

(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2005-508306
(P2005-508306A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int.Cl.⁷

A61P 43/00
A01K 67/027
A61K 31/7088
A61K 48/00
C12Q 1/68

F 1

A 61 P 43/00 105
 A 01 K 67/027
 A 61 K 31/7088 Z N A
 A 61 K 48/00
 C 12 Q 1/68 Z

テーマコード(参考)

4 B 02 4
 4 B 06 3
 4 C 08 4
 4 C 08 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-515539 (P2003-515539)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月19日 (2002.7.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年1月23日 (2004.1.23)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2002/022869
 (87) 國際公開番号 WO2003/010180
 (87) 國際公開日 平成15年2月6日 (2003.2.6)
 (31) 優先権主張番号 60/307,411
 (32) 優先日 平成13年7月23日 (2001.7.23)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/360,664
 (32) 優先日 平成14年2月27日 (2002.2.27)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (81) 指定国 EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,
 ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),AU,CA,J
 P

(71) 出願人 503174475
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
 ザ リーランド スタンフォード ジュ
 ニア ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ
 アルト エル カミノ リアル 170
 5
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳類における遺伝子発現のRNAiによる阻害に関する方法および組成物

(57) 【要約】

哺乳類においてコード配列の発現を調節する(例えば減少させる)方法および組成物を提供する。本方法において、RNAi物質、例えば、干渉リボ核酸(siRNAもしくはshRNAなど)またはその転写録型、例えばshRNAをコードするDNAを、例えば流体力学投与プロトコールによって胚以外の哺乳類に投与する。同様に、本発明の方法において用いられるRNAi物質薬学的調製物も提供される。本発明の方法および組成物は、学術的および治療的応用を含む、多様な異なる応用における用途を見出す。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下を含む、胚以外の哺乳類の標的細胞においてコード配列の発現を減少させる方法：
該コード配列の発現を減少させるために、該コード配列に特異的なRNAi物質の有効量を該哺乳類に投与する段階。

【請求項 2】

RNAi物質が干渉リボ核酸である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

干渉リボ核酸がsiRNAである、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

干渉リボ核酸がshRNAである、請求項2記載の方法。

【請求項 5】

RNAi物質が干渉リボ核酸の転写録型である、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

転写録型がデオキシリボ核酸である、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

デオキシリボ核酸がshRNAをコードする、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

胚以外の哺乳類が成体である、請求項8記載の方法。

【請求項 9】

胚以外の哺乳類が幼若体である、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

RNAi物質が胚以外の哺乳類に流体力学的に投与される、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

RNAi物質がRNアーゼ阻害剤と共に胚以外の哺乳類に流体力学的に投与される、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

薬学的に許容される輸送媒体においてRNAi物質を含む薬学的調製物。

【請求項 13】

調製物がRNアーゼ阻害剤をさらに含む、請求項12記載の薬学的調製物。

【請求項 14】

以下を含む、請求項1記載の方法の実践において用いるためのキット：

- (a) 薬学的に許容される輸送媒体においてRNAi物質を含む薬学的調製物；および
- (b) 請求項1記載の方法を実践するための説明書。

【請求項 15】

キットがRNアーゼ阻害剤をさらに含む、請求項14記載のキット。

【請求項 16】

RNAi物質を含む胚以外の非ヒト動物。

【請求項 17】

請求項1記載の方法に従って產生された胚以外の非ヒト動物。

【請求項 18】

以下を含む、脈管を有する多細胞生物の標的細胞にリボ核酸を導入するための方法：
該脈管を有する多細胞生物の該標的細胞に該リボ核酸を導入するために、該生物の脈管系に該リボ核酸を裸のリボ核酸として投与する段階。

【請求項 19】

投与が静脈内である、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

脈管を有する多細胞生物が哺乳類である、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

標的細胞が肝細胞である、請求項18記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

RNアーゼ阻害剤を投与する段階をさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項 2 3】

生物に競合リボ核酸を投与する段階をさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項 2 4】

以下を含む、脈管を有する多細胞生物の標的細胞に核酸を導入するための方法：

該核酸を該標的細胞に導入するために、裸の核酸としての該核酸およびRNアーゼ阻害剤を含む水性製剤を、該脈管を有する多細胞生物に流体力学的に投与する段階。

【請求項 2 5】

核酸がデオキシリボ核酸である、請求項24記載の方法。 10

【請求項 2 6】

核酸がリボ核酸である、請求項24記載の方法。

【請求項 2 7】

水性製剤が競合リボ核酸をさらに含む、請求項24記載の方法。

【請求項 2 8】

以下を含む、脈管を有する多細胞生物の標的細胞への核酸の輸送に用いるためのキット：裸の核酸として存在する該核酸；および

RNアーゼ阻害剤。

【請求項 2 9】

核酸がデオキシリボ核酸である、請求項28記載のキット。 20

【請求項 3 0】

核酸がリボ核酸である、請求項28記載のキット。

【請求項 3 1】

キットが、多細胞生物の脈管系に製剤を導入するための説明書をさらに含む、請求項28記載のキット。

【請求項 3 2】

キットが競合リボ核酸をさらに含む、請求項28記載のキット。

【請求項 3 3】

キットが水性製剤を血管内に投与する手段をさらに含む、請求項28記載のキット。

【請求項 3 4】

以下を含む、RNAウイルス候補調節物質の活性を決定する方法：

(1) 脈管を有する多細胞動物に流体力学的に以下を投与する段階：

(a) 以下のいずれかを含む核酸構築物：

(i) レポーター要素に機能的に結合した該RNAウイルスの少なくとも一つの調節要素を含むRNA分子；または

(ii) 該RNA分子に転写されうるDNA分子；および

(b) 該候補調節物質；ならびに

(2) 該構築物の活性に及ぼす該調節物質の影響を観察することにより、該候補調節物質の活性を決定する段階。

【請求項 3 5】

核酸法がRNアーゼ阻害剤を流体力学的に投与する段階をさらに含む、請求項34記載の方法 40

。

【請求項 3 6】

競合RNAを流体力学的に投与する段階をさらに含む、請求項34記載の方法。

【請求項 3 7】

RNAウイルスがHCVである、請求項34記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

関連出願の相互参照

米国法第35章119(e) 項に従って、本出願は、その開示が参照として本明細書に組み入れられる、2001年7月23日に提出された米国特許仮出願第60/307,411号および2002年2月27日に提出された米国特許仮出願第60/360,664号の提出日に対する優先権を主張する。

【 0 0 0 2 】

発明の分野

本発明の分野はRNAiである。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

発明の背景

二本鎖RNAは、RNA干渉(RNAi)または転写後遺伝子沈黙化(PTGS)と呼ばれるプロセスを通して強力かつ特異的な遺伝子沈黙化を誘導する。RNAiは、沈黙化誘因物質と相同なメッセンジャーRNAを破壊する配列特異的多成分スクレアーゼであるRNA誘導沈黙化複合体(RISC)によって媒介される。RISCは、二本鎖RNA誘因物質に由来する短いRNA(約22スクレオチド)を含むことが知られている。10

【 0 0 0 4 】

RNAiは、シード・エレガンス(*C. elegans*)、ショウジョウバエ、真菌、植物、および哺乳類細胞株さえも含む多数の系において機能喪失を調べるために選択される方法となった。大きいdsRNA(>30 bp)はインターフェロン反応を誘発して、非特異的遺伝子沈黙化を引き起こすことから、ほとんどの哺乳類細胞株において遺伝子を特異的に沈黙化する場合には、小さい干渉RNA(siRNA)が用いられている。20

【 0 0 0 5 】

今まで、本発明の出願人の知る限り、胚以外の哺乳類生物へのRNAi技術の適用に成功したという報告はない。RNAiが胚以外の哺乳類生物において作用することが証明されれば、研究および治療応用を含むRNAi技術に関する多くの重要なさらなる適応が提供され、したがって非常に興味深い。20

【 0 0 0 6 】

関連文献

国際公開公報第01/68836号。同様に、Bernsteinら、RNA(2001)7:1509~1521; Bernsteinら、Nature(2001)409:363~366; Billyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2001)98:14428~33; Caplanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2001)98:9742~7; Carthewら、Curr. Opin. Cell Biol.(2001)13:244~8; Elbashirら、Nature(2001)411:494~498; Hammondら、Science(2001)293:1146~50; Hammondら、Nat. Ref. Genet.(2001)2:110~119; Hammondら、Nature(2000)404:293~296; McCaffreyら、Nature(2002)418:38~39; およびMcCaffreyら、Mol. Ther.(2002)5:676~684; Paddisonら、Genes Dev.(2002)16:948~958; Paddisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2002)99:1443~48; Suiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2002)99:5515~20も参照されたい。30

【 0 0 0 7 】

関心対象の米国特許には、第5,985,847号および第5,922,687号が含まれる。同様に国際公開公報第11092号も関心対象である。さらに関心対象の参考文献には: Acsadiら、New Biol.(1991年1月)3:71~81; Changら、J. Virol.(2001)75:3469~3473; Hickmanら、Hum. Gen. Ther.(1994)5:1477~1483; Liuら、Gene Ther.(1999)6:1258~1266; Wolffら、Science(1990)247:1465~1468; およびZhangら、Hum. Gene Ther.(1999)10:1735~1737; およびZhangら、Gene Ther.(1999)7:1344~1349が含まれる。40

【 発明の開示 】

【 0 0 0 8 】

発明の概要

哺乳類においてコード配列の発現を調節する(例えば減少させる)方法および組成物を提供する。本発明の方法において、RNAi物質、例えば、干渉リボ核酸(siRNAもしくはshRNAのような)またはその転写録型、例えばshRNAをコードするDNAを、例えば流体力学投与プロトコールによって胚以外の哺乳類に投与する。同様に、本発明の方法において用いられ50

るRNAi物質の薬学的調製物も提供される。本発明の方法および組成物は、学術的および治療的応用を含む、多様な異なる応用における用途を見出す。

【0009】

定義

便宜上、明細書、実施例、および添付の請求の範囲において用いる特定の用語をここに集める。

【0010】

本明細書において用いられるように、「ベクター」という用語は、それが結合しているもう一つの核酸を輸送することができる核酸分子を意味する。一つのタイプのベクターは、ゲノムに組み込まれたベクター、または「組み込み型ベクター」であり、これは宿主細胞の染色体DNAの中に組み込まれる。もう一つのタイプのベクターは、エピゾームベクター、すなわち適当な宿主、例えば真核または原核宿主細胞において染色体外複製を行うことができる核酸である。機能的に結合される遺伝子の発現を指示することができるベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ぶ。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、本文が特に明記していない限り互換的に用いられる。10

【0011】

本明細書において用いられるように、「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸（DNA）および適当であればリボ核酸（RNA）のようなポリヌクレオチドを意味する。この用語にはまた、記述の態様に適応可能であるように、一本鎖（センスまたはアンチセンス）および二本鎖ポリヌクレオチドが含まれると理解すべきである。20

【0012】

本明細書において用いられるように、「遺伝子」または「組み換え型遺伝子」という用語は、エキソンと（選択的に）イントロン配列の双方を含む、本発明のポリペプチドをコードするオーブンリーディングフレームを含む核酸を意味する。「組み換え型遺伝子」とは、選択的に染色体DNAに由来するイントロン配列を含んでもよい、そのような調節ポリペプチドをコードする核酸を意味する。「イントロン」という用語は、タンパク質に翻訳されないが、一般的にエキソンのあいだに認められる所定の遺伝子に存在するDNA配列を意味する。本明細書において用いられるように、「トランスフェクション」という用語は、核酸、例えば発現ベクターを核酸媒介遺伝子移入によってレシピエント細胞に導入することを意味する。30

【0013】

「タンパク質コード配列」または特定のポリペプチドもしくはペプチドを「コードする」配列は、適当な調節配列の制御下に置かれた場合にインビトロまたはインビボで転写されて（DNAの場合）、ポリペプチドに翻訳される（mRNAの場合）核酸配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端での開始コドンと3'（カルボキシ）末端での翻訳終了コドンによって定義される。コード配列には、原核または真核細胞mRNAからのcDNA、原核または真核細胞DNAからのゲノムDNA配列、および合成DNA配列までもが含まれるがこれらに限定されない。転写終了配列は通常、コード配列の3'側に存在するであろう。

【0014】

同様に、その文脈から明確である場合を除き、「コードする」とは、用語が典型的に用いられるように、ポリペプチドをコードするDNA配列のみならず、阻害アンチセンス分子へと転写されるDNA配列が含まれることを意味するであろう。40

【0015】

「機能喪失」という用語は、本発明のRNAi法によって阻害される遺伝子を指す場合、RNAi物質の非存在下でのレベルと比較して遺伝子の発現レベルの減少を指す。

【0016】

遺伝子の配列に関する「発現」という用語は、遺伝子の転写を指し、適当であれば、得られたmRNA転写物のタンパク質への翻訳を指す。このように、本文から明確であるように、タンパク質コード配列の発現は、コード配列の転写および翻訳に帰因する。

【0017】

50

20

30

40

50

「細胞」、「宿主細胞」、または「組み換え型宿主細胞」は、本明細書において互換的に用いられる用語である。そのような用語は、特定の本発明の細胞のみならず、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫を指すと理解される。変異または環境の影響のいずれかにより、その後の世代に特定の改変が起こる可能性があるため、そのような子孫は実際には、親細胞と同一でない可能性があるが、それでもなお本明細書において用いられる用語の範囲内に含まれるであろう。

【0018】

「組み換え型ウイルス」とは、例えば、異種核酸構築物の粒子への付加、または挿入によって遺伝的に変化しているウイルスを意味する。

【0019】

本明細書において用いられるように、「形質導入」および「トランスフェクション」という用語は当技術分野において認識されており、核酸、例えば発現ベクターを核酸媒介遺伝子移入によってレシピエント細胞に導入することを意味する。本明細書において用いられるように、「形質転換」とは、外因性のDNAまたはRNAの細胞の取り込みの結果として細胞の遺伝子型が変化するプロセスを意味し、例えば形質転換細胞はdsRNA構築物を発現する。

【0020】

「一過性のトランスフェクション」は、外因性のDNAまたはRNAがトランスフェクトした細胞のゲノムに組み入れられない、例えばエピソームDNAがmRNAに転写されてタンパク質に翻訳される場合を指す。

【0021】

細胞は、核酸構築物が娘細胞によって遺伝されうる場合に、核酸構築物によって「安定にトランスフェクト」されている。

【0022】

本明細書において用いられるように、「レポーター遺伝子構築物」は、少なくとも一つの転写調節配列に機能的に結合した「レポーター遺伝子」を含む核酸である。レポーター遺伝子の転写は、結合しているこれらの配列によって制御される。少なくとも一つまたは複数のこれらの制御配列の活性は、標的受容体タンパク質によって直接または間接的に調節されうる。例としての転写制御配列はプロモーター配列である。レポーター遺伝子には、細胞において異種発現されるプロモーター-レポーター遺伝子構築物が含まれることを意味する。

【0023】

本明細書において用いられるように、「形質転換細胞」は、拘束されない増殖状態に自然変換した細胞、すなわちそれらが培養において無限分裂回数の増殖能を獲得したことを指す。形質転換細胞は、その増殖制御の喪失に関して新生物、未分化、または過形成のような用語によって特徴が示される可能性がある。本発明の目的に関して、「悪性哺乳類細胞の形質転換表現型」および「形質転換表現型」は、哺乳類細胞の細胞形質転換に関連した以下の任意の表現型形質を含むがこれらに限定されないことを意図する：細胞培養における持続的な増殖、半固体培地における増殖、または免疫不全もしくは同系動物における腫瘍形成増殖によって検出される、不死化、形態学的または増殖形質転換、および腫瘍形成性。

【0024】

本明細書において用いられるように、「増殖する」および「増殖」は、細胞分裂を受ける細胞を意味する。

【0025】

本明細書において用いられるように、「不死化細胞」は、化学、合成、および／または組み換え手段によって、細胞が培養における無限分裂回数増殖能を有するように変化している細胞を意味する。

【0026】

細胞の「増殖状態」は、細胞の増殖速度および細胞の分化状態を指す。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

「遺伝子発現の阻害」は、標的遺伝子からのタンパク質および／またはmRNA産物のレベルが存在しないこと（または認められないほど減少すること）を指す。「特異性」は、細胞の他の遺伝子に明白な影響を及ぼすことなく、標的遺伝子を阻害できることである。阻害の結果は、細胞もしくは生物の顕著な特性を調べることによって（下記の実施例において示すように）、またはRNA溶液ハイブリダイゼーション、スクレアーゼ保護、ノーザンハイブリダイゼーション、逆転写、マイクロアレイによる遺伝子発現のモニタリング、抗体結合、酵素結合免疫吸着アッセイ法（ELISA）、ウェスタンプローティング、放射免疫アッセイ法（RIA）、他の免疫アッセイ法、および蛍光活性化細胞分析（FACS）のような生化学技術によって確認することができる。細胞株または生物全体におけるRNA媒介阻害の場合、遺伝子発現は、そのタンパク質産物が容易にアッセイされるレポーターまたは薬物耐性遺伝子を用いることによって簡単にアッセイされる。そのようなレポーター遺伝子には、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（AHAS）、アルカリホスファターゼ（AP）、 β -ガラクトシダーゼ（LacZ）、 β -グルクロニダーゼ（GUS）、クロラムフェニコールアセチルトランスクレラーゼ（CAT）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ルシフェラーゼ（Luc）、ノバリンシンターゼ（NOS）、オクトピンシンターゼ（OCS）、およびその誘導体が含まれ、アンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ヒグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メソトレキセト、ホスフィノスリシン、ピューロマイシン、およびテトラサイクリンに対して抵抗性を付与する多数の選択マーカーが利用可能である。

10

20

30

40

【 0 0 2 8 】

アッセイ法に応じて、遺伝子発現量を定量することにより、本発明に従って処置していない細胞と比較して10%、33%、50%、90%、95%、または99%以上である阻害の程度を決定することができる。投与した活性物質の用量がより低く、そして活性物質の投与後の期間がより長ければ、より小さい分画の細胞に阻害が起こる可能性がある（例えば、標的細胞の少なくとも10%、20%、50%、75%、90%、または95%）。細胞における遺伝子発現の定量は、標的mRNAの蓄積または標的タンパク質の翻訳レベルで同様の量の阻害を示す可能性がある。例として、阻害効率は、細胞における遺伝子産物の量を評価することによって決定してもよい：mRNAを、阻害二本鎖RNAに関して用いられる領域の外側のスクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって検出してもよく、または翻訳されたポリペプチドを、その領域のポリペプチド配列に対する抗体によって検出してもよい。

【 0 0 2 9 】**特定の態様の説明**

哺乳類においてコード配列の発現を調節する（例えば減少させる）方法および組成物を提供する。本発明の方法において、RNAi物質、例えば干渉リボ核酸（siRNAまたはshRNAのような）またはその転写録型、例えばshRNAをコードするDNAの有効量を胚以外の哺乳類に、例えば流体力学プロトコールによって投与する。同様に、本発明の方法において用いられるRNAi物質薬学的調製物も提供される。本発明の方法および組成物は、学術的および治療的応用を含む、多様な異なる応用における用途を見出す。

【 0 0 3 0 】

本発明を詳しく説明する前に、本発明は、特定の態様の変更を行ってもよく、それらもなおも添付の請求の範囲内に含まれるため、下記の本発明の特定の態様に限定されないと理解すべきである。同様に、用いた用語は、特定の態様を説明する目的のためであって、制限的に解釈してはならないと理解すべきである。本発明の範囲は添付の請求の範囲によって確立されるであろう。

【 0 0 3 1 】

本明細書および添付の請求の範囲において、単数形「一つ」、「一つ（an）」、および「その」は本文が特に明記していない限り複数形が含まれる。特に明記していない限り、本明細書において用いた技術および化学用語は全て、本発明が属する当業者に一般的に理解

50

される意味と同じ意味を有する。

【0032】

値の範囲が提供される場合、特に明記していない限り、その範囲の上限と下限のあいだの、下限の単位の10分の1までのそれぞれの介在値、および他の任意の記述の値またはその記述の範囲における介在値が、本発明に含まれると理解すべきである。これらのより小さい範囲の上限および下限は、独立して小さい範囲に含まれてもよく、記述の範囲において特に除外された任意の限界に従って、同様に本発明に含まれる。記述範囲が限界の一つまたは双方を含む場合、それらの含まれる限界のいずれかまたは双方を除外する範囲も同様に本発明に含まれる。

【0033】

特に明記していない限り、本明細書において用いた技術および科学用語は全て本発明が属する当業者に一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の任意の方法、装置、および材料は、本発明の実践または試験において用いることができるが、代表的な方法、装置、および材料を記述する。

【0034】

本明細書において言及した全ての刊行物は、本明細書に記述される本発明に関連して用いられる可能性がある、刊行物において記述されている成分を説明および開示する目的で参考として本明細書に組み入れられる。

【0035】

胚以外の哺乳類におけるRNAi

先に要約したように、本発明は、胚以外の哺乳類においてRNAiを行う方法を提供する。本発明のこの局面をさらに記述するために、胚以外の哺乳類におけるRNAiの本方法を最初により詳細に説明してから、本発明が用いられる様々な代表的な応用のみならず、本発明の実践において用いられるキットについて論評する。

【0036】

方法

上記のように、本発明の一つの局面は、胚以外の哺乳類宿主において標的遺伝子または複数の遺伝子の発現を調節するためにRNAiを用いる方法を提供する。多くの態様において、本発明は、胚以外の哺乳類宿主生物において一つまたは複数の標的遺伝子の発現を減少させる方法を提供する。発現を減少させることは、標的遺伝子またはコード配列の発現レベルが、対照と比較して少なくとも約2倍、通常少なくとも約5倍、例えば10倍、15倍、20倍、50倍、100倍またはそれ以上減少するかまたは阻害されることを意味する。特定の態様において、標的遺伝子の発現は、標的遺伝子／コード配列の発現が有効に阻害される程度に減少する。標的遺伝子の発現を調節することは、コード配列、例えばゲノムDNA、mRNA等のポリペプチド、例えばタンパク質産物への転写／翻訳を変化させる、例えば減少させることを意味する。

【0037】

本発明は、胚以外の哺乳類生物において標的遺伝子の発現を調節する方法を提供する。胚以外の哺乳類生物とは、胚ではない、すなわち胚の発達段階より後期の発達段階にある哺乳類生物または宿主を意味する。そのため、宿主生物は、胎児であってもよいが、一般的に生後の発達段階の宿主生物、例えば幼若体、成体等である。

【0038】

本発明の実践にあたって、RNAi物質の有効量は、所望の様式で標的遺伝子の発現を調節するため、例えば標的細胞遺伝子発現の所望の減少を得るために、宿主生物に投与される。

【0039】

RNAi物質とは、RNA干渉機構によって標的遺伝子の発現を調節する物質を意味する。本発明の一つの態様において用いられるRNAi物質は、小さいリボ核酸分子（本明細書において干渉リボ核酸とも呼ぶ）、すなわち二本鎖構造で存在するオリゴヌクレオチド、例えば互いにハイブリダイズする二つの異なるオリゴリボヌクレオチド、または二本鎖構造を生成

10

20

30

40

50

するために小さいヘアピン形態をとる单一のリボオリゴヌクレオチドである。オリゴリボヌクレオチドとは、長さが約100ヌクレオチドを超えない、典型的に長さが約75ヌクレオチドを超えない、特定の態様において長さが約70ヌクレオチド未満であるリボ核酸を意味する。RNA物質が、互いにハイブリダイズする二つの異なるリボ核酸の二本鎖構造、例えばsiRNA（同時係属中の出願番号第60/377,704号に記述されるようなd-siRNA；その開示は参照として本明細書に組み入れられる）である場合、二本鎖構造の長さは典型的に約15~30 bp、通常約15~29 bpの範囲であり、長さが約20~29 bpsの場合、例えば21 bp、22 bpは特定の態様において特に重要である。RNA物質がヘアピン形態で存在する单一のリボ核酸の二本鎖構造、すなわちshRNAである場合、ヘアピンのハイブリダイズ部分の長さは典型的にsiRNA型の物質に関して先に提供した長さと同じであるか、または4~8ヌクレオチド長い。この態様のRNAi物質の重量は典型的に、約5,000ダルトンから約35,000ダルトンの範囲であり、多くの態様において少なくとも約10,000ダルトンであり、かつ約27,500ダルトン未満、しばしば約25,000ダルトン未満である。
10

【0040】

特定の態様において、RNAi物質が干渉リボ核酸、例えば上記のsiRNAまたはshRNAである代わりに、RNAi物質は上記のような干渉リボ核酸、例えばshRNAをコードしてもよい。言い換えれば、RNAi物質は、干渉リボ核酸の転写録型であってもよい。これらの態様において、転写録型は典型的に干渉リボ核酸をコードするDNAまたはRNAである。DNAは、ベクター（多様な異なるベクターが当技術分野で既知であり、例えばプラスミドベクター、ウイルスベクター等）に存在してもよい。
20

【0041】

RNAi物質は、用いるプロトコールが典型的に核酸投与プロトコールである場合、そのような異なる多くのプロトコールが当技術分野において既知である場合、任意の簡便なプロトコールを用いて胚以外の哺乳類宿主に投与することができる。以下の考察は、用いてもよい代表的な核酸投与プロトコールの論評を提供する。核酸は、ウイルス感染、マイクロインジェクション、または小胞の融合を含む任意の数の経路によって組織または宿主細胞に導入してもよい。Furthら（1992）、Anal Biochem 205：365~368によって記述されるように、ジェット注射も同様に筋肉内投与のために用いてもよい。核酸は金微粒子にコーティングしてもよく、文献に記述されている粒子衝突装置または「遺伝子銃」によって皮内に輸送してもよく（例えば、Tangら（1992）Nature 356：152~154）、金微粒子をDNAによってコーティングする場合、これを皮膚細胞に衝突させる。発現ベクターを用いて核酸を細胞に導入してもよい。そのようなベクターは一般的に、核酸配列の挿入を提供するために、プロモーター配列の近傍に存在する都合のよい制限部位を有する。転写開始領域、標的遺伝子またはその断片、および転写終了領域を含む転写力セットを調製してもよい。転写力セットは、多様なベクター、例えばプラスミド；レトロウイルス、例えばレンチウイルス；アデノウイルス等に導入してもよく、この場合、ベクターは細胞において一過性または安定に、通常少なくとも約1日、より通常は少なくとも約数日から数週間の期間、維持することができる。
30

【0042】

例えば、RNAi物質は、標的遺伝子を含む宿主生物に直接摂取させるか、または注射することができる。物質は細胞（すなわち、細胞内）に直接導入してもよく、または腔、間質腔、生物の体循環へ細胞外に導入してもよく、経口等で導入してもよい。経口導入方法には、RNAを生物の食物と直接混合することが含まれる。核酸を導入する物理的方法には、細胞への直接注入、またはRNA溶液の生物への細胞外注入が含まれる。物質は、細胞あたり少なくとも1コピーを輸送することができる量で導入してもよい。物質のより高用量（例えば、細胞あたり少なくとも5、10、100、500、または1000コピー）は、より有効な阻害を生じる可能性があり、より低用量もまた特定の態様にとって有用となる可能性がある。
40

【0043】

特定の態様において、流体力学核酸投与プロトコールを用いる。物質がリボ核酸である場合、下記に詳細に説明する流体力学リボ核酸投与プロトコールが、特に重要である。物質
50

がデオキシリボ核酸である場合、Changら、J. Virol. (2001) 75: 3469~3473; Liuら、Gene Ther. (1999) 6: 1258~1266; Wolffら、Science (1990) 247: 1465~1458; Zhangら、Hum Gene Ther. (1999) 19: 1735~1737; およびZhangら、Gene Ther. (1999) 7: 1344~1349において記述される流体工学デオキシリボ核酸投与プロトコールが重要である。

【0044】

関心対象のさらなる核酸輸送プロトコールには、以下が含まれるがこれらに限定されない：関心対象の米国特許には、第5,985,847号および第5,922,687号（その開示が参照として本明細書に組み入れられる）；国際公開公報第11092号；Acsadiら、New Biol. (1991) 3: 71~81; Hickmanら、Hum. Gen Ther. (1994) 5: 1477~1483；およびWolffら、Science (1990) 247: 1465~1468等が含まれる。10

【0045】

RNAi物質の特性に応じて、標的遺伝子発現の所望の調節を得ることができる任意の簡便な手段を用いて、宿主に活性物質（複数）を投与してもよい。このように、物質は治療応用のための多様な製剤に組み入れることができる。より詳しく述べると、本発明の物質は、適当であれば薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせて薬学的組成物に調製することができ、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、軟膏、溶液、坐剤、注射剤、吸入剤およびエアロゾルのような固体、半固体、液体、またはガス状の調製物に調製してもよい。そのため、物質の投与は、経口、口腔内、直腸内、非経口、腹腔内、皮内、経皮、気管内投与を含む多様な方法で行うことができる。20

【0046】

薬学的投与剤形において、物質は単独または他の薬学的に活性な化合物と適当に会合させて、ならびに組み合わせて投与してもよい。以下の方法および賦形剤は単なる例であって決して制限的ではない。20

【0047】

経口調製物の場合、物質は単独または適当な添加剤、例えば乳糖、マンニトール、コーンスターク、もしくはジャガイモデンプンのような通常の添加剤；結晶セルロース、セルロース誘導体、アカシア、コーンスターク、もしくはゼラチンのような結合剤；コーンスターク、ジャガイモデンプン、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムのような崩壊剤；タルクもしくはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；ならびに望ましければ緩衝剤、湿潤剤、保存剤、および着香料と組み合わせて錠剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤を形成することができる。30

【0048】

物質は、植物油または他の類似の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステルまたはポリエチレングリコールのような水性または非水性溶媒において；そして望ましければ溶解剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定化剤および保存剤のような通常の添加剤と共に、それらを溶解、懸濁、または乳化させることによって注射用調製物に調製することができる。40

【0049】

物質は、吸入によって投与されるエアロゾル調製物において利用することができる。本発明の化合物は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等のような許容される加圧噴射剤に調製することができる。40

【0050】

さらに、物質は、乳化基剤または水性基剤のような多様な基剤と共に混合することによって坐剤に調製することができる。本発明の化合物は、坐剤によって直腸内投与することができる。坐剤には、体温で溶解するが室温では固化したまであるカカオバター、カルボワックスおよびポリエチレングリコールのような媒体が含まれる。

【0051】

それぞれの用量単位、例えば小さじ1杯、大さじ1杯、錠剤、または坐剤が、一つまたは複数の阻害剤を含む組成物の規定量を含む、シロップ剤、エリキシル剤、および懸濁剤のような経口または直腸投与のための単位投与剤形を提供してもよい。同様に、注射または静

10

20

30

40

50

脈内投与のための単位投与剤形は、滅菌水、通常の生理食塩液、または他の薬学的に許容される担体中の溶液として組成物中に阻害剤（複数）を含んでもよい。

【0052】

本明細書において用いられるように、「単位投与剤形」という用語は、それぞれの単位が薬学的に許容される希釈剤、単体、または溶媒に関連して所望の作用を生じるために十分な量で計算される、本発明の化合物の規定量を含む、ヒトおよび動物被験者のための単位用量として適した、物理的に個別の単位を指す。本発明の新規単位投与剤形の仕様は、用いる特定の化合物および得られる作用、ならびに宿主におけるそれぞれの化合物に関連した薬物動態に依存する。

【0053】

溶媒、アジュバント、担体または希釈剤のような薬学的に許容される賦形剤は、公衆が容易に入手可能である。その上、pH調節および緩衝剤、等張性調節剤、安定化剤、湿潤剤等のような薬学的に許容される補助物質は、公衆が容易に入手可能である。

【0054】

当業者は、用量レベルが特定の化合物、輸送媒体の特性等に応じて変化しうることを容易に認識するであろう。所定の化合物に関する好ましい用量は、多様な手段によって当業者によって容易に決定される。

【0055】

上記に従ってRNAi物質の有効量を胚以外の哺乳類宿主に投与すると、上記のように、標的遺伝子（複数）発現の調節、例えば標的遺伝子（複数）発現の減少が起こる。

【0056】

上記の方法は任意の哺乳類（関心対象の代表的な哺乳類には、有蹄類または蹄のある動物、例えばウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ等；齧歯類、例えばハムスター、マウス、ラット等；ウサギ類、例えばウサギ；霊長類、例えばサル、ヒヒ、ヒト等が含まれるがこれらに限定されない）において作用する。

【0057】

上記の方法は、多様な異なる適用において有用であり、その代表的なタイプをこれから下記により詳細に説明する。

【0058】

有用性

本発明の方法は、多様な異なる応用において用いられ、代表的な応用には学術的／研究応用および治療応用の双方が含まれる。これらのタイプの代表的な応用のそれを下記により詳しく説明する。

【0059】

学術的／研究応用

本発明の方法は、例えば哺乳類宿主における標的遺伝子／コード配列の機能を決定するために、哺乳類宿主において一つまたは複数の標的遺伝子（コード配列）の発現を調節することが望まれる多様な異なるタイプの学術的、研究応用における用途を見出す。本発明の方法は、哺乳類宿主において一つまたは複数の標的遺伝子／コード配列の発現を低下、減少、または阻害するために本発明の方法を用いる、「機能喪失」型のアッセイ法において特別な用途を見出す。

【0060】

そのため、本発明の一つの代表的な有用性は、まだ機能がわかっていない標的遺伝子の活性を阻害するためにRNAi物質が本発明に従う哺乳類に投与される、胚以外の哺乳類における遺伝子機能を同定する方法としてである。従来の遺伝子スクリーニングによる、時間と労力のかかる変異体の単離の代わりに、本発明の方法を用いる機能的ゲノム学は、標的遺伝子活性の量を減少させ、かつ／または時期を変化させるためにRNAi物質を投与することによって、特徴が調べられていない遺伝子の機能を決定する。そのような方法は、医薬品の標的となる可能性があるか否かを決定するため、生後の発達および／または加齢に関与するシグナル伝達経路を決定するため等に用いることができる。哺乳類ゲノムに関する全

10

20

30

40

50

配列を含む、ゲノム上の遺伝子源および発現遺伝子源からのヌクレオチド配列情報の獲得をより速やかにすることは、生きている哺乳類生物における遺伝子機能を決定するために本発明の方法を用いることと結びつけることができる。特定のコドン使用に対する異なる生物の嗜好性、関連する遺伝子産物の配列データベースの検索、遺伝形質の連鎖マップとヌクレオチド配列が由来する物理的マップとの相関、および人工知能法を用いて、そのような配列決定プロジェクトにおいて獲得されたヌクレオチド配列から推定のオープンリーディングフレームを定義してもよい。

【 0 0 6 1 】

単純な代表的なアッセイ法は、発現された配列タグ（EST）から利用できる部分配列に従って遺伝子発現を阻害する。増殖、発達、代謝、疾患抵抗性、または他の生物学的プロセスにおける機能的变化は、EST遺伝子産物の正常な役割を示すであろう。標的遺伝子の機能は、遺伝子活性が阻害された場合にそれが哺乳類に及ぼす影響からアッセイすることができる。

【 0 0 6 2 】

生物の特徴がRFLPまたはQTL分析を通して多形性に遺伝子連鎖されることが決定されれば、本発明を用いて、その遺伝子多形がその特徴に直接関与する可能性があるか否かに関する洞察を得ることができる。例えば、遺伝子多形を定義する断片またはそのような遺伝子多形の近傍の配列を、RNAi物質を產生するために用いることができ、次にその物質を哺乳類に投与して、特徴の変化が阻害と関連するか否かを決定することができる。

【 0 0 6 3 】

本発明は、本質的な遺伝子の阻害を可能にするために有用である。そのような遺伝子は、特定の発達段階または細胞区画に限って生物の生存能力にとって必要であるかも知れない。条件的変異の機能的同等物は、それが生存能力にとって必要でない時間または場所で標的遺伝子の活性を阻害することによって产生してもよい。本発明は、標的ゲノムに永続的な変異を導入することなく、特定の発達時期および生物の部位にRNAi物質を付加することを可能にする。

【 0 0 6 4 】

選択的スプライシングが、特徴的なエキソンの使用によって区別することができる転写物ファミリーを产生する状況では、本発明は、ファミリーメンバーの機能を特異的に阻害するかまたは区別するために、適当なエキソンを介した阻害を標的とすることができる。例えば、選択的にスプライシングされう膜貫通ドメインを含むホルモンは、膜結合型および分泌型の双方で発現される可能性がある。膜貫通ドメインの前で翻訳を終了するナンセンス変異を単離する代わりに、膜貫通ドメインを含むエキソンを標的にし、それによって膜結合ホルモンの発現を阻害することによって、分泌型ホルモンのみを有する機能的結果を本発明に従って決定することができる。

【 0 0 6 5 】

治療応用

本発明の方法はまた、例えば哺乳類全体またはその一部、例えば組織、臓器等において一つまたは複数の標的遺伝子を調節することが望まれる多様な治療応用における用途を見出す。そのような方法において、RNAi活性物質の有効量を宿主哺乳類に投与する。有効量とは、標的遺伝子（複数）の発現を望ましく調節するために十分な用量を意味する。上記のように、このタイプの応用の多くの態様において、本発明の方法は、所望の治療転帰を得るために、宿主において一つまたは複数の標的遺伝子の発現を減少／阻害するために用いられる。

【 0 0 6 6 】

治療される病態の特性に応じて、標的遺伝子は、細胞に由来する遺伝子、内因性遺伝子、病的に変異した遺伝子、例えば癌を引き起こす遺伝子、トランスジーン、またはその感染後に細胞に存在する病原体の遺伝子であってもよい。特定の標的遺伝子および輸送されるRNAi物質の用量に応じて、技法は、標的遺伝子の部分的または完全な機能喪失を提供してもよい。注射した材料の用量がより低く、そしてRNAi物質の投与後の時間がより長ければ

10

20

30

40

50

、より小さい分画の細胞に阻害が起こる可能性がある。

【0067】

本発明の方法は、哺乳類宿主における標的遺伝子発現の調節が望まれる多数の異なる病態の治療において用いられる。治療とは、宿主に罹患する病態に関連した症状が少なくとも改善することを意味し、改善は、パラメータ、例えば治療すべき病態に関連した症状の程度が少なくとも減少することを意味するために広い意味で用いられる。そのため、治療には、宿主がもはや病態を有しないように、または病態の特徴を示す症状を少なくとも有しないように、病態または少なくともそれに関連する症状が完全に阻害される、例えば発生が防止されるか、または停止する、例えば終了する状況が含まれる。

【0068】

多様な宿主が本発明の方法に従って治療可能である。一般的にそのような宿主は、「哺乳類」または「哺乳動物」であり、これらの用語は、広く肉食目（例えば、イヌおよびネコ）、齧歯目（例えば、マウス、モルモット、およびラット）ならびに霊長目（例えば、ヒト、チンパンジー、およびサル）を含む、哺乳類に含まれる生物を記述するために用いられる。多くの態様において、宿主はヒトであろう。

【0069】

本発明は、任意の特定のタイプの標的遺伝子またはスクレオチド配列の調節に限定されない。関心対象の標的遺伝子の代表的なクラスには以下が含まれるがこれらに限定されない：発生上の遺伝子（例えば、接着分子、サイクリンキナーゼ阻害剤、サイトカイン／リンフォカインおよびその受容体、増殖／分化因子およびその受容体、神経伝達物質およびその受容体）；腫瘍遺伝子（例えば、

ABLI, BCLI, BCL2,

BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETSI, ETS1, ETV6, FOR, FOS,

FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN,

NRAS, PIM 1, PML, RET, SRC, TALI, TCL3, および YES

）；腫瘍抑制遺伝子（例えば、APC、BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NF1、NF2、RB1、TP53、およびWT1）；ならびに酵素（例えば、ACCシンターゼおよびオキシダーゼ、ACPデサチュラーゼおよびヒドロキシラーゼ、ADP-グルコースピロホスホリラーゼ、ATPアーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アミラーゼ、およびアミログルコシダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、カルコンシンターゼ、キチナーゼ、シクロオキシゲナーゼ、デカルボキシラーゼ、デキストリナーゼ、DNAおよびRNAポリメラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコースオキシダーゼ、顆粒結合デンプンシンターゼ、GTPアーゼ、ヘリカーゼ、ヘミセルラーゼ、インテグラーゼ、イヌリナーゼ、インペルターゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ラクターゼ、UPアーゼ、リポキシゲナーゼ、ライソザイム、ノパリンシンターゼ、オクトピンシンターゼ、ペクチンエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、ホスホリラーゼ、フィターゼ、植物生長調節シンターゼ、ポリガラクツロナーゼ、プロテナーゼ、およびペプチダーゼ、プラナーゼ、リコンビナーゼ、逆転写酵素、RUBISCO、トポイソメラーゼ、およびキシラナーゼ）；ケモカイン（例えば、CXCR4、CCR5）、テロメラーゼのRNA成分、血管内皮増殖因子（VEGF）、VEGF受容体、腫瘍壞死因子、核因子B、転写因子、細胞接着分子、インスリン様増殖因子、形質転換成長因子 ファミリーメンバー、細胞表面受容体、RNA結合タンパク質（例えば、小さい核小体RNA、RNA輸送因子、翻訳因子、テロメラーゼ逆転写酵素）等。

【0070】

キット

上記の方法の一つまたは複数を実践するための試薬およびそのキットも同様に提供される。本発明の試薬およびそのキットは、大きく変化してもよい。典型的に、キットは少なくとも上記のようにRNAi物質を含む。

【0071】

10

20

30

40

50

上記の成分の他に、本発明のキットは本発明の方法を実践するための説明書をさらに含むであろう。これらの説明書は、多様な形で本発明のキットに存在してもよく、その一つまたは複数がキットに存在してもよい。これらの説明書が存在しうる一つの形は、キットのパッケージ、添付文書等における、適した媒体または基材、例えば情報が印刷されている紙片または複数の紙片上の、印刷情報としてである。さらにもう一つの手段は、情報が記録されているコンピューター読み取り可能な媒体、例えばディスクケット、CD等であろう。存在しうるさらにもう一つの手段は、隔たったサイトで情報にアクセスするために、インターネットを通して用いられる可能性があるウェブサイトのアドレスである。任意の簡便な手段がキットに存在してもよい。

【0072】

10

裸のRNAの流体力学投与

本発明によって、裸の核酸、例えばリボ核酸、デオキシリボ核酸、または化学改変された核酸（モルフォリノ、ペプチド核酸、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、または2'-0メチルオリゴヌクレオチドを含むがこれらに限定されない）を脈管を有する（vascularized）生物、例えば哺乳類の標的細胞にインビボで導入するための方法および組成物が提供される。本発明のこれらの方法は、便宜上「流体力学」法と呼ぶ。

【0073】

20

本発明の方法の一つの態様において、裸の核酸およびRNアーゼ阻害剤の水性製剤を生物の脈管系に投与する。多くの態様において、水性製剤には同様に競合リボ核酸、例えば非キヤップ化非ポリアデニル化リボ核酸が含まれる。さらに他の態様において、RNA分子に転写されうるDNAと候補調節物質との同時輸送は、RNアーゼ阻害剤または競合リボ核酸を含まずに行われ、この場合調節物質とDNAとは、単一の組成物として輸送してもしなくてよい。本発明の方法は、研究および治療応用の双方を含む異なる多様な応用において用いられ、特に、肝細胞へのリボ核酸のインビボ輸送に用いるため、例えば核酸の肝臓標的化インビボ輸送のために特に適している。

【0074】

本発明のこの局面をさらに記述するために、本発明の方法を最初に説明した後、本発明の方法が用いられる代表的な応用および本発明の方法を実践するために用いられるキットの説明を行う。

【0075】

30

方法

先に要約したように、本発明の方法は脈管を有する多細胞生物に存在する標的細胞に、核酸、例えばリボ核酸をインビボで導入する方法を提供する。インビボ導入とは、本発明において、核酸が導入される標的細胞が、多細胞生物に存在する細胞であること、すなわち多細胞生物から分離された、例えば除去された細胞ではないことを意味する。そのため、本発明の方法は、細胞が由来する多細胞生物から分離された、例えば培養された細胞または複数の細胞に核酸が導入される、インビトロ核酸移入プロトコールとは異なる。言い換えれば、本発明の方法はインビトロ核酸移入法ではない。

【0076】

40

核酸の導入とは、核酸、例えばデオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、または天然に存在しない核酸類似体を標的細胞の細胞質に挿入することを意味する。言い換えれば、核酸は、標的細胞の外側から細胞膜を超えて標的細胞の内部に移動する。

【0077】

50

脈管を有する多細胞生物とは、脈管系を含む多細胞生物を意味する。関心対象の多細胞生物には植物および動物が含まれ、動物は、特に例えば心臓の鼓動に反応して血液が流れる静脈および動脈系で構成される脈管系を有する脊椎動物が特に重要である。関心対象の動物は、多くの態様において哺乳類である。関心対象の哺乳類には；齧歯類、例えばマウス、ラット；家畜、例えばブタ、ウマ、ウシ等；ペット、例えばイヌ、ネコ；および靈長類、例えばヒトが含まれる。特定の態様において、多細胞生物はヒトである。他の態様において、多細胞生物はヒト以外の哺乳類、例えばマウス、ラット等のような齧歯類である。

【 0 0 7 8 】

先に述べたように、本発明の方法は、最も広い意味において、宿主の標的細胞に核酸を導入するために適している。本明細書において用いられる「核酸」という用語は、ヌクレオチド、例えばデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドからなるポリマー、または天然に存在する二つの核酸と類似の、配列特異的な様式で、天然に存在する核酸とハイブリダイズすることができる、合成的に產生される化合物（例えば、米国特許第5,948,902号およびそこに引用されている文献に記載されるPNA）を意味する。本明細書において用いられる「リボ核酸」および「RNA」という用語は、リボヌクレオチドで構成されるポリマーを意味する。本明細書において用いられる「デオキシリボ核酸」および「DNA」という用語は、デオキシリボヌクレオチドからなるポリマーを意味する。

10

【 0 0 7 9 】

本発明の方法は、多細胞生物の標的細胞へのリボ核酸の輸送に用いるために特に適している。そのため、リボ核酸の輸送に関して方法をさらに説明する。しかし、以下のプロトコールも同様に他の核酸、例えばDNA（プラスミドDNAのような）の輸送に用いるために適している。

【 0 0 8 0 】

本発明の方法を実践する場合、リボ核酸が裸のリボ核酸として存在するリボ核酸の水性組成物を、多細胞生物または宿主の脈管系に投与する。多くの態様において、裸のRNA水性組成物または製剤を宿主の静脈に投与する、すなわち裸のRNA調製物を静脈内投与する。特定の態様において、裸のRNA調製物は高圧注射によって宿主に静脈内投与される。高圧注射とは、水性製剤が、一般的に少なくとも約20 mmHg、通常少なくとも約30 mmHgである上昇させた圧で静脈内に導入されることを意味する。多くの態様において、上昇させた圧は、約10 mmHg～50 mmHgの範囲であり、40 mmHg～50 mmHgがしばしば好ましい。上記の方法のように、高圧下で水性製剤を投与する方法は、上記の関連文献の章に記載の参考文献に記載される。

20

【 0 0 8 1 】

上記のように、本発明の方法によって標的細胞に導入されるRNAまたはDNAは、裸のRNAとして水性製剤に存在する。「裸」とは、標的細胞への流入を促進するように作用することができる如何なる輸送媒体も含まないことを意味する。例えば、本発明の方法において輸送される裸のRNAまたはDNAは、リポソーム製剤、荷電脂質または沈殿物質のようなransフェクションを促進する如何なる材料も含まず、例えば、それらはコロイド材料（リポソーム調製物を含む）と複合体を形成しない。さらに、本発明の裸のRNAは、標的細胞ゲノムにRNAの組み込みを引き起こすべきターゲットに含まれない、すなわち、それらは遺伝情報を有するウイルス配列または粒子を含まない。

30

【 0 0 8 2 】

本発明によって輸送してもよい裸のRNAは、その意図とする目的、例えばそれらがコードするタンパク質等に応じて、長さが多様に変化してもよい。一般的に、裸のRNAは長さが少なくとも約10 nt、通常は長さが少なくとも約30 nt、およびより通常は長さが少なくとも約35 ntであり、裸のRNAは長さが20,000 ntまたはそれ以上であってもよいが、一般的に長さが約10,000 ntを超える、通常は、長さが約6,000 ntを超えないと考えられる。上記のように裸のRNAがRNAi物質である特定の態様において、RNAの長さは、約10 nt～50 nt、しばしば約10 nt～40 nt、およびよりしばしば20 nt～25 nt、例えば21 ntまたは22 ntなどの15 nt～25 ntを含む、約15 nt～30 ntである。

40

【 0 0 8 3 】

本発明の方法に従って標的細胞に導入してもよい裸のRNAはタンパク質をコードしてもしなくてもよく、すなわち標的細胞への導入時にタンパク質に翻訳されてもされなくてもよい。裸のRNAが標的細胞への導入後にタンパク質に翻訳されうる態様において、裸のRNAはキャップ化されてもされなくともよく、それはIRESドメイン等を含んでもよい。しかし、本態様の多くの特定のプロトコールにおいて、裸のRNAはキャップ化されている。さらに、これらの態様におけるRNAには一般的に、少なくともポリアデニル化シグナルが含まれ

50

、多くの態様において、ポリアデニル化されており、ポリA尾部は存在する場合、一般的に長さが約10個～300個、通常約30個～50個である。裸のRNAに関するさらなる説明を下記に提供する。

【0084】

上記のように、裸のRNAの水性製剤は、宿主に血管内、通常静脈内投与される。本発明の方法において用いられる水性製剤において、裸のRNAの有効量を水性輸送媒体と配合する。有効量は、標的細胞に所望の輸送量を提供するために、例えば所望のタンパク質発現量のような所望の転帰を提供するために十分である量を意味する。多くの態様において、水性製剤に存在する裸のRNAの量は少なくとも約5 μg、通常は少なくとも約10 μg、およびより通常は少なくとも約20 μgであってもよく、量は10 mgまたはそれ以上の量であってもよいが、一般的に約1 mgを超える、通常は約200 μgを超えない。10

【0085】

関心対象の水性輸送媒体には：水、生理食塩液、および緩衝媒体が含まれる。関心対象の特定の溶媒には：塩化ナトリウム溶液、リングルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リングル液、リン酸緩衝生理食塩液等が含まれる。水性輸送媒体にはさらに、保存剤および他の添加剤、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤、不活性ガス、栄養補給剤、電解質補給剤、マグネシウム、カルシウムおよびマンガンのような二価陽イオンが含まれてもよい。多くの態様において特別な関心対象は、偽生理的である緩衝塩溶液の使用である。

【0086】

本発明の方法の特定の態様の特徴は、裸のRNAがRNアーゼ阻害剤と組み合わせて多細胞生物の脈管系に導入される点である。RNアーゼ阻害剤は、多細胞生物におけるRNアーゼ活性の活性を、完全には不活化しないが少なくとも減少させる化合物または物質を意味する。多くの態様において、RNアーゼ阻害剤は、RNアーゼのタンパク質阻害剤であり、この場合ヒトの胎盤RNアーゼ阻害剤が特に重要である。タンパク質RNアーゼ阻害剤は、天然起源から精製してもよく、または例えば組み換え技術によって合成的に產生してもよい。ヒト胎盤RNアーゼ阻害剤は、異なる多様な販売元から多様な異なる商品名で得てもよく、代表的な販売元には；プロメガ社（Promega Inc.）、ストラタジーン社（Stratagene Inc.）、フィッシャーサイエンティフィック社（Fisher Scientific Inc.）等が含まれる。20

【0087】

RNアーゼ阻害剤は、特定の態様において、水性の裸のRNA組成物とは異なる組成物で宿主に投与してもよいが、多くの態様において、RNアーゼ阻害剤は、裸のRNAの水性組成物に存在する。水性組成物に存在するRNアーゼ阻害剤の量は、裸のRNAの所望の取り込みを提供するために十分である。RNアーゼ阻害剤がタンパク質阻害剤である場合、本発明の方法を実践する際に多細胞生物に導入される水性組成物中の阻害剤の濃度は、約4～4,000単位の範囲であってもよく、通常は約400～4,000単位、およびより通常は約400～1,500単位であってもよい。30

【0088】

特定の態様において、裸のRNAまたはRNアーゼ阻害剤は、競合RNAと共に投与される。競合RNAはRNアーゼ活性の競合的阻害剤として作用することができるRNAを意味する。多くの態様において、競合RNAはキャップ化されず、ポリアデニル化されない。キャップ化されないとは、競合RNAが真核細胞メッセンジャーRNAの5'末端に認められるキャップ構造を欠損すること、すなわちそれが5' 7メチルGを欠損することを意味する。ポリアデニル化されないとは、競合RNAがその3'末端において、真核細胞メッセンジャーRNAにおいて認められるポリA尾部またはポリアデニル化ドメインを欠損することを意味する。競合RNAの長さは異なってもよいが、一般的に少なくとも約70 nt、通常少なくとも約200 nt、およびより通常少なくとも約1,500 ntであり、長さは10,000 ntまたはそれ以上であってもよいが、一般的に約3,500 ntを超える、通常約1,500 ntを超えない。水性組成物中の競合RNAの濃度は、裸のRNAの所望の保護（例えば、RNアーゼによる結合の競合によって）を提供するために十分であり、多くの態様において、約10 μg/ml～10 mg/ml、通常約20 μg/ml～20 mg/mlである。40

0 μg/ml、およびより通常約40 μg/ml～150 μg/mlの範囲である。

【0089】

本発明の方法によって、投与されたRNAの標的細胞（複数）の細胞質への非常に効率的な移入が起こる。本発明の方法は、肝臓または肝細胞および肝臓の非実質細胞の細胞質にRNAを移入するために特に適している。そのため、多くの態様において、本発明の方法は、高レベルの核酸、例えばRNAの肝細胞または肝組織への移入を得るインビボの方法である。

【0090】

本発明の方法によって標的細胞に導入される核酸は、標的細胞の内部では短命である。核酸の特定の性質に応じて、本発明の方法による導入後の核酸の半減期は一般的に約30秒～10日、通常は約1分～24時間の範囲であり、より通常は約5分～10時間の範囲である。そのため核酸が、関心対象のタンパク質をコードするRNAである場合、本発明の方法による導入後のタンパク質発現は一過性であり、典型的に約1分～3日間の範囲の期間、通常約5分～24時間持続する。そのため、本発明の方法の多くの態様において、本発明の方法は、タンパク質発現がRNAの寿命に等しい、導入遺伝子から一過性のタンパク質発現を提供する方法である。それにもかかわらず、発現されたタンパク質は、特定のタンパク質の性質に応じて、より長い寿命を有する可能性がある。

【0091】

有用性

本発明の方法は、標的細胞への裸の核酸の効率的なインビボ移入が望まれる、多様な異なる応用における用途を見出す。本発明の方法が用いられる応用には、治療的および研究応用の双方が含まれる。関心対象の治療応用には、遺伝子治療応用、ワクチン接種応用等が含まれる。関心対象の研究応用には、特定の病態、例えばRNAウイルス感染症の動物モデルの作製、遺伝子機能を解明するために表現型に関する遺伝子発現を観察すること等が含まれる。本発明の方法が用いられる他の応用には、アンチセンス、リボザイムおよびキメラ形成(chimeraplasty)（すなわち、RNA/DNAキメラによる遺伝子の修復）（例えば、Yonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93(5) : 2071～6；Cole-Straussら、Science (1996) 273 (5280) : 1386～9；およびZhuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96(15) : 8768～73を参照されたい）治療法のみならず、干渉RNA（細胞に存在することにより類似のRNAの翻訳を防止するRNA）（例えば、Wiannyら、Nat. Cell Biol. (2000) 2(2) : 70～5；およびSiQunら、Nature (1998) 391 : 806～811を参照されたい）治療法の開発が含まれる。

【0092】

本発明の方法が用いられる一つのタイプの応用は、例えば標的細胞からの、関心対象のポリペプチド、例えばタンパク質の合成においてであり、特にポリペプチドの一過性の発現である。そのような応用において、関心対象のポリペプチドをコードする核酸を、必要かつ／または望ましい発現成分、例えば5'キャップ構造、IRESドメイン、ポリAシグナルまたはポリA尾部等と組み合わせて、ポリペプチド発現のための発現宿主としての役割を有する標的細胞が存在する多細胞生物にインビボ投与によって標的細胞に導入する。例えば、本発明の方法によって投与される裸の核酸がRNAである場合、RNAは、標的細胞の細胞質においてRNAに含まれる配列によってコードされるタンパク質に翻訳されうるRNAである。RNAはキャップ化されてもされなくともよく、キャップ化されない場合、一般的にIRES配列を含む。RNAはまた一般的にポリA尾部をさらに含み、ポリA尾部の長さは典型的に約10 nt～300 nt、通常は約30 nt～50 ntである。インビボ投与およびその後の標的細胞への導入後、多細胞生物、およびそこに存在する標的細胞は、移入されたRNAによってコードされるタンパク質の発現にとって十分な条件で維持される。次に、発現されたタンパク質を回収して、望ましければ任意の都合のよいプロトコールを用いて精製する。

【0093】

そのため、本発明の方法は、多細胞生物において関心対象のタンパク質の量を少なくとも増強する手段を提供する。「少なくとも増強する」という用語には、本発明の方法を実践

10

20

30

40

50

する前に、タンパク質の特定の初期量が存在する多細胞生物において、タンパク質の量を増加させる方法が用いられる状況が含まれる。「少なくとも増強する」という用語にはまた、本発明の方法を実践する前に多細胞生物が実質的に如何なるタンパク質も含まない状況が含まれる。本発明の方法が、多細胞生物に存在するタンパク質の量を少なくとも増強するために用いられる場合、それらは薬学的調製物の応用および治療的応用を含む多様な異なる応用において用いられ、後者を下記により詳細に説明する。

【0094】

本発明の方法が用いられる治療的応用には、宿主生物における治療タンパク質レベルを増強するために本発明の方法が用いられる遺伝子治療応用、および宿主にワクチン接種する（または他の方法によって輸送されるワクチンを開発する）ために本発明の方法が用いられるワクチン接種応用が含まれる。DNAに基づく発現プロトコールとは異なり、本発明のRNAに基づく発現プロトコールは、真核細胞遺伝子に共通して関連するプロモーター、エンハンサー、リプレッサーおよび他の調節要素を用いる必要がなく複雑でない。本発明の方法は、標的細胞に流入すると宿主において必要な増強されたタンパク質レベルを提供する、広く多様な治療的核酸を輸送するために用いてもよい。関心対象の治療的核酸には、遺伝的欠損に基づく疾患状態の原因となる遺伝子などの欠損遺伝子を、標的宿主細胞において、これらの欠損遺伝子によって宿主に提供されると想定される産物をコードすることによって置換する核酸；癌の治療において治療的に有用な核酸等が含まれる。そのレベルが本発明の方法の実践によって増強する可能性がある遺伝子欠損疾患状態に関係する代表的な産物には、第VIII因子、第IX因子、 α -グロビン、低密度タンパク質受容体、アデノシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、グルコセレブロシダーゼ、囊胞性線維症膜貫通調節物質、 β -アンチトリプシン、CD-18、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノスクシネットシンターゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、分岐鎖 α -ケト酸デヒドロゲナーゼ、フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、 β -L-フコシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -L-イデュロニダーゼ(iduronidase)、ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ等が含まれるがこれらに限定されない。本発明の方法によって輸送してもよい癌治療核酸には：適当な因子をコードすることによってリンパ球の抗腫瘍活性を増強する核酸、その発現産物が腫瘍細胞の免疫原性を増強する核酸、腫瘍サブレッサーをコードする核酸、毒素コード核酸、自殺因子コード核酸、多剤耐性産物コード核酸、リボザイム、DNAリボザイム、DNA/RNAキメラ、干渉RNAおよびアンチセンス配列等が含まれる。

【0095】

上記のように、本発明の方法の重要な特徴は、本発明の方法をインビボ遺伝子治療応用のために用いてもよい点である。インビボ遺伝子治療応用とは、治療遺伝子の発現が望まれる標的細胞または複数の細胞が、本発明を実践する前に宿主から除去されないことを意味する。対照的に、裸の核酸組成物が多細胞生物に直接投与されて標的細胞によって取り込まれ、その後コードされた産物の発現が起こる。

【0096】

上記のように、本発明の方法が用いられるもう一つの治療応用は、宿主のワクチン接種（と共に他の方法によって輸送されるワクチンの開発）である。これらの方法において、本発明の方法によって宿主に投与される裸の核酸、例えばRNAは、標的細胞にRNAが流入すると、発現されて所望の免疫応答を誘発するために分泌される所望の免疫原をコードする。裸の核酸が用いられ、本発明の裸の核酸輸送方法が用いられるワクチン接種法は、その開示が参照として本明細書に組み入れられる、国際公開公報第90/11092号にさらに記述される。

【0097】

上記のように、本発明の方法はまた、様々な研究応用における用途を見出す。本発明の方法が用いられる一つの研究応用は、RNAウイルス感染症の動物モデルを作製する場合であり、この場合関心対象のRNAウイルスには、HCV、HIV、A型インフルエンザ、A型肝炎、ポリオウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、アフタウイルス等が含まれる。その

10

20

30

40

50

のような動物モデルを作製するために、レポータードメイン、例えば検出可能な産物（ルシフェラーゼ、蛍光タンパク質等）をコードするドメインに機能的に結合させた、関心対象のRNAウイルスからの一つまたは複数の調節要素等を含む構築物をまず提供する。または、そのようなRNA構築物にインビオで転写されうるDNA構築物を用いてもよい。次に、これらの構築物を本発明の方法に従って宿主、例えばマウスに投与して、対応するRNAウイルスによる感染症の動物モデルを作製する。そのため、本発明の方法によって作製されたRNAウイルスの動物モデルも同様に提供される。RNAウイルス動物モデルを作製するための代表的なプロトコールを下記の実験の章に提供する。

【0098】

本発明はまた、先により詳しく記述し、下記の実験の章でより詳しく記述するsiRNAおよびshRNAを含む、RNAi治療および／または研究物質の輸送に用いられる。10

【0099】

そのような動物モデルを用いて、候補となる調節物質、例えば、増強または阻害物質をスクリーニングする方法も提供される。異なる多様なタイプの候補物質を本発明に従ってスクリーニングしてもよい。候補物質は多数の化学クラスを含み、典型的にそれらは有機分子であるが、好ましくは分子量が50ダルトンより大きく、約2,500ダルトン未満である低分子有機化合物である。候補物質は、タンパク質との構造的相互作用、特に水素結合にとって必要である官能基を含み、典型的に少なくとも一つのアミン、カルボニル、ヒドロキシル、またはカルボキシル基を含み、好ましくは少なくとも二つの官能化学基を含む。候補物質はしばしば、一つまたは複数の上記の官能基によって置換された環状炭素または複素環構造および／または芳香環もしくは多芳香環構造を含む。候補物質は同様に、ペプチド、糖質、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン誘導体、構造的類似体またはその組み合わせを含む生体分子の中にも認められる。20

【0100】

特定の態様において特に重要なのはアンチセンス核酸である。アンチセンス試薬は、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ODN)、特に無処置の核酸からの化学改変を有する合成ODN、またはRNAのようなアンチセンス分子を発現する核酸構築物であってもよい。アンチセンス配列は、標的遺伝子のmRNAに対して相補的であり、標的遺伝子産物の発現を阻害する。アンチセンス分子は、様々な機構により、例えばRNアーゼHの活性化または立体的妨害により、翻訳に利用できるmRNAの量を減少させることによって、遺伝子発現を阻害する。アンチセンス分子の一つまたは組み合わせを投与してもよく、組み合わせは多数の異なる配列を含んでもよい。30

【0101】

アンチセンス分子は、転写開始が、アンチセンス鎖がRNA分子として產生されるように方向づけられた適当なベクターにおいて、標的遺伝子配列の全てまたは一部の発現によって產生してもよい。または、アンチセンス分子は合成オリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは一般的に、長さが少なくとも約7ヌクレオチド、通常は少なくとも約12ヌクレオチド、より通常は少なくとも約16ヌクレオチドであり、長さは約500ヌクレオチドを超えない、通常は約50ヌクレオチドを超えない、より通常は約35ヌクレオチドを超えず、長さは、阻害効率、特異性（交叉反応性がないことを含む）等によって支配される。長さが7~8塩基の短いオリゴヌクレオチドが、遺伝子発現の強くかつ選択的な阻害剤となりうることが判明している（Wagnerら（1996）、Nature Biotechnol. 14: 840~844）。40

【0102】

内因性のセンス鎖mRNA配列の特異的領域または複数の特異的領域は、アンチセンス配列によって相補的となるように選択される。オリゴヌクレオチドに関する特異的配列の選択は、いくつかの候補配列をインビトロまたは動物モデルにおいて標的遺伝子発現の阻害に関してアッセイする経験的な方法を用いてもよい。配列の組み合わせも同様に用いてもよく、この場合mRNA配列のいくつかの領域がアンチセンス相補性のために選択される。

【0103】

50

20

30

40

50

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知の方法によって化学合成してもよい（Wagnerら（1993）、上記、およびMilliganら、上記を参照されたい）。好ましいオリゴヌクレオチドは、細胞内安定性および結合親和性を増加させるために、本来のホスホジエステル構造から化学改変されている。そのような多くの改変が文献において記述されており、これらは骨格、糖または複素環基礎骨格の化学を変化させる。

【0104】

骨格の化学における有用な変更は、ホスホロジアミデート結合、メチルホスホネートホスホロチオエート；非架橋酸素がいずれも硫黄で置換されているホスホロジチオエート；ホスホロアミダイト；アルキルホスホトリエステルおよびボラノホスフェートである。アキラルホスフェート誘導体には、3'-O-5'-S-ホスホロチオエート、3'-S-5'-O-ホスホロチオエート、3'-CH₂-5'-O-ホスホネートおよび3'-NH-5'-O-ホスホロアミデートが含まれる。10

ペプチド核酸は、リボースホスホジエステル骨格全体をペプチド結合に置換する。安定性および親和性を増加させるために、糖の改変も同様に用いてもよい。一つの例は、モルフォリンによるリボース糖の置換である。基本骨格が天然の-D-アノマーとは逆転しているデオキシリボースの-L-アノマーを用いてもよい。リボース糖の2'-OHは、2'-O-メチルまたは2'-O-アリル糖を形成するように改変してもよく、これは親和性を含まずに分解に対する抵抗性を提供する。複素環基礎骨格の改変は適切な塩基対形成を維持しなければならない。いくつかの有用な置換には、デオキシチミジンの代わりにデオキシリジン；デオキシシチジンの代わりに5-メチル-2'-デオキシシチジンおよび5-プロモ-2'-デオキシシチジンを用いることが含まれる。5-プロピニル-2'-デオキシリジンおよび5-プロピニル-2'-デオキシシチジンを、それぞれデオキシチミジンおよびデオキシシチジンの代わりに用いると、親和性および生物活性を増加させることができることが示されている。20

【0105】

候補物質は、合成または天然の化合物のライプラリを含む多様な起源から得られる。例えば、幅広い有機化合物および生体分子のランダム合成および計画的合成を行うために、ランダム化オリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含む様々な手段が利用可能である。または、細菌、真菌、植物、および動物抽出物の形での天然化合物のライプラリも利用可能、または容易に産生される。さらに、天然または合成によって産生されたライプラリおよび化合物は、通常の化学、物理、および生化学手段によって容易に改変され、組み合わせライプラリを作製するために用いてもよい。公知の薬理学的物質に、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化等のような計画的またはランダム化学改変を行って、構造類似体を作製してもよい。30

【0106】

そのようなスクリーニングアッセイ法において、核酸構築物（例えば、上記のRNAまたはDNA構築物）および候補物質を宿主動物に投与して、構築物の活性に及ぼす候補物質の影響を観察して、認められた作用を候補化合物の調節活性に相關させる。候補物質および核酸構築物を、同じまたは異なる時期に本発明の方法に従って宿主に投与してもよく、特定の好ましい態様において、二つの成分を宿主に同時に、例えば単一の液体組成物の形で投与してもよい。代表的なスクリーニングアッセイ法を下記の実験の章に提供する。

【0107】

本発明が用いられるもう一つの研究応用は、遺伝子機能の解明である。特定の遺伝子配列を有するRNAを本発明の方法によって導入して、生物の表現型に及ぼす遺伝子の影響を観察する。遺伝子機能の研究応用のために本発明の方法を用いる利益には、遺伝子調節要素に関係なく遺伝子を発現可能であることが含まれる。本発明の方法が用いられる他の研究応用には、リボザイムおよびアンチセンス有効性に関する研究；RNA代謝に関する研究等が含まれるが、これらに限定されない。40

【0108】

キット

標的細胞、例えば肝細胞にインビボで核酸を輸送する本発明の方法を実践するために用いられるキットも、本発明によって提供される。本発明のキットには一般的に、標的細胞に50

導入されることが望まれる裸の核酸およびRNアーゼ阻害剤とが含まれる。本発明のキットはさらに、水性輸送媒体、例えば緩衝生理食塩液等をさらに含んでもよい。さらに、キットは上記のような競合RNAを含んでもよい。本発明のキットにおいて、上記の成分は宿主に輸送するために単一の水性組成物に配合してもよく、または異なるもしくは個別の組成物として、例えば異なる容器において個別であってもよい。選択的に、キットは、宿主に水性組成物を輸送するための血管内輸送手段、例えばシリンジ等をさらに含んでもよく、輸送手段は水性組成物を予め充填してもしなくてもよい。レポーター遺伝子がインビボでDNAから転写される場合、RNアーゼ阻害剤および競合RNAは必要でない。

【0109】

上記の成分の他に、本発明のキットはさらに、本発明の方法を実践するための説明書を含むであろう。これらの説明書は、多様な形で本発明のキットに存在してもよく、その一つまたは複数がキットに存在してもよい。これらの説明書が存在しうる一つの形は、キットのパッケージ、添付文書等における、適した媒体または基材上の、例えば情報が印刷されている紙片または複数の紙片上の、印刷情報としてである。さらにもう一つの手段は、情報が記録されているコンピューター読み取り可能な媒体、例えばディスクケット、CD等であろう。存在しうるさらにもう一つの手段は、隔たったサイトで情報にアクセスするために、インターネットによって用いられる可能性があるウェブサイトアドレスである。任意の簡便な手段がキットに存在してもよい。

【0110】

以下の実施例は本発明を説明するためであって、本発明を制限するためには提供するのではない。

【0111】

実験

1. 哺乳類におけるRNAi

A. 本発明者らは、ルシフェラーゼmRNAを発現するプラスミド(pCMVGL3) 2 μgを、以下の処方に沿って、PBS 1.8 ml、RNasin 1200単位、および競合RNA 40 μgと共に混合して同時輸送した：

- 1) (1群、RNAなし) 無処置対照としてPBS 1.8 ml;
- 2) (2群、アンチセンスRNA) : 配列

UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' (配列番号:01)

30

(デオキシチミジレート残基をdTで示し、残りのヌクレオチドはリボヌクレオチドである)を有するアンチセンス方向の21量体RNA/DNAキメラ20 μgと混合したPBS 1.8 ml; または

- 3) (3群、RNAi) 配列

5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3')(配列番号:02)

を有するそのセンス相補鎖20 μgにアニーリングした上記のアンチセンス21量体20 μgと混合したPBS 1.8 ml。

【0112】

オリゴヌクレオチドは、アデノシン三磷酸およびT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてキナーゼ処理した。それぞれの製剤(1~3)は、5週齢の雌性Balb/cマウスへの高圧尾静脈注射によって試験した。注射の5時間、72時間、および96時間後に、ルシフェラーゼ発現の結果として放出された光を上記のように測定した。この実験の結果を下記の表に要約する。数値は相対光単位として表記した。

40

| | 1群 | 1群 | 2群 | 2群 | 3群 | 3群 |
|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 標準 | | 標準 | | 標準 | |
| | 誤差 | | 誤差 | | 誤差 | |
| | RNAなし | | アンチセンス | | RNAi | |
| 3 時間 | 1.11×10^9 | 2.05×10^8 | 1.29×10^9 | 7.90×10^7 | 7.90×10^8 | 3.54×10^7 |
| 72 時間 | 6.60×10^5 | 7.57×10^5 | 5.41×10^5 | 9.91×10^5 | 8.23×10^5 | 2.86×10^5 |
| 96 時間 | 3.41×10^5 | 4.50×10^5 | 2.72×10^5 | 5.25×10^5 | 4.61×10^5 | 6.77×10^4 |

【 0 1 1 3 】

上記の結果は、RNAi(3群)が成体哺乳類の肝臓においてルシフェラーゼRNAの破壊を引き起こしたことを証明する。この破壊によって、RNAなしまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド単独を投与した動物と比較して、ルシフェラーゼ活性の結果として放出された光が減少した。われわれの知る限り、これは、RNAiが成体哺乳類において有効であることの最初の証明である。本発明の方法は、RNAiが哺乳類において機能する機構を研究するモデル系を提供する。これは同様に、RNAiに基づく治療の開発および最適化にとって有用である。さらに、発現プラスミドを調節物質と共に同時輸送する必要がない。同様に、内因性遺伝子を標的化する調節物質を輸送することができる。

【 0 1 1 4 】

B. ここでは、本発明者らは、RNAiが成体哺乳類における遺伝子発現を抑制できるか否かを試験する。本発明者らは、小さい合成干渉RNA(siRNA)がインビボで遺伝子発現の強力な阻害剤であることを発見した。さらに、小さいヘアピンRNA(shRNA)も同様に有効である。特に、これらのRNAi物質は、合成RNAとして、またはDNA発現構築物からインビボで転写されたRNAのいずれかとして輸送することができる。これらの研究は、RNAiが治療ツールとして開発されうることを示し、通常の遺伝子治療戦略と共に用いることができるることを証明している。

【 0 1 1 5 】

1. siRNA

本発明者らは、裸のRNAの効率的な輸送を行うために、既存の流体力学トランスフェクション法(J. Chang、L.J. Sigal、A. Lerro、J. Taylor、J. Virol. 75: 3469~73(2001))を改変した。ホタルのルシフェラーゼ由来するsiRNAまたは無関係なsiRNAのいずれかを、ルシフェラーゼ発現プラスミド(図1に構築物の説明)と共に同時注射した。ルシフェラーゼ発現を、生きている動物において、ルシフェラーゼ基質(4)の注射後の定量的全身造影を用いてモニターしたところ、注射したレポータープラスミドの量およびトランスフェクション後の時間に依存的であった(データは示していない)。代表的な動物を図2Aに示す。これらの結果の定量を図2Bに示す。

【 0 1 1 6 】

それぞれの実験において、同時注射したヒト-hAAT(S.R. Yantら、Nat. Genet. 25: 35~41(2000))をコードするプラスミドの血清測定値を内部対照としてトランスフェクション効率を標準化して、非特異的翻訳阻害をモニターした。74時間での血清hAATレベルの平均値は、動物のそれぞれの群において類似であった。

【 0 1 1 7 】

本発明者らの結果は、成体マウスにおいてルシフェラーゼ発現がsiRNAによって特異的に阻害されることを示している($p < 0.0115$) ; 無関係なsiRNAは作用を示さなかった($p < .864$)。異なる11回の実験において、ルシフェラーゼsiRNAはルシフェラーゼ発現(放出光)を平均で81%($\pm 2.2\%$)減少させた。

【 0 1 1 8 】

2. shRNA

ホタルのルシフェラーゼまたはウミシイタケのルシフェラーゼを標的とする短いヘアピンRNA(shRNA)を、T7ポリメラーゼインビトロランオフ(runoff)転写によって合成した。これらのインビトロで転写されたRNAをpGL3-対照DNAと共に同時トランスフェクトすると、培養におけるホタルのルシフェラーゼ発現が減少した(Paddisonら、Genes Dev. 16(8)

10

20

30

40

50

: 948 ~ 58 (2002))。これらのヘアピンRNAがマウスにおいて機能的であるか否かを試験するために、本発明者らは、インビトロで転写されたルシフェラーゼshRNA(または対照としてウミシイタケのshRNA) 40 μg、pGL3-対照DNA 2 μg、pThAAT 2 μg、RNasin 800 単位およびPBS 1.8 mlをマウスに流体力学的にトランスフェクトした。ホタルのルシフェラーゼshRNAを投与した72時間後にマウスから放出された光は、無処置対照と比較して平均で95% (± 1.4%) 減少した。ウミシイタケのshRNAを投与したマウスから放出された光はごくわずかに減少したに過ぎなかった。意外にも、T7転写録型DNAとT7タンパク質を発現するプラスミドとの同時トランスフェクションによって、培養またはマウスにおけるルシフェラーゼレポーター活性の如何なる減少も起らなかった(データは示していない)。

10

【 0 1 1 9 】

ホタルのルシフェラーゼshRNA配列 (5' から 3')

GGUCGAAGUACUCAGCGUAAGUGAUGCACUUAAAGUGGGUGUUGUUUGUG
UUGGGUGUUUUGGUU (配列番号 :11)

【 0 1 2 0 】

ウミシイタケのルシフェラーゼshRNA配列 (5' から 3')

GGGAUGGACGAUGGCCUUGAUCUUGUUACCGUCACACCCACCACUGGGAG
AUACAAGAUCAAGGCCAUCGUCUUCU (配列番号 :12)

20

【 0 1 2 1 】

上記の結果は、短いインビトロ転写されたヘアピンが同様にインビボでのルシフェラーゼ発現を減少させたことを示している。

【 0 1 2 2 】

3. 結論

上記のデータは、成体マウスにおける遺伝子発現を下方調節できることを証明している。

【 0 1 2 3 】

C. C型肝炎ウイルス (HCV) は、世界で40人に1人に感染するRNAウイルスであり、西欧社会において肝移植の最も一般的な基礎原因である。RNAiをヒト病原体に対して向けることができるか否かを決定するために、マウス肝臓においてHCV RNAを標的とする能力についていくつかのsiRNAを試験した。本発明者らは、HCV配列をルシフェラーゼRNAに融合させたレポーター戦略を用いて、RNAiをインビボでの同時トランスフェクションによってモニターした。HCV内部リボソーム進入部位およびコアタンパク質コード領域を標的とするsiRNAは、ルシフェラーゼ発現を阻害することができなかった。対照的に、キメラHCV NS5Bタンパク質-ルシフェラーゼ融合RNAのNS5B領域を標的とするsiRNAは、ルシフェラーゼ発現を75% (± 6.8%) 減少させた。これらの結果は、重要なヒト病原体を標的するためにRNAiを治療的に用いる有用性を示している。

30

【 0 1 2 4 】

D. これらのデータから、siRNAはマウスにおいて機能的であることは明白である。遺伝子抑制を誘導するために等しく有効である機能的shRNAは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターを用いてDNA録型からインビボで発現させることができる(Paddisonら、提出)。同起源のshRNA (pShh1-Ff1) の発現は、ルシフェラーゼ発現の98% (± 0.6%)までの抑制を誘導し、3回の独立した実験において平均で92.8% (± 3.39%) 抑制した(図2Cおよび2D)。空のshRNA発現ベクターは、作用を示さなかった(データは示していない)。さらに、shRNAインサートの方向を逆転させる(pShh1-Ff1rev)と、RNAポリメラーゼIIIによる終結が変化したことおよび不適切に構築されたshRNAがその後產生されたことにより、沈黙化が消失した(Paddisonら、提出)。これらのデータは、プラスミドコードshRNAが成体マウスにおいて強力かつ特異的RNAi反応を誘導できることを示している。さらに、本発明のRNAi輸送法は、遺伝子移入ベクターの開発においてなされた有意な進歩を利用するよう作製することができるることを証明している。

40

50

【0125】

既存の遺伝子治療戦略は、治療的結果を得るために外因性のタンパク質の異所発現に大きく依存している。その発見以来、RNAiは、疾患関連遺伝子を沈黙化する手段を提供することによって、これらの機能獲得アプローチを補完する見込みを有する。併せて考慮すると、本発明者らの結果は、小さいヘアピンRNAの発現を導くDNA構築物を用いて、成体哺乳類においてRNAiが誘導されうることを示している。これらの結果は、本発明が広範囲の疾患に治療的RNAiを適用するためのウイルスおよび非ウイルス輸送系を提供することを示している。

【0126】

II. 裸のRNAの流体力学輸送

10

A. 緒言

特に明記していない限り、全ての実験において、RNAおよびDNAをRNasinの表記の量に加えて、PBSの最終容積を1.4~1.8 mlとした。この溶液をマウスの尾静脈に4~5秒間注射した。これらの実験において用いたRNAは全て、mMessage Machineキットを用いて合成して、RNeasyキット（いずれもキアゲン社（Qiagen Inc.）製）を用いて精製した。しかし、RNAを精製する必要はなく、同様に役立つはずである他の精製法が存在する。本明細書に一覧で示した全ての実験において用いたRNasinは、特に明記していなければヒト胎盤から精製した天然のRNasin（プロメガ社（Promega Inc.）から購入）であった。ルシフェラーゼ試料に関しては、表記の時間において、マウスにルシフェリン（1.5 μg/g体重）を腹腔内投与して、マウスから放出された光を測定した。バックグラウンドは～ 2×10^2 相対光単位である。ヒト第IX因子試料は酵素結合免疫アッセイ法を用いて分析した。

20

【0127】

B. 裸のRNAの流体力学輸送

ルシフェラーゼタンパク質をコードするRNAを以下と共に、生きているマウスに注射した：

- 1) RNアーゼ阻害剤なし；または
- 2) RNアーゼ阻害剤（RNasinと呼ぶ）。

【0128】

全てのRNA試料はまた、RNアーゼ活性の競合的阻害剤として含まれる非キャップ化非ポリアデニル化RNA（競合RNA）を含んだ。それぞれの試料における総RNAを、競合RNAと共に全体で80 μgとなるように調節した。原核細胞プロモーターの制御下でルシフェラーゼタンパク質を発現する陰性対照（下記）DNAも同様に注射した。3時間および6時間で、マウスにルシフェリン（ルシフェラーゼ酵素の基質）の腹腔内注射を行い、マウスから放出された光を測定した。

30

【0129】

結果を表1に要約した。

【0130】

【表1】

40

| 用いた核酸 | マウスの数(N) | 製剤 | 相対光単位(RLU/5分) |
|------------|----------|--------------|-------------------|
| ポリA RNA | 1 | RNasin 4単位 | 1.0×10^6 |
| ポリA RNA | 1 | RNasin 400単位 | 2.0×10^4 |
| ポリAシグナルRNA | 1 | RNasin 4単位 | 7.2×10^4 |
| 鏡型DNA | 1 | なし | バックグラウンドのシグナル |

【0131】

上記の結果は以下であることを示す：

- ・注射したRNAは生きているマウスの肝臓にトランスフェクトされた。

- ・ポリA尾部（ポリA RNA）を有するキャップ化ポリアデニル化RNAは、キャップ化された

50

ポリアデニル化RNAが強いルシフェラーゼシグナルを生じることから、マウス肝臓において翻訳されている。

・ポリAシグナルを有するキャップ化RNA(ポリAシグナルRNA)は、マウス肝臓において翻訳されるが、シグナルはポリA尾部を有するRNAについて認められたシグナルより約100倍低い。

本明細書において記述された全ての実験において用いたRNAは、DNAプラスミドの細菌プロモーターから転写された。このプロモーターは、哺乳類細胞において効率的に機能しないはずである。DNA鑄型はDNアーゼを用いて転写後に除去したが、認められたシグナルがDNAの混入の結果となりうる懸念が常にある。これを制御するために、転写において用いた物と同等の鑄型DNAの量を注射した。シグナルがDNAの混入によるものであれば、この試料はシグナルを生じるはずである。しかし、DNA対照からはシグナルが認められない。10

【0132】

同様に、RNアーゼ阻害剤(RNasinと呼ぶ)を添加すると、用いた用量でシグナルが20倍増加したことから、RNasinの添加が血清ヌクレアーゼによる分解からRNAを保護し、したがって認められるシグナルを増加させることができることが判明した。

【0133】

上記から、以下の結論を得る。裸のRNAの流体力学輸送によって、生きているマウスの肝臓へのRNAの高レベルの移入が起こる。さらに、キャップ化してポリアデニル化したRNAは、ポリアデニル化シグナルを有するがポリA尾部を有しないRNAより良好に作用するが、双方のRNAがシグナルを生じた。RNアーゼ阻害剤を添加するとRNAを分解から保護し、それによってより高いルシフェラーゼシグナルが得られた。最後に、注射したRNAについて認められたシグナルはDNAの混入によるものではない。20

【0134】

C. 系の改良

ルシフェラーゼタンパク質をコードするRNAを、1)高用量もしくは低用量の天然もしくは組み換え型RNasinと共に、または2)RNAを破壊してシグナルを消失させるはずであるRNアーゼT1の処置(陰性対照)後に、生きているマウスに注射した。RNA試料は全て、注射されたRNAの全量が80 μgとなるように非キャップ化非ポリアデニル化競合RNAを含んだ。原核細胞プロモーターの制御下でルシフェラーゼタンパク質を発現する対照DNAも同様に、表記の対照反応において注射した。3時間および6時間目に、マウスにルシフェリンの腹腔内注射を行い、マウスから放出された光を測定した。この実験は主に、第一の実験の結果を確認するためであり、どのパラメータが重要であるかを試験するためのものである。6時間の時点で、RNAを注射したマウス1匹を屠殺して、臓器を摘出し、どの臓器がルシフェラーゼを発現するかを調べた。30

【0135】

結果を表2に要約する。

【0136】

【表2】

| 用いた核酸 | RNA または DNAの マイクロ グラム | マウスの数 (N) | 製剤 | 相対光単位 (RLU/5分) 3時間 | 相対光単位 (RLU/5分) 6時間 | 相対光単位 (RLU/5分) 24時間 |
|----------|-----------------------------------|--------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| ポリ A RNA | 35 | 1 | RNasin(天然) 240単位 | 1.8×10^5 | 1.1×10^6 | バックグラウンド |
| ポリ A RNA | 50 | 1 | RNasin(天然) 240単位 | 1.6×10^6 | 5.4×10^5 | バックグラウンド |
| ポリ A RNA | 50 | 1 | RNasin(天然) 44単位 | 5.5×10^4 | 1.9×10^4 | |
| ポリ A RNA | 10 | 1 | RNasin (組み換え型) 240単位 | 7.7×10^4 | 1.8×10^5 | |
| ポリ A RNA | 50 | 2 | 3000 単位 RNアーゼ T1 | バックグラウンド | バックグラウンド | |
| 錆型 DNA | 2 | 1 | なし | バックグラウンド | バックグラウンド | |

【0137】

上記の結果は以下を証明している：

- ・ RNasinの用量を増加させるとルシフェラーゼ活性レベルが増加することから、RNasinの投与は認められる発現レベルを変化させる。
- ・ 天然および組み換え型RNasinはいずれもRNAを保護する。
- ・ RNAがRNアーゼによって破壊されるとシグナルは消失し、RNAがシグナルに関与していることを示す（陰性対照）。
- ・ 転写に用いたものと同等の錆型DNAの量をDNアーゼ処置を行わずに注射すると、シグナルを認めず、シグナルはDNA混入によるものではないことを証明する。
- ・ 肝臓が唯一のルシフェラーゼ発現部位である。

【0138】

上記から、以下の結論を得る。RNasinの投与は発現レベルに影響を及ぼす。組み換え型および天然のRNasinはいずれも注射したRNAを保護した。錆型DNAを注射した場合、またはRNAをRNアーゼによって破壊した場合にはシグナルを認めず、シグナルがDNAの混入の結果ではないことを示している。最後に、肝臓が唯一のルシフェラーゼ発現部位である。

【0139】

D. 競合RNAは活性を増強する。

キャップ化されかつポリアデニル化されたルシフェラーゼRNA 20 μgのルシフェラーゼ活性を測定した。四つの条件を実験1および2に記載の条件と類似の実験において調べた。

- 1) RNasin 400単位 + 競合RNA；
- 2) 競合RNAを含まないRNasin 40単位；
- 3) 競合RNAを含まないRNasin 800単位；
- 4) 競合RNAを含まないRNasin 1200単位。

3時間、6時間および9時間に、マウスにルシフェリンの腹腔内注射を行い、マウスから放出された光を測定した。

【0140】

結果を表3に要約する。

【0141】

【表3】

| | 競合RNA マイクログラム | RNasin の単位 | マウスの数 (N) | 平均値 (RLU/2分) 3時間 | 平均値 (RLU/2分) 6時間 | 平均値 (RLU/2分) 9時間 |
|------|------------------|---------------|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| RLU | 60 | 400 | 3 | 7.6×10^4 | 1.7×10^4 | 3.5×10^3 |
| 標準誤差 | | | | 3.5×10^4 | 4.2×10^3 | 9.6×10^2 |
| RLU | なし | 400 | 3 | 6.5×10^3 | 4.2×10^3 | 2.6×10^3 |
| 標準誤差 | | | | 1.4×10^3 | 2.8×10^3 | 1.7×10^3 |
| RLU | なし | 800 | 3 | 6.2×10^4 | 8.7×10^3 | 2.0×10^3 |
| 標準誤差 | | | | 3.1×10^4 | 2.5×10^3 | 3.7×10^2 |
| RLU | なし | 1200 | 3 | 7.6×10^4 | 2.2×10^4 | 7.4×10^3 |
| 標準誤差 | | | | 5.4×10^4 | 1.6×10^4 | 4.5×10^3 |

10

20

30

【0142】

上記の結果は以下を証明する：

- ・RNasinの用量を増加するとルシフェラーゼ活性が増加したことから、RNasinはルシフェラーゼ活性を変化させる。最高用量(RNasin 1200単位)は調べた全ての時間において最高の活性を示した。
- ・競合RNAの存在によってルシフェラーゼ活性が増強されたことから、競合RNAを添加すると測定されたルシフェラーゼ活性が増強した。この作用は、RNasinの保護作用と相乗的であった。

【0143】

上記の結果から、以下の結論を得る。競合RNAの添加によってルシフェラーゼシグナルは増加する。さらに、RNasinの用量を増加すると、ルシフェラーゼ活性レベルが増加する。

【0144】

E. 内部リボソーム進入部位を用いるルシフェラーゼのキャップ非依存的翻訳

真核細胞において、RNAのタンパク質への翻訳は、キャップ依存的およびキャップ非依存的翻訳と呼ばれる二つの異なる機構によって起こる。キャップ非依存的翻訳は、内部リボソーム進入部位(IRES)と呼ばれる5'非翻訳領域を必要とする。C型肝炎ウイルス(HCV)、ポリオウイルスおよびA型肝炎ウイルスのようないくつかのRNAウイルスは、キャップ非依存的翻訳を行うためにIRES配列を利用する。本発明者らは当初、抗HCV治療を研究するための小動物モデル系を作製するために用いることができるであろうと考えて、本明細書に記述したRNAトランスクレプション法を開発した。IRES RNAのトランスクレプションも同様に、効率的なIRES機能にとって必要な配列要素を調べるために設計された変異誘発試験のために用いることができるであろう。

【0145】

1. 実験および結果の説明

RNA HCVlucは、5'末端にHCV IRES、およびルシフェラーゼ遺伝子の後にポリA尾部を有する。HCVluc 40 μg + 競合RNA 40 μg + RNasin 20 μlをマウスの尾静脈に注射した。3時間および6時間後、マウスにルシフェリンを腹腔内注射して、マウスから放出される光を測定した。結果：HCV IRESは、注射したHCVルシフェラーゼRNA融合体の翻訳を促進することができた。結果の定量を表4に要約する。

【0146】

【表4】

| | 注射後3時間 | 注射後6時間 |
|-----------|-------------------|-------------------|
| 相対光単位の平均値 | 1.7×10^5 | 4.6×10^4 |
| 標準誤差 | 7.4×10^4 | 1.6×10^4 |

50

【0147】

F. hFIX RNAを注射に応じて、測定可能な血清中濃度のヒト第IX因子（hFIX）タンパク質が産生され、分泌されうる。

ヒト第IXタンパク質は、血友病の患者では産生されない血液凝固タンパク質である。血清中のこのタンパク質レベルは、酵素結合イムノアッセイ（ELISA）によって容易に測定することができる。本発明者らは、二つの理由からこのタンパク質を発現させることを選択した：

1) hFIXは治療関連タンパク質である。hFIXの一過性の発現は臨床的に重要ではないが、慢性的な発現を必要としない他のいくつかのタイプの治療タンパク質を一過性に発現させることが望ましいであろう。

2) hFIXはヒトタンパク質であり、したがってマウスにおいて免疫応答を誘発することができる。

【0148】

RNA注射の一つの応用は、ワクチンの開発および試験である。hFIXの注射によるhFIXに対する免疫応答は、RNAをワクチンとして用いる原理の証明を示すであろう。

【0149】

1. 実験および結果の概要：

キャップ化され、かつポリアデニル化されたhFIX RNA 40 μg + 競合RNA 40 μg + RNasin 800単位をマウス1匹の尾静脈に注射した。結果：40 ng/ml血清がELISAによって6時間目に検出された。この量のhFIXは、ELISAアッセイ法の有意な範囲内である。

【0150】

G. HCVマウスモデルを作製するためのHCVゲノムRNAの流体力学的輸送

1群6匹のマウス2群に以下を注射した：

1) 90 FL HCVと呼ばれる（何らかの非キャップ化RNAを同様に含む）キャップ化HCVの完全長ゲノムRNA 50 μg + キャップ化されかつポリアデニル化されたhFIX RNA 40 μg + RNasin 400単位；または

2) 触媒的に不活性にするレプリカーゼ遺伝子に変異を有する完全長の非感染性HCVゲノムRNA（101 FL HCVと呼ばれる）+ キャップ化およびポリアデニル化hFIX RNA 40 μg + RNasin 400単位。

【0151】

HCV RNAを作製するための転写録型は、Charles Riceおよびワシントン大学から得た。注射の6時間後、マウスから採血してhFIXレベルを測定して注射効率を標準化する。注射したHCV RNAは急速に分解すると予想される。数日後に検出された如何なるRNAもウイルス複製の際に新たに合成されたRNAである可能性がある。これらのマウスの肝臓におけるHCV RNAレベルを測定するために、定量的リアルタイムPCR法が開発されている。ウイルスの複製が起こると、注射の数週間後に測定した場合、90 FL HCVを注射したマウスにおけるHCV RNAレベルは、101 FL HCVを注射したマウスのレベルより高いであろう。組織学的アッセイ法も同様にHCVタンパク質の合成に関してアッセイするために開発されている。異なる三つの陽性転帰が起こる可能性がある：1) RNAは肝臓に入るが翻訳されず複製されない、2) RNAは肝臓に入り翻訳されるが複製されない、3) RNAは肝臓に入り、翻訳されて複製される。三つの転帰は全て有用なモデル系である。1、2または3が起こる場合、この系を用いて、HCV RNAに対して向けられるリボザイムを試験することができるであろう（下記の実験9を参照されたい）。2または3が起これば、この系は、HCV翻訳、複製および感染の阻害剤を試験するために用いることができるであろう。

【0152】

このRNAの注射によって、HCVに関するウイルス複製サイクルは起こらなかった。しかし、別の研究グループはデルタ型肝炎複製サイクルを開始するために類似の方法を用いた。Chang J.、Sigal L.J.、Lerro A.、Taylor J.、J. Virol. 75(7) : 3469 ~ 73 (2001)。

【0153】

H. リボザイムによるHCV RNAのインビボ切断

10

20

30

40

50

HCVのIRESを標的とするDNAザイムは化学合成されている。本発明者らはこれらのリボザイムを流体力学的にマウスに注射して、それらが肝臓において注射したHCV RNAレベルを減少させることができるか否かを評価した。IRESを標的とするDNAザイム5 nmolを、HCV IRE Sの後にホタルのルシフェラーゼコード配列、その後にアデノシン30個が続く配列からなるRNA 20 μgと同時注射した。DNAザイムの配列は、

GAGGTTTAGGAGGCTAGCTACAAACGATCGTGCTCA-3' (配列番号:013)

であった。標的RNAと共にDNAザイムを投与したマウスは、6時間で標的RNAのみを投与したマウスより95%少ない光を放出した。結論：本発明者らは、このDNAザイムがHCV IRESからの翻訳を、おそらくIRES RNA配列を切断することによって、阻害しうることを証明した。
10 合成リボザイムを同様に類似の方法論を用いて試験したところ、無効であることが判明した。

【0154】

I. 本実験は、キャップ化およびポリアデニル化RNAを1回注射した後のルシフェラーゼ発現の経時的变化を調べることである。以下の条件を満たせば、本発明者らは、発現されたタンパク質の分解速度を計算するためにデータの一次指数関数的減衰適合（等式1に記述）を用いることができる。このデータを単純な一次指数関数的減衰に適合させるためには、mRNAの半減期はタンパク質の半減期より有意に短くなければならない（少なくとも5~10倍少ない）。この条件を満たさない場合、mRNAの半減期を考慮に入れたより複雑な数学的関係を用いることができる。この問題に対するもう一つの解決策は、mRNAを非キャップ化にする、または競合RNAを省略することによって、mRNAの半減期を減少させることである。
20

【0155】

所定の時間でのタンパク質の量（またはタンパク質からのシグナル）をA、第一の時点でのタンパク質（またはシグナル）の量をA₀、減衰速度定数をk、および最初の測定後の時間をtと定義すると、等式は以下の形となるであろう：

$$A = A_0 \exp(-kt) \quad (\text{等式1})$$

【0156】

1. 実験の説明：

1群6匹のマウス4群に、キャップ化したポリアデニル化ルシフェラーゼRNA 20 μg + 非キャップ化競合RNA 60 μg + RNasin 800単位を注射した。3時間、6時間、9時間または24時間で、マウスにルシフェリンを腹腔内投与（1.5 μg/g体重）してマウスから放出された光を測定した。
30

【0157】

結果を下記の表に提供する：

| | 投与後時間 | 光単位 | 標準値 | 標準誤差 |
|---|--------|------------|------------|------------|
| 1 | 3.000 | 530000.000 | 330000.000 | 150000.000 |
| 2 | 6.000 | 200000.000 | 88000.000 | 36000.000 |
| 3 | 9.000 | 110000.000 | 43000.000 | 18000.000 |
| 4 | 24.000 | 1900.000 | 1100.000 | 440.000 |

相対光単位を時間に対してプロットして、得られた曲線を等式1に適合させる。この分析により、見かけの分解速度定数は0.297 時間⁻¹である。
40

【0158】

タンパク質の半減期を測定する最も一般的な方法は以下の通りである。一つのアプローチにおいては、タンパク質を精製し、時に標識する（例えば、放射活性ヨウ素によって）。精製タンパク質を注射して、異なる時間に動物から試料を採取し、所定の時間で残っているタンパク質の量を時間に対してプロットすると、曲線は等式1のような等式に適合する。本発明者らの方法の長所は、タンパク質のインビトロ合成または精製を必要としない点である。

【0159】

10

20

30

40

50

J. 本発明者らは、ルシフェラーゼと呼ばれるタンパク質の翻訳を制御するHCV RNAの調節領域を含むRNA(本明細書においてHCV luc RNAと呼ぶ)を構築した。本発明者らはまた、それらが細胞に入ると類似のRNAを発現するDNA発現プラスミド(本明細書においてHCV luc DNAと呼ばれる)も構築した。これらの構築物の図に関しては図3を参照されたい。

【0160】

HCV luc RNAまたはHCV luc DNAのいずれかがマウスにトランスフェクトされると、それは肝臓に入り、HCV luc RNAまたはHCV luc DNAから転写されたRNAがルシフェラーゼタンパク質に翻訳される。様々な時間において、ルシフェラーゼタンパク質の基質、ルシフェリンをマウスに注射する。酵素ルシフェラーゼはルシフェリンを消費して、そのプロセスにおいて光を生成する。マウスから放出された光の量は、試料採取時に存在するルシフェラーゼタンパク質の量と比例する。

【0161】

本発明者らは、モルフォリノオリゴとして知られるタイプの短い合成オリゴヌクレオチドを合成した。本発明者らは、モルフォリノオリゴ1 nmolをHCV luc RNA 10 μgまたはHCV luc DNA 1 μgと混合した。モルフォリノオリゴは、ジーンツールズ(Gene Tools, LLCコーバリス、オレゴン州)が製造し、配列

TCTTGAGGTTAGGATTCTGCTC-3'(配列番号:14)

を有する。次に混合物に緩衝液1.8 mlを加えて、本発明者らのこれまでの出願に記述されるようにマウスの尾静脈に高圧下で注射する。対照として、阻害剤を含まない混合物を他のマウスに注射する。阻害剤の存在下では、放出光は90%以上減少する。本発明者らは、この知見から、注射したRNAの翻訳または注射したDNAから産生されたRNAの翻訳が、アンチセンス機構によって阻害剤によって阻害されると結論する。RNAを注射した場合、細胞におけるRNAの安定性が限られているために、本発明者らはこの阻害を約24時間追跡できたに過ぎなかった。DNAを注射した場合、本発明者らは、翻訳を約8日間モニターすることができる。翻訳の阻害は、本発明者らがこの系において翻訳を測定することができる全ての期間持続した。

【0162】

K.

実験A

対照群：HCV IRESおよびルシフェラーゼレポーター配列を含むRNAをマウスに注射し、それらは、このRNAがルシフェラーゼタンパク質に翻訳されると発光する。

【0163】

試験群：阻害剤をRNAと共に同時注射する。いずれも同じ細胞に移動する。阻害は、対照群と比較した活性(発光)として表記する。

【0164】

実験B

標的RNAをコードするDNAを阻害剤と共に注射したことを除いては実験Aと同じ。DNAはマウス肝細胞の核に移動して、転写されて標的RNAを生じる。このRNAは細胞の細胞質に移動してそこで阻害剤と相互作用する。

【0165】

これらの実験において用いた構築物を図4に提供する。アンチセンスおよびDNAザイム阻害剤によるこれらの実験の結果を図5A～5Fに提供する。

【0166】

阻害剤およびRNA/DNAを同時投与する上記のスクリーニングプロトコールは、薬物輸送の問題を薬物有効性の問題と区別できることから、重要な長所を提供する。

【0167】

上記の結果および考察から、本発明の方法および組成物が、多様な異なる学術的および治療応用のために用いることができる、胚以外の哺乳類生物においてRNAi物質を用いる実現可能な方法を、本発明が提供することは明らかである。さらに、本発明の方法は、標的細

10

20

30

40

50

胞に核酸を移入する改善された方法を提供する。特に、本発明は、ウイルスベクターを用いない裸の核酸移入に関する非常に効率的なインビオ法を提供し、したがって、核酸移入に関する先行技術の方法に対して多くの長所を提供する。そのため本発明は、当技術分野に有意な貢献をする。

【0168】

本明細書において引用した全ての刊行物および特許出願は、それぞれの個々の刊行物または特許出願が特にかつ個々に参照として本明細書に組み入れられることが示されているかのように、参照として本明細書に組み入れられる。如何なる刊行物の引用も、提出日以前にその開示がなされたためであり、先行発明に基づきそのような刊行物に先立つ権利が本発明には与えられないことを自認したと解釈すべきではない。

10

【0169】

前述の本発明は、理解を明快にする目的で説明および実施例によって幾分詳細に記述してきたが、添付の特許請求の範囲の趣旨および範囲から逸脱することなく特定の変更および改変を本発明に行ってもよいことは、本発明の教示に照らして当業者に容易に明らかであると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0170】

【図1】上記のRNAi実験において用いられる発現構築物を提供する。

【図2】成体マウスにおけるRNA干渉。図2A) ルシフェラーゼプラスミドpGL3-対照と、si RNAなし(左)、ルシフェラーゼsiRNA(中央)、または無関係なsiRNA(右)とを同時トランスクレクトしたマウスから放出された光の代表的な画像。グレースケールの参考画像(方向づけのため)上で重ねた放出光強度(赤が最も強く、青が最も弱い)を表す疑似カラー画像から、RNAiが成体哺乳類において機能することが示される。アニールした21量体siRNA(Dharmacon) 40 μgを、pGL3-対照DNA 2 μgおよびRNasin(Promega) 800単位と共にPBS 1.8 ml中でマウスの肝臓に5~7秒間同時注射した。最初の注入の72時間後、マウスを麻酔して造影の15分前にルシフェリン3 mgを腹腔内投与した。図2B) siRNAデータの概要。ルシフェラーゼsiRNAを投与したマウスは、無処置対照より有意に少ない光を放出した。一元配置ANOVA分析を行った後にFisher検定を行った。無処置および無関係なsiRNA群は統計学的に類似であった。図2C) pShh1-Ff1(中央)は、無処置対照(左)と比較してマウスにおけるルシフェラーゼ発現を減少させたが、pShh1-Ff1revは、減少させなかった。pShh1-Ff1またはpShh1-rev 10 μgを、PBS 1.8 ml中でpLuc-NS5B 40 μgと同時注入した。図2D) pShh1データの定量。動物は、NIH動物飼育ガイドラインおよびスタンフォード大学ガイドラインに従って処置した。

20

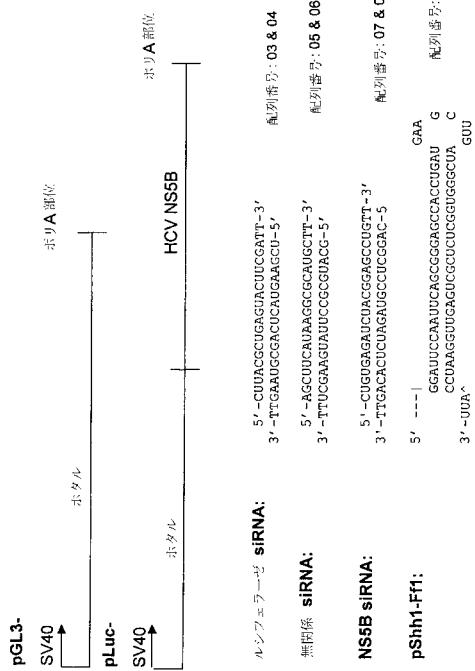
【図3】上記の実験の章で行うモルフォリノホスホロアミデートアンチセンスHCV阻害アッセイ法において用いられる構築物の略図を示す。

30

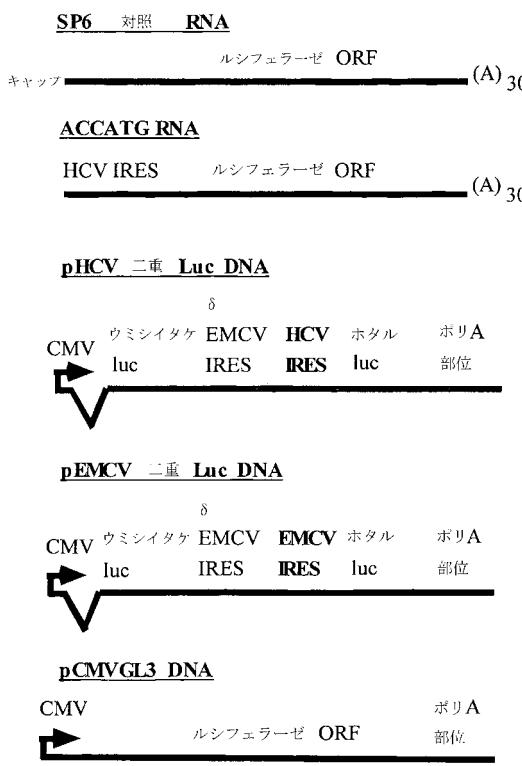
【図4】アンチセンス阻害剤の機構に関する背景となる情報を示す。

【図5】本発明に従って行ったモルフォリノホスホロアミデートアンチセンスHCV阻害アッセイのグラフによる結果を示す。

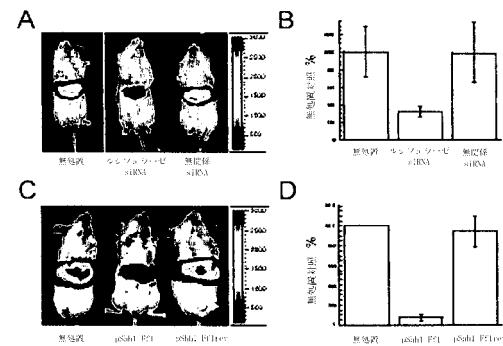
【 図 1 】



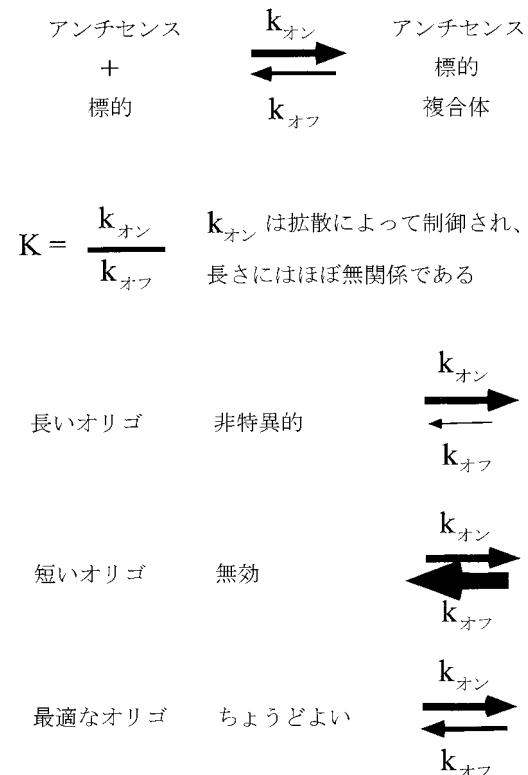
【図3】



【 四 2 】



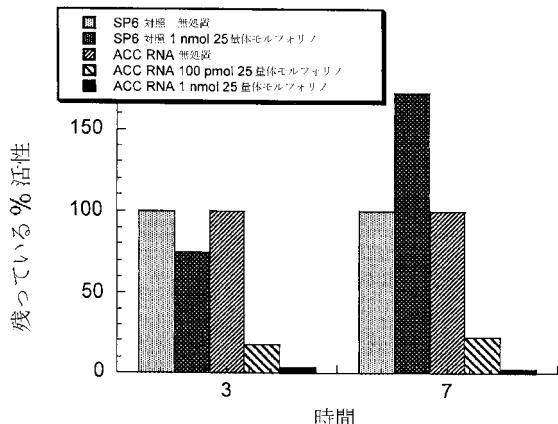
【 四 4 】



【図5A】

SP6対照 RNAはHCV IRESを含まず、このRNAの翻訳はモルフォリノアンチセンスによって阻害されないはずである。実際阻害されない。ACC RNAはIRESを含み、その翻訳は阻害される。

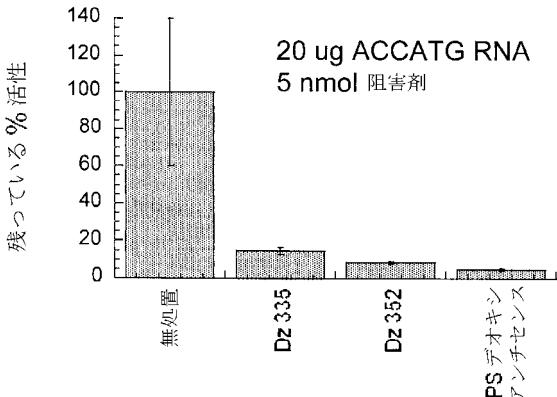
ACCATG RNA翻訳のモルフォリノ25量体阻害



【図5B】

DNAザイムDz335およびDz352と共にアンチセンス分子Psデオキシは、HCV IRESに結合することによってACCATG RNA(ACC RNAと同じ)の翻訳を阻害する。

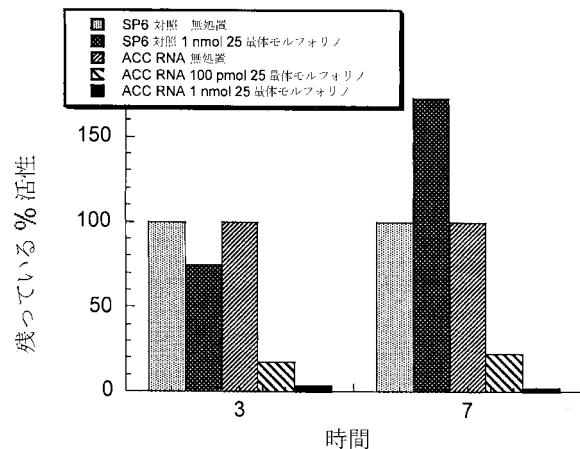
DzsおよびPsデオキシアンチセンスによるACCATG RNA阻害



【図5C】

アンチセンス分子モルフォリノ25量体は、HCV IRESを含むACCATG RNAの翻訳を阻害するが、HCV IRESを含まないSP6対照は阻害しない。この阻害は用量依存的である。

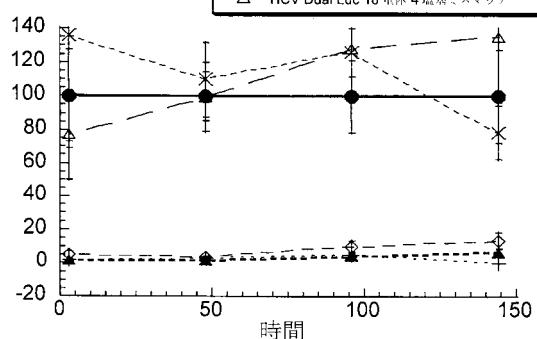
ACCATG RNA翻訳のモルフォリノ25量体阻害



【図5D】

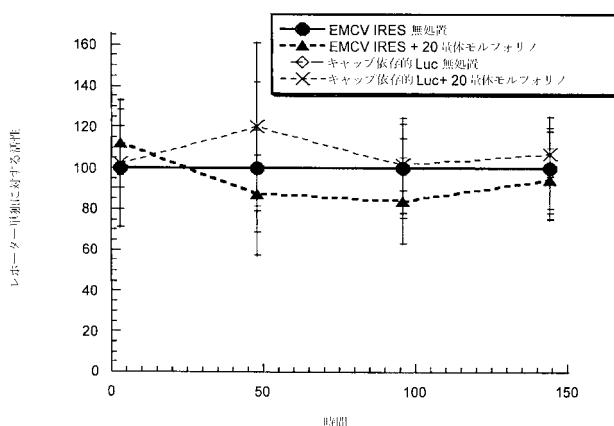
アンチセンス分子モルフォリノ25量体は、HCV二重lucから転写されたRNAを含むIRESの翻訳を阻害する。しかし、4塩基ミスマッチ对照も同様に阻害することからこの阻害は特異的ではない。より短いオリゴ、モルフォリノ20量体も同様に阻害するが、4塩基ミスマッチが阻害しないことから特異的である。

- HCV Dual Luc 無処置
- ▲ HCV Dual Luc 25量体
- △ HCV Dual Luc 25量体4塩基ミスマッチ
- × HCV Dual Luc 25量体逆方向配列
- △ HCV Dual Luc 18量体
- △ HCV Dual Luc 18量体4塩基ミスマッチ



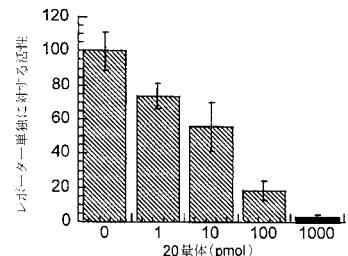
【図5E】

プラスミドEMCV二重lucおよびCMVGL3はHCV IRESを含まず、ルシフェラーゼ翻訳はモルフォリノアンチセンスによって阻害されないはずである。実際阻害されないACCATG RNAおよびHCV二重lucについて認められた阻害もまた特異的であることを示している。



【図5F】

20量体モルフォリノによるHCV二重lucの阻害は、アンチセンス阻害剤に関して予想されるように1~1000pmol/マウスのあいだで用量依存的である。



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 February 2003 (06.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/010180 A1(51) International Patent Classification⁵: C07H 21/02,
21/04, A61K 31/70, A01K 67/00(74) Agent: FIELD, Bret, E.; Bozicevic, Field & Francis,
LLP, 200 Middlefield Road, Suite 200, Menlo Park, CA
94025 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/22869

(81) Designated States (national): AU, CA, JP.

(22) International Filing Date: 19 July 2002 (19.07.2002)

(84) Designated States (regional): European patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/307,411 23 July 2001 (23.07.2001) US
60/360,664 27 February 2002 (27.02.2002) US(74) with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(71) Applicant: THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LE-
LAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY [US/US:
900 Welch Road, Suite 350, Palo Alto, CA 94304 (US)].For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(72) Inventors: KAY, Mark: 565 Casita Way, Los Altos, CA
94022 (US). MCCAFFREY, Anton: 77 Paloma, #204,
Pacifica, CA 94044 (US).

WO 03/010180 A1

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNAI MEDIATED INHIBITION OF GENE EXPRESSION IN MAMMALS

(57) Abstract: Methods and compositions are provided for modulating, e.g., reducing, coding sequence expression in mammals. In the subject methods, an effective amount of an RNAi agent, e.g., an interfering ribonucleic acid (such as an siRNA or shRNA) or a transcription template thereof, e.g., a DNA encoding an shRNA, is administered to a non-embryonic mammal, e.g., via a hydrodynamic administration protocol. Also provided are RNAi agent pharmaceutical preparations for use in the subject methods. The subject methods and compositions find use in a variety of different applications, including academic and therapeutic applications.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNAI MEDIATED INHIBITION OF GENE EXPRESSION IN MAMMALS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

Pursuant to 35 U.S.C. § 119 (e), this application claims priority to the filing
5 date of the United States Provisional Patent Application Serial No. 60/307,411 filed
July 23, 2001 and United States Provisional Patent Application Serial No.
60/360,664 filed February 27, 2002; the disclosures of which are herein
incorporated by reference.

INTRODUCTION

10 Field of the Invention

The field of this invention is RNAi.

Background of the Invention

Double-stranded RNA induces potent and specific gene silencing through a
process referred to as RNA interference (RNAi) or posttranscriptional gene silencing
15 (PTGS). RNAi is mediated by RNA-induced silencing complex (RISC); a sequence-
specific, multicomponent nuclease that destroys messenger RNAs homologous to
the silencing trigger. RISC is known to contain short RNAs (approximately 22
nucleotides) derived from the double-stranded RNA trigger.

RNAi has become the method of choice for loss-of-function investigations in
20 numerous systems including, *C. elegans*, *Drosophila*, fungi, plants, and even
mammalian cell lines. To specifically silence a gene in most mammalian cell lines,
small interfering RNAs (siRNA) are used because large dsRNAs (>30 bp) trigger the
interferon response and cause nonspecific gene silencing.

To date, the Applicants are not aware of any report of successful application
25 of RNAi technology to non-embryonic mammalian organisms. Demonstration that
RNAi works in non-embryonic mammalian organisms would provide for a number of
important additional applications for RNAi technology, including both research and
therapeutic applications, and is therefore of intense interest.

Relevant Literature

30 WO 01/68836. See also: Bernstein et al., RNA (2001) 7: 1509-1521;
Bernstein et al., Nature (2001) 409:363-366; Billy et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA
(2001) 98:14428-33; Caplan et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2001) 98:9742-7;

WO 03/010180

PCT/US02/22869

Carthew et al., Curr. Opin. Cell Biol (2001) 13: 244-8; Elbashir et al., Nature (2001) 411: 494-498; Hammond et al., Science (2001) 293:1146-50; Hammond et al., Nat. Ref. Genet. (2001) 2:110-119; Hammond et al., Nature (2000) 404:293-296; McCaffrey et al., Nature (2002) 418:38-39; and McCaffrey et al., Mol. Ther. (2002) 5:676-684; Paddison et al., Genes Dev. (2002) 16:948-958; Paddison et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2002) 99:1443-48; Sui et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2002) 99:5515-20.

U.S. Patents of interest include 5,985,847 and 5,922,687. Also of interest is WO/11092. Additional references of interest include: Acsadi et al., New Biol. (Jan. 1991) 3:71-81; Chang et al., J. Virol. (2001) 75:3469-3473; Hickman et al., Hum. Gen. Ther. (1994) 5:1477-1483; Liu et al., Gene Ther. (1999) 6:1258-1266; Wolff et al., Science (1990) 247: 1465-1468; and Zhang et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10:1735-1737; and Zhang et al., Gene Ther. (1999) 7:1344-1349.

15 SUMMARY OF THE INVENTION

Methods and compositions are provided for modulating, e.g., reducing, coding sequence expression in mammals. In the subject methods, an effective amount of an RNAi agent, e.g., an interfering ribonucleic acid (such as an siRNA or shRNA) or a transcription template thereof, e.g., a DNA encoding an shRNA, is administered to a non-embryonic mammal, e.g., via a hydrodynamic administration protocol. Also provided are RNAi agent pharmaceutical preparations for use in the subject methods. The subject methods and compositions find use in a variety of different applications, including academic and therapeutic applications.

25 BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 provides expression constructs employed in the RNAi experiments described below.

Figures 2A to 2D: RNA interference in adult mice. Figure 2A) Representative images of light emitted from mice co-transfected with the luciferase plasmid pGL3-30 Control and either no siRNA (left), luciferase siRNA (middle) or unrelated siRNA (right). A pseudocolor image representing intensity of emitted light (red most and blue least intense) superimposed on a grayscale reference image (for orientation) shows that RNAi functions in adult mammals. Forty µg of annealed 21-mer siRNAs

WO 03/010180

PCT/US02/22869

(Dharmacon) were co-injected into the livers of mice with the 2 µg of pGL3-Control DNA and 800 units of RNasin (Promega) in 1.8 ml of PBS in 5-7 seconds. Seventy two hours after the original injection, mice were anesthetized and given 3 mg of luciferin intraperitoneally 15 min prior to imaging. Figure 2B) Summary of siRNA data. Mice receiving luciferase siRNA emitted significantly less light than untreated controls. A one-way ANOVA analysis with a post hoc Fisher's test was conducted. The untreated and unrelated siRNA groups were statistically similar. Figure 2C) pShh1-Ff1 (center) but not pShh1-Ff1rev (right) reduced luciferase expression in mice compared to the untreated control (left). 10 µg of pShh1-Ff1 or pShh1-rev 10 were co-injected with 40 µg of pLuc-NS5B in 1.8 ml of PBS. Figure 2D) Quantitation of pShh1 data. Animals were treated according to NIH Guidelines for Animal Care and the Guidelines of Stanford University.

Figure 3 provides a schematic representation of the constructs employed in the morpholino phosphoramidate antisense HCV inhibition assay performed in the 15 Experimental Section, below.

Figure 4 provides background information of the mechanism of antisense inhibitors.

Figures 5A to 5F provide graphical results of a morpholino phosphoramidate antisense HCV inhibition assay performed according to the subject invention.

20

DEFINITIONS

For convenience, certain terms employed in the specification, examples, and appended claims are collected here.

As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of 25 transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a genomic integrated vector, or "integrated vector", which can become integrated into the chromosomal DNA of the host cell. Another type of vector is an episomal vector, i.e., a nucleic acid capable of extra-chromosomal replication in an appropriate host, e.g., a eukaryotic or prokaryotic host cell. Vectors capable of directing the expression of genes to 30 which they are operatively linked are referred to herein as "expression vectors". In the present specification, "plasmid" and "vector" are used interchangeably unless otherwise clear from the context.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

As used herein, the term "nucleic acid" refers to polynucleotides such as deoxyribonucleic acid (DNA), and, where appropriate, ribonucleic acid (RNA). The term should also be understood to include, as applicable to the embodiment being described, single-stranded (such as sense or antisense) and double-stranded polynucleotides.

5 As used herein, the term "gene" or "recombinant gene" refers to a nucleic acid comprising an open reading frame encoding a polypeptide of the present invention, including both exon and (optionally) intron sequences. A "recombinant gene" refers to nucleic acid encoding such regulatory polypeptides, that may optionally include intron sequences that are derived from chromosomal DNA. The term "intron" refers to a DNA
10 sequence present in a given gene that is not translated into protein and is generally found between exons. As used herein, the term "transfection" means the introduction of a nucleic acid, e.g., an expression vector, into a recipient cell by nucleic acid-mediated gene transfer.

A "protein coding sequence" or a sequence that "encodes" a particular polypeptide or peptide, is a nucleic acid sequence that is transcribed (in the case of DNA) and is translated (in the case of mRNA) into a polypeptide *in vitro* or *in vivo* when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' (amino) terminus and a translation stop codon at the 3' (carboxy) terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, cDNA from
15 prokaryotic or eukaryotic mRNA, genomic DNA sequences from prokaryotic or eukaryotic DNA, and even synthetic DNA sequences. A transcription termination sequence will
20 usually be located 3' to the coding sequence.

Likewise, "encodes", unless evident from its context, will be meant to include DNA sequences that encode a polypeptide, as the term is typically used, as well as DNA
25 sequences that are transcribed into inhibitory antisense molecules.

The term "loss-of-function", as it refers to genes inhibited by the subject RNAi method, refers a diminishment in the level of expression of a gene when compared to the level in the absence of the RNAi agent.

The term "expression" with respect to a gene sequence refers to transcription of the
30 gene and, as appropriate, translation of the resulting mRNA transcript to a protein. Thus, as will be clear from the context, expression of a protein coding sequence results from transcription and translation of the coding sequence.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

"Cells," "host cells" or "recombinant host cells" are terms used interchangeably herein. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell but to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein.

By "recombinant virus" is meant a virus that has been genetically altered, e.g., by the addition or insertion of a heterologous nucleic acid construct into the particle.

As used herein, the terms "transduction" and "transfection" are art recognized and 10 mean the introduction of a nucleic acid, e.g., an expression vector, into a recipient cell by nucleic acid-mediated gene transfer. "Transformation", as used herein, refers to a process in which a cell's genotype is changed as a result of the cellular uptake of exogenous DNA or RNA, and, for example, the transformed cell expresses a dsRNA construct.

"Transient transfection" refers to cases where exogenous DNA does not integrate 15 into the genome of a transfected cell, e.g., where episomal DNA is transcribed into mRNA and translated into protein.

A cell has been "stably transfected" with a nucleic acid construct when the nucleic acid construct is capable of being inherited by daughter cells.

As used herein, a "reporter gene construct" is a nucleic acid that includes a 20 "reporter gene" operatively linked to at least one transcriptional regulatory sequence. Transcription of the reporter gene is controlled by these sequences to which they are linked. The activity of at least one or more of these control sequences can be directly or indirectly regulated by the target receptor protein. Exemplary transcriptional control sequences are promoter sequences. A reporter gene is meant to include a promoter-reporter gene construct that is heterologously expressed in a cell.

As used herein, "transformed cells" refers to cells that have spontaneously converted to a state of unrestrained growth, i.e., they have acquired the ability to grow through an indefinite number of divisions in culture. Transformed cells may be characterized by such terms as neoplastic, anaplastic and/or hyperplastic, with respect 30 to their loss of growth control. For purposes of this invention, the terms "transformed phenotype of malignant mammalian cells" and "transformed phenotype" are intended to encompass, but not be limited to, any of the following phenotypic traits associated with

WO 03/010180

PCT/US02/22869

cellular transformation of mammalian cells: immortalization, morphological or growth transformation, and tumorigenicity, as detected by prolonged growth in cell culture, growth in semi-solid media, or tumorigenic growth in immuno-incompetent or syngeneic animals.

5 As used herein, "proliferating" and "proliferation" refer to cells undergoing mitosis.

As used herein, "immortalized cells" refers to cells that have been altered via chemical, genetic, and/or recombinant means such that the cells have the ability to grow through an indefinite number of divisions in culture.

10 The "growth state" of a cell refers to the rate of proliferation of the cell and the state of differentiation of the cell.

"Inhibition of gene expression" refers to the absence (or observable decrease) in the level of protein and/or mRNA product from a target gene. "Specificity" refers to the ability to inhibit the target gene without manifest effects on other genes of the cell. The 15 consequences of inhibition can be confirmed by examination of the outward properties of the cell or organism (as presented below in the examples) or by biochemical techniques such as RNA solution hybridization, nuclease protection, Northern hybridization, reverse transcription, gene expression monitoring with a microarray, antibody binding, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Western blotting, radioimmunoassay (RIA), other 20 immunoassays, and fluorescence activated cell analysis (FACS). For RNA-mediated inhibition in a cell line or whole organism, gene expression is conveniently assayed by use of a reporter or drug resistance gene whose protein product is easily assayed. Such reporter genes include acetohydroxyacid synthase (AHAS), alkaline phosphatase (AP), beta galactosidase (LacZ), beta glucuronidase (GUS), chloramphenicol acetyltransferase (CAT), 25 green fluorescent protein (GFP), horseradish peroxidase (HRP), luciferase (Luc), nopaline synthase (NOS), octopine synthase (OCS), and derivatives thereof multiple selectable markers are available that confer resistance to ampicillin, bleomycin, chloramphenicol, gentamycin, hygromycin, kanamycin, lincomycin, methotrexate, phosphinothricin, puromycin, and tetracycline.

30 Depending on the assay, quantitation of the amount of gene expression allows one to determine a degree of inhibition which is greater than 10%, 33%, 50%, 90%, 95% or 99% as compared to a cell not treated according to the present invention. Lower doses of

WO 03/010180

PCT/US02/22869

administered active agent and longer times after administration of active agent may result in inhibition in a smaller fraction of cells (e.g., at least 10%, 20%, 50%, 75%, 90%, or 95% of targeted cells). Quantitation of gene expression in a cell may show similar amounts of inhibition at the level of accumulation of target mRNA or translation of target protein. As an example, the efficiency of inhibition may be determined by assessing the amount of gene product in the cell: mRNA may be detected with a hybridization probe having a nucleotide sequence outside the region used for the inhibitory double-stranded RNA, or translated polypeptide may be detected with an antibody raised against the polypeptide sequence of that region.

10

DESCRIPTION OF THE SPECIFIC EMBODIMENTS

Methods and compositions are provided for modulating, e.g., reducing, coding sequence expression in mammals. In the subject methods, an effective amount of an RNAi agent, e.g., an interfering ribonucleic acid (such as an siRNA or shRNA) or a transcription template thereof, e.g., a DNA encoding an shRNA, is administered to a non-embryonic mammal, e.g., via a hydrodynamic administration protocol. Also provided are RNAi agent pharmaceutical preparations for use in the subject methods. The subject methods and compositions find use in a variety of different applications, including academic and therapeutic applications.

20

Before the subject invention is described further, it is to be understood that the invention is not limited to the particular embodiments of the invention described below, as variations of the particular embodiments may be made and still fall within the scope of the appended claims. It is also to be understood that the terminology employed is for the purpose of describing particular embodiments, and is not intended to be limiting. Instead, the scope of the present invention will be established by the appended claims.

In this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an" and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood to one of ordinary skill in the art to which this invention belongs.

Where a range of values is provided, it is understood that each intervening value, to the tenth of the unit of the lower limit unless the context clearly dictates

WO 03/010180

PCT/US02/22869

otherwise, between the upper and lower limit of that range, and any other stated or intervening value in that stated range, is encompassed within the invention. The upper and lower limits of these smaller ranges may independently be included in the smaller ranges, and are also encompassed within the invention, subject to any 5 specifically excluded limit in the stated range. Where the stated range includes one or both of the limits, ranges excluding either or both of those included limits are also included in the invention.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood to one of ordinary skill in the art to 10 which this invention belongs. Although any methods, devices and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, representative methods, devices and materials are now described.

All publications mentioned herein are incorporated herein by reference for the purpose of describing and disclosing the components that are described in the 15 publications which might be used in connection with the presently described invention.

RNAi IN NON-EMBRYONIC MAMMALS

20 As summarized above, the subject invention provides methods of performing RNAi in non-embryonic mammals. In further describing this aspect of the subject invention, the subject methods of RNAi in non-embryonic mammals are described first in greater detail, followed by a review of various representative applications in which the subject invention finds use as well as kits that find use in practicing the 25 subject invention.

METHODS

As indicated above, one aspect of the subject invention provides methods of employing RNAi to modulate expression of a target gene or genes in a non- 30 embryonic mammalian host. In many embodiments, the subject invention provides methods of reducing expression of one or more target genes in a non-embryonic mammalian host organism. By reducing expression is meant that the level of expression of a target gene or coding sequence is reduced or inhibited by at least

WO 03/010180

PCT/US02/22869

about 2-fold, usually by at least about 5-fold, e.g., 10-fold, 15-fold, 20-fold, 50-fold, 100-fold or more, as compared to a control. In certain embodiments, the expression of the target gene is reduced to such an extent that expression of the target gene/coding sequence is effectively inhibited. By modulating expression of a target gene is meant altering, e.g., reducing, transcription/translation of a coding sequence, e.g., genomic DNA, mRNA etc., into a polypeptide, e.g., protein, product.

The subject invention provides methods of modulating expression of a target gene in a non-embryonic mammalian organism. By non-embryonic mammalian organism is meant a mammalian organism or host that is not an embryo, i.e., is at a stage of development that is later in time than the embryonic stage of development. As such, the host organism may be a fetus, but is generally a host organism in a post natal stage of development, e.g., juvenile, adult, etc.

In practicing the subject methods, an effective amount of an RNAi agent is administered to the host organism to modulate expression of a target gene in a desirable manner, e.g., to achieve the desired reduction in target cell gene expression.

By RNAi agent is meant an agent that modulates expression of a target gene by a RNA interference mechanism. The RNAi agents employed in one embodiment of the subject invention are small ribonucleic acid molecules (also referred to herein as interfering ribonucleic acids), i.e., oligoribonucleotides, that are present in duplex structures, e.g., two distinct oligoribonucleotides hybridized to each other or a single ribooligonucleotide that assumes a small hairpin formation to produce a duplex structure. By oligoribonucleotide is meant a ribonucleic acid that does not exceed about 100 nt in length, and typically does not exceed about 75 nt length, where the length in certain embodiments is less than about 70 nt. Where the RNA agent is a duplex structure of two distinct ribonucleic acids hybridized to each other, e.g., an siRNA (such as d-siRNA as described in copending application serial no. 60/377,704; the disclosure of which is herein incorporated by reference), the length of the duplex structure typically ranges from about 15 to 30 bp, usually from about 15 to 29 bp, where lengths between about 20 and 29 bps, e.g., 21 bp, 22 bp, are of particular interest in certain embodiments. Where the RNA agent is a duplex structure of a single ribonucleic acid that is present in a hairpin formation, i.e., a shRNA, the length of the hybridized portion of the hairpin is typically the same as

WO 03/010180

PCT/US02/22869

that provided above for the siRNA type of agent or longer by 4-8 nucleotides. The weight of the RNAi agents of this embodiment typically ranges from about 5,000 daltons to about 35,000 daltons, and in many embodiments is at least about 10,000 daltons and less than about 27,500 daltons, often less than about 25,000 daltons.

- 5 In certain embodiments, instead of the RNAi agent being an interfering ribonucleic acid, e.g., an siRNA or shRNA as described above, the RNAi agent may encode an interfering ribonucleic acid, e.g., an shRNA, as described above. In other words, the RNAi agent may be a transcriptional template of the interfering ribonucleic acid. In these embodiments, the transcriptional template is typically a
10 DNA that encodes the interfering ribonucleic acid. The DNA may be present in a vector, where a variety of different vectors are known in the art, e.g., a plasmid vector, a viral vector, etc.

The RNAi agent can be administered to the non-embryonic mammalian host using any convenient protocol, where the protocol employed is typically a nucleic acid administration protocol, where a number of different such protocols are known in the art. The following discussion provides a review of representative nucleic acid administration protocols that may be employed. The nucleic acids may be introduced into tissues or host cells by any number of routes, including viral infection, microinjection, or fusion of vesicles. Jet injection may also be used for intra-muscular administration, as described by Furth *et al.* (1992), *Anal Biochem* 205:365-368. The nucleic acids may be coated onto gold microparticles, and delivered intradermally by a particle bombardment device, or "gene gun" as described in the literature (see, for example, Tang *et al.* (1992), *Nature* 356:152-154), where gold microprojectiles are coated with the DNA, then
25 bombarded into skin cells. Expression vectors may be used to introduce the nucleic acids into a cell. Such vectors generally have convenient restriction sites located near the promoter sequence to provide for the insertion of nucleic acid sequences. Transcription cassettes may be prepared comprising a transcription initiation region, the target gene or fragment thereof, and a transcriptional termination region. The
30 transcription cassettes may be introduced into a variety of vectors, e.g. plasmid; retrovirus, e.g. lentivirus; adenovirus; and the like, where the vectors are able to transiently or stably be maintained in the cells, usually for a period of at least about one day, more usually for a period of at least about several days to several weeks.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

For example, the RNAi agent can be fed directly to, injected into, the host organism containing the target gene. The agent may be directly introduced into the cell (i.e., intracellularly); or introduced extracellularly into a cavity, interstitial space, into the circulation of an organism, introduced orally, etc. Methods for oral introduction include direct mixing of RNA with food of the organism. Physical methods of introducing nucleic acids include injection directly into the cell or extracellular injection into the organism of an RNA solution. The agent may be introduced in an amount which allows delivery of at least one copy per cell. Higher doses (e.g., at least 5, 10, 100, 500 or 1000 copies per cell) of the agent may yield more effective inhibition; lower doses may also be useful for specific applications.

In certain embodiments, a hydrodynamic nucleic acid administration protocol is employed. Where the agent is a ribonucleic acid, the hydrodynamic ribonucleic acid administration protocol described in detail below is of particular interest. Where the agent is a deoxyribonucleic acid, the hydrodynamic deoxyribonucleic acid administration protocols described in Chang et al., J. Virol. (2001) 75:3469-3473; Liu et al., Gene Ther. (1999) 6:1258-1266; Wolff et al., Science (1990) 247: 1465-1468; Zhang et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10:1735-1737; and Zhang et al., Gene Ther. (1999) 7:1344-1349; are of interest.

Additional nucleic acid delivery protocols of interest include, but are not limited to: those described in U.S. Patents of interest include 5,985,847 and 5,922,687 (the disclosures of which are herein incorporated by reference); WO/11092; Acsadi et al., New Biol. (1991) 3:71-81; Hickman et al., Hum. Gen. Ther. (1994) 5:1477-1483; and Wolff et al., Science (1990) 247: 1465-1468; etc.

Depending on the nature of the RNAi agent, the active agent(s) may be administered to the host using any convenient means capable of resulting in the desired modulation of target gene expression. Thus, the agent can be incorporated into a variety of formulations for therapeutic administration. More particularly, the agents of the present invention can be formulated into pharmaceutical compositions by combination with appropriate, pharmaceutically acceptable carriers or diluents, and may be formulated into preparations in solid, semi-solid, liquid or gaseous forms, such as tablets, capsules, powders, granules, ointments, solutions, suppositories, injections, inhalants and aerosols. As such, administration of the

WO 03/010180

PCT/US02/22869

agents can be achieved in various ways, including oral, buccal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradermal, transdermal, intracheal, etc., administration.

In pharmaceutical dosage forms, the agents may be administered alone or in appropriate association, as well as in combination, with other pharmaceutically active compounds. The following methods and excipients are merely exemplary and are in no way limiting.

For oral preparations, the agents can be used alone or in combination with appropriate additives to make tablets, powders, granules or capsules, for example, with conventional additives, such as lactose, mannitol, corn starch or potato starch; with binders, such as crystalline cellulose, cellulose derivatives, acacia, corn starch or gelatins; with disintegrants, such as corn starch, potato starch or sodium carboxymethylcellulose; with lubricants, such as talc or magnesium stearate; and if desired, with diluents, buffering agents, moistening agents, preservatives and flavoring agents.

15 The agents can be formulated into preparations for injection by dissolving, suspending or emulsifying them in an aqueous or nonaqueous solvent, such as vegetable or other similar oils, synthetic aliphatic acid glycerides, esters of higher aliphatic acids or propylene glycol; and if desired, with conventional additives such as solubilizers, isotonic agents, suspending agents, emulsifying agents, stabilizers and preservatives.

20 The agents can be utilized in aerosol formulation to be administered via inhalation. The compounds of the present invention can be formulated into pressurized acceptable propellants such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen and the like.

25 Furthermore, the agents can be made into suppositories by mixing with a variety of bases such as emulsifying bases or water-soluble bases. The compounds of the present invention can be administered rectally via a suppository. The suppository can include vehicles such as cocoa butter, carbowaxes and polyethylene glycols, which melt at body temperature, yet are solidified at room temperature.

30 Unit dosage forms for oral or rectal administration such as syrups, elixirs, and suspensions may be provided wherein each dosage unit, for example, teaspoonful, tablespoonful, tablet or suppository, contains a predetermined amount of the

WO 03/010180

PCT/US02/22869

composition containing one or more inhibitors. Similarly, unit dosage forms for injection or intravenous administration may comprise the inhibitor(s) in a composition as a solution in sterile water, normal saline or another pharmaceutically acceptable carrier.

- 5 The term "unit dosage form," as used herein, refers to physically discrete units suitable as unitary dosages for human and animal subjects, each unit containing a predetermined quantity of compounds of the present invention calculated in an amount sufficient to produce the desired effect in association with a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or vehicle. The specifications for the
10 novel unit dosage forms of the present invention depend on the particular compound employed and the effect to be achieved, and the pharmacodynamics associated with each compound in the host.

The pharmaceutically acceptable excipients, such as vehicles, adjuvants, carriers or diluents, are readily available to the public. Moreover, pharmaceutically
15 acceptable auxiliary substances, such as pH adjusting and buffering agents, tonicity adjusting agents, stabilizers, wetting agents and the like, are readily available to the public.

- ... Those of skill in the art will readily appreciate that dose levels can vary as a function of the specific compound, the nature of the delivery vehicle, and the like.
20 Preferred dosages for a given compound are readily determinable by those of skill in the art by a variety of means.

Administration of an effective amount of an RNAi agent to a non-embryonic mammalian host according as described above results in a modulation of target gene(s) expression, e.g., a reduction of target gene(s) expression, as described above.

- 25 The above described methods work in any mammal, where representative mammals of interest include, but are not limited to: ungulates or hooved animals, e.g., cattle, goats, pigs, sheep, etc.; rodents, e.g., hamsters, mice, rats, etc.; lagomorphs, e.g., rabbits; primates, e.g., monkeys, baboons, humans, etc.; and the like.

The above described methods find use in a variety of different applications, representative types of which are now described in greater detail below.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

UTILITY

The subject methods find use in a variety of different applications, where representative applications include both academic/research applications and therapeutic applications. Each of these types of representative applications is described more fully below.

5

Academic/Research Applications

The subject methods find use in a variety of different types of academic, research applications, in which one desires to modulate expression of one or more target genes (coding sequences) in a mammalian host, e.g., to determine the function of a target gene/coding sequence in a mammalian host. The subject methods find particular use in "loss-of-function" type assays, where one employs the subject methods to reduce or decrease or inhibit expression of one or more target genes/coding sequences in a mammalian host.

As such, one representative utility of the present invention is as a method of identifying gene function in a non-embryonic mammal, where an RNAi agent is administered to a mammal according to the present invention in order to inhibit the activity of a target gene of previously unknown function. Instead of the time consuming and laborious isolation of mutants by traditional genetic screening, functional genomics using the subject methods determines the function of uncharacterized genes by administering an RNAi agent to reduce the amount and/or alter the timing of target gene activity. Such methods can be used in determining potential targets for pharmaceuticals, understanding normal and pathological events associated with development, determining signaling pathways responsible for postnatal development/aging, and the like. The increasing speed of acquiring nucleotide sequence information from genomic and expressed gene sources, including total sequences for mammalian genomes, can be coupled with use of the subject methods to determine gene function in a live mammalian organism. The preference of different organisms to use particular codons, searching sequence databases for related gene products, correlating the linkage map of genetic traits with the physical map from which the nucleotide sequences are derived, and artificial intelligence methods may be used to define putative open reading frames from the nucleotide sequences acquired in such sequencing projects.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

A simple representative assay inhibits gene expression according to the partial sequence available from an expressed sequence tag (EST). Functional alterations in growth, development, metabolism, disease resistance, or other biological processes would be indicative of the normal role of the EST's gene product. The function of the target gene can be assayed from the effects it has on the mammal when gene activity is inhibited.

If a characteristic of an organism is determined to be genetically linked to a polymorphism through RFLP or QTL analysis, the present invention can be used to gain insight regarding whether that genetic polymorphism might be directly responsible for the characteristic. For example, a fragment defining the genetic polymorphism or sequences in the vicinity of such a genetic polymorphism can be employed to produce an RNAi agent, which agent can then be administered to the mammal, and whether an alteration in the characteristic is correlated with inhibition can be determined.

The present invention is useful in allowing the inhibition of essential genes. Such genes may be required for organism viability at only particular stages of development or cellular compartments. The functional equivalent of conditional mutations may be produced by inhibiting activity of the target gene when or where it is not required for viability. The invention allows addition of an RNAi agent at specific times of development and locations in the organism without introducing permanent mutations into the target genome.

In situations where alternative splicing produces a family of transcripts that are distinguished by usage of characteristic exons, the present invention can target inhibition through the appropriate exons to specifically inhibit or to distinguish among the functions of family members. For example, a hormone that contained an alternatively spliced transmembrane domain may be expressed in both membrane bound and secreted forms. Instead of isolating a nonsense mutation that terminates translation before the transmembrane domain, the functional consequences of having only secreted hormone can be determined according to the invention by targeting the exon containing the transmembrane domain and thereby inhibiting expression of membrane-bound hormone.

Therapeutic Applications

The subject methods also find use in a variety of therapeutic applications in which it is desired to modulate, e.g., one or more target genes in a whole mammal or portion thereof, e.g., tissue, organ, etc. In such methods, an effective amount of

WO 03/010180

PCT/US02/22869

an RNAi active agent is administered to the host mammal. By effective amount is meant a dosage sufficient to modulate expression of the target gene(s), as desired. As indicated above, in many embodiments of this type of application, the subject methods are employed to reduce/inhibit expression of one or more target genes in the host in order to achieve 5 a desired therapeutic outcome.

Depending on the nature of the condition being treated, the target gene may be a gene derived from the cell, an endogenous gene, a pathologically mutated gene, e.g. a cancer causing gene, a transgene, or a gene of a pathogen which is present in the cell after infection thereof. Depending on the particular target gene and the dose of RNAi agent 10 delivered, the procedure may provide partial or complete loss of function for the target gene. Lower doses of injected material and longer times after administration of RNAi agent may result in inhibition in a smaller fraction of cells.

The subject methods find use in the treatment of a variety of different conditions in which the modulation of target gene expression in a mammalian host is 15 desired. By treatment is meant that at least an amelioration of the symptoms associated with the condition afflicting the host is achieved, where amelioration is used in a broad sense to refer to at least a reduction in the magnitude of a parameter, e.g. symptom, associated with the condition being treated. As such, treatment also includes situations where the pathological condition, or at least 20 symptoms associated therewith, are completely inhibited, e.g. prevented from happening, or stopped, e.g. terminated, such that the host no longer suffers from the condition, or at least the symptoms that characterize the condition.

A variety of hosts are treatable according to the subject methods. Generally 25 such hosts are "mammals" or "mammalian," where these terms are used broadly to describe organisms which are within the class mammalia, including the orders carnivore (e.g., dogs and cats), rodentia (e.g., mice, guinea pigs, and rats), and primates (e.g., humans, chimpanzees, and monkeys). In many embodiments, the hosts will be humans.

The present invention is not limited to modulation of expression of any specific type of 30 target gene or nucleotide sequence. Representative classes of target genes of interest include but are not limited to: developmental genes (e.g., adhesion molecules, cyclin kinase inhibitors, cytokines/lymphokines and their receptors, growth/differentiation factors and their receptors, neurotransmitters and their receptors); oncogenes (e.g., ABL1, BCL1, BCL2,

WO 03/010180

PCT/US02/22869

BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETV6, FOR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM 1, PML, RET, SRC, TALI, TCL3, and YES); tumor suppressor genes (e.g., APC, BRCA 1, BRCA2, MADH4, MCC, NF 1, NF2, RB 1, TP53, and WTI); and enzymes (e.g., ACC synthases and oxidases, ACP desaturases and hydroxylases, ADP-glucose pyrophorylases, ATPases, alcohol dehydrogenases, amylases, amyloglucosidases, catalases, cellulases, chalcone synthases, chitinases, cyclooxygenases, decarboxylases, dextrinases, DNA and RNA polymerases, galactosidases, glucanases, glucose oxidases, granule-bound starch synthases, GTPases, helicases, hemicellulases, integrases, inulinases, invertases, isomerase, kinases, lactases, Upases, lipoxygenases, lysozymes, nopaline synthases, octopine synthases, pectinesterases, peroxidases, phosphatases, phospholipases, phosphorylases, phytases, plant growth regulator synthases, polygalacturonases, proteinases and peptidases, pullulanases, recombinases, reverse transcriptases, RUBISCOs, topoisomerases, and xylanases); chemokines (e.g. CXCR4, . . .
15 CCR5), the RNA component of telomerase, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor, tumor necrosis factor nuclear factor kappa B, transcription factors, cell adhesion molecules, Insulin-like growth factor, transforming growth factor beta family members, cell surface receptors, RNA binding proteins (e.g. small nucleolar RNAs, RNA transport factors), . . .
20 translation factors, telomerase reverse transcriptase); etc.

20

Kits

Also provided are reagents and kits thereof for practicing one or more of the above-described methods. The subject reagents and kits thereof may vary greatly. Typically, the kits at least include an RNAi agent as described above.

25

In addition to the above components, the subject kits will further include instructions for practicing the subject methods. These instructions may be present in the subject kits in a variety of forms, one or more of which may be present in the kit. One form in which these instructions may be present is as printed information on a suitable medium or substrate, e.g., a piece or pieces of paper on which the
30 information is printed, in the packaging of the kit, in a package insert, etc. Yet another means would be a computer readable medium, e.g., diskette, CD, etc., on which the information has been recorded. Yet another means that may be present is

WO 03/010180

PCT/US02/22869

a website address which may be used via the internet to access the information at a removed site. Any convenient means may be present in the kits.

HYDRODYNAMIC ADMINISTRATION OF NAKED RNA

5 Also provided by the subject invention are methods and compositions for the in vivo introduction of a naked nucleic acid, e.g. ribonucleic acid, deoxyribonucleic or chemically modified nucleic acids (including, but not limited to, morpholino, peptide nucleic acids, methylphosphonate, phosphorothioate or 2'-Omethyl oligonucleotides), into the target cell of a vascularized organism, e.g. a mammal.

10 These methods of the subject invention are conveniently referred to as "hydrodynamic" methods.

In one embodiment of the subject methods, an aqueous formulation of a naked nucleic acid and an RNase inhibitor is administered into the vascular system of the organism. In many embodiments, the aqueous formulation also includes a competitor ribonucleic acid, e.g. a non-capped non-polyadenylated ribonucleic acid. In yet other embodiments, codelivery of DNA capable of being transcribed into the RNA molecule with candidate modulatory agents is performed without an RNase inhibitor or competitor ribonucleic acid, where the modulatory agent and the DNA may or may not be delivered as a single composition. The subject methods find use 20 in a variety of different applications, including both research and therapeutic applications, and are particularly suited for use in the in vivo delivery of a ribonucleic acid into a hepatic cell, e.g. for liver targeted in vivo delivery of nucleic acids.

In further describing this aspect of the subject invention, the subject methods 25 will be described first followed by a description of representative applications in which the subject methods find use and kits for use in practicing the subject methods.

METHODS

30 As summarized above, the subject invention provides a method for the in vivo introduction of a nucleic acid, e.g. a ribonucleic acid, into a target cell present in a vascularized multi-cellular organism. By in vivo introduction is meant that, in the subject methods, the target cell into which the nucleic acid is introduced is one that

WO 03/010180

PCT/US02/22869

is present in the multi-cellular organism, i.e., it is not a cell that is separated from, e.g. removed from, the multi-cellular organism. As such, the subject methods are distinct from *in vitro* nucleic acid transfer protocols, in which a nucleic acid is introduced into a cell or cells separated from the multi-cellular organism from which they originated, e.g. are in culture. In other words, the subject methods are not methods of *in vitro* nucleic acid transfer.

By introduction of the nucleic acid is meant that the nucleic acid, e.g., deoxyribonucleic acid (DNA) or ribonucleic acid (RNA) or a non-naturally occurring nucleic acid analog, is inserted into the cytoplasm of the target cell. In other words, the nucleic acid is moved from the outside of the target cell to the inside of the target cell across the cell membrane.

By vascularized multi-cellular organism is meant a multi-cellular organism that includes a vascular system. Multi-cellular organisms of interest include plants and animals, where animals are of particular interest, particularly vertebrate animals that have a vascular system made up of a system of veins and arteries through which blood is flowed, e.g. in response to the beating of a heart. Animals of interest are mammals in many embodiments. Mammals of interest include; rodents, e.g. mice, rats; livestock, e.g. pigs, horses, cows, etc., pets, e.g. dogs, cats; and primates, e.g. humans. In certain embodiments, the multi-cellular organism is a human. In other embodiments, the multi-cellular organism is a non-human mammal, e.g. a rodent, such as a mouse, rat, etc.

As mentioned above, the subject methods are, in the broadest sense, suitable for introduction of nucleic acids into the target cell of a host. The term "nucleic acid" as used herein means a polymer composed of nucleotides, e.g. deoxyribonucleotides or ribonucleotides, or compounds produced synthetically (e.g. PNA as described in U.S. Patent No. 5,948,902 and the references cited therein) which can hybridize with naturally occurring nucleic acids in a sequence specific manner analogous to that of two naturally occurring nucleic acids. The terms "ribonucleic acid" and "RNA" as used herein mean a polymer composed of ribonucleotides. The terms "deoxyribonucleic acid" and "DNA" as used herein mean a polymer composed of deoxyribonucleotides.

The subject methods are particularly suited for use in the delivery of a ribonucleic acid into a target cell of a multi-cellular organism. As such, the methods

WO 03/010180

PCT/US02/22869

will now be further described in terms of the delivery of ribonucleic acids. However, the following protocols are also suitable for use in the delivery of other nucleic acids, e.g. DNAs (such as plasmid DNA), etc.

In practicing the subject methods, an aqueous composition of the ribonucleic acid in which the ribonucleic acid is present as a naked ribonucleic acid is administered to the vascular system of the multi-cellular organism or host. In many embodiments, the naked RNA aqueous composition or formulation is administered to the vein of the host, i.e. the naked RNA formulation is intravenously administered. In certain embodiments, the naked RNA formulation is intravenously administered to the host via high pressure injection. By high pressure injection is meant that the aqueous formulation is intravenously introduced at an elevated pressure, where the elevated pressure is generally at least about 20, usually at least about 30 mmHg. In many embodiments, the elevated pressure ranges from about 10 to 50 mm Hg, where 40 to 50 mm Hg is often preferred. Methods of administering aqueous formulations under high pressure, such as those described above, are described in the references listed in the relevant literature section, supra.

As mentioned above, the RNA or DNA that is to be introduced into the target cell via the subject methods is present in the aqueous formulation as naked RNA. By "naked" is meant that the RNA is free from any delivery vehicle that can act to facilitate entry into the target cell. For example, the naked RNAs or DNAs delivered in the subject methods are free from any material that promotes transfection, such as liposomal formulations, charged lipids or precipitating agents, e.g. they are not complexed to colloidal materials (including liposomal preparations). In addition, the naked RNAs of the subject invention are not contained in a vector that would cause integration of the RNA into the target cell genome, i.e. they are free of viral sequences or particles that carry genetic information.

The naked RNAs that may be delivered via the subject invention may vary widely in length, depending on their intended purpose, e.g. the protein they encode, etc. Generally, the naked RNAs will be at least about 10 nt long, usually at least about 30 nt long and more usually at least about 35 nt long, where the naked RNAs may be as long as 20,000 nt or longer, but generally will not exceed about 10,000 nt long and usually will not exceed about 6,000 nt long. In certain embodiments where the naked RNA is an RNAi agent, as described above, the length of the RNA ranges

WO 03/010180

PCT/US02/22869

from about 10 to 50 nt, often from about 10 to 40 nt, and more often from about 15 to 30 nt, including 15 to 25 nt, such as 20 to 25 nt, e.g., 21 or 22 nt.

The naked RNAs that may be introduced into a target cell according to the subject methods may or may not encode a protein, i.e. may or may not be capable of being translated into a protein upon introduction into the target cell. In those embodiments where the naked RNA is capable of being translated into a protein following introduction into the target cell, the naked RNA may or may not be capped, it may include an IRES domain, etc. However, in many particular protocols of this embodiment, the naked RNA is capped. Furthermore, the RNA in these 5 embodiments generally includes at least a polyadenylation signal, and in many embodiments is polyadenylated, where the polyA tail, when present, generally ranges in length from about 10 to 300, usually from about 30 to 50. Further 10 description of the naked RNAs is provided *infra*.

As mentioned above, an aqueous formulation of the naked RNA is 15 intravascularly, usually intravenously, administered to the host. In the aqueous formulations employed in the subject methods, an effective amount of the naked RNA is combined with an aqueous delivery vehicle. By effective amount is meant an amount that is sufficient to provide for the desired amount of transfer into the target cell, e.g. to provide the desired outcome, such as desired amount of protein 20 expression. In many embodiments, the amount of naked RNA present in the aqueous formulation is at least about 5 micrograms, usually at least about 10 micrograms and more usually at least about 20 micrograms, where the amount may be as great as 10 milligrams or greater, but generally does not exceed about 1 milligram and usually does not exceed about 200 micrograms.

25 Aqueous delivery vehicles of interest include: water, saline and buffered media. Specific vehicles of interest include: sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's, phosphate buffered saline, etc. The aqueous delivery vehicles may further include preservatives and other additives, e.g. antimicrobials, antioxidants, chelating agents, inert gases, 30 nutrient replenishers, electrolyte replenishers, divalent cations, such as magnesium, calcium and manganese, etc. Of particular interest in many embodiments is the use of buffered salt solutions are pseudophysiological.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

A feature of certain embodiments of the subject methods is that the naked RNA is introduced into the vascular system of the multi-cellular organism in combination with an RNase inhibitor. By RNase inhibitor is meant a compound or agent that at least reduces the activity of, if not completely inactivates, an RNase 5 activity in the multi-cellular organism. In many embodiments, the RNase inhibitor is a protein inhibitor of RNase, where the human placental RNase inhibitor is of particular interest. The protein RNase inhibitor may be purified from a natural source or synthetically produced, e.g. via recombinant techniques. Human placental RNase inhibitor may be obtained from a variety of different sources under a variety of 10 different tradenames, where representative sources include: Promega, Inc., Strategene, Inc., Fisher Scientific, Inc., and the like.

While the RNase inhibitor may, in certain embodiments, be administered to the host in a composition separate from the aqueous naked RNA composition, in many embodiments the RNase inhibitor is present in the aqueous naked RNA 15 composition. The amount of RNase inhibitor that is present in the aqueous composition is sufficient to provide for the desired uptake of the naked RNA. Where the RNase inhibitor is a protein inhibitor, the concentration of the inhibitor in the aqueous composition that is introduced into the multi-cellular organism during practice of the subject methods may range from about 4 to 4,000 units, usually from 20 about 400 to 4,000 units and more usually from about 400 to 1,500 units.

In certain embodiments, the naked RNA and RNase inhibitor are administered in conjunction with a competitor RNA. By competitor RNA is meant an RNA that is capable of serving as a competitive inhibitor of RNase activity. In many embodiments, the competitor RNA is uncapped and non-polyadenylated. By 25 uncapped is meant that the competitor RNA lacks the cap structure found at the 5' end of eukaryotic messenger RNA, i.e. it lacks a 5' 7 methyl G. By non-polyadenylated is meant that the competitor RNA lacks a polyA tail or domain of polyadenylation at its 3' end, as is found in eukaryotic messenger RNA. The length of the competitor RNA may vary, but is generally at least about 70 nt, usually at 30 least about 200 nt and more usually at least about 1,500 nt, where the length may be as great as 10,000 nt or greater, but generally does not exceed about 3,500 nt and usually does not exceed about 1,500 nt. The concentration of competitor RNA in the aqueous composition is sufficient to provide for the desired protection of the

WO 03/010180

PCT/US02/22869

naked RNA (e.g. via competition for binding by RNase), and in many embodiments ranges from about 10 µg/ml to 10 mg/ml, usually from about 20 to 200 µg/ml and more usually from about 40 to 150 µg/ml.

- The subject methods result in highly efficient transfer of the administered
- 5 RNA into the cytoplasm of the target cell(s). The subject methods are particularly suited for transferring RNA into the cytoplasm of liver or hepatic cells and non-parenchymal cells in the liver. As such, in many embodiments the subject methods are *in vivo* methods of achieving high level nucleic acid, e.g. RNA, transfer into hepatic cells or liver tissue.
- 10 The nucleic acid that is introduced into the target cell via the subject methods is short lived once inside the target cell. Depending on the particular nature of the nucleic acid, the half life the nucleic acid following introduction via the subject methods generally ranges from about 30 sec to 10 days, usually from about 1 min to 24 hrs and more usually from about 5 min to 10 hrs. As such, where the nucleic acid
- 15 is an RNA encoding a protein of interest, protein expression following introduction via the subject method is transient, typically lasting for a period of time ranging from about 1 min to 3 days, usually from about 5 min to 24 hrs. As such, in many embodiments of the subject methods, the subject methods are methods of providing for transient protein expression from a transgene, where protein expression is equal
- 20 to RNA lifetime. Nonetheless, the protein expressed may have a longer lifetime, depending on the nature of the particular protein.

UTILITY

- The subject methods find use in a variety of different applications in which the
- 25 efficient *in vivo* transfer of a naked nucleic acid into a target cell is desired. Applications in which the subject methods find use include both therapeutic and research applications. Therapeutic applications of interest include gene therapy applications, vaccination applications, and the like. Research applications of interest include the production of animal models for particular conditions, e.g. RNA viral
- 30 infections, the observation of gene expression on phenotypes to elucidate gene function, etc. Other applications in which the subject invention finds use include the development of antisense, ribozyme and chimeroplasty (i.e. the repair of genes via RNA/DNA chimeras (see e.g. Yoon et al., Proc Natl Acad Sci U S A (1996)

WO 03/010180

PCT/US02/22869

93(5):2071-6; Cole-Strauss et al., *Science* (1996) 273(5280):1386-9; and Zhu et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96(15):8768-73) therapeutics, as well as interfering RNA (RNA whose presence in the cell prevents the translation of similar RNAs, (See e.g. Wianny et al., *Nat Cell Biol* (2000) 2(2):70-5; and SiQun et al., *Nature* (1998) 391: 806 - 811) therapeutics.

5 One type of application in which the subject methods find use is in the synthesis of polypeptides, e.g. proteins, of interest from a target cell, particularly the transient expression of a polypeptide. In such applications, a nucleic acid that encodes the polypeptide of interest in combination with requisite and/or desired 10 expression components, e.g. 5' cap structures, IRES domains, polyA signals or tails, etc., is introduced into the target cell via *in vivo* administration to the multi-cellular organism in which the target cell resides, where the target cell is to serve as an expression host for expression of the polypeptide. For example, where the naked nucleic acid administered by the subject methods is RNA, the RNA is an RNA that is 15 capable of being translated in the cytoplasm of the target cell into the protein encoded by the sequence contained in the RNA. The RNA may be capped or uncapped, where when it is uncapped it generally includes an IRES sequence. The RNA also generally further includes a polyA tail, where the length of the polyA tail typically ranges from about 10 to 300, usually from about 30 to 50 nt. Following in 20 *vivo* administration and subsequent introduction into the target cell, the multi-cellular organism, and targeted host cell present therein, is then maintained under conditions sufficient for expression of the protein encoded by the transferred RNA. The expressed protein is then harvested, and purified where desired, using any convenient protocol.

25 As such, the subject methods provide a means for at least enhancing the amount of a protein of interest in a multi-cellular organism. The term 'at least enhance' includes situations where the methods are employed to increase the amount of a protein in a multi-cellular organism where a certain initial amount of protein is present prior to practice of the subject methods. The term 'at least enhance' also includes those situations in which the multi-cellular organism includes substantially none of the protein prior to practice of the subject methods. As the 30 subject methods find use in at least enhancing the amount of a protein present in a multi-cellular organism, they find use in a variety of different applications, including

WO 03/010180

PCT/US02/22869

pharmaceutical preparation applications and therapeutic applications, where the latter is described in greater detail infra.

Therapeutic applications in which the subject methods find use include gene therapy applications in which the subject methods are used to enhance the level of a therapeutic protein in the host organism and vaccination applications, in which the subject methods are used to vaccinate the host (or develop vaccines for delivery by other methods). As distinct from DNA based expression protocols, the subject RNA based expression protocols are uncomplicated by the need for promoter, enhancer, repressor and other regulatory elements commonly associated with eukaryotic genes. The subject methods may be used to deliver a wide variety of therapeutic nucleic acids which, upon entry into the target cell, provide for the requisite enhanced protein level in the host. Therapeutic nucleic acids of interest include nucleic acids that replace defective genes in the target host cell, such as those responsible for genetic defect based diseased conditions, by encoding products that are supposed to be provided to the host by these defective genes; nucleic acids which have therapeutic utility in the treatment of cancer; and the like. Representative products involved in gene defect disease conditions whose level may be enhanced by practicing the subject methods include, but are not limited to: factor VIII, factor IX, β -globin, low-density protein receptor, adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase, sphingomyelinase, glucocerebrosidase, cystic fibrosis transmembrane regulator, α -antitrypsin, CD-18, ornithine transcarbamylase, arginosuccinate synthetase, phenylalanine hydroxylase, branched-chain α -ketoacid dehydrogenase, fumarylacetoacetate hydrolase, glucose 6-phosphatase, α -L-fucosidase, β -glucuronidase, α -L-iduronidase, galactose 1-phosphate uridylyltransferase, and the like. Cancer therapeutic nucleic acids that may be delivered via the subject methods include: nucleic acids that enhance the antitumor activity of lymphocytes by encoding appropriate factors, nucleic acids whose expression product enhances the immunogenicity of tumor cells, tumor suppressor encoding nucleic acids, toxin encoding nucleic acids, suicide factor encoding nucleic acids, multiple-drug resistance product encoding nucleic acids, ribozymes, DNA ribozymes, DNA/RNA chimeras, interfering RNA and antisense sequences, and the like.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

An important feature of the subject methods, as described supra, is that the subject methods may be used for *in vivo* gene therapy applications. By *in vivo* gene therapy applications is meant that the target cell or cells in which expression of the therapeutic gene is desired are not removed from the host prior to practice of the subject methods. In contrast, the naked nucleic acid compositions are administered directly to the multi-cellular organism and are taken up by the target cells, following which expression of the encoded product occurs.

As mentioned above, another therapeutic application in which the subject methods find use is in vaccination of a host (as well as development of a vaccine to be delivered by other methods). In these methods, the naked nucleic acid, e.g., RNA, that is administered to the host via the subject methods encodes a desired immunogen that, upon entry of the RNA into the target cell, is expressed and secreted to elicit the desired immune response. Vaccination methods in which naked nucleic acid are employed and in which the subject methods of naked nucleic acid delivery find use are further described in WO 90/11092, the disclosure of which is herein incorporated by reference.

As mentioned above, the subject methods also find use in various research applications. One research application in which the subject invention finds use is in the production of animal models of RNA virus infection, where RNA viruses of interest include: HCV, HIV, influenza A, Hepatitis A, poliovirus, enteroviruses, rhinoviruses, aphthoviruses, and the like. To produce such animal models, constructs are first provided that include one or more regulatory elements from the RNA virus of interest operably linked to a reporter domain, e.g., a domain encoding a detectable product (such as luciferase, a fluorescent protein, etc.); etc. Alternatively, DNA constructs that can be transcribed *in vivo* into such RNA constructs may be employed. These constructs are then administered to a host, e.g., a mouse, according to the subject methods to produce an animal model of an infection by the corresponding RNA virus. As such, also provided are the animal models of RNA viruses produced by the subject methods. A representative protocol for the production of an RNA virus animal model is provided in the experimental section infra.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

The subject methods also find use in the delivery of RNAi therapeutic and/or research agents, including siRNA and shRNA, as described more fully above and in the experimental section, below.

- Also provided are methods of screening candidate modulatory, e.g.,
- 5 enhancing or inhibitory, agents using such animal models. A variety of different types of candidate agents may be screened according to the subject methods.
 - Candidate agents encompass numerous chemical classes, though typically they are organic molecules, preferably small organic compounds having a molecular weight of more than 50 and less than about 2,500 daltons. Candidate agents comprise
 - 10 functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polycyclic structures substituted with one or more of the above
 - 15 functional groups. Candidate agents are also found among biomolecules including peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs or combinations thereof.
- Of particular interest in certain embodiments are antisense nucleic acids. The anti-sense reagent may be antisense oligonucleotides (ODN), particularly synthetic
- 20 ODN having chemical modifications from native nucleic acids, or nucleic acid constructs that express such anti-sense molecules as RNA. The antisense sequence is complementary to the mRNA of the targeted gene, and inhibits expression of the targeted gene products. Antisense molecules inhibit gene expression through various mechanisms, e.g. by reducing the amount of mRNA
 - 25 available for translation, through activation of RNase H, or steric hindrance. One or a combination of antisense molecules may be administered, where a combination may comprise multiple different sequences.
- Antisense molecules may be produced by expression of all or a part of the target gene sequence in an appropriate vector, where the transcriptional initiation is
- 30 oriented such that an antisense strand is produced as an RNA molecule. Alternatively, the antisense molecule is a synthetic oligonucleotide. Antisense oligonucleotides will generally be at least about 7, usually at least about 12, more usually at least about 16 nucleotides in length, and not more than about 500, usually

WO 03/010180

PCT/US02/22869

not more than about 50, more usually not more than about 35 nucleotides in length, where the length is governed by efficiency of inhibition, specificity, including absence of cross-reactivity, and the like. It has been found that short oligonucleotides, of from 7 to 8 bases in length, can be strong and selective 5 inhibitors of gene expression (see Wagner *et al.* (1996), *Nature Biotechnol.* 14:840-844).

A specific region or regions of the endogenous sense strand mRNA sequence is chosen to be complemented by the antisense sequence. Selection of a specific sequence for the oligonucleotide may use an empirical method, where 10 several candidate sequences are assayed for inhibition of expression of the target gene in an *in vitro* or animal model. A combination of sequences may also be used, where several regions of the mRNA sequence are selected for antisense complementation.

Antisense oligonucleotides may be chemically synthesized by methods 15 known in the art (see Wagner *et al.* (1993), *supra*, and Milligan *et al.*, *supra*.) Preferred oligonucleotides are chemically modified from the native phosphodiester structure, in order to increase their intracellular stability and binding affinity. A number of such modifications have been described in the literature, which alter the chemistry of the backbone, sugars or heterocyclic bases.

20 Among useful changes in the backbone chemistry are phosphorodiamidate linkages, methylphosphonates phosphorothioates; phosphorodithioates, where both of the non-bridging oxygens are substituted with sulfur; phosphoroamidites; alkyl phosphotriesters and boranophosphates. Achiral phosphate derivatives include 3'-O-5'-S-phosphorothioate, 3'-S-5'-O-phosphorothioate, 3'-CH₂-5'-O-phosphonate 25 and 3'-NH-5'-O-phosphoroamidate. Peptide nucleic acids replace the entire ribose phosphodiester backbone with a peptide linkage. Sugar modifications are also used to enhance stability and affinity. One example is the substitution of the ribose sugar with a morpholine. The α -anomer of deoxyribose may be used, where the base is inverted with respect to the natural β -anomer. The 2'-OH of the ribose sugar may 30 be altered to form 2'-O-methyl or 2'-O-allyl sugars, which provides resistance to degradation without comprising affinity. Modification of the heterocyclic bases must maintain proper base pairing. Some useful substitutions include deoxyuridine for deoxythymidine; 5-methyl-2'-deoxycytidine and 5-bromo-2'-deoxycytidine for

WO 03/010180

PCT/US02/22869

deoxycytidine. 5- propynyl-2'-deoxyuridine and 5-propynyl-2'-deoxycytidine have been shown to increase affinity and biological activity when substituted for deoxythymidine and deoxycytidine, respectively.

- Candidate agents are obtained from a wide variety of sources including
- 5 libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides and oligopeptides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced. Additionally,
 - 10 natural or synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical and biochemical means, and may be used to produce combinatorial libraries. Known pharmacological agents may be subjected to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification, etc. to produce structural analogs.

15 In such screening assays, the nucleic acid construct (e.g., the RNA or DNA construct described above) and the candidate agent are administered to the host animal, the effect of the candidate agent on the activity of the construct is observed, and the observed effect is related to the modulatory activity of the candidate compound. The candidate agent and nucleic acid construct may be administered to

- 20 the host according to the subject methods at the same or different times, where in certain preferred embodiments the two components are administered to the host simultaneously, e.g., in the form of a single fluid composition. Representative screening assays are provided in the experimental section infra.

Another research application in which the subject methods find use is the elucidation of gene function. In such methods, RNA having a particular gene sequence is introduced via the subject methods and the effect of the gene on the phenotype of the organism is observed. Benefits of using the subject methods for gene function research applications include the ability to express the genes without concern for genetic regulatory elements. Other research applications in which the subject methods find use include, but are not limited to: the study of ribozyme and antisense efficacy, the study of RNA metabolism, and the like.

Kits

WO 03/010180

PCT/US02/22869

Also provided by the subject invention are kits for use in practicing the subject methods of in vivo nucleic acid delivery to a target cell, e.g. hepatic cells. The subject kits generally include a naked nucleic acid that is desired to be introduced into the target cell and an RNase inhibitor. The subject kits may further include an aqueous delivery vehicle, e.g. a buffered saline solution, etc. In addition, the kits may include a competitor RNA, as described supra. In the subject kits, the above components may be combined into a single aqueous composition for delivery into the host or separate as different or disparate compositions, e.g. in separate containers. Optionally, the kit may further include a vascular delivery means for delivering the aqueous composition to the host, e.g. a syringe etc., where the delivery means may or may not be pre-loaded with the aqueous composition. In cases where the reporter gene is transcribed in vivo from a DNA, RNase inhibitor and competitor RNA are not required.

In addition to the above components, the subject kits will further include instructions for practicing the subject methods. These instructions may be present in the subject kits in a variety of forms, one or more of which may be present in the kit. One form in which these instructions may be present is as printed information on a suitable medium or substrate, e.g. a piece or pieces of paper on which the information is printed, in the packaging of the kit, in a package insert, etc. Yet another means would be a computer readable medium, e.g. diskette, CD, etc., on which the information has been recorded. Yet another means that may be present is a website address which may be used via the internet to access the information at a removed site. Any convenient means may be present in the kits.

The following examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXPERIMENTAL

I. RNAi in Mammals

A. We co-delivered a 2 micrograms of plasmid that expresses a luciferase mRNA (pCMVGL3) mixed with 1.8 ml PBS, 1200 units of RNasin and 40 micrograms of competitor RNA along with the following formulations:

1) (Group 1 no RNA) 1.8 ml PBS as a untreated control;

WO 03/010180

PCT/US02/22869

- 2) (Group 2 antisense RNA) 1.8 ml PBS mixed with 20 micrograms of antisense orientation 21 mer RNA/DNA chimera with the sequence 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' (SEQ ID NO:01) (deoxythymidilate residues are indicated by dT, the remaining nucleotides are ribonucleotides); or
- 5 3) (Group 3 RNAi) 1.8 ml PBS mixed with 20 micrograms of antisense 21 mer described above annealed to 20 micrograms of its sense complement (with sequence 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAddTdT-3')(SEQ ID NO:02).

The oligonucleotides were kinased using adenosine triphosphate and T4 polynucleotide kinase. Each formulation (1-3) was tested by high pressure tail vein injection in 5 week old female Balb/c mice. At 5, 72 and 96 hours post injection, light emitted as a result of luciferase expression was measured as described above. The results of this experiment are summarized in the table below. Numbers expressed as relative light units.

| | Group 1 | Group 1 standard | Group 2 | Group 2 standard | Group 3 | Group 3 standard |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | error | error | error | error | error | error |
| | no RNA | | Antisense | | RNAi | |
| 3 hours | 1.11x10 ⁶ | 2.05x10 ⁵ | 1.29x10 ⁶ | 7.90x10 ⁶ | 7.90x10 ⁶ | 3.54x10 ⁶ |
| 72 hours | 6.60x10 ⁶ | 7.57x10 ⁵ | 5.41x10 ⁶ | 9.91x10 ⁵ | 8.23x10 ⁵ | 2.86x10 ⁶ |
| 96 hours | 3.41x10 ⁶ | 4.50x10 ⁵ | 2.72x10 ⁶ | 5.25x10 ⁵ | 4.61x10 ⁵ | 6.77x10 ⁵ |

-15 The above results demonstrate that RNAi (group 3) caused the destruction of luciferase RNA in the liver of an adult mammal. This destruction resulted in a decrease in light emitted as a result of luciferase activity when compared to animals that received no RNA or antisense oligonucleotide alone. To our knowledge, this is the first demonstration that RNAi is effective in an adult mammal. This method
20 provides a model system to study the mechanism by which RNAi functions in a mammal. It is also useful for the development and optimization of RNAi based therapeutics. Furthermore, one need not codeliver the expression plasmid with the modulating agent. One could also deliver a modulating agent targeting an endogenous gene.

25 B. Here, we test the ability of RNAi to suppress gene expression in adult mammals. We find that synthetic small interfering RNAs (siRNAs) are potent inhibitors of gene expression *in vivo*. Furthermore, small-hairpin RNAs (shRNAs) are similarly effective. Notably, these RNAi agents can be delivered either as

WO 03/010180

PCT/US02/22869

synthetic RNAs or transcribed *in vivo* from DNA expression constructs. These studies indicate that RNAi can be developed as a therapeutic tool and demonstrate that it can be employed with conventional gene-therapy strategies.

1. siRNAs

5 We modified existing hydrodynamic transfection methods J. Chang, L. J. Sigal, A. Lerro, J. Taylor, *J Virol* **75**, 3469-73. (2001) to permit efficient delivery of naked RNAs. Either an siRNA derived from firefly luciferase or an unrelated siRNA were co-injected with a luciferase expression plasmid (construct description in Figure 1). Luciferase expression was monitored in living animals using quantitative 10 whole body imaging following injection of a luciferase substrate (4) and was dependent on the amount of reporter plasmid injected and the time after transfection (data not shown). Representative animals are shown in Figure 2A. Quantification of these results is shown in Figure 2B.

In each experiment, serum measurements of a co-injected plasmid encoding 15 human α -1 antitrypsin (hAAT) (S. R. Yant; et al., *Nat Genet* **25**, 35-41. (2000)) served as an internal control to normalize transfection efficiency and to monitor non-specific translational inhibition. Average serum hAAT levels at 74 hours were similar in each group of animals.

Our results indicate specific siRNA-mediated inhibition of luciferase 20 expression in adult mice ($p<0.0115$); unrelated siRNAs were without effect ($p<0.864$). In 11 independent experiments, luciferase siRNAs reduced luciferase expression (emitted light) by an average of 81% (+/- 2.2%).

2. shRNA

25 Short hairpin RNAs (shRNAs) targeting firefly luciferase or renilla luciferase were synthesized by T7 polymerase *in vitro* runoff transcription. Co-transfection of these *in vitro* transcribed RNAs with pGL3-Control DNA resulted in reduced firefly luciferase expression in culture (Paddison et al, *Genes Dev.* 16(8):948-58 (2002)). In order to test whether these hairpin RNAs were functional in mice, we 30 hydrodynamically transfected 40 μ g of *in vitro* transcribed luciferase shRNA (or as a

WO 03/010180

PCT/US02/22869

control, renilla shRNA), 2 µg pGL3-Control DNA 2 µg pThAAT, 800 units of RNasin and 1.8 ml of PBS into mice. Light emitted from mice 72 hours after receiving firefly luciferase shRNAs was reduced by an average of 95 % (+/- 1.4 %) compared to the untreated control. Light emitted from mice receiving the renilla shRNA was 5 reduced only slightly. Surprisingly, co-transfection of T7 transcription template DNA with a plasmid expressing the T7 polymerase protein did not lead to any reduction in luciferase reporter activity in culture or in mice (data not shown).

Firefly Luciferase shRNA sequence (from 5' to 3')

10 GGUCGAAGUACUCAGCGUAAGUGAUGCACUUAAUGGGUGUUGUUUGUG
UUGGGUGUUUUGGUU (SEQ ID NO:11)

Renilla Luciferase shRNA sequence (from 5' to 3')

15 GGGAUUCCGAAUCCGCUUUGAUUCUUGUUACCGUCACACCCACUUGGAG

AUACAAGAUCAAGGCCAUCGUCUUCCU (SEQ ID NO:12)

The above results demonstrate that short *in vitro* transcribed hairpins also reduced luciferase expression *in vivo*.

3. Conclusion

20 The above data demonstrate that RNAi can downregulate gene expression in adult mice.

C. Hepatitis C virus (HCV) is an RNA virus that infects 1 out of 40 people worldwide and is the most common underlying cause for liver transplantation in the western world. To determine whether RNAi could be directed against a human pathogen, several siRNAs were tested for their ability to target HCV RNAs in mouse 25 liver. We used a reporter strategy in which HCV sequences were fused to luciferase RNA and RNAi was monitored by co-transfection *in vivo*. siRNAs targeting the HCV internal ribosome entry site and core protein coding region failed to inhibit luciferase expression. In contrast, siRNAs targeting the NS5B region of a chimeric HCV NS5B protein-luciferase fusion RNA reduced luciferase expression by 75 % (+/- 6.8 %). 30 These results indicate the utility of using RNAi therapeutically to target important human pathogens.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

- D. From these data, it is clear that siRNAs are functional in mice. Functional shRNAs, which are equally effective in inducing gene suppression, can be expressed *in vivo* from DNA templates using RNA polymerase III promoters (Paddison et al., submitted). Expression of a cognate shRNA (pShh1-F1) induced up to a 98 % (+/- 0.6 %) suppression of luciferase expression, with an average suppression of 92.8 % (+/- 3.39 %) in three independent experiments (Figures 2C and 2D). An empty shRNA-expression vector had no effect (data not shown). Furthermore, reversing the orientation of the shRNA (pShh1-F1rev) insert abolished silencing, due to altered termination by RNA polymerase III and consequent production of an improperly structured shRNA (Paddison et al., submitted). These data indicate that plasmid-encoded shRNAs can induce a potent and specific RNAi response in adult mice. Furthermore, it demonstrates that this method of RNAi delivery can be tailored to take advantage of the significant progress that has been made in the development of gene-transfer vectors.
- Existing gene therapy strategies depend largely upon the ectopic expression of exogenous proteins to achieve a therapeutic result. Since its discovery, RNAi has held the promise of complementing these gain-of-function approaches by providing a means for silencing disease-related genes. Considered together, our results indicate that RNAi can be induced in adult mammals using DNA constructs to direct the expression of small hairpin RNAs. These studies demonstrate that the present invention provides viral and non-viral delivery systems for application of therapeutic RNAi to a wide range of diseases.

II. Hydrodynamic Delivery of Naked RNA

- A. Introduction
- Unless otherwise noted, in all experiments RNAs and DNAs were added to the indicated amount of RNasin and brought to a final volume of PBS equal to 1.4-1.8 milliliters. This solution was injected into the tail vein of the mice in 4-5 seconds. All RNAs used in these studies were synthesized using an mMessage Machine kit and purified using an RNeasy kit (both from Qiagen Inc.). However, it should not be necessary to purify the RNA and other purification methods exist that should also

WO 03/010180

PCT/US02/22869

work. RNasin used in all the experiments listed here was native RNasin purified from human placenta unless otherwise indicated (purchased from Promega Inc.). For luciferase samples, at the indicated time, mice were given an intraperitoneal injection of luciferin (1.5 micrograms/ gram body weight) and the light emitted from the mouse was measured. Background is ~ 2×10^2 relative light units. Human factor IX samples were analyzed using an enzyme linked immunoassay.

B. Hydrodynamic Delivery of Naked RNA

RNAs coding for luciferase protein were injected into living mice with:

10 1) no RNase inhibitor; or
 2) RNase inhibitor (called RNasin).

All RNA samples also contained an uncapped unpolyadenylated RNA (competitor RNA) that was included as a competitive inhibitor of RNase activity. Total RNA in each sample was adjusted to a total of 80 micrograms with competitor 15 RNA. As a negative control (described below) DNAs expressing the luciferase protein under the control of a prokaryotic promoter were also injected. At 3 and 6 hours mice were given an intraperitoneal injection of luciferin (the substrate for the luciferase enzyme) and the light emitted from the mouse was measured.

Results summarized in Table 1

20

Table 1

| Nucleic Acid Used | Number of Mice (N) | Formulation | Relative Light Units (RLU/ 5 min) |
|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Poly A RNA | 1 | 4 units of RNasin | 1.0×10^5 |
| Poly A RNA | 1 | 400 units of RNasin | 2.0×10^5 |
| Poly A signal RNA | 1 | 4 units of RNasin | 7.2×10^4 |
| Template DNA | 1 | none | signal at background |

The above results show that:

- Injected RNA is transfected into the liver of living mice.
- Capped polyadenylated RNA with a poly A tail (Poly A RNA) is translated in mouse livers because capped polyadenylated RNA gives a strong luciferase signal

25

WO 03/010180

PCT/US02/22869

- Capped RNA with a poly A signal (Poly A signal RNA) is translated in mouse livers but it gives a signal but it is about 100 fold lower than that seen with the RNA that has a poly A tail

The RNAs used in all the experiments described here were transcribed from a bacterial promoter on a DNA plasmid. This promoter should not function efficiently in mammalian cells. The DNA template was removed after transcription using DNase, however there is always the concern that the signal seen could be the result of DNA contamination. To control for this, an amount of template DNA equivalent to that used in the transcription was injected. If the signal is due to DNA contamination then this sample should give a signal. However, no signal is seen from the DNA control.

It was also found that addition of an RNase inhibitor (called RNasin) protects the RNA from degradation by serum nucleases, thus increasing the observed signal, because addition of RNasin increased the signal by 20 fold at the dose used.

From the above, the following conclusions are drawn. Hydrodynamic delivery of naked RNA results in high level transfer of RNA into the livers of living mice. Furthermore, capped and polyadenylated RNA works better than RNA with a polyadenylation signal but no poly A tail, although both RNAs gave a signal. Addition of an RNase inhibitor protected the RNA from degradation, resulting in a higher luciferase signal. Finally, the signal seen with the injected RNA is not due to DNA contamination.

C. Refinement of System

RNAs coding for luciferase protein were injected into living mice with 1) high or low doses of native or recombinant RNasin or 2) after treatment with RNase T1 which should destroy the RNA and abolish the signal (negative control). All RNA samples also contained an uncapped unpolyadenylated competitor RNA such that the total amount of RNA injected was 80 micrograms. Control DNAs expressing the luciferase protein under the control of a prokaryotic promoter were also injected in indicated control reactions. At 3 and 6 hours mice were given an intraperitoneal injection of luciferin and the light emitted from the mouse was measured. This experiment is largely to verify the results of the first experiment and to test which parameters are important. At the six hour timepoint, one mouse that had been

WO 03/010180

PCT/US02/22869

injected with RNA was sacrificed and its organs were removed to determine which organs express luciferase.

The results are summarized in Table 2

Table 2

5

| Nucleic Acid Used | micro-grams of RNA or DNA | Number of Mice (N) | Formulation | Relative Light Units (RLU/5 min) 3 hours | Relative Light Units (RLU/5 min) 6 hours | Relative Light Units (RLU/5 min) 24 hours | Background |
|-------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------------|---|---|--|------------|
| Poly A RNA | 35 | 1 | 240 units RNasin (Native) | 1.8×10^5 | 1.1×10^6 | | |
| Poly A RNA | 50 | 1 | 240 units RNasin (Native) | 1.6×10^5 | 5.4×10^5 | | Background |
| Poly A RNA | 50 | 1 | 44 units RNasin (Native) | 5.5×10^4 | 1.9×10^4 | | |
| Poly A RNA | 10 | 1 | 240 units RNasin (Recombinant) | 7.7×10^4 | 1.8×10^5 | | |
| Poly A RNA | 50 | 2 | 3000 units RNase T1 | Background | Background | | |
| Template DNA | 2 | 1 | none | Background | Background | | |

The above results demonstrate that:

- The dose of RNasin alters the level of expression seen because increasing doses of RNasin lead to increased levels of luciferase activity.
- Both native and recombinant RNasin both protect the RNA.
- When the RNA is destroyed with RNase, the signal is abolished, demonstrating that the RNA is responsible for the signal (negative control).
- When an amount of template DNA equivalent to that used in the transcription is injected without DNase treatment, no signal is seen, demonstrating that the signal is not due to DNA contamination.
- Liver is the only site of luciferase expression.

From the above, the following conclusions are drawn. RNasin dose effects the level of expression. Both recombinant and native RNasin protect the injected RNA. No signal was seen when template DNA was injected or when RNA was destroyed with RNase, demonstrating that signal is not the result of DNA contamination. Finally, liver is the only site of luciferase expression.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

D. Competitor RNA enhances the activity.

- Luciferase activity from 20 micrograms of capped and polyadenylated luciferase RNA was measured. Four conditions were tested in experiments similar to those described in experiments 1 and 2:
- 1) 400 units of RNasin + competitor RNA;
 - 2) 40 units of RNasin with no competitor RNA;
 - 3) 800 units of RNasin with no competitor RNA;
 - 4) 1200 units of RNasin with no competitor RNA.
- At 3, 6 and 9 hours mice were given an intraperitoneal injection of luciferin and the light emitted from the mouse was measured.

The results are summarized in Table 3.

Table 3

| | Micro-grams Competitor RNA | Units of RNasin | Number of Mice (N) | Average (RLU/2 min) 3 hours | Average (RLU/2 min) 6 hours | Average (RLU/2 min) 9 hours |
|----------------|----------------------------|-----------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| RLU | 60 | 400 | 3 | 7.6×10^4 | 1.7×10^4 | 3.5×10^3 |
| standard error | | | | 3.5×10^4 | 4.2×10^3 | 9.6×10^2 |
| RLU | None | 400 | 3 | 6.5×10^3 | 4.2×10^3 | 2.6×10^3 |
| standard error | | | | 1.4×10^3 | 2.8×10^3 | 1.7×10^3 |
| RLU | None | 800 | 3 | 6.2×10^4 | 8.7×10^3 | 2.0×10^3 |
| standard error | | | | 3.1×10^4 | 2.5×10^3 | 3.7×10^2 |
| RLU | None | 1200 | 3 | 7.6×10^4 | 2.2×10^4 | 7.4×10^3 |
| standard error | | | | 5.4×10^4 | 1.6×10^4 | 4.5×10^3 |

- The above results demonstrate that:
- RNasin dose alters the luciferase activity because increasing doses of RNasin lead to increasing luciferase activity. The highest dose (1200 units of RNasin) gave the highest activity at all times tested.
 - The addition of competitor RNA enhanced the measured luciferase activity, because presence of the competitor RNA enhanced the luciferase activity. This effect was synergistic with the protective effect of the RNasin.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

From the above results, the following conclusions are drawn. Addition of competitor RNA increases luciferase signal. Furthermore, increasing doses of RNasin lead to increasing levels of luciferase activity

- 5 E. Cap independent translation of luciferase using an internal ribosome entry site.
 In Eukaryotes, translation of RNAs into protein occurs by two different mechanisms called cap dependent and cap independent translation. Cap independent translation requires a 5' nontranslated region called an internal
 10 ribosome entry site (IRES). Several RNA viruses, such as hepatitis C virus (HCV), polio virus and hepatitis A utilize IRES sequences to carry out cap independent translation. We originally developed the RNA transfection method described here with the idea that it could be used to make a small animal model system for studying anti-HCV therapeutics. Transfection with IRES RNAs could also be used for
 15 mutagenesis studies designed to investigate sequence elements necessary for efficient IRES function.

1. Description of Experiment and Results:

- The RNA HCVluc has the HCV IRES at the 5' end and the luciferase gene
 20 followed by a poly A tail. 40 micrograms of HCVluc + 40 micrograms of competitor RNA + 20 microliters of RNasin were injected into the tail vein of the mice. At 3 and 6 hours mice were given an intraperitoneal injection of luciferin and the light emitted from the mouse was measured. Result: The HCV IRES was able to drive translation of the injected HCV luciferase RNA fusion. Quantitation of the results is
 25 summarized in Table 4.

Table 4

| | 3 hours post injection | 6 hours post injection |
|------------------------------|------------------------|------------------------|
| Average Relative Light Units | 1.7×10^5 | 4.6×10^5 |
| Standard Error | 7.4×10^4 | 1.6×10^5 |

- 30 F. Measurable serum concentrations of human factor IX (hFIX) protein can be produced and secreted upon injection of hFIX RNA.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

Human factor IX protein is a blood clotting protein that is not produced by some patients with hemophilia. The levels of this protein in serum can be easily measured using an enzyme linked immunoassay (ELISA). We chose to express this protein for two reasons:

- 5 1) hFIX is a therapeutically relevant protein. Although transient expression of hFIX is not clinically relevant, it would be desirable to transiently express some other types of therapeutic proteins that do not require chronic expression.
- 2) hFIX is a human protein and is thus capable of eliciting an immune response in mice.

10 One application of RNA injection is in the development and testing of vaccines. An immune response to hFIX upon injection of hFIX RNA would demonstrate the proof of principle of using RNA as a vaccine.

1. Description of Experiment and Results:

15 40 micrograms of capped and polyadenylated hFIX RNA + 40 micrograms of competitor RNA + 800 units of RNasin were injected by tail vein into 1 mouse.
Result: 40 nanograms / milliliter of serum were detected by ELISA at 6 hours. This amount of hFIX is within the significant range of the ELISA assay.

20

G. Hydrodynamic Delivery of HCV genomic RNAs to create an HCV mouse model

25 Two groups of 6 mice were injected with:

- 1) 50 micrograms of capped HCV full length genomic RNA called 90 FL HCV (which also contains some uncapped RNA) + 40 micrograms of capped and polyadenylated hFIX RNA + 400 units of RNasin; or
- 2) a full length non-infectious HCV genomic RNA that has a mutation in

30 the replicase gene that makes it catalytically inactive (called 101 FL HCV) + 40 micrograms of capped and polyadenylated hFIX RNA + 400 units of RNasin.

The transcription templates for making the HCV RNAs were obtained from Charles Rice and Washington University. Six hours after injection the mice were

WO 03/010180

PCT/US02/22869

bled and hFIX levels are being measured to normalize for injection efficiency. The injected HCV RNAs are expected to degrade rapidly. Any RNA detected after a few days is likely to be RNA newly synthesized during viral replication. A quantitative real time PCR method has been developed to measure the levels of HCV RNA in 5 the livers of these mice. If replication of the virus occurs, then the levels of HCV RNAs in the mice injected with 90 FL HCV will be greater than the levels in mice injected with 101 FL HCV when measured weeks after injection. A histological assay is also being developed in order to assay for the synthesis of HCV proteins. Three different positive outcomes are possible 1) The RNA enters the liver but is 10 not translated and does not replicate 2) the RNA enters the liver and is translated but does not replicate 3) the RNA enters the liver, is translated and replicates. All three outcomes are useful model systems. If 1, 2 or 3 occurs then this system could be used to test ribozymes directed against HCV RNAs (see experiment 9 below). If 2 or 3 occurs then, this system could be used to test inhibitors of HCV 15 translation, replication and infection.

Injection of this RNA did not result in a viral replication cycle for HCV. However, another group has used a similar method to initiate a hepatitis delta replication cycle. See Chang J, Sigal LJ, Lerro A, Taylor J., J Virol 75(7):3469-73 (2001).

20

H. In vivo cleavage of HCV RNAs by ribozymes

DNAzymes targeting the IRES of HCV have been chemically synthesized. We hydrodynamically injected these ribozymes into mice and assessed their ability to decrease the levels of injected HCV RNAs within the liver. Five nanomoles of 25 DNAzyme targetting the IRES was coinjected with 20 µg of an RNA comprised of the HCV IRES followed by the firefly luciferase coding sequence followed by 30 adenosines. The sequence of the DNAzyme was 5'- GAGGTTAGGAGGCTAGCTACAACGGATCGTGCTCA-3' (SEQ ID NO:013). Mice that received the DNAzyme in combination with the target RNA emitted 95 % less 30 light at 6 hours than mice that received the target RNA alone. Conclusion: We demonstrated that this DNAzyme can inhibit translation from the HCV IRES, presumably by cleaving the IRES RNA sequence. Synthetic ribozymes were also tested using an analogous methodology and were found to be ineffective.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

I. This experiment is to do a timecourse of luciferase expression after a single injection of capped and polyadenylated RNA. If the following condition is met, then we can use a first order exponential decay fit (described by Equation 1) of the data to calculate the degradation rate of the expressed protein. In order for this data to be fit to a simple first order exponential decay, the half life of the mRNA must be significantly less than the halflife of the protein (at least 5-10 fold less). If this condition is not met, then a more complex mathematical relationship that takes into account the halflife of the mRNA can be used. Another solution to this problem is to decrease the half life of the mRNA by making it uncapped or omitting the competitor RNA.

If we define the amount of protein at a given time (or the signal from the protein) as A, the amount of protein (or signal) at the first timepoint as Ao, the decay rate constant as k and time after the first measurement as t, the equation would be of the form :

$$15 \quad A = A_0 \exp^{-kt} \quad (\text{Equation 1})$$

1. Description of the experiment:

Four groups of 6 mice were injected with 20 micrograms of capped polyadenylated luciferase RNA + 60 micrograms of uncapped competitor RNA + 200 units of RNasin. At 3, 6, 9 or 24 hours, the mice were given an intraperitoneal injection of luciferin (1.5 micrograms/ gram body weight) and the light emitted from the mouse was measured.

The results are provided in the table below:

| | Hours Post | Light Units | Standard | Standard Error |
|---|------------|-------------|------------|----------------|
| 1 | 3.000 | 530000.000 | 330000.000 | 150000.000 |
| 2 | 6.000 | 200000.000 | 86000.000 | 36000.000 |
| 3 | 9.000 | 110000.000 | 43000.000 | 18000.000 |
| 4 | 24.000 | 1900.000 | 1100.000 | 440.000 |

25 Relative light units were plotted vs. time and the resulting curve is fit to Equation 1. This analysis yields an apparent degradation rate constant of 0.297 hour⁻¹.

The most common method for measuring a half-life of a protein is the following. In one approach, the protein is purified and sometimes labeled (for example with radioactive iodine). The purified protein is injected and at different times the animal is sampled and the amount of protein remaining at any given time is plotted vs. time and the curve is fit to an equation such as Equation 1. The

WO 03/010180

PCT/US02/22869

advantage of our method is that it does not require the in vitro synthesis or purification of the protein.

J. We have constructed RNAs that contain regulatory regions of the HCV RNA controlling the translation of a protein called luciferase (referred to here as HCV luc RNA). We have also constructed DNA expression plasmids that express similar RNAs once they enter cells (referred to here as HCV luc DNA). See Figure 3 for diagrams of these constructs.

When either the HCV luc RNAs or the HCV luc DNAs are transfected into mice, they go to the liver and HCV luc RNAs or RNAs transcribed from the HCV luc DNAs are translated into luciferase protein. At various times, the substrate of the luciferase protein, luciferin, is injected into the mice. The enzyme luciferase consumes the luciferin and makes light in the process. The amount of light emitted from the mice is proportional to the amount of luciferase protein present at the time of the sampling.

We have synthesized short synthetic oligonucleotides of a type known as Morpholino oligos. We mixed 1 nanomol of a morpholino oligo with 10 micrograms of HCV luc RNA or 1 microgram of HCV luc DNA. The morpholino oligo was made by Gene Tools, LLC in Corvallis, Oregon and has the sequence 5'-
TCTTGAGGTTAGGATTCGTGCTC-3' (SEQ ID NO:14). This mixture is then added to 1.8 milliliters of buffer and injected under high pressure into the tail veins of mice as described in our previous application. As a control, mixtures that do not contain the inhibitor are injected into other mice. In the presence of inhibitor, emitted light is reduced by more than 90 %. We conclude from this finding that translation of the injected RNA or translation of the RNA produced from the injected DNA is prevented by the inhibitor by an antisense mechanism. In the case of the injected RNA we can only follow this inhibition for about 24 hours, because of the limited stability of the RNA in cells. In the case of the injected DNA, we can monitor translation for about 8 days. The translational inhibition lasted for the whole duration of the time we could measure translation in this system.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

K.

Experiment A

control group: RNAs containing the HCV IRES and a luciferase reporter sequence are injected into mice and they glow when this RNA is translated into 5 luciferase protein

Test group:

Coinject inhibitor with RNA. Both go to the same cells. Inhibition is expressed as activity (glowing) compared to control group.

10

Experiment B

Same as experiment A except we inject a DNA that encodes the target RNA along with the inhibitor. The DNA goes to the nucleus of the mouse

15

hepatocytes and is transcribed to give the target RNA. This RNA goes to the cytoplasm of the cells where it interacts with the inhibitor.

20

The constructs employed in these experiments are provided in Figure 4.

The results of these experiments with antisense and DNAzyme inhibitors are 25 provided in Figures 5A to 5F.

The above screening protocol in which the inhibitor and RNA/DNA are coadministered offers important advantages in terms of allowing one to separate issues of drug delivery from issues of drug efficacy.

25

It is evident from the above results and discussion that the subject invention provides a viable way of using RNAi agents in non-embryonic mammalian organisms, where the subject methods and compositions can be employed for a 30 variety of different academic and therapeutic applications. In addition, the subject invention provides an improved method of transferring a nucleic acid into a target cell is provided by the subject invention. Specifically, the subject invention provides for a highly efficient in vivo method for naked nucleic acid transfer which does not

WO 03/010180

PCT/US02/22869

employ viral vectors and therefore provides many advantages over prior art methods of nucleic acid transfer. As such, the subject invention represents a significant contribution to the art.

5 All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference. The citation of any publication is for its disclosure prior to the filing date and should not be construed as an admission that the present invention is not entitled to antedate such 10 publication by virtue of prior invention.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it is readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention 15 that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of reducing expression of a coding sequence in a target cell of a non-embryonic mammal, said method comprising:
 - 5 administering to said mammal an effective amount of an RNAi agent specific for said coding sequence to reduce expression of said coding sequence.
2. The method according to Claim 1, wherein said RNAi agent is an interfering ribonucleic acid.
- 10 3. The method according to Claim 2, wherein said interfering ribonucleic acid is a siRNA.
4. The method according to Claim 2, wherein said interfering ribonucleic acid is a shRNA.
- 15 5. The method according to Claim 1, wherein said RNAi agent is a transcription template of an interfering ribonucleic acid.
6. The method according to Claim 5, wherein said transcription template is a deoxyribonucleic acid.
- 20 7. The method according to Claim 6, wherein said deoxyribonucleic acid encodes a shRNA.
- 25 8. The method according to Claim 8, wherein said non-embryonic mammal is an adult.
9. The method according to Claim 8, wherein said non-embryonic mammal is a juvenile.
- 30 10. The method according to Claim 1, wherein said RNAi agent is hydrodynamically administered to said non-embryonic mammal.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

11. The method according to Claim 10, wherein said RNAi agent is hydrodynamically administered to said non-embryonic mammal in conjunction with an RNase inhibitor.

5 12. A pharmaceutical preparation comprising an RNAi agent in a pharmaceutically acceptable delivery vehicle.

13. The pharmaceutical preparation according to Claim 12, wherein said preparation further comprises an RNase inhibitor.

10 14. A kit for use in practicing the method of Claim 1, said kit comprising:
(a) a pharmaceutical preparation comprising an RNAi agent in a pharmaceutically acceptable delivery vehicle; and
(b) instructions for practicing the method of Claim 1.

15 15. The kit according to Claim 14, wherein said kit further comprises an RNase inhibitor.

16. A non-embryonic non-human animal comprising an RNAi agent.

20 17. A non-embryonic non-human animal produced according to the method of Claim 1.

25 18. A method for introducing a ribonucleic acid into a target cell of a vascularized multi-cellular organism, said method comprising:
administering said ribonucleic acid as a naked ribonucleic acid into the vascular system of said organism to introduce said ribonucleic acid into said target cell of said vascularized multi-cellular organism.

30 19. The method according to Claim 18, wherein said administering is intravenous.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

20. The method according to Claim 18, wherein said vascularized multi-cellular organism is a mammal.

21. The method according to Claim 18, wherein said target cell is a hepatic cell.

5

22. The method according to Claim 18, wherein said method further comprises administering an RNase inhibitor.

10 23. The method according to Claim 18, wherein said method further comprises administering a competitor ribonucleic acid to said organism.

24. A method for introducing a nucleic acid into a target cell of a vascularized multi-cellular organism, said method comprising:

15 hydrodynamically administering to said vascularized multi-cellular organism an aqueous formulation comprising said nucleic acid as a naked nucleic acid and an RNase inhibitor to introduce said nucleic acid into said target cell.

25. The method according to Claim 24, wherein said nucleic acid is a deoxyribonucleic acid.

20

26. The method according to Claim 24, wherein said nucleic acid is ribonucleic acid.

27. The method according to Claim 24, wherein said aqueous formulation further 25 comprises competitor ribonucleic acid.

28. A kit for use in delivering a nucleic acid to a target cell of a vascularized multi-cellular organism, said kit comprising:

30 said nucleic acid present as a naked nucleic acid; and
an RNase inhibitor;

29. The kit according to Claim 28, wherein said nucleic acid is a deoxyribonucleic acid.

WO 03/010180

PCT/US02/22869

30. The kit according to Claim 28, wherein said nucleic acid is a ribonucleic acid.
31. The kit according to Claim 28, wherein said kit further comprises instructions
5 for introducing said formulation into the vascular system a multi-cellular organism.
32. The kit according to Claim 28, wherein said kit further comprises a competitor
ribonucleic acid.
- 10 33. The kit according to Claim 28, wherein said kit further comprises a means for
vascularly administrating said aqueous formulation.
34. A method of determining the activity of an RNA virus candidate modulatory
agent, said method comprising:
 - 15 (1) hydrodynamically administering to a vascularized multicellular animal:
 - (a) a nucleic acid construct that includes either:
 - (i) a RNA molecule that includes at least one regulatory element of said RNA virus operably linked to a reporter element; or
 - (ii) a DNA molecule capable of being transcribed into said RNA molecule; and
 - (b) said candidate modulatory agent; and
 - (2) observing the effect of said modulatory agent on the activity of said
construct is to determine the activity of said candidate modulatory agent.
- 25 35. The method according to Claim 34, wherein said nucleic acid method further
comprises hydrodynamically administering an RNase inhibitor.
36. The method according to Claim 34, wherein said method further comprising
30 hydrodynamically administering a competitor RNA.
37. The method according to Claim 34, wherein said RNA virus is HCV.

WO 03/010180

1/10

PCT/US02/22869

Figure 1:

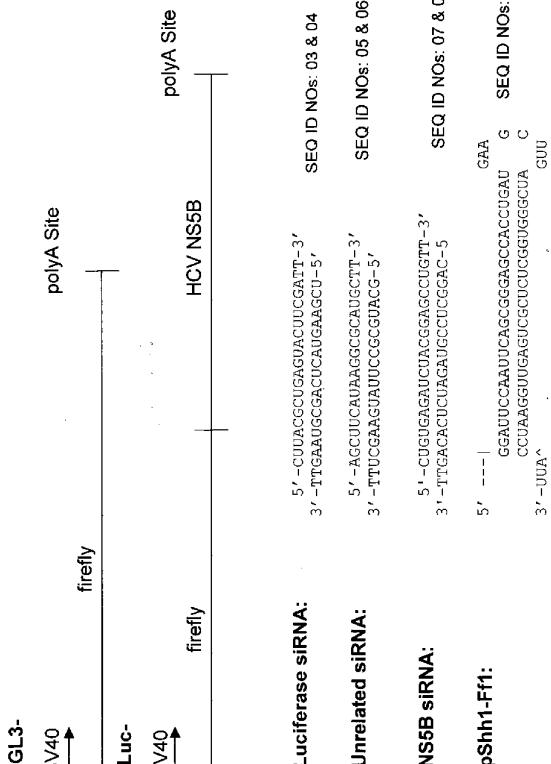
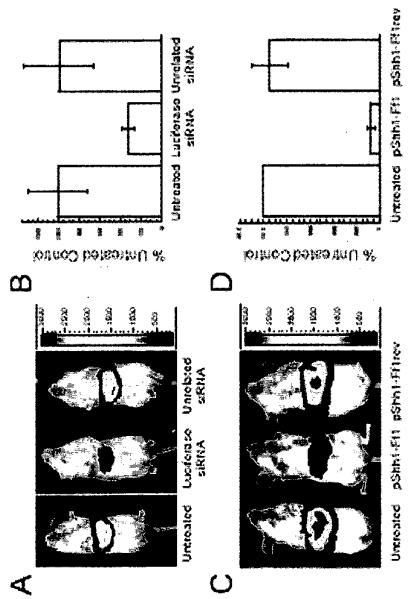


Figure 2

WO 03/010180

3/10

PCT/US02/22869

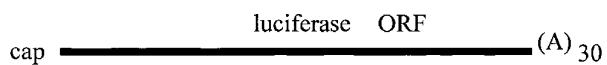
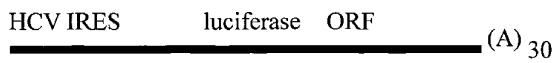
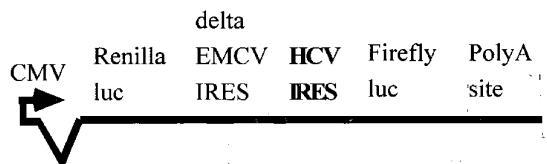
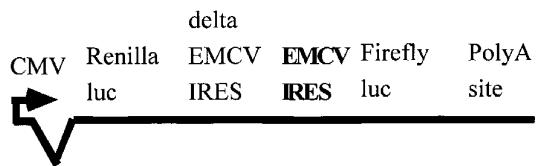
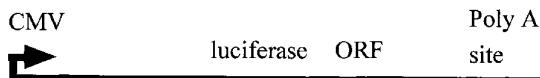
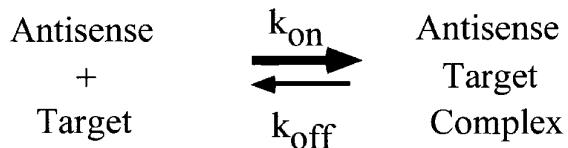
SP6 control RNA**ACCATG RNA****pHCV Dual Luc DNA****pEMCV Dual Luc DNA****pCMVGL3 DNA**

Figure 3

WO 03/010180

4/10

PCT/US02/22869



$$K = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} \quad k_{\text{on}} \text{ is diffusion controlled}$$

largely length independent

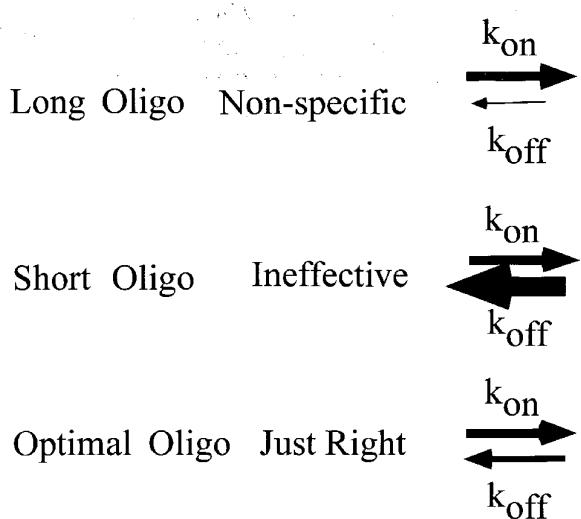


Figure 4

Figure 5A.
SP6 control RNA does not contain an HCV IRES and translation of this
RNA should not be inhibited by morpholino antisense. It is not. ACC
RNA does contain an IRES and its translation is inhibited

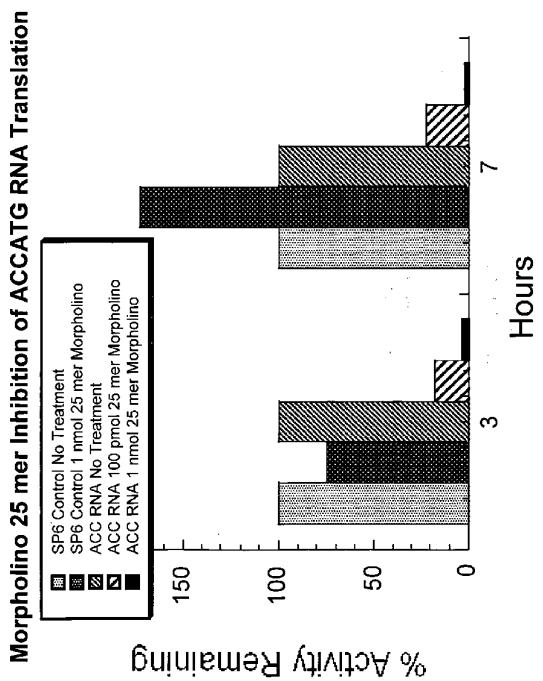


Figure 5B
The DNAzymes Dz 335 and Dz 352 as well as the antisense molecule Psdeoxy inhibit translation of ACCATG RNA (same as ACC RNA) by binding to the HCV IRES

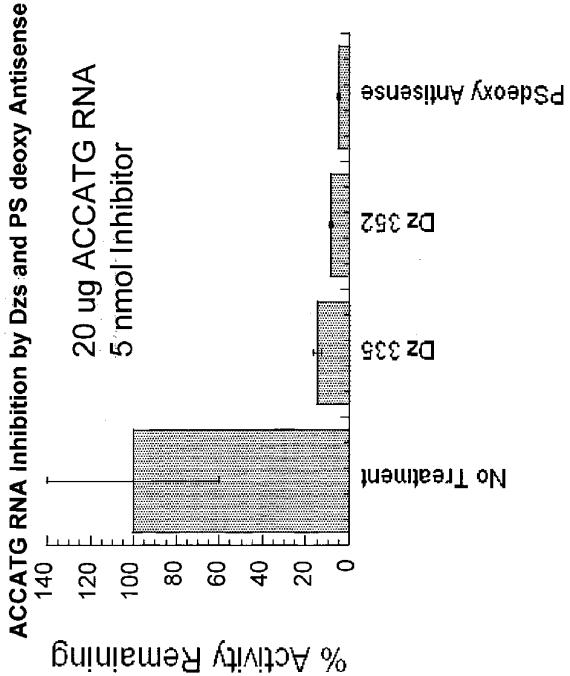


Figure 5C
The antisense molecule morpholino 25 mer inhibits translation of ACCATG RNA, which contains the HCV IRES, but not SP6 control RNA which does not. This inhibition is dose dependent.

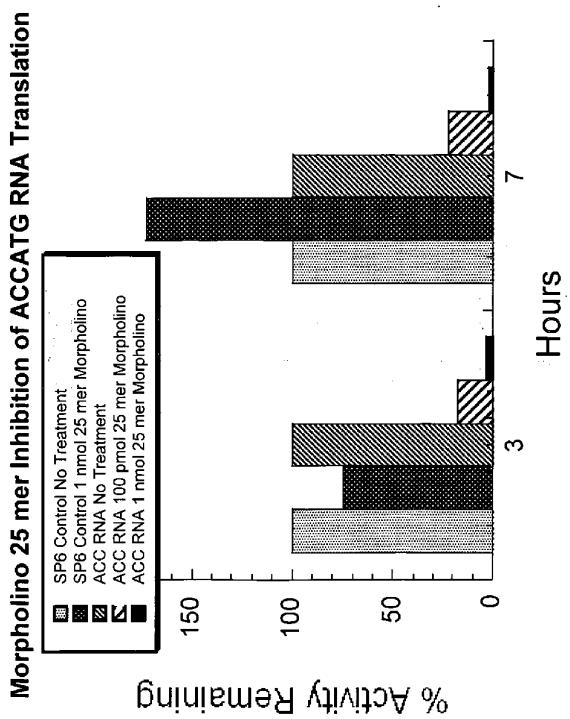
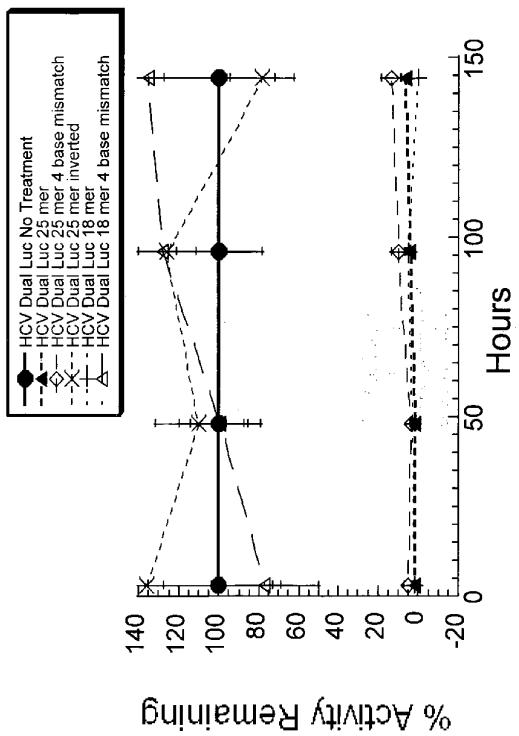


Figure 5D
The antisense molecule morpholino 25 mer inhibits translation of IRES containing RNA transcribed from HCV dual luc. However, this inhibition is not specific since a 4 base mismatch control also inhibits. A shorter oligo, morpholino 20 mer also inhibits and is specific since the 4 base mismatch does not inhibit.



WO 03/010180

PCT/US02/22869

9/10

Figure 5E
The plasmids EMCV dual luc and CMVGL3 do not contain an HCV IRES and luciferase translation should not be inhibited by morpholino antisense. It is not again indicating that the inhibition seen with ACCATG RNA and HCV dual luc is specific

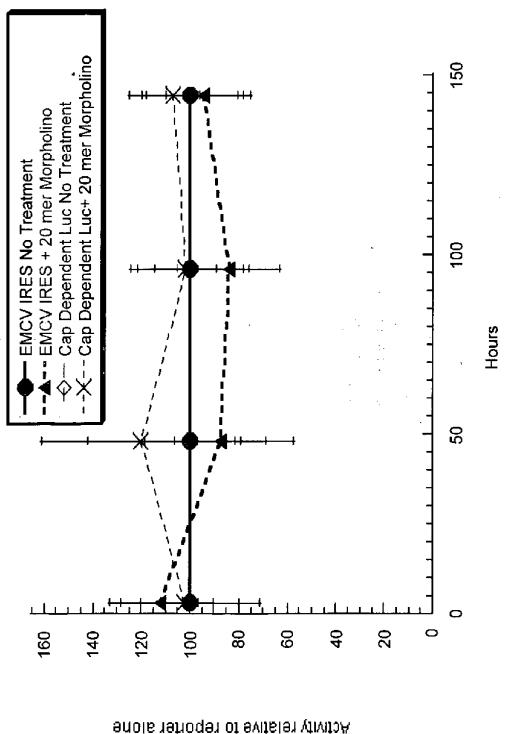
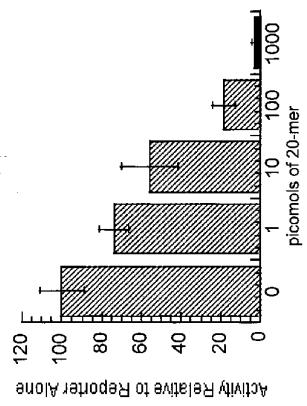


FIGURE 5F
Inhibition of HCV dual luc by the 20-mer morpholino is dose dependent between 1 and 1000 picomol per mouse as expected for an antisense inhibitor



WO 03/010180

PCT/US02/22869

1/3

SEQUENCE LISTING

<110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University
<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNAI
MEDiated INHIBITION OF GENE EXPRESSION IN MAMMALS

<130> STAN-180WO
<150> 60/307,411
<151> 2001-07-23

<150> 60/360,664
<151> 2002-02-27

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 21
<212> RNA
<213> oArtificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 1
ucgaaguacu cagcguagu u 21

<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 2
cuuacgcug a guacuucgau u 21

<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 3
cuuacgcug a guacuucgau u 21

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

WO 03/010180

PCT/US02/22869

2/3

<400> 4
uugaaugcga cucaugaagc u
<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide
<400> 5
agcuucauaa ggcgcaugcu u
<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide
<400> 6
uuucgaaagua uuccggguac g
<210> 7
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide
<400> 7
cugugagaau c uacggagccu guu
<210> 8
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide
<400> 8
uugacacucu agaugccucg gac
<210> 9
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide
<400> 9
ggauuccaau ucagcgaggag ccaccuau g
<210> 10
<211> 36

WO 03/010180

PCT/US02/22869

3/3

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 10
uaaccuaagg uugagucgcu cucggugggc uaguuc 36

<210> 11
<211> 66
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 11
ggucgaqua cucagcguaa gugaugucca cuuaaguggg uguuuuuugu guuggguguu 60
uugguu 66

<210> 12
<211> 78
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 12
gggauggacg auggccuuga ucuuuumuac cguacacccc accacuggga gauacaagau 60
caaggccauc gucuuccu 78

<210> 13
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

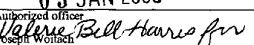
<400> 13
gaggtttagg aggcttagcta caacgatcg tgcra 35

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 14
tctttgaggt ttaggattcg tgctc 25

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US02/22869 |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC(7) : C07H 21/02, 21/04; G1K 31/70; A01K 67/00 US CL : 536/23.1, 23.5; 514/44; 800/8 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.1, 23.5, 514/44; 800/8 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched reviewed 60/307,411 and 60/360,664 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, STN search strategy attached | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | KENNEDY ET AL. Heritable gene silencing in <i>Drosophila</i> using double-stranded RNA. <i>Nature Biotechnology</i> . July 2000, Vol. 17, pages 896-898, entire reference. | 1-37 |
| Y | CLEMENTS ET AL. Use of double-stranded RNA interference in <i>Drosophila</i> cell lines to dissect signal transduction pathways. <i>PNAS</i> . 06 June 2000, Vol. 97, No. 12, pages 6499-6503. | 1-37 |
| X, P | PADDISON ET AL. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. <i>PNAS</i> . 05 February 2002, Vol. 99, No. 3, pages 1443-1448, entire reference. | 1-37 |
| X | BASS, B. Double-strand RNA as a template for gene silencing. <i>Cell</i> . 28 April 2000, Vol. 101, pages 235-238, see entire reference. | 1-17, 28-37 |
| --- | | ----- |
| Y | | 18-27 |
| Y | SOVOBODA ET AL. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. <i>Development</i> . 2000, Vol. 127, pages 4147-4156, entire reference. | 1-37 |
| Y | SMALHEISER ET AL. RNAi and brain function: was McConnell on the right track. 04 April 2001, <i>Trends Neurosciences</i> . Vol. 24, No. 4, pages 216-218, see entire reference. | 1-37 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | See patent family annex. |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <ul style="list-style-type: none"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*&* document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search 18 November 2002 (18.11.2002) | Date of mailing of the international search report 03 JAN 2003 | |
| Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. 703/305-3230 | Authorized officer  Telephone No. 703/308-1235 | |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | PCT/US02/22869 |
|---|--|-----------------------|
| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| | | |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き(51)Int.Cl.⁷

// C 1 2 N 15/09

F I

C 1 2 N 15/00

テーマコード(参考)

A

(72)発明者 カイ マーク

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス アルトス キャシタ ウエイ 565

(72)発明者 マカフリー アントン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パシフィカ #204 パロマ 77

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA11 DA02 GA11 HA11 HA17

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ20 QQ44 QQ52 QR32 QR35 QR39 QR41

QR72 QS11 QS36 QX02

4C084 AA13 AA17 ZB212 ZC202

4C086 AA01 AA02 MA01 MA04 ZB21 ZC20