を含み、該部分の配列がそれぞれ配列番号 89 および 90 のヌクレオチド 1 ~ 19 に記載の配列を含み、必要に応じて一方または両方の配列に 3' 突出部を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6 3】

前記 s i R N A または s h R N A が、センスおよびアンチセンスの一部を含み、該部分の配列がそれぞれ配列番号 91 および 92 のヌクレオチド 1 ~ 19 に記載の配列を含み、必要に応じて一方または両方の配列に 3' 突出部を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6 4】

前記 s i R N A または s h R N A が、センスおよびアンチセンスの一部を含み、該部分の配列がそれぞれ配列番号 93 および 94 のヌクレオチド 1 ~ 19 に記載の配列を含み、必要に応じて一方または両方の配列に 3' 突出部を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6 5】

前記 s i R N A または s h R N A が、センスおよびアンチセンスの一部を含み、該部分の配列がそれぞれ配列番号 188 および 189 のヌクレオチド 1 ~ 20 に記載の配列を含

10

20

30

40

50

み、必要に応じて一方または両方の配列に 3' 突出部を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6 6】

前記 siRNA または shRNA が、NP-1496、NP-1496a、PA-2087、PB1-2257、PB1-129、PB2-2240、M-37、もしくは M-598 またはこれらの任意の変異型の二重鎖部分からなる群から選択される二重鎖部分を含み、該変異型は、対応する siRNA と多くとも 1 つのヌクレオチドが異なる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6 7】

前記 siRNA または shRNA の二重鎖部分が NP-1496 の二重鎖部分と同一である、請求項 6 6 に記載の組成物。 10

【請求項 6 8】

前記 siRNA または shRNA の二重鎖部分が NP-1496a の二重鎖部分と同一である、請求項 6 6 に記載の組成物。

【請求項 6 9】

前記 siRNA または shRNA のセンス鎖またはその一部が、5' 3' 方向に読み取って配列番号 71、配列番号 75、配列番号 77、配列番号 83、配列番号 93、配列番号 95、配列番号 99、および配列番号 188 の最初の 19 ヌクレオチドからなる群から選択される配列を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7 0】

少なくとも 1 つの修飾を含むという点で siRNA または shRNA と異なる、請求項 1 に記載の siRNA または shRNA のアナログ。

【請求項 7 1】

前記修飾により前記 siRNA の安定性が増加するか、前記 siRNA の吸収が強化されるか、前記 siRNA の細胞侵入が強化されるか、これらの任意の組み合わせである、請求項 7 0 に記載のアナログ。

【請求項 7 2】

前記修飾が、塩基、糖、またはヌクレオチド間結合を修飾する、請求項 7 0 に記載のアナログ。

【請求項 7 3】

前記修飾がヌクレオチド 2' 修飾ではない、請求項 7 0 に記載のアナログ。 30

【請求項 7 4】

前記修飾がヌクレオチド 2' 修飾である、請求項 7 0 に記載のアナログ。

【請求項 7 5】

少なくとも 1 つのリボヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドに置換されるという点で前記 siRNA と異なる、請求項 1 に記載の siRNA または shRNA のアナログ。

【請求項 7 6】

互いにハイブリダイズした場合に請求項 1 に記載の組成物を形成する複数の一本鎖 RNA を含む、組成物。

【請求項 7 7】

前記一本鎖 RNA が約 21 ヌクレオチド以上 23 ヌクレオチド以下の長さの範囲である、請求項 7 6 に記載の組成物。 40

【請求項 7 8】

複数の請求項 1 に記載の siRNA または shRNA を含む組成物。

【請求項 7 9】

前記 siRNA または shRNA の少なくともいくつかが、異なるインフルエンザウイルス転写物にターゲティングされる、請求項 7 8 に記載の組成物。

【請求項 8 0】

前記 siRNA または shRNA の少なくともいくつかが、同一のインフルエンザウイルス転写物の異なる領域にターゲティングされる、請求項 7 8 に記載の組成物。 50

【請求項 8 1】

インフルエンザウイルス感染に感受性を示す細胞内の前記 s i R N A または s h R N A の存在により、少なくとも 2 つのインフルエンザ株による感染に対する該細胞の感受性が減少する、請求項 1 に記載の s i R N A または s h R N A 。

【請求項 8 2】

インフルエンザウイルス感染に感受性を示す被験体内の前記 s i R N A または s h R N A の存在により、少なくとも 2 つのインフルエンザ株による感染に対する該被験体の感受性が減少する、請求項 1 に記載の s i R N A または s h R N A 。

【請求項 8 3】

請求項 1 に記載の s i R N A または s h R N A を含む細胞。

10

【請求項 8 4】

請求項 1 に記載の s i R N A または s h R N A の合成のためのテンプレートを提供するベクター。

【請求項 8 5】

構築物が宿主細胞に導入された場合に請求項 1 に記載の s i R N A または s h R N A が該宿主細胞内に産生されるように、前記ベクターが、該宿主細胞中で活性な発現シグナルに作動可能に連結された核酸を含む、請求項 8 4 に記載のベクター。

【請求項 8 6】

構築物が宿主細胞に導入された場合に s i R N A または s h R N A が感染性因子に特異的な転写物にターゲティングされる該宿主細胞内に産生され、該転写物が該因子の感染または複製に関連するように、該宿主細胞中で活性な発現シグナルに作動可能に連結された核酸を含むベクター。

20

【請求項 8 7】

前記感染性因子がウイルスであり、該ウイルスの複数の変異型が存在し、該ウイルスが遺伝子再集合または混合を受けることができる、請求項 8 6 に記載のベクター。

【請求項 8 8】

請求項 8 7 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 8 9】

請求項 8 7 に記載のベクターを含む、トランスジェニック動物。

30

【請求項 9 0】

前記ウイルスが、そのゲノムが複数の独立した核酸分子を含むウイルスである、請求項 8 7 に記載のベクター。

【請求項 9 1】

前記感染性因子がインフルエンザウイルスである、請求項 8 7 に記載のベクター。

【請求項 9 2】

前記ベクターが、インフルエンザウイルスによる感染に対する前記細胞の感受性を減少させるかまたはインフルエンザウイルス産生を阻害する s i R N A または s h R N A の 1 つまたは複数の鎖の転写のためのテンプレートを提供する、請求項 9 1 に記載のベクター。

40

【請求項 9 3】

前記標的転写産物の分解により、インフルエンザウイルスの感染または複製の 1 つまたは複数の状態が遅延、防止、または阻害される、請求項 9 1 に記載のベクター。

【請求項 9 4】

前記 s i R N A または s h R N A の二重鎖部分が、N P - 1 4 9 6 、 N P - 1 4 9 6 a 、 P A - 2 0 8 7 、 P B 1 - 2 2 5 7 、 P B 1 - 1 2 9 、 P B 2 - 2 2 4 0 、 M - 3 7 、もしくは M - 5 9 8 またはこれらの任意の変異型の二重鎖部分からなる群から選択され、該変異型が、そのセンス部分、アンチセンス部分、または両方のいずれかにおいて対応する s i R N A と多くとも 1 つのヌクレオチドが異なる、請求項 9 2 に記載のベクター。

【請求項 9 5】

前記 s i R N A または s h R N A の二重鎖部分が N P - 1 4 9 6 の二重鎖部分と同一で

50

ある、請求項 9 4 に記載のベクター。

【請求項 9 6】

前記 s i R N A の二重鎖部分が N P - 1 4 9 6 a の二重鎖部分と同一である、請求項 9 4 に記載のベクター。

【請求項 9 7】

前記 s i R N A または s h R N A のセンス鎖またはその一部が、5' 3' 方向に読み取って配列番号 7 1 、配列番号 7 5 、配列番号 7 7 、配列番号 8 3 、配列番号 9 3 、配列番号 9 5 、配列番号 9 9 、および配列番号 1 8 8 のいずれかの最初の 1 9 ヌクレオチドからなる群から選択される配列を有する、請求項 9 4 に記載のベクター。

【請求項 9 8】

前記核酸が、R N A ポリメラーゼ I I I のプロモーターに作動可能に連結される、請求項 8 6 に記載のベクター。

【請求項 9 9】

前記プロモーターが U 6 プロモーターまたは H 1 プロモーターである、請求項 9 8 に記載のベクター。

【請求項 1 0 0】

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 8 6 に記載のベクター。

【請求項 1 0 1】

前記ベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 8 6 に記載のベクター。

【請求項 1 0 2】

前記ベクターが D N A ベクターである、請求項 8 6 に記載のベクター。

【請求項 1 0 3】

前記ベクターがウイルスである、請求項 8 6 に記載のベクター。

【請求項 1 0 4】

前記ベクターがレンチウイルスである、請求項 8 6 に記載のベクター。

【請求項 1 0 5】

感染性因子による感染の治療または予防方法であって、該方法は、被験体の該感染性因子での曝露前、同時、または曝露後に該被験体に、請求項 8 6 に記載のベクターまたは請求項 8 8 に記載の細胞を含む組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 1 0 6】

前記感染性因子がウイルスである、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記感染性因子が気道上皮細胞に感染する、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記感染性因子がインフルエンザウイルスである、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

前記組成物を静脈内投与する、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記組成物を鼻腔内投与する、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

前記組成物を吸入によって投与する、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

請求項 1 に記載の組成物と、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、薬学的組成物。

【請求項 1 1 3】

前記組成物をエアゾールとして処方する、請求項 1 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 4】

前記組成物を鼻腔用スプレーとして処方する、請求項 1 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 5】

10

20

30

40

50

前記組成物を静脈内投与のために処方する、請求項 1 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 6】

前記感染性因子がインフルエンザウイルスであり、前記組成物が第 2 の抗インフルエンザ剤をさらに含む、請求項 1 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 7】

前記第 2 の抗インフルエンザ剤が米国食品医薬品局で承認されている、請求項 1 1 6 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 8】

ウイルスインヒビターを同定するための方法であって、該方法は、
その配列がウイルス感染時に產生される少なくとも 1 つの転写物との相補領域を含む候補
s i R N A または s h R N A を含む細胞を提供する工程であって、該転写物がその分解に
よってウイルスの感染または複製の 1 つまたは複数の状態を遅延、防止、または阻害する
という点で特徴付けられる、工程と、

該細胞中の該ウイルスの感染または複製を検出する工程と、

ウイルスの感染性または複製を阻害する s i R N A または s h R N A を同定する工程であって、該 s i R N A または s h R N A がウイルスインヒビターである、工程と
を包含する、方法。

【請求項 1 1 9】

前記ウイルスがインフルエンザウイルスである、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記細胞が、前記 s i R N A または s h R N A の非存在下で該細胞が少なくとも 1 つの
ウイルス転写物を產生することによって特徴付けられる、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

ウイルスゲノムで前記細胞をトランスフェクトするかまたは該細胞に前記ウイルスを感
染させる工程をさらに包含する、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

ウイルス感染を治療または防止する方法であって、該方法は、被験体の該ウイルスへの
曝露前、同時、または曝露後に該被験体に、R N A i 誘導性物質の有効量を含む組成物を
投与する工程を包含し、該 R N A i 誘導性物質が該ウイルス感染時に產生された転写物に
ターゲティングされ、該転写物が、該転写物のレベルの低下により該ウイルスの感染または
複製の 1 つまたは複数の状態を遅延、防止、または阻害されるにより特徴付けられる、
方法。

【請求項 1 2 3】

前記ウイルスが気道上皮細胞に感染する、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記ウイルスがインフルエンザウイルスである、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記組成物を気道に投与する、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記組成物を従来の静脈内送達方法によって投与する、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記 R N A i 誘導性物質の非存在下で、前記ウイルスが感染性ウイルスを產生させる完
全な生活環を経ることができ、前記 s i R N A または s h R N A の存在により該ウイルス
の產生が阻害される、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記 R N A i 誘導性物質が、N P - 1 4 9 6 、N P - 1 4 9 6 a 、P A - 2 0 8 7 、P
B 1 - 2 2 5 7 、P B 1 - 1 2 9 、P B 2 - 2 2 4 0 、M - 3 7 、もしくはM - 5 9 8 ま
たはこれらの任意の変異型の二重鎖部分からなる群から選択される二重鎖部分を含み、該
変異型がそのセンス部分、アンチセンス部分、または両方のいずれかにおいて対応する s
i R N A と多くとも 1 つのヌクレオチドが異なる、請求項 1 2 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 129】

前記二重鎖部分がN P - 1 4 9 6の二重鎖部分と同一である、請求項128に記載の方法。

【請求項 130】

前記二重鎖部分がN P - 1 4 9 6 aの二重鎖部分と同一である、請求項128に記載の方法。

【請求項 131】

二重鎖部分を有するs i R N Aまたはs h R N Aを設計するための方法であって、該方法は、以下の工程：

標的転写物の一部分を同定する工程であって、該一部分が、感染性因子の複数の変異型の間で高度に保存されており、少なくとも15個連続するヌクレオチドを含む、工程と、

該s i R N Aまたはs h R N Aのセンス鎖または一部分の二重鎖部分の配列として該一部分の配列を選択する工程と

を包含する、方法。

【請求項 132】

前記s i R N Aまたはs h R N Aのアンチセンス鎖または一部分の二重鎖部分の配列として前記一部に相補的な配列を選択する工程をさらに含む、請求項131に記載の方法。

【請求項 133】

前記s i R N A二重鎖のセンス鎖およびアンチセンス鎖のいずれかまたは両方に3'突出部を付加する工程をさらに包含する、請求項132に記載の方法。

【請求項 134】

前記複数の変異体が少なくとも10個の変異型を含む、請求項131に記載の方法。

【請求項 135】

前記複数の変異体が少なくとも15個の変異型を含む、請求項131に記載の方法。

【請求項 136】

前記複数の変異体が少なくとも20個の変異型を含む、請求項131に記載の方法。

【請求項 137】

前記一部分が約19個のヌクレオチドを含む、請求項131に記載の方法。

【請求項 138】

前記変異型の間で多くとも1つのヌクレオチドが異なる場合、一部分が複数の変異型の間で高度に保存されていると見なされる、請求項131に記載の方法。

【請求項 139】

前記感染性因子がインフルエンザウイルスである、請求項131に記載の方法。

【請求項 140】

前記感染性因子が再集合を受けることができる、請求項131に記載の方法。

【請求項 141】

前記変異型が少なくとも2つの変異型を含み、それぞれ異なる種の宿主に天然に感染する、請求項131に記載の方法。

【請求項 142】

前記種が、ヒト、ブタ、ウマ、およびトリ種からなる群から選択される少なくとも2つの種を含む、請求項141に記載の方法。

【請求項 143】

前記変異型が少なくとも2つの変異型を含み、それぞれ異なる種の宿主中で生じる、請求項131に記載の方法。

【請求項 144】

前記種が、ヒト、ブタ、ウマ、およびトリ種からなる群から選択される少なくとも2つの種を含む、請求項143に記載の方法。

【請求項 145】

請求項131に記載の方法に従って設計したs i R N Aまたはs h R N Aを含む組成物。

【請求項 146】

転写物レベルを減少または低下させる方法であって、該転写物がvRNAまたはcRNAであり、少なくともその一部が該vRNAまたはcRNA転写物と相補的または同一である配列を有するmRNA転写物にターゲティングされたRNAi誘導性物質を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 147】

第1の転写物の阻害方法であって、第2の転写物にターゲティングされたRNAi誘導性物質を投与する工程を包含し、該第2の転写物の阻害により該第1の転写物が阻害される、方法。

【請求項 148】

前記第1の転写物のレベルが前記RNAi誘導性物質の非存在下での該第1の転写物のレベルと比較して減少する、請求項147に記載の方法。

【請求項 149】

前記第2の転写物のレベルが前記RNAi誘導性物質の非存在下での該第2の転写物のレベルと比較して減少する、請求項147に記載の方法。

【請求項 150】

前記第1および第2の転写物のレベルが前記RNAi誘導性物質の非存在下での該第1および第2の転写物のレベルと比較して減少する、請求項147に記載の方法。

【請求項 151】

前記RNAi誘導性物質が前記第1の転写物に特異的にターゲティングされない、請求項147に記載の方法。

【請求項 152】

前記第2の転写物がRNA安定性の維持において機能するタンパク質をコードする、請求項147に記載の方法。

【請求項 153】

前記タンパク質が核酸結合タンパク質である、請求項147に記載の方法。

【請求項 154】

前記核酸結合タンパク質がRNA結合タンパク質である、請求項153に記載の方法。

【請求項 155】

前記第2の転写物がポリメラーゼをコードする、請求項147に記載の方法。

【請求項 156】

前記ポリメラーゼがRNAポリメラーゼである、請求項155に記載の方法。

【請求項 157】

前記ポリメラーゼがDNAポリメラーゼである、請求項155に記載の方法。

【請求項 158】

前記ポリメラーゼが逆転写酵素である、請求項155に記載の方法。

【請求項 159】

前記第1および第2の転写物のいずれかまたは両方が因子特異的転写物であり、該因子が感染性因子である、請求項147に記載の方法。

【請求項 160】

前記第1および第2の転写物が因子特異的転写物であり、該因子が感染性因子である、請求項147に記載の方法。

【請求項 161】

前記感染性因子がウイルスである、請求項160に記載の方法。

【請求項 162】

前記ウイルスがインフルエンザウイルスである、請求項161に記載の方法。

【請求項 163】

前記第2の転写物がウイルスNPタンパク質またはウイルスPAタンパク質のいずれかをコードする、請求項162に記載の方法。

【請求項 164】

10

20

30

40

50

前記第1の転写物が、Mタンパク質、H Aタンパク質、P B 1タンパク質、P B 2タンパク質、またはN Sタンパク質からなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項163に記載の方法。

【請求項165】

組成物であって、
R N A i 誘導性物質であって、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされる
、R N A i 誘導性物質と、

カチオン性ポリマー、修飾カチオン性ポリマー、ペプチド分子輸送体、肺への導入に適切なサーファクタント、中性またはカチオン性脂質、リポソーム、非カチオン性ポリマー
、修飾非カチオン性ポリマー、ブピバカイン、およびクロロキンからなる群から選択される送達因子と
10

を含む、組成物。

【請求項166】

前記送達因子が、目的の細胞への送達を強化するための送達強化部分を含む、請求項165に記載の組成物。

【請求項167】

前記送達強化部分が、前記目的の細胞によって発現された分子に特異的に結合する抗体
、抗体フラグメント、またはリガンドを含む、請求項165に記載の組成物。

【請求項168】

前記目的の細胞が気道上皮細胞である、請求項167に記載の組成物。

20

【請求項169】

前記送達強化部分が、前記送達因子の分解、クリアランス、または非特異的結合を減少
させるために選択された部分を含む、請求項165に記載の組成物。

【請求項170】

前記R N A i 誘導性物質がウイルスベクターを含む、請求項165に記載の組成物。

【請求項171】

前記ウイルスベクターがレンチウイルスベクターを含む、請求項170に記載の組成物
。

【請求項172】

前記R N A i 誘導性物質がD N Aベクターを含む、請求項165に記載の組成物。

30

【請求項173】

前記R N A i 誘導性物質がウイルスを含む、請求項165に記載の組成物。

【請求項174】

前記R N A i 誘導性物質がレンチウイルスを含む、請求項173に記載の組成物。

【請求項175】

前記R N A i 誘導性物質がs i R N Aを含む、請求項165に記載の組成物。

【請求項176】

前記R N A i 誘導性物質がs h R N Aを含む、請求項165に記載の組成物。

【請求項177】

前記R N A i 誘導性物質が、細胞内でのその存在によりインフルエンザウイルス転写物
にターゲティングされたs i R N Aまたはs h R N Aが産生されるR N A i 誘導性ベクターを含む、請求項165に記載の組成物。

40

【請求項178】

前記R N A i 誘導性物質が、s i R N Aもしくはs h R N Aまたは細胞内でのその存在
によりs i R N Aもしくはs h R N Aが産生されるR N A i 誘導性ベクターを含み、該s
i R N Aまたはs h R N Aが前記標的転写物の領域と完全に相補的な部分を含み、該部分
が少なくとも15ヌクレオチド長である、請求項165に記載の組成物。

【請求項179】

前記R N A i 誘導性物質が、s i R N Aもしくはs h R N Aまたは細胞内でのその存在
によりs i R N Aもしくはs h R N Aが産生されるR N A i 誘導性ベクターを含み、該s

50

i RNA または s h RNA が、 NP - 1496、 NP - 1496a、 PA - 2087、 PB1 - 2257、 PB1 - 129、 PB2 - 2240、 M - 37、 および M - 598 またはこれらの任意の変異型の二重鎖部分からなる群から選択される二重鎖部分を含み、 該変異型がそのセンス部分、 アンチセンス部分、 または両方のいずれかにおいて対応する si RNA または s h RNA と多くとも 1 つのヌクレオチドが異なる、 請求項 165 に記載の組成物。

【請求項 180】

前記 si RNA または s h RNA の二重鎖部分が NP - 1496 の二重鎖部分を含む、 請求項 179 に記載の組成物。

【請求項 181】

前記 si RNA または s h RNA の二重鎖部分が NP - 1496a の二重鎖部分を含む、 請求項 179 に記載の組成物。

【請求項 182】

前記 RNAi 誘導性物質が、 si RNA もしくは s h RNA または細胞内でのその存在により si RNA もしくは s h RNA が産生される RNAi 誘導性ベクターを含み、 該 si RNA または s h RNA のセンス鎖または一部の配列が、 5' 3' 方向に読み取って配列番号 71、 配列番号 75、 配列番号 77、 配列番号 83、 配列番号 93、 配列番号 95、 配列番号 99、 および配列番号 188 の最初の 19 ヌクレオチドからなる群から選択される配列を含む、 請求項 165 に記載の組成物。

【請求項 183】

前記 si RNA または s h RNA のセンス鎖または一部分の配列が、 配列番号 93 の配列を含む、 請求項 182 に記載の組成物。

【請求項 184】

前記 si RNA または s h RNA のセンス鎖または一部分の配列が、 配列番号 188 の配列を含む、 請求項 182 に記載の組成物。

【請求項 185】

前記送達因子が、 カチオン性ポリマー、 修飾カチオン性ポリマー、 および肺への導入に適切なサーファクタントからなる群から選択される、 請求項 165 に記載の組成物。

【請求項 186】

前記カチオン性ポリマーが、 ポリリジン、 ポリアルギニン、 ポリエチレンイミン、 ポリビニルピロリドン、 キトサン、 およびポリ(- アミノエステル)ポリマーからなる群から選択される、 請求項 185 に記載の組成物。

【請求項 187】

前記カチオン性ポリマーがポリエチレンイミンである、 請求項 186 に記載の組成物。

【請求項 188】

前記修飾カチオン性ポリマーに、 該ポリマーのカチオン性を減少させるために選択した修飾を組み込む、 請求項 185 に記載の組成物。

【請求項 189】

前記修飾が、 アセチル、 イミダゾール、 スクシニル、 およびアシルからなるリストから選択される基との置換を含む、 請求項 188 に記載の組成物。

【請求項 190】

前記修飾カチオン性ポリマーの 25% と 75% との間の残基が修飾される、 請求項 185 に記載の組成物。

【請求項 191】

前記修飾カチオン性ポリマーの約 50% の残基が修飾される、 請求項 190 に記載の組成物。

【請求項 192】

前記送達因子が肺への導入に適切なサーファクタントを含む、 請求項 185 に記載の組成物。

【請求項 193】

10

20

30

40

50

前記サーファクタントが、Infasurf (登録商標)、Survant (登録商標)、またはExosurf (登録商標)である、請求項192に記載の組成物。

【請求項194】

インフルエンザウイルスの複製、病原性、または感染性を治療または防止する方法であって、インフルエンザウイルス感染のリスクがあるかまたはインフルエンザウイルス感染に罹患した被験体に請求項165に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項195】

前記組成物を、静脈内注射、吸入、鼻腔内、およびエアゾールからなる群から選択される経路によって投与する、請求項194に記載の方法。

【請求項196】

前記組成物を静脈内投与する、請求項194に記載の方法。

【請求項197】

前記組成物を従来の静脈内投与技術を使用して投与する、請求項196に記載の方法。

【請求項198】

前記組成物を吸入によって投与する、請求項194に記載の方法。

【請求項199】

前記組成物を鼻腔内投与する、請求項194に記載の方法。

【請求項200】

前記組成物をエアゾールとして投与する、請求項194に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2002年9月28日提出の米国仮出願60/414,457号および2003年2月10日提出の米国仮出願60/446,377号の優先権を主張する。これらの各出願の内容は、本明細書中で参考として援用される。

【0002】

(政府援助)

合衆国政府は、本発明の本発明の開発で使用した助成金を支給した。特に、国立衛生研究所助成金番号5-RO1-AI44477, 5-RO1-AI44478, 5-RO1-CA60686、および1-RO1-AI50631で本発明の開発を補助した。合衆国政府は、本発明に一定の権利を有し得る。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

インフルエンザは世界中で最も蔓延している感染症の1つである。命にかかる感染症であり、1,918年インフルエンザAウイルス流行時には200万人～400万人が死亡したと推定されている。米国では、2万人～4万人がインフルエンザAウイルス感染またはその合併症により死亡している。流行時のインフルエンザに関連する入院は、冬季のみで300,000人超に達し得る。

【0004】

いくつかの性質がインフルエンザウイルスの疫学的な蔓延の原因になっている。第1に、エアゾールによってヒトに容易に感染する(飛沫感染)。第2に、インフルエンザウイルス抗原の小規模の変化(抗原連続変異)が頻繁であるため、ウイルスは異なるウイルス変異型に対する以前の曝露によって誘導された防御免疫を容易に回避する。第3に、異なる株間での遺伝物質の再集合および混合(抗原不連続変異)によって新規のインフルエンザウイルス株を容易に作製することができる。インフルエンザAウイルスの場合、このような混合は、異なる種に影響を与えるサブタイプまたは株の間で起こり得る。1,918年の流行は、ブタおよびヒトでのインフルエンザAウイルスの間の再集合に由来するハイブリッド株によって引き起こされたと考えられている。

10

20

30

40

50

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

集中的な取り組みにもかかわらず、インフルエンザウイルスの有効な治療方法は依然として存在せず、上記の抗原不連続変異および抗原連続変異のために既存のワクチンの効果が制限される。これらの理由のために、インフルエンザAウイルスの世界的調査が長年に及んでおり、国立衛生研究所は、生物兵器防御の最優先病原体の1つに指定している。不活性化ウイルスに基づいた現在のワクチンは65歳未満の健常な個体において約70~80%の疾患を防止することができるにもかかわらず、この比率は高齢者または免疫無防備状態の個体ではさらに低い。さらに、ワクチン投与に関連する費用および潜在的な副作用により、このアプローチは決して最適ではない。米国ではインフルエンザの治療および/または予防用の現在承認された4つの抗ウイルス薬が有益であるが、副作用、服薬遵守、および耐性株出現の可能性が懸念されるためにその用途は制限される。従って、インフルエンザ感染の治療および防止のための有効な治療方法の開発が必要である。

10

【課題を解決するための手段】**【0006】****(発明の要旨)**

本発明は、RNA干渉(RNAi)現象に基づいたインフルエンザA型、B型、およびC型に起因するインフルエンザ治療のための新規の治療薬を提供する。特に、本発明は、ウイルス産生、ウイルス複製、ウイルス感染、および/またはウイルスRNAの転写などに関する1つまたは複数の標的転写物にターゲティングされた短干渉RNA20(siRNA)および/または短ヘアピンRNA(shRNA)分子を提供する。さらに、本発明は、細胞内でのその存在により1つまたは複数のRNAが転写され、自己ハイブリッド形成するか互いにハイブリッド形成して、ウイルス産生、ウイルス感染、ウイルス複製、および/またはウイルスマRNAの転写などに関する少なくとも1つの標的転写物の発現を阻害するshRNAまたはsiRNAを形成するベクターを提供する。

20

【0007】

本発明は、さらに、本発明のsiRNAs、shRNAs、および/またはベクターを含む種々の組成物を提供する。本発明の一定の実施形態では、siRNAは、鎖が互いにハイブリッド形成して約19ヌクレオチド長の二重鎖構造を形成するような相補領域を有する2つのRNA鎖を含み、各鎖は必要に応じて一本鎖突出部を含む。本発明は、さらに、siRNA、shRNAおよび/または本発明のベクターを含む種々な組成物を提供している。本発明の一定の実施形態では、siRNAは、相補領域を有する2つのRNA鎖を備え、相互にハイブリッド形成をして、各鎖が必要に応じて1本鎖突出部を備える約19ヌクレオチド長の二重鎖構造を形成している。本発明の一定の実施形態では、shRNAは、互いにハイブリッド形成して約19ヌクレオチド長の二重鎖部分および一本鎖ループを有するヘアピン(ステム/ループ)構造を形成する相補領域を有する1つのRNA分子を含む。このようなRNA分子を、自己ハイブリッドしたという。shRNAは、必要に応じてRNAの5'部分および/または3'部分に1つまたは複数の非対合部分を含む。本発明は、さらに、本発明のsiRNAs、shRNA、および/またはベクターを含む組成物ならびにこのような組成物の送達方法を提供する。

30

【0008】

したがって、1つの態様では、本発明は、標的転写物が薬剤特異的転写物であり、転写物が感染性因子の产生、複製、病原性、および/または感染および/または因子特異的RNAの転写に関する、標的転写物にターゲティングされるsiRNAまたはshRNAを提供する。説明の目的のために、感染性因子の产生、複製、病原性、および/または感染に関する標的転写物の発現を阻害し、それにより感染性因子の产生、複製、病原性、および/または感染が阻害されるsiRNAまたはshRNAは、感染性因子を阻害するといわれる。本発明の一定の実施形態によれば、感染性因子はウイルスである。本発明の一定の好ましい実施形態によれば、感染性因子は気道および/または肺の細胞(例えば

40

50

、気道上皮細胞)に感染するインフルエンザウイルスなどのウイルスである。本発明の一定の実施形態によれば、標的転写物は、ポリメラーゼ、ヌクレオキアプシドタンパク質、ノイラミニダーゼ、血球凝集素、基質タンパク質、および非構造タンパク質からなる群から選択されるタンパク質をコードする。本発明の一定の実施形態によれば、標的転写物は、血球凝集素、ノイラミニダーゼ、膜タンパク質1、膜タンパク質2、非構造タンパク質1、非構造タンパク質2、ポリメラーゼタンパク質PB1、ポリメラーゼタンパク質PB2、ポリメラーゼタンパク質PA、ポリメラーゼタンパク質NPからなる群から選択されるインフルエンザウイルスタンパク質をコードする。

【0009】

別の態様では、本発明は、構築物が細胞に移入された場合に、siRNAまたはshRNAが因子特異的転写物にターゲティングされる宿主細胞内で產生され、転写物が感染性因子の產生、複製、および/または感染および/または因子特異的RNAの転写に関与するように細胞内で活性な発現シグナル(例えば、プロモーターまたはプロモーター/エンハンサー)に作動可能に連結された核酸を含むベクターを提供する。本発明の一定の実施形態では、感染性因子はウイルス(例えば、インフルエンザウイルス)である。本発明の一定の好ましい実施形態では、siRNAまたはshRNAは、インフルエンザウイルスを阻害する。siRNAまたはshRNAを、上記の任意の転写物にターゲティングすることができる。一般に、ベクターは、細胞内のその存在により、1つまたは複数のリボ核酸(RNA)が転写され、自己ハイブリッド形成するか互いにハイブリッド形成して細胞内での少なくとも1つのインフルエンザウイルス転写物の発現を阻害する短ヘアピンRNA(shRNA)または短干渉RNA(siRNA)を形成する、DNAプラスミドまたはウイルスベクターレトロウイルス(例えば、レンチウイルス)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターであり得る。本発明の一定の実施形態では、ベクターは、プロモーター由来の転写(すなわち、プロモーターによって指示された転写)によって、ハイブリッド形成して標的転写物にターゲティングされたshRNAを形成する相補領域を含むRNAを合成するようにプロモーターに作動可能に連結された核酸セグメントを含む。本発明の一定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、プロモーター由来の転写によって互いにハイブリッド形成して標的転写物にターゲティングされたsiRNAを形成する2つの相補RNAが合成されるように、核酸セグメントに正方向で作動可能に連結された2つのプロモーターに隣接する核酸セグメントを含む。本発明は、さらに、ベクターを含む組成物を提供する。

【0010】

本発明はまた、siRNA、shRNA、またはベクターの送達および/または取り込みを容易にする任意の種々の物質(本明細書中で、「送達因子」という)をさらに含む、本明細書中に記載の本発明のsiRNA、shRNA、および/またはベクターを含む組成物を提供する。これらの物質には、カチオン性ポリマー、ペプチド分子輸送体(アルギニンが豊富なペプチドおよびヒスチジンが豊富なペプチドが含まれる)、カチオン性および中性脂質、リポソーム、一定の非カチオン性ポリマー、炭水化物、およびサーファクタント物質が含まれる。本発明はまた、任意の種々の方法(例えば、送達因子への送達強化部分の付加)で修飾した送達因子の使用を含む。

【0011】

本発明の一定の実施形態では、送達因子を、組成物の安定性の強化、細胞取り込みの促進、siRNA、shRNA、および/またはベクターの細胞内への放出の促進、細胞傷害性の減少、または組成物の特定の細胞型、組織、もしくは器官への指向のための任意の多数の方法で修飾する。例えば、本発明の一定の実施形態では、送達因子は、修飾カチオン性ポリマー(例えば、ポリマーのカチオン性を減少させ、それにより細胞傷害性を減少させるために選択した1つまたは複数の基で置換したカチオン性ポリマー)である。本発明の一定の実施形態では、送達因子は、気道上皮細胞などの細胞の表面上に存在する分子に特異的に結合する抗体、抗体フラグメント、またはリガンドなどの送達強化部分を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

本発明は、さらに、感染因子への曝露前、曝露時、もしくは曝露後、または被験体が感染性因子によって発症する疾患の症状を示す任意の時点における適切な時間枠内での本発明の任意の組成物の被験体への投与による、感染症、特に気管支の感染症（例えば、インフルエンザ）の治療または防止方法を提供する。s i R N A または s h R N A を、化学合成するか、インビトロ転写を使用して產生するか、インビトロで合成するか、細胞内等に產生することができる。組成物を、種々の経路（静脈内、吸入、鼻腔内、エアゾールとして、腹腔内、皮内、経口などが含まれる）によって投与することができる。

【 0 0 1 3 】

本発明は、遺伝子治療を使用した感染性因子によって発症する疾患（例えば、インフルエンザウイルスによる疾患）のさらなる治療または防止方法を提供する。一定のこれらの方法によれば、細胞（感染または非感染のいずれか）を、本発明の s i R N A または s h R N A を合成するように処理（engineer）または操作（manipulate）する。本発明の一定の実施形態によれば、細胞内でのその存在により 1 つまたは複数の R N A が合成され、細胞内で自己ハイブリッド形成するか互いにハイブリッド形成して適切な因子特異的標的転写物にターゲティングされた 1 つまたは複数の s i R N A または s h R N A を形成するベクターを含むように細胞を処理する。細胞を、インビトロまたは治療すべき被験体内（例えば、被験体の気管支内）で処理することができる。

【 0 0 1 4 】

別の態様では、本発明は、感染性因子を阻害するための好ましい s i R N A または s h R N A 配列の選択および設計方法を提供する。本発明は、感染性因子の複数の異なる株または変異型が存在する（特に、遺伝子の再集合または混合によって株が変異し得る）ことを特徴とする感染性因子を阻害するための s i R N A および s h R N A の選択および設計方法を提供する。これらの方法は、特に、あるサブタイプから別のサブタイプへの全ゲノムセグメントの置換によって遺伝子再集合が迅速且つ予想外に起こり得る、そのゲノムが複数の異なるセグメントからなる感染性因子と戦うための s i R N A および s h R N A 配列の選択および設計で使用される。従って、本発明のこれらの態様は、特に、そのゲノムが複数の独立したセグメントからなる（ゲノムが互いに共有結合していない物理的に異なる核酸分子からなることを意味する）感染性因子に適切である。本発明はまた、特に、プラスミド（例えば、治療化合物に耐性を付与する遺伝子をコードするプラスミド）の導入によって遺伝情報を交換する感染性因子のために使用することができる。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされた s i R N A および / または s h R N A などの 1 つまたは複数の R N A i 誘導性物質および / または細胞内でのその存在により 1 つまたは複数の R N A が產生され、互いにハイブリッド形成するか自己ハイブリッド形成してインフルエンザウイルス転写物にターゲティングする s i R N A または s h R N A を形成するベクターを含み、インフルエンザウイルスの阻害に有用な組成物の同定システムを提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明は、さらに、インフルエンザの複製機構および / またはインフルエンザウイルス R N A の転写機構の分析および特徴づけならびにウイルス生活環に関する関連ウイルス構成要素の特徴づけおよび分析のためのシステムを提供する。

【 0 0 1 7 】

別の態様では、本発明は、複数の感染性因子の変異型が存在する場合に感染性因子を阻害するための s i R N A および / または s h R N A の設計方法を提供する。例えば、本発明は、（ i ）標的転写物の一部を同定する工程と、一部が感染性因子の複数の変異型の間で高度に保存されており、少なくとも 15 個連続するヌクレオチドを含むことと、（ ii ） s i R N A または s h R N A を選択する工程と、 s i R N A のセンス鎖または s h R N A のセンス部分が高度に保存された配列を含むこととを含む、二重鎖部分を有する s i R N A または s h R N A 分子の設計方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0018】

別の態様では、本発明は、s i R N A または s h R N A がその阻害によって複数（または全ての）他のウイルス転写物を阻害する転写物にターゲティングされる、s i R N A および s h R N A およびその設計方法を提供する。特に、本発明は、ウイルスポリメラーゼ（D N A または R N A ポリメラーゼ）またはヌクレオキアブシドタンパク質をコードする転写物にターゲティングされた s i R N A または s h R N A を含む s i R N A および s h R N A 組成物を提供する。

【0019】

本願は、種々の特許、学術論文、および他の出願（その全てが本明細書中で参考として援用される）を参照する。さらに、以下の標準的な参考資料が本明細書中で参考として援用される：Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Immunology, Current Protocols in Protein Science, and Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons, N.Y., editions as of July 2002; Sambrook, Russell, and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001。

10

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

（略語）

D N A : デオキシリボ核酸

R N A : リボ核酸

v R N A : インフルエンザウイルスゲノム中のビリオン R N A (マイナス鎖)

c R N A : 相補性 R N A (v R N A の直接的転写物、プラス鎖)

m R N A : v R N A または細胞遺伝子から転写されたメッセンジャー R N A (タンパク質合成のテンプレート)

d s R N A : 二本鎖 R N A

30

s i R N A : 短干渉 R N A

s h R N A : 短ヘアピン R N A

R N A i : R N A 干渉。

【0021】

（定義）

一般に、用語「抗体」は、天然または全てもしくは部分的に合成された免疫グロブリンをいう。本発明の一定の実施形態では、この用語は、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のタンパク質も含む。これらのタンパク質は、天然の供給源に由来するか、部分的または全てを合成することができる。抗体は、任意の免疫グロブリンクラス（任意のヒトクラスが含まれる）のメンバー（I g G、I g M、I g A、I g D、およびI g E）であり得る。抗体は、F a b'、F (a b')₂、s c F v (単鎖可変部)などの抗体のフラグメント、抗原結合部位を保持する他のフラグメント、または組換え產生したs c F v フラグメント（組換え產生されたフラグメントが含まれる）であり得る。例えば、A l l e n, T., N a t u r e R e v i e w s C a n c e r , V o l . 2 , 7 5 0 - 7 6 5 , 2 0 0 2 およびその引用文献を参照のこと。本発明の一定の実施形態では、この用語には、例えば、げっ歯類起源の可変ドメインがヒト起源の定常ドメインと融合し、それによりげっ歯類抗体の特異性が保持された「ヒト化」抗体が含まれる。ヒト起源のドメインは、ヒトで最初に合成されるという意味でヒトに直接由来する必要が無いことに留意のこと。代わりに、そのゲノムにヒト免疫グロブリン遺伝子が組み込まれたげっ歯類で「ヒト」ドメインを作製することができる。例えば、V a u g h a n , e t a l . , (1 9 9 8) , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , 1 6 : 5 3 5 - 5 3 9 を参照のこと。抗

40

50

体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも良いが、本発明の目的のために、一般にモノクローナル抗体が好ましい。

【0022】

本明細書中で使用される、数に関する用語「約(approximately)」または「約(about)」は、一般に、他で記載するか文脈から明らかでない限り、いずれかの方向(超えるまたは未満)で5%の範囲内の数字を含むこととする(このような数字は可能性のある値の100%を超えない)。範囲が示されている場合、他で記載するか文脈から明らかでない限り、終点は範囲内に含まれる。

【0023】

本明細書中で使用される、用語「ハイブリッド形成する」とは、2つの相補核酸配列の相互作用をいう。句「高ストリンジエンシー条件下でハイブリッド形成する」とは、当該分野で認識される高ストリンジエンシー条件下で維持される十分に安定な相互作用を説明する。ハイブリッド形成反応実施のためのガイダンスは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1989および最新版(その全てが参考として援用される)で見出すことができる。Sambrook, Russell, and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001も参照のこと。水性法および非水性法は、この引用文献に記載されており、いずれかを使用することができる。典型的には、約50~100ヌクレオチド長にわたる核酸配列のために、低ストリンジエンシー(例えば、約45で6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)およびその後少なくとも50での0.2×SSC、0.1%SDSで2回洗浄(中-低ストリンジエンシー条件のために洗浄温度を55に上昇させることができる)、中ストリンジエンシー(例えば、約45で6×SSCおよびその後60での0.2×SSC、0.1%SDSで1回または複数回の洗浄)、高ストリンジエンシーハイブリッド形成(例えば、約45で6×SSCおよびその後65での0.2×SSC、0.1%SDSで1回または複数回の洗浄)、および非常に高いストリンジエンシーでのハイブリッド形成(例えば、約65で0.5Mリン酸ナトリウム、0.1%SDSおよびその後65での0.2×SSC、1%SDSで1回または複数回の洗浄)などの種々のストリンジエンシーレベルを定義する。非常に相補性が高い配列の間でのみ高ストリンジエンシー条件下でのハイブリッド形成が起こる。当業者は、異なるストリンジエンシー度についてのパラメーターは、一般に、ハイブリッド形成配列の長さ、RNAまたはDNAを含むかどうかなどの種々の要因に基づいて異なることを認識する。例えば、高、中、または低ストリンジエンシーハイブリッド形成に適切な温度は、一般に、オリゴヌクレオチドなどの配列がより長い配列よりもより短い配列のほうが低い。

【0024】

本明細書中で使用される、用語「インフルエンザ」は、動物またはヒト被験体で疾患を引き起こすことができるか実験分析のための興味深い候補である任意のインフルエンザウイルス株をいう。インフルエンザウイルスは、Fields, B., et al., Fields' Virology, 4th ed., Philadelphia: Lippincott WilliamsおよびWilkins; ISBN: 0781718325, 2001に記載されている。特に、この用語は、動物またはヒト被験体で疾患を引き起こすことができるか実験分析のための興味深い候補である任意のインフルエンザAウイルス株を含む。非常に多数のインフルエンザA単離物が部分的または完全に配列判定されている。付録Aは、公的データベース(The Influenza Sequence Database (ISD)) (Macken, C., Lu, H., Goodman, J., & Boykin, L., 'The value of a database in surveillance and vaccine selection.', in Options for the Control of Influenza

10

20

30

40

50

I V A . D . M . E . O s t e r h a u s , N . C o x & A . W . H a m p s o n (E d s .) A m s t e r d a m : E l s e v i e r S c i e n c e , 2 0 0 1 , 1 0 3 - 1 0 6) を参照のこと) に示されているインフルエンザ A ゲノムセグメントの完全な配列表の一部のみを示す。このデータベースは、インフルエンザ B および C ゲノムセグメントの完全な配列も含む。ユーザーがゲノムセグメント、ウイルスに感染した種、および単離年によって検索可能な従来の検索エンジンと共に U R L が h t t p : / / w w w . f l u . l a n l . g o v / のワールド・ワイド・ウェブのデータベースが利用可能である。 G e n b a n k のインフルエンザ配列も利用可能である。従って、インフルエンザの遺伝子配列は、当業者が容易に利用可能であるか判定可能である。

【 0 0 2 5 】

本明細書中で使用される、「単離された」は、1) 通常天然に会合した少なくともいくつかの構成要素から分離されること、2) 人の手を含むプロセスによって調製または精製されること、および / または 3) 天然に存在しないことを意味する。

【 0 0 2 6 】

本明細書中で使用される、「リガンド」は、抗原 - 抗体相互作用以外の機構によって炭水化物部分などの第 2 の分子（典型的には、ポリペプチドまたはその一部）に特異的に結合する分子を意味する。この用語は、例えば、ポリペプチド、ペプチド、および小分子（天然に存在するか合成されたその構造が人によって発明された構造を有する合成された分子）を含む。この用語は、相互作用して典型的にはその活性を調整する受容体および分子（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）の文脈で使用されるが、本明細書中で使用されるこの用語をより一般的に適用する。

【 0 0 2 7 】

本明細書中で使用される、「作動可能に連結された」は、1 つの核酸配列の発現が他の核酸配列によって調節、制御、調整などが行われる 2 つの核酸配列間の関係をいう。例えば、作動可能に連結されたプロモーター配列によって核酸配列の転写が指示される；作動可能に連結されたプロセシング配列によって核酸の転写後プロセシングが指示される；作動可能に連結された翻訳調節配列によって核酸配列の翻訳が指示される；作動可能に連結された輸送体または局在化配列によって核酸またはポリペプチドの局在化が指示される；および、作動可能に連結されたプロセシング配列によってポリペプチドの翻訳後プロセシングが指示される。好ましくは、第 2 の核酸配列に作動可能に連結された核酸配列はこのような配列と直接または間接的に共有結合するが、任意の有効な三次元会合が許容可能である。

【 0 0 2 8 】

本明細書中で使用される、「精製された」は、多数の他の化合物または物質から分離したことを意味する。化合物または物質は、部分的に精製されているか、実質的に精製されているか、純粋であり得る（実質的に全ての他の化合物または物質から取り出された場合に純粋なものであり得る（すなわち、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 9 9 % を超えて純粋である））。

【 0 0 2 9 】

用語「調節配列」は、作動可能に連結された配列の発現（特に、転写であるが、いくつかの場合、スプライシングまたは他のプロセスなどの他の事象）を指示、強化、または阻害する核酸配列領域を説明するために本明細書中で使用される。この用語には、プロモーター、エンハンサー、および他の転写調節エレメントが含まれる。本発明のいくつかの実施形態では、調節配列は、ヌクレオチド配列の構成的発現を指示することができ、他の実施形態では、調節配列は、組織特異的および / または誘導性発現を指示することができる。例えば、哺乳動物細胞での使用に適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例には、リンパ特異的プロモーター（例えば、C a l a m e e t a l . , A d v . I m m u n o l . 4 3 : 2 3 5 , 1 9 8 8 の（T 細胞受容体（例えば、W i n o t o e t a l . , E M B O J 8 : 7 2 9 , 1 9 8 9 を参照のこと）および免疫グロブリン（例えば、

10

20

30

40

50

Banerji et al., Cell 33: 729, 1983; Queen et al., Cell 33: 741, 1983を参照のこと)のプロモーターなど)およびニューロン特異的プロモーター(例えば、神経フィラメントプロモーター; Byrne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473, 1989)が含まれる。成長調節プロモーター(例えば、マウスホックスプロモーター(Kessel et al., Science 249: 374, 1990)および-フェトタンパク質プロモーター(Campes et al., Genes Dev. 3: 537, 1989)が含まれる)も含まれる。本発明のいくつかの実施形態では、調節配列は、感染性因子に感染した細胞中でのみヌクレオチド配列の発現を指示することができる。例えば、調節配列は、ウイルスタンパク質(例えば、ウイルスポリメラーゼ、転写因子など)によって認識されるウイルス特異的プロモーターまたはエンハンサーなどのプロモーターおよび/またはエンハンサーを含み得る。あるいは、調節配列は、鼻腔、気道、および/または肺中の上皮細胞で活性なプロモーターおよび/またはエンハンサーを含み得る。

10

20

30

40

50

【0030】

本明細書中で使用される、用語「RNAi誘導性物質」は、細胞内での存在によりRNAiが得られ、RNAi誘導性物質がターゲティングされる転写物の発現を減少させるRNA分子およびベクター(人の手によって改変されていない天然に存在する分子)を含む。この用語には、特に、siRNA、shRNA、およびRNAi誘導性ベクターが含まれる。

【0031】

本明細書中で使用される、「RNAi誘導性ベクター」は、細胞内での存在により1つまたは複数のRNAが転写され、自己ハイブリッド形成または互いにハイブリッド形成してshRNAまたはsiRNAを形成するベクターである。本発明の種々の実施形態では、この用語は、細胞内での存在により1つまたは複数のRNAが産生され、自己ハイブリッド形成または互いにハイブリッド形成してshRNAまたはsiRNAを形成するプラスミド(例えば、DNAベクター(その配列がウイルス由来の配列エレメントを含み得る)またはウイルス(人の手によって改変されていない天然に存在するウイルスまたはプラスミド以外))を含む。一般に、ベクターは、ベクターが細胞内に存在する場合にハイブリッド形成または自己ハイブリッド形成してsiRNAまたはshRNAを形成する1つまたは複数のRNA分子が転写されるように発現シグナルに作動可能に連結された核酸を含む。したがって、ベクターは、RNAまたはその前駆体の細胞内合成のためのテンプレートを提供する。RNAiの誘導のために、細胞内のウイルスゲノムの存在(例えば、ウイルスエンベロープと細胞膜との融合後)は、細胞内にウイルスを存在させるのに十分であると見なされる。さらに、RNAiの誘導のために、細胞内に移入されるか、細胞に侵入するか、親細胞から遺伝した場合、その後細胞内で修飾またはプロセシングするかに關係なく、ベクターは細胞内に存在すると見なされる。RNAi誘導性ベクターは、細胞内のベクターの存在により1つまたは複数のRNAが産生され、互いにハイブリッド形成するか自己ハイブリッド形成して転写物にターゲティングされたsiRNAまたはshRNAが形成される場合(すなわち、細胞内のベクターの存在によって転写物にターゲティングされた1つまたは複数のsiRNAまたはshRNAが産生される場合)、転写物にターゲティングされたものと見なされる。

【0032】

短干涉RNA(siRNA)は、約19塩基対長であるRNA二重鎖を含み、必要に応じて1つまたは2つの一本鎖突出部をさらに含む。siRNAを、互いにハイブリッド形成する2つのRNA分子から形成することができるか、自己ハイブリッド形成部分を含む1つのRNA分子から作製することができる。一般に、siRNA分子の遊離の5'末端はリン酸基を有し、3'末端は水酸基を有することが好ましい。siRNAの二重鎖部分は、1つまたは複数の非対合ヌクレオチドからなる1つまたは複数のバルジを含み得るが、典型的には含まない。siRNAの1つの鎖には、標的転写物とハイブリッド形成する部

分が含まれる。本発明の一定の好ましい実施形態では、s i R N A の 1 つの鎖は、標的転写物領域と正確に相補的であり、これは、s i R N A が 1 つもミスマッチせずに標的転写物とハイブリッド形成することを意味する。本発明の他の実施形態では、s i R N A と標的転写物のターゲティング部分との間の 1 つまたは複数のミスマッチが存在し得る。完全に相補的ではない本発明のほとんどの実施形態では、一般に、任意のミスマッチを s i R N A 末端またはその付近に位置付けることが好ましい。

【 0 0 3 3 】

用語「短ヘアピン R N A 」は、R N A i の媒介に十分な長さの（典型的には、少なくとも 1 9 塩基対長）二本鎖（二重鎖）構造を形成するためにハイブリダイズしたかハイブリッド形成することができる少なくとも 2 つの相補部分およびループを形成する典型的には約 1 ヌクレオチドと 1 0 ヌクレオチドとの間の少なくとも 1 つの一本鎖部分を含む R N A 分子をいう。二重鎖部分は、1 つまたは複数の非対合ヌクレオチドからなる 1 つまたは複数のバルジを含み得るが典型的には含まない。以下にさらに記載するように、s h R N A は、保存された細胞 R N A i 機構によって s i R N A にプロセシングされると考えられる。したがって、s h R N A は、s i R N A の前駆体であり、一般に、同様に標的転写物の発現を阻害することができる。

【 0 0 3 4 】

本明細書中で使用される、用語「特異的結合」は、標的ポリペプチド（または、より一般的には標的分子）と抗体、リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストなどの結合分子との間の相互作用をいう。相互作用は、典型的には、結合分子によって認識される抗原判定基またはエピトープなどの標的ポリペプチドの特定の構造特徴の存在に依存する。例えば、抗体がエピトープ A に特異的である場合、エピトープ A を含むポリペプチドの存在または遊離の標識された A およびその抗体の両方を含む反応における遊離の非標識 A の存在により、抗体に結合する標識された A の量が減少する。特異性は、絶対ではないが、一般に、結合する状況をいうと理解すべきである。例えば、多数の抗体が標的分子中に存在するエピトープに加えて、他のエピトープと交差反応することが当該分野で周知である。このような交差反応は、抗体が使用される適用に依存して許容可能である。当業者は、任意の所与の適用（例えば、治療目的などのための標的分子の検出のため）において適切に実施するために十分な特異性を有する抗体を選択することができる。標的ポリペプチドの結合分子の親和性に対する他の標的（例えば、競合物）の結合分子の親和性などのさらなる要因の状況で評価することができるとも理解すべきである。結合分子が検出が所望される標的分子に対して抗親和性を示し、且つ非標的分子に対して低親和性を示す場合、抗体は、免疫診断目的のための許容可能な試薬である可能性が高い。1 つまたは複数の状況で一旦結合分子の特異性が確立すると、その特性を再評価することなく他の（好ましくは、類似の）状況で使用することができる。

【 0 0 3 5 】

本明細書中で使用される、用語「被験体」とは、感染性因子に感染しやすい個体（例えば、インフルエンザウイルスなどのウイルスに感染しやすい個体）をいう。この用語には、トリおよび動物（例えば、家禽類および家畜（ニワトリ、哺乳動物（ブタ、ウマ、イヌ、ネコなど）などが含まれる）、野生動物、非ヒト霊長類、およびヒト）が含まれる。

【 0 0 3 6 】

s i R N A もしくは s h R N A または s i R N A もしくは s h R N A の配列は、1) 標的転写物の安定性が、その非存在下での場合と比較して s i R N A または s h R N A の存在下で減少する場合、および / または 2) s i R N A または s h R N A が、少なくとも約 1 5 、より好ましくは少なくとも約 1 7 、さらにより好ましくは少なくとも約 1 8 または 1 9 から約 2 1 ~ 2 3 個のヌクレオチドのストレッチについての標的転写物と少なくとも 9 0 % 、より好ましくは少なくとも約 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % 正確な配列相補性を示す場合、および / または 3) s i R N A の 1 つの鎖または s h R N A の自己相補部分の 1 つが、インビトロで小 (5 0 ヌクレオチド未満) R N A 分子のストリンジェントなハイブリッド形成条件下およ

10

20

30

40

50

び／または哺乳動物の細胞質もしくは核内で典型的に見出される条件下で標的転写物とハイブリッド形成する場合に本明細書中に記載の目的のための標的転写物にターゲティングされたものと見なされる。細胞内でのその存在により転写物にターゲティングした si RNA または sh RNA が産生される RNA 誘導性ベクターも標的転写物にターゲティングされると見なされる。転写物のターゲティング効果は転写物の合成を指示する遺伝子の発現を減少または阻害することであるため、遺伝子自体（すなわち、ゲノム DNA）が、 si RNA、 sh RNA、または細胞サイレンシング機構の構成要素と相互作用しないと考えられる場合でさえ、転写物にターゲティングされた si RNA または sh RNA も転写物の合成を指示する遺伝子をターゲティングすると見なす。したがって、本明細書中で使用されるように、転写物をターゲティングする si RNA、 sh RNA、または RNAi 誘導性ベクターは、転写物合成のためのテンプレートを提供する遺伝子をターゲティングすると理解される。
10

【 0 0 3 7 】

本明細書中で使用される、「治療」には、疾患、障害、もしくはこのような用語が適用される病態、またはこのような疾患、障害、もしくは病態の 1 つまたは複数の徵候もしくは発症の進行の逆転、緩和、阻害、または可能性の防止もしくは減少が含まれる。

【 0 0 3 8 】

一般に、用語「ベクター」とは、細胞への第 2 の核酸分子の侵入（例えば、導入、輸送など）を媒介することができる核酸分子をいう。導入された核酸は、一般に、ベクター核酸分子と連結される（例えば、挿入される）。ベクターは、自律複製を指示する配列を含み得るか、宿主細胞 DNA への組み込みに十分な配列を含み得る。有用なベクターには、例えば、プラスミド（典型的には DNA 分子であるが、 RNA プラスミドも公知である）、コスミド、およびウイルスベクターが含まれる。当該分野で周知なように、用語「ウイルスベクター」は、典型的には核酸分子の導入もしくは組み込みを容易にするウイルス由来の核酸エレメントを含む核酸分子（例えば、プラスミド）または核酸導入を媒介するウイルスもしくはウイルス粒子（例えば、レトロウイルスまたはレンチウイルスが含まれる）のいずれかをいうことができる。当業者に自明なように、ウイルスベクターは、核酸に加えて種々のウイルス構成要素を含み得る。
20

【 0 0 3 9 】

（本発明の一定の好ましい実施形態の詳細な説明）
30

（ I . インフルエンザウイルスの生活環および特徴 ）

インフルエンザウイルスは、オルトミクソウイルス科のエンベロープで包まれたマイナス鎖の RNA ウィルスである。これらは、インフルエンザ A 型、 B 型、および C 型に分類され、インフルエンザ A は病原性が最も高く、動物株内で再集合を受けることができる唯一の型と考えられている。インフルエンザ A 型、 B 型、および C 型を、その核タンパク質および基質タンパク質の相違によって区別することができる（図 1 を参照のこと）。以下でさらに考察されるように、インフルエンザ A サブタイプを、その血球凝集素（ HA ）およびノイラミニダーゼ（ NA ）遺伝子の変化によって定義し、通常、対応するタンパク質に結合する抗体によって区別する。
40

【 0 0 4 0 】

インフルエンザ A ウィルスゲノムは、 8 つの RNA セグメント中に分布した 10 個の遺伝子からなる。遺伝子は、以下の 10 個のタンパク質をコードする：エンベロープ糖タンパク質血球凝集素（ HA ）およびノイラミニダーゼ（ NA ）、基質タンパク質（ M1 ）、核タンパク質（ NP ）、本明細書中でポリメラーゼまたはポリメラーゼ複合体とも呼ばれる RNA 依存性 RNA 転写酵素の構成要素である 3 つのポリメラーゼ（ PB1 、 PB2 、および PA ）、イオンチャネルタンパク質（ M2 ）、および非構造タンパク質（ NS1 および NS2 ）。インフルエンザ A ウィルスおよびその分子病原性については、 J u l k u n e n , I . , et al . , C y t o k i n e a n d G r o w t h F a c t o r R e v i e w s , 12 : 171 - 180 , 2001 を参照のこと。 F i e l d s , B . , et al . , F i e l d s ' V i r o l o g y , 4 . e d . , P h i l a d e l p h 50

ia : Lippincott Williams and Wilkins ; ISBN : 0781718325, 2001も参照のこと。さらなる詳細については、インフルエンザBウイルスゲノムの組織化は、インフルエンザAのそれと非常に類似しているが、インフルエンザCウイルスゲノムは、7個のRNAセグメントを含み、NA遺伝子を欠く。

【0041】

インフルエンザAウイルス分類は、血球凝集素(H1~H15)およびノイラミニダーゼ(N1~N9)遺伝子に基づく。世界保健機関(WHO)の命名法により、各ウイルス株を各株をその期限となる動物宿主(ヒトでない場合に指定する)、地理的起源、株数、単離年、ならびにHAおよびNAの抗原についての説明によって定義する。例えば、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)は、1934にプエルトリコでヒトで発生したA株の単離物8を示し、且つHAおよびNAの抗原のサブタイプ1を有する。別の例として、A/Chicken/Hong Kong/258/97(H5N1)は、1997年にホンコンでニワトリで発生したA株の単離物258を示し、且つHAのサブタイプ5およびNAのサブタイプ1を有する。ヒトでの流行は、HAのH1、H2、およびH3型およびNAのN1型およびN2型を有するウイルスに起因した。

【0042】

上記のように、インフルエンザウイルスAにおいて2つの主な機構によって遺伝子が変化する。点変異を介して遺伝的浮動が起こり、これは、宿主免疫応答由来の選択圧によって抗原的に有意な位置でしばしば起こり、遺伝的シフト(*genetic shift*)（再集合ともいう）は、1つのサブタイプの全ウイルスゲノムセグメントから別のものへの置換を含む。多数の異なる動物種型(ヒト、ブタ、トリ、ウマ、水生動物などが含まれる)が、インフルエンザAウイルスで感染されるようになり得る。いくつかのインフルエンザAウイルスは、特定の種に限定され、通常、他の種に感染しない。しかし、いくつかのインフルエンザAウイルスは、いくつかの異なる動物種(主にトリ(特に渡り鳥)、ブタ、およびヒト)に感染し得る。この能力は、インフルエンザAウイルスの主な抗原不連続変異を担うと見なされる。例えば、ブタがヒト由来のインフルエンザAウイルスに感染するようになると、同時にアヒル由来の異なるインフルエンザAウイルスに感染するようになる。2つの異なるウイルスがブタ細胞で再生される場合、ヒト株およびアヒル株の遺伝子を「混合」することができ、RNAセグメントの固有の組み合わせを有する新規のウイルスが得られる。このプロセスは、遺伝子の再集合と呼ばれる。(遺伝子再集合型は、減数分裂時に染色体間で起こる遺伝情報の交換と異なることに留意のこと。)

他のウイルスおよび一定の細菌種と同様に、インフルエンザウイルスは細胞内で複製される。インフルエンザAウイルスは、上気道の上皮細胞で複製される。しかし、単球/マクロファージおよび他の白血球にも感染することができる。シアル酸含有細胞表面糖タンパク質を含む多数の他の細胞型は、ウイルスが受容体としてこれらの分子を使用するため、インビトロで感染しやすい。

【0043】

インフルエンザA感染/複製サイクルを、図1に示す。図1Aに示すように、インフルエンザAビリオン100は、以下のマイナス鎖RNAセグメントからなるゲノム101を含む：PB2(102)、PB1(103)、PA(104)、HA(105)、NP(106)、NA(107)、M(108)、およびNS(109)。従来は以下のように1~8の番号を付けていた：PB2=1、PB1=2、PA=3、HA=4、NP=5、NA=6、M=7、およびNS=8。ゲノムRNAセグメントは、エンベロープ糖タンパク質HA(140)およびNA(150)の細胞外ドメインならびにイオンチャネルM2(160)が突き出した脂質二重層130に囲まれた膜タンパク質M1(120)の膜内にパッケージングされている。RNAセグメント(102~108)は、核タンパク質MP(170)で覆われており(図15により詳細に図示する)、ポリメラーゼPB1、PB2、およびPAからなるウイルスポリメラーゼ複合体180を含む。非構造タンパク質NS1(示さず)は、感染細胞内で発見される。非構造タンパク質NS2 190もまた、ビリオン内で発見される。

10

20

30

40

50

【0044】

図1Bは、インフルエンザウイルスのゲノム構造およびインフルエンザゲノムから作製した転写物を示す(大きさを考慮しない)。8個のゲノムRNAセグメントのうちの6個(PB1(102)、PB2(103)、PA(104)、HA(105)、NP(106)、NA(107))はそれぞれ対応するタンパク質をコードする1つの非スプライシング転写物のテンプレートとして作用する。以下の3つのmRNA転写物は、インフルエンザAセグメントM(108)に由来すると同定された: M₁ タンパク質をコードする共線的(*co linear*)転写物191、M₂ タンパク質をコードし、且つ689個のヌクレオチドインtronを含むスプライシングmRNA(192)、およびウイルス感染細胞で検出されなかった9アミノ酸ペプチド(M3)をコードする能力を有する別のスプライシングmRNA(193)。以下の2つのmRNA転写物は、インフルエンザウイルスAセグメントNSに由来する: NS₁ タンパク質をコードする非スプライシングmRNA(194)およびNS₂ タンパク質をコードし、且つ473ヌクレオチドインtronを含むスプライシングmRNA(195)。

【0045】

感染サイクル(図2)は、ビリオン100がその血球凝集素を介してシアル酸含有細胞表面タンパク質との相互作用によって感染しやすい細胞の表面に攻撃した場合に開始される。攻撃されたウイルスは、クラスリン依存性エンドサイトーシスを介して被覆小胞にエンドサイトーシスされる。エンドソームの低pHにより、ウイルスとエンドソーム膜との融合を誘発し、それによりウイルスリボ核タンパク質(vRNP)複合体(ヌクレオキヤプシド)210が細胞質に遊離する。ウイルスヌクレオキヤプシドが細胞核にインポートされ、その後PB1、PB2、およびPAポリメラーゼからなるウイルスRNAポリメラーゼ複合体によって一次ウイルスmRNA合成が開始される。宿主細胞前mRNAに対するPB2タンパク質のエンドヌクレアーゼ活性によって產生されたプライマーを使用して、テンプレートとしてウイルスRNA(vRNA)220を使用したウイルスmRNA合成を開始する。PB1タンパク質は、細胞質に輸送されて翻訳されるウイルス特異的mRNA230の合成を触媒する。

【0046】

新規に合成されたポリメラーゼNP、NS1、およびNS2は核に輸送され、複製および二次ウイルスmRNA合成を調節する。ウイルスRNA(vRNA)由来の相補RNA(cRNA)の合成は、PB1、PB2、PA、およびNPによって開始され、その後新規のvRNA分子(250)が合成される。ウイルスポリメラーゼ複合体は、二次mRNA(260)の合成のためのテンプレートとしてこれらのvRNAを使用する。したがって、ウイルスコード転写酵素によるvRNAの転写により、ウイルスタンパク質合成のためのテンプレートとして作用するmRNAが產生され、5'キャップおよび3'ポリAテールの欠如がmRNAと異なり、且つ新規のビリオン產生のためにより多くのvRNAを合成するためのテンプレートとして作用する相補RNA(cRNA)も產生される。感染後期では、NS1タンパク質は、MおよびNSのmRNAのスプライシングを調節し、それによりM2およびNS2のmRNAが產生される。ウイルスマRNAが細胞質に輸送され、ウイルス構造タンパク質270が產生される。タンパク質PB1、PB2、PA、およびNPが核(vRNA複合体(ヌクレオキヤプシド)280のアセンブリ部位)に輸送される。M1およびNS2タンパク質は核にも輸送されるため、これらはvRNPと相互作用してその核輸送を調節する。ウイルスvRNA-M1タンパク質複合体は、原形質膜でHAおよびNA分子の細胞質部分と相互作用し、成熟ビリオンが出芽し、ウイルス粒子が放出される。

【0047】

インフルエンザAウイルスは細胞内で急速に複製され、細胞溶解効果またはアポトーシスによって宿主細胞が死滅する。感染により広範な種々の細胞活動およびプロセスが変化する(宿主細胞遺伝子発現の阻害が含まれる)。ウイルスポリメラーゼ複合体は、核内で新規に合成された細部ポリメラーゼII転写物に結合して切断する。NS1タンパク質は

、細胞前mRNAスプライシングを遮断し、宿主mRNAの核輸送を阻害する。細胞mRNAの翻訳が非常に阻害されるのに対し、ウイルスマRNAは有効に翻訳される。細胞インターフェロン(IFN)応答(典型的にはウイルス感染細胞における翻訳を阻害するように作用する宿主応答)のウイルス下方制御によってウイルスマRNAの有効な翻訳が一部維持される。特に、ウイルスNS1タンパク質は、IFN誘導性PKRに結合し、その活性を阻害する。したがって、インフルエンザウイルスの感染により細胞生合成において著しく変化する(細胞mRNAのプロセシングおよび翻訳の変化が含まれる)ことが明らかである。

【0048】

10 感染細胞は、ウイルスの蔓延を制限するための多数の方法で応答する。いくつかの転写因子系(核因子B(NFB)、活性化タンパク質(AP)-1、インターフェロン調節因子、シグナル伝達因子、および転写アクチベーター(STAT)、および核因子-IL-6などが含まれる)が活性化される。これらの転写因子経路の活性化により、炎症細胞の感染部位への移動を刺激し、多数の抗ウイルス効果を発揮し、ウイルス感染に対する免疫応答の役割を果たす化学走性、炎症性、および抗ウイルス性のサイトカインが得られる。I型(IFN- /)、RANTES、MCP-1、およびIL-8は、インフルエンザAウイルス感染上皮細胞によって産生されたサイトカインのうちの1つである。インフルエンザAウイルス感染単球/マクロファージにより、種々のさらなるサイトカイン(MIP-1 / 、MIP-3 、MCP-1、MCP-3、IP-10、IL-1 、IL-6、TNF- 、およびIL-18)が産生される。

20

20

【0049】

一般に、インフルエンザAウイルス感染から約20~40時間後に、ウイルス複製、ウイルス粒子の産生、ウイルスタンパク質合成の継続、および宿主タンパク質合成の遮断の結果として細胞の細胞溶解死が起こる。アポトーシスに特徴的な変化(例えば、クロマチン凝縮、DNA断片化、細胞収縮、およびマクロファージによるアポトーシス細胞のクリアランス)も明らかである。

【0050】

(II.siRNAの選択、設計、および合成)

本発明は、1つまたは複数のインフルエンザウイルス転写物にターゲティングされたsiRNAおよび/またはshRNAを含む組成物を提供する。上記のインフルエンザウイルス複製サイクルの説明として、種々のウイルスRNA転写物型(一次および二次vRNA、一次および二次ウイルスマRNA、ならびにウイルスのRNA)がインフルエンザウイルスに感染された細胞内に存在し、ウイルスの生活環で重要な役割を果たすことを証明する。任意のこれらの転写物は、本発明の直接または間接的機構のいずれかによるsiRNA媒介阻害の適切な標的である。任意のウイルスマRNA転写物をターゲティングするsiRNAおよびshRNAにより、直接的様式で(すなわち、転写物の分解によって)転写物自体のレベルが減少する。さらに、以下で考察するように、一定のウイルス転写物(例えば、NA、PA、PB1)をターゲティングするsiRNAおよびshRNAにより、特異的にターゲティングされないウイルス転写物のレベルが間接的に減少する。別のスプライシングが可能な状況では、M₁およびM₂をコードするmRNAならびにNS₁およびNS₂をコードするmRNAに関して、非スプライシング転写物またはスプライシング転写物は、標的転写物として作用し得る。

30

40

【0051】

本発明のRNAiベースの治療のための標的として作用し得る潜在的なウイルス転写物には、例えば、1)任意のインフルエンザウイルスゲノムセグメント、2)タンパク質PB1、PB2、PA、NP、NS₁、NS₂、M1、M2、HA、またはNAをコードする転写物を含む任意のウイルスタンパク質をコードする転写物が含まれる。認識されるように、転写物を、1つのsiRNAまたはshRNAによってそのvRNA、cRNA、および/またはmRNA形態にターゲティングすることができるが、以下でさらに考察するように、本発明者らは、ウイルスマRNAが唯一または主なRNAiの標的であるこ

50

とが示唆されるデータを得た。

【0052】

選択された任意の特定の遺伝子標的のために、本発明で使用するための s i R N A または s h R N A の設計は、一定のガイダンスに従うことが好ましい。一般に、ウイルスに特異的であり（宿主と比較して）、且つ好ましくはウイルス機能に重要または不可欠な配列をターゲティングすることが望ましい。一定のウイルスゲノム、特に H A および N A をコードする遺伝子は高変異率によって特徴付けられ、且つ変異を許容することができるにもかかわらず、一定の領域および / または配列は保存される傾向がある。本発明の一定の実施形態によれば、このような配列は特に適切な標的であり得る。以下にさらに記載するように、このような保存領域を、例えば、文献の再検討および / またはインフルエンザ遺伝子配列の比較（そのうちの多数が公的に利用可能である）によって同定することができる。また、多くの場合、本発明の細胞に送達される因子は、活性な抑制因子（s u p p r e s s i n g a g e n t ）となる前に 1 つまたは複数のプロセシング工程を受け得る（さらなる考察については以下を参照のこと）；この場合、当業者は、そのプロセシングに必要であり得る配列を含むように関連因子を設計することが好ましいと認識する。

10

【0053】

本発明者らは、本明細書中に記載の設計パラメーターを使用して選択した配列の有意な比率は、 s i R N A または s h R N A 中に含まれ、且つ下記のように試験した場合に有効な抑制配列であることを示すことを見出した。約 15 % の試験 s i R N A は高い効果を示し、インフルエンザウイルスの P R 8 または W S N 株のいずれかに感染した細胞におけるウイルス産生が阻害された；約 40 % が有意な効果を示した（すなわち、 P R 8 に感染した細胞および / または W S N に感染した細胞における s i R N A の存在下と非存在下との間のウイルス産生の統計的有意差（ p < 0.5 ））；約 45 % が効果なし、または最小の効果を示した。したがって、本発明は、少なくとも 2 つの異なるインフルエンザウイルスサブタイプのいずれかに感染した細胞のウイルス産生を阻害する s i R N A および s h R N A を提供する。

20

【0054】

本発明の s i R N A および s h R N A の一般的および特異的な特徴を本明細書中に記載する。短干渉 R N A (s i R N A) は、 W O 0 1 / 7 5 1 6 4 に記載のドロソフィラにおける R N A 干渉 (R N A i) 減少の研究において最初に発見された。特に、ドロソフィラでは、 D I C E R と呼ばれる R N A イーゼ I I I 様酵素 (B e r n s t e i n e t a l . , N a t u r e 4 0 9 : 3 6 3 , 2 0 0 1) によって長い二本鎖 R N A が 2 1 n t 鎮（それぞれ 5 ' リン酸基および 3 ' 水酸基を有し、且つ 2 n t - 3 ' 突出部に隣接した 1 9 n t の二重鎖領域が存在するように他の鎖と正確に相補的な 1 9 n t 領域を含む）から構成されるより小さな d s R N A にプロセシングされることが見出された。図 3 は、ドロソフィラで見出された s i R N A の略図を示す。この構造は、センス鎖 3 1 0 およびアンチセンス鎖 3 1 5 を含む 1 9 ヌクレオチド二本鎖 (D S) 部分 3 0 0 を含む。各鎖は、 2 n t の 3 ' 突出部を有する。

30

【0055】

おそらく、ヘリカーゼ活性により s i R N A 中の 1 9 b p 二重鎖が解かれ、 s i R N A の 1 つの鎖と標的転写物との間に別の二重鎖が形成されるため、これらの単 d s R N A (s i R N A) は、 d s R N A 鎮の 1 つに相補的な領域を含む任意の遺伝子の発現をサイレンシングするように作用する。次いで、この新規の二重鎖は、標的 R N A をエンドヌクレアーゼ複合体 (R I S C) にガイドし、 1 つの位置で切断（「スライス」）されて細胞機構によって即座に分解される非保護 R N A 末端が得られる（図 4 ）。下記のように、単 R N A 種（ミクロ R N A ）によって媒介されるさらなるサイレンシング機構も公知である（例えば、 R u v k u n , G . , S c i e n c e , 2 9 4 , 7 9 7 - 7 9 9 , 2 0 0 1 ; Z e n g , Y . , e t a l . , M o l e c u l a r C e l l , 9 , 1 - 2 0 , 2 0 0 2 を参照のこと）。機構およびこれらを示した図の考察は、本発明の作用機構にいかなる制限も与えないことを意図することに留意のこと。

40

50

【0056】

ヒトからC. エレガンスまでの範囲の種々の種でDICE R 酵素のホモログが見出されており(Sharp, Genes Dev. 15; 485, 2001; Zamore, Nat. Struct. Biol. 8: 746, 2001)、RBAbi様機構が種々の異なる細胞型(哺乳動物細胞、さらにはヒト細胞)での遺伝子発現をサイレンシングすることができる可能性が高まっている。しかし、長dsRNA(例えば、約30~50ヌクレオチドより長い二本鎖領域を有するdsRNA)は、哺乳動物細胞中でインターフェロン応答を活性化することが公知である。したがって、ドロソフィラRNAi機構を使用して認められた特異的遺伝子サイレンシングの達成よりもむしろ、哺乳動物細胞中の長dsRNAの存在により、インターフェロンに媒介されて非特異的に翻訳が抑制され、おそらく細胞が死滅する。したがって、長dsRNAは、哺乳動物細胞における特定の遺伝子発現の阻害に有用であると考えられない。

【0057】

しかし、本発明者らおよび他は、siRNAは、哺乳動物に移入した場合、標的遺伝子(ウイルス遺伝子が含まれる)の発現を有効に減少させることができることを見出した。本発明者らは、種々のインフルエンザウイルスRNA(RNA依存性RNA転写酵素および核タンパク質NPをコードするRNAが含まれる)にターゲティングされたsiRNAにより、感染哺乳動物細胞で產生されるウイルスレベルが劇的に減少したことを示した(実施例2、4、5、6)。本発明者らは、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされたsiRNAがインタクトな生物(すなわち、インフルエンザウイルスに感染したニワトリ胚)においてインビボでインフルエンザウイルスの複製を阻害することができるることも示した(実施例3)。さらに、本発明者らは、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされたsiRNAがウイルス感染前後に投与した場合にマウスでのウイルス產生を阻害することができることを証明した(実施例12および14)。さらに、本発明者らは、siRNA前駆体(shRNA)を発現することができるDNAベクターの投与によりマウスにおけるインフルエンザウイルス產生を阻害することができることを示した。したがって、本発明は、siRNA、shRNAまたは細胞内でのその存在によりsiRNAもしくはshRNAが発現されるベクターでの投与はインフルエンザウイルスの感染および/または複製の阻害のための有効なストラテジーであることを証明する。

【0058】

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、本発明者らは、この所見が、上記のインフルエンザウイルスの感染によって生じる細胞活性(例えば、代謝活性および生合成活性)の著しい変化に照らして特に有用であると示唆する。インフルエンザウイルス感染は、細胞mRNAのスプライシング、輸送、および翻訳のような基本的細胞プロセスを阻害し、それにより細胞タンパク質合成を阻害する。これらの変化にもかかわらず、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされたsiRNAはウイルス複製を阻害するという所見により、遺伝子発現のRNAi媒介阻害の基礎をなす細胞機構はインフルエンザ遺伝子発現の阻害に十分なレベルでインフルエンザウイルスに感染した細胞で操作しつづけると示唆される。

【0059】

本発明で使用するための好ましいsiRNAおよびshRNAは、約19nt長の塩基対合領域を含み、必要に応じて1つまたは複数の遊離またはループ状の末端を有し得る。例えば、図5は、本発明のsiRNAまたはshRNAとして使用することができる種々の構造を示す。図5Aは、上記のドロソフィラ系で活性であることが見出された構造を示し、哺乳動物細胞中で活性なsiRNA種を示し得る。本発明は、インフルエンザ感染を治療または防止するための哺乳動物細胞に図5Aに記載の構造を有するsiRNAの投与を含む。しかし、投与した因子がこの構造を有する必要はない。例えば、投与した因子がインターフェロン応答などの望ましくないまたは有害な事象を引き起こさない限り、投与した組成物はインビボで図5Aの構造にプロセシングすることができる任意の構造を含み得る。(siRNAまたはshRNAの合成、プロセシング、または活性に関して本明細

10

20

30

40

50

書中に使用される、用語「インビボ」は、一般に、無細胞系と対照的に細胞内で起こる事象をいうことに留意のこと。一般に、細胞を組織培養物中に保存することができるか、インタクトな生物の一部であり得る。) 本発明はまた、このような因子が本明細書中に考察したウイルス転写物レベルを大幅に減少させる限り、図 5 A に示す構造に正確にプロセシングされない因子の投与を含み得る。

【 0 0 6 0 】

図 5 B および 5 C は、RNA 干渉を媒介するために使用することができるさらなる構造を示す。これらのヘアピン(ステム-ループ)構造は、阻害 RNA として直接機能することができるか、図 5 A などの si RNA 構造を得るために細胞内でプロセシングスすることができる。図 5 B は、互いにハイブリッド形成してステム 400、ループ 410、および突出部 320 として示す二重鎖領域を形成する 2 つの相補領域を含む RNA 分子を含む因子を示す。このような分子を自己ハイブリッド形成するといい、この種の構造を sh RNA という。好ましくは、ステムは約 19 bp 長であり、ループは約 1 ~ 20 nt 長、より好ましくは 4 ~ 10 nt 長、最も好ましくは約 6 ~ 8 nt 長であり、そして / あるいは突出部に関しては、約 1 ~ 20 nt、より好ましくは 2 ~ 15 nt 長である。本発明の一定の実施形態では、ステムは、最小で 19 ヌクレオチド長であってよく、約 29 ヌクレオチド長までであってよい。当業者は、4 ヌクレオチドまたはそれ以上のループはより短いループよりも立体障害に供する可能性が低いため、好ましいと認識する。いくつかの実施形態では、突出部は 5' リン酸基および 3' 水酸基を含む。以下で考察されるように、図 5 B に示す構造を有する因子を、インビボまたはインビトロ転写によって容易に作製することができる；いくつかの好ましい実施形態では、突出部中に転写物テールを含み、それによりしばしば突出部は、例えば 1 U 残基と 5 U 残基との間に複数の U 残基を含む。哺乳動物系で研究した合成 si RNA はしばしば 2 個の突出部 U 残基を有することに留意のこと。sh RNA 構造の例については、図 20 および 21 も参照のこと。その阻害が所望される標的転写物に相補的な領域(すなわち、sh RNA のアンチセンス部分)の 5' 末端または 3' 末端のいずれかにループを位置付けることができる。

【 0 0 6 1 】

図 5 C は、約 19 bp 長のステム 400 の形成に十分な相補エレメントを含む RNA サークルを含む因子を示す。このような因子は、本明細書中に記載の種々の他の si RNA と比較して改良された安定性を示すことができる。

【 0 0 6 2 】

si RNA の説明では、si RNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖をいうことが都合がよい場合が多い。一般に、以下でさらに考察するように、si RNA のセンス鎖の二重鎖部分の配列は、標的転写物のターゲティングされた部分と実質的に同一であるが、si RNA のアンチセンス鎖はこの領域中の標的転写物と実質的に相補的である。sh RNA が自己ハイブリッド形成する 1 つの RNA 分子を含むにもかかわらず、得られた二重鎖構造はセンス鎖およびアンチセンス鎖またはその一部を含むと見なすことができると認識される。したがって、アンチセンス鎖またはその一部が二重鎖を形成するか形成することができ、且つ実質的に標的転写物のターゲティング部分に相補的であり、センス鎖またはその一部が二重鎖を形成するか形成することができ、且つ実質的に標的転写物のターゲティング部分に配列が相補的である場合、sh RNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖またはセンス部分およびアンチセンス部分をいうことが本明細書中で都合がよい。

【 0 0 6 3 】

説明のために、以下の考察では、si RNA または sh RNA よりもむしろ si RNA をいうことが多い。しかし、当業者に明らかなように、si RNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖に関連する技術は、一般に、対応する sh RNA のステム部分のセンス部分およびアンチセンス部分に適用可能である。したがって、以下の検討材料を本発明の sh RNA の設計、選択、および送達にも適用する。

【 0 0 6 4 】

図 5 に示す任意の構造または本明細書中に記載の任意の他の有効な構造を有する因子は

10

20

30

40

50

、全体が天然のRNAヌクレオチドから構成され得るか、その代わりに1つまたは複数のヌクレオチドアナログを含むことが当業者に認識される。広範な種々のこのようなアナログが当該分野で公知である；ホスホロチオエートが治療用核酸の研究で最も一般的に使用されている（ホスホロチオエートを使用した場合に関与する検討材料のいくつかの検討については、例えば、Agarwal, Birochim. Biophys. Acta 1489: 53, 1999を参照のこと）。特に、本発明の一定の実施形態では、例えば、エキソヌクレアーゼによる消化を減少させるために1つまたは複数の遊離鎖末端にヌクレオチドアナログの封入ことによってsiRNA構造を安定化させることが望ましい。1つまたは複数の遊離末端でのデオキシヌクレオチド（例えば、デオキシチミジンなどのピリミジン）の封入を本目的に使用することができる。あるいはまたはさらに、特にsiRNAの1つの鎖（またはshRNAのステム部分の1つの鎖）と標的転写物との相互作用によって形成される任意のハイブリッドと比較して19bpステムの安定性の増減させるために1つまたは複数のヌクレオチドアナログを含めることが望ましい。
10

【0065】

本発明の一定の実施形態によれば、siRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかで必要に応じて種々のヌクレオチド修飾を使用する。例えば、アンチセンス鎖で未修飾リボヌクレオチドを使用し、センス鎖のいくつかまたは全部の位置で修飾リボヌクレオチドおよび/または修飾もしくは未修飾デオキシリボヌクレオチドを使用することが好ましい。siRNAがウイルスmRNA、vRNA、および/またはcRNAをターゲティングするかどうかを判定するためのセンス鎖中のヌクレオチドの2'位を修飾したsiRNAの使用を記載した実施例5を参照のこと。本発明の一定の実施形態によれば、siRNAのアンチセンス鎖および/またはセンス鎖の二重鎖部分で未修飾リボヌクレオチドのみを使用し、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖の突出部は修飾リボヌクレオチドおよび/またはデオキシリボヌクレオチドを含み得る。本発明の一定の実施形態では、siRNA鎖の一方または両方は、1つまたは複数のOメチル化リボヌクレオチドを含む。
20

【0066】

多数のヌクレオチドアナログおよびヌクレオチド修飾物が当該分野で公知であり、ハイブリッド形成およびヌクレアーゼ耐性などの性質に対するその効果を調査した。例えば、塩基、糖、およびヌクレオシド間結合に対する種々の修飾を選択した位置のオリゴヌクレオチドに移入し、得られた効果を未修飾オリゴヌクレオチドと比較した。多数の修飾により、相補核酸とハイブリッド形成する能力、その安定性などのオリゴヌクレオチドの1つまたは複数の態様を変化させることができている。例えば、有用な2'修飾には、ハロ基、アルコキシ基、およびアリルオキシ基が含まれる。米国特許第、6,403,779号；同第6,399,754；同第6,225,460号；同第6,127,533号；同第6,031,086号；同第6,005,087号；同第5,977,089号、およびその引用文献は、本発明の実施で使用することができる広範な種々のヌクレオチドのアナログおよび修飾物を開示する。Crooke, S. (ed.) 'Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications' (1st ed.), Marcel Dekker; ISBN: 0824705661; 1st edition (2001)およびその引用文献も参照のこと。当業者によって認識されるように、アナログおよび修飾物を、ウイルス遺伝子の発現が有効に減少したものを選択するために、例えば、本明細書中に記載のアッセイまたは他の適切なアッセイを使用して試験することができる。siRNAの文脈で有用であることが見出された修飾のさらなる考察については、引用文献137~139を参照のこと。本発明は、このような修飾物の使用を含む。
30

【0067】

本発明の一定の実施形態では、アナログまたは修飾物により、吸収性が増加した（例えば、粘膜を透過する吸収性の増加、経口吸収の増加）、血流または細胞内での安定性が増加した、細胞膜の透過能力が増加したsiRNAなどが得られる。当業者によって認識されるように、アナログまたは修飾物によってTmを変化させることができ、それによりs
40

i R N A 配列と標的との間のミスマッチの耐性が増大させる一方でさらに有効に抑制することができるか、所望の標的転写物に対し特異的に安定性を増加または減少させることができる。

【 0 0 6 8 】

本発明で使用するための有効な s i R N A 分子がスクレオチドまたはスクレオチドアナログではない 1 つまたは複数の部分を含み得ることが当業者にさらに認識される。

【 0 0 6 9 】

一般に、本発明の s i R N A の 1 つの鎖は、好ましくは、標的転写物の一部で見出される領域と実質的に相補的な領域（「阻害領域」）を含み、その結果インビボで s i R N A の 1 つの鎖または一部（アンチセンス鎖）と標的転写物との間に正確なハイブリッドを形成することができる。s h R N A 構造を使用する本発明のこれらの実施形態では、この実質的に相補的な領域は、好ましくは、図 5 B に示すステム構造のほとんどまたは全部を含む。本発明の一定の実施形態では、s i R N A または s h R N A の関連阻害領域は、標的転写物と完全に相補的である；他の実施形態では、1 つまたは複数の非相補残基は s i R N A / テンプレート二重鎖内に存在する。s i R N A / テンプレート二重鎖の一定の部分中でのミスマッチを回避することが好ましい（例えば、E l b a s h i r e t a l . , E M B O J 2 0 : 6 8 7 7 , 2 0 0 1 (本明細書中で参考として援用される) を参照のこと）。

【 0 0 7 0 】

一般に、好ましい s i R N A は、標的転写物にエクソン配列を含む標的部位とハイブリッド形成する。イントロン配列とのハイブリッド形成は除外されないが、一般に、哺乳動物細胞では好ましくないようである。本発明の一定の好ましい実施形態では、s i R N A は、例外的にエクソン配列とハイブリッド形成する。本発明のいくつかの実施形態では、s i R N A は、1 つのエクソン内に唯一の配列を含む標的部位とハイブリッド形成する；他の実施形態では、一次転写物のスプライシングまたは他の修飾によって標的部位を作製する。一般に、転写物をスプライシングおよび分解する s i R N A とのハイブリッド形成に利用可能な任意の部位を、本発明にしたがって使用することができる。それにもかかわらず、当業者は、いくつかの例では、s i R N A ハイブリッド形成標的として標的転写物の特定の領域を選択することが望ましいことを認識する。例えば、分解されることが望ましくない他の転写物と共有し得る標的転写物の選択を回避することが望ましい。一般に、転写物のコード領域および 5' 末端よりも 3' 末端により近い領域が好ましい。

【 0 0 7 1 】

種々のアプローチにしたがって、s i R N A を選択することができる。一般に、上記のように、本発明の s i R N A は、好ましくは、標的転写物の一部（「標的部位」）で見出される領域と完全に相補的であるか実質的に相補的である領域（「阻害領域」または「二重鎖領域」）を含み、その結果インビボで s i R N A のアンチセンス鎖と標的転写物との間にハイブリッドを形成することができる。「コア領域」とも呼ばれるこの二重鎖領域は突出部を含まないと理解されているが、存在する場合、突出部はまた、標的転写物と相補的であり得る。好ましくは、図 3、4、および 5 に示す二本鎖構造のほとんどまたは全部を含む。s i R N A の関連阻害領域は、好ましくは標的転写物と完全に相補的である。しかし、1 つまたは複数の非相補残基を含む s i R N A もサイレンシングの媒介を示したが、阻害度は、標的転写物と完全に相補的な二重鎖部分を有する s i R N A を使用して達成可能な阻害度未満であり得る。一般に、s i R N A 二重鎖部分の 3' 側の半分のミスマッチにより s i R N A 二重鎖部分の 5' 側の半分のミスマッチよりも阻害効果があまり減少しないようである。

【 0 0 7 2 】

本明細書中の説明のために、s i R N A コア領域の長さは 1 9 ヌクレオチドであると予想され、1 9 ヌクレオチド配列は N 1 9 という。しかし、コア領域は、1 5 ~ 2 9 ヌクレオチド長の範囲であり得る。さらに、s i R N A のアンチセンス鎖のコア領域（すなわち、標的転写物と相補的な部分）が標的転写物と完全に相補的であるように s i R N A N

10

20

30

40

50

19 阻害領域を選択すると予想されるが、上記のように、1つまたは複数のミスマッチを許容することができる。一般に、古典的な経路を介した標的転写物の発現を減少させる最大の能力を有する siRNA が望ましい場合、二重鎖領域中のミスマッチを回避することが望ましい。しかし、下記のように、標的転写物の発現を減少する最大能力未満の siRNA を選択することが望ましいか、別の経路を介して作用する siRNA を使用することが望ましい。このような状況では、 siRNA の二重鎖部分に1つまたは複数のミスマッチを組み込むことが望ましい。一般に、好ましくは、阻害領域中の4個未満の残基または約15%未満の残基が標的とミスマッチする。

【0073】

いくつかの場合、全アンチセンス鎖（存在する場合、3'突出部を含む）が標的転写物と完全に相補的であるように siRNA 配列を選択する。しかし、突出部が必ずしも標的転写物と相補的であるか同一ではない。任意の所望の配列（例えば、UU）を、 siRNA のアンチセンスおよび / またはセンス 19 bp コア領域の 3' 末端に付加して 3' 突出部を作製することができる。一般に、1つまたは複数のピリミジン（通常、U、T、またはdT）を含む突出部を使用する。 siRNA の合成時、UよりもむしろTを使用するほうがより都合がよい一方で、TよりもむしろdTを使用して安定性を増加させることができる。上記のように、突出部の存在は選択的であり、存在する場合、標的配列自体といかなる関係も有する必要がない。 shRNA は1つのみの 3' 末端を有し、1つのみの 3' 突出部によりプロセシング前に siRNA を形成することが可能であることに留意のこと。

【0074】

まとめると、一般に、標的転写物中の適切な長さ（例えば、19 nt）の任意のコア領域の選択ならびにその配列がコア領域と実質的または完全に相補的なアンチセンス鎖およびその配列が siRNA のアンチセンス鎖と相補的なセンス鎖を有する siRNA の選択によって、 siRNA を設計することができる。次いで、上記などの 3' 突出部を、これらの配列に付加して siRNA 構造を作製することができる。したがって、アンチセンス鎖中の突出部が標的転写物と相補的であることまたはセンス鎖中の突出部が標的転写物中に存在する配列に対応する必要はない。一般に、従来通りに cDNA が U よりもむしろTを含むこと以外は、 cDNA のセンス鎖が mRNA と同一であるため、標的転写因子が mRNA である場合、 mRNA 配列自体よりもむしろ二本鎖 cDNA の対応する配列を参照して siRNA 配列を選択することができると認識される。（インフルエンザウイルス複製サイクルの文脈では、二本鎖 cDNA は作製されず、細胞中に存在する cDNA は一本鎖であり、ウイルス mRNA と相補的であることに留意のこと。）

全ての siRNA が任意の特定の標的遺伝子の発現の減少または阻害に等しく有効とは限らず（例えば、異なる siRNA の有効性の変動性を報告した Holen, T., et al., Nucleic Acids Res., 30 (8) : 1757-1766 を参照のこと）、種々の検討材料を使用して、選択した siRNA が有効である可能性を増加させることができる。例えば、イントロンよりもむしろエクソン内の標的部分を選択することが好ましい。一般に、標的転写物の 3' 末端付近の標的部分は、標的転写物の 5' 末端または中央付近の部分をターゲティングすることが好ましい。 Dharmac on Research, Inc., Lafayette, CO 80026 (RNA 試薬の販売業者) から市販されている Technical Bulletin #003 - Revision B, 'siRNA Oligonucleotides for RNAi Applications' に記載の原理に従って siRNA を設計することができる。 Dharmac on の Technical Bulletins #003 (ワールド・ワイド・ウェブ (www.dharmac on.com/tech/tech003B.html) でアクセス可能) および www.dharmac on.com/tech/tech004.html で利用可能な #004 は、 siRNA 設計パラメーター、合成などに関連する種々の情報を含み、本明細書中で参考として援用される。使用することができるさらなる設計の検討材料は、 Semizarov, D., et al., Pro

10

20

30

40

50

c . N a t l . A c a d . S c i . , V o l . 1 0 0 , N o . 1 1 , p p . 6 3 4 7 - 6
3 5 2 に記載されている。

【 0 0 7 5 】

本発明の 1 つの態様は、感染性因子の複数の株、サブタイプなど（集合的に変異型という）が存在する場合、異なる変異型の間で高度に保存された領域をターゲティングする s i R N A および s h R N A を選択および / または設計することがしばしば望ましいという認識である。特に、十分な数の配列の比較および高度に保存された領域の選択により、その二重鎖部分がこのような高度に保存された領域を含む 1 つの s i R N A を有する複数の変異型をターゲティングすることが可能である。一般に、このような領域は、 s i R N A の全二重鎖部分および必要に応じて 1 つまたは複数の 3 ' 突出部を含むのに十分な長さ（例えば、 1 9 ヌクレオチド）のはずであるが、二重鎖の全長よりも短い領域を使用することもできる（例えば、 1 5 、 1 6 、 1 7 、または 1 8 ヌクレオチド）。本発明の一定の実施形態によれば、配列間で同一の場合、領域は複数の変異型の間で高度に保存される。本発明の一定の実施形態によれば、変異型の間で多くとも 1 つのヌクレオチド（すなわち、 0 または 1 ヌクレオチド）が異なる場合、領域（ s i R N A の二重鎖部分に含めるべき長さの全て（例えば、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、または好ましくは 1 9 ヌクレオチド））は高度に保存されている。本発明の一定の実施形態によれば、変異型の間で多くとも 2 つのヌクレオチド（すなわち、 0 、 1 、または 2 ヌクレオチド）が異なる場合、このような領域は複数の変異型の間で高度に保存されている。本発明の一定の実施形態によれば、変異型の間で多くとも 3 つのヌクレオチド（すなわち、 0 、 1 、 2 、または 3 ヌクレオチド）が異なる場合、領域は複数の変異型の間で高度に保存されている。本発明の一定の実施形態によれば、 s i R N A は、少なくとも 5 個の変異型、少なくとも 1 0 個の変異型、少なくとも 1 5 個の変異型、少なくとも 2 0 個の変異型、少なくとも 2 5 個の変異型、少なくとも 3 0 個の変異型、少なくとも 4 0 個の変異型、もしくは少なくとも 5 0 個またはそれ以上の変異型の間で高度に保存されている領域をターゲティングする二重鎖部分を含む。

【 0 0 7 6 】

領域が複数の変異型組の間で高度に保存されているかどうかを判定するために、以下の手順を使用することができる。配列組の 1 つのメンバーを塩基配列（すなわち、他の配列と比較する配列）として選択する。典型的には、塩基配列の長さは、 s i R N A の二重鎖部分に所望される長さである（例えば、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、または好ましくは 1 9 ヌクレオチド）。本発明の異なる実施形態によれば、塩基配列は、比較される配列の 1 つであり得るか、例えば、各位置について組中の配列の間のその位置で最も頻繁に見出されるヌクレオチドの判定による由来するコンセンサス配列であり得る。

【 0 0 7 7 】

塩基配列が選択されると、複数の変異型組の各メンバーの配列を塩基配列と比較する。塩基配列間の相違数および配列の領域を超えた任意の数の複数の変異型組を使用して、塩基配列およびその数が目的の特定の領域を超えて高度に保存されているかどうかを判定する。上記のように、本発明の種々の実施形態では、 2 つの領域の間の配列相違数が 0 ; 0 もしくは 1 、 0 、 1 、もしくは 2 ; または 0 、 1 、 2 、もしくは 3 である場合、配列は高度に保存されていると見なす。相違が生じた位置で、塩基配列または他の配列の 1 つと同一の s i R N A 配列を選択することができる。一般に、塩基配列中に存在するヌクレオチドを選択する。しかし、本発明の一定の実施形態では、特に、比較される組中の第 2 の配列中の特定の位置に存在するヌクレオチドが塩基配列中のヌクレオチドよりも比較される配列中でより多く見出される場合、第 2 の配列と同一の s i R N A 配列を選択することができる。さらに、本発明の一定の実施形態によれば、相違が生じた位置のコンセンサスヌクレオチド（最も一般的に存在するヌクレオチド）が塩基配列中で見出されたものと異なる場合、コンセンサスヌクレオチドを使用することができる。これにより、比較した任意の配列と同一ではない配列を得ることに留意のこと（塩基配列としてコンセンサス配列の使用と同様）。

【 0 0 7 8 】

10

20

30

40

50

実施例1は、ヒト宿主起源の6つのインフルエンザA株由来の配列組の比較および異なる動物宿主（ヒトが含まれる）由来の7つのインフルエンザA株由来の配列組の比較を示す。高度に保存された領域の異なる選択方法を使用することができると理解すべきである。しかし、本発明は、どのようにして高度に保存された領域を選択するかに關係なく、その二重鎖領域（および必要に応じてs i RNA中に含まれる任意の突出部）が本明細書中に提供された基準を満たす高度に保存された領域に基づくs i RNAを含む。本発明は、本明細書中に記載の高度に保存された領域の基準を満たさないインフルエンザウイルス転写物の一部にターゲティングされたs i RNAを含むことも理解すべきである。このようなs i RNAは高度に保存された領域にターゲティングされたものよりも好ましくないが、その転写物がターゲティングされるウイルスのためのインフルエンザウイルス産生に対する依然として有効なインヒビターである。

【0079】

表1Aは、各ウイルス遺伝子セグメントにごとのインフルエンザウイルス配列組の間で高度に保存された21ヌクレオチド領域を列挙している。表1A中の配列を、Uの代わりにTを使用すること以外はウイルスmRNA中に存在する配列に従って5' 3'方向に列挙する。数字は、ウイルスゲノム中の配列の位置を示す。例えば、PB2-117/137は、セグメントPB2中の117位から137位に及ぶ配列を示す。本発明の一定の実施形態によれば、これらの配列の基づいてs i RNAを設計するために、s i RNAセンス鎖配列のコア領域としてヌクレオチド3~21を選択する。dTdTからなる2ntの3'突出部をそれぞれに付加する。対応するアンチセンス鎖として各配列のヌクレオチド1~21と相補的な配列を選択する。例えば、高度に保存された配列PA-44/64（すなわち、AATGCTTCAATCCGATGATTG（配列番号22））に基づいてs i RNAを設計する場合、配列TGCCTTCAATCCGATGATTG（配列番号109）を有する19ntのコア領域を選択する。dTdTからなる2nt3'の突出部を付加し、（TからUへの置換後に）配列5' - U G C U U C A A U C C G A U G A U U G d T d T - 3'（配列番号79）が得られる。これは、s i RNAセンス鎖の配列である。アンチセンスs i RNA鎖配列（5' 3'方向）は、配列番号22（すなわち、C A A U C A U C G G A U U G A A G C A d T d T（配列番号80））（TがdTに置換される2ntの3'突出部以外はTがUに置換されている）と相補的である。センスおよびアンチセンスs i RNA配列を、表1Aに列挙した各配列から簡単に得ることができる。20個のこのようなs i RNA配列を、表2に列挙する。

【0080】

表1Aに列挙した各配列は、19nt領域（nt3~21）および対応するs i RNAのセンス鎖中に存在しないがs i RNAのアンチセンス鎖の3'突出部と相補的な最初の2nt配列を含む。センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれかまたは両方に異なる3'突出部を有する種々のs i RNA分子を設計するために、19ntヌクレオチドを使用することができると認識される。表1Aに列挙した各配列中のヌクレオチド3~21は、左から右に5' 3'方向で列挙したs i RNAのセンス配列に対応する。対応するアンチセンス配列は、列挙した配列のヌクレオチド1~21と相補する。したがって、これらの配列を有するセンス鎖とアンチセンス鎖とのハイブリッド形成によって（センス鎖配列に3' OH突出部が付加され、両配列中でTがUに置換されている）、19塩基対のコア二重鎖領域（各鎖は2ヌクレオチドの3' OH突出部を有する）を有するs i RNAが得られる。しかし、上記説明によれば、表1Aに示した配列を使用して、この構造を正確に有さない種々のs i RNAを設計することができる。例えば、突出部配列を変化させることができ、突出部の1つまたは両方の存在は遺伝子配列の有効なs i RNA媒介阻害に不可欠ではないかもしれない。さらに、s i RNAの二重鎖部分の好ましい長さは19ヌクレオチドであり得るが、より短いまたはより長い二重鎖部分も有効であり得る。したがって、表1Aに示す高度に保存された配列にしたがって設計されたs i RNAは、s i RNAのセンス鎖中の3位と21位との間の領域中のこれらのヌクレオチドのいくつかのみを含み得る。（用語「between」に後に値の範囲がある場合、その範囲は終点を含むこと

10

20

30

40

50

に留意のこと)。

【0081】

表1Bは、インフルエンザウイルスの高度に保存された領域に基づいて設計したさらなるs i R N Aを列挙する。センス鎖およびアンチセンス鎖の両方を、5' 3'方向で示す。dTdT3'突出部を各鎖に付加する。表1Bに列挙した各センス鎖配列中のヌクレオチド1~19は、インフルエンザウイルス転写物の高度に保存された領域と同一の配列を有する。対応するアンチセンス配列は、センス鎖と相補的である。以下の説明のために、「高度に保存された領域」は、表1Aに列挙した任意の配列中のヌクレオチド3~21または表1Bに列挙した任意のセンス鎖のヌクレオチド1~19をいう。これらは、本発明のs i R N Aまたはs h R N A中で二重鎖形態で存在する。これらの領域の配列を、「高度に保存された配列」という。

【0082】

本発明は、表1Aおよび1Bに列挙した高度に保存された配列の全部または一部を含む配列を含むセンス鎖を有するs i R N Aを提供する。本発明は、さらに、表1Aおよび1Bに列挙した高度に保存された配列の全部または一部を含む配列を含むセンス部分を有するs h R N Aを提供する。簡単に述べれば、以下の考察は、s i R N Aを説明している。しかし、本発明は、s h R N Aのセンス部分が表1Aおよび1Bに列挙した高度に保存された配列の全部または一部を含む、対応するs h R N Aを含むと理解すべきである。

【0083】

一般に、表1Aまたは1Bに示す高度の保存された配列に従って設計されたs i R N Aのセンス鎖の配列は、列挙した高度に保存された配列の少なくとも10個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも12個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも17個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含む。一般に、表1Aまたは1Bに示す高度の保存された配列に従って設計されたs i R N Aのアンチセンス鎖の配列は、列挙した高度に保存された配列の一部と完全に相補的な少なくとも10個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも12個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも17個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含む。したがって、本発明は、相補的である標的転写物の一部に関して表1Aまたは表1B中の高度に保存された配列由来の1つまたは複数のヌクレオチド(例えば、9ヌクレオチドまで)を「シフトした」s i R N Aを含む。

【0084】

本発明の一定の実施形態では、表1Aまたは表1B中に示す高度に保存された配列にしたがって設計されたs i R N Aのセンス鎖の配列は、列挙された配列由来の1つのヌクレオチドの相違を有する高度に保存された配列の少なくとも10個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも12個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも17個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含む。本発明の一定の実施形態では、表1Aまたは表1B中に示す高度に保存された配列にしたがって設計されたs i R N Aのアンチセンス鎖の配列は、1つのヌクレオチドが相違している他は、高度に保存された配列の一部と完全に相補的である少なくとも10個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも12個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも17個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含む。

【0085】

本発明の一定の実施形態では、表1Aまたは表1B中に示す高度に保存された配列にしたがって設計されたs i R N Aのセンス鎖の配列は、列挙された配列由来の2つのヌクレオチドの相違を有する高度に保存された配列の少なくとも10個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも12個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも

10

20

30

40

50

15個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも17個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含む。本発明の一定の実施形態では、表1Aまたは表1B中に示す高度に保存された配列にしたがって設計されたs i R N Aのアンチセンス鎖の配列は、2つのヌクレオチドが相違し得る高度に保存された配列と相補的である少なくとも10個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも12個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも17個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含む。

【0086】

本発明の一定の実施形態によれば、s i R N Aは、少なくとも2つの異なる種の生物を天然に感染させた変異体で高度に保存された二重鎖を含む。本発明の一定の実施形態によれば、s i R N Aは、少なくとも2つの異なる種の生物を起源とする変異型で高度に保存された二重鎖部分を含む。本発明の一定の実施形態によれば、s i R N Aは、少なくとも3つの異なる種、少なくとも4つの異なる種、または少なくとも5つの異なる種を起源とする変異型で高度に保存された二重鎖部分を含む。種は、ヒト、ウマ(equine)(ウマ(horse))、トリ(例えは、アヒル、ニワトリ)、およびブタなどを含み得る。本発明の一定の好ましい実施形態では、種にはヒトが含まれる。多数の感染性因子の場合(例えは、多数の以前に同定されたインフルエンザAサブタイプ)、サブタイプの特定の種の宿主に感染する能力は公知である。さらに、多数のインフルエンザサブタイプ起源の種は、サブタイプの名称に影響を与えることが公知である。当業者は、感染性因子が任意の特定の宿主種に天然に感染するかどうか、および/または文献の再検討もしくはインフルエンザAウイルスのサブタイプに対して使用されている方法のいずれかによって因子の種の起源を判定することができる。異なる年数で単離した変異型および/または異なるN AおよびH Aサブタイプを発現する変異型を選択することも望ましい。例えは、実施例1に記載のs i R N A / s h R N Aの二重鎖部分の高度に保存された配列を選択するために使用された変異型は、ヒトおよび広範な異なる動物起源から単離した変異型を含んでいた。変異型は、異なる年数において単離したウイルスおよび公知のH AおよびN Aサブタイプのほとんど全てを発現するウイルスを含んでいた。

【0087】

本発明の一定の実施形態によれば、感染性因子は、そのゲノムは複数の独立した核酸セグメント(例えは、複数の独立したR N Aセグメント)を含む。一般に、二重鎖部分は、複数の変異型で高度に保存された少なくとも10個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも12個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含んでいた。好ましくは、二重鎖部分は、複数の変異型で高度に保存された少なくとも17個の連続したヌクレオチドを含んでいた。本発明の一定の実施形態によれば、二重鎖部分は、複数の変異型で高度に保存されている19個の連続したヌクレオチドを含む。二重鎖部分に加えて、s i R N Aは、1つまたは複数の鎖上に3'突出部を含み得る。s i R N Aのセンス鎖突出部は、標的領域の標的転写物の3'に存在する配列と同一であり得る(しかし、本発明の一定の実施形態によればその必要はない)。s i R N Aのアンチセンス鎖中の突出部は、標的転写物の標的部分の5'末端のすぐ近くのヌクレオチドと相補的であり得る(しかし、本発明の一定の実施形態によればその必要はない)。突出部は、本明細書中に記載の1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、またはそれ以上の長さであり得る。

【0088】

当業者は、s i R N Aは上記原理に従って融点(T m)および解離温度(T d)の範囲を示し得ると認識する。T mは、50%の核酸およびその完全な相補物が溶液中で二重鎖である温度と定義し、T dは、特定の塩濃度での温度と定義し、50%のオリゴヌクレオチドおよびその完全なフィルター結合相補物が二重鎖である全鎖濃度は、1つの分子がフィルター上に固定された条件に関する。当該分野で周知の方法(本明細書中の実施例に開示のs i R N Aに基づいた実験または適切な実験または理論に由来する方式のいずれか)

10

20

30

40

50

を使用して、許容可能な T_m の代表的な例を容易に判定することができる。

【0089】

実際の T_m を判定するための 1 つの共通の方法は、UV 分光光度計において恒温細胞 (thermostatted cell) を使用することである。吸光度に対して温度をプロットした場合、S 字カーブのプラトーが 2 箇所存在する曲線が見られる。プラトー間の中間を読み取った吸光度が T_m に相当する。Td の最も簡単な式は、Wallace の法則: $T_d = 2(A + T) + 4(G + C)$ (Wallace, R. B.; Shaffer, J.; Murphy, R. F.; Bonner, J.; Hirose, T.; Itakura, K., Nucleic Acids Res. 6, 3543 (1979)) である。固定化標的鎖の性質により、標的およびプローブの両方が溶液中で遊離している場合の値と比較して認められる T_m の正味の減少が得られる。減少の程度は約 7 ~ 8 である。1 倍のカチオンの濃度の適切な値の範囲内で pH 5 ~ 9 の 50 ヌクレオチドよりも長い配列に有用な DNA の別の有用な式は、 $T_m = 81.5 + 16.6 \log M + 41(XG + XC) - 500/L - 0.62F$ (式中、M は 1 倍のカチオンのモル濃度であり、XG および XC は配列中の G および C のモル比率であり、L は二重鎖中で最も短い鎖の長さであり、F はホルムアミドのモル濃度である) (Howley, P. M.; Israel, M. F.; Law, M.-F.; Martin, M. A., J. Biol. Chem. 254, 4876) である。RNA についての類似の式は、 $T_m = 79.8 + 18.5 \log M + 58.4(XG + XC) + 11.8(XG + XC)2 - 820/L - 0.35F$ であり、DNA - RNA ハイブリッドについては、 $T_m = 79.8 + 18.5 \log M + 58.4(XG + XC) + 11.8(XG + XC)2 - 820/L - 0.50F$ である。これらの式は、固定化された標的ハイブリッドに由来する。いくつかの研究は、最も近い近隣の相互作用についての熱力学的原理を使用して T_m の正確な式を有する。DNA および RNA の式は、 $T_m = (1000H)/A + AS + R1n(Ct/4) - 273.15 + 16.61n[Na^+]$ (式中、AH (Kcal/mol) は、ハイブリッドの最も近い近隣のエンタルピーの合計であり、A (eu) はヘリックス開始の修正を含む定数であり、S (eu) は最も近い近隣のエントロピーの合計であり、R は Gas 定数 ($1.987 \text{ cal deg}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) であり、Ct は鎖の総モル濃度である) である。鎖自体が相補的である場合、Ct/4 を Ct に置換する。熱力学的パラメーターについての値は、文献に記載のものを利用可能である。DNA については、Breslauer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3746 - 3750, 1986 を参照のこと。RNA:DNA 二重鎖については、Sugimoto, N., et al., Biochemistry, 34 (35): 11211-6, 1995 を参照のこと。RNA については、Freier, S. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 9373 - 9377, 1986. Rycklik, W., et al., Nucleic Acids Res. 18 (21), 6409 - 6412, 1990 を参照のこと。 T_m 計算のための種々のコンピュータプログラムは広範に利用可能である。例えば、URL www.basic.nwu.edu/bio/tools/oligocalc.html のウェブサイトを参照のこと。

【0090】

一定の siRNA は、3' UTR 配列を含むか完全にこれからなる標的部位とハイブリッド形成する。このような siRNA は、siRNA / テンプレート二重鎖中の非常に多数のミスマッチを許容することができ、特に二重鎖の中央領域内のミスマッチを許容することができる。例えば、1 つまたは両方の鎖は、図 6 に示すバルジを形成する 1 つまたは複数の「余剰の」ヌクレオチドを含み得る。典型的には、完全な相補性のストレッチは、少なくとも 5 ヌクレオチド長 (例えば、6、7、またはそれ以上のヌクレオチド長) であり、ミスマッチ領域は、例えば、1、2、3、または 4 ヌクレオチド長であり得る。標的転写物とハイブリダイズした場合、このような siRNA は、ミスマッチ領域によって分離された 2 つの完全な相補性ストレッチを頻繁に含む。種々の構造が可能である。例えば、siRNA は、複数の非同一性領域 (ミスマッチ) を含み得る。非同一性領域 (ミスマ

ツチ)は、対称である必要はない(すなわち、標的およびs i R N Aは共に非対称ヌクレオチドを含むことは必要でない)。

【0091】

いくつかのミスマッチは、3' UTR中のs i R N A /テンプレート二重鎖形成により古典的なR N A阻害に関連するが異なる機構によってテンプレート転写物によってコードされたタンパク質の発現を阻害することができる。特に、テンプレート転写物の3' UTRに結合するs i R N Aは、その安定性の減少よりもむしろ転写物の翻訳を減少させることができるということが示唆される証拠がある。具体的には、図6に示すように、上記で考察されたドロソフィラ系および種々の生物においてs i R N Aを作製するD I C E R酵素は、小さな一過性のR N A(s t R N A)基質を、標的転写物の3' UTR内で結合した場合に転写物の翻訳を遮断する因子にプロセシングすることもできる(G r i s h o k , A . , e t a l . , C e l l 1 0 6 , 2 3 - 2 4 , 2 0 0 1 ; H u t v a g n e r , G . , e t a l . , S c i e n c e , 2 9 3 , 8 3 4 - 8 3 8 , 2 0 0 1 ; K e t t i n g , R . , e t a l . , G e n e s D e v . , 1 5 , 2 6 5 4 - 2 6 5 9を参照のこと)。本発明の目的のために、本明細書中に記載の任意の部分的または全ての二本鎖単R N A(そのうちの1つの鎖が標的転写物に結合してその発現を減少させる(すなわち、転写レベルを減少させ、そして/または転写物によってコードされるポリペプチドの合成を減少させる))は、R N Aが分解の誘発、翻訳の阻害、または他の手段のいずれによるとかに關係なく、s i R N Aであると見なす。本発明の一定の好みの実施形態では、転写物の発現の減少は、転写物の分解を含む。さらに、このようなs i R N Aを作製するためインビボで(すなわち、細胞または生物内で)プロセシングすることができる任意の前駆体構造(例えば、本明細書中に記載される短ヘアピンR N A)は、本発明の実施で有用である。

【0092】

当業者は、本発明のR N A i誘導性因子を、任意の適用可能な技術(インビボまたはインビトロにおける化学合成、酵素、もしくは化学的分解、またはインビボまたはインビトロにおけるテンプレートの転写が含まれるが、これらに限定されない)に従って調製することができると容易に認識する。上記のように、本発明のR N A誘導性因子を、自己相補性部分を含む1つのR N A(すなわち、s i R N Aを得るために細胞内でプロセシングすることができるs h R N A)または互いにハイブリダイズした2つの鎖として送達することができる。例えば、2つの個別の21 n t R N A鎖を作製することができ(それぞれ互いに相補的な19 n t領域を含む)、各鎖をハイブリッド形成して図5Aに示される構造を作製することができる。

【0093】

あるいは、インビトロまたはインビボのいずれかでのプロモーターからの転写によって各鎖を作製することができる。例えば、2つの異なる転写可能な領域を含む構築物を得ることができ、それぞれ互いに相補的な19 n t領域を含む21 n t転写物を作製する。あるいは、2つの異なる転写物(それぞれ少なくとも部分的に互いに相補的である)ように位置付けた対立するプロモーターP 1およびP 2ならびにターミネーターt 1およびt 2を含む1つの構築物を使用することができる。

【0094】

別の実施形態では、本発明のR N A誘導性因子を、例えば、自己相補性領域をコードする1つの転写単位の転写によって1つの転写物として作製する。図8は、本発明のこのような実施形態を示す。示すように、第1および第2の相補性領域を含み、必要に応じてループ領域を含むテンプレートを使用する。このようなテンプレートを、プロモーター(および必要に応じて他の調節エレメント(例えば、ターミネーター))を適切に選択して、インビトロまたはインビボ転写のために使用することができる。本発明は、1つまたは複数のs i R N A鎖をコードする構築物を含む。

【0095】

種々の利用可能な系(例えば、P r o m e g a , C l o n e t e c h , N e w E n g l

10

20

30

40

50

and Biolabs から市販されている系)を使用してインピトロ転写を行うことができる。当業者に認識されるように、T7またはT3プロモーターの使用は、典型的には、5'末端に2つのG残基を有するsiRNA配列が必要であり、SP6プロモーターの使用は、典型的には、その5'末端にGA配列を有するsiRNA配列が必要である。T7、SP6、またはT3プロモーターを含むベクターは当該分野で周知であり、siRNAの転写を指示するために容易に修飾することができる。siRNAをインピトロで合成する場合、これらをトランスフェクションまたは被験体への送達前にハイブリッド形成させることができる。本発明のsiRNA組成物は完全に二重鎖(ハイブリダイズした)分子からなる必要はないと理解すべきである。例えば、siRNA組成物は、少量の一本鎖RNAを含み得る。例えば、ハイブリッド形成分子と非ハイブリッド形成分子との間の平衡の結果として、センスRNA鎖とアンチセンスRNA鎖との比の不均衡、自己相補性RNAの両方の部分の合成前の転写終結などのためにこれが起こり得る。一般に、好ましい組成物は、少なくとも約80%の一本鎖RNA、少なくとも約90%の一本鎖RNA、少なくとも約95%の一本鎖RNA、またはさらに少なくとも約99~100%の一本鎖RNAを含む。しかし、siRNA組成物は、有効であるのに十分な一本鎖RNAを含むという条件で80%未満のハイブリッド形成RNAを含み得る。

【0096】

当業者は、本発明のsiRNAまたはshRNA因子をインピボで作製する場合、一般に、1つまたは複数の転写単位の転写を介して產生することが好ましいと認識する。一次転写物を、遺伝子阻害を達成する最終因子を作製するために(例えば、1つまたは複数の細胞酵素によって)選択的にプロセシングすることができる。適切なプロモーターおよび/または調節エレメントを、哺乳動物細胞中の関連の転写単位を発現するように選択することができるとさらに認識される。本発明のいくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターを使用することが望ましく、他の実施形態では、構成的発現が望ましい。siRNAまたはsiRNA前駆体の合成(転写)に関して、本明細書中で使用される、用語「発現」は転写されたRNAの翻訳を意味しないことに留意のこと。

【0097】

本発明の一定の好ましい実施形態では、1つまたは複数のsiRNAまたはshRNA転写単位のインピボ発現を指示するために使用するプロモーターは、RNAポリメラーゼIII(PolIII)のプロモーターである。PolIIIは、テンプレート中の4~5個のT残基ストレッチとの遭遇によって終結される小転写物の合成を示す。U6またはH1プロモーターなどの一定のPolIIIプロモーターは、転写領域内にCIS作用調節エレメント(最初に転写されたヌクレオチド以外)を必要とせず、したがって、所望のsiRNA配列を容易に選択するため本発明の一定の実施形態において好ましい。天然に存在するU6プロモーターでは、最初に転写されたヌクレオチドはグアノシンであり、天然に存在するH1プロモーターの場合、最初に転写されたヌクレオチドはアデニンである(例えば、Yu, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99(9), 6047-6052(2002); Sui, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99(8), 5515-5520(2002); Paddison, P., et al., Genes and Dev., 16, 948-958(2002); Brummelkamp, T., et al., Science, 296, 550-553(2002); Miyagashii, M. and Taira, K., Nat. Biotech., 20, 497-500(2002); Paul, C., et al., Nat. Biotech., 20, 505-508(2002); Tuschl, T., et al., Nat. Biotech., 20, 446-448(2002)を参照のこと)。したがって、本発明の一定の実施形態では(例えば、転写をU6プロモーターによって駆動する場合)、好ましいsiRNA配列の5'-ヌクレオチドはGである。本発明の一定の他の実施形態では(例えば、転写をH1プロモーターによって駆動する場合)、5'ヌクレオチドはAであり得る。

【0098】

10

20

30

30

40

50

本発明の一定の実施形態によれば、P o l I I のプロモーターを、例えば、X i a , H . , e t a l . , N a t . B i o t e c h n o l . , 2 0 , pp . 1 0 0 6 - 1 0 1 0 , 2 0 0 2 に記載のように使用することもできる。これらに記載のように、ヘアピン配列は、転写開始部位およびその後のポリAカセットと極めて近接して並列した構築物（それにより、転写されたヘアピン中の突出部が最小または全くない）を使用することができる。本発明の一定の実施形態では、上記要件を満たす場合、組織特異的、細胞特異的、または誘導性 P o l I I プロモーターを使用することができる。さらに、本発明の一定の実施形態では、P o l I のプロモーターを、例えば、(M c C o w n 2 0 0 3) に記載のように使用することができる。

【 0 0 9 9 】

siRNA または shRNA の合成のためのテンプレートを提供する構築物（図 7 および図 8 など）のインビオ発現を、望ましくは、ベクター（例えば、DNA プラスミドまたはウイルスベクターなど）への構築物の移入および哺乳動物へのベクターの移入によって行うことができると認識される。任意の種々のベクターを選択することができるが、一定の実施形態では、インフルエンザウイルスに感染しやすい 1 つまたは複数の細胞に構築物を送達することができると認識されるベクターを選択することが望ましい。本発明は、siRNA および / または shRNA 転写単位を含むベクターならびに 1 つまたは複数の siRNA または shRNA 鎖をコードする転写単位を含むように操作されたこのようなベクターまたは他の物を含む細胞を含む。本発明の一定の好ましい実施形態では、本発明のベクターは、哺乳動物細胞（例えば、家畜動物の細胞）、最も好ましくはヒト細胞への構築物を発現する siRNA または shRNA の送達に適切な遺伝子治療ベクターである。このようなベクターを、ウイルスでの感染によって引き起こされる疾患および条件を予防または治療するためにインフルエンザウイルスへの曝露前後に被験体に投与することができる。本発明の RNAi 誘導性ベクターを、以下にさらに記載のように種々の送達因子を含む組成物中で送達することができる。

【 0 1 0 0 】

したがって、本発明は、細胞内での存在により 1 つまたは複数の RNA が転写され、自己ハイブリッド形成または互いにハイブリッド形成して細胞中で少なくとも 1 つのインフルエンザウイルス転写物の発現を阻害する shRNA または siRNA を形成する種々のウイルスおよび非ウイルスベクターを提供する。本発明の一定の実施形態では、2 つの個別の相補性 siRNA 鎖を 2 つのプロモーター（それぞれが siRNA 鎖の転写を指示する（すなわち、転写が起こるように siRNA のテンプレートに作動可能に連結された））を含む 1 つのベクターを使用して転写する。2 つのプロモーターは、1 つの siRNA 鎖のテンプレートに作動可能に連結される場合、同一方向であり得る。あるいは、プロモーターは、プロモーター由来の転写によって 2 つの相補 RNA 鎖が合成されるように隣接する 1 つのテンプレートと逆方向であり得る。

【 0 1 0 1 】

本発明の他の実施形態では、2 つの相補的領域を含む 1 つの RNA 分子（例えば、shRNA）の転写を駆動するプロモーターを含むベクターを使用する。本発明の一定の実施形態では、複数のプロモーター（それぞれ 2 つの相補領域を含む 1 つの RNA 分子の転写を駆動する）を含むベクターを使用する。あるいは、複数の異なる shRNA（それぞれ 1 つのプロモーターまたは複数のプロモーターに由来する）を転写することができる。種々の配置が可能である。例えば、1 つのプロモーターは、複数の相補領域（それぞれハイブリッド形成して複数のステム - ループ構造を作製する）を含む 1 つの RNA 転写物の合成を指示することができる。これらの構造を、例えば、D I C E R によって切断して複数の異なる shRNA を作製することができる。このような転写物は、好ましくは転写物の 3' 末端であるが各 shRNA 単位の間ではない終結シグナルを含むと認識される。複数の siRNA を作製することができる 1 つの RNA をインビオで產生する必要はないが、インビトロ転写を使用して化学合成するか產生し、外因的に得ることも認識される。

【0102】

本発明の別の実施形態では、ベクターは、複数のプロモーター（それぞれハイブリッド形成してshRNAを形成する自己相補RNA分子の合成を指示する）を含む。複数のshRNAは全て同一の転写物をターゲティングすることができるか、異なる転写物をターゲティングすることができる。ウイルス転写物の任意の組み合わせをターゲティングすることができる。実施例11は、本発明の一定の実施形態にしたがってインフルエンザウイルス感染の阻害のためにDNAベクターから転写したshRNAの設計および試験の詳細を提供する。図21を参照のこと。一般に、本発明の一定の実施形態によれば、細胞中で発現されたsiRNAおよび/またはshRNAは、約19ヌクレオチド長の塩基対合（二重鎖）領域を含む。

10

【0103】

当業者は、本発明のsiRNAまたはshRNAのインビオ発現により長期間（例えば、数日、好ましくは少なくとも数週間から数ヶ月、より好ましくは少なくとも1年またはそれ以上、あるいは一生）にわたりsiRNAまたはshRNAを産生する細胞を産生することができることをさらに認識する。このような細胞を、インフルエンザウイルスから無期限に防御することができる。

【0104】

siRNAおよびshRNAの細胞内発現を得るために組成物で使用するための好ましいウイルスベクターには、例えば、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターが含まれる。例えば、フィロウイルスエンベロープタンパク質シュードタイピングHI Vベクターに基づいたベクターを記載したKobinger, G. P., et al., Nat Biotechnol 19(3):225-30, 2001を参照のこと。Lois, C., et al., Science, 295:868-1872, Feb. 1, 2002, describing the FUGW lentiviral vector; Somia, N., et al. J Virol. 74(9):4420-4424, 2000; Miyoshi, H., et al., Science 283:682-686, 1999; および米国特許6,013,516号も参照のこと。

20

【0105】

本発明の一定の実施形態では、ベクターは、細胞内での存在により1つまたは複数のRNAが転写され、自己ハイブリッド形成または互いにハイブリッド形成して細胞中で少なくとも1つの転写物の発現を阻害するshRNAまたはsiRNAを形成する種々のレンチウイルスベクターである。説明のために、ベクターは、Rubinson, D., et al., Nature Genetics, Vol. 33, pp. 401-406, 2003などに記載のレンチウイルスベクターであると予想される。しかし、他のレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターも使用することができると理解すべきである。本発明の種々の実施形態によれば、レンチウイルスベクターは、レンチウイルス導入プラスミドまたはレンチウイルス粒子（例えば、細胞に感染することができるレンチウイルス）のいずれかであり得る。本発明の一定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、プロモーターに作動可能に連結された核酸セグメントを含み、その結果、プロモーター由来の転写（すなわち、プロモーターによって指示される転写）によりハイブリッド形成して標的転写物にターゲティングされたshRNAが作製される相補領域を含むRNAが合成される。本発明の一定の実施形態によれば、shRNAは、約19ヌクレオチド長の塩基対合領域を含む。本発明の一定の実施形態によれば、本発明のRNAは、2つを超える相補領域を含むことができ、その結果、自己ハイブリッド形成によりループまたは一本鎖領域によって分離された複数の塩基対合領域が得られる。塩基対合領域は同一または異なる配列を有し得るため、1つの転写物または異なる転写物の同一または異なる領域にターゲティングすることができる。

40

【0106】

本発明の一定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、核酸セグメントに作動可能に連結された反対方向の2つのプロモーターに隣接した核酸セグメントを含み、その結果

50

、プロモーター由来の転写によって互いにハイブリッド形成して標的転写物にターゲティングされた siRNA が作製される 2 つの相補 RNA が合成される。本発明の一定の実施形態によれば、 siRNA は約 19 ヌクレオチド長の塩基対合領域を含む。本発明の一定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、少なくとも 2 つのプロモーター（2 つのプロモーターは核酸セグメントに作動可能に連結される）および少なくとも 2 つの核酸セグメントを含み、その結果、プロモーター由来の転写により、互いにハイブリッド形成して標的転写物にターゲティングされた siRNA が形成される 2 つの相補 RNA が合成される。

【 0107 】

上記のように、レンチウイルスベクターは、レンチウイルス導入プラスミドまたは感染性レンチウイルス粒子（例えば、レンチウイルスまたはシードタイピングレンチウイルス）であり得る。例えば、レンチウイルス導入プラスミド、レンチウイルス粒子、およびレンチウイルス発現系のさらなる考察については、米国特許第 6,013,516 号および引用文献 113 ~ 117 を参照のこと。当該分野で周知のように、レンチウイルスは RNA ゲノムを有する。したがって、レンチウイルスベクターがレンチウイルス粒子（例えば、感染性レンチウイルス）である場合、ウイルスゲノムは RNA 転写を指示することができる DNA を產生するための逆転写および第 2 の合成を受けなければならない。さらに、プロモーター、調節エレメントなどのエレメントに関する場合、これらのエレメントの配列は、本発明のレンチウイルス粒子中で RNA 形態で存在し、本発明のレンチウイルス導入プラスミド中で DNA 形態で存在すると理解すべきである。さらに、 RNA 合成のためのテンプレートがレンチウイルス粒子中に存在する RNA 「によって提供される」場合、 RNA はと理解される。 RNA 合成用（転写）のテンプレートとして作用することができる DNA を產生するための逆転写および第 2 の合成を受けなければならない。 siRNA または shRNA の合成のためのテンプレートを提供するベクターは、このような合成が起こる細胞に移入される場合に siRNA または shRNA を提供すると見なす。

【 0108 】

本発明の siRNA または shRNA を、任意の利用可能な方法によって細胞に移入することができる。例えば、 siRNA 、 shRNA 、またはこれらをコードするベクターを、従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術を介して細胞に移入することができる。本明細書中で使用される、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、細胞に外来核酸（例えば、 DNA または RNA ）を移入するための当該分野で認識されている種々の技術（リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、 DEAE-デキストララン媒介トランスフェクション、リポフェクション、注入、またはエレクトロポレーションが含まれる）をいうことが意図される。下記のように、本発明の 1 つの態様は、細胞への siRNA または shRNA の合成のためのテンプレートを提供する siRNA 、 shRNA 、またはベクター（ DNA ベクターまたはウイルスベクターのいずれか）を移入するための種々の送達因子（アルギニンが豊富なペプチド、ヒスチジンが豊富なペプチド、ならびにカチオン性および中性脂質；種々の非カチオン性ポリマー；リポソーム；炭水化物；および界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない）の使用を含む。本発明はまた、任意の種々の方法（例えば、以下でさらに記載されている送達因子への送達強化部分の付加）で修飾した送達因子の使用を含む。

【 0109 】

本発明は、本発明の siRNA または shRNA の合成のためのテンプレートを提供する本発明の siRNA 、 shRNA 、またはベクターを含むように操作された任意の細胞を含む。好ましくは、細胞は、哺乳動物細胞、特にヒトである。最も好ましくは、細胞は気道上皮細胞である。必要に応じて、このような細胞は、インフルエンザウイルス RNA も含む。本発明のいくつかの実施形態では、細胞は、生物内における非ヒト細胞である。例えば、本発明では、本発明の siRNA または shRNA を含むか発現するように操作されたトランスジェニック動物を含む。このような動物は、本発明の siRNA および shRNA の機能および / もしくは活性の研究ならびに / またはインフルエンザウイルス感

10

20

30

40

50

染／複製系の研究に有用である。本明細書中で使用される、「トランスジェニック動物」は、1つまたは複数の動物細胞が導入遺伝子を含む非ヒト動物である。導入遺伝子は、外因性DNAまたは好ましくはトランスジェニック動物細胞のゲノムに組み込まれるかこのゲノムで起こる再集合（例えば、内因性染色体DNAの欠失）である。導入遺伝子は、トランスジェニック動物の1つまたは複数の細胞型または組織中でコードされたsiRNA産物の発現を指示することができる。好ましいトランスジェニック動物は、非ヒト哺乳動物、より好ましくはラットまたはマウスなどのげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト靈長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリなどのトリ、および両生類などが含まれる。本発明の一定の実施形態によれば、トランスジェニック動物は、潜在的なインフルエンザ治療の試験のための動物モデル（例えば、マウス、フェレット、または靈長類）として様々に使用される。

10

【0110】

(III.ウイルスRNA蓄積の広範な阻害)

遺伝子発現のRNAi媒介阻害の1つの一般的特徴はその特異性である。言い換えれば、特定の転写物配列にターゲティングされたsiRNAは、典型的に、他の転写物を分解しない。しかし、実施例6に記載のように、本発明者らは、NP、PA、またはPB1転写物にターゲティングされたsiRNAにより、他のウイルスRNA（NPまたはPA配列に無関係の配列を含むRNAが含まれる）レベルも減少することを発見した。さらに、実施例5に示すように、siRNAの直接的な標的はウイルスマRNAであり、NPまたはPA mRNAの蓄積の阻害に加えて、NP、PAにターゲティングされたsiRNAの投与により対応するvRNAおよびcRNAの蓄積を阻害する可能性が高いようである。実施例7に示すように、これらの効果は、インターフェロン応答またはウイルス転写物のウイルス媒介分解に起因しない。さらに、種々の細胞転写物にほとんど効果がないか全く効果がないため、効果はウイルス転写物に特異的であった。この効果を媒介することができる潜在的な機構を、実施例6で考察する。正確な機構に關係なく、これらの所見は、一定の条件下で、第2の転写物にターゲティングされたsiRNAの投与はまた、最初の転写物またはsiRNAがターゲティングされない転写物（例えば、第2の転写物に有意な同一性またはホモロジーを欠く第1の転写物）に影響を与えることができることを証明する。特に、第2の転写物によってコードされるタンパク質（または、潜在的には、転写物自体）は第1の転写物の合成、プロセシング、または安定性に関与する場合にこれが起こり得る。

20

30

40

【0111】

したがって、本発明は、第2の転写物にターゲティングされたsiRNAを投与する工程と、第2の転写物の阻害により第1の転写物が阻害されることとを含む、第1の転写物の阻害方法を提供する。一般に、第1および第2の転写物は、少なくともターゲティングされる第2の転写物の一部と非同一および非相同である。しかし、本発明の種々の実施形態では、第1および第2の転写物は、ターゲティングされる第2の転写物の一部と相同および同一の領域を共有することができる（例えば、siRNAの19ヌクレオチド二重鎖部分に対応する部分）。siRNAが少なくとも5個連続するヌクレオチドに同一な領域を含まない場合、siRNAは第1の転写物にターゲティングされない。一般に、第2の転写物にターゲティングされたsiRNAは、第1の転写物にターゲティングされない。相同または同一の共有領域が存在する場合、このような領域は、標的配列の一部または全部を含み得るがその必要はない。適切な第2の転写物（標的転写物）には、RNA結合タンパク質またはRNAの安定化で役割を果たす任意の他のタンパク質などのタンパク質をコードするものが含まれる。一般に、用語「阻害」は、転写物のレベルまたは量の減少をいう。しかし、他の阻害メカニズムも含まれる。阻害方法は、直接または間接的であり得る。

【0112】

実施例6で考察するように、いかなる理論にも拘束されることを望まないが、本発明者らは、NPにターゲティングされた転写物がNS、M、NS、PB1、PB2、およびP

50

A 遺伝子転写物の m R N A 、 v R N A 、および c R N A の蓄積レベルを減少させる能力はおそらくこれらの転写物の結合および安定化における N P タンパク質の重要性の結果であり、 N p 特異的 s i R N A が R N A 分解を非特異性にターゲティングすることによらないと示唆する。さらに、いかなる理論にも拘束されることを望まないが、本発明者らは、 P A にターゲティングされた転写物が N S 、 M 、 N S 、 P B 1 、 P B 2 、および P A 遺伝子転写物の m R N A 、 v R N A 、および c R N A の蓄積レベルを減少させる能力はおそらくウイルス転写物の合成における P A タンパク質の重要性の結果であり、 P A 特異的 s i R N A が R N A 分解を非特異性にターゲティングすることによらないと示唆する。 P A 特異的 s i R N A の存在下で、新規に転写された P A m R N A が分解されて P A タンパク質合成が阻害される。インフルエンザビリオン (1)あたり約 30 ~ 60 コピーの P A タンパク質 (R N A 転写酵素) の存在にもかかわらず、新規に合成した P A タンパク質を使用せずに、さらなるウイルスの転写および複製が阻害される可能性が高い。一定の s i R N A が特異的にターゲティングされない転写物のレベルを減少させる能力は他の系で証明されていないと考えられる。

【 0 1 1 3 】

本発明者らは、他の R N A 分子の安定化または R N A の合成において役割を果たすタンパク質をコードする標的転写物が感染性因子の成長阻害、複製、感染性などのための好ましい標的であり得ると認識している。したがって、本発明は、標的転写物にターゲティングされた s i R N A を投与する工程と、標的転写の阻害により少なくとも 1 つの他の転写物が阻害されることと、このような他の転写物が因子特異的であることを含む、感染性因子の成長、感染性、または複製を阻害する方法を提供する。標的転写物は、因子特異的転写物であり得るが、その必要はない。少なくとも 1 つの他の転写物は、標的転写物と相同領域または同一領域を共有することができるが、その必要はない。相同性領域または同一領域を共有する場合、このような領域は、標的配列の一部または全てを含み得るが、その必要はない。適切な標的転写物には、 R N A 結合タンパク質または R N A の安定化で役割を果たす任意の他のタンパク質などのタンパク質をコードするものが含まれる。適切な標的転写物には、 R N A 合成またはプロセシングで役割を果たすもの（例えば、ポリメラーゼ、逆転写酵素など）も含まれる。

【 0 1 1 4 】

本明細書中に記載の結果により、一般に、通常因子特異的核酸 (D N A または R N A) に結合する R N A または D N A 結合タンパク質をコードする転写物にターゲティングした s i R N A は、ターゲティングされた R N A レベルの単純な減少よりもむしろ広範な効果（例えば、他の因子特異的転写物に対する効果）を有する可能性が高いことが示唆される。同様に、本明細書中に記載の結果により、一般に、感染性因子のポリメラーゼ遺伝子 (R N A ポリメラーゼ、 D N A ポリメラーゼ、または逆転写酵素) にターゲティングされた s i R N A がポリメラーゼ R N A レベルの単純な減少よりもむしろ広範な効果（例えば、他の因子特異的転写物に対する効果）を有する可能性が高いことが示唆される。

【 0 1 1 5 】

宿主細胞の R N A よりもむしろ感染因子の R N A を特異的に安定化させるタンパク質をコードする標的転写物により、因子特異的転写物のレベルを選択的に減少させながら宿主細胞の転写物レベルに影響を与えないための機会が得られる。したがって、このような s i R N A の送達により宿主生物の細胞に悪影響を及ぼすと予想される。このアプローチは、宿主細胞の R N A よりもむしろ感染性因子の R N A を特異的に安定化させるタンパク質をコードする転写物にだけでなく、宿主細胞転写物よりもむしろ因子特異的転写物（すなわち、テンプレートが宿主細胞のゲノムよりもむしろ因子のゲノムの一部である転写物）のプロセシング、合成、および / または翻訳の任意の態様に特異的に関連するタンパク質をコードする転写物にも適用する。このようなタンパク質には、宿主細胞転写物ではなく因子特異的転写物の合成、スプライシング、キャッピングに関与するタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 1 6 】

10

20

30

40

50

(IV. インフルエンザウイルスを阻害する s i R N A および s h R N A の同定および試験)

上記のように、本発明は、インフルエンザウイルスの感染および / または複製のインヒビターとして有用な s i R N A を同定するための系を提供する。上記のように、 s h R N A のステム構造と同一の配列を有する二重鎖部分を有する s i R N A を產生するために s h R N A が細胞内でプロセシングされるため、系は、インフルエンザウイルス感染の阻害剤として有用な s h R N A の同定に等しく有用である。説明の目的で、区分を s i R N A というが、系は対応する s h R N A も含む。具体的には、本発明は、ウイルス感染および / または複製を遮断または阻害するためのウイルス遺伝子にターゲティングされた s i R N A の首尾のよい調製を証明する。本明細書中で考察されるように、本明細書中に記載の技術および試薬を、他の遺伝子または遺伝子領域にターゲティングされた潜在的な新規の s i R N A を設計するために容易に適用し、インフルエンザウイルス感染および / または複製の阻害活性について試験することができる。インフルエンザウイルスは変異および再集合を継続し、新規の異なってターゲティングされた s i R N A を開発および試験し続けることが望ましいと予想される。

【0117】

本発明の種々の実施形態では、潜在的なインフルエンザウイルスインヒビターを、インフルエンザウイルスゲノムもしくはその一部でのトランスフェクション（例えば、数分内、数時間内、または多くとも数日）の前、同時、もしくは後またはインフルエンザウイルス感染の前、同時、もしくは後に細胞への候補 s i R N A の移入（例えば、外因性投与または s i R N A の内因性合成を指示するベクターもしくは構築物の移入）によって試験することができる。あるいは、潜在的なインフルエンザウイルスインヒビターを、インフルエンザウイルスを産生的に感染させた細胞（すなわち、子孫ウイルスを产生する細胞）への候補 s i R N A の移入によって試験することができる。次いで、候補 s i R N A が標的転写レベルを阻害し、そして / またはウイルスの複製、病原性、および / または感染性などのウイルス生活環の 1 つまたは複数の態様または特徴を阻害する能力を評価する。例えば、ウイルス粒子の產生および / またはウイルスタンパク質の產生などを、当該分野で周知の方法を使用して直接または間接的に評価することができる。

【0118】

本発明の s i R N A 組成物が送達された細胞（試験細胞）を、本発明の組成物を投与していない類似または同様の細胞（コントロール細胞（例えば、 s i R N A を投与しないか、 G F P などの非ウイルス転写物にターゲティングされた s i R N A などのコントロール R N A を投与した細胞））と比較することができる。試験細胞のインフルエンザウイルス感染感受性を、コントロール細胞の感染感受性と比較することができる。ウイルスタンパク質および / または子孫ウイルスの產生について試験細胞とコントロール細胞とを比較することができる。ウイルス感染性の他の特徴、複製、病原性などを同様に比較することができる。標準的なインビトロ抗ウイルスアッセイは、ウイルスブラーク、ウイルス細胞変性効果（ C P E ）の阻害、およびウイルス血球凝集素もしくは他のタンパク質、ウイルス產生の阻害を使用することができる。 C P E を目視または色素の取り込みによって判定することができる。 Sidwell, R. W. and Smee, D. F., 'インビトロ

and インビボ assay systems for study of influenza virus inhibitors', Antiviral Res 2000 Oct; 48 (1) : 1-16, 2000 を参照のこと。一般に、試験細胞およびコントロール細胞は同種に由来し、且つ類似または同一の細胞型に由来する。例えば、同一の細胞株由来の細胞を比較することができる。試験細胞が初代細胞である場合、典型的にはコントロール細胞も初代細胞である。典型的には、同一のインフルエンザ株を使用して、試験細胞とコントロール細胞とを比較する。

【0119】

例えば、実施例 2 に記載のように、候補 s i R N A がインフルエンザウイルス產生を阻害する能力を、（ i ）候補 s i R N A の細胞への送達（インフルエンザウイルスへの曝露

10

20

30

40

50

の前、同時、または後のいずれか)、(i i) 血球凝集素アッセイを使用したウイルス血球凝集素産生のアッセイ、および(i i i) siRNAの存在下で產生された血球凝集素量とsiRNAの非存在下での產生量との比較によって都合よく判定することができる。(試験は、siRNAは存在しないが阻害の非存在下で產生された血球凝集素量に関する以前の情報を使用することができるコントロールを含む必要はない。) 血球凝集素量の減少により、ウイルス產生の減少が強く示唆される。このアッセイを使用して、任意のウイルス転写物をターゲティングするsiRNAについて試験を行うことができ、ウイルス血球凝集素をコードする転写物をターゲティングするsiRNAに限定されない。

【0120】

候補siRNAが標的転写物レベルを減少させる能力を、例えば、ノーザンプロット、ヌクレアーゼ保護アッセイ、逆転写(RT)-PCR、リアルタイムRT-PCR、マイクロアレイ分析などを使用した標的転写物の量の測定によってアッセイすることもできる。(転写または転写後レベルのいずれかでの) 候補siRNAが標的転写物によってコードされたポリペプチド產生を阻害する能力を、種々の抗体ベースのアプローチ(ウェスタンプロット、免疫アッセイ、ELISA、フローサイトメトリー、タンパク質マイクロアレイなどがあるが、これらに限定されるものではない。)を使用して測定することができる。一般に、標的転写物または標的転写物によってコードされたポリペプチドのいずれかの量の任意の測定方法を使用することができる。

【0121】

一般に、一定の好ましいインフルエンザウイルスインヒビターは、インヒビターの非存在下(例えば、インヒビターを欠く比較可能なコントロール細胞)で存在するレベルと比較して少なくとも約1/2、好ましくは少なくとも約1/4、より好ましくは少なくとも約1/8、少なくとも約1/16、少なくとも約1/64またはさらにそれ以下に標的転写物レベルを減少させる。一般に、一定の好ましいインフルエンザウイルスインヒビターはウイルス複製を阻害し、その結果、インヒビターを含まないコントロール細胞よりもインヒビターを含む細胞において複製レベルが、少なくとも約1/2、好ましくは少なくとも約1/4、より好ましくは少なくとも約1/8、少なくとも約1/16、少なくとも約1/64、少なくとも約1/100、少なくとも約1/200、またはさらにそれ以下に低下する。特に、実施例2に記載されるように、本発明者らは、血球凝集素の產生によって測定したところ、ウイルス力価は、単一用量のsiRNA(PB1-2257)を投与したインフルエンザウイルスA株/PR/8/34(H1N1)を感染させた細胞で1/256未満に減少し、単一用量のsiRNA(NP-1496および他)を投与したインフルエンザウイルスA株/WSN/33(H1N1)を感染した細胞で1/120未満に減少することを示した。0.001のMOIでのブラークアッセイで測定した場合、阻害度(fold inhibition)は、さらに高くなった(すなわち、少なくとも約1/30,000)。0.1のMOIでさえ、NP-1496により、ウイルス產生が約1/200に阻害された。

【0122】

一定の好ましいインフルエンザウイルスインヒビターは、検出可能なウイルス力価の進行が、siRNAの投与および細胞感染から少なくとも24時間後、少なくとも36時間後、少なくとも48時間後、または少なくとも60時間後に防止されるようにウイルス複製を阻害する。一定の好ましいインフルエンザウイルスインヒビターにより、siRNAの投与から少なくとも24時間後、少なくとも36時間後、少なくとも48時間後、または少なくとも60時間後にウイルス複製が防止(すなわち、検出不可能なレベルへの減少)されるか有意に減少する。本発明の種々の実施形態によれば、ウイルス複製の有意な減少は、siRNAの非存在下で起こるレベルの約90%未満の減少、siRNAの非存在下で起こるレベルの約75%未満の減少、siRNAの非存在下で起こるレベルの約50%未満の減少、siRNAの非存在下で起こるレベルの約25%未満の減少、siRNAの非存在下で起こるレベルの約10%未満の減少である。ウイルス複製の減少を、任意の適切な方法(HA力価の測定が含まれるが、これに限定されない)を使用して測定するこ

10

20

30

40

50

とができる。

【0123】

潜在的なインフルエンザウイルスインヒビターを、開発された任意の種々の動物モデルを使用して試験することもできる。候補 siRNA、宿主細胞内でのこのような siRNA の合成を指示することができる構築物もしくはベクター、または候補 siRNA を含むように処理または操作した細胞を含む組成物を、インフルエンザウイルスでの感染の前、同時に、または後に動物に投与することができる。組成物がウイルス感染を防止し、そして / またはインフルエンザ関連症状の出現を遅延もしくは防止し、そして / または潜在的なインフルエンザインヒビターを投与しなかったインフルエンザ感染動物と比較してその重症度を減少させる能力を評価する。このようなモデルには、インフルエンザ感染のためのネズミ、ニワトリ、フェレット、および非ヒト靈長類モデルが含まれるが、これらに制限されず、これらの全てが当該分野で公知であり、潜在的なインフルエンザ治療薬およびワクチンの有効性の試験に使用される。例えば、上記で引用された Sidewell, R. W. and Smeekens, D. F を参照のこと。このようなモデルは、天然に存在するインフルエンザウイルス株および / または特定の宿主中で存在するように改変または適合された株（例えば、マウス中の複製に適合された WSN または PR8 株）を含み得る。インビトロおよびインビボでの siRNA 組成物の試験のための方法の考察については、実施例 6、7、8、9、および 10 を参照のこと。

【0124】

（V. siRNA、shRNA、および RNAi 誘導性ベクターの送達を改良するための組成物）

本発明者らは、有効な RNAi 治療（一般に、インフルエンザウイルス感染の防止および治療が含まれる）は、インタクトな生物中の細胞への siRNA、shRNA、および / または RNAi 誘導性ベクターの有効な送達によって強化されると認識した。インフルエンザウイルスの場合、このような因子を、通常インフルエンザ感染が起こる気道中の細胞に移入しなければならない。ヒトで使用するために、siRNA または shRNA の細胞内への取り込みを容易にする非ウイルス法を使用することが好ましい。したがって、本発明は、インタクトな生物（例えば、哺乳動物およびトリ）中の細胞への siRNA、shRNA、および / または RNAi 誘導性ベクターの送達を強化するための任意の種々の非ウイルス送達因子を含む組成物を提供する。本明細書中に記載されるように、「送達」の概念には、siRNA、shRNA、またはベクターの細胞取り込みおよび細胞内 RNAi 機構（例えば、エンドソームからの siRNA または shRNA の放出）に利用可能な siRNA または shRNA の作製に関する任意のその後の工程に加えて、身体の侵入部位から機能させる細胞の位置への siRNA、shRNA、または RNAi 誘導性ベクターの輸送が含まれる。

【0125】

したがって、本発明は、細胞内での存在により、siRNA または shRNA がインフルエンザウイルス転写物にターゲティングされる siRNA または shRNA が產生される siRNA、shRNA、または RNAi 誘導性ベクターなどの RNAi 誘導性因子および任意の種々の送達因子（カチオン性ポリマー、修飾カチオン性ポリマー、ペプチド分子輸送体（アルギニンまたはヒスチジン豊富なペプチドが含まれる）、脂質（カチオン性脂質、中性脂質、およびその組み合わせが含まれる）、リポソーム、リポポリプレックス、リポポリプレックス（lipopopolysaccharide）、非カチオン性ポリマー、肺などへの移入に適切なサーファクタントが含まれるが、これらに限定されない）を含む組成物を含む。（上記言語および他の場所の「wherein」節は、細胞内のベクターの存在の結果として產生された siRNA または shRNA に加えて、組成物中の siRNA または shRNA をいうことが意図されることに留意のこと）。インフルエンザウイルス転写物を阻害することが望ましい細胞への siRNA、shRNA、または RNAi 誘導性ベクターの送達を増加させるか選択的送達を増加させる部分を組み込むために一定の送達因子を修飾する。本発明の一定の実施形態では、送達因子は生分解性である。本発明での使

10

20

30

40

50

用に適切な一定の送達因子を以下に記載するか、本願と同日に提出された「Compositions and Methods for Delivery of Short Interfering RNA and Short Hairpin RNA to Mammals」というタイトルの同時係属特許出願（本明細書中で参考として援用される）に記載されている。

【0126】

（A. カチオン性ポリマーおよび修飾カチオン性ポリマー）

DNAトランスフェクションのためのキャリアとしてカチオン性ポリマーベースの系が調査されている（35）。カチオン性ポリマーがDNAの細胞内への取り込みを促進する能力は、DNAに結合して巨大なプラスミドDNA分子をより小さなDNA／ポリマー複合体に縮合する能力から部分的に生じると考えられる。DNA／カチオン性ポリマー複合体はまた、細胞表面糖タンパク質の負電荷のシアル酸残基との静電的相互作用により、生体接着剤としても作用する（36）。さらに、いくつかのカチオン性ポリマーは、エンドソーム膜の分布およびそれによる細胞質ゾルへのDNAの放出を促進するようである（32）。したがって、本発明は、（i）インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされたRNAi誘導性物質および（ii）カチオン性ポリマーを含む組成物を提供する。本発明は、さらに、哺乳動物被験体にインフルエンザウイルス転写物にターゲティングされたRNA誘導性物質を含む組成物を投与する工程を含む、標的遺伝子発現の阻害方法を提供する。特に、本発明は、哺乳動物被験体にインフルエンザウイルス転写物をターゲティングするRNA誘導性物質およびカチオン性ポリマーを含む組成物を投与する工程を含む、インフルエンザウイルス感染の治療および／または防止方法を提供する。本発明の種々の実施形態では、RNAi誘導性物質は、siRNA、shRNA、またはRNAi誘導性ベクターである。

10

20

30

40

【0127】

一般に、カチオン性ポリマーは、正電荷のおよその生理学的pH（例えば、約7.0～7.6、好ましくは約7.2～7.6、より好ましくは約7.4のpH範囲）のポリマーである。このようなカチオン性ポリマーには、ポリリジン（PLL）、ポリアルギニン（PLA）、ポリヒスチジン、ポリエチレンイミン（PEI）（37）（例えば、（76）に記載の直鎖PEIおよび低分子量PEIが含まれる）、ポリビニルピロリドン（PVP）（38）、およびキトサン（39, 40）が含まれるが、これらに限定されない。一定のこれらのポリマーは第1級アミン基、イミン基、グアニジン基、および／またはイミダゾール基と認識される。好ましいカチオン性ポリマーは、比較的毒性が低く、DNAトランスフェクション効率が高い。

【0128】

適切なカチオン性ポリマーには、任意の上記ポリマーのサブユニットを含むコポリマー（例えば、リジン-ヒスチジンコポリマーなど）も含まれる。コポリマー中の種々のサブユニットの比率は等しくなる必要はないが、例えば、細胞傷害性を最小にしながら核酸との複合体を形成する能力などの性質を至適化するように選択することができる。さらに、サブユニットは標準的様式で変化する必要はない。所望の性質に関して種々のポリマーを評価するための適切なアッセイを、実施例に記載する。好ましいカチオン性ポリマーには、任意の種々の修飾をさらに組み込んだポリマーも含まれる。適切な修飾は以下に考察されており、アセチル基、スクシニル基、アシル基、またはイミダゾール基での修飾が含まれるが、これらに限定されない。

【0129】

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、PEIなどのカチオン性ポリマーにより、DNAがエンドサイトーシスによって細胞表面でアニオン性プロテオグリカンと相互作用して細胞に侵入することができる正電荷の粒子に小型化または縮合すると考えられる。このようなポリマーは、エンドソームpHで緩衝化し、分解からDNAを保護する「プロトンスポンジ」として作用する性質を有することができる。連続的プロトン流入は、エンドソーム浸透圧性膨張および破裂を誘導し、DNA粒子の細胞質への回避機構が得られ

50

る。（例えば、P E I および本発明の実施で有用な他のカチオン性ポリマーに関するさらなる情報については、引用文献 85 ~ 87 ; U . S . S . N . 6 , 0 1 3 , 2 4 0 号 ; W O 9 6 0 2 6 5 5 号を参照のこと）。本発明の一定の実施形態によれば、jet P E I T M (Q biogene, Carlsbad, CA) (P E I の直鎖形態 (U . S . S . N . 6 , 0 1 3 , 2 4 0 号)) として公知の市販のP E I 試薬を使用する。

【0130】

実施例 12 に記載のように、本発明者らは、P E I 、P L L 、またはP L A およびインフルエンザウイルスR N A をターゲティングするs i R N A を含む組成物は、インフルエンザウイルス感染の前または後のいずれかで静脈内投与した場合、インフルエンザウイルス産生を阻害することを示した。阻害は用量依存性であり、異なるインフルエンザウイルスR N A にターゲティングした2つのs i R N A を使用した場合、さらなる効果を示す。したがって、P E I 、P L L 、またはP L A などのカチオン性ポリマーと組み合わせた場合、s i R N A は肺に達し、細胞に侵入し、ウイルス複製サイクルを有効に阻害することができる。これらの所見は、s i R N A を使用した哺乳動物での感染性ウイルスの産生の阻害における有効性についての最初の報告を示すと考えられる（例えば、ウイルス複製サイクルにおけるウイルス転写物または中間体の産生の阻害と対照的である）。

【0131】

s i R N A を静脈内で体内の固体器官および組織に送達する試み（例えば、McCaffrey 2002 ; McCaffrey 2003 ; Lewis, D. L. et al. を参照のこと）は、マウスの尾静脈への大量の流動物の迅速な送達を含み、且つ固体器官（特に、肝臓）中に相当な量のプラスミドD N A が蓄積することを示す、水力学的トランスフェクションとして公知の技術を使用することに留意のこと（Liu 1999 ; Zhang 1999 ; Zhang 2000 ）。約200μlの流動物の注射を含む従来技術（Liu 1999 ）と対照的に、この技術は、動物の全血量にほとんど等しい流動物体積（体重18 ~ 20gのマウスについては1.6ml（体重の約8 ~ 12%に等しい））の送達を含む。さらに、水力学的トランスフェクションアプローチを使用した注射を、注射した導入遺伝子の有効な発現に必要な短い時間間隔（例えば、5秒）で行う（Liu 1999 ）。

【0132】

水力学トランスフェクションにより肝臓中の注射した導入遺伝子が導入および高レベルで発現する機構は完全に明らかでないが、一過性心臓鬱血に起因する肝静脈を介した肝臓へのD N A 溶液の逆流に起因すると考えられる（Zhang 2000 ）。ヒトにおける治療目的のための類似のアプローチは、実行可能ではないようである。本発明者らは、対照的に、従来の体積の流動物（例えば、200μl）を使用し、肝臓（水力学的トランスフェクションを使用して最も容易に発現する部位）中でさえも注射した導入遺伝子の最小発現が得られると予想されることを証明した。

【0133】

したがって、本発明は、従来の注射技術（例えば、流動物の従来の圧力および/または従来の体積を使用した技術）を使用して、標的転写物にターゲティングされたR N A i 誘導性物質を含む組成物を被験体の血管系に移入する工程を含む、哺乳動物被験体内的細胞中のウイルス転写物（インフルエンザウイルス転写物）の発現の阻害方法を提供する。R N A i 誘導性物質は、s i R N A 、s h R N A 、またはR N A i 誘導性ベクターであり得る。本発明の一定の好ましい実施形態では、組成物はカチオン性ポリマーを含む。本発明の好ましい実施形態では、組成物を、被験体の体重の10%以下の液量で移入する。本発明の一定の実施形態では、液量は、被験体の体重の5%以下、2%以下、1%以下、0.1%以下である。本発明の一定の実施形態では、方法は、肝臓以外の生体組織または器官中の細胞中の有効量のs i R N A またはs h R N A の送達を達成する。本発明の一定の好ましい実施形態では、組成物を、例えば、静脈内注射によって静脈に移入する。しかし、組成物を動脈に投与し、カテーテル、内在性静脈ラインなどのデバイスを使用して送達させることもできる。本発明の一定の好ましい実施形態では、R N A i 誘導性部分はウイル

10

20

30

40

50

ス产生を阻害する。

【0134】

実施例15に記載のように、本発明者らは、カチオン性ポリマーPLLおよびPLAはsiRNAと複合体を形成し、培養細胞中の機能的siRNAの取り込みを促進することができる。PLLとNP-1496との複合体またはPLAとNP-1496 siRNAとの複合体でのトランスフェクションにより、細胞中のインフルエンザウイルスの产生を阻害した。これらの結果および上記で考察下マウスでの結果は、被験体の体内の哺乳動物細胞へのsiRNAの送達のためのカチオン性ポリマーとsiRNAとの混合物の使用の実現可能性を証明する。実施例15に記載のアプローチを使用して、細胞傷害性を減少させ、最初に有効なものを至適化させるさらなるポリマー（特に、基（アシル基、スクシニル基、アセチル基、またはイミダゾール基）の付加によって修飾されたポリマー）について試験を行うことができる。一般に、一定の好ましい修飾により、カチオン性ポリマーの正電荷が減少する。一定の好ましい修飾により、第1級アミンが第2級アミンに変換される。このようなさらなる基を移入するためのカチオン性ポリマーの修飾方法は、当該分野で周知である（例えば、引用文献32を参照のこと）。例えば、種々の残基の-アミノ基を、例えば、抱合によってポリマー合成後の所望の修飾基と置換することができる。一般に、ポリマーがRNAi誘導性物質の送達を強化する能力を非常に大きく減少させることなく非置換ポリマーと比較して細胞傷害性が適切に減少するのに十分な置換率を選択することが望ましい。したがって、本発明の一定の実施形態では、ポリマー中の25%と75%との間の残基を置換する。本発明の一定の実施形態では、ポリマー中の約50%の残基を置換する。適切に選択された単量体サブユニット（すなわち、サブユニットのいくつかは既に所望の修飾が組み込まれている）のコポリマーの最初の形成によって類似の効果を達成することができることに留意のこと。

【0135】

種々のさらなるカチオン性ポリマーも使用することができる。新規のカチオン性ポリマーおよびジアクリレートおよびアミンモノマー由来のオリゴマーの巨大ライブラリーを開発し、DNAトランスフェクションで試験した。これらのポリマーを、本明細書中でポリ(-アミノエステル) (PAE) ポリマーをいう。例えば、7個のジアクリレートモノマーおよび20アミンモノマー由来の140個のポリマーのライブラリーが記載されており(34)、より巨大なライブラリーを類似または同一の方法を使用して产生することができる。このライブラリーの140メンバーのうち、70メンバーが十分な水溶性を示すことが見出された(2mg/ml、25mM酢酸緩衝液、pH=5.0)。電気泳動移動シフトによって示すように、70個の水溶性ポリマーのうちの56個がDNAと相互作用する。最も重要には、56ポリマーのうちの2つがCOS-7細胞へのDNAトランスフェクションを媒介した。新規のポリマーのトランスフェクション効率は、PEIの4~8倍であり、リポフェクタミン2000と同等またはより良い。したがって、本発明は、少なくとも1つのsiRNA分子およびカチオン性ポリマーを含む組成物（カチオン性ポリマーはポリ(-アミノエステル)）およびこのような組成物の投与による標的遺伝子発現の阻害方法を提供する。ポリ(-アミノエステル)は、Langer et al. and Anderson (2003)によって2002年9月19日に提出された'Biodegradable poly(beta-amino esters) and uses thereof' というタイトルの米国特許出願第20020131951号にさらに記載されている。RNAi誘導性物質の送達を容易にするために使用するためのカチオン性ポリマーを、ポリマーから構成される主要な1価のサブユニット以外の1つまたは複数の残基が組み込まれるように修飾することができることに留意のこと。例えば、1つまたは複数の別の残基をポリマーの末端に付加することができるか、ポリマーをポリマーが構成される主要な単量体以外の残基によって連結することができる。

【0136】

本発明のRNAi誘導性部分の送達を強化するために使用することができるさらなるカチオン性ポリマーには、ポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマー、ポリ(2-ジメ

10

20

30

40

50

チルアミノ)エチルメタクリレート(p D M A E M A)およびその第4級アミンアナログであるポリ(2-トリメチルアミノ(t r i e m e t y h l a m i n o))エチルメタクリレート(p T M A E M A)、ポリ[a - (4 - アミノブチル) - L - グリコール酸(P A G A)、およびポリ(4 - ヒドロキシ - 1 - プロリンエステル)が含まれる。これらの薬剤のさらなる説明については H a n (2 0 0 0)を参照のこと。

【 0 1 3 7 】

(B . ペプチド分子輸送体)

研究は、種々のペプチドが核酸の送達因子として作用することができる事を示す。(本明細書中で使用される、「ポリペプチド」は約 50 アミノ酸長よりも短い場合、「ペプチド」と考えられる。) 例えれば、転写因子(H I V T a t タンパク質(4 2 , 4 3)、単純ヘルペスウイルスの V P 2 2 タンパク質(4 4)、およびドロソフィラのアンテナペディアタンパク質(4 5))は、細胞表面から原形質膜に浸透することができる。膜浸透を担うペプチドセグメントは、11 ~ 34 アミノ酸残基からなり、アルギニンで高度に富化されており、アルギニンリッチペプチド(A R P)またはペネトラチン(p e n e t r a t i n)と呼ばれることが多い。)。さらにより大きなポリペプチドと共有結合する場合、A R P は、原形質膜を通過する融合ポリペプチドを輸送することができる(4 6 ~ 4 8)。同様に、オリゴヌクレオチドを A R P に共有結合する場合、さらにより迅速に細胞に取り込まれる(4 9 、 5 0)。8 個のアルギニンのポリマーはこの膜貫通輸送に十分であることが最近の研究で示された(5 1)。カチオン性ポリマーと同様に、A R P はまた正電荷であり、s i R N A に結合することができる可能性が高いため、s i R N A と A R P との共有結合にはおそらく必要ではないことが示唆される。

【 0 1 3 8 】

したがって、本発明は、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされた少なくとも1つの R N A i 誘導性物質およびペプチド分子輸送体を含む組成物ならびにこのような組成物の投与による標的遺伝子発現の阻害方法を提供する。本発明は、インフルエンザのリスクのある被験体またはこれに罹患した被験体にこのような組成物を投与する工程を含む、インフルエンザウイルス感染を治療および/または防止方法を提供する。ペプチド分子輸送体には、引用例 4 6 ~ 5 1 、 1 2 0 、および 1 3 4 ~ 1 3 6 ならびに当業者に明らかなるその変形形態が含まれるが、これらに限定されない。アルギニンリッチペプチドには、アルギニン残基のみからなるペプチドが含まれる。

【 0 1 3 9 】

一般に、好ましいペプチド分子輸送体は、約 50 アミノ酸長未満である。本発明の一定の実施形態によれば、ペプチド分子輸送体は、約 7 アミノ酸と 34 アミノ酸との間の長さを有するペプチドである。多数の好ましいペプチドはアルギニンが豊富である。本発明の一定の実施形態によれば、少なくとも 20 % 、少なくとも 30 % 、少なくとも 40 % 、少なくとも 50 % 、少なくとも 60 % 、少なくとも 70 % 、少なくとも 80 % 、または少なくとも 90 % のアルギニンを含む場合、ペプチドはアルギニンリッチである。本発明の一定の実施形態によれば、ペプチド分子輸送体は、6 個と 20 個との間のアルギニン残基を含むアルギニンリッチペプチドである。本発明の一定の実施形態によれば、アルギニンリッチペプチドは、6 個と 20 個との間のアルギニン残基からなる。本発明の一定の実施形態によれば、s i R N A およびペプチド分子輸送体は共有結合しているのに対して、本発明の他の実施形態では、s i R N A およびペプチド分子輸送体は共に混合しているが、互いに共有結合していない。本発明の一定の実施形態によれば、ヒスチジンリッチペプチドを使用する(8 8)。本発明によれば、ヒスチジンリッチペプチドはアルギニンリッチペプチドについて記載したヒスチジン残基の長さおよび比率を示し得る。したがって、本発明は、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされた少なくとも1つの R N A i 誘導性物質およびヒスチジンリッチペプチドを含む組成物ならびにこのような組成物の投与による標的転写物発現の阻害方法を提供する。本発明は、インフルエンザのリスクのある被験体またはこれに罹患した被験体にこのような組成物を投与する工程を含む、インフルエンザウイルス感染を治療および/または防止方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0140】

被験体中の細胞へのRNAi誘導性物質の送達を容易にするためのさらなるペプチドまたは修飾ペプチドを、本発明の組成物で使用することもできる。例えば、一般に、8個と50個との間のリジン残基を含むリジンリッチペプチドのファミリーが記載されている(McKenzie 2000)。これらのペプチドは、組織培養における細胞によって核酸取り込みを強化することができるが、これらは、より長いポリペプチド(例えば、50個を超えるリジン残基を含むPLL)よりも効率が低い被験体内への核酸のためのビヒクルである。これは、体内の核酸/ペプチド複合体の不十分な安定性に一部起因する。ペプチド内の種々の位置での複数のシステインの挿入により、プラスミドDNAの結合後に自発的に酸化してペプチド内ジスルフィド結合を形成する低分子量のDNA縮重ペプチドが得られる。これらの架橋DNA送達賦形剤は、細胞へのプラスミドの送達に使用する場合に、非架橋ペプチドDNA縮合物と比較した場合の遺伝子発現のためのより有効なインデューサーであった(McKenzie 2002)。さらに、ジスルフィド結合形成のためのスルフヒドリル基を含むペプチドは、血清タンパク質への非特異的結合を減少させると考えられるポリエチレングリコール(PEG)を組み込むことができる(Park 2002)。

10

【0141】

以下でさらに考察されるように、本発明は、ガラクトースまたはマンノース残基などの部分を含む糖ペプチドを使用して、RNAi誘導性物質の選択的な取り込みを強化することもできる。このような糖ペプチドは、ジスルフィド結合形成のためのスルフヒドリル基をも含み得る(Park 2002)。本発明は、細胞内液胞(endocytic vesicle)の出口(exit)を強化する種々の薬剤の投与を含む。このような薬剤には、クロロキン(Zhang 2003)およびブピバカインが含まれる(Satishchandran 2000)。出口強化薬を、全身、経口、および/または局所(例えば、所望の作用部位またはそれに極めて近接した部位に)投与することができる。これらを、本発明のsiRNA、shRNA、もしくはRNAi誘導性ベクターと共にまたは個別に送達することができる。

20

【0142】

(C. さらなる高分子送達薬)

本発明は、本発明のRNAi誘導性物質および任意の種々の高分子送達薬(上記に加えて修飾ポリマーが含まれる)を提供する。本発明は、さらに、細胞中のインフルエンザウイルス転写物発現の阻害方法および組成物の投与によるインフルエンザウイルス感染の治療または防止方法を提供する。適切な送達薬には、細胞へのDNAの送達を強化することが示された種々の薬剤が含まれる。これらには、上記などのカチオン性ポリマーの修飾バージョン(例えば、ポリ(L-ヒスチジン)-グラフト-ポリ(L-リジン)ポリマー(Benns 2000)、ポリヒスチジン-PEG(Putnam 2003)、葉酸-PEG-グラフト-ポリエチレンイミン(Benns 2002)、ポリエチレンイミン-デキストラン硫酸(Tiyanaboonchai 2003)など)が含まれる。ポリマーは、分岐または直鎖であってよく、グラフト化されていてもグラフト化されていなくてもよい。本発明によれば、ポリマーは、本発明のRNAi誘導性物質と複合体を形成し、その後被験体に投与する。複合体を、ナノ粒子またはナノコポリマーということができる。任意のポリマーを、補体活性化および他の原形質タンパク質の結合の減少に有用なPEGまたは他の親水性ポリマーが組み込まれるように修飾することができる。カチオン性ポリマーを複数修飾することができる。例えば、カチオン性ポリマーを、ポリマー(例えば、イミダゾール)の負電荷を減少させる部分が組み込まれるように修飾し、PEGのような第2の部分でさらに修飾することができる。

30

40

【0143】

さらに、上記のカチオン性ポリマーと区別される種々のポリマーおよびポリマーマトリクスを使用することもできる。このようなポリマーには、多数の非カチオン性ポリマー(すなわち、生理学的pHでは正電荷ではないポリマー)が含まれる。このようなポリマー

50

は、一定の利点（例えば、細胞傷害性の減少およびいくつかの場合 F D A 承認）を有し得る。多数の適切なポリマーは、他の状況で薬物および遺伝子の送達を増強することを示した。このようなポリマーには、例えば、本発明の R N A i 誘導性物質の送達のためのナノ粒子に処方することができるポリ（乳酸）（ P L A ）、ポリ（グリコリド）（ P L G ）、およびポリ（ D L - ラクチド - コ - グリコリド）（ P L G A ）（ P a n y a m 2 0 0 2 ）が含まれる。上記のコポリマーおよび組成物も使用することができる。本発明の一定の実施形態では、カチオン性ポリマーを使用して、 s i R N A 、 s h R N A 、またはベクターを縮合することができ、縮合複合体を、 P L G A または別の非カチオン性ポリマーによって保護する。使用することができる他のポリマーには、 P l u r o n i c 8 5 と複合体化することができるポリビニルアルコールまたはポリ（ N - エチル - 4 - ビニルピリジウムプロミド）などの非縮合ポリマーが含まれる。本発明で使用するための他のポリマーには、カチオン性ポリマーと非カチオン性ポリマーとの組み合わせが含まれる。例えば、ポリ（乳酸 - コ - グリコール酸）（ P L G A ） - グラフト化ポリ（ L - リジン）（ J e o n g 2 0 0 2 ）および他の組み合わせ（ P L A 、 P L G 、または P L G A が含まれる）および上記などの任意のカチオン性ポリマーまたは修飾カチオン性ポリマーを使用することができる。

【 0 1 4 4 】

（ D . 送達強化部分が組み込まれた送達薬 ）

本発明は、細胞への薬剤の送達を強化し、そして / または標的転写物を阻害することが望ましい細胞への薬剤の選択的送達を強化する部分を組み込むための任意の送達薬の修飾を含む。任意の種々の部分（（ i ）阻害が望まれる細胞によって発現された分子と特異的に結合する抗体または抗体フラグメント、（ i i ）阻害が望まれる細胞によって発現された分子と特異的に結合するリガンドが含まれるが、これらに限定されない）を使用することができる。好ましくは、分子は、細胞表面上で発現する。モノクローナル抗体が一般に好ましい。気道上皮細胞の場合、適切な部分には、気道上皮細胞への送達および特異性を増大するために種々の上記送達薬と抱合することができる、 p 2 Y 2 プリノセプター、ブラジキニン受容体、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター R 、またはセルピン酵素複合体などの受容体と特異的に結合する抗体が含まれる。同様に、これらの種々の分子のためのリガンドを、気道上皮細胞の送達および選択性を増大するための送達薬と抱合することができる。例えば、（ F e r r a r i 2 0 0 2 ）を参照のこと。本発明の一定の好ましい実施形態では、抗体またはリガンドの結合により、結合複合体の内在化が誘導される。本発明の 1 つの実施形態では、送達強化薬（例えば、抗体、抗体フラグメント、またはリガンド）を、送達を増大するか選択性を強化するための R N A i 誘導性ベクター（例えば、 D N A ベクター）に抱合する。抗体またはリガンドと本明細書中に記載の核酸または種々の送達薬との抱合方法は、当該分野で周知である。例えば、 U R L w w w . p i e r c e n e t . c o m のウェブサイトから利用可能であり、且つ初版が 1 9 9 4 - 9 5 年の P i e r c e C a t a l o g およびその引用文献である「 C r o s s - L i n k i n g 」 , P i e r c e C h e m i c a l T e c h n i c a l L i b r a r y ならびに W o n g S S , C h e m i s t r y o f P r o t e i n C o n j u g a t i o n a n d C r o s s l i n k i n g , C R C P r e s s P u b l i s h e r s , B o c a R a t o n , 1 9 9 1 を参照のこと。

【 0 1 4 5 】

（ E . 肺への移入に適切なサーファクタント ）

天然の内因性サーファクタントは、肺中の肺胞表面と肺胞気との間に層を形成し、肺胞内の表面張力の減少によって肺胞崩壊を減少させる、リン脂質、中性脂質、およびタンパク質（サーファクタントタンパク質 A 、 B 、 C 、および D ）から構成される化合物である（ 7 7 ~ 8 4 ）。サーファクタント分子は、肺胞壁の全細胞被膜を浸漬させる脂質フィルム内に拡散し、これらが本質的に単分子を產生する場合、その上の全てに層が行き渡る。未熟児のサーファクタントの欠損では、しばしば呼吸窮迫症候群（ R D S ）を発症する。したがって、この病態の治療および / または防止のための種々のサーファクタント調製物

10

20

30

40

50

が開発されている。サーファクタントは、動物肺洗浄物およびヒト羊水から抽出するか、合成材料から生成することができる（例えば、米国特許第4,338,301号；同第4,397,839号；同第4,312,860号；同第4,826,821号；同第5,110,806号を参照のこと）。種々のサーファクタント処方物は、市販されており、Infasurf（登録商標）（ONY, Inc., Amherst, NY製）；Survanta（登録商標）（Ross Labs, Abbott Park, IL）、およびExosurf Neonatal（登録商標）（GalexosmithKline, Research Triangle Park, NC）が含まれる。

【0146】

本明細書中で使用される、句「肺への移入に適切なサーファクタント」は、市販のサーファクタント製品で使用される特定の処方物ならびに上記の本発明の出願書類およびその等価物に記載されており、且つ特許請求の範囲に記載されている本発明の組成物を含む。本発明の一定の実施形態では、この句は、10～20%のタンパク質および80～90%の脂質（共に全サーファクタントに基づく）を含む調製物を含み、脂質は約10%の中性脂質（例えば、トリグリセリド、コレステロール）および約90%のリン脂質（共に全脂質に基づく）からなり、全リン脂質に基づくホスファチジルコリン含有率は86%である（「%」および「部」は、乾燥材料に基づく）（米国特許第4,388,301号および同第4,397,839号）。

【0147】

本発明の一定の実施形態では、この句は、タンパク質を完全にまたは実質的に含まなくともよい合成組成物（例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよび脂肪アルコールを含むか本質的に含む組成物であって、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）は主成分としてサーファクタント組成物を含み、脂肪アルコールは副成分として任意必要に応じてチロキサポールなどの非毒性非イオン性界面活性剤を含む（米国特許第4,312,860号；同第4,826,821号；および同第5,110,806号を参照のこと））を含む。当業者は、上記特許および文献に記載の試験を参考することによって、任意の特定のサーファクタント組成物が肺への移入に適切であるかどうかを判定することができる。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、サーファクタントが拡散して肺胞を覆う能力を容易にし、サーファクタント自体の組成物の肺中の細胞によるs i RNAおよび/またはベクターの取り込みを容易にすることが可能である。

【0148】

Infasurfは、気管内点滴注入のみを意図する滅菌非発熱性肺サーファクタントである。これは、リン脂質、中性脂質、および親水性サーファクタント会合タンパク質BおよびCを含む子牛肺由来の天然のサーファクタントの抽出物である。Infasurfは、呼吸窮迫症候群治療用として米国食品医薬品局で承認されているため、気道および肺への投与のための安全かつ許容されるビヒクル（vehicle）である。Survantaもウシ肺由来の抽出物であり、Exosurf Neonatalは、ジパルミトイルホスファチジルコリン、セチルアルコール、およびチロキサポールを含むタンパク質非合成の肺サーファクタントである。これらの両サーファクタントも、呼吸窮迫症候群の治療薬としてU.S.F.D.Aに承認されている。

【0149】

実施例14に記載するように、本発明者らは、インフルエンザRNAにターゲティングされたs h RNAの合成のためのテンプレートとして作用するDNAベクターが、Infasurfと混合してマウスに鼻腔内点滴注入によって投与した場合にインフルエンザウイルス産生を阻害することができることを示した。さらに、実施例13に記載のように、本発明者らは、同一のs h RNAを発現するレンチウイルスが細胞組織中の細胞におけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示した。これらの結果は、インフルエンザウイルスRNAにターゲティングされたs h RNAを細胞に送達し、インフルエンザウイルス感染の治療および/または防止に有効なs i RNAにプロセシングすることができるることを証明する。結果はまた、Infasurfなどのサーファクタント材料（例えば、

10

20

30

40

50

組成物および／または天然の肺サーファクタントに類似の性質を有する材料)が肺への s h R N A の送達のための適切なビヒクルであることを証明する。さらに、結果により、インフルエンザウイルスにターゲティングされた s i R N A が肺および／または気道に送達された場合にインフルエンザウイルス産生を有効に阻害することが示唆する。したがって、本発明は、(i)インフルエンザウイルス調製物にターゲティングされた少なくとも1つの R N A i 誘導性物質および(ii)肺への移入に適切なサーファクタント材料を含む組成物を提供することができる。サーファクタントおよび R N A i 誘導性物質を含む本発明の組成物を、任意の種々の方法(点滴注入、吸入、エアゾールなど)で肺に移入することができる。組成物が100%未満のサーファクタントを含み得ることに留意のこと。例えば、組成物は、約10重量%と25重量%との間のサーファクタント、約25重量%と50重量%との間のサーファクタント、約50重量%と75重量%との間のサーファクタント、約75重量%と100重量%との間のサーファクタントを含み得る。本発明は、インフルエンザのリスクを有する被験体またはこれを罹患した被験体に上記組成物を投与する工程を含む、インフルエンザを治療または防止方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0150】

(F. 肺への R N A i 誘導性物質の送達のためのさらなる薬剤)

本発明は、肺上皮細胞への本発明の R N A i 誘導性物質の送達を増強するための種々のさらなる薬剤および方法の使用を提供する。方法は、カルシウムキレート化を引き起こすための E G T A と共に送達または投与する前のベクターの C a P O₄ 沈殿を含む。界面活性剤およびチキソトロピック溶液の投与も使用することができる。ペルフルオロ化合物液を、送達ビヒクルとして使用することもできる。これらの方法およびその遺伝子導入における適用性については、(Weiss 2002)を参照のこと。さらに、本発明は、肺への送達のための本発明の R N A i 誘導性物質を組み込むタンパク質/ポリエチレンイミンの使用を含む。このような複合体は、アルブミン(または他の可溶性タンパク質)と組み合わせたポリエチレンイミンを含む。遺伝子導入のためのプラスミドを含む同様の複合体により、血管内投与後に肺組織に送達されることが示された(Orson 2002)。本発明の R N A i 誘導性物質を含むタンパク質/PEI複合体により、肺から離れた細胞への送達を強化することもできる。

【0151】

(G. 脂質)

実施例3に記載のように、本発明者らは、Oligofectamine(商標)として公知の脂質薬の存在下でのインタクトなニワトリ胚への注射によってインフルエンザウイルス転写物にターゲティングされた s i R N A の投与によりインフルエンザウイルス産生が有効に阻害され、Oligofectamineの非存在下でのこの s i R N A の投与では有効に阻害されないことを示した。これらの結果は、インタクトな生物中の s i R N A の有効性を強化するための脂質送達薬の有用性を証明する。したがって、本発明は、(i)インフルエンザウイルス調製物にターゲティングされた少なくとも1つの R N A i 誘導性物質および(ii)脂質を含む組成物を提供する。さらに、本発明は、被験体に本発明の組成物を投与する工程を含む、インフルエンザウイルス産生の阻害方法およびインフルエンザ感染の治療方法を提供する。

【0152】

(V. インフルエンザウイルス感染/複製の分析)

上記のように、本発明の R N A i 誘導性物質の1つの使用は、インフルエンザウイルス感染/複製サイクルおよび宿主細胞に対するインフルエンザウイルスタンパク質の効果の分析および特徴づけにおける使用である。ウイルス感染および／または複製サイクルの1つまたは複数の時期に関与する任意の種々のウイルス遺伝子および／または代謝、生合成、サイトカイン放出などの宿主細胞機能または活性に影響を与えるウイルス遺伝子にターゲティングされた s i R N A および s h R N A を設計することができる。 s i R N A 、 s h R N A 、または R N A i 誘導性ベクターを、ウイルス感染の前、その間、または後に細胞に移入することができ、所望するならば、種々の感染/複製サイクルの時期ならびに

細胞の活性および機能に対する効果をアッセイすることができる。

【0153】

(VII. 治療への適用)

上記のように、本発明のRNAi誘導性物質を含む組成物を使用して、インフルエンザウイルスの感染または複製を阻害または減少させることができる。このような適用では、有効量の本発明の組成物を、インフルエンザウイルスへの曝露の前、同時、または後で細胞または生物に送達させる。好ましくは、RNAi誘導性物質の量は、インフルエンザウイルス感染の1つまたは複数の症状を軽減または遅延させるのに十分である。説明のために、この節は、本発明のsiRNAをいうが、明白なように、本発明は、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされた他のRNAi誘導性物質のための類似の適用を含む。

10

【0154】

本発明のsiRNA含有組成物は、1つの標的転写物中の1つの部位にターゲティングされた1つのsiRNA種を含み得るか、1つまたは複数の転写物中の1つまたは複数の部位にターゲティングされた複数の異なるsiRNA種を含み得る。実施例8は、単独または組み合わせのいずれかでのインフルエンザウイルス産生を阻害する優れた能力を有するsiRNAの体系的同定への一般的アプローチを記載する。

20

【0155】

本発明のいくつかの実施形態では、異なる遺伝子にターゲティングされた異なるsiRNA種集団を含む組成物を使用することが望ましい。例えば、異なるウイルス転写物に指向する種々のsiRNAを使用したウイルス生活環の複数の時期にウイルスを攻撃することが望ましい。本発明の一定の実施形態によれば、siRNA組成物は、各ウイルスゲノムセグメントにターゲティングされたsiRNAを含む。

30

【0156】

本発明の一定の実施形態によれば、本発明のsiRNA組成物は、1つのウイルス転写物にターゲティングされた2つ以上のsiRNAを含み得る。一例を挙げれば、標的転写物のコード領域にターゲティングされた少なくとも1つのsiRNAおよび3'UTRにターゲティングされた少なくとも1つのsiRNAを含むことが望ましい。組成物中の少なくとも1つのsiRNAが分解のために転写物をターゲティングする一方で、少なくとも1つの他のsiRNAが分解を回避する任意の転写物の翻訳を阻害するため、このストラテジーにより、関連転写物によってコードされる産物は産生されないというさらなる確信を得ることができる。

40

【0157】

上記のように、本発明は、「治療カクテル」(複数のsiRNAオリゴヌクレオチドを投与するアプローチおよび1つのベクターが複数の標的を阻害するsiRNAまたは複数のsiRNAを得るようにプロセシングすることができるRNAの合成を指示するアプローチが含まれるが、これらに限定されない)を含む。本発明の一定の実施形態によれば、組成物は少なくとも1つのインフルエンザウイルスA転写物および少なくとも1つのインフルエンザウイルスB転写物にターゲティングされたsiRNAを含む。本発明の一定の実施形態によれば、組成物は、特定のセグメントの同一部分をターゲティングする異なる配列を有する複数のsiRNAを含む。本発明の一定の実施形態によれば、組成物は、異なるインフルエンザウイルス株またはサブタイプを阻害する複数のsiRNAを含む。

【0158】

本発明者らが、HA産生の大幅な減少によって明らかのように、例えば、トランスフェクトした遺伝子、組み込まれた導入遺伝子、組み込まれたウイルスゲノム、感染性分子クローンなどと対照的に全感染性ウイルスを使用してインフルエンザウイルス複製の有効なsiRNA媒介阻害を証明したことが重要である。

【0159】

上記のように、インフルエンザウイルスが抗原不連続変異および抗原連続変異の両方を受けると認識される。したがって、治療薬に対する耐性が出現し得る。このため、本発明

50

の組成物を同時に使用した後、特定の siRNA によって阻害されない変異体が出現し得るよう、変異および／または再集合が起こると予想され得る。したがって、本発明は、進化した治療計画を意図するものとなる。例えば、特定の変異または再集合に関する特定の場合、1つまたは複数の新規の siRNA を選択することができる。例えば、どのような変異をも組み込むか、新規に獲得した RNA セグメントをターゲティングすることになるのかという点以外は元の siRNA と同一の新規の siRNA を設計することがしばしば可能であり、他の場合、同一の転写物内で新規の配列をターゲティングすることが望ましく、さらに他の場合、新規の転写物全体をターゲティングすることが望ましい。

【 0 1 6 0 】

本発明の siRNA と、感染の1つまたは複数の症状または特徴づけを阻害、減少、または防止するために1つまたは複数の他の抗ウイルス薬とを組み合わせることがしばしば望ましい。本発明の一定の好ましい実施形態では、本発明の siRNA を、1つまたは複数の他の抗ウイルス薬（アマンタジンもしくはリマンタジン（共にウイルス脱外被に関与するイオンチャネル M2 タンパク質を阻害する）および／またはザナミビル、オセルタミビル、ペラミビル（BCX-1812、RWJ-270201）、Ro64-0796（GS 4104）、またはRWJ-270201（全て NA インヒビターであり、原形質膜からのウイルス粒子の適切な放出を防止する）など）と組み合わせる。しかし、本発明の siRNA 組成物の投与を、1つまたは複数の任意の種々の薬剤（例えば、変種が公知のインフルエンザワクチン（例えば、インフルエンザウイルスまたはウイルス抗原を使用した従来のワクチンおよび DNA ワクチン）が含まれる）と組み合わせることもできる。インフルエンザ治療または防止のための使用またはその研究における種々の薬剤に関するさらなる情報については、Palese, P. and Garcia-Sastre, 2002; Cheung and Lieberman, 2002, Leuscher-Mattli, 2000; and Stiver, 2003 を参照のこと。本発明の異なる実施形態では、用語「～と組み合わせた」または「～との組み合わせ」は、siRNA が他の薬剤として同一の混合物中に存在することまたは個体の治療計画が siRNA と他の薬剤の両方を含み、必ずしも同一混合物もしくは同時に送達されないことのいずれかを意味し得る。本発明の一定の実施形態によれば、抗ウイルス薬は、アマンタジン、リマンタジン、レレンザ、またはタミフルなどの米国食品医薬品局で承認された薬剤である。

【 0 1 6 1 】

本発明の siRNA は、ワクチン接種のための補助的ストラテジーを提供し、現在利用可能であるか開発中の任意の種々のワクチンを接種したか接種していない個体に投与することができる（Palese, P. and Garcia-Sastre, A., J. Clin. Invest., 110 (1) : 9-13, 2002 に概説）。米国における現在のワクチン処方物は、不活化ウイルスを含み、筋肉内注射によって投与しなければならない。ワクチンは3つの部分から構成され、インフルエンザ B 型に加えて現在市場に出回っているインフルエンザ A の両サブタイプ（H3N2 および H1N1）由来の代表的な株を含む。各季節によってその季節のワクチンで使用するための特定の株を同定するが特に推奨される。他のワクチニアプローチには、鼻腔用スプレーによって投与することができる低温馴化（cold-adapted）インフルエンザ生ウイルス；ウイルスゲノムの欠失または他の変異を含む遺伝子操作されたインフルエンザウイルス生ワクチン；複製欠損インフルエンザウイルス、および1つまたは複数のウイルスタンパク質をコードするプラスミド DNA を筋肉内または局所的に投与した DNA ワクチンが含まれる（例えば、Macklin, M. D., et al., J. Virol., 72 (2) : 1491-6, 1998; Illum, L., et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 51 (1-3) : 81-96, 2001; Ulmer, J., Vaccine, 20 : S74-S76, 2002 を参照のこと）。このような治療薬の有効性には有効な免疫応答は必要ないため、免疫無防備状態の患者および高齢の個体は、RNAi ベースの治療薬から特定の利益を得ることに留意のこと。

【 0 1 6 2 】

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの実施形態では、インフルエンザウイルスに感染した細胞または少なくともインフルエンザウイルス感染に感受性を示す細胞（例えば、シアル酸含有受容体を発現する細胞）に本発明の siRNA 組成物の投与をターゲティングすることが望ましい。他の実施形態では、送達に関する最も広い選択肢が利用可能であることが望ましい。

【 0 1 6 3 】

上記のように、本発明の治療プロトコールは、インフルエンザウイルスへの曝露の前、同時、または後に有効量の siRNA を投与する工程を含む。例えば、非感染個体を、インフルエンザへの曝露前に本発明の組成物で「免疫化」することができる；危険性のある個体（例えば、高齢の個体、免疫無防備状態の個体、インフルエンザウイルスに感染していることが疑われるか、あるいは可能性が高いか、既知の個体と最近接触した個体）を、疑いがあるか既知の曝露で実質的に一過性に（例えば、48時間内、好ましくは24時間以内、より好ましくは12時間以内）治療することができる。勿論、感染したことが公知の個体は、いつでも本発明の治療を受けることができる。

【 0 1 6 4 】

遺伝子治療プロトコールは、インフルエンザウイルス感染の前、実質的に一過性に、または後に被験体に阻害 siRNA の発現を指示することができる有効量の遺伝子治療ベクターを投与する工程を含み得る。上記の代わりまたは上記と組み合わせて使用することができる別のアプローチは、被験体から細胞（例えば、幹細胞または免疫系細胞）を単離し、必要に応じて組織培養物中の細胞を拡大し、インビトロで阻害 siRNA の発現を細胞に指示することができる遺伝子治療ベクターを投与する方法がある。その後、細胞を被験体に戻す。必要に応じて、 siRNA を発現する細胞を、被験体に移入する前にインビトロで選択することができる。本発明のいくつかの実施形態では、細胞株または被験体ではない個体由来の細胞であり得る細胞集団を使用することができる。被験体からの幹細胞、免疫系細胞などの単離およびそれらを被験体に戻す方法は、当該分野で周知である。例えば、化学療法を受けた患者における骨髄移植、末梢血幹細胞移植などにおいては、このような方法を使用する。

【 0 1 6 5 】

さらに別のアプローチでは、経口遺伝子治療薬を使用することができる。例えば、米国特許第 6,248,720 号は、プロモーターの調節下で遺伝子が保護されるように微粒子中に含まれ、作動形態 (operative form) で細胞に送達され、それにより非侵襲性遺伝子送達を達成する方法および組成物を記載する。微粒子の経口投与後、遺伝子が腸の吸収細胞を含む上皮細胞に取り込まれ、腸管関連リンパ組織に取り込まれ、粘膜上皮から離れた細胞に均一に輸送される。本明細書中に記載されるように、微粒子は、遺伝子を粘膜上皮から離れた部位に送達することができる（すなわち、上皮バリアを通過し、全身を循環し、それにより他の位置に細胞がトランスフェクトされる）。

【 0 1 6 6 】

上記のように、インフルエンザウイルスは、ヒトに加えて、広範な種々の種に感染する。本発明は、非ヒト種、特にニワトリ、ブタ、およびウシなどの種の治療のための本発明の siRNA 組成物の使用を含む。

【 0 1 6 7 】

（VII. 薬学的処方物）

本発明の組成物を、任意の利用可能な経路（非経口（例えば、静脈内）、皮内、皮下、経口、鼻腔内、気管支、眼内、経皮（局所）、経粘膜、直腸、および腔内が含まれるが、これらに限定されない）による送達のために処方することができる。好ましい送達経路には、経粘膜、鼻腔内、気管支、および経口が含まれる。本発明の薬学的組成物は、典型的には、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせることで、 siRNA または他の薬剤（送達後に siRNA を産生するベクターなど）が含まれる。本明細書で使用される、用語「薬学的に受容可能なキャリア」には、薬学的投与に適合する溶媒、分散媒、コーティング、抗菌薬および抗真菌薬、ならびに等張化剤および吸収遅延剤などが含まれる。補助活性化合物を、組成物に組み込むこともできる。

10

20

30

40

50

【0168】

薬学的組成物を、その意図する投与経路に適合するように処方する。非経口（例えば、静脈内）、筋肉内、皮内、または皮下適用のために使用される溶媒または懸濁液には、以下の成分が含まれ得る：注射用の水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌薬；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤；酢酸、クエン酸、またはリン酸などの緩衝液；および塩化ナトリウムまたはデキストランなどの緩衝液。塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基でpHを調整することができる。非経口調製物を、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または複数回投与バイアル中に封入することができる。

10

【0169】

注射に適切な薬学的組成物は、典型的には、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与のために、適切なキャリアには、生理学的食塩水、静菌水、Cremophore E L（商標）（BASF, Parsippany, NJ）、またはリン酸緩衝化生理食塩水（PNS）が含まれる。全ての場合、組成物は滅菌されているべきであり、シリンジ中に容易に存在する範囲の流動物であるべきである。好ましい薬学的組成物は、製造および保存条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。一般に、関連するキャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびその適切な混合物を含む溶媒または分散媒であり得る。例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合に必要な粒子サイズの維持、および界面活性剤の使用によって適切な流動性を維持することができる。種々の抗菌薬および抗真菌薬（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、およびチメロサールなど）によって微生物作用を防止することができる。多くの場合、組成物中に等張化剤（例えば、糖、ポリアルコール（マンニトール（mannitol）、ソルビトール、塩化ナトリウム））を含めることが好ましい。組成物に吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を含めることにより、注射用組成物を長期吸収させることができる。

20

【0170】

上で列挙した成分の1つまたは組み合わせを含む適切な溶媒中に必要量の活性化合物を組み込み、その後濾過滅菌することによって、滅菌注射用溶液を調製することができる。好ましくは、注射用溶液は、内毒素を含まない。一般に、分散媒の基剤および上記由来の必要な他の成分を含む滅菌ビヒクリへの組み込みによって分散液を調製する。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、有効成分およびその予め濾過滅菌した溶液由来の所望の成分の粉末がさらに得られる真空乾燥および凍結乾燥である。

30

【0171】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。経口治療投与の目的のために、活性化合物を、賦形剤に組み込み、錠剤、トローチ、またはカプセル（例えば、ゼラチンカプセル）の形態で使用することができる。うがい薬として使用するための流動物キャリアを使用して、経口組成物を調製することもできる。組成物の一部として薬学的に適合する結合剤およびアジュvant材料を含むことができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、以下の任意の成分または類似の性質の化合物を含み得る：微結晶性セルロース、トラガカントガム、またはゼラチンなどの結合剤；デンプンまたはラクトースなどの賦形剤；アルギン酸、Primogel、またはコーンスタークなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはStereotexなどの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤（glidant）；スクロースまたはサッカリンなどの甘味料；またはペパーミント、メチルサリチル酸、またはオレンジフレーバーなどの嗜味嗜臭薬。経口送達用の処方物は、胃腸管内の安定性を改善し、そして/または吸収を強化するための薬剤を遊離に組み込むことができる。

40

50

【0172】

吸入による投与のために、本発明の siRNA、shRNA、またはベクターを、好ましくは、適切な高圧ガス（例えば、二酸化炭素または）を含む加圧コンテナまたはディスペンサー、または噴霧器由来のエアゾールスプレーの形態で送達する。本発明は、特に、鼻腔用スプレーを使用した siRNA 組成物の送達を意図する。インフルエンザウイルスに指向する DNA ワクチンの鼻腔内投与は、CD8T 細胞応答を誘導することが示されており、この経路によって送達された場合、気道内の少なくともいくつかの細胞は DNA を取り込むことができる（例えば、K. Okuda, A. Ihat, S. Watabe, E. Okada, T. Yamakawa, K. Hamajima, J. Yang, N. Ishii, M. Nakazawa, K. Okuda, K. Ohnari, K. Nakajima, K. -Q. Xin, 「Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene」, Vaccine 19: 3681-3691, 2001 を参照のこと）。siRNA は、ワクチンで使用されたものなどのプラスミド DNA よりはるかに小さく、siRNA がさらにより大量に取り込まれることが示唆される。さらに、本発明の一定の実施形態によれば、気道内の細胞による核酸取り込みを容易にするための本発明の送達因子は、薬学的組成物中に含まれる（S. -O. Han, R. I. Mahato, Y. K. Sung, S. W. Kim, 「Development of biomaterials for gene therapy」, Molecular Therapy 2: 302317, 2000）。本発明の一定の実施形態によれば、siRNA 組成物は、実施例 10 により詳細に記載したエアゾール投与のための多孔質巨大粒子として処方される。

【0173】

経粘膜または経皮手段によって全身投与を行うこともできる。経粘膜または経皮投与のために、透過すべき障壁に適切な浸透剤を処方物で使用する。このような浸透剤は、一般に、当該分野で公知であり、例えば、経粘膜投与、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。鼻腔用スプレー、または坐剤の使用によって経粘膜投与を行うことができる。経皮投与のために、活性化合物を、当該分野で一般に公知の軟膏、軟膏剤（salve）、ゲル、またはクリームに処方する。

【0174】

直腸送達のために、座剤（例えば、カカオバターおよび他のグリセリドなどの従来の座剤基剤）または浣腸剤の形態で化合物を調製することもできる。

【0175】

上記の送達因子に加えて、本発明の一定の実施形態では、徐放正の処方物（移植片およびマイクロカプセル化送達系が含まれる）などの体内からの急速な排除から化合物を保護するキャリアを使用して、活性化合物（siRNA、shRNA、またはベクター）を調製する。エチレンビニルアセテート、ポリアンヒドライド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルソエステル、およびポリ乳酸などの生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。このような処方物の調製方法は、当業者に明らかである。材料を、Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. から入手することもできる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を使用して感染細胞にターゲティングされたリポソームが含まれる）を、薬学的に受容可能なキャリアとして使用することもできる。例えば、米国特許第 4,522,811 号に記載の当業者に公知の方法にしたがって、これらを調製することができる。

【0176】

投与の容易さおよび投薬量の均一性の点から、単位投与形態で経口または非経口組成物を処方することが有利である。本明細書中で使用される「単位投与形態」とは、治療すべき被験体のための単位投薬量として適切な物理的に個別の単位をいう（必要な薬学的キャリアに関して所望の効果が得られるように計算された所定量の活性化合物を含む各単位）

10

20

30

40

50

。

【0177】

LD_{50} （集団の50%の致死用量）および ED_{50} （集団の50%で治療に有効な用量）このような化合物の毒性および治療有効性を判定することができる。毒性と治療効果との間の用量比は治療指数であり、 LD_{50} / ED_{50} 比として示すことができる。治療指数の高い化合物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物を使用することもできるが、非感染細胞に対する損傷の可能性を最小にし、それにより副作用を軽減するために罹患組織部位へのこのような化合物をターゲティングする送達系を設計するように注意すべきである。

【0178】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを、ヒトで使用するための一定の投薬範囲の処方で使用することができる。このような化合物の投薬量は、好ましくは、ほとんどまたは全く毒性のない ED_{50} を含む体循環濃度範囲内である。投薬量は、使用した投与形態および使用した投与経路に依存してこの範囲内で変化することができる。本発明の方法で使用した任意の化合物のために、細胞培養アッセイ由来の治療有効量を最初に評価することができる。細胞培養物において判定したところ、 IC_{50} （すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルの用量を処方することができる。このような情報を使用して、ヒトに有用な用量をより正確に判定することができる。例えば、高速液体クロマトグラフィによって血漿レベルを測定することができる。

【0179】

治療有効量の薬学的組成物は、典型的には、約0.001~30mg/kg体重、好ましくは約0.01~25mg/kg体重、より好ましくは約0.1~20mg/kg体重、さらにより好ましくは約1~10mg/kg、2~9mg/kg体重、3~8mg/kg体重、4~7mg/kg体重、または5~6mg/kg体重の範囲である。薬学的組成物を、必要に応じて種々の間隔および異なる期間（例えば、1日に複数回、毎日、隔日、1週間と10週間との間、2週間と8週間との間、3週間と7週間との間（4、5、または6週間など）に1回）投与することができる。当業者は、一定の因子が被験体を有効に治療するために必要な投薬量およびタイミングに影響を与えることができると認識し、疾患もしくは障害の重症度、治療歴、身体全体の健康および/または被験体の年齢ならびに存在する他の疾患が含まれるが、これらに限定されない。一般に、本明細書中に記載のsiRNA、shRNA、またはベクターでの被験体の治療は、1回の治療を含み得るか、多数の場合、一連の治療を含み得る。

【0180】

用量の例には、1kgの被験体またはサンプルあたりミリグラムまたはマイクログラム単位の本発明のsiRNA（例えば、約1μg/kg~約500mg/kg、約100μg/kg~約5mg/kg、または約1μg/kg~約50μg/kg）が含まれる。局所投与（例えば、鼻腔内）では、これらよりもはるかに少ない用量を使用することができる。siRNAの適量はsiRNAの潜在性に依存し、必要に応じて特定のレシピに合わせることができることができがさらに理解される（例えば、予め選択した所望の応答を達成するまで漸増用量の投与）。任意の特定の動物被験体のための特定の用量レベルは、種々の要因（使用した特定の化合物の活性、年齢、体重、身体全体の健康、性別、被験体の食事、投与期間、投与経路、排泄率、任意の薬物の組み合わせ、および調整すべき発現または活性の程度）に依存し得ると理解される。

【0181】

上記のように、本発明は、非ヒト動物（ウマ、ブタ、およびトリが含まれるが、これらに限定されない）の治療のための本発明のsiRNA組成物の使用を含む。したがって、家畜薬理学および医学の公知の原理にしたがって、投与量および投与方法を選択することができる。ガイダンスを、例えば、Adams, R. (ed.), Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 8th editi

10

20

30

40

50

on, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001に見出すことができる。

【0182】

上記のように、s i R N A またはs h R N A の転写のためのテンプレートとして作用する核酸分子を、遺伝子治療ベクターとして使用することができるベクターに挿入することができる。一般に、例えば、静脈内注射、局所投与、または定位注射によって、遺伝子治療ベクターを被験体に送達することができる（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057を参照のこと）。本発明の一定の実施形態では、遺伝子治療ベクターおよび送達因子を含む本発明の組成物を経口または吸入によって送達することができ、カプセル化するか、分解から保護するために操作することなどができる。遺伝子治療ベクターを含む薬学的組成物は、許容可能な希釈剤を含み得るか、遺伝子送達用のビヒクルが埋め込まれた徐放性マトリクスを含み得る。あるいは、組換え細胞から完全な遺伝子送達ベクター（例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター）をインタクトなまま産生することができる場合、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1つまたは複数の細胞を含み得る。

【0183】

本発明の薬学的組成物を、投与についての説明書と共に、コンテナ、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

【0184】

（さらなる実施形態）

本明細書中に提供した多数の技術を、インフルエンザウイルス以外の感染性因子による感染に容易に適用することができると認識される。したがって、本発明は、感染性因子の生活環に関する1つまたは複数の薬剤特異的遺伝子の発現または活性を阻害するR N A i 誘導性物質（例えば、s i R N A 、s h R N A 、またはR N A i 誘導性ベクター）の投与を介した任意の感染性因子による感染および／または複製を阻害するための方法および組成物を提供する。例えば、本発明は、体外から容易に接近可能な細胞に感染する感染性因子による感染および／または複製を阻害するための方法および組成物を提供する。このような細胞には、皮膚細胞および粘膜細胞（例えば、気道、尿生殖路、および眼の細胞）が含まれる。

【0185】

これらの条件には、ウイルス、原生動物、および／または真菌因子による感染が含まれる。本明細書中に記載の本発明のs i R N A 組成物を使用した治療に適切な気道感染には、ハンタウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、コクシジオイデス真菌症、およびヒストプラズマ症感染が含まれるが、これらに限定されない。R N A i 誘導性組成物を使用した治療に適切な尿生殖路および皮膚の感染には、乳頭腫ウイルス（他の病態もあるが、子宮頸癌を発症する）およびヘルペスウイルスが含まれるが、これらに限定されない。

【0186】

特に、R N A i ベースの治療は、（i）有効なワクチンが存在しないこと、および／または（ii）他の有効な機構が存在しないことおよび／または既存の治療計画が長期にわたるか取り扱いにくいこと、および／または（iii）因子がより古い治療またはワクチンを無効にすることができる遺伝子の変化を受けることのいずれかの相互作用に特に適切であり得ることに留意のこと。これらの因子は、生物兵器で使用するための多くの候補を含み、したがって、有効な予防および治療方法の開発に大きな関心が寄せられている。トリパノゾーマは、遺伝子組換えによって表面抗原を頻繁に変化させる。新規の表面抗原をコードする転写物にターゲティングされたs i R N A およびs h R N A を迅速に設計する能力によって提供される自由度（flexibility）により、R N A i ベースの治療が表面抗原を急速に変化させる生物に起因する疾患に適切であり得ることから、免疫系ベースのアプローチが回避されることが示唆される。

【0187】

10

20

30

40

50

いずれの場合にも、当業者は、有効な感染、生存、複製、変異などに必要または重要な1つまたは複数の因子特異的転写物を選択する。「因子特異的転写物」は、通常非感染宿主細胞で見出される転写物の配列とRNAiの標的として作用するのに十分な長さの領域が異なる配列を有する転写物を意味する。一般に、このような領域は、少なくとも15又クレオチド長である。宿主細胞mRNA由来の配列を含むインフルエンザウイルスマRNAを因子特異的転写物と見なすことに留意のこと。因子特異的転写物は、転写因子のゲノム中に存在し、その後感染プロセス中に產生され得る。次いで、1つまたは複数のsiRNAを、本明細書中に示した基準にしたがって設計する。

【0188】

候補siRNAが標的転写物の発現を抑制する能力および/または治療薬としてのsiRNAの潜在的有効性を、標的転写物の発現を阻害し、そして/または感染性因子の感染性、病原性、複製などを減少もしくは防止することができるsiRNAを選択するための適切なインピトロおよび/またはインピボ(例えば、動物)モデルを使用して試験することができる。適切なモデルは、感染性因子に依存して変化し、当業者によって容易に選択することができる。例えば、一定の感染性因子および一定の目的のために、宿主細胞を提供することが必要である一方で、他の場合、宿主細胞の非存在下で因子に対するsiRNAの効果を評価することができる。インフルエンザ感染について上記のように、感染および/または複製サイクルの1つまたは複数の時期に関与する任意の種々の因子特異的遺伝子にターゲティングされたsiRNAを設計することができる。このようなsiRNAを、感染の前、間、または後に細胞に組み込むことができ、所望ならば、感染/複製サイクルの種々の時期に対するその効果を評価することができる。

【0189】

本発明者らは、トランスフェクトした遺伝子、組み込まれた導入遺伝子、組み込まれたウイルスゲノム、感染性分子クローンなどと対照的に全感染性ウイルスを使用して、標的転写物の発現ならびに感染性因子の侵入および複製のRNAi媒介阻害を証明している点が重要である。本発明は、感染性因子による複製、病原性、または感染に関与する因子特異的転写物にターゲティングされたRNAi誘導性物質を含む。本発明にしたがってターゲティングすることができる好ましい因子特異的転写物には、因子の生活環の間に產生された因子のゲノムおよび/または他の転写物が含まれる。好ましい標的には、感染因子に特異的であり、且つ宿主細胞で見出されない転写物が含まれる。例えば、好ましい標的には、因子特異的ポリメラーゼ、因子、転写因子などが含まれ得る。このような分子は当該分野で周知であり、当業者は、因子の生活環の知識に基づいて適切な標的を選択することができる。これに関して、有用な情報を、Fields' Virology, 4 ed., Knipe, D. et al. (eds.) Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001; Marr, J., et al., Molecular Medical Parasitology; and Georgi's Parasitology for Veterinarians, Bowman, D., et al., W. B. Saunders, 2003で見出すことができる。

【0190】

本発明のいくつかの実施形態では、好ましい転写物は、感染性因子のビルレンスに特に関連する転写物(例えば、ビルレンス遺伝子の発現産物)である。ビルレンス遺伝子の種々の同定方法は当該分野で公知であり、多数のこの遺伝子が同定されている。多数の病原性および非病原性ウイルス、細菌などのゲノム配列の利用可能性により、ビルレンス遺伝子の同定が容易になる。同様に、病原性および非病原性株および/またはその生活環因子の異なる時期の1つの株の遺伝子およびタンパク質の発現プロフィールを判定および比較する方法により、発現がビルレンスに関連する遺伝子を同定することができる。例えば、Winstanley, 'Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens', J Med

10

20

30

40

50

Microbiol 2002 Jun; 51(6):459-67; Schoolnik, G, 「Functional and comparative genomic studies of pathogenic bacteria」, Curr Opin Microbiol 2002 Feb; 5(1):20-6を参照のこと。例えば、宿主細胞に対して有毒なタンパク質をコードする因子の遺伝子をビルレンス遺伝子と見なし、これはRNAiの好ましい標的であり得る。本発明の一定の実施形態では、従来の治療に対する因子の耐性に関連する転写物も好ましい標的である。これに関して、本発明のいくつかの実施形態では、標的転写物は因子のゲノムによってコードされる必要はないが、代わりに因子内のプラスミドまたは他の染色体外エレメントによってコードされ得ることに留意のこと。

10

【0191】

本発明のいくつかの実施形態では、ウイルスは呼吸器合胞体ウイルス以外のウイルスである。本発明のいくつかの実施形態では、ウイルスはポリオウイルス以外のウイルスである。

【0192】

RNAi誘導性物質は、上記の任意の種々の構造（例えば、2つの相補RNA鎖、ヘアピン、構造など）を有し得る。これらを化学合成するか、インピトロ転写によって產生するか、宿主細胞内で產生することができる。

【実施例】

【0193】

（実施例1：インフルエンザAウイルスを阻害するためのsiRNAの設計）

インフルエンザウイルス株組由来のゲノム配列を比較し、最も保存された各セグメントの領域を同定した。このウイルス群は、トリ、ブタ、ウマ、およびヒト由来のウイルスを含んでいた。比較するために、異なる年数で単離した異なる動物（非ヒト）種由来のインフルエンザAウイルスの12～15株由来の各セグメントの配列とは異なる年において単離したヒト由来のそれとを整列させた。広範な種々のHAおよびNAサブタイプを含むように株を選択した。異なる株の間で0、1、または2個のヌクレオチドが異なる領域を選択した。例えば、NP転写物をターゲティングするsiRNAの選択のために以下の株を使用し、各鎖の前のアクセッション番号はNP配列のアクセッション番号をいい、配列の比較部分をヌクレオチド数によって示す。

30

【0194】

以下のリスト中のエントリーの順番は、アクセッション番号、株名、比較配列部分、年数、サブタイプである。他のゲノムセグメントのアクセッション番号は異なるが、上記データベースで容易に見出すことができる。以下の株を比較した。

【0195】

【表1】

| | | | | | |
|-----------|------------------------------------|------|------|-------|----|
| NC_002019 | A/Puerto Rico/8/34 | 1565 | 1934 | H1N1 | |
| M30746 | A/Wilson-Smith/33 | 1565 | 1933 | H1N1 | |
| M81583 | A/Leningrad/134/47/57 | 1566 | 1957 | H2N2 | |
| AF348180 | A/Hong Kong/1/68 | 1520 | 1968 | H3N2 | |
| L07345 | A/Memphis/101/72 | 1565 | 1972 | H3N2 | |
| D00051 | A/Udorn/307/72 | 1565 | 1972 | H3N2 | |
| L07359 | A/Guangdong/38/77 | 1565 | 1977 | H3N2 | 10 |
| M59333 | A/Ohio/201/83 | 1565 | 1983 | H1N1 | |
| L07364 | A/Memphis/14/85 | 1565 | 1985 | H3N2 | |
| M76610 | A/Wisconsin/3623/88 | 1565 | 1988 | H1N1 | |
| U71144 | A/Akita/1/94 | 1497 | 1994 | H3N2 | |
| AF084277 | A/Hong Kong/483/97 | 1497 | 1997 | H5N1 | |
| AF036359 | A/Hong Kong/156/97 | 1565 | 1997 | H5N1 | |
| AF250472 | A/Aquatic bird/Hong Kong/M603/98 | 1497 | 1998 | H11N1 | |
| ISDN13443 | A/Sydney/274/2000 | 1503 | 2000 | H3N2 | 20 |
| M63773 | A/Duck/Manitoba/1/53 | 1565 | 1953 | H10N7 | |
| M63775 | A/Duck/Pennsylvania/1/69 | 1565 | 1969 | H6N1 | |
| M30750 | A/Equine/London/1416/73 | 1565 | 1973 | H7N7 | |
| M63777 | A/Gull/Maryland/5/77 | 1565 | 1977 | H11N9 | |
| M30756 | A/gull/Maryland/1815/79 | 1565 | 1979 | H13N6 | |
| M63785 | A/Mallard/Astrakhan(Gurjev)/263/82 | 1565 | 1982 | H14N5 | |
| M27520 | A/whale/Maine/328/84 | 1565 | 1984 | H13N2 | |
| M63768 | A/Swine/Iowa/17672/88 | 1565 | 1988 | H1N1 | 30 |
| Z26857 | A/turkey/Germany/3/91 | 1554 | 1991 | H1N1 | |
| U49094 | A/Duck/Nanchang/1749/92 | 1407 | 1992 | H11N2 | |
| AF156402 | A/Chicken/Hong Kong/G9/97 | 1536 | 1997 | H9N2 | |
| AF285888 | A/Swine/Ontario/01911-1/99 | 1532 | 1999 | H4N6 | |

図9は、6つのインフルエンザA変異型（その全てがヒト宿主起源）の間で高度に保存されている一定のPA転写領域を示し、これらが0、1、または2個のヌクレオチドが異なる場合に高度に保存されたものと見なす。（配列をRNAではなくてDNAとして列挙しているため、UではなくてTを含むことに留意のこと。）A/Puerto Rico/8/34(H1N1)株の配列を、塩基配列（すなわち、他の配列と比較した配列）として選択した。他の組のメンバーは、A/WSN/33(H1N1)、A/Leningrad/134/17/57(H2N2)、A/Hong Kong/1/68(H3N2)、A/Hong Kong/481/97(H5N1)、およびA/Hong Kong/1073/99(H9N2)であった。図は、コンピュータプログラムCLUSTALW(1.4)によって作成された複数の配列アラインメントを示す。塩基配列が異なるヌクレオチドに影をついている。

【0196】

図10は、5つのインフルエンザA変異型（その全てが動物宿主起源）の間およびヒト

宿主起源の 2 つの株の間でも高度に保存されている一定の PA 転写領域を示し、領域が 0 、 1 、または 2 個のヌクレオチドが異なる場合に高度に保存されたものと見なす。（配列を RNA ではなくて DNA として列挙しているため、 U ではなくて T を含むことに留意のこと。） A / Puerto Rico / 8 / 34 (H1N1) 株の配列を、塩基配列（すなわち、他の配列と比較した配列）として選択した。他の組のメンバーは、 A / WSN / 33 (H1N1) 、 A / chicken / FPV / Rostock / 34 (H7N1) 、 A / turkey / California / 189 / 66 (H9M2) 、 A / Equine / London / 1416 / 73 (H7N7) 、 A / gull / Maryland / 704 / 77 (H13N6) 、および A / swine / Hong Kong / 9 / 98 (H9N2) であった。塩基配列が異なるヌクレオチドに影をつけている。

10

【 0197 】

図 9 および 10 中の配列比較では、配列の大部分が高度に保存されたという基準を満たすため、多数の異なる高度に保存された領域を選択することができることに留意のこと。しかし、 5' 末端に AA を有する配列により、相補（アンチセンス） siRNA 鎖中に 19 ヌクレオチドのコア配列および 2 ヌクレオチド 3' UU 突出部が得られる。したがって、 siRNA のアンチセンス鎖中に存在する相補ヌクレオチドが UU であるように、 5' 末端に AA を有する 21 ヌクレオチド部分を同定するために高度に保存された領域をスキヤニングした。例えは、それぞれ影をつけた配列はその 5' 末端を有する。表 2 に示すように、得られた siRNA 分子のアンチセンス鎖中の UU 3' 突出部を TT または dTdT に置換することができることに留意のこと。しかし、アンチセンス鎖の 2nt の 3' 突出部は UU である。

20

【 0198 】

方法のさらなる例示のために、図 12 は、ヒト宿主または動物宿主のいずれかを起源とする 12 種のインフルエンザ A ウィルスサブタイプまたは単離物の間の NP 配列の 3' 領域部分の間の配列比較を示す。下線を引いた配列および下線を引いた配列の下の対応する配列部分を使用して、 siRNA NP - 1496 を設計した（以下を参照のこと）。これらの配列を図 12 に示す。塩基配列は、 A / Puerto Rico / 8 / 34 の配列である。影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【 0199 】

表 1 は、 7 種の他のウィルス遺伝子セグメントに加えて PA セグメントと比較したインフルエンザウィルス配列組の間で高度に保存されている 21 種のヌクレオチド領域を列挙する。多数の配列が、相補鎖中に 3' UU 突出部が得られるようにその 5' 末端に AA を有するさらなる基準を満たす。 PA セグメントに関しては、 1 つまたは 2 つのヌクレオチドが存在する場合、 siRNA の配列は、 A / WSN / 33 (H1N1) 株に基づいた配列 PA - 2087 / 2107 AAGCAATTGAGGGAGTGCCTG (配列番号 30) 以外は、 A / PR8 / 34 (H1N1) 株に基づいていた。 20 位では、 6 つの配列のうちの 5 つが G を含み、塩基配列は A を含むことに留意のこと。したがって、この場合では、 siRNA 設計について塩基配列の配列を使用しなかった。

30

【 0200 】

表 1 A に列挙した配列に基づいた siRNA を設計するために、 siRNA センス鎖配列のコア領域としてヌクレオチド 3 ~ 21 を選択し、 dTdT からなる 2nt の 3' 突出部を得られた各配列に付加した。各配列のヌクレオチド 1 ~ 21 に相補的な配列を、対応するアンチセンス鎖として選択した。例えは、高度に保存された配列 PA - 44 / 64 (すなわち、 AATGCTTCAATCCGATGATTG (配列番号 22)) に基づいて siRNA を設計するために、配列 TGCTTCAATCCGATGATTG (配列番号 109) を有する 19nt のコア領域を選択した。 dTdT からなる 2nt の 3' 突出部を添加し、 (T の U への置換後に) siRNA センス鎖配列である配列 5' - UGCUUCAAUCCGAUGAUUGdTdT - 3' (配列番号 79) を得た。対応するアンチセンス siRNA 鎖配列は、配列番号 22 と相補的である（すなわち、 CAUCAUCGGAUUGAAGCAdTdT (配列番号 80) (T が dT に置換されている 2nt の

40

50

3' 突出部以外は T が U に置換されている))。

【 0 2 0 1 】

表 1 B は、インフルエンザウイルス転写物のさらなる高度に保存された領域に基づいて設計した s i R N A を列挙する。表 1 B で「センス鎖」として示した配列の最初の 19 nt 配列は、高度に保存された領域の配列である。インフルエンザウイルス配列に対応せず、s i R N A の選択的特徴である、3' 末端に d T d T 突出部を有するセンス鎖 s i R N A 配列を示す。選択的特徴として 3' 末端に d T d T 突出部も組み込まれた対応するアンチセンス鎖も示す。名称は、表 1 B のとおりである。例えば、P B 2 - 4 / 2 2 センスは、センス鎖は P B 2 転写物のヌクレオチド 4 ~ 2 2 の配列を有する s i R N A を示す。P B 2 - 4 / 2 2 アンチセンスは、P B 2 - 4 / 2 2 センスに対応する相補アンチセンス鎖を示す。スプライス部位にわたる転写物中の部位をターゲティングする s i R N A のために、非スプライシング転写物内の位置を示す。例えば、M - 4 4 - 5 2 / 7 4 1 - 7 5 0 は、ゲノム配列の 4 4 ~ 5 2 および 7 4 1 ~ 7 5 0 に対応するヌクレオチドをスプライシングされ m R N A 中にターゲティングすることを示す。
10

【 0 2 0 2 】

図 9 および 10 の影をつけた領域は、高度に保存されたという基準を満たすいくつかの 21 ヌクレオチド領域を示す。上記のこれらの配列に基づいて、s i R N A を設計した。試験した実際の s i R N A 配列を、表 2 に列挙する。

【 0 2 0 3 】

【表1A-1】

表1A. インフルエンザAウイルス感染を干渉するためのsiRNAの設計のための保存領域

セグメント1: PB2

| | | |
|---------------|------------------------|--------------|
| PB2-117/137 | AATCAAGAAGTACACATCAGG | (配列番号 : 1) |
| PB2-124/144 | AACTACACATCAGGAAGACAG | (配列番号 : 2) |
| PB2-170/190 | AATGGATGATGGCAATGAAAT | (配列番号 : 3) |
| PB2-195/215 | AATTACAGCAGACAAGAGGAT | (配列番号 : 4) |
| PB2-1614/1634 | AACTTACTCATCGTCAATGAT | (配列番号 : 5) |
| PB2-1942/1962 | AATGTGAGGGGATCAGGAATG | (配列番号 : 6) |
| PB2-2151/2171 | AAGCATCAATGAACGTGAGCAA | (配列番号 : 7) |
| PB2-2210/2230 | AAGGAGACGTGGTGGTAA | (配列番号 : 8) |
| PB2-2240/2260 | AACGGGACTCTAGCATACTTA | (配列番号 : 9) |
| PB2-2283/2303 | AAGAATTCCGGATGGCCATCAA | (配列番号 : 10) |

10

セグメント2: PB1

| | | |
|---------------|------------------------|--------------|
| PB1-6/26 | AAGCAGGCCAAACCATTGAAAT | (配列番号 : 11) |
| PB1-15/35 | AACCATTGAAATGGATGTCAA | (配列番号 : 12) |
| PB1-34/54 | AATCCGACCTTACTTTCTTA | (配列番号 : 13) |
| PB1-56/76 | AAGTGCAGCACAAATGCTA | (配列番号 : 14) |
| PB1-129/149 | AACAGGATACACCATGGATAC | (配列番号 : 15) |
| PB1-1050/1070 | AATGTTCTCAAACAAAATGGC | (配列番号 : 16) |
| PB1-1242/1262 | AATGATGATGGGCATGTTCAA | (配列番号 : 17) |
| PB1-2257/2277 | AAGATCTGTTCCACCATTGAA | (配列番号 : 18) |

20

セグメント3: PA

| | | |
|--------------|------------------------|--------------|
| PA-6/26 | AAGCAGGTACTGATCCAAAT | (配列番号 : 19) |
| PA-24/44 | AATGGAAGATTTGTGCGACA | (配列番号 : 20) |
| PA-35/55 | TTGTGCGACAATGCTTCATC | (配列番号 : 21) |
| PA-44/64 | AATGCTTCAATCCGATGATTG | (配列番号 : 22) |
| PA-52/72 | AATCCGATGATTGTCGAGCTT | (配列番号 : 23) |
| PA-121/141 | AACAAATTGCAAGCAATATGC | (配列番号 : 24) |
| PA-617/637 | AAGAGACAATTGAAAGAAAGGT | (配列番号 : 25) |
| PA-711/731 | TAGAGCCTATGTGGATGGATT | (配列番号 : 26) |
| PA-739/759 | AACGGCTACATTGAGGGCAAG | (配列番号 : 27) |
| PA-995/1015 | AACCACACGAAAAGGAATAA | (配列番号 : 28) |
| PA-2054/2074 | AACCTGGGACCTTGATCTG | (配列番号 : 29) |
| PA-2087/2107 | AAGCAATTGAGGAGTGCCTGA | (配列番号 : 30) |
| PA-2110/2130 | AATGATCCCTGGGTTTGTCTT | (配列番号 : 31) |
| PA-2131/2151 | AATGCTTCTGGTTCAACTCC | (配列番号 : 32) |

30

セグメント4: HA

| | | |
|--------------|-----------------------|--------------|
| HA-1119/1139 | TTGGAGCCATTGCCGGTTTA | (配列番号 : 33) |
| HA-1121/1141 | GGAGCCATTGCCGGTTTATT | (配列番号 : 34) |
| HA-1571/1591 | AATGGGACTTATGATTATCCC | (配列番号 : 35) |

セグメント5: NP

| | | |
|--------------|-----------------------|--------------|
| NP-19/39 | AATCACTCACTGAGTGACATC | (配列番号 : 36) |
| NP-42/62 | AATCATGGCGTCCCAAGGCAC | (配列番号 : 37) |
| NP-231/251 | AATAGAGAGAATGGTGTCTC | (配列番号 : 38) |
| NP-390/410 | AATAAGGCGAATCTGGCGCCA | (配列番号 : 39) |
| NP-393/413 | AAGGCGAATCTGGCGCCAAGC | (配列番号 : 40) |
| NP-708/728 | AATGTGCAACATTCTCAAAGG | (配列番号 : 41) |
| NP-1492/1512 | AATGAAGGATCTTATTCTTC | (配列番号 : 42) |

40

【表1A-2】

| | | |
|--------------|-----------------------|-------------|
| NP-1496/1516 | AAGGATCTTATTCCTCGGAG | (配列番号 : 43) |
| NP-1519/1539 | AATGCAGAGGAGTACGACAAT | (配列番号 : 44) |

セグメント6: NA

| | | |
|------------|-----------------------|-------------|
| NA-20/40 | AATGAATCCAAATCAGAAAAT | (配列番号 : 45) |
| NA704/724 | GAGGACACAAGAGTCTGAATG | (配列番号 : 46) |
| NA-861/881 | GAGGAATGTCCTGTTACCT | (配列番号 : 47) |
| NA-901/921 | GTGTGTGCAGAGACAATTGGC | (配列番号 : 48) |

セグメント7: M

| | | | |
|------------|-----------------------|-------------|----|
| M-156/176 | AATGGCTAAAGACAAGACCAA | (配列番号 : 49) | 10 |
| M-175/195 | AATCCTGTCACCTCTGACTAA | (配列番号 : 50) | |
| M-218/238 | ACGCTCACCGTCCCCAGTGAG | (配列番号 : 51) | |
| M-244/264 | ACTGCAGCGTAGACGCTTTGT | (配列番号 : 52) | |
| M-373/393 | ACTCAGTTATTCTGCTGGTGC | (配列番号 : 53) | |
| M-377/397 | AGTTATTCTGCTGGTGCACTT | (配列番号 : 54) | |
| M-480/500 | AACAGATTGCTGACTCCCAGC | (配列番号 : 55) | |
| M-584/604 | AAGGCTATGGAGCAAATGGCT | (配列番号 : 56) | |
| M-598/618 | AATGGCTGGATCGAGTGAGCA | (配列番号 : 57) | |
| M-686/706 | ACTCATCCTAGCTCCAGTGCT | (配列番号 : 58) | |
| M-731/751 | AATTTGCAGGCCTATCAGAAA | (配列番号 : 59) | |
| M-816/836 | ATTGTGGATTCTTGATCGTCT | (配列番号 : 60) | |
| M-934/954 | AAGAATATCGAAAGGAACAGC | (配列番号 : 61) | |
| M-982/1002 | ATTTGTCAGCATAGAGCTGG | (配列番号 : 62) | 20 |

セグメント8: NS

| | | |
|------------|-----------------------|-------------|
| NS-101/121 | AAGAACTAGGTGATGCCCAT | (配列番号 : 63) |
| NS-104/124 | AACTAGGTGATGCCCATTCC | (配列番号 : 64) |
| NS-128/148 | ATCGGCTTCGCCGAGATCAGA | (配列番号 : 65) |
| NS-137/157 | GCCGAGATCAGAAATCCCTAA | (配列番号 : 66) |
| NS-562/582 | GGAGTCCTCATCGGAGGACTT | (配列番号 : 67) |
| NS-589/609 | AATGATAACACAGTCGAGTC | (配列番号 : 68) |

【0205】

【表1B-1】

30

表1B. インフルエンザAウイルス感染を干渉するためのsiRNAの設計のための保存領域

セグメント1: PB2

| | | | |
|----------------------|--------------------------|--------------|----|
| PB2-4/22 センス | GAAAGCAGGUCAUUUAUAdTdT | (配列番号 : 190) | |
| PB2-4/22 アンチセンス | AUUAUAAUUGACCUGCUUUCdTdT | (配列番号 : 191) | |
| PB2-12/30 センス | GUCAUUUAUUAUCAAAUUGdTdT | (配列番号 : 192) | |
| PB2-12/30 アンチセンス | CAUAUUGAAUUAUAAUGACdTdT | (配列番号 : 193) | |
| PB2-68/86 センス | CUCGCACCCCGCGAGAUACdTdT | (配列番号 : 194) | |
| PB2-68/86 アンチセンス | AGUAUCUCGCGGGUGCGAGdTdT | (配列番号 : 195) | |
| PB2-115/133 センス | AUAAUCAAGAAGUACACAUdTdT | (配列番号 : 196) | |
| PB2-115/133 アンチセンス | AUGUGUACUUUCUUGAUUAUdTdT | (配列番号 : 197) | |
| PB2-167/185 センス | UGAAAUGGAUGAUGGCAAUdTdT | (配列番号 : 198) | 40 |
| PB2-167/185 アンチセンス | AUUGCACAUCCAUUUCAdTdT | (配列番号 : 199) | |
| PB2-473/491 センス | CUGGUCAUGCAGAUCUCAGdTdT | (配列番号 : 200) | |
| PB2-473/491 アンチセンス | CUGAGAUCUGCAUGACCAGdTdT | (配列番号 : 201) | |
| PB2-956/974 センス | UAUGCAAGGCUGCAAUGGGdTdT | (配列番号 : 202) | |
| PB2-956/974 アンチセンス | CCCAUUGCAGCCUUGCAUAdTdT | (配列番号 : 203) | |
| PB2-1622/1640 センス | CAUCGUCAAUGAUGUGGGAdTdT | (配列番号 : 204) | |
| PB2-1622/1640 アンチセンス | UCCCACAUCAUUGACGAUGdTdT | (配列番号 : 205) | |

【0206】

【表1B-2】

セグメント2: PB1

PB1-1124/1142 センス
 PB1-1124/1142 アンチセンス
 PB1-1618/1636 センス
 PB1-1618/1636 アンチセンス

AAAUAACCUGCAGAAAUGCdTdT (配列番号 : 206)
 AGCAUUUCUGCAGGUUUUdTdT (配列番号 : 207)
 AACAAUAUGAUAAAACAAUGdTdT (配列番号 : 208)
 CAUUGUUUAUCAUAAUUGUdTdT (配列番号 : 209)

セグメント3: PA

PA-3/21 センス
 PA-3/21 アンチセンス
 PA-544/562 センス
 PA-544/562 アンチセンス
 PA-587/605 センス
 PA-587/605 アンチセンス
 PA-1438/1466 センス
 PA-1438/1466 アンチセンス
 PA-2175/2193 センス
 PA-2175/2193 アンチセンス
 PA-2188/2206 センス
 PA-2188/2206 アンチセンス

CGAAAGCAGGUACUGAUCCdTdT (配列番号 : 210)
 GGAUCAGUACCUGCUUUCGdTdT (配列番号 : 211)
 AGGCUAUUCACCAUAAGACdTdT (配列番号 : 212)
 GUCUUAUGGUGAAUAGCCdTdT (配列番号 : 213)
 GGGAUUCCUUUCGUCAGUCdTdT (配列番号 : 214)
 GACUGACGAAAGGAAUCCdTdT (配列番号 : 215)
 GCAUCUUGUGCAGCAAUGGdTdT (配列番号 : 216)
 CCAUUGCUGCACAAGAUGCdTdT (配列番号 : 217)
 GUUGUGGCAGUGCUACUAUdTdT (配列番号 : 218)
 AUAGUAGCACUGCCACAAUCdTdT (配列番号 : 219)
 UACUAUUUGCUAUCCAUACdTdT (配列番号 : 220)
 GUAUGGAUAGCAAAUAGUAdTdT (配列番号 : 221)

10

20

30

40

セグメント5: NP

NP-14/32 センス
 NP-14/32 アンチセンス
 NP-50/68 センス
 NP-50/68 アンチセンス
 NP-1505/1523 センス
 NP-1505/1523 アンチセンス
 NP-1521/1539 センス
 NP-1521/1539 アンチセンス
 NP-1488/1506 センス
 NP-1488/1506 アンチセンス

UAGAUAAUCACUCACUGAGdTdT (配列番号 : 222)
 CUCAGUGAGUGAUUAUCUAdTdT (配列番号 : 223)
 CGUCCCAAGGCACCAAAACGdTdT (配列番号 : 224)
 CGUUUGGUGCCUUGGGACGdTdT (配列番号 : 225)
 AUUCUUCGGAGACAAUUGCdTdT (配列番号 : 226)
 GCAUUGUCUCCGAAGAAAAdTdT (配列番号 : 227)
 UGCAGAGGAGUACGACAAUdTdT (配列番号 : 228)
 AUUGUCGUACUCCUCUGCAdTdT (配列番号 : 229)
 GAGTAATGAAGGATCTTATdTdT (配列番号 : 230)
 ATAAGATCCTTCATTACTCdTdT (配列番号 : 231)

セグメント7: M

M-3/21 センス
 M-3/21 アンチセンス
 M-13/31 センス
 M-13/31 アンチセンス
 M-150/158 センス
 M-150/158 アンチセンス
 M-172/190 センス
 M-172/190 アンチセンス
 M-211/229 センス
 M-211/229 アンチセンス
 M-232/250 センス
 M-232/250 アンチセンス
 M-255/273 センス
 M-255/273 アンチセンス
 M-645/663 センス
 M-645/663 アンチセンス
 M-723/741 センス
 M-723/741 アンチセンス
 M-808/826 センス
 M-808/826 アンチセンス
 M-832/850 センス
 M-832/850 アンチセンス

CGAAAGCAGGUAGAUUUUGdTdT (配列番号 : 232)
 CAAUAUCUACCUGCUUUCGdTdT (配列番号 : 233)
 UAGAUAUUGAAAGAUGAGUdTdT (配列番号 : 234)
 ACUCAUCUUUCAUAUUCUAdTdT (配列番号 : 235)
 UCAUGGAAUGGCUAAAGACdTdT (配列番号 : 236)
 GCUUUUAGCCAUCUCAUGAdTdT (配列番号 : 237)
 ACCAAUCCUGUCACCUCUGdTdT (配列番号 : 238)
 CAGAGGUGACAGGAUUGGdTdT (配列番号 : 239)
 UGUGUUCACGCUCACCGUGdTdT (配列番号 : 240)
 CACGGUGAGCGUGAACACAdTdT (配列番号 : 241)
 CAGUGAGCGAGGACUGCGAGdTdT (配列番号 : 242)
 CUGCAGUCCUCGCUCACUGdTdT (配列番号 : 243)
 GACGCCUUUGGUCCAAAUGCdTdT (配列番号 : 244)
 GCAUUUUGGACAAAGCGUCdTdT (配列番号 : 245)
 GUCAGGCUAGGCAAAUUGGdTdT (配列番号 : 246)
 ACCAUUUGCCUAGCCUGACdTdT (配列番号 : 247)
 UUCUUGAAAAUUUUGCAGGCdTdT (配列番号 : 248)
 GCCUGCAAAUUUUCAAGAACdTdT (配列番号 : 249)
 UCAUUGGGAUCUUGCACUUdTdT (配列番号 : 250)
 AAGUGCAAGAUCCCAUUGAdTdT (配列番号 : 251)
 UGUGGAUUCUUGAUCGUCdTdT (配列番号 : 252)
 AGACGAUCAAGAAUCCACAdTdT (配列番号 : 253)

【表1B-3】

| | | |
|------------------------|-------------------------|---------------|
| M-986/1004 センス | UGUCAGCAUAGAGCUGGAGdTdT | (配列番号 : 254) |
| M-986/1004 アンチセンス | CUCCAGCUCUAUGCUGACAdTdT | (配列番号 : 255) |
| M-44-52/741-750 センス | GTCGAAACGCCTATCAGAAdTdT | (配列番号 : 256) |
| M-44-52/741-750 アンチセンス | UUCUGAUAGGCGUUUCGACdTdT | (配列番号 : 257) |

セグメント8: NS

| | | |
|-------------------|--------------------------|---------------|
| NS-5/23 センス | AAAAGCAGGGUGACAAAGAdTdT | (配列番号 : 258) |
| NS-5/23 アンチセンス | UCUUUGUCACCCUGCUUUdTdT | (配列番号 : 259) |
| NS-9/27 センス | GCAGGGUGACAAAGACAUAdTdT | (配列番号 : 260) |
| NS-9/27 アンチセンス | UAUGUCUUUGUCACCCUGCdTdT | (配列番号 : 261) |
| NS-543/561 センス | GGAUGUCAAAAAUGCAGUUdTdT | (配列番号 : 262) |
| NS-543/561 アンチセンス | AACUGCAUUUUUGACAUCCdTdT | (配列番号 : 263) |
| NS-623/641 センス | AGAGAUUCGCUUGGAGAAGdTdT | (配列番号 : 264) |
| NS-623/641 アンチセンス | CUUCUCCAAGCGAAUCUCdTdT | (配列番号 : 265) |
| NS-642/660 センス | CAGUAAUGAGAAUGGGAGAdTdT | (配列番号 : 266) |
| NS-642/660 アンチセンス | UCUCCAUUCUCAUUACUGdTdT | (配列番号 : 267) |
| NS-831/849 センス | UUGUGGAUUCUUGAUCGUCdTdT | (配列番号 : 268) |
| NS-831/839 アンチセンス | GACGAUCAAGAAUCCACAAAdTdT | (配列番号 : 269) |

10

20

40

(実施例2:ウイルスRNAポリメラーゼまたは核タンパク質をターゲティングする siRNAはインフルエンザAウイルス産生を阻害する)

(材料と方法)

細胞培養。Mad in - Darbyイヌ腎臓細胞(MDCK) (Dr. Peter Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NYからの好意的な贈呈)を、10%熱不活化FCS、2mM L-グルタミン、100単位/mlペニシリン、および100μg/ml streptotimycinを含むD MEM培地で成長させた。細胞を、37、5%CO₂で成長させた。エレクトロポレーションのために、細胞を、無血清 RPMI 1640 培地で維持した。感染培地(DMEM、0.3%ウシ血清アルブミン(BSA、Sigma, St. Louis, MO)、10mM HEPES、100単位/mlペニシリン、および100μg/ml streptotimycin)中でウイルス感染を行った。

【0208】

ウイルス。インフルエンザウイルスA/PR/8/34(PR8)およびA/WSN/33(WSN)(サブタイプH1N1、Dr. Peter Palese, Mount Sinai School of Medicineからの好意的な贈呈)を、10日齢の胚含有ニワトリ卵(Charles River laboratories, MA)中、37で48時間成長させた。ウイルス接種から48時間後に尿膜腔液を回収し、-80で保存した。

【0209】

siRNA。siRNAを上記のように設計した。実施例1に記載の選択基準に従うことと加えて、siRNAを、Dharmacon Research, Inc., Lafayette, CO 80026(RNA試薬の販売業者)から、一般に利用可能な技術告示番号003-Revision B, 「siRNA Oligonucleotides for RNAi Applications」に記載の原理に従って設計した。Dharmaconの技術告示番号003(ワールドワイドウェブ www.dharmacon.com/tech/tech003B.htmlからアクセス可能)およびwww.dharmacon.com/tech/tech004.htmlから利用可能な#004は、siRNA設計パラメーター、合成などに関連する種々の情報を含み、本明細書中で参考として援用される。試験したセンスおよびアンチセンス配列を表2に列記する。

【0210】

【表2】

表2. siRNA配列

| 名称 | siRNA配列 (5' - 3') |
|---------------------------|---------------------------------------|
| PB2-2210/2230 (センス) | GGAGACGUGGUUGGUUAGUAAdTdT (配列番号 : 69) |
| PB2-2210/2230 (アンチセンス) | UUACCAACACCACGUUCUCCdTdT (配列番号 : 70) |
| PB2-2240/2260 (センス) | CGGGACUCUAGCAUACUUAAdTdT (配列番号 : 71) |
| PB2-2240/2260 (アンチセンス) | UAAGUAUGCUAGAGUCCCGdTdT (配列番号 : 72) |
| PB1-6/26 (センス) | GCAGGCAAACCAUUUGAAUdTdT (配列番号 : 73) |
| PB1-6/26 (アンチセンス) | AUUCAAAUGGUUUGCCUGCdTdT (配列番号 : 74) |
| PB1-129/149 (センス) | CAGGAUACACCAUAGGAUACdTdT (配列番号 : 75) |
| PB1-129/149 (アンチセンス) | GUAUCCAUGGUGUAUCCUGdTdT (配列番号 : 76) |
| PB1-2257/2277 (センス) | GAUCUGUUCCACCAUUGAAAdTdT (配列番号 : 77) |
| PB1-2257/2277 (アンチセンス) | UUCAAUGGUGGAAACAGAACUdTdT (配列番号 : 78) |
| PA-44/64 (センス) | UGCUUCAAUCCGAUGAUUGdTdT (配列番号 : 79) |
| PA-44/64 (アンチセンス) | CAAUCAUCGGAUUGAAGCAdTdT (配列番号 : 80) |
| PA-739/759 (センス) | CGGCUACAUUGAGGGCAAGdTdT (配列番号 : 81) |
| PA-739/759 (アンチセンス) | CUUGCCCUCAAUGUAGGCCdTdT (配列番号 : 82) |
| PA-2087/2107 (G) (センス) | GCAAUUGAGGGAGUGCCUGAdTdT (配列番号 : 83) |
| PA-2087/2107 (G) (アンチセンス) | UCAGGCACUCCUCAAUUGCdTdT (配列番号 : 84) |
| PA-2110/2130 (センス) | UGAUCCCUGGGUUUUGCUUdTdT (配列番号 : 85) |
| PA-2110/2130 (アンチセンス) | AAGCAAAACCCAGGGAUCAAdTdT (配列番号 : 86) |
| PA-2131/2151 (センス) | UGCUUCUUGGUUCAACUCCdTdT (配列番号 : 87) |
| PA-2131/2151 (アンチセンス) | GGAGUUGAACCAAGAACGAdTdT (配列番号 : 88) |
| NP-231/251 (センス) | UAGAGAGAAUGGUGCUCUCdTdT (配列番号 : 89) |
| NP-231/251 (アンチセンス) | GAGAGCACCAUUCUCUCAAdTdT (配列番号 : 90) |
| NP-390/410 (センス) | UAAGGCGAACUCUGGCGCCAdTdT (配列番号 : 91) |
| NP-390/410 (アンチセンス) | UGGCGCCAGAUUCGCCUUAdTdT (配列番号 : 92) |
| NP-1496/1516 (センス) | GGAUCUUUUUCUUCGGAGdTdT (配列番号 : 93) |
| NP-1496/1516 (アンチセンス) | CUCCGAAGAAAAGAUCCdTdT (配列番号 : 94) |
| NP-1496/1516a (センス) | GGAUCUUUUUCUUCGGAGAdTdT (配列番号 : 188) |
| NP-1496/1516a (アンチセンス) | UCUCCGAAGAAAAGAUCCdTdT (配列番号 : 189) |
| M-37/57 (センス) | CCGAGGUCGAAACGUACGUAdTdT (配列番号 : 95) |
| M-37/57 (アンチセンス) | ACGUACGUUUCGACCUCGGdTdT (配列番号 : 96) |
| M-480/500 (センス) | CAGAUUGCUGACUCCCAGCdTdT (配列番号 : 97) |
| M-480/500 (アンチセンス) | GCUGGGAGUCAGCAAUCUGdTdT (配列番号 : 98) |
| M-598/618 (センス) | UGGCUGGGAUCCGAGUGAGCAdTdT (配列番号 : 99) |
| M-598/618 (アンチセンス) | UGCUCACUCGAUCCAGCCAdTdT (配列番号 : 100) |
| M-934/954 (センス) | GAAUAUCGAAAGGAACAGCdTdT (配列番号 : 101) |
| M-934/954 (アンチセンス) | GCUGUUCCUUUCGUAUUCUAdTdT (配列番号 : 102) |
| NS-128/148 (センス) | CGGCUUCGCCGAGAACAGAdAdT (配列番号 : 103) |
| NS-128/148 (アンチセンス) | UCUGAACUCGCCGAAGCCGdAdT (配列番号 : 104) |
| NS-562/582 (R) (センス) | GUCCUCCGAUGAGGACUCCdTdT (配列番号 : 105) |
| NS-562/582 (R) (アンチセンス) | GGAGUCCUCAUCCGAGGACdTdT (配列番号 : 106) |
| NS-589/609 (センス) | UGAUAAACACAGUUCGAGUCdTdT (配列番号 : 107) |
| NS-589/609 (アンチセンス) | GACUCGAACUGUGUUUAUCAdTdT (配列番号 : 108) |

10

20

30

40

2' ACE 保護化学を使用して、Dharmacon Research (Lafayette, CO) によって全ての siRNA を合成した。製造者の説明書に従って siRNA 鎮を脱保護し、等モル比で混合し、95 °C での加熱および 35 °C までの 30 秒毎に 1 ずつならびに 5 °C までの 1 分毎に 1 ずつの温度のゆっくりとした低下によってアニーリングした。

【0211】

siRNA エレクトロポレーション。MDCK 細胞の対数期培養物をトリプシン処理し、洗浄し、無血清 RPMI 1640 中に 2×10^7 細胞 / ml を再懸濁し、0.5 ml の細胞を 0.4 cm キュベットに入れ、2.5 nmol の siRNA を含む Gene Pulse 装置 (Bio-Rad) を使用して 400 V、975 μ F でエレクトロポレーション

50

ョンを行った。エレクトロポレーション効率は、約30～40%の生存細胞であった。エレクトロポレーションを行った細胞を、10%FCSを含むDMEM培地中を含む6ウェルプレートを3ウェルに分割し、37、5%CO₂でインキュベートした。

【0212】

ウイルス感染。エレクトロポレーションから6～8時間後、血清含有培地を洗浄し、適切な感染多重度の100μlのPR8またはWSNウイルスを、それぞれ約10⁶細胞を含むウェルに接種した。細胞を、1,000PFU(1,000個の細胞あたり1個のウイルス; MOI = 0.001)または10,000PFU(100個の細胞あたり1個のウイルス; MOI = 0.01)のウイルスのいずれかを感染させた。室温で1時間のインキュベーション後、4μg/mlのトリプシンを含む2mlの感染培地を各ウェルに付加し、細胞を37、5%CO₂でインキュベートした。示した時間では、感染培養物から上清を回収し、ウイルス力価をニワトリ赤血球の血球凝集素(50μl、0.5%、Charles River laboratories, MA)によって判定した。

【0213】

ウイルス力価の測定。感染から24、36、48、および60時間後に上清を回収した。Knipe DM, Howley PM, Fundamental Virology, 4th edition, p34-35に記載の標準的な血球凝集素アッセイを使用して、ウイルス力価を測定した。V底96ウェルプレートで血球凝集素アッセイを行った。各サンプルの連続2倍希釈物を、同体積のニワトリ赤血球の0.5%懸濁液と氷上で1時間インキュベートした(Charles River Laboratories)。接着性の均一な赤血球層を含むウェルを正として記録した。ブラークアッセイのために、Fundamental Virology, 4th edition, p.32(本明細書中で参考として援用される)に記載され、且つ当該分野で周知の各サンプルの連続10倍希釈物のウイルス力価を測定した。

【0214】

(結果)

インフルエンザウイルス複製を抑制するためのsiRNA使用の可能性を調査するため、種々のインフルエンザウイルスAのRNAをターゲティングした。具体的には、容易に感染し、インフルエンザウイルスを研究するために広範に使用されているMDCK細胞株を使用した。各siRNAを、エレクトロポレーションによってそれぞれMDCK集団に組み込んだ。GFPにターゲティングされたsiRNA(センス: 5' - GGCUACGUCCAGGAGCGCAUU - 3' (配列番号110); アンチセンス: 5' - UGCGCUCCUGGACGUAGCCUU - 3' (配列番号111))をコントロールとして使用した。このsiRNAを、GFP-949という。その後の実験(以下の実施例に記載)では、両鎖の3'末端のUU突出部をdTdTと置換したが、結果として効果はなかった。コントロールとして偽エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションから8時間後、細胞を0.1または0.01のMOIのインフルエンザAウイルスPR8またはWSNのいずれかを感染させ、種々の測定点(24、36、48、60時間)で標準的な血球凝集素アッセイを使用してウイルス産生について分析した。標準的な方法を使用したフローサイトメトリーによってGFP発現をアッセイした。

【0215】

図11Aおよび11Bは、各siRNAがインフルエンザウイルスA株A/Puerto Rico/8/34(H1N1)(図11A)またはインフルエンザウイルスA株A/WSN/33(H1N1)(図11B)の複製を阻害する能力をHA力価の測定によって判定した実験結果を比較している。したがって、高HA力価は阻害の欠如を示し、低HA力価は有効な阻害を示す。MDCK細胞に0.01のMOIで感染させた。これらの実験のために、PB1セグメント(PB1-2257/2277)をターゲティングする1つのsiRNA、PB2セグメント(PB2-2240/2260)をターゲティングする1つのsiRNA、PAセグメント(PA-2087/2107(G))をターゲティングする1つのsiRNA、ならびにNPゲノムおよび転写物をターゲティングする3つ

10

20

30

40

50

の異なる siRNA (NP-231/251, NP-390/410、およびNP-1496/1516) を試験した。図11Aおよび11Bは、siRNAの4'ヌクレオチドを列挙することに留意のこと。

【0216】

図11Aおよび11B中の記号は、以下を示す：黒塗りの四角はsiRNAを投与していないコントロール細胞を示す。白抜きの四角は、GFPコントロールsiRNAを投与した細胞を示す。黒塗りの円は、siRNA PB1-2257/2277を投与した細胞を示す。白抜きの円は、siRNA PB2-2240/2260を投与した細胞を示す。白抜きの三角は、siRNA PA-2087/2107(G)を投与した細胞を示す。X記号は、siRNA NP-231/251を投与した細胞を示す。+記号は、siRNA NP-390/410を投与した細胞を示す。黒塗りの三角は、siRNA NP-1496/1516を投与した細胞を示す。グラフ中の一定の記号は重なっている場合があることに留意のこと。例えば、図11Bでは、白抜きおよび黒塗りの三角が重なっている。各測定点で数値を列挙した表3および4を、解明のために参考にことができる。

【0217】

図11Aおよび11B(表3および4)に示すように、siRNAの非存在下(偽TF)またはコントロール(GFP)siRNAの存在下で、ウイルス力価が長期間増加し、感染から約48~60時間後にピークに達する。対照的に、60時間後のウイルス力価は、任意のsiRNAの存在下で有意に低かった。例えば、WSN株では、HA力価(ウイルスレベルを反映する)は、siRNAs PB2-2240またはNP-231の存在下ではコントロールの約半分であった。特に、siRNA NP-1496の存在下でのウイルスレベルは、両株で検出限界(10,000PFU/ml)未満であった。これは、PR株で60倍超およびWSN株で120倍超の因子による減少を示す。ウイルスレベルはまた、WSN株においてsiRNA PA-2087(G)の存在下で検出限界(10,000PFU/ml)未満であり、PR8株では極めて低い。siRNAによるウイルス産生の抑制は、最も初期の測定点でさえも明らかであった。感染から72時間後ほどの有効な抑制(検出不可能レベル(HA力価による測定)へのウイルス産生の抑制が含まれる)が測定点で認められた。

【0218】

表5は、阻害倍率に関して示したMDCK細胞における60時間のsiRNA阻害アッセイの結果をまとめている。したがって、低い値は阻害の欠如を示し、高い値は有効な阻害を示す。ウイルス遺伝子内のsiRNAの位置を、遺伝子名の後に数字で示す。本明細書中に記載のように、数字は、遺伝子中のsiRNAの出発ヌクレオチドを示す。例えば、NP-1496は、NPに特異的なsiRNA(NP配列のヌクレオチド1496から出発する第1のヌクレオチド)を示す。示した値(阻害倍率)は、偽トランスフェクション由来の血球凝集素単位を示したsiRNAでのトランスフェクション由来の血球凝集素単位で割ることによって計算し、値1は阻害無しを意味する。

【0219】

インフルエンザウイルスゲノムの6つのセグメント(PB2, PB1, PA, NP, M、およびNS)にターゲティングされた全部で20個のsiRNAを、MDCK細胞株系で試験した(表5)。約15%の試験したsiRNA(PB1-2257, PA-2087G、およびNP-1496)は、PR8ウイルスまたはWSNウイルスのいずれを使用したかとは無関係に、ほとんどの場合MOI=0.001で1/100未満およびMOI=0.01で1/16~1/64にウイルス産生を阻害する高い効果を示した。特に、siRNA NP-1496またはPA-2087を使用した場合、阻害は、培養上清が検出可能な研究凝集素活性をもたらさないことが非常に明白であった。これらの強力なsiRNAが3つの異なるウイルス遺伝子セグメント(RNA転写複合体に関するPB1およびPAならびに一本鎖RNA結合核タンパク質であるNP)をターゲティングする。他の系における所見と一致して、これらのsiRNAによってターゲティングされた配

列は全てコード領域の 3' プライム末端に比較的隣接させて配置させる(図 13)。

【0220】

約 40% の siRNA はウイルス産生を有意に阻害するが、阻害範囲は一定のパラメーターにしたがって変化した。PR または WSN ウイルスのいずれを使用したかとは無関係に、約 15% の siRNA がウイルス産生を強力に阻害した。しかし、一定の siRNA の場合、阻害の程度は PR8 または WSN のいずれを使用するかに依存していくらか変化した。いくつかの siRNA は初期の測定点(感染から 24~36 時間後)でのみまたはより低い感染量(MOI = 0.001)のみウイルス産生を阻害した(PB2-2240、PB1-129、NP-231、および M37 など)。これらの siRNA は、異なるウイルス遺伝子ゲノムをターゲティングし、対応する配列を、コード領域の 3' - プライム末端または 5' - プライム末端に近接して位置付ける(図 13 および表 5)。

【0221】

約 45% の siRNA はウイルス力値に対する効果は認識できず、これらが MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルス産生の干渉で有効でないことを示す。特に、NS 遺伝子セグメントをターゲティングする 4 つの siRNA において阻害効果を示したものはない。

【0222】

ウイルス力値をより正確に評価するために、偽トランスフェクションまたは NP-1496 でのトランスフェクションを行ったウイルス感染細胞から得た培養物上清由来の培養物上清を使用したブラークアッセイを行った(60 時間後)。偽上清において約 6×10^5 pfu/m¹ が検出されたのに対し、非希釈 NP-1496 上清においてはブラークは検出されなかった(図 11C)。ブラークアッセイの検出限界約 20 pfu(ブラーク形成単位)/m¹ であるため、NP-1496 によるウイルス産生を少なくとも約 1/30,000 に阻害する。0.1 の MOI でさえ、NP-1496 はウイルス産生を約 1/200 に阻害した。

【0223】

siRNA の有効性を判定するために、段階的な量の NP-1496 を、MDCK 細胞にトランスフェクトし、その後 PR8 ウイルスを感染させた。血球凝集素アッセイによって培養上清のウイルス力値を測定した。図 11D に示すように、siRNA 量が減少するにつれて、培養物上清のウイルス力値が増加した。しかし、トランスフェクションのために 25 pmol ほどの siRNA しか使用しない場合でさえ、偽トランスフェクションと比較してウイルス産生を約 1/4 に阻害し、インフルエンザウイルス産生阻害における NP-1496 siRNA の有効性を示す。

【0224】

治療において、siRNA が既存のウイルス感染を有効に阻害することができることが望ましい。典型的なインフルエンザ感染では、感染から約 4 時間後から新規のビリオンが放出され始める。siRNA が既存の感染に反して新規に放出されたウイルスによって感染を減少または消失させることができるかを判定するために、MDCK 細胞に PR8 ウイルスを 2 時間感染させ、その後、NP-1496 siRNA でトランスフェクトした。図 11E に示すように、偽トランスフェクション後長期間安定にウイルス力値が増大するのに対し、NP-1496 トランスフェクト細胞では僅かに増加しただけであった。したがって、ウイルス感染後の siRNA の投与が有効である。

【0225】

まとめると、これらの結果は、(i) 一定の siRNA はインフルエンザウイルス産生を協力に阻害することができること、(ii) インフルエンザウイルス産生を、異なるウイルス遺伝子に特異的な siRNA (NP、PA、および PB1 タンパク質をコードするものが含まれる) によって阻害することができること、および (iii) siRNA の投与と同時に動的で感染させた細胞に加えて、以前に感染した細胞で siRNA 阻害が起こることを示す。

【0226】

10

20

30

40

50

【表3】

表3. siRNAによるウイルス株A／Puerto Rico／8／34(H1N1) 產生の阻害

| siRNA | | | | | | | | |
|-------|----|-----|----------|----------|------------|--------|--------|---------|
| | 偽 | GFP | PB1-2257 | PB2-2040 | PA-2087(G) | NP-231 | NP-390 | NP-1496 |
| 24時間 | 8 | 8 | 1 | 4 | 1 | 1 | 4 | 1 |
| 36時間 | 16 | 8 | 4 | 8 | 1 | 4 | 8 | 1 |
| 48時間 | 32 | 32 | 4 | 8 | 2 | 4 | 8 | 1 |
| 60時間 | 64 | 64 | 8 | 8 | 4 | 8 | 32 | 1 |

【0227】

【表4】

表4. siRNAによるウイルス株A／WSN／33(H1N1) 產生の阻害

| siRNA | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|----------|----------|------------|--------|--------|---------|
| | 偽 | GFP | PB1-2257 | PB2-2040 | PA-2087(G) | NP-231 | NP-390 | NP-1496 |
| 24時間 | 32 | 32 | 1 | 8 | 1 | 8 | 16 | 1 |
| 36時間 | 64 | 128 | 16 | 32 | 1 | 64 | 64 | 1 |
| 48時間 | 128 | 128 | 16 | 64 | 1 | 64 | 64 | 1 |
| 60時間 | 128 | 128 | 32 | 64 | 1 | 64 | 128 | 1 |

【0228】

【表5】

表5. MDCK細胞におけるインフルエンザウイルス産生に対する20siRNAの効果

| siRNA | 感染ウイルス (MOI) | | | | |
|-------|----------------|---------------|--------------|----------------|---------------|
| | PR8 (0.001) | PR8 (0.01) | PR8 (0.1) | WSN (0.001) | WSN (0.01) |
| 実験. 1 | GFP-949 | 2 | 1 | | |
| | PB2-2210 | 16 | 8 | | |
| | PB2-2240 | 128 | 16 | | |
| | PB1-6 | 4 | 4 | | |
| | PB1-129 | 128 | 16 | | |
| | PB1-2257 | 256 | 64 | | |
| 実験. 2 | GFP-949 | 2 | 1 | | |
| | PA-44 | 2 | 1 | | |
| | PA-739 | 4 | 2 | | |
| | PA-2087 | 128 | 16 | | |
| | PA-2110 | 8 | 4 | | |
| | PA-2131 | 4 | 2 | | |
| 実験. 3 | NP-231 | 16 | 4 | 4 | |
| | NP-390 | 4 | 2 | 2 | |
| | NP-1496 | 16 | 64 | 128 | |
| | M-37 | 2 | 2 | 128 | |
| 実験. 4 | M-37 | | 2 | 128 | |
| | M-480 | | 2 | 4 | |
| | M-598 | | 2 | 128 | |
| | M-934 | | 1 | 4 | |
| | NS-128 | | 2 | 2 | |
| | NS-562 | | 1 | 1 | |
| | NS-589 | | 1 | 1 | |
| 実験. 5 | NP-1496 | | 64 | 128 | |
| | GFP-949 | | 1 | 1 | |
| | PB2-2240 | | 8 | 2 | |
| | PB1-2257 | | 8 | 4 | |
| | PA-2087 | | 16 | 128 | |
| | NP-1496 | | 64 | 128 | |
| | NP-231 | | 8 | 2 | |

(実施例3:ウイルスRNAポリメラーゼまたは核タンパク質をターゲティングするsiRNAはニワトリ胚におけるインフルエンザAウイルス産生を阻害する)

(材料と方法)

siRNA-オリゴフェクタミン複合体の処方物およびニワトリ胚接種。siRNAを上記のように調製した。ニワトリの卵を標準的な条件下で保持した。30μlのオリゴフェクタミン(製品番号:12252011。Life Technologies, now Invitrogen)を、30μlのOpti-MEMI(Gibco)と混合し、室温で5分間インキュベートした。2.5nmol(10μl)のsiRNAを30μlのOpti-MEMIと混合し、希釈したオリゴフェクタミンに添加した。siRNAおよびオリゴフェクタミンを、室温で30分間インキュベートした。10日齢のニワトリ卵を、100μlのPR8ウイルス(5000pfu/ml)と共にsiRNA-オリゴフェクタミン複合体とインキュベートした。卵を、37℃で指示された時間インキュベートし、尿膜腔液を採取した。尿膜腔液ウイルス力値を、上記のHAアッセイによって試験した。

【0229】

(結果)

MDCK細胞が得られたか否かを確認するために、siRNAがニワトリ受精卵中のイ

10

20

30

40

50

ンフルエンザウイルス産生を阻害する能力もアッセイした。卵にはエレクトロポレーションを使用することができないため、オリゴフェクタミン（DNAオリゴヌクレオチドの細胞内への取り込みを容易にすることが示されている脂質ベースの薬剤）およびインビトロでsiRNAを使用した（25）。簡単に述べれば、図14Aに図示するように、PR8ウイルスのみ（500pfu）またはウイルス+siRNA-オリゴフェクタミン複合体を、10日齢のニワトリ卵の尿膜腔液に注射した。血球凝集素アッセイによるウイルス力価の測定のために、17時間後に尿膜腔液を採取した。図14Bに示すように、ウイルスを単独で注射した場合（オリゴフェクタミンの存在下）、抗ウイルス力価が容易に検出された。GFP-949の同時注射では、有意にウイルス力価に影響を与えたかった（オリゴフェクタミンを省略した場合、ウイルス力価の有意な減少は認められなかった）。

10

【0230】

インフルエンザウイルスに特異的なsiRNAの注射により、MDCK細胞で認められた結果と一致する結果が示された。MDCK細胞のインフルエンザウイルス産生を阻害した同一のsiRNA（NP-1496、PA2087、およびPB1-2257）もニワトリ卵におけるウイルス産生を阻害するのに対して、MDCK細胞では有効性の低いsiRNA（NP-231、M-37、およびPB1-129）は、ニワトリ受精卵で無効であった。したがって、siRNAはまた、ニワトリ受精卵におけるインフルエンザウイルス産生の干渉に有効である。

【0231】

（実施例4：siRNAはmRNAレベルでインフルエンザウイルス産生を阻害する）
20
材料と方法

siRNAを上記のように調製した。

【0232】

RNAの抽出、逆転写、およびリアルタイムPCR。 1×10^7 MDCK細胞に対して、2.5nmolのNP-1496を用いてエレクトロポレーションを行うか、偽エレクトロポレーション（siRNAなし）を行った。8時間後、MOI=0.1のインフルエンザA PR8ウイルスを細胞に接種した。感染から1、2、および3時間ごとの、上清を除去し、細胞をTrizol試薬（ Gibco）で溶解した。製造者の説明書に従って、RNAを精製した。製造者の説明書に従って、200ngの総RNA、特異的プライマー（以下を参照のこと）、およびOmniScript逆転写酵素キット（Qiagen）を含む20μlの反応混合物を使用して、37℃で1時間逆転写（RT）を行った。mRNA、NPvRNA、NPcRNA、NSvRNA、またはNScRNAのいずれかに特異的なプライマーを以下に示す。

30

【0233】

【化1】

mRNA, dT₁₈=5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3'（配列番号：112）

NPvRNA, NP-367: 5'-CTCGTCGCTTATGACAAAGAAG-3'（配列番号：

113).

NPcRNA, NP-1565R:

40

5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTT-3'（配列番号：

114).

NSvRNA, NS-527: 5'-CAGGACATACTGATGAGGATG-3'（配列番号：

115).

NScRNA, NS-890R:

5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT-3'（配列番号：

116).

50

1 μ l の R T 反応混合物（すなわち、逆転写の実施によって得られるサンプル）および配列特異的プライマーを、SYBR Green I 二本鎖DNA結合色素を含むSYBR Green PCR マスター ミックス（AB Applied Biosystems）を使用したリアルタイムPCRのために使用した。ABI PRISM 7000 配列検出システム（AB applied Biosystems）でPCRサイクルを実施し、ABI PRISM 7000SS ソフトウェア（AB Applied Biosystems）で分析した。50 で2分間、95 で10分間、その後95 で15秒間および60 で1分間を50サイクルでPCR反応を行った。0.2 蛍光単位の読み取りでサイクル時間を分析した。全ての反応を二連で行った。二連の間で1.0を超えて変化することによってサイクル時間は切り捨てた。次いで二連のサイクル時間を平均し、正規化された値のために、これらから - アクチンのサイクル時間を引いた。
10

【0234】

PCR プライマーを以下に示す。

【0235】

【化2】

NP RNA用:

NP-367: 5'-CTCGTCGCTTATGACAAAGAAG-3' (配列番号: 117).

NP-460R: 5'-AGATCATCATGTGAGTCAGAC-3' (配列番号: 118).

NS RNA用:

NS-527: 5'-CAGGACATACTGATGAGGATG-3' (配列番号: 119).

NS-617R: 5'-GTTTCAGAGACTCGAACTGTG-3' (配列番号: 120).

(結果)

上記のように、インフルエンザウイルスの複製時、vRNAが転写されてcRNA（より多くのvRNA合成のためのテンプレートとして作用する）およびmRNA（タンパク質合成のためのテンプレートとして作用する）を产生する（1）。RNAiは配列特異的様式でmRNAの分解をターゲティングすることが公知であるが（16～18）、インフルエンザAウイルスのvRNAがヌクレアーゼに感受性を示すため、vRNAおよびcRNAもsiRNAの標的である可能性がある（1）。種々のRNA種の分解に対するsiRNAの効果を調査するために、配列特異的プライマーを使用した逆転写およびその後のリアルタイムPCRを使用して、vRNA、cRNA、およびmRNAのレベルを定量することができた。図16は、インフルエンザウイルスvRNA、mRNA、およびcRNAとの関係を示す。図16Aおよび16Bに示すように、cRNAはvRNAの正確に相補的であるが、mRNAは、5'末端にキャップ構造および宿主細胞mRNA由来のさらなる10～13ヌクレオチドを含み、mRNAは3'末端にポリA配列を含み、vRNAセグメントの5'末端から15～22ヌクレオチド下流の部位に相補的な部位から始まる。したがって、vRNAおよびcRNAと比較すると、mRNAは3'末端の15～22ヌクレオチドを欠く。3つのウイルスRNA種を区別するために、第1の逆転写反応においてvRNA、cRNA、およびmRNAに特異的なプライマーを使用した（図16B）。mRNAのために、プライマーとしてポリdT18を使用した。cRNAのために、mRNAから失われたRNAの3'末端に相補的なプライマーを使用した。vRNAのために、vRNAに相補的であり、且つ5'末端にあまり接近しない限り、プライマーは、RNAの間のほとんどどこでも良い。たった1つのRNAから転写して得られたcDNAを、リアルタイムPCRによって増幅した。
20
30
40
50

【0236】

インフルエンザウイルス感染後、新規のビリオンがパッケージングされ始め、約4時間までに放出される。mRNAおよびcRNAの第1の波（wave）に対するsiRNAの効果を判定するために、感染RNAを感染後の早い時期に単離した。簡単に述べれば、NP-1496を、MDCK細胞にエレクトロポレーションした。偽エレクトロポレーション

ヨン (siRNA なし) も行った。6 ~ 8 時間後、細胞に MOI = 0.1 の PR8 ウイルスを感染させた。次いで、細胞を、感染から 1、2、および 3 時間後に溶解し、RNA を単離した。mRNA、vRNA、および cRNA のレベルを、各 RNA 種のためのプライマーを使用した逆転写およびその後のリアルタイム PCR によってアッセイした。

【 0237 】

図 17 は、感染前に約 6 ~ 8 時間偽トランスフェクトするか siRNA NP-149 6 でトランスフェクトした細胞中の感染後の種々の時間でのウイルス NP および NS RNA 種の量を示す。図 17 に示すように、感染から 1 時間後、NP siRNA トランスフェクションを用いるか用いないサンプルの間の NP mRNA の量に有意差はなかった。早ければ感染から 2 時間で、NP mRNA が偽トランスフェクション群で 38 倍に増加するのに対して、siRNA でトランスフェクトした細胞における NP mRNA レベルは増加しなかった（またはさらに僅かに減少した）。感染から 3 時間後、偽トランスフェクションにおいて mRNA 転写物レベルが増加しつづけるのに対して、siRNA 処理を受けた細胞では NP mRNA 量が連続的に減少する。偽トランスフェクションにおける vRNA および cRNA の量の増加は感染から 3 時間後のみで有意であったこと以外は、NP vRNA および cRNA は類似のパターンを示した。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、これはおそらく cRNA およびさらなる vRNA 合成前に最初の mRNA 転写ラウンドが起こるインフルエンザウイルスの生活環に起因する。

10

【 0238 】

これらの結果は、血球凝集素アッセイまたはブラークアッセイによるインタクトな生ウイルスの測定結果と一致して、全ての NP RNA 種の量が、NP siRNA での投与によっても有意に減少することを示す。siRNA が主に mRNA の分解を媒介することが公知であるにもかかわらず、この実験由来のデータは、NP cRNA および vRNA の siRNA 媒介分解の可能性が除外しないが、下記の結果により、NP mRNA 減少の結果としての NP タンパク質レベルの減少により NP cRNA および / または vRNA の安定性が減少することが示唆される。

20

【 0239 】

（実施例 5：RNA 干渉の標的的同定）

（材料と方法）

未修飾 siRNA の siRNA を上記のように調製した。センス鎖もしくはアンチセンス鎖または両方のいずれかの各ヌクレオチド残基の 2' - 水酸基が 2' - O - メチル基に置換された修飾 RNA オリゴヌクレオチドも Dharmacron によって合成した。未修飾オリゴヌクレオチドについて記載のように、修飾オリゴヌクレオチドを脱保護し、相補鎖にアニーリングした。ゲル電気泳動によって二重鎖形成の完了について siRNA 二重鎖を分析した。

30

【 0240 】

細胞培養、siRNA でのトランスフェクション、およびウイルスでの感染。これらを本質的に上記のように行なった。簡単に述べれば、修飾 NP-1496 siRNA に関する実験のために、MDCK 細胞を最初に野生型 (wt) 鎖および修飾 (m) 鎖から形成した NP-1496 siRNA (2.5 nmol) でトランスフェクトし、8 時間後に 0.1 の MOI の PR8 ウイルスに感染させる。感染から 24 時間後に培養上清のウイルス力価をアッセイした。M-37 siRNA に関する実験のために、MDCK 細胞を、M-37 siRNA (2.5 nmol) でトランスフェクトし、0.01 MOI の PR8 ウイルスに感染させ、感染から 1、2、および 3 時間後に RNA 単離のために回収した。M-37 センスおよびアンチセンス配列については、表 2 を参照のこと。

40

【 0241 】

本質的に上記のよう RNA 抽出、逆転写、およびリアルタイム PCR を行った。逆転写のために使用される mRNA、M 特異的 vRNA、および M 特異的 cRNA のいずれかに特異的なプライマーを以下に示す。

【 0242 】

50

【化3】

mRNA, dT₁₈ = 5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3' (配列番号 : 112)

M vRNA: 5'- CGCTCAGACATGAGAACAGAACATGG -3' (配列番号 : 161)

M cRNA: 5'- ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAAGGTAGTTTT-3'

(配列番号 : 162).

M RNAのためのPCRプライマーを以下に示す。

M 正方向 : 5'- CGCTCAGACATGAGAACAGAACATGG -3' (配列番号 : 163)

M 逆方向 : 5' - TAACTAGCCTGACTAGCAACCTC -3' (配列番号 : 164)

10

(結果)

mRNAに加えて siRNAがvRNAおよび/またはcRNAを干渉する可能性を調査するために、センス(Sまたは+)鎖またはアンチセンス(A Sまたは-)鎖が修飾されたNP-1496 siRNAを合成した。各ヌクレオチド残基中の2'-水酸基を2'-O-メチル基に置換する修飾では、二重鎖形成のための塩基対合に影響を与えないが、修飾RNAはもはやRNA干渉を補助していない。言い換えれば、センス鎖が修飾されているがアンチセンス鎖が野生型であるsiRNA(mS:w t A S)は、アンチセンス鎖に相補的な配列を有するRNAの分解を補助するが、センス鎖に相補的な配列はそうではない。逆に、センス鎖が野生型であるがアンチセンス鎖が修飾されているsiRNA(w t S:m A S)は、センス鎖に相補的な配列を有するRNAの分解を補助するが、センス鎖に相補的な配列を有するRNAの分解は補助しない。この減少は、「Reducing RNA in Background」というタイトルの米国特許出願番号60/446,387号により詳細に記載されている。

20

【0243】

M D C K細胞を、偽トランسفェクトするかセンス鎖(mS:w t A S)またはアンチセンス鎖(w t S:m A S)のいずれかの鎖が修飾される一方で他の鎖が野生型であるNP-1496 siRNAでトランسفェクトした。細胞を、両方の鎖が修飾されたNP-1496 siRNA(mS:m A S)でもトランسفェクトした。次いで、細胞を、PR8ウイルスに感染させ、上清のウイルス力価を測定した。図18Aに示すように、偽トランسفェクションに供した培養物で高ウイルス力価が検出された。予想通り、野生型siRNA(w t S:w t A S)でトランسفェクトした培養物で非常に低いウイルス力価が検出されたが、両方の鎖を修飾したsiRNA(mS:m A S)でトランسفェクトして培養物では高ウイルス力価が検出された。アンチセンス鎖が修飾されたsiRNA(w t A S:m A S)でトランسفェクトした培養物でウイルス力価が高かったのに対して、センス鎖のみが修飾されたsiRNA(mS:w t A S)でトランسفェクトした培養物ではウイルス力価は低かった。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、本発明者らは、インフルエンザウイルスの産生を阻害するsiRNA二重鎖の野生型アンチセンス(-)鎖のための要件として、RNA干渉の標的は、mRNA(+)、cRNA(+)、または両方と示唆する。

30

40

【0244】

これらの可能性をさらに区別するために、対応するmRNA、vRNA、およびcRNAの蓄積に対するsiRNAの効果を試験した。同時に感染した細胞のコホートにおける転写を追跡するために、感染から1、2、および3時間後(新規のビリオンの放出および再感染前)にRNA単離用のsiRNAトランسفェクトM D C K細胞を採取した。ウイルスmRNA、vRNA、およびcRNAを、特異的プライマーを使用した逆転写によって最初に独立してcDNAに変換した。次いで、リアルタイムPCRによって各cDNAのレベルを定量した。図18Aに示すように、M特異的siRNA M-37を使用した場合、感染から1時間後または2時間後にM特異的mRNAはほとんど検出されなかった。感染から3時間後、M-37の非存在下でM特異的mRNAが容易に検出された。M-

50

37でトランスフェクトされた細胞では、M特異的mRNAのレベルは、約50%減少した。対照的に、M特異的vRNAおよびcRNAのレベルは、M-37の存在によって阻害されなかった。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、これらの結果は、ウイルスmRNAはおそらくsiRNA媒介性干渉の標的であることを示す。

【0245】

(実施例6：ウイルスRNA蓄積に対する一定のsiRNAの広範な効果)

(結果)

上記のようにsiRNAを調製した。

【0246】

実施例3に記載のように、RNAの抽出、逆転写、およびリアルタイムPCRを行った。mRNA、NPvRNA、NPcRNA、NSvRNA、NScRNA、MvRNA、またはMcRNAのいずれかに特異的なプライマーを、実施例4および5に記載した。逆転写に使用するPB1vRNA、PB1cRNA、PB2vRNA、PB2cRNA、PAvRNA、またはPAcRNAに特異的なプライマーを以下に示す。

【0247】

【化4】

PB1 vRNA: 5'-GTGCAGAAATCAGCCGAATGGTTC-3' (配列番号: 165)

PB1 cRNA: 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATT-3' (配列番号: 166)

PB2 vRNA: 5'-GCGAAAGGAGAGAAGGCTAATGTG-3' (配列番号: 167)

PB2 cRNA: 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTT-3' (配列番号: 168)

PA vRNA: 5'-GCTTCTTATCGTTAGGCTCTTAGG-3' (配列番号: 169)

PA cRNA: 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTT-3' (配列番号: 170)

PB1、PB2、およびPA RNAのPCRプライマーを以下に示す。

【0248】

【化5】

PB1 正方向: 5'-CGGATTGATGCACGGATTGATTTC-3' (配列番号: 171)

PB1 逆方向: 5'-GACGTCTGAGCTCTCAATGGTGGAAC-3' (配列番号: 172)

PB2 正方向: 5'-GCGAAAGGAGAGAAGGCTAATGTG-3' (配列番号: 173)

PB2 逆方向: 5'-AATCGCTGTCTGGCTGTCAGTAAG-3' (配列番号: 174)

PA 正方向: 5'-GCTTCTTATCGTTAGGCTCTTAGG-3' (配列番号: 175)

PA 逆方向: 5'-CCGAGAAGCATTAAAGCAAAACCCAG-3' (配列番号: 176)

(結果)

上記のように(実施例4)、NP-1496がNP遺伝子セグメントの分解を特異的にターゲティングするかどうかまたはNP以外のウイルスRNAレベルも影響を受けるかどうかを判定するために、NSに特異的なプライマーを、異なるNS RNA種(mRNA、vRNA、cRNA)の量を測定するためのRTおよびリアルタイムPCRに使用した。図19に示すように、NSmRNA、vRNA、およびcRNAの変化は、NP RNAについて認められたものと同一のパターンを示した。感染から3時間後、偽トランスフェクト細胞で全てのNS RNA種の有意な増加が認められるのに対し、NP-1496 siRNAを投与された細胞でNS RNAレベルの有意な変化は認められなかった。こ

10

20

30

40

50

の結果は、異なるウイルスRNAの転写および複製が少なくともNP RNAに関して調和良く調節されることを示す。「調和良く調節された」は、ある転写物レベルが別の転写物レベルに直接または間接的に影響を与えることを意味する。特別な機構は含まれていない。NP転写物がsiRNA処理によって分解された場合、他のウイルスRNAレベルも減少する。

【0249】

他のウイルスRNAに対するNPsiRNAの効果をさらに調査するために、NP-1496で投与した細胞中の全てのウイルス遺伝子のmRNA、vRNA、およびcRNAの蓄積を測定した。図19(上のパネル)に示すように、NP特異的mRNAは、感染から1~2時間後は低かった。感染から3時間後、NP-1496の非存在下でNPmRNAが容易に検出されたのに対し、NP-1496の存在下では、NPmRNAはバックグラウンドレベルを保持し、siRNAが特定のmRNAの蓄積を阻害したことを示す。図19A(中央および下のパネル)に示すように、NP-1496の存在によってNP特異的およびNS特異的vRNAおよびcRNAのレベルは大幅に阻害された。これらの結果は、実施例4に記載の結果を確認するものである。さらに、NP-1496投与細胞では、M、NS、PB1、PB2、およびPAのmRNA、vRNA、およびcRNAの蓄積も阻害された(図19B、19C、および19H)。さらに、PA-2087については広範な効果も認められた。図19E、19F、および19Gの左側の上、中央、および下のパネルは、NP-1496siRNAによるウイルスマRNA転写ならびにvRNAおよびcRNA複製の阻害を示す図19A、19B、および19Cに示す結果と同一の結果を示す。図19E、19F、および19Gの右側の下のパネルは、同一濃度でPA-2087siRNAを使用して行った同一の実験の結果を示す。図19Eに示すように、感染から3時間後、PA-2087の非存在下でPA、M、およびNSmRNAが容易に検出されたのに対し、PA-2087の存在により、PA、M、およびNSmRNAの転写が阻害された。図19F(それぞれ右側の上、中央、および下のパネル)に示すように、感染から3時間後、PA-2087の非存在下でPA、M、およびNSvRNAが容易に検出されたのに対し、PA-2087の存在によりPA、M、およびNSvRNAの蓄積が阻害された。図19G(それぞれ右側の上、中央、および下のパネル)に示すように、感染から3時間後、PA-2087の非存在下でPA、M、およびNScRNAが容易に検出されたのに対し、PA-2087の存在によりPA、M、およびNScRNAの蓄積が阻害された。さらに、図19Hは、NP特異的siRNAがPB1(上のパネル)、PB2(中央のパネル)、およびPA(下のパネル)特異的mRNAの蓄積を阻害することを示す。

【0250】

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、本発明者らは、NPsiRNAの広範な効果は、おそらくvRNAおよびcRNAの結合および安定化の重要な結果であり、NP特異的siRNAがRNA分解を非特異的にターゲティングするためではないことを示唆する。インフルエンザウイルス中のNP遺伝子セグメントは、vRNAおよびcRNAの両方に結合することができる一本鎖RNA結合核タンパク質をコードする(図15を参照のこと)。ウイルスの生活環の内に、NP mRNAを最初にトランスクライブし、翻訳した。NPタンパク質の主な機能は、RNAの転写、複製、およびパッケージングのためにウイルスゲノムをキャプシドに包むことである。NPタンパク質の非存在下では、vRNAおよびcRNAの全長合成は強く損なわれる。NPsiRNAがNP RNAの分解を誘導する場合、NPタンパク質合成が損なわれ、それにより十分なNPタンパク質の欠乏が他のウイルス遺伝子セグメントの複製に影響を与える。この方法で、NPsiRNAは、非常に初期の段階でウイルス産生を強力に阻害することができる。

【0251】

感染細胞中のNPタンパク質分子数は、ゲノムRNA(vRNAおよびcRNA)複製に対してmRNA合成レベルを調節すると仮定されている(1)。NPタンパク質の温度感受性変異を使用して、以前の研究で、cRNAの合成はインビトロおよびインビボの両

10

20

30

40

50

方で温度感受性を示すが、mRNAはそうではないことが示されている(70、71)。NPタンパク質は、初期のcRNAおよびvRNA転写物の伸長および抗終結のために必要であることが示された(71、72)。上記の結果は、NP特異的siRNAが感染細胞中の全てのウイルスRNAの蓄積を阻害したことを示す。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、おそらく、NP特異的siRNAの存在下で、新規に転写されたNP mRNAが分解され、ウイルス感染後にNPタンパク質合成が阻害されるようである。新規に合成されたNP、さらなるウイルス転写、および複製がなければ、新規のビリオン産生は阻害される。

【0252】

同様に、PA特異性の存在下で、新規に転写されたPAmRNAが分解され、PAタンパク質合成が阻害される。インフルエンザウイルスあたり30~60コピーのRNA転写酵素が存在するにもかかわらず(1)、新規に合成されたRNA転写酵素がなければ、さらなるウイルスの転写および複製は同様に阻害される。PB1に特異的なsiRNAを使用しても類似の結果が得られた。対照的に、ウイルス感染後期まで基質(M)タンパク質は必要ない(1)。したがって、M特異的siRNAはM特異的mRNAの蓄積を阻害するが、vRNA、cRNA、または他のウイルスRNAの蓄積は阻害しない。まとめると、これらの所見は、インフルエンザウイルスRNAの転写および複製における新規に合成された核タンパク質およびポリメラーゼタンパク質の重要な要件を証明する。NP、PA、およびPB1特異的siRNAがmRNAの蓄積および他のウイルスRNA転写を干渉するmRNAおよびウイルス特異的機構により、これらのsiRNAはインフルエンザウイルス感染の特に強力なインヒビターであり得ることが示唆される。特に、本明細書中に記載の結果により、一般に、通常は因子特異的核酸(DNAまたはRNA)に結合するRNAまたはDNA結合タンパク質をコードする転写物にターゲティングされたsiRNAはターゲティングされたRNAレベルの単純な減少よりもむしろ広範な効果(例えば、他の因子特異的転写物に対する効果)を有する可能性が高いことが示唆される。同様に、本明細書中に記載の結果により、一般に、感染性因子のポリメラーゼ遺伝子(RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ、または逆転写酵素)にターゲティングされたsiRNAはポリメラーゼRNAレベルの単純な減少よりもむしろ広範な効果(例えば、他の因子特異的転写物に対する効果)を有する可能性が高いことが示唆される。

【0253】

(実施例7:一定のsiRNAによるウイルスRNA蓄積の広範な阻害は、インターフェロン応答やウイルス誘導性RNA分解に起因しない)

(材料と方法)

RNAレベルの測定。標準的な条件下でPCRを使用してRNAレベルを測定した。PCR後、-アクチンRNAの測定のためにプライマーを使用した。

【0254】

【化6】

γ-actin 正方向: 5'-TCTGTCAGGGTTGGAAAGTC-3' (配列番号: 177)

γ-actin 逆方向: 5'-AAATGCAAACCGCTTCCAAC-3' (配列番号: 178)

以下に引用された引用文献に記載の標準的な技術にしたがって、ベロ細胞の培養およびリン酸化PKRの測定を行った。

【0255】

(結果)

ウイルスRNA蓄積の広範な阻害についての1つの可能な理由は、siRNAの存在下での感染細胞のインターフェロン応答である(23、65、66)。したがって、全IFN遺伝子座(全ての、および遺伝子が含まれる)が欠失したベロ細胞において上記実験を繰り返した(67、68)(Q.G.およびJ.C.未公開データ)。MDCK細胞と同様に、NP、M、およびNS特異的mRNAの蓄積の全てがNP-1496によ

10

20

30

40

50

って阻害された(図19D)。さらに、細胞遺伝子由来の転写物(α-アクチン、β-アクチン、およびGAPDHが含まれる)のレベルに対するsiRNAの効果を、PCRを使用してアッセイした。siRNAの非存在下または存在下で転写レベルの有意な相違は検出されず(α-アクチンmRNAに対するM-37siRNAの効果の欠如を示す図18Cの下のパネル、データ示さず)、siRNAの効果が、ウイルスRNAに特異的であることを示唆している。一定のsiRNAによるウイルスRNA蓄積の広範な阻害は細胞インターフェロン応答の結果ではないことが示唆される。

【0256】

インフルエンザウイルス感染後、dsRNAの存在は、分解のためにRNAにターゲティングする細胞経路も活性化させる(23)。本経路の活性化に対するsiRNAの効果について試験を行うために、本発明者らは、リン酸化タンパク質キナーゼR(PKR)(経路の最も重要な成分)のレベルをアッセイした(23)。ウイルス感染の非存在下におけるNP-1496でのMDCK細胞のトランスフェクションは、活性化PKRレベルに影響を与えたかった(データ示さず)。インフルエンザウイルスによる感染によってリン酸化PKRレベルが増加し、これは以前の研究と一致する(65、66、69)。しかし、NP-1496の存在下または非存在下で増加は同一であった(データ示さず)。したがって、ウイルスRNA蓄積の広範な阻害は、siRNAの存在下での強化されたウイルス誘導性分解の結果ではない。

【0257】

(実施例8:単独または組み合わせのいずれかでインフルエンザウイルス産生を阻害する優れた能力を有するsiRNAの体系的同定) 20

本実施例は、インフルエンザウイルス産生を阻害する優れた能力を有するsiRNAの同定への体系的アプローチを記載する。例としてsiRNAに言及しているが、二重鎖部分が下記のsiRNAの二重鎖部分と同一であり、且つ上記のように配列が変化し得るループを含むshRNAの評価のために同一の方法を使用すると理解すべきである。

【0258】

原理:予防および治療目的のために、優れたインフルエンザウイルス感染阻害能力を示すsiRNAを同定することが望ましい。上記のように、20個のsiRNA(そのうちの19個が5'末端にAAジヌクレオチドを含む高度に保存された配列に基づいている)を設計および試験した。この位置でのAAジヌクレオチドの存在はsiRNA機能に重要であると最初に見なされ、より最近の所見では、この位置に他のヌクレオチドを含む配列に基づいたsiRNAも同様に有効であるため、これらは必要ないことが示されている(22、28)。したがって、AAで始まらない配列に基づいて設計されたさらなるsiRNAを設計し、インフルエンザウイルス産生を有効に阻害するさらなるsiRNAを同定するために試験した。 30

【0259】

いくつかの強力な阻害siRNAの利用可能性により、組み合わせで使用することができる。ポリオウイルスのsiRNAについての最近の研究は、1つのsiRNAの使用によりsiRNAによってターゲティングすることができない既存の変異ポリオウイルスの増殖(outgrowth)が得られることを示した(24)。インフルエンザウイルスが高い比率で変異することが公知であるため(4)、1つのsiRNAの使用によりおそらく耐性ウイルスの増殖を促進することができ、それによりsiRNAが一定期間後に無効にする可能性がある。他方では、2つまたはそれ以上の異なるsiRNA(特に異なるウイルスRNAに特異的なsiRNA)を同時に使用する場合、耐性ウイルスが出現する可能性を桁数によって減少させる。したがって、最も有効な組み合わせを見出すために、2つまたはそれ以上の組み合わせにおいてsiRNAについて試験を行う。 40

【0260】

本実施例は、以下の目的を達成するための体系的アプローチを記載する。

【0261】

10

20

30

40

50

1) インフルエンザウイルスゲノムの全保存領域が非重複 s i R N A によって一度対象となるようにさらなる s i R N A を設計および試験すること。

【 0 2 6 2 】

2) 漸増する高感染多重度 (M O I) を使用したスクリーニングによる最も強力な阻害 s i R N A を同定すること。

【 0 2 6 3 】

3) 耐性ウイルスの出現を防止するために有効な s i R N A の最も強力な組み合わせを同定すること。

【 0 2 6 4 】

さらなる s i R N A の設計および試験。実施例 1 に記載の s i R N A によって対象とされないウイルスゲノムの保存領域に特異的なさらなる s i R N A を設計する。ウイルスゲノムの保存領域が非重複 s i R N A を一度対象とすることを目的とする。2つの理由から非重複 s i R N A を選択する。第 1 に、いくつかの標的配列を共有するため、重複 s i R N A の同時適用ではおそらく最も有効な組み合わせは得られない。重複領域の変異により両 s i R N A が無効になる可能性が高い。第 2 に、広範なスクリーニングのために、重複 s i R N A 数は、合理的な期間内での試験には大き過ぎ得る。各 P A 、 P B 1 、 P B 2 、 N P 、 M 、および N S について少なくとも 1 つの強力な s i R N A を得ることを目的とする。(R N A スプライシングによって、 M および N S 遺伝子はそれぞれ 2 つのタンパク質をコードする。可能ならば、同一の遺伝子由来の両方の転写物に特異的な s i R N A を設計する。) N P 、 P A 、および P B 1 に特異的な強力な s i R N A は既に同定されているため(表 5)、 P B 2 、 M 、および N S に特異的なより多くの s i R N A 候補について試験を行うことに集中する。非重複 s i R N A の試験によってこれらの遺伝子の強力な s i R N A が明らかにならない場合、重複 s i R N A 候補について試験を行う。6つの各遺伝子に特異的な強力な阻害 s i R N A の適用可能性により、最も強力な組み合わせの同定が容易になる。

【 0 2 6 5 】

さらなる非重複 s i R N A を設計するために、最初の A A ジヌクレオチドが必要でないこと以外は、実施例 1 および詳細な説明に記載の同一の基準を使用する。これらの基準に基づいて、約 40 個の s i R N A について試験を行うことが望ましいと予想される。一本鎖 R N A オリゴヌクレオチドを市販用に合成し、その相補鎖にアニーリングする。血球凝集素アッセイによって測定した場合に M D C K 細胞中でインフルエンザウイルス産生(P R 8 、 W S N 、またはその両方)を干渉する能力について得られた s i R N A 二重鎖について試験を行う。細胞株中で有効な s i R N A を、ニワトリ胚中でさらに評価する。ウイルスの両サブタイプならびに細胞および胚の両方と阻害効果が一致する s i R N A をさらに調査することが好ましい。

【 0 2 6 6 】

s i R N A の効力の比較。一旦インフルエンザウイルス産生を有意に阻害する s i R N A が同定されると、最も強力なものを同定するために同一アッセイにおけるその効力を比較する。 M D C K 細胞を使用したほとんどの上記アッセイでは、 0.001 または 0.01 の M O I のウイルスを使用した。2つのサンプル(N P - 1496 および P A - 2087)ウイルス力価が血球凝集素アッセイによって検出不可能であり、1つのサンプル(N P - 1496)ではブラークアッセイによって検出不可能であることが見出された。これらの s i R N A (具体的には、同一の遺伝子に特異的な s i R N A)の効力を区別するために、 M D C K 細胞を感染するために使用した M O I を 0.1 またはそれ以上に増加させる。 s i R N A もニワトリ胚で試験する。ブラークアッセイを使用して、ウイルス力価をより正確に測定する。

【 0 2 6 7 】

さらに、トランスフェクションのために使用した s i R N A 量の滴定によって s i R N A の効力を比較する。簡単に述べれば、異なる量の s i R N A (0.025 、 0.05 、 0.1 、および 0.25 n m o l) を使用して M D C K 細胞 (1 × 10⁷) にエレクトロ

10

20

30

40

50

ポレーションを実施する。細胞に固定M O I (0 . 0 1 など) の P R 8 または W S N ウイルスを感染させ、血球凝集素によるウイルス力価を測定するために 6 0 時間後に培養上清を回収した。これらの実験結果は、各 s i R N A の相対効力だけでなく、最大阻害の最小必要量を判定するために役立つ。後者は、上記組み合わせに各 s i R N A をどの程度使用するのかということの判定に有用である。

【 0 2 6 8 】

s i R N A の最も強力な組み合わせの同定。2つまたはそれ以上の異なる s i R N A の同時使用は、1つの s i R N A による干渉を回避することができる変異ウイルスの出現を防止するために非常に有用であり得る。一旦多数の 8 個のウイルス遺伝子の強力な s i R N A が同定されると、組み合わせにおけるその有効性について試験を行う。好ましくは、少なくとも 2 個の遺伝子にターゲティングされた強力な s i R N A を同定する。または、さらに好ましくは、少なくとも 3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、またはさらに 8 個全ての遺伝子にターゲティングされた強力な s i R N A を同定する。しかし、最初は 8 個全部の遺伝子未満に制限することが望ましい(例えは、5 または 6 遺伝子)。これらの研究のために、以下の検討材料が重要である: i) 同一の混合物で使用した異なる s i R N A 数、i i) 「カクテル」における各 s i R N A の最小使用量、および i i i) 最も強力な組み合わせを同定するための最も有効な方法。

【 0 2 6 9 】

インフルエンザウイルスの変異率は、 $1 . 5 \times 10^{-5}$ / ヌクレオチド / 感染サイクルと推定される(4)。異なる遺伝子に特異的な 2 つの s i R N A を同時に使用する場合、耐性ウイルスの出現率は、 $2 . 2 5 \times 10^{-10}$ である。s i R N A は時折 1 つのヌクレオチドミスマッチ(2 6)(具体的には、アンチセンス鎖の末端(2 8) および 3 ' 側の半分) を許容することができることを考慮すると、2 つの s i R N A の同時使用は、耐性ウイルスの出現防止に非常に有効なはずである。控えめにいえば、組み合わせ中には 3 つの s i R N A で十分なはずである。この計算は、混合物中の各 s i R N A が独立して作用することを前提にしている。最初、この s i R N A のみを使用して上記のように判定したインフルエンザウイルス産生の最大阻害に必要な s i R N A の最小量を組み合わせ中に使用する。いくつかの研究は、哺乳動物細胞およびドロソフィラの R N A i 機構は限定的であり得ることを示す(2 7 、 2 9 、 3 0)。これがインフルエンザウイルス産生の R N A 干渉と思われる場合、本発明者らは組み合わせ中の各 s i R N A 量を減少させて試験する(2 つの組み合わせ中の各 s i R N A の最大量の半分をについて試験を行う)。

【 0 2 7 0 】

最初に、2つの s i R N A の試験組み合わせを体系的に試験する。このストラテジーの利点は、2つの s i R N A の最も強力な組み合わせだけでなく 3 つの s i R N A の組み合わせ中の強力な成分も得られるという点である。異なる遺伝子またはウイルス生活環の異なる時期に特異的な 2 つの s i R N A の組み合わせが潜在的相乗効果のためにより望ましいが、転写酵素が豊富なタンパク質ではなく、且つウイルス産生に重要であるため、転写酵素の異なる成分に特異的な s i R N A の組み合わせについて試験を行う価値がある。各遺伝子(P A 、 P B 1 、 P B 2 、 N P 、 M 、および N S) のための 1 つの強力な s i R N A を同定すると仮定すると、2つの s i R N A の全ての可能な組み合わせを対象とするために 1 5 個の組み合わせについて試験を行う必要がある。

【 0 2 7 1 】

個別または 2 つの組み合わせのエレクトロポレーションによって、s i R N A を M D C K 細胞に移入する。8 時間後、細胞に所定の M O I の P R 8 または W S N ウイルスを感染させ、培養上清を、血球凝集素によるウイルス力価のアッセイのために 6 0 時間後に回収する。実質的に低い血球凝集素単位を有するサンプル中の正確な力価を、ブラークアッセイによって判定する。細胞株由来の結果を確認するために、ニワトリ胚中で s i R N A の組み合わせをアッセイする。

【 0 2 7 2 】

この一連の実験結果により、2つの s i R N A の組み合わせの相対効力および 2 つの s

10

20

30

40

50

i R N A の組み合わせが相乗効果を有するかどうかが明らかとなる。例えば、N P - 1 4 9 6 と P A - 2 0 8 7 との組み合わせがN P - 1 4 9 6 およびP A - 2 0 8 7 の個別の効果を合計した効果よりも高い場合、組み合わせは相乗効果を有する。これらの結果は、3つのs i R N A のどの組み合わせが必要に応じて有効である可能性が高いかについての目安が得られる。例えば、N P - 1 4 9 6 と P A - 2 0 8 7 との組み合わせがN P - 1 4 9 6 またはP A - 2 0 8 7 のみよりも有効であり、且つP A - 2 0 8 7 とP B 1 - 2 2 5 7 との組み合わせがP A - 2 0 8 7 またはP B 1 - 2 2 5 7 のみよりも有効であると仮定すると、N P - 1 4 9 6 、P A - 2 0 8 7 、およびP B 1 - 2 2 5 7 を含むカクテル中の3つのs i R N A は特に有効である可能性が高い。M D C K 細胞およびニワトリ胚で有効である可能性が最も高い少なくとも3つのs i R N A カクテルの効力を測定する。2つのs i R N A の組み合わせ由来の結果が役に立たない場合、3つのs i R N A カクテルの効力を、2つのs i R N A カクテルの試験について記載のように体系的に試験する。全ての可能性を対象とするために、10の異なる組み合わせについて試験を行う必要がある。
10

【0273】

まとめると、推奨される実験から得た結果により、多数の8個のインフルエンザウイルス遺伝子の保存領域由来の最も強力なs i R N A およびインフルエンザウイルス産生阻害におけるその最も有効な組み合わせが同定される可能性が高い。

【0274】

(実施例9：s i R N A の細胞取り込みを容易にする非ウイルス送達因子の評価)

本実施例は、s i R N A の細胞取り込みを強化する能力についての種々の非ウイルス送達因子の試験を記載する。その後の実施例で、上記および実施例自体で試験した多数のポリマーを使用して正の結果を示すデータを提供する。他の送達因子も同様に試験することができる。
20

【0275】

カチオン性ポリマー。カチオン性ポリマーがD N A の細胞内への取り込みを容易にする能力は、より有効なエンドサイトシスのためにD N A に結合して巨大なプラスミドD N A 分子をより小さなD N A /ポリマー複合体に縮合する能力に一部起因すると考えられる。s i R N A 二重鎖は短いため（例えば、たった21ヌクレオチド長）、これらはおそらくさらにより縮合することができる事が示唆される。s h R N A などのs i R N A 前駆体もまた比較的短い。しかし、カチオン性ポリマーが負電荷のs i R N A に結合して負電荷の細胞表面と相互作用する能力を有するため、s i R N A およびs h R N A の細胞内への取り込みを容易にことができる。したがって、公知のカチオン性ポリマー（P L L、修飾P L L（例えば、アシル基、スクシニル基、アセチル基、またはイミダゾール基での修飾（32））、ポリエチレンイミン（P E I）（37）、ポリビニルピロリドン（P V P）（38）、およびキトサン（39、40）が含まれるが、これらに限定されない）は、s i R N A およびs h R N A の送達因子としての有望な候補である。
30

【0276】

さらに、R o b e r t L a n g e r ' s l a b o r a t o r y で開発された新規のカチオン性ポリマーおよびオリゴマーは、送達因子として有望な候補である。D N A トランスフェクションで使用するためのジアクリレート単量体およびアミン単量体由来の新規のカチオン性ポリマーおよびオリゴマーの巨大ライブラリーを合成および試験するための有効なストラテジーを開発した。本明細書中では、これらのポリマーを、ポリ（-アミノエステル）（P A E）ポリマーという。第1の研究では、7種のジアクリレート単量体および20種のアミン単量体由来の140種のポリマーのライブラリーを合成し、試験した（34）。140種のメンバーのうち、70種は十分に水溶性であることが見出された（2m g / m l 、25m M 酢酸緩衝液（p H = 5.0））。電気泳動移動度シフトによって示されるように、70種の水溶性ポリマーのうちの56種はD N A と相互作用した。最も重要なこととして、これらは、56種のポリマーのうちの2種でC O S - 7 細胞へのD N A トランスフェクションの媒介が認められた。新規のポリマーのトランスフェクション効率は、P E I の4~8倍であり、リポフェクタミン2000と同等またはそれ以上であ
40

った。

【0277】

最初の研究以来、2,400種のカチオン性ポリマーが構築およびスクリーニングされており、効率的なDNAトランスフェクションを促進する別の約40種のポリマーが得られている(118)。構造のばらつきはDNA結合およびトランスフェクション効率に有意な影響を与えることができ(33)、siRNAの細胞内への取り込みを促進する能力について多数のポリマーについて試験を行うことが好ましい。さらに、インビボ系(すなわち、哺乳動物被験体)への移行中に、そのインビボでの能力、吸収、分配、代謝、および排泄(ADME)の研究の結果として一定のポリマーが排除される可能性がある。したがって、インタクトな生物での試験は重要である。

10

【0278】

まとめると、少なくとも約50種のカチオン性ポリマーを、siRNAトランスフェクション試験で試験する。これらのほとんどは上記のPAEおよびイミダゾール基修飾PLLである。PEI、PVP、およびキトサンを、販売業者から購入する。これらのポリマーを迅速且つ効率的にスクリーニングするために、首尾よく細胞をトランスフェクトするPAEポリマーのライブラリーを96ウェルプレートに移す。この標準的な96ウェル形式でのポリマーの保存により、滅菌Labcyte EDR 384S/96Sマイクロピッターロボットを使用した半自動的スクリーニングを簡単に開発することが可能である。適切なポリマー-siRNA比および最も効率的な送達条件を定義するために一定量のポリマーを滴定する(所定量のsiRNAを使用)。下記のように、特異的アッセイによっては半自動スクリーニングは僅かに異なる。

20

【0279】

siRNA/ポリマー複合体の特徴づけ。siRNAの細胞内への取り込みを容易にするための種々のカチオン性ポリマーについて、これらは、siRNAと複合体を形成することができるべきである。(34)に記載のものに類似のプロトコールにしたがった電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)によってこの問題について試験を行う。簡単に述べれば、マイクロピッターロボットを使用して96ウェルプレート中でNP-1496 siRNAを、それぞれ50種ほどのポリマーと、1:0.1、1:0.3、1:0.9、1:2.7、1:8.1、および1:24.3(siRNA/ポリマー、w/w)の比で混合する。混合物を、マルチチャネルピッターロボットを使用して500サンプルまでアッセイすることができる4%アガロースゲルスラブにロードする。臭化エチジウム染色によっsiRNAの移動パターンを視覚化する。ポリマーの存在下でsiRNAの移動度が減少した場合、siRNAは、このポリマーと複合体を形成する。siRNA-ポリマー比に基づいて、中和比を同定することが可能である。siRNAに結合しないポリマーはあまり好ましくなく、さらなる試験はsiRNAに結合しないポリマーに注目する。

30

【0280】

イミダゾール基修飾PLL、PEI、PVP、キトサン、およびいくつかのPAEポリマーを、単独または細胞株中のDNAとの複合体として測定した。細胞傷害性は結合した分子によって変化するため、siRNAと複合体化した種々のポリマーおよび修飾ポリマーをMDCK細胞中で測定する。簡単に述べれば、滅菌Labcyteマイクロピッターロボットを使用して、NP-1496を異なる量の上記ポリマーと混合する。複合体を96ウェルプレート中のMDCK細胞に4時間アブライする。次いで、ポリマー含有培地を、通常の成長培地に置換する。24時間後、細胞の代謝活性を、MTTアッセイを使用して96ウェル形式で測定する(41)。最も低い使用量で細胞を90%またはそれ以上死滅させるポリマーはあまり好ましくなく、最も低い使用量で細胞が90%を超えて死滅しないポリマーをさらに調査することにさらに注目する。

40

【0281】

いくつかの場合、DNA/ポリマー組成物を使用して類似の研究を行い、DNA/ポリマー組成物を使用して類似の結果(例えば、細胞傷害性、細胞取り込みの促進)が得られるかどうかを判定することが重要である。

50

【0282】

培養細胞による siRNA取り込み。一旦 siRNA / ポリマー複合体が特徴付けられると、2つの異なるアッセイ系を使用した培養細胞から出発するその siRNA の細胞取り込み能力について試験を行う。第1のアプローチでは、蛍光強度の測定によって GFP 発現の減少が容易に定量されるので、GFP特異的 siRNA (GFP-949) を、GFP 発現 MDCK 細胞に対して試験する。簡単に述べれば、同一の比の上記の GFP-949 / ポリマーを、96ウェルプレート中の MDCK 細胞にアプライする。負のコントロールとして、NP-1496 を使用するか、siRNA を使用しない。正のコントロールとして、エレクトロポレーションによって GFP-949 を細胞に移入する。36時間後、細胞を 96ウェルプレート中で溶解し、溶解物の蛍光強度を蛍光プレートリーダーによって測定した。siRNA の細胞取り込みを促進するための種々のポリマーの能力 GFP 強度の全減少によって示す。あるいは、96ウェル形式においてサンプルを取り扱うために具備したフローサイトメトリーを使用して GFP 発現について細胞を分析した。siRNA の細胞取り込みを促進する種々のポリマーの能力を、GFP 強度が減少した細胞の比率および GFP 強度の減少の程度によって示す。これらのアッセイ由来の結果により、最も有効なトランスフェクションの至適な siRNA : ポリマー比が明らかとなる。

【0283】

第2のアプローチでは、MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルス産生の阻害を直接測定する。上記のように、種々の比の NP-1496 siRNA / ポリマーを、96ウェルプレート中の MDCK 細胞にアプライする。正のコントロールとして、エレクトロポレーションによって siRNA を MDCK 細胞に移入する。負のコントロールとして、GFP-949 を使用するか、siRNA を使用しない。8時間後、細胞に所定の MOI の PR8 または WSN ウィルスに感染させる。60時間後に培養上清を回収し、96ウェルプレートにおいて血球凝集反応によって希釈することなくウイルスをアッセイする。最初のアッセイで低ウイルス力値を有するウェル由来の上清を希釈し（したがって、siRNA / ポリマー組成物がウイルス産生を阻害することを示す）、血球凝集反応によってアッセイする。あるいは、60時間後、感染培養物を、MTTアッセイによる代謝活性についてアッセイする。最終的に感染細胞は溶解するため、代謝活性の相対レベルはまた、ウイルス感染の阻害の目安が得られる。

【0284】

siRNA / ポリマーで投与した培養物中でウイルス力値または代謝活性が投与していないものよりも実質的に低い場合、ポリマーが siRNA トランスフェクションを促進すると結論付ける。エレクトロポレーションによる siRNA が移入された培養物中のウイルス力値の比較により、siRNA および siRNA / ポリマー組成物の相対トランスフェクション効率を評価する。

【0285】

最初の2つのスクリーニング由来の多数の最も有効なカチオンポリマーを、siRNA およびポリマーの両方の滴定によって 96ウェルプレート中のウイルス感染アッセイで確認する。得られた結果に基づいて、最も有効な siRNA : ポリマー比での6種のポリマーの能力を、24ウェルプレートおよび 6ウェルプレート中の MDCK 細胞中でさらに分析する。多数の最も有効なポリマーを、実施例 10 に記載のようにマウスにおけるさらなる研究のために選択する。

【0286】

別のアプローチ。培養細胞中の siRNA の細胞内への取り込みの効率的な促進のためのカチオン性ポリマーの代替物として、アルギニンリッチペプチドを、siRNA トランスフェクション実験で調査する。ARP が負電荷リン脂質との相互作用によって原形質膜を直接透過すると考えられるため（48）、最も最近使用したカチオン性ポリマーは、エンドサイトーシスによる DNA の細胞取り込みを促進すると考えられ、siRNA の細胞内への取り込みの促進における ARP の効率を調査する。カチオン性ポリマーのように、ARP およびポリアルギニン（PLA）も正電荷であり、siRNA を結合する可能性が

10

20

30

40

50

高く、A R P または P L A へ s i R N A が共有結合する必要はおそらくないことが示唆される。したがって、他のカチオン性ポリマーと同様に A R P または P L A を投与する。T a t 由来の A R P および異なる長さの P L A (S i g m a から市販) が s i R N A の細胞取り込みを促進する能力を上記のように判定する。

【 0 2 8 7 】

(実施例 1 0 : マウスにおける s i R N A および s i R N A / 送達因子組成物の試験)

原理 : 同定されたポリマーがマウスの気道細胞による s i R N A 取り込みを促進する能力を評価し、マウスにおけるインフルエンザウイルス感染の防止および治療における s i R N A の効率について試験を行う。マウスにおけるインフルエンザウイルス感染の s i R N A 阻害の証明により、例えば、s i R N A の鼻腔内または肺投与によるヒトにおけるインフルエンザウイルス感染を防止または治療するための潜在的使用の証拠が得られる。細胞に s i R N A を有効に送達し、且つインフルエンザウイルス感染を有効に治療または防止する s i R N A 含有組成物の同定方法を、本実施例に記載する。簡単にするために、実施例は、s i R N A / ポリマー組成物の試験を記載する。s i R N A / カチオン性ポリマー組成物、s i R N A / アルギニンリッチペプチド組成物などの他の s i R N A / 送達因子組成物の試験のために類似の方法を使用することができる。

【 0 2 8 8 】

投与経路。インフルエンザウイルスは、上気道および肺内の上皮細胞に感染するため、気道内の上皮細胞への s i R N A の送達方法に注目する。多数の異なる方法を使用して、小分子薬物、タンパク質、および D N A / ポリマー複合体はマウス上気道および / または肺に送達されている (点滴注入法、エアゾール (液体または乾燥粉末の両方) 吸入、気管内投与、および静脈内注射が含まれる) 。点滴注入法により、マウスと通常軽く麻酔し、直立で保持した。少量 (通常、 3 0 ~ 5 0 μ l) での治療 (すなわち、 s i R N A / ポリマー複合体) を、流動動物を吸入する場合、一方の鼻孔にゆっくりと適用する。点滴注入した流動動物を肺に到達させるために、動物を短期間直立に維持する。点滴注入法は、治療薬を上気道および肺の両方に送達させるために有効であり、同一のマウスに複数回繰り返すことができる。

【 0 2 8 9 】

エアゾールにより、液体および乾燥粉末を通常は別に適用する。噴霧器によってマウスを入れた密封したプラスチック製のケージに液体エアゾールを產生する (5 2) 。エアゾールを動物の呼気として吸入するため、この方法は無効且つ不正確であり得る。通常、麻酔マウスへの強制された通気によって乾燥粉末エアゾールを投与する。エアゾール粒子が巨大且つ多孔質である限り、この方法は非常に有効であり得る (以下を参照のこと) (3 1) 。気管内投与のために、チューブを介して麻酔マウスの肺へ治療薬を含む溶液を注射する (5 4) 。肺への送達に非常に有効であるにもかかわらず、上気道を外している。タンパク質およびポリエチレンイミンと複合体形成した少量の D N A (約 1 μ g) の静脈内注射は、内皮細胞および肺間質組織細胞をトランسفェクトすることを示した (5 5) 。この検討材料に基づいて、s i R N A / ポリマー複合体を、点滴注入法によってマウスに最初に投与する。巨大多孔質粒子を使用した静脈内送達およびエアゾール送達も調査する。さらに、静脈内注射および腹腔内注射を含む他の送達方法も試験する。

【 0 2 9 0 】

気道内の細胞による s i R N A 取り込み。実施例 9 に記載の多数の最も有効なポリマーを、マウス気道内の s i R N A の細胞内への取り込みを促進する能力について試験する。調査を促進するために、G F P 発現トランスジェニックマウスにおける G F P 特異的 s i R N A (G F P - 9 4 9) による G F P 発現の阻害を使用する。最初に G F P 特異的 s i R N A を使用する利点は、アッセイの単純さおよび正確さによりマウスにおける有効なポリマーの同定を迅速化することができる点である。さらに、得られた結果により、インビオで s i R N A を取り込む細胞の領域または型が明らかとなる。後者の情報は、送達因子の修飾および気道上皮細胞への s i R N A の至適な送達のための投与方法に有用である。

【 0 2 9 1 】

10

20

30

40

50

簡単に述べれば、段階的用量の G F P - 949 / ポリマー複合体（実施例 9 で判定した最も有効な比）を、点滴注入によって G F P トランスジェニックマウスに投与する。コントロールとして、マウスに s i R N A のみ、ポリマーのみ、なし、または非特異的 s i R N A / ポリマー複合体を投与する。上気道および肺由来の組織を、s i R N A 投与から 36 ~ 48 時間後に採取し、O C T に包埋し、凍結する。切片を、G F P 強度について調べ、蛍光顕微鏡下で視覚化し、隣接切片をヘマトキシリソ / エオシン (H / E) で染色した。あるいは、組織をパラホルムアルデヒド中に固定し、O C T に包埋した。いくつかの切片を、H & E で染色し、隣接する切片を H R P 抱合抗 G F P 抗体で染色する。組織学と G F P 画像（または抗 G F P 染色）の重ね合わせにより、G F P 発現が阻害される領域または細胞型を同定することができる。感受性の増大について、組織を、G F P 強度が減少した領域を同定するために共焦点顕微鏡によって試験することができる。

10

【 0 2 9 2 】

点滴注入による D N A トランスフェクションからの所見に基づいて（52、56）、s i R N A は気道の管腔表面上の上皮細胞によって取り込まれる可能性が最も高いと予想される。コントロールマウスと比較して G F P - 949 / ポリマー処理マウスで G F P 強度の有意な減少が認められる場合、これは、特定のポリマーがインビボでの s i R N A の細胞取り込みを促進することを示す。

【 0 2 9 3 】

マウスにおけるインフルエンザウイルス感染の s i R N A 阻害。G F P トランスジェニックマウスにおける上記 G F P - 949 研究に加えて、マウスにおける s i R N A 取り込みの促進における多数の最も有効なポリマーを、インフルエンザウイルスに特異的な s i R N A (N P - 1496 など) またはおそらく 2 つまたは 3 つの s i R N A 「カクテル」を使用して試験する。最初の研究のために、s i R N A / ポリマー複合体およびインフルエンザウイルスを、点滴注入の前に s i R N A / ポリマー複合体およびウイルスの混合によって同時にマウスに組み込む。段階的用量の s i R N A / ポリマー複合体および P R 8 ウィルス（所定用量）を使用する。コントロールとして、マウスに s i R N A のみ、ポリマーのみ、なし、または G F P - 949 / ポリマーを投与する。感染後の種々の時間で（例えば、2 ~ 3 日、またはそれ以上（例えば、数日または 1 週間またはそれ以上））、鼻孔洗浄物を調製し、凍結融解によってウイルスを溶離するために肺をホモジナイズする。洗浄物および肺中のウイルス力価を、血球凝集反応によって測定する。血球凝集素アッセイによって力価は結果的に検出には低すぎる場合、血球凝集素アッセイ前にウイルスを M D C K 細胞中で増殖させる。ウイルス力価のより正確な判定のために、選択されたサンプルに対してブラークアッセイを行う。

20

【 0 2 9 4 】

単回用量の s i R N A / ポリマーがインフルエンザ感染の阻害に有効ではない場合、複数回投与がより有効であるかを判定するために、s i R N A の複数回投与（比較的高い投薬量）を調査する。例えば、最初の s i R N A / ポリマーおよびウイルス投与後、マウスに s i R N A / ポリマーを 12 時間ごとに 2 日間（4 回投与）投与する。肺および鼻腔内洗浄物のウイルス力価を、最初の感染から種々の時点での測定する。

30

【 0 2 9 5 】

これらの実験由来の結果は、s i R N A が上気道および肺のインフルエンザウイルス感染の阻害に有効であるかどうかを示し、最も有効な単回用量を示す。s i R N A / ポリマーの複数回の投与は、インフルエンザウイルス感染治療において単回投与よりも有効である可能性が高いと予想される。他のポリマーまたは送達因子および s i R N A / ポリマー送達のための異なるアプローチ（例えば、下記のアプローチ）を調査することもできる。

40

【 0 2 9 6 】

巨大孔質粒子を使用した s i R N A / ポリマー送達。上気道および肺への別の有効な送達方法は、Robert Langer グループによって最初に開発された巨大孔質粒子の使用である。液体ベースの点滴注入法と対照的に、後者の方法は、治療薬を保有する巨大な多孔質粒子（乾燥粉末）の吸入に依存する。その最初の研究では、これらは、治

50

療薬およびポリ(乳酸-コ-グリコール酸)(PLGA)またはポリ(乳酸-コ-リジン-グラフト-リジン)(PLAL-Lys)のダブルエマルジョン溶媒の蒸発により、巨大多孔質粒子が作製されることを示した(31)。これらの粒子は、密度が0.4g/cm³未満であり、平均直径が5μmを超える。低密度のために、これらを肺深部に効率的に吸入することができる。これらは、肺内のマクロファージによってあまり有効にクリアランスされない(57)。ラットによる巨大な多孔質インスリン含有粒子の吸入により、小非多孔質粒子による4時間と比較して、インスリンの全身レベルが上昇し、96時間全身のグルコースレベルが抑制される。

【0297】

吸入についてFDAにより承認されているが、肺に対して内因性である(または両方)賦形剤を使用した巨大な多孔質粒子の產生手順が開発された(58)。この手順では、水溶性賦形剤(すなわち、ラクトース、アルブミンなど)および治療薬を蒸留水に溶解した。溶液を、Niro Atomizer Portable Spray Dryer(Niro, Inc., Columbus, MD)に送り込んで、3μmと15μmとの間の範囲の平均幾何学的直径である0.04g/cm³と0.6g/cm³との間のタップ密度を有する乾燥粉末を作製した。

【0298】

吹き付け乾燥法を使用して、治療薬がsiRNA/ポリマーに置換されたこと以外はLangenによって記載のsiRNA/ポリマーを保有する巨大多孔質低密度粒子を作製する。(31, 58)に記載のように、得られた粒子を、空隙率、密度、およびサイズについて特徴付ける。上記基準に到達した粒子を、Harvard呼吸器を使用した強制通気によって麻酔マウスに投与する。GFPまたはインフルエンザウイルスのいずれかに特異的なsiRNAを使用するかどうかに依存して、上記のように異なるアッセイを行う。特異的siRNA/ポリマーを含む巨大な多孔質粒子を投与したマウスにおけるGFP発現またはウイルス力価は、コントロールマウスよりも有意に低く、巨大多孔質粒子を介したエアゾール吸入はsiRNA送達のための有効な方法なるようである。

【0299】

siRNA/ポリマー複合体の予防および治療適用。マウスにおけるインフルエンザウイルス感染のための予防または治療としてのsiRNA/ポリマー複合体の有効性について試験を行う。単回用量のsiRNA/ポリマー複合体が有効であると仮定すると、siRNAがインフルエンザ感染の干渉に有効なままである投与後の時間を評価する。siRNA/ポリマー複合体を、点滴注入法または巨大多孔質エアゾール(上記で判定するように、より有効であることに依存して)によってマウスに投与する。マウスにインフルエンザウイルスを直後、1、2、または3日後に感染させ、ウイルス感染から24時間後または48時間後に鼻腔内洗浄物および肺のウイルス力価を測定する。siRNAが3日後に依然として有効であることが見出された場合、siRNA/ポリマー投与から4、5、6、および7日後にマウスに感染させ、感染から24時間後のウイルス力価のアッセイのために組織を採取する。これらの実験からの結果は、投与後の長さが明らかになる可能性が高く、siRNAはマウスにおけるウイルス産生の干渉で有用なままであり、ヒトにおける使用をガイドする。

【0300】

siRNAの治療有効性を評価するために、マウスにインフルエンザウイルスを感染させ、その後、感染後の異なる時間でsiRNA/ポリマー複合体を投与する。具体的には、マウスに鼻腔内投与し、有効用量(上記で判定)のsiRNA/ポリマーを、直後、1、2、または3日後に投与する。コントロールとして、感染直後のマウスにGFP-949を投与するかsiRNAを全く投与しない。鼻腔内洗浄物および肺のウイルス力価を、siRNA投与から24または48時間後に測定する。

【0301】

さらに、マウスに致死量のインフルエンザウイルスを感染させ、5つの群(5~8マウス/群)に分類する。群1に直後に有効用量のsiRNA/ポリマー複合体を投与する。

10

20

30

40

50

群2～4に有効用量のsiRNA／ポリマー複合体を注射から1～3日後にそれぞれ投与する。5群には、感染直後にGFP特異的siRNAを投与して、コントロールとする。感染マウスの生存を追跡する。これらの実験結果は、感染後どれくらいの期間siRNAがマウスで治療効果を発揮するかが明らかになる可能性が高い。

【0302】

(実施例11:DNAベクターまたはレンチウイルスによって提供されたテンプレートから転写されたsiRNAによるインフルエンザウイルス感染の阻害)

原理:インフルエンザウイルス感染の有効なsiRNA治療は、インビボで候補細胞に十分量のsiRNAを送達させる能力に依存する。耐性ウイルスの出現を防止するために、2つまたは3つのsiRNAを互いに使用することが好ましい。同一細胞への2つまたは3つのsiRNAの同時送達は、有効な送達系が必要である。上記アプローチの代替法として、siRNA前駆体を転写し、有効なsiRNAにプロセシングすることができるDNAベクターの使用を調査する。

【0303】

本発明者らは、DNAベクターから転写されたsiRNAは、同一の細胞に移入された合成siRNAと同一の程度でCD8発現を阻害することができることを以前に示していた。具体的には、本発明者らは、CD8-61と呼ばれるCD8遺伝子をターゲティングするように設計された5つのsiRNAのうちの1つがマウスCD8⁺CD4⁺T細胞株中のCD8を阻害するがCD4発現は阻害しないことを見出した(27)。CD8-61siRNAの種々のヘアピン誘導体の試験により、本発明者らは、CD8-61FはCD8-61に類似の阻害活性を有することを見出した(図20Aおよび20B)(59)。

ヘアピン構造のために、CD8-61をpSLOOPIII(CD8-61FがH1RNAプロモーターによって駆動するDNAベクター(図20C))に構築した。H1RNAプロモーターは小型であり(60)、ポリメラーゼII(polIII)によって転写される。通常は单RNAを転写し、以前にsiRNA型サイレンシングを作製するために使用されているため(61)、PolIIIプロモーターを使用した。DNAベクターについて試験を行うために、本発明者らは、CD8発現ベクターでトランスフェクトしたHeLa細胞を使用した。図20Dに示すように、pSLOOPIII-CD8-61FプラスミドのCD8発現HeLa細胞の一過性トランスフェクションにより、合成CD8-61siRNAでトランスフェクトしたHeLa細胞と同一の程度でCD8発現が減少した。対照的に、プロモータレスベクターのトランスフェクションはCD8発現を有意に減少させなかった。これらの結果は、RNAヘアピンを、DNAベクターから転写し、その後RNAスプライシングのためにsiRNAにプロセシングすることができることを示す。類似のアプローチを使用して、インフルエンザウイルスに特異的なsiRNA前駆体を発現するDNAベクターを設計する。

【0304】

培養細胞中のDNAテンプレートから転写したsiRNAの調査。DNAベクターからsiRNA前駆体を発現するために、siRNA二重鎖にプロセシングすることができるsiRNAのヘアピン誘導体(インフルエンザウイルスに特異的)を設計する。さらに、2つまたはそれ以上のsiRNA前駆体を転写することができるベクターを产生する。これらの調査を迅速化するために、GFP-949およびNP-1496siRNAを、GFPを発現するMDCK細胞で使用する。CD8-61F設計後、GFP-949およびNP-1496のヘアピン誘導体(それぞれ、GFP-949HおよびNP-1496H)合成する(図21A)。

【0305】

GFP-949およびGFP-949Hの両方を、GFP発現MDCK細胞にエレクトロポレーションを行う。NP-1496または偽エレクトロポレーションを負のコントロールとして使用する。24時間後および48時間後、細胞をフローサイトメトリーによるGFP発現についてアッセイする。GFP陽性細胞の比率およびGFPレベルの強度がGFP-949Hを投与した培養物で有意に減少する場合、ヘアピン誘導体の有効性を証明

10

20

30

40

50

した。その有効性を、標準的な G F P - 9 4 9 を投与した細胞中の G F P 強度との比較によって示す。

【 0 3 0 6 】

同様に、N P - 1 4 9 6 およびN P - 1 4 9 6 H をM D C K 細胞にエレクトロポレーションを行う。ネガティブコントロールとして G F P - 9 4 9 または偽エレクトロポレーションを使用する。転写から 8 時間後、細胞に P R 8 または W S N ウィルスを感染させた。培養上清のウイルス力価を、感染から 6 0 時間後の血球凝集反応によって測定する。N P - 1 4 9 6 H を投与した培地でウイルス力価が有意に減少する場合、ヘアピン誘導体は、ウイルス産生を阻害する。C D 8 - 6 1 F での研究に基づいてヘアピン誘導体が機能的であることが予想される。そこでなければ、(5 9 、 6 1 、 6 2) に記載のものに類似するヘアピン誘導体の異なる設計を合成および試験する。

10

【 0 3 0 7 】

D N A ベクターの設計および培養細胞中の試験。一旦 G F P - 9 4 9 H およびN P - 1 4 9 6 H が機能的であることが示されると、対応する発現ベクターを構築する。G F P - 9 4 9 H およびN P - 1 4 9 6 H を、p S L O O P I I I ベクター中の H 1 プロモーターの後にそれぞれクローニングする。得られたベクターを、エレクトロポレーションによって G F P 発現 M D C K 細胞に一過性にトランスフェクトする。トランスフェクトした細胞を G F P 強度について分析するか、ウイルスを感染させ、且つウイルス産生についてアッセイする。s i R N A 前駆体転写のために強力なプロモーターを同定するための他のプロモーターに加え、高レベルの s i R N A 前駆体発現を駆動することも示されている U 6 P o 1 I I I プロモーターをこれについて試験する。

20

【 0 3 0 8 】

一旦 1 つの s i R N A 前駆体を転写するベクターが有効であると示される場合、2 つの s i R N A 前駆体を転写できるベクターを構築する。この目的のために、G F P - 9 4 9 H およびN P - 1 4 9 6 H を、p S L O O P I I I ベクターに縦列でクローニングする(5 ' 末端の G F P - 9 1 9 H および 3 ' 末端の N P - 1 4 9 6 または他の周辺の方法のいずれか) (図 2 1 C 、中央)。得られたベクターでは、2 つの s i R N A 前駆体を、ヘアピン構造中に存在する余剰のヌクレオチドによって連結される (図 2 1 B)。1 つの構築物から 2 つの s i R N A をプロセシングすることができるかどうか公知ではないので、G F P - 9 4 9 H およびN P - 1 4 9 6 H の両方が独立したプロモーターによって転写されるベクターも構築する (図 2 1 C 、下)。

30

【 0 3 0 9 】

M D C K のトランスフェクション効率が約 5 0 % であるため、一過性トランスフェクションは、2 つの s i R N A 前駆体をコードするベクターの評価と同一ではないかもしれない。したがって、線状化ベクター + n e o 耐性ベクターでの G F P 発現 M D C K 細胞のエレクトロポレーションによって安定なトランスフェクタントを確立する。サザンプロットによって s i R N A 発現ベクターの存在を確認するために、複数のトランスフェクタントから D N A を単離する。安定に組み込まれたベクターから転写された G F P 特異的 s i R N A が G F P 発現を阻害することができるかどうかを判定するために、正のトランスフェクタントを G F P 発現についてアッセイする。G F P 発現が阻害されたトランスフェクタントに P R 8 または W S N ウィルスを感染させ、血球凝集反応によってウイルス力価を測定する。トランスフェクタントの有意な画分で G F P 発現およびウイルス産生の両方が阻害されるという所見は、2 つの s i R N A 前駆体を転写し、1 つの D N A ベクターからプロセシングすることができる事が確立される。

40

【 0 3 1 0 】

類似のアプローチが以前の研究で首尾よく使用されているので、1 つの s i R N A 前駆体を転写するベクターの構築は容易である (5 9)。多数の研究により、同一のプロモーターおよび終結配列を使用して同一のベクターから 2 つの遺伝子を独立して転写することができる事が示されているため、2 つの s i R N A 前駆体を同一のベクターから転写することができる可能性が高い。後者のアプローチでは、s i R N A 前駆体を独立して転写

50

する。得られた d s R N A 前駆体の長さは、50ヌクレオチド未満である可能性が高い。対照的に、2つの s i R N A 前駆体がタンデムで転写される場合(図21BおよびC)、得られた d s R N A 前駆体は、50ヌクレオチド超である。50ヌクレオチドより長い d s R N A の存在は、哺乳動物細胞中のインターフェロン応答を活性化させる(22、23)。したがって、同一のベクター由来の2つの s i R N A 前駆体の独立した転写の別の利点は、インターフェロン応答を回避するという点である。インターフェロンはウイルス感染を阻害するので有用であり得るが、応答はまた多数の代謝経路を遮断し、それにより細胞機能を干渉する(63)。

【0311】

インターフェロン応答が種々のD N A ベクターでトランスフェクトされたM D C K 細胞で誘導されるかどうかを判定するために、インターフェロンにはP K R のリン酸化が必要であるため、全部およびリン酸化された d s R N A 依存性タンパク質キナーゼ(P K R)のレベルをアッセイする(23)。ベクタートランスフェクト細胞および偽トランスフェクト細胞から調製した細胞溶解物を、S D S - P A G E で分画する。タンパク質をメンブレンに移し、メンブレンを、リン酸化P K R または全P K R に特異的な抗体で探索した。アッセイの感度が十分でない場合、免疫沈降およびその後のウェスタンブロッティングを行う。活性化P K R レベルの相違が検出されない場合、D N A ベクターから転写された d s R N A 前駆体はインターフェロン応答を活性化しない。s i R N A の細胞内合成のための好みのD N A ベクターは、インターフェロン応答を活性化せず、本発明はこのようなベクターを提供する。

【0312】

マウスにおけるD N A ベクターの調査。一旦D N A ベクターから転写された s i R N A がM D C K 細胞中でインフルエンザウイルス産生を阻害することができる事が示されると、マウスにおけるその有効性を調査する。細胞ゲノムへの移入プラスミドD N A の組み込みを最小にするために、一過性発現のために超らせんD N A を使用する。一過性発現の他の利点は、配列レベルが高い傾向があるという点であり、これはおそらく組み込み前の細胞あたりのプラスミド数が多いからである。マウスにおけるD N A トランスフェクションを容易にするために、遺伝子治療のために開発されたカチオン性ポリマー(実施例8に記載のイミダゾール基修飾P L L 、P E I 、P V P 、およびP A E が含まれる)を使用する。

【0313】

具体的には、G F P - 949 H またはN P - 1496 H を単独でまたはN P - 1496 H およびG F P - 949 H と共に発現するD N A ベクターを所定の比で特異的ポリマーと混合する。段階的な量の複合体+P R 8 またはW S N ウィルスを、点滴注入によって麻酔G F P トランスジェニックマウスに移入する。コントロールとして、マウスにD N A のみまたはポリメラーゼのみを投与するか、何も投与しない。感染から2日後および3日後、実施例10に記載のようにウイルス力価をアッセイするために、鼻腔内洗浄物および肺を採取した。さらに、上気道および肺切片を、G F P 発現での減少について試験する。

【0314】

D N A / ポリマー複合体を複数回投与する(例えば、最初にウイルスと共に投与し、その後の2日間は1日2回投与する)。複数回投与の効果を、感染から3日後に試験する。さらに、2つまたは3つのインフルエンザ特異的 s i R N A 前駆体をコードするD N A ベクターを構築し、マウスにおけるインフルエンザ感染の阻害におけるその有効性を試験する。

【0315】

レンチウイルス。上記構築物を、レンチウイルス導入プラスミドに挿入し、感染性レンチウイルスの産生で使用する。したがって、レンチウイルスは、ウイルス感染細胞内でのs h R N A 合成のためのテンプレートを提供する。D N A ベクターについて上記のように、レンチウイルスベクターがインフルエンザウイルス産生を阻害する能力を組織培養およびマウスで試験する。本発明の任意の送達因子またはレンチウイルスもしくは他のウイル

10

20

30

40

50

ス遺伝子治療ベクターの投与のために既に使用されている送達因子を使用して、レンチウイルスをマウスに投与することができる。

【0316】

(実施例12: siRNAによるマウスにおけるインフルエンザウイルス産生の阻害)

本実施例は、インフルエンザウイルスでの感染の前または後のいずれかで投与した場合、インフルエンザウイルスNPまたはPA転写物にターゲティングされたsiRNAの投与によりマウスにおけるインフルエンザウイルスの産生を阻害することを示す実験を記載する。阻害は用量依存性であり、2つの異なるインフルエンザウイルス遺伝子から発現した転写物にターゲティングした2つのsiRNAを共に投与した場合、さらなる効果を示す。

10

【0317】

(材料と方法)

siRNAの調製。上記のようにこれを行う。

【0318】

siRNA送達。siRNA(30もしくは60μgのGFP-949、NP-1496、またはPA-2087)を、オリゴヌクレオチドカチオン性ポリマートランスフェクション試薬N/P(比=5)(Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA; Cat. No. GDSP20130; N/Pは、jetPEI試薬中のリン酸ヌクレオチドあたりの窒素残基数をいう)のためのjetPEI(商標)またはポリ-L-リジン(MW)(vis)52,000; MW(LALLS)41,800、Sigma Cat. No. P2636)と5%グルコース中で室温にて20分間インキュベートした。混合物をマウスに静脈内注射し、眼窩静脈に注射する(マウスあたり200μl、群あたり4マウス)。200μlの5%グルコースをコントロール(未投与)マウスに注射した。マウスを2.5%Avertinsで麻酔し、その後siRNA注射または鼻腔内感染を行った。

20

【0319】

ウイルス感染。B6マウス(標準的な実験条件下で保持)に、ピペットを使用して30μl(12,000pfu)/マウスでマウスの鼻腔にウイルス含有緩衝液を滴下することによってPR8ウイルスを鼻腔内注射した。

30

【0320】

ウイルス力価の決定。マウスを、感染後の種々の時間で屠殺し、肺を採取した。肺をホモジナイズし、ホモジネートを2回凍結融解してウイルスを放出させた。感染肺中に存在するPR8ウイルスを、MDCK細胞の感染によって滴定した。平底96ウェルプレートに、 3×10^4 MDCK細胞/ウェルを播種し、24時間後に血清含有培地を除去した。25μlの肺ホモジネート(非希釈または $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-7}$ に希釈)を3連のウェルに接種した。4μg/mlのトリプシンを含む175μlの感染培地を、各ウェルに添加した。37度48時間後、感染細胞由来の上清によるニワトリRBCの血球凝集反応によってウイルスの有無を判定した。V底96ウェルプレート中で血球凝集反応アッセイを行った。上清の連続2倍希釈物を、同体積の0.5%懸濁液(vol/vol)のニワトリ赤血球(Charles River Laboratories)と混合し、氷上で1時間インキュベートした。接着性で均一な赤血球層を含むウェルを、正とスコアリングした。ウイルス力価を、Reed and Muench法(TCID₅₀)による50%のウェルが感染した希釈終点の内挿によって判定した。任意の2つの群由来のデータを、有意を評価するために本明細書中に記載の実験を通して使用したスチューデントt検定によって比較した。

40

【0321】

(結果)

図22Aは、感染前に投与した場合、ウイルスNP転写物にターゲティングされたsiRNAがマウスにおけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを証明する実験結果を示す。上記の材料と方法に記載のように、30または60μgのGFP-949または

50

NP-1496 siRNAを、jetPEIとインキュベートし、マウスに静脈内注射した。3時間後、マウスに、マウスあたり12000pfuのPR8ウイルスを鼻腔内注射した。感染から24時間後、肺を採取した。図22Aに示すように、siRNA未投与(NT；黒塗りの四角)またはGFPにターゲティングされたsiRNA(GFP 60μg；白抜きの四角)を投与されたマウス肺ホモジネートの平均 \log_{10} TCID₅₀は4.2であった。NP(NP 30μg；白抜きの円)およびjetPEIにターゲティングされた30μgのsiRNAで事前投与したマウスでは、平均 \log_{10} TCID₅₀は3.9であった。NP(NP 60μg；黒塗りの円)およびjetPEIにターゲティングされた60μgのsiRNAで事前投与したマウスでは、平均 \log_{10} TCID₅₀は3.2であった。未投与群と60μg NP siRNAを投与した群との間の肺ホモジネートにおけるウイルス力価の相違は、P=0.0002で有意であった。各マウスについてのデータを、表6A(NT=未投与)に示す。

【0322】

図22Bは、感染前にカチオン性ポリマーPLLを含む組成物中で静脈内投与した場合、ウイルスNP転写物にターゲティングされたsiRNAがマウスにおけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを証明する別の実験結果を示す。上記の材料と方法に記載のように、30または60μgのGFP-949またはNP-1496 siRNAを、PLLとインキュベートし、マウスに静脈内注射した。3時間後、マウスに、マウスあたり12000pfuのPR8ウイルスを鼻腔内注射した。感染から24時間後、肺を採取した。図22Bに示すように、siRNA未投与(NT；黒塗りの四角)またはGFPにターゲティングされたsiRNA(GFP 60μg；白抜きの四角)を投与されたマウス肺ホモジネートの平均 \log_{10} TCID₅₀は4.1であった。NP(NP 60μg；黒塗りの円)およびPLLにターゲティングされた60μgのsiRNAで事前投与したマウスでは、肺ホモジネートの平均 \log_{10} TCID₅₀は3.0であった。60μg GFPを投与した群と60μg NP siRNAを投与した群との間の肺ホモジネート中のウイルス力価の相違は、P=0.001で有意であった。各マウスのデータを表6Aに示す(NT=未投与)。これらのデータは、インフルエンザNP転写物にターゲティングされたsiRNAは、ウイルス感染前に投与した場合に肺のウイルス力価が減少することを示す。これらはまた、siRNAとカチオン性ポリマーとの混合物は静脈内注射した場合に(水力学的トランسفェクションなどの技術は必要ない)肺のインフルエンザウイルスの阻害に有用な因子であることを示す。

【0323】

【表6A】

表6A. カチオン性ポリマーを使用したsiRNAによるマウスのインフルエンザウイルス
産生の阻害

| 投与 | log ₁₀ TCID50 | | | |
|----------------------|--------------------------|-----|-----|--------|
| | 4.3 | 4.3 | 4.0 | 4.0 |
| NT (jetPEI 実験) | 4.3 | 4.3 | 4.0 | 4.0 |
| GFP (60 µg) + jetPEI | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 4.0 |
| NP (30 µg) + jetPEI | 4.0 | 4.0 | 3.7 | 3.7 |
| NP (60 µg) + jetPEI | 3.3 | 3.3 | 3.0 | 3.0 |
| NT (PLL 実験) | 4.0 | 4.3 | 4.0 | 4.0 |
| GFP (60 µg) + PLL | 4.3 | 4.0 | 4.0 | (実施せず) |
| NP (60 µg) + PLL | 3.3 | 3.0 | 3.0 | 2.7 |

10

20

30

40

図22Cは、ウイルスNP転写物にターゲティングされたsiRNAが感染前に投与した場合にマウスのインフルエンザウイルス産生を阻害することを証明し、カチオン性ポリマーの存在はsiRNAの阻害効果が有意に増加する第3の実験結果を示す。上記の材料と方法に記載のように、60 µgのGFP-949またはNP-1496siRNAを、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)またはjetPEIとインキュベートし、マウスに静脈注射した。3時間後、マウスに12000pfu/マウスのPR8を鼻腔内注射した。注射から24時間後、肺を採取した。図22Cに示すように、siRNA投与を行っていないマウス(NT;白抜きの四角)についての肺ホモジネートの平均log₁₀TCID₅₀は4.1であり、PBS中のGFPにターゲティングされたsiRNAを受けたマウス(GFP-PBS;白抜きの三角)についての肺ホモジネートの平均log₁₀TCID₅₀は、4.4であった。PBS中のNP(NP-PBS;白抜きの円)にターゲティングされた60 µgのsiRNAで事前投与したマウスでは、肺ホモジネートの平均log₁₀TCID₅₀は4.2であり、投与なしまたはGFPにターゲティングされたsiRNAでの投与と比較して最も穏やかな有効性のみを示す。jetPEI中のGFP(GFP-PEI;白抜きの円)にターゲティングされた60 µgのsiRNAで事前投与したマウスでは、肺ホモジネートの平均log₁₀TCID₅₀は4.2であった。しかし、jetPEI中のNP(NP-PEI;黒塗りの円)およびjetPEIにターゲティングされた60 µgのsiRNAを投与されたマウスでは、肺ホモジネートの平均log₁₀TCID₅₀は3.9であった。jetPEI中のNP(NP-PEI;黒塗りの円)にターゲティングされた60 µgのsiRNAを投与されたマウスでは、肺ホモジネートの平均log₁₀TCID₅₀は3.2であった。GFPsiRNAを含むPBSを投与された群とNPsiRNAを含むPBSを投与された群との間の肺ホモジネートのウイルス力価の相違は、P=0.04で有意であり、jetPEIを含むGFPsiRNAを投与された群とjetPEIを含むNPsiRNAを投与された群との間の肺ホモジネートのウイルス力価の相違は、P=0.003であり高度に有意義であった。各マウス由来のデータを、表6Bで示す(NT=未投与)。

【0324】

50

【表6B】

表6B. カチオン性ポリマーを用いて有効性が増加した siRNAによるマウスにおける
ウイルス産生を介したインフルエンザウイルスの阻害

| 投与 | $\log_{10}\text{TCID}_{50}$ | | | |
|----------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|
| NT | 4.3 | 4.3 | 4.0 | 3.7 |
| GFP (60 µg) + PBS | 4.3 | 4.3 | 4.7 | 4.3 |
| NP (60 µg) + PBS | 3.7 | 4.3 | 4.0 | 4.0 |
| GPP (60 µg) + jetPEI | 4.3 | 4.3 | 4.0 | 3.0 |
| NT (60 µg) + jetPEI | 3.3 | 3.0 | 3.7 | 3.0 |

図23は、異なるインフルエンザウイルス転写物にターゲティングされた siRNA がさらなる効果を示すことを証明する実験結果を示す。上記の材料と方法に記載するように、60 µg の NP - 1496 siRNA、60 µg の PA - 2087 siRNA、または60 µg の NP - 1496 siRNA + 60 µg の PA - 2087 siRNA を、jetPEI とインキュベートし、マウスに静脈内注射した。3時間後、マウスに 12000 pfu / マウスの PR8 ウィルスを鼻腔内注射した。感染から 24 時間後に肺を採取した。図23に示すように、siRNA 投与を受けていない (NT; 黒塗りの四角) マウスの肺ホモジネートの平均 $\log_{10}\text{TCID}_{50}$ は 4.2 であった。NP (NP 60 µg; 白塗りの円) にターゲティングされた 60 µg の siRNA を投与されたマウスでは、肺ホモジネートの平均 $\log_{10}\text{TCID}_{50}$ は 3.2 であった。PA (PA 60 µg; 白抜きの三角) にターゲティングされた 60 µg の siRNA を投与したマウスでは、肺ホモジネートの平均 $\log_{10}\text{TCID}_{50}$ は 3.4 であった。NP にターゲティングされた 60 µg の siRNA + PA にターゲティングされた 60 µg の siRNA (NP + PA; 白抜きの円) にターゲティングされた 60 µg の siRNA を投与したマウスでは、肺ホモジネートの平均 $\log_{10}\text{TCID}_{50}$ は 2.4 であった。未投与群と、60 µg の NP siRNA、60 µg の PA siRNA、または 60 µg の NP siRNA + 60 µg の PA siRNA を投与された群との間の肺のウイルス力価の相違は、それぞれ $P = 0.003$ 、 0.01 、および 0.0001 有意であった。60 µg の NP siRNA または 60 µg の NP siRNA を投与された群と、60 µg の NP siRNA + 60 µg の PA siRNA を投与された群との間の肺ホモジネートの相違は、 $P = 0.01$ 有意であった。各マウスのデータを、表7に示す (NT = 未投与)。これらのデータは、インフルエンザ NP または PA 転写物にターゲティングされた siRNA での事前投与によりインフルエンザウイルスにその後感染したマウス肺のウイルス力価が減少することを示す。データは、さらに、異なるウイルス転写物にターゲティングされた siRNA の組み合わせによりさらなる効果を示すことを示し、異なる転写物にターゲティングされた siRNA の組み合わせを使用した治療は、等価な有効性を達成するために必要な 1 つの siRNA の量と比較して各 siRNA の用量を減少させることができると示唆される。異なる転写物にターゲティングされた一定の siRNA が相乗効果（すなわち、相加効果よりも高い効果）を示すことが可能である。強力な siRNA と siRNA との組み合わせの同定への全身アプローチを使用して、siRNA が相乗効果を示す siRNA の組み合わせを示すことができる。

【0325】

【表7】

表7. マウスにおけるインフルエンザウイルスに対する si RNAの相加効果

| 投与 | \log_{10} TCID50 | | | |
|-----------------------|--------------------|-----|-----|-----|
| NT | 4.3 | 4.3 | 4.0 | 4.0 |
| NP (60 µg) | 3.7 | 3.3 | 3.0 | 3.0 |
| PA (60 µg) | 3.7 | 3.7 | 3.0 | 3.0 |
| NP + PA (各々 60 µg) | 2.7 | 2.7 | 2.3 | 2.0 |

10

20

30

図24は、ウイルスNP転写物にターゲティングされたsiRNAが感染後に投与された場合にマウスにおけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを証明する実験結果を示す。マウスに、500pfuのPR8ウイルスを鼻腔内感染させた。上記の材料と方法に記載のように、60µgのGFP-949siRNA、60µgのPA-2087siRNA、60µgのNP-1496siRNA、または60µgのNPsirNA+60µgのPAsirNAをjetPEIとインキュベートし、5時間後にマウスに静脈内注射した。siRNAの投与から28時間後に肺を採取した。図24に示すように、siRNA投与なし(NT；黒塗りの四角)またはGFP特異的siRNAGFP-949(GFP；白塗りの四角)を投与された肺ホモジネートの平均 \log_{10} TCID₅₀は3.0であった。PA(PA 60µg；白抜きの三角)にターゲティングされた60µgのsiRNAを投与されたマウスでは、肺ホモジネートの平均 \log_{10} TCID₅₀は2.2であった。NP(NP 60µg；白抜きの円)にターゲティングされた60µgのsiRNAを投与されたマウスでは、肺ホモジネートの平均 \log_{10} TCID₅₀は2.2であった。60µgのNPsirNA+60µgPAsirNA(PA+NP；黒塗りの円)を投与されたマウスでは、肺ホモジネートの平均 \log_{10} TCID₅₀は1.8であった。未投与群と、60µgのPA、NPsirNA、または60µg NPsirNA+60µgPAsirNAを投与された群との間の肺ホモジネートのウイルス力値の相違は、それぞれP=0.09、0.02、および0.003で有意であった。NPsirNAおよびPA+NPsirNAを投与された群の間の肺サーファクタントのウイルス力値の相違は、P値が0.2であった。各マウスのデータを表8に示す(NT=未投与)。これらのデータは、インフルエンザNPおよび/またはPA転写物にターゲティングされたsiRNAによりウイルス感染後に投与された場合に肺のウイルス力値が減少することを示す。

【0326】

【表8】

表8. siRNAによる感染マウスのインフルエンザウイルス産生の阻害

| 投与 | \log_{10} TCID50 | | | |
|-----------------------|--------------------|-----|-----|-----|
| NT | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| GFP (60 µg) | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 2.7 |
| PA (60 µg) | 2.7 | 2.7 | 2.3 | 1.3 |
| NP (60 µg) | 2.7 | 2.3 | 2.3 | 1.7 |
| NP + PA (各々 60 µg) | 2.3 | 2.0 | 1.7 | 1.3 |

40

(実施例13: shRNA産生のテンプレートを提供するレンチウイルス投与による細

50

胞におけるインフルエンザウイルス産生の阻害)

(材料と方法)

細胞培養。24ウェルプレートに、 4×10^5 細胞/ウェルを含む1mlのD M E M - 10% F C Sを含むベロ細胞を播種し、37、5% C O₂でインキュベートした。

【0327】

s h R N A産生のためのテンプレートを提供するレンチウイルスの产生。図25Aに図示されるように、N P - 1 4 9 6 a s h R N Aの合成のためのテンプレートとして作用するオリゴヌクレオチド(図25Aを参照のこと)を、レンチウイルスベクターのp L L 3 . 7のU 6プロモーターと終結配列との間でクローン化した(R ub i n s o n , D . , et al , N ature G enetics , V ol . 3 3 , pp . 4 0 1 - 4 0 6 , 10 2 0 0 3)。オリゴヌクレオチドを、p L L 3 . 7のマルチクローニング部位内のH p a IとX h o I制限部位との間に挿入した。レンチウイルスベクターは、トランスフェクト/感染疾患のモニタリングを容易にするためにE G F Pも発現する。N P - 1 4 9 6 a s h R N A産生用のテンプレートを含むD N Aベクターの同時トランスフェクションおよび2 9 3 T細胞へのベクターのパッケージングによってレンチウイルスが产生された。48時間後、レンチウイルスを含む培養上清を回収し、4、2 0 0 0 r p mで7分間スピンし、0.45μmのフィルターで濾過した。1 × 10⁵/ウェルのベロ細胞を、24ウェルプレートに播種した。一晩の培養後、インサート(0.25mlまたは1.0ml)を含む培養上清を、8μg/mlポリブレンの存在下でウェルに添加した。ついで、プレートを、2 5 0 0 r p mにて室温で1時間遠心分離し、培養物に戻した。感染から24時間後、得られたベロ細胞株(ベロ-N P - 0 . 2 5 およびベロ-N P - 1 . 0)を、親(非感染)ベロ細胞を用いたフローサイトメトリーによってG F P発現について分析した。N P - 1 4 9 6 中の19よりもむしろ20nt長の二重鎖が得られる、センス部分の3'末端のさらなるヌクレオチド(A)およびアンチセンス部分の5'末端の相補的ヌクレオチド(U)の偶発的封入によってN P - 1 4 9 6 a がN P - 1 4 9 6 と異なることに留意のこと(表2を参照のこと)。本発明の他の実施形態によれば、N P - 1 4 9 6 a 配列よりもむしろN P - 1 4 9 6 配列を使用する。さらに、図21に示すN P - 1 4 9 6 a s h R N Aループ部分は、N P - 1 4 9 6 s h R N Aのそれと異なる。

【0328】

インフルエンザウイルス感染およびウイルス力価の判定。コントロールベロ細胞およびインサートを含むレンチウイルスでトランスフェクトしたベロ細胞(ベロ-N P - 0 . 2 5 およびベロ-N P - 1 . 0)に、0.04、0.2、および1のM O IのP R 8ウイルスを感染させた。実施例12に記載のように、上清中のインフルエンザウイルス力価を、感染から48時間後の血球凝集反応(H A)アッセイによって判定した。

【0329】

(結果)

N P - 1 4 9 6 a s h R N Aの产生のためのテンプレートを含むレンチウイルスを、ベロ細胞中のインフルエンザウイルス産生を阻害する能力について試験した。N P - 1 4 9 6 a s h R N Aは、上記のN P - 1 4 9 6 a s i R N Aと同一の配列を有する二重鎖部分を含むステム-ループ構造を形成することができる2つの相補領域を含む。図25Bに示すように、ベロ細胞と共にレンチウイルス含有上清の一晩の封入により、E G F Pが発現され、レンチウイルスによるベロ細胞の感染が示される。影をつけた曲線は、コントロール細胞(非感染)の平均蛍光強度を示す。1mlの上清を使用した場合、ほとんど全ての細胞がE G F P陽性となり、平均蛍光強度は高かった(1818)(Vero-N P - 1 . 0)。0.25mlの上清を使用した場合、ほとんどの細胞(約95%)はE G F P陽性であり、平均蛍光強度は低かった(503)(ベロ-N P - 0 . 2 5)。

【0330】

次いで、親ベロ細胞およびレンチウイルス感染ベロ細胞に、0.04、0.2、および0.1のM O Iのインフルエンザウイルスを感染させ、インフルエンザウイルス感染から48時間後にウイルス力価をアッセイした。M O Iの増加につれて、親ベロ細胞培養物の

上清のウイルス力価が増加した(図25C)。対照的に、ベロ-NP-1.0細胞培養物上清のウイルス力価は非常に低値のままであり、インフルエンザウイルス産生がこれらの細胞中で阻害されることを示す。同様に、ベロ-NP-0.25細胞培養物中のインフルエンザウイルス産生も部分的に阻害された。ウイルス力価を、表9に示す。これらの結果により、ベロ細胞中のインフルエンザウイルス産生を阻害するためにレンチウイルスベクターから発現されたNP-1496shRNAをsiRNAにプロセシングすることができる事が示唆される。阻害の程度は、細胞あたりのウイルス感染の程度に比例するようである(EGFPレベルによって示される)。

【0331】

【表9】

10

表9. 細胞培養物中の細胞で発見されたsiRNAによるインフルエンザウイルス産生の阻害

| 細胞株 | ウイルス力価 | | |
|--------------|--------|----|-----|
| Vero | 16 | 64 | 128 |
| Vero-NP-0.25 | 8 | 32 | 64 |
| Vero-NP-1.0 | 1 | 4 | 8 |

(実施例14: siRNA前駆体を転写することができるDNAベクターの鼻腔内投与によるマウスにおけるインフルエンザ産生の阻害) 20

(材料と方法)

shRNAのテンプレートとして作用するプラスミドの構築。NP-1496ashRNAが発現するプラスミドの構築を実施例13に記載する。実施例13に記載のように、PB1-2257shRNAまたはRSV特異的shRNAの合成のためのテンプレートとして作用するオリゴヌクレオチドを、レンチウイルスベクターpLL3.7のU6プロモーターと終結配列との間にクローン化し、NP-1496ashRNAについて図25Aに図示する。オリゴヌクレオチドの配列を以下に示した。

【0332】

【化7】

NP-1496a センス :

5'- TGGATCTTATTCTCGGAGATTCAAGAGATCTCCGAAGAAATAAGATCCTTTTC-3'

(配列番号: 179)

NP-1496a アンチセンス :

5'-TCGAGAAAAAAGGATCTTATTCTCGGAGATCTCTGAATCTCCGAAGAAATAAGATCCA-3'

(配列番号: 180)

PB1-2257 センス :

5'-TGATCTGTTCCACCATTGAATTCAAGAGATTCAATGGTGGAACAGATCTTTTC-3' (配列番号: 181)

PB1-2257 アンチセンス :

5'-TCGAGAAAAAAGATCTGTTCCACCATTGAATCTCTGAATTCAATGGTGGAACAGATCA-3'

(配列番号: 182)

RSV センス :

5'-TGCATAATATAACTGCAAGATTCAAGAGATCTGCAGTTATATTATCGTTTTTC-3' (配列番号: 183)

RSV アンチセンス :

5'-TCGAGAAAAACGATAATATAACTGCAAGATCTCTGAATCTGCAGTTATATTATCGCA-3'

(配列番号: 184)

10

20

20

30

40

40

50

上記オリゴヌクレオチドを含むベクターから発現した R S V s h R N A を、インビオでプロセシングして、以下の配列を含むセンスおよびアンチセンス鎖を有する s i R N A を作製する。

【0333】

【化8】

センス: 5'-CGATAATATAACTGCAAGA-3' (配列番号: 185)

アンチセンス: 5'-TCTTGCAGTTATATTATCG-3' (配列番号: 186)

P A 特異的ヘアピンを、以下のオリゴヌクレオチドを使用して簡単に構築することができる。

【0334】

【化9】

PA-2087 センス :

5'-TGCAATTGAGGAGTGCCTGATTCAAGAGATCAGGCACCTCCTCAATTGCTTTTC-3' (配列番号: 187)

PA-2087 アンチセンス :

5'-TCGAGAAAAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATCTCTGAATCAGGCACCTCCTCAATTGCA-3'

(配列番号: 270)

ウイルス感染およびウイルス力価の判定。実施例 12 に記載のようにこれらを行った。

【0335】

D N A 送達。上記のように、N P - 1 4 9 6 a s h R N A 、 P B 1 - 2 2 5 7 s h R N A 、 または R S V 特異的 s h R N A (各 6 0 μ g) の発現のためのテンプレートとして作用することができるプラスミド D N A を、4 0 μ l I n f a s u r (登録商標) (O N Y , I n c . , A m h e r s t N Y) および 2 0 μ l の 5 % グルコースと個別に混合し、マウス群 (各群あたり 4 匹) に鼻腔内投与した。4 0 μ l の I n f a s u r f と 2 0 μ l の 5 % グルコースとの混合物を、未投与 (N T) 群のマウスに投与した。上記のように、

13時間後にマウスに 12000 p.f.u / マウスの PR8ウイルスを鼻腔内に感染させた。感染から 24 時間後に肺を採取してウイルス力値を判定した。

【0336】

(結果)

DNAベクターから発現された shRNAがマウスにおけるインフルエンザウイルス感染を阻害する能力を試験した。これらの実験では、プラスミドDNAを、Infasur f (肺内の遺伝子導入を促進することが以前に示されたビヒクルに類似の子牛肺由来の天然サーファクタント抽出物)と混合した(74)。DNA/Infasur f混合物を、ピペットを使用して鼻に混合物を滴下することによってマウスに滴下した。13時間後、マウスに 12000 p.f.u / マウスの PR8ウイルスを感染させた。インフルエンザウイルス感染からの 24 時間後、肺を採取し、MDCK / 血球凝集素アッセイによって測定した。

【0337】

図26に記載のように、ウイルス力値は、いかなるプラスミドDNAも投与していないか呼吸器合胞体ウイルス (RSV) 特異的 shRNAを発現するDNAベクターを投与したマウスで高かった。NP-1496ashRNAまたはPB1-2257shRNAのいずれかを発現するプラスミドDNAをマウスに投与した場合により低いウイルス力値が認められた。マウスに両インフルエンザ特異的プラスミドDNA (一方はNP-1496ashRNAを発現し、他方はPB1-2257shRNAを発現する)を投与した場合、ウイルス力値はより有意に減少した。未投与 (NT; 白抜きの四角) または RSV 特異的 shRNA (RSV; 黒塗りの四角) をコードするプラスミドを投与したマウスの肺ホモジネートの平均 $1.0 \text{ g}_{10} \text{ TCID}_{50}$ は、それぞれ 4.0 または 4.1 であった。NP-1496ashRNA (NP; 白抜きの円) のテンプレートとして作用することができるプラスミドを投与したマウスでは、肺ホモジネートの平均 $1.0 \text{ g}_{10} \text{ TCID}_{50}$ は 3.4 であった。PB1-2257shRNA (PB; 白抜きの三角) のテンプレートとして作用することができるプラスミドを投与したマウスでは、肺ホモジネートの平均 $1.0 \text{ g}_{10} \text{ TCID}_{50}$ は 3.8 であった。NP および PB shRNA (NP + PB1; 黒塗りの円) のテンプレートとして作用することができるプラスミドを投与したマウスでは、肺ホモジネートの平均 $1.0 \text{ g}_{10} \text{ TCID}_{50}$ は 3.2 であった。未投与または RSV 特異的 shRNA プラスミドを投与された群と NP shRNA プラスミド、PB1 shRNA プラスミド、または NP および PB1 shRNA プラスミドを投与された群との間の肺ホモジネートのウイルス力値の相違についての P 値は、それぞれ 0.049.0.124 および 0.004 であった。各マウスのデータを、表10に示す (NT = 未投与)。予備試験は PB S または jetPEI の存在下では NP shRNA よりもむしろ NP-1496 siRNA の鼻腔内投与を含むが、Infasur f の非存在下では、インフルエンザウイルスが有効に阻害される。これらの結果は、DNAベクターから発現した shRNA を、マウスにおけるインフルエンザウイルス産生を阻害するために siRNA にプロセシングすることができ、Infasur f が shRNA を発現することができるプラスミドの送達のための適切なビヒクルであることが証明されることを示す。特に、これらのデータは、インフルエンザ NP および / または PB1 転写物にターゲティングされた shRNA により、以下のウイルス感染を投与した場合に肺内ウイルス力値を減少することを示す。

【0338】

【表10】

表10. マウス中で発現したs i RNAによるインフルエンザウイルス産生の阻害

| 投与 | log ₁₀ TCID50 | | | |
|------------------------|--------------------------|-------------|------------|-------------|
| | NT | RSV (60 µg) | NP (60 µg) | PB1 (60 µg) |
| NT | 4.3 | 4.0 | 4.0 | 4.3 |
| RSV (60 µg) | 4.3 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| NP (60 µg) | 4.0 | 3.7 | 3.0 | 3.0 |
| PB1 (60 µg) | 4.0 | 4.0 | 3.7 | 3.3 |
| NP + PB1 (各々 60 µg) | 3.7 | 3.3 | 3.0 | 3.0 |

10

(実施例15: カチオン性ポリマーは、s i RNAの細胞取り込みを促進する)

(材料と方法)

試薬。2つの異なる平均分子量のポリ-L-リジン(ポリ-L-リジン(MW(vi)s)52,000; MW(LALLS)41,800, Cat. No. P2636)およびポリ-L-リジン(MW(vi)s)9,400; MW(LALLS)8,400, Cat. No. P2636)、ポリ-L-arginine(MW 15,000-70,000 Cat. No. P7762)、および3-(4,5-ジメチルチアゾン-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムテトラゾリウムプロミド(MTT)をSigmaから購入した。説明の目的で、LALLS法を使用して得られる分子量と仮定するが、ポリマーはいくらかサイズが異なるため、分子量はおよそであると理解すべきである。

20

【0339】

ゲル遅延アッセイ。10 µlのs i RNA(10 mM Hepes緩衝液(pH 7.2)中に10 pmol)と種々の量のポリマーを含む10 µlのポリマー溶液との混合によってs i RNA-ポリマー複合体を形成した。室温で30分間複合体を形成し、その後20 µlを4%アガロースゲルで泳動した。エチジウムプロミド染色を使用して、バンドを視覚化した。

30

【0340】

細胞傷害性アッセイ。等量(50 pmol)のs i RNAを含む10 mM Hepes緩衝液(pH 7.2)と種々の量のポリマーを含むポリマー溶液と室温で30分間混合することによってs i RNA-ポリマー複合体を形成した。MTTアッセイによって細胞傷害性を評価した。細胞を、30,000細胞/ウェルで10%ウシ胎児結成(FCS)を含む0.2 mlのDMEMを含む96ウェルプレートに播種する。37度一晩のインキュベーション後、培地を除去し、0.18 ml OPTI-MEM(GIBCO/BRL)と置換した。s i RNA-ポリマー複合体を含む20 µlのHepes緩衝液を細胞に添加した。37度6時間のインキュベーション後、ポリマー含有培地を除去し、DMW M-10%FCSと置換した。製造者の説明書に従って、MTTアッセイを使用して24時間後に細胞の代謝活性を測定した。実験を3連で行い、データを平均した。

40

【0341】

細胞培養、トランスフェクション、s i RNA-ポリマー複合体形成、およびウイルス力価判定。10%熱不活化FCS、2 mM L-グルタミン、100単位/mlペニシリン、および100 µg/ml streptomycinを含むDMEM中、37度5%CO₂/95%空気にてベロ細胞を成長させた。トランスフェクション実験のために、4×10⁵細胞/ウェルの対数期ベロ細胞を、1 mlのDMEM-10%FCSを含む24ウェルプレートに播種した。37度一晩のインキュベーション後、50 µlのs i RNA(400 pmol(約700 ng))を含む10 mM Hepes緩衝液(pH 7.2))の50 µlのポリマー溶液への添加によってs i RNA-ポリマー複合体を形成した。s i RNAとポリマーとの間の完全な複合体形成を達成するために、異なる濃度のポリ

50

マーを使用した。複合体形成を完了するために混合物を室温で30分間インキュベートした。細胞成長培地を除去し、OPTI-MEMI(Life Technology)に置換し、その後に複合体を添加した。

【0342】

5%CO₂下にて37度6時間の細胞と複合体とのインキュベーション後、複合体含有培地を除去し、D MEM、0.3%BSA(Sigma)、10mM Hepes、100単位/mlペニシリン、および100μg/mlストレプトマイシンからなる感染培地中の200μlのPR8ウイルスを、各ウェルに添加した。継続的に振り動かしながら室温で1時間のインキュベーション後、4μg/mlトリプシンを含む0.8mlの感染培地を各ウェルに添加し、細胞を37度の5%CO₂下で培養した。上記のように、感染から異なる時間後に、感染培養物から上清を回収し、血球凝集反応(HA)アッセイによってウイルス力値を判定した。

【0343】

接着性細胞株について製造者の説明書に従って、リポフェクタミン2000(Life Technology)によるsiRNAのトランスフェクションを行った。簡単に述べれば、4×10⁵細胞/ウェルの対数期のベロ細胞を1mlのD MEM-10%FCSを含む24ウェルプレートに播種し、37度5%CO₂下にてインキュベートした。翌日、50μlの希釈リポフェクチン2000を含むOPTI-MEMIを50μlのsiRNAに添加して(400pmolを含むOPTI-MEMI)、複合体を形成させた。細胞を洗浄し、無血清培地でインキュベートした。上記のように、複合体を細胞に適用し、細胞を37度6時間インキュベートし、その後洗浄してインフルエンザに感染させた。上記のように、感染から異なる時間後、感染培養物から上清を回収し、ウイルス力値を、血球凝集反応(HA)によって判定した。

【0344】

(結果)

ポリ-L-リジン(PLL)およびポリ-L-アルギニン(PLA)がsiRNAと複合体を形成する能力および培養細胞によってsiRNAの取り込みを促進する能力を試験した。PLLおよび/またはPLAがsiRNAと複合体を形成するかどうかを判定するために、定量のNP-1496 siRNAを漸増量のポリマーと混合した。次いで、ポリマー/siRNA複合体の形成を、4%アガロースゲルによって視覚化した。ポリマーが漸増するにつれて、siRNAの電気泳動移動度が遅延し(図27Aおよび27B)、複合体形成が示される。図27Aおよび27Bは、siRNAとPLL(41.8K)またはPLAとの間の複合体が形成される。各パネルで使用したポリマーの量は、左から右に増加する。図27Aおよび27Bでは、各ウェル中で、左側のレーンにバンドが認められ、複合体形成の欠如が示され、それにより、siRNAがゲルに侵入し、その後移動する。右側に移動するにつれて、バンドは消滅し、複合体形成および複合体のゲル侵入および移動に失敗する。

【0345】

siRNA/ポリマー複合体の細胞傷害性を調査するために、異なる比でのsiRNAとPLLまたはPLAとの混合物を、96ウェルプレート中のベロ細胞培養物に添加した。細胞の代謝活性をMTTによって測定した。3連で実験を行い、データを平均にした。PLL(MW約42K)の増加に伴って細胞生存度が有意に減少するのに対して、PLL(約8K)は、毒性を有意に低減させ、PLL/siRNA比が4:1もの高さでも毒性をほとんどまたは全く示さなかった(図28A;円=PLL(MW約8K);四角=PLL(MW約42K))。図28Bに示すように、細胞生存度はPLA/siRNA比が増大するほど減少するが、生存度は、PLA/siRNA比が4.5:1もの高さで約80%超に保持された。図28Aおよび28Bにおいて、ポリマー/siRNA比をx軸に示す。図28Aおよび28Bにプロットしたデータを、表11および12に示す。表11では、数値は、非投与細胞の生存率と比較したポリマー/siRNA複合体での投与後の細胞の生存度を示す。ND=実施せず。表12では、数値は、PLA/siRNA比、生存

10

20

30

40

50

度、および標準偏差を示す。

【0346】

【表11】

表11. PLL/siRNA複合体の細胞傷害性(生存率)

| 投与 | ポリマー/siRNA比 | | | | | |
|-----------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 | 16.0 |
| PLL~8.4K | 92.26 | 83.57 | 84.39 | 41.42 | 32.51 | ND |
| PLL~41.8K | ND | 100 | 100 | 100 | 82.55 | 69.63 |

【0347】

【表12】

表12. PLA/siRNA複合体の細胞傷害性(生存率)

| | ポリマー/siRNA比 | | | | |
|--------|-------------|------|-------|------|-------|
| | 0.17 | 0.5 | 1.5 | 4.5 | 13.5 |
| 生存度(%) | 94.61 | 100 | 92.33 | 83 | 39.19 |
| 標準偏差 | .74 | 1.91 | 2.92 | 1.51 | 4.12 |

PLLまたはPLAがsiRNAの細胞取り込みを促進するかどうかを判定するために、種々の量のポリマーおよびNP-1496を、全てのsiRNAがポリマーと複合化する比で混合した。それぞれ等量のsiRNAを使用した。約42K PLLについては約8K PLLよりも低いポリマー/siRNA比を使用した。前者の細胞毒性がより高いからである。ベロ細胞に複合体を添加し、6時間後に培養物にPR8ウイルスを感染させた。感染から異なる時間後、培養上清を回収し、HAアッセイによってウイルスについてアッセイした。図29Aは、種々のトランスフェクション投与(円=未投与、四角=リポフェクタミン；黒塗りの三角=PLL(約42KのPLL/siRNA比=2)；白塗りの三角=PLL(約8KのPLL/siRNA比=8))を受けた細胞における長期にわたるウイルス力価のプロットである。図29Aに示すように、ウイルス力価は、非トランスフェクト培養物で時間と共に増加した。ウイルス力価は、NP-1496/リポフェクタミンでトランスフェクトされた細胞で有意に低く、PLL/NP-1496複合体で投与した培養物でさらに低かった。図29Aでプロットしたデータを、表13に示す(NT=未投与；LF2K=リポフェクタミン)。PLL:siRNA比を括弧で示す。

【0348】

一定範囲のポリマー/siRNA比にわたりPLAを同様に試験した。図29Bは、種々のトランスフェクション投与(黒塗りの四角=偽トランスフェクション；黒塗りの円=リポフェクタミン；白抜きの四角=PLA/siRNA比=1でのPLA；白抜きの円=PLA/siRNA比でのPLA=2；白抜きの三角=PLA/siRNA比=4でのPLA；黒塗りの三角=PLA/siRNA比=8でのPLA)を受けた細胞における長期にわたるウイルス力価のプロットである。図29Bに示すように、ウイルス力価はコントロール(偽トランスフェクション)培養物およびPLA/siRNA比が1:1で投与した培養物で時間と共に増加した。ウイルス力価は、NP-1496/リポフェクタミンでトランスフェクトした培養物で有意に低く、PLA/siRNA比が4:1またはそれ以上の複合体を含むPLA/siRNA複合体で投与した培養物でさらに低かった。漸増量のポリマーにより、ウイルス力価がより大きく減少した。図29Bでプロットしたデータを、表4に示す。

【0349】

【表13】

表13. ポリマー/siRNA複合体によるインフルエンザウイルス産生の阻害

| 投与 | 時間(時間) | | | |
|--------------|--------|----|----|----|
| | 24 | 36 | 48 | 60 |
| 偽トランスフェクション | 16 | 64 | 64 | 64 |
| LF2K | 4 | 8 | 16 | 16 |
| PLL~42K(2:1) | 1 | 4 | 8 | 8 |
| PLL~8K(8:1) | 1 | 2 | 4 | 8 |

10

【0350】

【表14】

表14. ポリマー/siRNA複合体によるインフルエンザウイルス産生の阻害

| 投与 | 時間(時間) | | | |
|-------------|--------|----|-----|-----|
| | 24 | 36 | 48 | 60 |
| 偽トランスフェクション | 8 | 64 | 128 | 256 |
| LF2K | 2 | 6 | 16 | 32 |
| PLA(1:1) | 4 | 16 | 128 | 256 |
| PLA(2:1) | 4 | 16 | 32 | 64 |
| PLA(4:1) | 1 | 4 | 8 | 16 |
| PLA(8:1) | 1 | 1 | 1 | 2 |

20

したがって、カチオン性ポリマーは、siRNAの細胞取り込みを促進、細胞株中のインフルエンザウイルス産生を阻害し、広範に使用されているトランスフェクション試薬であるリポフェクタミンより有効である。これらの結果はまた、siRNAの細胞取り込みを刺激し、その同定方法を記載するためにさらなるカチオン性ポリマーを容易に同定することができる事が示唆される。PLLおよびPLAは、このような試みのための正のコントロールとして作用することができる。

30

【0351】

(等価物)

当業者は、日常的実験だけでなく、本明細書中に記載の本発明の特定の実施形態の多数の等価物を使用して認識する確認することができる。本発明の範囲は、上記説明に制限されることを意図せず、むしろ添付の特許請求の範囲に記載されている。

40

【0352】

【表 1 5 - 1】

参考文献

1. Lamb, R.A., and R.M. Krug. 2001. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. *Fundamental Virology* Ed. D.M. Knipe & P.M. Howley:725-770.
2. Simonsen, L., K. Fukuda, L.B. Schonberger, and N.J. Cox. 2000. The impact of influenza epidemics on hospitalizations. *J. Infect. Dis.* 181:831-837.
3. Webster, R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers, and Y. Kawaoka. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56:152-179.
4. Parvin, J.D., A. Moscona, W.T. Pan, J.M. Leider, and P. Palese. 1986. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J. Virol.* 59:377-383.
5. Smith, F.L., and P. Palese. 1989. Variation in influenza virus genes: epidemiology, pathogenic, and evolutionary consequences. *The influenza viruses* Krug, R.M. ed.:New York:Plenum.
6. Webster, R.G., W.G. Laver, G.M. air, and S. G.C. 1982. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* 296:115-121.
7. Webby, R.J., and R.G. Webster. 2001. Emergence of influenza A viruses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356:1817-1828.
8. Patterson, K.D., and G.F. Pyle. 1991. The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic. *Bull. Hist. Med.* 65:4-21.
9. Taubenberger, J.K., A.H. Reid, T.A. Janczewski, and T.G. Fanning. 2001. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356:1829-1839.
10. Claas, E.C., A.D. Osterhaus, R. van Beek, J.C. De Jong, G.F. Rimmelzwaan, D.A. Senne, S. Krauss, K.F. Shortridge, and R.G. Webster. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351:472-477.
11. Yuen, K.Y., P.K. Chan, M. Peiris, D.N. Tsang, T.L. Que, K.F. Shortridge, P.T. Cheung, W.K. To, E.T. Ho, R. Sung, and A.F. Cheng. 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 351:467-471.

【0 3 5 3】

【表15-2】

12. Fukuda, F., C.B. Bridges, and T.L.e.a. Brammer. 1999. Prevention and control of influenza: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48:1-28.
13. Castle, S.C. 2000. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin. Infect. Dis.* 31:578-585.
14. Luscher-Mattli, M. 2000. Influenza chemotherapy: a review of the present state of art and of new drugs in development. *Arch. Virol.* 145:2233-2248. 10
15. Cox, N.J., and K. Subbarao. 1999. Influenza. *Lancet* 354:1277-1282.
16. Vaucheret, H., C. Beclin, and M. Fagard. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 114:3083-3091.
17. Sharp, P.A. 2001. RNA interference-2001. *Genes Dev.* 15:485-490.
18. Brantl, S. 2002. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochem. Biophys. Acta* 1575:15-25.
19. Baulcombe, D. 2002. RNA silencing. *Curr. Biol.* 12:R82-R84.
20. Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and M. C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811. 20
21. Elbashir, S., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
22. McManus, M.T., and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by short interfering RNAs. *Nature Rev. Gene.* 3:737-747.
23. Kumar, M., and G.G. Carmichael. 1998. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1415-1434. 30
24. Gitlin, L., S. Karelsky, and R. Andino. 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418:430-434.
25. Pderoso de Lima, M.C., S. Simoes, P. Pires, H. Faneca, and N. Duzgunes. 2001. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47:277-294.
26. Holen, T., M. Amarzguioui, M.T. Wiiger, E. Babaie, and H. Prydz. 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acids Res.* 30:1757-1766. 40

【0 3 5 4】

【表15-3】

27. McManus, M. T., Haines, B. B., Dillon, C. P., Whitehurst, C. E., van Parijs, L., Chen, J., and Sharp, P. A. (2002). Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J Immunol* 169, 5754-5760.
28. Elbashir, S.M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20:6877-6888.
29. Yang, D., H. Lu, and J.W. Erickson. 2000. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* 10:1191-1200. 10
30. Caplen, N.J., J. Fleenor, A. Fire, and R.A. Morgan. 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RAN interference. *Gene* 252:95-105.
31. Edwards, D.A., J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan, and R. Langer. 1997. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* 276:1868-1871. 20
32. Putnam, D., C.A. Gentry, D.W. Pack, and R. Langer. 2001. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1200-1205.
33. Lynn, D.M., and R. Langer. 2000. Degradable Poly(-amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 122:10761-10768.
34. Lynn, D.M., D.G. Anderson, D. Putnam, and R. Langer. 2001. Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: parallel synthesis and screening of a degradable polymer library. *J. Am. Chem. Soc.* 123:8155-8156. 30
35. Han, S.-O., R.I. Mahato, Y.K. Sung, and S.W. Kim. 2000. Development of Biomaterials for gene therapy. *Mol. Therapy* 2:302-317.
36. Soane, R.J., M. Frier, A.C. Perkins, N.S. Jones, S.S. Davis, and L. Illum. 1999. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.* 178:55-65.
37. Boussif, O., F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7297-7301. 40

【表15-4】

38. Astafieva, I., I. Maksimova, E. Lukandin, V. Alakhov, and A. Kabanov. 1996. Enhancement of the polycation-mediated DNA uptake and cell transfection with Pluronic P85 block copolymer. *FESB Lett.* 389:278-280.
39. Davis, S.S. 1999. Delivery of peptide and non-peptide drugs through the respiratory tract. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2:450-457.
40. Roy, K., H.-Q. Mao, S.-K. Huang, and K.W. Leong. 1999. Oral delivery with chitosan/DNA nanoparticles generates immunologic protection in murine model of peanut allergy. *Nat. Med.* 5:387-391. 10
41. Hansen, M.B., S.E. Nielsen, and K. Berg. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119:203-210.
42. Green, M., and P.M. Loewenstein. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55:1179-1188.
43. Frankel, A.D., and C.O. Pabo. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189-1193. 20
44. Elliott, G., and P. O'Hare. 1997. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88:223-233.
45. Joliot, A., C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, and A. Prochiantz. 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868.
46. Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, and J. Barsoum. 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:664-668. 30
47. Schwarze, S.R., A. Ho, A. Vocero-Akbani, and S.F. Dowdy. 1999. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein. *Science* 285:1569-1572.
48. Derossi, D., G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1998. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8:84-87.
49. Troy, C.M., D. Derossi, A. Prochiantz, L.A. Greene, and M.L. Shelanski. 1996. Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J. Neurosci.* 16:253-261. 40

【表15-5】

50. Allinquant, B., P. Hantraye, P. Mailleux, K. Moya, C. Bouillot, and A. Prochiantz. 1995. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J. Cell Biol.* 128:919-927.
51. Futaki, S., T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, and Y. Sugiura. 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276:5836-5840. 10
52. Densmore, C.L., F.M. Orson, B. Xu, B.M. Kinsey, J.C. Waldrep, P. Hua, B. Bhogal, and V. Knight. 1999. Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol. Therapy* 1:180-188.
53. Arppe, J., M. Widgred, and J.C. Waldrep. 1998. Pulmonary pharmacokinetics of cyclosporin A liposomes. *Intl. J. Pharm.* 161:205-214.
54. Griesenbach, U., A. chonn, R. Cassady, V. Hannam, C. Ackerley, M. Post, A.K. Transwell, K. Olek, H. O'Brodovich, and L.-C. Tsui. 1998. Comparison between intratracheal and intravenous administration of liposome-DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy. *Gene Ther.* 5:181-188. 20
55. Orson, F.M., L. Song, A. Gautam, C.L. DEnsmore, B. Bhogal, and B.M. Kinsey. 2002. Gene delivery to the lung using protein/polyethyleneimine/plasmid complexes. *Gene Therapy* 9:463-471.
56. Gautam, A., C.L. Densmore, E. Golunski, B. Xu, and J.C. Waldrep. 2001. Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol. Therapy* 3:551-556.
57. Tabata, Y., and Y. Ikada. 1988. Effect of size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *J. Biomed. Mater. Res.* 22:837-842. 30
58. Vanbever, R., J.D. Mintzes, J. Wang, J. Nice, D. chen, R. Batycky, L. R., and D.A. Edwards. 1999. Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation. *Pharmaceutical Res.* 16:1735-1742.
59. McManus, M.T., C.P. Peterson, B.B. Haines, J. Chen, and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* 8:842-850.
60. Myslinski, E., J.C. Ame, A. Krol, and P. Carbon. 2001. An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1 RNA gene. *Nucleic Acids Res.* 29:2502-2509. 40

【表15-6】

61. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.
62. Paddison, P.J., A.A. Caudy, E. Bernstein, G.J. Hannon, and D.S. Conklin. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16:948-958.
63. Gil, J., and M. Esteban. 2000. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5:107-114. 10
64. Bitko, V., and S. Barik. 2001. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetic of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.* 1:34-43.
65. Garcia-Sastre, A. (2002) *Microbes & Inf.* 4, 647-655.
66. Katze, M. G., He, Y. & Gale Jr., M. (2002) *Nature Rev. Immunol.* 2, 675-687.
67. Diaz, M. O., Ziemin, S., Le Beau, M. M., Pitha, P., Smith, S. D., Chilcote, R. R. & Rowley, J. D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5259-5263.
68. Diaz, M. O., Pomykala, H. M., Bohlander, S. K., Maltepe, E., Malik, K., Brownstein, B. & Olopade, O. I. (1994) *Genomics* 22, 540-552. 20
69. Kim, M.-J., Latham, A. G. & Krug, R. M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10096-10101.
70. Medcalf, L., Poole, E., Elton, D. & Digard, P. (1999) *J. Virol.* 73, 7349-7356.
71. Shapiro, G. I. & Krug, R. M. (1988) *J. Virol.* 62, 2285-2290.
72. Beaton, A. R. & Krug, R. M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6282-6286.
73. Lois, C., E.J. Hong, S. Pease, E.J. Brown, and D. Baltimore. (2002) *Science* 295:868-872. 30
74. Weiss, D.J., G.M. Mutlu, L. Bonneau, M. Mendez, Y. Wang, V. Dumasius, and P. Factor. (2002) *Mol. Ther.* 6:43-49.
75. Hansen, M.B., S.E. Nielsen, and K. Berg. (1989) *J. Immunol. Methods* 119:203-210.
76. Kunath, K., von Harpe A, Fischer D, Petersen H, Bickel U, Voigt K, Kissel T. (2003) *J Control Release* 89(1):113-25.
77. Jobe A. Surfactant treatment for respiratory distress syndrome. *Respir Care* 1986;31(6):467-476.
78. Berry D. Neonatology in the 1990's: surfactant replacement therapy becomes a reality. *Clin Pediatr* 1991;30(3):167-170. 40

【表15-7】

79. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 1959;97:517-523.
80. von Neergard K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik: die Retraktionskraft der Lunge, abhangig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Ges Exp Med* 1929;66:373.
81. Hallman M, Teramo K, Ylikorkala O, Merritt TA. Natural surfactant substitution in respiratory distress syndrome. *J Perinat Med* 1987;15:463-468. 10
82. Bloom BT, Kattwinkel J, Hall RT, et al. Comparison of Infasurf (calf lung surfactant extract) to Survanta (beractant) in the treatment and prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1997;100:31-38.
83. Mizuno K, Ikegami M, Chen C-M, et al. Surfactant protein-B supplementation improves in vivo function of a modified natural surfactant. *Pediatr Res*. 1995;37:271-276.
84. Hall SB, Venkitaraman AR, Whitsett JA, et al. Importance of hydrophobic apoproteins as constituents of clinical exogenous surfactants. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145:24-30. 20
85. C. H. Ahn, S. Y. Chae, Y. H. Bae and S. W. Kim, Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *J Control Release* 80, 273-82, 2002.
86. Kichler, A., Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med*. 2001 Mar-Apr;3(2):135-44.
87. Brissault B, Kichler A, Guis C, Leborgne C, Danos O, Cheradame H. Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjug Chem*. 2003 May-Jun;14(3):581-7. 30
88. Kichler A, Leborgne C, Marz J, Danos O, Bechinger B. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18;100(4):1564-8
89. Brantl, S. (2002). Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 1575, 15-25.
90. Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N., and Fesik, S. W. (2003). Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6347-6352. 40

【表15-8】

91. Chi, J. T., Chang, H. Y., Wang, N. N., Chang, D. S., Dunphy, N., and Brown, P. O. (2003). Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6343-6346.
92. Bitko, V., and Barik, S. (2001). Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol* **1**, 34.
93. Anderson, D. G., Lynn, D. M., and Langer, R. (2003). Semi-Automated Synthesis and Screening of a Large Library of Degradable Cationic Polymers for Gene Delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, 3153-3158. 10
94. Ge, Q., McManus, M., Nguyen, T., Shen, C.-H., Sharp, P. A., Eisen, H. N., and Chen, J. (2003). RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 2718-2723.
95. Kumar, M., and Carmichael, G. G. (1998). Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1415-1434. 20
96. Lèuscher-Mattli, M. (2000). Influenza chemotherapy: a review of the present state of art and of new drugs in development. *Arch Virol* **145**, 2233-2248.
97. McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J., and Kay, M. A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature* **418**, 38-39.
98. McCaffrey, A. P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F. H., Xu, H., Wieland, S. F., Marion, P. L., and Kay, M. A. (2003). Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* **21**, 639-644.
99. Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., et al. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**, 401-406. 30
100. Shapiro, G. I., and Krug, R. M. (1988). Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* **62**, 2285-2290.
101. Shen, C., Buck, A. K., Liu, X., Winkler, M., and Reske, S. N. (2003). Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS lett* **539**, 111-114. 40

【0360】

【表15-9】

102. Simeoni, F., Morris, M. C., Heitz, F., and Divita, G. (2003). Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31, 2717-2724.
103. Soane, R. J., Frier, M., Perkins, A. C., Jones, N. S., Davis, S. S., and Illum, L. (1999). Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int J Pharm* 178, 55-65.
104. Stiver, G. (2003). The treatment of influenza with antiviral drugs. *CMAJ* 168, 49-56.
105. Tachibana, R., Harashima, H., Ide, N., Ukitsu, S., Ohta, Y., Suzuki, N., Kikuchi, H., Shinohara, Y., and Kiwada, H. (2002). Quantitative analysis of correlation between number of nuclear plasmids and gene expression activity after transfection with cationic liposomes. *Pharm Res* 19, 377-381.
106. Thomas, C. E., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346-358.
107. Xia, H., Mao, Q., Paulson, H. L., and Davidson, B. L. (2002). siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 20, 1006-1010.
108. Zhang, G., Song, Y. K., and Liu, D. (2000). Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther* 7, 1344-1349.
109. Cheung, M., and Lieberman, J. M. (2002). Influenza: update on strategies for management. *Contemporay Pediatrics* 19, 82-114.
110. Yang, P., Althage, A., Chung, J., and Chisari, F. (2000). Hydrodynamic injection of viral DNA: A mouse model of acute hepatitis B virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99(21): 13825-13830.
111. Zhang, G., Budker, V., Wolff, JA (1999) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA, *Hum Gene Ther*, 10:1735-1737.
112. Liu, F., Song, Y.K., Liu, D. (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*; 6:1258-1266.
113. Naldini, L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol* 9, 457-63 (1998).
114. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-7 (1996).

【表15-10】

115. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H. & Verma, I. M. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72, 8150-7 (1998).
116. Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. & Verma, I. M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2140-5 (2002).
117. Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J. & Baltimore, D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-72 (2002).
118. Anderson DG, Lynn DM, Langer R., Semi-Automated Synthesis and Screening of a Large Library of Degradable Cationic Polymers for Gene Delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003 Jul 14;42(27):3153-3158.
119. McCown, M., Diamond, M.S., and Pekosz, A., *Virology* , 313: 514-524 (2003).
120. Gratton, J.P., Yu, J., Griffith, J.W., Babbitt, R.W., Scotland, R.S., Hickey, R., Giordano, F.J., and Sessa, W.C., Cell-permeable peptides improve cellular uptake and therapeutic gene delivery of replication-deficient viruses in cells and *in vivo*. *Nat. Med.*, 9(3): 357-362 (2003).
121. McKenzie, D.L., Kwok, K.Y., and Rice, K. G., A Potent New Class of Reductively Activated Peptide Gene Delivery Agents. *J. Biol. Chem.*, 275(14): 9970-9977 (2000).
122. Park, Y., Kwok, K.Y., Boukarim, C., and Rice, K.G., Synthesis of Sulphydryl Cross-Linking Poly(Ethylene Glycol Peptides and Glycopeptides as Carriers for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.*, 13: 232-239 (2002).
123. Zhang, X., Sawyer, G., J., Dong, X., Qiu, Y., Collins, L., and Fabre, J.W. The *in vivo* use of chloroquine to promote non-viral gene delivery to the liver via the portal vein and bile duct. *J. Gene Med.* , 5:209-218, 2003.
124. Thomas, N., and Klibanov, A.M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62:27-34 (2003).
125. S.-O. Han, R. I. Mahato, Y. K. Sung, S. W. Kim, "Development of biomaterials for gene therapy", *Molecular Therapy* 2:302317, 2000.
126. Weiss, D., Delivery of Gene Transfer Vectors to the Lung: Obstacles and the Role of Adjunct Techniques for Airway Administration. *Mol. Therapy* 6(2) (2002).
127. Ferrari S, Geddes DM, Alton EW. Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 54(11):1373-93 (2002).

【表15-11】

128. Orson FM, Song L, Gautam A, Densmore CL, Bhogal BS, Kinsey BM. Gene delivery to the lung using protein/polyethylenimine/plasmid complexes. *Gene Ther.* 2002 Apr;9(7):463-71.
129. Tiyaboonchai, W., Woiszwillo, J., and Middaugh, C.R. Formulation and characterization of DNA-polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 19:191-202 (2003).
130. Benns, J., Mahato, R., and Kim, S.W., Optimization of factors influencing the transfection efficiency of folate-PEG-folate -graft polyethyleneimine, *J. Cont. Release* 79:255-269 (2002). 10
131. Putnam, D., Zelikin, A.N., Izumrudov, V.A., and Langer, R., Polyhistidine-PEG:DNA nanocomposites for gene delivery, *Biomaterials* 24: 4425-4433 (2003).
132. Benns, J., Choi, J-S., Mahato, R.I., Park, J-H., and Kim, S.W., pH-Sensitive Cationic Polymer Gene Delivery Vehicle: *N*-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) Comb Shaped Polymer, *Bioconj. Chem.* 11:637-645 (2000).
133. Panyam, J., Zhou, W-Z., Prabha, S., Sahoo, S.K., and Labhasetwar, V., Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery, *FASEB J.*, 16: 1217-1226 (2002). 20
134. Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A., and Langel, U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:99-103 (2000).
135. Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G., A peptide carrier for the biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 19:1174-1176 (2001).
136. Schwarze, S.R. and Dowdy, S.F. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds, and DNA. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:99-103 (2000). 30
137. Amarzguioui, A., Holen, T., Babaie, E., and Prydz, H. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nuc. Acids. Res.* 31(2): 589-595 (2003).
138. Braasch, D.A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M.A., and Corey, D.R> RNA Interference in Mammalian Cells by Chemically Modified RNA. *Biochemistry* 42: 7967-7975 (2003).
139. Chiu, Y-L. and Rana, T.M. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 9(9): 1034-1048 (2003). 40

【表15-12】

140. Satishchandran C. Characterization of a new class of DNA delivery complexe formed by the local anesthetic bupivacaine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1468: 20-30 (2000).
141. Jeong JH, Park TG., Poly(L-lysine)-g-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) micelles for low cytotoxic biodegradable gene delivery carriers. *J Control Release*, 82(1):159-66 (2002)

【図面の簡単な説明】

10

【0364】

【図1A】図1A (Julkunen, I., et al. (本明細書中で参考として援用される)を適用)は、インフルエンザウイルスの略図を示す。

【図1B】図1B (Fields' Virology (本明細書中で参考として援用される)を適用)は、インフルエンザウイルスのゲノム構造およびインフルエンザゲノム由来の転写物を示す。mRNAの5'末端および3'末端の細線は、非翻訳領域を示す。影をつけた領域または斜線の領域は、それぞれ0または+1読み取り枠中にコード領域を示す。V型の線はイントロンを示す。mRNAの5'末端の小さな四角は、ウイルス核酸に共有結合した異種細胞RNAを示す。A_(n)は、ポリAテールを示す。

【図2】図2 (Julkunen, I., et al. (本明細書中で参考として援用される)を適用)は、インフルエンザウイルス複製サイクルを示す。

【図3】図3は、ドロソフィラ系で認められるsiRNAの構造を示す。

【図4】図4は、ドロソフィラにおけるRNA干渉に関する工程の略図を示す。

【図5】図5は、本発明で有用なsiRNAおよびshRNA構造の種々の例を示す。

【図6】図6は、Dicer酵素がシステム中の塩基ミスマッチを有する基質を切断して標的転写物の3'UTRに結合して翻訳を阻害する阻害産物を作製する別の阻害経路の図を示す。

【図7】図7は、本発明のsiRNAの両方の鎖の転写を指示するために使用することができる構築物の一例を示す。

【図8】図8は、ハイブリッド形成して本発明のshRNAを形成する1つのRNA分子の転写を指示するために使用することができる構築物の一例を示す。

【図9-1】図9は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの6つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図9-2】図9は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの6つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図9-3】図9は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの6つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図9-4】図9は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの6つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図9-5】図9は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの6つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く

20

30

40

50

影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図9-6】図9は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの6つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図10-1】図10は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの2つの株および動物宿主起源のインフルエンザウイルスAの5つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図10-2】図10は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの2つの株および動物宿主起源のインフルエンザウイルスAの5つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図10-3】図10は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの2つの株および動物宿主起源のインフルエンザウイルスAの5つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図10-4】図10は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの2つの株および動物宿主起源のインフルエンザウイルスAの5つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図10-5】図10は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの2つの株および動物宿主起源のインフルエンザウイルスAの5つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図10-6】図10は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの2つの株および動物宿主起源のインフルエンザウイルスAの5つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図10-7】図10は、ヒト宿主起源のインフルエンザウイルスAの2つの株および動物宿主起源のインフルエンザウイルスAの5つの株の間の配列比較を示す。濃く影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2に記載のように試験した。塩基配列は、A / Puerto Rico / 8 / 34株の配列である。薄く影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図11A】図11A～11Fは、siRNAがMDCK細胞におけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示す実験結果を示す。種々のウイルス転写物をターゲティングする6つの異なるsiRNAをエレクトロポレーションによってMDCKに移入し、その後8時間細胞にウイルスを感染させた。図11Aは、種々のsiRNAまたはコントロールsiRNAの存在下または非存在下で0.01の感染多倍度(MOI)でウイルス株A / PR / 8 / 34(H1N1)(PR8)による感染後の種々の時間での血球凝集素アッセイによって測定した培養上清中のウイルス力値を示す経時変化である。

【図11B】図11A～11Fは、siRNAがMDCK細胞におけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示す実験結果を示す。種々のウイルス転写物をターゲティングする6つの異なるsiRNAをエレクトロポレーションによってMDCKに移入し、そ

10

20

30

40

50

の後8時間細胞にウイルスを感染させた。図11Bは、種々のsiRNAまたはコントロールsiRNAの存在下または非存在下で0.01のMOIでインフルエンザウイルス株A/WSN/33(H1N1)(WSN)での感染後の種々の時間での血球凝集素アッセイによって測定した培養上清中のウイルス力価を示す経時変化である。

【図11C】図11A～11Fは、siRNAがMDCK細胞におけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示す実験結果を示す。種々のウイルス転写物をターゲティングする6つの異なるsiRNAをエレクトロポレーションによってMDCKに移入し、その後8時間細胞にウイルスを感染させた。図11Cは、siRNA NP-1496で偽トランスフェクトするかトランスフェクトしたウイルス感染細胞由来の培養上清中のウイルス力価を示すブラークアッセイを示す。

【図11D】図11A～11Fは、siRNAがMDCK細胞におけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示す実験結果を示す。種々のウイルス転写物をターゲティングする6つの異なるsiRNAをエレクトロポレーションによってMDCKに移入し、その後8時間細胞にウイルスを感染させた。図11Dは、異なる用量のsiRNAでのインフルエンザウイルス産生阻害を示す。MDCK細胞を、表示量のNP-1496 siRNAでトランスフェクトし、その後0.01のMOIでPR8を感染させた。感染から48時間後にウイルス力価を測定した。2つの実験のうちの1つに由来の代表的なデータを示す。

【図11E】図11A～11Fは、siRNAがMDCK細胞におけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示す実験結果を示す。種々のウイルス転写物をターゲティングする6つの異なるsiRNAをエレクトロポレーションによってMDCKに移入し、その後8時間細胞にウイルスを感染させた。図11Eは、ウイルス感染後に投与したsiRNAによるインフルエンザウイルス産生阻害を示す。MDCK細胞に0.01のMOIのPR8ウイルスを2時間感染させ、その後NP-1496(2.5nmol)でトランスフェクトした。感染後の表示の時間でウイルス力価を測定した。2つの実験のうちの1つに由来の代表的なデータを示す。

【図12】図12は、ヒトまたは動物宿主起源の12種のインフルエンザAウイルスのサブタイプまたは単離物の間のNP配列の3'領域部分の間の配列比較を示す。影をつけた領域を使用して、siRNAを設計し、実施例2および3に記載のように試験した。塩基配列は、A/Puerto Rico/8/34株の配列である。影をつけた文字は、塩基配列が異なるヌクレオチドを示す。

【図13】図13は、インフルエンザウイルス阻害の有効性と相關する、インフルエンザウイルス遺伝子セグメントと比較した種々のsiRNAの位置を示す。

【図14A】図14Aは、siRNAおよびsiRNA/送達因子組成物の注射領域を示す成長中のニワトリ胚の略図である。

【図14B】図14Bは、種々のsiRNAの成長中のニワトリ胚におけるインフルエンザウイルス産生を阻害する能力を示す。

【図15】図15は、核タンパク質のウイルスRNA分子との相互作用を示す略図である。

【図16A】図16Aおよび16Bは、インフルエンザウイルスのvRNAと、mRNAと、cRNA(テンプレートRNA)との間の相違およびこれらの間の関係を示す略図を示す。

【図16B】図16Aおよび16Bは、インフルエンザウイルスのvRNAと、mRNAと、cRNA(テンプレートRNA)との間の相違およびこれらの間の関係を示す略図を示す。各インフルエンザAウイルスvRNAセグメントの3'末端の保存された12個のヌクレオチドおよび5'末端の13個のヌクレオチドを図16Bに示す。mRNAは、⁷GpppN^mキャップ構造および宿主細胞RNAのサブセット由来の平均して10～13個のヌクレオチドを含む。vRNAセグメントの5'末端から15～22ヌクレオチド前の位置に対応するmRNA中の部位でmRNAのポリアデニル化が起こる。矢印は、各RNA種に特異的なプライマーの位置を示す(引用文献(1)の適用)。

【図17】図17は、感染の6～8時間前にs i R N A N P - 1 4 9 6で偽トランسفェクトするかトランسفェクトした細胞におけるウイルス感染後の種々の時間でのウイルスN PおよびN S R N A種の量を示す。

【図18】図18Aは、インフルエンザウイルス産生の阻害には二重鎖s i R N A中に野生型(w t)アンチセンス鎖が必要であることを示す。M D C K細胞を、最初にw t鎖および修飾(m)鎖から形成されたs i R N Aでトランسفェクトし、8時間後に0.1M O IのP Rウイルスを感染させた。感染から24時間後に培養上清のウイルス力値をアッセイした。2つの実験のうちの1つに由来の代表的なデータを示す。図18Bは、M特異的s i R N Aが特異的m R N Aの蓄積を阻害することを示す。M D C K細胞をM - 3 7でトランسفェクトし、0.01のM O IのP R 8を感染させ、感染から1時間、2時間、および3時間後にR N A单離物を回収した。M特異的m R N A、c R N A、およびv R N Aのレベルを、R N A特異的プライマーを使用した逆転写およびその後のリアルタイムP C Rによって測定した。各ウイルスR N A種のレベルを、同一サンプル中の-アクチンm R N A(下のパネル)のレベルに正規化する。R N Aの相対レベルを、平均±S. D.として示す。2つの実験のうちの1つに由来の代表的なデータを示す。

【図19A～D】図19A～Dは、N P特異的s i R N AがN Pだけでなく、MおよびN S特異的m R N A、v R N A、およびc R N Aの蓄積も阻害することを示す。M D C K(A～C)細胞およびベロ(D)細胞を、N P - 1 4 9 6でトランسفェクトし、0.1のM O IのP R 8を感染させ、感染から1時間、2時間、および3時間後にR N A单離物を回収した。N P、M、およびN Sに特異的なm R N A、c R N A、およびv R N Aのレベルを、R N A特異的プライマーを使用した逆転写およびその後のリアルタイムP C Rによって測定した。各ウイルスR N A種のレベルを、同一サンプル中の-アクチンm R N Aレベル(示さず)に正規化する。R N Aの相対レベルを示す。2つの実験のうちの1つに由来の代表的なデータを示す。

【図19E】図19G～E(各図の右側)は、P A特異的s i R N AがP Aだけでなく、MおよびN S特異的m R N A、v R N A、およびc R N Aの蓄積も阻害することを示す。M D C K細胞を、N P - 1 4 9 6でトランسفェクトし、0.1のM O IのP R 8を感染させ、感染から1時間、2時間、および3時間後にR N A单離物を回収した。P A、M、およびN Sに特異的なm R N A、c R N A、およびv R N Aのレベルを、R N A特異的プライマーを使用した逆転写およびその後のリアルタイムP C Rによって測定した。各ウイルスR N A種のレベルを、同一サンプル中の-アクチンm R N Aレベル(示さず)に正規化する。R N Aの相対レベルを示す。

【図19F】図19G～E(各図の右側)は、P A特異的s i R N AがP Aだけでなく、MおよびN S特異的m R N A、v R N A、およびc R N Aの蓄積も阻害することを示す。M D C K細胞を、N P - 1 4 9 6でトランسفェクトし、0.1のM O IのP R 8を感染させ、感染から1時間、2時間、および3時間後にR N A单離物を回収した。P A、M、およびN Sに特異的なm R N A、c R N A、およびv R N Aのレベルを、R N A特異的プライマーを使用した逆転写およびその後のリアルタイムP C Rによって測定した。各ウイルスR N A種のレベルを、同一サンプル中の-アクチンm R N Aレベル(示さず)に正規化する。R N Aの相対レベルを示す。

【図19G】図19G～E(各図の右側)は、P A特異的s i R N AがP Aだけでなく、MおよびN S特異的m R N A、v R N A、およびc R N Aの蓄積も阻害することを示す。M D C K細胞を、N P - 1 4 9 6でトランسفェクトし、0.1のM O IのP R 8を感染させ、感染から1時間、2時間、および3時間後にR N A单離物を回収した。P A、M、およびN Sに特異的なm R N A、c R N A、およびv R N Aのレベルを、R N A特異的プライマーを使用した逆転写およびその後のリアルタイムP C Rによって測定した。各ウイルスR N A種のレベルを、同一サンプル中の-アクチンm R N Aレベル(示さず)に正規化する。R N Aの相対レベルを示す。

【図19H】図19Hは、N P特異的s i R N AがP B 1(上のパネル)、P B 2(中央のパネル)、およびP A(下のパネル)特異的m R N Aの蓄積を阻害することを示す。M

10

20

30

40

50

DCK細胞を、NP-1496でトランスフェクトし、0.1のMOIのPR8を感染させ、感染から1時間、2時間、および3時間後にRNA単離物を回収した。PB1、PB2、およびPAのmRNAに特異的なmRNAのレベルを、RNA特異的プライマーを使用した逆転写およびその後のリアルタイムPCRによって測定した。各ウイルスRNA種のレベルを、同一サンプル中の-アクチンmRNAレベル(示さず)に正規化する。RNAの相対レベルを示す。

【図20】図20Aは、siRNA CD8-61およびそのヘアピン誘導性CD8-61Fの配列を示す。図20Bは、CD8-61およびCD8-61FによるCD8発現の阻害を示す。CD8⁺CD4⁺T細胞株を、エレクトロポレーションによってCD8-61またはCD8-61Fのいずれかでトランスフェクトした。CD8発現を、48時間後のフローサイトメトリーによってアッセイした。印をつけていない線は偽トランスフェクションを示す。図20Cは、CD8-61FヘアピンRNAの発現がH1RNApol IIプロモーターによって駆動される、pSLOOPIIベクターの略図を示す。Terminatorはシグナル配列の終結を示す。図20Dは、pSLOOPIIを使用したHeLa細胞中でのCD8のサイレンシングを示すプロットを示す。非トランスフェクト細胞は、CD8を発現しなかった。細胞をCD8発現ベクターおよび無プロモーターpSLOOPII-CD8-61F構築物、合成siRNA、またはプロモーターを含むpSLOOPII-CD8-61Fのいずれかでトランスフェクトした。

【図21】図21Aは、NP-1496およびGFP-949のsiRNAならびにそのヘアピン誘導体/前駆体の略図を示す。図21Bは、2つの異なる順番でのNP-1496HおよびGFP-949Hのタンデムアレイを示す。図21Cは、pSLOOPII発現ベクターを示す。siRNAのヘアピン前駆体を、pSLOOPIIベクターのみ(上)、タンデムアレイ(中央)、または独立プロモーターおよび終結配列(下)と同時にクローニングする。

【図22A】図22Aは、インフルエンザウイルスでの感染前にカチオン性ポリマーPEIと共に投与した場合にsiRNAがマウスにおけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示すプロットである。黒塗りの四角(未処理)、白抜きの四角(GFPsiRNA)、白抜きの円(30μgNPsirNA)、黒塗りの円(60μgNPsirNA)。各印は、各動物を示す。異なる群の間のp値を示す。

【図22B】図22Bは、インフルエンザウイルスでの感染前にカチオン性ポリマーPLLと共に投与した場合にsiRNAがマウスにおけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示すプロットである。黒塗りの四角(未処理)、白抜きの四角(GFPsiRNA)、黒塗りの円(60μgNPsirNA)。各印は、各動物を示す。異なる群の間のp値を示す。

【図22C】図22Cは、インフルエンザウイルスでの感染前にカチオン性ポリマーjetPEIと共に投与した場合に、PBS中で投与した場合よりも有意により有効にsiRNAがマウスにおけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示すプロットである。白抜きの四角(未処理)、白抜きの三角(PBS中のGFPsiRNA)、黒塗りの三角(PBS中のNPsirNA)、白抜きの円(jetPEIを含むGFPsiRNA)、黒塗りの円(jetPEIを含むNPsirNA)。各印は、各動物を示す。異なる群の間のp値を示す。

【図23】図23は、インフルエンザウイルスでの感染前に共に投与した場合にインフルエンザウイルスNPおよびPA転写物にターゲティングされたsiRNAがさらなる効果を示すプロットである。黒塗りの四角(未処理)、白抜きの円(60μgNPsirNA)、白抜きの三角(60μgPAsirNA)、黒塗りの円(60μgNPsirNA+60μgPAsirNA)。各印は、各動物を示す。異なる群の間のp値を示す。

【図24】図24は、インフルエンザウイルスでの感染後に投与した場合にsiRNAがマウスにおけるインフルエンザウイルス産生を阻害することを示すプロットである。黒塗りの四角(未処理)、白抜きの四角(60μgGFPsiRNA)、白抜きの三角(60μgPAsirNA)、白抜きの円(60μgNPsirNA)、黒塗りの円(60μg

10

20

30

40

50

NP + 60 μg P A s i R N A)。各印は、各動物を示す。異なる群の間のp値を示す。【図25】図25Aは、shRNAを発現するレンチウイルスベクターの略図である。shRNAの転写は、U6プロモーターによって駆動される。EGFP発現は、CMVプロモーターによって駆動される。SIN-LTR、、cPPT、およびWREは、レンチウイルス構成要素である。NP-1496shRNAの配列を示す。図25Bは、図25Bに示すレンチウイルスに感染したベロ細胞が用量依存的にEGFPを発現することを証明するフローサイトメトリーの結果のプロットを示す。NP-1496ashRNAをコードするDNAベクターおよびパッケージングベクターの293T細胞への同時トランسفエクションによってレンチウイルスを産生した。培養上清(0.25mlまたは1.0ml)を使用して、ベロ細胞を感染させた。得られたベロ細胞株(ベロ-NP-0.25およびベロ-NP-1.0)ならびにコントロール(非感染)ベロ細胞を、フローサイトメトリーによってGFP発現について分析した。ベロ-NP-0.25(図の上部)およびベロ-NP-1.0(図の下部)細胞の平均蛍光強度を示す。影をつけた曲線は、コントロール(非感染)ベロ細胞の平均蛍光強度を示す。図25Cは、NP-1496shRNAを発現するベロ細胞におけるインフルエンザウイルス産生の阻害を示すプロットである。親ベロ細胞およびNP-1496発現ベロ細胞に、0.04、0.2、および1のMOIのPR8ウイルスを感染させた。上清中のウイルス力値を、感染から48時間後に血球凝集素(HA)アッセイによって判定した。

【図26】図26は、インフルエンザウイルス転写物にターゲティングされたsiRNAを発現するDNAベクターの投与によってマウスにおけるインフルエンザウイルス産生が阻害されることを示すプロットである。60 μgのRSV、NP-1496(NP)、またはPB1-2257(PB1)shRNAをコードするDNAを、40 μlのInflasurfと混合し、点滴注入法によってマウスに投与した。未処理(NT)群について、マウスに60 μlの5%グルコースを点滴した。13時間後、マウスにPRウイルスを12000pfu/マウスで鼻腔内感染させた。感染24時間後にMDCK/血球凝集素アッセイによって肺のウイルス力値を測定した。各データポイントは1匹のマウスを示す。群間のp値を示す。

【図27A】図27Aは、siRNAとポリ-L-リジン(PLL)との間の複合体形成を検出するための電気泳動移動度シフトアッセイの結果を示す。150ngのNP-1496siRNAと漸増量のポリマー(0~1200ng)との室温で30分間の混合によって、siRNA-ポリマー複合体を形成させた。次いで、反応混合物を、4%アガロースゲルで泳動し、siRNAを臭化工チジウム染色を使用して視覚化した。

【図27B】図27Bは、siRNAとポリ-L-アルギニン(PLA)との間の複合体形成を検出するための電気泳動移動度シフトアッセイの結果を示す。150ngのNP-1496siRNAと漸増量のポリマー(0~1200ng)との室温で30分間の混合によって、siRNA-ポリマー複合体を形成させた。次いで、反応混合物を、4%アガロースゲルで泳動し、siRNAを臭化工チジウム染色を使用して視覚化した。

【図28A】図28Aは、siRNA/PLL複合体の細胞傷害性を示すプロットである。96ウェルプレート中のベロ細胞を、siRNA(400pmol)/ポリマー複合体で6時間処理した。次いで、ポリマー含有培地を、DMEM-10%FCSと交換した。24時間後にMTTアッセイの使用によって細胞の代謝活性を測定した。四角=PLL(分子量約8K)、円=PLL(分子量約42K)、黒塗りの四角=25%、白抜きの三角=50%、黒塗りの三角=75%、X=95%。三つ組みの平均としてデータを示す。

【図28B】図28Bは、siRNA/PLA複合体の細胞傷害性を示すプロットである。96ウェルプレート中のベロ細胞を、siRNA(400pmol)/ポリマー複合体で6時間処理した。次いで、ポリマー含有培地を、DMEM-10%FCSと交換した。24時間後にMTTアッセイの使用によって細胞の代謝活性を測定した。三つ組みの平均としてデータを示す。

【図29A】図29Aは、PLLがsiRNAの細胞取り込みを刺激することを示すプロットである。24ウェルプレート中のベロ細胞を、リポフェクタミン+siRNA(40

10

20

30

40

50

0 p m o l) または s i R N A (4 0 0 p m o l) / ポリマー複合体と 6 時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、0.04 の M O I の P R 8 ウィルスを感染させた。異なる感染時点での培養上清中のウイルス力値を、H A アッセイによって測定した。ポリマー : s i R N A 比を示す。白抜きの円 = 未処理、黒塗りの四角 = リポフェクタミン、黒塗りの三角 = P L L (分子量約 4 2 K) 、白塗りの三角 = P L L (分子量約 8 K) 。

【図 29 B】図 29 B は、ポリ - L - アルギニンが s i R N A の細胞取り込みを刺激することを示すプロットである。24 ウェルプレート中のベロ細胞を、s i R N A (4 0 0 p m o l) / ポリマー複合体と 6 時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、0.04 の M O I の P R 8 ウィルスを感染させた。異なる感染時点での培養上清中のウイルス力値を、H A アッセイによって測定した。ポリマー : s i R N A 比を示す。0, 25%、50%、75%、および 95% は、イミダゾールアセチル基に置換した P L L 上の - アミノ基の割合をいう。黒塗りの円 = 非トランスフェクション、白抜きの円 = リポフェクタミン、白抜きおよび黒塗りの四角 = 0% および 25% (0% と 25% のデータポイントは同一であることに留意のこと) 、黒塗りの三角 = 50% 、白抜きの三角 = 75% 、X = 95% 。

10

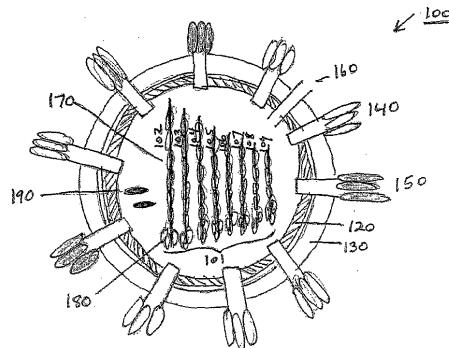


FIGURE 1A

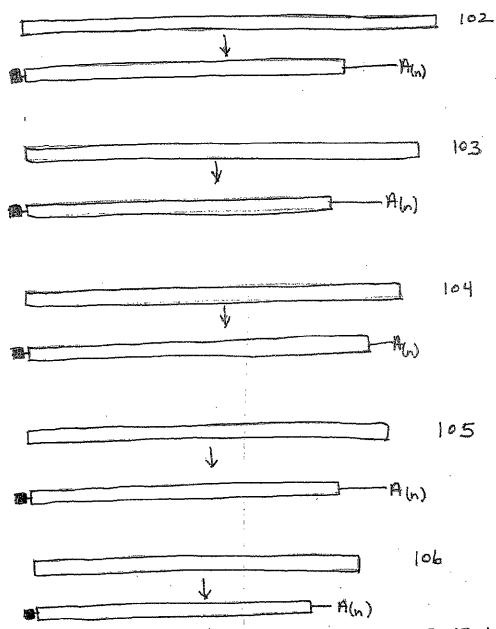
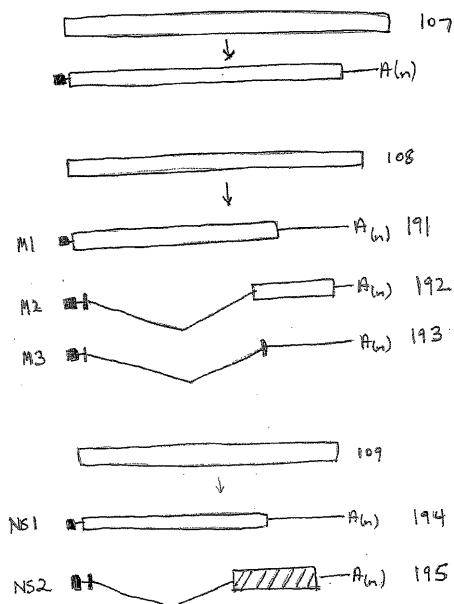


FIGURE 1B-1



【図2】

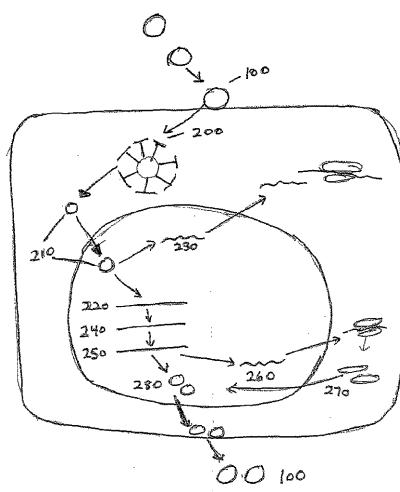


FIGURE 2

【図3】

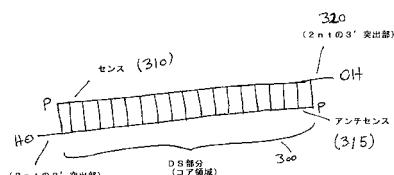


FIGURE 3

【図4】

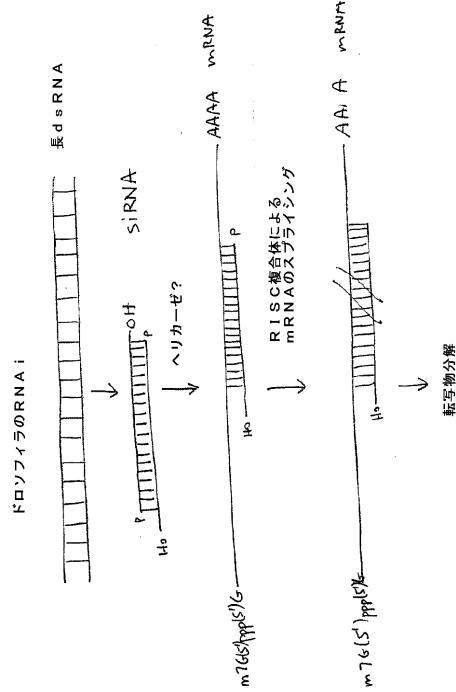
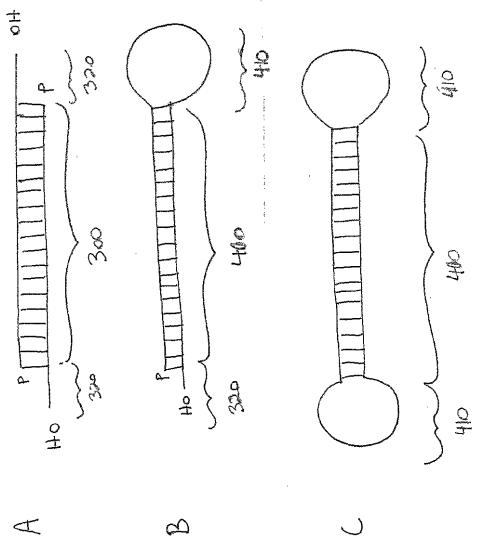


FIGURE 4

【 図 5 】



【 四 6 】

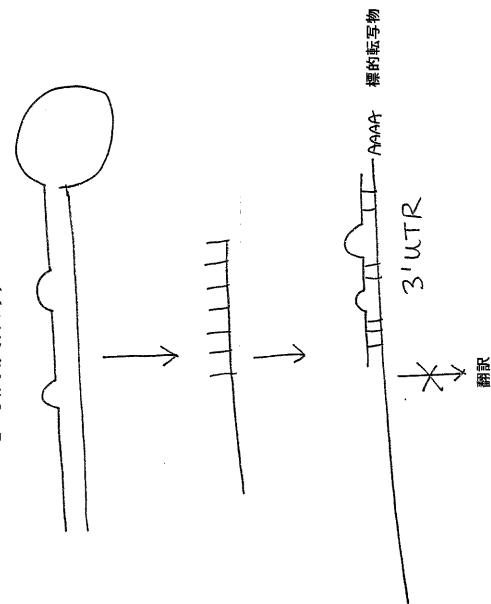
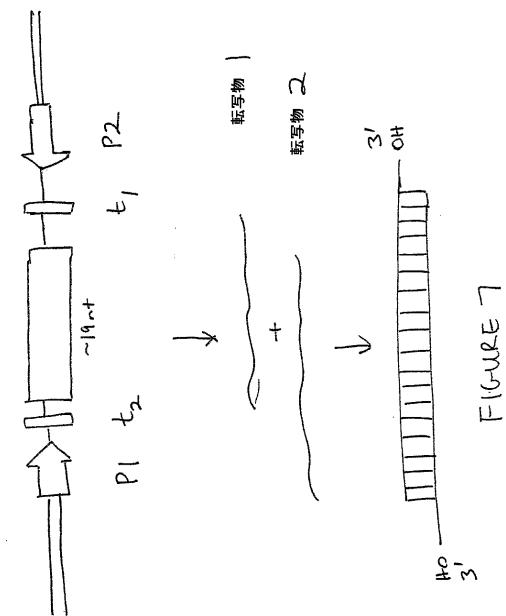


FIGURE 5

【図7】



【 図 8 】

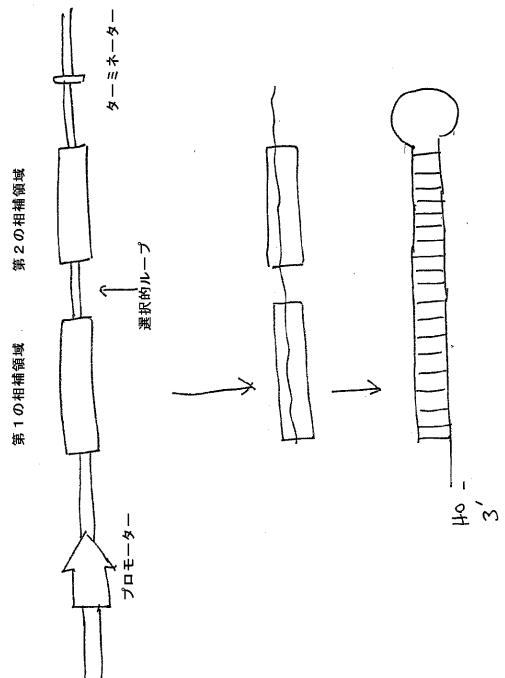


FIGURE 8

【 図 1 0 - 7 】

| | |
|------------|---|
| X17336/- | CTTCTCTACACATCGATCGAATGAGTAGTGTGCGAATGCTACTATATTGTGCTAT |
| M18150/- | CTTCTCTACACATCGATCGAATGAGTAGTGTGCGAATGCTACTATATTGTGCTAT |
| AF156457/- | CTTCTCTACACATCGATCGAATGAGTAGTGTGCGAATGCTACTATATTGTGCTAT |
| M26087/- | CTTCTCTACACATCGATCGAATGAGTAGTGTGCGAATGCTACTATATTGTGCTAT |
| M20588/- | CTTCTCTACACATCGATCGAATGAGTAGTGTGCGAATGCTACTATATTGTGCTAT |
| BB22820/- | CTTCTCTACACATCGATCGAATGAGTAGTGTGCGAATGCTACTATATTGTGCTAT |
| | C----- |

| | | |
|-------------|--|-------------|
| NC_002022/- | CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- | 配列番号 : 127) |
| X11736/- | CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- | 配列番号 : 128) |
| M21850/- | CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- | 配列番号 : 129) |
| AF25757/- | CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- | 配列番号 : 130) |
| M26087/- | CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- | 配列番号 : 131) |
| M26088/- | CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- | 配列番号 : 132) |
| AF22820/- | CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- CCATACGTGCCAAAAGTACCTGTGTTCTACT- | 配列番号 : 133) |

【図11A】

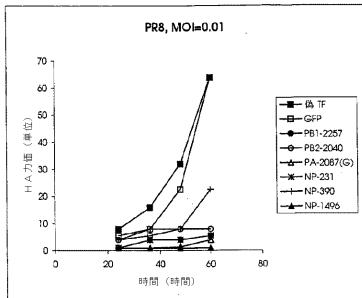


FIGURE 11A

【 図 1 1 B 】

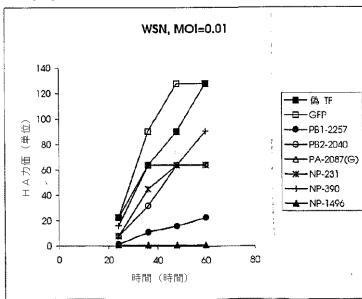
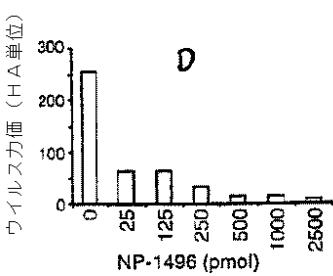
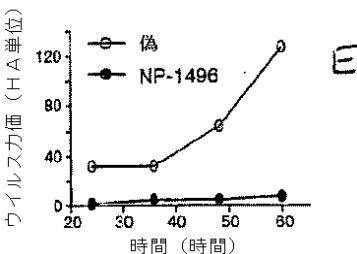


FIGURE 11B

【 図 1 1 D 】

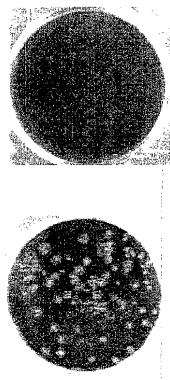


【 図 1 1 E 】



【 図 1 1 C 】

NP-1496 si RNAによる
インフルエンザウイルス複製の強力を阻害



| 相違倍率 | NP-1496 siRNA 2.5 nmole | 3x10 ⁴ |
|-----------|----------------------------|--------------------------|
| MOI=0.001 | 6x10 ⁵ PFU/ml | <20 PFU/ml |
| MOI=0.1 | 1x10 ⁶ PFU/ml | 5x10 ³ PFU/ml |
| | | 2x10 ³ |

FIGURE 11C

【 図 1 2 】

Figure 12

【図 1 3】

インフルエンザAウイルス産生に対する
siRNAの阻害効果のまとめ

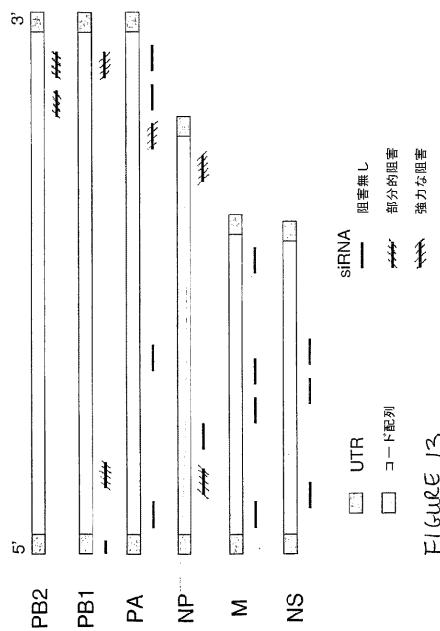


Figure 1-3

【図 1 4 A】

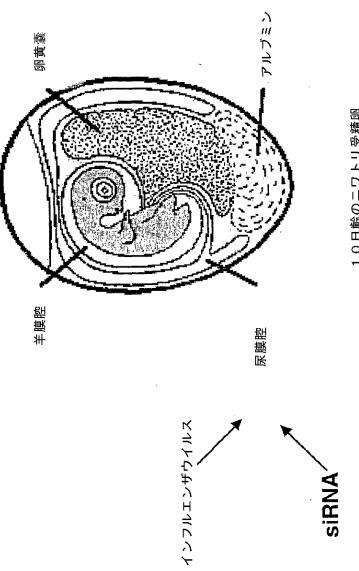


Figure 1-4 A

【図 1 4 B】

ニワトリ胚におけるインフルエンザA複製の阻害

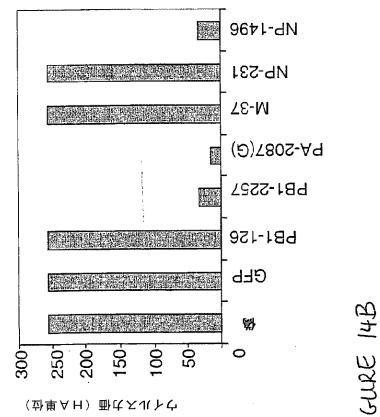
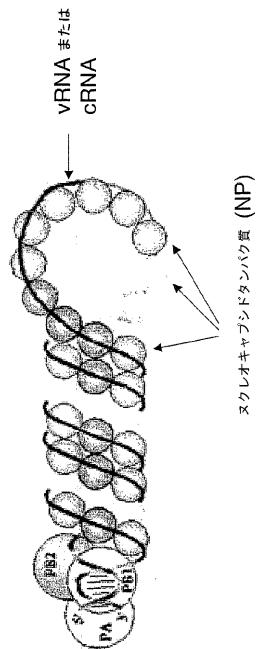


Figure 1-4 B

【図 1 5】

ウイルス複製に重要なRNA結合タンパク質



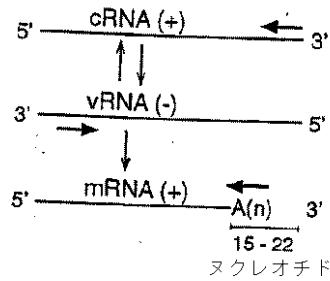
スクリオキヤフシドタンパク質 (NP)

Figure 1-5

【 义 1 6 A 】

【 図 1 6 B 】

Figure 16A



インフルエンザウイルスビリオンRNA (vRNA)、mRNA、および全長cRNAまたはテンブレートRNAの図

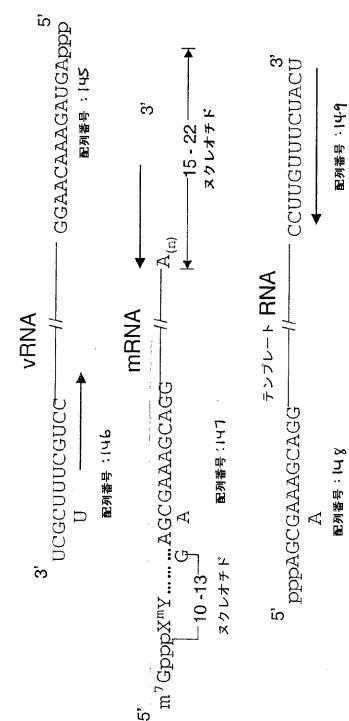


FIGURE 16B

【 図 17 】

【 図 1 8 】

NPs i RNAは非常に初期のウイルス複製に干渉する

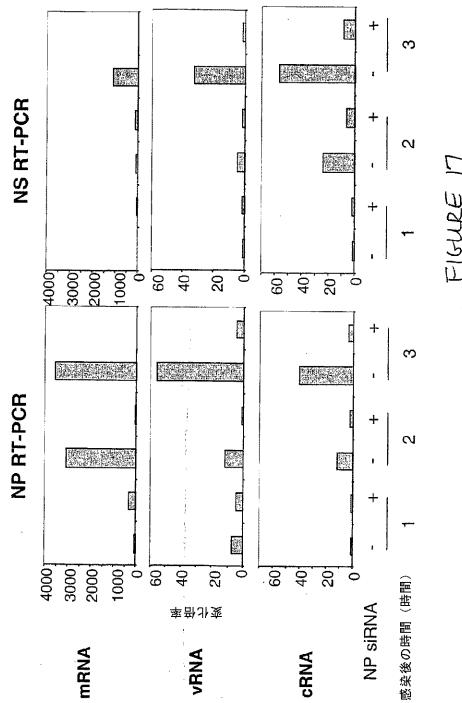
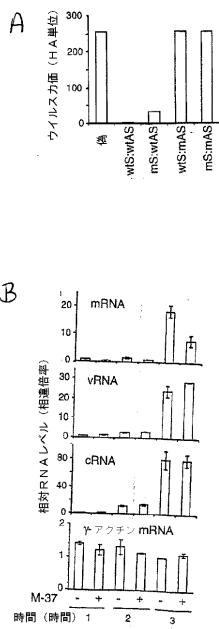


Figure 18



【図 19 A - D】

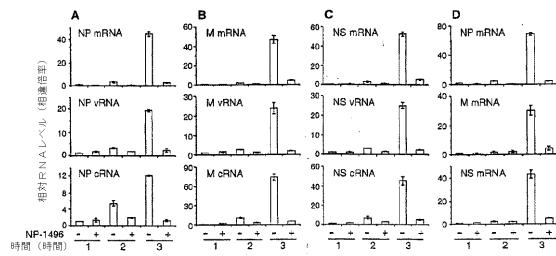


Figure 19 A-D

【図 19 E】

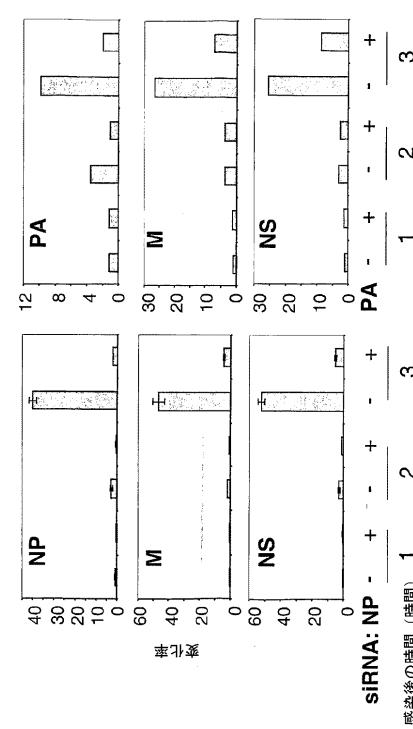


Figure 19 E

NPおよびPA siRNAは
ウイルスmRNA転写を干渉する

【図 19 F】

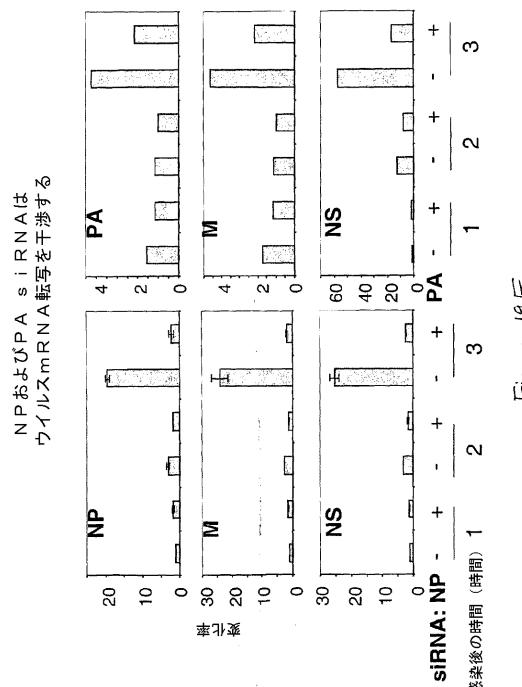


Figure 19 F

【図 19 G】

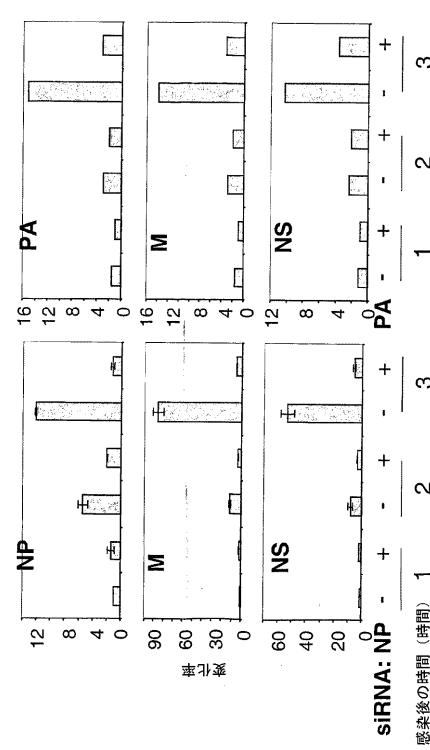


Figure 19 G

NPおよびPA siRNAは
ウイルスmRNA転写を干渉する

NPおよびPA siRNAは
ウイルスmRNA転写を干渉する

【図 19 H】

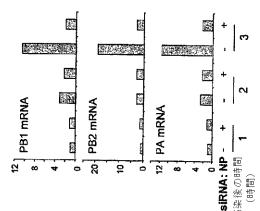


Figure 19H

【図 20】

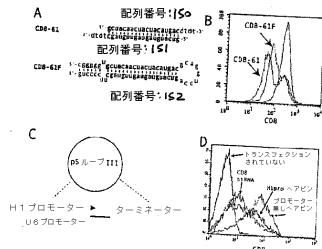
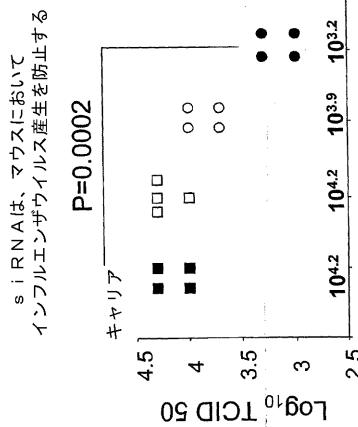


Figure 20

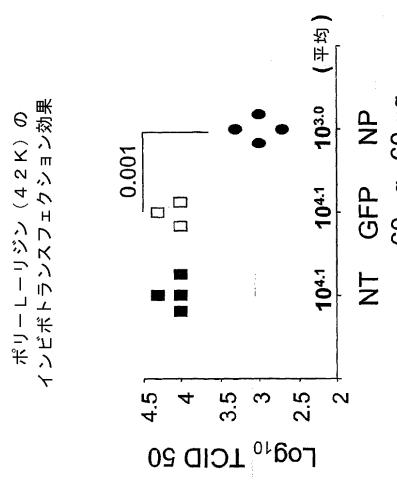
【図 22 A】



siRNA + 3 h PR8, i.n. 2k pfu/マウス → 肺ホモジネート → MDCK HAアッセイ

Figure 22A

【図 22 B】

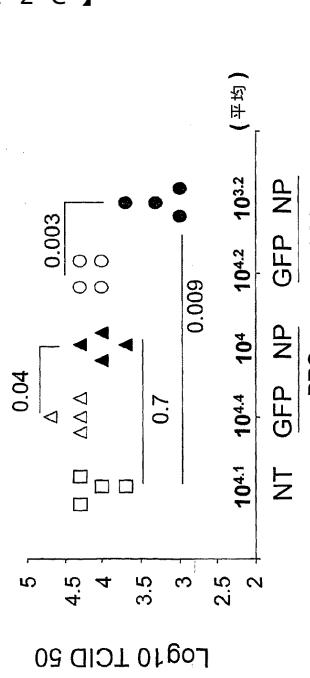


ポリ-レーリング (42K) の
インビットransフェクション効果

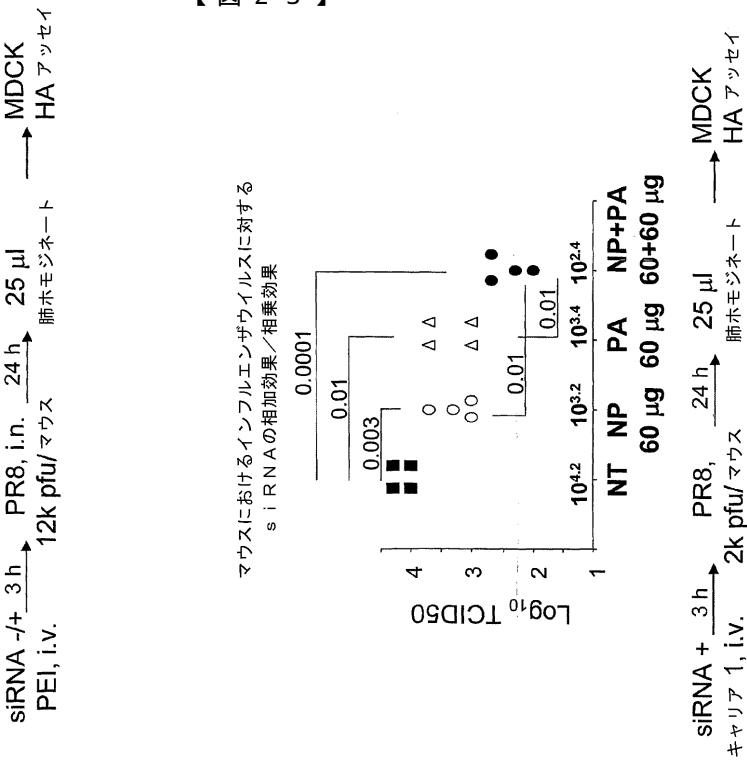
siRNA + 3 h PR8, i.n. 24 h 12k pfu/マウス → 肺ホモジネート → MDCK HAアッセイ

【図 2 2 C】

siRNAはインビットでの
インフルエンザウイルス産生を防止する



【図 2 3】



【図 2 4】

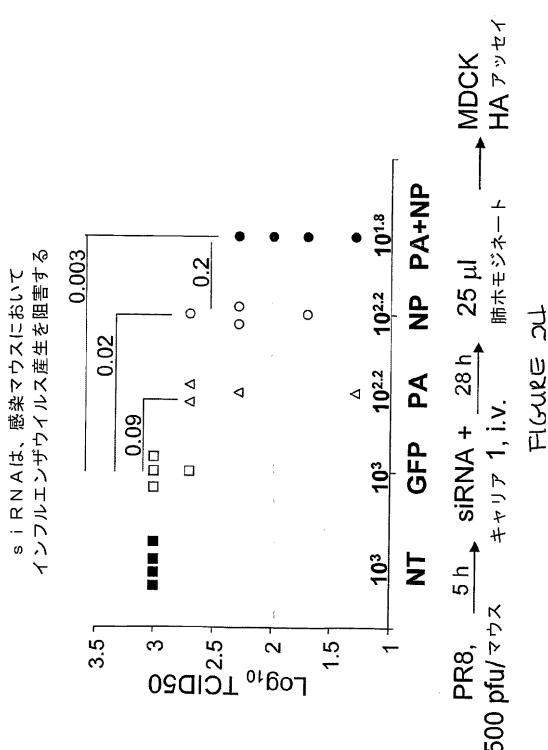


FIGURE 24

【図 2 5】

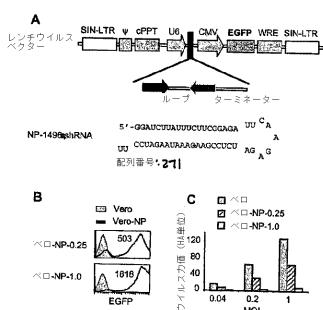


FIGURE 25

【図 2 6】

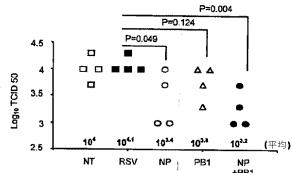


FIGURE 26

【図 27 A】

ポリ-L-リジンを使用した
siRNAの電気泳動の遅延

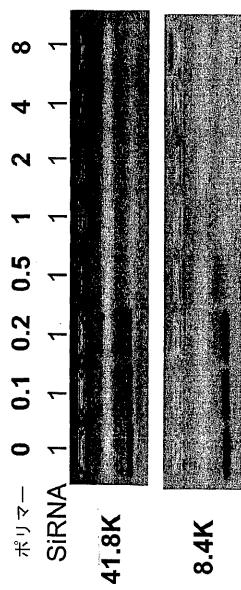


Figure 27A

【図 27 B】

ポリ-L-アルギニンを使用した
siRNAの電気泳動の遅延

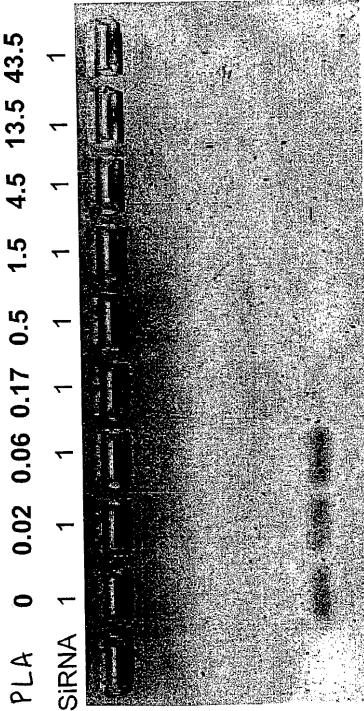


Figure 27B

【図 28 A】

異なる分子量でのポリ-L-リジンの比較

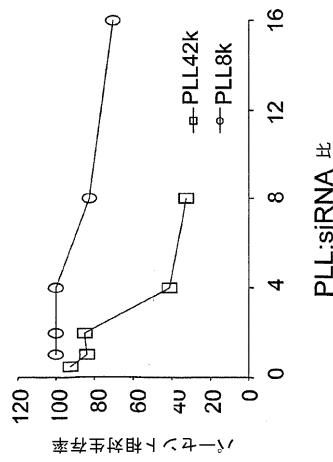


Figure 28A

【図 28 B】

ポリ-L-アルギニンのインビトロ細胞傷害性

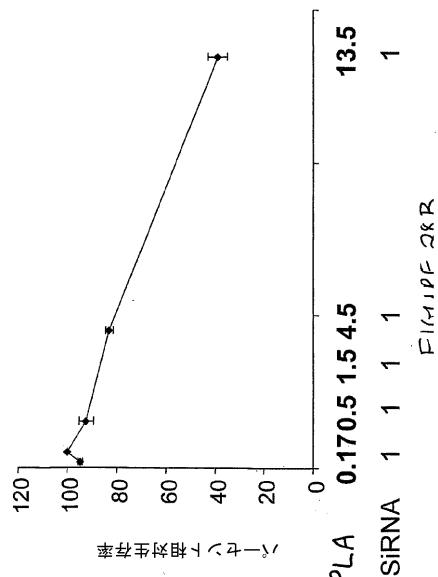
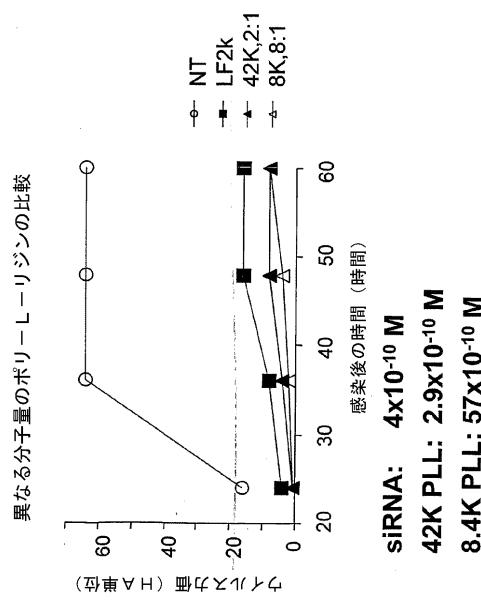
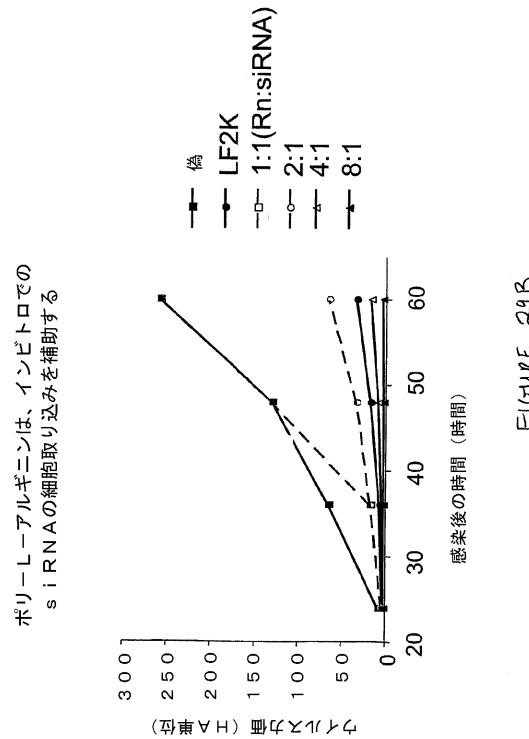


Figure 28B

【図29A】



【図29B】



フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 P 31/16 (2006.01) | A 6 1 P 31/16 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K 9/12 (2006.01) | A 6 1 K 9/12 | |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 | A |
| A 0 1 K 67/027 (2006.01) | A 0 1 K 67/027 | |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 | A |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 | |

(81)指定国 AP(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,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,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 チェン, チアンツ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルックリン, スターンズ ロード 17
, アパートメントナンバー6

(72)発明者 エイゼン, ハーマン エヌ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02468, ワバン, ホームステッド ストリート 9

(72)発明者 ジエ, チン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02140, ケンブリッジ, ハーベイ ストリート 5
5, アパートメント 1アール

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA11 DA01 DA02 DA05 DA11 EA02 GA11 HA11

4B063 QA18 QQ08 QQ52 QR35 QR40 QR77 QS38

4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 BA02 CA23 CA44 CA46

4C076 AA11 AA93 BB13 BB25 CC31

4C084 AA13 MA13 MA16 MA59 MA66 NA14 ZB33

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA13 MA16 MA59 MA66 NA14

ZB33