

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成20年10月2日(2008.10.2)

【公表番号】特表2008-514242(P2008-514242A)

【公表日】平成20年5月8日(2008.5.8)

【年通号数】公開・登録公報2008-018

【出願番号】特願2007-534866(P2007-534866)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 31/197 (2006.01)

A 6 1 P 1/16 (2006.01)

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 31/197

A 6 1 P 1/16

A 6 1 P 31/14

A 6 1 K 47/48

【手続補正書】

【提出日】平成20年8月13日(2008.8.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変型リボヌクレオチドを含む s i R N A 分子であって、該 s i R N A は、
 (a) その 3 ' 末端に 2 塩基デオキシヌクレオチド「 T T 」配列を含み、
 (b) R N アーゼに対して耐性であり、
 (c) ウイルス複製を阻害し得る、
 s i R N A 分子。

【請求項 2】

前記 s i R N A 分子が 2 ' 改変されている、請求項 1 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 3】

前記 2 ' 改変が、フルオロ改変、メチル改変、メトキシエチル改変、およびプロピル改変からなる群より選択される、請求項 2 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 4】

前記フルオロ改変が、2 ' - フルオロ改変または 2 ' , 2 ' - フルオロ改変である、請求項 3 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 5】

前記 s i R N A の少なくとも 1 つのピリミジンが改変されており、該ピリミジンは、シトシン、シトシンの誘導体、ウラシル、またはウラシルの誘導体である、請求項 4 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 6】

前記 s i R N A 中のピリミジンすべてが改変されている、請求項 5 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 7】

前記 s i R N A の両方の鎖が、少なくとも 1 つの改変型ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 8】

前記 s i R N A が、約 10 個～約 30 個のリボヌクレオチドからなる、請求項 1 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 9】

前記 s i R N A が、約 19 個～約 23 個のリボヌクレオチドからなる、請求項 8 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 10】

H C V の複製を阻害する、請求項 1 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 11】

s i R N A 5、s i R N A C 1、s i R N A C 2、s i R N A 5 B 1、s i R N A 5 B 2、または s i R N A 5 B 4 のヌクレオチド配列と少なくとも 80 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 10 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 12】

少なくとも 1 つのレセプター結合リガンドに連結されている、請求項 10 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 13】

前記レセプター結合リガンドが、前記 s i R N A 分子の 5' 末端または 3' 末端に結合されている、請求項 12 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 14】

前記レセプター結合リガンドが前記 s i R N A 分子の複数の末端に結合されている、請求項 13 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 15】

前記レセプター結合リガンドが、コレステロール、H B V 表面抗原、および低密度リボタンパク質からなる群より選択される、請求項 12 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 16】

前記レセプター結合リガンドがコレステロールである、請求項 15 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 17】

少なくとも 1 つのリボヌクレオチドの 2' 位改変をさらに含み、該少なくとも 1 つのリボヌクレオチドの 2' 位改変によって前記 s i R N A が分解に対して耐性になっている、請求項 12 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 つのリボヌクレオチドの 2' 位改変が、2' - フルオロ改変または 2' , 2' - フルオロ改変である、請求項 17 に記載の s i R N A 分子。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0134

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0134】

2つの例示的な改変型 *s i R N A* (順に、配列番号5および配列番号6)を以下に示す:

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0143

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0143】

【図1】図1は、HCVゲノム由来の5'UTRの配列および二次構造を示す(配列番号2)。肝細胞中のHCVに対してRNAiを誘導するための*s i R N A*の特異的配列(出現する順序で、それぞれ、配列番号3~配列番号10)も提供する。

【図2】図2は、肝細胞中のHCVに対するRNAiの誘導に有用ないくつかのHCV特異的*s i R N A*の配列を提供する。各HCV特異的*s i R N A*を、第1のカラム中に示す記号表示によって特定する。左に示される配列は、出現する順序で、それぞれ、配列番号11~配列番号29であり、右に示される配列は、出現する順序で、それぞれ、配列番号30~配列番号67である。

【図3】図3は、SARSコロナウイルスのヌクレオチド配列を示す(配列番号1)。

【図4】図4は、SARSコロナウイルスのオープンリーディングフレームの略図である(配列番号1の塩基27263~塩基27272が示される)。

【図5】図5は、ヒト肝臓細胞中での*s i R N A*の有効性を試験するために使用した肝細胞癌細胞株Huh7中に含まれるサブゲノムHCVレプリコンを示す。

【図6】種々の濃度の*s i R N A*5を投与したサブゲノムHCVレプリコンを含むHuh-7細胞(5-2株)中での正規化ルシフェラーゼ活性の用量応答を示す。トランスフェクションから1、2、および3日後に測定したルシフェラーゼ活性は、*s i R N A*用量の増加に伴って減少した。Promega Corp. (Madison, WI)から市販されているルシフェラーゼアッセイシステムを製造者の説明書にしたがって使用してルシフェラーゼアッセイを行った。

【図7】図7は、Huh-7肝臓細胞中でHCV指向性(*directed*)RNAを誘導するための*s i R N A*5の配列特異性を示す。

【図8】図8は、*s i R N A*5がHuh-7細胞に毒性を示さないことを証明する。Promega Corp. (Madison, WI)から市販されているATPアーゼアッセイキットを製造者の説明書にしたがって使用してATPアーゼレベルをアッセイした。

【図9】図9は、RNAアッセイによって測定した、21-5細胞(全長HCVを含むHuh-7細胞)中でのHCV複製に対する*s i R N A*5の効果を示す。TaqMan(商標)RNAキット(F. Hoffman La-Roche, Switzerland)を製造者の説明書にしたがって使用してRNAレベルをアッセイした。値を正規化する。

【図10】図10は、*s i R N A*5がHuh5-2細胞の生存度に影響を与えないことを証明する。詳細には、*s i R N A*5またはGAPDH特異的*s i R N A*でトランスフェクトしたHuh5-2細胞中のGAPDH(解糖に不可欠な酵素)をコードするmRNAを測定した。グラフは、*s i R N A*がGAPDHのRNAレベルに影響を与えなかったことを証明する。TaqMan(商標)RNAキット(F. Hoffman La-Roche, Switzerland)を製造者の説明書にしたがって使用してGAPDHを測定した。値を正規化する。

【図11】図11は、ショウジョウバエルシフェラーゼ遺伝子をターゲティングする異なる濃度の2'-フルオロ-*s i R N A*(2'-F-GL2)を投与したサブゲノムHCVレプリコンを含むHuh7細胞(5-2株)中での正規化ルシフェラーゼ活性の用量応答を示す。トランスフェクションから2日後に測定したルシフェラーゼ活性は、*s i R N A*用量の増加に伴って減少した。ホタルルシフェラーゼキット(Promega Corp., Madison, WI)を製造者の説明書にしたがって使用してルシフェラーゼアッセイを行った。

【図12】図12は、リボソームの非存在下で *siRNA* Chol-GL2 を使用した 5-2 細胞中でのルシフェラーゼ活性の阻害を証明する。

【図13】図13は、PAGE によって分離した 5' 標識 *siRNA* 二重鎖のオートラジオグラフを示し、10日目までのヒト血清中でインキュベートした 2'-フルオロ改変型 *siRNA* (2'-F-GL2) の安定性を示す。*siRNA* 二重鎖を、ヒト血清とのインキュベーションおよび 20% PAGE による分析に供した。レーンの組成は以下である：レーン1、11、および 21：32 P 末端標識 *siRNA* のみ；レーン2～10、12～20、および 22～25：ヒト血清とインキュベートした *siRNA*。レーン2および 12、1分；レーン3および 13、5分；レーン4および 14、15分；レーン5および 15、30分；レーン6および 16、1時間；レーン7および 17、2時間；レーン8および 18、4時間；レーン9および 19、8時間；レーン10および 20、24時間；レーン22、24時間；レーン23、48時間；レーン24、120時間；レーン25、240時間のインキュベーション。

【図14】図14は、フッ素化 *dsRNA* を 2'-F-*siRNA* に変換するための組換えヒトダイサーの使用を証明する。レーンの組成は以下である：レーン1：サイズマーカー、 λ HindIII + X174 λ HaeIII；レーン2：*ribo/ribo* ホモ二重鎖 *RNA*；レーン3：*ribo/2'-F* ヘテロ二重鎖 *RNA*；レーン4：2'-F/*ribo* ヘテロ二重鎖 *RNA*；レーン6：サイズマーカー、10bp DNA ラダー；レーン7：*ribo/ribo* ホモ二重鎖 *siRNA*；レーン8：*ribo/2'-F* ヘテロ二重鎖 *siRNA*；レーン9：2'-F/*ribo* ヘテロ二重鎖 *siRNA*；レーン10：2'-F/2'-F ホモ二重鎖 *siRNA*。

【図15】図15は、HCV 特異的 *siRNA* に対するサブゲノム HCV レプリコンを含む Huh-7 細胞 (5-2 株) 中での正規化ルシフェラーゼ活性の用量応答を示す。ルシフェラーゼ活性は、各 *siRNA* 用量の増加に伴って減少した。

【図16】図16は、コレステロールがコレステロール改変型 GL2 *siRNA* に対するサブゲノム HCV レプリコンを含む Huh-7 細胞 (5-2 株) 中での正規化ルシフェラーゼ活性の用量応答を示すことを示す。

【図17】図17は、全ピリミジンの 2'-フルオロピリミジン置換 (2'-F-*siRNA*) および全ピリミジンの 2'-フルオロピリミジン置換を含み、2'-F-*siRNA* 中に存在するリボヌクレオチド「UU」突出部に代わる分子の 3' 末端に添加した 2 塩基デオキシリボヌクレオチド「TT」配列も含むように改変された *siRNA* で認められた安定性の増加を証明する。

【図18】図18は、2'-糖内のフッ素化によって *siRNA* 安定性を劇的に増加させることができることを示す。

【図19】図19は、インビボでの *siRNA* の評価を示す。

【図20】図20は、低圧 IV 注射によって結合体化 2'-F-*siRNA* がキメラマウスで有効であることを示す。

【図21】図21は、皮下投与した結合体化 2'-F-*siRNA* がキメラマウスで部分的に有効であることを示す。