

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5723154号
(P5723154)

(45) 発行日 平成27年5月27日 (2015. 5. 27)

(24) 登録日 平成27年4月3日 (2015. 4. 3)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)
A 6 1 K 31/713 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 G
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 K 31/713

請求項の数 43 (全 100 頁)

(21) 出願番号 特願2010-525916 (P2010-525916)
 (86) (22) 出願日 平成20年9月17日 (2008. 9. 17)
 (65) 公表番号 特表2010-538677 (P2010-538677A)
 (43) 公表日 平成22年12月16日 (2010. 12. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/076675
 (87) 国際公開番号 W02009/039173
 (87) 国際公開日 平成21年3月26日 (2009. 3. 26)
 審査請求日 平成23年8月22日 (2011. 8. 22)
 (31) 優先権主張番号 60/973, 548
 (32) 優先日 平成19年9月19日 (2007. 9. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 310009775
 アブライド バイオシステムズ リミテッ
 ド ライアビリティー カンパニー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カー
 ルズバッド パン アレン ウェイ 57
 91
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 パリ, ニティン
 アメリカ合衆国 テキサス 78681,
 ラウンド ロック, ハーブズ コーブ
 8005

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNA iにおけるオフターゲット表現型の影響を減少させるための S iRNA配列非依存性修飾
 フォーマットおよびその安定化型

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

各々が 1 8 ~ 2 5ヌクレオチドの長さを有するパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドおよびガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドを含む化学合成した低分子干渉RNAであって、該ガイドオリゴヌクレオチドは少なくとも12ヌクレオチドのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドに対して連続して相補的な領域を有し、該ガイドオリゴヌクレオチドは標的mRNAの少なくとも一部に相補性をさらに有し、該パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは以下の配列非依存性修飾フォーマット（1）、配列非依存性修飾フォーマット（2）、または配列非依存性修飾フォーマット（3）に従うオリゴヌクレオチド：

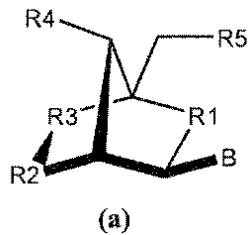
（1）5' N_p - m - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'（式中、pは0または1であり、xは、7、8、9、10、または11であり、rは、0、1、または2であり、qは、パッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス（p + x + r + 4）を示す整数である）、
 （2）5' N_p - m - m - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'（式中、pは0または1であり、yは、7、8、9または10であり、zは1であり、rは0、1、または2であり、qは、パッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス（p + y + z + r + 4）を示す整数である）、

（3）5' m - N₁ - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'（式中、xは、8、9、または10であり、rは、0、1、または2であり、qは、パッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス（x + r + 5）を示す整数である）の1つを含み、

ここで、

各 m は、独立して、構造 (a) のピシクロヌクレオチドであるか、または、 m は独立して 2' - O - メチルヌクレオチドであり、ここで、構造 (a) は、以下：

【化 4】



10

(式中、

R 1 および R 2 は、独立して、O、S、CH₂、または NR であり、ここで、R は水素または C₁ - 3 アルキルであり、

R 3 は、CH₂、CH₂ - O、CH₂ - S、CH₂ - CH₂、CH₂ - CH₂ - CH₂、CH = CH、または CH₂ - NR であり、ここで、R は水素または C₁ - 3 アルキルであり、

R 4 および R 5 は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、

R 4 および R 5 の少なくとも 1 つはヌクレオシド間結合であり、

B は、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである)

20

であり、

各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、

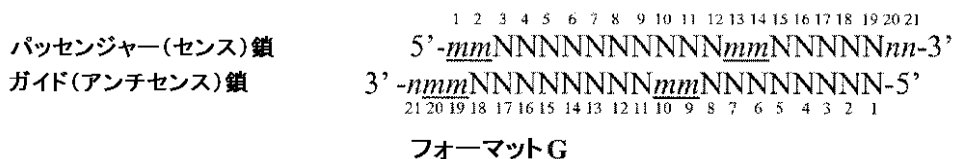
m がピシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

m が 2' - O - メチルヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、2' - O - メチルヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

ここで、

該低分子干渉 RNA は、以下のフォーマット G：

【化 5 A】



30

ではない、

化学合成した低分子干渉 RNA。

【請求項 2】

前記パッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドが配列非依存性修飾フォーマット(1)(式中、 p は 0 であり、 x は 10 であり、 r は 2 である)を含む、請求項 1 に記載の化学合成した低分子干渉 RNA。

40

【請求項 3】

前記パッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドが配列非依存性修飾フォーマット(1)(式中、 p は 0 であり、 x は 9 または 11 であり、 r は 2 である)を含む、請求項 1 に記載の化学合成した低分子干渉 RNA。

【請求項 4】

前記パッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドが配列非依存性修飾フォーマット(2)(p は 0 であり、 y は 9 であり、 r は 2 である)を含む、請求項 1 に記載の化学合成した低分子干渉 RNA。

【請求項 5】

50

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット（１）（式中、 p は０であり、 x は１０であり、 r は２であり、各 m は構造（ a ）（式中、 R_1 は０であり、 R_2 は０であり、 R_3 は CH_2 である）を有する）を含む、請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

【請求項６】

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット（１）（式中、 p は１であり、 x は９または１０であり、 r は２であり、各 m は構造（ a ）（式中、 R_1 は０であり、 R_2 は０であり、 R_3 は CH_2 である）を有する）を含む、請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

【請求項７】

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット（３）（式中、 x は９または１０であり、 r は２であり、各 m は構造（ a ）（式中、 R_1 は０であり、 R_2 は０であり、 R_3 は CH_2 である）を有する）を含む、請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

【請求項８】

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドおよびガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドがヌクレオチドループまたはリンカーループを介して共有結合して低分子ヘアピンオリゴヌクレオチドを形成する、請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

【請求項９】

siRNAの各3'末端が、独立して、１つ、２つ、または３つのヌクレオチドオーバーハングを有する、請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

【請求項１０】

少なくとも１つのヌクレオシド間結合がホスホジエステルヌクレオシド間結合以外である、請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

【請求項１１】

前記化学合成した低分子干渉RNAが細胞ターゲティングリガンドとさらに会合する、請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

【請求項１２】

5'末端がリン酸置換基、 C_{1-12} -アルキル置換基、 C_{1-12} -アルキルアミン置換基、 C_{1-12} -アルケニル置換基、 C_{1-12} -アルキニル置換基、 C_{1-12} -シクロアルキル置換基、 C_{1-12} -アラルキル置換基、アリール置換基、アシル置換基、またはシリル置換基でさらに誘導体化される、請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

【請求項１３】

請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNAおよび生物学的に許容可能なキャリアを含む組成物。

【請求項１４】

請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNAおよびトランスフェクション剤を含むキット。

【請求項１５】

請求項１に記載の化学合成した低分子干渉RNAを効力を維持しながらオフターゲット事象を減少させるのに十分な量で含む、RNA干渉による標的遺伝子発現の阻害のためにオフターゲット事象を最小にするための組成物であって、該組成物は、該標的遺伝子を含む細胞へと投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項１６】

前記遺伝子が内因性遺伝子である、請求項１５に記載の組成物。

【請求項１７】

前記組成物が、細胞を含む細胞培養物または細胞を含む組織に対して*in vitro*で投与されることを特徴とする、請求項１５に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

前記組成物が、細胞を含む組織、細胞を含む体液、または細胞を含む器官に対して *ex vivo* で投与されることを特徴とする、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物が、細胞を含む器官または動物に対して *in vivo* で投与されることを特徴とする、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 20】

化学合成した低分子干渉 RNA をガイドオリゴヌクレオチドの効力を維持しながらパッセンジャーオリゴヌクレオチドによる切断を最小にするのに十分な量で含む RNA 干渉による外因的に得られた標的遺伝子の発現阻害におけるパッセンジャーオリゴヌクレオチドによる切断を最小にするための組成物であって、該低分子干渉 RNA が、

パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドであって、該パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、18 ~ 25ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾フォーマット（1）、配列非依存性修飾フォーマット（2）、または（3）配列非依存性修飾フォーマット（3）に従うオリゴヌクレオチド：

（1） $5' N_p - m - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 p は 0 または 1 であり、 x は、7、8、9、10、または 11 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q は、パッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス（ $p + x + r + 4$ ）を示す整数であり、

（2） $5' N_p - m - m - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 p は 0 または 1 であり、 y は 7、8、9 または 10 であり、 z は 1 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q は、パッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス（ $p + y + z + r + 4$ ）を示す整数であり、

（3） $5' m - N_1 - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 x は、8、9、または 10 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q は、パッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス（ $x + r + 5$ ）を示す整数である）の 1 つを含み、

ここで、

各 m は、独立して、2' - O - メチル修飾ヌクレオチドであり、

各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、

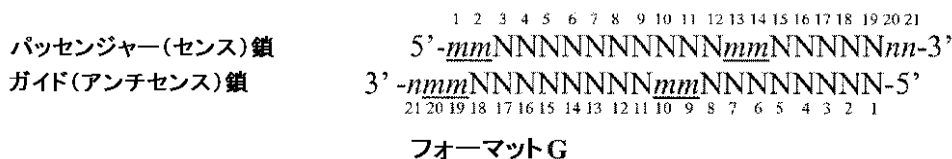
各 N は、独立して、非修飾ヌクレオチドである、パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチド、および

18 ~ 25ヌクレオチドを有するガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドであって、該ガイドオリゴヌクレオチドは、少なくとも 12ヌクレオチドのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域を有し、該ガイドオリゴヌクレオチドが標的 mRNA の少なくとも一部とさらに相補的である、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチド

を含み、ここで、

該低分子干渉 RNA は、以下のフォーマット G：

【化 5 B】



ではない組成物。

【請求項 21】

パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドであって、18 ~ 25ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾フォーマット（4）、フォーマット（5）、またはフォーマット（6）に従うオリゴヌクレオチド：

(4) $5' m_p - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ (式中、 p は0、1、2、3または4であり、そして p が0である場合、 x は12であり、 p が1である場合、 x は11であり、 p が2である場合、 x は10であり、 p が3である場合、 x は9であり、 p が4である場合、 x は8であり、 r は、0、1、または2であり、 q はパッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス($p + x + r + 2$)を示す整数である)

(5) $5' m - m - N_x - m - N_q - n_r 3'$ (式中、 x は11であり、 r は、0、1、または2であり、 q はパッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス($x + r + 3$)を示す整数である)

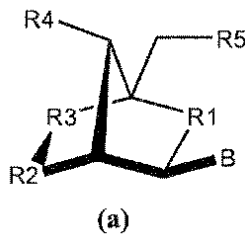
(6) $5' m_p - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'$ (式中、 p は3であり、 y は9であり、 z は1であり、 r は、0、1、または2であり、 q はパッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス($p + y + z + r + 2$)を示す整数である)の1つを含むパッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチド、および

18~25ヌクレオチドを有するガイド(アンチセンス)オリゴヌクレオチドであって、該ガイドオリゴヌクレオチドは、少なくとも12ヌクレオチドのパッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域を有し、該ガイドオリゴヌクレオチドが標的mRNAの少なくとも一部とさらに相補的である、ガイド(アンチセンス)オリゴヌクレオチド

を含む低分子干渉RNAであって、ここで、

各 m は、独立して、構造(a)のビシクロヌクレオチドであるか、または、 m は独立して2'-O-メチルヌクレオチドであり、ここで、構造(a)は、以下：

【化4】



(式中、

R1およびR2は、独立して、O、S、CH₂、またはNRであり、ここで、Rは水素またはC₁₋₃アルキルであり、

R3は、CH₂、CH₂-O、CH₂-S、CH₂-CH₂、CH₂-CH₂-CH₂、CH=CH、またはCH₂-NRであり、ここで、Rは水素またはC₁₋₃アルキルであり、

R4およびR5は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、

R4およびR5の少なくとも1つはヌクレオシド間結合であり、

Bは、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである)であり、

各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、且つオーバーハンギングヌクレオチドであり、

m がビシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ビシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

m が2'-O-メチルヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、2'-O-メチルヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

ここで、

該低分子干渉RNAは、以下のフォーマットG：

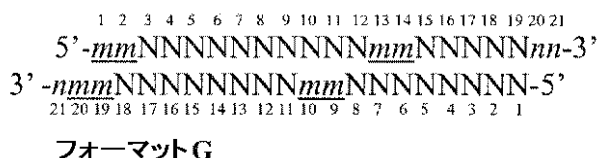
10

20

30

40

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



【請求項 2 2】

10

各修飾ヌクレオチドは、独立して、ピシクロヌクレオチド、トリシクロヌクレオチド、または 2' - 修飾ヌクレオチドである、請求項 21 に記載の低分子干渉 RNA。

【請求項 23】

【請求項 24】

20

前記長さが19ヌクレオチドである場合、前記ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、および5位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、

前記長さが20ヌクレオチドである場合、前記ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、5位、および6位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、

前記長さが 2 1 ヌクレオチドである場合、前記ガイドオリゴヌクレオチドの 2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、および 7 位の少なくとも 1 つは修飾ヌクレオチドである、請求項 2 2に記載の低分子干渉 RNA。

【請求項 25】

30

請求項 2 1 から 2 4 のいずれか 1 項に記載の低分子干渉 R N A および生物学的に許容可能なキャリアを含む組成物。

【請求項 26】

請求項 2 1 から 2 4 のいずれか 1 項に記載の低分子干渉 RNA を効力を維持しながらオフターゲット事象を減少させるのに十分な量で含む、RNA 干渉による標的遺伝子発現の阻害のためのオフターゲット事象を減少させるための組成物。

【請求項 27】

前記組成物が血管内注射を介して投与されることを特徴とする、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 28】

40

請求項 2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6 または 2 7 に記載の低分子干渉 R N A を含む組成物であって、各修飾ヌクレオチドが、構造 (a) を有し、

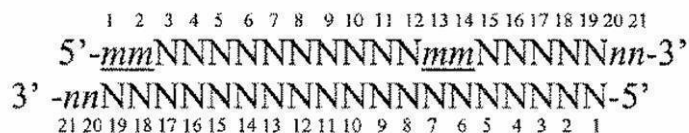
該組成物がそれを必要とする被験体に *in vivo* で投与されることを特徴とし、投与後、修飾ヌクレオチドを欠く低分子干渉RNAの量と比較した場合、より大量の該低分子干渉RNAが *in vivo* で存在する、組成物。

【請求項 29】

以下：

【化 1 A】

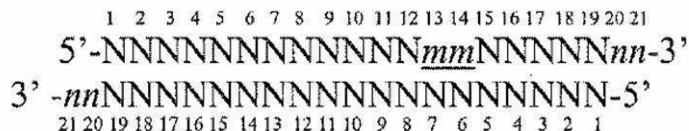
パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



フォーマット H

【化 1 B】

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖

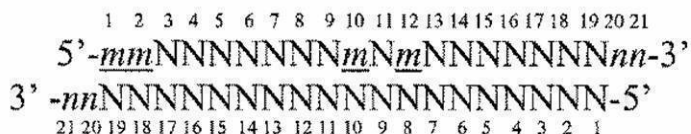


フォーマット Q

10

【化 1 C】

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖

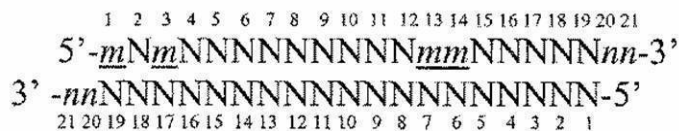


フォーマット V (-2)

20

【化 1 D】

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



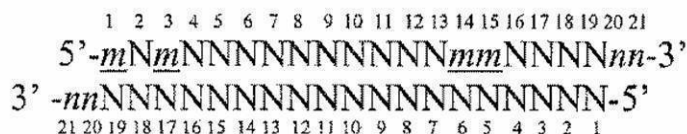
フォーマット Y

または

【化 1 E】

30

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



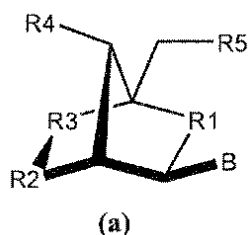
フォーマット Y+1

から選択される修飾フォーマットに従う化学合成した低分子干渉RNAであって、ここで、

各mは、独立して、構造(a)のピシクロヌクレオチドであるか、または、mは独立して2'-O-メチルヌクレオチドであり、ここで、構造(a)は、以下：

40

【化 4】



(式中、

R1およびR2は、独立して、O、S、CH₂、またはNRであり、ここで、Rは水

50

素または C_{1-3} アルキルであり、

R_3 は、 CH_2 、 CH_2-O 、 CH_2-S 、 CH_2-CH_2 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、 $CH=CH$ 、または CH_2-NR であり、ここで、 R は水素または C_{1-3} アルキルであり、

R_4 および R_5 は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、
 R_4 および R_5 の少なくとも 1 つはヌクレオシド間結合であり、

B は、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである)
 であり、

各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、

m がピシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

m が 2'-O-メチルヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、2'-O-メチルヌクレオチド以外のヌクレオチドである、

化学合成した低分子干渉 RNA。

【請求項 30】

以下：

【化 2 A】

パッセンジャー(センス)鎖
 ガイド(アンチセンス)鎖



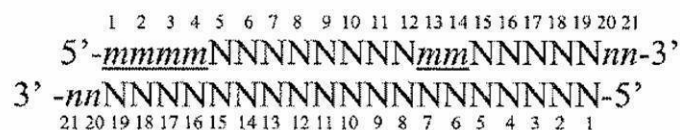
フォーマット JB1

パッセンジャー(センス)鎖
 ガイド(アンチセンス)鎖



フォーマット JB2

パッセンジャー(センス)鎖
 ガイド(アンチセンス)鎖



フォーマット JB3

パッセンジャー(センス)鎖
 ガイド(アンチセンス)鎖



フォーマット JB4

または

パッセンジャー(センス)鎖
 ガイド(アンチセンス)鎖



フォーマット JB5

から選択される修飾フォーマットに従う化学合成した低分子干渉 RNA であって、ここで

、

10

20

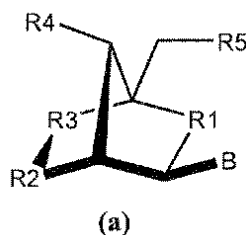
30

40

50

各 m は、独立して、構造 (a) のビスクロヌクレオチドであるか、または、 m は独立して 2' - O - メチルヌクレオチドであり、ここで、構造 (a) は、以下：

【化 4】



10

(式中、

R_1 および R_2 は、独立して、O、S、 CH_2 、またはNRであり、ここで、Rは水素または C_{1-3} アルキルであり、

R_3 は、 CH_2 、 CH_2-O 、 CH_2-S 、 CH_2-CH_2 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、 $CH=CH$ 、または CH_2-NR であり、ここで、Rは水素または C_{1-3} アルキルであり、

R_4 および R_5 は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、

R_4 および R_5 の少なくとも1つはヌクレオシド間結合であり、

Bは、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである)

であり、

20

各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、

m がビスクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ビスクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

m が 2' - O - メチルヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、2' - O - メチルヌクレオチド以外のヌクレオチドである、

化学合成した低分子干渉RNA。

【請求項 31】

以下

【化 3 A】

30

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



フォーマット DH47

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖

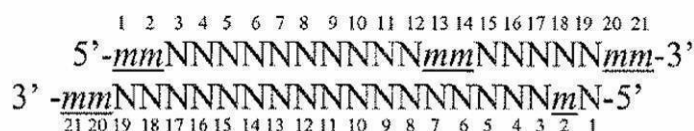


フォーマット DH29

40

【化 3 B】

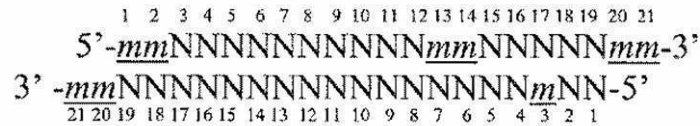
パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



フォーマット DH1

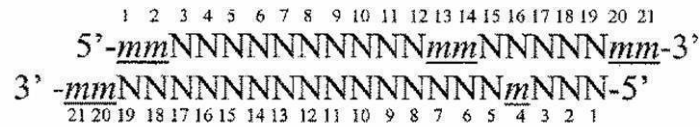
【化 3 C】

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



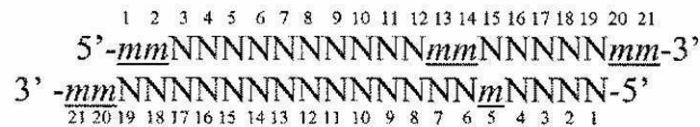
フォーマット DH39

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



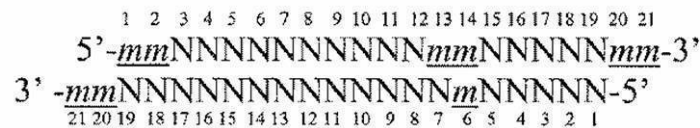
フォーマット DH40

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



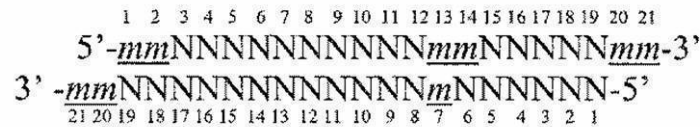
フォーマット DH41

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖



フォーマット DH42

パッセンジャー(センス)鎖
ガイド(アンチセンス)鎖

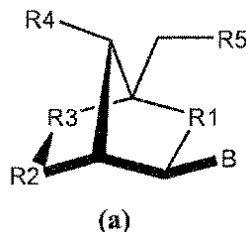


フォーマット DH43

から選択される修飾フォーマットに従う化学合成した低分子干渉RNAであって、ここで、

各mは、独立して、構造(a)のピシクロヌクレオチドであるか、または、mは独立して2'-O-メチルヌクレオチドであり、ここで、構造(a)は、以下：

【化 4】



(式中、

R1およびR2は、独立して、O、S、CH₂、またはNRであり、ここで、Rは水素またはC₁~₃アルキルであり、

R3は、CH₂、CH₂-O、CH₂-S、CH₂-CH₂、CH₂-CH₂-CH₂、CH=CH、またはCH₂-NRであり、ここで、Rは水素またはC₁~₃アルキルであり、

R4およびR5は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、R4およびR5の少なくとも1つはヌクレオシド間結合であり、

10

20

30

40

50

B は、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである）
であり、

各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、

m がピシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

m が 2' - O - メチルヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、2' - O - メチルヌクレオチド以外のヌクレオチドである、
化学合成した低分子干渉 RNA。

【請求項 3 2】

各々が 1 8 ~ 2 5 ヌクレオチドの長さを有するパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドおよびガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドを含む化学合成した二本鎖 RNA であって、該ガイドオリゴヌクレオチドは少なくとも 1 2 ヌクレオチドのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドに対して連続して相補的な領域を有し、該ガイドオリゴヌクレオチドは標的 mRNA の少なくとも一部に相補性をさらに有し、該パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは以下の配列非依存性修飾フォーマット（1）、配列非依存性修飾フォーマット（2）、または配列非依存性修飾フォーマット（3）に従うオリゴヌクレオチド：

（1）5' N_p - m - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'（式中、p は 0 または 1 であり、x は、9、10、または 11 であり、r は、0、1、または 2 であり、q は、パッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス（p + x + r + 4）を示す整数である）、（2）5' N_p - m - m - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'（式中、p は 0 または 1 であり、y は、7 であり、z は 1 であり、r は 0、1、または 2 であり、q は、パッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス（p + y + z + r + 4）を示す整数である）、

（3）5' m - N₁ - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'（式中、x は、9、または 10 であり、r は、0、1、または 2 であり、q は、パッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス（x + r + 5）を示す整数である）の 1 つを含み、

ここで、

各 m は、独立して、2' - 修飾ヌクレオチドであって、該 2' - 修飾ヌクレオチドの該 2' - 修飾は、OR であり、R はアルキルであり、該アルキル部分は C1 - C6 であり、

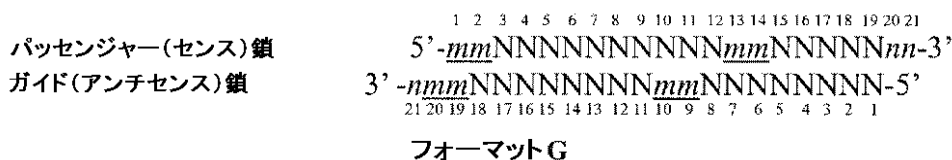
各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、

各 N は、独立して、非修飾ヌクレオチドであり、

ここで、

該二本鎖 RNA は、以下のフォーマット G：

【化 5 D】



ではない、化学合成した二本鎖 RNA。

【請求項 3 3】

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドが配列非依存性修飾フォーマット（1）（式中、p は 0 であり、x は 10 であり、r は 2 である）または配列非依存性修飾フォーマット（1）（式中、p は 0 であり、x は 9 または 11 であり、r は 2 である）を含む、請求項 3 2 に記載の化学合成した二本鎖 RNA。

【請求項 3 4】

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドおよびガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドループまたはリンカーを介して共有結合して低分子

ヘアピンオリゴヌクレオチドを形成する、請求項 3 2 に記載の化学合成した二本鎖 RNA。

【請求項 3 5】

前記 RNA の各 3' 末端が、独立して、1つ、2つ、または3つのヌクレオチドオーバーハングを有し、そして/または、5' 末端がリン酸置換基、 $C_{1 \sim 12}$ - アルキル置換基、 $C_{1 \sim 12}$ - アルキルアミン置換基、 $C_{1 \sim 12}$ - アルケニル置換基、 $C_{1 \sim 12}$ - アルキニル置換基、 $C_{1 \sim 12}$ - シクロアルキル置換基、 $C_{1 \sim 12}$ - アラルキル置換基、アリール置換基、アシル置換基、またはシリル置換基でさらに誘導体化される、請求項 3 2 に記載の化学合成した二本鎖 RNA。

【請求項 3 6】

少なくとも1つのヌクレオシド間結合がホスホジエステルヌクレオシド間結合以外である、請求項 3 2 に記載の化学合成した二本鎖 RNA。

【請求項 3 7】

前記化学合成した二本鎖 RNA が細胞ターゲティングリガンドとさらに会合する、請求項 3 2 に記載の化学合成した二本鎖 RNA。

【請求項 3 8】

請求項 3 2 に記載の化学合成した二本鎖 RNA と、トランスフェクション薬剤とを備えるキット。

【請求項 3 9】

請求項 3 2 に記載の化学合成した二本鎖 RNA を含む医薬。

【請求項 4 0】

二本鎖 RNA であって、以下：

1 8 ~ 2 5 ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾フォーマット (4)、フォーマット (5)、またはフォーマット (6) に従うオリゴヌクレオチドを含むパッセンジャー (センス) オリゴヌクレオチド；

(4) $5' m_p - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ (式中、 p は 0、1、2、3 または 4 であり、そして p が 0 である場合、 x は 12 であり、 p が 1 である場合、 x は 11 であり、 p が 2 である場合、 x は 10 であり、 p が 3 である場合、 x は 9 であり、 p が 4 である場合、 x は 8 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q はパッセンジャーオリゴヌクレオチド長マイナス ($p + x + r + 2$) を示す整数である)、

(5) $5' m - m - N_x - m - N_q - n_r 3'$ (式中、 x は 11 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q はパッセンジャー鎖長マイナス ($x + r + 3$) を示す整数である)、

(6) $5' m_p - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'$ (式中、 p は 3 であり、 y は 9 であり、 z は 1 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q はパッセンジャー鎖長マイナス ($p + y + z + r + 2$) を示す整数である)；ならびに

1 8 ~ 2 5 ヌクレオチド長であり、少なくとも 12 ヌクレオチドのパッセンジャー (センス) オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域を有するガイド (アンチセンス) オリゴヌクレオチドであって、該ガイドオリゴヌクレオチドが標的 mRNA の少なくとも一部とさらに相補的である、ガイド (センス) オリゴヌクレオチド

を含み、

ここで、

各 m は、独立して、2' - 修飾ヌクレオチドであり、該 2' - 修飾ヌクレオチドの 2' - 修飾は OR であり、R はアルキルであり、該アルキル部分は、 $C_1 - C_6$ であり、

各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、

各 N は、独立して、非修飾ヌクレオチドであり、

ここで、

該二本鎖 RNA は、以下のフォーマット G：

10

20

30

40

フォーマット G

10

20

30

40

50

その5'末端のより弱い塩基対を有する鎖は組み込みを好む。したがって、任意の siRNA は、意図する標的 RNA および非標的 RNA の両方を切断することができる活性化 RISC 複合体の混合物の産生を導くであろう。生物学的応用では、大多数、好ましくは全ての活性化 RISC 複合体が所望の標的と相補的な siRNA 鎖を含むことが望ましい。本教示は、望ましくない siRNA 鎖による mRNA 切断を減少するだけでなく、内因性遺伝子の干渉のためのオフターゲット効果も減少させるための方法、組成物、およびキットを提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

10

概要

予想外に、ストランドバイアスの増加または維持は、内因性 RNA 干渉の効力の維持に必要である一方で、細胞生物学アッセイにおけるオフターゲット効果の減少には十分でない。効力を維持しながらオフターゲット効果を減少または最小にする能力を、本明細書中で、標的 mRNA が外因的に得られ、且つ標的 mRNA が内因性 mRNA である条件下、異なる修飾ヌクレオチド型が siRNA に導入される条件下、および異なる修飾フォーマットが siRNA に導入される条件下で研究した。さらに、多数の標的 RNA のそれぞれのための複数の siRNA 修飾フォーマットを研究した。したがって、表現型および細胞生物学レベルで観察した場合にオフターゲット事象を減少または最小にし、且つ極めて強力な siRNA の効力を維持する修飾ヌクレオチドおよび修飾フォーマットは、任意の siRNA 配列に適用可能であり、siRNA の塩基配列に依存しない。すなわち、本明細書中に提供した修飾フォーマットは、配列非依存性修飾である。

20

【0004】

いくつかの実施形態では、化学合成したパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドを提供する。このオリゴヌクレオチドは、15～30ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾フォーマット（1）、配列非依存性修飾フォーマット（2）、および配列非依存性修飾フォーマット（3）：

（1）5' $N_p - m - m - N_x - m - m - N_q - n_r$ 3'（式中、p は 0 または 1 であり、x は、7、8、9、10、または 11 であり、r は、0、1、または 2 であり、q はパッセンジャー鎖長マイナス（ $p + x + r + 4$ ）を示す整数である）、

30

（2）5' $N_p - m - m - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r$ 3'（式中、p は 0 または 1 であり、y は、7、8、または 9 であり、z は 1 であるか、y は 7 であり、z は 2 または 3 であり、r は、0、1、または 2 であり、q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $p + y + z + r + 4$ ）を示す整数であり、

（3）5' $m - N_1 - m - N_x - m - m - N_q - n_r$ 3'（式中、x は、8、9、または 10 であり、r は、0、1、または 2 であり、q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $x + r + 5$ ）を示す整数である）の 1 つを含み、

ここで、各 m は独立してピシクロヌクレオチドまたはトリシクロヌクレオチドであり、各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、m がピシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、m がトリシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、トリシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドである。

40

【0005】

いくつかの実施形態では、上記のパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドおよび 15～30ヌクレオチド（少なくとも 12ヌクレオチドのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域）を有するガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドを含み、ガイド鎖が標的 mRNA の少なくとも一部とさらに相補的である、化学合成した低分子干渉 RNA を提供する。

【0006】

いくつかの実施形態では、17～30ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾

50

フォーマット(4)、フォーマット(5)、およびフォーマット(6)の1つを含むパッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドならびに17~30ヌクレオチド(少なくとも12ヌクレオチドのパッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域)を有するガイド(アンチセンス)オリゴヌクレオチドを含む低分子干渉RNAであって、ガイド鎖が標的mRNAの少なくとも一部とさらに相補的であり、

(4) $5' m_p - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ (式中、pが0である場合、xは12であり、pが1である場合、xは11であり、pが2である場合、xは10であり、pが3である場合、xは9であり、pが4である場合、xは8であり、rは、0、1、または2であり、qはパッセンジャー鎖長マイナス($p + x + r + 2$)を示す整数である)、

(5) $5' m - m - N_x - m - N_q - n_r 3'$ (式中、xは11であり、rは、0、1、または2であり、qはパッセンジャー鎖長マイナス($x + r + 3$)を示す整数である)、

(6) $5' m_p - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'$ (式中、pは3であり、yは9であり、zは1であり、rは、0、1、または2であり、qはパッセンジャー鎖長マイナス($p + y + z + r + 2$)を示す整数である)、

ここで、

各mは、独立して、ピシクロヌクレオチド、トリシクロヌクレオチド、または2'-修飾ヌクレオチドであり、各nは、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、且つオーバーハンギングヌクレオチドであり、mがピシクロヌクレオチドである場合、各Nは、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、mがトリシクロヌクレオチドである場合、各Nは、独立して、トリシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、mが2'-修飾ヌクレオチドである場合、各Nは、独立して、2'-修飾ヌクレオチド以外のヌクレオチドである、低分子干渉RNAを提供する。

【0007】

低分子干渉RNAの1つの実施形態では、パッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット(4)を有し、pは2であり、xは10であり、rは2であり、各nはオーバーハンギングヌクレオチドであり、各nは、独立して、修飾ヌクレオチドであり、ガイド(アンチセンス)オリゴヌクレオチドは、2つの3'-オーバーハング修飾ヌクレオチドを含み、各修飾ヌクレオチドは、独立して、ピシクロヌクレオチド、トリシクロヌクレオチド、または2'-修飾ヌクレオチドである。1つの実施形態では、パッセンジャーオリゴヌクレオチドの3'末端から3番目の位置および3'末端から4番目の位置の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドである。3'末端から3番目の位置は、最後の位置から3番目である(すなわち、例えば、図1HのフォーマットDH47に関して、末端から2番目の前の位置)。3'末端から4番目の位置は、最後の位置から4番目である(すなわち、図1HのフォーマットDH29に関して、末端から3番目の前の位置)。かかるsiRNAは、例えば、血清または血漿の存在下などでのヌクレアーゼに対して特に安定である。

【0008】

低分子干渉RNAのいくつかの実施形態では、長さが17ヌクレオチドである場合、ガイドオリゴヌクレオチドの2位および3位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、長さが18ヌクレオチドである場合、ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、および4位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、長さが19ヌクレオチドである場合、ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、および5位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、長さが20ヌクレオチドである場合、ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、5位、および6位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、長さが21~30ヌクレオチドである場合、ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、5位、6位、および7位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドである。図1KのフォーマットDH1およびフォーマットDH39~DH43は、21ヌクレオチド長であり、修飾ヌクレオチドとしてガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、5位、6位、および7位の少なくとも1つを有するsiRNA修飾フォーマットの例である。いくつかの実施形態で

は、ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、5位、6位、および7位（上記引用の長さに依存する）のたった1つが修飾ヌクレオチドである。かかる *siRNA* はまた、例えば、血清の存在下などのヌクレアーゼに対して特に安定である。

【0009】

標的遺伝子を含む細胞を上記の化学合成した低分子干渉RNA（式中、各 *m* は、独立して、ピシクロヌクレオチドまたはトリシクロヌクレオチドである）と効力を維持しながらオフターゲット事象を減少させるのに十分な量で接触させる工程を含む、RNA干渉による標的遺伝子発現の阻害のためにオフターゲット事象を減少させる、または、最小にする方法を提供する。句「効力を維持しながら」は、本明細書中で、効力を維持しながらオフターゲット事象を減少させるのに十分な量の *siRNA* の使用という文脈で使用される。この文脈では、この句は、オフターゲット事象を減少させながら *siRNA* のノックダウン活性の減少に耐性を示すことをいい、ノックダウン活性の減少が遺伝子関連表現型を誘発するかどうかによって決定される。一般に、「効力を維持しながら」は、通常のノックダウンレベルの80%へのノックダウンの減少が許容されることを意味する。しかし、特定の遺伝子のノックダウンの減少の許容は、通常のノックダウンの50%～95%の範囲であり得る。

10

【0010】

さらなる実施形態では、標的遺伝子を含む細胞を化学合成した低分子干渉RNAとガイド鎖の効力を維持しながらパッセンジャー鎖による切断を減少または最小にするのに十分な量で接触させる工程を含み、低分子干渉RNAのパッセンジャー鎖が、配列非依存性修飾フォーマット（1）、（2）、（3）、（4）、（5）、または（6）（式中、各 *m* は、独立して、2'-修飾ヌクレオチドであり、各 *n* は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、各 *N* は、独立して、非修飾ヌクレオチドである）の1つを含む、RNA干渉による外因的に得られた標的遺伝子の発現阻害におけるパッセンジャー鎖による切断を減少または最小にする方法を提供する。切断の減少を、非修飾 *siRNA* の切断の減少と比較する。

20

【0011】

いくつかの実施形態では、接触は、細胞を含む細胞培養物または細胞を含む組織の化学合成した低分子干渉RNAとの *in vivo* 接触である。さらなる実施形態では、接触は、細胞を含む組織、細胞を含む体液、または細胞を含む器官の化学合成した低分子干渉RNAとの *ex vivo* 接触である。さらに他の実施形態では、接触は、細胞を含む器官または動物の化学合成した低分子干渉RNAとの *in vivo* 接触である。いくつかの実施形態では、接触は、必要とする被験体にヌクレアーゼ安定性を付与する修飾フォーマットを有する低分子干渉RNAの *in vivo* 血管内投与である。実施例8のデータによって証明されるように、投与後の同一の時点での修飾ヌクレオチドを欠くコントロール低分子干渉RNAの *in vivo* での存在量と比較した場合、安定化低分子干渉RNAの投与後の *in vivo* での存在量はより多い。

30

【0012】

本明細書中の実施形態によって得られ、外因的に得られた遺伝子に対して実施されたRNA干渉アッセイにより、種々の修飾フォーマットでの多数の修飾ヌクレオチド型によって効力を維持しながら増強されたストランドバイアスが得られることが証明されている。図4Aおよび図4Bのピシクロヌクレオチドを使用したフォーマットH、K、およびOのデータならびに図6Aおよび図6Bの2'-O-メチルヌクレオチドを使用したフォーマットH、K、およびOのデータを参照のこと。

40

【0013】

予想外に、これらの修飾ヌクレオチドおよび修飾フォーマットは、内因性遺伝子のRNA干渉におけるオフターゲット事象を減少または最小にする能力が異なっていた。導入された *siRNA* によるオフターゲット効果の基準である異なって発現される遺伝子の数を決定するためにマイクロアレイ分析を行った。異なって発現される遺伝子を、*p* 値が < 0.001のRNA干渉による変化が少なくとも2倍の遺伝子と定義した。LNA（登録商

50

標)ヌクレオチド修飾フォーマットH siRNAは、同一のsiRNA配列を有する非修飾フォーマットA siRNAによって異なって発現される遺伝子の数と比較した場合、異なって発現される遺伝子が38%~68%少なかった。対照的に、2'-O-メチル修飾フォーマットH siRNAは、非修飾フォーマットA siRNAと比較した場合、異なって発現される遺伝子が0~22%少なかった。したがって、LNA(登録商標)ヌクレオチド修飾siRNAは、大域的遺伝子プロファイリング分析によって判断したところ、減少したオフターゲット効果で2'-O-メチル修飾siRNAよりも有効である。図9A~図9Cを参照のこと。

【0014】

これらの予想外の所見を、実施例6に例示の細胞生物学研究を使用して確認した。一連の結果を内因性遺伝子のsiRNA干渉について分析した場合、図11Cに示す種々の修飾フォーマットの2'-O-メチル修飾ヌクレオチドが非修飾フォーマットと比較して統計的に有意な程度に「オフターゲット」表現型を除去しないことが明らかであった。これらの結果は図10Eの結果と対照的である。これにより、非修飾フォーマットAと比較してより低いアポトーシスシグナルによって明らかのように、フォーマットHを有するsiRNAがオフターゲット効果を除去する統計的に有意な能力が証明される。

【0015】

いくつかの実施形態では、以下にさらに記載するように、化学合成した低分子干渉RNAは、細胞ターゲティングリガンドとさらに会合する。

【0016】

パッセンジャーオリゴヌクレオチド、ガイドオリゴヌクレオチド、または化学合成した低分子干渉RNA、および生物学的に許容可能なキャリアを含む組成物は、本明細書中で実施形態として意図される。さらに、例えば、パッセンジャーオリゴヌクレオチド、ガイドオリゴヌクレオチド、または化学合成した低分子干渉RNA、およびトランスフェクション剤を含むキットは、本明細書中で実施形態と指定とされる。実施形態の修飾ヌクレオチドと共に修飾フォーマットを有する低分子干渉RNAにより、有効性が改善されてsiRNAをデザインおよび試験する時間が節約され、特異性が改善されて間違った結果に費やす時間および費用が節約され、効力が改善されて所望の結果を達成するために使用される材料がより少なくなる。有効性および特異性の改善により、各遺伝子およびライブラリーのスクリーニング研究のための遺伝子あたりのsiRNAの使用もより少なくなる。

【0017】

別の実施形態では、RNA干渉に及ぼすオフターゲット効果を減少させる方法は、標的転写RNAに相同な領域を含むパッセンジャーセンス鎖を有し、センス鎖に相補的なガイドアンチセンス鎖を有するsiRNAを得る工程であって、siRNAは修飾フォーマットH、Q、V-2、Y、Y+1、JB1、JB2、JB3、JB4、またはJB5を有する、工程、およびsiRNAを細胞と接触させる工程を含む。オフターゲット効果の減少を、修飾フォーマットしたsiRNAと同一の配列を有する非修飾siRNAに起因するオフターゲット効果と比較して測定する。

【0018】

さらなる実施形態では、ヌクレアーゼが豊富な環境におけるsiRNAの安定性を増加させる方法は、標的転写RNAに相同な領域を含むパッセンジャーセンス鎖を有し、センス鎖に相補的なガイドアンチセンス鎖を有し、3'-オーバーハングングヌクレオチドを有するsiRNAを得る工程であって、siRNAは修飾フォーマットDH47、DH29、DH1、DH39、DH40、DH41、DH42、またはDH43を有する、工程、およびsiRNAをヌクレアーゼ豊富な環境と接触させる工程を含む。siRNAの安定性の増加を、同一修飾ヌクレオチド型を有し、同一配列を有するフォーマットFを有するsiRNAの安定性と比較して測定する。

【0019】

さらなる実施形態は、標的遺伝子の発現阻害のためのin vitro、ex vivo、またはin vivoでの適用におけるRNA干渉で使用するための本明細書中に提

10

20

30

40

50

供した修飾フォーマットを有する *s i R N A* を含む。標的遺伝子の発現が疾患と関連することが知られている場合、本明細書中の *s i R N A* は、疾患のスクリーニング、診断、または治療に有用である。

【 0 0 2 0 】

本明細書中に記載の *s i R N A* パフォーマンス研究の予想外の態様は、レポーターベースの鎖数アッセイが細胞表現型レベルでの修飾フォーマットした *s i R N A* のパフォーマンスを予測できないことである。下記のマイクロアレイ大域遺伝子プロファイリングまたは細胞ベースのアッセイを使用して、表現型レベルでのパフォーマンスの差異が認められた。

【 0 0 2 1 】

本教示のこれらおよび他の特徴は、本明細書中の説明から明らかとなるであろう。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

化学合成したパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドであって、15～30ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾フォーマット（1）、配列非依存性修飾フォーマット（2）、および配列非依存性修飾フォーマット（3）：

（1） $5' N_p - m - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 p は0または1であり、 x は、7、8、9、10、または11であり、 r は、0、1、または2であり、 q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $p + x + r + 4$ ）を示す整数である）、

（2） $5' N_p - m - m - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 p は0または1であり、 y は、7、8、または9であり、 z は1であるか、 y は7であり、 z は2または3であり、 r は0、1、または2であり、 q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $p + y + z + r + 4$ ）を示す整数である）、

（3） $5' m - N_1 - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 x は、8、9、または10であり、 r は、0、1、または2であり、 q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $x + r + 5$ ）を示す整数である）の1つを含み、

ここで、

各 m は、独立して、ピシクロヌクレオチドまたはトリシクロヌクレオチドであり、

各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、

m がピシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

m がトリシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、トリシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドである、

化学合成したパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチド。

(項目 2)

項目1に記載のパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドおよび15～30ヌクレオチド（少なくとも12ヌクレオチドのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域）を有するガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドを含み、前記ガイド鎖が標的 *m R N A* の少なくとも一部とさらに相補的である、化学合成した低分子干渉 *R N A* 。

(項目 3)

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドが配列非依存性修飾フォーマット（1）（式中、 p は0であり、 x は10であり、 r は2である）を含む、項目2に記載の化学合成した低分子干渉 *R N A* 。

(項目 4)

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドが配列非依存性修飾フォーマット（1）（式中、 p は0であり、 x は9または11であり、 r は2である）を含む、項目2に記載の化学合成した低分子干渉 *R N A* 。

(項目 5)

10

20

30

40

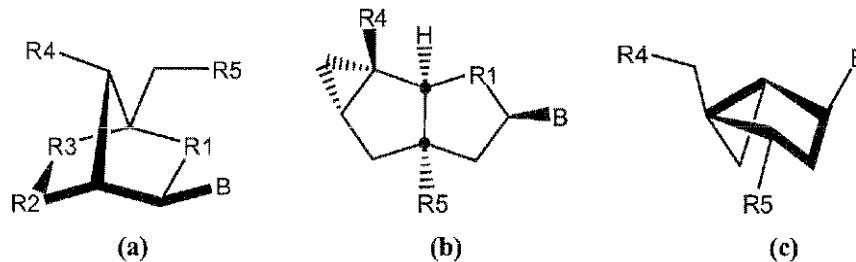
50

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドが配列非依存性修飾フォーマット（2）（ p は0であり、 y は9であり、 r は2である）を含む、項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

（項目6）

少なくとも1つの m が、構造（a）、（b）、または（c）：

【化2】



10

（式中、

R_1 および R_2 は、独立して、O、S、 CH_2 、またはNRであり、ここで、Rは水素または C_{1-3} アルキルであり、

R_3 は、 CH_2 、 CH_2-O 、 CH_2-S 、 CH_2-CH_2 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、 $CH=CH$ 、または CH_2-NR であり、ここで、Rは水素または C_{1-3} アルキルであり、

20

R_4 および R_5 は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、

R_4 および R_5 の少なくとも1つはヌクレオシド間結合であり、

Bは、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである）を有する、項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

（項目7）

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット（1）（式中、 p は0であり、 x は10であり、 r は2であり、各 m は構造（a）（式中、 R_1 はOであり、 R_2 はOであり、 R_3 は CH_2 である）を有する）を含む、項目6に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

30

（項目8）

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット（1）（式中、 p は1であり、 x は9または10であり、 r は2であり、各 m は構造（a）（式中、 R_1 はOであり、 R_2 はOであり、 R_3 は CH_2 である）を有する）を含む、項目6に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

（項目9）

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット（3）（式中、 x は9または10であり、 r は2であり、各 m は構造（a）（式中、 R_1 はOであり、 R_2 はOであり、 R_3 は CH_2 である）を有する）を含む、項目6に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

40

（項目10）

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドおよびガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドがヌクレオチドループまたはリンカーループを介して共有結合して低分子ヘアピンオリゴヌクレオチドを形成する、項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

（項目11）

siRNAの各3'末端が、独立して、1つ、2つ、または3つのヌクレオチドオーバーハングを有する、項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

（項目12）

少なくとも1つのヌクレオシド間結合がホスホジエステルヌクレオシド間結合以外である、項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

50

(項目 13)

前記化学合成した低分子干渉RNAが細胞ターゲティングリガンドとさらに会合する、項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

(項目 14)

5'末端がリン酸置換基、 $C_{1 \sim 12}$ -アルキル置換基、 $C_{1 \sim 12}$ -アルキルアミン置換基、 $C_{1 \sim 12}$ -アルケニル置換基、 $C_{1 \sim 12}$ -アルキニル置換基、 $C_{1 \sim 12}$ -シクロアルキル置換基、 $C_{1 \sim 12}$ -アラルキル置換基、アリール置換基、アシル置換基、またはシリル置換基でさらに誘導体化される、項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNA。

(項目 15)

項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNAおよび生物学的に許容可能なキャリアを含む組成物。

(項目 16)

項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNAおよびトランスフェクション剤を含むキット。

(項目 17)

標的遺伝子を含む細胞を項目2に記載の化学合成した低分子干渉RNAと効力を維持しながらオフターゲット事象を減少させるのに十分な量で接触させる工程を含む、RNA干渉による標的遺伝子発現の阻害のためにオフターゲット事象を最小にする方法。

(項目 18)

前記遺伝子が内因性遺伝子である、項目17に記載の方法。

(項目 19)

前記接触が、細胞を含む細胞培養物または細胞を含む組織と化学合成した低分子干渉RNAとのin vitro接触である、項目17に記載の方法。

(項目 20)

前記接触が、細胞を含む組織、細胞を含む体液、または細胞を含む器官と化学合成した低分子干渉RNAとのex vivo接触である、項目17に記載の方法。

(項目 21)

前記接触が、細胞を含む器官または動物と化学合成した低分子干渉RNAとのin vivo接触である、項目17に記載の方法。

(項目 22)

標的遺伝子を含む細胞を化学合成した低分子干渉RNAとガイド鎖の効力を維持しながらパッセンジャー鎖による切断を最小にするのに十分な量で接触させる工程を含み、前記低分子干渉RNAが、

パッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドであって、15~30ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾フォーマット(1)、配列非依存性修飾フォーマット(2)、および配列非依存性修飾フォーマット(3)：

(1) $5' N_p - m - m - N_x - m - m - N_p - n_r 3'$ (式中、pは0または1であり、xは、7、8、9、10、または11であり、rは、0、1、または2であり、qは、パッセンジャー鎖長マイナス($p + x + r + 4$)を示す整数であり、

(2) $5' N_p - m - m - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'$ (式中、pは0または1であり、yは7、8、または9であり、zは1であるか、yは7であり、zは2または3であり、rは、0、1、または2であり、qは、パッセンジャー鎖長マイナス($p + y + z + r + 4$)を示す整数であり、

(3) $5' m - N_1 - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ (式中、xは、8、9、または10であり、rは、0、1、または2であり、qは、パッセンジャー鎖長マイナス($x + r + 5$)を示す整数である)の1つを含み、

ここで、

各mは、独立して、2'-修飾ヌクレオチドであり、

各nは、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオ

10

20

30

40

50

チドであり、

各Nは、独立して、非修飾ヌクレオチドである、パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチド、および

15 ~ 30ヌクレオチド（少なくとも12ヌクレオチドのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域）を有するガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドであって、前記ガイド鎖が標的mRNAの少なくとも一部とさらに相補的である、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドを含む、RNA干渉による外因的に得られた標的遺伝子の発現阻害におけるパッセンジャー鎖による切断を最小にする方法。

（項目23）

前記2' - 修飾ヌクレオチドの2'修飾が、H、プロモ、クロロ、ヨード、フルオロ、アラビノース高次構造中のフルオロ（FANA）、SH、NH₂、CN、アジド、またはOR、R、SR、NHR、もしくはN(R)₂（式中、Rはアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、オキシアルキル、アルコキシアルキル、またはアルキルアミンであり、アルキル部分はC1 ~ C6である）を含む、項目22に記載の方法。

（項目24）

パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドであって、17 ~ 30ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾フォーマット（4）、フォーマット（5）、およびフォーマット（6）：

（4）5' m_p - N_x - m - m - N_q - n_r 3'（式中、pが0である場合、xは12であり、pが1である場合、xは11であり、pが2である場合、xは10であり、pが3である場合、xは9であり、pが4である場合、xは8であり、rは、0、1、または2であり、qはパッセンジャー鎖長マイナス（p + x + r + 2）を示す整数である）

（5）5' m - m - N_x - m - N_q - n_r 3'（式中、xは11であり、rは、0、1、または2であり、qはパッセンジャー鎖長マイナス（x + r + 3）を示す整数である）

（6）5' m_p - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'（式中、pは3であり、yは9であり、zは1であり、rは、0、1、または2であり、qはパッセンジャー鎖長マイナス（p + y + z + r + 2）を示す整数である）の1つを含むパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチド、および

17 ~ 30ヌクレオチド（少なくとも12ヌクレオチドのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域）を有するガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドであって、前記ガイド鎖が標的mRNAの少なくとも一部とさらに相補的である、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドを含み、
ここで、

各mは、独立して、ピシクロヌクレオチド、トリシクロヌクレオチド、または2' - 修飾ヌクレオチドであり、

各nは、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、且つオーバーハンギングヌクレオチドであり、

mがピシクロヌクレオチドである場合、各Nは、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

mがトリシクロヌクレオチドである場合、各Nは、独立して、トリシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、

mが2' - 修飾ヌクレオチドである場合、各Nは、独立して、2' - 修飾ヌクレオチド以外のヌクレオチドである、低分子干渉RNA。

（項目25）

前記パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドが配列非依存性修飾フォーマット（4）を有し、pは2であり、xは10であり、rは2であり、各nはオーバーハンギングヌクレオチドであり、各nは、独立して、修飾ヌクレオチドであり、
ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドは2つの3' - オーバーハング修飾ヌクレオチドを含み、

10

20

30

40

50

各修飾ヌクレオチドは、独立して、ピシクロヌクレオチド、トリシクロヌクレオチド、または 2' - 修飾ヌクレオチドである、項目 2 4 に記載の低分子干渉 RNA。

(項目 2 6)

前記パッセンジャーオリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目の位置および 3' 末端から 4 番目の位置の少なくとも 1 つは修飾ヌクレオチドである、項目 2 5 に記載の低分子干渉 RNA。

(項目 2 7)

前記長さが 1 7 ヌクレオチドである場合、前記ガイドオリゴヌクレオチドの 2 位および 3 位の少なくとも 1 つは修飾ヌクレオチドであり、

前記長さが 1 8 ヌクレオチドである場合、前記ガイドオリゴヌクレオチドの 2 位、3 位、および 4 位の少なくとも 1 つは修飾ヌクレオチドであり、

前記長さが 1 9 ヌクレオチドである場合、前記ガイドオリゴヌクレオチドの 2 位、3 位、4 位、および 5 位の少なくとも 1 つは修飾ヌクレオチドであり、

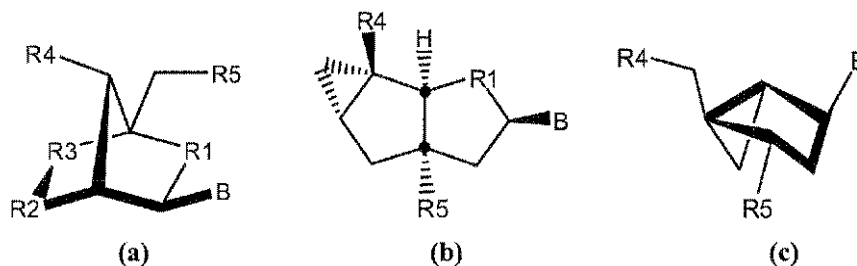
前記長さが 2 0 ヌクレオチドである場合、前記ガイドオリゴヌクレオチドの 2 位、3 位、4 位、5 位、および 6 位の少なくとも 1 つは修飾ヌクレオチドであり、

前記長さが 2 1 ~ 3 0 ヌクレオチドである場合、前記ガイドオリゴヌクレオチドの 2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、および 7 位の少なくとも 1 つは修飾ヌクレオチドである、項目 2 5 に記載の低分子干渉 RNA。

(項目 2 8)

前記パッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つの m が、以下の構造 (a)、(b)、または (c) :

【化 3】



(式中、

R 1 および R 2 は、独立して、O、S、CH₂、または NR であり、ここで、R は水素または C₁₋₃-アルキルであり、

R 3 は、CH₂、CH₂-O、CH₂-S、CH₂-CH₂、CH₂-CH₂-CH₂、CH=CH、または CH₂-NR であり、ここで、R は水素または C₁₋₃-アルキルであり、

R 4 および R 5 は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、

R 4 および R 5 の少なくとも 1 つはヌクレオシド間結合であり、

B は、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである)を有する、項目 2 4、2 5、2 6、または 2 7 に記載の低分子干渉 RNA。

(項目 2 9)

前記各修飾ヌクレオチドが、構造 (a) :

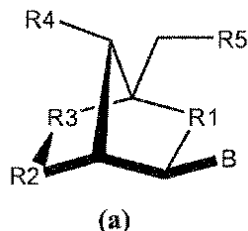
10

20

30

40

【化 4】



(式中、

R 1 および R 2 は、独立して、O、S、CH₂、またはNRであり、ここで、Rは水素またはC₁~₃-アルキルであり、

R 3 は、CH₂、CH₂-O、CH₂-S、CH₂-CH₂、CH₂-CH₂-CH₂、CH=CH、またはCH₂-NRであり、ここで、Rは水素またはC₁~₃-アルキルであり、

R 4 および R 5 は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、

R 4 および R 5 の少なくとも1つはヌクレオシド間結合であり、

B は、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである)を有する、項目24、25、26、または27に記載の低分子干渉RNA。

(項目30)

項目24から29のいずれか1項に記載の低分子干渉RNAおよび生物学的に許容可能なキャリアを含む組成物。

(項目31)

被験体を項目25から30のいずれか1項に記載の低分子干渉RNAと効力を維持しながらオフターゲット事象を減少させるのに十分な量で接触させる工程を含む、必要とされる被験体におけるRNA干渉による標的遺伝子発現の阻害のためのオフターゲット事象を減少させる方法。

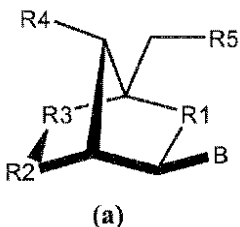
(項目32)

前記接触が血管内注射を介した投与である、項目31に記載の方法。

(項目33)

項目26または27に記載の低分子干渉RNAを得る工程であって、各修飾ヌクレオチドが、構造(a)：

【化 5】



(式中、

R 1 および R 2 は、独立して、O、S、CH₂、またはNRであり、ここで、Rは水素またはC₁~₃-アルキルであり、

R 3 は、CH₂、CH₂-O、CH₂-S、CH₂-CH₂、CH₂-CH₂-CH₂、CH=CH、またはCH₂-NRであり、ここで、Rは水素またはC₁~₃-アルキルであり、

R 4 および R 5 は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、

R 4 および R 5 の少なくとも1つはヌクレオシド間結合であり、

B は、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである)を有する、低分

10

20

30

40

50

子干渉RNAを得る工程、および

前記低分子干渉RNAを必要とする被験体に *in vivo* で投与する工程であって、投与後、修飾ヌクレオチドを欠く低分子干渉RNAの量と比較した場合、より大量の前記低分子干渉RNAが *in vivo* で存在する、投与する工程、を含む、方法。

【0022】

当業者は、下記の図面が例示のみを目的とすると理解するであろう。図面は、本教示の範囲を制限することを決して意図しない。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

【図1B】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

【図1C】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

【図1D】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

【図1E】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

【図1F】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

【図1G】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

【図1H】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

【図1I】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

【図1J】図1A～図1Kは、*siRNA* 研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA* 中のヌクレオチドの位置を示す。m = 修飾ヌクレオチド、N = ヌクレオチド、またはmの修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、n = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、P = リン酸基。

10

20

30

40

50

【図1K】図1A～図1Kは、*siRNA*研究のための修飾フォーマットを示す。ヌクレオチド上の数字は、フォーマットの5'末端と比較した*siRNA*中のヌクレオチドの位置を示す。*m* = 修飾ヌクレオチド、*N* = ヌクレオチド、または*m*の修飾以外の修飾を有する修飾ヌクレオチド、*n* = ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、*P* = リン酸基。

【図2】図2A～図2Bは、種々の実施例で使用される発現レポーターベクターを示す略図を示す。図2Aは、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を含むpMIR-REPORT (商標) *miRNA*発現レポーターベクター (Ambion / Applied Biosystems) マップを示す。種々の目的の遺伝子 (GOI) のコード領域を、ルシフェラーゼ遺伝子の3'末端に存在するマルチクロニング部位 (MCS) 内のHindIII (ヌクレオチド463位) およびSpeI (ヌクレオチド525位) 制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入した。図2Bは、 β -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子を含むpMIR-REPORT (商標) β -galコントロールベクター (Ambion / Applied Biosystems) のマップを示す。コントロールベクターを、GOIを保有し、トランスフェクション正規化コントロールとして使用されるpMIR-REPORT (商標) *miRNA* 発現レポーターベクターと同時にトランスフェクションした。

【図3】図3A～図3Bは、pMIR-REPORT (商標) *miRNA*発現ベクター中のクローン化GOIの*mRNA*とルシフェラーゼ遺伝子の*mRNA*との間の方向の関係を示す略図を示す。図3Aは、順方向 (すなわち、GOI *mRNA*の5'末端が*fluc mRNA*の3'末端の近位にある) を示す。図3Bは、逆方向 (すなわち、GOI *mRNA*の5'末端が*fluc mRNA*の3'末端の遠位にある) を示す。

【図4A】図4A～図4Eは、示した非修飾フォーマットAおよび修飾フォーマットを有する*siRNA*について実施例2および3に記載の鎖アッセイの結果を示す。図4Aは、示した修飾フォーマットを有する*siRNA*について*RNAi*研究を行った後の正規化したレポータータンパク質の存在量を示す。暗色のバーはガイド鎖によるノックダウン活性を示し、明色のバーはパッセンジャー鎖によるノックダウン活性を示す。修飾*siRNA*鎖の鎖数の結果の分布を示すために、図4B～図4Eのデータを、「箱ひげ」表示ともいわれるボックスプロットフォーマットで示す。「箱ひげ」表示の暗色の横線はデータセットの中央値を示し、ボックスはデータセットの下位四分位点および上位四分位点でのデータの分布を示し、点線 (ひげ) はデータセットの最小値および最大値を示し、長円形は各修飾フォーマットについてのデータセットにおける外れ値を示す。

【図4B】図4A～図4Eは、示した非修飾フォーマットAおよび修飾フォーマットを有する*siRNA*について実施例2および3に記載の鎖アッセイの結果を示す。図4Bは、以下の式によって測定された*siRNA*パッセンジャー鎖のノックダウン活性を示す：パッセンジャー鎖活性 $P = (\text{試験 } siRNA \text{ で処理した逆方向クローン由来の残存する } fLUC \text{ 活性} / \beta\text{-gal 活性}) / (\text{Neg コントロール } siRNA \text{ で処理した逆方向クローン由来の残存する } fLUC \text{ 活性} / \beta\text{-gal 活性})$ 。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定 (対応のある) の結果を以下に示す：フォーマットE、0.1434；フォーマットF、0.1011；フォーマットG、0.0002052；フォーマットH、0.0001755；フォーマットJ、0.0002052；フォーマットK、0.006516；フォーマットM、0.002246；フォーマットO、0.0009626。

【図4C】図4A～図4Eは、示した非修飾フォーマットAおよび修飾フォーマットを有する*siRNA*について実施例2および3に記載の鎖アッセイの結果を示す。図4Cは、以下の式によって測定されたガイド鎖のノックダウン活性を示す：ガイド鎖活性 $G = (\text{試験 } siRNA \text{ で処理した順方向クローン由来の残存する } fLUC \text{ 活性} / \beta\text{-gal 活性}) / (\text{Neg コントロール } siRNA \text{ で処理した順方向クローン由来の残存する } fLUC \text{ 活性} / \beta\text{-gal 活性})$ 。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定 (対応のある) の結果を以下に示す：フォーマットE、0.0001271；フォーマットF、0.8774；フォーマットG、0.0006498；フォーマットH、0.

8 1 1 5 ; フォーマット J、0 . 0 0 0 0 0 6 5 5 7 ; フォーマット K、0 . 0 1 0 5 1 ; フォーマット M、0 . 7 8 9 8 ; フォーマット O、0 . 8 7 7 4。

【図 4 D】図 4 A ~ 図 4 E は、示した非修飾フォーマット A および修飾フォーマットを有する *s i R N A* について実施例 2 および 3 に記載の鎖アッセイの結果を示す。図 4 D は、図 4 B および図 4 C の *s i R N A* のパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の *f L U C* 活性の相違を示す。活性の相違を、正規化した順方向 *f L U C* 活性を正規化した逆方向 *f L U C* 活性から引くことによって計算した (すなわち、相違 = $P - G$)。したがって、パッセンジャー鎖 (より低いロックダウン (すなわち、より高いルシフェラーゼ活性)) の活性がガイド鎖 (より高いロックダウン (すなわち、より低いルシフェラーゼ活性)) より低い場合、活性値の相違は、0 より高いと予想される。0 未満の値は、パッセンジャー鎖がガイド鎖より活性が高いことを示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定 (対応のある) の結果を以下に示す: フォーマット E、0 . 0 0 7 9 2 ; フォーマット F、0 . 0 6 0 4 3 ; フォーマット G、0 . 9 6 6 4 ; フォーマット H、0 . 0 0 1 4 ; フォーマット J、0 . 0 0 8 7 1 5 ; フォーマット K、0 . 6 6 3 4 ; フォーマット M、0 . 0 0 2 5 1 6 ; フォーマット O、0 . 0 0 0 6 4 9 8。

10

【図 4 E】図 4 A ~ 図 4 E は、示した非修飾フォーマット A および修飾フォーマットを有する *s i R N A* について実施例 2 および 3 に記載の鎖アッセイの結果を示す。図 4 E は、 $(\log_2(P) - \log_2(G))$ として計算した活性の変化倍率を示す。これにより、図 4 D の *s i R N A* のパッセンジャー鎖に及ぼすフォーマットの影響と比較したガイド鎖に及ぼす修飾フォーマットの影響が測定される。したがって、活性の変化倍率がより高いほど、*s i R N A* のガイド鎖の偏りが高くなる。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定 (対応のある) の結果を以下に示す: フォーマット E、0 . 0 0 0 2 7 8 1 ; フォーマット F、0 . 0 8 9 3 7 ; フォーマット G、0 . 2 0 7 6 ; フォーマット H、0 . 0 1 9 4 4 ; フォーマット J、0 . 0 0 0 3 2 2 3 ; フォーマット K、0 . 8 5 5 3 ; フォーマット M、0 . 0 0 2 5 1 6 ; フォーマット O、0 . 0 0 3 5 0 4。

20

【図 5 A】図 5 A ~ 図 5 C は、図 4 A ~ 図 4 E の研究と比較して修飾フォーマットが鎖スイッチングされた研究について実施例 3 に記載の結果を示す。すなわち、修飾 F については、例えば、パッセンジャー (センス) 鎖の 1、2 0、2 1 修飾をガイド (アンチセンス) 鎖に導入し、ガイド (アンチセンス) 鎖の 2 0、2 1 修飾をパッセンジャー (センス) 鎖に導入した。図 5 A は、鎖をスイッチングした修飾を有する 1 2 種の異なる *s i R N A* についての *R N A i* 研究の実施後の正規化したレポータータンパク質の存在量を示す。暗色のバーはガイド鎖によるロックダウン活性を示し、明色のバーはパッセンジャー鎖によるロックダウン活性を示す。

30

【図 5 B】図 5 A ~ 図 5 C は、図 4 A ~ 図 4 E の研究と比較して修飾フォーマットが鎖スイッチングされた研究について実施例 3 に記載の結果を示す。図 5 B は、ボックスプロットフォーマットでの図 5 A の *s i R N A* のパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の相違を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定 (対応のある) の結果は、全フォーマットについて 0 . 0 3 1 2 5 で同一である。

【図 5 C】図 5 A ~ 図 5 C は、図 4 A ~ 図 4 E の研究と比較して修飾フォーマットが鎖スイッチングされた研究について実施例 3 に記載の結果を示す。図 5 C は、図 5 B の *s i R N A* のパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定 (対応のある) の結果は、全フォーマットについて 0 . 0 3 1 2 5 で同一である。

40

【図 6 A】図 6 A ~ 図 6 C は、修飾フォーマットの修飾ヌクレオチドが 2' - O メチル化された研究についての実施例 3 に記載の鎖アッセイの結果を示す。図 6 A は、示した修飾フォーマットを有する 6 種の異なる *s i R N A* について *R N A i* 研究を行った後の正規化したレポータータンパク質の存在量を示す。暗色のバーはガイド鎖によるロックダウン活性を示し、明色のバーはパッセンジャー鎖によるロックダウン活性を示す。

【図 6 B】図 6 A ~ 図 6 C は、修飾フォーマットの修飾ヌクレオチドが 2' - O メチル化

50

された研究についての実施例 3 に記載の鎖アッセイの結果を示す。図 6 B は、ボックスプロットフォーマットにおける図 6 A の *s i R N A* 組および実施例 3 に記載の 18 種の異なるさらなる *s i R N A* 組についてのパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の *f L U C* 活性の相違を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H - 1、0 . 0 0 1 9 1 8；フォーマット H、0 . 0 0 0 0 1 5 7 4；フォーマット H + 1、0 . 0 0 1 0 9 1；フォーマット V - 2、0 . 0 0 0 2 1 3 1；フォーマット K、0 . 0 0 0 3 6 1 9；フォーマット O、0 . 4 0 6。

【図 6 C】図 6 A ~ 図 6 C は、修飾フォーマットの修飾ヌクレオチドが 2' - O メチル化された研究についての実施例 3 に記載の鎖アッセイの結果を示す。図 6 C は、図 6 B の *s i R N A* についてのパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H - 1、0 . 0 2 5 1 4；フォーマット H、0 . 0 0 0 0 1 5 7 4；フォーマット H + 1、0 . 0 0 7 4 4 3；フォーマット V - 2、0 . 0 0 0 1 4 6 4；フォーマット K、0 . 0 0 0 3 6 1 9；フォーマット O、0 . 5 4 4 6。

【図 7】図 7 A ~ 図 7 B は、修飾フォーマットの修飾ヌクレオチドが 2' , 5' 結合ヌクレオチドである研究についての実施例 3 に記載の鎖アッセイの結果を示す。図 7 A は、非修飾フォーマット A を有する *s i R N A* および修飾フォーマット H - 1、H、H + 1、V - 2、K、および O を有する *s i R N A* についてのガイド鎖およびパッセンジャー鎖のノックダウン活性の相違を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H - 1、0 . 3 5 9 4；フォーマット H、0 . 0 7 4 2 2；フォーマット H + 1、0 . 5 7 0 3；フォーマット V - 2、0 . 4 2 5 8；フォーマット K、0 . 2 0 3 1；フォーマット O、0 . 0 1 9 5 3。図 7 B は、図 7 A の *s i R N A* についてのパッセンジャー鎖とガイド鎖との間のノックダウン活性の変化倍率を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H - 1、0 . 3 0 0 8；フォーマット H、0 . 0 1 9 5 3；フォーマット H + 1、0 . 2 0 3 1；フォーマット V - 2、0 . 4 9 6 1；フォーマット K、0 . 1 9 2 1；フォーマット O、0 . 0 0 9 0 9。

【図 8】図 8 は、8 つの各内因性標的の 6 つの *s i R N A* についてのノックダウン活性データを示す。48 の各 *s i R N A* は、実施例 4 に記載のように組み込まれたピシクロ修飾ヌクレオチドをフォーマットする記載の修飾を有する。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット E、0 . 0 0 0 0 0 0 0 0 8 6 5 7；フォーマット F、0 . 4 6 3 1；フォーマット G、0 . 0 0 0 0 0 9 6 9 8；フォーマット H、0 . 5 5 6 9；フォーマット J、0 . 0 0 0 0 0 0 0 1 9 1；フォーマット K、0 . 0 0 0 0 1 3 3 6；フォーマット M、0 . 7 2 6 9；フォーマット O、0 . 0 5 9 3。

【図 9 A】図 9 A ~ 図 9 C は、マイクロアレイ分析によって決定し、実施例 5 に記載の非修飾 *s i R N A*、2' - O - メチル修飾 *s i R N A*、またはピシクロ修飾 *s i R N A* の間の 2 倍異なって発現される遺伝子の交差のベン図を示す。各図について、左下の組（カラー表示の場合赤色）は非修飾 *s i R N A* で処理したサンプルにおける 2 倍以上変化した遺伝子を示し、上の組（カラー表示の場合青色）は 2' - O - メチルフォーマット H 修飾 *s i R N A* で処理したサンプルにおける 2 倍以上変化した遺伝子を示し、右下の組（カラー表示の場合緑色）はピシクロ修飾ヌクレオチド（LNA（登録商標））フォーマット H 修飾 *s i R N A* で処理したサンプルにおける 2 倍以上変化した遺伝子を示す。

【図 9 B】図 9 A ~ 図 9 C は、マイクロアレイ分析によって決定し、実施例 5 に記載の非修飾 *s i R N A*、2' - O - メチル修飾 *s i R N A*、またはピシクロ修飾 *s i R N A* の間の 2 倍異なって発現される遺伝子の交差のベン図を示す。各図について、左下の組（カラー表示の場合赤色）は非修飾 *s i R N A* で処理したサンプルにおける 2 倍以上変化した遺伝子を示し、上の組（カラー表示の場合青色）は 2' - O - メチルフォーマット H 修飾 *s i R N A* で処理したサンプルにおける 2 倍以上変化した遺伝子を示し、右下の組（カラー表示の場合緑色）はピシクロ修飾ヌクレオチド（LNA（登録商標））フォーマット H 修飾 *s i R N A* で処理したサンプルにおける 2 倍以上変化した遺伝子を示す。

10

20

30

40

50

iRNAで処理したサンプルにおける2倍以上変化した遺伝子を示し、右下の組（カラー表示の場合緑色）はピシクロ修飾ヌクレオチド（LNA（登録商標））フォーマットH修飾 siRNAで処理したサンプルにおける2倍以上変化した遺伝子を示す。

【図9C】図9A～図9Cは、マイクロアレイ分析によって決定し、実施例5に記載の非修飾 siRNA、2'-O-メチル修飾 siRNA、またはピシクロ修飾 siRNAの間の2倍異なって発現される遺伝子の交差のベン図を示す。各図について、左下の組（カラー表示の場合赤色）は非修飾 siRNAで処理したサンプルにおける2倍以上変化した遺伝子を示し、上の組（カラー表示の場合青色）は2'-O-メチルフォーマットH修飾 siRNAで処理したサンプルにおける2倍以上変化した遺伝子を示し、右下の組（カラー表示の場合緑色）はピシクロ修飾ヌクレオチド（LNA（登録商標））フォーマットH修飾 siRNAで処理したサンプルにおける2倍以上変化した遺伝子を示す。

10

【図10A】図10A～図10Eは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼすLNA（登録商標）修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、有糸分裂またはアポトーシスの定量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティング siRNAである。実施例6を参照のこと。図10Aは、遺伝子標的組（実施例6に記載のように、そのサブセットのノックダウンが有糸分裂を増加させると予想され、そのサブセットが有糸分裂に影響を及ぼさないと予想され、そのサブセットが有糸分裂を減少させると予想される）についてLNA（登録商標）修飾フォーマットE、F、G、H、J、K、M、およびOを有する siRNAによるサイレンシングに起因する正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾 siRNAフォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットE、0.805；フォーマットF、0.5483；フォーマットG、0.3215；フォーマットH、0.004561；フォーマットJ、0.000952；フォーマットK、0.01974；フォーマットM、0.1007；フォーマットO、0.9438；。

20

【図10B】図10A～図10Eは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼすLNA（登録商標）修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、有糸分裂またはアポトーシスの定量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティング siRNAである。実施例6を参照のこと。図10Bは、遺伝子サブセット（そのノックダウンが有糸分裂を減少させると予想される）についての図10Aに関するボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾 siRNAフォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットE、0.3247；フォーマットF、0.4683；フォーマットG、0.1815；フォーマットH、0.03423；フォーマットJ、0.01387；フォーマットK、0.09874；フォーマットM、0.5509；フォーマットO、0.6705。

30

【図10C】図10A～図10Eは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼすLNA（登録商標）修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、有糸分裂またはアポトーシスの定量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティング siRNAである。実施例6を参照のこと。図10Cは、遺伝子標的組（実施例6に記載のように、そのサブセットのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想され、そのサブセットがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される）についてLNA（登録商標）修飾フォーマットE、F、G、H、J、K、M、およびOを有する siRNAによるサイレンシングに起因する正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾 siRNAフォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットE、0.2641；フォーマットF、0.5366；フォーマットG、0.0001888；フォーマットH、0.0000102；フォーマットJ、0.00000263；フォーマットK、0.000000553；フォーマットM、0.5366；フォーマットO、0.05753。

40

50

【図10D】図10A～図10Eは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼすLNA（登録商標）修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、有糸分裂またはアポトーシスの量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティングsiRNAである。実施例6を参照のこと。図10Dは、遺伝子サブセット（実施例6に記載のように、そのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想される）についての図10Cに関するボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾siRNAフォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットE、0.2188；フォーマットF、0.4375；フォーマットG、0.3125；フォーマットH、0.2188；フォーマットJ、0.03125；フォーマットK、0.03125；フォーマットM、1；フォーマットO、0.2188。

10

【図10E】図10A～図10Eは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼすLNA（登録商標）修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、有糸分裂またはアポトーシスの量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティングsiRNAである。実施例6を参照のこと。図10Eは、遺伝子サブセット（実施例6に記載のように、そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される）について図10Cに関するボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有するsiRNAを、かかるsiRNAが修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。siRNAがオフターゲット効果を有することは、Negコントロールと比較してデータの中央値が増加し、且つその分布がより広くなる非修飾フォーマットAのボックスプロットによって明らかである。各修飾フォーマットを非修飾siRNAフォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットE、0.5303；フォーマットF、0.804；フォーマットG、0.00005488；フォーマットH、0.00001347；フォーマットJ、0.0001253；フォーマットK、0.00003023；フォーマットM、0.441；フォーマットO、0.1551。

20

【図11A】図11A～図11Fは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす2'-O-メチル化修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、有糸分裂またはアポトーシスの量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティングsiRNAである。実施例6を参照のこと。図11Aは、遺伝子標的組（実施例6に記載のように、そのサブセットのノックダウンが有糸分裂を増加させると予想され、そのサブセットが有糸分裂に影響を及ぼさないと予想される）についての非修飾フォーマットAを有するsiRNAならびに2'-O-メチル化修飾フォーマットHおよびKを有するsiRNAによるサイレンシングに起因する正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾siRNAフォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.3529；フォーマットK、0.3289。

30

【図11B】図11A～図11Fは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす2'-O-メチル化修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、有糸分裂またはアポトーシスの量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティングsiRNAである。実施例6を参照のこと。図11Bは、遺伝子サブセット（そのノックダウンが有糸分裂を減少させると予想される）についての図11Aに関するボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾siRNAフォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.3125；フォーマットK、0.5469。

40

【図11C】図11A～図11Fは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす2'-O-メチル化修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、有糸分裂またはアポトーシスの量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティングsiRNAである。実施例

50

6を参照のこと。図11Cは、遺伝子サブセット（そのノックダウンが有糸分裂に影響を及ぼさないと予想される）についての図11Aに関するボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明された有糸分裂オフターゲット効果を有する*siRNA*を、かかる*siRNA*が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。*siRNA*がオフターゲット効果を有することは、*Neg*コントロールと比較してデータの分布がより広くなる非修飾フォーマットAのボックスプロットによって明らかである。各修飾フォーマットを非修飾*siRNA*フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.9102；フォーマットK、0.4961。

【図11D】図11A～図11Fは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす2'-O-メチル化修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（*Neg*）は、有糸分裂またはアポトーシスの量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティング*siRNA*である。実施例6を参照のこと。図11Dは、遺伝子標的組（実施例6に記載のように、そのサブセットのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想され、そのサブセットがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される）について2'-O-メチル修飾フォーマットHおよびKを有する*siRNA*によるサイレンシングに起因する正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾*siRNA*フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.3529；フォーマットK、0.3529。

【図11E】図11A～図11Fは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす2'-O-メチル化修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（*Neg*）は、有糸分裂またはアポトーシスの量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティング*siRNA*である。実施例6を参照のこと。図11Eは、遺伝子サブセット（実施例6に記載のようにそのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想される）についての図11Dに関するボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾*siRNA*フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.3125；フォーマットK、0.5469。

【図11F】図11A～図11Fは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす2'-O-メチル化修飾フォーマットの影響についてのデータを示す。ネガティブコントロール（*Neg*）は、有糸分裂またはアポトーシスの量を値1.0に正規化するスクランブルした非ターゲティング*siRNA*である。実施例6を参照のこと。図11Fは、遺伝子サブセット（実施例6に記載のように、そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される）についての図11Dに関するボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する*siRNA*を、かかる*siRNA*が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。各修飾フォーマットを非修飾*siRNA*フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.9102；フォーマットK、0.7344。

【図12A-1】図12A-1は、P-G（PおよびGは、非修飾フォーマットAならびに試験フォーマットH、H+1、H-1、H-2、V、V-1、V-2、K、およびQ（修飾はLNA（登録商標）残基である）について図4Bおよび図4Cに関して定義した）として計算したパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の相違を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.04199；フォーマットH+1、0.123；フォーマットH-1、0.1748；フォーマットH-2、0.2402；フォーマットV、0.06738；フォーマットV-1、0.05371；フォーマットV-2、0.5771；フォーマットK、0.4648；フォーマットQ、0.1016。図12A-2は、図1

10

20

30

40

50

2 A - 1 の *siRNA* のパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0.3652；フォーマット H + 1、0.2783；フォーマット H - 1、0.2402；フォーマット H - 2、0.4131；フォーマット V、0.2061；フォーマット V - 1、0.1016；フォーマット V - 2、0.7002；フォーマット K、0.6377；フォーマット Q、0.7002。

【図 1 2 A - 2】図 1 2 A - 1 は、P - G（P および G は、非修飾フォーマット A ならびに試験フォーマット H、H + 1、H - 1、H - 2、V、V - 1、V - 2、K、および Q（修飾は LNA（登録商標）残基である）について図 4 B および図 4 C に関して定義した）として計算したパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の相違を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0.04199；フォーマット H + 1、0.123；フォーマット H - 1、0.1748；フォーマット H - 2、0.2402；フォーマット V、0.06738；フォーマット V - 1、0.05371；フォーマット V - 2、0.5771；フォーマット K、0.4648；フォーマット Q、0.1016。図 1 2 A - 2 は、図 1 2 A - 1 の *siRNA* のパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0.3652；フォーマット H + 1、0.2783；フォーマット H - 1、0.2402；フォーマット H - 2、0.4131；フォーマット V、0.2061；フォーマット V - 1、0.1016；フォーマット V - 2、0.7002；フォーマット K、0.6377；フォーマット Q、0.7002。

【図 1 2 B】図 1 2 B は、実施例 6 に記載の非修飾フォーマット A ならびに LNA（登録商標）修飾フォーマット H、H - 2、H - 1、H + 1、Q、K、V、V - 1、および V - 2 を有する *siRNA* の内因性標的についてのノックダウン活性データを示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0.029598160；フォーマット H - 2、0.004296849；フォーマット H - 1、0.000833165；フォーマット H + 1、0.052779900；フォーマット Q、0.011454170；フォーマット K、0.745852000；フォーマット V、0.005660834；フォーマット V - 1、0.998100800；フォーマット V - 2、0.374661100。

【図 1 2 C】図 1 2 C は、遺伝子標的組（実施例 6 に記載のように、そのノックダウンが有糸分裂を増加させると予想される）についての非修飾フォーマット A ならびに LNA（登録商標）修飾フォーマット H、H + 1、H - 1、H - 2、K、Q、V、V - 1、および V - 2 を有する *siRNA* によるサイレンシングに起因する正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、有糸分裂の定量を値 1.0 に正規化した、スクランブルした非ターゲティング *siRNA* である。各修飾フォーマットを非修飾 *siRNA* フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0.01563；フォーマット H + 1、0.1953；フォーマット H - 1、0.07813；フォーマット H - 2、0.07813；フォーマット V、0.05469；フォーマット V - 1、0.1953；フォーマット V - 2、1；フォーマット K、0.1953；フォーマット Q、0.1953。

【図 1 2 D】図 1 2 D は、遺伝子標的組（そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される）についての非修飾フォーマット A ならびに LNA（登録商標）修飾フォーマット H、H + 1、H - 1、H - 2、K、Q、V、V - 1、および V - 2 を有する *siRNA* によるサイレンシングに起因する正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットを示す。ネガティブコントロール（Neg）は、アポトーシスの定量を値 1.0 に正規化した、スクランブルした非ターゲティング *siRNA* である。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する *siRNA* を、かかる *siRNA* が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。*siRNA* がオフターゲット効果を有

10

20

30

40

50

することは、Negコントロールと比較してデータの中央値が増加し、且つその分布がより広くなる非修飾フォーマットAのボックスプロットによって明らかである。非修飾フォーマットAコントロールを各修飾フォーマットと比較したコントロールの%としての正規化したアポトーシスフラグメントについてのウィルコクソン検定（対応のある）による統計的有意性の計算を以下に示す：フォーマットH、0.04199；フォーマットH+1、0.2061；フォーマットH-1、0.2783；フォーマットH-2、0.6377；フォーマットV、0.05371；フォーマットV-1、0.4648；フォーマットV-2、0.006836；フォーマットK、0.01855；フォーマットQ、0.024。

【図13A-1】図13A-1は、P-G（PおよびGを、非修飾フォーマットAならびに修飾フォーマットH、H+1、H-1、V-2、K、およびO（修飾は2'-O-メチル修飾ヌクレオチドである）を有するsiRNAについて図4Bおよび図4Cに関して定義した）として計算したパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の相違を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.00001574；フォーマットH+1、0.001091；フォーマットH-1、0.001918；フォーマットV-2、0.0002131；フォーマットK、0.0003619；フォーマットO、0.406。図13A-2は、図13A-1のsiRNAのパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.00001574；フォーマットH+1、0.007443；フォーマットH-1、0.02514；フォーマットV-2、0.0001464；フォーマットK、0.0003619；フォーマットO、0.5446。

【図13A-2】図13A-1は、P-G（PおよびGを、非修飾フォーマットAならびに修飾フォーマットH、H+1、H-1、V-2、K、およびO（修飾は2'-O-メチル修飾ヌクレオチドである）を有するsiRNAについて図4Bおよび図4Cに関して定義した）として計算したパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の相違を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.00001574；フォーマットH+1、0.001091；フォーマットH-1、0.001918；フォーマットV-2、0.0002131；フォーマットK、0.0003619；フォーマットO、0.406。図13A-2は、図13A-1のsiRNAのパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率を示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、0.00001574；フォーマットH+1、0.007443；フォーマットH-1、0.02514；フォーマットV-2、0.0001464；フォーマットK、0.0003619；フォーマットO、0.5446。

【図13B】図13Bは、非修飾フォーマットAならびに修飾フォーマットH、H+1、H-1、K、V-2、およびO（修飾は2'-O-メチル修飾ヌクレオチドである）を有するsiRNAの内因性標的についてのノックダウン活性データを示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマットH、3.47E-06；フォーマットH+1、0.001957517；フォーマットH-1、8.79E-09；フォーマットK、0.005446013；フォーマットV-2、1.95E-09；およびフォーマットO、0.9972392。

【図13C】図13Cは、遺伝子標的組（実施例6に記載のように、そのノックダウンが有糸分裂を増加させると予想される）についての非修飾フォーマットAならびに2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する修飾フォーマットH、H-1、K、およびVを有するsiRNAによるサイレンシングに起因する正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応

10

20

30

40

50

のある)の結果を以下に示す:フォーマットH、0.1953;フォーマットH-1、0.6406;フォーマットV、0.1953;フォーマットK、0.6406。

【図13D】図13Dは、遺伝子標的組(実施例6に記載のように、そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される)についての非修飾フォーマットAならびに2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する修飾フォーマットH、H-1、V、およびKを有する*siRNA*によるサイレンシングに起因する正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する*siRNA*を、かかる*siRNA*が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。*siRNA*がオフターゲット効果を有することは、Negコントロールと比較してデータの分布がより広くなる非修飾フォーマットAのボックスプロットによって明らかである。非修飾フォーマットAを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)の結果を以下に示す:フォーマットH、0.9102;フォーマットH-1、0.25;フォーマットV、0.6523;フォーマットK、0.7344。

【図14】図14Aは、非修飾フォーマットAならびにLNA(登録商標)修飾フォーマットH、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1、およびY-1を有する*siRNA*の内因性標的についての*mRNA*ノックダウン活性のボックスプロットを示す。非修飾フォーマットAを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)による統計的有意性の計算を以下に示す:フォーマットH、0.005302;フォーマットM、0.02475;フォーマットW、1;フォーマットW+1、0.8423;フォーマットW-1、0.5096;フォーマットY、0.932;フォーマットY+1、0.887;フォーマットY-1、0.5891。図14Bは、非修飾フォーマットAならびにLNA(登録商標)修飾フォーマットH、M、JB1、JB2、JB3、JB4、およびJB5を有する*siRNA*の内因性標的についての*mRNA*ノックダウン活性のボックスプロットを示す。非修飾フォーマットAを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)による統計的有意性の計算を以下に示す:フォーマットH、0.005302;フォーマットM、0.02475;フォーマットJB1、0.009613;フォーマットJB2、0.7259;フォーマットJB3、0.4213;フォーマットJB4、0.04904;フォーマットJB5、0.972。

【図15A】図15A~図15Dは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす非修飾フォーマットAならびにLNA(登録商標)修飾フォーマットH、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1、およびY-1を有する*siRNA*の影響についてのデータを示す。実施例6を参照のこと。図15Aは、遺伝子標的組(実施例6に記載のように、そのノックダウンが有糸分裂を減少させると予想される)についての実施例6に記載の正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。ネガティブコントロール(Neg)は、有糸分裂の定量を値1.0に正規化したスクランブルした非ターゲティング*siRNA*である。各修飾フォーマットを非修飾*siRNA*フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)の結果を以下に示す:フォーマットH、0.4961;フォーマットM、1;フォーマットW、0.01953;フォーマットW+1、0.5703;フォーマットW-1、0.07422;フォーマットY、0.03906;フォーマットY+1、0.4961;フォーマットY-1、0.09766。

【図15B】図15A~図15Dは、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす非修飾フォーマットAならびにLNA(登録商標)修飾フォーマットH、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1、およびY-1を有する*siRNA*の影響についてのデータを示す。実施例6を参照のこと。図15Bは、遺伝子標的組(そのノックダウンが有糸分裂に影響を及ぼさないと予想される)についての図15Aに関するボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明された有糸分裂オフターゲット効果を有する*siRNA*を、かかる*siRNA*が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。*siRNA*がオフターゲット効果を有することは、Negコントロールと比較して中央

10

20

30

40

50

値約 0.7 を有する非修飾フォーマット A のボックスプロットによって明らかである。非修飾フォーマット A コントロールを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）による統計的有意性の計算を以下に示す：フォーマット H、0.5；フォーマット M、0.75；フォーマット W、0.25；フォーマット W + 1、0.25；フォーマット W - 1、0.25；フォーマット Y、0.25；フォーマット Y + 1、0.25；フォーマット Y - 1、1。

【図 15 C】図 15 A ~ 図 15 D は、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす非修飾フォーマット A ならびに LNA（登録商標）修飾フォーマット H、M、W、W + 1、W - 1、Y、Y + 1、および Y - 1 を有する siRNA の影響についてのデータを示す。実施例 6 を参照のこと。図 15 C は、遺伝子標的組（実施例 6 に記載のように、そのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想される）についての正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾 siRNA フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0.75；フォーマット M、0.25；フォーマット W、0.25；フォーマット W - 1、1；フォーマット W + 1、0.25；フォーマット Y、0.25；フォーマット Y - 1、0.25；フォーマット Y + 1、0.25。

【図 15 D】図 15 A ~ 図 15 D は、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす非修飾フォーマット A ならびに LNA（登録商標）修飾フォーマット H、M、W、W + 1、W - 1、Y、Y + 1、および Y - 1 を有する siRNA の影響についてのデータを示す。実施例 6 を参照のこと。図 15 D は、遺伝子標的のサブセット（そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される）についての図 15 C に関するボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する siRNA を、かかる siRNA が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。siRNA がオフターゲット効果を有することは、Neg コントロールと比較してデータの中央値が 3.5 より大きい値であり、且つその分布がより広くなる非修飾フォーマット A のボックスプロットによって明らかである。各修飾フォーマットを非修飾 siRNA フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0.01221；フォーマット M、0.8501；フォーマット W、0.07715；フォーマット W + 1、0.06396；フォーマット W - 1、0.1763；フォーマット Y、0.03418；フォーマット Y + 1、0.021；フォーマット Y - 1、0.2036。

【図 16 A】図 16 A ~ 図 16 D は、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす非修飾フォーマット A ならびに LNA（登録商標）修飾フォーマット H、M、JB 1、JB 2、JB 3、JB 4、および JB 5 を有する siRNA の影響についてのデータを示す。実施例 6 を参照のこと。図 16 A は、遺伝子標的組（そのノックダウンが有糸分裂を減少させると予想される）についての正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾 siRNA フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0.4961；フォーマット M、1；フォーマット JB 1、0.3594；フォーマット JB 2、0.6523；フォーマット JB 3、0.02734；フォーマット JB 4、0.1641；フォーマット JB 5、0.2031。

【図 16 B】図 16 A ~ 図 16 D は、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす非修飾フォーマット A ならびに LNA（登録商標）修飾フォーマット H、M、JB 1、JB 2、JB 3、JB 4、および JB 5 を有する siRNA の影響についてのデータを示す。実施例 6 を参照のこと。図 16 B は、遺伝子標的組（そのノックダウンが有糸分裂に影響を及ぼさないと予想される）についての図 16 A に関するボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明された有糸分裂オフターゲット効果を有する siRNA を、かかる siRNA が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した

10

20

30

40

50

。s i R N A がオフターゲット効果を有することは、N e g コントロールと比較して中央値が約 0 . 6 5 であり、それにより、有糸分裂の減少を示す非修飾フォーマット A のボックスプロットによって明らかである。非修飾フォーマット A コントロールを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0 . 5 ；フォーマット M、0 . 7 5 ；フォーマット J B 1、0 . 2 5 ；フォーマット J B 2、0 . 2 5 ；フォーマット J B 3、0 . 7 5 ；フォーマット J B 4、0 . 2 5 ；フォーマット J B 5、0 . 2 5 。

【図 1 6 C】図 1 6 A ~ 図 1 6 D は、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす非修飾フォーマット A ならびに L N A（登録商標）修飾フォーマット H、M、J B 1、J B 2、J B 3、J B 4、および J B 5 を有する s i R N A の影響についてのデータを示す。実施例 6 を参照のこと。図 1 6 C は、遺伝子標的組（実施例 6 に記載のように、そのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想される）についてのサイレンシングに起因する正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットを示す。各修飾フォーマットを非修飾 s i R N A フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0 . 7 5 ；フォーマット M、0 . 2 5 ；フォーマット J B 1、0 . 2 5 ；フォーマット J B 2、0 . 2 5 ；フォーマット J B 3、0 . 2 5 ；フォーマット J B 4、0 . 5 ；フォーマット J B 5、0 . 7 5 。

【図 1 6 D】図 1 6 A ~ 図 1 6 D は、細胞生物学研究におけるオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に及ぼす非修飾フォーマット A ならびに L N A（登録商標）修飾フォーマット H、M、J B 1、J B 2、J B 3、J B 4、および J B 5 を有する s i R N A の影響についてのデータを示す。実施例 6 を参照のこと。図 1 6 D は、遺伝子標的組（そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される）についての図 1 6 C に関するボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する s i R N A を、かかる s i R N A が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。s i R N A がオフターゲット効果を有することは、N e g コントロール処置サンプルと比較してデータの中央値が 3 より大きい値で増加し、且つその分布がより広くなる非修飾フォーマット A のボックスプロットによって明らかである。各修飾フォーマットを非修飾 s i R N A フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0 . 0 1 2 2 1 ；フォーマット M、0 . 8 5 0 1 ；フォーマット J B 1、0 . 0 0 0 9 7 6 6 ；フォーマット J B 2、0 . 0 0 0 4 8 8 3 ；フォーマット J B 3、0 . 0 0 0 4 8 8 3 ；フォーマット J B 4、0 . 0 0 3 4 1 8 ；フォーマット J B 5、0 . 0 0 3 4 1 8 。

【図 1 7】図 1 7 は、3 7 で 9 0 % 血清中における非修飾 s i R N A についての時間の関数としての血清安定性についてのアッセイを示す。0、5、1 0、1 5、3 0、6 0、1 2 0 分間のインキュベーション後の 8 つの異なる s i R N A についての全長 s i R N A 二重鎖の残存率を示す。

【図 1 8】図 1 8 A は、実施例 7 に記載の条件下で 9 0 % 血清で処置した場合の全長 s i R N A の残存率のボックスプロットを示す。非修飾フォーマット A の s i R N A、s i R N A 修飾フォーマット F（フォーマットは、E l m e n t a r y（N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 3 3 : 1、4 3 9 - 4 4 7、2 0 0 5）によって s i L N A 5 として引用され、本明細書中で安定性の参照コントロールとして使用される）、ならびに修飾フォーマット H、D H 2 1、D H 2 0、D H 3、D H 3 0、D H 3 5、D H 6、D H 3 4、および D H 2（修飾は L N A（登録商標）残基である）を有する s i R N A についてのデータを示す。フォーマット F を各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）の結果を以下に示す：フォーマット H、0 . 0 0 7 8 1 3 ；フォーマット D H 2 1、0 . 0 0 7 8 1 3 ；フォーマット D H 2 0、0 . 0 0 7 8 1 3 ；フォーマット D H 3、0 . 0 0 7 8 1 3 ；フォーマット D H 3 0、0 . 0 0 7 8 1 3 ；フォーマット D H 3 5、0 . 0 1 5 6 3 ；フォーマット D H 6、0 . 0 0 7 8 1 3 ；フォーマット D H 3 4、

10

20

30

40

50

0.02488;フォーマットDH2、0.2049。図18Bは、NegコントロールsiRNAと比較した、実施例7に記載のフォーマットA、F、H、DH21、DH20、DH3、DH30、DH35、DH6、DH34、DH2のLNA(登録商標)修飾siRNAによるmRNAノックダウンの関数のボックスプロットを示す。非修飾フォーマットAコントロールを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)による統計的有意性の計算を以下に示す:フォーマットF、0.05469;フォーマットH、0.3828;フォーマットDH21、0.007813;フォーマットDH20、0.007813;フォーマットDH3、0.007813;フォーマットDH30、0.007813;フォーマットDH35、0.01563;フォーマットDH6、0.007813;フォーマットDH34、0.03906;フォーマットDH2、0.6406。

10

【図19】図19Aは、実施例7に記載の条件下で90%血清で処置した場合の全長siRNAの残存率のボックスプロットを示す。修飾フォーマットF、DH2、DH19、DH4、DH31、DH27、およびDH25(修飾はLNA(登録商標)残基である)についてのデータを示す。フォーマットFを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)による統計的有意性の計算を以下に示す:フォーマットDH2、0.2049;フォーマットDH19、0.1953;フォーマットDH4、0.02249;フォーマットDH31、0.01563;フォーマットDH27、0.1094;フォーマットDH25、0.1094。図19Bは、NegコントロールsiRNAと比較した、実施例7に記載のフォーマットF、DH2、DH19、DH4、DH31、DH27、およびDH25のLNA(登録商標)修飾siRNAによるmRNAノックダウンの関数のボックスプロットを示す。非修飾フォーマットAコントロールを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)による統計的有意性の計算を以下に示す:フォーマットF、0.05469;フォーマットDH2、0.6406;フォーマットDH19、0.01563;フォーマットDH4、0.007813;フォーマットDH31、0.01563;フォーマットDH27、0.01563;フォーマットDH25、0.007813。

20

【図20】図20Aは、実施例7に記載の条件下で血清で処置した場合の全長siRNAの残存率のボックスプロットを示す。修飾フォーマットF、DH2、DH47、DH29、DH28、およびDH18(修飾はLNA(登録商標)残基である)についてのデータを示す。フォーマットFを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)による統計的有意性の計算を以下に示す:フォーマットDH2、0.2049;フォーマットDH47、0.03906;フォーマットDH29、0.07813;フォーマットDH28、0.01415;フォーマットDH18、0.06836。図20Bは、NegコントロールsiRNAと比較した、実施例7に記載のフォーマットF、DH2、DH47、DH29、DH28、およびDH18のLNA(登録商標)修飾siRNAによるmRNAノックダウンの関数のボックスプロットを示す。非修飾フォーマットAコントロールを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)による統計的有意性の計算を以下に示す:F、0.05469;フォーマットDH2、0.6406;フォーマットDH47、0.3125;フォーマットDH29、0.02249;フォーマットDH28、0.01563;フォーマットDH18、0.01563。

30

40

【図21】図21Aは、実施例7に記載の条件下で血清で処置した場合の全長siRNAの残存率のボックスプロットを示す。修飾フォーマットF、DH36、DH2、DH9、DH46、DH33、およびDH10(修飾はLNA(登録商標)残基である)についてのデータを示す。フォーマットFを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定(対応のある)による統計的有意性の計算を以下に示す:フォーマットDH36、0.1609;フォーマットDH2、0.2049;フォーマットDH9、0.5534;フォーマットDH46、0.02071;フォーマットDH33、0.1508;フォーマットDH10、0.05469。図21Bは、NegコントロールsiRNAと比較した、実施例7に記載のフォーマットF、DH36、DH2、DH9、DH46、DH33、およ

50

びDH10のLNA（登録商標）修飾 siRNAによるmRNAノックダウンの関数のボックスプロットを示す。非修飾フォーマットAコントロールを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）による統計的有意性の計算を以下に示す：フォーマットF、0.05469；フォーマットDH36、0.01563；フォーマットDH2、0.6406；フォーマットDH9、0.1484；フォーマットDH46、0.1484；フォーマットDH33、0.007813；フォーマットDH10、0.007813。

【図22】図22Aは、実施例7に記載の条件下で血清で処置した場合の全長 siRNAの残存率のボックスプロットを示す。修飾フォーマットF、DH2、DH7、DH23、DH1、DH48、DH49、DH44、およびDH45（修飾はLNA（登録商標）残基である）についてのデータを示す。フォーマットFを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）による統計的有意性の計算を以下に示す：フォーマットDH2、0.2049；フォーマットDH7、0.3828；フォーマットDH23、0.03461；フォーマットDH1、0.1484；フォーマットDH48、0.6406；フォーマットDH49、0.1410；フォーマットDH44、0.3125；フォーマットDH45、0.1052。図22Bは、Negコントロール siRNAと比較した、実施例7に記載のフォーマットF、DH2、DH7、DH23、DH1、DH48、DH49、DH44、およびDH45のLNA（登録商標）修飾 siRNAによるmRNAノックダウンの関数のボックスプロットを示す。非修飾フォーマットAを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）による統計的有意性の計算を以下に示す：フォーマットF、0.05469；フォーマットDH2、0.6406；フォーマットDH7、0.05469；フォーマットDH23、0.007813；フォーマットDH1、0.007813；フォーマットDH48、0.1953；フォーマットDH49、0.4609；フォーマットDH44、0.007813；フォーマットDH45、0.01563。

【図23】図23Aは、実施例7に記載の条件下で血清で処置した場合の全長 siRNAの残存率のボックスプロットを示す。修飾フォーマットF、DH2、DH38、DH1、DH39、DH40、DH41、DH42、およびDH43（修飾はLNA（登録商標）残基である）についてのデータを示す。フォーマットFを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）による統計的有意性の計算を以下に示す：フォーマットDH2、0.2049；フォーマットDH38、0.04206；フォーマットDH1、0.1484；フォーマットDH39、0.07813；フォーマットDH40、0.2500；フォーマットDH41、0.2620；フォーマットDH42、0.1094；フォーマットDH43、0.3621。図23Bは、Negコントロール siRNAと比較した、実施例7に記載のフォーマットF、DH2、DH38、DH1、DH39、DH40、DH41、DH42、およびDH43のLNA（登録商標）修飾 siRNAによるmRNAノックダウンの断片のボックスプロットを示す。非修飾フォーマットAを各修飾フォーマットと比較したウィルコクソン検定（対応のある）による統計的有意性の計算を以下に示す：フォーマットF、0.05469；フォーマットDH2、0.6406；フォーマットDH38、0.007813；フォーマットDH1、0.007813；フォーマットDH39、0.007813；フォーマットDH40、0.01563；フォーマットDH41、0.007813；フォーマットDH42、0.007813；フォーマットDH43、0.02344。

【図24】図24は、in vivoでの siRNAの存在の定量を示す。スパイクしたコントロール動物由来の肝臓中の siRNAの存在量を、非修飾フォーマットAの siRNAおよびフォーマットDH1またはフォーマットDH47を有するLNA（登録商標）修飾フォーマットした安定化 siRNAを注射した試験動物由来の肝臓中の siRNAの存在量と比較する。CTはサイクル閾値である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

10

20

30

40

50

種々の実施形態の説明

上記の一般的な説明および以下の詳細な説明は例示および説明のみを目的とし、本教示の範囲を制限することを意図しないと理解すべきである。本出願では、他で特記しない限り、単数形の使用には複数形が含まれる。例えば、「少なくとも1つ」は、1つを超えて存在し得ることを意味する。また、「comprise」、「contain」、および「include」、またはこれらの基本用語の変更形態（例えば、「comprise s」、「contained」、および「including」であるが、これらに限定されない）は本発明を制限することを意図せず、「以下の要素を含むが他を排除しないこと」を意味する。本明細書中で使用する場合、用語「consists essentially of」または「consisting essentially of」は、
10
組み合わせに対する任意の本質的な意義から他の要素を排除する。「または」の使用は、他で示さない限り、「および/または」を意味する。用語「および/または」は、この用語の前後の用語を共にまたは個別に使用することができることを意味する。限定されない例として、「Xおよび/またはY」は、「X」または「Y」または「XおよびY」を意味することができる。

【0025】

他で特記しない限り、一定範囲の値を本明細書中に提供する場合は常に、この範囲は、最初の値および最後の値ならびにその間の任意の値または範囲が含まれることを意味する。例えば、「0.2~0.5」は、0.2、0.3、0.4、0.5、その間の範囲（0.2~0.3、0.3~0.4、0.2~0.4など）、その間の値（0.25、0.3
20
5、0.225、0.335、0.49など）、およびその間の値の範囲（0.26~0.39など）などを意味する。

【0026】

本出願で引用された全ての文献および類似資料（特許、特許出願、論文、書籍、学术论文、およびインターネットウェブページが含まれるが、これらに限定されない）は、かかる文献および類似資料の形式と無関係に、任意の目的でその全体が参考として明白に援用される。1つまたは複数の援用された文献および類似資料が本出願中の用語の定義と矛盾するように用語を定義または使用する場合には、本出願を優先する。本教示を種々の実施形態と合わせて記載するが、本教示がかかる実施形態に制限されることを意図しない。それどころか、当業者に認識されるように、本教示は、種々の変更形態、修正形態、および
30
等価物を含む。

【0027】

本明細書中で使用する場合、用語「またはその組み合わせ」は、本用語の前に列挙した用語の全ての順列および組み合わせをいう。例えば、「A、B、C、またはその組み合わせ」は、A、B、C、AB、AC、BC、またはABCの少なくとも1つを含むことを意図し、特定の状況において順序が重要である場合、BA、CA、CB、ACB、CBA、BCA、BAC、またはCABも含むことを意図する。この例に続いて、1つまたは複数の用語の繰り返しを含む組み合わせ（BB、AAA、AAB、BBC、AAABCC、CBBAAA、およびCABABBなど）が明確に含まれる。当業者は、文脈から明白
40
でない限り、典型的には、用語数または任意に組み合わせた用語に制限はないと理解するであろう。本明細書中で使用する場合、用語「代替物」は、別の産物の存在を示す産物を意味する。例えば、増幅産物は、増幅された核酸の代替物である。

【0028】

本明細書中で使用する場合、siRNAの「修飾フォーマット」は、図1A~図1Kに記載のパターンまたはフォーマットによって例示される修飾ヌクレオチドおよび「修飾以外の」ヌクレオチドのパターンを意味する。修飾ヌクレオチドは、以下に記載されている。「修飾以外の」は、特定のフォーマットの修飾ヌクレオチドの修飾以外の修飾を有する非修飾ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを意味する。

【0029】

本明細書中で使用する場合、「配列非依存性修飾」は、実施形態によって得られた修飾
50

ヌクレオチドおよび修飾フォーマットを *siRNA* の特定の配列を問わずに任意の *siRNA* に適用することができることを意味する。

【0030】

本明細書中で使用する場合、「オンターゲット」事象は、発現の減少、*mRNA* レベルの減少、または特定の表現型の増減によって証明されるように、標的遺伝子の *mRNA* がこの遺伝子をターゲティングするためにデザインされた *siRNA* に影響を受ける（すなわち、ノックダウンされる）ことを意味する。「オンターゲット」事象を、例えば、標的に影響を及ぼすことが公知の薬物の使用などまたはオルソログ由来の標的 *mRNA* の導入による喪失した表現型のレスキューなどの別の方法によって検証することができる。

【0031】

本明細書中で使用する場合、「オフターゲット事象」は、*RNA* 干渉における所望の事象以外の任意の事象を意味する。オフターゲット事象の例は、ターゲティングされない遺伝子の *mRNA* が *siRNA* に影響を及ぼされた（すなわち、ノックダウンされた）場合である。かかる「オフターゲット事象」を、適切に関連するオルソログ由来の標的 *mRNA* の供給によってレスキューすることができる。「オフターゲット事象」は、非ターゲット発現を変化させる方法での別の *mRNA*、内因性 *RNA*、*DNA*、またはタンパク質との相互作用に起因し得る。かかるオフターゲット事象は、例えば、*RISC* に組み込まれたヌクレオチド配列と非標的 *mRNA* との間のミスマッチ塩基対合または細胞環境内の非特異的相互作用に起因し得る。不適切な *RISC* 結合、不適切な *RISC* 媒介相互作用、および不適切な *RISC* 媒介切断は、オフターゲット事象に寄与し得る。オフターゲット事象はまた、細胞傷害応答、インターフェロン応答、マイクロ *RNA* 効果、または非コード *RNA* との相互作用に起因し得る。最も一般的なオフターゲット事象は、おそらく、*RISC* 複合体へのパッセンジャー（センス）鎖の望ましくない組み込みである。しかし、*siRNA* に影響を受けるオフターゲット事象は全く予想できず、非特異的な傾向を示す。オフターゲット事象はオフターゲット効果を生じ、この用語を本明細書中で交換可能に使用する。

【0032】

本明細書中で使用する場合、用語「効力」は、その標的 *mRNA* を最初の *mRNA* レベルの 50% にノックダウンするのに必要な各 *siRNA* または *siRNA* プールの濃度の基準である。一般に、効力を、*IC* 50（最大半量（50%）の *mRNA* 阻害に必要な *siRNA* の濃度）を単位として記載する。効力を、本明細書中で、一定範囲の *siRNA* 濃度（例えば、100 nM ~ 10 pM の範囲の少なくとも 6 つ）のトランスフェクションおよびサンプルに対する *qRT-PCR* 分析の実施によって決定する。結果をプロットし、50% の *mRNA* ノックダウンが達成される濃度に対する外挿によって *IC* 50 を決定する。カーブフィッティングプログラムを使用して、*mRNA* 標的の 50% ノックダウンを達成するのに必要な *siRNA* 濃度を決定する。本明細書中で使用する場合、用語「効力」を、用語「ノックダウン活性」と交換可能に使用し、この用語は、ネガティブコントロール *siRNA* への曝露後の *mRNA* の存在量と比較した試験 *siRNA* への曝露後の *mRNA* の減少量の基準である。

【0033】

本明細書中で使用する場合、用語「効力」は、*mRNA* ノックダウンの最小閾値が得られる *siRNA* の比率である。用語「効力」を、一般に、*siRNA* の集合物または *siRNA* デザインアルゴリズムの予測力に適用する。効力を、標的 *mRNA* の *siRNA* ノックダウンの *qRT-PCR* またはベクターベースの測定によって測定し、その結果を、ノックダウンの最小閾値が得られる *siRNA* の比率（例えば、70% 以上ノックダウンする *siRNA* の比率）として示す。

【0034】

本明細書中で使用する場合、用語「特異性」は、*siRNA* が *mRNA* レベルまたはタンパク質レベルで遺伝子調節に影響を及ぼす精度または標的遺伝子機能のノックダウンによって示される真の表現型の基準である。特異性を、*siRNA* のトランスフェクション

10

20

30

40

50

の結果として一定の閾値と比較して変化し、意図する標的ではなく、標的遺伝子のシグナル伝達経路に存在することが知られていない遺伝子数の決定によって測定する。当該分野の標準閾値は、2 変化倍率である。細胞生物学研究では、特定の標的に対する高特異性 *siRNA* により、表現型が予想外の表現型とほとんどまたは全く重複しない。低特異性 *siRNA* により、オフターゲット効果に起因する表現型が得られる。

【0035】

効力の「改善」は、同一の濃度で別の *siRNA* よりも低い IC50 または高いノックダウン率を有する *siRNA* をいう。特異性の「改善」は、別の *siRNA* よりも少ない遺伝子で影響を及ぼす *siRNA* をいう。効力の「改善」は、より高い *siRNA* 群率によって異なるアルゴリズムを使用して得られる別の *siRNA* 群と比較して最小の指定量のノックダウンが得られるアルゴリズムを使用して得られる *siRNA* 群をいう。

10

【0036】

本明細書中に記載の研究のために、試験結果をコントロールの結果と比較し、全ての結果を非ターゲティングであるようにデザインされたナンセンス *siRNA* に正規化する。対応のあるサンプルについてのウィルコクソン検定は、対応のあるサンプルの t 検定のノンパラメトリックな等価物である。ウィルコクソン検定は、サンプル 1 およびサンプル 2 の対応のあるデータの間の相違の絶対値をランキングし、正負の相違数の統計値を計算する（サンプル 2 - サンプル 1 として相違を計算する）。使用ソフトウェアは、cran.org から無料で利用可能な「R Package」である。

【0037】

20

用語「ヌクレオチド」は、一般に、単量体としてか、ジヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチド内のヌクレオシドのリン酸エステルをいう。ヌクレオシドは、一般に、リボース（リボヌクレオシド）またはデオキシリボース（デオキシリボヌクレオシド）の C - 1' 炭素に連結したプリン塩基またはピリミジン塩基である。天然に存在するプリン塩基には、一般に、アデニン（A）およびグアニン（G）が含まれる。天然に存在するピリミジン塩基には、一般に、シトシン（C）、ウラシル（U）、およびチミン（T）が含まれる。ヌクレオシド塩基がプリンである場合、リボースまたはデオキシリボースはプリンの 9 位で核酸塩基に結合し、核酸塩基がピリミジンである場合、リボースまたはデオキシリボースはピリミジンの 1 位で核酸塩基に結合する。リボヌクレオチドはリボヌクレオシドのリン酸エステルであり、デオキシリボヌクレオチドはデオキシリボヌクレオシドのリン酸エステルである。用語「ヌクレオチド」は、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの両方の一般名である。ジヌクレオチドは、一般に、3' - 5' ホスホジエステル結合を介して共有結合された 2 つのヌクレオチドを有する。オリゴヌクレオチドは、一般に、2 つを超えるヌクレオチドを有し、ポリヌクレオチドは、一般に、ヌクレオチド単量体のポリマーをいう。出願人は、本明細書中で、用語「ヌクレオチド」および「ヌクレオシド」を便宜上交換可能に使用しているが、当業者は、この用語が出現する状況からどの用語を適用可能であるかを容易に理解している。

30

【0038】

ヌクレオチド単量体は、「ヌクレオシド間結合またはヌクレオチド間結合」（例えば、ホスホジエステル結合）によって連結し、ここで、本明細書中で使用する場合、用語「ホスホジエステル結合」は、ホスホジエステル結合（そのリン酸アナログが含まれる）をいい、かかる対イオンが存在する場合、関連対イオン（例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+ ）が含まれる。さらなるヌクレオシド間結合またはヌクレオチド間結合を以下に記載する。オリゴヌクレオチドが一連の文字によって示される場合は常に、他で示さない限り、ヌクレオチドは左から右に 5' - 3' の順序であるか、文脈からその逆が意図されることが当業者に明白であると理解されるであろう。オリゴヌクレオチドの合成方法についての記載を、米国特許第 4, 373, 071 号；同第 4, 401, 796 号；同第 4, 415, 732 号；同第 4, 458, 066 号；同第 4, 500, 707 号；同第 4, 668, 777 号；同第 4, 973, 679 号；同第 5, 047, 524 号；同第 5, 132, 418 号；同第 5, 153, 319 号；および同第 5, 262, 530 号などで見出すことがで

40

50

きる。オリゴヌクレオチドは、任意の長さであり得る。

【0039】

本明細書中で使用する場合、「塩基対合」は、標準的なワトソン - クリック塩基対合をいう。二本鎖（二重鎖）核酸中に一般的に見出される塩基対合は、G : C、A : T、および A : U である。かかる塩基対は相補塩基対といわれ、一方の塩基対はその対合した塩基と相補的である。下記のヌクレオチドアナログは、相補ヌクレオチドまたは相補ヌクレオチドアナログと対合する場合に水素結合を形成することもできる。

【0040】

本明細書中で使用する場合、用語「相補的」または「相補性」は、塩基対に関してだけでなく、ワトソン - クリック塩基対合規則によって標準的な相補規則にしたがって塩基対合することができるか、比較的ストリンジェントな条件下で特定の核酸セグメントとハイブリッド形成することができる核酸配列に対するオリゴヌクレオチドの逆平行鎖に関して使用される。例えば、配列 5' - AGTTC - 3' は配列 5' - GAAC T - 3' と相補的である。用語「完全に素補的な」または「100%相補的な」などは、逆平行鎖間の塩基が完全に対合する（ポリヌクレオチド二重鎖中にミスマッチはない）相補配列をいう。核酸ポリマーは、その全配列の一部のみに相補的であり得る。用語「部分的相補性」、「部分的に相補的な」、「不完全な相補性」、または「不完全に相補的な」などは、100%未満完全な（例えば、ポリヌクレオチド二重鎖中に少なくとも1つのミスマッチが存在する）逆平行ポリヌクレオチド鎖間の塩基の任意のアラインメントをいう。さらに、そのアラインメント中に1つまたは複数のミスマッチ、ギャップ、または挿入が存在する場合、2つの配列はその長さの一部について相補的であるといわれる。

【0041】

さらに、標的ポリヌクレオチドの「相補物」は、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部と逆平行結合で組み合わせることができるポリヌクレオチドをいう。逆平行結合は、分子内（例えば、核酸分子内のヘアピンループの形態）または分子間（2つ以上の一本鎖核酸分子が互いにハイブリッド形成する場合など）であり得る。用語「～に対応する」は、核酸に関する場合、特定の配列が逆平行配列と十分に相補的であり、その結果、2つの配列が適切な条件下でアニーリングして二重鎖を形成することを意味する。

【0042】

本明細書中で使用する場合、「パッセンジャー（センス）」鎖、領域、またはオリゴヌクレオチドは、DNAのセンス鎖の少なくとも一部の同一のヌクレオチド配列を有するヌクレオチド配列またはmRNAの少なくとも一部のヌクレオチド配列をいう。「パッセンジャー（センス）鎖」は、別のポリヌクレオチドの相補ガイド（アンチセンス）領域と二重鎖を形成するポリヌクレオチドのセンス領域を含む。ヘアピン一本鎖オリゴヌクレオチド（shRNA）は、同一分子内にパッセンジャー（センス）領域およびガイド（アンチセンス）領域も含むことができ、この領域は、以下にさらに説明するように、ループ配列またはループリンカー部分によって連結された二重鎖構造を形成する。ヘアピンは、左方向（すなわち、5' - アンチセンス - ループ - センス - 3'）または右方向（すなわち、5' - センス - ループ - アンチセンス - 3'）のいずれかであり得る。

【0043】

本明細書中で使用する場合、「siRNA」は、RNA干渉（RNAi）経路を介して遺伝子サイレンシングを誘導する低分子干渉RNA二重鎖をいう。低分子干渉RNAの長さは様々であり得、アンチセンス領域とセンス領域との間およびアンチセンス領域と標的mRNA配列との間に多くても1つまたは2つのミスマッチ塩基対を含むことができる。各siRNAは、15～30塩基対、18～25塩基対、19～22塩基対、21塩基対、または19塩基対を含むことができる。いくつかの実施形態では、siRNAは、独立して、5'末端、3'末端、または5'末端と3'末端の両方に1、2、3、4、または5つの非対合オーバーハングヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、siRNAは平滑末端を有する。さらに、用語「siRNA」には、2つの個別の鎖の二重鎖およびヘアピン構造を形成することができる一本鎖（shRNA）が含まれる。shRN

Aは、ヌクレオチド（4～30、6～20、または7～15ヌクレオチドなど）のループ配列を有することができるか、非ヌクレオチド部分（炭化水素結合領域など）またはその組み合わせを含むことができる。shRNAはミスマッチまたはバルジを含むことができる。

【0044】

いくつかの実施形態では、本教示は、非修飾ヌクレオチドと比較して塩基対合に対する親和性が増強されているか、親和性の増強が一部をなすヌクレオチド配列に寄与する修飾ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドは、本明細書中で意図されるように、RNAの配座平衡を、RNA二重鎖のA形態幾何学と一致するノーザン（C3'エンド）高次構造にシフトさせる。それにより、DNA:RNA二重鎖を安定化させることもできる。いくつかの実施形態では、塩基対合に対する親和性を、ピシクロヌクレオチド、トリシクロヌクレオチド、または2'-修飾ヌクレオチドを有するパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドの構築によって増強する。

【0045】

いくつかの実施形態では、siRNAの修飾ヌクレオチドには、独立して、修飾糖部分、修飾塩基部分、修飾ヌクレオシド間部分、またはこれらの修飾部分のいずれかの組み合わせが含まれる。

【0046】

いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドには、修飾糖部分（2'-ハロ（式中、ハロはクロロ、フルオロ、ブロモ、またはヨードである）が含まれるが、これらに限定されない）；アラビノまたはアラビノース高次構造中の2'-フルオロ（FANA）；2'-H、-SH、-NH₂、-CN、アジド；または-OR、-R、-SR、-NHR、もしくは-N(R)₂（式中、Rは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、オキシアルキル、アルコキシアルキル、アルキルアミンであり、アルキル部分はC₁～C₆である）が含まれる。

【0047】

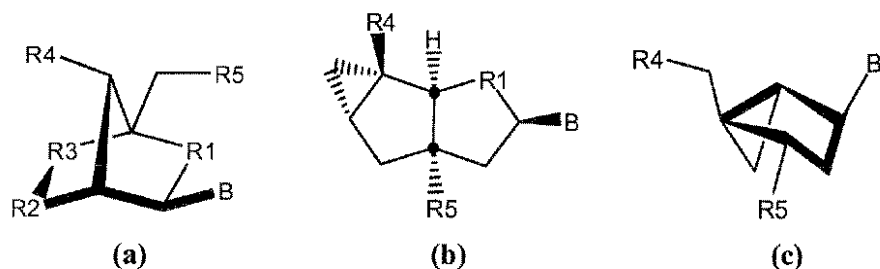
さらなる2'修飾には、2'-O-(CH₂)₄NH₂；2'-O-アントラキノリルアルキル（ここで、アルキルはメチルまたはエチルを含む）；2'-O-(CH₂)₂-OCH₃；2'-O-(CH₂CH₂O)_n-CH₃（式中、nは1～4である）；2'-O-CH₂-CHR-X（式中、X=OH、F、CF₃、またはOCH₃およびR=H、CH₃、CH₂OH、またはCH₂OCH₃）；ペプチド核酸単量体またはその誘導体（PNA）；2'修飾（ここで、2'位はアルコキシ（例えば、メトキシ、エトキシ、アリルオキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、およびフェノキシ）である）などが含まれる。

【0048】

いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドには、修飾糖部分または疑似糖（以下が含まれるが、これらに限定されない：ピシクロヌクレオチド構造（a）、トリシクロヌクレオチド構造（b）、またはピシクロヌクレオチド構造（c））：

【0049】

【化1】



（式中、

10

20

30

40

50

R₁およびR₂は、独立して、O、S、CH₂、またはNRであり、ここで、Rは水素またはC₁₋₃-アルキルであり、R₃は、CH₂、CH₂-O、CH₂-S、CH₂-CH₂、CH₂-CH₂-CH₂、CH=CH、またはCH₂-NRであり、ここで、Rは水素またはC₁₋₃-アルキルであり、R₄およびR₅は、独立して、ヌクレオシド間結合、末端基、または保護基であり、R₄およびR₅の少なくとも1つはヌクレオシド間結合であり、Bは、核酸塩基、核酸塩基誘導体、または核酸塩基アナログである)が含まれる。いくつかの実施形態では、R₄およびR₅は、独立して、H、OH、ホスファート、C₁₋₁₂-アルキル、C₁₋₁₂-アルキルアミン、C₁₋₁₂-アルケニル、C₁₋₁₂-アルキニル、C₁₋₁₂-シクロアルキル、C₁₋₁₂-アラルキル、アリール、アシル、シリル、オリゴヌクレオチド、ヌクレオシド間結合を介して結合したヌクレオシド、またはその組み合わせであり、R₄およびR₅の少なくとも1つはオリゴヌクレオチドまたはヌクレオシド間結合を介して結合したヌクレオシドである。5'末端を、置換基(ホスファート、C₁₋₁₂-アルキル、C₁₋₁₂-アルキルアミン、C₁₋₁₂-アルケニル、C₁₋₁₂-アルキニル、C₁₋₁₂-シクロアルキル、C₁₋₁₂-アラルキル、アリール、アシル、またはシリルなど)によってさらに誘導体化することができる。いくつかの実施形態では、5'末端を、例えば、C₁₂またはC₆置換基またはホスファートによって誘導体化する。

【0050】

ビスクロヌクレオチドには、上記の構造(a)および(c)のビスクロヌクレオチドが含まれる。構造(a)のビスクロヌクレオチドはロックド核酸またはLNA(登録商標)とも呼ばれ、例えば、-Dおよび-Lビスクロヌクレオチド、ビスクロヌクレオチド(キシロ-ロックド核酸(米国特許第7,084,125号)、L-リボ-ロックド核酸(米国特許第7,053,207号)、1'-2'ロックド核酸(米国特許第6,734,291号および同第6,639,059号)、および3'-5'ロックド核酸(米国特許第6,083,482号)など)が含まれる。構造(c)のビスクロヌクレオチドおよびかかるビスクロヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの合成は、例えば、Maierら(Nucleic Acids Research 2004, 32:12,3642-3650)およびMaderiaら(Nucleic Acids Research 2007, 35:6,1978-1991)に記載されている。構造(b)のトリシクロヌクレオチドおよびかかるトリシクロヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの合成は、例えば、Ittigら(Nucleic Acids Research 2004, 32:1,346-353)に記載されている。

【0051】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチドには、修飾ヌクレオシド間リンカー部分(ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホロセレノアート、ホスホロジセレノアート、ホスホロアニロチオアート、ホスホルアニリダート、ホスホルアミダート、ボロノホスファート、チオホルムアセタール(-S-CH₂-O-CH₂-)、メチレン(メチルイミノ)、ジメチルヒドラジノ、ホスホリル結合モルホリノ、-CH₂-CO-NH-CH₂-、-CH₂-NH-CO-CH₂-、およびリン原子が+5酸化状態にあり、且つ1つまたは複数の酸素原子が非酸素部分(例えば、硫黄)に置換された任意のホスファートアナログが含まれるが、これらに限定されない)が含まれる。ペプチド核酸は、骨格が通常はN-(2-アミノ-エチル)-グリシン単位から形成される合成ペプチド様結合(アミド結合)を含み、それにより、アキラルおよび非荷電性の分子が得られる核酸アナログである。例示的なリン酸アナログには、関連対イオン(例えば、H⁺、NH₄⁺、Na⁺)が含まれる(かかる対イオンが存在する場合)。

【0052】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチドには、修飾塩基部分(ピリミジン核酸塩基およびプリン核酸塩基が含まれるが、これらに限定されない)、その誘導体およびアナログ(1つまたは複数のアルキル、カルボキシアルキル、アミノ、ヒドロキシル、ハロ(すなわち、フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード)、チオールまたはアルキルチオール部分

10

20

30

40

50

に置換されたピリミジンおよびプリンが含まれるが、これらに限定されない)が含まれる。アルキル(例えば、アルキル、カルボキシアリルなど)部分は、1~6個の炭素原子を含む。本明細書中で意図されるさらなる修飾ヌクレオチドには、オキセタン修飾塩基(オキセタン修飾を含む塩基の考察については、米国特許出願公開第20040142946号を参照のこと)が含まれる。

【0053】

ピリミジン、ピリミジン誘導体、およびピリミジンアナログには、プロモチミン、1-メチルシュードウラシル、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、2-チオピリミジン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、3-メチルシトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシ-プロピル)ウラシル、4-アセチルシトシン、4-チオウラシル、N4, N4-エタノシトシン、4-(6-アミノヘキシルシトシン)、5-メチルシトシン、5-エチルシトシン、5-(C3, C6)-アルキニルシトシン、5-プロモウラシル、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-クロロウラシル、5-エチルウラシル、5-フルオロウラシル、5-ヨードウラシル、5-プロピルウラシル、5-プロピニルウラシル、チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メチル-2-チオウラシル、5-ヨード-2'-デオキシウラシル、5-フルオロウラシル、5-メチルウラシル、三環系カルバゾールベースのピリミジンアナログ、三環系フェノキサジンベースのピリミジンアナログ、イソシトシン、シュードイソシトシン、ジヒドロウラシル、シュードウラシル、およびユニバーサルヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0054】

いくつかの実施形態では、プリン、プリン誘導体、およびプリンアナログには、アザプリン、アザグアニン、アザアデニン、デアザプリン、デアザグアニン、デアザアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルアデニン、1-メチルイノシン、2-アミノプリン、2-クロロ-6-アミノプリン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、2, 6-ジアミノプリン、6-アミノプリン、6-チオグアニン、6-チオアデニン、6-チオプリン、6-ヒドロキシアミノプリン、N6-メチルアデニン、N, N-ジメチルアデニン、N6-イソペンテニルアデニン、N6, N6-エタノ-2, 6-ジアミノプリン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、7-メチルグアニン、7-ハロ-7-デアザプリン(式中、ハロは、プロモ、フルオロ、ヨード、またはクロロである)、7-プロピン-7-デアザプリン、8-プロモアデニン、8-ヒドロキシアデニン、8-プロモグアニン、8-クロログアニン、8-アミノグアニン、8-ヒドロキシグアニン、8-メチルグアニン、8-チオグアニン、8-オキソ-N6-メチルアデニン、N-(9-D-リボフラノシルプリン-6-イル)-カルバモイル)トレオニン、メチルチオアデニン、キサンチン、ヒポキサンチン、イノシン、ワイプトキソシン、ワイプトシン、イソグアニン、キューオシン、-D-マンノシルキューオシン、-D-ガラクトシルキューオシン、およびユニバーサルヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0055】

ユニバーサル塩基は、1つを超える特定の塩基型または任意の特定の塩基と塩基対合することができる。他の実施形態では、ユニバーサル塩基は、任意の塩基と特異的に水素結合しないが、疎水性スタッキングによって同一核酸鎖上の隣接塩基と相互作用する。ユニバーサル塩基には、インドール(7-アザインドール、6-メチル-7-アザインドール、プロピニル-7-アザ-インドール、アレニル-7-アザインドールなど)、イソカルボスチリル、プロピニルイソカルボスチリル、イミジソピリジン、およびピロールピリジンが含まれるが、これらに限定されない。

【0056】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、図 1 A ~ 図 1 K に記載のパターンまたはフォーマットによって例示の本明細書中で「フォーマット」と呼ばれる特定のパターンで s i R N A 中に存在する。いくつかの実施形態では、化学合成したパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは 15 ~ 30 ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾フォーマット（1）、配列非依存性修飾フォーマット（2）、および配列非依存性修飾フォーマット（3）：

（1） $5' N_p - m - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 p は 0 または 1 であり、 x は、7、8、9、10、または 11 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $p + x + r + 4$ ）を示す整数である）、

（2） $5' N_p - m - m - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 p は 0 または 1 であり、 y は、7、8、または 9 であり、 z は 1 であるか、 y は 7 であり、 z は 2 または 3 であり、 r は 0、1、または 2 であり、 q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $p + y + z + r + 4$ ）を示す整数である）、

（3） $5' m - N_1 - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 x は、8、9、または 10 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $x + r + 5$ ）を示す整数である）の 1 つを含み、

ここで、各 m は独立してピシクロヌクレオチドまたはトリシクロヌクレオチドであり、各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、 m がピシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、 m がトリシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、トリシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドである。

【0057】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドが本質的に 15 ~ 30 ヌクレオチド長からなり、以下の配列非依存性修飾フォーマット（1）、配列非依存性修飾フォーマット（2）、および配列非依存性修飾フォーマット（3）：

（1） $5' N_p - m - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 p は 0 または 1 であり、 x は、7、8、9、10、または 11 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $p + x + r + 4$ ）を示す整数である）、

（2） $5' N_p - m - m - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 p は 0 または 1 であり、 y は 7、8、または 9 であり、 z は 1 であるか、 y は 7 であり、 z は 2 または 3 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $p + y + z + r + 4$ ）を示す整数である）、

（3） $5' m - N_1 - m - N_x - m - m - N_q - n_r 3'$ （式中、 x は、8、9、または 10 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q は、パッセンジャー鎖長マイナス（ $x + r + 5$ ）を示す整数である）の 1 つから本質的になり、

ここで、各 m は独立してピシクロヌクレオチドまたはトリシクロヌクレオチドであり、各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、 m がピシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、 m がトリシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、トリシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドである、化学合成したパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドを提供する。

【0058】

いくつかの実施形態では、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドは、15 ~ 30 ヌクレオチド（少なくとも 12 ヌクレオチドのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域）を含み、標的 mRNA の少なくとも一部と相補的である。いくつかの実施形態では、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドは、少なくとも 13 ヌクレオチドからオリゴヌクレオチドの全長に相当するヌクレオチド数までのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域を含む。いくつかの実施形態では、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドは、2 つの 3' ヌクレオチドを除いてパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドの全長と連続的に相補的な領域を含む。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドは、標的 mRNA の少なくとも一部と少なくとも 12 個の連続するヌクレオチドが相補的である。いくつかの実施形態では、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドは、標的 mRNA の少なくとも一部と少なくとも 13 ヌクレオチドからガイドオリゴヌクレオチドの全長に相当するヌクレオチド数まで相補的である。いくつかの実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドは、2 つの 3' ヌクレオチドを除いて標的 mRNA の一部と完全に相補的である。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、17 ~ 30 ヌクレオチド長であり、以下の配列非依存性修飾フォーマット（4）、フォーマット（5）、およびフォーマット（6）：

（4）5' $m_p - N_x - m - m - N_q - n_r$ 3'（式中、 p が 0 である場合、 x は 12 であり、 p が 1 である場合、 x は 11 であり、 p が 2 である場合、 x は 10 であり、 p が 3 である場合、 x は 9 であり、 p が 4 である場合、 x は 8 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q はパッセンジャー鎖長マイナス（ $p + x + r + 2$ ）を示す整数である）、

（5）5' $m - m - N_x - m - N_q - n_r$ 3'（式中、 x は 11 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q はパッセンジャー鎖長マイナス（ $x + r + 3$ ）を示す整数である）

（6）5' $m_p - N_y - m - N_z - m - N_q - n_r$ 3'（式中、 p は 3 であり、 y は 9 であり、 z は 1 であり、 r は、0、1、または 2 であり、 q はパッセンジャー鎖長マイナス（ $p + y + z + r + 2$ ）を示す整数である）

の 1 つを含むパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチド、ならびに 17 ~ 30 ヌクレオチド（少なくとも 12 ヌクレオチドのパッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドと連続的に相補的な領域）を有するガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドであって、ガイド鎖が標的 mRNA の少なくとも一部とさらに相補的である、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドを含み、

ここで、

各 m は、独立して、ピシクロヌクレオチド、トリシクロヌクレオチド、または 2' - 修飾ヌクレオチドであり、各 n は、独立して、デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドであり、且つオーバーハンギングヌクレオチドであり、 m がピシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、ピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、 m がトリシクロヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、トリシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、 m が 2' - 修飾ヌクレオチドである場合、各 N は、独立して、2' - 修飾ヌクレオチド以外のヌクレオチドである、低分子干渉 RNA を提供する。

【 0 0 6 1 】

低分子干渉 RNA の 1 つの実施形態では、パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは配列非依存性修飾フォーマット（4）を有し、 p は 2 であり、 x は 10 であり、 r は 2 であり、各 n はオーバーハンギングヌクレオチドであり、各 n は、独立して、修飾ヌクレオチドであり、ガイド（アンチセンス）オリゴヌクレオチドは、2 つの 3' - オーバーハング修飾ヌクレオチドを含み、各修飾ヌクレオチドは、独立して、ピシクロヌクレオチド、トリシクロヌクレオチド、または 2' - 修飾ヌクレオチドである。1 つの実施形態では、パッセンジャーオリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目の位置および 3' 末端から 4 番目の位置の少なくとも 1 つは修飾ヌクレオチドである。3' 末端から 3 番目の位置は、最後の位置から 3 番目である（すなわち、例えば、図 1 H のフォーマット DH 47 に関して、末端から 2 番目の前の位置）。3' 末端から 4 番目の位置は、最後の位置から 4 番目である（すなわち、図 1 H のフォーマット DH 29 に関して、末端から 3 番目の前の位置）。かかる siRNA は、例えば、血清の存在下などでのヌクレアーゼに対して特に安定である。

【 0 0 6 2 】

低分子干渉 RNA のいくつかの実施形態では、長さが 17 ヌクレオチドである場合、ガ

10

20

30

40

50

イドオリゴヌクレオチドの2位および3位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、長さが18ヌクレオチドである場合、ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、および4位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、長さが19ヌクレオチドである場合、ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、および5位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、長さが20ヌクレオチドである場合、ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、5位、および6位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであり、長さが21~30ヌクレオチドである場合、ガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、5位、6位、および7位の少なくとも1つは修飾ヌクレオチドである。図1KのフォーマットDH1およびフォーマットDH39~DH43は、21ヌクレオチド長であり、修飾ヌクレオチドとしてガイドオリゴヌクレオチドの2位、3位、4位、5位、6位、および7位の少なくとも1つを有するsiRNA修飾フォーマットの例である。かかるsiRNAはまた、例えば、血清または血漿の存在下などでヌクレアーゼに対して特に安定である。

【0063】

いくつかの実施形態では、パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット(1)（式中、pは0であり、xは10であり、rは2である）（フォーマットH、図1Aに記載のフォーマットHを有する21量体）、配列非依存性修飾フォーマット(1)（式中、pは0であり、xは9または11であり、rは2である）（フォーマットH-1またはフォーマットH+1、図1Bに記載のかかるフォーマットを有する21量体）、または配列非依存性修飾フォーマット(2)（式中、pは0であり、yは9であり、rは2である）（フォーマットV、図1Cに記載のフォーマットVを有する21量体）を含む。

【0064】

いくつかの実施形態では、パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット(1)（式中、pは1であり、xは9または10であり、rは2である）（フォーマットWまたはフォーマットW+1、図1Dに記載のかかるフォーマットを有する21量体を示す）を含み、各mは、構造(a)（式中、R1はOであり、R2はOであり、R3はCH₂である）を有する。いくつかの実施形態では、パッセンジャー（センス）オリゴヌクレオチドは、配列非依存性修飾フォーマット(3)（式中、xは9または10であり、rは2である）（フォーマットYまたはフォーマットY+1、図1Dに記載のかかるフォーマットを有する21量体）を含み、各mは、構造(a)（式中、R1はOであり、R2はOであり、R3はCH₂である）を有する。

【0065】

さらなる実施形態では、ガイド（アンチセンス）鎖の各Nはピシクロヌクレオチド以外のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ガイド（アンチセンス）鎖は修飾を持たない。

【0066】

いくつかの実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは、修飾フォーマットH（式中、修飾ヌクレオチドmはフォーマットの1位、2位、13位、および14位に存在し、各mはLNA（登録商標）であり、各nはデオキシヌクレオチドであり、各Nはリボヌクレオチドである）を有する。いくつかの実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは修飾フォーマットHを有し、各mは構造(a)（式中、R1はOであり、R2はOであり、R3はCH₂である）を有する。

【0067】

いくつかの実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは、修飾フォーマットV（式中、修飾ヌクレオチドmはフォーマットの1位、2位、12位、および14位に存在し、各mはLNA（登録商標）であり、各nはデオキシヌクレオチドであり、各Nはリボヌクレオチドである）を有する。いくつかの実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは、修飾フォーマットVを有し、各mは構造(a)（式中、R1はOであり、R2はOであり、R3はCH₂である）を有する。いくつかの実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは、フォーマット(2)（式中、p

10

20

30

40

50

は0であり、yは7である)を有する修飾フォーマットV-2を有する。

【0068】

いくつかの実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは、修飾フォーマットQ(式中、修飾ヌクレオチドmは、フォーマットの13位および14位に存在し、各mはLNA(登録商標)であり、各nはデオキシヌクレオチドであり、各Nはリボヌクレオチドである)を有する。いくつかの実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは修飾フォーマットQを有し、各mは構造(a)(式中、R1はOであり、R2はOであり、R3はCH₂である)を有する。

【0069】

いくつかの実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは、フォーマット(4)(式中、pが0である場合、xは12であり(フォーマットQ)、pが1である場合、xは11であり(フォーマットJB2)、pが2である場合、xは10であり(フォーマットH)、pが3である場合、xは9であり(フォーマットJB5)、pが4である場合、xは8であり(フォーマットJB3)、rは2である)を有する。いくつかの実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは、フォーマット(5)(式中、xは11であり(フォーマットJB1)、rは2である)を有する。さらなる実施形態では、siRNAパッセンジャーオリゴヌクレオチドは、フォーマット(6)(式中、pは3であり、yは9であり、zは1であり(フォーマットJB4)、rは2である)を有する。

【0070】

いくつかの実施形態では、化学合成した低分子干渉RNAは、ヌクレオチドループまたはリンカーループを介して共有結合したパッセンジャー(センス)オリゴヌクレオチドおよびガイド(アンチセンス)オリゴヌクレオチドを含み、これらが低分子ヘアピンオリゴヌクレオチドを形成する。

【0071】

いくつかの実施形態では、siRNAの各3'末端は、独立して、1つ、2つ、または3つのヌクレオチドオーバーハングを有し、いくつかの実施形態では、各3'末端は、各オーバーハングのヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドを含む2つのヌクレオチドオーバーハングを有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのオーバーハングヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、siRNAの各3'末端は2つのヌクレオチドオーバーハングを有し、1つ、2つ、3つ、または4つ全てのオーバーハングヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのヌクレオチド間結合は、ホスホジエステルヌクレオチド間結合以外である。

【0072】

化学合成：干渉RNAオリゴヌクレオチド合成を、標準的方法にしたがって行う。合成方法の制限されない例には、ジエステル法、トリエステル法、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ法、および固相化学を使用したin vitro化学合成が含まれる。これらの方法は、以下でさらに詳細に考察されている。

【0073】

ビスクロヌクレオチド構造(構造(a)が含まれる)を有するオリゴヌクレオチドを、例えば、Imanishi(米国特許第6,770,748および同第6,268,490号に記載);Wengel(米国特許第7,084,125号、同第7,060,809号、同第7,053,207号、同第7,034,133号、同第6,794,499号、および同第6,670,461号、ならびに米国特許出願公開2005/0287566号および同第2003/0224377号に記載);Kochkin(米国特許第6,734,291号および同第6,639,059号ならびに米国特許出願公開2003/0092905号に記載)、Kauppinen(米国特許出願公開2004/0219565号に記載)、およびSrivastava,P.,ら(J.Am.Chem.Soc.129,8362-8379,2007)にしたがって合成する。

【0074】

トリシクロヌクレオチド構造 (b) を有するオリゴヌクレオチドを、例えば、Ittig, D. ら (Nucleic Acids Res. 32: 1, 346-353, 2004) にしたがって合成する。ピシクロヌクレオチド構造 (c) を有するオリゴヌクレオチドを、例えば、Maier, M. A. ら (Nucleic Acids Res. 32: 12, 3642-3650, 2004) にしたがって合成する。FANA置換基を有するオリゴヌクレオチドを、Dowler ら (Nucleic Acids Res. 2006, 34: 6, p 1669-1675) にしたがって合成する。

【0075】

オリゴヌクレオチド合成のジエステル法は、最初にKhorana ら (Science, 203, 614, 1979) によって使用可能な状態にまで開発された。基本工程は、2つの適切に保護したヌクレオチドを結合させてホスホジエステル結合を含むジヌクレオチドを形成することである。ジエステル法は十分に確立されており、DNA分子を合成するために使用されている。

【0076】

ジエステル法とトリエステル法との間の主な相違は、反応物および生成物のリン酸分子上の後者の余剰な保護基中の存在である (Itakura ら, J. Biol. Chem., 250: 4592, 1975)。リン酸保護基は、通常クロロフェニル基であり、これがヌクレオチドおよびポリヌクレオチド中間体を有機溶媒に可溶にする。したがって、クロロホルム溶液中で精製する。本方法における他の改善点には、(i) 三量体およびより大きなオリゴマーのブロックカップリング、(ii) 中間体および最終生成物の両方のための高速液体クロマトグラフィの広範囲の使用、および (iii) 固相合成が含まれる。

【0077】

ポリペプチドの固相合成のために開発されたテクノロジーを利用して、最初のヌクレオチドを固相材料に付着させ、ヌクレオチドの段階的添加に進めることが可能であった。全ての混合および洗浄工程を単純化し、手順を自動化することが可能となる。これらの合成は、現在、自動核酸合成機を使用して日常的に行われている。

【0078】

ホスホルアミダイト化学 (Beaucage, S. L. and Iyer, R. P. Tetrahedron, 1993 (49) 6123; Tetrahedron, 1992 (48) 2223) は、オリゴヌクレオチド合成のための圧倒的に最も広範に使用されているカップリング化学となっている。当業者に周知のように、オリゴヌクレオチドのホスホルアミダイト合成は、活性化剤との反応によってヌクレオシドホスホルアミダイト単量体の前駆体を活性化して活性化中間体を形成させる工程、その後成長中のオリゴヌクレオチド鎖 (一般に、その一方の末端が適切な固体支持体に係留されている) に活性化中間体を連続的に添加して、オリゴヌクレオチド生成物を形成する工程を含む。

【0079】

siRNA を、逆相精製カートリッジ、イオン交換HPLC、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、塩化セシウム勾配遠心法、カラム、フィルター、核酸に結合する薬剤 (グラスファイバーなど) を含むカートリッジ、または当業者に公知の任意の他の手段によって精製することができる。一本鎖構造と二本鎖構造とを判断するためにゲル電気泳動を使用することができ、純度を決定するためにイオン交換HPLCを使用することができ、同一性を決定するためにMALDI-MSを使用することができ、siRNAを定量するためにUV分光法を使用することができる。

【0080】

内因性標的遺伝子を含む細胞は、任意の生物 (例えば、植物、動物、真菌などの真核生物、細菌などの原核生物) に由来し得るかこれらに含まれ得る。植物は単子葉植物、双子葉植物、または裸子植物であり得る。動物は脊椎動物または無脊椎動物であり得る。微生物を農業または産業で使用するができるか、植物または動物に病原性を示しても良い。真菌には、カビ形態および酵母形態の両方の生物が含まれる。脊椎動物の例には、魚類

10

20

30

40

50

および哺乳動物（ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ハムスター、マウス、ラット、およびヒトが含まれる）が含まれ、無脊椎動物には、線虫、昆虫、クモ類、および他の節足動物が含まれる。

【 0 0 8 1 】

標的遺伝子は、細胞、内因性遺伝子、導入遺伝子、または外因性遺伝子（病原体（例えば、その感染後に細胞中に存在するウイルス）の遺伝子など）に由来する遺伝子であり得る。標的遺伝子を有する細胞は、生殖系列細胞または体細胞、全能性細胞または多能性細胞、分裂細胞または非分裂細胞、実質細胞または上皮細胞、または不死化細胞または形質転換細胞などに由来し得る。細胞は配偶子または胚であり得、胚である場合、単細胞胚、構成細胞、または多細胞胚由来の細胞であり得る。したがって、用語「胚」は、胎児組織を含む。標的遺伝子を有する細胞は、未分化細胞（幹細胞など）、分化細胞（器官または組織（胎児組織が含まれる）の細胞由来など）、または生物中に存在する任意の他の細胞であり得る。分化細胞型には、脂肪細胞、線維芽細胞、筋細胞、心筋細胞、内皮、ニューロン、膠細胞、血球、巨核球、リンパ球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞、白血球、顆粒球、角化細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞、および内分泌性または外分泌腺の細胞が含まれる。

10

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態では、標的RNAは、転写RNA（コードRNAおよび非コードRNAが含まれる）である。

【 0 0 8 3 】

本明細書中で使用する場合、用語「細胞」、「細胞株」、および「細胞培養物」には、その子孫が含まれる。子孫は、細胞分裂によって形成される任意および全てのその後の世代である。人為的または偶然の変異を原因として全子孫が同一でなくてよいと理解される。宿主細胞を「トランスフェクション」または「形質転換」することができ、これらは、外因性核酸を宿主細胞に移入または導入する過程をいう。形質転換細胞には、初代対象細胞およびその子孫が含まれる。本明細書中で使用する場合、用語「操作された」および「組換え」細胞または宿主細胞は、外因性核酸配列（例えば、低分子干渉RNAまたはかかるRNAをコードするテンプレート構築物など）が導入された細胞をいうことが意図される。したがって、組換え細胞は、組換えによって導入された核酸を含まない天然に存在する細胞と識別可能である。

20

30

【 0 0 8 4 】

一定の実施形態では、RNAまたはタンパク性配列を同一宿主細胞中で他の選択されたRNAまたはタンパク性配列と同時発現させることができることが意図される。同時発現を、2つ以上の異なる組換えベクターでの宿主細胞の同時トランスフェクションによって行うことができる。あるいは、単一の組換えベクターを、RNAの複数の異なるコード領域を含むように構築し、次いで、単一ベクターでトランスフェクションした宿主細胞中で発現させることができる。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態では、内因性標的遺伝子を含む組織はヒト組織である。一定の実施形態では、組織は、血液（例えば、赤血球、白血球、血小板、血漿、血清、または全血）を含むが、これらに限定されない。一定の実施形態では、組織は固形組織を含む。一定の実施形態では、組織はウイルス、細菌、または真菌を含む。一定の実施形態では、組織は *ex vivo* 組織を含む。

40

【 0 0 8 6 】

組織は、核酸送達組成物もしくはさらなる薬剤で形質転換されるかこれらと接触させるべき宿主細胞を含むことができる。組織は、生物の一部であるか、生物から分離することができる。一定の実施形態では、組織およびその構成細胞は、血液（例えば、造血細胞（ヒト造血前駆細胞、ヒト造血幹細胞、CD34+細胞、CD4+細胞など）、リンパ球、および他の血液系統細胞）、骨髓、脳、幹細胞、血管、肝臓、胚、骨、乳房、軟骨、子宮頸部、結腸、角膜、胚、子宮内膜、内皮、上皮、食道、帯膜、線維芽細胞、濾胞、神経節

50

細胞、膠細胞、杯細胞、腎臓、リンパ節、筋肉、ニューロン、卵巣、膵臓、末梢血、前立腺、皮膚、皮膚、小腸、脾臓、胃、精巣を含むことができるが、これらに限定されない。

【0087】

いくつかの実施形態では、細胞内および細胞外のヌクレアーゼに対して安定な修飾フォーマットした *siRNA* を提供する。かかる *siRNA* は、体液の存在下で既知の安定化 *siRNA* よりも長期間全長で維持されることが本明細書中で証明された。ヌクレアーゼ安定化 *siRNA* は、特に高濃度のヌクレアーゼを含む体液および組織（例えば、血清、血漿、ならびに特に血管化された器官および組織が含まれる）で有用である。

【0088】

siRNA を、細胞ターゲティングリガンドと会合することができる。本明細書中で使用する場合、「細胞ターゲティングリガンド」は、細胞表面受容体などのターゲティングされた部位に特異性を有する細胞指向分子である。「ターゲティングされた部位に対する特異性」は、細胞ターゲティングリガンドの細胞との接触の際、イオン強度、温度、および pH などの生理学的条件下で特異的結合が起こることを意味する。細胞 - リガンド相互作用は、相互作用の促進に有効な条件下で安定な複合体を形成するためのリガンドの一定の残基の細胞の特定の残基との特異的な静電的相互作用、疎水性相互作用、または他の相互作用によって起こり得る。

【0089】

例示的な細胞ターゲティングリガンドには、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリアミド、細胞受容体に親和性を示すペプチド、抗体などのタンパク質、脂肪酸、ビタミン、フラボノイド、糖、抗原、受容体、レポーター分子、レポーター酵素、キレート剤、ポルフィリン、介入物、ステロイドおよびステロイド誘導体、ホルモン（プロゲステロン（例えば、プロゲステロン）、糖質コルチコイド（例えば、コルチゾール）、鉱質コルチコイド（例えば、アルドステロン）、アンドロゲン（例えば、テストステロン）、およびエストロゲン（例えば、エストラジオール）など）、ヒスタミン、ホルモン模倣物（モルヒネなど）、および大環状分子が含まれるが、これらに限定されない。細胞受容体に親和性を示すペプチドには、エンドルフィン、エンケファリン、成長因子（例えば、上皮成長因子）、ポリ-L-リジン、ホルモン、インスリン、リボヌクレアーゼ、血清アルブミン結合ペプチド、タンパク質のペプチド領域、および能動輸送または受動輸送のいずれかによって細胞膜を透過することができる他の分子が含まれ得る。

【0090】

実施形態にしたがって *RNAi* を行うのに適切な *siRNA* 送達方法には、*siRNA* をオルガネラ、細胞、組織、または生物に導入することができる、本明細書中に記載されているか当業者に公知の任意の方法が含まれる。かかる方法には、注入などによる *siRNA* の直接送達（微量注入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、DEAE-デキストランおよびその後のポリエチレングリコールの使用、直接超音波処理、リボソーム媒介トランスフェクション、微粒子銃、炭化ケイ素繊維との攪拌、アグロバクテリウム媒介形質転換形質転換、PEG媒介形質転換、および乾燥/阻害媒介取り込みが含まれる）などが含まれるが、これらに限定されない。これらなどの技術の使用にもかかわらず、オルガネラ、細胞、組織、または生物を、安定または一過性に形質転換することができる。血清安定化修飾フォーマットした *siRNA* が非修飾 *siRNA* と比較して400%のレベルにて *in vivo* で存在するという実施例8のデータによって証明されるように、ヌクレアーゼ消化に対して安定化された *siRNA*（その実施形態は本明細書中に提供されている）は、直接注入に特に適切である。

【0091】

siRNA を視覚化または検出するための技術には、顕微鏡法、アレイ、蛍光測定法、ライトサイクラーまたは他のリアルタイムPCR装置、FACS分析、シンチレーションカウンター、ホスホイメジャー、ガイガー計数管、MRI、CAT、抗体ベースの検出方法（ウェスタン、免疫蛍光、免疫組織化学）、組織化学的技術、HPLC、分光法、質量分析；放射線技術、キャピラリーゲル電気泳動、および物質収支（Mass Balance）

10

20

30

40

50

nce) 技術が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、核酸を、効率的に単離するために標識またはタグ化することができる。本発明の他の実施形態では、核酸をバイオチン化する。

【0092】

「標識」または「レポーター」は、その結合を検出することが可能な部分または性質をいう。標識を、共有結合または非共有結合することができる。標識の例には、蛍光標識（例えば、消光剤または吸収体が含まれる）、比色標識、化学発光標識、生物発光標識、放射性標識、質量改変基、抗体、抗原、バイオチン、ハプテン、酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼなどが含まれる）などが含まれる。蛍光標識には、負電荷の色素（フルオレセインファミリーの色素（例えば、FAM、HEX、TET、JOE、NAN、およびZOEが含まれる）など）、中性の色素（ローダミンファミリーの色素（例えば、テキサスレッド、ROX、R110、R6G、およびTAMRAが含まれる）など）、または正電荷の色素（シアニンファミリーの色素（例えば、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、およびCy7が含まれる）など）が含まれ得る。FAM、HEX、TET、JOE、NAN、ZOE、ROX、R110、R6G、およびTAMRAは、例えば、Perkin-Elmer, Inc. (Wellesley, MA) から入手可能であり、テキサスレッドは、例えば、Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) から入手可能であり、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、およびCy7は、例えば、Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ) から入手可能である。一定の実施形態では、蛍光剤分子は、フルオレセイン色素であり、消光剤分子はローダミン色素である。

【0093】

標識またはレポーターは、フルオロフォアおよび蛍光消光剤の両方を含むことができる。蛍光消光剤は、蛍光性蛍光消光剤（フルオロフォアTAMRAなど）または非蛍光性蛍光消光剤（NFQ）（例えば、組み合わせNFQ-マイナーグループバインダー（MGB）（Epoch Biosciences (Bothell, WA) から供給され、TaqMan（商標）プローブ（Applied Biosystems, Foster City, CA）と共に使用されるMGB ECLIPSE（商標）マイナーグループバインダーなど）であり得る。フルオロフォアは、核酸に結合することができる任意のフルオロフォア（例えば、上記で引用したFAM、HEX、TET、JOE、NAN、ZOE、テキサスレッド、ROX、R110、R6G、TAMRA、Cy2、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、およびCy7ならびにVIC、NED、LIZ、ALEXA、Cy9、およびdR6Gなど）であり得る。

【0094】

標識のさらなる例には、ブラックホール消光剤（BHQ）（Biosearch）、Iowa Black（IDT）、QSY消光剤（Molecular Probes）、およびダブルシルおよびダブルセルスルホナート/カルカルボキシラート消光剤（Epoch）が含まれる。標識は、フルオレセイン色素のスルホン酸誘導体、フルオレセインのホスホルアミダイト形態、CY5のホスホルアミダイト形態（例えば、Amershamから入手可能）、介入標識（臭化エチジウムなど）、SYBR（商標）Green I、およびPICO GREEN（商標）（Molecular Probes）も含むことができる。

【0095】

種々の実施形態では、当業者に公知の任意の方法によって蛍光を検出することができ、これらの方法は、定性的または定量的であり得る。定量的結果を、例えば、蛍光光度計を用いて得ることができる。いくつかの実施形態では、マイクロアレイおよび関連ソフトウェア（Applied Biosystems Array Systemなど）をApplied Biosystems 1700化学発光マイクロアレイ分析器および特に、Affymetrix、Agilent、Illumina、およびNimbleGenから入手可能な他の市販のアレイシステムと共に使用して検出することができる（Ge

rryら, J. Mol. Biol. 292:251-62, 1999; De Bellisら, Minerva Biotech 14:247-52, 2002; および Stearsら, Nat. Med. 9:140-45 (補遺を含む) 2003も参照のこと)。

【0096】

生物学的に許容可能なキャリアは、適切に保存し、必要に応じて、1つまたは複数の本実施形態の干渉RNAを均一な用量で送達させるキャリアをいう。キャリア型は、siRNAが、固体、液体、またはエアゾール形態のいずれで利用されるか、注射などの投与経路のために無菌である必要があるかどうかによって依存し得る。siRNA組成物を、遊離塩基形態、中性形態、または塩形態の組成物に処方することができる。siRNAの塩形態は、オフターゲット効果を減少させ、本明細書中に記載のsiRNAに匹敵するノックダウン活性を維持する性質を有する。塩形態の例には、有機酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。siRNA組成物を、細胞内で活性形態に代謝することができるプロドラッグ形態で提供することができ、かかるプロドラッグ形態には、S-アセチルチオエチル基またはS-ピバロイルチオエチル基などの保護基を含むことができる。

【0097】

組成物が液体形態である実施形態では、キャリアは、溶媒または分散媒（無RNAアーゼ水、緩衝液、生理食塩水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、脂質（例えば、トリグリセリド、植物油、リポソーム）、グリシン、許容可能な防腐剤（例えば、抗菌薬、抗真菌薬）、共溶媒、界面活性剤、浸透促進剤（例えば、クレモフォアおよびTWEEN（商標）80（ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.））、ヒアルロン酸、マンニトール、塩化ベンザルコニウム、増粘剤（例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、等張剤、吸収遅延剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、香味物質、色素、およびその組み合わせが含まれるが、これらに限定されない）であり得る。滅菌注射液を、種々の上記列挙の成分と共にsiRNAを適切な溶媒に組み込み、必要に応じて、その後ろに濾過滅菌することによって調製する。処方物は、生物学的に許容可能なキャリアと混合した本明細書中の実施形態の干渉RNAまたはその塩を99重量%まで含む。実施形態の干渉RNAを、溶液、懸濁液、または乳濁液として使用することができる。

【0098】

実施形態の干渉RNAの使用に許容可能なキャリアには、脂質ベースの試薬であるsiPORT（商標）NeoFX（商標）トランスフェクション剤（Ambion カタログ番号AM4510）、ポリアミンベースの試薬であるsiPORT（商標）アミントランスフェクション剤（Ambion カタログ番号AM4502）、カチオン性および中性の脂質ベースの試薬であるsiPORT（商標）脂質トランスフェクション剤（Ambion カタログ番号AM4504）、カチオン性脂質ベースのトランスフェクション試薬であるTransIT（登録商標）-TKO（Mirus Corporation, Madison, Wis.）、リポフェクチン（登録商標）、リポフェクタミン、オリゴフェクタミン（商標）（Invitrogen, Carlsbad, Calif.）、またはDharmafect（商標）（Dharmacon, Lafayette, Colo.）、さらにはポリカチオン（ポリエチレンジアミンなど）、カチオン性ペプチド（Tat、ポリアルギニン、またはペネトラチンなど）、またはリポソームが含まれる。リポソームを、標準的なビヒクル形成脂質およびステロール（コレステロールなど）から形成し、リポソームは、例えば、ターゲティング分子（細胞表面抗原に対する結合親和性を有するモノクローナル抗体など）を含むことができる。さらに、リポソームは、PEG化リポソームであり得る。

【0099】

干渉RNAを、溶液中、懸濁液中、または生体内分解性もしくは生体内非分解性送達デ

10

20

30

40

50

バイス中に送達させることができる。干渉RNAを、単独で送達させるか、ポリエチレングリコール部分、コレステロール部分、または受容体媒介エンドサイトーシスのための成長因子などとの定義された共有結合性抱合体の成分として送達させることができる。干渉RNAを、カチオン性脂質、カチオン性ペプチド、またはカチオン性ポリマーと複合体化するか、核酸結合性を有するタンパク質、融合タンパク質、またはタンパク質ドメイン（例えば、プロタミン）と複合体化するか、ナノ粒子またはリポソーム中にカプセル化することもできる。適切なターゲティング部分（抗体または抗体フラグメントなど）を含めることによって組織または細胞特異的送達を行うことができる。任意の従来のキャリアがsiRNAと不適合である場合を除き、組成物中でのその使用または生物キャリアとしてのその使用が本明細書中の実施形態によって意図される。

10

【0100】

本明細書中の実施形態の干渉RNAを、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病巣内、頭蓋内、関節内、脳室内、前立腺内、胸膜内、気管内、鼻腔内、硝子体内、腔内、子宮内、直腸内、局所、腫瘍内、髄腔内、筋肉内、皮下、結膜下、小胞内、粘膜、心膜内、臍帯内、眼内、経口、局所、局部、吸入（例えば、エアゾール吸入）、注射、注入、連続注入、局所灌流による標的細胞の直接浸漬、カテーテル、洗浄液、クリーム、液体組成物（例えば、リポソーム）、または当業者に公知の他の方法もしくは上記の任意の組み合わせ（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co. 1990）で投与することができる。

【0101】

20

ex vivoまたはin vivoでの使用のための投薬量は0.01 µg ~ 1 g / kg体重であり、1日、1週間、1ヶ月、または1年に1回または複数回投与することができる。一般に、本明細書中の実施形態の修飾ヌクレオチドおよび修飾フォーマットを有する干渉RNAの有効量は、効力を維持しながらオフターゲット事象を減少させるのに十分な量であり、それにより、標的細胞の表面上の細胞外濃度は100 pM ~ 1 µM、1 nM ~ 100 nM、または2 nM ~ 約25 nMまたは約10 nMになる。この局部濃度を達成するために必要な量は、多数の要因（送達方法、送達部位、送達部位と標的細胞または標的組織との間の細胞層数、送達が局部または全身のいずれであるかなどが含まれる）によって変化するであろう。送達部位での濃度は、標的細胞または標的組織の表面よりも大幅に高いかもしれない。処方物は、約pH 4 ~ 9またはpH 4.5 ~ pH 7.4である。

30

【0102】

いくつかの実施形態では、siRNAが内因性標的遺伝子発現レベルをノックダウンする能力を、以下のようにin vitroで評価する。細胞を、製造者によって説明された「逆」トランスフェクションプロトコルにしたがってsiPORT（商標）NeoFX（商標）トランスフェクション剤（Ambion / Applied Biosystems Austin, TX カタログ番号AM4510）を使用してトランスフェクションする。非修飾コントロールまたは修飾フォーマットしたsiRNAを、例えば、1 nMまたは5 nMのいずれかの最終濃度になるように96ウェル組織培養プレートにプレートする。siPORT（商標）NeoFX（商標）トランスフェクション剤をsiRNAと少なくとも10分間複合体化し、その後にsiRNA / トランスフェクション剤複合体上に新たにトリプシン処理した細胞（約 4.0×10^3 ）を重層する。プレートを、組織培養条件下にて37 °Cで48時間インキュベートする。

40

【0103】

トランスフェクションした細胞の回収後、製造者のプロトコルにしたがってMagMAX（商標）-96総RNA単離キット（Ambion, Inc. Austin TX カタログ番号AM1830）を使用して総RNAを単離する。RNAを50 µlの無ヌクレアーゼ水中に溶出する。製造者のプロトコルにしたがってHigh Capacity cDNA逆転写キット（Applied Biosystems, Inc., Foster City CA, カタログ番号4368814）を使用して、反応体積30 µlでcDNAを生成する。TaqMan（登録商標）遺伝子発現アッセイ（Applied

50

Biosystems, Inc., カタログ番号 4331182) を、総 PCR 反応体積 10 μ l で 2 μ l の cDNA を使用して行う。技術的複製物を生成し、各サンプルについての 18 S 値を計算する。増幅前の均一性を、以下の式：

$$ddCT = (siRNA \text{ 処置 } Ct_{GOI} - siRNA \text{ 処置 } Ct_{18S}) - (Neg \text{ コントロール } Ct_{GOI} - Neg \text{ コントロール } Ct_{18S})$$

(式中、

GOI = 目的の内因性遺伝子

18S = 18S リボゾーム RNA 正規化群

siRNA 処置 = siRNA で処置された生物サンプル

Neg コントロール = 任意の公知の標的 mRNA と相同でない siRNA で処置した生物サンプル)

10

を使用した ddCT の計算によってチェックする。

残存率を、以下の式を使用して計算した：

$$\text{残存率} = 100 \times 2^{-ddCT}$$

標的タンパク質レベルを、例えば、ウェスタンブロットによって、トランスフェクションから約 72 時間後に (実際の時間はタンパク質代謝回転率に依存する) 評価することができる。培養細胞からの RNA および / またはタンパク質の標準的な単離技術は、当業者に周知である。

【0104】

siRNA の視覚化または検出技術には、上記で引用した技術が含まれる。核酸を標識またはタグ化して、効率的に単離することが可能である。したがって、任意の所与の siRNA のサイレンシング能力を、多数の試験手順のうちの 1 つによって研究することができる。

20

【0105】

本明細書中で使用する場合、「キット」は、RNA 干渉におけるオフターゲット効果の減少のための少なくともいくつかの品目の組み合わせをいう。キットの実施形態は、例えば、本明細書中の実施形態の修飾フォーマットの修飾ヌクレオチドを有する少なくとも 1 つの siRNA を含む。少なくとも 1 つの siRNA はオーダーメイドであり得る。いくつかの実施形態では、キットは、修飾フォーマット H、Q、V-2、Y、Y+1、JB1、JB2、JB3、JB4、または JB5 のピンクロヌクレオチドを有する少なくとも 1

30

【0106】

キットの実施形態は、ヒト、マウス、およびラットの全ての細胞型においてハウスキーピング遺伝子をターゲティングする有効なポジティブコントロール siRNA をさらに含むことができる。キットの実施形態は、ターゲティングしない有効なネガティブコントロール siRNA をさらに含むことができる。siRNA コントロールを予めプレートし、検出可能なマーカーで標識することができる。

【0107】

キットの実施形態は、免疫蛍光またはウェスタン分析によってタンパク質レベルでノックダウンをモニタリングするための抗体などの意図する標的遺伝子のノックダウンを評価するための試薬、レポータータンパク質の酵素活性または存在を評価するための試薬、または細胞生存率の評価のための試薬をさらに含むことができる。標的 mRNA またはレポーター mRNA の検出のために RT-PCR のプライマーおよびプローブを含めることができる。キットの実施形態は、RNAアーゼインヒビターをさらに含むことができる。

40

【0108】

キットの容器手段には、一般に、成分を配置することができ、いくつかの実施形態では、適切に等分することができる少なくとも 1 つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または他のパッケージング手段が含まれるであろう。1 つを超える成分をキットに含める (成分を共にパッケージングすることができる) 場合、キットはまた、一般に

50

、さらなる成分を個別に配置することができる少なくとも1つの第2、第3、または他のさらなる容器を含むであろう。しかし、成分の種々の組み合わせを、容器手段にパッケージングすることができる。本教示のキットはまた、典型的には、本明細書中に記載の修飾フォーマットの修飾ヌクレオチドを有する *s i R N A* を含めるための手段および市販するために厳重に封じ込める任意の他の試薬容器を含むであろう。かかる容器は、所望の容器手段を保持する射出成形または吹き込み成形されたプラスチック容器を含むことができる。キットの成分を1つおよび/またはそれを超える液体で提供する場合、液体は滅菌水溶液であり得る水溶液を含む。

【0109】

一定の実施形態では、少なくとも1つのキット成分は、凍結乾燥され、乾燥粉末として提供される。試薬および/または成分を乾燥粉末として提供する場合、粉末を、適切な溶媒の添加によって再構成することができる。一定の実施形態では、溶媒を別の容器手段で提供する。キットは、無菌の生物学的に許容可能な緩衝液および/または他の希釈剤を含めるためのさらなる容器手段も含むことができる。

【0110】

キットは、キット成分およびキット中に含まれない任意の他の試薬の使用説明書も含むことができる。説明書は、実行可能に変化し得る。

【0111】

本発明の方法およびキット実施形態を、高容量スクリーニングのために使用することができる。*s i R N A* または候補 *s i R N A* のいずれかのライブラリーを、本明細書中の実施形態を使用して構築することができる。次いで、このライブラリーを高処理アッセイ（マイクロアレイが含まれる）でを使用することができる。多数の遺伝子を迅速且つ正確に分析するための定量法を含むチップベースの核酸テクノロジーが特に意図される。固定プローブアレイの使用により、チップテクノロジーを使用して高密度アレイとして標的分子を分離し、ハイブリッド形成に基づいてこれらの分子をスクリーニングすることができる。本明細書中で使用する場合、用語「アレイ」は、核酸の組織的な配列をいう。例えば、所望の供給源（例えば、成人ヒトの脳）を代表する核酸集団を、最小数のプールに分割し、プール中で所望のスクリーニング手順を使用して標的遺伝子を検出または枯渇させ、1つのマルチウェルプレートに分配することができる。アレイは、以下を含む所望の *m R N A* 供給源から得ることができる核酸集団の水性懸濁液のアレイであり得る：複数の個別のウェルを含むマルチウェルプレート（各ウェルは核酸集団の異なる内容物の水性懸濁液を含む）。アレイ、その使用、およびその実行の例を、米国特許第6,329,209号、同第6,329,140号、同第6,324,479号、同第6,322,971号、同第6,316,193号、同第6,309,823号、同第5,412,087号、同第5,445,934号、および同第5,744,305号（本明細書中で参考として援用される）で見出すことができる。

【0112】

マイクロアレイは当該分野で公知であり、遺伝子産物（例えば、*c D N A*、*m R N A*、*c R N A*、ポリペプチド、およびそのフラグメント）に順に対応するプローブが公知の位置で特異的にハイブリッド形成または結合することができる表面からなる。1つの実施形態では、マイクロアレイは、各位置が遺伝子によってコードされる産物（例えば、タンパク質または *R N A*）の個別の結合部位を示し、生物ゲノム中の大部分またはほとんど全ての遺伝子産物の結合部位が存在するアレイ（すなわち、マトリックス）である。好ましい実施形態では、「結合部位」は、特定の同族 *c D N A* が特異的にハイブリッド形成することができる核酸または核酸アナログである。核酸または結合部位のアナログは、例えば、合成オリゴマー、全長 *c D N A*、全長未満の *c D N A*、または遺伝子フラグメントであり得る。

【0113】

固体支持体を、ガラス、プラスチック（例えば、ポリプロピレン、ナイロン）、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、または他の材料から作製することができる。核酸を表

10

20

30

40

50

面に結合する方法の例には、ガラスプレート上のプリントまたはマスキングが含まれる。原則として、任意のアレイ型（例えば、ナイロンハイブリッド形成メンブレン上のドットプロット）を使用することができるが、当業者に認識されるように、ハイブリッド形成体積がより小さいので、非常に小さいアレイが好ましいであろう。

【0114】

本教示の実施形態を、以下の実施例を考慮してさらに理解することができるが、実施例が本教示の範囲を制限すると決して解釈されるべきではない。

【実施例】

【0115】

（実施例1）s i R N A 修飾フォーマット

低分子干渉RNA（s i R N A）を、標準的なホスホルアミダイトベースのヌクレオシド単量体および確立された固相オリゴマー形成サイクルを使用して、Beaucage, S. L. and Iyer, R. P. (Tetrahedron, 1993 (49) 6123; Tetrahedron, 1992 (48) 2223) にしたがって化学合成した。BioAutomation MerMade 192 合成機 (BioAutomation Corp, Plano, TX) によってオリゴヌクレオチドを合成した。アクチベーターの8つの等価物をLNA（登録商標）ホスホルアミダイトの全ての等価物について使用して、付加塩基あたり98%超の収率の満足な段階的カップリングを行った。各s i R N A 鎖の精製を、使い捨ての逆相精製カートリッジまたはイオン交換HPLCのいずれかを使用して行った。アニーリングしたサンプルの一本鎖構造と二本鎖構造とを判断するためにゲル電気泳動を使用し、一本鎖の純度を決定するためにイオン交換HPLCを使用し、一本鎖の同一性を決定するためにMALDI-MSを使用し、一本鎖オリゴヌクレオチドおよびs i R N A の両方の定量のためにUV分光法を使用した。各s i R N A のガイド鎖およびパッセンジャー鎖は共に21ヌクレオチド長であり、両3'末端上の2つの塩基オーバーハングを使用して全s i R N A をデザインした。各ガイド（アンチセンス）鎖の1位を、「Aヌクレオチド」または「Uヌクレオチド」のいずれかであるようにデザインした。シチジン（C）ヌクレオシドをピシクロ-糖として修飾する場合、置換核酸塩基は、5-メチル化シチジン残基であった。ウリジン（U）ヌクレオシドをピシクロ-糖として修飾した場合、置換核酸塩基はチミン（T）残基であった。オーバーハングヌクレオチドは、図1A～図1Kに示すように、（独立して）：デオキシヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはリボヌクレオチドである。フォーマット「O」の場合、ガイド鎖を化学的にリン酸化した。全ての他の3'末端および5'末端を、ヒドロキシル基を含むように合成した。

【0116】

s i R N A 分子に導入された修飾ヌクレオチドには、ロックド核酸（LNA（登録商標）残基）（特に、上記構造（a）（式中、R1はOであり、R2はOであり、R3はCH₂である）を有するもの）；2'-O-メチルヌクレオチド誘導体；および2'-5'結合ヌクレオチドが含まれる。LNA（登録商標）アミダイトをProligo (Boulder, CO) およびExiqon A/S (Vedbaek, Denmark) から購入し、2'-O-メチルヌクレオチド誘導体ならびに3'-および2'-TBDMRS R N A アミダイトを、Chemgenes Corporation (Wilmington, MA) から購入した。

【0117】

s i R N A に導入された修飾フォーマットには、図1A（非修飾コントロールであるフォーマットAに加えてフォーマットE、F、G、H、J、K、およびO）、図1B（フォーマットM、H（反復）、H（-1）、H（-2）、H（+1）、およびQ）、図1C（フォーマットM（反復）、H（反復）V、V（-1）、V（-2）、V（+1）、図1D（フォーマットW、W+1、W-1、Y、Y-1、およびY+1）、図1E（フォーマットJB1、JB2、JB3、JB4、およびJB5）に記載の修飾フォーマット、ならびに実施例7にさらに記載されている図1F～図1Kに記載の修飾フォーマットが含まれて

いた。

【 0 1 1 8 】

修飾フォーマットには、パッセンジャー（センス）鎖のみ（フォーマット E、H、K、M、H - 1、H - 2、H + 1、Q、V、V - 1、V - 2、V + 1、W、W + 1、W - 1、Y、Y - 1、Y + 1、JB 1、JB 2、JB 3、JB 4、JB 5、DH 3、DH 3 0、および DH 2 8（DH フォーマットについては実施例 7 を参照のこと））またはガイド（アンチセンス）鎖およびパッセンジャー（センス）鎖の両方（フォーマット F、G、J、O、および DH 3、DH 3 0、および DH 2 8 以外の全ての DH フォーマット（DH フォーマットについては実施例 7 を参照のこと））に対する修飾を含んでいた。図 1 A ~ 図 1 E の修飾フォーマットを、以下にさらに記載する。

10

【 0 1 1 9 】

【 数 1 】

フォーマット修飾位置(各鎖の5'末端からの付番)

	パッセンジャー配列	ガイド配列
A, コントロール	なし	なし
E	1, 20, 21	なし
F	1, 20, 21	20, 21
G	1, 2, 13, 14	9, 10, 19, 20
H	1, 2, 13, 14	なし
J	1, 2, 10, 14	11, 12, 19, 20
K	1, 2, 10, 14	なし
O	1, 2	2+5' リン酸
M	1, 2	なし
H(-1)	1, 2, 12, 13	なし
H(-2)	1, 2, 11, 12	なし
H(+1)	1, 2, 14, 15	なし
Q	13, 14	なし
V	1, 2, 12, 14	なし
V(-1)	1, 2, 11, 13	なし
V(-2)	1, 2, 10, 12	なし
V(+1)	1, 2, 13, 15	なし
W	2, 3, 13, 14	なし
W+1	2, 3, 14, 15	なし
W-1	2, 3, 12, 13	なし
Y	1, 3, 13, 14	なし
Y-1	1, 3, 12, 13	なし
Y+1	1, 3, 14, 15	なし
JB1	1, 2, 14	なし
JB2	1, 13, 14	なし
JB3	1, 2, 3, 4, 13, 14	なし
JB4	1, 2, 3, 13, 15	なし
JB5	1, 2, 3, 13, 14	なし

20

30

フォーマット F は、Mookら (Molecular Cancer Therapeutics March, 2007 6: 3, 833 - 843) によって以前に報告されている。フォーマット E および F は、Elmenら (Nucleic Acids Research January 14, 2005. 33: 1, 439 - 447) によって以前に報告されている。フォーマット O は、Jacksonら (RNA May 8, 2006 12: 711 97 - 1205) によって記載されている。

40

【 0 1 2 0 】

(実施例 2) s i R N A サイレンシング効果のアッセイ方法

外因的に得られた遺伝子についての所与の s i R N A のガイド（アンチセンス）鎖およびパッセンジャー（センス）鎖によって媒介される切断活性を、以下のようにアッセイした。目的の遺伝子（GOI）由来の c D N A フラグメントを、D N A リガーゼおよび標準的なクローニング技術を使用した遺伝子の D N A のコード鎖の方向に対して順方向または

50

逆方向のいずれかで pMIR-REPORT (商標) miRNA 発現レポーターベクターシステム (Ambion / Applied Biosystems, Austin TX カタログ番号 AM5795) にクローニングした。以下の GOI についての全長 cDNA クローンを Open Biosystems (Huntsville, AL) から購入した。

【0121】

【数2】

遺伝子ID	記号	説明
983	CDC2	細胞分裂周期2
1017	CDK2	サイクリン依存性キナーゼ2
701	BUB1B	ベンズイミダゾール1ホモログβによって阻害されないBUB1出芽
2222	FDFT1	ファルネシルニリン酸ファルネシルトランスフェラーゼ1
3156	HMGCR	3-ヒドロキシ-2メチルグルタリル-補酵素Aレダクターゼ
7456	WEE1	WEE1 ホモログ (<i>S. pombe</i>)
5347	PLK1	ポロ様キナーゼ1
1213	CLTC	クラスリン重鎖(Hc)
836	CASP3	カスパーゼ3(アポトーシス関連システインペプチダーゼ)
595	CCND1	サイクリンD1
1595	CYP51A1	シトクロムP450、ファミリー51、サブファミリーA、ポリペプチド1

10

GOI のコード配列のサイズは、1.2 kb から 6 kb 長超までの範囲であった。各 GOI 由来の cDNA フラグメントを、図 2 A に示す哺乳動物プロモーター/ターミネーター系の調節下でホタルルシフェラーゼレポータータンパク質を含む pMIR-REPORT (商標) miRNA 発現レポーターベクターの HindIII (ヌクレオチド 463 位) / SpeI (ヌクレオチド 525 位) マルチクローニング部位に個別にサブクローニングした。標準的な PCR ベースの技術を使用して、HindIII および SpeI 制限エンドヌクレアーゼ部位を操作した。図 3 A および図 3 B に示す fLuc mRNA に対して順方向および逆方法のいずれかで GOI の mRNA に融合したルシフェラーゼ mRNA を含む mRNA 転写物を発現するレポーターベクターを生成した。fLuc-GOI 融合 mRNA を、fLuc コード配列の 5' 開始部位の最も近くに存在する CMV プロモーターの調節下で発現する。レポーター構築物を fLuc または cDNA GOI に相補的な siRNA と細胞に同時トランスフェクションする場合、RNA 干渉の結果としてのノックダウンを、残存ルシフェラーゼタンパク質または残存 fLuc-GOI 融合 mRNA のいずれかの測定によってモニタリングする。各 GOI の各方向由来の全てのサブクローニングしたフラグメントの 5' および 3' 末端の 500 ヌクレオチドをヌクレオチド配列分析に供してベクター内に含まれる cDNA の同一性および方向を検証した。したがって、これらのベクターは、ガイド鎖 (順方向クローン) またはパッセンジャー鎖 (逆方向クローン) のいずれかによって媒介される siRNA 切断のモニタリングのための代替物の供給源としての機能を果たした。

20

30

【0122】

図 2 B に示す pMIR-REPORT (商標) - ガラクトシダーゼレポーターコントロールベクター (Ambion / Applied Biosystems, Austin TX カタログ番号 # AM5795) を、トランスフェクション効率の正規化のための製造者のプロトコールにしたがって使用した。- gal コード配列を、CMV プロモーターの調節下で発現させる。fLuc レポーターから得たシグナルを、各 - gal レポーター遺伝子から得たシグナルで割って各アッセイについての正規化ルシフェラーゼ活性を計算する。

40

【0123】

トランスフェクション: HeLa 細胞 (ATCC 番号 CCL-2, Manassas, VA) を、ウェルあたり約 8.0×10^3 細胞の密度で 96 ウェル組織培養プレートにプレートした。24 時間後、siPORT (商標) アミントランスフェクション剤 (Amb

50

ion / Applied Biosystems Austin, TX カタログ番号 AM4502) を最終濃度が 30 nM の調査対象の siRNA, 40 ng の pMIR-REPORT (商標) ルシフェラーゼ-GOI プラスミド、および 4 ng の pMIR-REPORT (商標) トランスフェクションコントロールプラスミドと共に標準的なトランスフェクションプロトコルを使用して細胞をトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に細胞を完全培地で洗浄し、トランスフェクションから 48 時間後に分析のために回収した。3 つの生物学的複製物を、各プラスミドの調査対象の各 siRNA について試験した。並行して、Silencer (登録商標) ネガティブコントロール siRNA (Ambion / Applied Biosystems, Austin TX カタログ番号 AM4636) を、同一の実験条件下でトランスフェクションして、試験 siRNA 由来のパスセンジャー鎖およびガイド鎖による mRNA ノックダウン率の計算のための非ターゲティング siRNA を使用した基本発現レベルを測定した。

10

【0124】

Dual-Light (登録商標) 組み合わせレポーター遺伝子アッセイ系: Applied Biosystems Dual-Light (登録商標) 組み合わせレポーター遺伝子アッセイシステム (Applied Biosystems, Foster City CA カタログ番号 T1003) を使用して、製造者が推奨するプロトコルにしたがって、同一サンプル中のルシフェラーゼおよび -gal を同時に検出した。BMG LABTECH POLARstar Optima reader (BMG LABTECH, Durham, NC) を使用して発光を読み取った。

20

【0125】

Dual-Light (登録商標) アッセイシステムへのルシフェリン基質添加の 2 ~ 5 秒後にルシフェラーゼアッセイを行った。プレートを少なくとも 45 分間静置後、-ガラクトシダーゼの検出および測定のための基質を添加した。適切な -gal 読み取りを使用して各ウェルを正規化して、ルシフェラーゼシグナル / -gal シグナル比を得た。次いで、ルシフェラーゼ発現のノックダウンまたは残存率を、ネガティブコントロール siRNA トランスフェクションした細胞に対する生物サンプルの正規化によって計算した。

【0126】

(実施例 3) siRNA 修飾フォーマットのサイレンシング効果を鎖スイッチングすることができる

30

本研究のために、3 つの外因的に得た各標的 mRNA のために 2 つの siRNA を非修飾フォーマット A および 8 つの異なる各試験修飾フォーマット (E、F、G、H、J、K、M、および O) で合成した。したがって、各試験フォーマットにより、6 つの siRNA のデータが得られる。図 4 A ~ 図 4 E のデータについて、図 1 A および図 1 B を参照してフォーマットの文字によって示した位置の修飾ヌクレオチド「m」は、上記構造 (a) (式中、R1 は O であり、R2 は O であり、R3 は CH₂ である) を有する LNA (登録商標) 残基であった。図 4 A に例示した本研究のために選択した siRNA を、両鎖の一部に対して鎖サイレンシング活性を有すると実験的に判断した。かかる集団により、ストランドバイアス (すなわち、一方の鎖のサイレンシング活性を損なう一方で他方の鎖の活性を保持する能力) を導入するための修飾を有する影響の分析が可能になった。この siRNA 集団について、非修飾ガイド鎖によって媒介されたルシフェラーゼ-GOI mRNA の、平均して約 70 % ノックダウンが証明され、非修飾パスセンジャー鎖によって媒介されたルシフェラーゼ-GOI mRNA の、平均して約 58 % ノックダウンが証明された (図 4 A、フォーマット A)。

40

【0127】

非修飾フォーマット A および各試験修飾フォーマット (E、F、G、H、J、K、M、および O) についての RNAi 研究実施後の正規化したレポータータンパク質の存在量を図 4 A にプロットする。データが順方向の GOI を有するクローンに起因するので、暗色のバーはガイド鎖によるサイレンシングに起因する活性の残存率を示す。データが逆方向

50

のGOIを有するクローンに起因するので、図4Aの明色のバーはパッセンジャー鎖のサイレンシングに起因する活性の残存率を示す。スクランブルした（ナンセンス）siRNAと並行したトランスフェクションによって正規化し、そのトランスフェクションにより、両鎖に少量のロックダウンが得られる。このシグナルの減少（約20%）により、全ての正規化した結果についてレポータータンパク質が見かけ上増加する。これは、正規化がナンセンスsiRNAの負の値に基づくからである。この見かけ上の増加は、修飾標識E、F、G、H、J、K、M、およびOのパッセンジャー鎖データで最も顕著である。このモデルレポーター系は、パッセンジャー鎖およびガイド鎖の活性の変化の検出で有用である。

【0128】

10

図4Aのデータは、修飾フォーマットE、F、H、K、M、およびOを有するsiRNAのガイド（アンチセンス）鎖がコントロールフォーマットAガイド鎖と同一のサイレンシング活性を本質的に達成したことを証明している。修飾フォーマットGおよびJの存在下で、siRNAのガイド鎖がその標的をサイレンシングする能力が低下し、フォーマットJの場合、siRNAのガイド鎖がその標的をサイレンシングする能力が平均して20%ロックダウン活性未満に低下した。

【0129】

図4Aに示した修飾フォーマットの大部分によって非修飾コントロールガイド鎖と類似のガイド（アンチセンス）鎖媒介切断が得られる一方で、全ての試験修飾フォーマットは、パッセンジャー鎖がその標的をサイレンシングする能力を激しく妨害され、本質的にパッセンジャー鎖が干渉活性に不活性にされる。

20

【0130】

鎖活性に及ぼす修飾フォーマットの影響をさらに試験するために、鎖数アッセイのために使用されるsiRNA組を、さらなる18siRNAを含めるために拡大した。図4B～図4Eのデータは、箱ひげプロットとも呼ばれるボックスプロットフォーマットでのより大きなsiRNA集団のアッセイ結果を示す。各プロットについて、暗色の横線は各修飾フォーマットについてのデータセットの中央値を示す。ボックスは各修飾フォーマットのデータセットの下位四分位点および上位四分位点でのデータの分布を示す一方で、点線（髭）は各修飾フォーマットのデータセットの最小値および最大値を示す。円は各修飾フォーマットのデータセットで起こり得る外れ値を示す。

30

【0131】

このより大きなsiRNA組のsiRNAのHeLa細胞におけるトランスフェクション後のパッセンジャー鎖の活性を図4Bに示す。以下の式を使用して活性を計算する： P （パッセンジャー鎖活性）＝（試験siRNA - gal活性で処理した逆方向クローン由来のfLUC残存）／（NegコントロールsiRNA - gal活性で処理した逆方向クローン由来のfLUC残存）。図4Bのデータは、フォーマットAと比較した場合のパッセンジャー鎖ロックダウン活性の中央値の上方へのシフトによって認められる修飾siRNAフォーマットのパッセンジャー鎖の活性の喪失を証明している。修飾フォーマットG、H、J、K、M、およびOのデータは統計的に有意であるので（ $p < 0.05$ ）、修飾フォーマットがパッセンジャー鎖活性の減少に有効であることが証明された。

40

【0132】

図4Bのために分析したsiRNA組のHeLa細胞におけるトランスフェクション後のガイド鎖の活性を図4Cに示す。以下の式を使用して活性を計算する： G （ガイド鎖活性）＝（試験siRNA - gal活性で処理した順方向クローン由来のfLUC残存）／（NegコントロールsiRNA / - gal活性で処理した順方向クローン由来のfLUC残存）。フォーマットE、F、H、M、およびOは、ガイド鎖の活性に負の影響を及ぼさなかった（すなわち、「害さない」）。フォーマットEは、非修飾フォーマットAと比較してガイド鎖活性の中央値の下方のシフトによって示される統計的に有意な様式でガイド鎖がルシフェラーゼシグナルを減少させる能力を増加させるようである。フォーマットAの非修飾siRNAと比較してこれらのフォーマットについての中央値の上方へ

50

のシフト ($p < 0.05$) によって証明されるように、修飾フォーマット G、J、および K はガイド鎖活性を減少させた。

【0133】

図 4 D のデータは、以下の式を使用して図 4 B および図 4 C のパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の f L U C 活性の相違を示す：活性の相違 = $P - G$ (上記の P および G の定義を使用)。f L U C レポーターアッセイは細胞における s i R N A トランスフェクション後のフルシフェラーゼ活性量を測定するので、活性な s i R N A 鎖の活性が高いほどより多数の各 f L U C レポーター m R N A をロックダウンし、それにより、ルシフェラーゼ活性の相対量が減少する。したがって、パッセンジャー鎖の活性がガイド鎖より低い場合、この活性相違の計算値は 0 を超えるであろう。パッセンジャー鎖の活性がガイド鎖より高い場合、値は 0 未満であろう。修飾フォーマット J により、2 つの試験 s i R N A 鎖間の活性の相違が減少した。

10

【0134】

図 4 E のデータは、図 4 B および図 4 C の s i R N A のパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率を示す。活性の変化倍率を、上記の P および G の定義を使用して $\log_2(P) - \log_2(G)$ として計算した。値 0 は、各鎖が等しいサイレンシング能力を有する s i R N A を示す。活性の変化倍率が高いほど、s i R N A のガイド鎖の偏りが大きい。図 4 E のボックスプロットの比較により、パッセンジャー鎖とガイド鎖との間のストランドバイアスが、コントロール非修飾 s i R N A フォーマット A と比較して、修飾フォーマット E、H、M、および O について有意に増強される ($p < 0.05$) ことが証明される。したがって、修飾フォーマット E、H、M、および O を有する s i R N A は、非修飾フォーマット A と比較して鎖数が増加した。フォーマット G、J、および K は、パッセンジャー鎖とガイド鎖との間の相違倍率がより低いが、フォーマット J のみはフォーマット A と比較して活性の変化倍率が有意に減少した。もっとも高い各ストランドバイアスは、フォーマット H によって証明された。

20

【0135】

修飾フォーマットが各修飾フォーマットについてパッセンジャー鎖からガイド鎖へおよびガイド鎖からパッセンジャー鎖への修飾フォーマットの鎖スイッチング (S W) によって極めて強力な s i R N A 鎖のサイレンシング活性に影響を及ぼす能力を試験するための研究を行った。すなわち、図 5 A の修飾フォーマット F_{S W} について、例えば、パッセンジャー (センス) 鎖の 1 位、20 位、および 21 位でのフォーマット F の修飾 (図 1 A) をガイド (アンチセンス) 鎖に導入し、ガイド (アンチセンス) 鎖の 20 位および 21 位でのフォーマット F の修飾 (図 1 A) をパッセンジャー (センス) 鎖に導入した。

30

【0136】

図 5 A のデータは、RNAi 研究の実施後の正規化したレポータータンパク質の存在量を、非修飾 s i R N A フォーマット A を有する 12 の s i R N A および図 4 A と比較してスイッチングされた鎖の修飾を有する同一の 12 の s i R N A についてプロットする鎖アッセイの結果を示す。非フォーマット化フォーマット A s i R N A のガイド鎖とパッセンジャー鎖との間の f L U C シグナルの残存率の大きな相違によって証明されるように、図 5 A のデータについての s i R N A がストランドバイアスを有するという点で、図 5 A のデータについて研究した s i R N A 組は、図 4 A のデータについて研究した組と異なる。この「鎖スイッチング」アッセイでロックダウンを測定するために使用された実験条件は、図 4 A のデータを作成するために使用された実験条件と同一であった。

40

【0137】

図 5 A のデータによって示されるように、ガイド鎖のサイレンシング活性は、鎖スイッチングされた修飾によって劇的に減少した。平均して、鎖スイッチングされた修飾フォーマットを有するガイド鎖は、20% 未満ロックダウンされた。鎖スイッチングされた修飾フォーマット H_{S W} は、この s i R N A 集団のガイド (アンチセンス) 鎖を不活化するための最も強力な修飾フォーマットの 1 つであった。

【0138】

50

鎖スイッチングされた修飾フォーマットを有する試験パッセンジャー鎖によって種々の結果が得られた。しかし、鎖スイッチングされた修飾フォーマットを有する全ての試験パッセンジャー鎖は、図5AにおいてフォーマットAの非修飾 *siRNA* よりもロックダウンに有効であった。理論に拘束されることを望まないが、鎖スイッチングされた修飾フォーマットでのパッセンジャー鎖によって達成されるロックダウンの増強によって示唆されるように、ガイド鎖効力の妨害の結果として、パッセンジャー鎖の効力を間接的または二次的に増強することが可能である。

【0139】

図5Bは、フォーマットが図4Dに関して上に記載されているボックスプロットフォーマットでの図5Aのデータを示す。したがって、パッセンジャー鎖の活性がガイド鎖の活性より低い場合、相違は0を超えると予想され、この相違は修飾フォーマットAによって証明され、この *siRNA* 集団についての活性相違の中央値は約0.65である。鎖スイッチングされた修飾フォーマットは0未満の活性相違を有し、これは、フォーマット H_{SW} 、 M_{SW} 、 F_{SW} 、 E_{SW} 、および O_{SW} が非修飾フォーマットAと比較してガイド鎖よりもむしろパッセンジャー鎖を好むように鎖数をスイッチングさせたことを示す。もっとも高い鎖数の増強は鎖スイッチングされた修飾フォーマット M_{SW} について認められ、活性相違の中央値は約 - 0.5 である。

【0140】

図5Bの *siRNA* についてのパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率 ($\log_2(P) - \log_2(G)$) を、図5C中の各修飾フォーマットについて示す。これらの結果は、ガイド鎖にロックダウン活性を付与し、且つパッセンジャー鎖を本質的に不活性化する修飾フォーマットが、鎖スイッチングした場合に、ガイド鎖のロックダウン活性を減少させ、且つパッセンジャー鎖のロックダウン活性を増加させることができることを示す。

【0141】

図4Aおよび図4Dに類似の研究 (LNA (登録商標) 修飾ヌクレオチドを使用) を、修飾ヌクレオチドが 2' - Oメチル化された種々の修飾フォーマットを使用して行った。本研究のために、3つの各標的 *mRNA* について2つの *siRNA* を非修飾フォーマットAおよび各試験フォーマットで合成した。したがって、各試験フォーマットから6つの *siRNA* のデータが得られる。図4Aの研究に関して、本研究のために選択した特定の *siRNA* 配列は、非修飾フォーマットA *siRNA* の両鎖がサイレンシングを示した *siRNA* 配列である。非修飾 *siRNA* のガイド (アンチセンス) 鎖は、平均して70%まで標的 *mRNA* を減少させる一方で、パッセンジャー (センス) 鎖は55%まで標的 *mRNA* を減少させた。

【0142】

パッセンジャー (センス) 鎖活性に関して、図6Aのデータは、本質的に全ての *mRNA* A産物が培養下での *siRNA* とのインキュベーションの48時間後のルシフェラーゼアッセイに利用可能であることを証明する。すなわち、これらのサンプルにおける遺伝子発現の残存率の増加によって示されるように、修飾ヌクレオチドが 2' - Oメチル化された修飾フォーマットを有する試験 *siRNA* により、パッセンジャー (センス) 鎖の効力の有意な喪失が証明される。ロックダウンに対するこのパッセンジャー鎖の不活性は、LNA (登録商標) 修飾ヌクレオチドを使用した修飾フォーマットのデータと一致する。LNA (登録商標) 修飾フォーマットH、K、およびOのデータとも一致して、2' - O - メチルヌクレオチドを有する修飾フォーマットH、K、およびOを有するガイド鎖の効力は、非修飾コントロールフォーマットAと比較して本質的に不変であった。したがって、2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを有する修飾フォーマットは、ガイド (アンチセンス) 鎖活性の維持に有効なようである一方で、標的を外因的に得たこれらの鎖アッセイにおいてパッセンジャー (センス) 鎖の切断活性を無効にする。

【0143】

図6Bは、ボックスプロットフォーマットでの図6Aのために研究した *siRNA* (6

10

20

30

40

50

つの s i R N A) およびさらなる 18 の s i R N A 配列のデータを示す。フォーマット A 群の活性の相違は、大部分の s i R N A がガイド鎖に偏る (約 0.5 の中央値で示す) ことを示す。しかし、示した修飾フォーマットで 2' O M e を使用して生成した s i R N A は、コントロールフォーマット A と比較した場合にパッセンジャー鎖とガイド鎖との間でより大きな相違が証明された。フォーマット H および H + 1 により、鎖間に最も大きな相違が誘導された。2' - O M e 修飾塩基を有するフォーマット O は、鎖間の活性の相違を増大させることができなかった。

【 0 1 4 4 】

上述のように計算したガイド鎖と比較したパッセンジャー鎖の活性の変化倍率を図 6 C に示す。変化倍率分析は、フォーマット H によってフォーマット A の非修飾 s i R N A と比較して最も大きな変化倍率が得られることを示した。しかし、図 6 C の説明で引用されたウィルコクソン値によって判断したところ、鎖間の活性の有意な変化倍率は、フォーマット H - 1、H、H + 1、V - 2、および K によっても認められたが、フォーマット O によって認められなかった。

【 0 1 4 5 】

第 3 の修飾ヌクレオチド型を、種々の修飾フォーマットで研究した。図 7 A は、修飾フォーマットの修飾ヌクレオチドが 2' , 5' 結合ヌクレオチドであった鎖アッセイの結果を示す。順方向および逆方向でクローン化した G O I の p M I R - R E P O R T (商標) 研究由来の f l u c シグナルの活性の相違 (それにより、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖の有効性およびロックダウン活性の相違を示す) を、非修飾フォーマット A および試験フォーマット H - 1、H、H + 1、V - 2、K、および O についてプロットする。非修飾コントロールフォーマット A の鎖数の結果と 2' , 5' 結合塩基を含む試験フォーマットの結果との比較は、s i R N A の鎖数の統計的に有意である変化がフォーマット O を除いた 2'、5' 結合塩基修飾を含めることによって得られなかったことを示した。2' - 5' 結合塩基修飾を有するフォーマット O は活性の相違を減少させ、このことは、統計的に有意な様式でのガイド鎖のロックダウン活性の喪失を示す。

【 0 1 4 6 】

上述のように計算したパッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率を図 7 B に示す。パッセンジャー鎖とガイド鎖との間の活性の変化倍率の減少によって示されるように、変化倍率分析は 2' - 5' 結合核酸を含むフォーマット O が負の方向で s i R N A の鎖数に影響を及ぼすことを示した。さらに、フォーマット H - 1、H + 1、V - 2、および K での 2' - 5' 結合核酸由来のデータは統計的に有意でないため、これらのフォーマットは s i R N A の鎖数の改善に適切ではない。図 7 B の説明で引用されたウィルコクソン値によって判断したところ、2' - 5' 塩基修飾で修飾したフォーマット H のみが、鎖数の統計的に有意な増加を示した。

【 0 1 4 7 】

ガイド鎖とパッセンジャー鎖との切断活性の相違に関する統計分析は、図 4 A および図 6 A のデータに基づいて、ストランドバイアスの最も大きな変化が修飾フォーマット H で L N A (登録商標) および 2' O M e 修飾ヌクレオチドによって導入されたことを証明した。鎖数分析はまた、フォーマット G、フォーマット J、およびフォーマット K が統計的に有意な様式でガイド鎖の活性を減少させたことを証明した。したがって、これらを、s i R N A 特異性の増強のための次の検討材料からはずした。図 4 A のデータによって証明されるように、L N A (登録商標) 修飾ヌクレオチドを有するフォーマット H は、平均してパッセンジャー鎖の 8 倍のガイド鎖の切断活性の相違を誘導した。比較すると、非修飾コントロールフォーマット A は、平均してパッセンジャー鎖の 4 倍のガイド鎖活性の増加が証明された。したがって、フォーマット H 修飾は、至適にデザインした s i R N A 中に通常存在するストランドバイアスを倍増させた。

【 0 1 4 8 】

さらに、これらのデータは、L N A (登録商標) 修飾残基を有する鎖スイッチングされたフォーマットがパッセンジャー鎖を不活化するのと同様の効率でガイド鎖を不活化する

10

20

30

40

50

ことができることを証明した。

【0149】

図12A-1および図12A-2のデータは、表示のフォーマットのLNA（登録商標）修飾ヌクレオチドを含むように生成した12のsiRNAのノックダウン活性を示す。試験群の鎖数は、大部分のsiRNAがより高い活性のガイド鎖に非対称に偏っていることを示す（図12A-1のフォーマットAの活性相違の中央値0.5によって示される）。しかし、修飾フォーマットおよびLNA（登録商標）残基を使用して生成したsiRNAは、非修飾フォーマットAと比較してパッセンジャー鎖とガイド鎖活性との間により大きな相違が証明された。フォーマットH修飾フォーマットは、統計的に有意な様式で鎖間の活性の相違を増強したが、図12A-2のデータによって示されるように、活性の変化倍率は有意ではなかった。

10

【0150】

図13A-1および図13A-2のデータは、表示のフォーマットで2'OMe修飾ヌクレオチドを含むように生成したsiRNAを示す。図13A-1の活性相違の中央値0.5によって証明されるように、試験群の鎖数は、大部分のsiRNAがより高い活性のガイド鎖に非対称に偏っていることを示す。しかし、図13A-2に示すように、2'OMe修飾ヌクレオチドを使用して生成したsiRNAは、非修飾コントロールフォーマットAと比較してパッセンジャー鎖とガイド鎖活性との間により大きな変化倍率が証明された。フォーマットH、K、およびV-2は、鎖間に最も巨大且つ統計的に有意な変化倍率を誘導した（ $p < 0.05$ ）。フォーマットOを除く全フォーマットのデータは、非修飾siRNAと比較して統計的に有意であった。

20

【0151】

（実施例4）内因性遺伝子のサイレンシングに及ぼすsiRNA修飾フォーマットの影響

修飾フォーマットしたsiRNAによる内因性遺伝子のサイレンシングを試験して、修飾フォーマットがそのmRNA標的をノックダウンするようにsiRNAの有効性を変化させたかどうかを決定した。本研究のために、内因性遺伝子のノックダウンを、HeLa細胞（ATCC番号CCL-2、Manassas, VA）、U2OS細胞（ヒト骨肉腫細胞株、ATCC番号HTB-96）、およびHUH7細胞（ヒト肝細胞癌細胞株、番号JCRB 0403, Japanese Cancer Research Resource Bank, Tokyo, Japan）への低濃度の修飾フォーマットしたsiRNAのトランスフェクションによって試験した。HeLa細胞データを本明細書中で考察する。

30

【0152】

製造者によって説明された「逆方向」トランスフェクションプロトコルを使用したSiPORT（商標）NeoFX（商標）トランスフェクション剤（Ambion / Applied Biosystems Austin, TX カタログ番号AM4510）を使用して、HeLa細胞をトランスフェクションした。非修飾コントロールまたは修飾フォーマットしたsiRNAを、1nMまたは5nMのいずれかの最終濃度になるように96ウェル組織培養プレートにプレートした。SiPORT（商標）NeoFX（商標）トランスフェクション剤をsiRNAと少なくとも10分間複合体化し、その後新たにトリプシン処理したHeLa細胞（約 4.0×10^3 細胞）をsiRNA/トランスフェクション剤複合体上に重層した。プレートを、組織培養条件下にて37℃で48時間インキュベートした。

40

【0153】

製造者によって説明された「順方向」トランスフェクションプロトコルを使用したHyPerFect（登録商標）トランスフェクション剤（Qiagen, Gaithersburg, MD）を使用して、U2OS細胞をトランスフェクションした。非修飾コントロールまたは修飾フォーマットしたsiRNAを、3nMまたは30nMのいずれかの最終濃度になるように96ウェル組織培養プレートにプレートした。HyPerFect

50

(登録商標)トランスフェクション剤を *siRNA* と少なくとも 10 分間複合体化し、複合体を培養液中の *U2OS* 細胞 (約 4.0×10^3) に添加した。プレートを、組織培養条件下にて 37 で 48 時間インキュベートした。

【0154】

トランスフェクションした細胞の回収後、製造者のプロトコールにしたがって *MagMAX* (商標) - 96 総 RNA 単離キット (*Ambion, Inc. Austin TX* カタログ番号 *AM1830*) を使用して総 RNA を単離した。RNA を 50 μ l の無ヌクレアーゼ水で溶出した。製造者のプロトコールにしたがって *High Capacity cDNA 逆転写キット* (*Applied Biosystems, Inc. Foster City CA*, カタログ番号 4368814) を使用して、反応体積 30 μ l で *cDNA* を生成した。2 μ l の *cDNA* を使用して全 PCR 反応体積 10 μ l で *TaqMan* (登録商標) 遺伝子発現アッセイ (*Applied Biosystems, Inc.*, カタログ番号 4331182) を行った。技術的複製物を生成し、各サンプルの 18S 値を計算した。予備増幅の均一性を、上記式を使用した *ddCT* の計算によってチェックした。

10

【0155】

以下の式を使用して残存率を計算した：残存率 = $100 \times 2^{-(\text{ddCT})}$ 。

【0156】

mRNA ノックダウン比を、以下の式を使用して計算した：
mRNA ノックダウン比 = $1 - (2^{-(\text{ddCT})})$ および
mRNA ノックダウン率 = *mRNA* ノックダウン比 $\times 100$

20

このノックダウン研究のために、8 つの各内因性標的 *mRNA* のための 6 つの *siRNA* A を、非修飾フォーマット A および 8 つの試験修飾フォーマット E、F、G、H、J、K、M、および O で合成した。したがって、各試験フォーマットにより、48 の *siRNA* のデータが得られる。図 8 のデータについて、図 1A ~ 図 1C を参照してフォーマットの文字によって示した位置の修飾ヌクレオチド「m」は、上記構造 (a) (式中、R1 は O であり、R2 は O であり、R3 は CH_2 である) を有する LNA (登録商標) 残基であった。

【0157】

30

図 8 は、最終濃度 5 nM の修飾フォーマットした *siRNA* での *HeLa* 細胞における内因性 *mRNA* 標的のサイレンシングおよび *TaqMan* (登録商標) 遺伝子発現アッセイを使用したトランスフェクションから 48 時間後の標的のノックダウン率のアッセイについてのデータを示す。これらの研究由来の結果は、フォーマット G、J、および K で修飾フォーマットした LNA (登録商標) を含む *siRNA* が *siRNA* のノックダウン活性を損なう一方で、フォーマット E、F、H、M、および O で修飾フォーマットした LNA (登録商標) を含む *siRNA* が非修飾フォーマット A 群で認められたノックダウンと比較してノックダウンを維持または増加させることを証明する。したがって、種々の位置で LNA (登録商標) 残基を有するいくつかの修飾フォーマットは、*siRNA* のノックダウン活性に負の影響を及ぼさなかったが、ガイド鎖対パッセンジャー鎖の鎖数を増強するのに十分であった。ヒト肝細胞癌細胞 (*HUH7*) およびヒト骨肉腫細胞 (*U2OS*) 中のこの LNA (登録商標) 修飾 *siRNA* 集団における *siRNA* のノックダウン活性も決定した。これらの細胞株では、各修飾フォーマットの LNA (登録商標) 修飾 *siRNA* は、異なるトランスフェクション効率を考慮して *HeLa* 細胞で認められるものと類似のノックダウン活性を示した (データ示さず)。したがって、サイレンシング能力は、使用した細胞株型に影響を受けなかった。

40

【0158】

LNA (登録商標) 修飾ヌクレオチドを使用した修飾フォーマット H、H-2、H-1、H+1、Q、K、V、V-1、および V-2 についてのさらなるノックダウン活性データを図 12B に示す。このデータセットは、4 つの異なる内因性 *mRNA* 標的をターゲ

50

ィングする24の異なる*s i R N A*を示す。24の各*s i R N A*を各フォーマットで合成し、各群における*s i R N A*のノックダウンを同様に分析した。最終濃度5 nMでH e l a細胞にトランスフェクションし、トランスフェクションの48時間後にT a q M a n（登録商標）遺伝子発現アッセイを用いてアッセイを行った。結果はフォーマットKおよびV - 2での*s i R N A*のノックダウン活性のわずかな減少を示しているが、これは、非修飾*s i R N A*から統計的に有意ではない。修飾フォーマットH、H - 1、H - 2、H + 1、Q、V、およびV - 1は、非修飾*s i R N A*群で認められたノックダウン活性と比較してm R N A標的のノックダウン活性を維持または増加させた。

【0159】

図13Bのデータは、2' O M e修飾ヌクレオチドを使用した修飾フォーマットH、H + 1、H - 1、K、V - 2、およびOのノックダウン活性を示す。このデータセットは、4つの異なる内因性m R N A標的をターゲティングする24の異なる*s i R N A*を示す。24の各*s i R N A*を各フォーマットで合成し、各群における*s i R N A*のノックダウンを同様に分析した。最終濃度5 nMでH e l a細胞にトランスフェクションし、トランスフェクションの48時間後にT a q M a n（登録商標）遺伝子発現アッセイを用いてアッセイを行った。結果は、修飾フォーマットH、H + 1、H - 1、K、V - 2、およびOが非修飾フォーマットA *s i R N A*で認められたノックダウンと比較してノックダウンを維持または増加させることを証明している。

【0160】

フォーマットAと比較したL N A（登録商標）修飾ヌクレオチドを使用した修飾フォーマットH、M、W、W + 1、W - 1、Y、Y + 1、およびY - 1についてのさらなるデータを図14Aに示す。このデータセットは、5つの異なる内因性m R N A標的をターゲティングする15の異なる*s i R N A*を示す。15の各*s i R N A*を表示のフォーマットで合成し、各群における*s i R N A*のノックダウンを同様に分析した。最終濃度30 nMでU 2 O S細胞にトランスフェクションし、トランスフェクションの48時間後にT a q M a n（登録商標）遺伝子発現アッセイを用いてアッセイを行った。結果は、L N A（登録商標）残基で修飾した修飾フォーマットW、W + 1、W - 1、Y、Y + 1、およびY - 1を有する*s i R N A*が非修飾*s i R N A*フォーマットAと比較してノックダウン活性を維持することを証明している。共に統計的に有意な様式で、修飾フォーマットMを有する*s i R N A*は非修飾フォーマットAを有する*s i R N A*と比較してノックダウン活性が損なわれ、修飾フォーマットHを有する*s i R N A*は非修飾フォーマットAを有する*s i R N A*と比較してノックダウン活性を改善する。

【0161】

図14Bのデータは、フォーマットAと比較したL N A（登録商標）修飾ヌクレオチドを使用した修飾フォーマットH、M、J B 1、J B 2、J B 3、J B 4、およびJ B 5のノックダウン活性を示す。このデータセットは、5つの異なる内因性m R N A標的をターゲティングする15の異なる*s i R N A*を示す。15の各*s i R N A*を表示のフォーマットで合成し、各群における*s i R N A*のノックダウンを同様に分析した。最終濃度30 nMでU 2 O S細胞にトランスフェクションし、トランスフェクションの48時間後にT a q M a n（登録商標）遺伝子発現アッセイを用いてアッセイを行った。結果は、修飾フォーマットJ B 2、J B 3、およびJ B 5を有する*s i R N A*がノックダウン活性に関して非修飾フォーマットAと統計的に有意に異ならず、フォーマットH、J B 1、およびJ B 4を有する*s i R N A*がフォーマットAと比較した場合にノックダウン活性を改善し、フォーマットMを有する*s i R N A*がフォーマットAと比較した場合にノックダウン活性がより低いことを証明している。

【0162】

本実施例で試験した*s i R N A*修飾フォーマットのうち、フォーマットG、J、K、およびMは、非修飾フォーマットと比較した場合にノックダウン活性を損なわせる。

【0163】

（実施例5）オフターゲット効果の指標としての大域遺伝子発現プロファイリングに及

10

20

30

40

50

ばす修飾フォーマットHを有する *siRNA* の影響

フォーマットHの *LNA* (登録商標) および 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドが異なって発現される遺伝子の特徴に影響を及ぼす能力を、マイクロアレイ分析を使用した遺伝子プロファイルの測定によって非修飾 *siRNA* と比較した。F D F T 1 遺伝子をターゲティングするようにデザインされた4つの *siRNA* でトランスフェクションした四連の生物サンプルに対してマイクロアレイゲノム分析を行った。F D F T 1 はコレステロール合成に関与するが、試験用の細胞に不可欠ではない遺伝子である。この基準は、アレイ分析によって検出可能な遺伝子発現の相違は機能的 *mRNA* 標的の喪失に起因する任意の生物学的カスケードの結果よりもむしろ *siRNA* によって媒介された切断のみによる結果であることを確認する。

10

【0164】

3つの各 *siRNA* 配列 (*siRNA* 番号183、番号184、および番号192と命名) を、上記で概説した標準的手順を使用して非修飾フォーマットA、*LNA* (登録商標) 修飾フォーマットH、および2' - O - メチル修飾フォーマットHで *HeLa* 細胞に個別にトランスフェクションし、24時間後にトランスフェクションされた細胞を回収した。*RNA* を、マイクロアレイ分析のために標準的手順を使用して単離した。ヒトプローブセットを含む *Affymetrix* U133 V2 マイクロアレイチップ (*Affymetrix*, *Santa Clara*, *CA*) を、これらの研究のために使用した。コントロールには、試験治療を欠く場合に遺伝子発現のベースラインレベルを記録するためのネガティブコントロール *siRNA*、*「偽」* トランスフェクションされた細胞、および無処理細胞が含まれていた。データの正規化後、結果を分析して、偽 (送達因子のみ) コントロールサンプルの結果と比較して各サンプル組で2倍以上変化した遺伝子の同一性を決定した。次いで、計画比較を使用した一元配置分散分析を使用して、各偽処理条件対実験条件についての *p* 値を決定した。次いで、異なって発現される遺伝子プローブ組を、 $p < 0.001$ での2倍変化と定義した。異なって発現される遺伝子の数は、*siRNA* によるオフターゲット効果の基準である。

20

【0165】

図9A~図9Cは、*siRNA* 番号183 (図9A)、*siRNA* 番号184 (図9B)、および *siRNA* 番号192 (図9C) (F D F T 1 遺伝子をターゲティングするようにデザインされた3つの異なる *siRNA*) の結果のベン図を示す。各図は、表示の非修飾 *siRNA*、2' - O - メチル修飾 *siRNA*、または *LNA* (登録商標) 修飾 *siRNA* における3つの *siRNA* のうちの1つの結果を示す。ベン図は、各実験条件で変化した特定の遺伝子の数および *siRNA* 条件間の遺伝子の共通部分を示す。各図について、左下の組 (カラー表示の場合赤色) は非修飾 *siRNA* で処理されたサンプルにおける2倍以上変化した特定の遺伝子の数を示し、上の組 (カラー表示の場合青色) は2' - O - メチルフォーマットH修飾 *siRNA* で処理されたサンプルにおける2倍以上変化した特定の遺伝子の数を示し、右下の組 (カラー表示の場合緑色) は *LNA* (登録商標) フォーマットH修飾 *siRNA* で処理されたサンプルにおける2倍以上変化した特定の遺伝子の数を示す。

30

【0166】

siRNA 番号183 (図9A) について、非修飾 *siRNA* は31個の遺伝子 ($2 + 19 + 10 + 0$) の *mRNA* レベルを $1/2$ 以下に減少させた。2' - O - メチル修飾 *siRNA* は、32個の遺伝子 ($3 + 0 + 10 + 19$) の *mRNA* レベルを $1/2$ 以下に減少させ、そのうちの29個は非修飾コントロール *siRNA* にも影響を受けた。2' - O - メチル修飾 *siRNA* で処理したサンプルは、非修飾 *siRNA* とオフターゲット遺伝子数がたった3遺伝子しか異ならなかった。*LNA* (登録商標) 修飾 *siRNA* は、10個の遺伝子 ($0 + 0 + 10 + 0$) の *mRNA* レベルを $1/2$ 以下に減少させ、その全てが非修飾コントロールおよび2' - O - メチル修飾によっても変化する。したがって、これら10個の遺伝子は、配列依存性であり、本明細書中に示した教示によって軽減できないオフターゲット効果を示す。したがって、*LNA* (登録商標) 修飾フォーマットは、2'

40

50

- O - メチル修飾（オフターゲット効果を 0 % 減少）と比較して、オフターゲット遺伝子発現の変化の除去に有意な影響を及ぼした（オフターゲット効果を 68 % 減少）。

【0167】

s i R N A 番号 184（図 9 B）のために、非修飾 s i R N A は、70 個の異なって発現される遺伝子（14 + 23 + 33 + 1）の m R N A レベルを H e l a 細胞中で 1 / 2 以下に減少させた。2' - O - メチル修飾 s i R N A は、66 個の遺伝子（9 + 1 + 33 + 23）の m R N A レベルを 1 / 2 以下に減少させた。対照的に、L N A（登録商標）修飾 s i R N A は、異なって発現される遺伝子の数を非修飾 s i R N A の結果と比較して 50 % まで（35 個の遺伝子（0 + 1 + 33 + 1））減少させた。L N A（登録商標）修飾で処理されたサンプル（33 遺伝子）における大多数の異なって発現される遺伝子も、非修飾および 2' - O - メチル修飾 s i R N A で処理されたサンプルで異なって発現すると同定された。かかる遺伝子は、配列依存性であり、本明細書中に示した教示によって軽減できないオフターゲット効果を示す。したがって、L N A（登録商標）修飾フォーマットも、2' - O - メチル修飾（オフターゲット効果を 6 % 減少）と比較して、オフターゲット遺伝子発現の変化の除去に有意な影響を及ぼした（オフターゲット効果を 50 % 減少）。

【0168】

s i R N A 番号 192（図 9 C）について、非修飾 s i R N A は、103 個の異なって発現される遺伝子（28 + 13 + 61 + 1）の m R N A レベルを 1 / 2 以下に減少させた。2' - O - メチル修飾 s i R N A は、81 個の遺伝子（7 + 0 + 61 + 13）の m R N A レベルを 1 / 2 以下に減少させた。L N A（登録商標）修飾 s i R N A は、64 個の遺伝子（2 + 1 + 61 + 0）の m R N A レベルを 1 / 2 以下に減少させた。したがって、L N A（登録商標）修飾は、非修飾 s i R N A と比較してオフターゲット効果を約 38 % 排除した。この s i R N A について、61 個の遺伝子は、配列依存性であり、本明細書中に示した教示によって軽減できないオフターゲット効果を示す。L N A（登録商標）修飾フォーマットはまた、2' - O - メチル修飾（オフターゲット効果を 21 % 減少）と比較して、オフターゲット遺伝子発現の変化の除去に有意な影響を及ぼした（オフターゲット効果を 38 % 減少）。

【0169】

要約すると、マイクロアレイ分析は、L N A（登録商標）修飾フォーマット H s i R N A が非修飾フォーマット A s i R N A と比較した場合に異なって発現される遺伝子の産生が 38 % ~ 68 % 少なく、2' - O - メチル修飾フォーマット H s i R N A が非修飾フォーマット A s i R N A と比較した場合に異なって発現される遺伝子の産生が 0 % ~ 22 % 少ないことを証明した。したがって、L N A（登録商標）修飾フォーマット H s i R N A は、オフターゲット効果の数が最も少なかった。

【0170】

（実施例 6）細胞生物学研究における修飾フォーマットした s i R N A のパフォーマンス

細胞生物学研究を行って、修飾フォーマットおよび修飾ヌクレオチド型が s i R N A によって誘発されたオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型に影響を及ぼす能力を評価した。

【0171】

修飾フォーマットした s i R N A が「オンターゲット」または所望の表現型を維持し、「オフターゲット」または望ましくない表現型を軽減するかどうかを決定するために、測定可能で高度に特徴づけられた生物学的応答を誘導した s i R N A を選択した。したがって、オフターゲット表現型の除去に加えてオンターゲット表現型の保存をモニタリングした。試験修飾フォーマットを使用して s i R N A を合成し、下記のようにアッセイに適した細胞にトランスフェクションした。

【0172】

本明細書中で「成長アッセイ」と呼ばれるアッセイを行って、細胞レベルで非修飾 s i R N A およびネガティブコントロール s i R N A と比較した、修飾フォーマットした s i

10

20

30

40

50

RNAの相違を調査した。成長アッセイは、30 nMおよび3 nMでのsiRNAトランスフェクション後のU2OS骨肉腫細胞株における細胞表現型関連パラメータ（増殖、アポトーシス、および形態学など）の測定を含んでいた。siRNA濃度が高いほどより高いオフターゲット効果が認められ、したがって、かかるオフターゲット効果の除去のための障壁がより高いので、本明細書では30 nMアッセイ由来の結果を考察する。成長アッセイの分析は、表示の表現型のマーカーである以下の抗原の免疫蛍光検出を含んでいた：

- 1．切断ラミン-A（アポトーシス）、
- 2．リン酸化ヒストンH3（有糸分裂）、
- 3．チューブリン（品質管理の基準であり（すなわち、細胞構造のバックグラウンドの決定）、全細胞を特徴づける細胞骨格形態）、および
- 4．Hoescht染色（細胞数を正規化する核形態）。

10

【0173】

ロボット制御の画像収集ソフトウェア（Cellinger, Munich, Germany）およびMETAMORPH（登録商標）画像分析ソフトウェアパッケージ（Molecular Devices, Toronto, Canada）を備えた倍率10倍の対物レンズを使用したIMAGEEXPRESS^{MIcro}（商標）自動蛍光顕微鏡（Molecular Devices, Toronto, Canada）を使用して免疫蛍光を回収した。384個の各ウェルサンプル中の4点を回収し、3つの生物学的複製物のデータを平均し、類似の様式で処理したネガティブsiRNAコントロールサンプル（スクランブルした非ターゲティングsiRNA）と比較した。画像分析後、データを以下のプロトコールにしたがって評価する。

20

- 1）指標の計算：ウェル内の各部位について、分裂期核およびアポトーシス核の数を総核数に対して正規化し、総画像領域から非細胞バックグラウンド領域を引いて細胞占有面積を計算し、次いで、核数に対して正規化した。
- 2）サンプルウェル平均の計算：ウェル内の全部位の平均を計算し、さらに、プレートあたりの全ネガティブコントロールウェルの全部位を平均化した。
- 3）正規化：三連の各プレートについてのサンプルおよびポジティブコントロールを、ネガティブsiRNAコントロールウェルの平均に対して正規化した。
- 4）三連の平均の計算：プレート三連物の平均を各処理および読み取りについて計算した。

30

【0174】

既刊文献によって種々の細胞で機能的に十分に特徴づけられる試験遺伝子を選択した。試験遺伝子は、表1の遺伝子を含んでいた。

【0175】

【表 1】

表1

mRNA標的			遺伝子産物のノックダウンに起因する、予想されるオンターゲット表現型	
遺伝子の説明	遺伝子の記号	遺伝子 ID	アポトーシス	有糸分裂
ベンズイミダゾール1 ホモログβによって 阻害されないBUB1出芽	BUB1B	701	中立	減少
WEE1ホモログ (<i>S. pombe</i>)	WEE1	7465	増加	増加
細胞分裂周期2	CDC2	983	中立	減少
サイクリン依存性キナーゼ2	CDK2	1017	中立	減少
サイクリンD1	CCND1	595	中立	減少
ポロ様キナーゼ1	PLK1	5347	増加	増加
カスパーゼ3	CASP3	836	中立	中立
ファルネシルニリン酸ファル ネシルトランスフェラーゼ1	FDFT1	2222	中立	中立
低密度リポタンパク質 受容体	LDLR	3949	中立	中立
ステロール-C5- デサチュラーゼ (ERG3δ-5-デサチュラーゼ ホモログ, <i>S. cerevisiae</i>)様	SC5DL	6309	中立	中立

予想される表現型の測定可能な強い誘導（例えば、Wee1またはPLK1のノックダウン後の有糸分裂の300%増加）を示したsiRNAを同定した（Watanabe, N.ら（2004）PNAS, 101, 4419-4424; Leach, S.D.ら（1998）Cancer Research, 58, 3132-3136; Cogswell, J.P.ら（2000）Cell Growth and Diff. 11, 615-623）。BUB1B遺伝子のノックダウンは、Negコントロールと比較して有糸分裂の比率を減少させると予想される（Lampson, M.A. and Kapoor, T.M.（2004）Nature Cell Biology, 7, 93-98）。

【0176】

さらに、オフターゲット表現型を示すsiRNAを同定した。例えば、LDLR（アポトーシスを誘導しないと予想される遺伝子）（他のかかる遺伝子については表1を参照のこと）に対するsiRNAは、アポトーシスを500%増加させることが証明された。かかるsiRNA配列は、修飾フォーマットがsiRNAの特異性を改善することができるかどうかを決定するためのツールとしての役割を果たした。観察可能なオンターゲット表現型およびオフターゲット表現型を有する個別のsiRNA組を、いくつかの修飾フォーマットおよび上記の構造（a）（式中、R1はOであり、R2はOであり、R3はCH₂である）を有する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドまたはLNA（登録商標）残基のいずれかを含むように生成した。これらの修飾siRNAを、オンターゲットおよびオフターゲット表現型について試験して、オンターゲット表現型を維持しながらオフターゲット効果を除去することができる修飾フォーマットを決定した。

【0177】

細胞ベースのアッセイで並行して分析されたネガティブコントロールsiRNA処理サンプルについての正規化された値（図中にNegとして記す）と比較した修飾フォーマットしたsiRNA細胞ベースのアッセイの結果を、図10A～図10E、図11A～図11F、図12C～図12D、図13C～図13D、図15A～15D、および図16A～図16Dに箱ひげプロットとしてプロットする。

【 0 1 7 8 】

LNA（登録商標）修飾フォーマットE、F、G、H、J、K、M、およびOを有する siRNA によるサイレンシングに起因する正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを図10Aに示す。siRNAは、BUB1B、WEE1、CDC2、CDK2、CASP3、およびCCND1（有糸分裂表現型に異なる影響を及ぼす遺伝子）をターゲティングした。すなわち、この遺伝子組は、サイレンシングされた場合に有糸分裂を増加させるサブセット、サイレンシングされた場合に有糸分裂を減少させるサブセット、およびサイレンシングされた場合に有糸分裂に影響を及ぼさないと予想されるサブセットが含まれる。これらの異なる影響のために、遺伝子のサブセット（そのノックダウンにより、有糸分裂減少が予想される表現型が得られる）を分析し、データを図10Bに示す。

10

【 0 1 7 9 】

図10Bのデータは、遺伝子（BUB1B、CDC2、CCND1）（そのノックダウンが有糸分裂を減少させると予想される）をターゲティングする siRNA のトランスフェクション後の正規化した有糸分裂細胞を示す（Lampson, M. A. and Kapoor, T. M. (2004) *Nature Cell Biology*, 7, 93-98; Harborth, J. ら (2001) *Journal of Cell Science* 114, 4557-4565; Klier, M. (2008) *Leukemia*, E P U B）。したがって、これらのデータはオンターゲット表現型の影響を測定する。すなわち、このアッセイは、修飾フォーマットした siRNA が機能的 siRNA 組を「害さない」ことを確認する。Neg コントロール処理サンプルの正規化した値は、中央値約1.0を示す。非修飾フォーマットA siRNA によって中央値約0.55が得られ、これは、有糸分裂の約1/2減少を示した。Neg コントロールと比較して有糸分裂が減少した全修飾フォーマットを示した。修飾フォーマットHおよびJを有する siRNA により、ウィルコクソン値および非修飾フォーマットAからの有糸分裂の中央値の乖離によって証明されるように、非修飾フォーマットAと比較して有糸分裂に及ぼすその影響が統計的に有意に異なった（オンターゲット効果がより低い）。したがって、図8のmRNA ノックダウンに関する結果と一致して、細胞ベースのアッセイは、フォーマットJが高度に機能的な siRNA の所望の特徴に適合しないことを証明している。

20

【 0 1 8 0 】

細胞ベースの成長アッセイにより、切断されたラミン-Aを示す細胞由来の蛍光シグナルの定量によってNeg コントロール処理サンプルと比較したアポトーシスも測定した（Rao, L. ら (1996) *J Cell Biology*, 135, 1441-1455）。歴史的に、ゲノム規模の siRNA スクリーニング実験で認められた最も一般的な予想外の表現型は細胞死である。これらの研究についてのこの siRNA 集団では、修飾フォーマットが望ましくない細胞表現型を除去することができるかどうかを決定するためのツールとして予想外の細胞死を誘導することが知られている siRNA 配列が含まれていた。

30

【 0 1 8 1 】

LNA（登録商標）修飾フォーマットE、F、G、H、J、K、M、およびOを有する siRNA でのU2OS細胞の処理に起因するアポトーシスフラグメントの定量的結果を、図10Cに示す。Neg コントロール siRNA 処理サンプルを使用して siRNA トランスフェクション後のアポトーシスのベースラインを確立し、データを1.0に正規化した。この集団中の siRNA は以下の遺伝子をターゲティングする：BUB1B、CDC2、CCND1、WEE1、CASP3、およびCDK2（そのサブセットのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想され、そのサブセットがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される遺伝子標的組）。これらの異なる影響により、遺伝子のサブセット（そのノックダウンによってアポトーシス増加の表現型が予想される）を分析し、データを図10Dに示す。

40

【 0 1 8 2 】

図10Dは、WEE1をターゲティングする siRNA のトランスフェクション後のU

50

2 O S 細胞におけるアポトーシス測定の結果を示す。W E E 1 のノックダウンによりアポトーシスが増加すると予想される (W a t a n a b e , N . ら (2 0 0 4) P N A S , 1 0 1 , 4 4 1 9 - 4 4 2 4 ; L e a c h , S . D . ら (1 9 9 8) C a n c e r R e s e a r c h , 5 8 , 3 1 3 2 - 3 1 3 6) 。したがって、これらのデータはオンターゲット表現型の影響を測定する。すなわち、このアッセイは、修飾フォーマットした s i R N A が機能的 s i R N A 組を「害さない」ことを確認する。N e g コントロール s i R N A 処理サンプルを使用してアポトーシスの正規化ベースラインを確立した。W E E 1 をターゲティングするフォーマット A の非修飾 s i R N A は N E G 処理サンプルと比較して約 7 . 5 の中央値を示し、したがって、予想される表現型の変化が得られた。フォーマット J および K を有する修飾フォーマットした s i R N A は、非修飾フォーマット A s i R N A と比較した場合に統計的に有意な様式でアポトーシス量を減少させることによってオンターゲット表現型を減少させた。これにより、フォーマット J および K が s i R N A のパフォーマンスを損なうことが証明された。これらのデータは、修飾フォーマット J および K を有する s i R N A によるノックダウンに関する図 8 のデータと一致する。

【 0 1 8 3 】

遺伝子のサブセット (そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される) についての修飾フォーマットした s i R N A がオフターゲット表現型を除去する能力の分析を図 1 0 E のデータによって示す。経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する s i R N A を、かかる s i R N A が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果を排除または減少させるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。s i R N A がオフターゲット効果を有することは、N e g コントロールと比較してデータの中央値が増加し、且つその分布がより広くなる非修飾フォーマット A のボックスプロットによって明らかである (図 1 0 E) 。研究した s i R N A はフォーマット A 、 E 、 F 、 G 、 H 、 J 、 K 、 M 、および O を有し、標的遺伝子 (そのノックダウンによってアポトーシスが誘導されないと予想される) には、B U B 1 B 、 C C N D 1 、 C D K 2 、および C D C 2 が含まれていた。N e g コントロール処理集団を使用して、アポトーシスのベースラインを確立した。非修飾フォーマット A と比較してより低いアポトーシスシグナルによって証明されるように、フォーマット G 、 H 、 J 、および K を有する s i R N A により、統計的に有意なオフターゲット効果を除去する能力が証明される (図 1 0 E) 。

【 0 1 8 4 】

修飾フォーマット J および K を有する s i R N A が s i R N A オンターゲット有効性を損ねることが証明された図 1 0 D のデータならびに修飾フォーマット G 、 J 、および K を有する s i R N A がノックダウン活性を損ねることを証明した図 8 のデータを考慮して、フォーマット G 、 J 、および K が他の機能的 s i R N A を「害する」ようである。

【 0 1 8 5 】

L N A (登録商標) 残基の代わりに 2 ' O - メチル化残基を含む修飾ヌクレオチドの使用によって修飾フォーマットのさらなる特徴づけを行い、他の修飾型が s i R N A によってオフターゲット効果を減少させることができるかどうかを決定した。図 1 1 A は、2 ' - O - メチル修飾フォーマット H および K を有し、W E E 1 、 P L K 1 、 F D F T 1 、 L D L R 、および S C 5 D L (有糸分裂表現型に異なる影響を及ぼす遺伝子) をターゲティングする s i R N A によるサイレンシングに起因する正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。すなわち、この遺伝子組は、サイレンシングした場合に有糸分裂を増加させるサブセットおよびサイレンシングした場合に有糸分裂に影響を及ぼさないと予想されるサブセットを含む。これらの異なる影響のために、遺伝子のサブセット (そのノックダウンにより、有糸分裂の増加が予想される表現型が得られる) を分析し、データを図 1 1 B に示す。

【 0 1 8 6 】

図 1 1 B は、2 ' - O - メチル修飾フォーマット H および K を有する s i R N A による W E E 1 または P L K 1 をターゲティングする s i R N A のトランスフェクション後の U 2 O S 細胞における有糸分裂の測定結果を示す。W E E 1 または P L K 1 のサイレンシ

グによってU2OS細胞において有糸分裂が増加することは、Watanabe, N.ら((2004)PNAS, 101, 4419-4424), Leach, S.D.ら((1998)Cancer Research, 58, 3132-3136)およびCogswell, J.P.ら((2000)Cell Growth and Diff, 11, 615-623)に記載されており、Negコントロール処理サンプルと比較して有糸分裂の4倍増加を誘導した非修飾フォーマットAを有するsiRNAのデータによって確認される。したがって、これらのデータは、オンターゲット表現型の影響を測定する。すなわち、このアッセイは、修飾フォーマットしたsiRNAが機能的siRNA組を「害さない」ことを確認する。図11Bのデータに示すように、2'OMe修飾フォーマットHおよびKを有するsiRNAを使用して類似のレベルの有糸分裂に及ぼす影響が認められる。本研究は、フォーマットHおよびKでの2'OMe修飾が他の機能的siRNAを害さないことを証明している。

10

【0187】

2'OMe修飾フォーマットHおよびKを有するsiRNAがオフターゲット効果を減少させることができるかどうかを決定するために、遺伝子のサブセット(FDFT1、SC5DL、およびLDLR)(そのノックダウンが有糸分裂に影響を及ぼさないと予想される)をターゲティングするsiRNAをU2OS細胞にトランスフェクションし、有糸分裂に及ぼす影響を決定した。しかし、経験的に証明された有糸分裂オフターゲット効果を有するsiRNAを、かかるsiRNAが修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。図11Cにデータを示す。siRNAがオフターゲット効果を有することは、Negコントロールと比較してデータの分布がより広くなる非修飾フォーマットAのボックスプロットによって明らかである(図11C)。フォーマットHの2'OMe残基を有するsiRNAは、各siRNA配列を比較した場合に非修飾siRNAフォーマットAで認められた多数のオフターゲット表現型を減少させた。フォーマットKの2'OMe残基を有するsiRNAは、非修飾siRNAと比較して有糸分裂の影響の中央値を上昇させた。しかし、フォーマットHおよびKのこの2'-O-メチル修飾についてのデータは、非修飾フォーマットAのデータと統計的に有意に異ならなかった。

20

【0188】

2'-O-メチル修飾フォーマットHおよびKを有するsiRNAでのU2OS細胞の処理に起因するアポトーシス画分の定量的結果を図11Dに示す。NegコントロールsiRNA処理サンプルを使用してsiRNAトランスフェクション後のアポトーシスのベースラインを確立し、データを1.0に正規化した。この集団中のsiRNAは、この集団中のsiRNAは、遺伝子(WEE1、PLK1、FDFT1、LDLR、およびSC5DL)(そのサブセットのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想され、そのサブセットがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される)をターゲティングする。これらの異なる影響により、遺伝子のサブセット(そのノックダウンによってアポトーシス増加の表現型が得られると予想される)を分析し、データを図11Eに示す。

30

【0189】

図11Eは、2'-O-メチル修飾フォーマットHおよびKを有する12のsiRNA組によるWEE1およびPLK1をターゲティングするsiRNAのトランスフェクション後のU2OS細胞におけるアポトーシス測定の結果を示す。したがって、これらのデータはオンターゲット表現型の影響を測定する。すなわち、このアッセイは、修飾フォーマットしたsiRNAが機能的siRNA組を「害さない」ことを確認する。NegコントロールsiRNA処理サンプルを使用してアポトーシスの正規化ベースラインを確立した。WEE1またはPLK1をターゲティングするフォーマットAの非修飾siRNAはNEG処理サンプルと比較して約4倍以上のアポトーシスの中央値を示し、したがって、予想される表現型の変化が得られた。フォーマットHおよびフォーマットKの2'OMe修飾siRNAを使用して、類似のアポトーシスレベルが認められた。この研究は、HおよびKフォーマットの2'OMe修飾がsiRNAの有効性を減少させず、非修飾siRNA

40

50

AフォーマットAと類似の表現型を示すことを証明している。

【0190】

遺伝子組 (F D F T 1、L D L R、および S C 5 D L) (そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される) についての 2' - O - メチル修飾フォーマットした s i R N A がオフターゲット表現型を除去する能力の分析を図 1 1 F のデータによって示す。経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する s i R N A を、かかる s i R N A が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果を排除または減少させるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。研究した s i R N A は、フォーマット A、H、および K を有する。N e g コントロール処理集団を使用して、アポトーシスのベースラインを確立し、これは特に広範囲のアポトーシスの結果を示す。コントロールフォーマット A の中央値は、N e g コントロール処理サンプルの中央値と類似していた。修飾フォーマット H および K の 2' O M e 修飾ヌクレオチドを有する s i R N A は、各 s i R N A 配列を評価した場合に非修飾 s i R N A フォーマット A で認められた多数のオフターゲット表現型を減少させたが、試験集団に関して、オフターゲット効果の減少は統計的に関連する様式で認められた。

10

【0191】

フォーマット H、H - 2、H - 1、H + 1、Q、V、V - 1、V - 2、および K を示す図 1 A ~ 図 1 C の略図に示すように、さらなる修飾フォーマットを試験した。L N A (登録商標) 修飾ヌクレオチドは、構造 (a) (式中、R 1 および R 2 は O であり、R 3 は C H₂ であり、R 4 および R 5 は本明細書中に記載の s i R N A 中のヌクレオチドの位置によって決定されるとおりである) を有していた。図 1 2 C の s i R N A 修飾フォーマットについての U 2 O S 細胞における有糸分裂のオンターゲット表現型アッセイ (すなわち、「害さない」アッセイ) を行った。図 1 2 C のデータによって示されるように、非修飾 s i R N A は、N e g コントロール処理細胞と比較して s i R N A 処理細胞における有糸分裂の約 2 倍の増加を証明した。これらのフォーマットで L N A (登録商標) によって修飾された修飾フォーマットした s i R N A のオンターゲットパフォーマンスは、予想される表現型に負の影響を及ぼさなかった。修飾フォーマット H は、統計的に有意に表現型を増加させる。

20

【0192】

図 1 2 D は、図 1 2 C の L N A (登録商標) 修飾フォーマットを有する s i R N A のオフターゲット効果の除去に関するデータを示す。遺伝子標的組 (そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される) (F D F T 1、L D L R、または S C 5 D L) についての非修飾フォーマット A を有し、L N A (登録商標) 修飾フォーマット H、H + 1、H - 1、H - 2、K、Q、V、V - 1、および V - 2 のための s i R N A によるサイレンシングに起因する正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロット。ネガティブコントロール (N e g) は、アポトーシスの定量を値 1 . 0 に正規化したスクランブルした非ターゲット s i R N A である。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する s i R N A を、かかる s i R N A が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。s i R N A がオフターゲット効果を有することは、N e g コントロールと比較してデータの中央値が増加し、且つその分布がより広くなる非修飾フォーマット A のボックスプロットによって明らかである。望ましくないアポトーシス表現型の除去に最も有効であった修飾フォーマットがフォーマット H、K、Q、および V - 2 である一方で、修飾フォーマット H - 2、H - 1、H + 1、V、および V - 1 は、非修飾 s i R N A と比較して任意の統計的有意性でアポトーシス性フラグメントの測定値を変化させなかった。

30

40

【0193】

修飾フォーマット H、H - 1、K、および V についての 2' O M e ヌクレオチドによって修飾された s i R N A はまた、図 1 3 C のデータによって示すように、U 2 O S 細胞ベースのアッセイにおいてオンターゲット表現型に負の影響を及ぼさない。図 1 3 C は、遺

50

伝子標的組（そのノックダウンが有糸分裂を増加させると予想される）（WEE1およびPLK1）についての非修飾フォーマットAを有し、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する修飾フォーマットのためのsiRNAによるサイレンシングに起因する正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。このアッセイは、「害さない」アッセイである。非修飾siRNAは、予想されるNegコントロール処置サンプルの約2倍を超える有糸分裂の中央値を示した。修飾フォーマットしたsiRNAのデータは、2'OMe修飾ヌクレオチドを有するsiRNAが細胞ベースのアッセイにおいて予想される表現型に負の影響を及ぼさないことを証明している。

【0194】

図13Dは、遺伝子標的組（そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される）（FDF1、SC5DL、またはLCLR）についての非修飾フォーマットAを有するsiRNAならびに2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する修飾フォーマットH、H-1、V、およびKを有するsiRNAによるサイレンシングに起因する正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有するsiRNAを、かかるsiRNAが修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。siRNAがオフターゲット効果を有することは、Negコントロールと比較してデータの分布がより広くなる非修飾フォーマットAのボックスプロットによって明らかである。siRNA組は、各フォーマットについて13個の異なるsiRNAを含んでいた。2'OMe修飾フォーマットを有するsiRNAから非修飾コントロールフォーマットAと統計的に有意に異なるデータが得られず、これは、2'OMe修飾フォーマットしたsiRNAが非修飾フォーマットA siRNAで認められたものと同じオフターゲット効果を維持していたことを証明する。

【0195】

フォーマットHに類似し、図1Dに記載のさらなる修飾フォーマットを研究した。図15Aは、フォーマットA、H、M、W、W+1、W-1、Y、Y+1、およびY-1のLNA（登録商標）修飾ヌクレオチドを有するsiRNAについての正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。U2OS細胞の有糸分裂指数の予測される減少が得られるようにBUB1B、CCND1、およびCDC2 mRNAをノックダウンするためのsiRNA組を選択した。したがって、これらのデータは、オンターゲット表現型の影響を測定する。すなわち、このアッセイは、修飾フォーマットしたsiRNAが機能的siRNA組を「害さない」ことを確認する。図15Aのデータに示すように、非修飾フォーマットA siRNAで処理されたサンプルの有糸分裂の中央値は、NegコントロールsiRNA処理サンプルと比較して約0.75へと有糸分裂の減少を示した。フォーマットH、M、W+1、W-1、Y-1、およびY+1で修飾フォーマットしたsiRNAは有糸分裂に及ぼすこれらのsiRNAの影響を有意に変化させず、これは、これらの修飾フォーマットが「害さない」ことを証明している。しかし、修飾フォーマットYおよびWはsiRNAの予想されるオンターゲットへの影響を減少させ、これは、これらの修飾フォーマットがオンターゲット機能を妨害することを証明している。

【0196】

図15Bは、CASP3（そのノックダウンが有糸分裂に影響を及ぼさないと予想される）についての図15Aに関するボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明された有糸分裂オフターゲット効果を有するsiRNAを、かかるsiRNAが修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。siRNAがオフターゲット効果を有することは、Negコントロールと比較して中央値約0.7を有する非修飾フォーマットAのボックスプロットによって明らかである。修飾フォーマットH、W、W+1、W-1、Y、およびY+1を有するsiRNAは、フォーマットAのsiRNAによって証明されるオフターゲット効果を逆にした。フォーマットMおよびY-1でのsiRNAの修飾により、フォーマットA siRNAのオフターゲット表現型は逆にされなかった。図15Bのデータについ

て $p < 0.05$ のウィルコクソン値は得られなかった。これはおそらく各フォーマットの *siRNA* の小集団に起因する。

【0197】

WEE1 遺伝子 (そのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想される) をターゲットにする *siRNA* 組についての正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットをフォーマット A、H、M、W、W + 1、W - 1、Y、Y + 1、および Y - 1 について図 15 C に示す。非修飾フォーマット A *siRNA* は Neg コントロール *siRNA* 処理サンプルと比較して 4.0 を超えるアポトーシスの中央値を示し、これは、WEE1 ノックダウンの結果としてのアポトーシスの堅調な増加を証明している。したがって、試験データはオンターゲット表現型の影響を測定する。すなわち、このアッセイは、修飾フォーマットした *siRNA* が機能的非修飾 *siRNA* 組を「害さない」ことを確認する。図 15 C のデータに示すように、修飾フォーマット H、M、および W - 1 を有する *siRNA* はフォーマット A と比較して類似のアポトーシスの増加を示すのに対して、フォーマット W、W + 1、Y、Y + 1、および Y - 1 は、非修飾 *siRNA* フォーマット A と比較してアポトーシスにより弱い影響を及ぼす。図 15 C のデータについて $p < 0.05$ のウィルコクソン値は得られなかった。これはおそらく各フォーマットの *siRNA* の小集団に起因する。アポトーシスへの影響の減少にもかかわらず、化学修飾フォーマット W、W + 1、Y、Y + 1、および Y - 1 は、Neg コントロール *siRNA* 処理サンプルと比較して標的 mRNA をノックダウンし (図 14 A)、アポトーシスを誘導する能力を維持する。

【0198】

遺伝子標的組 (そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される) についての正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットを、修飾フォーマット A、H、M、W、W + 1、W - 1、Y、Y + 1、および Y - 1 を有する *siRNA* について図 15 D に示す。この組中の *siRNA* は、BUB1B、CCND1、CDC2、または CDK2 をターゲットにする。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する *siRNA* を、かかる *siRNA* が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。*siRNA* がオフターゲット効果を有することは、Neg コントロールと比較してデータの中央値が 3.5 以上であり、且つその分布がより広くなる非修飾フォーマット A のボックスプロットによって明らかである。フォーマット H、Y、および Y + 1 を有する *siRNA* によるサイレンシングは、フォーマット A と比較してオフターゲット効果の統計的に有意な逆転を示す。

【0199】

図 1 E に記載のなおさらなる *siRNA* 修飾フォーマットを研究した。*siRNA* を U2OS 細胞にトランスフェクションし、有糸分裂への影響を本明細書中に記載のように測定した。図 16 A は、非修飾フォーマット A を有し、LNA (登録商標) 修飾フォーマット H、M、JB1、JB2、JB3、JB4、および JB5 のための *siRNA* についての正規化した有糸分裂細胞のボックスプロットを示す。U2OS 細胞の有糸分裂指数の予想される減少が得られるように BUB1B、CCND1、および CDC2 mRNA をノックダウンするために *siRNA* 組 (標的 mRNA あたり 3 つの *siRNA*) を選択した。したがって、これらのデータは、オンターゲット表現型の影響を測定する。すなわち、このアッセイは、修飾フォーマットした *siRNA* が機能的 *siRNA* 組を「害さない」ことを確認する。図 16 A のデータによって示されるように、非修飾フォーマット A *siRNA* で処理されたサンプルの有糸分裂の中央値は、Neg コントロール *siRNA* 処理サンプルと比較して約 0.75 へと有糸分裂の減少を示した。フォーマット H、M、JB1、JB2、JB4、および JB5 で修飾フォーマットした *siRNA* は有糸分裂に及ぼす *siRNA* のオンターゲットの影響を有意に変化させず、これは、*siRNA* がこれらのフォーマットに耐性を示すことを証明している。しかし、修飾フォーマット JB3 を有する *siRNA* はこれらの遺伝子をターゲットにする *siRNA* の予想されるオンタ

ターゲットの影響を有意に減少させ、これは、フォーマット J B 3 がオンターゲット機能を干渉することを証明している。

【 0 2 0 0 】

図 1 6 B は、遺伝子標的 C A S P 3 (そのノックダウンが有糸分裂に影響を及ぼさないと予想される) についての図 1 6 A に関する修飾フォーマットのボックスプロットを示す。しかし、経験的に証明された有糸分裂オフターゲット効果を有する s i R N A を、かかる s i R N A が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。s i R N A がオフターゲット効果を有することは、N e g コントロールと比較して中央値が約 0 . 6 5 であり、それにより、有糸分裂の減少を示す非修飾フォーマット A のボックスプロットによって明らかである。図 1 6 B のデータによって証明されるように、修飾フォーマット H、J B 1、J B 2、J B 4、および J B 5 は、これらのオフターゲット効果を逆にすることができた。修飾フォーマット M および J B 3 は C A S P 3 をターゲティングする s i R N A のオフターゲット表現型を減少させず、これは、これらのフォーマットがオフターゲット表現型の除去に有効でないことを証明している。図 1 6 B のデータについて $p < 0 . 0 5$ のウィルコクソン値は得られなかった。これはおそらく各フォーマットの s i R N A の小集団に起因する。

10

【 0 2 0 1 】

修飾フォーマット A、H、M、J B 1、J B 2、J B 3、J B 4、および J B 5 を有する s i R N A についての遺伝子標的 W E E 1 (そのノックダウンがアポトーシスを増加させると予想される) のサイレンシングに起因する正規化したアポトーシスフラグメントのボックスプロットを図 1 6 C に示す。したがって、これらのデータは、オンターゲット表現型の影響を測定する。すなわち、このアッセイは、修飾フォーマットした s i R N A が機能的 s i R N A 組を「害さない」ことを確認する。図 1 6 C のデータによって示すように、非修飾フォーマット A s i R N A で処理されたサンプルのアポトーシスの中央値は N e g コントロール s i R N A 処理サンプルと比較して 4 . 0 超へのアポトーシス増加を示し、これは、W E E 1 ノックダウンの結果としてのアポトーシスの堅調な増加を証明している。修飾フォーマットを有する s i R N A は種々の程度に予想される表現型を誘導し、これは、全試験フォーマットが機能的 s i R N A 組を害さないことを証明している。図 1 5 B のデータについて $p < 0 . 0 5$ のウィルコクソン値は得られなかった。これはおそ

20

30

【 0 2 0 2 】

図 1 6 D は、B U B 1 B、C C N D 1、C D C 2、および C D K 2 を含む遺伝子標的組 (そのノックダウンがアポトーシスに影響を及ぼさないと予想される) についての図 1 6 C に関する修飾フォーマットのボックスプロットをフォーマット A、H、M、J B 1、J B 2、J B 3、J B 4、および J B 5 で L N A 修飾ヌクレオチドを有する s i R N A について示す。しかし、経験的に証明されたアポトーシスオフターゲット効果を有する s i R N A を、かかる s i R N A が修飾フォーマットされた場合にオフターゲット効果が排除または減少されるかどうかを決定するための研究のために特異的に選択した。s i R N A がオフターゲット効果を有することは、N e g コントロール処理サンプルと比較してデータの中央値が 3 を超えて増加し、且つその分布がより広くなる非修飾フォーマット A のボックスプロットによって明らかである。図 1 6 D のデータによって示されるように、修飾フォーマット H、J B 1、J B 2、J B 3、J B 4、および J B 5 を有する s i R N A は、フォーマット A と比較した場合にアポトーシスオフターゲット効果を統計的に有意な様式で逆にすることができる。フォーマット M を有する s i R N A は、アポトーシス効果を統計的に有意な程度に逆にできない。

40

【 0 2 0 3 】

まとめると、図 1 0 E、1 1 C、1 1 F、1 2 D、1 3 D、1 5 B、1 5 D、1 6 B、および 1 6 D のデータは、オフターゲット表現型の影響を予想外に減少させる修飾フォーマットにはフォーマット G、H、J、K、Q、V - 2、Y、Y + 1、J B 1、J B 2、J

50

B 3、J B 4、および J B 5 が含まれることを証明している。これらの修飾フォーマットのうち、フォーマット G、J、および K は、他の機能的 s i R N A が活性をノックダウンする能力を「害する」。高機能性 s i R N A はオフターゲット表現型の影響を減少させる性質を有し、さらに、ノックダウン活性の点から「害さない」。他の機能的 s i R N A にかかる高機能性を提供する修飾フォーマットには、フォーマット H、Q、V - 2、Y、Y + 1、J B 1、J B 2、J B 3、J B 4、および J B 5 が含まれる。

【 0 2 0 4 】

上記の鎖数の影響（図 4 E、6 C、7 B、1 2 A、1 3 A のデータ、本明細書中の実施例 3）およびオフターゲット効果の減少を付与する能力の両方について研究した修飾フォーマットにより、修飾フォーマットした s i R N A がオフターゲット効果の除去でどのようにして挙動するのかを鎖数アッセイから予想することができるかどうかの評価される。古典的レポーターアッセイを使用した実施例 3 の鎖数データは、修飾フォーマット E、G、H、K、O、および M が細胞表現型アッセイにおいて十分に機能すると予想されることを証明している。実際に、これらのフォーマットのうちの 3 つが十分に機能し、3 つが機能しなかった。したがって、鎖数アッセイは、修飾フォーマットした s i R N A が所望の細胞表現型の達成で機能的あるかどうかの予測には無効なようである。

【 0 2 0 5 】

（実施例 7）安定化した、修飾フォーマットした s i R N A

本実施例は、上記で考察したノックダウン活性の性質の維持およびオフターゲット効果の除去に加えてヌクレアーゼを含む体液への曝露に対して特に安定な修飾フォーマットした s i R N A を提供する。Elmenら（Nucleic Acids Research 33:1, 439-447, 2005）は、本明細書中のフォーマット F と同一の修飾フォーマットを有する s i L N A 5 と呼ばれる安定化 s i R N A およびどのフォーマットを本実施例の安定性研究のための基準コントロールとして使用するのかを報告している。本明細書中で使用する場合、用語「体液への曝露に安定な」は、ヌクレアーゼを含む体液の存在下で同一の体液に同一の期間曝露された修飾フォーマット F を有する s i R N A と比較して s i R N A が同一またはより高い程度にその全長を維持することを意味する。

【 0 2 0 6 】

本実施例が安定化した修飾フォーマットを提供する一方で、前の実施例で提供された修飾フォーマットした s i R N A は、ヌクレアーゼ活性の懸念が最も低い環境での使用に適切である。

【 0 2 0 7 】

フォーマット F に関して、実施例 6 および図 1 0 E 由来のデータは、修飾フォーマット F を有する s i R N A がオフターゲット細胞の影響の除去で実質的に無効であることを証明している。

【 0 2 0 8 】

90%マウス血清中の s i R N A に安定性を付与する修飾フォーマットを決定するための研究を、C L T C および W E E 1 の m R N A をターゲティングする 8 つの異なる s i R N A 配列に対して行った。下記および図 1 F ~ 図 1 K に記載の修飾フォーマットについて、実施例 1 に記載のように s i R N A を合成した。

【 0 2 0 9 】

10

20

30

40

【数 3】

フォーマット 修飾した位置(各鎖の5'末端から番号付け)

	パッセンジャー配列	ガイド配列	
A, コントロール	なし	なし	
F (Elmen <i>et al.</i>)	1, 20, 21	20, 21	
H	1, 2, 13, 14	なし	
DH21	1, 2, 13, 14	20, 21	
DH20	1, 2, 13, 14	19, 20, 21	
DH3	1, 2, 13, 14, 20, 21	なし	10
DH30	1, 2, 13, 14, 19, 20	なし	
DH35	1, 2, 13, 14, 20	21	
DH6	1, 13, 14, 21	21	
DH34	1, 2, 13, 14, 20, 21	21	
DH2	1, 2, 13, 14, 20, 21	20, 21	
DH19	1, 2, 13, 14, 19, 20	19, 20, 21	
DH4	1, 2, 13, 14, 19, 20	19, 20	
DH31	1, 2, 13, 14, 19, 20	20, 21	
DH27	1, 2, 7, 13, 14, 19, 20	20, 21	
DH25	1, 2, 6, 9, 13, 14, 19, 20	20, 21	
DH47	1, 2, 13, 14, 19, 20, 21	20, 21	20
DH29	1, 2, 13, 14, 18, 20, 21	20, 21	
DH28	1, 2, 13, 14, 18, 20, 21	なし	
DH18	1, 2, 13, 14, 18, 20, 21	19, 20, 21	
DH36	1, 2, 20, 21	20, 21	
DH9	1, 2, 13, 14, 20	20, 21	
DH46	1, 2, 13, 14, 21	20, 21	
DH33	1, 2, 13, 14, 20, 21	20	
DH10	1, 2, 13, 14, 20	20	
DH7	1, 2, 20, 21	2, 20, 21	
DH23	1, 2, 13, 14	2, 20, 21	
DH1	1, 2, 13, 14, 20, 21	2, 20, 21	
DH48	1, 2, 13, 14, 20, 21	2, 20	30
DH49	1, 2, 13, 14, 20, 21	2, 21	
DH44	1, 2, 13, 14, 20	2, 20, 21	
DH45	1, 2, 13, 14, 21	2, 20, 21	
DH38	1, 2, 13, 14, 20, 21	1, 20, 21	
DH39	1, 2, 13, 14, 20, 21	3, 20, 21	
DH40	1, 2, 13, 14, 20, 21	4, 20, 21	
DH41	1, 2, 13, 14, 20, 21	5, 20, 21	
DH42	1, 2, 13, 14, 20, 21	6, 20, 21	
DH43	1, 2, 13, 14, 20, 21	7, 20, 21	

修飾フォーマットした *siRNA* に導入した修飾ヌクレオチドは、ロックス核酸 (LN A (登録商標) 残基)、特に、上記の構造 (a) (式中、R1はOであり、R2はOであり、R3はCH₂である) を有するものであった。

【0210】

本明細書中で使用される場合、安定性アッセイにより、熱不活性化されていない90% マウス血清 (カタログ番号44135, JR Scientific, Inc., Woodland, CA) 中での修飾フォーマットした *siRNA* のインキュベーション後の全長産物の存在量が得られる。全 *siRNA* を、使用前に強いヌクレアーゼ活性を有することが確認された同一ロットのマウス血清で処理した。ヒト血清 (カタログ番号CC-5500, SeraCare Life Sciences, Inc., Oceanside, CA) およびウシ胎児血清 (カタログ番号SV30014, HyClone, Loga

40

50

n, Utah) を使用して類似の結果が得られた(データ示さず)。

【0211】

各アッセイのために、最終体積50 μ Lの10 μ Mの修飾フォーマットしたsiRNAを、90%マウス血清中で経時変化に示す時間(図17)または5時間(図18A~図23B)のいずれかにて37 でインキュベーションした。血清中でのインキュベーションと並行して、各siRNA組をPBS(カタログ番号9625, Applied Biosystems, Austin, TX)で血清処理サンプルと同一の期間処理して、HPLC研究のための全長産物の量についてのベースラインを確立した。インキュベーション後、siRNAをフェノール(カタログ番号9700, Applied Biosystems, Austin, TX)で抽出し、5 μ gグリコーゲンキャリア(1 μ l/管, カタログ番号AM9510, Applied Biosystems, Austin, TX)の存在下でエタノール沈殿させて、小RNAの回収を強化した。siRNAおよび切断産物を遠心分離(15,000 \times gで15分間)によって回収し、HPLC分析前にPBS緩衝液(リン酸緩衝化生理食塩水)に溶解した。

【0212】

過塩素酸ナトリウム(NaClO_4)含有アセトニトリルの連続勾配を使用したイオン交換高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を使用して、全長産物を定量した。固定相は、Waters 2795 ALLIANCE(登録商標)分析HPLCシステムおよびEMPOWER(商標)Dissolution Software v2(Waters Corp, Milford, MA)と共に使用されるDionex DNAPAC(登録商標)200カラム(4mm \times 250mm, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA)であった。siRNA二重鎖が変性しないような温度を維持した。定量およびUV検出を、Waters 2998フォトダイオードアレイ検出器(Waters Corp, Milford, MA)によって254nmで行う。注入量10 μ l~20 μ lのGAPdHのmRNAをターゲティングするsiRNA(各末端に2つのオーバーハング3'ヌクレオチドを有する21量体の二重鎖)(10 μ M)を使用して、カラムの質および保持時間を確認する。HPLCの結果の分析は、100%とした無処理siRNAについてのピーク面積および血清処理サンプルについての同一保持時間(+/-0.1~0.2分)でのピーク面積に基づき、これにより残存率を計算した。

【0213】

血清安定性について試験した同一のsiRNAを、内因性遺伝子のノックダウン活性について個別に試験して、修飾フォーマットがsiRNAの、そのmRNA標的をノックダウンする効率を変化させたかどうかを決定した。製造者によって記載された「順方向」プロトコルにてトランスフェクションでリポフェクタミン(商標)2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用したことを除いて実施例4に記載のように最終濃度5 nMの修飾フォーマットしたsiRNAおよび非修飾コントロールsiRNAをHeLa細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞の回収後、全細胞溶解物を、製造者のプロトコルにしたがってTaqMan(登録商標)遺伝子発現Cells-to-CT(商標)キット(Applied Biosystems, inc. カタログ番号AM1728)を使用して単離した。cDNAの調製、遺伝子発現アッセイ、およびノックダウン活性の計算を、実施例4のように行った。

【0214】

本研究の8つの異なるsiRNAの非修飾形態の血清中での分解を、血清曝露から5~10分以内に50%を超える全長分子が分解される図17のデータによって示す。

【0215】

非修飾フォーマットA、安定性コントロールフォーマットF、ならびに修飾フォーマットH、DH21、DH20、DH3、DH30、DH35、DH6、DH34, およびDH2についての90%血清で記載の条件下にて5時間処理した場合に全長を保持するsiRNAの比率のボックスプロットを図18Aに示す。非修飾フォーマットAおよび修飾フォーマットHは、記載の条件下で完全に分解された。安定性基準となるコントロールフォ

フォーマットFは、記載の条件下で血清中で約43%が全長siRNAである中央値を有する。図18Aのデータ分析は、たった1つの3'末端および/またはその付近のヌクレオチドの修飾では血清中で修飾siRNAを保護するには不十分であることを示す(フォーマットFと比較した場合のフォーマットDH21、DH20、DH3、およびDH30)。2つまたは3つのオーバーハングングヌクレオチドの修飾も血清中での修飾siRNAの保護には不十分である(フォーマットFと比較した場合のフォーマットDH6、DH34、およびDH35)。4つ全てのオーバーハングングヌクレオチドが修飾されたフォーマットDH2は、フォーマットF以上に良好に血清中で保護する。図18Bは、図18Aのために研究したsiRNAのNegコントロールの比率としてのmRNAノックダウンのボックスプロットを示す。図18Bによって示されるように、非修飾フォーマットAのsiRNAは、NegコントロールsiRNA処理サンプルと比較してノックダウンの中央値が約85%である。siRNA修飾フォーマットDH20は、特に、フォーマットHと比較したノックダウン活性の減少を示す。研究したこの修飾フォーマット組のうち、フォーマットDH2のみがその安定性およびノックダウン活性のためにさらなる研究が考慮される。

10

【0216】

図19Aに示すように、センス鎖の3'末端から2番目および3番目の位置への2つの修飾ヌクレオチドの配置は、アンチセンス鎖の2つまたは3つの末端残基(DH4、DH31、DH19)中の修飾ヌクレオチドと共に、血清安定性に有害な作用を及ぼすようである。これらのデータは、オーバーハングングヌクレオチドとしての修飾ヌクレオチドの位置づけをさらに支持する。さらに、図19Bのデータによって示されるように、フォーマットDH19、DH27、およびDH25は、フォーマットAと比較して有意なノックダウン活性の減少を示す。フォーマットDH31は、70%を超えるノックダウン活性を有していた。保護されていない末端残基を遊離しながらの内部残基(DH27(7位)およびDH25(6位および9位)に関して)の保護は、データをフォーマットDH2のデータと比較した場合にノックダウン能力に関して逆効果なようである。

20

【0217】

図20Aに示すデータは、コントロールフォーマットFと比較した修飾フォーマットDH47およびDH29の安定性の増加およびDH18の安定性のなおさらなる増加を証明している。修飾フォーマットDH47およびDH29により、オーバーハングングの位置およびフォーマットHの位置の修飾ヌクレオチドに加えて、センス鎖配列の末端から3番目および4番目の位置のうちの1つ(すなわち、21量体について、18位および19位のうちの1つ)で修飾ヌクレオチドが得られる。フォーマットDH18により、DH29に関する修飾ヌクレオチドが得られ、さらに、アンチセンス鎖の3番目の位置(すなわち、21量体について、19位)に修飾ヌクレオチドが得られる。フォーマットDH28のデータは、フォーマットDH29と直接比較した場合、アンチセンス鎖のオーバーハングング位置での修飾ヌクレオチドの欠如が保護されたセンス鎖によって得られた安定性をノックアウトすることも証明している。フォーマットFと比較した場合、フォーマットDH47およびDH28のデータは、 $p < 0.05$ の場合にウィルコクソン値を有する。図20Bのデータは、フォーマットDH47、DH29、およびDH28が70%を超えるノックダウン活性を有することを証明している。フォーマットDH18などの場合のアンチセンス鎖の末端から3番目の位置(19位)の修飾は、安定性が強化される一方で、ノックダウン活性を約60%の中央値に損なう。上記データに基づいて、フォーマットDH47およびDH29は共にコントロールフォーマットFよりもsiRNAの安定性が増加し、フォーマットDH47によって非修飾フォーマットAに匹敵するノックダウン活性が得られ、フォーマットDH29によって70%を超えるノックダウン活性が得られる。

30

40

【0218】

図21Aに示す修飾フォーマットを有するsiRNAでは修飾フォーマットFまたはフォーマットDH2を有するsiRNAを超える血清安定性の増加は得られない。添加血清の安定性の欠如は、オーバーハングングヌクレオチドが修飾される修飾フォーマットを支

50

持する。図 2 1 A のために研究した *s i R N A* のノックダウン活性データは全て、図 2 1 B によって示される活性の 7 0 % 超を証明している。

【 0 2 1 9 】

修飾フォーマット F を有する *s i R N A* と図 2 2 A の修飾フォーマット D H 2 3、D H 4 8、D H 4 9、D H 4 4、および D H 4 5 を有する *s i R N A* との血清安定性の比較は、オーバーハングヌクレオチドの位置の修飾ヌクレオチドをさらに支持する。フォーマット D H 1 および D H 7 などのオーバーハングヌクレオチドの位置での修飾ヌクレオチドを有することに加えて、アンチセンス鎖の 2 位のヌクレオチドの修飾は、血清中の安定性の中央値を増加させる (図 2 2 A)。図 2 2 B のデータは、フォーマット D H 2 3 を除く図 2 2 A の全てのフォーマットした *s i R N A* が 7 0 % を超えるノックダウン活性を達成することを証明している。まとめると、オーバーハングヌクレオチドの位置に加えてガイド鎖の 2 位に修飾ヌクレオチドを有するフォーマット D H 1 および D H 7 により、血清安定性およびノックダウン活性の両方の性質が得られる。修飾フォーマット D H 7 を有する *s i R N A* は 1 3 位および 1 4 位およびこれらの近くの位置に修飾ヌクレオチドを欠き、したがって、オフターゲット効果を除去する性質を得ることができない。しかし、かかる *s i R N A* は、オフターゲット効果が予想されない環境下でのサイレンシングに有用であり得る。

10

【 0 2 2 0 】

図 2 3 A に示したデータは、フォーマット H およびオーバーハング位置 (それぞれ、D H 3 8、D H 1、D H 3 9、D H 4 0、D H 4 1、D H 4 2、D H 4 3) の修飾ヌクレオチドに加えて、アンチセンス鎖の 1、2、3、4、5、6、または 7 位 (位置番号 1 は 5' ヌクレオチドである) での 1 つのヌクレオチド修飾の影響を試験する。データは、血清安定性の中央値が試験した全てのフォーマットした *s i R N A* によって増加し、修飾ヌクレオチドがガイドアンチセンス鎖の 5' 末端からさらに離れて配置されるにつれて安定性が減少する傾向があることを証明している。

20

【 0 2 2 1 】

図 2 3 B のデータによって示されるように、フォーマット D H 3 8 を有する *s i R N A* を除いた全てのフォーマットした *s i R N A* は、7 0 % を超えるノックダウン活性を有する。この所見は、アンチセンス鎖の 5' 末端に配置された修飾ヌクレオチドの不適合性を強調している。アンチセンス鎖の 5' 末端へのリン酸基の付加により、生物活性が部分的に救済されるが、安定性の救済が犠牲になった (データ示さず)。まとめると、血清の安定性およびノックダウンに関するデータは、ガイドアンチセンス鎖の 2、3、4、5、6、または 7 位 (5' 末端に関して) での少なくとも 1 つのヌクレオチド修飾が *s i R N A* 安定性を増強する一方で、少なくとも 7 0 % のノックダウン活性も得られることを証明している。

30

【 0 2 2 2 】

図 1 8 A ~ 図 2 3 B のデータをまとめると、少なくとも 7 0 % のノックダウン活性を維持しながらフォーマット F を超える血清安定性が得られる修飾フォーマットは、フォーマット D H 4 7、D H 2 9、D H 7、D H 1、D H 3 9、D H 4 0、D H 4 1、D H 4 2、および D H 4 3 である。

40

【 0 2 2 3 】

フォーマット D H 7 は 1 3 位および 1 4 位およびその付近に修飾ヌクレオチドを欠き、したがって、オフターゲット効果を除去する性質を得ることができない。

【 0 2 2 4 】

フォーマット D H 4 7、D H 2 9、D H 1、D H 3 9、D H 4 0、D H 4 1、D H 4 2、および D H 4 3 は、パッセンジャーセンス鎖中の 1、2、1 3、1 4、2 0、2 1 位に修飾ヌクレオチドを有し、D H 4 7 および D H 2 9 については、1 8 位または 1 9 位のいずれか 1 つに修飾ヌクレオチドを有し、ガイドアンチセンス鎖中の 2 0 位および 2 1 位に修飾ヌクレオチドを有し、D H 3 9 ~ D H 4 3 については 2、3、4、5、6、または 7 位の任意の 1 つに修飾ヌクレオチドを有する。両ヌクレオチドがパッセンジャーセンス鎖

50

の1位で修飾される二重の塩基対は、ノックダウン活性に有害なようである(DH20、DH19、DH4、DH18)。

【0225】

(実施例8)安定化siRNAのin vivo送達

非修飾フォーマットA siRNAならびに修飾フォーマットDH1およびDH47を有する安定化siRNAをin vivoで送達させ、コントロールおよび試験動物由来の肝臓中の全長siRNAの存在量を比較した。siRNAおよびmiRNAの信頼性があり且つ頑健な定量が可能であり、全長分子のみを特異的に検出するTaqMan(登録商標)ベースのステム-ループRT-PCRアッセイを、分析のために使用した(2004年9月21日出願のChenらの米国特許出願公開第2005/0266418号、Chen, C.ら、Nucleic Acids Research 33, e179, 2005)。

10

【0226】

Zhangら(Human Gene Therapy 10, 1735-1737, 1999)およびLewisら(Nature Genetics 32, 107-108, 2002)に記載のように、Fas遺伝子をターゲティングするsiRNAを、水圧(高圧)尾静脈注入を使用してマウス(1nmolを2.5ml PBS(マウス体重の10%)で希釈)に投与した。各修飾フォーマットしたsiRNAを4匹のマウスに注射した。修飾ヌクレオチドは、構造(a)(式中、R1はOであり、R2はOであり、R3はCH₂である)を有するLNA(登録商標)残基であった。

20

【0227】

注射5分後、マウスを屠殺し、全肝臓を回収し、ドライアイス中で凍結させた。製造者のプロトコールにしたがってmirVana(商標)PARIS(商標)キット(Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して、全RNAを全肝臓から単離し、以下のように修飾した。細胞破壊緩衝液(20ml)を添加し、サンプルを均質化した。溶解物(400μl)を新規のチューブに移し、変性溶液(400μl)を各チューブに添加し、ボルテックスによってチューブを十分に混合した。800μlフェノールの添加、5分間のボルテックス、および10分間の遠心分離によってフェノール抽出を行った。上相(300μl)を新規のチューブに移し、375μl(1.25vol)の100%エタノールと混合した。キットのプロトコールにしたがって濾過カラムに混合物を通過させ、100μlの溶離緩衝液で最終溶離を行った。RNA濃度を測定し、10ng/μlに調整した。

30

【0228】

siRNAの定量アッセイは、TaqMan(登録商標)MicroRNA逆転写アッセイ(Applied Biosystems, Foster City, CA)に記載のようにステム-ループデザインを有するRTプライマーを使用したsiRNAのガイド鎖の逆転写(RT)およびその後のPCRを含んでいた。10μlのRT反応物中で、1ng/μlの総RNAおよび50nMのRTプライマーを85℃で5分間変性させ、次いで、60℃で5分間、次いで、4℃でアニーリングした。酵素ミックス(0.25mMの各dNTP、最終濃度; 3.33単位/μlのMultiScribe(商標)逆転写酵素(Applied Biosystems)、1×RT緩衝液、0.25単位/μlのRNアーゼインヒビター)の添加後、反応混合物を16℃で30分間、42℃で30分間、85℃で5分間、次いで、4℃でインキュベーションした。標準的なTaqMan(登録商標)PCRプロトコールを使用して、Applied Biosystems 7900HT配列検出システム(Applied Biosystems)にてリアルタイムPCRを行った。10μlのPCR反応混合物は、1μl RT産物、1×TaqMan(登録商標)ユニバーサルPCRマスターミックス、0.2μM TaqMan(登録商標)プローブ、1.5μM順方向プライマー、および0.7μM逆方向プライマーを含んでいた。反応物を95℃で10分間インキュベーションし、その後に95℃で15秒間を40サイクル、および60℃で1分間インキュベーションした。

40

50

【0229】

均質化の前に、個別のコントロール無処理マウス群由来の凍結した全肝臓に、300、200、100、および50 pmolのsiRNAをスパイクした。これらの「スパイクした」サンプルは、研究のコントロールとしての機能を果たし、注入サンプルとコントロールサンプルとの間のサイクル閾値(Ct)の比較のための検量線が得られる。上記のように、RNAをコントロール器官から単離した。用語「Ct」は、シグナルが最初に統計的に有意に記録された場合のPCRサイクル数を示す。したがって、Ct値が低いほど、核酸標的の濃度が高い。TAQMAN(登録商標)アッセイでは、典型的には、各サイクルでPCR産物の量がほぼ倍増する。したがって、反応が全く阻害されず、且つ精製核酸とほぼ100%の効率で反応する場合、蛍光シグナルが倍増するはずである。

10

【0230】

図24は、「スパイクした」コントロール、非修飾フォーマットA注入した動物、ならびにフォーマットDH1およびフォーマットDH47 siRNA処置動物についてのCt値を示す。水圧注入の5分後に肝臓中で約5%の非修飾フォーマットA siRNAが検出された。対照的に、フォーマットDH1およびDH47を有する修飾フォーマットしたsiRNAの約20%が検出され、非修飾siRNAと比較して400%増加した。このin vivo研究は、安定化のために修飾フォーマットしたsiRNAが全身投与の際に全長siRNAの送達を有意に増加させることを証明している。

【0231】

本教示の組成物、方法、およびキットは、本明細書中に広範且つ一般的に記載されている。一般的開示の範囲に含まれる各々のより狭い種および亜属の分類も本教示の一部を形成する。これには、本教示の一般的説明が含まれる。これには、削除された資料が本明細書中に具体的に引用されるかどうかと無関係に、属からの任意の対象物を除去する但し書きまたは否定による限定を含む。

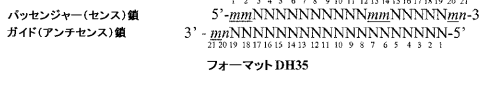
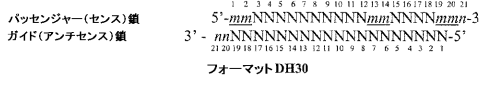
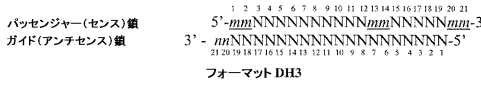
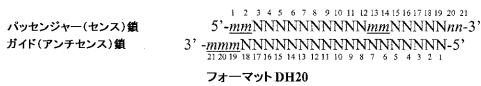
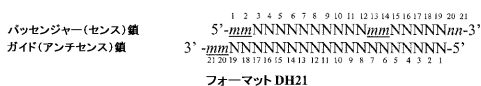
20

【0232】

開示の教示が種々の適用、方法、および組成物に関して記載されているにもかかわらず、本明細書中の教示を逸脱することなく種々の変更形態および修正形態が可能であると認識されるであろう。本教示をより良好に例示するために上記実施例を提供しているが、これは、本明細書中の教示の範囲を限定することを意図しない。本教示の一定の態様を、以下の特許請求の範囲を考慮してさらに理解することができる。

30

【 図 1 F 】



NNNNNNN

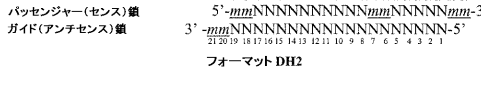
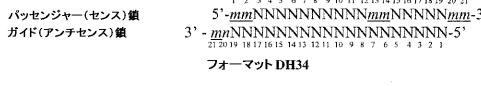


FIG. 1F

【 図 1 H 】

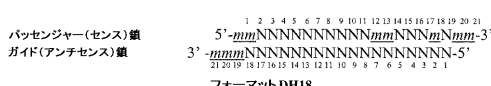
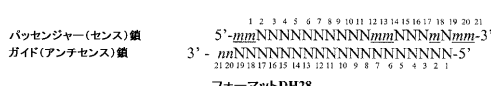
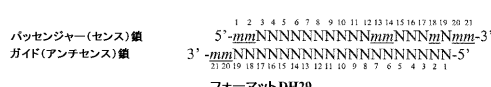
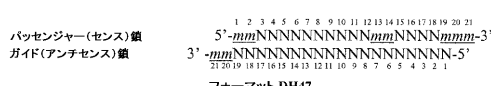
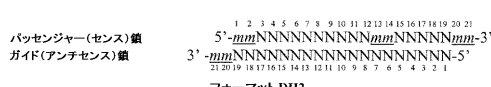
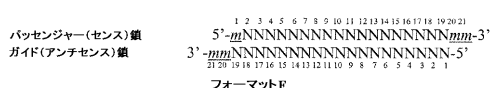


FIG. 1H

【 図 1 J 】

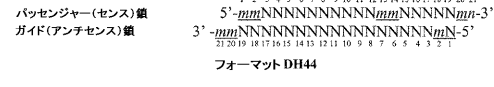
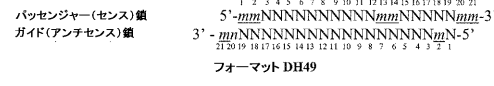
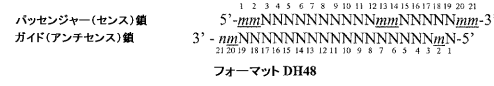
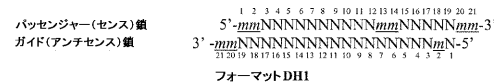
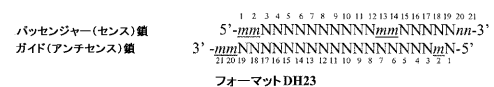
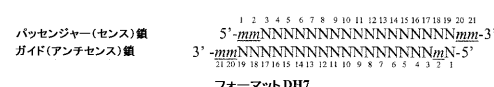
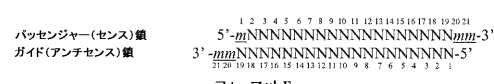


FIG. 1J

【 図 3 】

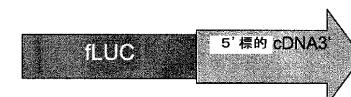


FIG. 1K

【図 4 A】

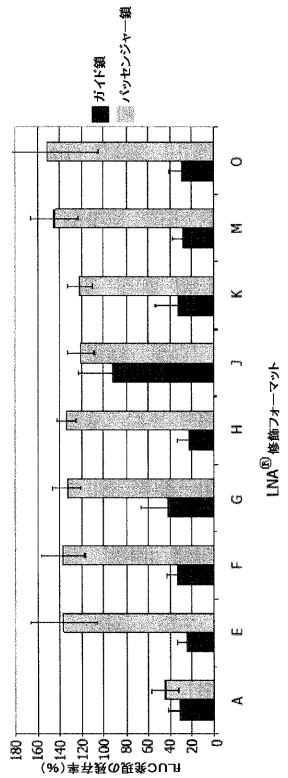


FIG. 4A

【図 4 B】

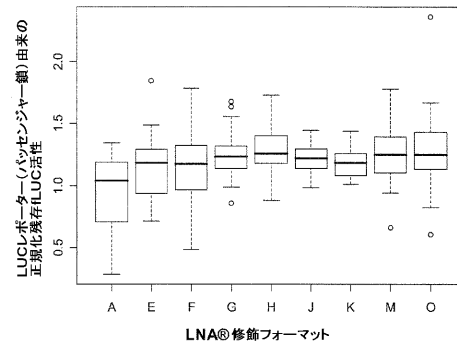


FIG. 4B

【図 4 C】

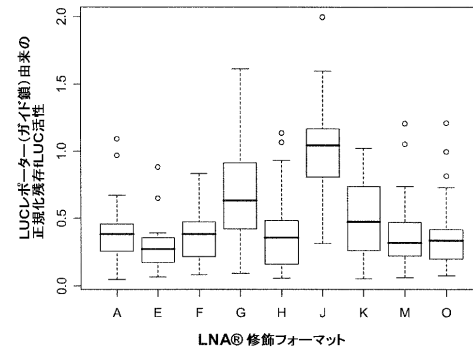


FIG. 4C

【図 4 D】

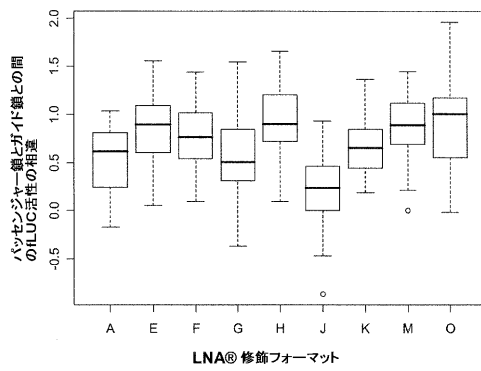


FIG. 4D

【図 4 E】

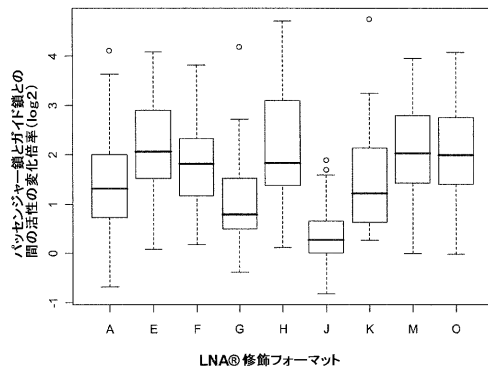


FIG. 4E

【図 5 A】

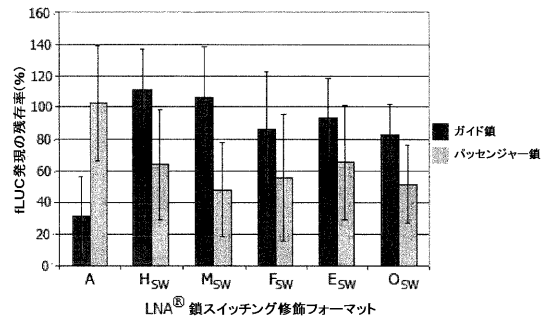


FIG. 5A

【図 5 B】

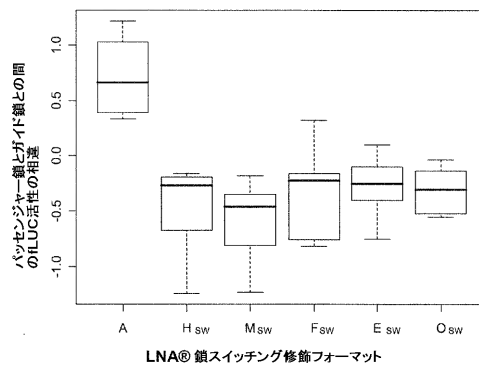
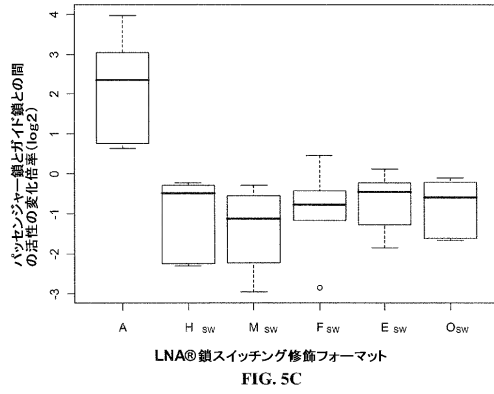
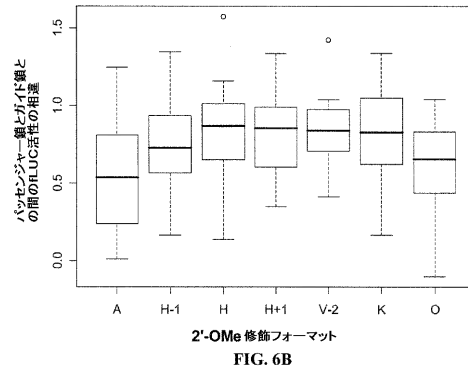


FIG. 5B

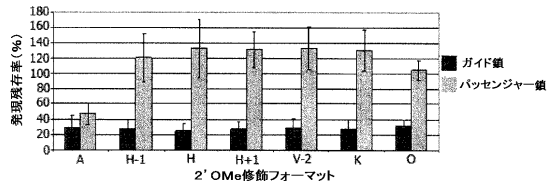
【図 5 C】



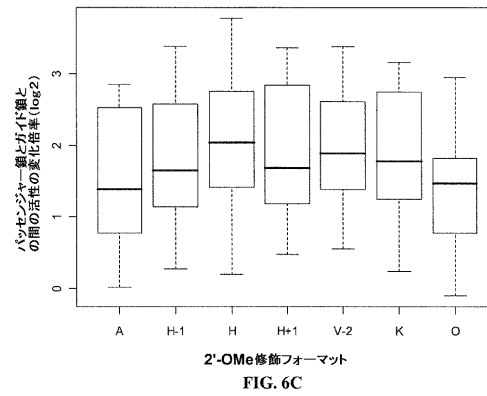
【図 6 B】



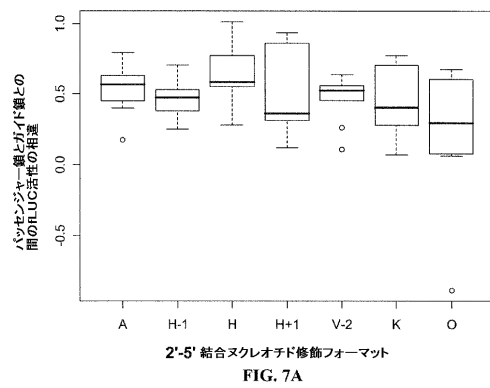
【図 6 A】



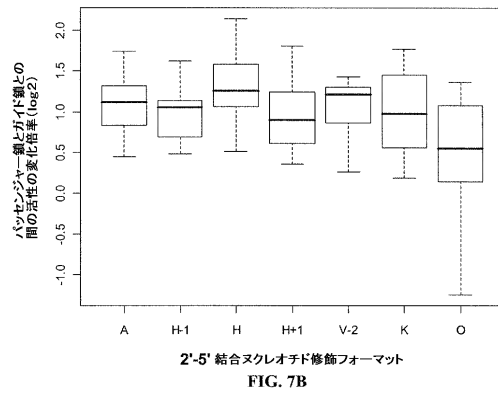
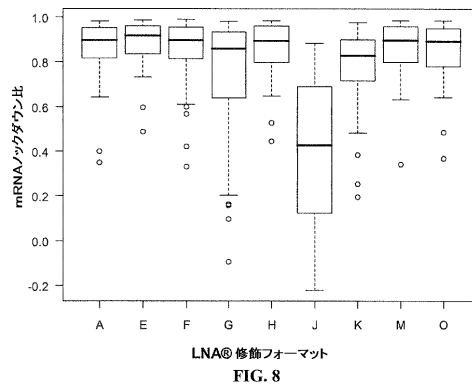
【図 6 C】



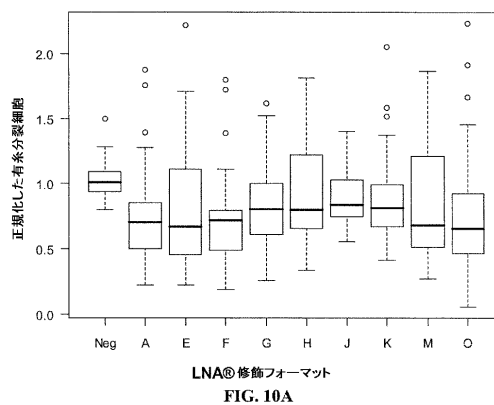
【図 7】



【図 8】



【図 10 A】



【図 10 B】

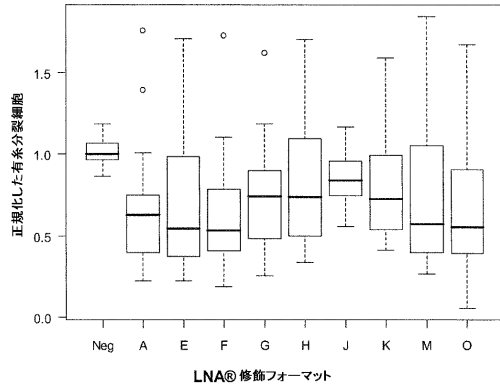


FIG. 10B

【図 10 D】

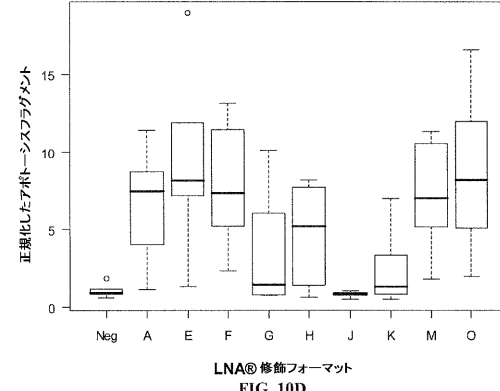


FIG. 10D

【図 10 C】

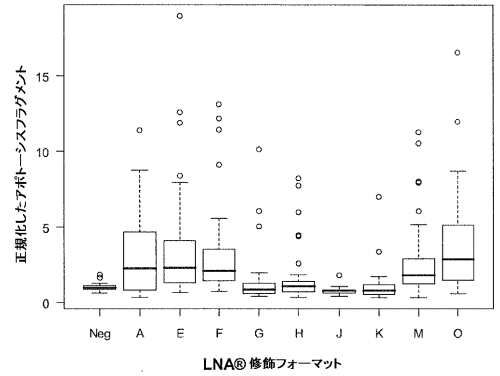


FIG. 10C

【図 10 E】

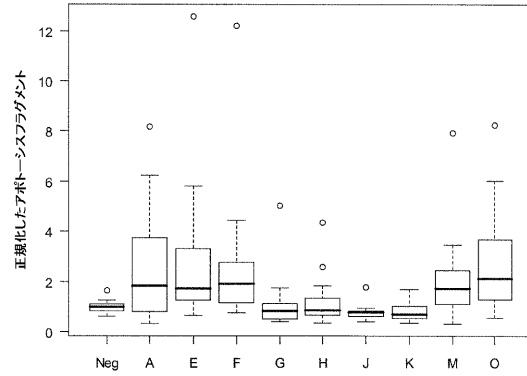


FIG. 10E

【図 11 A】

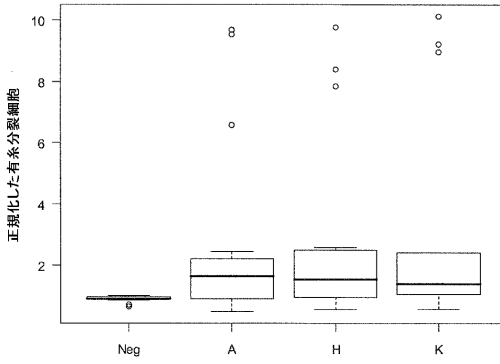


FIG. 11A

【図 11 C】

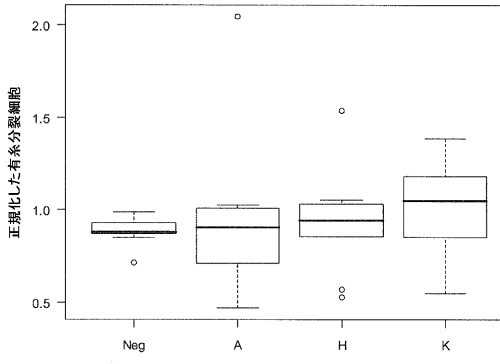


FIG. 11C

【図 11 B】

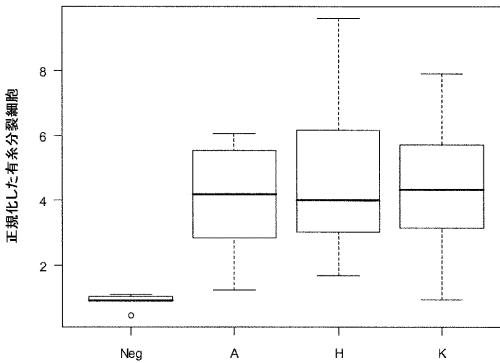


FIG. 11B

【図 11 D】

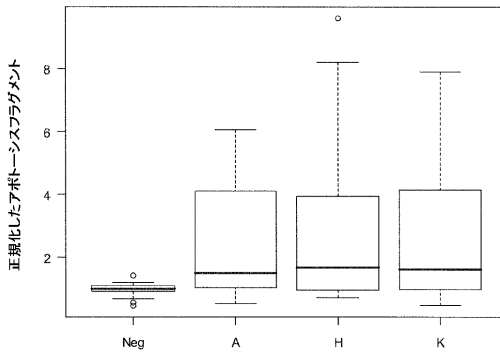
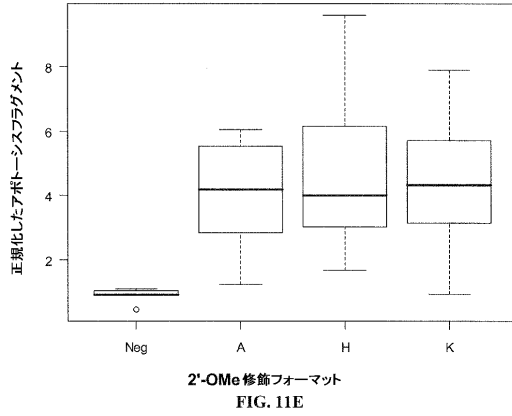
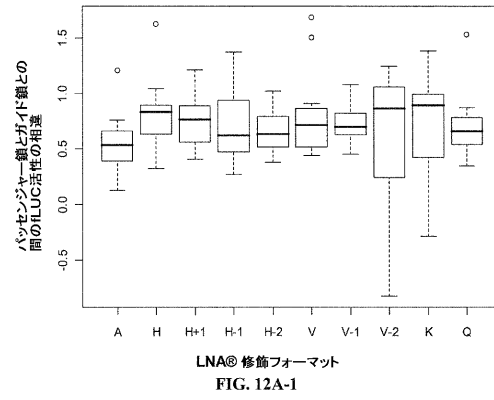


FIG. 11D

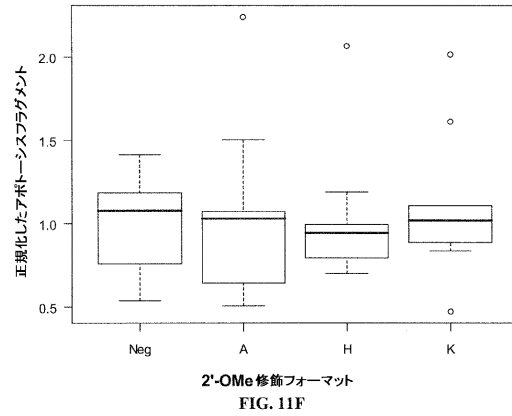
【図 1 1 E】



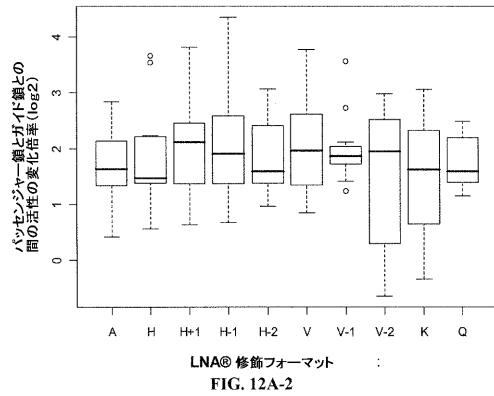
【図 1 2 A - 1】



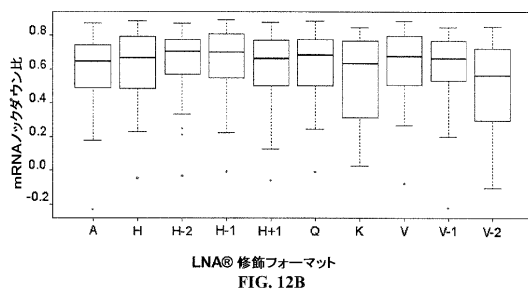
【図 1 1 F】



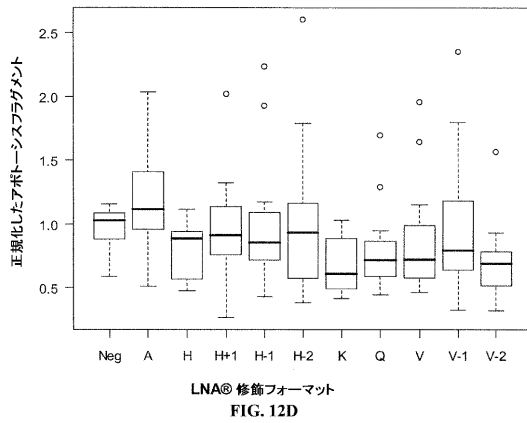
【図 1 2 A - 2】



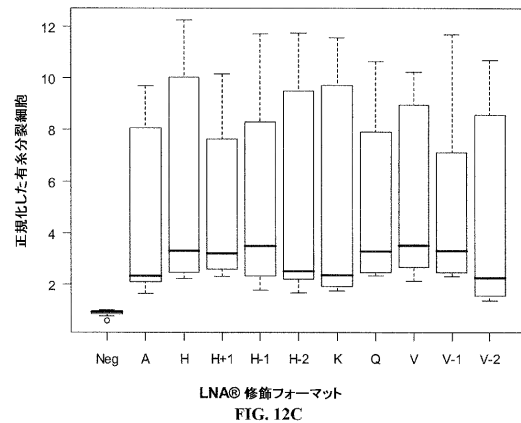
【図 1 2 B】



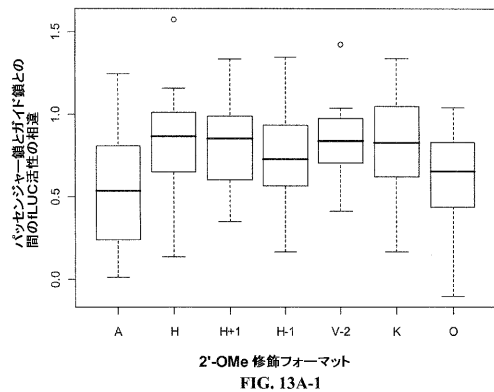
【図 1 2 D】



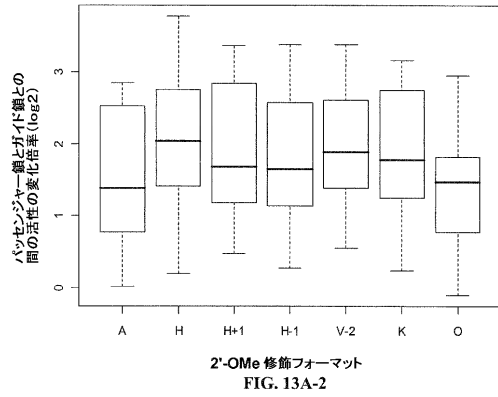
【図 1 2 C】



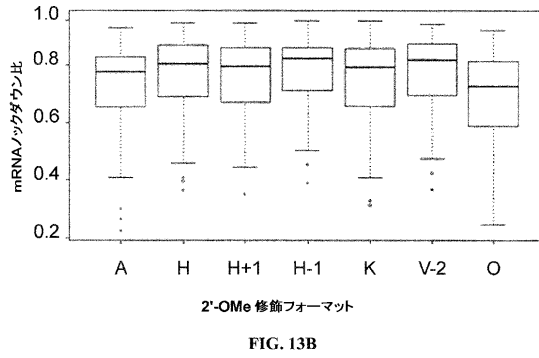
【図 1 3 A - 1】



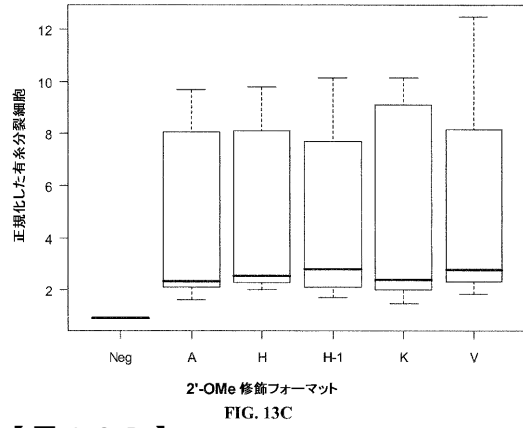
【図 13 A - 2】



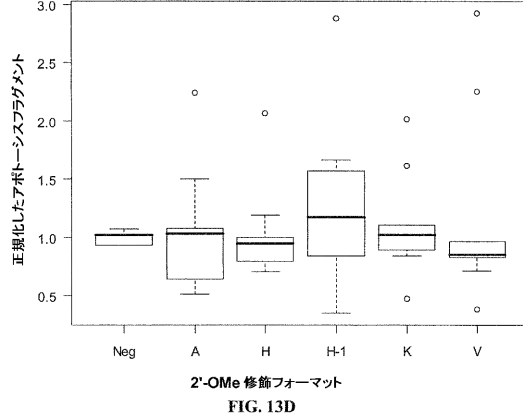
【図 13 B】



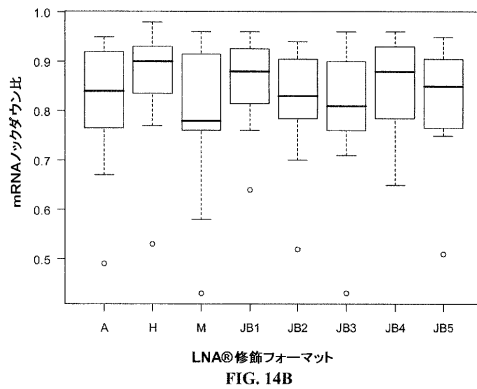
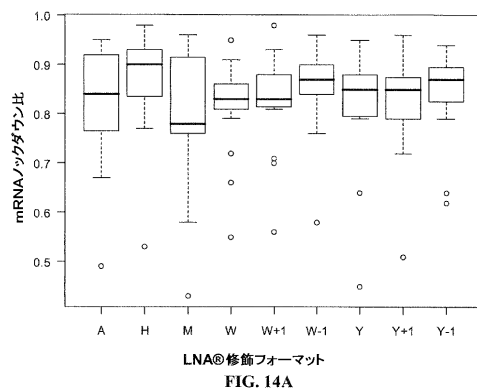
【図 13 C】



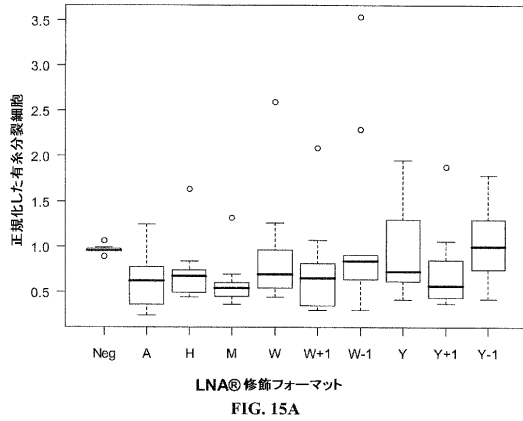
【図 13 D】



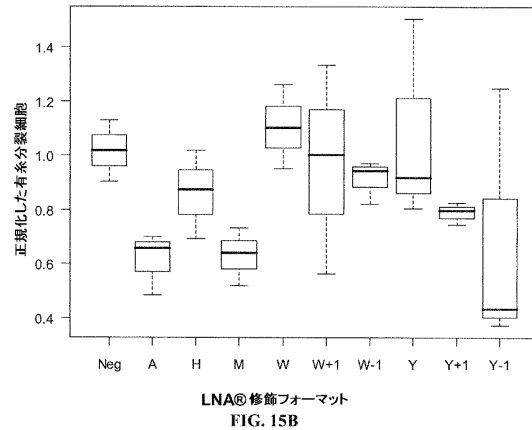
【図 14】



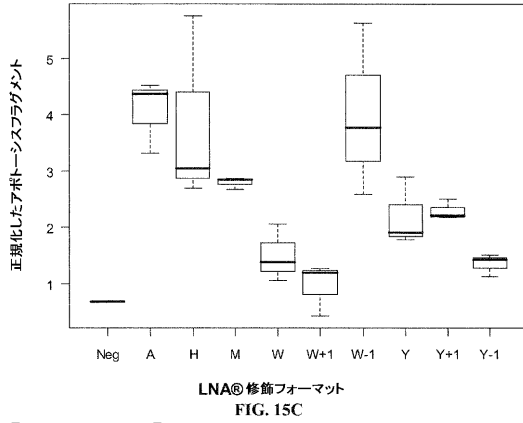
【図 15 A】



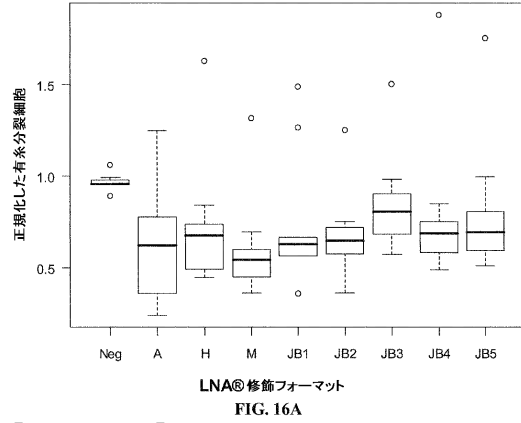
【図 15 B】



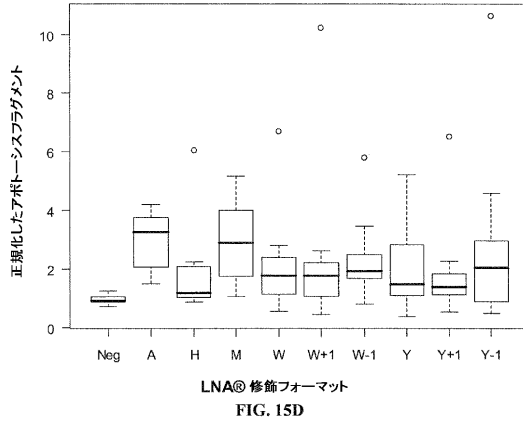
【図 15 C】



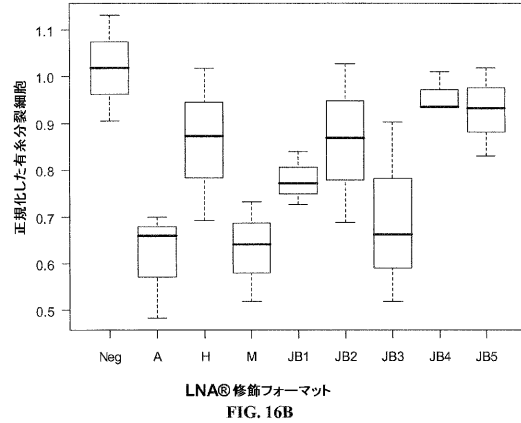
【図 16 A】



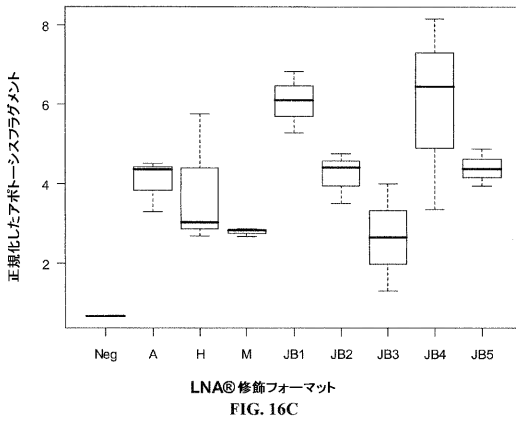
【図 15 D】



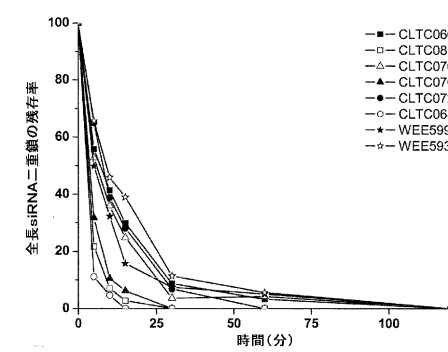
【図 16 B】



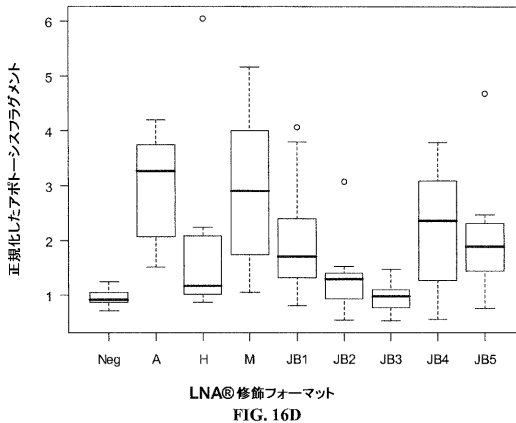
【図 16 C】



【図 17】



【図 16 D】



【図 18】

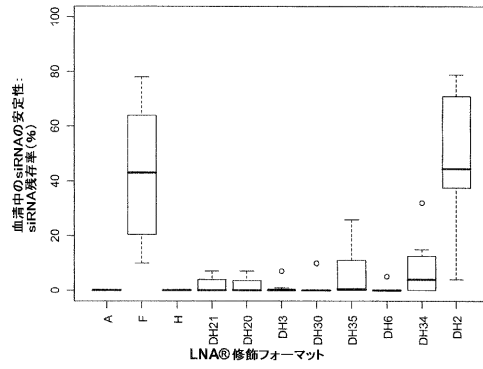


FIG. 18A

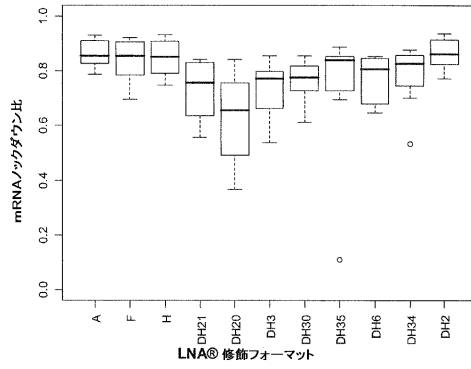


FIG. 18B

【図 19】

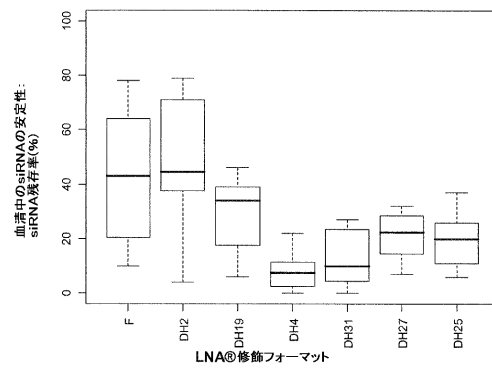


FIG. 19A

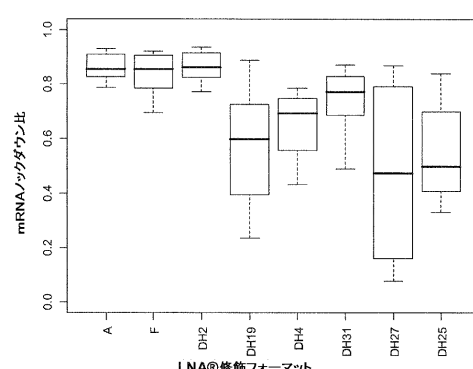


FIG. 19B

【図 20】

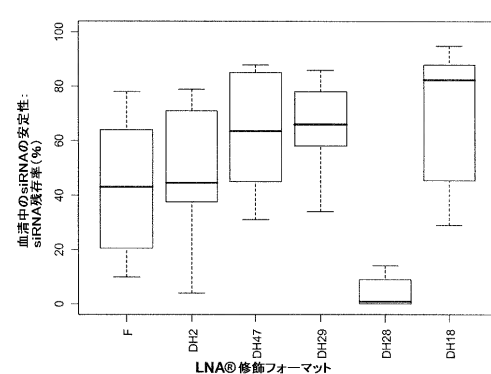


FIG. 20A

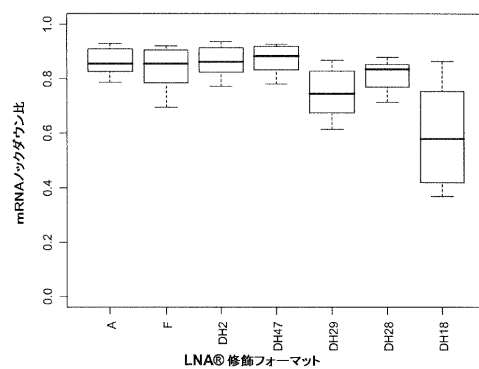


FIG. 20B

【図 21】

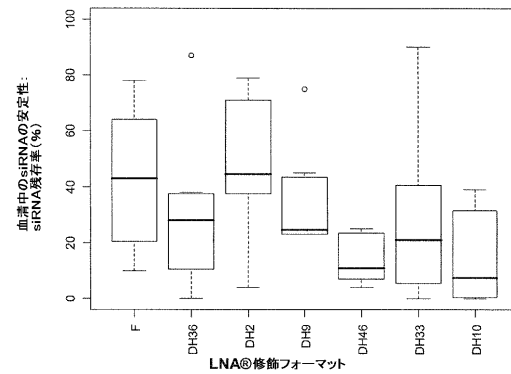


FIG. 21A

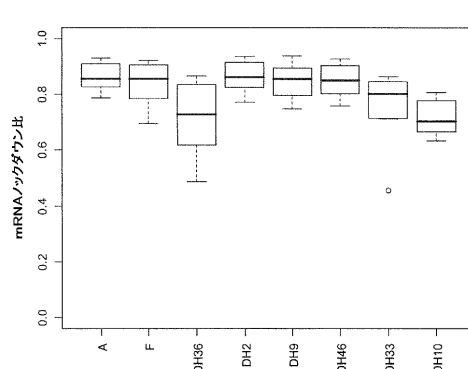
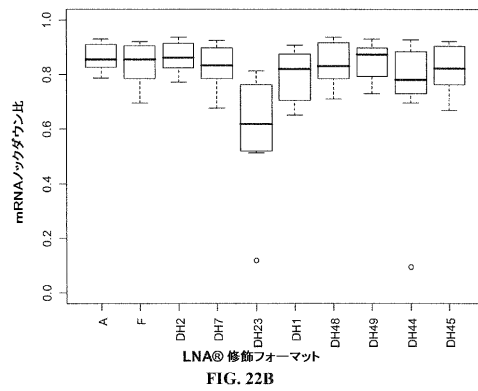
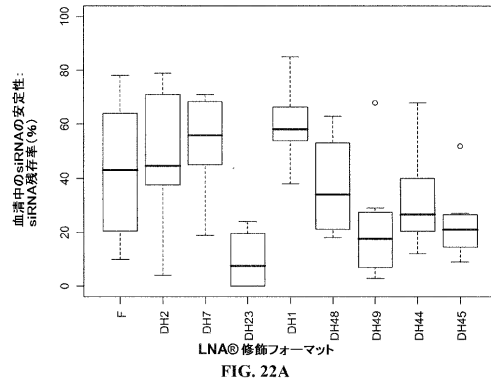
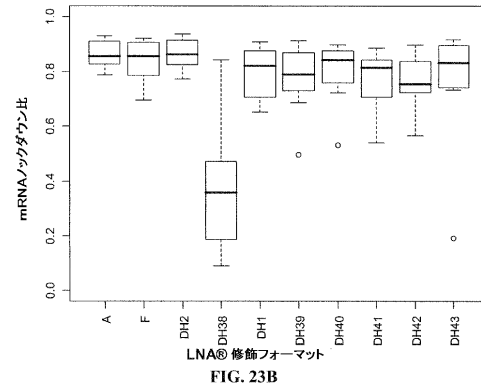
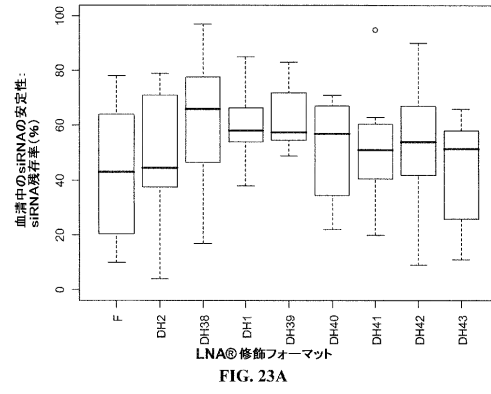


FIG. 21B

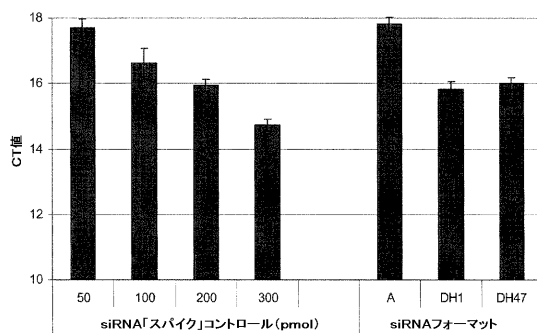
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



【 図 2 】

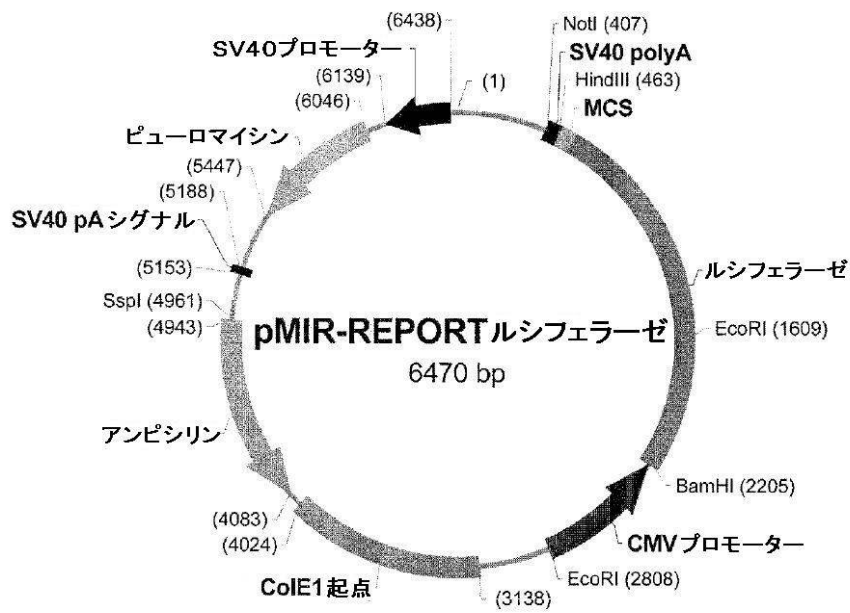


FIG. 2A

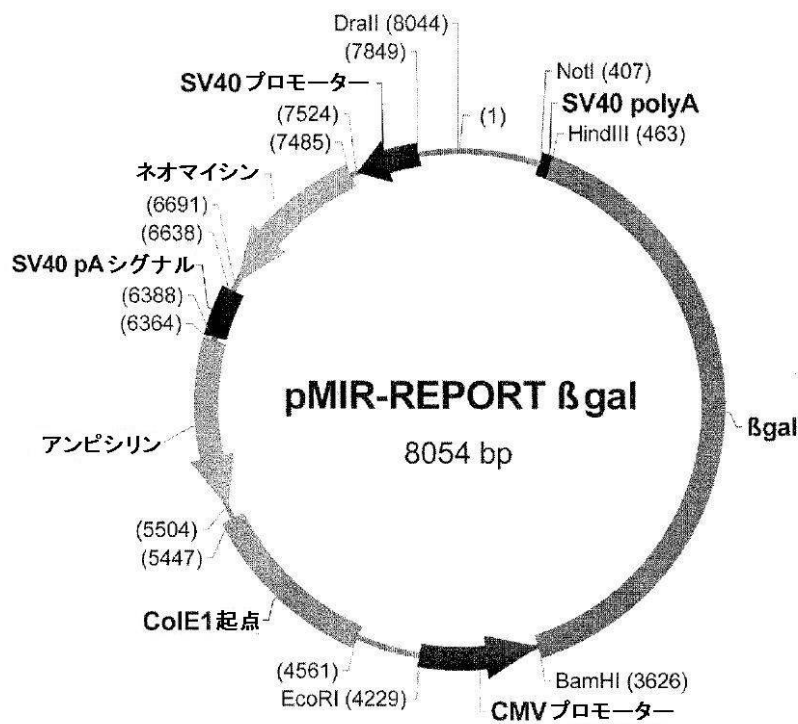


FIG. 2B

【図 9 A】

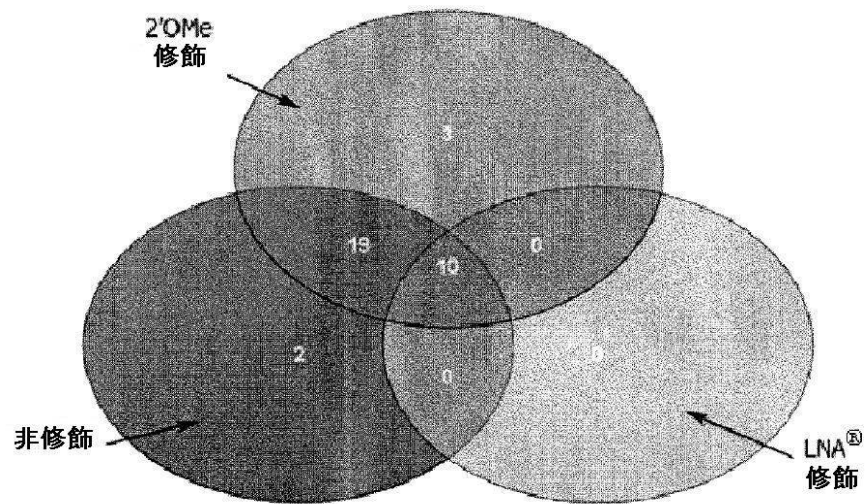


FIG. 9A

【図 9 B】

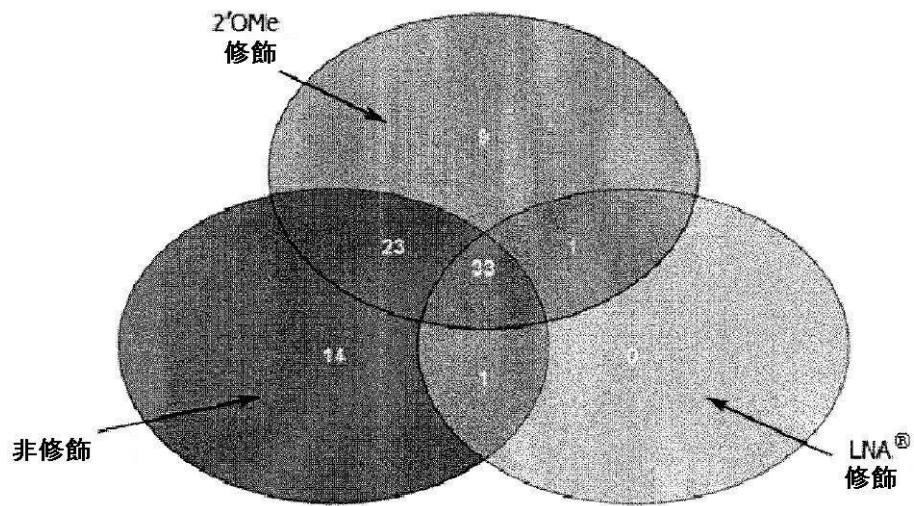


FIG. 9B

【図 9 C】

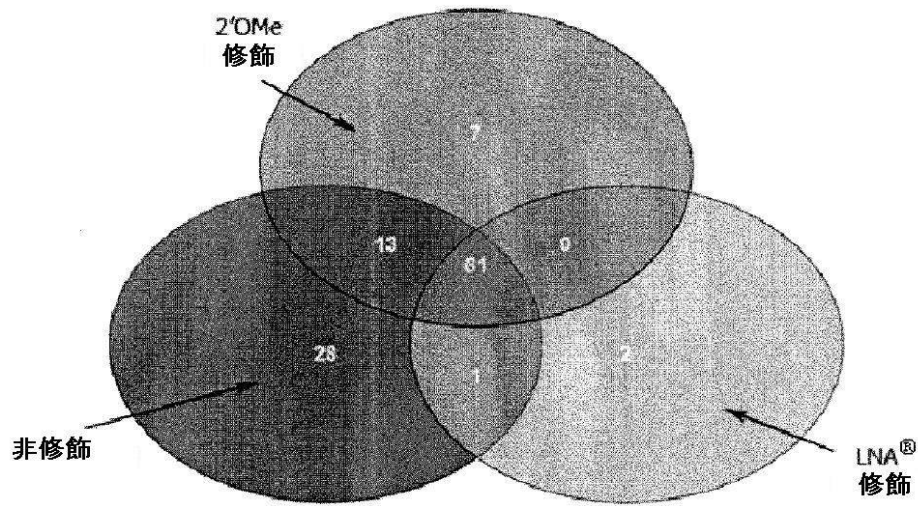


FIG. 9C

フロントページの続き

- (72)発明者 チャールズ, イルダヤ
アメリカ合衆国 テキサス 78739, オースティン, ムーン ウォーク 7220
- (72)発明者 マグダレノ, スーザン
アメリカ合衆国 テキサス 78748, オースティン, シャディー ホロー 10904
- (72)発明者 ブラッソフ, アレキサンダー
アメリカ合衆国 テキサス 78739, オースティン, バレントン コート 5704
- (72)発明者 バーネット, クリス
アメリカ合衆国 テキサス 78731, オースティン, ロックポート ドライブ 7625

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 国際公開第2004/083430(WO, A1)
ELMEN JOACIM, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2005年, V33 N1, P439-447
MOOK OLAF R, MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, 2007年 3月, V6 N3, P833-843
JACKSON AIMEE L, RNA, 米国, 2006年 7月, V12 N7, P1197-1205
RNA, 13[11](2007) p.1887-1893
PURI NITIN, NUCLEIC ACIDS SYMPOSIUM SERIES, 2008年, N52, P25-26

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/
CA/MEDLINE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
WPI