

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7009356号  
(P7009356)

(45)発行日 令和4年1月25日(2022.1.25)

(24)登録日 令和4年1月14日(2022.1.14)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A
C 1 2 N 5/10(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K 31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 P 43/00(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
請求項の数 24 (全152頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2018-502624(P2018-502624)	(73)特許権者	517346037
(86)(22)出願日	平成28年4月1日(2016.4.1)		ユニバーシティ・オブ・マサチューセツ
(65)公表番号	特表2018-516091(P2018-516091 A)		UNIVERSITY OF MASSA
(43)公表日	平成30年6月21日(2018.6.21)		CHUSETTS
(86)国際出願番号	PCT/US2016/025722		アメリカ合衆国02108マサチューセ
(87)国際公開番号	WO2016/161374		ッツ州ボストン、ビーコン・ストリート
(87)国際公開日	平成28年10月6日(2016.10.6)		1番、サーティファースト・フロア
審査請求日	平成31年1月24日(2019.1.24)	(74)代理人	100100158
(31)優先権主張番号	62/289,274		弁理士 鮫島 睦
(32)優先日	平成28年1月31日(2016.1.31)	(74)代理人	100122301
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 富田 憲史
(31)優先権主張番号	62/142,731	(74)代理人	100157956
(32)優先日	平成27年4月3日(2015.4.3)		弁理士 稲井 史生
	最終頁に続く	(74)代理人	100170520
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ハンチンチンmRNAをターゲティングするオリゴヌクレオチド化合物

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

生物におけるハンチンチン(HTT)遺伝子の発現を阻害することにおける治療的使用のための、5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号1)、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号2)または5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号3)に対する完全相補性を含む、15~35塩基長であるRNA分子。

## 【請求項2】

該RNA分子が一本鎖(ss)RNAまたは二本鎖(ds)RNAである、請求項1に記載の治療的使用のためのRNA分子であって、該RNA分子が、HTT遺伝子短mRNAの3'非翻訳領域(UTR)を標的とし、該RNA分子が、

2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミデート、非天然塩基含有ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、およびコレステリル誘導体またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合した末端ヌクレオチドからなる群から選択される、少なくとも一つの修飾ヌクレオチドを含むdsRNA

を含む、RNA分子。

## 【請求項3】

請求項2に記載のRNA分子および薬学的に許容される担体を含む、生物におけるハンチ

ンチン(H T T)遺伝子の発現を阻害することにおける治療的使用のための医薬組成物。

【請求項 4】

5'末端、3'末端を含み、標的に対する相補性を有し、ここで、

(1)RNA分子は交互の2'-メトキシ-リボヌクレオチドおよび2'-フルオロ-リボヌクレオチドを含み；

(2)5'末端から2位および14位のヌクレオチドは2'-メトキシ-リボヌクレオチドではなく；

(3)ヌクレオチドはホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合により結合し；  
そして

(4)3'末端から1~6位または3'末端から1~7位のヌクレオチドはホスホロチオエート結合により隣接ヌクレオチドと結合する、

請求項1に記載の治療的使用のためのRNA分子。

【請求項 5】

5'末端、3'末端および標的に対する相補性を有し、第一オリゴヌクレオチドおよび第二オリゴヌクレオチドを含み、ここで、

(1)第一オリゴヌクレオチドは配列番号1に示す配列を含み；

(2)第一オリゴヌクレオチドの一部は第二オリゴヌクレオチドの一部と相補的であり；

(3)第二オリゴヌクレオチドは交互の2'-メトキシ-リボヌクレオチドおよび2'-フルオロ-リボヌクレオチドを含み；

(4)第二オリゴヌクレオチドの3'末端から2位および14位のヌクレオチドは2'-メトキシ-リボヌクレオチドであり、そして

(5)第二オリゴヌクレオチドのヌクレオチドはホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合により結合する、

請求項2に記載のRNA分子。

【請求項 6】

以下：

第二オリゴヌクレオチドが第二オリゴヌクレオチドの3'末端で疎水性分子と結合する、ここで第二オリゴヌクレオチドと疎水性分子の結合がポリエチレングリコールまたはトリエチレングリコールを含む；

第二オリゴヌクレオチドの3'末端から1位および2位のヌクレオチドが隣接ヌクレオチドにホスホロチオエート結合により結合する；および

第二オリゴヌクレオチドの3'末端から1位および2位のヌクレオチドおよび第二オリゴヌクレオチドの5'末端から1位および2位のヌクレオチドが隣接リボヌクレオチドにホスホロチオエート結合により結合する、

の1つ以上を含む、請求項5に記載のRNA分子。

【請求項 7】

(a)細胞に請求項2に記載のRNA分子をインビトロで導入し；そして

(b)工程(a)で産生した細胞を、H T T遺伝子のmRNAトランスクリプトを分解させるのに十分な時間維持し、それにより、細胞におけるH T T遺伝子の発現を阻害することを含む、細胞におけるH T T遺伝子の発現をインビトロで阻害する方法。

【請求項 8】

請求項2に記載のRNA分子がdsRNAであって、

以下：

該dsRNAが患者の脳に投与される；

該dsRNAが線条体内注入により投与される；

請求項2に記載のdsRNAの脳への投与が、線条体におけるH T T遺伝子mRNAの減少を引き起こす；および

請求項2に記載のdsRNAの脳への投与が、皮質におけるH T T遺伝子mRNAの減少を引き起こす、

の1つ以上を含む、請求項2に記載の治療的使用のためのRNA分子。

10

20

30

40

50



## 【請求項 9】

細胞における H T T 遺伝子の発現を阻害することにおける治療的使用のためのベクターであって、5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号 1)、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号 2) または 5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号 3) に完全相補性である RNA 分子をコードするヌクレオチド配列に操作可能に結合した制御配列を含み、ここで、該 RNA 分子が 10 ~ 35 塩基長であり、該 RNA 分子が、該 H T T 遺伝子を発現する細胞と接触したとき、該 H T T 遺伝子の発現を少なくとも 20 % 阻害する、ベクター。

## 【請求項 10】

該 RNA 分子が、ssRNA である；または  
 該 RNA 分子が、dsRNA であり、30 ~ 35 塩基対長である、 請求項 9 に記載のベクターであって、該 dsRNA が、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖が 5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号 1)、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号 2) または 5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号 3) に対する完全相補性を含む、  
 ベクター。

10

## 【請求項 11】

請求項 10 に記載のベクターを含む、細胞。

## 【請求項 12】

生物におけるハンチンチン(H T T)遺伝子の発現を阻害することにおける治療的使用のための、5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号 1)、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号 2) または 5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号 3) に対する完全相補性を含む、15 ~ 35 塩基長である RNA 分子であって、H T T mRNA を標的とし、少なくとも一つの修飾ヌクレオチドを含む、RNA 分子。

20

## 【請求項 13】

該修飾ヌクレオチドがホスファチジルコリン誘導体に結合した末端ヌクレオチドである、請求項 12 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 14】

2 RNA 分子を含む二分岐 RNA 化合物であって、各 RNA 分子が、(i) 独立して 15 ~ 35 塩基長であり、および (ii) 5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号 1)、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号 2) または 5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号 3) に対する完全相補性を含み、ここで RNA 分子がリンカー、スパーサーおよび分岐点から独立して選択される 1 以上の部分により、互いに結合する、二分岐 RNA 化合物。

30

## 【請求項 15】

該 RNA 分子がアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは GAPMER 分子である、請求項 1 に記載の RNA 分子。

## 【請求項 16】

ヒトにおける H T T 遺伝子の発現を阻害することにおける使用のための、請求項 1、2、4 - 6、8 および 12 - 15 のいずれか一項に記載の RNA 分子。

40

## 【請求項 17】

ヒトにおける H T T 遺伝子の発現を阻害することにおける使用のための、請求項 3 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 18】

ハンチントン病を処置または管理するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項 2 に記載の RNA 分子を含む、医薬組成物。

## 【請求項 19】

5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号 1) に対する完全相補性を含む、請求項 1 に記載の治療的使用のための RNA 分子。

## 【請求項 20】

50

5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (配列番号2) に対する完全相補性を含む、請求項1に記載の治療的使用のためのRNA分子。

【請求項21】

5' CUCAGGAUUUAAA AU 3' (配列番号3) に対する完全相補性を含む、請求項1に記載の治療的使用のためのRNA分子。

【請求項22】

各RNA分子が、5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (配列番号1) に対する完全相補性を含む、請求項14に記載の二分岐RNA化合物。

【請求項23】

各RNA分子が、5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (配列番号2) に対する完全相補性を含む、請求項14に記載の二分岐RNA化合物。

10

【請求項24】

各RNA分子が、5' CUCAGGAUUUAAA AU 3' (配列番号3) に対する完全相補性を含む、請求項14に記載の二分岐RNA化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2016年1月31日出願の米国仮特許出願番号62/289,274号および2015年4月3日出願の米国仮特許出願番号62/142,731号に基づく優先権を主張し、これらの出願の全内容を、引用によりここに包含させる。

20

【0002】

連邦援助研究または開発に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所(NIH)により与えられる認可番号NS038194およびTR000888のもとに政府援助を受けて実施された。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、ハンチントン病の処置のための新規ハンチンチン標的および新規オリゴヌクレオチドに関する。

30

【背景技術】

【0004】

背景

ハンチントン病、パーキンソン病およびアルツハイマー病を含む神経障害は、主要なまだ満たされていない医療上の必要性を代表する。一部の症例では、これらの疾患は一遺伝子性であり、オリゴヌクレオチド治療介入、例えば、RNA干渉(RNAi)の理想的な標的となる。RNAiは、細胞機序を再プログラムし、標的mRNAをオン・デマンドで発現停止および分解させるのに使用できる、短二本鎖RNA断片を含む基本メカニズムである。このテクノロジーは臨床的に進歩しており、ヒトの機能遺伝学の分野に大改革をもたらしている。

40

【0005】

低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)およびネイキッドまたはわずかに修飾したsiRNAのウイルスベクターの送達を含む、多くのテクノロジーが、治療剤および機能研究用ツールとして、mRNAノックダウンのために探索されている(Sah, D. W. Y. & Aronin, N. Oligonucleotide therapeutic approaches for Huntington disease. J. Clin. Invest. 121, 500-507 (2011); DiFiglia, M. et al. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 17204-17209 (2007))。

50

## 【 0 0 0 6 】

A S Oはまた将来有望な手法であることも示されている。このテクノロジーは、送達媒体を用いずに細胞への効率的送達を行い、齧歯類および非ヒト霊長類の脳において、ハンチントン病の処置用の有効なノックダウンのために、脳に投与されている(Mantha, N., Das, S. K. & Das, N. G. RNAi-based therapies for Huntington's disease: delivery challenges and opportunities. *Therapeutic delivery* 3, 1061-1076 (2012); Kordasiewicz, H. B. et al. Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. *NEURON* 74, 1031-1044 (2012))。残念ながら、現在の研究は、わずか50%のサイレンシングを見るために700µgの蓄積用量を2週間で投与することが必要であることを示すのみである(Kordasiewicz, Supra)。

10

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 7 】

非修飾 siRNA (“ネイキッド siRNA”)は、これまで、より感受性の細胞株やインビボで組織に送達することが困難であった。リポフェクタミンのようなトランスフェクション試薬を使用できるが、有効かつ非毒性である範囲内のウィンドウは極めて狭く、比較可能なレベルのサイレンシングに必要な siRNA 対脂質比を決定するためには、ニューロンのパッチ毎に独立して最適化しなければならない(Bell, H., Kimber, W. L., Li, M. & Whittle, I. R. Liposomal transfection efficiency and toxicity on glioma cell lines: in vitro and in vivo studies. *NeuroReport* 9, 793-798 (1998); Dass, C. R. Cytotoxicity issues pertinent to lipoplex-mediated gene therapy in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1-9 (2010); Masotti, A. et al. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 68, 136-144 (2009); Zou, L. L. et al. Liposome-mediated NGF gene transfection following neuronal injury: potential therapeutic applications. *Gene Ther* 6, 994-1005 (1999))。疎水性に修飾された siRNA も、細胞および脳への送達の代替手段として使用されており(Sah, Supra; Soutschek, J. et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178 (2004); Cheng, K., Ye, Z., Guntaka, R. V. & Mahato, R. I. Enhanced hepatic uptake and bioactivity of type alpha1(I) collagen gene promoter-specific triplex-forming oligonucleotides after conjugation with cholesterol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317, 797-805 (2006); Byrne, M. et al. Novel Hydrophobically Modified Asymmetric RNAi Compounds (sd-rxRNA) Demonstrate Robust Efficacy in the Eye. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 29, 855-864 (2013))、これらの化合物のいくつかは臨床にまで進んでいるが、送達を最大にしながら、化学的安定性および最小毒性の両者を確実にするのは、困難な課題のままである。RNAiテクノロジーにおける現在のハードルは、機能ゲノム研究および治療剤の両方に使用される能力を制限し、インビトロおよびインビボ両方での神経科学領域に適用されるようにそれらの設計を改善する機会を提供している。

20

30

40

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 8 】

## 要約

従って、ここに提供するのは、新規ハンチンチン標的配列である。新規ハンチンチン標的配列を標的とする新規RNA分子(例えば、siRNA)も提供される。該新規RNA分子(例えば、siRNA)は、効能および効力を、インビトロでの一次ニューロンおよびインビボでの単回低用量注射後のマウス脳の両方で示す。

## 【 0 0 0 9 】

50

ある側面において、5' CAGUAAAGAGA UUA 3' (配列番号1)に実質的に相補性である相補性領域を含む、15~30塩基長または15~35塩基長であるRNA分子が提供される。

【0010】

ある態様において、RNA分子は、一本鎖(ss)RNAまたは二本鎖(ds)RNAである。ある態様において、dsRNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、5' CAGUAAAGAGA UUA 3' (配列番号1)と実質的に相補性である相補性領域を含む。

【0011】

ある態様において、dsRNAは、30~35塩基対長である。ある態様において、相補性領域は、配列番号1の少なくとも10、11、12または13連続ヌクレオチドと相補性である。ある態様において、相補性領域は、配列番号1と3未満のミスマッチを含む。ある態様において、相補性領域は、配列番号1と完全相補性である。

10

【0012】

ある態様において、dsRNAは平滑末端である。ある態様において、dsRNAは、少なくとも一つの一本鎖ヌクレオチドオーバーハングを含む。ある態様において、dsRNAは、天然に存在するヌクレオチドを含む。

【0013】

ある態様において、dsRNAは、少なくとも一つの修飾ヌクレオチドを含む。ある態様において、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'ホスホロチオエート基を含むヌクレオチドおよびコレステリル誘導体またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合した末端ヌクレオチドからなる群から選択される。ある態様において、修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミデートおよび非天然塩基含有ヌクレオチドからなる群から選択される。ある態様において、dsRNAは、少なくとも一つの2'-O-メチル修飾ヌクレオチドおよび少なくとも一つの5'ホスホロチオエート基を含むヌクレオチドを含む。

20

【0014】

ある態様において、RNA分子は5'末端、3'末端を含み、標的に対する相補性を有し、ここで、(1)RNA分子は交互の2'-メトキシ-リボヌクレオチドおよび2'-フルオロ-リボヌクレオチドを含み；(2)5'末端から2位および14位のヌクレオチドは2'-メトキシ-リボヌクレオチドではなく；(3)ヌクレオチドはホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合により結合し；そして(4)3'末端から1~6位または3'末端から1~7位のヌクレオチドはホスホロチオエート結合により隣接ヌクレオチドと結合する。

30

【0015】

ある態様において、dsRNAは、5'末端、3'末端および標的に対する相補性を有し、第一オリゴヌクレオチドおよび第二オリゴヌクレオチドを含み、ここで、(1)第一オリゴヌクレオチドは配列番号1に示す配列を含み；(2)第一オリゴヌクレオチドの一部は第二オリゴヌクレオチドの一部と相補的であり；(3)第二オリゴヌクレオチドは交互の2'-メトキシ-リボヌクレオチド2'-フルオロ-リボヌクレオチドを含み；(4)第二オリゴヌクレオチドの3'末端から2位および14位のヌクレオチドは2'-メトキシ-リボヌクレオチドであり；そして(5)第二オリゴヌクレオチドのヌクレオチドはホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合により結合する。

40

【0016】

ある態様において、第二オリゴヌクレオチドは、第二オリゴヌクレオチドの3'末端で疎水性分子に結合する。ある態様において、第二オリゴヌクレオチドと疎水性分子の結合は、ポリエチレングリコールまたはトリエチレングリコールを含む。ある態様において、第二オリゴヌクレオチドの3'末端から1位および2位のヌクレオチドは、隣接ヌクレオチドにホスホロチオエート結合により結合する。ある態様において、第二オリゴヌクレオチドの

50

3'末端から1位および2位のヌクレオチドおよび第二オリゴヌクレオチドの5'末端から1位および2位のヌクレオチドは、隣接リボヌクレオチドにホスホロチオエート結合により結合する。

【0017】

ある側面において、dsRNAおよび薬学的に許容される担体を含む、生物におけるHTT遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物が提供される。dsRNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。dsRNAは15~35塩基対長であり、アンチセンス鎖は、5' CAGUAAAGAGAUUA 3' (配列番号1)に実質的に相補性である相補性領域を含む。

【0018】

ある態様において、dsRNAはコレステロール部分を含む。

【0019】

ある側面において、細胞におけるHTT遺伝子の発現を阻害する方法が提供される。方法は、細胞にセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖リボ核酸(dsRNA)(dsRNAは15~35塩基対長であり、アンチセンス鎖は5' CAGUAAAGAGAUUA 3' (配列番号1)に実質的に相補性である相補性領域を含む)を導入し、工程(a)で産生した細胞を、HTT遺伝子のmRNAトランスクリプトを分解させるのに十分な時間維持し、それにより、細胞におけるHTT遺伝子の発現を阻害する、工程を含む。

【0020】

ある側面において、ハンチントン病を処置または管理する方法であって、このような処置または管理を必要とする患者に、治療有効量のdsRNAを投与することを含む、方法が提供される。dsRNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、15~35塩基対長であり、アンチセンス鎖は5' CAGUAAAGAGAUUA 3' (配列番号1)に実質的に相補性である相補性領域を含む。

【0021】

ある態様において、dsRNAは、患者の脳に投与される。ある態様において、dsRNAは、線条体内、脳室内および/または髄腔内注入および/またはポンプのいずれかにより投与される。ある態様において、dsRNAの脳への投与は、線条体におけるHTT遺伝子mRNAの減少を引き起こす。ある態様において、dsRNAの脳への投与は、皮質におけるHTT遺伝子mRNAの減少を引き起こす。

【0022】

ある側面において、細胞におけるHTT遺伝子の発現を阻害するためのベクターが提供される。ベクターは、5' CAGUAAAGAGAUUA 3' (配列番号1)に実質的に相補性であるRNA分子をコードするヌクレオチド配列に操作可能に結合した制御配列を含み、ここで、該RNA分子は15~35塩基長であり、該RNA分子は、該HTT遺伝子を発現する細胞と接触したとき、該HTT遺伝子の発現を少なくとも20%阻害する。

【0023】

ある態様において、RNA分子はssRNAまたはdsRNAである。ある態様において、dsRNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は5' CAGUAAAGAGAUUA 3' (配列番号1)と実質的に相補性である相補性領域を含む。

【0024】

ある側面において、細胞におけるHTT遺伝子の発現を阻害するためのベクターを含む細胞が提供される。ベクターは、5' CAGUAAAGAGAUUA 3' (配列番号1)に実質的に相補性であるRNA分子をコードするヌクレオチド配列に操作可能に結合した制御配列を含み、ここで、該RNA分子は15~35塩基長であり、該RNA分子は、該HTT遺伝子を発現する細胞と接触したとき、該HTT遺伝子の発現を少なくとも20%阻害する。

【0025】

ある態様において、RNA分子はssRNAまたはdsRNAである。ある態様において、dsRNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は5' C A

10

20

30

40

50

G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号1)と実質的に相補性である相補性領域を含む。

【0026】

ある側面において、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号2)または5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号3)に実質的に相補性である相補性領域を含む、15~35塩基長であるRNA分子が提供される。

【0027】

ある態様において、RNA分子は一本鎖(ss)RNAまたは二本鎖(ds)RNAである。ある態様において、dsRNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号1)と実質的に相補性である相補性領域を含む。

10

【0028】

ある態様において、dsRNAは30~35塩基対長である。ある態様において、相補性領域は、配列番号2または3の少なくとも10、11、12または13連続ヌクレオチドと相補性である。ある態様において、相補性領域は、配列番号1と3個以下のミスマッチを含む。ある態様において、相補性領域は、配列番号2または3と完全相補性である。

【0029】

ある態様において、dsRNAは平滑末端である。ある態様において、dsRNAは少なくとも一つの一本鎖ヌクレオチドオーバーハングを含む。ある態様において、dsRNAは天然に存在するヌクレオチドを含む。

【0030】

ある態様において、dsRNAは少なくとも一つの修飾ヌクレオチドを含む。ある態様において、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'ホスホロチオエート基を含むヌクレオチドおよびコレステリル誘導体またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合した末端ヌクレオチドからなる群から選択される。ある態様において、修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミデートおよび非天然塩基含有ヌクレオチドからなる群から選択される。ある態様において、dsRNAは少なくとも一つの2'-O-メチル修飾ヌクレオチドおよび少なくとも一つの5'ホスホロチオエート基を含むヌクレオチドを含む。

20

【0031】

ある態様において、RNA分子は5'末端、3'末端を含み、標的に対する相補性を有し、ここで、(1)RNA分子は交互の2'-メトキシ-リボヌクレオチドおよび2'-フルオロ-リボヌクレオチドを含み；(2)5'末端から2位および14位のヌクレオチドは2'-メトキシ-リボヌクレオチドではなく；(3)ヌクレオチドはホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合により結合し；そして(4)3'末端から1~6位または3'末端から1~7位のヌクレオチドはホスホロチオエート結合により隣接ヌクレオチドと結合する。

30

【0032】

ある態様において、dsRNAは5'末端、3'末端および標的に対する相補性を有し、第一オリゴヌクレオチドおよび第二オリゴヌクレオチドを含み、ここで、(1)第一オリゴヌクレオチドは配列番号1に示す配列を含み；(2)第一オリゴヌクレオチドの一部は第二オリゴヌクレオチドの一部と相補的であり；(3)第二オリゴヌクレオチドは交互の2'-メトキシ-リボヌクレオチド2'-フルオロ-リボヌクレオチドを含み；(4)第二オリゴヌクレオチドの3'末端から2位および14位のヌクレオチドは2'-メトキシ-リボヌクレオチドであり；および(5)第二オリゴヌクレオチドのヌクレオチドはホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合により結合する。

40

【0033】

ある態様において、第二オリゴヌクレオチドは、第二オリゴヌクレオチドの3'末端で疎水性分子と結合する。ある態様において、第二オリゴヌクレオチドと疎水性分子の結合はポリエチレングリコールまたはトリエチレングリコールを含む。ある態様において、第二オ

50

リゴヌクレオチドの3'末端から1位および2位のヌクレオチドは、隣接ヌクレオチドにホスホロチオエート結合により結合する。ある態様において、第二オリゴヌクレオチドの3'末端から1位および2位のヌクレオチドおよび第二オリゴヌクレオチドの5'末端から1位および2位のヌクレオチドは、隣接リボヌクレオチドにホスホロチオエート結合により結合する。

【0034】

ある側面において、dsRNAおよび薬学的に許容される担体を含む、生物におけるHTT遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物が提供される。dsRNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。dsRNAは15~35塩基対長であり、アンチセンス鎖は5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (配列番号2)または5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (配列番号3)に実質的に相補性である相補性領域を含む。 10

【0035】

ある態様において、dsRNAはコレステロール部分を含む。

【0036】

ある側面において、細胞におけるHTT遺伝子の発現を阻害する方法が提供される。該方法は、細胞にセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖リボ核酸(dsRNA)(dsRNAは15~35塩基対長であり、アンチセンス鎖は5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (配列番号2)または5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (配列番号3)に実質的に相補性である相補性領域を含む)を導入し、工程(a)で産生した細胞を、HTT遺伝子のmRNAトランスクリプトを分解させるのに十分な時間維持し、それにより、細胞におけるHTT遺伝子の発現を阻害する。 20

【0037】

ある側面において、ハンチントン病を処置または管理する方法であって、このような処置または管理を必要とする患者に治療有効量のdsRNAを投与する、方法が提供される。dsRNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、15~35塩基対長であり、アンチセンス鎖は5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (配列番号2)または5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (配列番号3)に実質的に相補性である相補性領域を含む。

【0038】

ある態様において、dsRNAは患者の脳に投与される。ある態様において、dsRNAは、線条体内注入により投与される。ある態様において、dsRNAの脳への投与は、線条体におけるHTT遺伝子mRNAの減少を引き起こす。ある態様において、dsRNAの脳への投与は、皮質におけるHTT遺伝子mRNAの減少を引き起こす。 30

【0039】

ある側面において、細胞におけるHTT遺伝子の発現を阻害するためのベクターが提供される。ベクターは、5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (配列番号2)または5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (配列番号3)に実質的に相補性であるRNA分子をコードするヌクレオチド配列に操作可能に結合した制御配列を含み、ここで、該RNA分子は15~35塩基長であり、該RNA分子は、該HTT遺伝子を発現する細胞と接触したとき、該HTT遺伝子の発現を少なくとも20%阻害する。

【0040】

ある態様において、RNA分子はssRNAまたはdsRNAである。ある態様において、dsRNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (配列番号2)または5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (配列番号3)に実質的に相補性である相補性領域を含む。 40

【0041】

ある側面において、細胞におけるHTT遺伝子の発現を阻害するためのベクターを含む細胞が提供される。ベクターは5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (配列番号2)または5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (配列番号3)に実質的に相補性であるRNA分子をコードするヌクレオチド配列に操作可能に結合した制御配列を含み、ここで、該RNA分子は15~35塩基長であり、該RNA分子は、該HTT遺伝子を発現する細胞と接触 50

したとき、該 H T T 遺伝子の発現を少なくとも 20% 阻害する。

【0042】

ある態様において、RNA 分子は ssRNA または dsRNA である。ある態様において、dsRNA はセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は 5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号 2) または 5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号 3) に実質的に相補性である相補性領域を含む。

【0043】

ある側面において、15 ~ 35 塩基長である RNA 分子が提供される。RNA 分子は、5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号 1)、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号 2) または 5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号 3) に実質的に相 10 補性である相補性領域を含み、RNA 分子は、H T T 遺伝子短 mRNA の 3' 非翻訳領域 (U T R) を標的とする。

【0044】

H T T 遺伝子短 mRNA の 3' U T R は次のとおりである。

【化 1】

```
AGCGCCAUGGUGGGAGAGACUGUGAGGCGGCAGCUGGGGCCGGAGCCUUUGGAAGUCUGCGC
CCUUGUGCCCUGCCUCCACCGAGCCAGCUUGGUCCCUAUGGGCCUCCGCACAUGCCGCGGGC
GGCCAGGCAACGUGCGUGUCUCUGCCAUGUGGCAGAAGUGCUCUUUGUGGCAGUGGCCAGGC
AGGGAGUGUCUGCAGUCCUGGUGGGGCUGAGCCUGAGGCCUUCAGAAAGCAGGAGCAGCUG 20
UGCUGCACCCCAUGUGGGUGACCAGGUCCUUUCUCCUGAUAGUCACCUGCUGGUUGUUGCCA
GGUUGCAGCUGCUCUUGCAUCUGGGCCAGAAGUCCUCCCUCUGCAGGCUGGCUGUUGGCC
CUCUGCUGUCCUGCAGUAGAAGGUGCCGUGAGCAGGCCUUUGGGAACACUGGCCUGGGUCUCC
CUGGUGGGGUGUGCAUGCCACGCCCCGUGUCUGGAUGCACAGAUGCCAUGGCCUGUGCUGGG
CCAGUGGCUGGGGGUGCUAGACACCCGGCACCAUUCUCCUUCUCUUUUUCUUCUCAGGAU
UUAAAAUUAAAUUAUAUCAGUAAAGAGAUUAAUUUUAAACGUAACUCUUUCUAUGCCCGUGUA
```

(配列番号 4)

【0045】

ある態様において、RNA 分子は ssRNA または dsRNA である。ある態様において、dsRNA はセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は 5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号 1)、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号 2) または 5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号 3) と実質的に相補性である相補性領域を含む。

【0046】

ある側面において、5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号 1)、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号 2) または 5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号 3) に実質的に相補性である相補性領域を含む ds 15 ~ 35 塩基長である RNA 40 分子が提供され、ここで、RNA 分子は H T T mRNA を標的とし、少なくとも一つの修飾ヌクレオチドを含む。ある態様において、修飾ヌクレオチドは、ホスファチジルコリン誘導体に結合した末端ヌクレオチドである。

【0047】

ある側面において、5' C A G U A A A G A G A U U A A 3' (配列番号 1)、5' A U A U C A G U A A A G A G A 3' (配列番号 2) または 5' C U C A G G A U U U A A A A U 3' (配列番号 3) に実質的に相補性である相補性領域を含む、15 ~ 35 塩基長である 2 RNA 分子を含む二分岐 RNA 化合物が提供され、ここで、2 RNA 分子は、リンカー、スパーサーおよび分岐点から独立して選択される 1 以上の部分により、互いに結合する。

【0048】

20

30

40

50



ここに記載する側面のいずれかにおいて、RNA分子はアンチセンス分子(例えば、ASO)またはGAPMER分子である。ある態様において、アンチセンス分子は、相補性領域の分解を増強する。ある態様において、分解は、ヌクレアーゼ分解(例えば、RNase H)である。

【0049】

図面の簡単な説明

本発明の前記のおよび他の特性および利点は、添付する図面と組み合わせて解説する、下記の説明的態様の詳細な説明からより完全に理解される。特許または出願書類は、カラーで提出した少なくとも一枚の図を含む。カラー図面を含むこの特許または特許出願公報は、請求と必要な費用の支払いにより、役所から提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1A-B】疎水性siRNA構造および化学的組成および一次皮質ニューロンにおける効率的内部移行を記載する。A)疎水性修飾および安定化されたsiRNA(hsiRNA)の模式図；B)Cy3-HTT10150 hsiRNA(赤色)(0.5 μM)を一次皮質ニューロンに添加した。ツァイス共焦点顕微鏡、63X、ヘキスト色素(青色)で各染色して造影。

【0051】

【図2A-C】線グラフ(A)または棒グラフ(B)および(C)としてプロットしたハンチンチンmRNAをターゲティングする非公式化hsiRNAの系統的スクリーニングを示す。94個のhsiRNAの一団を、HeLa細胞に1.5 μMで添加した。ハンチンチンmRNAのレベルを72時間目にハウスキーピング遺伝子、PPIB(シクロフィリンB)に対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n=3、平均±SD)。UNT - 未処理細胞、NTC - 非ターゲティング対照。活性化化合物(赤色)を、さらなる分析のために選択した。

20

【0052】

【図3A-C】受動的(A)および脂質介在送達(B)両方での、HTT10150によるハンチンチンmRNAの濃度依存的サイレンシングを示す。化学的修飾は、siRNA RISCRNA誘導サイレンシング複合体)エンタリーに負に影響することなく、受動的取り込みを可能にする。HeLa細胞を、示す濃度の修飾(疎水性および塩基化学的修飾の両方を含む)または非修飾HTT10150と、RNAIMAX非存在下(A)および存在下(B)インキュベートした。ハンチンチンmRNAのレベルを72時間目にハウスキーピング遺伝子、PPIB(シクロフィリンB)に対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n=3、平均±SD)。UNT - 未処理細胞。IC50値はここに記載するとおり計算した。(C)はこれらの結果を要約する表である。

30

【0053】

【図4A-B】一次ニューロンにおけるHTT10150によるハンチンチンmRNAおよびタンパク質の濃度依存的サイレンシングをグラフ的に示す(受動的取り込み)。一次ニューロンを、示す濃度のHTT10150とインキュベートした。ハンチンチンmRNAのレベルを、ハウスキーピング遺伝子、PPIB(シクロフィリンB)に対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n=3、平均±SD)。UNT - 未処理細胞。A)一次皮質および線条体ニューロンにおける、1週間。B)HTT10150と1週間インキュベーション後のハンチンチンタンパク質レベルをウェスタンブロットにより検出し、α-チューブリンに対して正規化した。

40

【0054】

【図5A-H】HTT10150の単回線条体内注射は、24時間後、注射部位に同側性のニューロンおよび神経索に局在化することを示す。1nmol CY3-HTT10150(赤色)を、WT(FVBNj)マウスの線条体に一側性に注射した。脳を24時間後採取し

50

、パラフィン包埋および切片化した。(A)冠状脳切片のタイル画像(16X)。HTT10150の大部分は、鋭い勾配の拡散を伴い、注射部位に局在化した。(B)矢状脳切片のタイル画像(16X)、注射部位。(C)冠状脳切片の画像(40X)、非注射部位。(D)冠状脳切片の画像(40X)、注射部位。(E、G)非注射部位からのNueN染色ニューロン(60X)。(F、H)注射部位からのNueN染色ニューロン(60X)。

【0055】

【図6】インビボでのHTT10150有効性評価をグラフ的に示す。HTT10150を、WT(FVB)マウスの線条体に一側性に注射した(2 $\mu$ l)。120時間目にマウスを殺した。脳を300 $\mu$ m切片にスライスし、線条体の6個の2mmパンチ生検を、同側の側および対側の側の両方から採取した。ハンチンチンmRNAのレベルを、ハウスキーピング遺伝子、PPIB(シクロフィリンB)に対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n=24、平均 $\pm$ SEM、8動物、領域あたり3生検)。

10

【0056】

【図7A-E】HTT10150が、注射部位付近にDARPP-32陽性ニューロンにおいて毒性を示さないことを示す。HTT10150を、WT(FVB)マウスの線条体に一側性に注射した。脳を5日後に採取し、固定し、切片化し、DARPP-32に対する抗体で染色した(A~D)。ACSF[完全脳スキャンおよび60X拡大率(A、B)]または12.5 $\mu$ g HTT10150[完全脳スキャンおよび60X拡大率(C、D)]の注射後の線条体の代表的画像。DARPP-32陽性ニューロンの定量化(E)(n=3動物、平均 $\pm$ SD)。

20

【0057】

【図8】ある態様による、標的配列、修飾オリゴヌクレオチドおよびそれらの有効性を示す。

【0058】

【図9】一次皮質ニューロンにおけるhsiRNAの経時的な効率的取り込みおよび内部移行を示す。Cy3-HTT10150 hsiRNA(赤色)、0.5 $\mu$ Mを一次皮質ニューロンに添加した。ツァイス共焦点顕微鏡、63X、ヘキスト色素(青色)で各染色して造影。

【0059】

【図10A-B】HeLa細胞におけるHTT10150によるハンチンチンmRNAの濃度依存的サイレンシングをグラフ的に示す。ハンチンチンmRNAのレベルを72時間目にハウスキーピング遺伝子、PPIB(シクロフィリンB)に対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n=3、平均 $\pm$ SD)。UNT - 未処理細胞、NTC - 非ターゲティング対照。A)受動的取り込みにおける16活性配列の用量応答(製剤せず)。B)脂質介在取り込みにおける、8選択配列の用量応答(Invitrogen LIPOFECTAMINE RNAIMAX Transfection Reagentを使用)。用量応答データを、GraphPad Prism 6.03を使用して適合させた。

30

【0060】

【図11A-B】ハンチンチンmRNAレベルをグラフ的に示す。A)HTT10150およびNTCと一次皮質ニューロンを72時間および1週間インキュベーション後、細胞生存能をALAMAR BLUE(Life Technologies)を使用して試験した。B)一次皮質ニューロンを、示す濃度の3HTT hsiRNA配列HTT10150、HTT10146およびHTT1215とインキュベートした。ハンチンチンmRNAのレベルを、ハウスキーピング遺伝子、PPIB(シクロフィリンB)に対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n=3、平均 $\pm$ SD)。UNT - 未処理細胞。

40

【0061】

【図12A-B】一次ニューロンにおけるHTT10150によるハンチンチンmRNAの濃度依存的サイレンシングをグラフ的に示す(受動的取り込み)。一次ニューロンを、示

50

す濃度のHTT10150とインキュベートした。ハンチンチンmRNAのレベルを、ハウスキーピング遺伝子、PPIB(シクロフィリンB)に対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n = 3、平均 ± SD)。UNT - 未処理細胞。A) 72時間および1週間について。B) 1週間、2週間および3週間について。

【0062】

【図13】一次皮質ニューロンにおけるシクロフィリンB(PPIB)に対するhsiRNAの有効性をグラフ的に示す。一次ニューロンを、示す濃度のPPIBをターゲティングするhsiRNAとインキュベートした。PPIB mRNAのレベルを、ハウスキーピング遺伝子、HTTに対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n = 3、平均 ± SD)。UNT - 1週間の未処理細胞。

10

【0063】

【図14】一次皮質ニューロンにおけるHtt減少の代表的ウェスタンブロットを示す。一次皮質ニューロンを、5つの個々の子(#1~5)から培養し、示す濃度のHTT10150と1週間インキュベートした。ハンチンチンタンパク質レベルを、抗体AB1を使用するウェスタンブロットにより検出した。

【0064】

【図15A-B】インビボでのHTT10150有効性の評価をグラフ的に示す。A) HTT10150を、WT(FVB)マウスの線条体に一側性に注射した(2 μl)。120時間目にマウスを殺した。脳を300 μm切片にスライスし、線条体の6個の2mmパンチ生検を、同側の側および対側の側の両方から採取した。ハンチンチンmRNAのレベルを、ハウスキーピング遺伝子、PPIB(シクロフィリンB)に対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n = 8動物、平均 ± SD)。B)ウェスタンブロットによるハンチンチンタンパク質サイレンシングの定量化。

20

【0065】

【図16】インビボでのHTT10150細胞毒性の評価をグラフ的に示す。DARPP32神経細胞マーカーはHTT10150注射により受ける影響は最小限であり、神経細胞の健康に大きな影響がないことを示した。HTT10150を、示す用量で野生型(FVB)マウスの線条体に一側性に注射した。120時間目にマウスを殺した。脳を300 μm切片にスライスし、線条体の6個のパンチ生検(2mm)を、同側の側および対側の側の両方から採取した。DARPP32 mRNA発現レベルを、ハウスキーピング遺伝子、PPIB(シクロフィリンB)に対して正規化したQUANTIGENE(Affymetrix)を使用して測定し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n = 24、平均 ± SD)。

30

【0066】

【図17A-C】HTT10150が、注射部位でミクログリア活性化の2倍増加を示したことを示す。HTT10150を、WT(FVB)マウスの線条体に一側性に注射した。脳を、6時間後(b)および5日後(aおよびc)に採取し、固定し、切片化し、IBA-1に対する抗体で染色した。(A)注射後5日の1nmol HTT10150およびACSFの注射後の活性化ミクログリア(黒色矢頭)および静止ミクログリア(白色矢頭)の代表的画像。40X拡大率。(B)ACSF(n = 6)および1nmol HTT10150(n = 3)注射6時間後の活性化および静止ミクログリアの定量化。(c)ACSF(n = 4)および1nmol HTT10150(n = 3)注射5日後の活性化および静止ミクログリア。

40

【0067】

【図18A-C】HTT10150が、25 μg用量で注射部位に限定的な毒性を示したことを示す。HTT10150を、WT(FVB)マウスの線条体に一側性に注射した。脳を5日後に採取し、固定し、切片化し、DARPP-32に対する抗体で染色した。25 μg注射後の線条体の代表的画像、完全脳スキャン(A)、注射部位10X拡大率(B)、注射部位20X拡大率(C)および60X拡大率。

50

## 【0068】

【図19】HTT10150は、低濃度でDarpp32陽性ニューロンに対して毒性を示さなかったことを示す。HTT10150を、WT(FVB)マウスの線条体に一側性に注射した。脳を5日後に採取し、固定し、切片化し、DARPP-32に対する抗体で染色した。注射部位に同側性および対側性の25 $\mu$ g、12.5 $\mu$ gおよびACSF(20X拡大率)注射後の線条体の代表的画像。

## 【0069】

【図20A-B】HTT10150が注射5日後総静止ミクログリアのわずかな増加を引き起こしたことを示す。HTT10150を、WT(FVB)マウスの線条体に一側性に注射した。脳を6時間および5日後に採取し、固定し、切片化し、IBA-1に対する抗体で染色した。ACSF(n=6、A)(n=4、B)および12.5 $\mu$ g HTT10150(n=3、A、B)注射6時間(A)および5日(B)後の総ミクログリアの定量化。

10

## 【0070】

【図21】本発明のある態様による化学的修飾および構造的足場と併せたさらなる標的配列を示す。

## 【0071】

【図22】QUANTIGENEおよびALAMAR BLUEを使用する、1週間後の一次皮質ニューロン(細胞生存能)におけるhsiRNAHTT有効性を示す。NTC=非ターゲティング対照。

## 【0072】

【図23】QUANTIGENEを使用する、1週間後の野生型一次線条体ニューロンおよび一次皮質ニューロンにおけるHTT hsiRNA有効性を示す。NTC=非ターゲティング対照。

20

## 【0073】

【図24】受動的取り込みにおける処理1~3週間後の一次ニューロン(効果持続期間)におけるHTT hsiRNA有効性を示す。HTT発現を、PPIBに対して正規化した。データを、非ターゲティング対照のおよそのパーセンテージとして示す。UNT=未処理。

## 【0074】

【図25】LNA-GAPMERではなく、hsiRNAHTTが、QUANTIGENEを使用して、72時間後の皮質ニューロンにおけるサイレンシングプラトーを示すことを示す。N=3。

30

## 【0075】

【図26】RNA-SCOPEを使用する、一次皮質ニューロンにおけるhttおよびppiBの細胞内局在化を示す。Htt mRNA、赤色；ppiB mRNA、緑色；核(DAPI)、青色。

## 【0076】

【図27】ニューロンにおけるhtt検出プローブセットを検証し、特異性を確認する。

## 【0077】

【図28】ニューロンにおけるhtt検出プローブセットを検証し、シグナルがイントロン特異的ではないことを示す(イントロン60~61について検証)。

40

## 【0078】

【図29】htt mRNA核局在化がニューロンのみの特異的であることを示す。左パネルは一次ニューロンを示す；ppiB mRNA、緑色；htt mRNA、赤色；核、青色。

## 【0079】

【図30】皮質ニューロンのhsiRNAHTT処理が、優先的に細胞質htt mRNAを排除することを示す。ppiB mRNA、緑色；htt mRNA、赤色；核、青色。上部パネル：非処理。下部パネル、3日間1.5 $\mu$ M hsiRNAHTTで処理。

## 【0080】

50

【図31】皮質ニューロンの *h s i R N A* *H T T* 処理が優先的に細胞質 *h t t m R N A* を排除することを示す。

【0081】

【図32】野生型一次皮質ニューロンにおける *H T T* タンパク質サイレンシングを示すウェスタンブロットを示す。*h s i R N A h t t - 1 0 1 5 0*; *N T C* = 非ターゲティング対照、1週間。

【0082】

【図33】*H T T 1 0 1 5 0* 直接注射の結果をグラフ的に示す。神経細胞生存能に対する影響は観察されなかった。

【0083】

【図34】コレステロール - *h s i R N A* 投与後の注射部位近辺の毒性を示す。

【0084】

【図35A - C】部分的修飾 *h s i R N A* が短効果持続期間を示し、全身曝露がないことを示す。

【0085】

【図36A - C】*h s i R N A* の完全代謝安定化を示す。

【0086】

【図37A - C】完全代謝安定化が *h s i R N A* の *R I S C* エントリーを妨害しないことを示す。

【0087】

【図38A - 38E】局所送達および分布の完全代謝安定化 *h s i R N A* (*F M - h s i R N A*) 増強を示す。

【0088】

【図39A - B】*F M - h s i R N A* が介在する効力および効果持続期間の増強を示す。

【0089】

【図40】*h s i R N A* バイオコンジュゲートとしての向神経活性の天然に存在する脂質を特徴付けする。

【0090】

【図41】*h s i R N A* 疎水性が脳分布および保持と直接関連することを示す。線条体内注射、 $12.5 \mu\text{g}$  ( $0.5 \text{mg}/\text{kg}$ )、 $t = 24$  時間、*F V B / N J* マウス ( $n = 2$ )。

【0091】

【図42】ドコサヘキサエン酸 (*D H A*) *h s i R N A* 合成を示す。

【0092】

【図43】*D H A - h s i R N A* および *c h o l - h s i R N A* の一次皮質ニューロンへの内部移行を示す。取り込み： $0.5 \mu\text{M}$  *C y 3 - D H A - h s i R N A* (赤色)、*D A P I* (青色)。

【0093】

【図44】*D H A - h s i R N A* とニューロンおよび星状膠細胞の共局在化を示す。線条体内注射、 $12.5 \mu\text{g}$  ( $0.5 \text{mg}/\text{kg}$ )、 $t = 24$  時間、*F V B / N J* マウス ( $n = 2$ )。

【0094】

【図45】*D H A - h s i R N A* の線条体ニューロンにおける核周囲領域への局在化を示し、一方 *c h o l - h s i R N A* は検出不能である。線条体内注射、 $12.5 \mu\text{g}$  ( $0.5 \text{mg}/\text{kg}$ )、 $t = 24$  時間、*F V B / N J* マウス ( $n = 2$ )。

【0095】

【図46】単回線条体内注射後の皮質における *D H A - h s i R N A* とニューロンおよび星状膠細胞の共局在化を示す。線条体内注射、 $12.5 \mu\text{g}$  ( $0.5 \text{mg}/\text{kg}$ )、 $t = 24$  時間、*F V B / N J* マウス ( $n = 2$ )。

【0096】

【図47】*D H A - h s i R N A* の皮質ニューロンにおける核周囲領域への局在化を示し、一方 *c h o l - h s i R N A* は検出不能である。

10

20

30

40

50

【0097】

【図48】線条体および皮質におけるDHA-hsiRNAの確固たるサイレンシング効率を示す。線条体内注射、6~25 µg(0.25~1 mg/kg)、t=5日、FVB/NJマウス(n=8)。

【0098】

【図49】DHA-hsiRNAの単回線条体内投与後の線条体における効果持続期間および回復を示す。

【0099】

【図50】有効用量の20倍より多くて、DHA-siRNA投与が線条体ニューロン完全性に影響しないことを示す、パイロット安全性試験を示す。

10

【0100】

【図51】有効用量の20倍より多くて、DHA-siRNAが最小限の線条体ミクログリア活性化しか引き起こさないことを示す、パイロット安全性試験を示す。

【0101】

【図52】オリゴヌクレオチド化学により引き起こされる、核周囲局在化を示す。

【0102】

【図53】オリゴヌクレオチド化学により引き起こされる、核内フォーカス分布を示す。

【0103】

【図54】htt mRNA線条体サイレンシングの程度は、オリゴヌクレオチド細胞局在化により影響されることを示す。

20

【0104】

【図55】標的膠細胞送達を示す。

【0105】

【図56】標的神経細胞送達を示す。

【0106】

【図57】DHA-hsiRNAが効率的に脳全体に分布し、線条体および皮質の両方における遺伝子をサイレンスさせることを示す。線条体内注射、12.5 µg(0.5 mg/kg)、t=24時間、FVB/NJマウス(n=2)。

【0107】

【図58】野生型一次海馬ニューロンおよびQ140一次海馬ニューロンにおけるhsiRNA有効性を示す。16%ゲル。

30

【0108】

【図59】野生型一次海馬ニューロンおよびQ140一次海馬ニューロンにおけるhsiRNA有効性をグラフ的に示す。

【0109】

【図60】野生型一次海馬ニューロンおよびQ140一次海馬ニューロンにおけるhsiRNA有効性を示す。7.5%ゲル。

【0110】

【図61】PC-DHA-hsiRNAおよびchol-hsiRNAの各々が、変異体および野生型htt mRNAをサイレンスさせることを示す。

40

【0111】

【図62】三群のhsiRNA化学：DHA-hsiRNA、PC-DHA-hsiRNAおよびchol-hsiRNAを示す。

【0112】

【図63A-B】皮質一次ニューロンにおけるDHA-hsiRNAに対するPC-DHA-hsiRNAの効力増強をグラフ的に示す。1週間、QUANTIGENEにより分析、PPIBに対してデータ正規化。

【0113】

【図64】chol-hsiRNAが、PC-DHA-hsiRNAおよびDHA-hsiRNAと比較して、一次皮質ニューロンにおける遺伝子調節についてより有効な化学を

50

有することを説明する。1週間、QUANTIGENEにより分析、PPIBに対してデータ正規化。

【0114】

【図65】PC-DHA-hsiRNAが、DHA-hsiRNAよりも良好な脳保持および広い分布を示すことを示す。2nmolまたは10nmol線条体内注射、N=2、脳を48時間目に採取。

【0115】

【図66】マウス線条体におけるPC-DHA-hsiRNA単回IS注射後の約80%サイレンシングを示す。

【0116】

【図67】マウス皮質におけるPC-DHA-hsiRNA単回IS注射後の約60%サイレンシングを示す。

【0117】

【図68】CSFボラス注射(250 $\mu$ g)後のジ-hsiRNA脳分布を示す、48時間。

【0118】

【図69】単回IS注射後のジ-hsiRNAの分布を示す。

【0119】

【図70】脳分布における分岐の効果を示す。

【0120】

【図71】ジ-hsiRNAの単回IS注射後のインビボ遺伝子サイレンシングのアクセスのための試験設計を示す。

【0121】

【図72】ジ-hsiRNAの神経細胞送達を示す。

【0122】

【図73】線条体および皮質におけるジ-hsiRNAの有効性を示す。IS注射、2nmolジ-hsiRNA、1週間、QUANTIGENE 2.0。

【0123】

【図74】ジ-hsiRNAの均一脊髄分布を示す。

【0124】

【図75】ジ-hsiRNAHTTボラス投与後の脊髄におけるhtt mRNAサイレンシングを示す。IT、3nmol、1週間、QUANTIGENE。

【0125】

【図76】HeLa細胞および一次皮質ニューロンにおけるジ-hsiRNA介在インビトロサイレンシングを示す。

【0126】

【図77】ジ-hsiRNAの体内分布を示す。2nmolのジ-siRNAオリゴ(4nmolの対応するアンチセンス鎖)の線条体内注射。N=2マウス/コンジュゲート。脳を48時間に採取し、DAPI(核、青色)およびNeuN(神経細胞マーカー、緑色)で染色した。画像は代表図である。赤色-オリゴ。

【0127】

【図78】ジ-hsiRNAの体内分布を示す。2nmolのジ-siRNAオリゴ(4nmolの対応するアンチセンス鎖)の線条体内注射。N=2マウス/コンジュゲート。脳を48時間に採取し、DAPI(核、青色)およびNeuN(神経細胞マーカー、緑色)で染色した。画像は代表図である。赤色-オリゴ。

【0128】

【図79】48時間後のジ-hsiRNA、TEG-アジド、TEGおよびビタミンDの脳分布を示す。2nmoleをISに注射、N=2マウス/コンジュゲート、脳を48時間後に採取した。

【0129】

10

20

30

40

50

【図80】 h t t m R N A 発現に対するビタミン D 合成の有効性を示す。

【0130】

【図81】ここに提供する化合物の化学式を示す。

【0131】

【図82】R<sup>3</sup>のヌクレオチド間結合の例を示す。

【0132】

【図83】図81の化学式のある態様を示す。

【0133】

【図84】ここに提供する化合物の化学式を示す。

【0134】

【図85】ここに提供する化合物の化学式を示す。

【0135】

【図86】図84または図85のY部分のある態様を示す。

【0136】

【図87】ここに提供する化合物の化学式を示す。

【0137】

【図88】図87の化学式のある態様を示す。

【0138】

【図89】ここに提供する化合物の化学式を示す。

【0139】

【図90】図89の化学式のある態様を示す。

【0140】

【図91A-D】完全代謝安定化 h s i R N A ( F M - h s i R N A ) の 発 展 を 示 す 。 ( A ) 部分的におよび完全に修飾された h s i R N A の 模 式 図 。 ( B ) h s i R N A お よ び F M - h s i R N A は 、 R I S C に 進 入 す る 同 等 な 能 力 を 有 す る ( H e L a 、 7 2 時 間 ) 。 ( C ) 代 謝 的 に 安 定 な 5 ' - E - V P は 、 5 ' - P と 同 程 度 活 性 で あ る 。 ( D ) 5 ' - E - V P は 、 遠 位 組 織 へ の 持 続 性 送 達 を 可 能 と す る ( 注 射 7 日 後 、 P N A ア ッ セ イ ) 。

【0141】

【図92】化学の進化がボラスCSF(ICV)注入後のマウス脳における h s i R N A の 広 範 な 分 布 を 可 能 と し た こ と を 示 す 。 矢 状 断 ( 左 パ ネ ル ) の 図 は I C V 注 射 4 8 時 間 後 で あり、250 μg Cy3 標識 h s i R N A バ リ ア ン ト を 伴 う ( 右 パ ネ ル ) 。 画 像 は ラ イ カ タ イ リ ン グ ア レ イ 顕 微 鏡 で 1 0 × お よ び 同 一 レ ー ザ ー 強 度 で 得 た 。 核 ( 青 色 ) ; C y 3 - h s i R N A ( 赤 色 ) 。 C h o l - h s i R N A は 、 主 に 注 射 し た 脳 室 周 圍 に 留 ま り 、 脳 の 遠 位 側 へ の 最 低 限 度 の 分 布 を 伴 う 。 D H A - h s i R N A は 良 好 な 分 布 を 示 す 。 P C - D H A お よ び ジ - h s i R N A は 、 最 も 広 汎 性 の 分 布 と 、 皮 質 、 線 条 体 お よ び 小 脳 ま で の 明 ら か な 送 達 を 示 す 。 ス ケ ー ル バ ー = 9 0 0 μ m 。

【0142】

【図93】PC-DHA官能化固体支持体の合成プロトコールを示す。

【0143】

【図94】二官能化固体支持体の合成プロトコールを示す。

【0144】

【図95A-C】ジ-h s i R N A 発見を示す。(A)カルシフェロール-h s i R N A 合 成 か ら の 4 個 の ビ 生 成 物 の 化 学 的 組 成 ( 粗 製 合 成 物 の 分 析 的 H P L C ) 。 ( B ) H e L a 細 胞 におけるビ生成物の有効性、72時間、QUANTIGENE(登録商標)。全化合物は等しく活性であった。(C)各Cy3-h s i R N A ビ生成物の単回一側性線条体内注射(25 μg)、48時間。ジ-h s i R N A の み が 、 広 範 な 分 布 と 優 先 的 神 經 細 胞 取 り 込 み を 示 し た 。

【0145】

【図96】h s i R N A アンチセンス鎖シード領域に完全相補性であるように設計された高親和性修飾(LNA)を担持するh s i 解毒薬アンチセンスオリゴヌクレオチドを示す。

【0146】

10

20

30

40

50



【図97】コレステロールおよびエンドサイトーシスペプチド(プロトンスポンジ)コンジュゲート *h s i R N A* を示す。

【0147】

【図98】GM1コンジュゲート *h s i R N A* の液相合成プロトコールを示す。

【0148】

【図99】DHAコンジュゲート(*g 1 D H A*)およびPC-DHA *h s i R N A* コンジュゲート(*g 2 D H A*)の化学構造を示す。

【0149】

【図100】PC-DHA *h s i R N A* コンジュゲートの固相合成プロトコールを示す。

【0150】

【図101】PC-DHA *h s i R N A* コンジュゲートの液相合成プロトコールを示す。

【0151】

【図102A-D】完全代謝安定化が、インビボでのコンジュゲート介在 *s i R N A* 送達および効果持続期間に必須であったことを示す。(A、B) *h s i R N A* (A)、FM-*h s i R N A* (B)との比較は、静脈内(IV)およびCSF(ICV)投与後の組織における顕著に増強された分布および保持を示す。野生型妊娠マウス(E15)に10mg/kg(IV)または60μg(ICV)を注射した。組織を、ライカタイリング蛍光顕微鏡で、同一レーザー強度で10×で撮像した。*H s i R N A* (赤色);核(青色)。スケールバー=900μm。(C)組織中のインタクトガイド鎖をIV注射5日後定量化した(n=3、平均±SEM)。(D)FM-*h s i R N A* は、注射1ヶ月後マウス線条体における *H t t m R N A* をサイレンスさせる(12μg、線条体内)。部分的修飾 *h s i R N A* は、2週間未満サイレンスさせる。

【0152】

【図103A-C】インビボでのマウス脳におけるPC-DHA-*h s i R N A* 有効性および安全性を示す。(A)25μgまたは50μg DHA-*h s i R N A* 注射1週間後の線条体および皮質における *H t t m R N A* レベル。\*\*\*aCSFおよびNTC両者に対してP<0.0001。(B)有効量の20倍の用量レベルで検出可能な天然免疫活性化は生じなかった(データは、DHA-*h s i R N A* に対する総ミクログリアについて示す)。(C)DARPP32レベルに基づく正常神経細胞生存能。chol-*h s i R N A* に対する毒性用量(赤色棒)に注意。

【0153】

【図104A-C】ジ-*h s i R N A* が、マウス脳における広範な分布および有効性を示したことを示す。(A)ICV注射48時間の目視および組織学による脳全体へのCy3-ジ-*h s i R N A* の確固たるおよび均一な分布と、明らかな神経細胞取り込み(250μg、CSF、両側)、スケールバー=100μm。(B)単回線条体内注射7日後の皮質および線条体における *H t t m R N A* サイレンシング(25μg)。(C)注射7日後の組織における *h s i R N A* 蓄積(PNAアッセイ)。

【0154】

【図105A-B】ジ-*h s i R N A* が、ポラス腰部髄腔内注射後マウス脊髄において広範な分布および有効性を示したことを示す。(A)Chol-*h s i R N A* は、脊髄の外側から内側への急勾配の拡散を示すが、ジ-*h s i R N A* は脊髄全体に広く分布する。動物に、75μg Cy3-Chol-*h s i R N A* またはCy3-ジ-*h s i R N A* を髄腔内注射した。スケールバー=100μm。(B)確固たる *H t t m R N A* サイレンシングが脊髄の全領域で観察された(注射7日後、n=6)。

【0155】

【図106】マウス組織における *h s i R N A* ガイド鎖検出のためのPNA(ペプチド核酸)ベースのアッセイを示す。組織を溶解し、残骸を沈殿により分離し、PNAガイド鎖二本鎖をHPLCにより精製した(DNA Pac P100、50%水50%アセトニトリル、塩勾配0~1M NaClO<sub>4</sub>)。

【0156】

【図107】PC-DHA-*h s i R N A* による腎臓のターゲティングを示す。

10

20

30

40

50

【0157】

【図108】GM1-hsiRNA内部移行およびGM1-hsiRNA介在h t t m RNAサイレンシングを示す。

【0158】

【図109】GM1-hsiRNA脳分布を示す。

【0159】

【図110A-G】全身性に投与された完全修飾(FM)hsiRNAが、インビボで劇的に増強された組織分布および有効性を示すことを示す。(a)Cy3-hsiRNAおよびCy3-FM-hsiRNAFLT1(赤色)の組織分布10mg/kg IV注射。DAPIで核染色(青色)。全画像を同一設定で得た。(b-e)PNAハイブリダイゼーションベースのアッセイによるガイド鎖定量化(b)10mg/kg、IV、24時間 (c)10mg/kg、SC、24時間 (d)2×20mg/kg、IV、120時間、(n=7) (e)2×15mg/kg、IV、120時間、(n=12)。(f、g) (f)2×20mg/kg、C57B6マウス(n=3、PBS;n=7、FM-hsiRNAFLT1)、(g)2×15mg/kg、CD1マウス(n=12、PBS;n=6、NTC;n=12、FM-hsiRNAFLT1)後のsFLT1 mRNAサイレンシングの定量化。mRNAレベルを、注射120時間後QUANTIGENE(登録商標)(Affymetrix)アッセイで測定し、ハウスキーピング遺伝子FLT1に対して正規化し、PBS処置対照のパーセントとして示した。全エラーバーは平均±SDを示す。\*\*\*、P<0.001;\*\*\*\*、P<0.0001。

10

【0160】

【図111A-G】局所投与により、完全修飾hsiRNAが脳全体に広く分布し、サイレンシングの高い効力および長い作用時間を示すことを示す。hsiRNAHTT(a)およびFM-hsiRNAHTT(b、c、d、e)をICVに注射し、48時間後の脳の矢状切片にわたる分布を示す。核をDAPIで染色した(青色)。Cy3-hsiRNA(赤色)。(f、g)hsiRNAHTTおよびFM-hsiRNAHTTを線条体に一側性に注射し、HTT mRNAレベルを、(f)5日または(g)7日、14日および28日後にQUANTIGENE(登録商標)(Affymetrix)を使用して測定し、ハウスキーピング遺伝子、PPIBに対して正規化し、未処理対照に対するパーセントとして示した(n=8マウス、平均±SD)。NTC=非ターゲティング対照;CSF=人工脳脊髄液。全エラーバーは平均±SD。\*\*P<0.01;\*\*\*P<0.001;\*\*\*\*P<0.0001。

20

30

【発明を実施するための形態】

【0161】

ある例示的態様の詳細な記載

新規ハンチンチン標的配列が提供される。本発明の新規ハンチンチン標的配列を標的とする新規siRNAも提供される。

【0162】

一般に、ここに記載する細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学およびタンパク質および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションと関連して使用する命名法は、当分野で周知であり、一般に使用されるものである。ここに提供する方法および技術は、特に断らない限り、一般に、当分野で周知であり、ここに引用する種々の包括的なおよびより具体的な引用文献に記載され、本明細書全体に記載するとおり、慣用法に従い実施される。酵素反応および精製技術は、製造業者の明細に従い、当分野で一般になされているとおりまたはここに記載のとおり実施する。ここに記載する分析化学、合成有機化学ならびに医薬品化学および薬化学と関連して使用する、およびこれらの実験室法および技術の命名法は、当分野で周知であり、一般的に使用されるものである。標準的技術を、化学的合成、化学的分析、医薬調製、製剤および送達および患者の処置に使用する。

40

【0163】

特に断らない限り、ここに使用する科学的および技術的用語は、当業者により一般的に理解されている意味を有する。何らかの曖昧さが潜在している場合、ここに提供する定義が、あらゆる辞書または外的定義に優先する。文脈から他の解釈が必要でない限り、単数表

50

現は複数を含み、複数表現は単数を含む。“または”の使用は、特に断らない限り“および/または”を意味する。用語“含む”ならびに“含み”および“含まれる”のような他の形態は限定的ではない。

【0164】

本発明がより容易に理解され得るように、いくつかの用語をまず定義する。

【0165】

用語“ヌクレオシド”は、リボースまたはデオキシリボース糖に共有結合したプリンまたはピリミジン塩基を有する分子をいう。ヌクレオシドの例は、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジンおよびチミジンを含む。さらなるヌクレオシドの例は、イノシン、1-メチルイノシン、シュードウリジン、5,6-ジヒドロウリジン、リボチミジン、2N-メチルグアノシンおよび2,2N,N-ジメチルグアノシン(“希”ヌクレオシドとも称される)を含む。用語“ヌクレオチド”は、糖部分にエステル結合により結合した1以上のリン酸基を有するヌクレオシドをいう。ヌクレオチドの例は、ヌクレオシド-リン酸類、二リン酸類および三リン酸類を含む。用語“ポリヌクレオチド”および“核酸分子”は、ここでは、相互交換可能に使用し、5'および3'炭素原子間のホスホジエステルまたはホスホロチオエート結合により互いに結合したヌクレオチドのポリマーをいう。

【0166】

用語“RNA”または“RNA分子”または“リボ核酸分子”は、リボヌクレオチドのポリマーをいう(例えば、2、3、4、5、10、15、20、25、30またはそれを超えるリボヌクレオチド)。用語“DNA”または“DNA分子”または“デオキシリボ核酸分子”は、デオキシリボヌクレオチドのポリマーをいう。DNAおよびRNAは、自然界で合成され得る(例えば、それぞれDNA複製またはDNA転写による)。RNAは、転写後修飾され得る。DNAおよびRNAはまた化学合成もできる。DNAおよびRNAは、一本鎖(すなわち、それぞれssRNAおよびssDNA)または多重鎖(例えば、二本鎖、すなわち、それぞれdsRNAおよびdsDNA)であり得る。“mRNA”または“メッセンジャーRNA”は、1以上のポリペプチド鎖のアミノ酸配列を特定する一本鎖RNAである。この情報が、リボソームがmRNAに結合したとき、タンパク質合成中に翻訳される。

【0167】

ここで使用する用語“低分子干渉RNA”(“siRNA”)(当分野では“短干渉RNA”とも称する)は、RNA干渉を指示または伝達できる、約10~50ヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)を含むRNA(またはRNAアナログ)をいう。好ましくは、siRNAは、約15~30ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログ、より好ましくは約16~25ヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)、よりさらに好ましくは約18~23ヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)、よりさらに好ましくは約19~22ヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)(例えば、19、20、21または22ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログ)を含む。用語“短”siRNAは、約21ヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)、例えば、19、20、21または22ヌクレオチドを含むsiRNAをいう。用語“長”siRNAは、約24~25ヌクレオチド、例えば、23、24、25または26ヌクレオチドを含むsiRNAをいう。短siRNAは、ある場合、19より少ないヌクレオチド、例えば、16、17または18ヌクレオチドを含むかもしれないが、但しこのより短いsiRNAは、RNAiに介在する能力を保持する。同様に、長siRNAは、ある場合、26をこえるヌクレオチドを含むかもしれないが、但しこのより長いsiRNAは、短siRNAへのさらなるプロセッシング、例えば、酵素プロセッシングなしで、RNAiに介在する能力を保持する。

【0168】

用語“ヌクレオチドアナログ”または“変改ヌクレオチド”または“修飾ヌクレオチド”は、天然に存在しないリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含む、非標準ヌクレオチドをいう。ヌクレオチドアナログの例は、ヌクレオチドのある化学的性質を変えるために任意の位置が修飾されているが、ヌクレオチドアナログがその意図する機能を発揮する能力はなお保持する。誘導体化し得るヌクレオチドの位置は、5位、例えば、5-(2-

10

20

30

40

50

アミノ)プロピルウリジン、5 - プロモウリジン、5 - プロピンウリジン、5 - プロペニルウリジンなど；6位、例えば、6 - (2 - アミノ)プロピルウリジン；アデノシンおよびノまたはグアノシンについては8位、例えば、8 - プロモグアノシン、8 - クロログアノシン、8 - フルオログアノシンなどを含む。ヌクレオチドアナログはデアザヌクレオチド、例えば、7 - デアザ - アデノシン；O - およびN修飾(例えば、アルキル化、例えば、N 6 - メチルアデノシンまたは他に当分野で知られるように)ヌクレオチド；およびHerdewijn, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 2000 Aug. 10(4):297-310に記載のもののような他のヘテロ環修飾ヌクレオチドアナログも含む。

【0169】

ヌクレオチドアナログはまたヌクレオチドの糖部分にも修飾を含み得る。例えば、2' OH基をH、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、COORまたはOR(ここで、Rは置換または非置換C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールなどである)に置き換えてよい。他の可能な修飾は、米国特許5,858,988号および6,291,438号に記載のものを含む。

【0170】

ヌクレオチドのリン酸基も、例えば、リン酸基の酸素の1以上を硫黄に置き換えることにより(例えば、ホスホロチオエート)または、例えば、Eckstein, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2000 Apr. 10(2):117-21, Rusckowski et al. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2000 Oct. 10(5):333-45, Stein, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2001 Oct. 11(5):317-25, Vorobjev et al. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2001 Apr. 11(2):77-85および米国特許5,684,143号に記載のように、ヌクレオチドがその意図する機能を発揮することを可能にする他の置換をすることにより、修飾してよい。上記修飾のいくつか(例えば、リン酸基修飾)は、好ましくはインビボまたはインビトロで、例えば、該アナログを含むポリヌクレオチドの加水分解の速度を低減する。

【0171】

用語“オリゴヌクレオチド”は、ヌクレオチドおよびノまたはヌクレオチドアナログの短ポリマーをいう。用語“RNAアナログ”は、対応する非変改または非修飾RNAと比較して、少なくとも一つの変改または修飾ヌクレオチドを有するが、対応する非変改または非修飾RNAと同じまたは類似する性質または機能を保持する、ポリヌクレオチド(例えば、化学合成ポリヌクレオチド)をいう。上記のとおり、オリゴヌクレオチドを、ホスホジエステル結合を有するRNA分子と比較して、RNAアナログの低加水分解速度をもたらす結合で結合してよい。例えば、アナログのヌクレオチドは、メチレンジオール、エチレンジオール、オキシメチルチオ、オキシエチルチオ、オキシカルボニルオキシ、ホスホロジアミデート、ホスホロアミデートおよびノまたはホスホロチオエート結合を含み得る。好ましいRNAアナログは、糖およびノまたは主鎖修飾リボヌクレオチドおよびノまたはデオキシリボヌクレオチドを含む。このような変改または修飾は、さらに、非ヌクレオチド物質の、例えば、RNAの末端または内部への付加を含み得る(RNAの1以上のヌクレオチドで)。RNAアナログに必要とされるのは、天然RNAに十分類似するRNA干渉に介在する能力を有することのみである。

【0172】

ここで使用する用語“RNA干渉”(“RNAi”)は、RNAの選択的細胞内分解をいう。RNAiは、外来RNA(例えば、ウイルスRNA)を除去するために天然に細胞で起こる。天然のRNAiは、他の類似RNA配列への分解機序を指示する、遊離dsRNAから開裂された断片を経て進行する。あるいは、RNAiは、例えば、標的遺伝子の発現をサイレンスさせるために、人の手により開始され得る。

【0173】

“標的特定のRNA干渉(RNAi)を指示するために標的mRNA配列と十分に相補性である配列”である鎖を有するRNAi剤、例えば、RNAサイレンシング剤は、鎖が、RNAi機序または過程により標的mRNAの破壊を誘発するのに十分な配列を有することを意味する。

10

20

30

40

50

## 【0174】

ここで使用する用語“単離RNA”(例えば、“単離siRNA”または“単離siRNA前駆体”)は、組み換え技術により産生されたとき他の細胞物質もしくは培養媒体を実質的に含まないまたは化学合成されたとき化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない、RNA分子をいう。

## 【0175】

ここで使用する用語“RNAサイレンシング”は、対応するタンパク質コード化遺伝子の発現の阻害または“サイレンシング”をもたらす、RNA分子が介在する一群の配列特異的制御機序(例えばRNA干渉(RNAi)、転写型遺伝子サイレンシング(TGS)、転写後型遺伝子サイレンシング(PTGS)、鎮圧、共抑制および翻訳抑制)をいう。RNAサイレンシングは、植物、動物および真菌を含む多くのタイプの生物で観察されている。

10

## 【0176】

用語“識別RNAサイレンシング”は、RNA分子が、例えば、両ポリヌクレオチド配列が同じ細胞に存在するとき、“第一”または“標的”ポリヌクレオチド配列の発現を実質的に阻害するが、“第二”または“非標的”ポリヌクレオチド配列の発現を実質的に阻害しない能力をいう。ある態様において、標的ポリヌクレオチド配列は標的遺伝子に対応し、一方非標的ポリヌクレオチド配列は非標的遺伝子に対応する。他の態様において、標的ポリヌクレオチド配列は標的アレルに対応し、一方非標的ポリヌクレオチド配列は非標的アレルに対応する。ある態様において、標的ポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子の制御領域をコードするDNA配列(例えばプロモーターまたはエンハンサーエレメント)である。他の態様において、標的ポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子によりコードされる標的mRNAである。

20

## 【0177】

用語“インビトロ”は、例えば、精製された反応物または抽出物、例えば、細胞抽出物が関与する、当分野で認識されているその意味を有する。用語“インビボ”も、例えば、生存細胞、例えば、不死化細胞、一次細胞、細胞株および/または生物中の細胞が関与する、当分野で認識されているその意味を有する。

## 【0178】

ここで使用する用語“トランスジーン”は、細工により細胞へ挿入され、該細胞から発達した生物のゲノムの一部となる、あらゆる核酸分子をいう。このようなトランスジーンは、トランスジェニック生物に一部または完全に異種性(すなわち、外来)である遺伝子を含んでよく、または生物の内在性遺伝子と相同である遺伝子を表し得る。用語“トランスジーン”はまた、トランスジェニック生物、例えば、動物において発現する、1以上の改変RNA前駆体をコードする1以上の選択核酸配列、例えば、DNAを含む核酸分子をいい、これは、トランスジェニック動物に一部または完全に異種性、すなわち、外来であるか、またはトランスジェニック動物の内在性遺伝子と相同であるが、天然遺伝子と異なる位置で動物ゲノムに挿入するよう設計されている。トランスジーンは、選択核酸配列の発現に必要な1以上のプロモーターおよびイントロンのような何らかの他のDNA(全て選択配列に操作可能に結合している)を含み、そしてエンハンサー配列を含み得る。

30

## 【0179】

疾患または障害に“関与する”遺伝子は、正常または異常発現または機能が疾患または障害または該疾患または障害の少なくとも一つの症状に影響するまたは原因となる遺伝子である。

40

## 【0180】

ここで使用する用語“機能獲得型変異”は、遺伝子における何らかの変異をいい、これにより、該遺伝子によりコードされるタンパク質(すなわち、変異体タンパク質)が、疾患または障害の原因となるかまたは寄与し、通常該タンパク質(すなわち、野生型タンパク質)と関係しない機能を獲得する。機能獲得型変異は、コード化タンパク質における機能を变化させる、遺伝子におけるヌクレオチドまたはヌクレオチドの欠失、付加または置換であり得る。ある態様において、機能獲得型変異は、変異体タンパク質の機能を变化させるかま

50

たは他のタンパク質との相互作用を引き起こす。他の態様において、機能獲得型変異は、正常野生型タンパク質の、例えば、変改、変異体タンパク質と、該正常、野生型タンパク質との相互作用による低減または除去を引き起こす。

【0181】

ここで使用する用語“標的遺伝子”は、発現が実質的に阻害または“サイレンシング”される遺伝子である。このサイレンシングは、RNAサイレンシングにより、例えば、標的遺伝子のmRNAの開裂または標的遺伝子の翻訳抑制により達成される。用語“非標的遺伝子”は、発現が実質的にサイレンシングされない遺伝子である。ある態様において、標的および非標的遺伝子のポリヌクレオチド配列(例えば標的および非標的遺伝子によりコードされるmRNA)は、1以上のヌクレオチドで異なり得る。他の態様において、標的および非標的遺伝子は、1以上の多型(例えば、一塩基多型またはSNP)で異なり得る。他の態様において、標的および非標的遺伝子は、100%未満の配列同一性を有してよい。他の態様において、非標的遺伝子は、標的遺伝子のホモログ(例えばオルソログまたはパラログ)であり得る。

10

【0182】

“標的アレル”は、発現が選択的に阻害または“サイレンス”されるアレル(例えば、SNPアレル)である。このサイレンシングは、RNAサイレンシングにより、例えば、siRNAによる標的遺伝子または標的アレルのmRNAの開裂により達成できる。用語“非標的アレル”は、発現が実質的にサイレンスされないアレルである。ある態様において、標的および非標的アレルは、同じ標的遺伝子に対応し得る。他の態様において、標的アレルは標的遺伝子に対応または結合し、非標的アレルは非標的遺伝子に対応または結合する。ある態様において、標的および非標的アレルのポリヌクレオチド配列は、1以上のヌクレオチドで異なり得る。他の態様において、標的および非標的アレルは、1以上のアレル多型(例えば、1以上のSNP)で異なり得る。他の態様において、標的および非標的アレルは、100%未満の配列同一性を有し得る。

20

【0183】

ここで使用する用語“多型”は、異なる起源または対象(しかし同じ生物)からの同じ遺伝子配列を比較したときに同定または検出される、遺伝子配列における多様性(例えば、1以上の欠失、挿入または置換)をいう。例えば、多型は、異なる対象からの同じ遺伝子配列を比較したとき、同定できる。このような多型の同定は当分野で常套的であり、方法論は、例えば、乳癌点変異検出に使用されるものに類似する。同定は、例えば、対象のリンパ球から抽出されたDNAから、続く該多型領域に対する特異的プライマーを使用する多型領域の増幅により行い得る。あるいは、多型は、同じ遺伝子の2アレルを比較したとき、同定できる。特定の態様において、多型は一塩基多型(SNP)である。

30

【0184】

生物内の同じ遺伝子の2アレル間の配列の多様性を、ここでは“アレル多型”と称する。ある態様において、アレル多型はSNPアレルに対応する。例えば、アレル多型は、SNPの2アレル間の単一ヌクレオチド多様性を含み得る。多型は、コーディング領域内のヌクレオチドであってよいが、遺伝コードの縮重により、アミノ酸配列の変化はコードされない。あるいは、多型配列は、特定の位置の異なるアミノ酸をコードできるが、アミノ酸の変化はタンパク質機能に影響しない。多型領域はまた遺伝子の非コード化領域にも見ることができ。例示的態様において、多型は遺伝子のコーディング領域または遺伝子の非翻訳領域(例えば、5'UTRまたは3'UTR)に見られる。

40

【0185】

ここで使用する用語“アレル頻度”は、個体集団における単一座位でのアレル(例えば、SNPアレル)の関連頻度の指標(例えば、比率またはパーセンテージ)である。例えば、個体集団が、体細胞の各々に特定の染色体座位(および座位を占拠する遺伝子)のn座位を担持するならば、あるアレルのアレル頻度は、該アレルが集団内で占める座位の分数またはパーセンテージである。特定の態様において、アレル(例えば、SNPアレル)のアレル頻度は、サンプル集団の少なくとも10%(例えば、少なくとも15%、20%、25%、30%

50

、35%、40%またはそれ以上)である。

【0186】

ここで使用する用語“サンプル集団”は、統計学的に有意な数の個体を含む、個体集団をいう。例えば、サンプル集団は、50、75、100、200、500、1000またはそれ以上の個体を含み得る。特定の態様において、サンプル集団は、少なくとも一つの共通疾患表現型(例えば、機能獲得型障害)または変異(例えば、機能獲得型変異)を共有する個体を含み得る。

【0187】

ここで使用する用語“ヘテロ接合性”は、特定の座位(例えば、SNP)でヘテロ接合である(例えば、2以上の異なるアレルを含む)、集団内の個体の分数をいう。ヘテロ接合性は、当業者に周知の方法を使用してサンプル集団について計算できる。

10

【0188】

ここで使用する用語“ポリグルタミンドメイン”は、ペプチド結合により結合された連続的グルタミン残基からなるタンパク質のセグメントまたはドメインをいう。ある態様において、連続的領域は少なくとも5グルタミン残基を含む。

【0189】

ここで使用する用語“拡張ポリグルタミンドメイン”または“拡張ポリグルタミンセグメント”は、ペプチド結合により結合された少なくとも35連続的グルタミン残基を含むタンパク質のセグメントまたはドメインをいう。このような拡張セグメントは、ここに記載するとおり、ポリグルタミン障害に罹患した対象に、対象が顕在化した症状を有するか否かに関わらず、見られる。

20

【0190】

ここで使用する用語“トリヌクレオチド反復”または“トリヌクレオチド反復領域”は、特定のトリヌクレオチド配列の連続的的反復からなる、例えば、核酸配列のセグメントをいう。ある態様において、トリヌクレオチド反復は、少なくとも5連続的トリヌクレオチド配列を含む。トリヌクレオチド配列の例は、CAG、CGG、GCC、GAA、CTGおよび/またはCGGを含むが、これらに限定されない。

【0191】

ここで使用する用語“トリヌクレオチド反復疾患”は、遺伝子内に位置する拡張トリヌクレオチド反復領域により特徴付けられる何らかの疾患または障害をいい、拡張トリヌクレオチド反復領域は該疾患または障害の原因である。トリヌクレオチド反復疾患の例は、脊髄小脳失調症12型、脊髄小脳失調症8型、脆弱X症候群、脆弱XE精神遅滞、フリードライヒ失調症および筋強直性ジストロフィーを含むが、これらに限定されない。本発明による処置のためのトリヌクレオチド反復疾患の例は、遺伝子のコーディング領域の5'末端での拡張トリヌクレオチド反復領域により特徴付けられるまたは引き起こされるものであり、遺伝子は、該疾患または障害を引き起こすまたは原因である変異体タンパク質をコードする。あるトリヌクレオチド疾患、例えば、脆弱X症候群は、変異がコーディング領域と関係しないとき、RNAiにより標的とすべき適当なmRNAがないため、本発明の方法での処置に不適であり得る。対照的に、フリードライヒ失調症のような疾患は、原因変異がコーディング領域内ではないが(すなわち、イントロンにある)、変異が、例えば、mRNA前駆体(例えば、プレスパイスmRNA前駆体)内にあり得るため、本発明の方法での処置に適し得る。

30

40

【0192】

ここで使用する用語“ポリグルタミン障害”は、コーディング領域(すなわち、コード化タンパク質における拡張ポリグルタミン領域をコード化する)の5'末端での(CAG)<sub>n</sub>反復の拡張により特徴付けられるあらゆる疾患または障害をいう。ある態様において、ポリグルタミン障害は、神経細胞の進行性変性により特徴付けられる。ポリグルタミン障害の例は、次のものを含むが、これらに限定されない：ハンチントン病、脊髄小脳失調症1型、脊髄小脳失調症2型、脊髄小脳失調症3型(マシャド・ジョセフ病としても知られる)および脊髄小脳失調症6型、脊髄小脳失調症7型および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症。

50

## 【0193】

用語“細胞または生物における遺伝子の機能を試験”は、それに起因する発現、活性、機能または表現型の試験または研究をいう。

## 【0194】

ここで使用する用語“RNAサイレンシング剤”は、標的遺伝子の発現を阻害または“サイレンシング”できるRNAをいう。ある態様において、RNAサイレンシング剤は、転写後サイレンシング機序を介してmRNA分子の完全プロセッシング(例えば、完全翻訳および/または発現)を阻止できる。RNAサイレンシング剤は、小(<50 b.p.)、非コーディングRNA分子、例えば対鎖を含むRNA二本鎖、ならびにこのような小非コーディングRNAが産生され得る前駆体RNAを含む。RNAサイレンシング剤の例は、siRNA、miRNA、siRNA様二本鎖、アンチセンスオリゴヌクレオチド、GAPMER分子および二機能性オリゴヌクレオチドならびにその前駆体を含む。ある態様において、RNAサイレンシング剤はRNA干渉を誘発できる。他の態様において、RNAサイレンシング剤は翻訳抑制に介在できる。

10

## 【0195】

ここで使用する用語“希ヌクレオチド”は、稀に生じる天然に存在するデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、例えば、グアノシン、アデノシン、シトシンまたはウリジンではない天然に存在するリボヌクレオチドを含む、稀に生じる天然に存在するヌクレオチドをいう。希ヌクレオチドの例は、イノシン、1-メチルイノシン、シュードウリジン、5,6-ジヒドロウリジン、リボチミジン、2N-メチルグアノシンおよび2,2N,N-ジメチルグアノシンを含むが、これらに限定されない。

20

## 【0196】

改変RNA前駆体または改変核酸分子におけるような用語“改変”は、前駆体または分子の核酸配列の全てまたは一部がヒトにより作製または選択される点で、該前駆体または分子が天然に見られないことを示す。作製または選択されたら、配列は、複製、翻訳、転写または細胞内での機序により他に処理される。それ故に、改変核酸分子を含むトランスジェンから細胞内で製造されたRNA前駆体は改変RNA前駆体である。

## 【0197】

ここで使用する用語“マイクロRNA”(“miRNA”)は、当分野では“小一過性RNA”(“stRNA”)とも称され、遺伝的にコード化され(例えば、ウイルス、哺乳動物または植物ゲノムによる)、RNAサイレンシングの指示または介在が可能である、小(10~50ヌクレオチド)RNAをいう。“miRNA障害”は、miRNAの異常発現または活性により特徴付けられる疾患または障害をいう。

30

## 【0198】

ここで使用する用語“二機能性オリゴヌクレオチド”は、式T-L- $\mu$ (式中、TはmRNAターゲット部分であり、Lは連結部分であり、 $\mu$ はmiRNA動員部分である)を有するRNAサイレンシング剤をいう。ここで使用する用語“mRNAターゲット部分”、“ターゲット部分”、“mRNAターゲット部分”または“ターゲット部分”は、十分なサイズを有し、かつサイレンシングのために選択したまたは標的化したmRNAの部分または領域に十分な相補性を有する、二機能性オリゴヌクレオチドのドメイン、部分または領域をいう(すなわち、該部分は、標的mRNAを捕捉するのに十分な配列を有する)。ここで使用する用語“連結部分”または“連結部分”は、mRNAと共有結合的に連結または架橋するRNAサイレンシング剤のドメイン、部分または領域をいう。

40

## 【0199】

ここで使用するRNAサイレンシング剤、例えば、siRNAまたはRNAサイレンシング剤の“アンチセンス鎖”なる用語は、サイレンシングの標的である遺伝子のmRNAの約10~50ヌクレオチド、例えば、約15~30、16~25、18~23または19~22ヌクレオチドの切片に実質的に相補性である鎖をいう。アンチセンス鎖または第一鎖は、標的的特異的サイレンシングを指示するために所望の標的mRNA配列に十分に相補性である、例えば、RNAi機序または過程(RNAi干渉)による所望の標的mRNAの破

50



壊の誘発に十分な相補性または所望の標的 mRNA の翻訳抑制の誘発に十分な相補性の配列をいう。

【0200】

RNAサイレンシング剤、例えば、siRNAまたはRNAサイレンシング剤の“センス鎖”または“第二鎖”なる用語は、アンチセンス鎖または第一鎖と相補的な鎖をいう。アンチセンス鎖およびセンス鎖は、第一鎖または第二鎖とも称することができ、第一鎖または第二鎖は標的配列に相補性を有し、各第二鎖または第一鎖は、該第一鎖または第二鎖に相補性を有する。miRNA二本鎖は、サイレンシングの標的である遺伝子のmRNAの約10～50ヌクレオチドの切片に十分な相補性を有するmiRNA鎖およびmiRNA鎖と二本鎖を形成するための十分な相補性を有するmiRNA\*鎖に介在するか、またはsiRNA様二本鎖はそれを含む。

10

【0201】

ここで使用する用語“ガイド鎖”は、RISC複合体の中に進入し、標的mRNAの切断を支持する、RNAサイレンシング剤、例えば、siRNA二本鎖のアンチセンス鎖またはsiRNA配列の鎖をいう。

【0202】

RNAサイレンシング剤の二本鎖領域(例えば、shRNAのステム)の非対称におけるような、ここで使用する用語“非対称”は、二本鎖の一方の鎖の5'末端が相補的鎖の5'末端よりも高頻度で一過性不對、例えば、一本鎖状態であるように、RNAサイレンシング剤の終端間(例えば、第一鎖の末端ヌクレオチドまたはステム部分と、反対の第二鎖の末端ヌクレオチドまたはステム部分の間)の結合強度または塩基対形成強度の不均衡をいう。この構造差は、二本鎖の一方の鎖が、RISC複合体に優先的に取り込まれることを決定する。5'末端が相補的鎖にあまり堅く対合していない鎖が、RISCに優先的に取り込まれ、RNAiに介在する。

20

【0203】

ここで使用する用語“結合強度”または“塩基対強度”は、主にヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)間のH結合形成、ファンデルワールス相互作用などによる、オリゴヌクレオチド二本鎖(例えば、siRNA二本鎖)の反対の鎖上のヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)の対間の相互作用の強度をいう。

【0204】

アンチセンス鎖の5'末端におけるような、ここで使用する“5'末端”は、アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチド、例えば、5'末端の1～約5ヌクレオチドをいう。センス鎖の3'末端におけるようなここで使用する“3'末端”は、相補的アンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチドに相補的である領域、例えば、1～約5ヌクレオチドの領域をいう。

30

【0205】

ここで使用する用語“不安定化ヌクレオチド”は、塩基対が慣用の塩基対(すなわち、ワトソン・クリック塩基対)より低結合強度であるように、第二ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログと塩基対を形成する第一ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログをいう。ある態様において、不安定化ヌクレオチドは、第二ヌクレオチドとミスマッチ塩基対を形成できる。他の態様において、不安定化ヌクレオチドは、第二ヌクレオチドと揺らぎ塩基対を形成できる。さらに他の態様において、不安定化ヌクレオチドは、第二ヌクレオチドと多義性塩基対を形成できる。

40

【0206】

ここで使用する用語“塩基対”は、主にヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)間のH結合形成、ファンデルワールス相互作用などによる、オリゴヌクレオチド二本鎖(例えば、RNAサイレンシング剤の一鎖と標的mRNA配列により形成される二本鎖)の反対の鎖のヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)間の相互作用をいう。ここで使用する用語“結合強度”または“塩基対強度”は、塩基対の強度をいう。

【0207】

ここで使用する用語“不適正塩基対”は、非相補的または非ワトソン・クリック塩基対から

50

なる塩基対、例えば、通常の相補的 G : C、A : T または A : U 塩基対以外をいう。ここで使用する用語“多義性塩基対”(非識別塩基対としても既知)は、普遍的ヌクレオチドにより形成される塩基対をいう。

【0208】

ここで使用する用語“普遍的ヌクレオチド”(“中立ヌクレオチド”としても既知)は、塩基対を形成するとき、相補的ポリヌクレオチド上の塩基間を顕著に識別しない塩基(“普遍的塩基”または“中立塩基”)を有するヌクレオチド(例えばある不安定化ヌクレオチド)を含む。普遍的ヌクレオチドは、主にスタッキング相互作用により逆平行二本鎖核酸(例えば、二本鎖 DNA または RNA)に効率的に包装され得る疎水性分子である。普遍的ヌクレオチドの塩基部分は、一般に窒素含有芳香族ヘテロ環式部分を含む。

10

【0209】

ここで使用する用語“十分な相補性”または“十分な程度の相補性”は、RNAサイレンシング剤が、それぞれ所望の標的 RNA に結合し、標的 mRNA の RNAサイレンシングを誘発するのに十分な配列(例えばアンチセンス鎖において、mRNA ターゲティング部分または miRNA 動員部分)を有することを意味する。

【0210】

ここで使用する用語“翻訳抑制”は、mRNA 翻訳の選択的阻害をいう。天然の翻訳抑制は、shRNA 前駆体から開裂された miRNA を経て進行する。RNAi および翻訳抑制の両方は、RISC が介在する。RNAi および翻訳抑制の両方は、自然に生じ、または、例えば、標的遺伝子の発現をサイレンスさせるために人の手により開始され得る。

20

【0211】

本発明の種々の方法論は、“適当な対照”(ここでは、“適切な対照”と相互交換可能に使用する)との値、レベル、特色、特徴、性質などの比較を含む工程を含む。“適当な対照”または“適切な対照”は、比較目的に有用な、当業者に周知の何らかの対照または標品である。ある態様において、“適当な対照”または“適切な対照”は、ここに記載する RNAi 方法論の実施前に決定した値、レベル、特色、特徴、性質などである。例えば、転写速度、mRNA レベル、翻訳速度、タンパク質レベル、生物学的活性、細胞の特徴または性質、遺伝子型、表現型などを、本発明の RNAサイレンシング剤を細胞または生物に導入する前に決定できる。他の態様において、“適当な対照”または“適切な対照”は、例えば、正常形質を示す細胞または生物、例えば、対照または正常細胞または生物で決定した値、レベル、特色、特徴、性質などである。さらに他の態様において、“適当な対照”または“適切な対照”は、定義済み値、レベル、特色、特徴、性質などである。

30

【0212】

他に定義しない限り、ここで使用する全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者により一般に理解されているのと同じ意味を有する。ここに記載するものに類似するまたは等価な方法および物質を、本発明の実施または試験に際して使用できるが、適当な方法および物質を下に記載する。ここに記載する全ての刊行物、特許出願、特許および他の引用文献は、その全体を引用により本明細書に包含させる。矛盾する場合は、定義を含む本明細書が支配する。さらに、物質、方法および例は説明のみであり、限定的であることは意図しない。

40

【0213】

本発明の種々の側面を、次のセクションでさらに詳細に記載する。

【0214】

I. ポリグルタミン障害

ポリグルタミン障害は、一般的遺伝子突然変により特徴付けられる疾患または障害の一群である。特に、本疾患または障害は、コード化タンパク質における、拡張した一続きのグルタミン残基を生じさせる、トリヌクレオチド CAG の拡張反復により特徴付けられる。ポリグルタミン障害は、疾患が神経細胞の進行性変性により特徴付けられる点で類似する。それらの類似性に関わらず、ポリグルタミン障害は種々の染色体で生じ、故に、DNA の全く異なるセグメントで生じる。ポリグルタミン障害の例は、ハンチントン病、歯状

50

核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症 1 型、脊髄小脳失調症 2 型、脊髄小脳失調症 3 型、脊髄小脳失調症 6 型および脊髄小脳失調症 7 型を含む。

【 0 2 1 5 】

本発明でいうポリグルタミン障害は、例えば、約 3 0 ~ 3 5 グルタミン残基、約 3 5 ~ 4 0 グルタミン残基、約 4 0 ~ 4 5 グルタミン残基を有するまたは約 4 5 以上のグルタミン残基を有するドメインにより特徴付けられる。ポリグルタミンドメインは、一般に連続的グルタミン残基を含む(Q n > 3 6)。

【 0 2 1 6 】

## II. ハンチントン病

ある態様において、本発明の RNA サイレンシング剤は、ハンチントン病の処置のための変異体ヒトハンチンチンタンパク質(h t t)における多型(例えば一塩基多型)を標的とするよう設計される。

【 0 2 1 7 】

常染色体優性疾患として遺伝するハンチントン病は、認知障害および運動疾患を引き起こす。患者は、飢餓または感染で早死にする前に、重度に衰弱しながら 1 0 年以上生存することができる。疾患は、大部分で 4 0 代または 5 0 代で始まるが、一部の患者では、1 0 代で疾患が顕在化する。ハンチントン病の遺伝子突然変異は、ハンチンチン遺伝子における C A G 反復延長である。C A G 反復は、正常個体で 8 ~ 3 5 の間で数が変わる(Kremer et al., 1994)。遺伝子突然変異、例えば、C A G 反復の長さの延長(ハンチンチン遺伝子における 3 6 未満から、疾患における 3 6 超)は、3 6 を超えるポリグルタミン酸を有する変異体ハンチンチンタンパク質の合成と関係する(Aronin et al., 1995)。一般に、3 6 以上の C A G 反復を有する個体はハンチントン病を発症する。根底にある変異として延長した C A G を伴う 2 0 もの多くの他の疾患のプロトタイプとして、ハンチントン病はなお有効な治療がない。アポトーシス経路の妨害、ミトコンドリア効率を増強する薬剤の追加および N M D A 受容体の遮断のような多種多様な介入は、細胞培養およびハンチントン病のマウスモデルで有望であることが示されている。しかしながら、これらの研究は、せいぜい細胞または動物の生存の短期延命を示すのみである。

【 0 2 1 8 】

ハンチントン病は、変異体遺伝子が、変異体 m R N A の産生の鋳型として働き、次いで変異体 m R N A が変異体タンパク質の合成を指示するという遺伝学の中心的ドグマに従う(Aronin et al., 1995; DiFiglia et al., 1997)。科学的理論に縛られることを意図しないが、変異体ハンチンチンタンパク質は、線条体および皮質の選択的ニューロンに蓄積し、これまでに知られている細胞の活動を妨害し、神経細胞の機能不全および死を引き起こすと考えられる(Aronin et al., 1999; Laforet et al., 2001)。変異体遺伝子の単一コピーがハンチントン病を引き起こすのに十分であるため、最も廉価な処置が、変異体遺伝子を無効とする。理論によるアプローチは、変異体ハンチンチンの遺伝子転写停止、変異体 m R N A 破壊および翻訳遮断を含む。各々が変異体ハンチンチンの喪失という同じ結果に到る。

【 0 2 1 9 】

## III. ハンチンチン遺伝子

ハンチントン病と関連する疾患遺伝子は、ハンチンチンまたは(h t t)と呼ばれる。ハンチンチン座位は大きく、1 8 0 kb に及び、6 7 エクソンからなる。ハンチンチン遺伝子は広範に発現され、正常発達に必要である。種々の胎児および成体組織において種々の相対的豊富さを示す、2 つの選択的ポリアデニル化形態として発現される。大きなトランスクリプトは約 1 3 . 7 kb であり、主に成体および胎児脳で発現され、約 1 0 . 3 kb の小トランスクリプトはより広範に発現される。2 つのトランスクリプトは、その 3 ' 非翻訳領域が異なる(Lin et al., 1993)。両メッセージは、3 1 4 4 アミノ酸を含む 3 4 8 キロダルトンタンパク質をコードすると予測される。ハンチントン病に至る遺伝的欠陥は、m R N A に新規性質を付与するかまたはタンパク質の機能を変えると考えられる。

【 0 2 2 0 】

10

20

30

40

50

本発明は、RNA干渉を利用してハンチンチン(例えば、野生型および/または変異体ハンチンチン)を標的とする(Hutvagner et al., 2002)。二本鎖RNAの一鎖(s i RNA)は、ハンチンチンmRNA内の標的配列を補完する。s i RNAをニューロンに挿入後、s i RNAは部分的に巻き戻され、部位特異的方式でハンチンチンmRNA内の多型領域に結合し、mRNAヌクレアーゼを活性化させる。このヌクレアーゼはハンチンチンmRNAを開裂し、それによりハンチンチン(例えば、野生型および/または変異体ハンチンチン)の翻訳を停止させる。細胞は部分的に消化されたmRNAを排除し、そうして翻訳を妨げるか、または細胞は部分的に翻訳されたタンパク質を消化する。ある態様において、ニューロンは、その産生を排除することにより変異体ハンチンチンの被害を阻止し、正常アレルからの野生型ハンチンチンで生き残る。

10

## 【0221】

本発明の態様において、本発明のRNAサイレンシング剤は、図8に挙げる標的配列の1以上のターゲティングができる。ある例示的態様において、本発明のRNAサイレンシング剤は、ヒトh t t遺伝子の1214、1218、1219、1257、1894、1907、2866、4041、4049、5301、6016、6579、8603、10125、10146、10150、424、456、522、527、878、879、908、1024、1165、1207、1212、1217、1220、1223、1227、1229、1260、1403、1470、1901、1903、2411、2412、2865、3801、4040、4048、4052、4055、4083、4275、4372、4374、4376、4425、4562、4692、4721、5200、5443、5515、8609、10130、10134、10142、10169、10182、10186、10809、11116、11129、11134、11147、11412、11426、11443、11659、11666、11677、11863、11890、11927、11947、12163、12218、12223、12235、12279、12282、12297、12309、12313、12331、13136、13398、13403、13423、13428からなる群から選択される遺伝子位置で、挙げられた1以上の標的配列の標的配列の1以上をターゲティングできる(図8に示す)。ある例示的態様において、本発明のRNAサイレンシング剤は、ヒトh t t遺伝子の5301、10125、10146、10150、424、878、879、4083、4275、4562、4721、5200、10130、10134、10142、11116、11129、11134、11147、11412、11426、11443、11659、11666、11677、11863、11890、11927、11947、12163、12218、12223、12235、12279、12282、12297、12331、13136、13423および13428からなる群から選択される遺伝子位置で、挙げられた1以上の標的配列の標的配列の1以上をターゲティングできる(図8に示す)。特にヒトh t t遺伝子の例示的標的配列は、10150(5' CAGUAAAGAGAUUA 3'(配列番号1))、10146(5' AUAUCAAGUAAAGAGA 3'(配列番号2))および10125(5' CUCAGGAUUUAAA 3'(配列番号3))の位置で見ることができる。各標的配列のゲノム配列は、例えば、NCBIにより維持されている公的に利用可能なデータベースに見ることができる。

20

30

40

## 【0222】

ある例示的態様において、1以上の標的配列で標的配列の1以上をターゲティングできる本発明のRNAサイレンシング剤を、下記表1および図21に示す(これはまた例示的修飾も含む)。

## 【0223】

50

【表 1】

GCUGCCGGG	受入番号	位置	ターゲティング領域(20量体)	ターゲティング領域(30量体)
HTT	NM_002111.6	1214	GUCCA GGUUUA UGAA CUGAC	AGCUUGUCCA GGUUUA UGAA CUGA CGUUAC
HTT	NM_002111.6	1218	AGGUUUA UGAA CUGA CGUUA	UGUCCA GGUUUA UGAA CUGA CGUUA CAUCA
HTT	NM_002111.6	1219	GGUUUA UGAA CUGA CGUUA C	GUCCA GGUUUA UGAA CUGA CGUUA CAUCAU
HTT	NM_002111.6	1257	ACCA CA UGUUGUGA CCGGA	CCAA GA CCA CA UGUUGUGA CCGGA GCCCU
HTT	NM_002111.6	1894	UGUGUUA GA CCGUA CCGA CA	GAA AUUGUGUUA GA CCGUA CCGA CA CCA G
HTT	NM_002111.6	1907	ACCGA CA CCA GUA UUUUGG	ACCGUA CCGA CA CCA GUA UUUUGGCCUUC
HTT	NM_002111.6	2866	ACGA GUGCUA AUA UGUUG	CAAGAA CGA GUGCUA AUA UGUUGUCAUC
HTT	NM_002111.6	4041	UGAAA UCCUGCUUUA GUCCA	AUA CCUGAAA UCCUGCUUUA GUCCA GAA CC
HTT	NM_002111.6	4049	UGCUUUA GUCCA GAA CCAA U	AAUCCUGCUUUA GUCCA GAA CCAA UGA UGG
HTT	NM_002111.6	5301	GGGCA GUA CUUCA CCGUA	AGA UGGGGA CAGUA CUUCA CCGUA GAA GA
HTT	NM_002111.6	6016	GGCA AUCA GUCUGUUGUG	AUCCA GGCA AUCA GUCUGUUGUGAAA C
HTT	NM_002111.6	6579	GCCUGUA GCUCCA UGCUUA	CCUA AGCCUGUA GCUCCA UGCUUA GCCU
HTT	NM_002111.6	8603	GCCCA CUGCGUGA CAUUA	GGA UCGCCCA CUGCGUGA CAUUA CA GCC
HTT	NM_002111.6	10125	UUCUUCUA GGAUUUAAA U	CUUCUUUCUUCUA GGAUUUAAA UUUAA U
HTT	NM_002111.6	10146	UAA UUA UCA GUA A GA GA	AAAUUUA UUA UCA GUA A GA GA UUA AU
HTT	NM_002111.6	10150	UAUA UCA GUA A GA GA UUA	UUA UUA UCA GUA A GA GA UUA UUUUA
HTT	NM_002111.6	424	ACUJUCA GCUA CCA A GA A G	AAA GA ACUJUCA GCUA CCA A GA A G CCGU
HTT	NM_002111.6	456	AUUGUCUGA CAUA UGUGAA	GAA UCAUUGUCUGA CAUA UGUGAAA CAU
HTT	NM_002111.6	522	UUCUGGGCA UCGCUA UGGAA	
HTT	NM_002111.6	527	GGCA UCGCUA UGGAA CUUUU	UUCUGGGCA UCGCUA UGGAA CUUUUUCUGC
HTT	NM_002111.6	878	GCAA AUGA CA A UGAA AUUA	AUUUUGCAA AUGA CA A UGAA AUUA GGUUU
HTT	NM_002111.6	879	CAAAUGA CA A UGAA AUUA A G	UUUUGCAA AUGA CA A UGAA AUUA GGUUUU
HTT	NM_002111.6	908	AA GGCUJUCA UA GCGAA CCU	UGUJUA A GGCUJUCA UA GCGAA CCUGAA GU
HTT	NM_002111.6	1024	ACUAAA UGUGCUUUA GGCU	UGGCUA CUAAA UGUGCUUUA GGCUUA CUC
HTT	NM_002111.6	1165	CGGA GUGA CA A GGA A A GAA A	AGCUUCGGA GUGA CA A GGA A A GAA A UGGAA
HTT	NM_002111.6	1207	GCA GCUUGUCCA GGUUUA UG	GCA GA GCA GCUUGUCCA GGUUUA UGAA CUG
HTT	NM_002111.6	1212	UUGUCCA GGUUUA UGAA CUG	GCA GCUUGUCCA GGUUUA UGAA CUGA CGUU
HTT	NM_002111.6	1217	CAGGUUUA UGAA CUGA CGUU	UUGUCCA GGUUUA UGAA CUGA CGUUA CAUC
HTT	NM_002111.6	1220	GUUUA UGAA CUGA CGUUA CA	UCCA GGUUUA UGAA CUGA CGUUA CAUCA UA
HTT	NM_002111.6	1223	UAUGAA CUGA CGUUA CAUCA	AGGUUUA UGAA CUGA CGUUA CAUCA CAC
HTT	NM_002111.6	1227	AA CUGA CGUUA CAUCA UCA CA	UUAUGAA CUGA CGUUA CAUCA UCA CA CAGCA
HTT	NM_002111.6	1229	CUGA CGUUA CAUCA UCA CA CA	AUGAA CUGA CGUUA CAUCA UCA CA CAGCC
HTT	NM_002111.6	1260	ACAA UGUUGUGA CCGGA GCC	AGA CCA CA UGUUGUGA CCGGA GCCUGGA
HTT	NM_002111.6	1403	GGGA GUA UUGUGGA A CUUA U	GUA GUGGGA GUA UUGUGGA A CUUA UA GCUG
HTT	NM_002111.6	1470	AA GGCA A A GUGCUUUA GGA	ACAAA A A GGCAA A GUGCUUUA GGA GAA GA
HTT	NM_002111.6	1901	GACGGUA CCGA CA A CCA GUA	UGUUA GA CGGUA CCGA CA A CCA GUA UUUUGG
HTT	NM_002111.6	1903	CGGUA CCGA CA A CCA GUA UU	UUA GA CGGUA CCGA CA A CCA GUA UUUUGGC
HTT	NM_002111.6	2411	UUGA A CUA CA UCGA UCA UGG	ACAUCUUGA A CUA CA UCGA UCA UGGAGA CC
HTT	NM_002111.6	2412	UGA A CUA CA UCGA UCA UGGA	CAUCUUGA A CUA CA UCGA UCA UGGAGA CCC
HTT	NM_002111.6	2865	AA CGA GUGCUA A UA A UGUU	GCAA GAA CGA GUGCUA A UA A UGUUGUCAU
HTT	NM_002111.6	3801	GUCCUGUUA CA A CA A GUA A A	CUCA GGUCCUGUUA CA A CA A GUA A A UCCUC
HTT	NM_002111.6	4040	CUGAAA UCCUGCUUUA GUCG	GAUA CCUGAAA UCCUGCUUUA GUCGAGA A C
HTT	NM_002111.6	4048	CUUGCUUUA GUCCA GAA CCAA	AAA UCCUGCUUUA GUCCA GAA CCAA UGA UG
HTT	NM_002111.6	4052	UUUA GUCGA GAA CCAA UGA U	CCUGCUUUA GUCGA GAA CCAA UGA UGGCAA
HTT	NM_002111.6	4055	AGUCGAA A CCAA UGA UGGC	GCUUUA GUCGA GAA CCAA UGA UGGCA A CUG
HTT	NM_002111.6	4083	GUUGUCA A CAA UUGUUGA A G	UGUUUGUGUCA A CAA UUGUUGAA GAUCUCU
HTT	NM_002111.6	4275	UGAGAA CA UGUGCA GCGG	CAGCCUGA GGA A CA UGUGCA GCGCGA GCA
HTT	NM_002111.6	4372	UGUCA CAAA GAA CCGUGCA G	ACGA GUGUCA CAAA GAA CCGUGCA GAUAA G
HTT	NM_002111.6	4374	UCA CAAA GAA CCGUGCA GA U	GAGUGUCA CAAA GAA CCGUGCAGA UAA GAA

10

20

30

40

50

【表 2】

HTT	NM_002111.6	4376	A C A A G A A C C G U G C A G A U A A	G U G U C A C A A G A A C C G U G C A G A U A A G A A U G
HTT	NM_002111.6	4425	U U G A A C C U C U U G U U A U A A A A	U U U G U U U G A A C C C U U G U U A U A A A G C U U U
HTT	NM_002111.6	4562	U U U A U U G G C U U U G U A U U G A A	A G G U U U U A U U G G C U U U G U A U U G A A C A G U
HTT	NM_002111.6	4692	U C A U U G G A A U U C C U A A A A U C	A C A G A U C A U U G G A A U U C C U A A A A U C A U U C A
HTT	NM_002111.6	4721	U G U A U G G C A U C A U G G C C A G	A G C U C U G U G A U G G C A U C A U G G C C A G U G G A A
HTT	NM_002111.6	5200	G A U U U C C C A G U C A A C U G A A G	G U U C U G A U U U C C C A G U C A A C U G A A G A U A U U
HTT	NM_002111.6	5443	G A G U G A G C A G C A A C A U A C U U	G A A A U G A G U G A G C A G C A A C A U A C U U U C U A U
HTT	NM_002111.6	5515	G U C U G G A A U G U U C C G G A G A A	U U C A A G U C U G G A A U G U U C C G G A G A A U C A C A
HTT	NM_002111.6	8609	U G C G U G A A C A U U C A C A G C C A	C C C A C U G C G U G A A C A U U C A C A G C C A G C A G C
HTT	NM_002111.6	10130	C U C A G G A U U U A A A U U U A A U	U U C U U C U C A G G A U U U A A A U U U A A U U U A U A U
HTT	NM_002111.6	10134	G G A U U U A A A A U U U A A U U A U A	U C U C A G G A U U U A A A A U U U A A U U A U A C A G U
HTT	NM_002111.6	10142	A A U U U A A U U A U A U C A G U A A A	U U U A A A U U U A A U U A U A U C A G U A A A G A G A U
HTT	NM_002111.6	10169	A U U U U A A C G U A A C U C U U U C U	G A U U A A U U U U A A C G U A A C U C U U U C U A U G C C
HTT	NM_002111.6	10182	U C U U U C U A U G C C C G U G U A A A	G U A A C U C U U U C U A U G C C C G U G U A A A G U A U G
HTT	NM_002111.6	10186	U C U A U G C C C G U G U A A A G U A U	C U C U U U C U A U G C C C G U G U A A A G U A U G U G A A
HTT	NM_002111.6	10809	C U U U U A G U C A G G A G A G U G C A	G A C C C U U U U A G U C A G G A G A G U G C A G A U C U
HTT	NM_002111.6	11116	U G U U U G G G U A U U G A A U G U G	G U C G A U G U U U G G G U A U U G A A U G U G U G A A G
HTT	NM_002111.6	11129	G A A U G U G G U A A G U G G A G G A A	G U A U U G A A U G U G G U A A G U G G A G G A A A U G U U
HTT	NM_002111.6	11134	U G G U A A G U G G A G G A A A U G U U	G A A U G U G G U A A G U G G A G G A A A U G U U G G A A C
HTT	NM_002111.6	11147	A A A U G U G G A A C U C U G U G C A	G G A G G A A A U G U G G A A C U C U G U G C A G G U G C
HTT	NM_002111.6	11412	A U G U U G A G G A G G C C U U A A	G U C C G A U G U U G A G G A G G C C U U A A G G G A A
HTT	NM_002111.6	11426	C C U J A A G G G A A G C U A C U G A A	G A G G C C U J A A G G G A A G C U A C U G A A U U A U A
HTT	NM_002111.6	11443	G A A U U A U A A C A C G U A A G A A A	C U A C U G A A U U A U A A C A C G U A A G A A A U C A C
HTT	NM_002111.6	11659	A U G U U A C A U U U G U A A G A A A	G C U A G A U G U U A C A U U U G U A A G A A A U A A C A
HTT	NM_002111.6	11666	C A U U U G U A A G A A U A A C A C U	G U U U A C A U U U G U A A G A A U A A C A C U G U G A A
HTT	NM_002111.6	11677	A A U A A C A C U G U G A A U G U A A A	U A A G A A A U A A C A C U G U G A A U G U A A A A C A G A
HTT	NM_002111.6	11863	A A U A U G A G C U C A U U A G U A A A	A G A U G A A U A U G A G C U C A U U A G U A A A A A U G A
HTT	NM_002111.6	11890	U C A C C C A C G C A U A U A C A U A A	U G A C U C A C C C A C G C A U A U A C A U A A A G U A U
HTT	NM_002111.6	11927	A U A U A G A C A C A C U C A U A A U U	U G U G C A U A U A G A C A C A C U C A U A A U U U U A C A
HTT	NM_002111.6	11947	U U A C A C A C A C A C C U C U C A A G	U A A U U U U A C A C A C A C C C U C U C A A G A C G G A
HTT	NM_002111.6	12163	G A C U U A U C A U G U U C C U A A A	A G G A A G A C U U U A U C A U G U U C C U A A A A A U C U
HTT	NM_002111.6	12218	U U G U G C A A A U G U G A U U A A U	A A A U U U U G U U G C A A A U G U G A U A A U U U G G U
HTT	NM_002111.6	12223	G C A A A U G U G A U J A A U U U G G U	U U G U G C A A A U G U G A U J A A U U U G G U U G U C A
HTT	NM_002111.6	12235	A A U U U G G U G U C A A G U U U U G	U G A U U A A U U U G G U G U C A A G U U U U G G G G G U
HTT	NM_002111.6	12279	U U U G U U U C C U G C G G U A A U	U U G C U U U U G U U U C C U G C G G U A A U A U C G G
HTT	NM_002111.6	12282	G U U U U C U G C U G G U A A U A U C	C U U U G U U U U C C U G C G G U A A U A U C G G G A A
HTT	NM_002111.6	12297	A U A U C G G G A A A G A U U U U A A U	U G G U A A U A U C G G G A A A G A U U U U A A U G A A A C
HTT	NM_002111.6	12309	A U U U U A A U G A A A C C A G G G U A	G A A A G A U U U U A A U G A A A C C A G G G U A G A A U U
HTT	NM_002111.6	12313	U A A U G A A A C C A G G G U A G A A U	G A U U U A A U G A A A C C A G G G U A G A A U G U G U U
HTT	NM_002111.6	12331	A U U G U U U G G C A A U G C A C U G A	G U A G A A U U G U U U G G C A A U G C A C U G A A G C G U
HTT	NM_002111.6	13136	C C C C U C A G U U G U U U C U A A G A	G C C U U C C C U C A G U U G U U U C U A A G A G C A G A
HTT	NM_002111.6	13398	G G A C U G A C G A G A G U G U A U A	G G G A A G G A C U G A C G A G A G U G U A U A U U U A A
HTT	NM_002111.6	13403	G A C G A G A G A U G U A U A U U U A A	G G A C U G A C G A G A U G U A U A U U U A A U U U U U
HTT	NM_002111.6	13423	U U U U U A A C U G C U G C A A A C A	U U U A A U U U U U A A C U G C U G C A A A C A U U G U A
HTT	NM_002111.6	13428	U A A C U G C U G C A A A C A U U G U A	U U U U U A A C U G C U G C A A A C A U U G U A C A U C C
HTT	NM_002111.6	152	A C C C U G G A A A A G C G U A U G A A	U G G C G A C C C U G G A A A A G C G U A U G A A G G C C U
HTT	NM_002111.6	170	A A G G C C U U C G A G U C C C U C A A	U G A U G A A G G C C U U C G A G U C C C U C A A G U C C U
HTT	NM_002111.6	402	C G C U G C A C C G A C C A A A G A A A	G G A G C C G C U G C A C G A C C A A A G A A A G A A A C U
HTT	NM_002111.6	420	A A G A A C U U U C A G C U A C C A A G	A A A G A A A G A A C U U U C A G C U A C C A A G A A A G A
HTT	NM_002111.6	430	A G C U A C C A A G A A A G A C C G U G	C U U U C A G C U A C C A A G A A A G A C C G U G U G A A U
HTT	NM_002111.6	446	C G U G U G A A U C A U U G U C U G A C	A A G A C C G U G U G A A U C A U U G U C U G A C A A U A U
HTT	NM_002111.6	454	U C A U U G U C U G A C A A U A U G U G	G U G A A U C A U U G U C U G A C A A U A U G U G A A A A C
HTT	NM_002111.6	462	U G A C A A U A U G U G A A A A C A U A	U U G U C U G A C A A U A U G U G A A A A C A U A U G U G C
HTT	NM_002111.6	467	A U A U G U G A A A C A U A U G U G C	U G A C A A U A U G U G A A A A C A U A U G U G C A C A G U
HTT	NM_002111.6	211	G C A G C A G C A G C A G C A G C A G C	C A G C A G C A G C A G C A G C A G C A G C A G C A G C

10

20

30

40

表 1. 本発明のある態様によるさらなる標的配列

【 0 2 2 4 】

IV. s i R N A 設計

ある態様において、s i R N A は、次のように設計される。まず、標的遺伝子(例えば、h t t 遺伝子)、例えば、図 8 に示す標的配列の 1 以上の部分、例えば、標的遺伝子の 5 ' 非翻訳領域から 1 0 1 5 0、1 0 1 4 6 および/または 1 0 1 2 5 を選択する。これらの部位での m R N A の開裂は、対応する変異体タンパク質の翻訳を排除するはずである。センス鎖を、標的配列に基づき設計した(図 8 参照)。好ましくは、該部分(および対応するセンス鎖)は、約 1 9 ~ 2 5 ヌクレオチド、例えば、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 また

50

は25ヌクレオチド含む。より好ましくは、該部分(および対応するセンス鎖)は、21、22または23ヌクレオチド含む。しかしながら、当業者は、19未満のヌクレオチドまたは25を超えるヌクレオチドの長さを有するsiRNAも、RNAiの介在に機能できることを認識する。従って、このような長さのsiRNAも、RNAiに介在する能力を保持する限り、本発明の範囲内である。長いRNAi剤は、ある哺乳動物細胞においてインターフェロンまたはPKR応答を惹起することが示されており、これは望ましくない可能性がある。好ましくは、本発明のRNAi剤はPKR応答を惹起しない(すなわち、十分に短い長さである)。しかしながら、長いRNAi剤は、例えば、PKR応答を産生できない細胞型またはPKR応答が代替的に手段により下方制御または減弱されている状況では有用であり得る。

10

## 【0225】

センス鎖配列を、標的配列が原則的に鎖の中心になるように設計する。標的配列の中心を外れた位置への移動は、ある場合、siRNAによる開裂の効率を下げ得る。野生型mRNAのオフサイレンシングが検出されるならば、このような組成物、すなわち、低効率組成物の使用が望ましいことがある。

## 【0226】

アンチセンス鎖は、通常センス鎖と同じ長さであり、相補的ヌクレオチドを含む。ある態様において、これらの鎖は完全に相補的であり、すなわち、これらの鎖は、整列またはアニールしたとき、平滑末端である。他の態様において、これらの鎖は、1、2、3、4、5、6または7ヌクレオチドオーバーハングが産生されるように、アラインまたはアニールすることを含み、すなわち、センス鎖の3'末端が、アンチセンス鎖の5'末端より1、2、3、4、5、6または7ヌクレオチド伸びおよび/またはアンチセンス鎖の3'末端がセンス鎖の5'末端より1、2、3、4、5、6または7ヌクレオチド延びる。オーバーハングは、標的遺伝子配列(またはその相補体)に対応するヌクレオチドを含む(またはこれからなる)。あるいは、オーバーハングは、デオキシリボヌクレオチド、例えばdTssまたはヌクレオチドアナログまたは他の適当な非ヌクレオチド物質を含む(またはこれからなる)。

20

## 【0227】

アンチセンス鎖のRISCへのエントリーを促進する(およびそれにより標的開裂およびサイレンシングの効率を増加または改善する)ために、引用によりその内容を全体に本明細書に包含させる、“RNAサイレンシングの有効性を制御するための方法および組成物”なる表題の米国特許7,459,547号、7,772,203号および7,732,593号(2003年6月2日出願)および“RNAiの有効性および特異性を増強するための方法および組成物”なる表題の米国特許8,309,704号、7,750,144号、8,304,530号、8,329,892号および8,309,705号(2003年6月2日出願)に詳述されるように、センス鎖の5'末端とアンチセンス鎖の3'末端の間の塩基対強度を改変、例えば、低下または減少させ得る。本発明のこれらの側面のある態様において、塩基対強度は、第一鎖またはアンチセンス鎖の5'末端と第二鎖またはセンス鎖の3'末端の間のG:C塩基対が、第一鎖またはアンチセンス鎖の3'末端と第二鎖またはセンス鎖の5'末端の間より少ないため、低い。他の態様において、塩基対強度は、第一鎖またはアンチセンス鎖の5'末端と第二鎖またはセンス鎖の3'末端の間の少なくとも一つの不適正塩基対により低い。ある例示的態様において、不適正塩基対は、G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:CおよびU:Uからなる群から選択される。他の態様において、塩基対強度は、第一鎖またはアンチセンス鎖の5'末端と第二鎖またはセンス鎖の3'末端の間の少なくとも一つの揺らぎ塩基対、例えば、G:Uにより低い。他の態様において、塩基対強度は、希ヌクレオチド、例えば、イノシン(I)を含む少なくとも一つの塩基対により低い。ある例示的態様において、塩基対は、I:A、I:UおよびI:Cからなる群から選択される。さらに他の態様において、塩基対強度は、修飾ヌクレオチドを含む少なくとも一つの塩基対により低い。ある例示的態様において、修飾ヌクレオチドは、2-アミノ-G、2-アミノ-A、2,6-ジアミノ-Gおよび2,6-ジアミノ-Aからなる群から選択される。

30

40

## 【0228】

50

図 8 に示す h t t 標的配列のターゲティングに適切な s i R N A の設計を、下に詳細に記載する。s i R N A は、h t t 遺伝子に見られるあらゆる他の標的配列に対して、上記例示的教示に従い設計され得る。さらに、本テクノロジーは、あらゆる他の標的配列、例えば、非病因標的配列のターゲティングに適用可能である。

#### 【 0 2 2 9 】

s i R N A が m R N A (例えば、ハンチンチン m R N A) を破壊する有効性を評価するために、ショウジョウバエベースのインビトロ m R N A 発現系で s i R N A を c D N A (例えば、ハンチンチン c D N A) とインキュベートさせ得る。3 2 P で放射標識された新たに合成された m R N A (例えば、ハンチンチン m R N A) を、アガロースゲル上でオートラジオグラフィにより検出する。開裂 m R N A の存在が、m R N A ヌクレアーゼ活性を示す。適切な対照は、s i R N A の省略を含む。あるいは、選択 s i R N A と同じヌクレオチド組成を有するが、適切な標的遺伝子に顕著な配列相補性がない対照 s i R N A を選択する。このような陰性対照を、選択 s i R N A のヌクレオチド配列を無作為に混合することにより設計できる；相同性サーチを、陰性対照が適切なゲノムにおける何らかの他の遺伝子との相同性を欠くことを確実にするために実施できる。さらに、陰性対照 s i R N A を、配列に 1 以上の塩基ミスマッチを導入することにより設計できる。

10

#### 【 0 2 3 0 】

最適 m R N A 特異性および最大 m R N A 開裂を生じる s i R N A - m R N A 相補性の部位を選択する。

#### 【 0 2 3 1 】

本発明は、主に拡張 C A G 領域変異と異なる遺伝子の特異的標的配列(例えば、h t t における)のターゲティングに注目するが、変異体領域のターゲティングがある状況においては治療戦略として適用性を有し得ることを当業者は認識する。変異体領域のターゲティングは、C A G を直列で補完する s i R N A を使用して達成できる。s i R N A c a g は、C A G 相補性で m R N A に結合するが、拡張された C A G 系列に結合する機会が多いことが予測される。複数 s i R N A c a g が、変異体ハンチンチン m R N A に結合する(野生型ハンチンチン m R N A に対して少ないのと逆に)；それにより、変異体ハンチンチン m R N A が開裂される可能性が高い。この方法を使用した m R N A 不活性化の成功はまた正常または野生型ハンチンチン m R N A も排除する。また、C A G 反復を同様に有する他の正常遺伝子(約 7 0)を、その m R N A が s i R N A と相互作用するならば、少なくともある程度、不活性化する。この方法は、それ故に、消耗戦略に依存する - すなわち、野生型ハンチンチン m R N A またはポリグルタミンをコードする他の約 6 9 m R N A よりも多くの変異体ハンチンチン m R N A が破壊される。

20

30

#### 【 0 2 3 2 】

##### V. R N A i 剤

本発明は、例えば、上記のとおり設計された、s i R N A 分子を含む。本発明の s i R N A 分子は化学的に合成できまたはインビトロで D N A 鋳型からまたはインビボで例えば、s h R N A からまたはインビトロ転写 d s R N A 鋳型を 2 0、2 1 または 2 3 b p 二本鎖 R N A 介在 R N A i のプールに開裂するための組み換えヒトダイサー(DICER)酵素の使用により、転写され得る。s i R N A 分子を、当分野で知られる任意の方法を使用して設計

40

#### 【 0 2 3 3 】

ある側面において、干渉リボ核酸としての R N A i 剤、例えば、上記の s i R N A または s h R N A の代わりに、R N A i 剤は、干渉リボ核酸、例えば、上記の s h R N A をコードすることができる。換言すると、R N A i 剤は、干渉リボ核酸の転写鋳型であり得る。それ故に、本発明の R N A i 剤はまた小ヘアピン R N A (s h R N A) および s h R N A を発現するために改変された発現構築物も含み得る。s h R N A の転写はポリメラーゼ III (p o l I I I) プロモーターで開始され、4 - 5 - チミン転写終結部位の 2 位で停止すると考えられる。発現により、s h R N A は、3 ' U U - オーバーハングを伴うステムループ構造に折りたたまれると考えられる；その後これらの s h R N A の末端が処理され、s h R N

50



Aが約21~23ヌクレオチドのsiRNA様分子に変換される(Brummelkamp et al., 2002; Lee et al., 2002, supra; Miyagishi et al., 2002; Paddison et al., 2002, supra; Paul et al., 2002, supra; Sui et al., 2002 supra; Yu et al., 2002, supra)。shRNA設計および使用に関するさらなる情報は、インターネットで次のアドレスで見ることができる(katandin.cshl.org:9331/RNAi/docs/BseRI-BamHI\_Strategy.pdf and katandin.cshl.org:9331/RNAi/docs/Web\_version\_of\_PCR\_strategy1.pdf)。

#### 【0234】

本発明の発現構築物は、適切な発現系における使用に適するあらゆる構築物を含み、当分野で知られるように、レトロウイルスベクター、直線状発現カセット、プラスミドおよびウイルスまたはウイルス由来ベクターを含むが、これらに限定されない。このような発現構築物は、誘導性プロモーター、U6 snRNAプロモーターまたはH1 RNAポリメラーゼIIIプロモーターのようなRNA Pol IIIプロモーター系または当分野で知られる他のプロモーターの1以上を含み得る。構築物は、siRNAの一鎖または両鎖を含み得る。両鎖を発言する発現構築物はまた両鎖を連結するループ構造も含んでよくまたは各鎖は、同じ構築物内の別のプロモーターから別々に転写され得る。各鎖はまた別の発現構築物から転写され得る(Tuschl, T., 2002, supra)。

#### 【0235】

合成siRNAは、カチオン性リポソームトランスフェクションおよびエレクトロポレーションを含む、当分野で知られる方法により細胞に送達できる。標的遺伝子(すなわち、htt遺伝子)の長期抑制を得るためおよびある状況下での送達を促進するために、1以上のsiRNAを、組み換えDNA構築物から細胞内で発現させ得る。細胞における長期標的遺伝子抑制を可能とするために組み換えDNA構築物から細胞内でsiRNA二本鎖を発現するこのような方法は当分野で知られ、機能的二本鎖siRNAの発現が可能な哺乳動物Pol IIIプロモーター系を含む(例えば、H1またはU6/snRNAプロモーター系(Tuschl, T., 2002, supra); (Bagella et al., 1998; Lee et al., 2002, supra; Miyagishi et al., 2002, supra; Paul et al., 2002, supra; Yu et al., 2002), supra; Sui et al., 2002, supra)。RNA Pol IIIによる転写終結は、DNA鋳型における4連続的T残基のランで生じ、siRNAトランスクリプトが特異的配列で末端する機序を提供する。siRNAは、5'-3'および3'-5'配向で標的遺伝子の配列に相補的であり、siRNAの2鎖は同じ構築物にまたは別の構築物に発現させ得る。H1またはU6 snRNAプロモーターにより駆動され、細胞で発現するヘアピンsiRNAは、標的遺伝子発現を阻害できる(Bagella et al., 1998; Lee et al., 2002, supra; Miyagishi et al., 2002, supra; Paul et al., 2002, supra; Yu et al., 2002), supra; Sui et al., 2002, supra)。T7プロモーター制御下にsiRNA配列を含む構築物も、細胞にT7 RNAポリメラーゼを発現するベクターと共トランスフェクトしたとき、機能的siRNAを作る(Jacque et al., 2002, supra)。単一構築物は、同じ遺伝子または複数遺伝子をターゲティングする、遺伝子コード化httの複数領域のようなsiRNAのための複数配列コーディングを含んでよく、例えば、別のPol IIIプロモーター部位により駆動され得る。

#### 【0236】

動物細胞は、動物発育中に転写後または翻訳後レベルで遺伝子発現を制御できる、マイクロRNA(miRNA)と呼ばれる約22ヌクレオチドの様々な非コーディングRNAを発現する。miRNAの一つの共通する特色は、恐らく、ダイサー、RNase III型酵素またはそのホモログにより、全て、約70ヌクレオチド前駆体RNAステムループから切り取られることである。miRNA前駆体のステム配列を、標的mRNAに相補的な配列に変えることにより、改変前駆体を発現するベクター構築物を、哺乳動物細胞における特異的mRNA標的に対するRNAiを開始するためのsiRNAの産生に使用できる(Zeng et al., 2002, supra)。ポリメラーゼIIIプロモーターを含むDNAベクターから発現されたとき、マイクロRNA設計ヘアピンは、遺伝子発現をサイレンスできる(McManus et al., 2002, supra)。多型をターゲティングするマイクロRNAも、siRNA介在遺伝

10

20

30

40

50

子 - サイレンシング非存在下で、変異体タンパク質の翻訳の遮断に有用であり得る。このような適用は、例えば、設計 *siRNA* が、野生型タンパク質の標的外サイレンシングを引き起こす状況で有用であり得る。

【0237】

ウイルス介在送達機序はまた、例えば、RNA Pol IIプロモーター転写下に *siRNA* を担持する組み換えアデノウイルスの産生により、*siRNA* の発現を介する標的遺伝子の特異的サイレンシングの誘発にも使用できる(Xia et al., 2002, supra)。これらの組み換えアデノウイルスによるHeLa細胞の感染は、内在性標的遺伝子発現低減を可能にする。組み換えアデノウイルスベクターの、*siRNA* の標的遺伝子を発現するトランスジェニックマウスへの注射は、インピボでの標的遺伝子発現の減少をもたらす。Id。動物モデルにおいて、全胚エレクトロポレーションは、着床後マウス胚へ合成 *siRNA* を効率的に送達できる(Calegari et al., 2002)。成体マウスにおいて、*siRNA* の効率的送達は、動物に尾静脈から大量の *siRNA* 含有溶液を急速注射(5秒以内)する、“高圧”送達技術により達成できる(Liu et al., 1999, supra; McCaffrey et al., 2002, supra; Lewis et al., 2002)。ナノ粒子およびリポソームも、動物への *siRNA* 送達に使用できる。ある例示的態様において、組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)およびその関連ベクターを、1以上の *siRNA* の細胞、例えば、神経系細胞(例えば、脳細胞)への送達に使用できる(US特許出願2014/0296486号、2010/0186103号、2008/0269149号、2006/0078542号および2005/0220766号)。

10

20

【0238】

本発明の核酸組成物は、非修飾 *siRNA* および架橋 *siRNA* 誘導体または例えば3'末端または5'末端に結合した非ヌクレオチド部分を有する誘導体のような修飾 *siRNA* の両方を含む。*siRNA* 誘導体のこの方法での修飾は、対応する *siRNA* と比較して、得られた *siRNA* 誘導体の細胞の取り込みを改善するかまたは細胞ターゲティング活性を増強でき、細胞における *siRNA* 誘導体のトレーシングに有用でありまたは対応する *siRNA* と比較して *siRNA* 誘導体の安定性を改善する。

【0239】

ここに記載するとおり細胞または生物全体に導入された改変RNA前駆体は、所望の *siRNA* 分子の産生をもたらす。このような *siRNA* 分子は、次いで、RNAi経路の内在性タンパク質成分と結合し、特異的mRNA配列と結合し、開裂および破壊のための標的とする。この方法で、改変RNA前駆体から産生された *siRNA* により標的化されるmRNAは、細胞または生物で枯渇し、細胞または生物におけるそのmRNAによりコードされるタンパク質濃度の低下に至る。RNA前駆体は、一般にdsRNAのいずれか一鎖を個々にコードするまたはRNAヘアピンループ構造のヌクレオチド配列全体をコードする核酸分子である。

30

【0240】

本発明の核酸組成物は、コンジュゲートされていなくても、組成物の性質、例えば、吸収、有効性、バイオアベイラビリティおよび/または半減期のような薬物動態パラメータを増強するため、ナノ粒子のような他の部分とコンジュゲートされていてもよい。コンジュゲーションは、当分野で知られる方法により、例えば、Lambert et al., Drug Deliv. Rev.: 47(1), 99-112 (2001)(ポリアルキルシアノアクリレート(PACA)ナノ粒子に充填された核酸を記載する); Fattal et al., J. Control Release 53(1-3):137-43 (1998)(ナノ粒子に結合した核酸を記載する); Schwab et al., Ann. Oncol. 5 Suppl. 4:55-8 (1994)(挿入剤、疎水性基、ポリカチオンまたはPACAナノ粒子に連結した核酸を記載する); およびGodard et al., Eur. J. Biochem. 232(2):404-10 (1995)(ナノ粒子に連結した核酸を記載する)の方法を使用して、達成できる。

40

【0241】

本発明の核酸分子を、当分野で知られる任意の方法を使用して標識もできる。例えば、核酸組成物をフルオロフォア、例えば、Cy3、フルオレセインまたはローダミンで標識で

50

きる。標識はキット、例えば、SILENCERTM siRNA 標識キット(Ambion)を使用して実施できる。さらに、siRNAを、例えば、<sup>3</sup>H、<sup>32</sup>Pまたは他の適切な同位体を使用して、放射標識してよい。

【0242】

さらに、RNAiが少なくとも一つの一本鎖RNA中間物を経て進行すると考えられるため、当業者は、ss-siRNA(例えば、ds-siRNAのアンチセンス鎖)も(例えば、化学的合成のために)設計し、ここに記載するように産生(例えば、酵素的に産生)または発現(例えば、ベクターまたはプラスミドから)させ、本願方法論に従い使用できる。さらに、無脊椎動物において、RNAiは、RNAiのエフェクターとして作用する長dsRNA(例えば、dsRNA約100~1000ヌクレオチド長、好ましくは約200~500、例えば、約250、300、350、400または450ヌクレオチド長)により効果的に誘発され得る(Brondani et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Dec. 4; 98(25): 14428-33. Epub 2001 Nov. 27.)。

10

【0243】

VI. 抗Htt RNAサイレンシング剤

本発明は、抗ハンチンチンRNAサイレンシング剤(例えば、siRNAおよびshRNA)、該RNAサイレンシング剤を製造する方法およびハンチンチンタンパク質(例えば、変異体ハンチンチンタンパク質)のRNAサイレンシングのための該改善されたRNAサイレンシング剤(またはその一部)の使用のための方法(例えば、研究および/または治療方法)に関する。RNAサイレンシング剤はアンチセンス鎖(またはその一部)を含み、ここで、アンチセンス鎖は、RNA介在サイレンシング機序(例えばRNAi)に介在するのに十分な相補性をヘテロ接合一塩基多型に対して有する。

20

【0244】

ある態様において、次の性質の一つまたは任意の組み合わせを有するsiRNA化合物が提供される：(1)完全化学的安定化(すなわち、非修飾2'-OH残基なし)；(2)非対称；(3)11~16塩基対二本鎖；(4)化学修飾ヌクレオチドの交互パターン(例えば、2'-フルオロおよび2'-メトキシ修飾)；および(5)5~8塩基の一本鎖、完全ホスホロチオエート化テイル。ホスホロチオエート修飾の数は重要である。この数は、種々の態様で計6~17で変わり得る。

【0245】

ある態様において、ここに記載するsiRNA化合物を、コレステロール、DHA、フェニルトロパン、コルチゾール、ビタミンA、ビタミンD、GalNacおよびガングリオジドを含むが、これらに限定されない種々のターゲティング剤にコンジュゲートできる。コレステロール修飾型は、広範な細胞型(例えば、HeLa、ニューロン、肝細胞、栄養芽細胞)で、先に使用した化学的安定化パターン(例えば、ピリミジンではなく、全プリンを修飾)に対してインピトロで有効性の5~10倍改善を示す。

30

【0246】

本明細書中に記載する構造的性質を有するある本発明の化合物は、“hsRNA-ASP”(高度安定化パターンを特徴する、疎水性修飾、低分子干渉RNA)と称し得る。さらに、このhsRNA-ASPパターンは、脳、脊髄にわたる分布、肝臓、胎盤、腎臓、脾臓およびいくつかの他の組織への送達の劇的改善を示し、それらを治療介入に利用可能とする。

40

【0247】

肝臓において、hsRNA-ASPは特異的に内皮およびクッパー細胞に送達されるが、肝細胞にされず、この化学的修飾パターンを、GalNacコンジュゲートに対する競合的テクノロジーではなく、むしろ補完的とする。

【0248】

本発明の化合物は、次の側面および態様において説明され得る。

【0249】

第一の側面において、ここに提供されるのは少なくとも16連続ヌクレオチドのオリゴヌ

50

クレオチドであり、該オリゴヌクレオチドは5'末端、3'末端および標的に対する相補性を有し、ここで、(1)オリゴヌクレオチドは交互の2'-メトキシ-リボヌクレオチドおよび2'-フルオロ-リボヌクレオチドを含み；(2)5'末端から2位および14位のヌクレオチドは2'-メトキシ-リボヌクレオチドではなく；(3)ヌクレオチドはホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合により結合し；そして(4)3'末端から1~6位または3'末端から1~7位のヌクレオチドはホスホロチオエート結合により隣接ヌクレオチドと結合する。

【0250】

第二の側面において、ここに提供されるのは第一オリゴヌクレオチドおよび第二オリゴヌクレオチドを含む二本鎖、化学修飾核酸であり、ここで、(1)第一オリゴヌクレオチドはここに記載するオリゴヌクレオチドである(例えば、配列番号1、2、3または4を含む)；(2)第一オリゴヌクレオチドの一部は第二オリゴヌクレオチドの一部と相補的であり；(3)第二オリゴヌクレオチドは交互の2'-メトキシ-リボヌクレオチド2'-フルオロ-リボヌクレオチドを含み；(4)第二オリゴヌクレオチドの3'末端から2位および14位のヌクレオチドは2'-メトキシ-リボヌクレオチドであり；および(5)第二オリゴヌクレオチドのヌクレオチドはホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合により結合する。

10

【0251】

第三の側面において、ここに提供されるのは、構造

$$X - A(-L - B - L - A)j(-S - B - S - A)r(-S - B)t - OR$$

[式中、Xは5'リン酸基であり；Aは、各々独立して2'-メトキシ-リボヌクレオチドであり；Bは、各々独立して2'-フルオロ-リボヌクレオチドであり；Lは、各々独立してホスホジエステルまたはホスホロチオエートリンカーであり；Sはホスホロチオエートリンカーであり；Rは水素およびキャッピング基(例えば、アセチルのようなアシル)から選択され；jは4、5、6または7であり；rは2または3であり；tは0または1である。]

20

を有するオリゴヌクレオチドである。

【0252】

第四の側面において、ここに提供されるのは第一オリゴヌクレオチドおよび第二オリゴヌクレオチドを含む二本鎖、化学修飾核酸であり、ここで、(1)第一オリゴヌクレオチドは第三の側面のオリゴヌクレオチドから選択され；(2)第一オリゴヌクレオチドの一部は第二オリゴヌクレオチドの一部と相補的であり；(3)第二オリゴヌクレオチドは構造

30

$$C - L - B(-S - A - S - B)m'(-P - A - P - B)n'(-P - A - S - B)q'(-S - A)r'(-S - B)t' - OR$$

[式中、Cは疎水性分子であり；Aは各々独立して2'-メトキシ-リボヌクレオチドであり；Bは、各々独立して2'-フルオロ-リボヌクレオチドであり；Lはエチレングリコール、ホスホジエステルおよびホスホロチオエートの0~4反復単位からなる群から選択される1以上の部分を含むリンカーであり；Sはホスホロチオエートリンカーであり；Pはホスホジエステルリンカーであり；Rは水素およびキャッピング基(例えば、アセチルのようなアシル)から選択され；m'は0または1であり；n'は4、5または6であり；q'は0または1であり；r'は0または1であり；t'は0または1である。]

40

を有する。

【0253】

a)抗Htt siRNA分子の設計

本発明のsiRNA分子は、センス鎖および相補的アンチセンス鎖からなる二本鎖であり、アンチセンス鎖は、htt mRNAに対してRNAiに介在するのに十分な相補性を有する。好ましくは、siRNA分子は約10~50以上のヌクレオチドの長さであり、すなわち、各鎖は10~50ヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)を含む。より好ましくは、siRNA分子は各鎖で約16~30、例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチドの長さを有し、ここで、鎖の一方は、標的領域に十分に相補性である。好ましくは、これら

50

の鎖を、これらの鎖をアニールしたとき、二本鎖の一端または両端に1、2または3残基のオーバーハングが生じるように、鎖の末端に整列しない(すなわち、相補的塩基が反対の鎖に存在しない)少なくとも1、2または3塩基があるように、整列させる。好ましくは、*siRNA*分子は約10~50以上のヌクレオチドの長さを有し、すなわち、各鎖は10~50ヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)含む。より好ましくは、*siRNA*分は、各鎖約16~30、例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチドの長さを有し、ここで、鎖の一方は標的配列に実質的に相補性であり、他方の鎖は、第一鎖と同一または実質的に同一である。

【0254】

一般に、*siRNA*は、当分野で知られる任意の方法、例えば、次のプロトコルを使用して設計され得る。

【0255】

1. *siRNA*は、標的配列、例えば、図8に示す標的配列に特異的でなければならない。ある態様において、標的配列は変異体ハンチンチン(*htt*)アレルに見られるが、野生型ハンチンチンアレルには見られない。他の態様において、標的配列は、変異体ハンチンチン(*htt*)アレルおよび野生型ハンチンチンアレル両者に見られる。他の態様において、標的配列は野生型ハンチンチンアレルに見られる。第一鎖は、標的配列に相補的でなければならない。他方の鎖は第一鎖に実質的に相補性である(センス鎖およびアンチセンス鎖の例について図8参照)。ある態様において、標的配列は、変異体ハンチンチン(*htt*)アレルの拡張CAG反復の外側である。他の態様において、標的配列は、標的遺伝子のコーディング領域の外側である。標的配列例は、標的遺伝子の5'非翻訳領域(5'-UTR)から選択される。これらの部位での*mRNA*の開裂は、対応する変異体タンパク質の翻訳を排除すべきである。*htt*遺伝子の他の領域からの標的配列もターゲティングに適する。センス鎖は、標的配列に基づき設計される。さらに、低G/C含量(35~55%)の*siRNA*は、55%より高いG/C含量のものより活性であり得る。このようにして、ある態様において、本発明は、35~55%G/C含量を有する核酸分子を含む。

【0256】

2. *siRNA*のセンス鎖は、選択標的部位の配列に基づき設計される。好ましくは、センス鎖は約19~25ヌクレオチド、例えば、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチドを含む。より好ましくは、センス鎖は、21、22または23ヌクレオチドを含む。しかしながら、当業者は、19未満のヌクレオチドまたは25を超えるヌクレオチドの長さを有する*siRNA*も、*RNAi*の介在に機能できることを認識する。従って、このような長さの*siRNA*も、*RNAi*に介在する能力を保持する限り、本発明の範囲内である。長い*RNAi*剤は、ある哺乳動物細胞においてインターフェロンまたはPKR応答を惹起することが示されており、これは望ましくない可能性がある。好ましくは、本発明の*RNAi*剤はPKR応答を惹起しない(すなわち、十分に短い長さである)。しかしながら、長い*RNAi*剤は、例えば、PKR応答を産生できない細胞型またはPKR応答が代替的に手段により下方制御または減弱されている状況では有用であり得る。

【0257】

本発明の*siRNA*分子は、*siRNA*が*RNAi*に介在できるように、標的配列と十分な相補性を有する。一般に、標的遺伝子のRISC介在開裂を行うために標的遺伝子の標的配列部分と十分に同一であるヌクレオチド配列を含む*siRNA*が好ましい。従って、好ましい態様において、*siRNA*のセンス鎖は、標的の一部と十分に同一である配列を有するように設計される。例えば、センス鎖は、標的部位と100%同一性を有し得る。しかしながら、100%同一性は必要ではない。センス鎖と標的*RNA*配列の間の80%を超える同一性、例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性が好ましい。本発明は、*RNAi*の効率および特異性を増強するために、ある配列多様性に相容性であるという利点を有する。ある

10

20

30

40

50

態様において、センス鎖は、野生型と変異体アレルが少なくとも一つの塩基対により異なる標的領域、例えば、機能獲得型変異を含む標的領域のように、標的領域と4、3、2、1または0不適正ヌクレオチドを有し、他方の鎖は、第一鎖と同一または実質的に同一である。さらに、1または2ヌクレオチドの小挿入または欠失を有する*s i R N A*配列も、*R N A i*介在に有効であり得る。あるいは、ヌクレオチドアナログ置換または挿入を有する*s i R N A*配列は、阻害に有効であり得る。

#### 【0258】

配列同一性を、当分野で知られる配列比較およびアライメントアルゴリズムにより決定し得る。2核酸配列(または2アミノ酸配列)の同一性パーセントを決定するために、配列を、最適比較目的で整列させる(例えば、最適アライメントのためにギャップを第一配列または第二配列に挿入し得る)。対応するヌクレオチド(またはアミノ酸)位置のヌクレオチド(またはアミノ酸残基)を続いて比較する。第一配列におけるある位置が、第二配列における対応する位置と同じ残基で占拠されているならば、これら分子はその位置で同一である。2配列間の同一性パーセントは、配列により共有される同一位置の数の関数であり(すなわち、相同性% = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100)、所望によりスコアを挿入したギャップ数および/または挿入したギャップの長さのペナルティに付す。

10

#### 【0259】

2配列間の配列比較および同一性パーセント決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成できる。ある態様において、アライメントを、十分な同一性を有する整列配列のある部分にわたり作製するが、低同一性度を有する部分にはしない(すなわち、局所アライメント)。配列の比較のために利用する局所アライメントアルゴリズムの好ましい、非限定的例は、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77におけるように修飾された、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、BLASTプログラム(version 2.0)に組み込まれる(Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10)。

20

#### 【0260】

他の態様において、アライメントを適切なギャップの挿入により最適化し、同一性パーセントを整列配列の長さにより決定する(すなわち、ギャップ付アライメント)。比較目的のためのギャップ付アライメントを得るには、ギャップ付BLASTを利用できる(Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402)。他の態様において、アライメントを適切なギャップの挿入により最適化し、同一性パーセントを配列整列の全長により決定する(すなわち、網羅的アライメント)。配列の網羅的比較に利用する数学的アルゴリズムの好ましい、非限定的例は、Myers and Miller, CABIOS (1989)のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(version 2.0)に組み込まれる。アミノ酸配列比較のためにALIGNプログラムを使用するとき、PAM120重量残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を使用できる。

30

#### 【0261】

3. *s i R N A*のアンチセンス鎖またはガイド鎖は、日常的にセンス鎖と同じ長さであり、相補的ヌクレオチドを含む。ある態様において、ガイド鎖およびセンス鎖は、完全相補的であり、すなわち、これら鎖は、整列またはアニールしたとき平滑末端である。他の態様において、*s i R N A*の鎖は、1~7(例えば、2、3、4、5、6または7)または1~4、例えば、2、3または4ヌクレオチドの3'オーバーハングを有するような方法で対合できる。オーバーハングは、標的遺伝子配列(またはその相補体)に対応するヌクレオチドを含む(またはこれからなる)ことができる。あるいは、オーバーハングは、デオキシリボヌクレオチド、例えばdT<sub>s</sub>またはヌクレオチドアナログまたは他の適当な非ヌクレオチド物質を含む(またはこれからなる)ことができる。こうして、他の態様において、核酸分子は、TTのような2ヌクレオチドの3'オーバーハングを有し得る。オーバーハングヌクレオチドは、RNAまたはDNAであり得る。上記のとおり、変異体：野生型 mismatchesがプリン：プリン mismatchesである、標的領域を選択するのが望ましい。

40

50

## 【0262】

4. 当分野で知られる任意の方法を使用して、潜在的標的を適切なゲノムデータベース(ヒト、マウス、ラットなど)と比較し、他のコーディング配列と顕著な相同性を有するあらゆる標的配列を考慮から外す。このような配列相同性サーチのための一つのこのような方法が、BLASTとして知られ、これは、National Center for Biotechnology Information websiteで利用可能である。

## 【0263】

5. 評価基準に合う1以上の配列の選択。

## 【0264】

siRNAの設計および使用に関するさらなる一般的情報は、The Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie websiteで利用可能な“The siRNA User Guide”に見ることができる。

## 【0265】

あるいは、siRNAを、標的配列(例えば、400mM NaCl、40mM PIPES pH6.4、1mM EDTA、50 または70 で12~16時間ハイブリダイゼーションし、続いて洗浄)とハイブリダイズできるヌクレオチド配列(またはオリゴヌクレオチド配列)として機能的に定義してよい。さらなる好ましいハイブリダイゼーション条件は、1×SSC中70 または1×SSC中50、50%ホルムアミドでのハイブリダイゼーション、続く、0.3×SSC中70 での洗浄または4×SSC中70 または4×SSC中50、50%ホルムアミドでのハイブリダイゼーション、続く、1×SSC中67 での洗浄を含む。50塩基対長未満であると推定されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融点(T<sub>m</sub>)より5~10 低くなくならず、ここで、T<sub>m</sub>は、次の式に従い決定する。18~49塩基対長のハイブリッドについて、 $T_m( ) = 2(A + T \text{塩基数}) + 4(G + C \text{塩基数})$ 。18~49塩基対長のハイブリッドについて、 $T_m( ) = 81.5 + 16.6(\log_{10}[Na^+]) + 0.41(\%G + C) - (600/N)$ であり、ここで、Nはハイブリッドにおける塩基数であり、[Na<sup>+</sup>]はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である(1×SSCの[Na<sup>+</sup>]=0.165M)。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのストリンジェンシー条件のさらなる例(Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11およびCurrent Protocols in Molecular Biology, 1995, F. M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4)は、引用により本明細書に包含させる。

## 【0266】

陰性対照siRNAは、選択siRNAと同じヌクレオチド組成を有するが、適切なゲノムと顕著な配列相補性はないべきである。このような陰性対照を、選択siRNAのヌクレオチド配列を無作為に混合することにより設計できる。相同性サーチを、陰性対照が適切なゲノムにおける何らかの他の遺伝子との相同性を欠くことを確実にするために実施できる。さらに、陰性対照siRNAを、配列に1以上の塩基ミスマッチを導入することにより設計できる。

## 【0267】

6. siRNAが標的mRNA(例えば、野生型または変異体ハンチンチンmRNA)を破壊する効果を評価するために、ショウジョウバエベースのインビトロmRNA発現系でsiRNAをcDNA(例えば、ハンチンチンcDNA)とインキュベートさせ得る。32Pで放射標識された新たに合成されたmRNA(例えば、ハンチンチンmRNA)を、アガロースゲル上でオートラジオグラフィにより検出する。開裂mRNAの存在が、mRNAヌクレアーゼ活性を示す。適当な対照は、siRNAの省略および非標的cDNAの使用を含む。あるいは、選択siRNAと同じヌクレオチド組成を有するが、適切な標的遺伝子に顕著な配列相補性がない対照siRNAを選択する。このような陰性対照を、選択siRNAのヌクレオチド配列を無作為に混合することにより設計できる。相同性サーチを、

陰性対照が適切なゲノムにおける何らかの他の遺伝子との相同性を欠くことを確実にするために実施できる。さらに、陰性対照 *siRNA* を、配列に 1 以上の塩基ミスマッチを導入することにより設計できる。

【0268】

抗 *h t t siRNA* を、上記標的配列のいずれかを標的とするように設計できる。該 *siRNA* は、標的配列のサイレンシングに介在するのに標的配列と十分に相補的であるアンチセンス鎖を含む。ある態様において、*RNA* サイレンシング剤は *siRNA* である。

【0269】

ある態様において、*siRNA* は、図 8 に示す配列を含むセンス鎖および図 8 に示す配列を含むアンチセンス鎖を含む。

10

【0270】

最適 *mRNA* 特異性および最大 *mRNA* 開裂を生じる *siRNA* - *mRNA* 相補性の部位を選択する。

【0271】

b) *siRNA* 様分子

本発明の *siRNA* 様分子は、*RNAi* または翻訳抑制により遺伝子サイレンシングを指示するために *mRNA* の標的配列と “十分に相補的” である配列を有する(すなわち、配列を有する鎖を有する)。*siRNA* 様分子は *siRNA* 分子に準じて設計されるが、センス鎖と標的 *RNA* の間の配列同一性の程度は *miRNA* とその標的の間で観察されるものに近似する。一般に、*miRNA* 配列と対応する標的遺伝子配列の間の配列同一性の程度が下がるに連れて、*RNAi* ではなく翻訳抑制により転写後遺伝子サイレンシングに介在する傾向が高まる。それ故に、代替的態様において、標的遺伝子の翻訳抑制による転写後遺伝子サイレンシングが望まれるとき、*miRNA* 配列は、標的遺伝子配列と部分的相補性を有する。ある態様において、*miRNA* 配列は、標的 *mRNA* に分散している 1 以上の短配列(相補性部位)と部分的相補性を有する(例えば標的 *mRNA* の 3' - UTR 内)(Hutvagner and Zamore, Science, 2002; Zeng et al., Mol. Cell, 2002; Zeng et al., RNA, 2003; Doench et al., Genes & Dev., 2003)。翻訳抑制の機序が協調的であるとき、複数相補性部位(例えば、2、3、4、5 または 6)がある態様において標的とされ得る。

20

【0272】

*siRNA* 様二本鎖が *RNAi* または翻訳抑制に介在する能力は、相補性の部位での標的遺伝子配列とサイレンシング剤のヌクレオチド配列の間の非同ーヌクレオチドの分布により予測され得る。ある態様において、翻訳抑制による遺伝子サイレンシングが望まれるとき、*miRNA* ガイド鎖と標的 *mRNA* により形成される二本鎖が中央 “隆起” を含むように、少なくとも一つの非同ーヌクレオチドが相補性部位の中央部分に存在する(Doench J G et al., Genes & Dev., 2003)。他の態様において、2、3、4、5 または 6 連続のまたは非連続的非同ーヌクレオチドが導入される。非同ーヌクレオチドを、揺らぎ塩基対(例えば、G : U)または不適正塩基対(G : A、C : A、C : U、G : G、A : A、C : C、U : U)を形成するように選択し得る。さらに好ましい態様において、“隆起” は、*miRNA* 分子の 5' 末端のヌクレオチド 12 位および 13 位に集中させる。

30

【0273】

c) 低分子ヘアピン型 *RNA* (*shRNA*) 分子

ある特徴的態様において、本発明は、増強された選択性で *h t t* 標的配列の *RNA* サイレンシングに介在できる *shRNA* を提供する。*siRNA* とは対照的に、*shRNA* はマイクロ *RNA* (*miRNA*) の天然前駆体を模倣し、遺伝子サイレンシング経路の最初の部分で介入する。この理由のため、*shRNA* は、天然遺伝子サイレンシング経路全体を通して供給されることにより、遺伝子サイレンシングにより効率的に介在すると考えられる。

40

【0274】

*miRNA* は、植物および動物発育中に転写後または翻訳後レベルで遺伝子発現を制御できる、約 22 ヌクレオチドの非コーディング *RNA* である。*miRNA* の一つの共通する特色は、恐らく、ダイサー、*RNAse III* 型酵素またはそのホモログにより、全て、約

50



70ヌクレオチド前駆体RNAステムループから切り取られることである。天然に存在するmiRNA前駆体(前miRNA)は、一般に相補的である2部分を含む二本鎖ステムおよびステムの2部分を連結するループを形成する単鎖である。典型的な前miRNAにおいて、ステムは、1以上の隆起、例えば、ステムの一部分における単一ヌクレオチド“ループ”を形成する余分なヌクレオチドおよび/または互いにステムの2部分のハイブリダイゼーションにおけるギャップを作る1以上の不對ヌクレオチドを含む。本発明の低分子ヘアピン型RNAまたは改変RNA前駆体は、天然に存在する前miRNAに基づく人工構築物であるが、所望のRNAサイレンシング剤(例えば、本発明のsiRNA)を送達するように操作されている。前miRNAのステム配列を標的mRNAに相補的な配列で置き換えることにより、shRNAが形成される。shRNAは細胞の遺伝子サイレンシング経路全体で処理され、それによりRNAiに効率的に介在する。

10

## 【0275】

shRNA分子の必須要素は、二本鎖または二本鎖ステム部分を形成するためにアニールまたはハイブリダイズするための十分な相補性を有する第一部分および第二部分である。2部分は、完全にまたは完璧に相補的である必要はない。第一および第二“ステム”部分は、shRNAの他の部分とアニールまたはハイブリダイズするためには不十分な配列相補性を有する配列を有する部分を含む。この後者の部分は、shRNA分子における“ループ”部分と称される。shRNA分子は、siRNAを産生するように処理される。shRNAはまた1以上の隆起、すなわち、ステムの部分に小ヌクレオチド“ループ”を作る余分なヌクレオチド、例えば1、2または3ヌクレオチドループも含み得る。これらステム部分は同じ長さであっても、一部分が例えば、1~5ヌクレオチドのオーバーハングを含んでもよい。オーバーハングヌクレオチドは、例えば、ウラシル(U)を含んでよく、例えば、全Uである。このようなUは、とりわけshRNAコード化DNAにおけるチミジン(T)によりコードされ、これは転写停止をシグナル伝達する。

20

## 【0276】

本発明のshRNA(または改変前駆体RNA)において、二本鎖ステムの一部分は、httt標的配列に相補的(またはアンチセンス)である核酸配列である。好ましくは、shRNAのステム部分の一鎖は、標的RNA(例えば、mRNA)配列に、RNA干渉(RNAi)を介して該標的RNAの分解または開裂に介在するのに、十分に相補的(例えば、アンチセンス)である。それ故に、改変RNA前駆体は、2部分および2ステム部分を連結するループを有する二本鎖ステムを含む。アンチセンス部分は、ステムの5'末端または3'末端にあり得る。shRNAのステム部分は好ましくは約15~約50ヌクレオチド長である。好ましくは2ステム部分は、約18または19~約21、22、23、24、25、30、35、37、38、39または40以上のヌクレオチド長である。好ましい態様において、ステム部分の長さは21ヌクレオチド以上でなければならない。哺乳動物細胞において使用するとき、ステム部分の長さは、インターフェロン経路のような非特異的応答の誘発を避けるために、約30ヌクレオチド未満でなければならない。非哺乳動物細胞において、ステムは30ヌクレオチドより長くてもよい。事実、ステムは、標的mRNAに相補的なはるかに長い切片を含み得る(mRNA全体までおよびそれを含む)。事実、ステム部分は、標的mRNAに相補的なはるかに長い切片を含み得る(mRNA全体までおよびそれを含む)。

30

40

## 【0277】

二本鎖ステムの2部分は、二本鎖ステムを形成するのにハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。それ故に、2部分は、完全にまたは完璧に相補的であってもよいが、その必要はない。さらに、2ステム部分は同じ長さでも、一部分1、2、3または4ヌクレオチドのオーバーハングを含んでもよい。オーバーハングヌクレオチドは、例えば、ウラシル(U)を含んでよく、例えば、全Uであり得る。shRNAまたは改変RNA前駆体におけるループは、対合ヌクレオチドの数を増やすもしくは減らすためのループ配列の修飾またはループ配列の全てもしくは一部のテトラループまたは他のループ配列での置換により天然前miRNA配列と異なり得る。それ故に、shRNAまたは改変RNA

50

前駆体におけるループは、2、3、4、5、6、7、8、9以上の、例えば、15または20以上のヌクレオチド長であり得る。

【0278】

shRNAまたは改変RNA前駆体におけるループは、対合ヌクレオチドの数を増やすもしくは減らすためのループ配列の修飾または一配列の全てもしくは一部のテトラループまたは他のループ配列での置換により天然前miRNA配列と異なる。それ故に、shRNAにおけるループ部分は、約2～約20ヌクレオチド長、すなわち、約2、3、4、5、6、7、8、9以上の、例えば、15または20以上のヌクレオチド長であり得る。好ましいループは“テトラループ”配列からなるまたはこれを含む。テトラループ配列の例は、配列GNRA(ここで、Nは任意のヌクレオチドであり、Rはプリンヌクレオチドである)、GGGGおよびUUUUを含むが、これらに限定されない。

10

【0279】

ある態様において、本発明のshRNAは、上記所望のsiRNA分子の配列を含む。他の態様において、shRNAのアンチセンス部分の配列は、本質的に上記のとおり、または一般に標的RNA(例えば、htt mRNA)内の18、19、20、21ヌクレオチドまたはそれより長い配列からの、例えば、翻訳の開始から領域100～200または300ヌクレオチド上流または下流からの選択により設計できる。一般に、配列は、5'UTR(非翻訳領域)、コーディング配列または3'UTRを含む標的RNA(例えば、mRNA)のあらゆる部分から選択できるが、該部分は、機能獲得型変異の部分から遠位でなければならぬ。この配列は、所望により2隣接AAヌクレオチドを含む標的遺伝子の領域の直ぐ後ろに続いてよい。ヌクレオチド配列の最後の2ヌクレオチドは、UUであるように選択できる。この21程度のヌクレオチド配列を、shRNAにおける二本鎖ステムの一部分を作るために使用する。この配列は、野生型前miRNA配列のステム部分を、例えば、酵素的に置き換えることができ、または合成された完全配列に含まれる。例えば、ステムループ改変RNA前駆体全体をコードするまたは前駆体の二本鎖ステムに挿入する部分のみをコードするDNAオリゴヌクレオチドを合成し、例えば、野生型前miRNAから、制限酵素を使用して、改変RNA前駆体構築物を構築できる。

20

【0280】

改変RNA前駆体は、二本鎖ステムに、インビボでの産生が望まれるsiRNAまたはsiRNA様二本鎖の21～22程度のヌクレオチド配列を含む。それ故に、改変RNA前駆体のステム部分は、発現が低減または阻害されるべき遺伝子のエクソン部分の配列に対応する少なくとも18または19ヌクレオチド対を含む。ステムのこの領域に隣接する2個の3'ヌクレオチドが、改変RNA前駆体からのsiRNAの産生を最大化し、インビボおよびインビトロでRNAiによる翻訳抑制または破壊のための対応するmRNAのターゲティングにおいて得られたsiRNAの効果を最大化するために、選択される。

30

【0281】

ある態様において、本発明のshRNAは、RISCへのエントリーを増強するために、miRNA配列、所望により末端修飾miRNA配列を含む。miRNA配列は、何れかの天然に存在するmiRNAと類似でも同一でもよい(例えばThe miRNA Registry; Griffiths-Jones S, Nuc. Acids Res., 2004参照)。1000を超える天然miRNAが現在までに同定されており、合わせてゲノムにおける全予測遺伝子の約1%を構成すると考えられる。多くの天然miRNAが、前mRNAのイントロンと一緒にクラスター化し、イン・シリコで相同性ベースのサーチを使用し(Pasquinelli et al., 2000; Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001)またはコンピュータアルゴリズム(例えばMiRScan, MiRSeeker)を使用して同定され、これは、候補miRNA遺伝子が前mRNAのステムループ構造を形成する能力を予測させる(Grad et al., Mol. Cell., 2003; Lim et al., Genes Dev., 2003; Lim et al., Science, 2003; Lai EC et al., Genome Bio., 2003)。オンライン登録は、全公開miRNA配列のサーチ可能なデータベースを提供する(The miRNA Registry at the Sanger Institute website; Griffiths-Jones S, Nuc. Acids Res., 2004)。例として、天然miRNAは、lin-4、

40

50

let - 7、miR - 10、mirR - 15、miR - 16、miR - 168、miR - 175、miR - 196 およびそれらのホモログ、ならびに国際PCT公開番号WO03 / 029459号に記載のようにヒトおよびキイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)、線虫(*Caenorhabditis elegans*)、ゼブラフィッシュ、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、マウス(*Mus musculus*)およびラット(*Rattus norvegicus*)を含むあるモデル生物からの他の天然miRNAを含む。

#### 【0282】

天然に存在するmiRNAは、インビボで内在性遺伝子により発現され、ヘアピンまたはステムループ前駆体(前miRNAまたは前miRNA)から、ダイサーまたは他のRNAse酵素により処理される(Lagos-Quintana et al., *Science*, 2001; Lau et al., *Science*, 2001; Lee and Ambros, *Science*, 2001; Lagos-Quintana et al., *Curr. Biol.*, 2002; Mourelatos et al., *Genes Dev.*, 2002; Reinhart et al., *Science*, 2002; Ambros et al., *Curr. Biol.*, 2003; Brennecke et al., 2003; Lagos-Quintana et al., *RNA*, 2003; Lim et al., *Genes Dev.*, 2003; Lim et al., *Science*, 2003)。miRNAは、インビボで一過性に二本鎖となった二重鎖として存在できるが、一鎖のみがRISC複合体に取り込まれ、遺伝子サイレンシングを指示する。あるmiRNA、例えば、植物miRNAは、標的mRNAと完璧またはほぼ完璧な相補性を有し、従って、標的mRNAの開裂を指示する。他のmiRNAは、標的mRNAと完璧に満たない相補性であり、従って、標的mRNAの翻訳抑制を指示する。miRNAとその標的mRNAの間の相補性の程度は、その作用機序を決定すると考えられる。例えば、miRNAとその標的mRNAの間の完璧またはほぼ完璧な相補性は、開裂機序の予測となり(Yekta et al., *Science*, 2004)、一方完璧に満たない相補性は、翻訳抑制機序の予測となる。特定の態様において、miRNA配列は、天然に存在するmiRNA配列のものであり、その異常発現または活性がmiRNA障害と相関する。

#### 【0283】

d) 二機能性オリゴヌクレオチドテザー

他の態様において、本発明のRNAサイレンシング剤は、miRNAの細胞間動員に有用な二機能性オリゴヌクレオチドテザーを含む。動物細胞は、転写後または翻訳後レベルで遺伝子発現を制御できる約22ヌクレオチドの非コーディングRNAである様々なmiRNAを発現する。miRNAをRISCに結合させ、それを標的mRNAに動員することにより、二機能性オリゴヌクレオチドテザーは、例えば、動脈硬化過程に関与する、遺伝子の発現を抑制できる。オリゴヌクレオチドテザーの使用は、特定の遺伝子の発現抑制のための、既存の技術を超えるいくつかの利点を提供する。第一に、ここに記載する方法は、内在性分子(しばしば豊富に存在する)、miRNAのRNAサイレンシングへの介在を可能とする。従って、ここに記載する方法は、RNAサイレンシングの介在に外来分子(例えば、siRNA)を導入する必要性をなくす。第二に、RNAサイレンシング剤、および、特に、連結部分(例えば、2'-O-メチルオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチド)は、安定であり、かつヌクレアーゼ活性に抵抗性であるように製造できる。その結果、本発明のテザーは直接送達のために設計でき、細胞内で所望の薬剤を製造するよう設計された前駆体分子またはプラスミドの間接的送達(例えばウイルス)の必要性を取り除く。第三に、テザーおよびその各部分は、特異的mRNA部位および特異的miRNAと適合するように設計され得る。設計は細胞および遺伝子産物特異的であり得る。第四に、ここに開示する方法は、mRNAをインタクトとし、当業者が細胞それら自体の機序を使用して短パルスでタンパク質合成を遮断することを可能とする。その結果、RNAサイレンシングのこれらの方法は、高度に制御可能である。

#### 【0284】

本発明の二機能性オリゴヌクレオチドテザー(“テザー”)は、目的の遺伝子の調節を誘発するように、それらがmiRNA(例えば、内在性細胞のmiRNA)を標的mRNAに動員するように設計される。好ましい態様において、テザーは式T-L- $\mu$ (式中、TはmRNAターゲティング部分であり、Lは連結部分であり、 $\mu$ はmiRNA動員部分である)を有

する。任意の1以上の部分は二本鎖でよい。好ましくは、しかしながら、各部分は一本鎖である。

【0285】

テザー内の部分は、(5'から3'方向)で式T-L- $\mu$ に描かれるように配置または連結される(すなわち、ターゲティング部分の3'末端が連結部分の5'末端に連結および連結部分の3'末端がmiRNA動員部分の5'末端に連結)。あるいは、これら部分は、テザー内で $\mu$ -T-Lのように配置または連結され得る(ここで、miRNA動員部分の3'末端が連結部分の5'末端に連結および連結部分の3'末端がターゲティング部分の5'末端に連結)。

【0286】

上記のとおりmRNAターゲティング部分は特異的標的mRNAを捕捉できる。本発明においては、標的mRNAの発現は望ましくなく、それゆえに、mRNAの翻訳抑制が望まれる。mRNAターゲティング部分は、標的mRNAに効果的に結合するのに十分なサイズでなければならない。ターゲティング部分の長さは、一部、標的mRNAの長さおよび標的mRNAとターゲティング部分の間の相補性の程度による。種々の態様において、ターゲティング部分は、約200、100、50、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6または5ヌクレオチド長未満である。特定の態様において、ターゲティング部分は約15~約25ヌクレオチド長である。

10

【0287】

上記のmiRNA動員部分は、miRNAと結合できる。本発明において、miRNAは、標的mRNAを抑制できるあらゆるmiRNAであり得る。哺乳動物は、250を超える内在性miRNAを有すると報告されている(Lagos-Quintana et al. (2002) Current Biol. 12:735-739; Lagos-Quintana et al. (2001) Science 294:858-862;およびLim et al. (2003) Science 299:1540)。種々の態様において、miRNAは、当分野において認識されているあらゆるmiRNAであり得る。

20

【0288】

連結部分は、ターゲティング部分の活性が維持されるように、ターゲティング部分に連結ができるあらゆる薬剤であり得る。連結部分は、好ましくはターゲティング剤がその各標的と十分に相互作用できるように、十分な数のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド部分である。連結部分は、細胞のmRNAまたはmiRNA配列と配列相同性をほとんど有しないかまたは全く有しない。連結部分の例は、1以上の2'-O-メチルヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルチミジン、2'-O-メチルグアノシンまたは2'-O-メチルウリジンを含む。

30

【0289】

e) 遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチド

ある例示的態様において、遺伝子発現(すなわち、htt遺伝子発現)は、htt遺伝子発現を効果的に阻害または減少させるために2以上の利用可能な3'末端の存在を可能にする、5'末端を経て連結した2以上の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドベースの化合物を使用して調節できる。このような連結オリゴヌクレオチドはまた遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチド(GSO)として知られている(例えば、その全体を全ての目的のために本明細書に引用により包含させる、Idera Pharmaceuticals, Incに譲渡されたUS 8,431,544参照)。

40

【0290】

GSOの5'末端での結合は、他のオリゴヌクレオチド結合と無関係であり、5'、3'または2'ヒドロキシル基を経て直接的でも、ヌクレオシドの2'または3'ヒドロキシル位置を使用する、非ヌクレオチドリンカーまたはヌクレオシドを経て間接的でもよい。結合は5'末端ヌクレオチドの官能化糖または核酸塩基も使用し得る。

【0291】

GSOは、ホスホジエステル、ホスホロチオエートまたは非ヌクレオシドリンカーにより5'-5'末端でコンジュゲートされた2つの同一または異なる配列を含み得る。このよう

50

な化合物は、遺伝子産物のアンチセンス下方制御のための目的の mRNA 標的の特異的部分と相補的である 15 ~ 27ヌクレオチドを含み得る。同一配列を含む GSO は、ワトソン・クリック水素結合相互作用により特異的 mRNA と結合し、タンパク質発現を阻害する。異なる配列を含む GSO は、1 以上の mRNA 標的の 2 以上の異なる領域と結合し、タンパク質発現を阻害できる。このような化合物は標的 mRNA に相補的なヘテロヌクレオチド配列からなり、ワトソン・クリック水素結合により安定な二本鎖構造を形成する。ある条件下では、2 つの遊離 3' 末端 (5' - 5' 結合アンチセンス) を含む GSO は、単一遊離 3' 末端を含むかまたは遊離 3' 末端を含まないものよりも、遺伝子発現の強力な阻害剤であり得る。

【0292】

ある態様において、非ヌクレオチドリンカーは、式  $\text{HO} - (\text{CH}_2)_o - \text{CH}(\text{OH}) - (\text{CH}_2)_p - \text{OH}$  (式中、 $o$  および  $p$  は、独立して 1 ~ 約 6、1 ~ 約 4 または 1 ~ 約 3 の整数である) のグリセロールまたはグリセロールホモログである。ある他の態様において、非ヌクレオチドリンカーは、1,3 - ジアミノ - 2 - ヒドロキシプロパンの誘導体である。このような誘導体のいくつかは、式  $\text{HO} - (\text{CH}_2)_m - \text{C}(\text{O})\text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{NHC}(\text{O}) - (\text{CH}_2)_m - \text{OH}$  (式中、 $m$  は 0 ~ 約 10、0 ~ 約 6、2 ~ 約 6 または 2 ~ 約 4 の整数である) を有する。

【0293】

いくつかの非ヌクレオチドリンカーは、2 を超える GSO 成分の結合を可能とする。例えば、非ヌクレオチドリンカーグリセロールは、GSO 成分が共有結合し得る 3 ヒドロキシル基を有する。あるオリゴヌクレオチドベースの本発明の化合物は、それ故に、ヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリンカーに連結した 2 以上のオリゴヌクレオチドを含む。このようなオリゴヌクレオチドは、本発明において“分枝している”と称される。

【0294】

ある態様において、GSO は少なくとも 14ヌクレオチド長である。ある例示的態様において、GSO は 15 ~ 40ヌクレオチド長または 20 ~ 30ヌクレオチド長である。それ故に、GSO の成分オリゴヌクレオチドは、独立して 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40ヌクレオチド長であり得る。

【0295】

これらのオリゴヌクレオチドは、ホスホロアミデートまたは H - ホスホネート化学のような当分野において認識されている方法により製造でき、これらは手動でまたは自動化合成装置により実施できる。これらのオリゴヌクレオチドはまた mRNA とハイブリダイズする能力を損なうことなく、多様な方法で修飾もできる。このような修飾は、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスフェートエステル、アルキルホスホチオエート、ホスホロアミデート、カルバメート、カーボネート、ホスフェートヒドロキシル、アセトアミデートまたはカルボキシメチルエステルまたはこれらの組み合わせであるオリゴヌクレオチドの少なくとも一つのヌクレオチド間結合およびあるヌクレオチドの 5' 末端と、5'ヌクレオチドホスホジエステル結合が任意の数の化学基で置換されている他方のヌクレオチドの 3' 末端の間の他のヌクレオチド間結合を含み得る。

【0296】

VII. 修飾抗 Htt RNA サイレncing 剤

本発明のある側面において、上記の本発明の RNA サイレncing 剤 (またはその任意の部分) は、該薬剤の活性がさらに改善されるように修飾し得る。例えば、上記セクション II の RNA サイレncing 剤を、下記修飾のいずれかで修飾し得る。修飾は、一部、さらなる標的識別増強、薬剤の安定性増強 (例えば、分解阻止)、細胞の取り込み促進、標的効率増強、(例えば、標的への) 結合における有効性改善、薬剤に対する患者耐容性改善および / または毒性軽減に役立つ。

【0297】

10

20

30

40

50

### 1) 標的識別増強のための修飾

ある態様において、本発明のRNAサイレンシング剤を、単一ヌクレオチド標的識別を増強するために、不安定化ヌクレオチドで置換し得る(2007年1月25日出願の米国出願11/698,689号および2006年1月25日出願の米国仮出願60/762,225号参照、これら両者は引用により本明細書に包含させる)。このような修飾は、標的mRNA(例えば機能獲得型変異体mRNA)に対するRNAサイレンシング剤の特異性に明らかに影響することなく、非標的mRNA(例えば野生型mRNA)に対するRNAサイレンシング剤の特異性を排除するのに十分であり得る。

#### 【0298】

好ましい態様において、本発明のRNAサイレンシング剤を、そのアンチセンス鎖に少なくとも一つの普遍的ヌクレオチドを導入することにより修飾する。普遍的ヌクレオチドは、4つの慣用のヌクレオチド塩基(例えばA、G、C、U)のいずれかと識別をつけずに塩基対形成できる塩基部分を含む。普遍的ヌクレオチドは、RNA二本鎖またはRNAサイレンシング剤のガイド鎖と標的mRNAにより形成された二本鎖の安定性に比較的影響が少ないため、好ましい。普遍的ヌクレオチドの例は、イノシン塩基部分またはデオキシイノシン(例えば2'-デオキシイノシン)、7-デアザ-2'-デオキシイノシン、2'-アザ-2'-デオキシイノシン、PNA-イノシン、モルホリノ-イノシン、LNA-イノシン、ホスホロアミデート-イノシン、2'-O-メトキシエチル-イノシンおよび2'-OMe-イノシンからなる群から選択されるイノシンアナログ塩基部分を有するものを含む。特に好ましい態様において、普遍的ヌクレオチドはイノシン残基またはその天然に存在するアナログである。

#### 【0299】

ある態様において、本発明のRNAサイレンシング剤は、特異性決定ヌクレオチド(すなわち、疾患関連多型を認識するヌクレオチド)から5ヌクレオチド以内の少なくとも一つの不安定化ヌクレオチドの導入により修飾される。例えば、不安定化ヌクレオチドは、特異性決定ヌクレオチドから5、4、3、2または1ヌクレオチド内である位置に導入され得る。例示的態様において、不安定化ヌクレオチドは、特異性決定ヌクレオチドから3ヌクレオチドである位置に導入される(すなわち、不安定化ヌクレオチドと特異性決定ヌクレオチドの間に2つの安定化ヌクレオチドがあるように)。2鎖または鎖部分を有するRNAサイレンシング剤(例えばsiRNAおよびshRNA)において、不安定化ヌクレオチドを、特異性決定ヌクレオチドを含まない鎖または鎖部分に導入し得る。好ましい態様において、不安定化ヌクレオチドを、特異性決定ヌクレオチドを含むのと同じ鎖または鎖部分に導入する。

#### 【0300】

### 2) 有効性および特異性増強のための修飾

ある態様において、本発明のRNAサイレンシング剤を、非対称設計規則により、介在RNAiにおける有効性および特異性の増強を促進するように変改し得る(米国特許8,309,704号、7,750,144号、8,304,530号、8,329,892号および8,309,705号参照)。このような変改は、アンチセンス鎖が優先的に標的mRNAの開裂または翻訳抑制をガイドし、それにより、標的開裂およびサイレンシングの効率を増加または改善するように、センス鎖のために、siRNAのアンチセンス鎖(例えば、本発明の方法を使用して設計されたsiRNAまたはshRNAから産生されたsiRNA)のRISCへのエンタリーを促進する。好ましくは、RNAサイレンシング剤の非対称性は、RNAサイレンシング剤のアンチセンス鎖5'末端(AS 5')とセンス鎖3'末端(S 3')の間の塩基対強度を、該RNAサイレンシング剤のアンチセンス鎖3'末端(AS 3')とセンス鎖5'末端(S 5')の間の結合強度または塩基対強度に比して低減させることにより増強される。

#### 【0301】

ある態様において、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称性は、第一鎖またはアンチセンス鎖の3'末端とセンス鎖部分の5'末端の間よりも第一鎖またはアンチセンス鎖の5' 50

末端とセンス鎖部分の3'末端の間でG:C塩基対が少ないように増強し得る。他の態様において、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称性は、第一鎖またはアンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖部分の3'末端の間に少なくとも一つの不適正塩基対があるように増強し得る。好ましくは、不適正塩基対は、G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:CおよびU:Uからなる群から選択される。他の態様において、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称性は、第一鎖またはアンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖部分の3'末端の間に、少なくとも一つの揺らぎ塩基対、例えば、G:Uがあるように増強し得る。他の態様において、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称性は、希ヌクレオチド、例えば、イノシン(I)を含む少なくとも一つの塩基対があるように増強し得る。好ましくは、塩基対をI:A、I:UおよびI:Cからなる群から選択する。さらに他の態様において、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称性を、修飾ヌクレオチドを含む少なくとも一つの塩基対があるように増強し得る。好ましい態様において、修飾ヌクレオチドは2-アミノ-G、2-アミノ-A、2,6-ジアミノ-Gおよび2,6-ジアミノ-Aからなる群から選択される。

10

#### 【0302】

##### 3)安定性が増強されたRNAサイレンシング剤

本発明のRNAサイレンシング剤を、血清または細胞培養用増殖培地における安定性を改善するために修飾できる。安定性を増強するために、3'残基を分解に対して安定化でき、例えば、それらをプリンヌクレオチド、特にアデノシンまたはグアノシンヌクレオチドからなるように選択し得る。あるいは、ピリミジンヌクレオチドの修飾アナログによる置換、例えば、ウリジンの2'-デオキシチミジンによる置換は耐容性であり、RNA干渉の効率に影響しない。

20

#### 【0303】

好ましい側面において、本発明は、第一鎖および第二鎖を含むRNAサイレンシング剤に関し、ここで、第二鎖および/または第一鎖は、対応する非修飾RNAサイレンシング剤と比較してインピボ安定性が増強されるように、内部ヌクレオチドの修飾ヌクレオチドでの置換により修飾される。ここで定義する“内部”ヌクレオチドは、核酸分子、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端以外のあらゆる位置にあるものである。内部ヌクレオチドは、一本鎖分子内でも二本鎖または二重鎖分子の一鎖内でもよい。ある態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、少なくとも一つの内部ヌクレオチドの置換により修飾される。他の態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25以上の内部ヌクレオチドの置換により修飾される。他の態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、内部ヌクレオチドの少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上の置換により修飾される。さらに他の態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、内部ヌクレオチドの全ての置換により修飾される。

30

#### 【0304】

本発明の好ましい態様において、RNAサイレンシング剤は少なくとも一つの修飾ヌクレオチドアナログを含み得る。ヌクレオチドアナログは、標的的特異的サイレンシング活性、例えば、RNA i介在活性または翻訳抑制活性が実質的に影響されない位置、例えば、siRNA分子の5'末端および/または3'末端における領域に位置し得る。特に、末端は、修飾ヌクレオチドアナログの取り込みにより安定化され得る。

40

#### 【0305】

ヌクレオチドアナログの例は、糖および/または主鎖修飾リボヌクレオチド(すなわち、ホスフェート-糖主鎖の修飾を含む)を含む。例えば、天然RNAのホスホジエステル結合を、窒素または硫黄ヘテロ原子の少なくとも一つを含むように修飾し得る。主鎖修飾リボヌクレオチドの例において、隣接リボヌクレオチドを接続するホスホエステル基を、例えば

50

、ホスホチオエート基の、修飾基に置き換える。糖修飾リボヌクレオチドの例において、2' OH基を、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>またはONから選択される基に置き換え、ここで、RはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、ハロはF、Cl、BrまたはIである。

#### 【0306】

特定の態様において、修飾は、2'-フルオロ、2'-アミノおよび/または2'-チオ修飾である。特に好ましい修飾は、2'-フルオロ-シチジン、2'-フルオロ-ウリジン、2'-フルオロ-アデノシン、2'-フルオロ-グアノシン、2'-アミノ-シチジン、2'-アミノ-ウリジン、2'-アミノ-アデノシン、2'-アミノ-グアノシン、2,6-ジアミノプリン、4-チオ-ウリジンおよび/または5-アミノ-アリル-ウリジンを含む。特定の態様において、2'-フルオロリボヌクレオチドは、全てウリジンおよびシチジンである。修飾のさらなる例は、5-プロモ-ウリジン、5-ヨード-ウリジン、5-メチル-シチジン、リボ-チミジン、2-アミノプリン、2'-アミノ-ブチリル-ピレン-ウリジン、5-フルオロ-シチジンおよび5-フルオロ-ウリジンを含む。2'-デオキシ-ヌクレオチドおよび2'-Omeヌクレオチドも、本発明の修飾RNAサイレンシング剤部分内で使用できる。さらなる修飾残基は、デオキシ-無塩基、イノシン、N<sub>3</sub>-メチル-ウリジン、N<sub>6</sub>,N<sub>6</sub>-ジメチル-アデノシン、シュードウリジン、プリンリボヌクレオチドおよびリバピリンを含む。特に好ましい態様において、2'部分は、連結部分が2'-O-メチルオリゴヌクレオチドであるようにメチル基である。

#### 【0307】

例示的態様において、本発明のRNAサイレンシング剤は、ロックド核酸(LNA)を含む。LNAは、ヌクレアーゼ活性に抵抗する(高度に安定)およびmRNAに対する単一ヌクレオチド識別を有する糖修飾ヌクレオチドを含む(Elmen et al., *Nucleic Acids Res.*, (2005), 33(1): 439-447; Braasch et al. (2003) *Biochemistry* 42:7967-7975, Petersen et al. (2003) *Trends Biotechnol* 21:74-81)。これらの分子は、2'-O,4'-C-エチレン架橋核酸を、2'-デオキシ-2''-フルオロウリジンのような可能な修飾と共に有する。さらに、LNAは、糖部分を3'-endo立体構造に拘束することによりオリゴヌクレオチドの特異性を増加し、それにより塩基対形成のためにヌクレオチドを前組織化し、オリゴヌクレオチドの融点を塩基あたり10程度上昇させる。

#### 【0308】

他の例示的態様において、本発明のRNAサイレンシング剤は、ペプチド核酸(PNA)を含む。PNAは、糖-ホスフェート部分が、ヌクレオチドがヌクレアーゼ消化に高度に抵抗性であり、分子への結合特異性の改善を与える、ポリアミド主鎖を形成できる中立2'-アミノエチルグリシン部分で置換された、修飾ヌクレオチドを含む(Nielsen, et al., *Science*, (2001), 254: 1497-1500)。

#### 【0309】

また好ましいのは、核酸塩基修飾リボヌクレオチド、すなわち、天然に存在する核酸塩基の代わりに少なくとも一つの天然に存在しない核酸塩基を含む、リボヌクレオチドである。塩基は、アデノシンデアミナーゼ活性を遮断するよう修飾される。修飾核酸塩基の例は、5位を修飾されたウリジンおよび/またはシチジン、例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-プロモウリジン; 8位を修飾されたアデノシンおよび/またはグアノシン、例えば、8-プロモグアノシン; デアザヌクレオチド、例えば、7-デアザ-アデノシン; O-およびN-アルキル化ヌクレオチド、例えば、N<sub>6</sub>-メチルアデノシンを含むが、これらに限定されない。上記修飾を組み合わせるとよいことは注意すべきである。

#### 【0310】

他の態様において、RNAサイレンシング剤の薬物動態を変えるために、例えば、体内の半減期を延長するために、架橋結合を用いることができる。そのために、本発明は、核酸の2つの相補的鎖を有するRNAサイレンシング剤を含み、ここで、2鎖は架橋結合される。本発明はまた、他の部分(例えばペプチドのような非核酸部分)、有機化合物(例えば、色素)などとコンジュゲートされたまたはコンジュゲートされていない(例えば、3'末端で



)RNAサイレンシング剤も含む。この方法での*siRNA*誘導体の修飾は、対応する*siRNA*と比較して得られた*siRNA*誘導体の細胞の取り込みを改善するかまたは細胞ターゲティング活性を増強でき、細胞における*siRNA*誘導体の追跡に有用でありまたは対応する*siRNA*と比較して*siRNA*誘導体の安定性を改善する。

#### 【0311】

他の修飾の例は、(a)2'修飾、例えば、センス鎖またはアンチセンス鎖、特にセンス鎖のUにおける2'OMe部分の提供または、例えば、3'末端での、3'オーバーハングにおける2'OMe部分の提供(文脈から示されるとおり、3'末端は分子の3'原子または最も3'部分、例えば、最も3'Pまたは2'位を意味する)；(b)例えば、ホスフェート主鎖における、OのSでの置換による、主鎖の修飾、例えば、特にアンチセンス鎖における、UまたはAまたは両者のホスホロチオエート修飾の提供；例えば、OのSでの置換；(c)UのC5アミノリンカーでの置換；(d)AのGでの置換(配列変化は、アンチセンス鎖ではなくセンス鎖に位置するのが好ましい)；および(d)2'位、6'位、7'位または8'位の修飾。例示的態様は、これらの修飾の1以上がセンス鎖に存在するが、アンチセンス鎖にない、またはアンチセンス鎖が有するこのような修飾が少ない態様である。さらに他の例示的修飾は、例えば、3'末端での3'オーバーハングにおけるメチル化Pの使用；2'修飾、例えば、2'OMe部分の提供および主鎖の、例えば、OのSでの置換による、修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾の提供または例えば、3'末端でのメチル化Pの使用の組み合わせ；3'アルキルでの修飾；例えば、3'末端での、3'オーバーハングにおける脱塩基ピロリドンでの修飾；ナプロキセン、イブプロフェンまたは3'末端での分解を阻害する他の部分での修飾を含む。

#### 【0312】

##### 4)細胞の取り込みを増強するための修飾

他の態様において、RNAサイレンシング剤を、例えば、標的細胞(例えば、神経細胞)による細胞の取り込みを増強するために、化学的部分で修飾し得る。それ故に、本発明は、他の部分(例えばペプチドのような非核酸部分)、有機化合物(例えば、色素)などとコンジュゲートしたまたはコンジュゲートしていない(例えば、3'末端で)RNAサイレンシング剤を含む。コンジュゲーションは、当分野で知られる方法により、例えば、Lambert et al., *Drug Deliv. Rev.*: 47(1), 99-112 (2001)(ポリアルキルシアノアクリレート(PACA)ナノ粒子に充填された核酸を記載する)；Fattal et al., *J. Control Release* 53(1-3):137-43 (1998)(ナノ粒子に結合した核酸を記載する)；Schwab et al., *Ann. Oncol.* 5 Suppl. 4:55-8 (1994)(挿入剤、疎水性基、ポリカチオンまたはPACAナノ粒子に連結された核酸を記載する)；およびGodard et al., *Eur. J. Biochem.* 232(2):404-10 (1995)(ナノ粒子に連結された核酸を記載する)の方法を使用して、達成できる。

#### 【0313】

特定の態様において、本発明のRNAサイレンシング剤を、親油性部分とコンジュゲートする。ある態様において、親油性部分は、カチオン基を含むリガンドである。他の態様において、親油性部分を、*siRNA*の一鎖または両鎖に結合する。例示的態様において、親油性部分を、*siRNA*のセンス鎖の一端に結合する。他の例示的態様において、親油性部分をセンス鎖の3'末端に結合する。ある態様において、親油性部分を、コレステロール、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンA、葉酸またはカチオン性色素(例えば、Cy3)からなる群から選択する。例示的態様において、親油性部分はコレステロールである。他の親油性部分はコール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチルまたはフェノキサジンを含む。

#### 【0314】

##### 5)テザーリガンド

他の物を、本発明のRNAサイレンシング剤にテザーできる。リガンドを、例えば、安定

性、標的核酸とのハイブリダイゼーション熱力学、特定の組織または細胞型へのターゲティングまたは、例えば、エンドサイトーシス依存的または非依存的機序による細胞透過性の改善のためにRNAサイレンシング剤にテザーする。リガンドおよび関連する修飾は、配列特異性を増加し、結果として標的外ターゲティングを減少させ得る。テザリガンドは、介入物として機能できる1以上の修飾塩基または糖を含み得る。これらは、好ましくは、RNAサイレンシング剤/標的二本鎖の隆起におけるような、内部領域に位置する。介入物は芳香族、例えば、多環式芳香族またはヘテロ環式芳香族化合物であり得る。多環式介入物は、スタッキング能を有することができ、2、3または4縮合環を有する系を含み得る。ここに記載する普遍的塩基は、リガンド上に挿入され得る。ある態様において、リガンドは、標的核酸の開裂により標的遺伝子阻害に寄与する開裂基を含み得る。開裂基は、例えば、プレオマイシン(例えば、プレオマイシン - A 5、プレオマイシン - A 2またはプレオマイシン - B 2)、ピレン、フェナントロリン(例えば、O - フェナントロリン)、ポリアミン、トリペプチド(例えば、lys - tyr - lysトリペプチド)または金属イオンキレート基であり得る。金属イオンキレート基は、例えば、Lu(III)またはEu(III)大環状複合体、Zn(II)<sub>2</sub>, 9 - ジメチルフェナントロリン誘導体、Cu(II)テルピリジンまたはアクリジンを含み得て、これは、Lu(III)のような遊離金属イオンにより隆起の部位での標的RNAの選択的開裂を促進できる。ある態様において、ペプチドリガンドを、例えば、隆起領域での、標的RNAの開裂促進のためにRNAサイレンシング剤にテザーできる。例えば、1, 8 - ジメチル - 1, 3, 6, 8, 10, 13 - ヘキサアザシクロテトラデカン(シクラム)を、ペプチドにコンジュゲートさせて(例えば、アミノ酸誘導体により)、標的RNA開裂を促進できる。テザリガンドは、RNAサイレンシング剤のハイブリダイゼーション性質改善または配列特異性改善をもたらし得る、アミノグリコシドリガンドであり得る。アミノグリコシドの例は、グリコシル化ポリリシン、ガラクトース化ポリリシン、ネオマイシンB、トブラマイシン、カナマイシンAおよびアミノグリコシドのアクリジンコンジュゲート、例えばNeo - N - アクリジン、Neo - S - アクリジン、Neo - C - アクリジン、Tobra - N - アクリジンおよびKana A - N - アクリジンを含む。アクリジンアナログの使用は配列特異性を増加させ得る。例えば、ネオマイシンBは、DNAと比較してRNAに高親和性を有するが、低配列特異性である。アクリジンアナログ、neo - 5 - アクリジンは、HIV Rev 応答配列(RRE)に対して増加した親和性を有する。ある態様において、アミノグリコシドリガンドのグアニジンアナログ(グアニジノグリコシド)を、RNAサイレンシング剤にテザーする。グアニジノグリコシドにおいて、アミノ酸のアミン基をグアニジン基に交換する。グアニジンアナログの結合は、RNAサイレンシング剤の細胞透過性を増加させる。テザリガンドは、ポリアルギニンペプチド、ペプトイドまたはペプチド模倣体であってよく、これは、オリゴヌクレオチド剤の細胞の取り込みを増強できる。

#### 【0315】

リガンドの例は、リガンドコンジュゲート担体に、直接的にまたはテザーを経て間接的に、好ましくは共有結合により、結合する。例示的態様において、リガンドは、担体に介在テザーを経て結合する。例示的態様において、リガンドは、取り込まれるRNAサイレンシング剤の分布、ターゲティングまたは寿命を変える。例示的態様において、リガンドは、例えば、このようなリガンドを欠く種と比較して、選択標的、例えば、分子、細胞または細胞型、区画、例えば、細胞または臓器区画、組織、臓器または体の領域に対する親和性の増強を提供する。

#### 【0316】

リガンドの例は、輸送、ハイブリダイゼーションおよび特異性の特性を改善でき、また得られる天然または修飾RNAサイレンシング剤またはここに記載する単量体の任意の組み合わせを含む重合分子および/または天然または修飾リボヌクレオチドのヌクレアーゼ抵抗性も改善し得る。リガンドは、一般に、例えば、取り込みを増強するための治療修飾因子；例えば、分布をモニタリングするための診断化合物またはレポーター基；架橋結合剤；ヌクレアーゼ - 抵抗性付与部分；および天然または異常核酸塩基を含み得る。一般的例

10

20

30

40

50

は、脂溶性物、脂質、ステロイド(例えば、ウバオール、ヘコゲニン(hecigenin)、ジオステゲニン)、テルペン(例えば、トリテルペン、例えば、サルササポゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸)、ビタミン(例えば、葉酸、ビタミンA、ピオチン、ピリドキサル)、炭水化物、タンパク質、タンパク質結合剤、インテグリンターゲット分子、ポリカチオン性物、ペプチド、ポリアミンおよびペプチド模倣物を含む。リガンドは、天然に存在する物質(例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、低密度リポタンパク質(LDL)またはグロブリン);炭水化物(例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリンまたはヒアルロン酸);アミノ酸または脂質を含み得る。リガンドはまた組み換えまたは合成分子、例えば、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸であり得る。ポリアミノ酸の例は、ポリアミノ酸を含み、ポリリシン(PLL)、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物コポリマー、ポリ(L-ラクチド-コ-グリコリド)コポリマー、ジビニルエーテル-マレイン酸無水物コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコポリマー(HMPA)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマーまたはポリホスファジンである。ポリアミンの例は、ポリエチレンイミン、ポリリシン(PLL)、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣体ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの四級塩またはアルファ螺旋状ペプチドを含む。

【0317】

リガンドはまた、腎細胞のような特定の細胞型に結合する、ターゲティング基、例えば、細胞または組織ターゲティング剤、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質、例えば、抗体も含み得る。ターゲティング基は、チロトロピン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤タンパク質A、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパルテート、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ピオチンまたはRGDペプチドまたはRGDペプチド模倣体であり得る。リガンドの他の例は、色素、挿入剤(例えばアクリジンおよび置換アクリジン)、クロスリンカー(例えばソラレン、マイトマイシンC)、ポルフィリン(TPPC4、テキサフィリン、サフィリン)、多環式芳香族炭化水素(例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン、フェナントロリン、ピレン)、lys-tyr-lystripeptide、アミノグリコシド、グアニジニウムアミノグリコリド、人工エンドヌクレアーゼ(例えばEDTA)、親油性分子、例えば、コレステロール(およびそのチオアナログ)、コール酸、コラン酸、リトコール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、グリセロール(例えば、エステル(例えば、モノ、ビスまたはトリス脂肪酸エステル、例えば、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19またはC20脂肪酸)およびそのエーテル、例えば、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19またはC20アルキル;例えば、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、1,3-ビス-O(オクタデシル)グリセロール)、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ステアリン酸(例えば、ジステアリン酸グリセリル)、オレイン酸、ミリスチン酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチルまたはフェノキサジンおよびペプチドコンジュゲート(例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド)、アルキル化剤、ホスフェート、アミノ、メルカプト、PEG(例えば、PEG-40K)、MPEG、[MPEG]<sub>2</sub>、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射標識マーカー、酵素、ハプテン(例えばピオチン)、輸送/吸収促進剤(例えば、アスピリン、ナプロキセン、ビタミンE、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ(例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュゲート

10

20

30

40

50

、テトラアザ大環状環の  $Eu^{3+}$  複合体)、ジニトロフェニル、HRPまたはAPを含む。

【0318】

リガンドは、タンパク質、例えば、糖タンパク質またはペプチド、例えば、共リガンドに対する特異的親和性を有する分子または抗体、例えば、癌細胞、内皮細胞または骨細胞のような特定の細胞型に結合する抗体であり得る。リガンドはまたホルモンおよびホルモン受容体も含み得る。それらはまた脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノースまたは多価フコースのような非ペプチド種でもあり得る。リガンドは、例えば、リポサッカライド、p38MAPキナーゼのアクティベーターまたはNF- $\kappa$ Bのアクティベーターであり得る。

10

【0319】

リガンドは、例えば、細胞の細胞骨格の破壊、例えば、細胞の微小管、マイクロフィラメントおよび/または中間径フィラメントの破壊により、RNAサイレンシング剤の細胞への取り込みを増加できる物質、例えば、薬物であり得る。薬物は、例えば、タクソル、ビンクリスチン、ピンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャスプラキノリド、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシンまたはmyoservinであり得る。リガンドは、例えば、炎症性応答の活性化により、RNAサイレンシング剤の細胞への取り込みを増加できる。このような効果を有するリガンドの例は、腫瘍壊死因子アルファ(TNF)、インターロイキン-1ベータまたはガンマインターフェロンを含む。ある側面において、リガンドは、脂質または脂質ベースの分子である。このような脂質または脂質ベースの分子は、好ましくは血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)に結合する。HSA結合リガンドは、コンジュゲートの、標的組織、例えば、体の非腎臓標的組織への分布を可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞を含む肝臓であり得る。HSAに結合できる他の分子もリガンドとして使用できる。例えば、neproxinまたはアスピリンを使用できる。脂質または脂質ベースのリガンドは、(a)コンジュゲートの分解に対する抵抗性の増加、(b)標的細胞または細胞膜へのターゲティングまたは輸送の増加ができおよび/または(c)血清タンパク質、例えば、HSAへの結合の調整に使用できる。脂質ベースのリガンドは、標的組織へのコンジュゲートの結合の調節、例えば、制御に使用できる。例えば、HSAにより強力に結合する脂質または脂質ベースのリガンドは、腎臓に標的化される可能性が低く、それ故に体内から浄化される可能性が低い。あまり強くなくHSAに結合する脂質または脂質ベースのリガンドを使用して、コンジュゲートを腎臓に標的化できる。好ましい態様において、脂質ベースのリガンドは、HSAに結合する。脂質ベースのリガンドは、コンジュゲートが好ましくは非腎臓組織に分布するようにHSAと十分な親和性で結合できる。しかしながら、親和性は、HSA-リガンド結合が保持できないほどには強くないのが好ましい。他の好ましい態様において、脂質ベースのリガンドは、コンジュゲートが好ましくは腎臓に分布するように、HSAに弱く結合するかまたは全く結合しない。腎細胞を標的とする他の部も、脂質ベースのリガンドに代えてまたはそれに加えて使用できる。

20

30

【0320】

他の側面において、リガンドは、標的細胞、例えば、増殖細胞により取り込まれる部分、例えば、ビタミンである。これらは、例えば、悪性または非悪性タイプの、望まない細胞増殖、例えば、癌細胞により特徴付けられる障害の処置に特に有用である。ビタミンの例は、ビタミンA、EおよびKを含む。ビタミンの他の例は、ビタミンB、例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ピオチン、ピリドキサルまたは癌細胞により取り込まれる他のビタミンもしくは栄養素である。HSAおよび低密度リポタンパク質(LDL)も包含される。

40

【0321】

他の側面において、リガンドは、細胞浸透剤、好ましくは螺旋状細胞浸透剤である。好ましくは、薬剤は両親媒性である。薬剤の例は、tatまたはアンテナペディアのようなペプチドである。薬剤がペプチドであるならば、修飾でき、ペプチジル模倣体、逆転異性体

50

、非ペプチドまたはシュード - ペプチド結合および D - アミノ酸の使用を含む。螺旋状薬剤は、好ましくはアルファ螺旋状剤であり、これは、好ましくは親油性および疎油性相を有する。

【 0 3 2 2 】

リガンドはペプチドまたはペプチド模倣体であり得る。ペプチド模倣体(ここではオリゴペプチド模倣体とも称する)は、天然ペプチドに類似する規定の三次元構造に折りたたまれることができる分子である。ペプチドおよびペプチド模倣体のオリゴヌクレオチド剤への結合は、細胞の認識および吸収の増加によるなどのように、RNAサイレンシング剤の薬物動態分布に影響する。ペプチドまたはペプチド模倣体部分は、約 5 ~ 50 アミノ酸長、例えば、約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 または 50 アミノ酸長であり得る。ペプチドまたはペプチド模倣体は、例えば、細胞浸透ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチドまたは疎水性ペプチド(例えば、主に Tyr、Trp または Phe からなる)であり得る。ペプチド部分は、 dendrimer ペプチド、拘束ペプチドまたは架橋ペプチドであり得る。ペプチド部分は L - ペプチドまたは D - ペプチドであり得る。他の代替において、ペプチド部分は、疎水性膜転座配列(MTS)を含むことができる。ペプチドまたはペプチド模倣体は、ファージディスプレイライブラリーまたは one-bead-one-compound(OBOC)コンビナトリアルライブラリーから同定されたペプチドのような、DNAの無作為配列によりコードされ得る(Lam et al., Nature 354:82-84, 1991)。例示的態様において、組み込まれた単量体単位により RNAサイレンシング剤にテザーされたペプチドまたはペプチド模倣体は、アルギニン - グリシン - アスパラギン酸(RGD) - ペプチドまたは RGD 模倣体のような細胞ターゲティングペプチドである。ペプチド部分は、約 5 アミノ酸 ~ 約 40 アミノ酸長の範囲であり得る。ペプチド部分は、安定性を増加させるためまたは立体構造的性質を指示するための、構造的修飾を有し得る。下記構造的修飾のいずれかを利用できる。

【 0 3 2 3 】

6) 化合物

ある側面において、ここに提供されるのは、図 8 1 に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで、

R<sup>1</sup> は

10

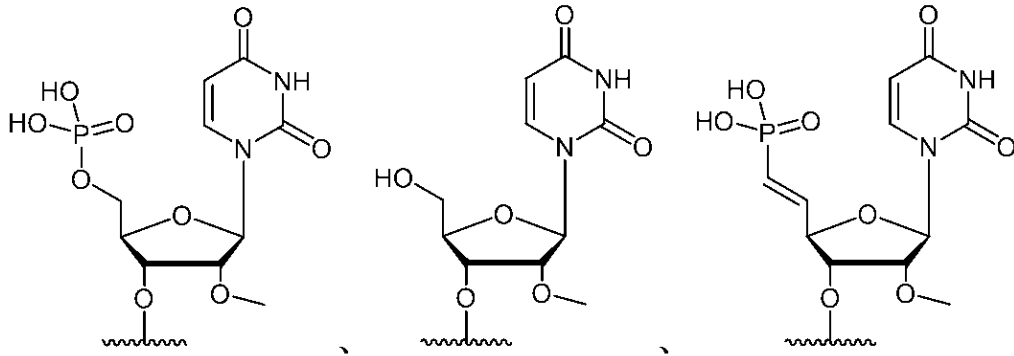
20

30

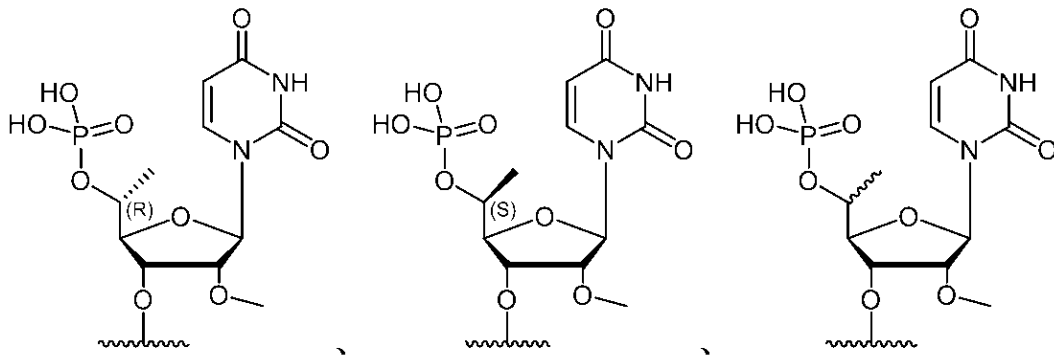
40

50

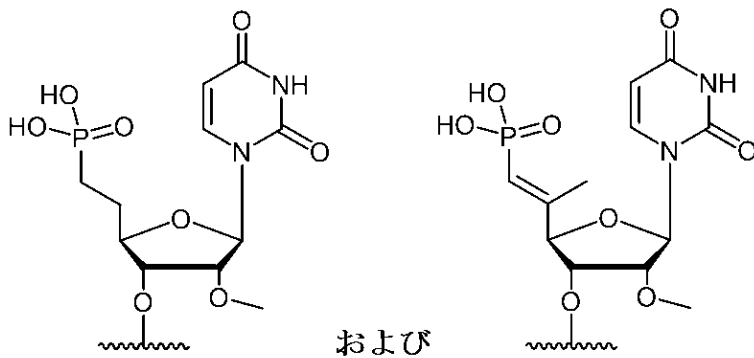
【化 2】



10



20



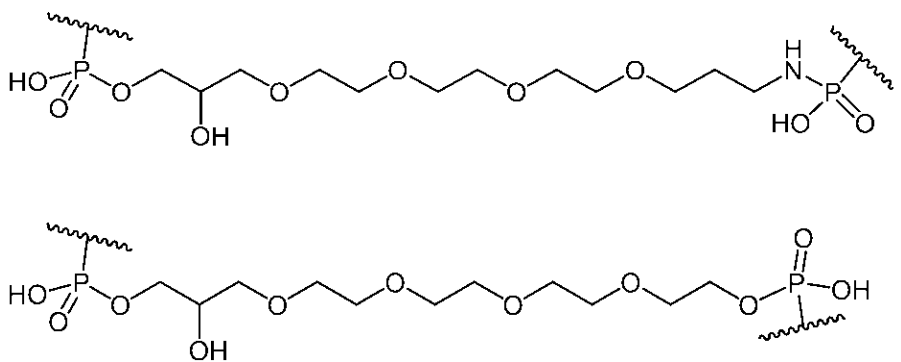
30

および

から選択され；

R<sup>3</sup>は、各々独立して、図82に示すヌクレオチド間リンカーからなる群から選択され；  
Lは、2部分を連結するリンカーであり、ここで、リンカーは、エチレングリコール鎖、  
アルキル鎖、ペプチド、RNA、DNA、

【化 3】



40

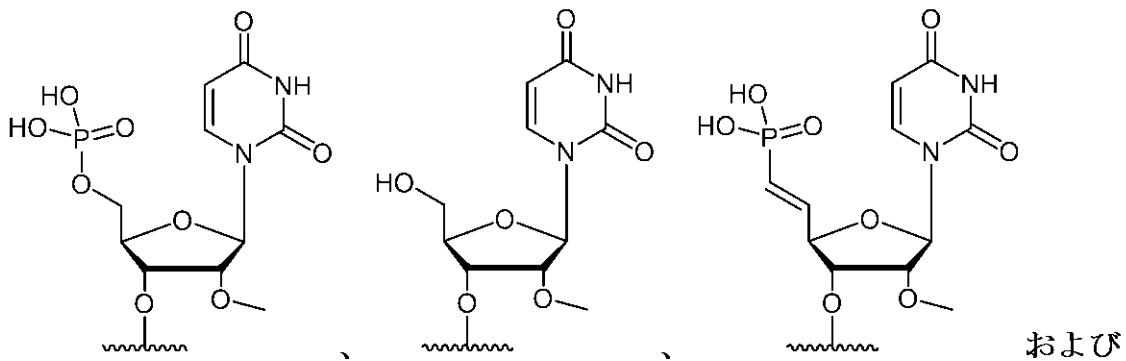
またはこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0324】

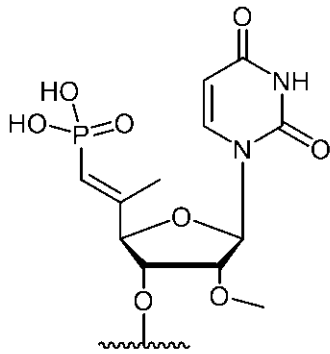
50

ある態様において、R<sup>1</sup>は

【化4】



10



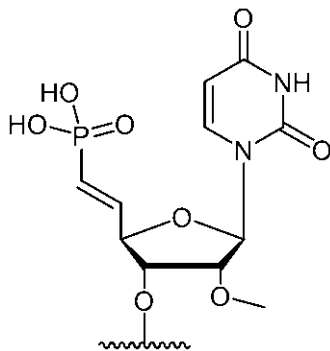
20

からなる群から選択される。

【0325】

他の態様において、R<sup>1</sup>は

【化5】



30

である。

【0326】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、メチレンホスホネート、ホスホトリエステルおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

40

【0327】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

【0328】

他の態様において、R<sup>3</sup>はホスホロチオエートである。

【0329】

他の態様において、Lは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖およびペプチドからなる群から選択される。

50

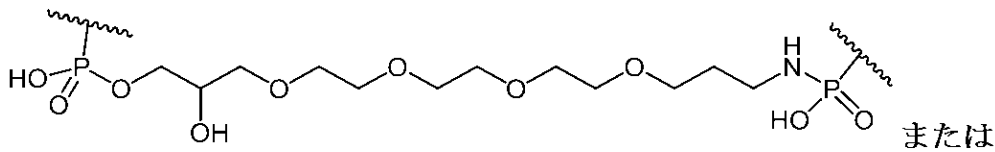
【0330】

他の態様において、Lは、エチレングリコール鎖またはペプチドから選択される。

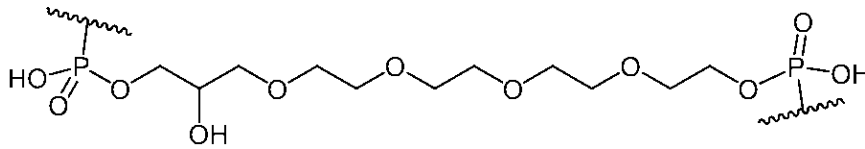
【0331】

さらに他の態様において、Lは

【化6】



10

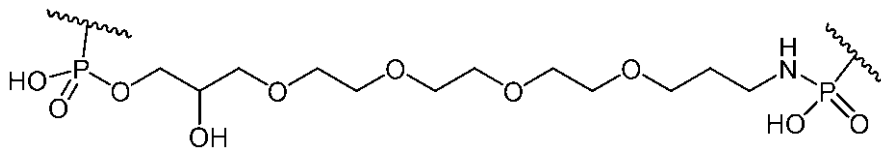


である。

【0332】

さらに他の態様において、Lは

【化7】



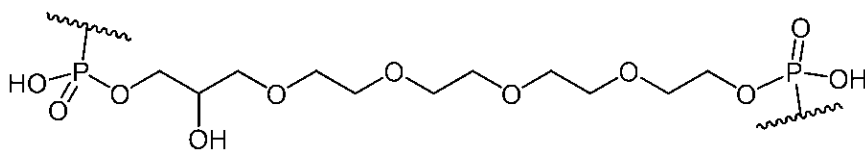
20

である。

【0333】

他の態様において、Lは

【化8】



30

である。

【0334】

ある態様において、図81に示す式の化合物は、図83に示す式の化合物である。

【0335】

他の態様において、図81に示す式の化合物は、図83に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

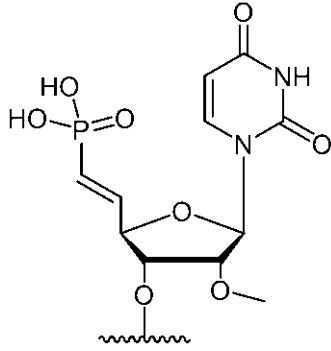
40

R<sup>1</sup>は

50



【化 9】

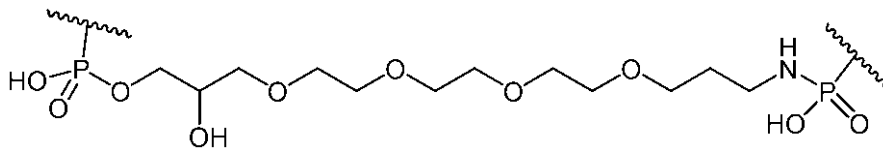


10

であり；

Lは

【化 10】



20

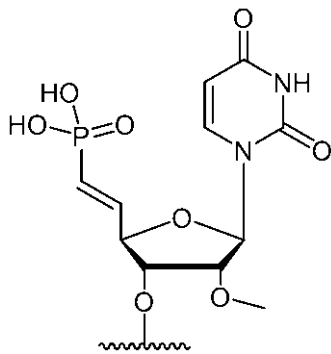
である。

【 0 3 3 6】

他の態様において、図 8 1 に示す式の化合物は、図 8 3 に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

R 1 は

【化 1 1】

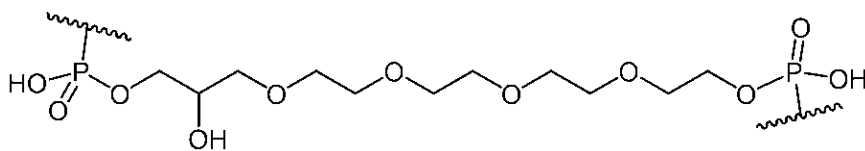


30

であり；

Lは

【化 1 2】



40

である。

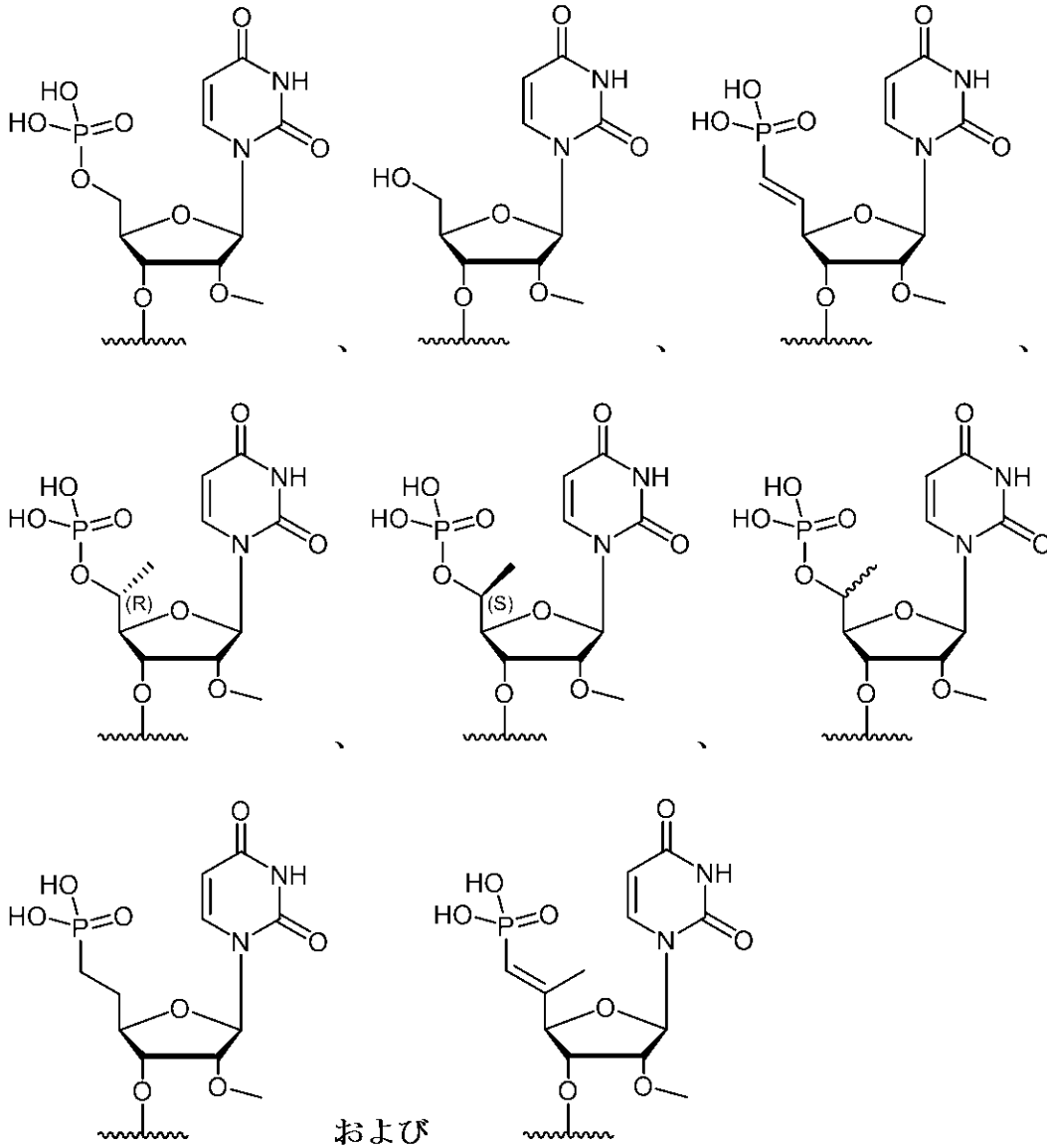
【 0 3 3 7】

他の側面において、ここに提供されるのは図 8 4 に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

R 1 は

50

## 【化 1 3】



10

20

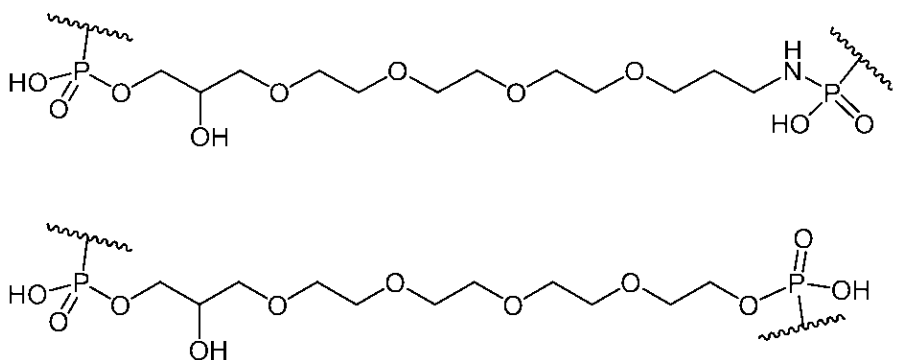
30

からなる群から選択され；

R<sup>3</sup>は、各々独立して、図82に示すヌクレオチド間リンカーからなる群から選択され；

Lは、2部分を連結するリンカーであり、ここで、リンカーは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ペプチド、RNA、DNA、

## 【化 1 4】



40

またはこれらの組み合わせからなる群から選択され；

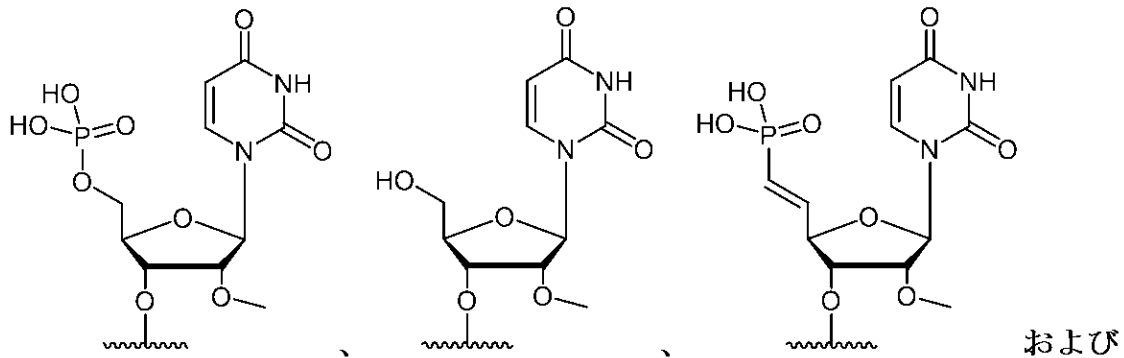
50

Bは2以上のリンカー間の分岐点であり、ここで、分岐点はグリコール、アミノ酸または任意の多価有機種からなる群から選択される。

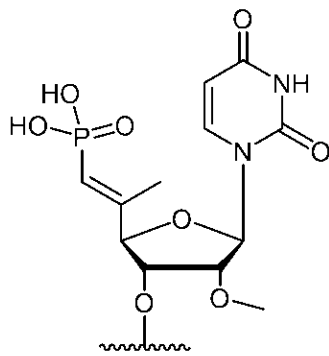
【0338】

ある態様において、R<sup>1</sup>は

【化15】



10



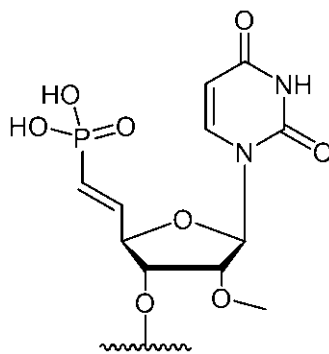
20

からなる群から選択される。

【0339】

他の態様において、R<sup>1</sup>は

【化16】



30

である。

【0340】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、メチレンホスホネート、ホスホトリエステルおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

【0341】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

【0342】

他の態様において、R<sup>3</sup>はホスホロチオエートである。

40

50

【0343】

他の態様において、Lは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖およびペプチドからなる群から選択される。

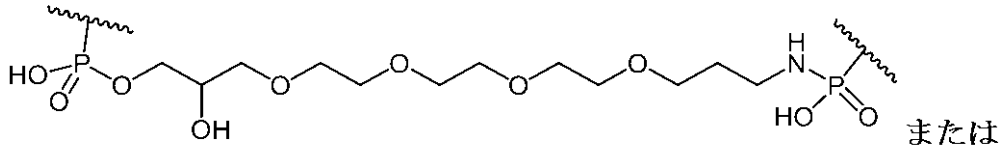
【0344】

他の態様において、Lは、エチレングリコール鎖またはペプチドから選択される。

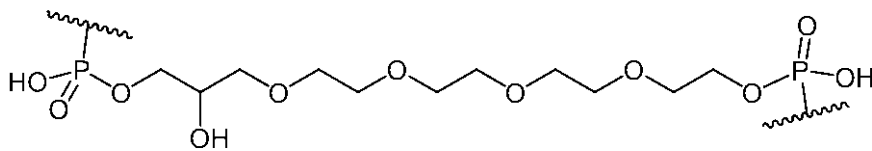
【0345】

さらに他の態様において、Lは

【化17】



10



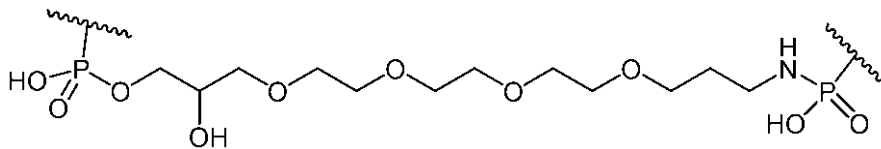
である。

20

【0346】

さらに他の態様において、Lは

【化18】



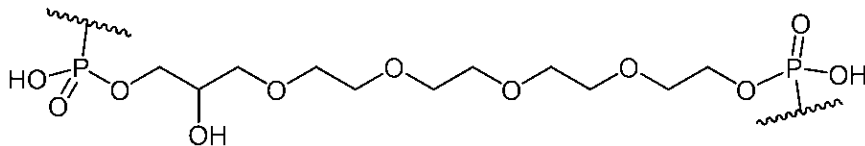
である。

30

【0347】

他の態様において、Lは

【化19】



である。

【0348】

ある態様において、Bは2以上のリンカー間の分岐点であり、ここで、分岐点はグリコールまたはアミノ酸から選択される。他の態様において、分岐点はグリコールである。他の態様において、分岐点はアミノ酸である。

40

【0349】

図84に示す式の化合物の他の態様において、Yは図86に示すとおり定義される。

【0350】

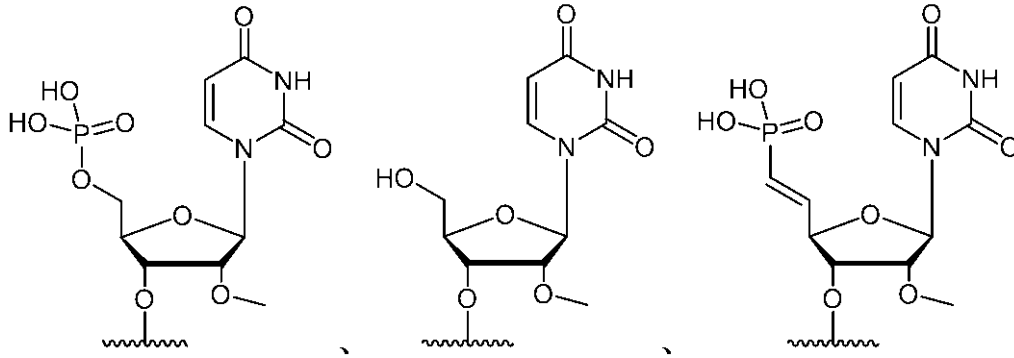
他の側面において、ここに提供されるのは図85に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

【0351】

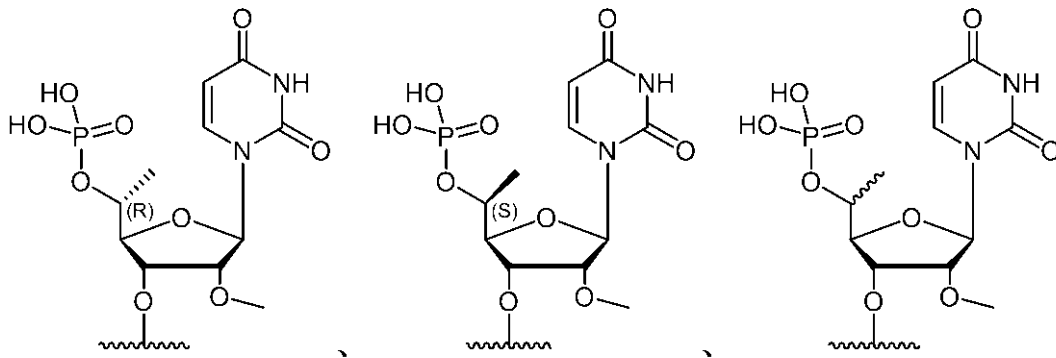
R1は

50

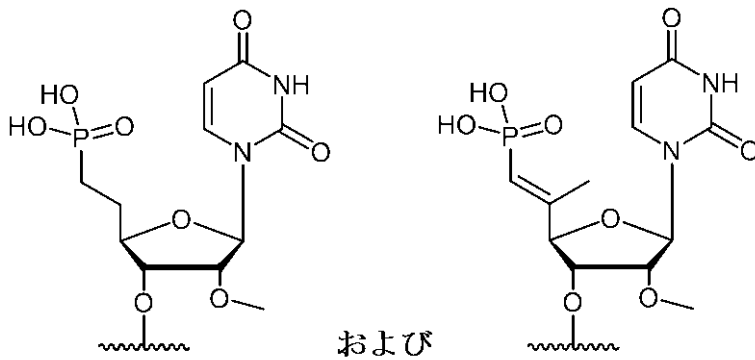
## 【化 2 0】



10



20



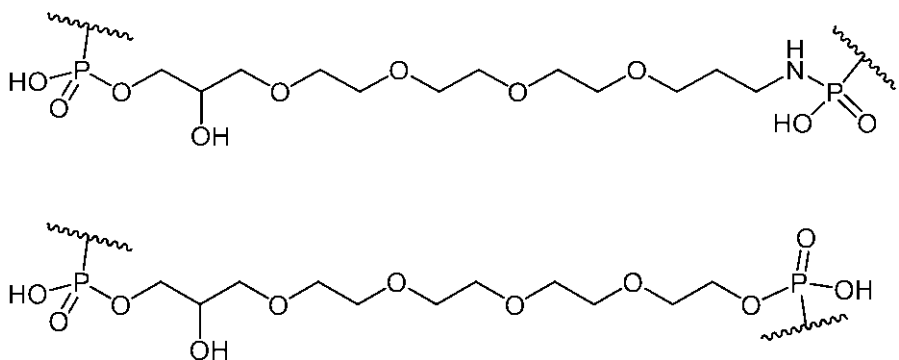
30

からなる群から選択され；

R<sup>3</sup>は、各々独立して、図 8 2 に示すヌクレオチド間リンカーからなる群から選択され；

Lは、2 部分を連結するリンカーであり、ここで、リンカーは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ペプチド、RNA、DNA、

## 【化 2 1】



40

またはこれらの組み合わせからなる群から選択され；

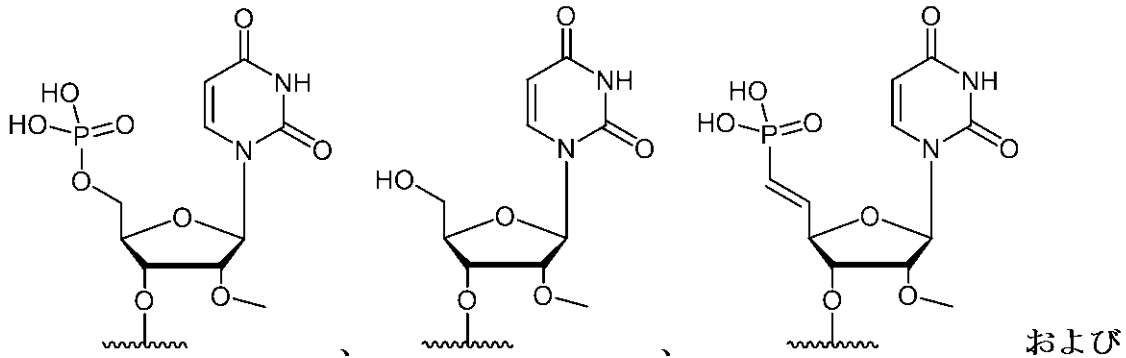
50

Bは2以上のリンカー間の分岐点であり、ここで、分岐点はグリコール、アミノ酸またはあらゆる多価有機種からなる群から選択される。

【0352】

ある態様において、R<sup>1</sup>は

【化22】



からなる群から選択される。

【0353】

他の態様において、R<sup>1</sup>は

【化23】



である。

【0354】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、メチレンホスホネート、ホスホトリエステルおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

【0355】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

【0356】

他の態様において、R<sup>3</sup>はホスホロチオエートである。

【0357】

他の態様において、Lは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖およびペプチドからなる群から選択される。

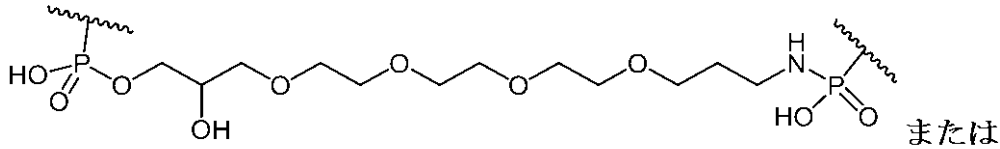
【0358】

他の態様において、Lは、エチレングリコール鎖またはペプチドから選択される。

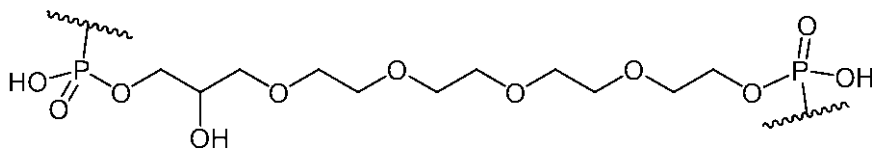
【0359】

さらに他の態様において、Lは

【化24】



10



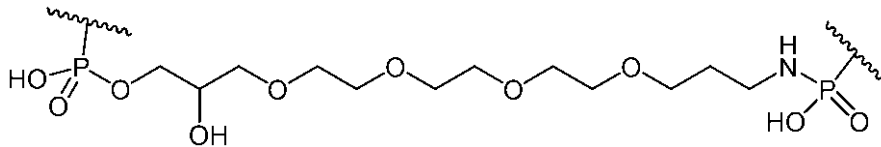
である。

20

【0360】

さらに他の態様において、Lは

【化25】

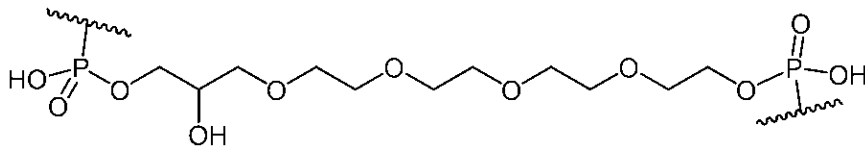


である。

【0361】

他の態様において、Lは

【化26】



である。

【0362】

ある態様において、Bは2以上のリンカー間の分岐点であり、ここで、分岐点はグリコールまたはアミノ酸から選択される。他の態様において、分岐点はグリコールである。他の態様において、分岐点はアミノ酸である。

40

【0363】

図85に示す式の化合物のある態様において、Yは図86に示すとおり定義される。

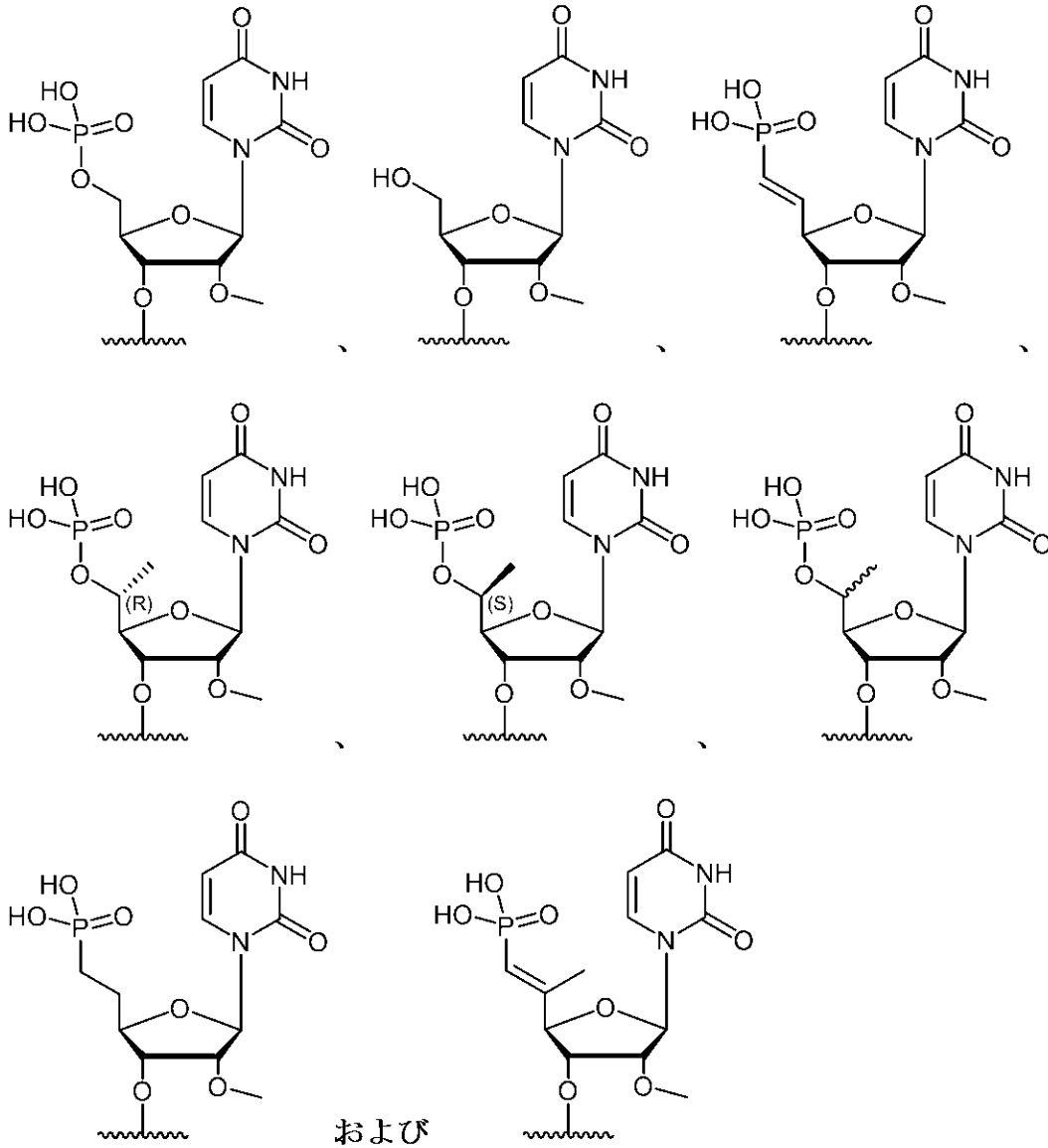
【0364】

他の側面において、ここに提供されるのは図87に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

R<sup>1</sup>は

50

## 【化 2 7】

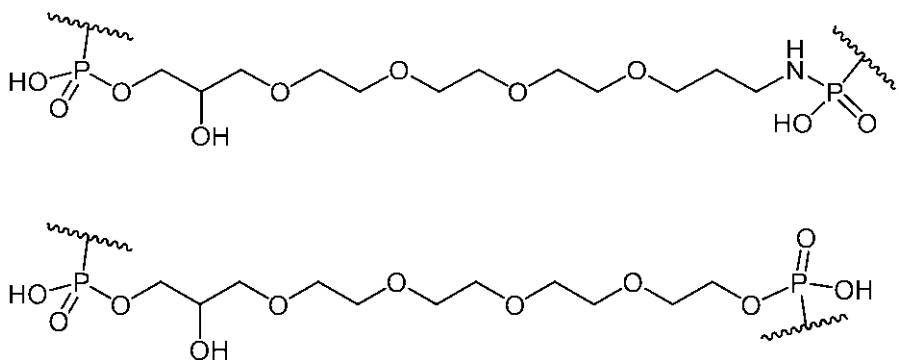


からなる群から選択され；

R<sup>3</sup>は、各々独立して、図82に示すヌクレオチド間リンカーからなる群から選択され；

Lは、2部分を連結するリンカーであり、ここで、リンカーは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ペプチド、RNA、DNA、

## 【化 2 8】

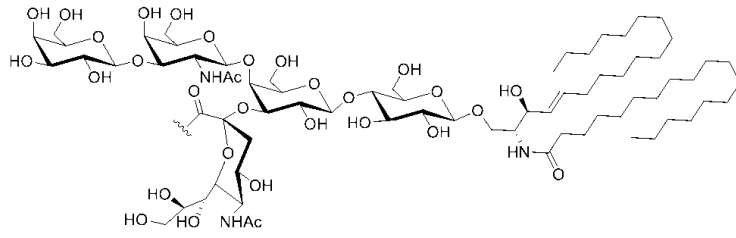


またはこれらの組み合わせからなる群から選択され；

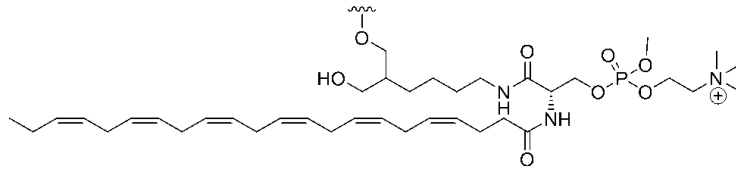
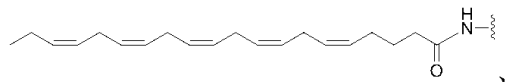
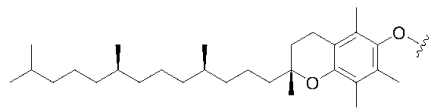


R<sup>2</sup> は、アルキル鎖(例えば、C<sub>1</sub>-6、C<sub>1</sub>-10、C<sub>1</sub>-20、C<sub>1</sub>-30またはC<sub>1</sub>-40)、ビタミン、リガンド、ペプチド、生理活性コンジュゲート(スフィンゴ糖脂質、多不飽和脂肪酸、セコステロイド、ステロイドホルモンまたはステロール脂質を含むが、これらに限定されない)、

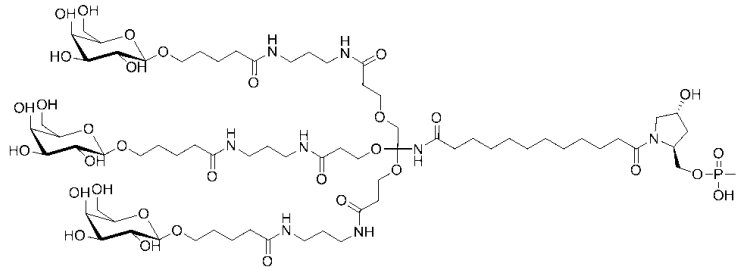
【化29】



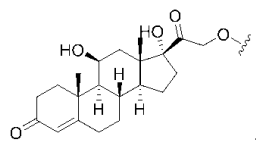
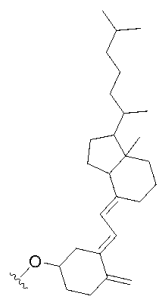
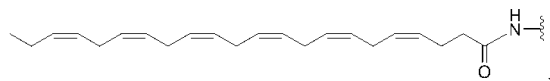
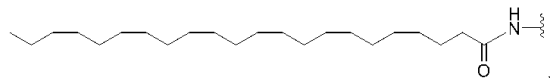
10



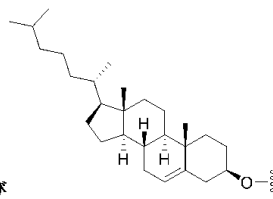
20



30



および



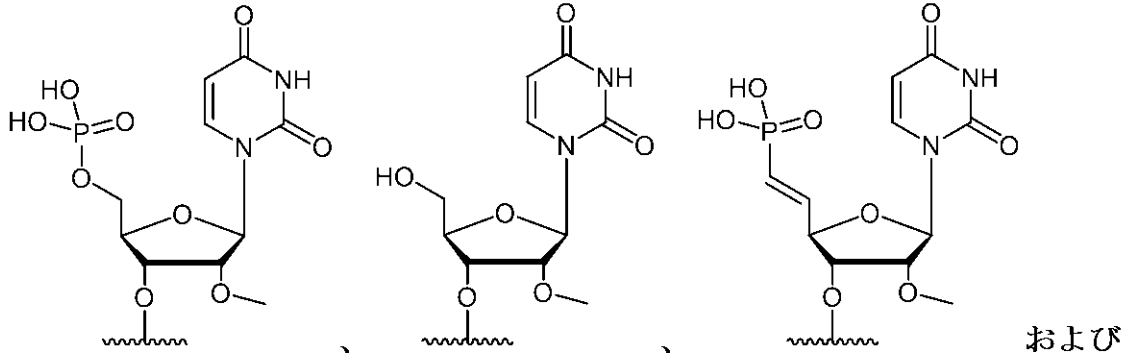
40

からなる群から選択される。

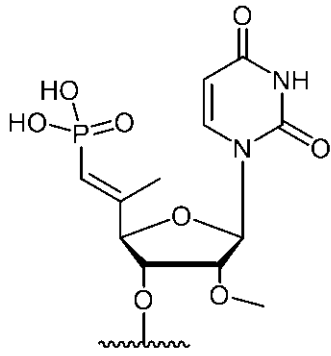
【0365】

ある態様において、R<sup>1</sup>は

【化30】



10



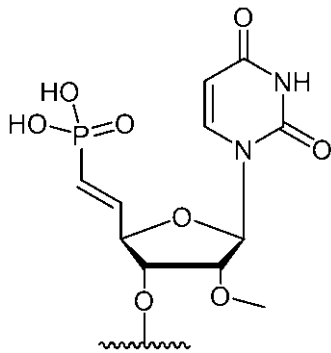
20

からなる群から選択される。

【0366】

他の態様において、R<sup>1</sup>は

【化31】



30

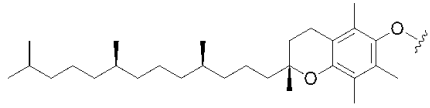
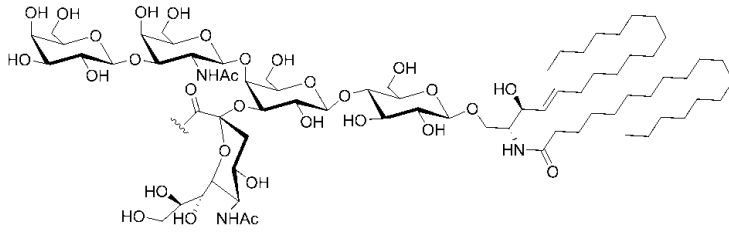
である。

【0367】

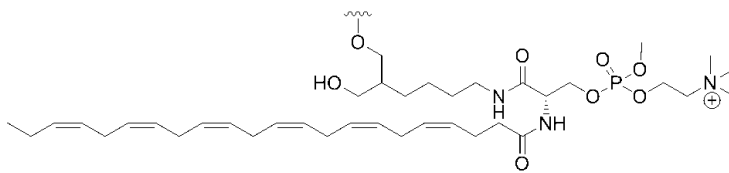
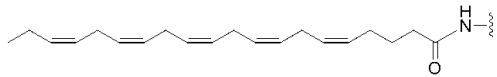
他の態様において、R<sup>2</sup>は

40

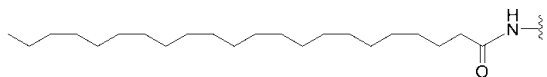
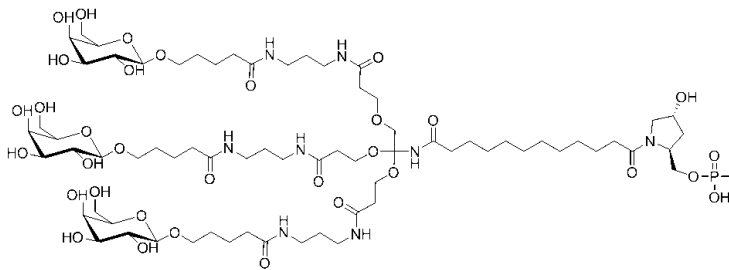
## 【化 3 2】



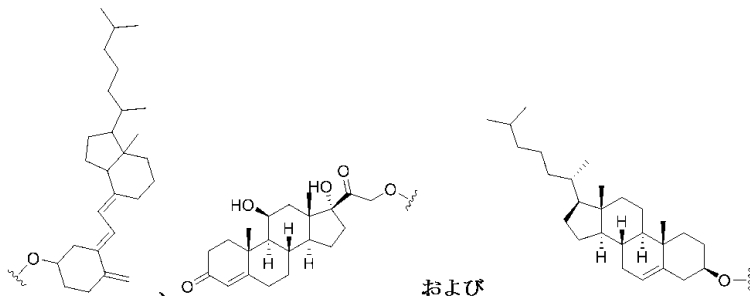
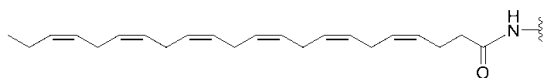
10



20



30



40

からなる群から選択される。

## 【 0 3 6 8 】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、メチレンホスホネート、ホスホトリエステルおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

## 【 0 3 6 9 】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

## 【 0 3 7 0 】

50

他の態様において、R<sup>3</sup>はホスホロチオエートである。

【0371】

他の態様において、Lは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖およびペプチドからなる群から選択される。

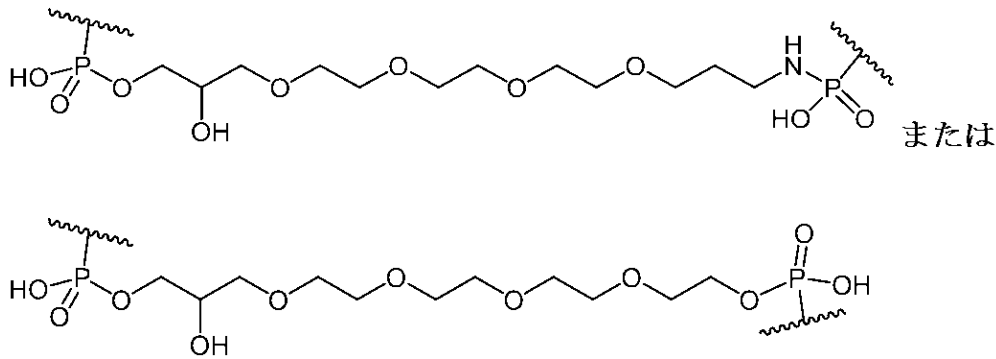
【0372】

他の態様において、Lは、エチレングリコール鎖またはペプチドから選択される。

【0373】

さらに他の態様において、Lは

【化33】



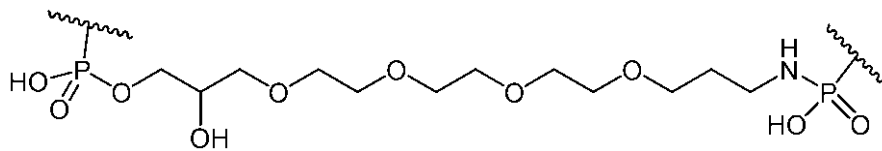
10

である。

【0374】

さらに他の態様において、Lは

【化34】

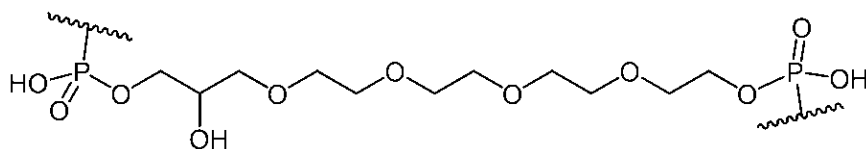


である。

【0375】

他の態様において、Lは

【化35】



である。

【0376】

ある態様において、図87に示す式の化合物は、図88に示す式の化合物である。

【0377】

他の態様において、図87に示す式の化合物は、図88またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

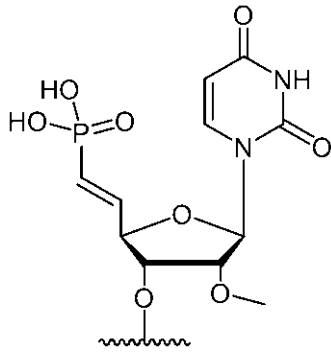
R<sup>1</sup>は

30

40

50

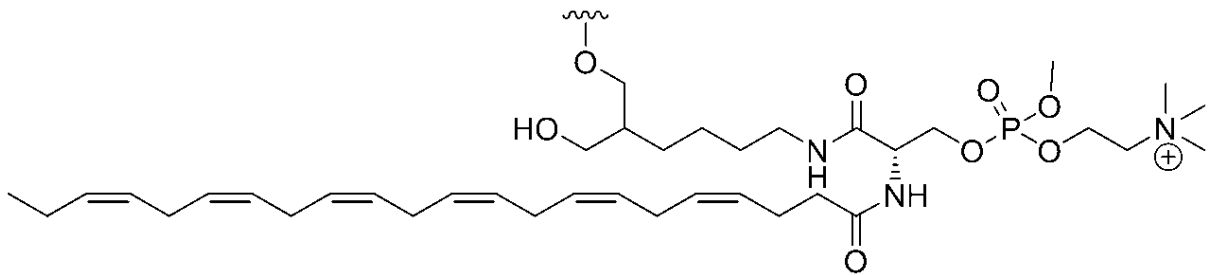
【化 3 6】



10

R 2 は

【化 3 7】



20

である。

【 0 3 7 8】

他の側面において、ここに提供されるのは図 8 9 に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

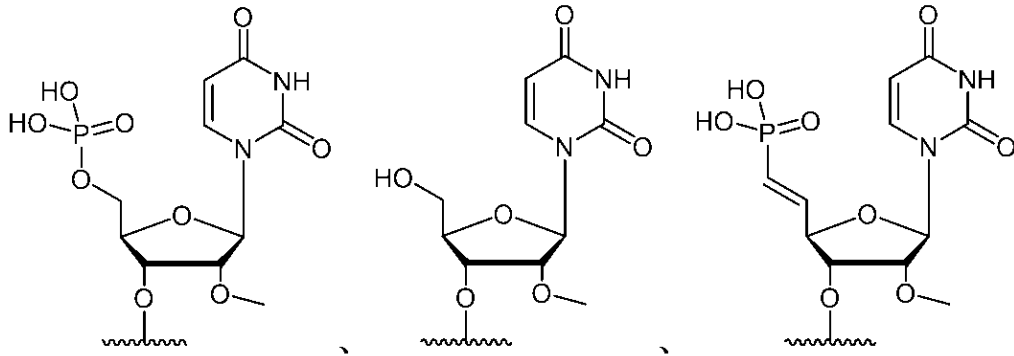
R 1 は

30

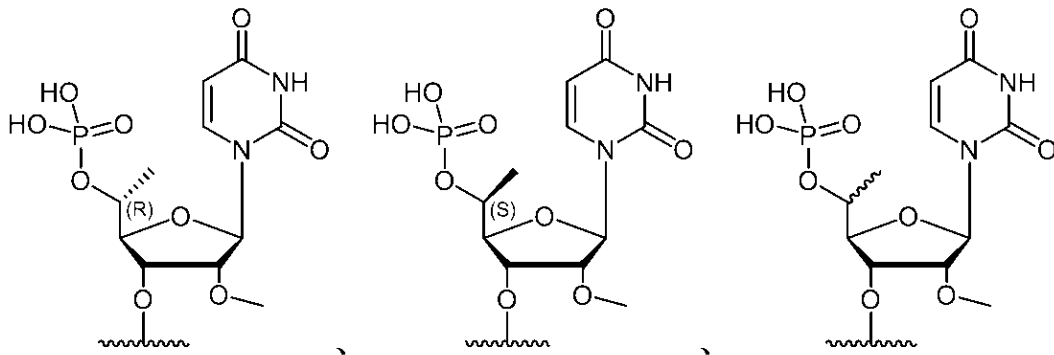
40

50

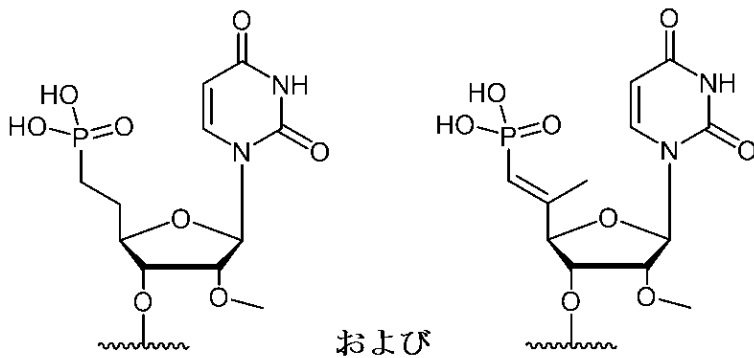
## 【化 3 8】



10



20



30

および

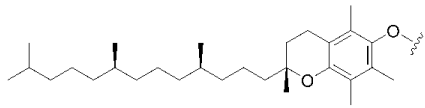
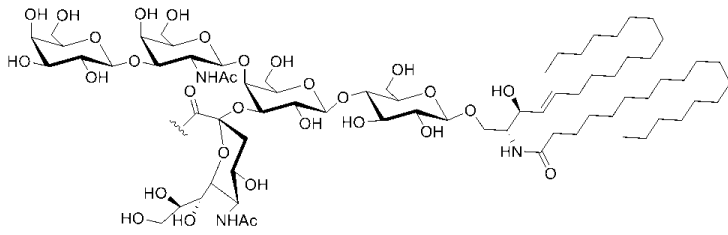
からなる群から選択され；

R<sup>3</sup>は、各々独立して、図82に示すヌクレオチド間リンカーからなる群から選択され；  
 R<sup>2</sup>は、アルキル鎖(例えば、C1-6、C1-10、C1-20、C1-30またはC1-40)、ビタミン、リガンド、ペプチド、生理活性コンジュゲート(スフィンゴ糖脂質、多不飽和脂肪酸、セコステロイド、ステロイドホルモンまたはステロール脂質を含むが、これらに限定されない)、

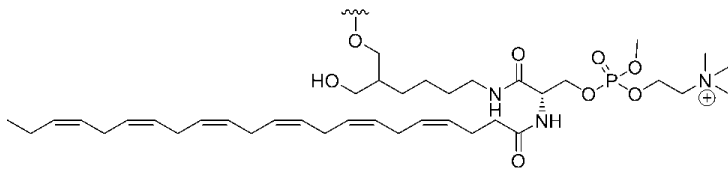
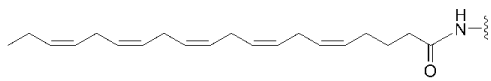
40

50

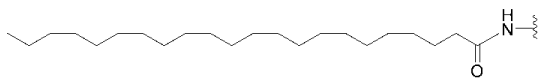
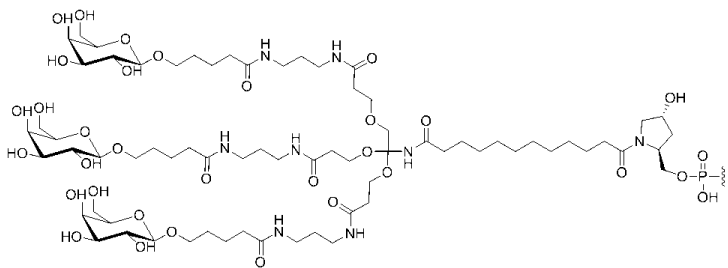
【化 3 9】



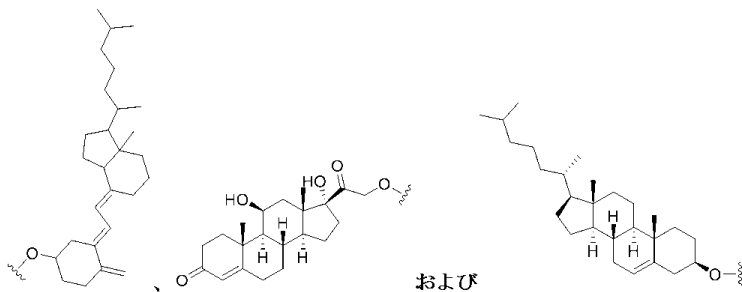
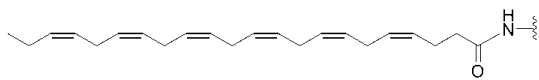
10



20



30



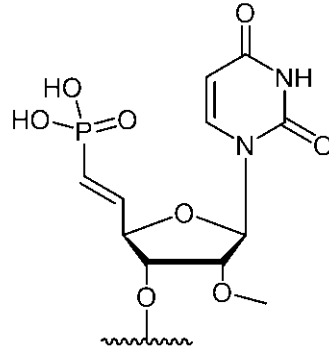
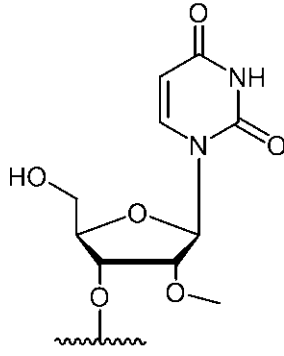
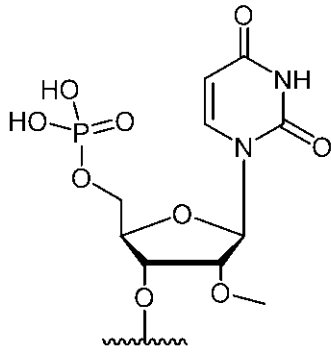
40

からなる群から選択される。

【 0 3 7 9】

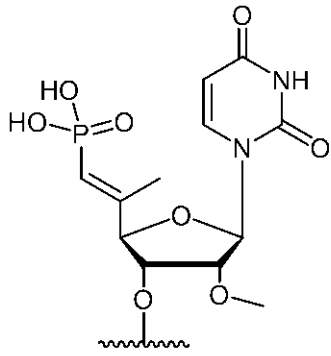
ある態様において、R<sup>1</sup>は

【化40】



および

10



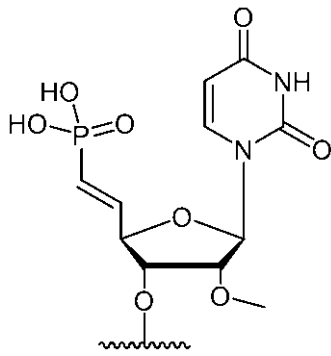
20

からなる群から選択される。

【0380】

他の態様において、R<sup>1</sup>は

【化41】



30

である。

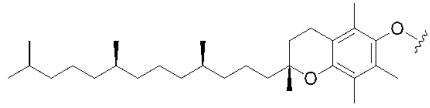
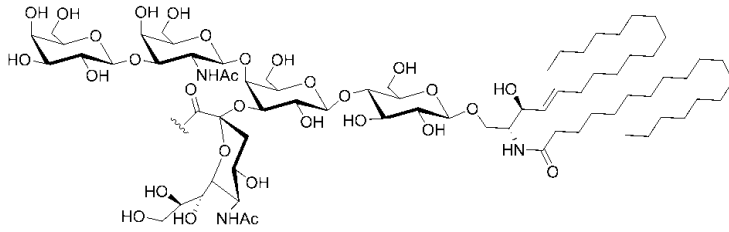
【0381】

他の態様において、R<sup>2</sup>は

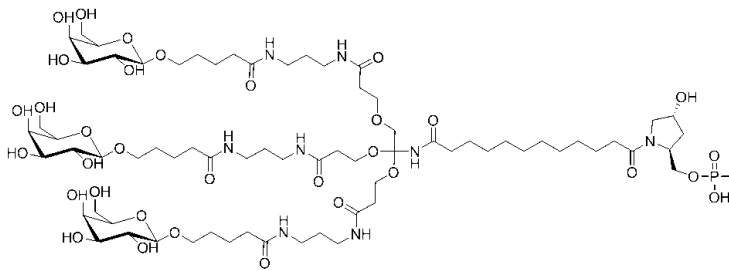
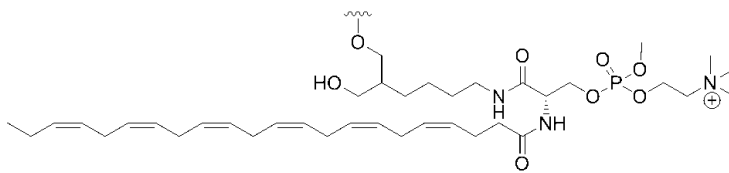
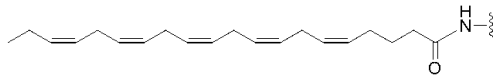
40



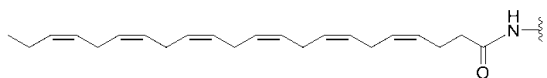
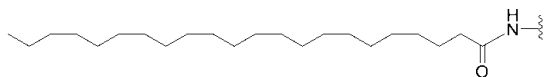
## 【化 4 2】



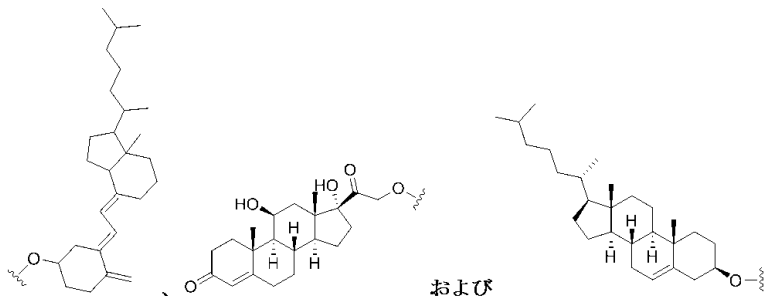
10



20



30



40

からなる群から選択される。

## 【 0 3 8 2】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、メチレンホスホネート、ホスホトリエステルおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

## 【 0 3 8 3】

他の態様において、R<sup>3</sup>は、各々、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートおよびボラノホスフェートからなる群から独立して選択されるヌクレオチド間リンカーである。

## 【 0 3 8 4】

50

他の態様において、R<sup>3</sup>はホスホロチオエートである。

【0385】

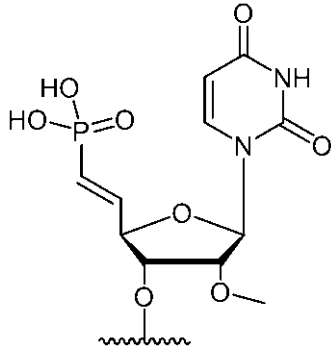
ある態様において、図89に示す式の化合物は図90に示す式の化合物である。

【0386】

ある態様において、図89に示す式の化合物は図90に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

R<sup>1</sup>は

【化43】

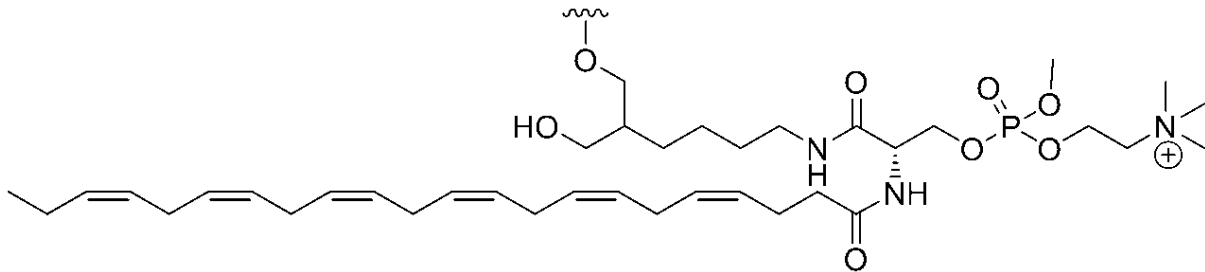


10

であり、

R<sup>2</sup>は

【化44】



20

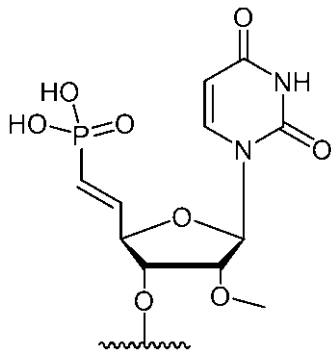
である。

【0387】

ある態様において、図89に示す式の化合物は図90に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

R<sup>1</sup>は

【化45】



30

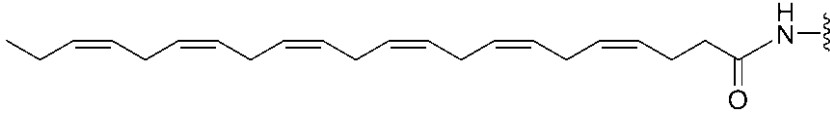
40

であり、

R<sup>2</sup>は

50

【化 4 6】



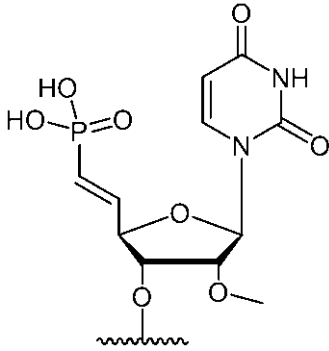
である。

【 0 3 8 8】

ある態様において、図 8 9 に示す式の化合物は図 9 0 に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

R 1 は

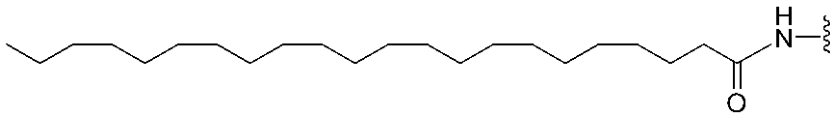
【化 4 7】



であり、

R 2 は

【化 4 8】



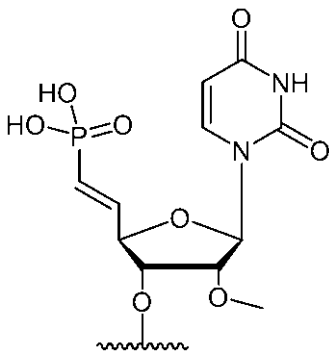
である。

【 0 3 8 9】

ある態様において、図 8 9 に示す式の化合物、i s 図 9 0 に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

R 1 は

【化 4 9】



であり、

R 2 は

10

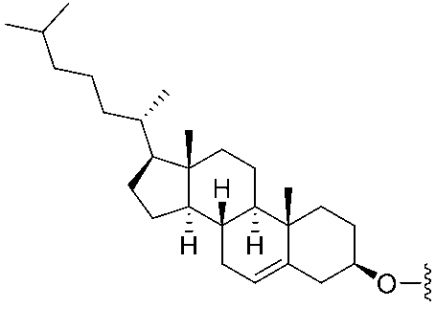
20

30

40

50

【化 5 0】



10

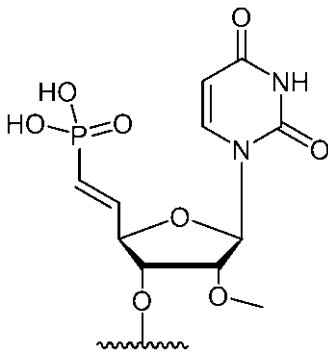
である。

【 0 3 9 0】

ある態様において、図 8 9 に示す式の化合物、 i s 図 9 0 に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

R 1 は

【化 5 1】

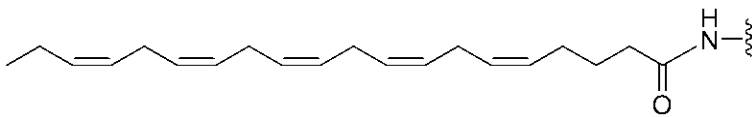


20

であり、

R 2 は

【化 5 2】



30

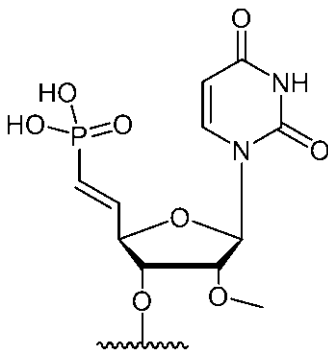
である。

【 0 3 9 1】

ある態様において、図 8 9 に示す式の化合物、 i s 図 9 0 に示す式の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、ここで

R 1 は

【化 5 3】



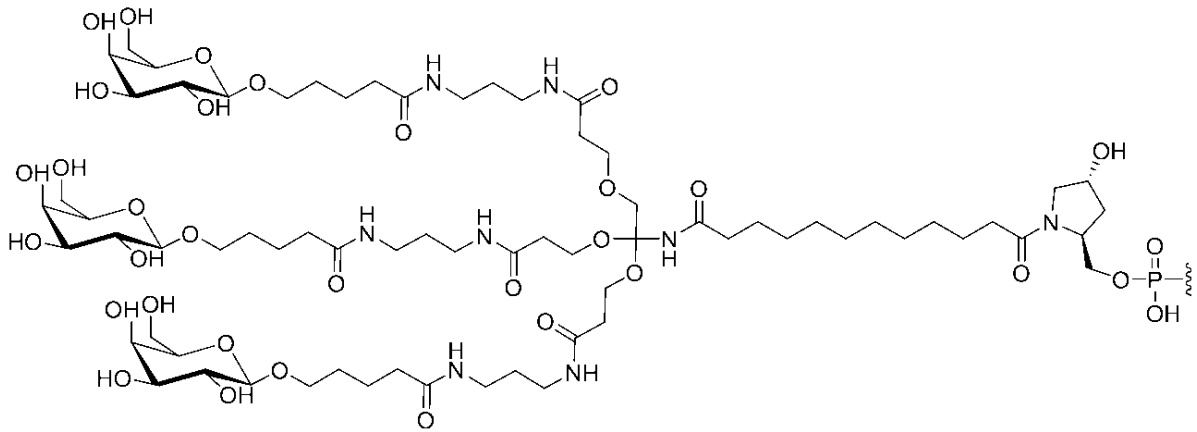
40

であり、

50

R 2 は

【化 5 4】



10

である。

【 0 3 9 2】

#### VIII. 核酸、ベクターおよび宿主細胞を導入する方法

本発明のRNAサイレンシング剤を、細胞(例えば、神経系細胞)に直接導入できる(すなわち、細胞内)、または細胞外に、空洞、間質性空間、生物の循環に、経口的に導入しまたは核酸含有溶液に細胞または生物を浸すことにより導入し得る。血管または血管外循環、血液またはリンパ系および脳脊髄液は、核酸を導入し得る部位である。

20

【 0 3 9 3】

本発明のRNAサイレンシング剤を、核酸含有溶液の注入、核酸で覆われた粒子による被曝(bombardment)、細胞または生物の核酸溶液への浸漬または核酸存在下の細胞膜の電位差を含む当分野で知られる核酸送達方法を使用して導入できる。脂質介在担体輸送、化学的介在輸送およびカチオン性リポソームトランスフェクション、たとえばリン酸カルシウムなどのような、核酸を細胞に導入する他の既知方法を使用し得る。核酸は、次の活性(細胞による核酸取り込みの増強および他の手段による標的遺伝子の阻害増強)の1以上を実現する他の成分とともに導入し得る。

【 0 3 9 4】

核酸を導入する物理的方法は、RNA含有溶液の注入、RNAで覆われた粒子による被曝、細胞または生物のRNA溶液への浸漬またはRNA存在下の細胞膜の電位差を含む。ウイルス粒子に包装されたウイルス構築物は、発現構築物の細胞への効率的導入および発現構築物によりコードされるRNAの転写の両方を達成する。脂質介在担体輸送、化学的介在輸送、例えばリン酸カルシウムなどのような核酸を細胞に導入する他の既知方法を使用し得る。それ故に、RNAは、次の活性(細胞によるRNA取り込みの増強、一本鎖アニーリングの阻害、一本鎖安定化または他の方法による標的遺伝子の阻害増強)の1以上を実現する他の成分とともに導入し得る。

30

【 0 3 9 5】

RNAを、細胞(例えば、神経系細胞)に直接導入できる(すなわち、細胞内に)または細胞外に、空洞、間質性空間、生物の循環に、経口的に導入しまたはRNA含有溶液に細胞または生物を浸すことにより導入し得る。血管または血管外循環、血液またはリンパ系および脳脊髄液は、RNAを導入し得る部位である。

40

【 0 3 9 6】

標的遺伝子を有する細胞は、生殖細胞系または体細胞、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、柔組織細胞または上皮細胞、不死化細胞またはトランスフォーム細胞などに由来し得る。細胞は幹細胞または分化細胞であり得る。分化した細胞型は、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、血液細胞、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、ケラチン生成細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞および内分泌または外分泌

50

腺の細胞を含む。

【0397】

特定の標的遺伝子および送達する二本鎖RNA物質の用量により、この過程は、標的遺伝子の機能の部分的または完全喪失をもたらし得る。標的細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%以上における遺伝子発現の減少または喪失の障害が例示される。遺伝子発現の障害は、標的遺伝子からのタンパク質および/またはmRNA産物のレベルの不在(または観察可能な減少)をいう。特異性は、細胞の他の遺伝子に明らかな影響を及ぼすことなく、標的遺伝子を障害する能力をいう。障害の結果は、細胞または生物の外向き性質の試験(下記実施例に示すとおり)またはRNA溶液ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、ノーザンハイブリダイゼーション、逆転写、マイクロアレイでの遺伝子発現モニタリング、抗体結合、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ウェスタンブロッティング、放射免疫アッセイ(RIA)、他の免疫アッセイおよび蛍光標示式細胞分取(FACS)のような生化学的技術により確認できる。

10

【0398】

細胞株または生物全体におけるRNA介在障害について、遺伝子発現を、タンパク質産物が容易にアッセイされるレポーターまたは薬物抵抗性遺伝子の使用により便利にアッセイされる。このようなレポーター遺伝子は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ(AHAS)、アルカリホスファターゼ(AP)、ベータガラクトシダーゼ(LacZ)、ベータグルクロニダーゼ(GUS)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、ルシフェラーゼ(Luc)、ノパリンシンターゼ(NOS)、オクトピンシンターゼ(OCIS)およびそれらの誘導体を含む。複数の選択可能マーカーが利用可能であり、これはアンピシリン、プレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、ホスフィノトリシン、ピューロマイシンおよびテトラサイクリンに対する耐性を付与する。遺伝子発現量のアッセイによる定量により、本発明によって処理されない細胞と比較して、10%、33%、50%、90%、95%または99%より大きい程度の障害の決定を可能にする。注入物質の低用量およびRNAi剤投与後のより長い時間経過は、細胞の小さい分画の障害をもたらし得る(例えば、少なくとも標的細胞の10%、20%、50%、75%、90%または95%)。細胞における遺伝子発現の定量は、標的mRNAの蓄積または標的タンパク質の翻訳のレベルでの障害の類似量を示し得る。一例として、障害の効率は、細胞における遺伝子産物の評価により決定し得る；mRNAは障害性二本鎖RNAに使用する領域外のヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブで検出できるし、また翻訳ポリペプチドはその領域のポリペプチド配列に対して誘導された抗体で検出できる。

20

30

【0399】

RNAを、細胞あたり少なくとも一コピーの送達を可能にする量で導入し得る。高用量(例えば、少なくとも細胞あたり5、10、100、500または1000コピー)の物質は、より有効な障害を生じ得る；低用量も特異的適用に対して有用であり得る。

【0400】

例示的側面において、本発明のRNAi剤(例えば、htt標的配列をターゲティングするsiRNA)の有効性を、細胞、特に、ニューロン(例えば、線条体または皮質神経細胞栄養系および/または一次ニューロン)における変異体mRNA(例えば、htt mRNAおよび/またはハンチンタンパク質の産生)を特異的に分解する能力について試験する。また細胞ベースの検証アッセイに適当なのは、他の容易にトランスフェクト可能な細胞、例えば、HeLa細胞またはCOS細胞である。細胞を、ヒト野生型または変異体cDNA(例えば、ヒト野生型または変異体ハンチンチンcDNA)でトランスフェクトする。UループmRNAからsiRNAを産生できる標準的siRNA、修飾siRNAまたはベクターを共トランスフェクトする。標的mRNA(例えば、ハンチンチンmRNA)および/または標的タンパク質(例えば、ハンチンチンタンパク質)の選択的減少を測定する。標的mRNAまたはタンパク質の減少を、RNAi剤非存在下またはhtt mRNAを標

40

50

的としないRNAi剤存在下の標的mRNAまたはタンパク質レベルと比較できる。外因的に導入したmRNAまたはタンパク質(または内在性mRNAまたはタンパク質)を、比較目的でアッセイできる。標準的トランスフェクション技術にいくぶん抵抗性であることが知られる神経細胞を使用するとき、受動的取り込みによりRNAi剤(例えば、siRNA)を導入することが望ましい。

#### 【0401】

##### 組み換えアデノ随伴ウイルスおよびベクター

ある例示的態様において、組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)およびその関連ベクターを使用して、1以上のsiRNAを細胞、例えば、神経系細胞(例えば、脳細胞)に送達できる。AAVは、多くの細胞型への感染が可能であるが、感染効率は、カプシドタンパク質の配列により決定される血清型により変わる。いくつかの天然AAV血清型が同定されており、血清型1~9が組み換えAAVに最も一般的に使用されている。AAV-2が最も広く研究され、公開されている血清型である。AAV-DJ系は、血清型AAV-DJおよびAAV-DJ/8を含む。これらの血清型を、インビトロで(AAV-DJ)および種々の細胞および組織においてインビボで(AAV-DJ/8)、改善された形質導入効率を有するハイブリッドカプシドを備えたAAVを産生するための複数AAV血清型のDNAシャッフリングにより作製した。

10

#### 【0402】

特定の態様において、広範な中枢神経系(CNS)送達が、組み換えアデノ随伴ウイルス7(rAAV7)、RAAV9およびrAAV10または他の適当なrAAVの血管内送達により達成できる(Zhang et al. (2011) Mol. Ther. 19(8):1440-8. doi: 10.1038/mt.2011.98. Epub 2011 May 24)。rAAVおよびその関連ベクターは文献から周知であり、US特許出願2014/0296486号、2010/0186103号、2008/0269149号、2006/0078542号および2005/0220766号に記載れ、この各々を、引用によりその全体を全ての目的で本明細書に包含させる。

20

#### 【0403】

rAAVを、当分野で知られる任意の適切な方法により組成物で対象に送達し得る。rAAVを生理学的適合性担体中(すなわち、組成物中)に懸濁し、ヒト、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、モルモット、ハムスター、ニワトリ、七面鳥、非ヒト霊長類(例えば、マカク)などのような対象、すなわち、宿主動物に投与し得る。ある態様において、宿主動物は非ヒト宿主動物である。

30

#### 【0404】

1以上のrAAVの哺乳動物対象への送達は、例えば、筋肉内注射または哺乳動物対象の血流への投与により実施できる。血流への投与は、静脈、動脈または任意の他の血液導管への注射によるものであり得る。ある態様において、1以上のrAAVを、単独肢灌流法で単独肢血流に投与し、これは、外科分野で周知の技術であり、当業者がrAAVウイルス粒子投与前に、全身循環から単独肢を独立させることを本質的に可能とする方法である。米国特許6,177,403号に記載の単独肢灌流技術の変法も、筋肉細胞または組織への形質導入を増強する可能性のために、単独肢の脈管構造にウイルス粒子を投与するために当業者により用いられ得る。さらに、ある例において、ウイルス粒子を、対象の中枢神経系(CNS)に送達することが望ましいことがある。“CNS”は、脊椎動物の脳および脊髄の全細胞および組織を意味する。それ故に、本用語は、神経細胞、膠細胞、星状膠細胞、脳脊髄液(CSF)、間質性空間、骨、軟骨などを含むが、これらに限定されない。組み換えAAVは、CNSまたは脳に、直接、例えば、脳室領域への、ならびに線条体(例えば、線条体の尾状核または被殻)、脊髄および神経筋接合部または小脳葉への、針、カテーテルまたは関連デバイスでの注射により、定位的注射によるような当分野で知られる神経外科的技術により、送達し得る(例えば、Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993;およびAlisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000参照)。

40

#### 【0405】

50

本発明の組成物は、rAAVを単独でまたは1以上の他のウイルス(例えば、1以上の異なるトランスジーンを有する第二rAAV)と組み合わせて含み得る。ある態様において、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上の異なるrAAVを含み、各々、1以上の異なるトランスジーンを含む。

#### 【0406】

rAAVの有効量は、動物、標的所望の組織の標的感染に十分な量である。ある態様において、rAAVの有効量は、安定な体細胞トランスジェニック動物モデルの提供に十分な量である。有効量は、主に対象の種、年齢、体重、健康および標的する組織のような因子により、従って、動物および組織毎に異なり得る。例えば、1以上のrAAVの有効量は、一般に約 $10^9 \sim 10^{16}$ ゲノムコピー含有溶液約1ml~約100mlの範囲である。一部の症例では、約 $10^{11} \sim 10^{12}$  rAAVゲノムコピーの量が適切である。ある態様において、 $10^{12}$  rAAVゲノムコピーが、心臓、肝臓および膵臓組織の標的に有効である。一部の症例では、安定なトランスジェニック動物が、rAAVの複数用量により産生される。

10

#### 【0407】

ある態様において、rAAV組成物は、特に高rAAV濃度が存在するとき(例えば、約 $10^{13}$ ゲノムコピー/mL以上)、組成物中のAAV粒子の凝集を低減するように製剤する。rAAVの凝集を低減する方法は当分野で周知であり、例えば、界面活性剤添加、pH調節、塩濃度調節などを含む(例えば、内容を引用により本明細書に包含させるWright et al. (2005) *Molecular Therapy* 12:171-178参照)。

20

#### 【0408】

“組み換えAAV(rAAV)ベクター”は、最低限、トランスジーンおよびその制御配列および5'および3'AAV末端逆位配列(ITR)を含む。カプシドタンパク質に包装され、選択標的細胞に送達されるのは、この組み換えAAVベクターである。ある態様において、トランスジーンは、目的のポリペプチド、タンパク質、機能的RNA分子(例えば、siRNA)または他の遺伝子産物をコードする、ベクター配列に異種性の核酸配列である。核酸コーディング配列を、標的組織の細胞におけるトランスジーン転写、翻訳および/または発現を可能にする方法で、制御成分と操作可能に連結する。

#### 【0409】

ベクターのAAV配列は、一般にcis作動性5'および3'末端逆位(ITR)配列を含む(例えば、B. J. Carter, in “Handbook of Parvoviruses”, ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990)参照)。ITR配列は、通常約145塩基対長である。ある態様において、実質的にITRをコードする配列全体が分子において使用されるが、これらの配列のある程度の微細な修飾は許容される。これらのITR配列を修飾する能力は、当分野の技術範囲内である(例えば、Sambrook et al., “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); and K. Fisher et al., *J Virol.*, 70:520-532 (1996)のような参考書参照)。本発明で用いるこのような分子の例は、選択トランスジーン配列および関連する制御要素が5'および3'AAV ITR配列が横にある、トランスジーンを含む“cis作動性”プラスミドである。AAV ITR配列は、ここにさらに記載する哺乳動物AAVタイプを含む、あらゆる既知AAVから得ることができる。

30

40

#### 【0410】

##### IX. 処置方法

本発明は、全体または一部が、機能獲得型変異体タンパク質が原因の、疾患または障害のリスクにある(または疑われる)対象における予防および治療両方の方法を提供する。ある態様において、疾患または障害は、トリヌクレオチド反復疾患または障害である。他の態様において、疾患または障害は、ポリグルタミン障害である。好ましい態様において、疾患または障害は、ハンチンチンの発現と関連する障害であり、ハンチンチンの変改、特にCAG反復コピー数の増幅が、臨床的顕在化がハンチントン病患者に見られるものを含むように、ハンチンチン遺伝子(構造または機能)またはハンチンチンタンパク質(構造または

50



機能または発現)の欠損をもたらす。

【0411】

ここで使用する“処置”または“処置する”は疾患または障害、疾患または障害の症状または疾患の素因を治療、治癒、軽減、軽快、改変、矯正、向上、改善または作用を目的とした、患者への治療剤(例えば、RNA剤またはそれをコードするベクターまたはトランスジーン)の適用または投与または疾患または障害、疾患または障害の症状または疾患または障害の素因を有する患者から単離した単離組織または細胞株への治療剤の適用または投与として定義する。

【0412】

ある側面において、本発明は、対象に治療剤(例えば、RNA剤またはそれをコードするベクターまたはトランスジーン)を投与することによる、対象における上記の疾患または障害を予防する方法を提供する。疾患の危険がある対象は、例えば、ここに記載する診断または予後アッセイのいずれかまたは組み合わせにより同定できる。予防剤の投与は、疾患または障害が阻止される、あるいは、その進行が遅延されるように、疾患または障害の特徴症状の顕在化前に行い得る。

10

【0413】

本発明の他の側面は、対象を治療的に処置する、すなわち、疾患または障害の症状の発症を変える方法に関する。例示的態様において、本発明の調節的方法は、機能獲得型変異体を発現する細胞と、遺伝子内の標的配列(例えば、配列番号1、2または3)に特異的な治療剤(例えば、RNA剤またはそれをコードするベクターまたはトランスジーン)を、遺伝子での配列特異的干渉が達成されるように接触させることを含む。これらの方法は、インピトロで(例えば、細胞を薬剤と培養するにより)、あるいは、インピボで(例えば、対象に薬剤を投与することにより)実施できる。

20

【0414】

処置の予防および治療両方の方法に関して、薬理ゲノミクスの分野から得られた知識に基づき、このような処置は特異的にあつらえても修飾してもよい。ここで使用する“薬理ゲノミクス”は、遺伝子配列決定、統計遺伝学、臨床開発および市場での薬物に対する遺伝子発現解析のようなゲノミクステクノロジーの適用をいう。より具体的に、本用語は、患者の遺伝子が、どのように薬物に対する応答を決定するかの研究をいう(例えば、患者の“薬物応答表現型”または“薬物応答遺伝子型”)。それ故に、本発明の他の側面は、本発明の標的遺伝子分子または標的遺伝子モジュレーターでの個々の予防または治療処置を、個々の薬物応答遺伝子型に応じてあつらえる方法を提供する。薬理ゲノミクスは、臨床医または内科医が、処置により最も利益を受ける患者への標的予防または治療処置を実施するおよび毒性薬物副作用を経験するであろう患者の処置を避けることを可能にする。

30

【0415】

治療剤を適切な動物モデルで試験できる。例えば、ここに記載するRNA剤(または発現、それをコードするベクターまたはトランスジーン)を動物モデルで使用して、該薬剤での処置の有効性、毒性または副作用を決定できる。あるいは、治療剤を動物モデルで使用して、このような薬剤の作用機序を決定できる。例えば、薬剤を動物モデルで使用して、このような薬剤での処置の有効性、毒性または副作用を決定できる。あるいは、薬剤を動物モデルで使用して、このような薬剤の作用機序を決定できる。

40

【0416】

本発明のRNAサイレンシング剤を含む医薬組成物を、ハンチントン病のような神経障害を有するまたは発症する危険があると診断されたあらゆる患者に投与できる。ある態様において、患者は神経障害と診断され、患者はその他は一般に良好な健康状態である。例えば、患者は、病状末期ではなく、患者は、診断後少なくとも2年、3年、5年以上生存する可能性がある。患者を、診断後すぐに処置してよく、または処置は、患者が、パーキンソン病患者における運動変動およびジスキネジアのような、より衰弱性の症状を経験するまで遅らせてよい。他の態様において、患者は、疾患の最終段階に達していない。

【0417】

50

神経系細胞への取り込み増強のために修飾されたRNAサイレンシング剤を、約1.4 mg / 体重kgまたは10 mg / 体重kg、5 mg / 体重kg、2 mg / 体重kg、1 mg / 体重kg、0.5 mg / 体重kg、0.1 mg / 体重kg、0.05 mg / 体重kg、0.01 mg / 体重kg、0.005 mg / 体重kg、0.001 mg / 体重kg、0.0005 mg / 体重kgまたは0.0001 mg / 体重kg未満および200 nmoleのRNA剤(例えば、約 $4.4 \times 10^{16}$ コピー) / 体重kg未満または1500 nmole、750 nmole、300 nmole、150 nmole、75 nmole、15 nmole、7.5 nmole、1.5 nmole、0.75 nmole、0.15 nmole、0.075 nmole、0.015 nmole、0.0075 nmole、0.0015 nmoleのRNAサイレンシング剤 / 体重kg未満の単位用量で投与できる。単位用量は、例えば、注射(例えば、静脈内または筋肉内、髄腔内または直接脳に)、吸入用量または局所適用により投与できる。特に好ましい用量は、2、1または0.1 mg / 体重kg未満である。

10

#### 【0418】

臓器へ直接(例えば、脳へ直接)のRNAサイレンシング剤の送達は、臓器あたり約0.0001 mg ~ 約3 mg程度の用量または好ましくは臓器あたり約0.0001 ~ 0.001 mg、臓器あたり約0.03 ~ 3.0 mg、眼あたり約0.1 ~ 3.0 mgまたは臓器あたり約0.3 ~ 3.0 mgの用量であり得る。用量は、神経疾患または障害、例えば、ハンチントン病の処置または予防に有効な用量である。ある態様において、単位用量を、1日1回より少ない、例えば、2日毎、4日毎、8日毎または30日毎より少ない頻度で投与する。他の態様において、単位用量を一定頻度で投与しない(例えば、規則的頻度ではない)。例えば、単位用量を一度に投与し得る。ある態様において、有効用量を他の伝統的治療モダリティと投与する。

20

#### 【0419】

ある態様において、対象に、初期用量および1以上の維持用量のRNAサイレンシング剤を投与する。1以上の維持用量は、一般に初期用量より低く、例えば、初期用量の半分である。維持レジメンは、対象を、1日あたり0.01  $\mu$ g ~ 1.4 mg / 体重kg、例えば、1日あたり10、1、0.1、0.01、0.001または0.0001 mg / 体重kgの1以上の用量で処置することを含み得る。維持用量は、好ましくは5日、10日または30日に1回未満で投与する。さらに、処置レジメンは、特定の疾患の性質、その重症度および患者の全体的状態によって変わる一定期間で終了し得る。好ましい態様において、用量は1日1回未満、例えば、24時間、36時間、48時間以上で1回以下、例えば、5日または8日に1回以下で送達し得る。処置後、患者を、状態の変化および疾患状態の症状の軽減についてモニターし得る。化合物の用量は、患者が現在の用量レベルで顕著に応答しないならば増やしてよく、または疾患状態の症状の軽減が観察され、疾患状態が消失し、または望まない副作用が観察されたならば用量を減らしてよい。

30

#### 【0420】

有効用量を、所望によりまたは特定の状況下で適切と考えるならば単一用量または2以上の用量で投与してよい。反復を容易にするまたは頻繁な注入が望まれるならば、送達デバイス、例えば、ポンプ、半永久的ステント(例えば、静脈内、腹腔内、大槽内または嚢内)またはリザーバーの移植が賢明である。ある態様において、医薬組成物は、複数のRNAサイレンシング剤種を含む。他の態様において、RNAサイレンシング剤種は、天然に存在する標的配列に関して、他の種と非重複および非隣接である配列を有する。他の態様において、複数のRNAサイレンシング剤種は、異なる天然に存在する標的遺伝子に特異的である。他の態様において、RNAサイレンシング剤は、アレル特異的である。他の態様において、複数のRNAサイレンシング剤種は、2以上の標的配列(例えば、2、3、4、5、6以上の標的配列)を標的とする。

40

#### 【0421】

処置が成功した後、疾患状態の再発を防止するために患者を維持治療に付すのが望ましい可能性があり、ここで、本発明の化合物を、0.01  $\mu$ g ~ 100 g / kg体重範囲の維持用量で投与する(米国特許6,107,094号参照)。

50

## 【0422】

RNAサイレンシング剤組成物の濃度は、障害の処置または予防にまたはヒトにおける生理学的状態の制御に有効であるのに十分な量である。投与するRNAサイレンシング剤の濃度または量は、薬剤および投与方法、例えば経鼻、バツカルまたは肺について決定されるパラメータによる。例えば、経鼻製剤は、経鼻経路の刺激またはヒリヒリ感を避けるために、ある成分の濃度を遥かに下げる必要がある傾向にある。適当な経鼻製剤を提供するために、経口製剤を10～100倍希釈することが望ましいことがある。

## 【0423】

疾患または障害の重症度、先の処置、対象の一般的健康および/または年齢および存在する他の疾患を含むが、これらに限定されないある因子は、対象の効果的処置に必要な用量に影響し得る。さらに、治療有効量のRNAサイレンシング剤での対象の処置は、単回処置を含んでよく、または、好ましくは、連続的処置を含み得る。処置のためのRNAサイレンシング剤の有効用量は、特定の処置中に増加させても減少させてもよいことも認識される。用量の変更は、ここに記載する診断アッセイの結果であり、明らかである。例えば、対象を、RNAサイレンシング剤組成物投与後にモニターできる。モニタリングの情報に基づき、RNAサイレンシング剤組成物のさらなる量を投与できる。

## 【0424】

投薬は重症度および処置する疾患状態により、処置の経過は数日～数ヶ月または治癒するまでまたは疾患状態の軽減が達成されるまで続く。最適投薬スケジュールは患者体内の薬物蓄積の測定から計算できる。当業者は、最適用量、投与方法および反復率を容易に決定できる。最適用量は、個々の化合物の相対的効力により変わり得て、一般にインビトロおよびインビボ動物モデルで有効と判明したEC<sub>50</sub>に基づき概算され得る。ある態様において、動物モデルは、標的RNA、例えば、神経系細胞で発現されるRNAを産生するヒト遺伝子、例えば、遺伝子を発現するトランスジェニック動物を含む。トランスジェニック動物は、対応する内在性RNAが欠損してよい。他の態様において、試験用組成物は、少なくとも内部領域において、動物モデルにおける標的RNAとヒトにおける標的RNAの間で保存されている配列に、相補的であるRNAサイレンシング剤を含む。

## 【0425】

## X. 医薬組成物および投与方法

本発明は、下記のとおり予防および/または治療処置のための上記薬剤の使用に関する。従って、本発明のモジュレーター(例えば、RNAi剤)を、投与に適する医薬組成物に組み込み得る。このような組成物は、一般に核酸分子、タンパク質、抗体または調節化合物および薬学的に許容される担体を含む。ここで使用する用語“薬学的に許容される担体”は、医薬投与と適合する任意かつ全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含む。薬学的活性物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は当分野で周知である。何らかの慣用の媒体または薬剤が活性化合物と非適合性でない限り、組成物におけるその使用が企図される。補助的活性化合物も組成物に組み込み得る。

## 【0426】

本発明の医薬組成物を、意図する投与経路に適合するように製剤する。投与経路の例は、非経腸、例えば、静脈内、皮内、皮下、腹腔内、筋肉内、経口(例えば、吸入)、経皮(局所)および経粘膜投与を含む。ある例示的態様において、本発明の医薬組成物は、線条体内(IS)投与、脳室内(ICV)投与および髄腔内(IT)投与(例えば、ポンプ、注入などにより)を含むが、これらに限定されない投与経路により脳脊髄液(CSF)に送達される。非経腸、皮内または皮下適用に使用する溶液または懸濁液は、次の成分を含み得る：注射用水、食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような無菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗細菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のようなキレート剤；アセテート、シトレートまたはホスフェートのような緩衝液および塩化ナトリウムまたはデキストロースのような張性調節用薬剤。pHを、塩酸

10

20

30

40

50

または水酸化ナトリウムのような酸または塩基で調節できる。非経腸製剤は、アンプル、使い捨てシリンジまたはガラスもしくはプラスチック製複数用量バイアルに充填する。

【0427】

注射使用に適する医薬組成物は、無菌水溶液(水可溶性であるとき)または分散剤および無菌注射用溶液または即時製剤用無菌粉末を含む。静脈内、I S、I C V および / または I T 投与について、適当な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor ELT M (BASF, Parsippany, N.J.) またはリン酸緩衝化食塩水(PBS)を含む。いずれの場合も、組成物は無菌でなければならず、容易な注射性(syringability)を有する程度に流体でなければならない。製造および保存条件下で安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物の汚染に対して保護されていなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど)および適当なそれらの混合物を含む、溶媒または分散媒体であり得る。適正な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散剤の場合必要な粒子径の維持によりおよび界面活性剤の使用により維持できる。微生物の作用の予防は、種々の抗細菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより達成できる。多くの場合、組成物に等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを包含させるのが好ましい。注射用組成物の吸収延長は、組成物に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを添加することによりもたらされる。

10

【0428】

無菌注射用溶液は、必要な量の活性化化合物を、必要に応じて、上記成分の一つまたは組み合わせと適切な溶媒に取り込み、続いて滅菌濾過することにより製造できる。一般に、分散剤は、基本分散媒体および上記からの必要な他の成分を含む、無菌媒体に活性化化合物を取り込むことにより製造する。無菌注射用溶液の製剤用無菌粉末の場合、製剤の好ましい方法は、先に無菌濾過した溶液から活性成分と何らかの所望の追加成分の粉末を産生する真空乾燥および凍結乾燥である。

20

【0429】

経口組成物は、一般に不活性希釈剤または可食担体を含む。それらはゼラチンカプセルに充填されるかまたは錠剤に圧縮される。経口治療投与のために、活性化化合物を錠剤、トローチ剤またはカプセル剤の形で添加物と共に組み込み、使用できる。経口組成物はまた洗口液として使用する流体担体を使用しても製造でき、ここで、流体担体中の化合物を経口的に適用し、クチュクチュし、吐き出し、または嚥下する。薬学的に適合性の結合剤および / またはアジュバント物質が組成物の一部として包含され得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、次の成分または類似性質の化合物のいずれかを含み得る：微結晶セルロース、トラガカントガムまたはゼラチンのような結合剤；デンプンまたはラクトースのような添加物、アルギン酸、Primogelまたはコーンデンプンのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはSterotesのような滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素のような流動促進剤；スクロースまたはサッカリンのような甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジフレーバーのような風味剤。

30

【0430】

吸入による投与について、化合物は、適当な噴射剤、例えば、二酸化炭素のようなガスを含む加圧容器またはディスペンサーからエアロゾルスプレーの形でまたはネブライザーで送達される。

40

【0431】

全身投与はまた経粘膜または経皮手段にもよる。経粘膜または経皮投与のために、透過すべき障壁に適切な浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は、一般に当分野で知られ、例えば、経粘膜投与、界面活性剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、経鼻スプレーまたは坐薬を経て達成できる。経皮投与について、活性化化合物を当分野で一般に知られるとおり、軟膏、膏薬、ゲルまたはクリームに製剤する。

【0432】

50

化合物を、坐薬(例えば、カカオバターおよび他のグリセリドのような慣用の坐薬基剤と)または直腸送達のような保持浣腸の形にも製剤できる。

【0433】

RNAサイレンシング剤を、McCaffrey et al. (2002), Nature, 418(6893), 38-9 (流体力学トランスフェクション); Xia et al. (2002), Nature Biotechnol., 20(10), 1006-10 (ウイルス介在送達); またはPutnam (1996), Am. J. Health Syst. Pharm. 53(2), 151-160, erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. 53(3), 325 (1996)に記載の方法を含むが、これらに限定されない当分野で知られる方法を使用して、トランスフェクションまたは感染によっても送達できる。

【0434】

RNAサイレンシング剤をまた、DNAワクチンのような核酸剤投与に適するあらゆる方法も送達できる。これらの方法は、遺伝子銃、バイオ注射器および皮膚パッチならびに米国特許6,194,389号に開示のマイクロ粒子DNAワクチンテクノロジーおよび米国特許6,168,587号に開示のような粉末形態ワクチンの哺乳動物経皮無針ワクチン接種のような無針方法を含む。さらに、とりわけ、Hamajima et al. (1998), Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10に開示のような、鼻腔内送達が可能である。リポソーム(例えば、米国特許6,472,375号に記載)およびマイクロカプセル封入も使用できる。生分解性標的可能微粒子送達系も使用できる(例えば、米国特許6,471,996号に記載)。

【0435】

ある態様において、活性化合物を、インプラントおよびマイクロカプセル封入送達系を含む、制御送達製剤のような、化合物を身体からの急速な排除に対して保護する担体と製造する。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸のような生分解性、生体適合性のポリマーを使用できる。このような製剤の製剤方法は当業者には明らかである。物質をまたAlza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から購入することができる。リポソーム懸濁液(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染細胞に標的化したリポソームを含む)も薬学的に許容される担体として使用できる。これらは、例えば、米国特許4,522,811号に記載のような、当業者に知られる方法で製造できる。

【0436】

投与の容易さおよび用量の均一性のために、経口または非経腸組成物を用量単位で製剤するのが特に有益である。ここで使用する用量単位形態は、処置する対象のための単位用量として適する物理的に分離された単位をいう。各単位は、必要な医薬担体と共に、所望の治療効果を生じるように予定された量の活性化合物を含む。本発明の用量単位の仕様は、活性化合物および達成すべき特定の治療効果の特異的特徴および個体の処置のための活性化合物の製剤に固有の制約に必要とされ、直接的に依存する。

【0437】

このような化合物の毒性および治療有効性は、例えば、LD<sub>50</sub>(集団の50%に致死の用量)およびED<sub>50</sub>(集団の50%に治療的に有効な用量)を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的薬学手段により決定できる。毒性と治療効果の用量比は治療指数であり、比LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>として表現できる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を使用できるが、非感染細胞への損傷の可能性を最小化するために罹患組織の部位へこのような化合物を標的化し、それにより、副作用を軽減する送達系の設計に留意すべきである。

【0438】

細胞培養アッセイおよび動物試験から得たデータを、ヒトにおける使用のための範囲の用量の決定に使用できる。このような化合物の用量は、好ましくは毒性がわずかであるかまたはなく、ED<sub>50</sub>を含む循環濃度範囲内である。用量は用いる用量形態および利用する投与経路により変わる。本発明の方法において使用するあらゆる化合物について、治療的有效用量は、最初に細胞培養アッセイから計算できる。用量を、細胞培養で決定されるE

10

20

30

40

50

C<sub>50</sub> (すなわち、最大の半分の応答を達成する試験化合物の濃度)を含む、循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルで決定し得る。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより詳細に決定できる。血漿レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定し得る。

【0439】

医薬組成物を、必要な投与指示書と共に容器、パックまたはディスペンサーに包装することができる。

【0440】

ここで定義する治療有効量のRNAサイレンシング剤(すなわち、有効な用量)は、選択するRNAサイレンシング剤による。例えば、プラスミドコード化shRNAを選択したならば、約1 µg ~ 1000 mg範囲の量の単回用量を投与し得る；ある態様において、10 µg、30 µg、100 µgまたは1000 µgを投与し得る。ある態様において、1 ~ 5 gの組成物を投与できる。組成物を1日1回以上から、隔日を含む週に回1以上投与できる。当業者は、疾患または障害の重症度、先行処置、対象の一般的健康および/または年齢および併存する他の疾患を含むが、これらに限定されないある因子が、対象の効果的処置に必要な用量およびタイミングに影響することを認識する。さらに、治療有効量のタンパク質、ポリペプチドまたは抗体での対象の処置は、単回処置を含んでよく、または好ましくは、連続処置を含んでよい。

【0441】

本発明の核酸分子を、例えば、Xia et al., (2002), Supra.に記載のものを含むが、これに限定されない当分野で知られる方法を使用して、発現構築物、例えば、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、発現カセットまたはプラスミドウイルスベクターに挿入できる。発現構築物を、対象に、例えば、吸入、経口、静脈内注射、局所投与により(米国特許5,328,470号参照)または定位的注射により送達できる(例えば、Chen et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3054-3057参照)。送達ベクターの医薬調製は、許容される希釈剤中のベクターを含んでよくまたは送達媒体が包埋された遅延放出マトリクスを含み得る。あるいは、完全送達ベクターが組み換え細胞、例えば、レトロウイルスベクターからインタクトで製造できるとき、医薬調製は、遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。

【0442】

本発明の核酸分子はまた小ヘアピンRNA(shRNA)およびshRNAを発現するように改変された発現構築物も含み得る。shRNAの転写はポリメラーゼIII(pol III)プロモーターにより開始され、4-5-チミン転写終結部位の2位で停止すると考えられる。発現により、shRNAは3' UU-オーバーハングを備えたステムループ構造に折りたたまれ；その後、これらのshRNAの末端が処理され、shRNAを約21ヌクレオチドのsiRNA様分子に変換すると考えられる。Brummelkamp et al. (2002), Science, 296, 550-553; Lee et al. (2002), supra; Miyagishi and Taira (2002), Nature Biotechnol., 20, 497-500; Paddison et al. (2002), supra; Paul (2002), supra; Sui (2002) supra; Yu et al. (2002), supra.

【0443】

発現構築物は、適切な発現系における使用に適するあらゆる構築物であってよく、当分野で知られるように、レトロウイルスベクター、直線状発現カセット、プラスミドおよびウイルスまたはウイルス由来ベクターを含むが、これらに限定されない。このような発現構築物は、誘導性プロモーター、RNA Pol IIIプロモーター系、例えばU6 snRNAプロモーターまたはH1 RNAポリメラーゼIIIプロモーターまたは当分野で知られる他のプロモーターの1以上を含み得る。構築物はsiRNAの一鎖または両鎖を含み得る。両鎖を発現する発現構築物はまた両鎖を連結するループ構造も含んでよく、また各鎖は同じ構築物内の個別のプロモーターから個別に転写され得る。各鎖はまた個別の発現構築物から転写され得る、Tuschl (2002), Supra.

【0444】

10

20

30

40

50

ある例示的態様において、本発明のRNAサイレンシング剤を含む組成物は、多種多様な経路により対象の神経系に送達される。経路の例は、髄腔内、柔組織内(例えば、脳内)、経鼻および眼送達を含む。組成物はまた、例えば、静脈内、皮下または筋肉内注射により全身送達でき、これは、末梢ニューロンへのRNAサイレンシング剤の送達に特に有用である。好ましい送達経路は、脳に直接、例えば、脳室または脳の視床下部にまたは脳の側面または背領域にである。神経系細胞送達用RNAサイレンシング剤を、投与に適する医薬組成物に混合し得る。

【0445】

例えば、組成物はRNAサイレンシング剤の1以上の種および薬学的に許容される担体を含み得る。本発明の医薬組成物を、局所または全身処置が望まれるかおよび処置領域により、多くの方法で投与し得る。投与は、局所(眼、鼻腔内、経皮を含む)、経口または非経腸であり得る。非経腸投与は、静脈内点滴、皮下、腹腔内または筋肉内注射、髄腔内または脳室内(例えば、脳室内)投与を含む。ある例示的態様において、本発明のRNAサイレンシング剤を、ここに記載する多種多様な適当な組成物および方法を使用し、血液脳関門(BBB)を通して送達する。

10

【0446】

送達経路は、患者の障害に依存する。例えば、ハンチントン病を有すると診断された対象に、脳に直接本発明の抗htt RNAサイレンシング剤を投与できる(例えば、大脳基底核細胞の淡蒼球または線条体および線条体の近中型有棘ニューロンに)。本発明のRNAサイレンシング剤に加えて、患者に第二治療、例えば、軽減治療および/または疾患特異的治療を実施できる。第二治療は、例えば、対症的治療(例えば、症状を軽減するため)、神経保護的治療(例えば、疾患進行遅延または停止のため)または回復的治療(例えば、疾患過程の逆転のため)であり得る。ハンチントン病処置のためには、例えば、対症治療は、薬物ハロペリドール、カルバマゼピンまたはパロプロエートを含み得る。他の治療は、精神療法、理学療法、言語療法、伝達および記憶補助、社会的支持サービスおよび食事アドバイスを含み得る。

20

【0447】

RNAサイレンシング剤を、脳の神経系細胞に送達できる。組成物の血液脳関門を超える通過を必要としない送達方法を利用できる。例えば、RNAサイレンシング剤含有医薬組成物を、患者に、疾患罹患細胞を含む領域に直接注射することにより送達できる。例えば、医薬組成物を、脳への直接注射により送達できる。注射は、脳の特定の領域への定位的注射により得る(例えば、黒質、皮質、海馬、線条体または淡蒼球)。RNAサイレンシング剤を、中枢神経系の複数領域に送達できる(例えば、脳および/または脊髄の複数領域)。RNAサイレンシング剤を、脳の汎発性領域に送達できる(例えば、脳の皮質への汎発性送達)。

30

【0448】

ある態様において、RNAサイレンシング剤を、一端が組織、例えば、脳、例えば、脳の黒質、皮質、海馬、線条体または淡蒼球にインプラントされた、カニューレまたは他の送達デバイスの方法により送達できる。カニューレをRNAサイレンシング剤のリザーバーに接続できる。流れまたは送達は、ポンプ、例えば、Alzetポンプ(Durect, Cupertino, CA)のような浸透圧ポンプまたはミニポンプが介在し得る。ある態様において、ポンプおよびリザーバーを、組織から遠位の領域、例えば、腹部にインプラントし、送達をポンプまたはリザーバーから放出部位に至る導管により行う。脳への送達用デバイスは、例えば、米国特許6,093,180号および5,814,014号に記載される。

40

【0449】

本発明のRNAサイレンシング剤を、さらに血液脳関門を通過できるように修飾できる。例えば、RNAサイレンシング剤を、薬剤を関門通過させることができる分子にコンジュゲートできる。このような修飾RNAサイレンシング剤を、脳室内または筋肉内注射または、例えば肺送達のような任意の所望の方法により投与できる。

【0450】

50

ある態様において、エキソソームを、本発明のRNAサイレンシング剤の送達に使用する。エキソソームは、全身注射後BBBを通過し、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、化学療法剤およびタンパク質を、特異的にニューロン送達できる(Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011 Apr;29(4):341-5. doi: 10.1038/nbt.1807; El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C, Alvarez-Erviti L, Sargent IL, Wood MJ.(2011). Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc.* 2012 Dec;7(12):2112-26. doi: 10.1038/nprot.2012.131; EL Andaloussi S, Maeger I, Breakefield XO, Wood MJ. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 May;12(5):347-57. doi: 10.1038/nrd3978; El Andaloussi S, Lakhali S, Maeger I, Wood MJ. (2013). Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Mar;65(3):391-7. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.008参照)。

#### 【0451】

ある態様において、1以上の親油性分子を、本発明のRNAサイレンシング剤をBBBを通過して送達させるために使用する(Alvarez-Erviti (2011))。RNAサイレンシング剤は、その後、薬物をその活性形態で放出するために、親油性偽装の活性化、例えば、酵素分解により活性化される。

#### 【0452】

ある態様において、1以上の受容体介在透過性化合物を使用して、本発明のRNAサイレンシング剤の送達を可能にするためにBBBの透過性を増加できる。これらの薬物は、内皮細胞間の密接な接合を緩める、血液における浸透圧上昇により、BBBの透過性を一過性に増加させる((El-Andaloussi (2012))。密接な接合を緩めることにより、RNAサイレンシング剤の通常の静脈内注射が実施できる。

#### 【0453】

ある態様において、ナノ粒子ベースの送達系を使用して、BBBを通過して本発明のRNAサイレンシング剤を送達する。ここで使用する“ナノ粒子”は、一般に、薬物または遺伝子担体として集中的に探索されている、固体、生分解性、コロイド状態である重合ナノ粒子をいう(S. P. Egusquiaguirre, M. Igartua, R. M. Hernandez, and J. L. Pedraz, “Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research,” *Clinical and Translational Oncology*, vol. 14, no. 2, pp. 83-93, 2012)。重合ナノ粒子は2つの大きなカテゴリー、天然ポリマーおよび合成ポリマーに分類できる。siRNA送達用の天然のポリマーは、シクロデキストリン、キトサンおよびアテロコラーゲンを含むが、これらに限定されない(Y. Wang, Z. Li, Y. Han, L. H. Liang, and A. Ji, “Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA in vivo,” *Current Drug Metabolism*, vol. 11, no. 2, pp. 182-196, 2010)。合成ポリマーは、集中的に探索されているポリエチレンイミン(PEI)、ポリ(D,L-ラクチド-共グリコリド)(PLGA)およびデンドリマーを含むが、これらに限定されない(X. Yuan, S. Naguib, and Z. Wu, “Recent advances of siRNA delivery by nanoparticles,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 8, no. 4, pp. 521-536, 2011)。ナノ粒子および他の適当な送達系のレビューについて、Jong-Min Lee, Tae-Jong Yoon, and Young-Seok Cho, “Recent Developments in Nanoparticle-Based siRNA Delivery for Cancer Therapy,” *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 782041, 10 pages, 2013. doi:10.1155/2013/782041参照(その全体を引用によりここに包含させる)。

#### 【0454】

本発明のRNAサイレンシング剤を、網膜障害、例えば、網膜症処置のためなどに、眼に投与できる。例えば、医薬組成物を、眼の表面または近位組織、例えば、瞼に適用できる。それらは、局所的に、例えば、スプレー、点眼、洗眼剤または軟膏として適用できる。



軟膏または滴下可能液体を、アプリーケーターまたは点眼剤のような当分野で既知の眼送達系で送達し得る。このような組成物は、ムコミメチック、例えばヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはポリ(ビニルアルコール)、防腐剤、例えばソルビン酸、EDTAまたは塩化ベンジルクロニウムおよび通常量の希釈剤および/または担体を含み得る。医薬組成物はまた眼の内部に投与でき、選択領域または構造に導入できる針または他の送達デバイスにより導入できる。RNAサイレンシング剤含有組成物は、眼パッチによっても適用できる。

#### 【0455】

一般に、本発明のRNAサイレンシング剤を、あらゆる適当な方法により投与できる。ここで使用する局所送達は、RNAサイレンシング剤の眼、粘膜、体空洞表面またはいずれかの内部表面を含む、身体のいずれかの表面への直接適用を指し得る。局所投与用製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、液滴、スプレーおよび液体を含み得る。慣用の医薬担体、水性、粉末または油性基剤、濃厚剤などが必要であるか望ましいことがあり得る。局所投与はまたRNAサイレンシング剤を対象の表皮または真皮またはその特異的層または裏打ち組織に選択的送達する手段としても使用し得る。

10

#### 【0456】

髄腔内または脳室内(例えば、脳室内)投与用組成物は、緩衝液、希釈剤および他の適当な添加剤も含み得る無菌水溶液を含み得る。髄腔内または脳室内投与用組成物は、好ましくは、例えば、RNAサイレンシング剤に結合した親油性部分以外、トランスフェクション試薬またはさらなる親油性部分を含まない。

20

#### 【0457】

非経腸投与用製剤は、緩衝液、希釈剤および他の適当な添加剤も含み得る無菌水溶液を含み得る。脳室内注射は、例えば、リザーバーに結合した、脳室内カテーテルにより促進され得る。静脈内使用のために、溶質の総濃度は、製剤を等張とするように制御されなければならない。

#### 【0458】

本発明のRNAサイレンシング剤を、肺送達により対象に投与できる。肺送達組成物は、分散剤中の組成物が肺胞領域を通して直接血液循環に容易に吸収され得る場所である肺に到達するように、分散剤の吸入により送達できる。肺送達は、肺疾患処置のために全身送達および局所送達両方のために有効である。ある態様において、肺送達により投与されるRNAサイレンシング剤は、血液脳関門を通過できるように、修飾されている。

30

#### 【0459】

肺送達は、噴霧化、エアロゾル化、ミセルおよび乾燥粉末ベースの製剤の使用を含む、種々のアプローチにより達成できる。送達は、液体ネブライザー、エアロゾルベースの吸入器および乾燥粉末分散デバイスで達成できる。定量デバイスが好ましい。アトマイザーまたは吸入器を使用する一つの利点は、デバイスが自給式であるため、汚染の可能性が最小化されることである。乾燥粉末分散デバイスは、例えば、乾燥粉末として容易に製剤化され得る薬物を送達する。RNAサイレンシング剤組成物は、それ自体または適当な粉末担体と組み合わせて、凍結乾燥または噴霧乾燥粉末として安定に保存できる。吸入用組成物の送達は、タイマー、用量カウンター、回数測定デバイスまたは回数インディケーターを含み得る投薬回数要素が介在でき、これは、デバイスに取り込まれたとき、エアロゾル医薬の投与中の用量トラッキング、コンプライアンスモニタリングおよび/または投与誘発を可能とする。

40

#### 【0460】

担体として有用な医薬添加物のタイプは、安定化剤、例えばヒト血清アルブミン(HSA)、増量剤、例えば炭水化物、アミノ酸およびポリペプチド; pH調節剤または緩衝液; 塩、例えば塩化ナトリウムなどを含む。これらの担体は結晶形態でも非晶質形態でもよく、または2種の混合物であってもよい。

#### 【0461】

特に有益な増量剤は、適合性の炭水化物、ポリペプチド、アミノ酸またはこれらの組み合

50

わせを含む。適当な炭水化物は、単糖、例えばガラクトース、D - マンノース、ソルボースなど；二糖、例えばラクトース、トレハロースなど；シクロデキストリン、例えば2 - ヒドロキシプロピル - シクロデキストリン；および多糖、例えばラフィノース、マルトデキストリン、デキストランなど；アルジトール、例えばマンニトール、キシリトールなどを含む。炭水化物の好ましい群は、ラクトース、トレハロース、ラフィノースマルトデキストリンおよびマンニトールを含む。適当なポリペプチドは、アスパルテムを含む。アミノ酸はアラニンおよびグリシンを含み、グリシンが好ましい。

【0462】

適当なpH調節剤または緩衝液は、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムなどのような有機酸および塩基から製造された有機塩を含み、クエン酸ナトリウムが好ましい。

10

【0463】

本発明のRNAサイレンシング剤を、経口および経鼻送達により投与できる。例えば、これらの膜を通して投与した薬物は、効果開始が迅速であり、治療血漿レベルを提供し、肝臓代謝の初回通過効果を避け、薬物に有害な消化器(GI)環境への暴露を避ける。さらなる利益は、薬物を適用し、局在化し、容易に除去できるように、膜部位への容易な接近を含む。ある態様において、経口または経鼻送達により投与されるRNAサイレンシング剤は、血液脳関門を通過できるように、修飾されている。

【0464】

ある態様において、RNAサイレンシング剤を含む組成物の単位用量または計測用量を、インプラントデバイスにより分配する。デバイスは、対象内のパラメータをモニターするセンサーを含み得る。例えば、デバイスは、浸透圧ポンプのようなポンプ、および所望により、関連する電子機器を含み得る。

20

【0465】

RNAサイレンシング剤を、ウイルス天然カプシドにまたはそれ由来の化学的または酵素的に産生した人工カプシドまたは構造に含み得る。

【0466】

#### XI. キット

ある他の側面において、本発明は、RNAサイレンシング剤、例えば、二本鎖RNAサイレンシング剤またはsRNA剤の医薬製剤を含む適当な容器を含むキットを提供する(例えば、sRNA剤に処理され得る前駆体、例えば、大型RNAサイレンシング剤またはRNAサイレンシング剤、例えば、二本鎖RNAサイレンシング剤またはsRNA剤またはその前駆体をコードするDNA)。ある態様において、医薬製剤の個々の成分を一容器に提供し得る。あるいは、医薬製剤の成分を2以上の容器、例えば、RNAサイレンシング剤製剤用の一容器および担体化合物の少なくとも一つの他の容器に別々に提供するのが望ましいことがある。キットを、一つの箱における1以上の容器のような多くの配置で包装し得る。異なる成分を、例えば、キットに備わった指示書に従い組み合わせ得る。成分を、ここに記載する方法で組み合わせ、例えば、医薬組成物を製造し、投与できる。キットはまた送達デバイスも含み得る。

30

【0467】

ここに記載する方法の他の適当な修飾および適合が、ここに開示する態様の範囲から逸脱することなく、適当な等価物を使用して実施し得ることは当業者には容易に明らかである。ある態様がここで詳細に記載されているが、それは説明の目的のために包含させ、限定を意図しない、次の実施例を参照して、より明らかに理解される。

40

【実施例】

【0468】

実施例1. 非製剤化、安定化、疎水性siRNAでの一次ニューロンおよびマウス脳の両方におけるハンチンチンの減少

インピボで良好な有効性および分布ならびにインピトロで一次ニューロンにおけるノックダウンの両方を提供する可能性を有する疎水性に修飾されたASO-siRNAハイブリッドを探索した。ハンチンチン遺伝子をmRNAノックダウンの標的として使用した。ハ

50

ンチントン病は一遺伝子性であり(Mangiarini, L. et al. Exon 1 of the HTT gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506 (1996))、疾患病理に至る多数の細胞の機序を有し(Zuccato, C., Valenza, M. & Cattaneo, E. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiological Reviews* 90, 905-981 (2010))、将来的オリゴヌクレオチド治療の可能性の優れた候補となる。

#### 【0469】

一団の疎水性に修飾された siRNA ターゲティングハンチンチン遺伝子を開発した。効果および効力が、送達用製剤を行うことなく、単回低用量注射でインビトロで一次ニューロンおよびインビボでマウス脳の両方で観察された。これらの化合物は早期のモデル siRNA および hsiRNA、ならびに AS の両者に見られた多数の種々の化学的および構造的修飾を組み合わせる。安定化塩基修飾、コレステロールコンジュゲーションおよび完全ホスホロチオエート化一本鎖テイルを含むこれらの性質は、これらの hsiRNA を、多数の種々の生物学的に適切な系における使用に適合できる、標的困難一次細胞および臓器における遺伝子機能の研究の優れたツールとする。

10

#### 【0470】

1.1 hsiRNA - 疎水性に修飾された siRNA / アンチセンスハイブリッドは、一次ニューロンに効率的に内在化された

hsiRNA は非対称化合物であり、短二本鎖領域(15塩基対)および一本鎖完全ホスホロチオエート化テイルを有する。これらの化合物における全ピリミジンは 2' -フルオロおよび 2' -O -メチル修飾され(安定化する)、パッセンジャー鎖の 3' 末端は TEG -コレステロールにコンジュゲートされた(図 1A、図 8)13。コレステロールコンジュゲートは迅速な膜結合を可能とし、一方一本鎖ホスホロチオエート化テイルは、慣用のアンチセンスオリゴヌクレオチドにより使用されるものに類似する機序による細胞内部移行に必要であった。Cy3 標識 hsiRNA の一次皮質ニューロンへの添加は、即時の(数分以内)細胞結合をもたらした(図 1B)。興味深いことに、取り込みがまず優先的にデンドライトで観察され、続いて細胞体に再局在化した(図 9)。取り込みは、皿の全細胞で均一であり、効率的内部移行が確認された。

20

#### 【0471】

1.2 ハンチンチンをターゲティングする hsiRNA の同定

ハンチンチン mRNA をターゲティングする一団の 94 hsiRNA 化合物(図 8)を設計し、合成した。これらの配列は遺伝子にわたっており、GC 含量、特異性および低シード相補性(compliment)頻度の評価(Anderson, E. M. et al. Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA* 14, 853-861 (2008))、miRNA シード含有配列の除去および熱力学バイアスの試験(Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 115, 209-216 (2003); Schwarz, D. S. et al. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 115, 199-208 (2003))を含み、標準的 siRNA 設計パラメータに適合するように選択した(Birmingham, A. et al. A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nat Protoc* 2, 2068-2078 (2007))。50%を超える塩基が化学修飾され、インビボ安定性および免疫応答の最小化を提供した(Judge, A., Bola, G., Lee, A. & MacLachlan, I. Design of Noninflammatory Synthetic siRNA Mediating Potent Gene Silencing in Vivo. *Molecular Therapy* 13, 494-505 (2006))。修飾は、さらなる制限を配列空間に付し、ヒット率を低減した。ハンチンチン mRNA 発現への影響を、QUANTIGENE アッセイにより HeLa 細胞における 1.5 μM hsiRNA (受動的取り込み、製剤せず)暴露 72 時間後に測定し(図 2)、7%の配列が 70%を超えるサイレンシングを示した。機能的標的部位は、3' UTR の遠位部分を例外として遺伝子中に広がり、後に HeLa 細胞における短 htt アイソフォームの優先的発現により説明された(Li, S. H. et al. Huntington's

30

40

50

disease gene (IT15))。IC<sub>50</sub>値が、活性および異種間保存の一次スクリーンに基づき選択された16活性配列で同定された(図10)。IC<sub>50</sub>値は、受動的取り込みで90~766 nM(製剤せず)および脂質介在取り込みで4~91 pMの範囲であった(図8)。完全化学的最適化活性化化合物は容易に同定され、はるかに小さいライブラリーが他の遺伝子の将来的スクリーニングに十分であるが、hit率は標的毎に異なる可能性がある。10150位をターゲティングするhsiRNA(HTT10150(すなわち、5' CAGUAAAGAGAUAUA 3'(配列番号1)))をさらなる試験に使用した。hsiRNA化学的骨格がHTT10150の有効性および効力に負に影響しないことを確実にするために、修飾および非修飾型の化合物を受動的および脂質介在サイレンシングアッセイの両方で試験した(図3)。予想通り、修飾配列のみが受動的取り込みによる細胞送達およびHttサイレンシングに成功し(IC<sub>50</sub>=82.2 nM)、一方修飾および非修飾化合物両者は、脂質介在送達で類似IC<sub>50</sub>値を示し(それぞれ4 pMおよび13 pM)、hsiRNA骨格修飾がRNA誘発サイレンシング複合体(RISC)充填を妨害しないことを示唆した。

【0472】

1.3 一次ニューロンにおける非公式化hsiRNAでの強力および特異的遺伝子サイレンシング

HTT10150を、FVBマウスから単離した一次ニューロンにおけるmRNAサイレンシングについてさらに試験した。有効性を、皮質ニューロンに単純非製剤化合物添加72時間および1週間後見られ(図4A)、最大サイレンシング(70%)は1.25 μM濃度で見られた。HTT10150はまた一次線条体ニューロンで類似サイレンシングを示した(図4B)。タンパク質レベルを1週間後ウェスタンブロットで測定し(図14)、1.25 μMの化合物で処置後タンパク質が85%減少するmRNAデータを確認した(図4C)。ALAMARBLUEアッセイで測定したハウスキーピング遺伝子(PP1B、GAPDH)および全体的細胞生存能(図11Bおよび14)はこれらの濃度で影響されなかった。他の実験において、細胞生存能へのわずかな影響が3 μMで観察された。

【0473】

単一HTT10150処置での効果持続期間の評価のため、サイレンシングを、1週間、2週間および3週間間隔で測定した(図4D)。充填RISC複合体の半減期は数週間であり(Song, E. et al. Sustained Small Interfering RNA-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibition in Primary Macrophages. Journal of Virology 77, 7174-7181 (2003))、サイレンシングは、非分裂細胞で長く続くと予想された。実際、hsiRNAでの単回処置は、試験した全ての時点でHttサイレンシング誘発に十分であった。3週間は、最長であり、一次ニューロンは培養で維持できた。他の系を長期実験に使用できる。

【0474】

hsiRNAの神経細胞遺伝子サイレンシングのツールとしての一般的適用性を示し、この化学骨格が神経細胞送達に妥当であることを確認するために、いくつかの他のHTTをターゲティングするhsiRNAおよびハウスキーピング遺伝子PP1B(シクロフィリンB)をターゲティング一つでの類似実験を実施した(図11Aおよび13)。70%および90%の高いサイレンシングがHTTおよびPP1Bでそれぞれ観察された。

【0475】

要約すると、これらのデータは、疎水性に修飾されたsiRNAが一次ニューロンにおける遺伝子サイレンシングの単純かつ簡単なアプローチであり、複数遺伝子標的に適合できることを示す。

【0476】

1.4 単回注射によるマウス脳におけるインビボhsiRNA分布

RNAは、インビトロで種々のタイプのニューロンにより効率的に内在化される。選択hsiRNA、HTT10150を、さらにインビボで脳における遺伝子発現をサイレンシングする可能性について評価した。インビボ投与によるHTT10150の分布プロファイルを確認するために、12.5 μgのCy3標識hsiRNA(配列について図8参照)を

10

20

30

40

50

線条体内注射し、24時間後、脳を灌流し、切片化し、オリゴヌクレオチド分布を蛍光顕微鏡(ライカDM5500 - DFC365FX)で可視化した。同時に処理した人工CSF注入サンプルを、背景組織落射蛍光の対照のために設定した顕微鏡的造影設定のために使用した。

【0477】

化合物の大部分は、注射部位から離れる拡散の急勾配を示し、同側性線条体の大部分が被覆された(図5A、5B)。興味深いことに、hsirNAは脳(皮質および線条体の両方)の非注射部位(対側)側で検出されたが、相対的濃度ははるかに低いように見えた。高拡大率画像は、疎水性修飾の存在による可能性が高い、hsirNAとファイバートラックの有意な関係を示した。hsirNAのこの側面は、脳シグナル伝達構造可視化のための標識試薬として有用とし得る(図5C、5D)。ファイバートラックおよび神経突起標識に加えて、hsirNAは、注射わずか24時間後のNeuN(神経細胞マーカー)染色細胞(図5E)での共局在化により示されるとおり、ニューロンを含む種々の細胞型の核周囲空間における染色の細点として検出できた。

10

【0478】

hsirNA分布におけるビタミンDの効果を図79および80に示す。

【0479】

1.5 単回注射によるマウス脳におけるインピボでのhsirNA有効性

HTT10150有効性をインピボで決定するために、野生型FVBNマウスを、3~25 $\mu$ g(0.1~0.9mg/kg)の化合物の単回注射により線条体内投与し、mRNAサイレンシングを注射部位の同側性および対側性の両方で試験した。8動物を処置群あたり投与し、3の個々のパンチをmRNAおよびタンパク質定量化のために線条体の各側からとった。ハンチンチン発現レベルをQUANTIGENEアッセイで測定し、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した(オンライン方法に詳述)。

20

【0480】

統計解析を、GraphPad Prismを使用して、CSFまたはPBS対照に対して一元配置ANOVA比較で実施し、反復測定はボンフェローニ補正を用いた(詳細はオンライン方法)。サイレンシングを誘発した全群はCSF、PBSおよび非ターゲティング対照処置動物に対して有意であった。処置群あたり24の独立したパンチからの生データ(8動物、動物あたり3パンチ)は図15に見られる。投与部位(同側性側)で、統計的に有意に達する用量依存性サイレンシングが全濃度で見られた。25 $\mu$ g処置は77%サイレンシング( $p < 0.0001$ )を誘発し、12.5 $\mu$ g処置は、動物2群で異なる日に反復し、統計的に有意な66%および42%のサイレンシングを示した(図6)。

30

【0481】

初期分布試験は、注射部位から離れる拡散の急勾配と、対側性部位に移動する最小量の化合物をしめしたが、25 $\mu$ gおよび12.5 $\mu$ gの高用量での処置は、非注射部位に統計学的に有意なサイレンシング( $p < 0.0001$ )をもたらした。しかしながら、サイレンシングレベルは、脳の処置側より有意に低かった(25 $\mu$ g群でわずか36%)。

【0482】

要約すると、これらのデータは、hsirNAの単回線条体内注射が投与部位周囲の強力遺伝子サイレンシング誘発に十分であることを示す。この効果は種々の処置群および独立した実験で再現性があった。

40

【0483】

1.6 マウス脳における単回hsirNA注射後の神経細胞生存能

非修飾、ネイキッドsirNAのコレステロール修飾が、sirNA脳分布改善のために先に使用されており、高用量での毒性は可能性限界と同定された。脳に対する非特異的学関連効果の程度を評価するために、線条体における中型有棘ニューロンのドーパミン受容体発現の確立されたマーカーであり、神経細胞生存能を表すDARPP32発現を試験した。さらに、免疫応答を誘発する可能性を、hsirNA注射によるミクログリア活性化の評価により実施した。

【0484】

50

DARPP32発現に対する顕著な影響は12.5 µgまでの用量で観察されず、永続性神経細胞生存能が示された(図7A、7B、16)。同様に、修飾hsiRNA存在下の限定的な免疫応答の指標である最小ミクログリア活性化が12.5 µg用量で可視化された(図7C、7D)。25 µg用量は、毒性の指標である注射部位周囲のみのDARPP32のいくぶんかの減少を誘発し、示した投与経路によるこの化学的骨格の最大用量レベルを確立した。hsiRNAの10~12.5 µg単回投与は、3つの、十分に力のある、独立した試験でHTT mRNAを効率的にサイレンシングし、毒性なしで62%、42%および52%の確実なサイレンシングを示した。これらのデータは、このテクノロジーが他の神経学的に有意な標的の機能的試験に広範に使用できることを示す。

【0485】

10

#### 1.7 ニューロンにおけるさらなる特徴付け

持続性サイレンシングが、21日間末期分化ニューロンで達成された(図24)。サイレンシングプラトーがRNAi(細胞質)で観察されたが、RNaseH(主に核)化合物で観察されなかった(図25)。観察されたプラトーは、htt遺伝子に特異的であった。htt mRNAの約60%が核に局在化した(図26)。

【0486】

プローブセットをニューロンで検証した(図27)。検出シグナルの大部分はhtt mRNAに特異的であった。黄色(共局在化染色)領域の高フラクションが観察された。科学的理論に縛られることを意図しないが、高程度の赤色シグナルは、2プローブセットの一樣でない濃度と関連し得る。

20

【0487】

さらなるプローブセットを、ニューロンにおいてイントロン60~61について検証した(図28)。イントロン特異的プローブは、転写部位に特異的に核において1~2黄色ドットを示した。エキソン特異的プローブは高い程度の重複を示した。

【0488】

Htt mRNA核局在化はニューロンに特異的であり、線維芽細胞にはなかった(図29)。皮質ニューロンのHsiRNAHTT処置は、細胞質htt mRNAを優先的に排除した(図30および31)。

【0489】

完全に近いHTTタンパク質サイレンシングが一次皮質ニューロンで観察された(図32)。

30

【0490】

HTT10150の直接注射は、神経細胞数に検出可能な変化をもたらさなかった(図33)。コレステロール-hsiRNAは、注射部位に隣接した毒性の小領域を示した(図34)。

【0491】

図58~60は、野生型およびQ140一次海馬ニューロンにおけるhsiRNA有効性を示す。

【0492】

#### 1.8 考察

本研究は、一次細胞への送達のための疎水性に修飾されたsiRNAの使用が、神経細胞経路および神経障害の機能試験およびゲノム試験を可能にするための価値あるツールであることを示す。

40

【0493】

毒性製剤を用いずに一次ニューロンにおいて遺伝子サイレンシングを起こす能力は、神経科学研究において相当な影響を与え、一次細胞株の状況における神経障害のより深い研究を促進し、最終的にインビボ機能および病理のより有意な理解を提供する。大部分の神経細胞試験は、送達および細胞維持の容易さのために安定な細胞株で行われているが、人工細胞系使用は、一次細胞使用により避けられる問題であるこれらの細胞株の操作に起因し得るデータのアーチファクトをもたらし得る(Cheung, Y.-T. et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neuroto

50

xicity research. *NeuroToxicology* 30, 127-135 (2009); Gilany, K. et al. The proteome of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: An enlarged proteome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1784, 983-985 (2008); Lopes, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research* 1337, 85-94 (2010); Zhang, W. et al. Cyclohexane 1,3-diones and their inhibition of mutant SOD1-dependent protein aggregation and toxicity in PC12 cells. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY* 1-17 (2011). doi:10.1016/j.bmc.2011.11.039)。一次ニューロンに siRNA を送達する現在の方法は、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)またはリポフェクタミンTM 介在トランスフェクションの使用を含む(Karra, D. & Dahm, R. *Transfection Techniques for Neuronal Cells*. *Journal of Neuroscience* 30, 6171-6177 (2010))。siRNA 自体にコレステロールのような疎水性部分を直接コンジュゲートし、取り込み促進のためにさらなる一本鎖ホスホロチオエート化テイルを用いることにより、ここで、siRNA が最小毒性で効率的に一次ニューロンにインビトロで送達できるだけでなく、なお mRNA の強力なサイレンサーのままであることが示された。

#### 【0494】

科学的理論に縛られることを意図しないが、アンチセンステクノロジーを超える RNAi の大きな利点の一つは、充填 RISC が非分裂細胞で長時間活性なままであることが予測されることである(Bartlett, D. W. *Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging*. *Nucleic Acids Research* 34, 322-333 (2006))。さらに、限定的な数の充填 RISC が、RNAi 介在サイレンシングの誘発に十分である(Stalder, L. et al. *The rough endoplasmic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing*. *The EMBO Journal* 32, 1115-1127 (2013))。ここに示すデータは、インビトロで hsiRNA の単回処置により一次皮質ニューロンの3週間までのサイレンシングを示し、RNAi 介在サイレンシングが効率がよく、かつ持続的であるとの見解を支持する。ここに示すデータはまたこれらの化合物が、異なる遺伝子の複数領域を標的とできることを示し、これは、代替的神経経路および疾患の研究のための hsiRNA の適応性を示す。

#### 【0495】

hsiRNA の単回線条体内注射が、インビボで注射部位近辺で強力な遺伝子サイレンシングをもたらすが、効果は脳全体に均一に拡散しなかった。限定的であるが、脳の他の領域への拡散(インビボ有効性試験により照明)は、多くの機序を介して起こり得た。これらは CSF における移動、分布試験における Cy3 標識 hsiRNA の大きな可視密度を有することが示された神経索を経る拡散またはおそらく逆行輸送の可能性を含むが(tewart, G. R. & Sah, D. *Retrograde Transport of siRNA and Therapeutic Uses to Treat Neurological Disorders*. United States Patent Application Publication US 2008/0039415 A1, 1-18 (2008))、正確な機序の決定にさらなる試験を実施する。

#### 【0496】

ここに示すテクノロジーは、特定の脳領域の機能的ゲノムの理解、ならびに複数脳領域間の関係の解明に有用である。さらに、ある神経障害の研究(例えば記憶障害(Samuelson, K. W. *Post-traumatic stress disorder and declarative memory functioning: a review*. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 13, 346-351 (2011)))は、限定的かつ領域的標的分布およびサイレンシングから利益を受け得る。しかしながら、その分布プロファイルにより、現在存在している hsiRNA は、ハンチントン病のような一般的神経障害に実行可能な治療ではない。複数注射は小齧歯類で全体的サイレンシングの増加に作用するが、このテクノロジーを大型動物脳およびヒトでの使用に適合させ、均一かつ広範な分布を達成するために、他の化学的修飾および送達の治療方法が利用されるであろう。これに接近するであろう多数の方法がある。まず、hsiRNA 組成物自体への化学的調節をなし得る。これらは、種々の脂質へのコンジュゲート、主鎖のさらなるホスホロチオ

10

20

30

40

50

エート基での補助または疎水性部分のヌクレオチド自体への添加を含む(Vaught, J. D., D ewey, T. & Eaton, B. E. T7 RNA Polymerase Transcription with 5-Position Modified UTP Derivatives. J. Am. Chem. Soc. 126, 11231-11237 (2004)). これらの修飾の全ては、より遠い距離を経るより改善された分布を可能にする一定範囲の疎水性によって支持される。バイオアベイラビリティの増大もまた線条体内ではなく、脳全体の暴露の可能性を高めるCSFへのような種々の態様による注射により達成される。しかしながら、CSFを経る送達は、線条体以外の脳領域へのhsRNAの局在化を支持し、ハンチントン病処置のためのより理想的送達方法とはならない。他の可能性は、これらの疎水性に修飾されたsiRNAをエキソソームおよびリポソームに包含させることによる製剤化送達であり(現在のリポフェクタミン<sup>TM</sup>製剤より低毒性)、これらの天然および合成ナノ担体のより均一に分散された形式での積荷の送達に使用することである(Alvarez-Erviti, L. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nat Biotechnol 1-7 (2011). doi:10.1038/nbt.1807; Marcus, M. & Leonard, J. FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver. Pharmaceuticals 6, 659-680 (2013)). しかしながら、送達hsRNAの効力および効果は、これらの方法について検証する必要がある。

10

## 【0497】

結論として、HTT10150はインビトロで一次ニューロンおよびインビボでマウス脳への局所的なハンチンチンmRNAのターゲティングに効率的であった。この化合物は一次細胞への送達のためになんら製剤を必要とせず、ハンチンチンならびに他の標的のための遺伝子機能的試験を可能とし、神経障害研究のために極めて有用なツールとなった。このテクノロジーの潜在的利点は、将来的にハンチントン病ならびに他の神経疾患のための治療処置としてhsRNAが機能することを可能とするはずである。

20

## 【0498】

## 1.9 方法

## 細胞培養

HeLa細胞を、10%胎児ウシ血清(Gibco)および100U/mLペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen)添加DMEM(Corning Cellgro)に播種し、37 °Cおよび5%CO<sub>2</sub>で増殖させた。細胞は15継代まで2~5日に分け、その後廃棄した。

## 【0499】

## 受動的取り込みのための細胞培養

細胞を、96ウェル組織培養処置プレートにおいて6%FBS添加DMEM中、10,000細胞/ウェルで播種した。hsRNAをOptiMEM(Gibco)で2×最終濃度まで希釈し、50μL希釈hsRNAを50μLの細胞に3%FBS最終まで添加した。細胞を、72時間、37 °Cおよび5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。

30

## 【0500】

## 脂質介在取り込みのための細胞培養

細胞を、96ウェル組織培養処置プレートにおいて、6%FBS添加DMEM中10,000細胞/ウェルで播種した。hsRNAを、OptiMEMで4×最終濃度に希釈した。LIPOFECTAMINE RNAiMAX Transfection Reagent(Invitrogen #13778150)を4×最終濃度に希釈した(最終=0.3μL/25μL/ウェル)。RNAiMAXおよびhsRNAを1:1で混合し、50μLを、50μLの細胞に3%FBS最終について添加した。細胞を、72時間、37 °Cおよび5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。

40

## 【0501】

## 一次ニューロンの製造

一次皮質ニューロンをWT(FVBN)マウスのE15.5マウス胚から得た。妊娠雌をアパチン(250mg/体重kg)IP注射で麻酔し、次いで頸椎脱臼させた。胚を除き、氷冷DMEM/F12媒体(Invitrogen)含有ペトリ皿に移した。脳を除き、髄膜を注意深く離した。皮質を単離し、予め温めたパパイン溶液含有1.5mlチューブに25分、37 °Cおよび5%CO<sub>2</sub>で移し、組織を溶解した。パパイン溶液を次のとおり調製した:パパイン(Worth

50



ington #54N15251)を2 mL HibernateE(Brainbits)および1 mL E B S S (Worthington)に溶解した。別に、DNase (Worthington #54M15168)を0.5 mL HibernateEに再懸濁した。次いで、0.25 mLの再懸濁DNaseを再懸濁パラインに最終溶液のために移した。25分インキュベーション後、パライン溶液を除き、2.5% FBS添加1 mL NbActiv4(Brainbits)を組織に添加した。次いで皮質を、熱加工、ガラスパスツールピペットを上下することにより解離させた。皮質ニューロンを計数し、 $1 \times 10^6$ 細胞/mlでプレATINGした。生存細胞造影試験のために、培養プレートをポリ-L-リシン(Sigma #P4707)でプレコートし、 $2 \times 10^5$ 細胞を、各皿のガラス中心に添加した。サイレンシングアッセイのために、ニューロンを、ポリ-L-リシンプレコート96ウェルプレート(BD BIOCOAT #356515)に $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルで播種した。一夜、37 °Cおよび5% CO<sub>2</sub>でインキュベーション後、非神経細胞の増殖を阻止するための有糸分裂阻害剤、0.484 μL/mLの5' UTP(Sigma #U6625)および0.2402 μL/mLの5-FdU(Sigma #F3503)添加等体積のNbActiv4(Brainbits)を神経細胞培養に添加した。培地の体積の半分を、ニューロンをsiRNAで処置するまで48時間毎に変えた(有糸分裂阻害剤含有新NbActiv4)。細胞が処置されたら、培地を除かず、添加だけした。全てのこの後の培地添加は有糸分裂阻害剤を含んだ。

#### 【0502】

##### mRNA定量化

mRNAをQUANTIGENE 2.0アッセイ(Affymetrix #QS0011)を使用して定量化した。細胞を250 μL希釈溶解混合物(Affymetrix #13228)、1部溶解混合物、2部H<sub>2</sub>Oと、0.167 μg/μLプロテイナーゼK(Affymetrix #QS0103)で30分、55 °Cで溶解した。細胞ライセートを徹底的に混合し、40 μL(約8000細胞)のライセートを、プロテイナーゼKなしの40 μLのさらなる希釈溶解混合物と共に捕捉プレートに添加した。プローブセットをAffymetrixプロトコールに特定のとおりに希釈した。HeLa細胞について、20 μLのヒトHTTまたはPPIBプローブセット(Affymetrix #SA-50339, #SA-10003)を100 μL最終体積まで適切なウェルに添加した。一次ニューロンについて、20 μLのマウスHTTまたはPPIBプローブセット(Affymetrix #SB-14150, #SB-10002)を使用した。

#### 【0503】

組織を、5 mg組織パンチについて2 μg/μLプロテイナーゼKを添加した300 μLの均質化緩衝液(Affymetrix #10642)で同様に処置した。次いで組織を96ウェルプレート形式で、QIAGEN TissueLyser IIで均質化し、40 μLを捕捉プレートに添加した。プローブセットをAffymetrixプロトコールに特定するように希釈し、60 μLのHTTまたはPPIBプローブセット(Affymetrix #SB-14150, #SB-10002)を、100 μL最終体積まで捕捉プレートの各ウェルに添加した。DARPP32定量化について、10 μLの組織サンプルおよび30 μLの均質化緩衝液のみを、60 μLのマウスPpp1r1bプローブセット(Affymetrix #SB-21622)と共に各ウェルに添加した。シグナルをAffymetrixプロトコールに従い増幅させた。発光をVeritas LuminometeまたはTecan M 1000で検出した。

#### 【0504】

##### 生存細胞染色

生存細胞hsiRNA取り込みをモニターするために、一次ニューロンの製造について上記のとおりに細胞を35 mmガラス底皿あたり $2 \times 10^5$ 細胞で播種した。造影前に、細胞核を、製造業者により示されるとおり、NUCBLUE(Life Technologies #R37605によるMolecular Probes)を使用して無フェノールレッドNbActiv4で染色した。造影を無フェノールレッドNbActiv4で実施した。細胞を0.5 μMのCy3標識hsiRNAで処置し、生存細胞造影を経時的に実施した。全生存細胞共焦点画像をツァイス共焦点顕微鏡で獲得し、画像をImageJ(1.47v)ソフトウェアを使用して処理した。

#### 【0505】

##### 免疫組織化学 / 免疫蛍光

10

20

30

40

50

分布試験について、脳に1nmol(12.5µg)のCy3標識hsirNAを注射した。24時間後、マウスを殺し、脳を取り出し、DERC Morphology Core at UMASS Medical Schoolに送り、パラフィンに包埋させ、4µm切片にスライスし、ガラススライドにマウントした。切片をキシレン中で2回8分脱パラフィン化した。次いで切片を連続エタノール希釈(100%、95%、80%)で各4分再水和し、次いで2回、2分、PBSで洗浄した。NueN染色について、スライドを、5分、抗原回収緩衝液で沸騰させ、次いで室温で20分静置し、続いてPBSで5分洗浄した。次いでスライドを5%正常ヤギ血清でPBS+0.05%Tween20で1時間遮断し、PBS+0.05%Tween20で1回、5分洗浄した。一次抗体(PBS+0.05%Tween20中1:1000希釈)をスライドに1時間インキュベーションのために添加し、続いて3回PBS+0.05%Tween20で5分洗浄した。二次抗体(PBS+0.05%Tween20中1:1000希釈)をスライドに暗所での30分インキュベーションのために添加し、続いて3回PBS+0.05%Tween20で5分洗浄した。次いで、スライドをDAPI(Life Technologies #D3571のMolecular Probes)で染色し、250ng/mLにPBSで1分希釈し、続いて3回、PBSで1分洗浄した。マウンティング媒体およびカバーガラスをスライドに適用し、一夜乾燥させて、記載する拡大率でライカDM5500-DFC365FX顕微鏡で造影した。

10

【0506】

毒性およびミクログリア活性化試験のために、抽出、灌流脳を氷冷PBS中、ライカ2000T Vibratomeで40µm切片にスライスした。免疫組織化学を、DARPP32(Millipore、1:10,000希釈)およびIBA-1(Millipore、1:500希釈)に対して6切片毎に実施した。切片をマウントし、光学顕微鏡で可視化した。4画像を線条体の各切片の注射および非注射部位の両方で20倍で撮った。DARPP32陽性ニューロン数をImageJを使用して定量化した。活性化ミクログリアをIBA-1に対する染色細胞の形態により定量化した。

20

【0507】

動物、定位注射

野生型(FVBN)マウスは、定位的配置で右線条体(協調(ブレグマに相対的)は1.0mm前側、2.0mm側面および3.0mm腹側)のマイクロ注射を受けた。動物を、1.2%アパチンで注射前に深く麻酔した。毒性(DARPP32)および有効性の両方の試験について、マウスはPBSまたは人工脳脊髄液(2µL/線条体、N=8マウス)、12.5µgのNTChsirNA(2µLの500µM原液/線条体、N=8マウス)、25µgのHTT10150hsirNA(2µLの1mM原液/線条体、N=8マウス)、12.5µgのHTT10150hsirNA(2µLの500µM原液/線条体、計N=16マウス、2回の異なる日に8マウスの2セット)、6.3µgのHTT10150hsirNA(2µLの250µM原液/線条体、N=8マウス)または3.1µgのHTT10150hsirNA(2µLの125µM原液/線条体、N=8マウス)を注射され、5日後殺された。脳を取り出し、3個の300µm冠状切片を製造した。1個の2mmパンチを各切片の側あたり(注射および非注射)取得し、RNAlater(Ambion #AM7020)で24時間、4に置いた。各パンチを、QUANTIGENEアッセイ解析のための独立したサンプルとして処理した。全動物手順は、the University of Massachusetts Medical School Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC, protocol number A-2411)により承認された。

30

40

【0508】

統計解析

データ分析を、GraphPad Prism 6 version 6.04ソフトウェア(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)を使用して実施した。濃度依存的曲線IC50について、曲線をlog(阻害剤)対応答-可変傾斜(4パラメータ)を使用して適合させた。曲線の底を0以上に設定し、曲線上部を100以下に設定した。各独立したマウス実験について、全データが対照の比率として表されるように、各用量でのロックダウンレベルをPBSまたは人工CSF群の非注射部位である対照群の平均に対して正規化した。インビボデータを複数比

50

較についてボンフェローニ補正を伴うクラスカル・ワリス検定(一元配置ANOVA)を使用して分析した。全比較における差異は、0.05未満のP値で有意とみなした。

#### 【0509】

受動的取り込み(一次スクリーニングおよび用量応答)のための細胞培養

細胞を、96ウェル組織培養処置プレートで6%FBS(Gibco)添加DMEM(Gibco)中、10,000細胞/ウェルで播種した。HsiRNAをOptiMEM(Gibco)で2×最終濃度に希釈し、50μL希釈hsiRNAを、50μLの細胞に3%FBS最終について添加した。細胞を、72時間、37°Cおよび5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。

#### 【0510】

脂質介在取り込みのための細胞培養

細胞を、96ウェル組織培養処置プレートで6%FBS(Gibco)含有DMEM(Gibco)中、10,000細胞/ウェルで播種した。HsiRNAを、OptiMEM(Gibco)で4×最終濃度に希釈した。LIPOFECTAMINE RNAiMAX Transfection Reagent(Invitrogen CAT#13778150)を4×最終濃度に希釈した(最終=0.3μL/25μL/ウェル)。RNAiMAXおよびhsiRNAを1:1で混合し、50μLを50μLの細胞に3%FBS最終のために添加した。細胞を72時間、37°Cおよび5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。

#### 【0511】

mRNA定量化

mRNAを、QUANTIGENE 2.0アッセイ(Affymetrix QS0011)を使用して定量化した。細胞を250μL希釈溶解混合物、1部溶解混合物、2部H<sub>2</sub>Oと、0.167μg/μLプロテイナーゼK(Affymetrix QS0103)で30分、55°Cで溶解した。細胞ライセートを徹底的に混合し、40μL(~8000細胞)のライセートをプロテイナーゼKを含まない40μLのさらなる希釈溶解混合物と共に捕捉プレートに添加した。組織を、5mg組織パンチについて、2μg/μLプロテイナーゼK含有300μLの均質化緩衝液(Affymetrix)を使用して同様に処置した。次いで組織を、96ウェルプレート形式でQiagen TissueLyzerで均質化し、40μLを捕捉プレートに添加した。プローブセットをAffymetrixプロトコールに特定されるように希釈し、20μLのHTTまたはPPIBプローブ(Affymetrix: SA-50339, SA-10003)を捕捉プレートの各ウェルに最終体積100μLまで添加した。シグナルを製造プロトコールに従い増幅させた。発光をVeritas LuminometeまたはTecan M 1000で検出した。

#### 【0512】

生存細胞染色および脳切片免疫染色

生存細胞取り込みモニタリングについて、細胞を35mmガラス底皿あたり2×10<sup>5</sup>細胞密度で播種し、一夜増殖させた。造影前に、細胞小器官を、特記しない限り、Life Technologiesから購入した染色試薬を使用してHBSS(Gibco)において染色した:細胞核、小胞体およびリソソームを、製造業者の指示どおり、NUCBLUE LIVE READYPROBE、ER-TRACKER Green(Bodipy FL Glibenclamide)およびLYSOTRACKER Deep Red試薬を使用して、各々染色した。造影を、フェノールレッドなしの非補足DMEMで実施した(Invitrogen)。細胞を0.5μMのCy3標識hsiRNAで処置し、生存細胞造影を経時的に実施した。

#### 【0513】

共焦点造影

全共焦点画像を、60x Plan/APOオイルレンズおよびCoolSnap HQ2カメラ(Roper)を備えたTE-200E2倒立顕微鏡(Nikon)にマウントしたCSU10B Spinning Disk Confocal System scan head(Solamere Technology Group)で獲得した。画像をImageJ(1.47v)ソフトウェアを使用して処理した。hsiRNAを伴わないまたは伴うニューロン数をImageJソフトウェアを使用して計数した。脳切片画像を、1μmのz軸スキャンで獲得した。

#### 【0514】

実施例2. hsiRNA保持および分布は疎水性と直接関連する

10

20

30

40

50

FM-hsiRNAは、部分的安定化hsiRNAより10倍低用量で脳および脊髄における改善された保持および蓄積ならびに最大サイレンシングを示すが、それらは注射部位近辺に大部分保持された(図102; Chol-hsiRNA)。hsiRNAの限定的な分布が、コレステロールコンジュゲートの強い疎水性によるものであり、hsiRNAの脂質に富むミエリンおよび有髄構造への優先的結合に起因し、そしてhsiRNAコンジュゲートの疎水性の微調整が脊髄および脳にわたる分布を改善するとの仮説を立てた。この考えを試験するために、活性神経細胞輸送ができる一団の天然に存在する疎水性分子をスクリーニングし、(i)向神経活性ステロイド、すなわち、GABA(Lan NC, Gee KW. Neuroactive steroid actions at the GABAA receptor. *Hormones and behavior*. 1994; 28:537-44. PMID: 7729823)を含む、血液脳関門を通過でき、多様な開口型イオンチャネルおよび神経細胞発現受容体に結合する(Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*. 2003; 28:139-68. PMID: 12510009)内在性ステロイド;(ii)神経細胞可塑性および修復に重要なガングリオシド神経保護糖脂質(Aureli M, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A, Toffano G, Secchieri C, Sonnino S. GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential. *Molecular neurobiology*. 2015. PMID: 25762012);および(iii)食欲、疼痛、気分および記憶に關与する受容体により認識されるエンドカンナビノイド様長鎖多不飽和脂肪酸神経調節性脂質((Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in aging neuroscience*. 2015; 7:52. PMID: 25954194; PMCID: PMC4404917; Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Progress in lipid research*. 2014; 53:1-17. PMID: 24334113; Figueroa JD, De Leon M. Neurorestorative targets of dietary long-chain omega-3 fatty acids in neurological injury. *Molecular neurobiology*. 2014; 50:197-213. PMID: 24740740; PMCID: PMC4183712)を含めた。

#### 【0515】

オリゴヌクレオチドコンジュゲート合成のための最も確実なアプローチは、活性化コンジュゲートのアミノ修飾支持体への結合である。リンカーの構造および長さは多様であり(例えば、分枝)、支持体は実行できるならば必ず官能化された。図93および94に概説する合成アプローチの変法を使用して、コルチゾール、ドコサヘキサエン酸(DHA)、カルシフェロール、コレステロールおよびGM1ガングリオシドにコンジュゲートしたhsiRNAを合成した(図98および99)。全ての化合物はHPLC精製し、その同一性をマスマスペクトロメトリーにより確認した。カルシフェロール官能化支持体は不安定であり、インピボで試験した数バリエーションの混合物をもたらした(下記)。

#### 【0516】

予想通り、化合物は、逆相クロマトグラフィーでの保持時間に基づき、種々の程度の疎水性を示した。野生型マウスの線条体またはICVへのCy3標識hsiRNAコンジュゲートの注射(図92)は、疎水性と強く相関する、種々の程度のhsiRNA分布および保持を示した。コンジュゲートしていないまたはリンカーのみのhsiRNAは、脳において最小保持を示し(アンチセンスオリゴヌクレオチドに類似)、最も疎水性化合物、コレステロールおよびGM1は、主に注射部位近辺に保持された。最適保持/分布が中間物疎水性プロファイルを有するDHAおよびカルシフェロールコンジュゲート(下記)で達成された。DHA-hsiRNAを詳細に試験し、大きな有効性および前例のない安全性を示した(治療指数>20倍)(Nikan et al., 2016; *Molecular Therapy*, in revision, Appendix参照)。要約すると、ここに示すデータは、コンジュゲートの疎水性の微調整が、脳組織における最適保持、分布および安全性を支持するコンジュゲートを同定する価値ある戦略であることを示す。

#### 【0517】

GM1-hsiRNAは一次皮質ニューロンにおいて効率的に内在化し、ハンチンチンmRNAサイレンシングを誘発した(図108)。GM1-hsiRNAは、線条体内注射によるマウス脳における限定的な分布を示した(図109)。

【0518】

実施例3. DHA-hsiRNA

部分的に修飾されたhsiRNAは短効果持続時間を示し、全身曝露を示さなかった(図35A~C)。代謝安定化をさらに探索した(図36)。完全代謝安定化は、hsiRNAのRISCエントリを妨害しなかった(図37)。完全代謝安定化hsiRNA(FM-hsiRNA)は局所送達および分布を増大し、長時間の効果持続を可能とした(図38、39A~B、91、110および111;用語“ヌクレオシド”)。

10

【0519】

天然に存在する脂質(すなわち、スフィンゴ糖脂質、多不飽和脂肪酸、セコステロイド、ステロイドホルモンおよびステロール脂質)をhsiRNAバイオコンジュゲートとして試験した(図40)。脂質バイオコンジュゲートは、hsiRNAHTTセンス鎖疎水性に顕著な効果を有した。

【0520】

研究を、hsiRNAコンジュゲートのインビボ分布探索のために設計した。FVBNWTマウスのaCSF中のP2安定化siRNA-CY3コンジュゲートでの線条体内片側注射(2nmol/2μl)を実施した。注射48時間後、動物をPBSおよび10%ホルマリンで灌流した。それらの脳を取り出し、48時間後固定した。4μm冠状および矢状切片を調製し、DAPIで染色した。造影をライカDM5500蛍光顕微鏡(CY3およびDAPI)で実施した。hsiRNA疎水性が脳分布および保持と直接関連することが確認された(図41)。重要な性質は分布と保持のバランスであった。

20

【0521】

ドコサヘキサエン酸(DHA)-hsiRNAを合成した(図42)。DHAは、ヒト脳の主要成分(70%)であるオメガ-3脂肪酸である。DHAは血液脳関門(BBB)を通過し、ニューロンおよび他の細胞型により能動的に内在化される。これは、HDおよびALS患者における認知機能改善が臨床的に示された非毒性サプリメントである。DHAは、コレステロールよりはるかに低い疎水性である。

【0522】

DHA-hsiRNAおよびchol-hsiRNAは一次皮質ニューロンに内在化されることが示された(図43)。DHA-hsiRNAはニューロンおよび星状膠細胞で共局所し(図44)、線条体ニューロンの核周囲領域に局在化した(chol-hsiRNAは線条体ニューロンで検出不可能であった)(図45)。DHA-hsiRNAは単回線条体内注射後皮質におけるニューロンおよび星状膠細胞に共局在化した(図46)。DHA-hsiRNAは、皮質ニューロンにおける核周囲領域に局在化した。chol-hsiRNAは検出不可能であった(図47)。DHA-hsiRNAは、効率的に脳内に分散し、線条体および皮質の両方で遺伝子をサイレンシングした(図57)。

30

【0523】

DHA-hsiRNAは、線条体および皮質で確固たる有効性を示した(図48および49)。200μgまでのDHA-hsiRNAはDARPP-32レベルに影響せず、化合物安全性を示した(図50)。対照的に、25μg(1mg/kg)がchol-hsiRNAの最大耐性線条体内用量であった。200μgまでのDHA-hsiRNAは活性化ミクログリアを顕著に増加させず、最小免疫刺激を示した(図51)。

40

【0524】

hsiRNAは、インビボで脳における一次ニューロン単純かつ効率的な遺伝子サイレンシングを可能にする。オリゴヌクレオチド疎水性が脳組織保持および分布を規定する。オリゴヌクレオチド化学は細胞送達および分布に影響することが示された(図52~56)。DHA-hsiRNAコンジュゲートは、広いインビボ有効性および広い治療指数を備えた新規オリゴヌクレオチド群を表す。

50

## 【0525】

実施例4. PC-DHA-hsiRNA(PC-DHA-hsiRNA)

DHA-hsiRNAの広い治療指数に鼓舞され、DHAおよび関連コンジュゲートをより詳細に調べた。循環DHAは大部分リソホスファチジルコリンエステルとして存在し、これは、特異的輸送体Mfsd2aにより血液脳関門を通して能動的に輸送される唯一の形態である(Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL, Silver DL. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. Nature. 2014; 509:503-6. PMID: 24828044)。

## 【0526】

DHAのリソホスファチジルコリンエステルは不安定であり、従って、DHAのリソホスファチジルコリン(PC)アミドを合成した(図93、94、100および101)。PC-DHAは、固相オリゴヌクレオチド合成に適合性の代謝的に安定なアナログである。その同一性をNMRおよびマスマスペクトロメトリーで確認した。リソホスファチジルコリンがDHA-hsiRNAの輸送を改善するはずであるとの考えを試験するために、PC-DHA-hsiRNAが、DHA-hsiRNAよりも脳組織において広い分布および有効性増加を示すことが確認された(図92および103)。重要なことに、一群として、DHAコンジュゲートは、最小有効用量より20倍高い濃度で、明白な天然免疫活性化または神経細胞変性なく、広い治療指数を示した(図92)。対照的に、Chol-hsiRNAは、25 µg注射で顕著な毒性を示した(図92C)。最後に、ポーラスCSF(ICV)注入は、脳における広い分布を支持し、線条体、皮質を多い、脳のより後側および腹側の領域にまで達した(図92)。その例外的特徴により、PC-DHA-hsiRNAを、試験すべきリード化合物として選択した。

## 【0527】

PC-DHAは、DHAの代謝活性アナログである(図62)。PC-DHA-hsiRNAは、DHA-hsiRNAに比して、インビトロで神経細胞サイレンシング増強、脳分布増強およびインビボ効力増強を示す(毒性の徴候なく)。

## 【0528】

PC-DHA-hsiRNAおよびchol-hsiRNAは、各々変異体および野生型h1tt mRNA両方の効率的サイレンシングを示した(図61)。Chol-hsiRNAは毒性を示した(6匹中3匹の動物死亡)。生存動物は極めて低い(背景に対して3倍)h1tt発現を示した。

## 【0529】

PC-DHA-hsiRNAは、一次ニューロンに送達されたとき、DHA-hsiRNAに比して富化された効力を示した(図63)。chol-hsiRNAが一次ニューロンにおけるh1tt遺伝子発現減少により有効であったが(図64)、PC-DHA-hsiRNAは優れた脳保持および広い分布を示した(図65)。

## 【0530】

PC-DHA-hsiRNAは、単回間質(IS)注射後マウス線条体における約80%サイレンシングを示し(図66)、単回IS注射後マウス皮質における約60%サイレンシングを示した(図67)。毒性の徴候はなかった。サイレンシングは、脳の注射部位に限定的であった。

## 【0531】

腎臓は、PC-DHA-hsiRNAの主標的である(図107)。PC-DHA-hsiRNAは近位曲尿細管に蓄積した。

## 【0532】

実施例5. ジ-hsiRNAの発見

分枝オリゴヌクレオチドは、新規オリゴヌクレオチド治療剤群を代表する。2~8オリゴヌクレオチドを、疎水性リンカーを介して一体として結合させ、2~3オリゴヌクレオチドを一体として結合させるのが好ましかった。実質的的化学的安定化が一般に使用された(少なくとも40%塩基修飾、完全修飾が好ましい。2~20の一本鎖ホスホロチオエート化

10

20

30

40

50

テイルを一般に使用した(8 ~ 10が好ましい))。

【0533】

二分岐 *hsirNA* (ジ-*hsirNA*) 化合物の発見は、純粹に偶然の事件であった。カルシフェロールは容易に酸化され、固体支持体は不安定となり、QCおよび精製が複雑である。4つの主要な副産物のプールを野生型マウスの線条体に注射した。CNSに今まで注射されたどんな化合物よりも良好な成績であった。生成物は、広い拡散、大きな保持および皮質、線条体および脊髄におけるニューロンへの優先的取り込みを示し、これはほぼ理想的プロファイルである。HPLCおよびマスペクトロメトリーによる詳細な特徴付けの結果、粗製混合物に存在する副産物を同定した。所望のカルシフェロール-*hsirNA* コンジュゲート、トリエチレングリコールリンカー(TEG)でキャップされた *hsirNA* および TEGリンカーにより接続された2つの *hsirNA* であった。後者の化合物は、支持体に負荷中に開裂されたカルシフェロール由来であり、*hsirNA* パッセンジャー鎖が増殖する2つの活性基を遊離させた(図95A)。各副産物精製後、各々がインピトロで効率的にRISCに入ることが確認されたが(図95B)、ジ-*hsirNA* のみが広い分布および優先的神経細胞取り込みを示した(図95C)。マスペクトロメトリーにより確認された、>70%収率でのジ-*hsirNA* の合成経路(図93および94)が考えられた(図100および101)。

10

【0534】

脳中へのジ-*hsirNA* 支持送達ポラスICV注入で、二分岐 *hsirNA* (ジ-*hsirNA*) 化合物が脳における広い分布を支持することが確認された(図68、69および104A)。図104AにおけるCy3-ジ-*hsirNA* での脳注射が至るところピンク色であることに注意。ジ-*hsirNA* の単回注射は、注射部位の同側性および対側性の両方で検出され、拡散が注射半球に限定的ではなく、非注射部位へ中線を越えて拡散することも示した。対側性側への、顕著ではあるが、少ない程度のジ-*hsirNA* 蓄積は、完全脳サイレンシングには両側注射を必要とし得る。脳内-脳室を含む代替的注射方法がまた単回注射での両側分布を促進し得る。

20

【0535】

分岐は、脳分布増強に必須であることが確認された(図70)。ジ-*hsirNA* は、線条体内注射後、マウス脳の注射半球中に分布した。単一非コンジュゲート *hsirNA* は一次ニューロンにおいてmRNAをサイレンシングできるが、ジ-*hsirNA* 構造は、修飾オリゴヌクレオチドの組織分布および組織保持増強に必須であった。コレステロールのような他のコンジュゲートは、保持されるものの、注射部位からの急勾配での拡散を示した。2つの一本鎖ホスホロチオエート化テイルのわずかな疎水性が組織保持を支持し、同時に注射した脳の同側半球中の広い拡散および均一分布も可能とする。

30

【0536】

ジ-*hsirNA* 単回IS注射後のインピボ遺伝子サイレンシングを試験した(図71)。ジ-*hsirNA* の単回注射は、マウス脳の線条体および皮質の両方に確固たるサイレンシングを誘発した(図72および73)。このレベルの有効性は、非コンジュゲート *hsirNA* で今まで示されたことはなかった。ジ-*hsirNA* は、線条体における神経索と関連するように見えるが、観察された有効性は、線条体ニューロンが相当な程度ジ-*hsirNA* を内在化させたことを明らかに示す。

40

【0537】

ジ-*hsirNA* はまた均一脊髄分布も支持した(図74)。ジ-*hsirNA* ポラスIT注射は、脊髄における *hstt* サイレncingを支持した(図75)。ジ-*hsirNA* は、髄腔内注射後脊髄中の確実で、均一なサイレンシングを示した。脊髄の腰部領域におけるジ-*hsirNA* の単回注射は、頸部、胸部および腰部領域で同程度にmRNAをサイレンシングさせ、均一かつ長距離の分布を示した。薬物送達のこの認められた方法は、脊髄におけるニューロンを脅かす神経変性疾患の処置を可能とする。

【0538】

ジ-*hsirNA* は、脳への線条体内注射時、極めて独特な細胞分布を示した(図76)。蛍

50

光標識ジ - s i R N A は、優先的に皮質におけるニューロンに局在化することが明らかとなった。この選択的特色は、これらの化合物に特異的であり、細胞型優先性を示さなかったコレステロールの他の s i R N A コンジュゲートには当てはまらなかった。

【 0 5 3 9 】

ジ - s i R N A は線条体における神経索への局在化を示したが、皮質における神経細胞体内にも存在した(図 7 7)。科学的理論に縛られることを意図しないが、皮質への移動は拡散または線条体神経索を経る逆行輸送によるものである。逆行輸送が部分的に担うとの理論は、皮質のある領域が完全神経細胞浸透を示すのに対し、隣接領域におけるニューロンはジ - h s i R N A 結合を示さないとの事実により支持される。

【 0 5 4 0 】

ジ - h s i R N A の髄腔内注射は、同様に脊髄について印象的な結果であった(図 1 0 5 A)。c h o l - h s i R N A (元のコンジュゲート h s i R N A) は、急勾配の分布を示し、比較的小量が灰白質および運動神経に達するのに対し、ジ - h s i R N A は、脊髄中に均一に分散し、運動神経で共局在化した(図 1 0 5 A において拡大)。

【 0 5 4 1 】

単回注射後のジ - h s i R N A の広い分布は、線条体における 8 5 % を超えるサイレンシング、皮質における 7 0 % サイレncing(図 1 0 4 B) および脊髄における約 5 0 % サイレncing(図 1 0 5 B) と関係する。相当量のジ - h s i R N A が線条体、皮質、肝臓および腎臓に時間と共に蓄積されるが(図 1 0 4 C)、炎症または神経細胞変性の証拠は、最小有効用量をはるかに超える試験した最高用量で検出されなかった(すなわち、4 0 0 μg I C V および 1 5 0 μg I T)。これらのレベルで、C h o l - h s i R N A は毒性である。これらのデータに基づき、ジ - h s i R N A を、詳細な特徴付け、最適化および検証のための第二化学物群として選択した。ジ - h s i R N A の詳細な特徴付けは、用量 - 応答、最大耐性用量および治療指数の決定のために実施する。細胞、分子および生化学的アッセイを使用して、さらに化合物のインビボ分布および蓄積ならびに標的遺伝子制御程度を測定する。

【 0 5 4 2 】

実施例 6. 軸索輸送が脳におけるジ - h s i R N A 分布に寄与する証拠

ジ - h s i R N A のニューロンへの、特に注射部位遠位への優先的送達は励みとなった。C y 3 - ジ - h s i R N A を線条体内注射したマウスにおいて(図 9 5 C)、我々は、皮質の全 N e u N 陽性細胞(ニューロン)でジ - h s i R N A を検出したが、他の非神経細胞型(例えば、膠細胞)では検出しなかった。この観察の一つの解釈は、ジ - h s i R N A が遠位ニューロンまで軸索に沿って優先的に輸送されることである。なぜ分枝オリゴヌクレオチドが分布にこのような深い効果を有するのか? h s i R N A が受容体と弱く結合し、第二の独立した結合事象が内部移行を促進する、協調的結合の役割が仮説立てられた(Alves I D, Ciano K A, Boguslavski V, Varga E, Salamon Z, Yamamura H I, Hruby V J, Tollin G. Selectivity, cooperativity, and reciprocity in the interactions between the delta-opioid receptor, its ligands, and G-proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279:44673-82. PMID: 15317820)。h s i R N A の共有結合による協調的結合は、細胞の取り込み率および結果として組織保持を劇的に増強するはずである。この仮説および他の仮説を試験し、ジ - h s i R N A の詳細な構造 - 活性相関試験を実施する。

【 0 5 4 3 】

実施例 7. P C - D H A およびジ - h s i R N A コンジュゲートの証拠：新規 2 群の C N S 活性オリゴヌクレオチド

上述のデータで説明するとおり、C S F 注入後 C N S 組織における広い分布および強力な遺伝子サイレンシングを支持する、2 つの新規な、化学的に異なる群の治療 s i R N A、P C - D H A - h s i R N A およびジ - h s i R N A が設計されている。ジ - h s i R N A は有望であるように見えるが、現在安全性および治療指数のデータが足りない。P C - D H A - h s i R N A は、広い治療可能性を有する(図 1 0 3)。C N S 適応症についての

10

20

30

40

50



臨床治験におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドが狭い治療指数を有するため、これは重要である。

#### 【0544】

可能性のあるリスクを軽減するために、両群の化合物を詳細に評価する。目標は、CSFでのボラス注入による、200 µg/注射未満の用量での70%を超える標的遺伝子サイレンシング、10倍を超える治療指数および1ヶ月～3ヶ月効果持続期間である。小動物の脳および脊髄における簡単かつ長期サイレンシングを可能にする単純なテクノロジープラットフォームの開発は、神経科学研究分野を顕著に進歩させるであろう。それは、脳生物学および神経変性疾患進行の関与への疑いと同時に様々な新規標的の直接機能的解析を可能にする。ここに記載するデータは、化学がオリゴヌクレオチドの分布、有効性および安全性を規定することを示す。PC-DHA-hsiRNAおよびジ-hsiRNAの化学的バリエーションを評価し、このテクノロジープラットフォームのヒト治療に向けた将来的翻訳に必須である特色である、高い有効性および広い治療指数を有する骨格を同定する。最後に、数化合物の性能を、HDにおけるサイレンシングHTTにより、神経変性疾患の確立された動物モデルで検証する。

10

#### 【0545】

実施例8. 脳および脊髄におけるPC-DHAおよびジ-hsiRNA分布、有効性および安全性の特徴付け

##### オリゴヌクレオチド合成

HsiRNAおよびジ-hsiRNAを合成し(0.2 g、+/-Cy3)、完全代謝的安定hsiRNAとしてHPLC精製し(末端ホスフェートアナログとして5'-EVPを含む)、続いてマスマススペクトロメトリーにより特徴付けする。多種多様なリンカーがスクリーニングされており、PC-DHAおよびジ-hsiRNAコンジュゲーションの最適骨格が同定されている。官能化支持体を図93および94に示すとおり合成する。次の化合物を使用する：HTT-10150(HD)およびPPIB-437(ハウスキーピング対照)。数字は、ガイド鎖の5'ヌクレオチドにより標的されるヒトmRNAの位置を示す。全化合物は、先に、最適化バイオインフォマティクスパラメータを使用して、同定(Birmingham A, Anderson E, Sullivan K, Reynolds A, Boese Q, Leake D, Karpilow J, Khvorova A. A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. Nature protocols. 2007; 2:2068-78. PMID: 17853862)および詳細な実験スクリーニングされている。各siRNAは、対応するヒト、マウスおよびサルmRNAを標的およびサイレンシングし、これは、将来的臨床開発を単純化する。

20

30

#### 【0546】

標準的オリゴヌクレオチド合成系、すなわち、Mermaid12およびExpediteに加えて、オリゴパイロット100分取HPLCおよび高分解能LC-MSを含む中規模RNA合成能力(S10承諾により出資)が確立されている。下に提案するインビボ試験に必要な新規化合物の大量のバッチが合成される。

#### 【0547】

##### 投与経路最適化

数投与経路を比較し、CSFを経るボラス注入(ICVおよびIT注入)が、最良の程度の化合物保持およびCNS組織における分布を支持することが決定された。これらの経路を経るCSF送達は、臨床的に許容される投与経路である“脊椎穿刺”に類似する。組織保持および有効性のサイド・バイ・サイドの比較を、等用量がボラス注射または1週間の期間にわたるALZETポンプによる送達で実施した。顕著に良好な組織保持および有効性が、ASOで報告されたデータに一致して、ボラス注射で観察された(Rigo F, Chun SJ, Norris DA, Hung G, Lee S, Matson J, Fey RA, Gaus H, Hua Y, Grundy JS, Krainer AR, Henry SP, Bennett CF. Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl-modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2014; 350:46-55. PMID: 24784568; PMCID: PMC40

40

50

56267)。科学的理論に縛られることを意図しないが、ポンプ投与を超えるボーラス投与の良好な成績は、オリゴヌクレオチド取り込み機序と関係する。例えば、非増殖性オリゴヌクレオチドシンクは、ポンプ注入よりボーラスで速く飽和し、それにより過剰なオリゴヌクレオチドがより容易に輸送されることを可能にする。

#### 【0548】

組織におけるインタクトガイド鎖の直接定量のために、我々は、新規な定量的ペプチド核酸(PNA)ハイブリダイゼーションアッセイを開発し、実施した(図106)。アッセイは高感度であり、検出限度は組織1gあたり10fmole hsiRNAであった。完全長、部分的分解、5'-リン酸化および5'-脱リン酸化ガイド鎖を有するhsiRNA代謝物は、HPLCトレースの別のピークまたはショルダーとして容易に定量された。このアッセイを使用して、脊髄および脳中の領域から採った2mmパンチ生検におけるガイド鎖保持の動態を定量する。

10

#### 【0549】

先の経験に基づき、注射1週間後組織1gあたり1~5µgオリゴヌクレオチドの蓄積が、通常増殖性標的サイレンシング支持に十分である(図104B、104C)。蛍光およびPNAアッセイは、送達コンジュゲートhsiRNAの分布のマッピングおよび定量を可能とする。これらの試験は、機能的分析を補完し、サイレンシング有効性試験の基礎を確立する。

#### 【0550】

##### 最大耐性用量の同定

パイロット試験において、200µg DHA-hsiRNAおよびジ-hsiRNAが線条体内注射の安全用量として確立され(DHAのデータは図103Bおよび103Cに示す)、150µgが髄腔内注射の安全用量として確立され、400µgが脳室内注射の安全用量として確立された。これらのレベルから開始して、用量を動物が何らかの毒性徴候を示すかまたはPC-DHA-hsiRNAについて約20mMおよびジ-hsiRNAについて約50mMである薬物溶解度限度に達するまで、2倍増分で増加させる。注射3週間後(オリゴヌクレオチド毒性を見るのに必要な最適時間)、脳組織を採取し、ニューロンの数および生存能を神経細胞マーカーNeuNおよびDARPP-32での染色により評価する(Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* (Cambridge, England). 1992; 116:201-11. PMID: 1483388; Weyer A, Schilling K. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *Journal of neuroscience research*. 2003; 73:400-9. PMID: 12868073; Ouimet CC, Miller PE, Hemmings HC, Jr., Walaas SI, Greengard P. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1984; 4:111-24. PMID: 6319625)。ミクログリア活性化(天然免疫活性化)もIBA1での染色により評価する(Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2006; 13:494-505. PMID: 16343994; Marques JT, Williams BR. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nature biotechnology*. 2005; 23:1399-405. PMID: 16273073)。化合物が、可逆性、短期炎症性応答を誘発するかを試験するために、マウスに最大耐性用量を注射し、膠細胞活性化を投与6時間後に試験する。この研究の完成は、ここに記載する新規2群の治療hsiRNAの最大耐性用量に対するデータを作成する。

20

30

40

#### 【0551】

##### PC-DHAおよびジ-hsiRNAクリアランスプロファイルの推定

CSFおよび血液におけるRNA滞在時間を決定する。マウスにおける反復CSF採取は実行不可能であり、それ故にCSFクリアランス試験を、用量を適宜調節した、ラットを

50

使用して実施する。10  $\mu$ lのCSFを、動物の重複群を使用して、PC-DHA-およびジ-hsiRNA投与1時間、6時間、12時間および24時間および1週間後に採取する。同様に、20  $\mu$ Lの血液を、注射5分および30分および1時間、4時間、12時間、24時間、48時間、72時間および96時間後に採る。短時間の反復採血と関連する懸念を最小化し、厳密なデータを得るために必要な動物数を最小化するために、頸静脈カテーテル法を使用する。

#### 【0552】

関連siRNA化合物での先の薬物動態試験に基づき、二相性クリアランス動態が観察され、早期相は4~6時間以内に完了することが予測された。パイロット試験に基づき、完全薬物クリアランスに1ヶ月かかる。しかしながら、1週間のパイロット試験がクリアランスプロファイルの近似に十分である。この試験は、ここに記載する2クラスの新規治療剤hsiRNAのクリアランスプロファイルに対するパイロットデータを完成する。

10

#### 【0553】

##### 用量応答の確立

用量応答試験を実施し、顕著なオリゴヌクレオチド蓄積を示す脳の領域におけるサイレンシングの最適用量を決定する。実験は、図103、104および105に示すものに準じて実施する。3mmパンチ生検試料をPC-DHAおよびジ-hsiRNAの用量を増加させながら注入したマウスの脳および脊柱から採取し、HTTまたは対照mRNAのレベルをQUANTIGENE(登録商標)アッセイを使用して測定する。

#### 【0554】

QUANTIGENE(登録商標)は、組織または細胞ライセートにおけるmRNAを直接検出するためにシグナル増幅を使用する高感度の96ウェルベースのアッセイである。TissueLyserとQUANTIGENE(登録商標)を直接連結する、自動化、ハイスループット(96ウェル)型アッセイを記載するプロトコールが最近公開された(Coles AH, Osborn MF, Alterman JF, Turanov AA, Godinho BM, Kennington L, Chase K, Aronin N, Khvorova A. A High-Throughput Method for Direct Detection of Therapeutic Oligonucleotide-Induced Gene Silencing In Vivo. *Nucleic acid therapeutics*. 2015. PMID: 26595721)。それ故に、HTTおよびハウスキーピングmRNAの同時定量化を多くの組織および/または動物で実施できる。パイロット試験において、8マウス/群が、80%信頼区間(Id)で標的遺伝子発現の40%減少を検出するのに十分であることが決定された。

20

30

#### 【0555】

HTT mRNAレベルを対照ハウスキーピングmRNAについて正規化する。同じ化学的組成物の人工CSFおよび非ターゲティング対照(NTC)を、非配列特異的事象の制御に使用する。NTC hsiRNAを、使用動物数を制限するために、最高非毒性濃度でのみ注射する。NTCは良好な陰性対照であるが、第二ターゲティングhsiRNA(例えば、PPIB-ターゲティング)は、同じ動物数で2つの異なる標的に対するサイレンシングデータを提供する。タンパク質レベルでのサイレンシングの確認は、疾患の動物モデルに向けた移行の前に必須であり、したがって、ウェスタンブロットティングを、chol-hsiRNAについて先に実施した方法に準じて実施する(Alterman JF, Hall LM, Coles AH, Hassler MR, Didiot MC, Chase K, Abraham J, Sottosanti E, Johnson E, Sapp E, Osborn MF, Difiglia M, Aronin N, Khvorova A. Hydrophobically Modified siRNAs Silence Huntingtin mRNA in Primary Neurons and Mouse Brain. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2015; 4:e266. PMID: 26623938)。この研究の完了は、ここに記載する新規2クラスの治療薬hsiRNAについて、CNSの種々の領域における機能的遺伝子サイレンシングを可能にする用量を同定するはずである。

40

#### 【0556】

##### 単回投与によるサイレンシングのPC-DHAおよびジ-hsiRNA期間

大部分の神経変性障害および疾患モデルは、症状の発症遅延を示す(例えば、マウスにおいて3~9ヶ月)。1回の注入からのサイレンシング期間および何回の注射が6~9ヶ月のサイレンシング支持に必要であるかを決定しなければならない。一般に、非分裂細胞におけ

50

る siRNA 誘発サイレンシングは月単位(1ヶ月または数ヶ月)で続くと予測される。充填 RISC 複合体の半減期は数週間であり(Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nature reviews Drug discovery. 2009; 8:129-38. PMID: 19180106)、細胞あたり 1,000 未満の充填 RISC 分子がサイレンシング誘発に十分である(Stalder L, Heusermann W, Sokol L, Trojer D, Wirz J, Hean J, Fritzsche A, Aeschmann F, Pfanzagl V, Basselet P, Weiler J, Hintersteiner M, Morrissey DV, Meisner-Kober NC. The rough endoplasmatic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. The EMBO journal. 2013; 32:1115-27. PMID: 23511973; PMCID: 3630355; Pei Y, Hancock PJ, Zhang H, Bartz R, Cherrin C, Innocent N, Pomerantz CJ, Seitzer J, Koser ML, Abrams MT, Xu Y, Kuklin NA, Burke PA, Sachs AB, Sepp-Lorenzino L, Barnett SF. Quantitative evaluation of siRNA delivery in vivo. Rna. 2010; 16:2553-63. PMID: 20940339; PMCID: 2995415)。

#### 【0557】

さらに、FM-hsiRNA は他の利点を提供し得る。細胞は、通常数百万の hsiRNA を取り込むが、大多数はリソソームに捕捉される。リソソームに捕捉された、慣用の、部分的修飾 hsiRNA は分解されるが、FM-hsiRNA はしない。その結果、FM-hsiRNA は、リソソームに一過性に捕捉された FM-hsiRNA をゆっくり放出する細胞内“デポー”を形成し、RISC 充填に有用となる。Alynlam GalNAc 治療のデータは、肝臓への最適化送達、単回皮下注射から最大6ヶ月の有効性を提供することを示す。ここに示すデータはこの観察と一致する；単回 FM-hsiRNA 注射が少なくとも1ヶ月最大サイレンシングを提供する(図2D)。

#### 【0558】

hsiRNA の保持およびサイレンシングの期間を測定するために、3マウスに最高耐性用量の PC-DHA- またはジ-hsiRNA を注射し、組織におけるインタクトガイド鎖のレベルを、1週間、2週間および4週間および2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月および6ヶ月に PNA アッセイを使用して測定する(図106)。インタクトガイド鎖レベルが組織 1g あたり 1 μg hsiRNA 未満に落ちたら、試験を終了する。HTT mRNA レベルを、別の研究検出力(n=8)で、ガイド鎖濃度が組織 1g あたり 1 μg 以上である時点で測定し、サイレンシング効果の検出を容易にする。サイレンシングの期間が少なくとも3ヶ月であることが予測されるが、実験検証が望まれる。

#### 【0559】

##### ジ-hsiRNA の細胞の取り込みおよび輸送の機序の探索

二分岐 hsiRNA は、等用量のリンカー結合単一 siRNA と比較して CNS 組織における顕著に増強された保持および分布を示しており、共有結合した siRNA の協調的結合または受容体二量体化が細胞の取り込みを駆動することを示す(図95C)。示差的取り込みを、TESM 顕微鏡(時間分解落射蛍光構造顕微鏡)およびマススペクトロメトリーの組み合わせにより可視化および特徴付けする。

#### 【0560】

##### HTT 化合物に対する“解毒薬”開発

遺伝子治療アプローチ(すなわち、永続的遺伝子サイレンシング)は現在神経変性障害の処置について考慮されており、したがって1~6ヶ月のサイレンシング期間は比較的安全であると考えられる。それにも関わらず、サイレンシングを戻す“解毒薬が安全性に関する懸念である。“解毒薬”はまたインビボでの遺伝子機能の研究の大きなツールであり、関連する表現型を産生するためにどの程度の時間が遺伝子の下方制御に必要なかの試験を可能とする。

#### 【0561】

FDA の同様の懸念に鑑み、Alynlam は、長期サイレンシングの逆転が可能である、“REVERSIR(登録商標)”と呼ばれるテクノロジーを開発している。概念は、機能的 hsiRNA のシード領域に完全相補的な高親和性アンチセンス(LNA および 2'-O-メチル/デオ

10

20

30

40

50

キシ)MIXMER(登録商標)の開発を含む。H T T 1 0 1 5 0(および最終的に他の化合物)をターゲットにするW A パネルのh s i 解毒薬を設計し、合成し、インビトロおよびインビボでサイレンシングを逆転する能力を評価する(図9 6)。解毒薬を、P C - D H A - h s i R N A と類似する分布性質を可能とするために、P C - D H A コンジュゲートのように合成する。この研究の完了は、所望によりインビボ活性を逆転可能な、リードh s i R N A 化合物に対する解毒薬の産生を可能にする。

#### 【0562】

代替的アプローチ：P C - D H A コンジュゲーションおよび二分岐構造が脳におけるアンチセンス介在サイレンシングに介在するか否かの試験

神経変性障害の処置用アンチセンスオリゴヌクレオチドは、臨床的に進んだ開発段階にある(Evers MM, Toonen LJ, van Roon-Mom WM. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. Advanced drug delivery reviews. 2015. PMID: 25797014; Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz EV, Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, Artates JW, Weiss A, Cheng SH, Shihabuddin LS, Hung G, Bennett CF, Cleveland DW. Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. Neuron. 2012; 74:1031-44. PMID: 22726834; PMCID: PMC3383626)。I O N I S - H T T R x は、I o n i s に独占的な2.5世代アンチセンス化学であり、学界で一般に利用可能ではない。

#### 【0563】

H T T をターゲットにする高度に強力なロックド核酸(L N A)G a p m e R は、いずれにしても、開発されている。P C - D H A コンジュゲーションおよび/またはジ分岐が脳組織におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの分布および保持を改善し、有効用量を低減するかを試験するために、H T T をターゲットにするP C - D H A - およびジ - L N A G a p m e R を合成する。

#### 【0564】

本例の完了は、最適送達経路、薬物クリアランスおよび保持、安全性、用量応答および効果持続期間を含む、C N S (脳および脊髄)における、ここに記載する2つの新規オリゴヌクレオチドコンジュゲート(すなわち、P C - D H A およびジ - h s i R N A)の完全特徴付けをもたらす。ここに記載する実験は、インビボでのC N S における遺伝子サイレンシングおよび標的検証試験のためのこれらの化合物の使用を可能とし、またH D の新規治療の開発に向けた確実な基礎を提供する。

#### 【0565】

実施例9. 分布および治療指数を改善するための、一団のP C - D H A およびジ - h s i R N A 化学的バリエーションの合成および特徴付け

ここに示すデータ(図9 2、1 0 3、1 0 4 および1 0 5)は、P C - D H A - およびジ - h s i R N A 化合物が、脊髄、線条体および皮質における標的に1ヶ月~3ヶ月効果持続期間で到達するのに十分であることを示し、これは、インビボ機能的ゲノム研究に十分である。これ単独で、顕著な達成であるが、このテクノロジープラットフォームのヒト治療に向けた将来的翻訳は、他のレベルの複雑さを示す。テクノロジー翻訳前に、我々は、(i)最も広い可能な治療指数および(ii)大きな脳への送達を支持する分布の増強のために、この化合物を最適化する。

#### 【0566】

コンジュゲートの化学的骨格のわずかな変化が、ホスファチジルコリンでのD H A 官能化により示されたように、組織分布に大きく影響し得る(図9 2)。これらの合成プラットフォームを利用して、一団のP C - D H A - およびジ - h s i R N A バリエーションを合成し、さらに治療指数および広い組織分布を最適化する。

#### 【0567】

P C - D H A 最適化

P C - D H A 構造に2個の必須成分がある。ホスファチジルコリンおよびD H A (図9 2における構造参照)である。ここに記載する合成アプローチ(図9 3および9 4)は、これらの

10

20

30

40

50

化合物を独立して変えることを可能とする。オリゴヌクレオチドコンジュゲートの構造機能相関に関する情報は文献にはほとんどまたは全く存在せず、むしろポリマー構造および脂質化合物がどのように脂質 - 粒子形成に影響するかを記載する多くの情報が存在する<sup>48</sup>。試験は、脂質の長さが製剤の全体的有効性に大きく影響することを示す。

#### 【0568】

多不飽和結合はCNS組織における増強されたhsRNA分布に必須である。DHAの完全飽和アナログであるDCAのコンジュゲーションは、CNSにおける広い分布を促進しない。DHAより2炭素短いEPAのコンジュゲーションは、興味深い分布プロファイルをもたらすが、有効性はまだ試験していない。脂質テイルが10から22炭素まで、多不飽和結合数が0から4までの種々の一団のホスファチジルコリン修飾多不飽和脂肪酸バリエーションを合成する。これらの合成反応の前駆体は市販されている。これらの化合物は、脂質テイル長の長さおよび多不飽和結合数がCNSにおけるオリゴヌクレオチド分布にどのように影響するかを確認する。

10

#### 【0569】

第二に、コリンエンティターの系統的置換を、様々な修飾について、大部分天然に存在する化学的骨格、例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールおよびホスファチジルアミンを用いて行う。これらの合成の大部分を、固定脂質テイル組成物および多様な頭基を有する化合物のライブラリーを作り、並行して実施できる。このライブラリーは、hsRNAコンジュゲートのインビボ性能に対する頭基の重要性を定義するために使用されよう。

20

#### 【0570】

送達用の化合物または製剤の性質とは無関係に、大部分の内在化オリゴヌクレオチドが生物学的に利用可能ではないことは周知である。エンドソーム溶解、ペプチド修飾ポリマーが、共投与コレステロール修飾siRNA化合物の全身有効性を増強するために、Arrowhead Research Corporationにより使用されている(Wong SC, Klein JJ, Hamilton HL, Chu Q, Frey CL, Trubetsky VS, Hegge J, Wakefield D, Rozema DB, Lewis DL. Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo. *Nucleic acid therapeutics*. 2012; 22:380-90. PMID: 23181701)。この概念の構築により、エンドソーム溶解ペプチドの種々の数および組成のリンカーのライブラリーを合成した。大部分のバリエーションはchol-hsRNA有効性に影響しなかったが、最良のリード(図97A)は、受動的取り込みにより10倍を超えてサイレンシングを増強した(図97B)。科学的理論に縛られることを意図しないが、増強された活性は、修飾リンカーが脂質介在取り込みによる有効性を増加させなかったため(図97B)、内在化chol-hsRNAのバイオアベイラビリティ増加または内在化したオリゴヌクレオチドの全体的量によるものである可能性が高い。このリンカーを、最も適当である脂質長および頭基と組み合わせる。

30

#### 【0571】

##### ジ-hsRNA最適化

ジ-hsRNA化合物における二つのhsRNAは、非対称性に結合されている：一方はホスフェート結合および他方はホスホロアミデート結合による(図93、94および103A)。ホスホロアミデート結合が必要であるか否かを確立するために、hsRNAが両方ともホスフェートを経てリンカーに連結した二分岐化合物が現在試験中である(図93および94に基づく修飾合成スキーム)。ホスホロアミデート結合が必須でないことを示すことは、多数の前駆体が購入可能であるため、構造活性相関試験を単純化する。それにも関わらず、ホスホアミド結合の必要性は、ホスホアミドが酸性条件では不安定であり、エンドソームからの化合物遊離を促進すると予測されるため、興味深い。

40

#### 【0572】

一団のバリエーションを合成し、次のパラメータについて試験する：hsRNAの数(2、3、4または6、Glen Researchから購入できる2および3分岐ディバイダーを使用)なら

50

びにオリゴヌクレオチドを接続するリンカーの化学的性質(TEG、飽和および非飽和アルキル鎖、荷電、非荷電、3～30炭素の長さおよびプロトンスポンジである。取り込みに必要なホスホロチオエート結合の最小数も決定される。ホスホロチオエート結合がhsRNAの受動的取り込みおよび有効性に必須であることが既に決定されているため、ホスホロチオエートテイルの協調的結合がジ-hsRNAの分布および取り込み増強を駆動することが疑われる。しかしながら、ホスホロチオエート結合はまたアンチセンスオリゴヌクレオチドの毒性も駆動する(Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;87:46-51)。それ故に、ホスホロチオエート数の最適化および減少は、治療指数増強に向けた合理的方針である。

10

【0573】

#### PC-DHA-およびジ-hsRNAバリエーションの有効性評価

組織培養実験を使用して、安全性およびRISC複合体への効率的侵入を確認する。次いで、各化合物を、ここで記載するように確立された最小有効量および最大耐性用量でICV注射する。低濃度で有効であるおよび/または高濃度で非毒性である化合物を、詳細な試験のために選択する。最後に、大きな脳(例えば、ヒツジ)中の分布に最も有望な化合物を評価する。ヒツジモデルは、AAV-httベクターの分布の評価のために設計されている。ここに記載するPNAアッセイを使用して、ポラスICV注入後のヒツジ脳の種々の領域からの生検サンプルにおける化合物のレベルを測定する。

【0574】

20

本実施例の完了は：(i)PC-DHA-およびジ-hsRNAのインビボ有効性を規定する化学構造を知ること；および(ii)増強された分布、有効性および治療指数を有する化合物の型を知ることが予測される。

【0575】

実施例10. ハンチントン病モデルのための候補前臨床化合物の開発

#### ハンチントン病動物モデルにおけるhsRNA HTT10150の新規コンジュゲートの評価

Httのための機能亢進性、FM-hsRNAであるHTT-10150をここで記載する。その研究室で現在飼育されている複数HD動物モデル(Chang R, Liu X, Li S, Li XJ. Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy. *Drug design, development and therapy*. 2015; 9:2179-88. PMID: 25931812; PMCID: PMC4404937)は、YAC128(Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*. 1999; 23:181-92. PMID: 10402204)、BACHD(Hult S, Soylu R, Bjorklund T, Belgardt BF, Mauer J, Bruning JC, Kirik D, Petersen A. Mutant huntingtin causes metabolic imbalance by disruption of hypothalamic neurocircuits. *Cell metabolism*. 2011;13:428-39. PMID: 21459327; Hult Lundh S, Nilsson N, Soylu R, Kirik D, Petersen A. Hypothalamic expression of mutant huntingtin contributes to the development of depressive-like behavior in the BAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics*. 2013; 22:3485-97. PMID: 23697793; Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, Andre VM, Wilburn B, Lu XH, Tao J, Yamazaki I, Li SH, Sun YE, Li XJ, Levine MS, Yang XW. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008; 28:6182-95. PMID: 18550760; PMCID: PMC2630800)および最近確立されたQ140を含むアレルシリーズ(Website: chdifo

30

40

50

undation.org)を含み、使用される。

【0576】

ここに記載されたように同定した最適パラメータに基づき、HTT-10150のポラスICV注入を、各ハンチントンマウスモデルに実施し、マウスをHttサイレンシング、ハンチントン行動および/またはハンチントン関連表現型の発症についてアッセイし、組織学的パラメータを検証する。一組の検証アッセイが、YAC128およびQ140変異体mRNAと野生型Htt mRNAの示差的発現の検出のために設計されている。ロータロッド、プラットホーム上昇 およびオープンフィールドアッセイを含む、一団の行動的アッセイが、運動機能評価のために設計されている(Sah DW, Aronin N. Oligonucleotide therapeutic approaches for Huntington disease. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121:500-7. PMID: 21285523; PMCID: 3026739; Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz EV, Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, Artates JW, Weiss A, Cheng SH, Shihabuddin LS, Hung G, Bennett CF, Cleveland DW. Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron*. 2012; 74:1031-44. PMID: 22726834; PMCID: PMC3383626)。一群のマウスを、3ヶ月齢で処置して疾患予防を評価し、他群のマウスを6ヶ月で処置して疾患回復を評価する。HTT凝集体を、市販の抗ポリグルタミン抗体(3B5H10)を使用して免疫組織化学的染色により評価する。HTT-10150 hsiRNAコンジュゲートを、必要に応じて再投与する。対照群は、PBSおよびHTT-10150 hsiRNAコンジュゲートと同一化学を有する非ターゲティング対照化合物を注射されたマウスを含む。最良のリードを、ハンチントン病の数行動的モデルの他の群により、独立して再試験する。

【0577】

この例の完了は、有効性、安全性および効果試験期間と共に、最適化hsiRNA HTT-10150を前臨床開発に進めるのに十分な一組のデータを作成する。現在、ハンチントン病のオリゴヌクレオチドベースの処置の最良の利用可能なプログラムは2'-O-メトキシエチルGapmeR(Id.)であり、これを基準として使用する。IONIS-HTTRx化合物は、最近、第1相臨床治験を開始しており、そこで、患者はポラス脊椎穿刺注入を受け、CSFにおけるHTTレベル減少が、概念実証のバイオマーカーとして利用される。これは、ハンチントン病処置のためのオリゴヌクレオチド治療の開発に向けた臨床的方針を確立する。最初に、IONISアプローチに類似して、変異体および野生型Httの両方のサイレンシングが計画される。ここに記載する骨格を使用して、SNP識別により変異体HTTを選択的にサイレンシングする化合物も産生される。実際、5SNPアレルが、ハンチントン病患者変異の75%で毒性CAG拡張と結びつく(Pfister EL, Kennington L, Straubhaar J, Wagh S, Liu W, DiFiglia M, Landwehrmeyer B, Vonsattel JP, Zamore PD, Aronin N. Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. *Current biology* : CB. 2009;19:774-8. PMID: 19361997; PMCID: PMC2746439)。

【0578】

引用による取り込み

本明細書を通して引用され得る引用文献(文献、特許、特許出願およびウェブサイトを含む)を、引用文献がここに引用される限り、その全体を、あらゆる目的のために、ここに明示的に包含させる。特に断らない限り、本開示は、当分野で周知の免疫学、分子生物学および細胞生物学の慣用の技術を使用する。

【0579】

本開示はまた、分子生物学および薬物送達分野で周知の技術を、その全体として引用により包含させる。これらの技術は、次の刊行物に記載される技術を含むが、これらに限定されない。

Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 1997, 270: 26-35;

Ausubel et al. (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wi

10

20

30

40

50



- ley & Sons, NY (1993);  
 Ausubel, F.M. et al. eds., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X);  
 CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);  
 Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);  
 Goodson, in MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, vol. 2, pp. 115-138 (1984); 10  
 Hammerling, et al., in: MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);  
 Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);  
 Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);  
 Kabat, E.A., et al. (1991) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;  
 Kontermann and Dubel eds., ANTIBODY ENGINEERING (2001) Springer-Verlag. 20  
 New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).  
 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);  
 Lu and Weiner eds., CLONING AND EXPRESSION VECTORS FOR GENE FUNCTION ANALYSIS (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).  
 MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Press., Boca Raton, Fla. (1974);  
 Old, R.W. & S.B. Primrose, PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION: AN INTRODUCTION TO GENETIC ENGINEERING (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4). 30  
 Sambrook, J. et al. eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).  
 SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978  
 Winnacker, E.L. FROM GENES TO CLONES: INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauf). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4)

【 0 5 8 0 】 40

均等物

本開示は、その精神または必須特徴から逸脱することなく、他の特定の形態に具現化され得る。前記態様は、それ故に、全てに関して、開示を限定するのではなく、説明的と見なされる。本開示の範囲は、それゆえに、前の記載ではなく、添付する特許請求の範囲により示され、特許請求の範囲の均等の意義および範囲内に入る全ての変化は、それ故に、ここに包含されることが意図される。

【図面】

【図 1】

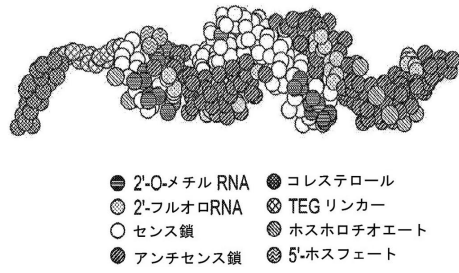


Fig. 1A

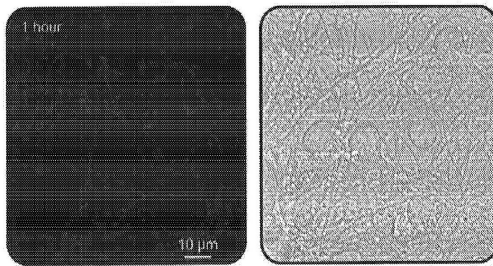


Fig. 1B

【図 2 A】

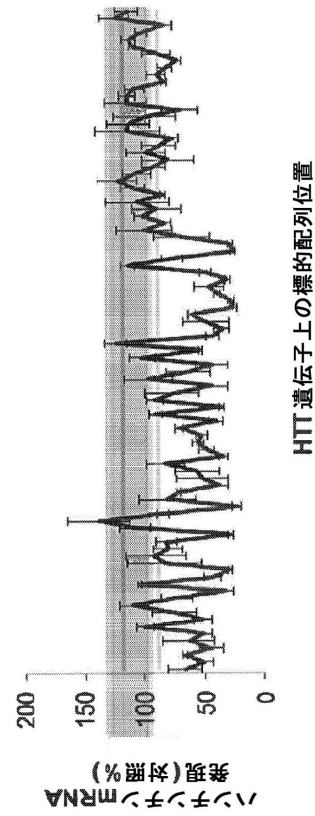


Fig. 2A

【図 2 B】

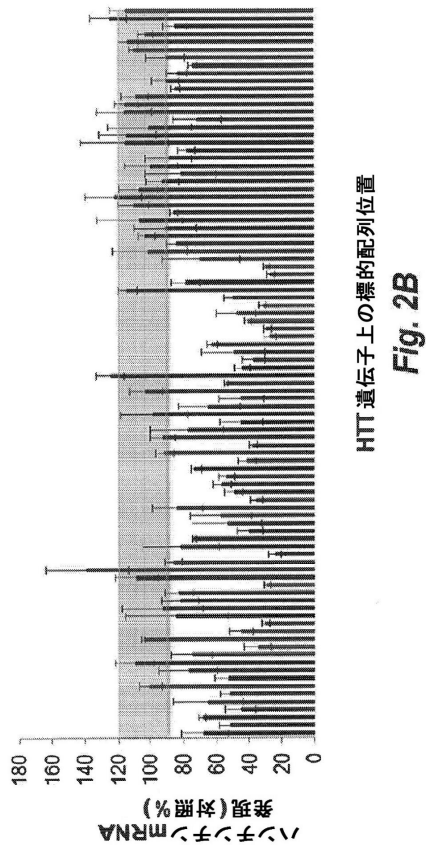


Fig. 2B

【図 2 C】

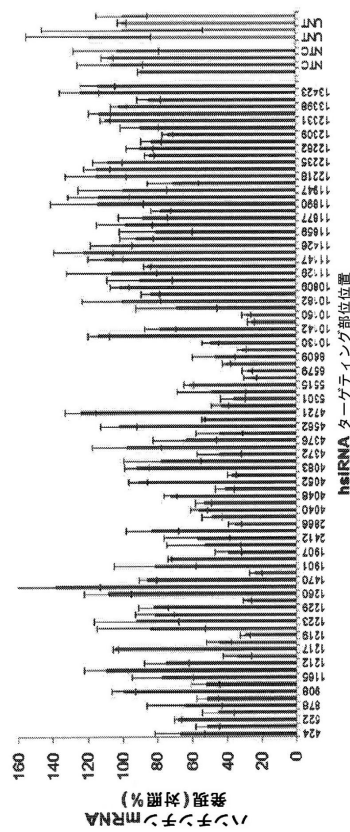


Fig. 2C

10

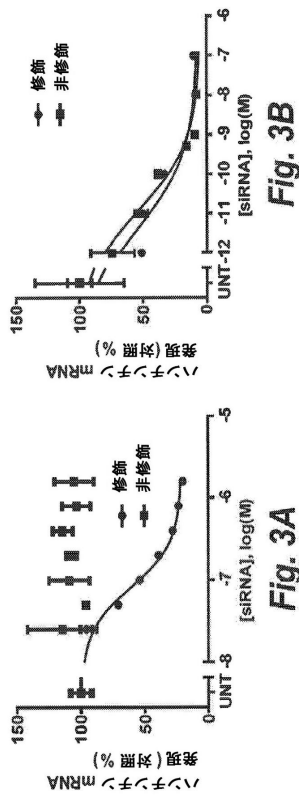
20

30

40

50

【 図 3 】



IC50 修飾	受動的取り込み	脂質介在取り込み
IC50 非修飾	82.2 nM	4.4 pM
	N/A	13.3 pM

Fig. 3C

【 図 4 】

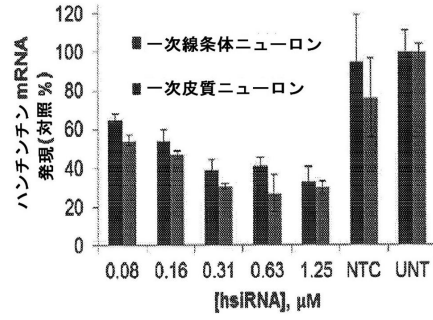


Fig. 4A

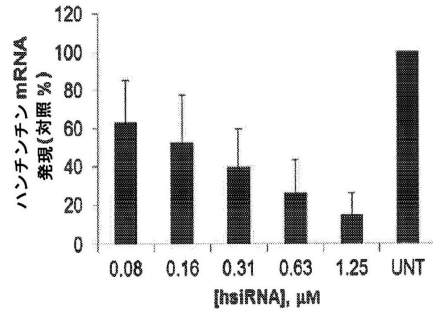


Fig. 4B

【 図 5 】

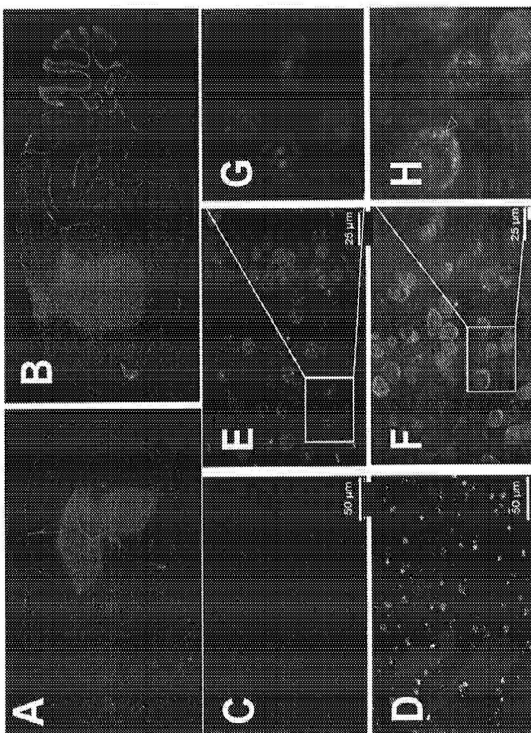


Fig. 5A-5H

【 図 6 】

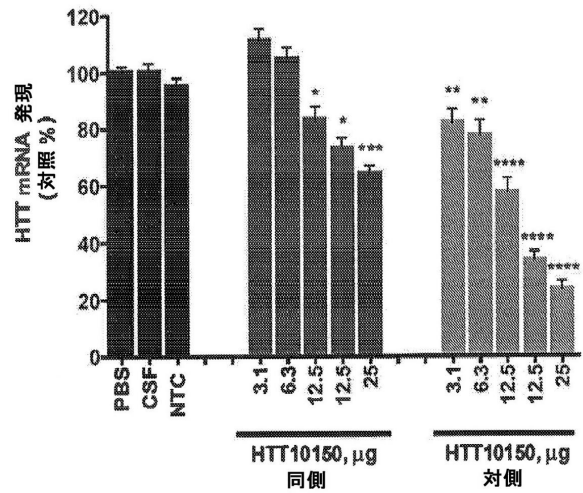


Fig. 6

10

20

30

40

50

【図 7 - 1】

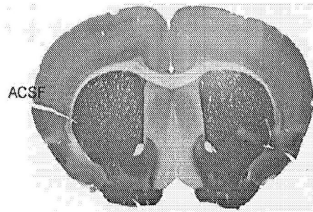


Fig. 7A

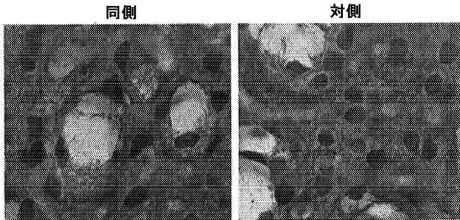


Fig. 7B

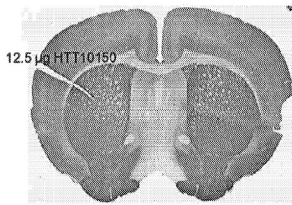


Fig. 7C

【図 7 - 2】

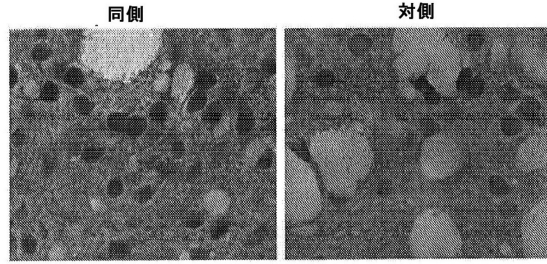


Fig. 7D

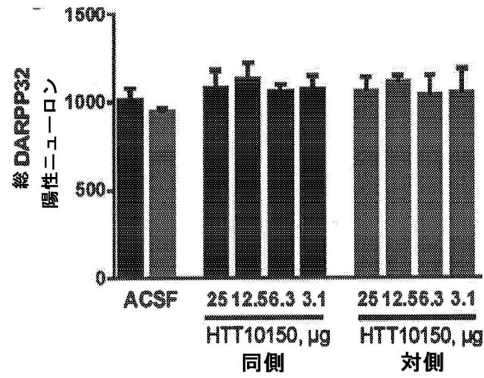


Fig. 7E

【図 8 - 1】

Table with 4 columns: 遺伝子 (Gene), 受託番号 (Accession Number), 位置 (Position), 標的配列 (Target Sequence). Includes a list of 161 miRNAs and their target sequences.

Fig. 8

【図 8 - 2】

Table with 4 columns: 遺伝子 (Gene), 受託番号 (Accession Number), 位置 (Position), 標的配列 (Target Sequence). Includes a list of 161 miRNAs and their target sequences.

Fig. 8 (続き)

10

20

30

40

50

【 図 8 - 3 】

Table with 6 columns: 遺伝子, 発注番号, 位置, 活性 hsaRNAs, 標的配列, センズ類, 顕修飾. Includes 13136 and 14136 series.

シート 14136 に続く

シート 14136

シート 14136 に続く

シート 14136

【 図 8 - 4 】

Table with 6 columns: 遺伝子, 発注番号, 位置, 活性 hsaRNAs, 標的配列, センズ類, 顕修飾. Includes 14136 series.

シート 14136 に続く

【 図 8 - 5 】

Table with 6 columns: 遺伝子, 発注番号, 位置, 相同性 (H. sapiens, M. musculus, M. mulatta), 一次リボソームRNA (発注率%), IC50 (nM), 顕修飾 (アプテセンズ類).

シート 16136 に続く

【 図 8 - 6 】

Table with 6 columns: 遺伝子, 発注番号, 位置, 相同性 (H. sapiens, M. musculus, M. mulatta), 一次リボソームRNA (発注率%), IC50 (nM), 顕修飾 (アプテセンズ類).

シート 16136 に続く

シート 16136

シート 16136

10

20

30

40

50

【 図 8 - 7 】

遺伝子	受託番号	位置	アナンセンス額		相対性		一次カクタン のツツ/mRNA 集現 (対照%)	受動的 取り込み (対照%)	IC50 (nM)
			H. sapien	M. musculus	H. sapien	M. musculus			
HTT	NM_002111.5	4625	yes	yes	yes	44.5	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	4622	yes	yes	yes	53.3	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	4721	yes	yes	yes	72.2	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	5200	yes	yes	yes	43.8	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	5443	yes	yes	yes	46.9	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	5935	yes	yes	yes	52.0	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	6928	yes	yes	yes	47.4	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	10324	yes	yes	yes	41.7	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	10342	yes	yes	yes	78.0	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	10359	yes	yes	yes	68.0	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	10385	yes	yes	yes	100.1	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	10389	yes	yes	yes	83.5	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11116	yes	yes	yes	101.7	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11129	yes	yes	yes	50.0	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11134	yes	yes	yes	105.9	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11147	yes	yes	yes	85.1	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11412	yes	yes	yes	109.9	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11443	yes	yes	yes	122.0	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11669	yes	yes	yes	91.7	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11686	yes	yes	yes	80.7	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11677	yes	yes	yes	58.5	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11677	yes	yes	yes	87.8	N/A	N/A	

シート 13/136 からの抜粋

シート 18/136 に続く  
Fig. 8 (続き)

【 図 8 - 8 】

遺伝子	受託番号	位置	アナンセンス額		相対性		一次カクタン のツツ/mRNA 集現 (対照%)	受動的 取り込み (対照%)	IC50 (nM)
			H. sapien	M. musculus	H. sapien	M. musculus			
HTT	NM_002111.5	11863	yes	yes	yes	77.4	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11850	yes	yes	yes	114.3	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11827	yes	yes	yes	113.3	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	11947	yes	yes	yes	99.8	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	12163	yes	yes	yes	70.7	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	12218	yes	yes	yes	115.3	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	12255	yes	yes	yes	114.6	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	12278	yes	yes	yes	108.3	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	12282	yes	yes	yes	83.9	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	12297	yes	yes	yes	82.9	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	12309	yes	yes	yes	73.4	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	12313	yes	yes	yes	89.8	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	12331	yes	yes	yes	109.9	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	13356	yes	yes	yes	113.2	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	13403	yes	yes	yes	102.1	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	13423	yes	yes	yes	84.1	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.5	13426	yes	yes	yes	124.8	N/A	N/A	
NTC	N/A	N/A	yes	yes	yes	114.1	N/A	N/A	
NTC	N/A	N/A	yes	yes	yes	102.0	N/A	N/A	

シート 14/136 からの抜粋

シート 18/136 に続く  
Fig. 8 (続き)

【 図 9 】



Fig. 9

【 図 10 - 1 】

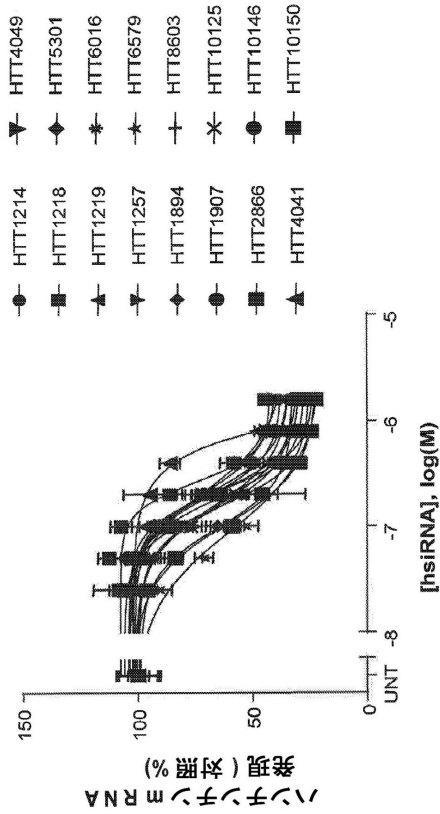
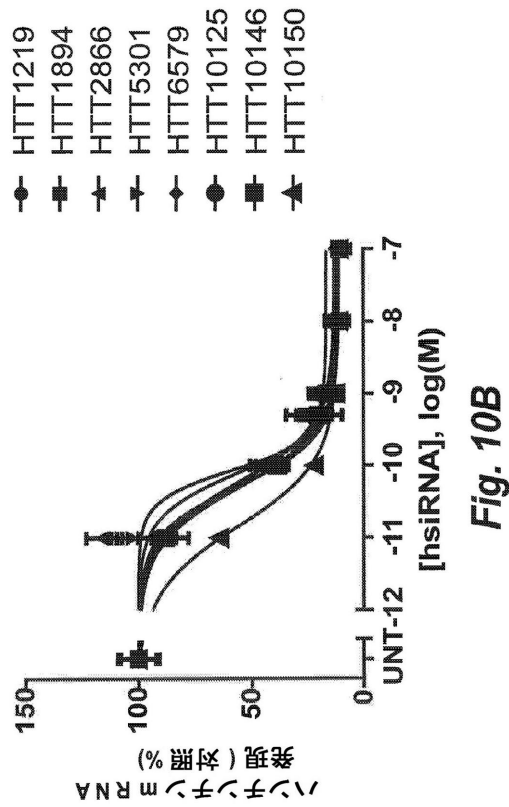


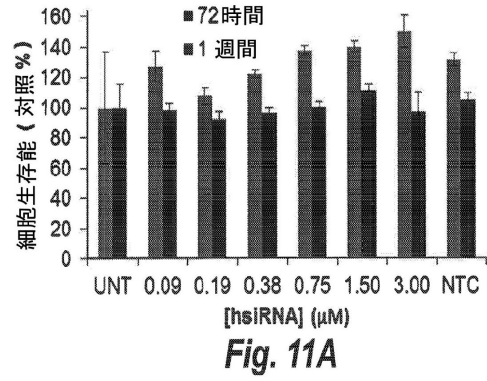
Fig. 10A



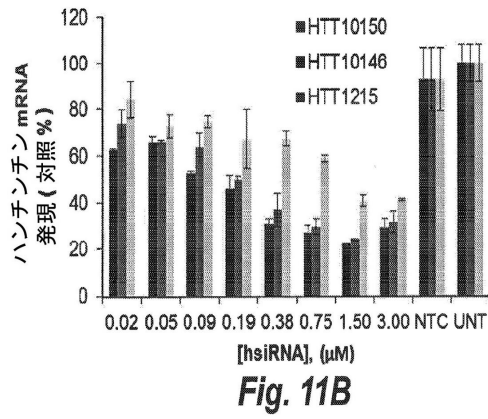
【 図 1 0 - 2 】



【 図 1 1 】

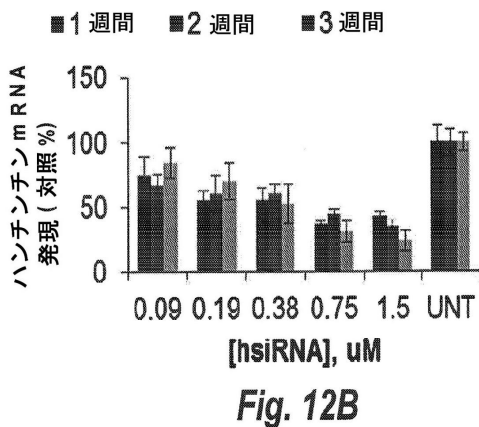
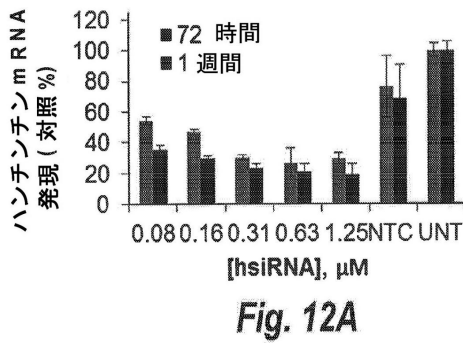


10

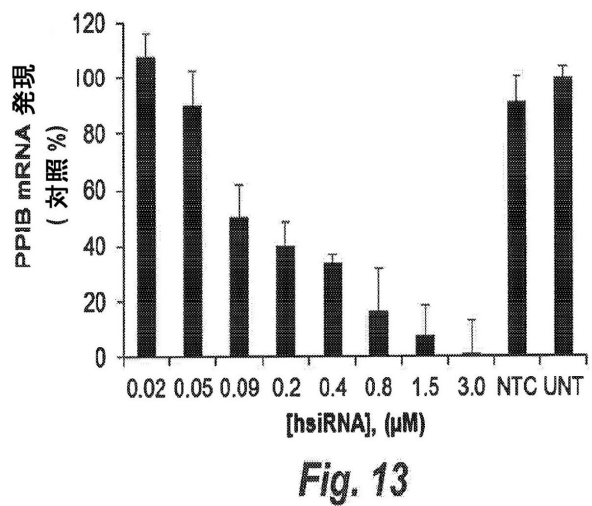


20

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



30

40

50

【 図 1 4 】

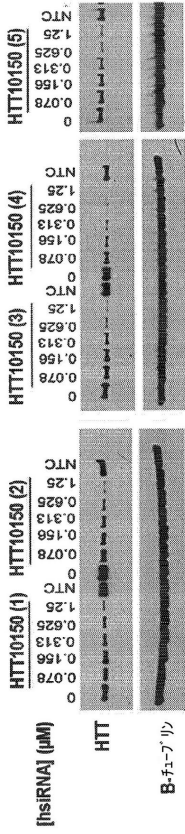


Fig. 14

【 図 1 5 】

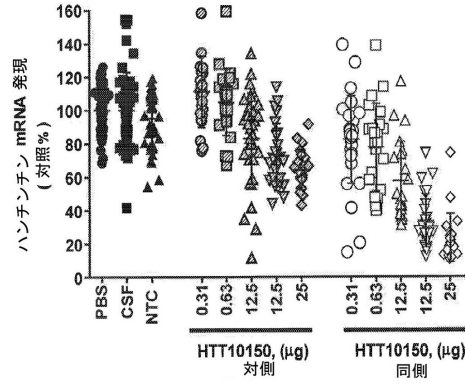


Fig. 15A

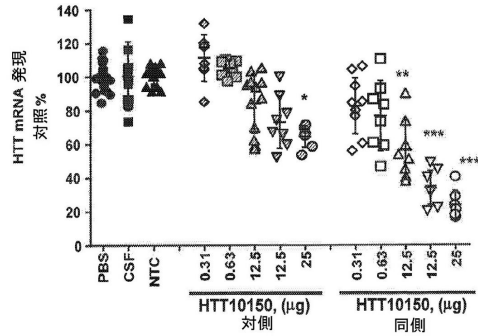


Fig. 15B

【 図 1 6 】

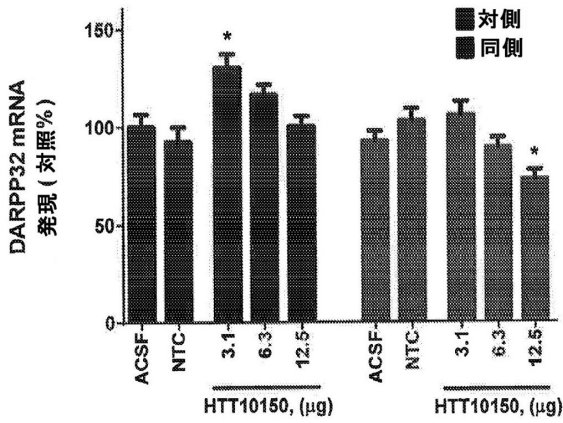


Fig. 16

【 図 1 7 】

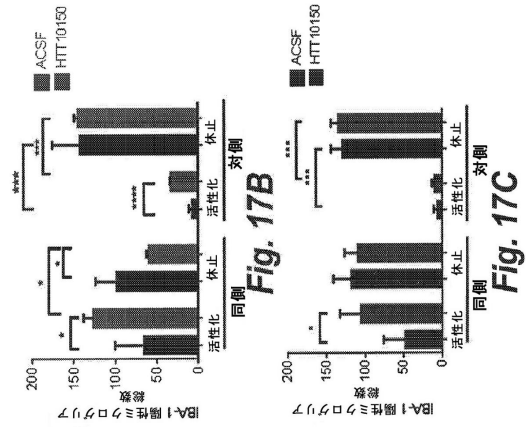


Fig. 17B

Fig. 17C

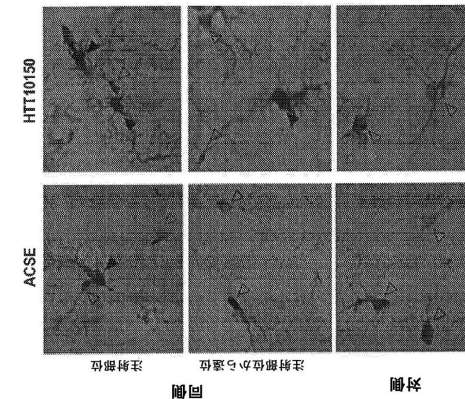


Fig. 17A

10

20

30

40

50



【 図 1 8 】

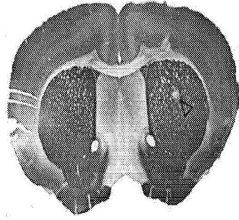


Fig. 18A

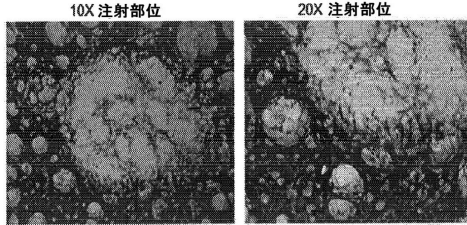


Fig. 18B

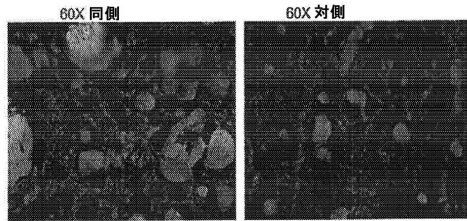


Fig. 18C

【 図 1 9 】

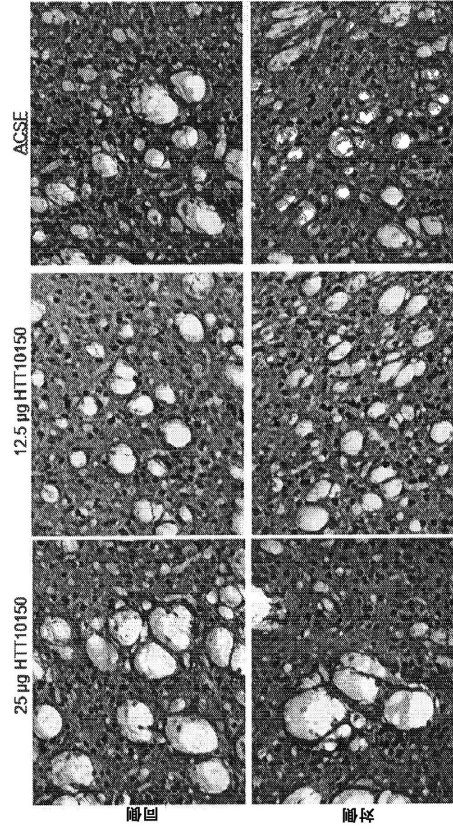


Fig. 19

10

20

【 図 2 0 】

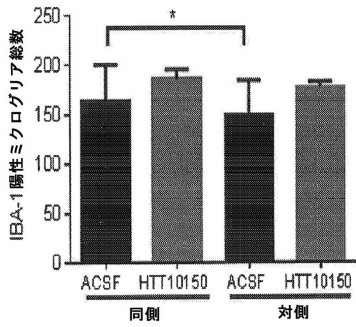


Fig. 20A

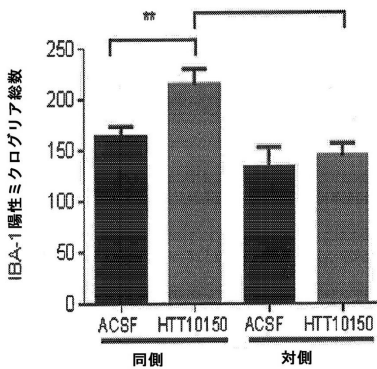


Fig. 20B

【 図 2 1 - 1 】

Table with 5 columns: ID, Accession Number, Position, Target Region (2D Sequence), and Target Region (3D Structure). It lists various protein sequences and their corresponding 3D structures.

Fig. 21

30

40

50

【図 21 - 2】

Table with 4 columns: HTT, No, Name, and Content. It lists various alphanumeric identifiers and their corresponding data points.

Fig. 21 (続き)

【図 21 - 3】

Table with 4 columns: センスネイクド, アンチセンスネイクド, センス順 (P0), and Content. It lists identifiers and their corresponding data points.

Fig. 21 (続き)

【図 21 - 4】

Table with 4 columns: アンチセンス順 (P0), センス順 (P1), and Content. It lists identifiers and their corresponding data points.

Fig. 21 (続き)

【図 21 - 5】

Table with 4 columns: アンチセンス順 (P1), センス順 (P2), and Content. It lists identifiers and their corresponding data points.

Fig. 21 (続き)

シート 347/136 から続き

シート 361/136 から続き

シート 351/136 から続き

シート 351/136 に続く

10

20

30

40

50



【図 2 3】

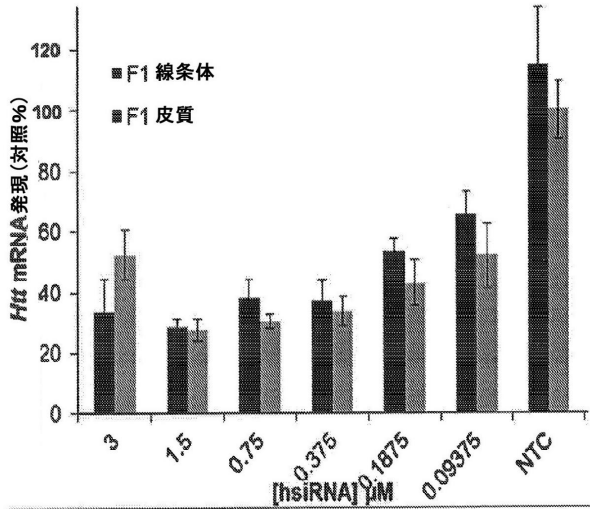


Fig. 23

【図 2 4】

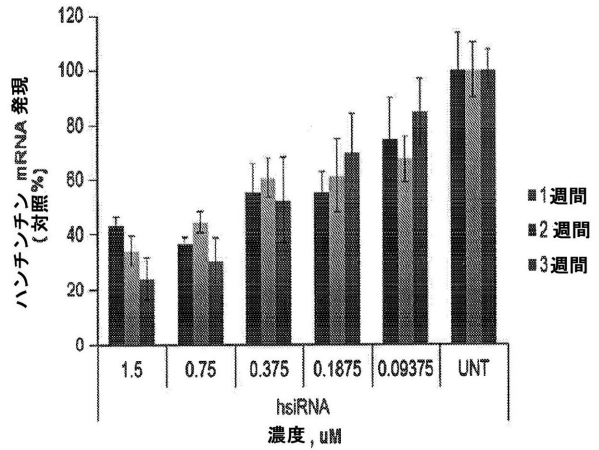


Fig. 24

【図 2 5】

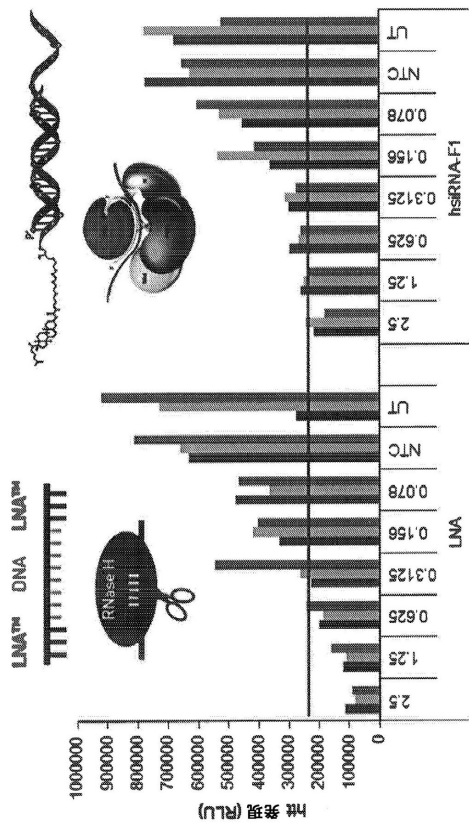


Fig. 25

【図 2 6】

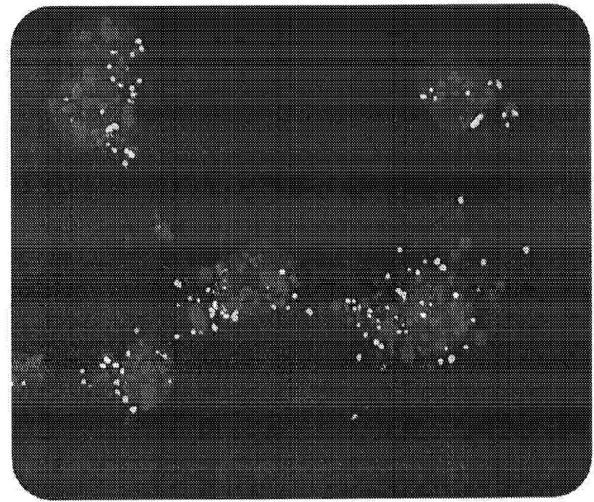


Fig. 26

10

20

30

40

50



【 図 2 7 】

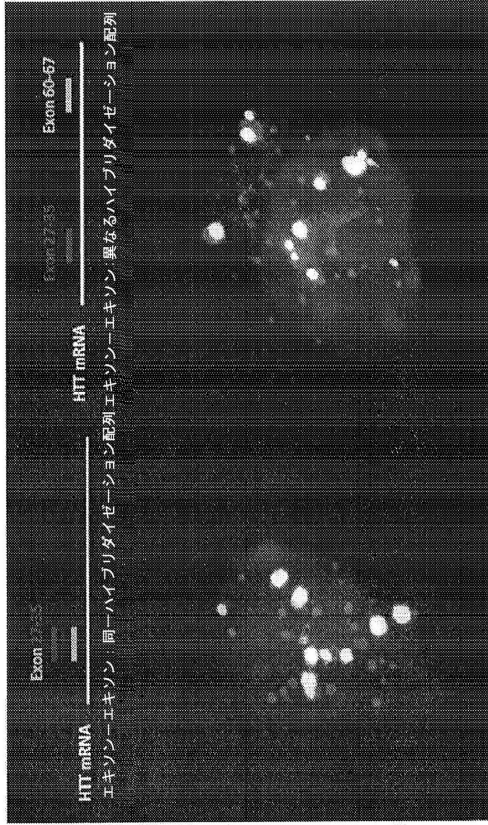


Fig. 27

【 図 2 8 】

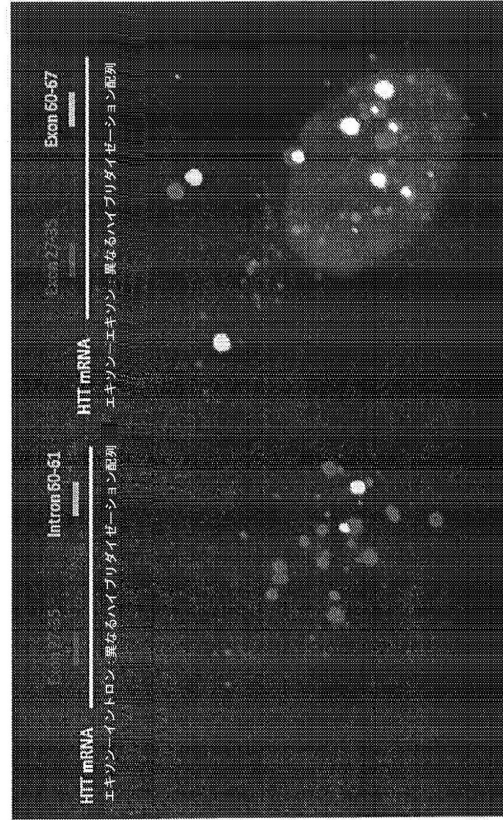


Fig. 28

【 図 2 9 】

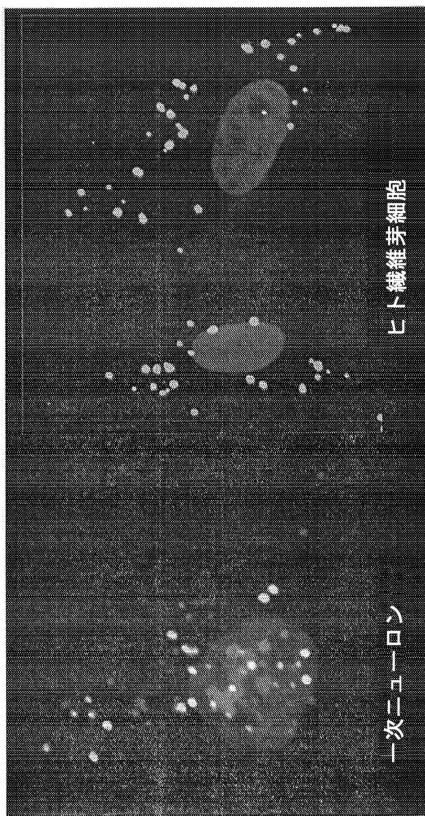


Fig. 29

【 図 3 0 】

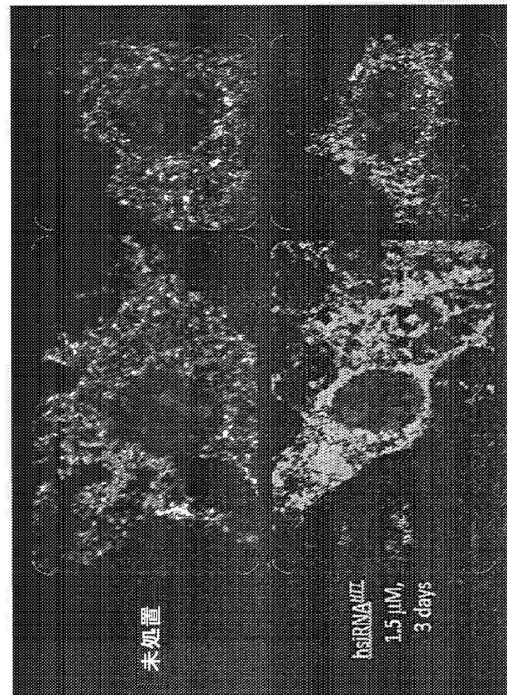


Fig. 30

10

20

30

40

50

【 図 3 1 】

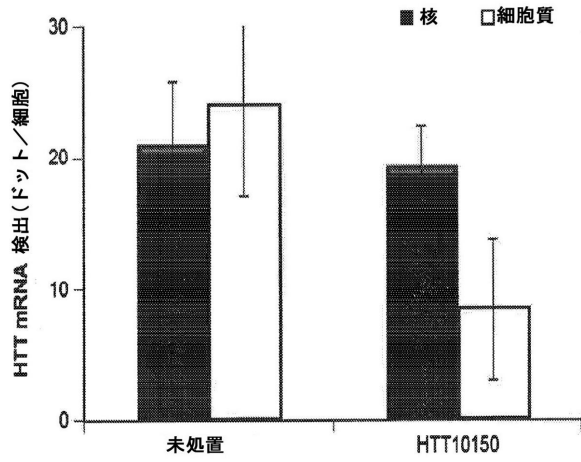


Fig. 31

【 図 3 2 】

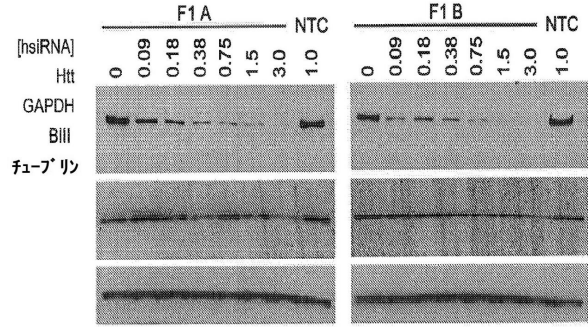


Fig. 32

【 図 3 3 】

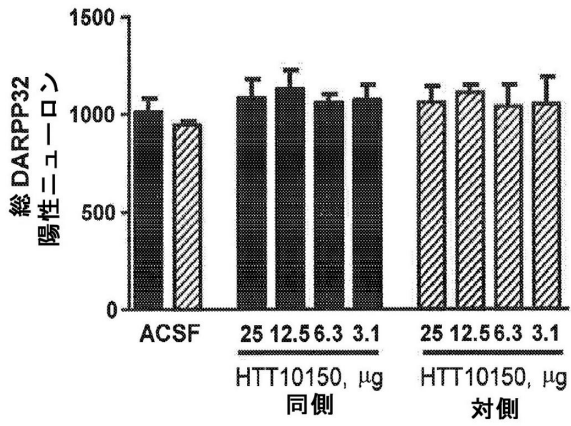


Fig. 33

【 図 3 4 】

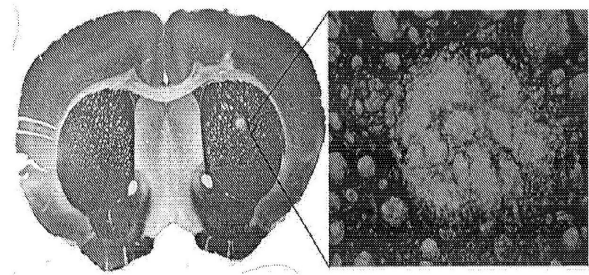


Fig. 34

10

20

30

40

50

【 図 3 5 - 1 】

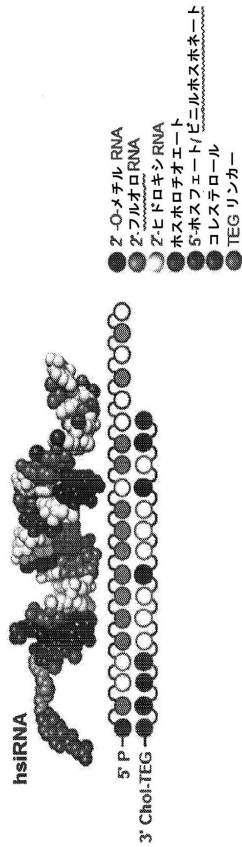


Fig. 35A

【 図 3 5 - 2 】

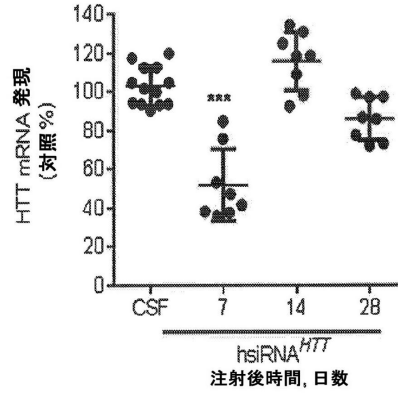


Fig. 35B

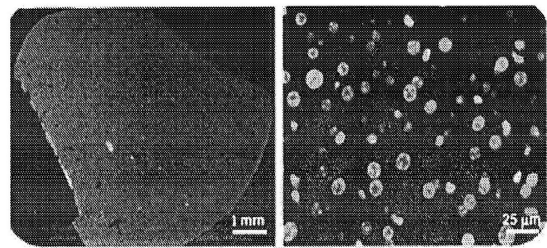


Fig. 35C

【 図 3 6 - 1 】

hsiRNA ID	hsiRNA 構造	IC50 (受動的取り込み)	IC50 (脂質介在取り込み)
hsiRNA <sup>HTT</sup>		180 nM	7.5 μM
FM.1-hsiRNA <sup>HTT</sup>		70 nM	2.3 μM
フルオロ AS-hsiRNA <sup>HTT</sup>		222 nM	2.9 μM
フルオロ AS-hsiRNA <sup>HTT</sup>		251 nM	6.4 μM
FM-hsiRNA-mismatch <sup>HTT</sup>		136 nM	3.4 μM
フルオロ AS-hsiRNA-mismatch <sup>HTT</sup>		279 nM	2.9 μM

○ 2'-OH ● 2'-O-Methyl ● 2'-F ● 2'-F Mismatch ● Phosphorothioate ● Phosphorothioate

Fig. 36A

【 図 3 6 - 2 】

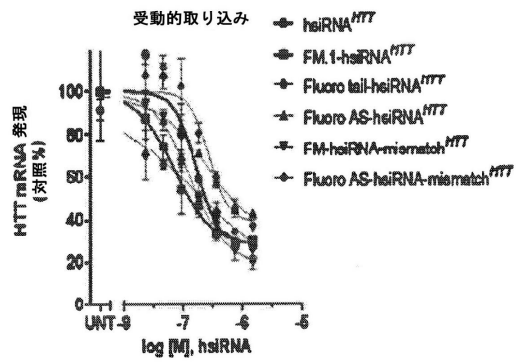


Fig. 36B

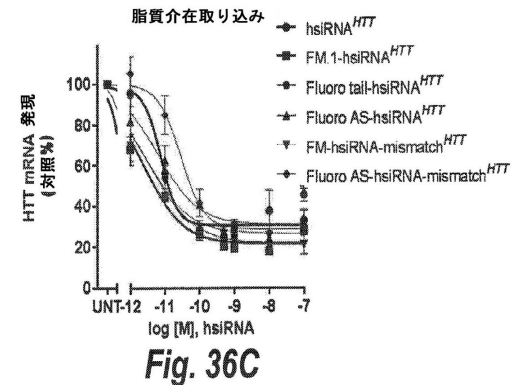


Fig. 36C

10

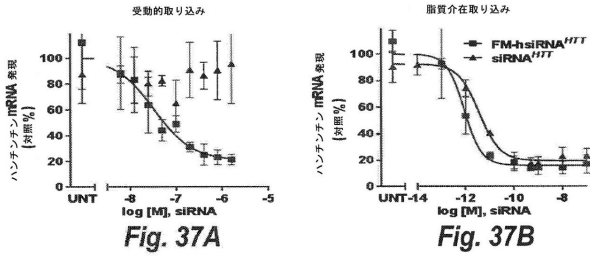
20

30

40

50

【 37 】



	siRNA <sup>HTT</sup>	FM-hsiRNA <sup>HTT</sup>
IC50 (受動取り込み)	N/A	33.5 nM
IC50 (脂質介在取り込み)	3.5 pM	0.9 pM

Fig. 37C

【 38 】

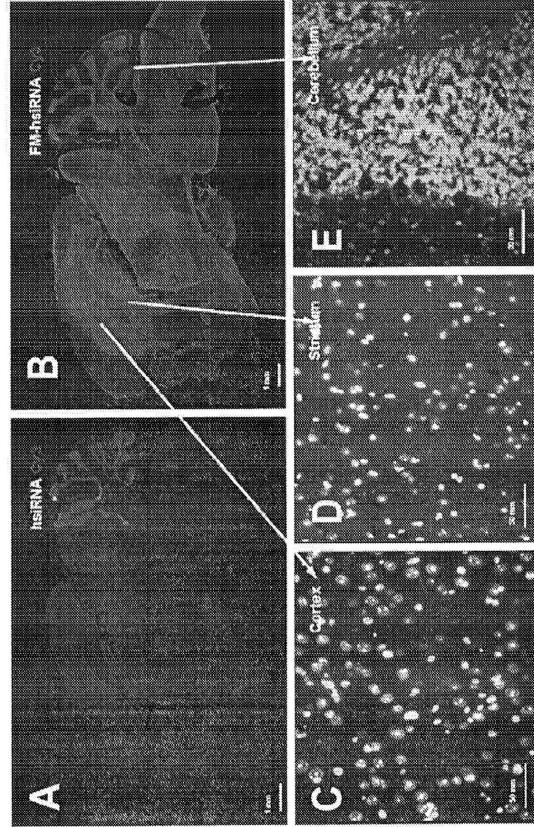


Fig. 38A-E

【 39 】

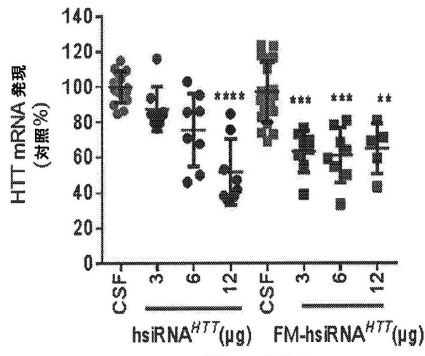


Fig. 39A

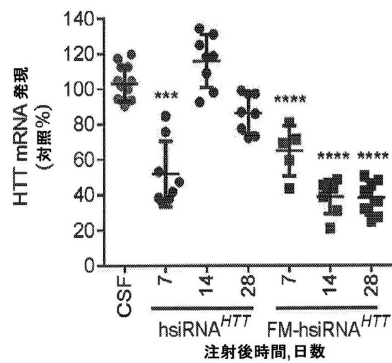


Fig. 39B

【 40 】

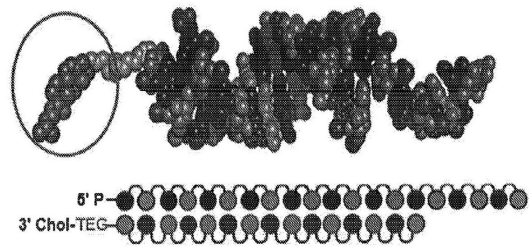


Fig. 40A

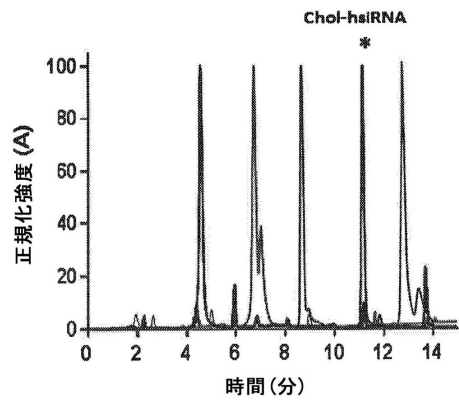


Fig. 40B

10

20

30

40

50



【 図 4 1 】

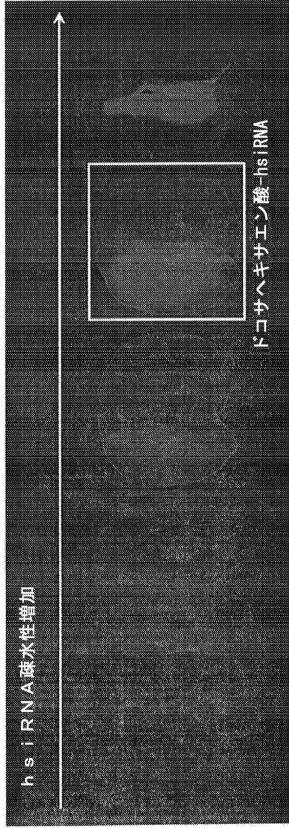


Fig. 41

【 図 4 2 】

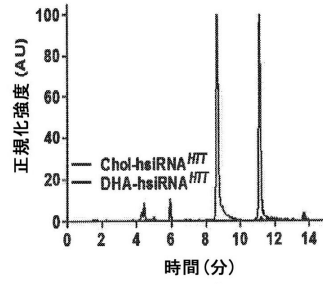
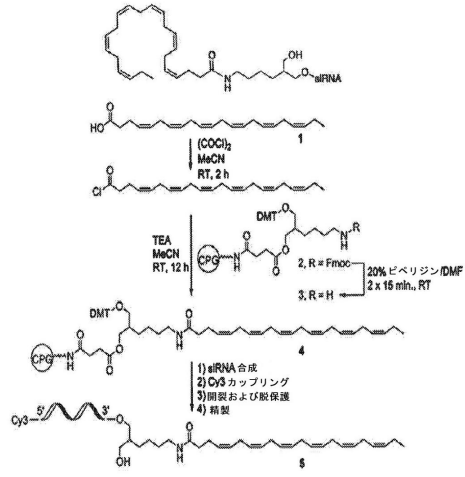


Fig. 42

【 図 4 3 】

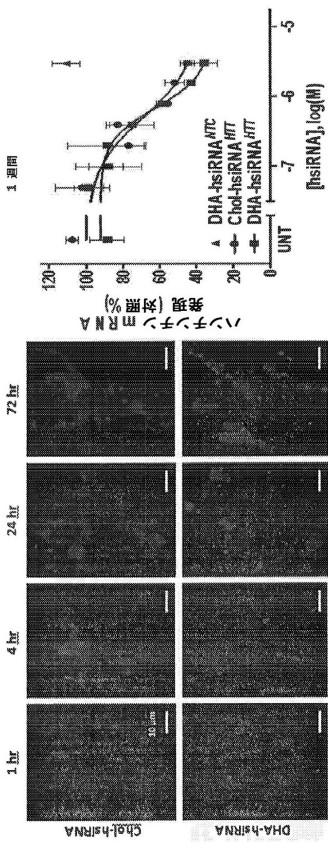


Fig. 43

【 図 4 4 】

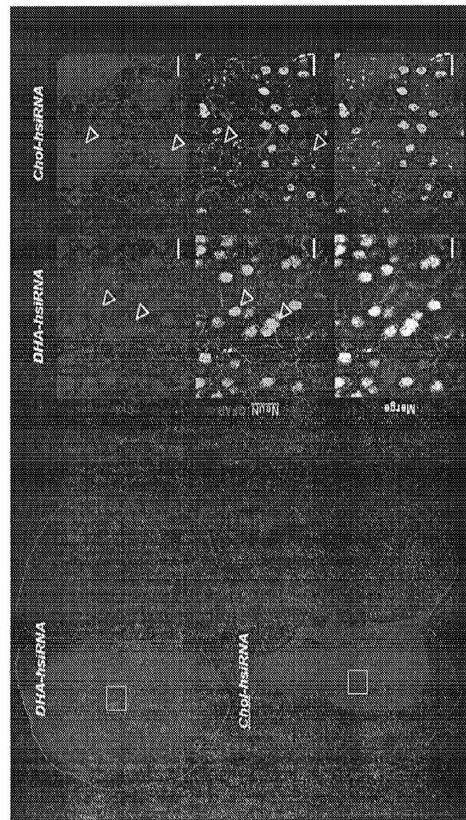


Fig. 44

10

20

30

40

50

【 4 5 】

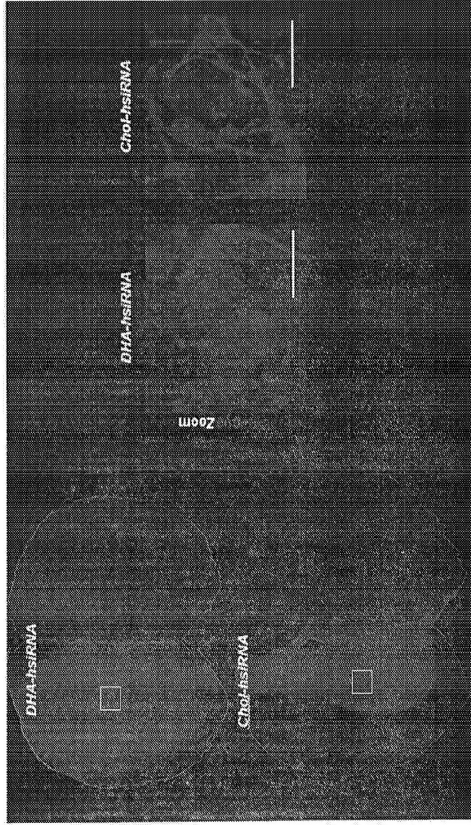


Fig. 45

【 4 6 】

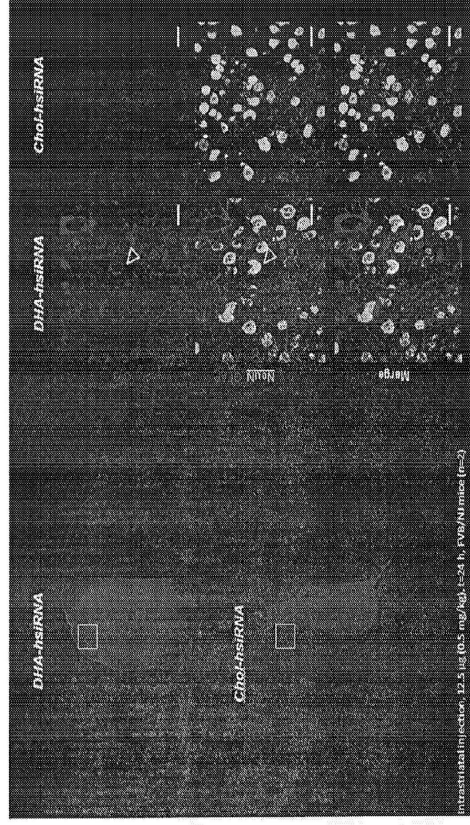


Fig. 46

【 4 7 】

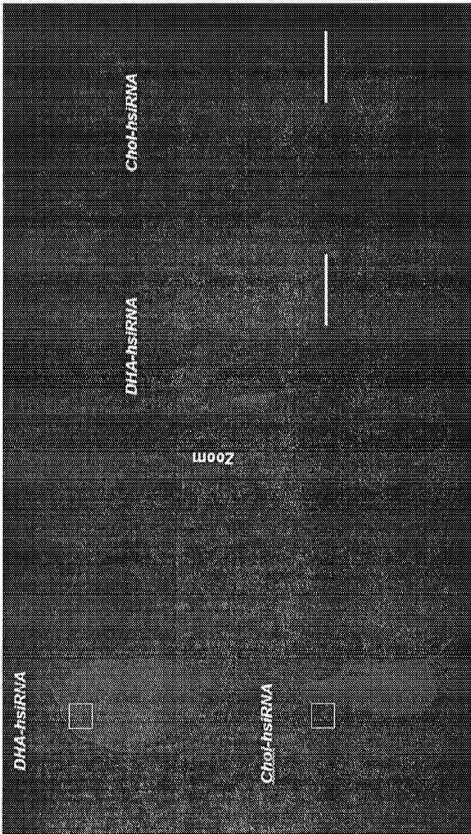


Fig. 47

【 4 8 】

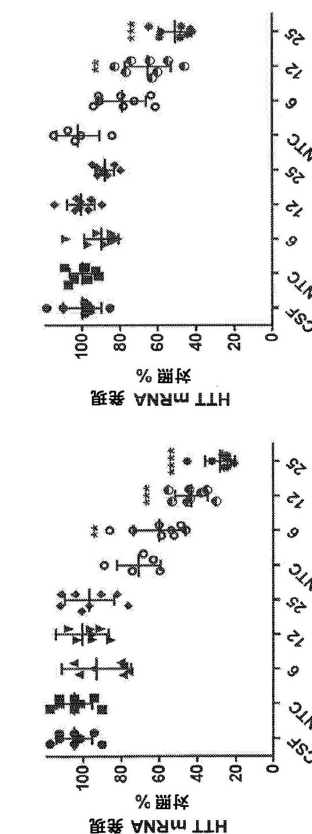


Fig. 48

10

20

30

40

50

【 図 49 】

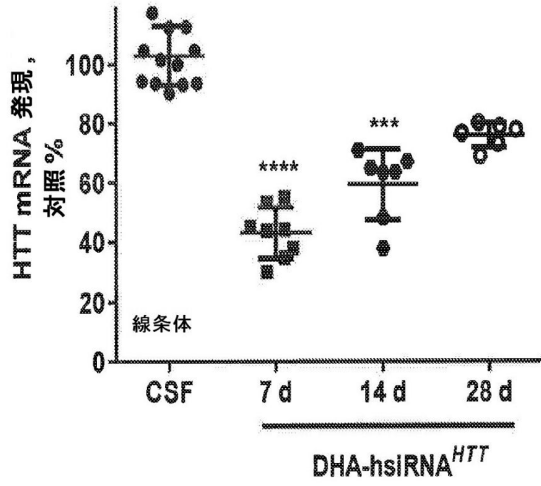


Fig. 49

【 図 50 】

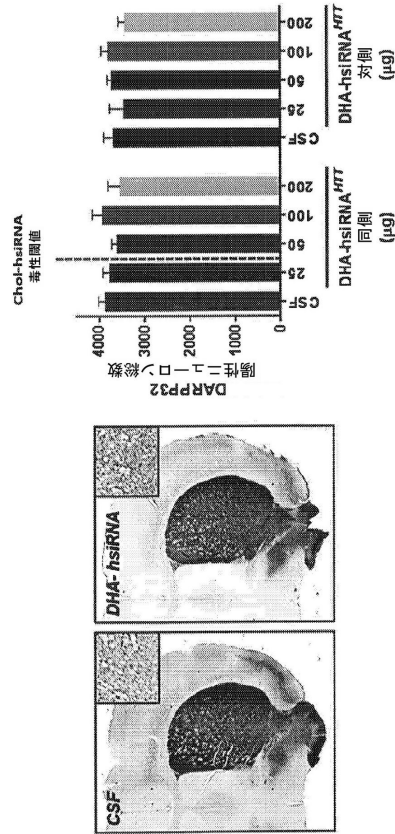


Fig. 50

【 図 51 】

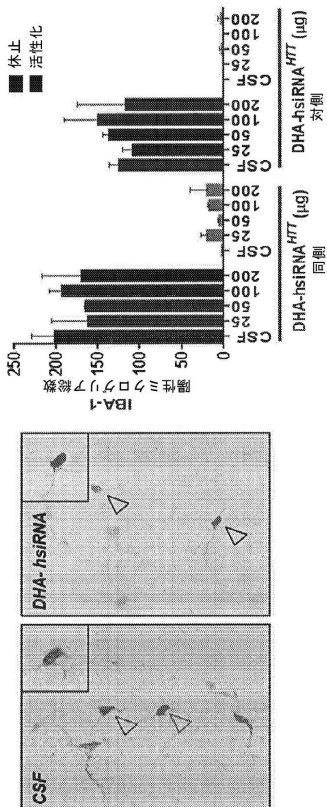


Fig. 51

【 図 52 】

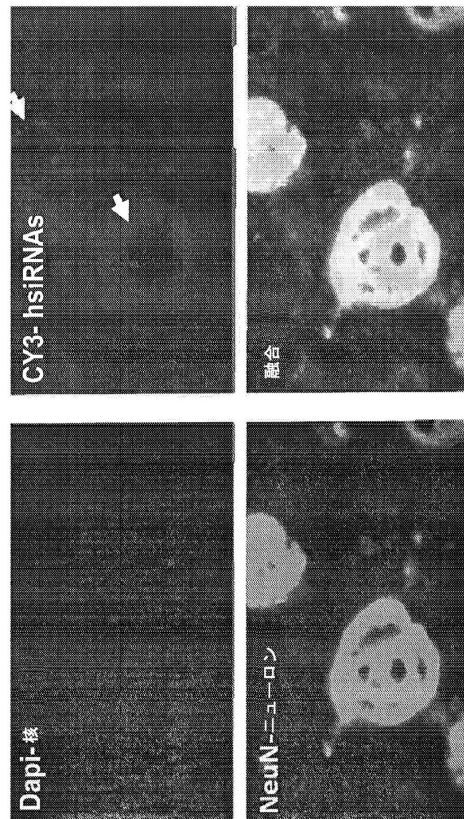


Fig. 52

10

20

30

40

50



【 図 5 3 】

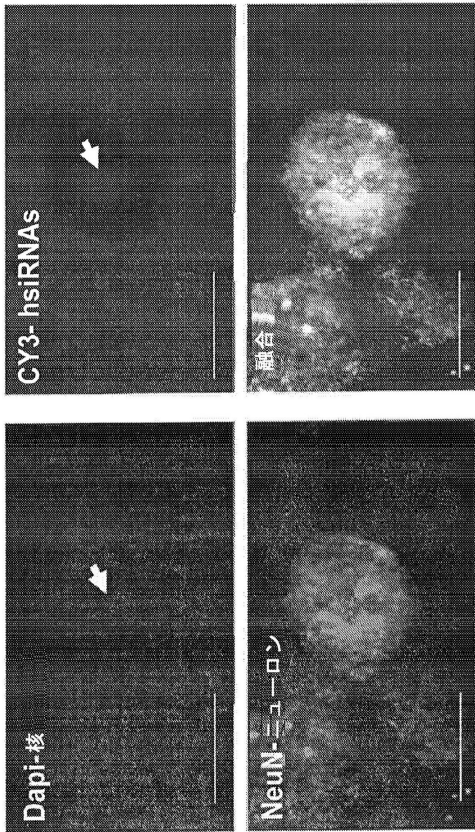


Fig. 53

【 図 5 4 】

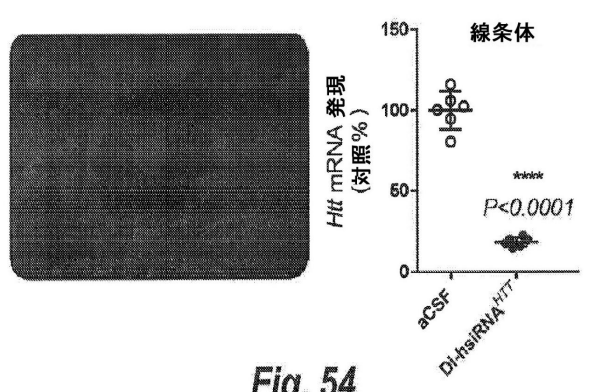


Fig. 54

10

20

【 図 5 5 】

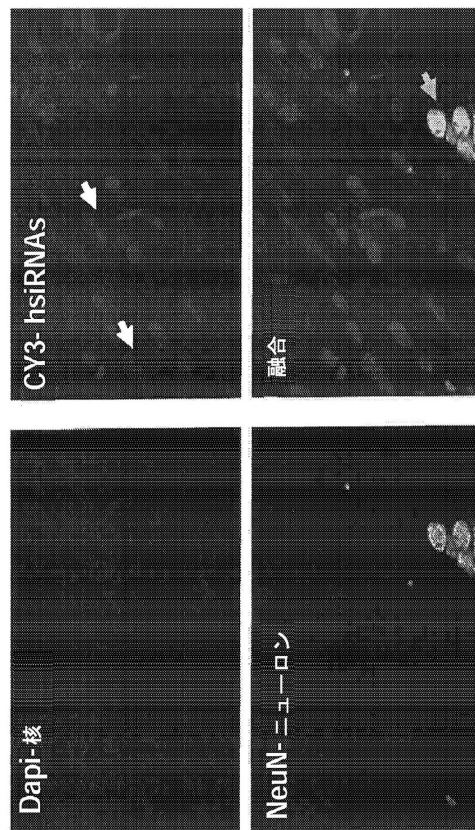


Fig. 55

【 図 5 6 】

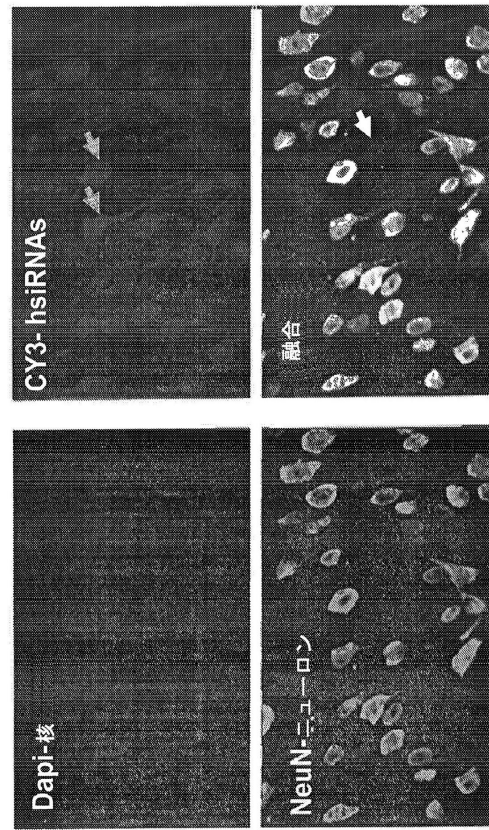


Fig. 56

30

40

50

【图 5 7】

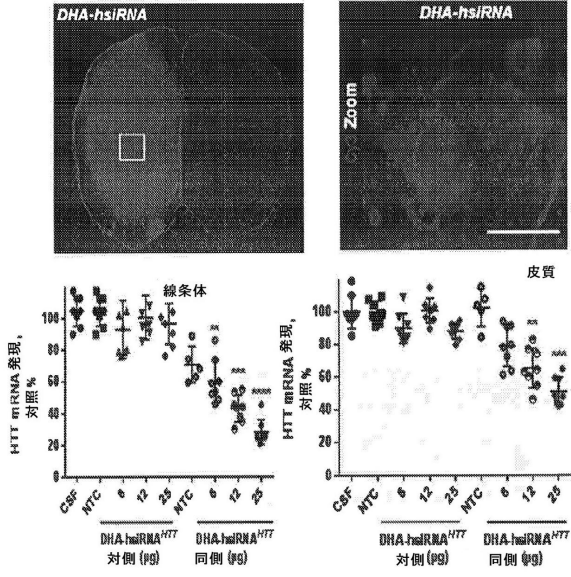


Fig. 57

【图 5 8】

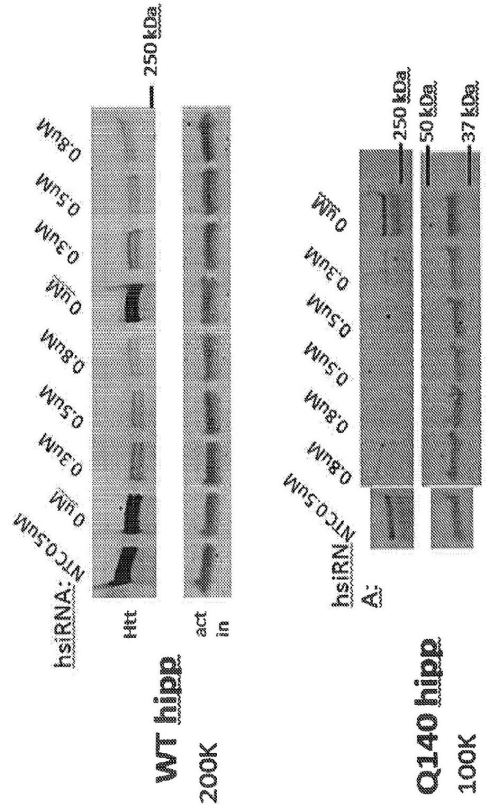


Fig. 58

【图 5 9】

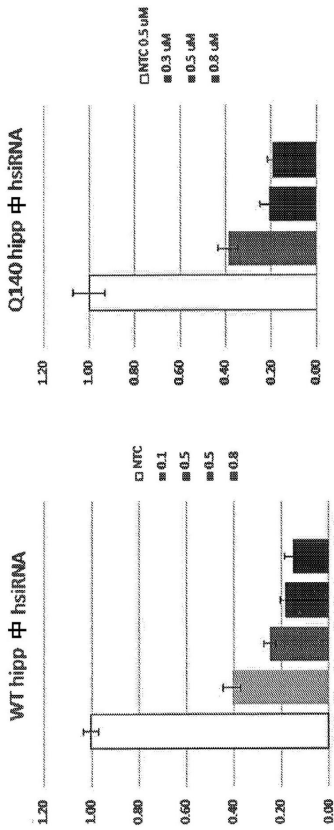


Fig. 59

【图 6 0】

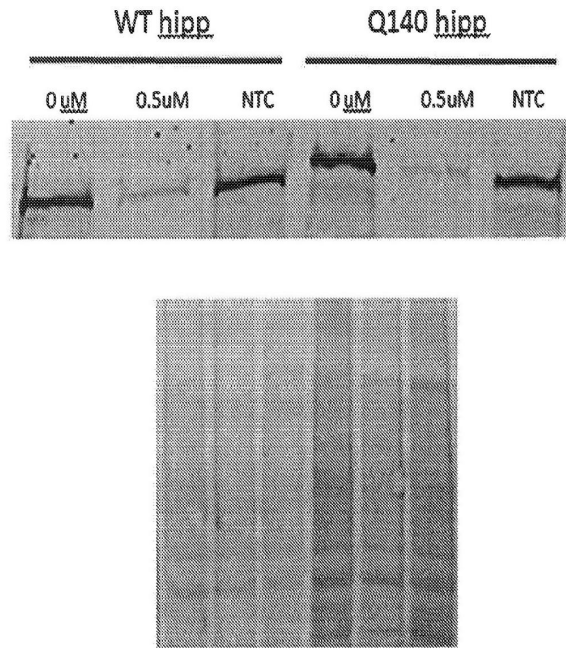


Fig. 60

10

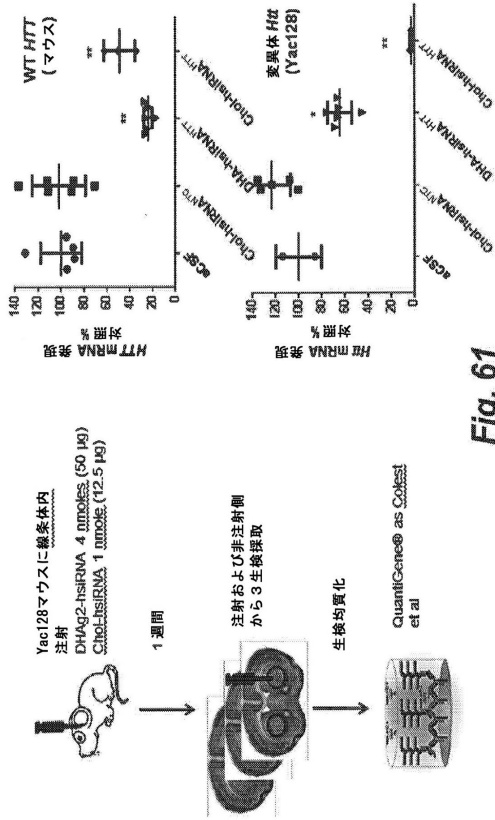
20

30

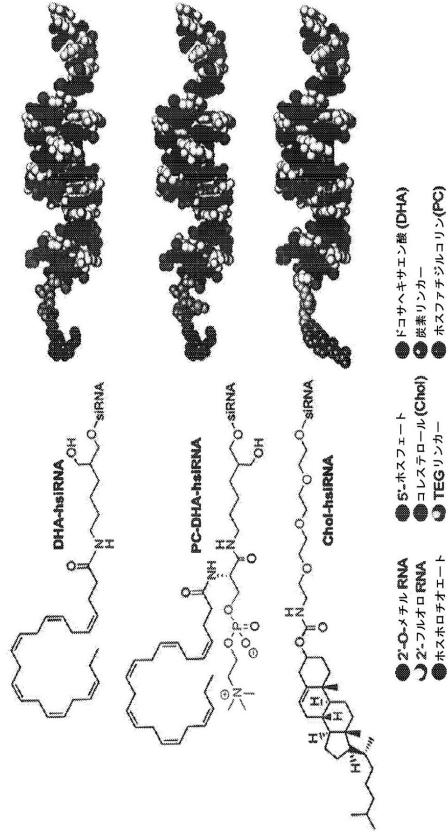
40

50

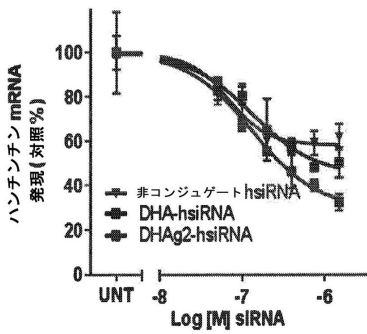
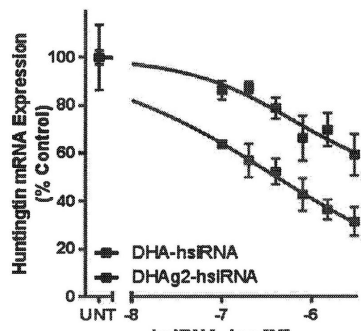
【 図 6 1 】



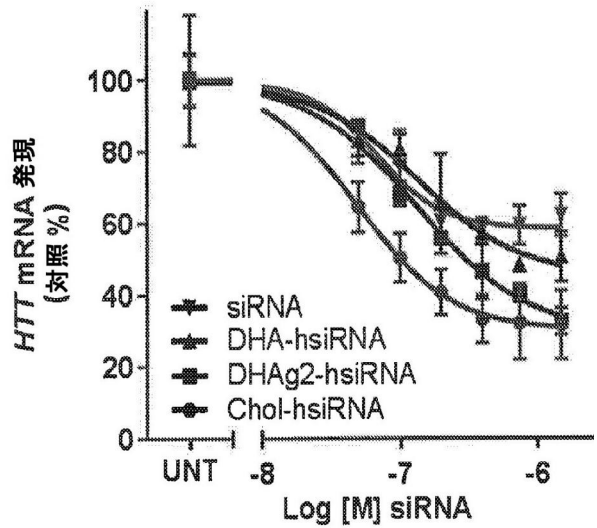
【 図 6 2 】



【 図 6 3 】



【 図 6 4 】



10

20

30

40

50

【 図 6 5 】

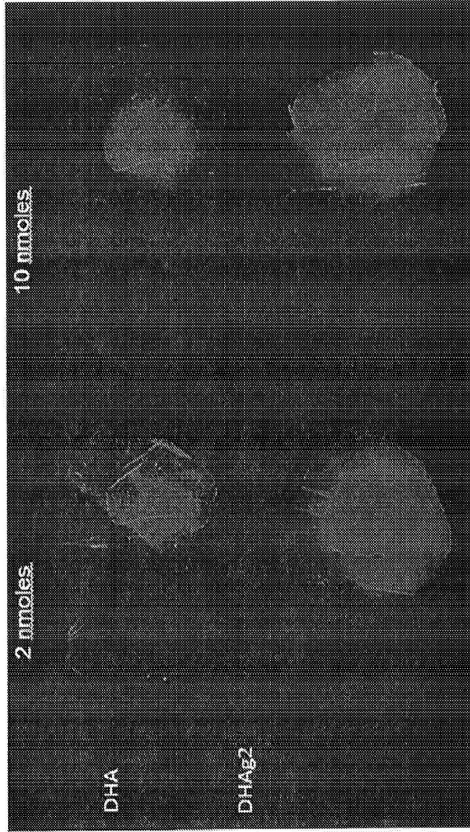


Fig. 65

【 図 6 6 】

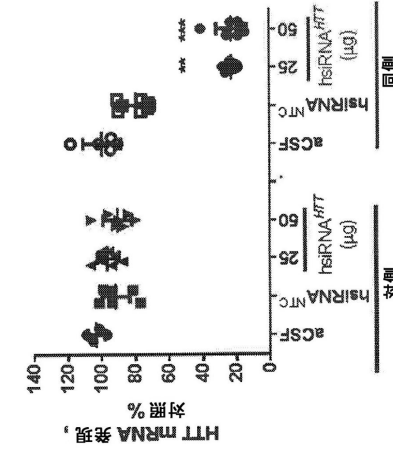
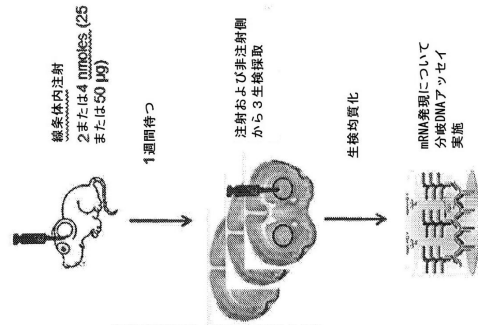


Fig. 66



【 図 6 7 】

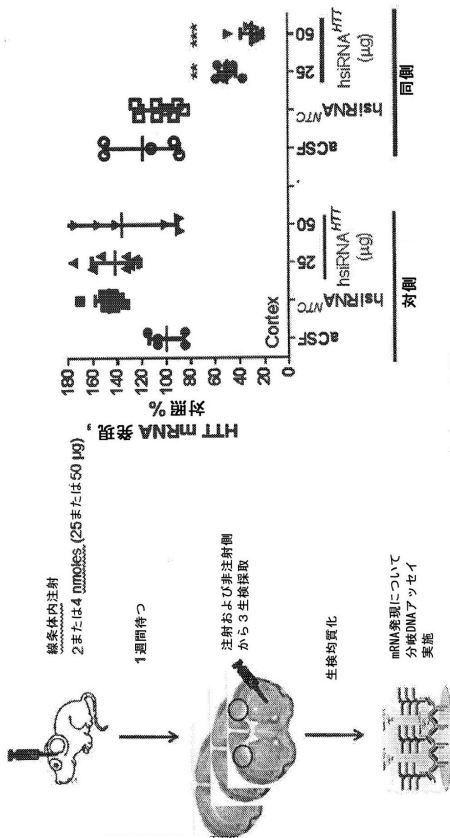


Fig. 67

【 図 6 8 】

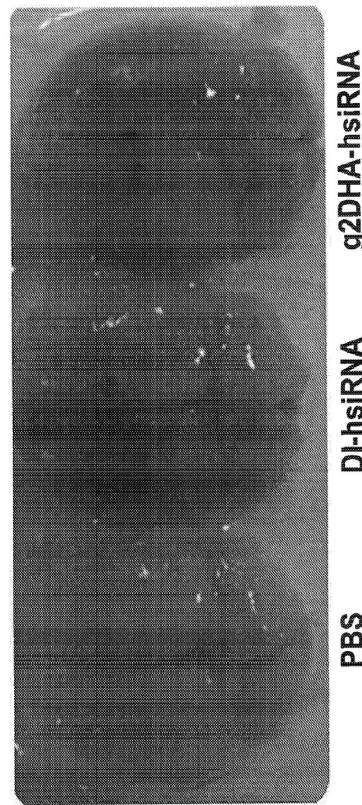


Fig. 68

10

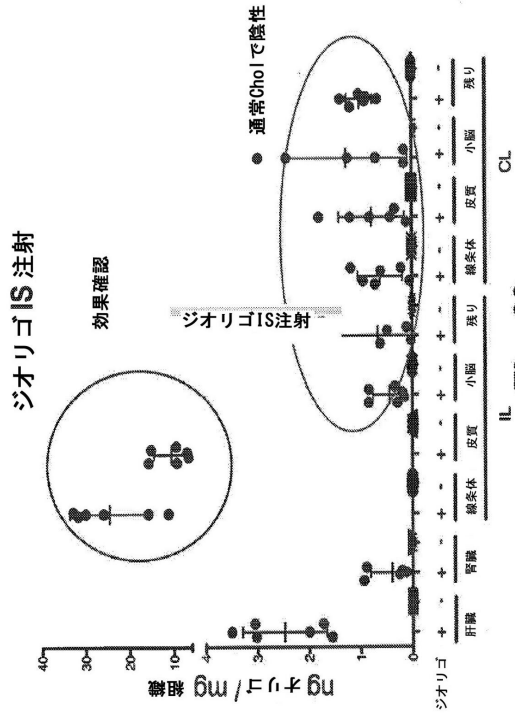
20

30

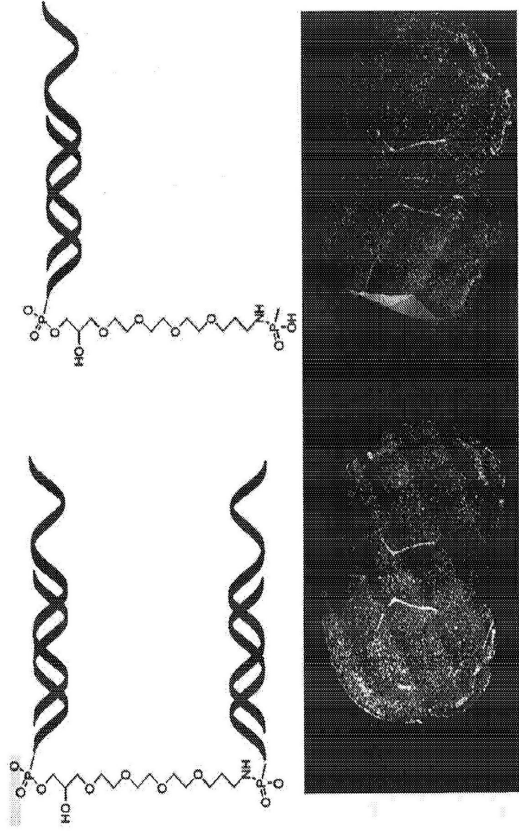
40

50

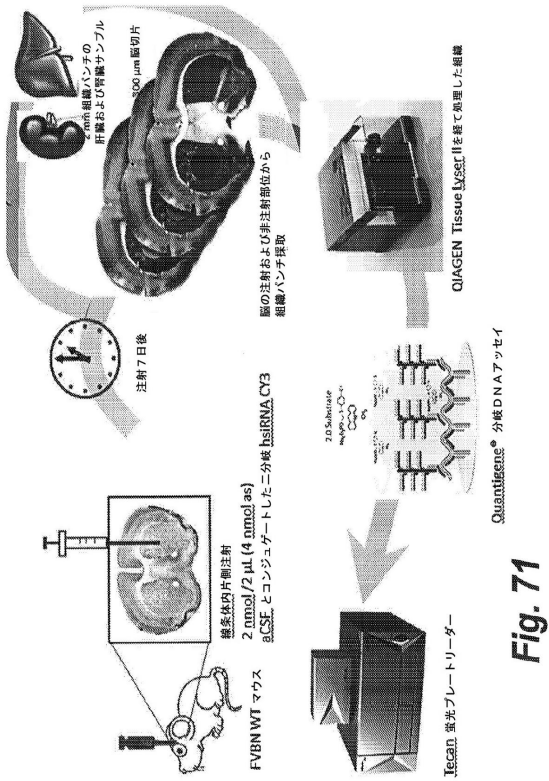
【 図 6 9 】



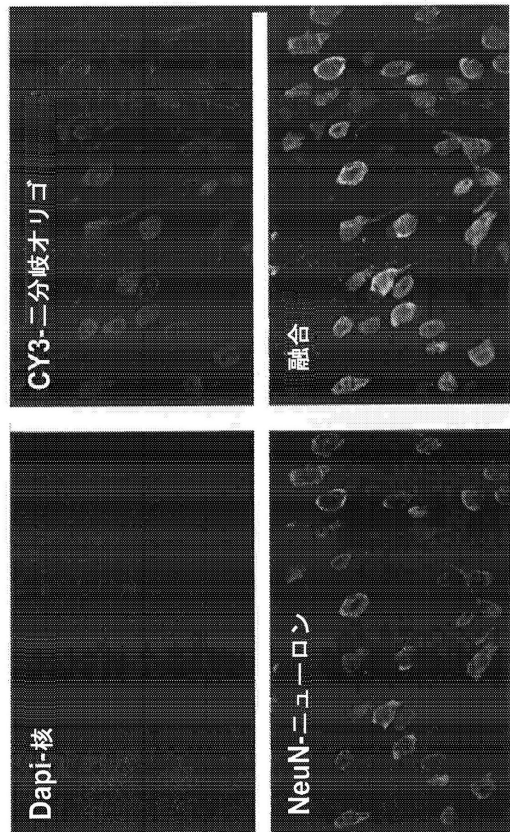
【 図 7 0 】



【 図 7 1 】



【 図 7 2 】





【 図 7 3 】

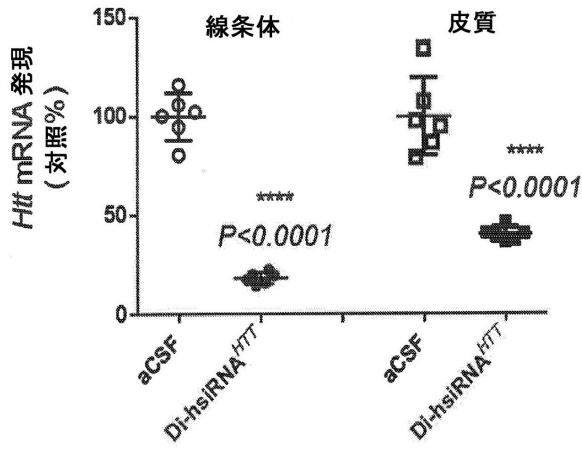


Fig. 73

【 図 7 4 】

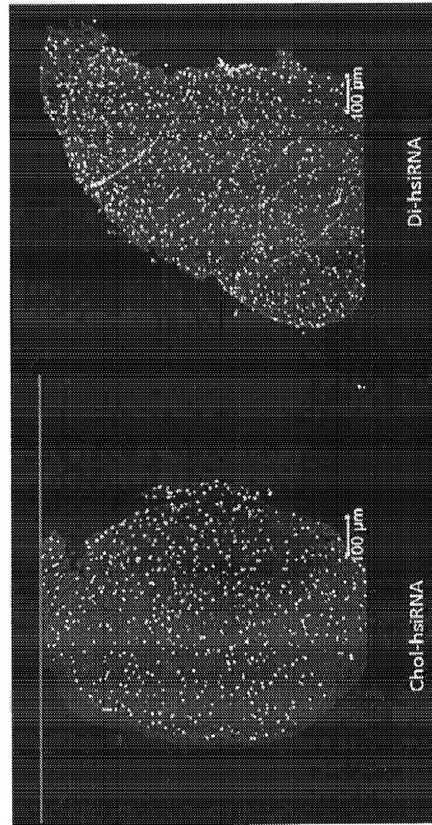


Fig. 74

【 図 7 5 】

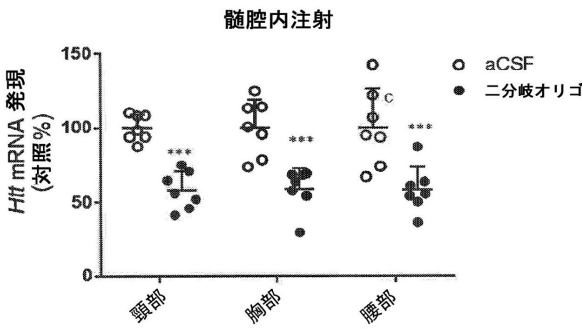


Fig. 75

【 図 7 6 】

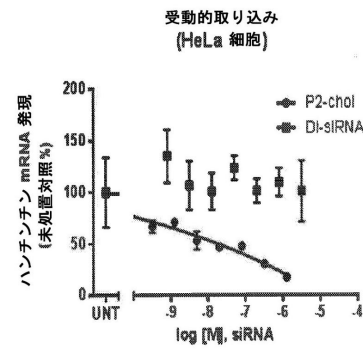


Fig. 76A

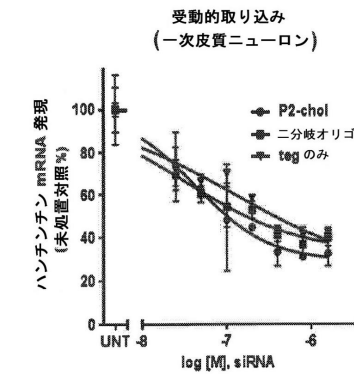


Fig. 76B

10

20

30

40

50

【 図 7 7 】

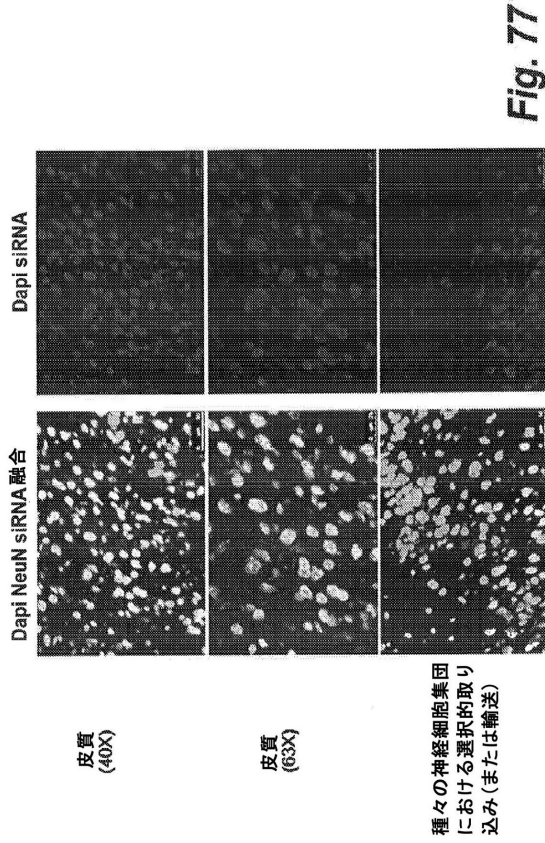


Fig. 77

【 図 7 8 】

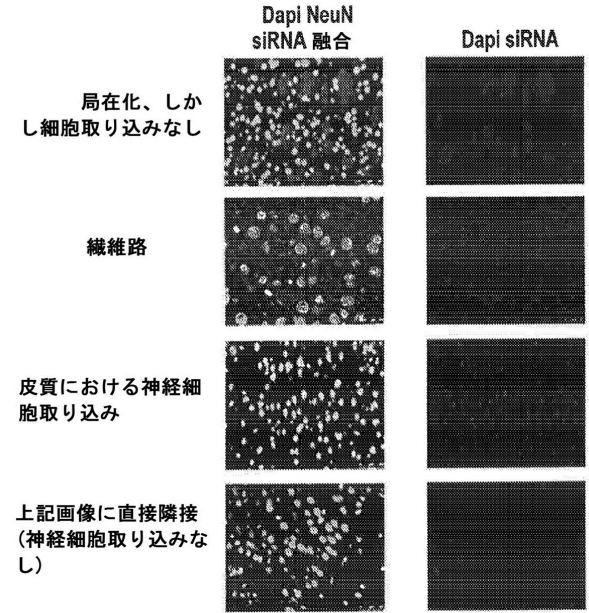


Fig. 78

【 図 7 9 】

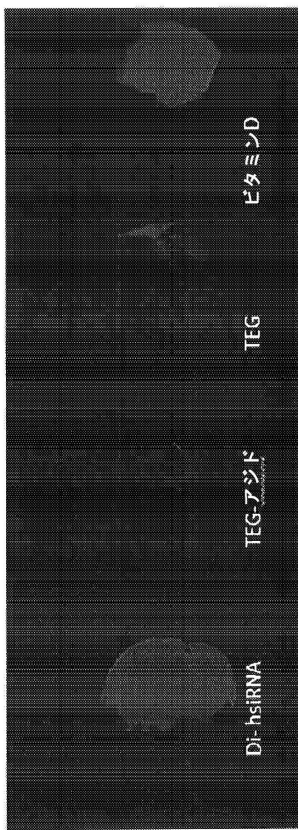


Fig. 79

【 図 8 0 】

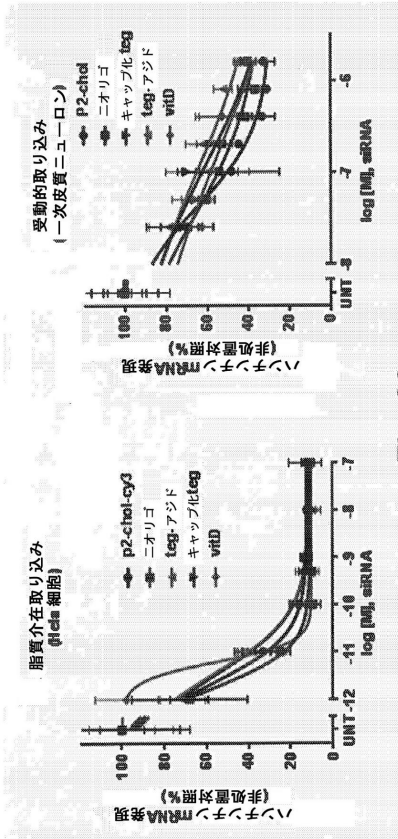


Fig. 80

10

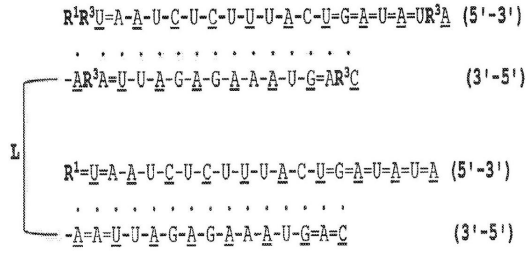
20

30

40

50

【 図 8 1 】



凡例

$X$ - 2'-デオキシ-2'-フルオロ  
 $X$ - 2'-O-メチル

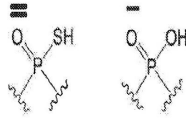
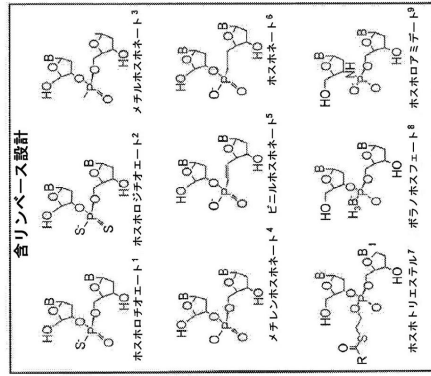


Fig. 81

【 図 8 2 】



R3 定義

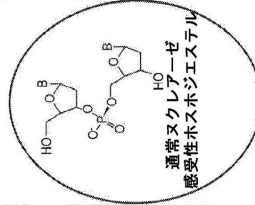
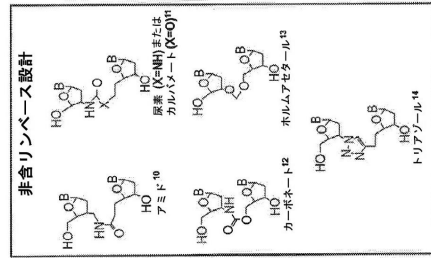


Fig. 82



【 図 8 3 】

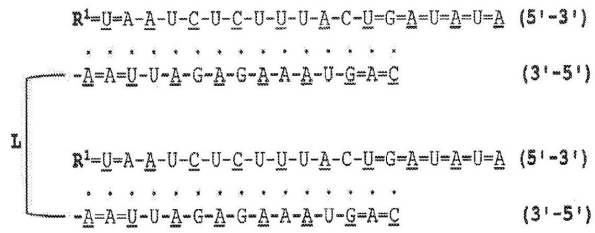
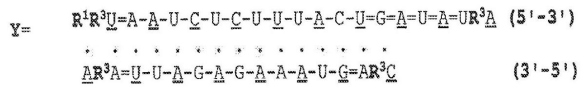
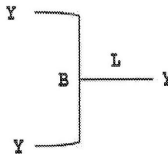


Fig. 83

【 図 8 4 】



凡例

$X$ - 2'-デオキシ-2'-フルオロ  
 $X$ - 2'-O-メチル

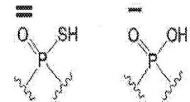


Fig. 84

10

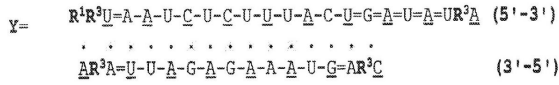
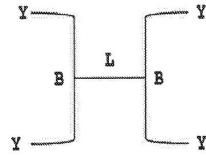
20

30

40

50

【 図 8 5 】



凡例

X- 2'-デオキシ-2'-フルオロ  
 X- 2'-O-メチル

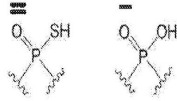


Fig. 85

【 図 8 6 】

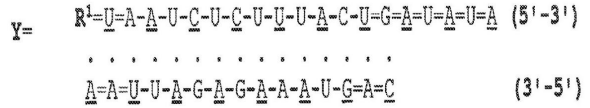
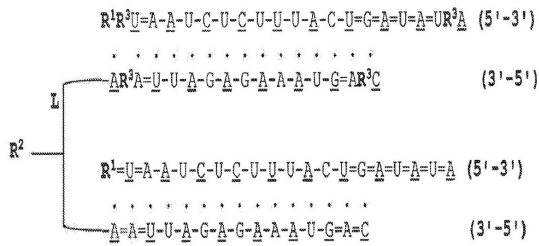


Fig. 86

10

【 図 8 7 】



凡例

X- 2'-デオキシ-2'-フルオロ  
 X- 2'-O-メチル

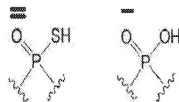


Fig. 87

【 図 8 8 】

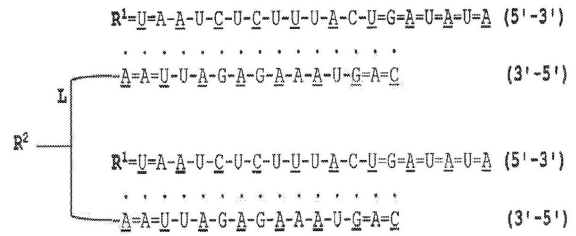


Fig. 88

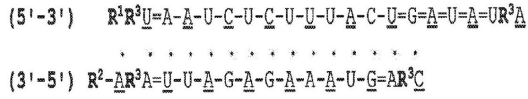
20

30

40

50

【 89 】



凡例

X- 2'-デオキシ-2'-フルオロ  
 X- 2'-O-メチル

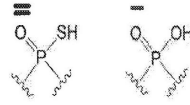


Fig. 89

【 90 】

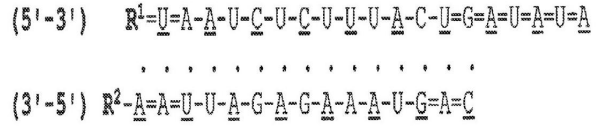


Fig. 90

【 91 - 1 】

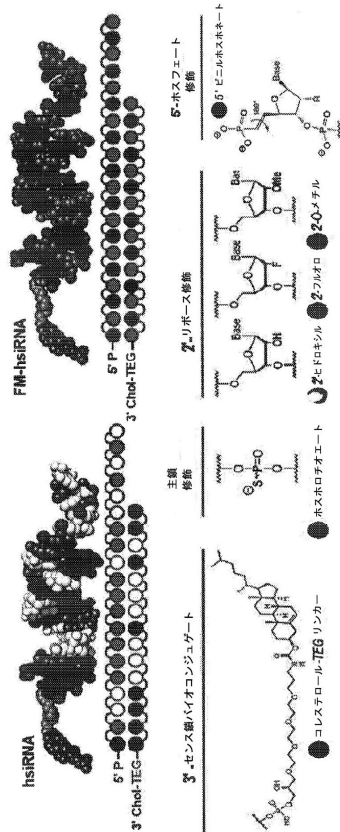


Fig. 91A

【 91 - 2 】

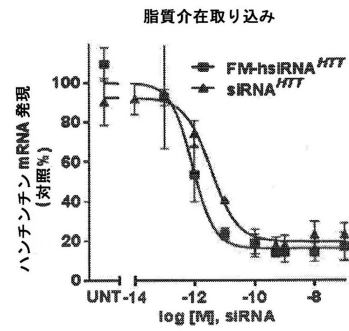


Fig. 91B

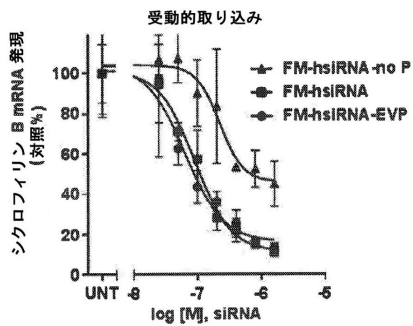


Fig. 91C

10

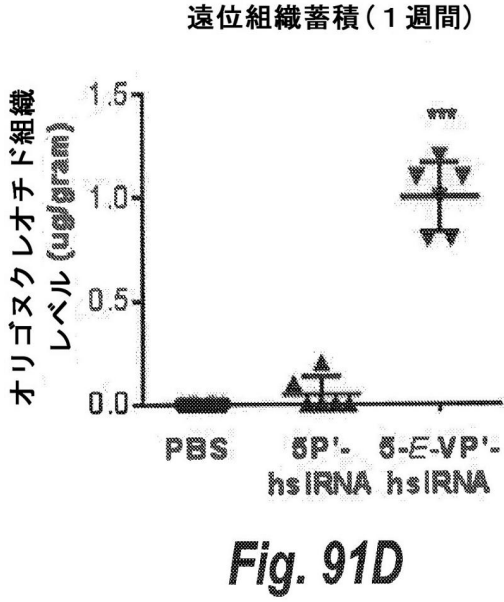
20

30

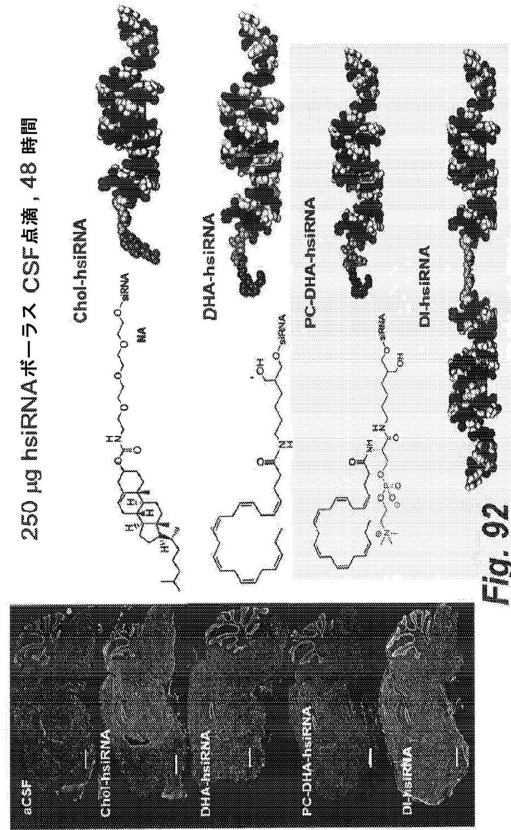
40

50

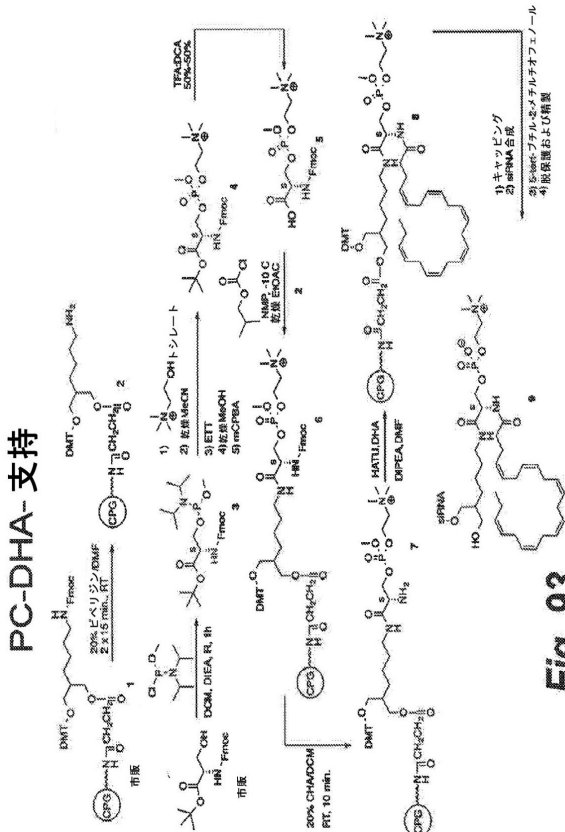
【 図 9 1 - 3 】



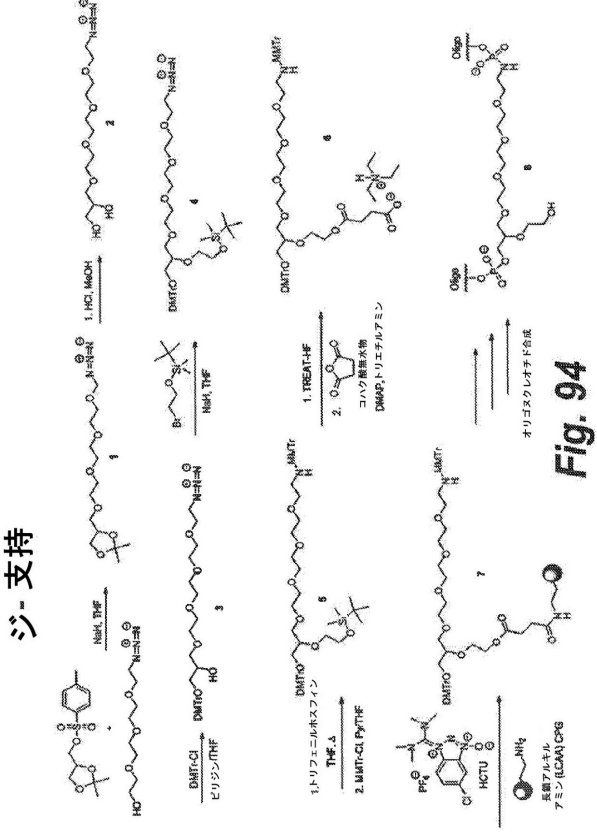
【 図 9 2 】



【 図 9 3 】



【 図 9 4 】



10

20

30

40

50

【 図 95 - 1 】

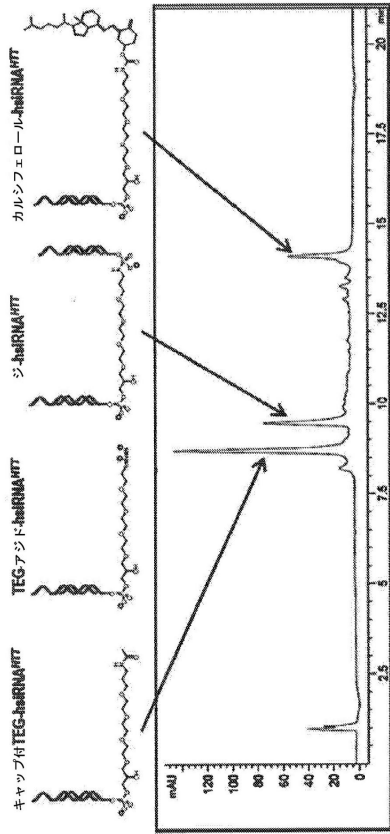


Fig. 95A

【 図 95 - 2 】

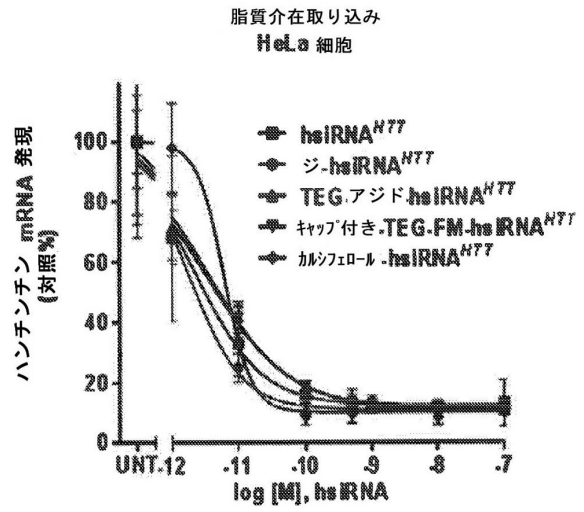


Fig. 95B

【 図 95 - 3 】

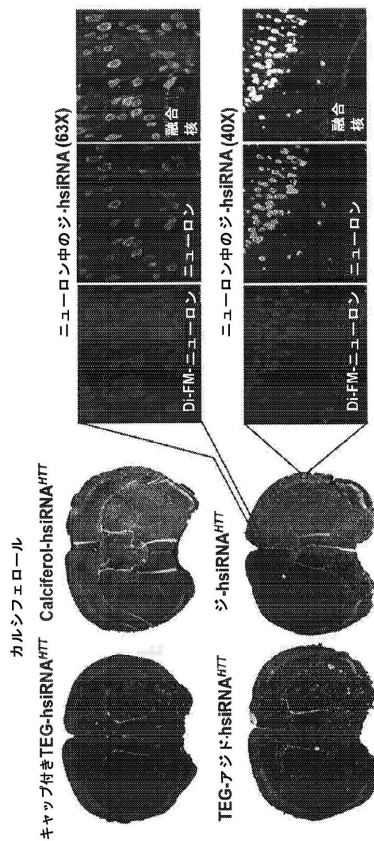


Fig. 95C

【 図 96 】

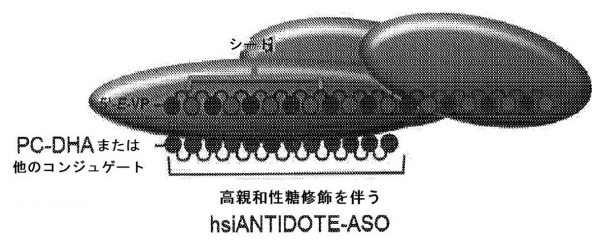


Fig. 96

10

20

30

40

50

【 図 97 】

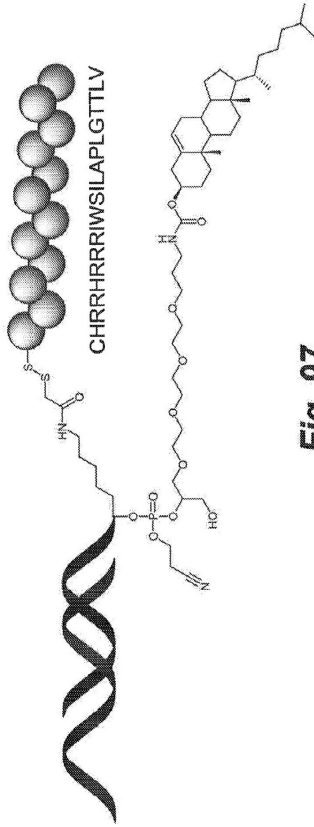


Fig. 97

【 図 98 - 1 】

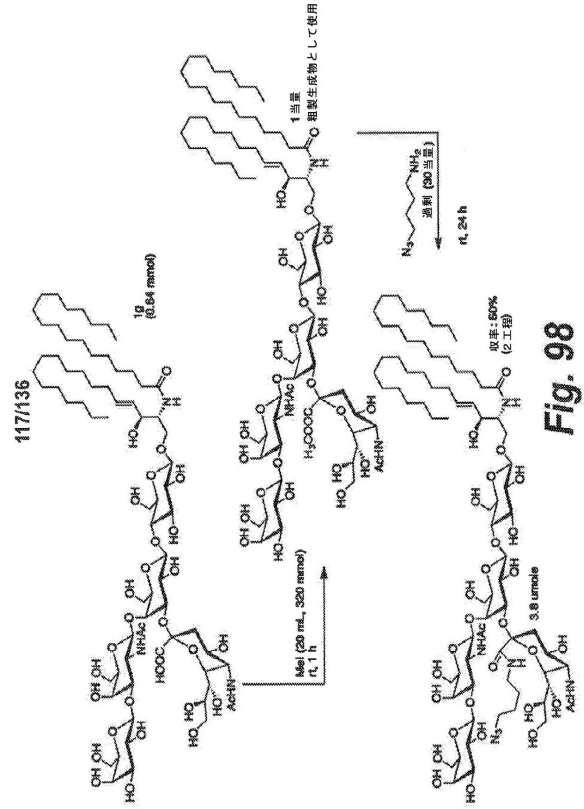


Fig. 98

【 図 98 - 2 】

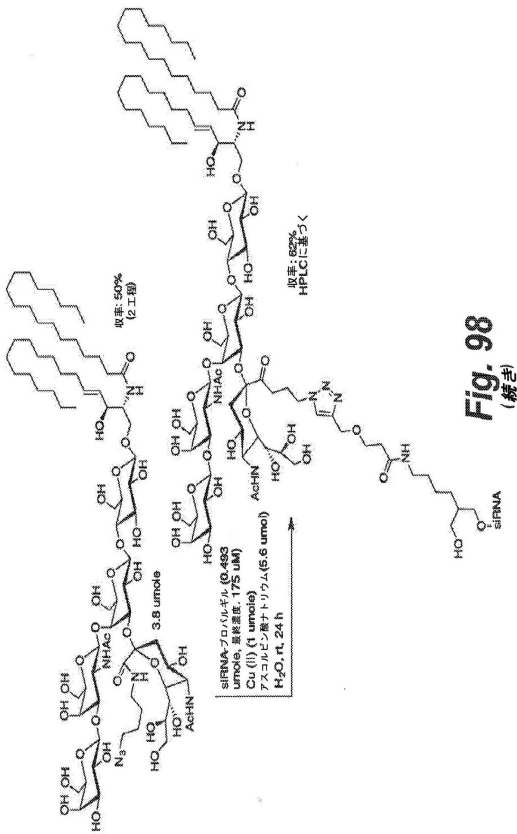


Fig. 98 (続き)

【 図 99 】

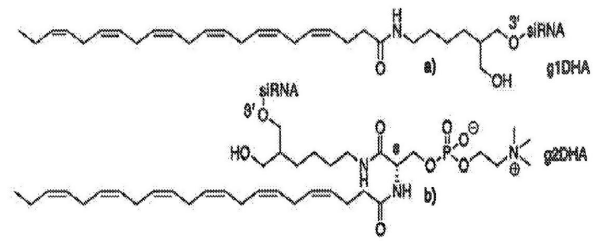


Fig. 99

10

20

30

40

50



【 100】

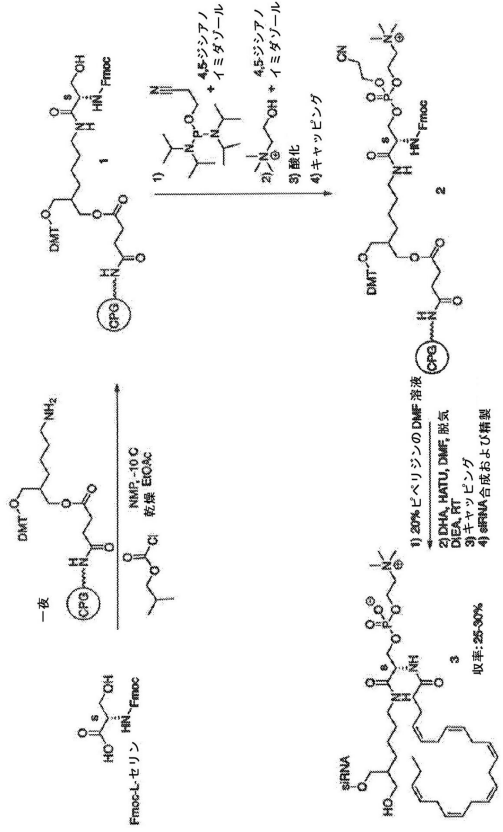


Fig. 100

【 101】

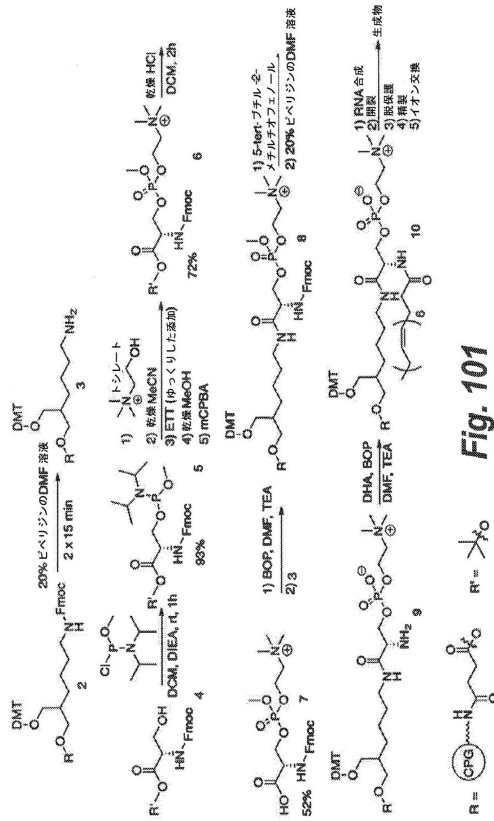


Fig. 101

【 102 - 1】

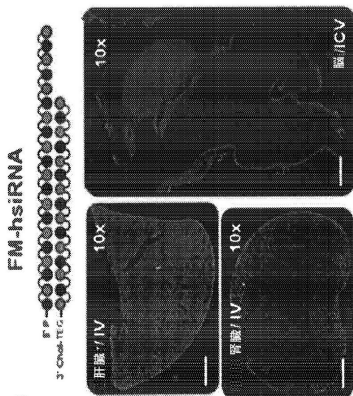


Fig. 102B

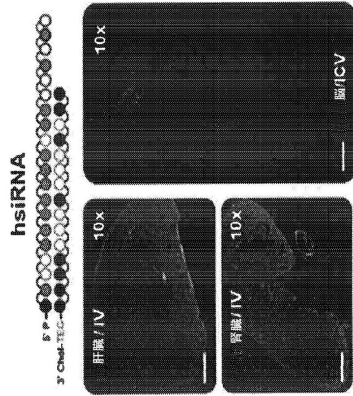


Fig. 102A

【 102 - 2】

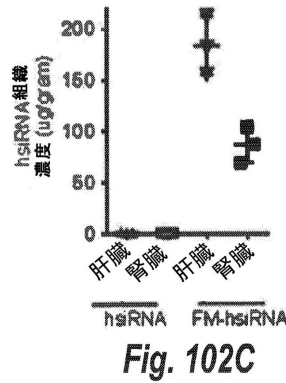


Fig. 102C

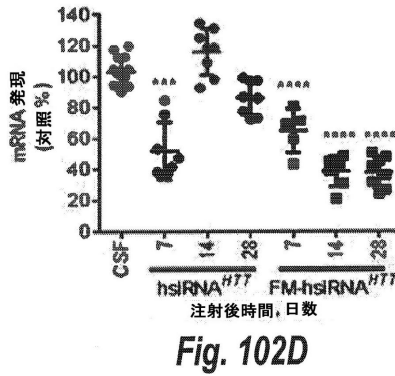
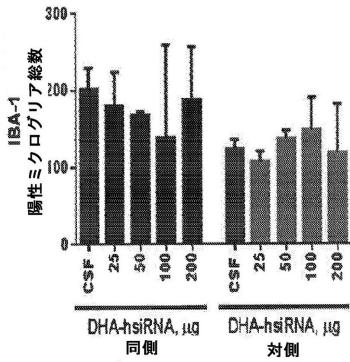
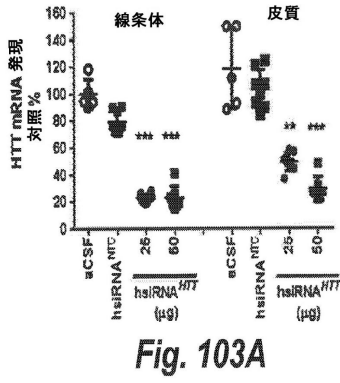
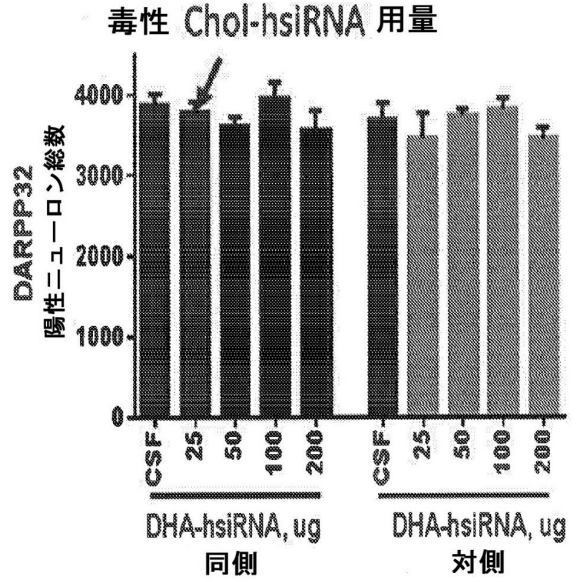


Fig. 102D

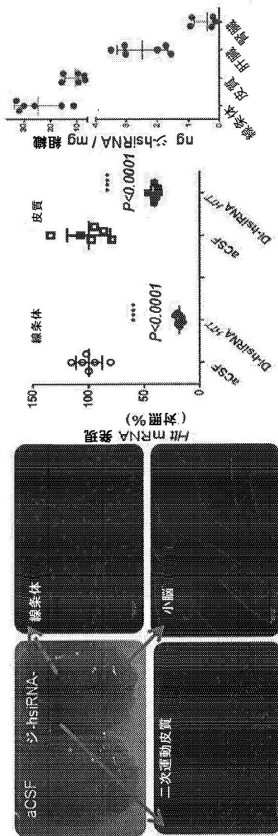
【 図 1 0 3 - 1 】



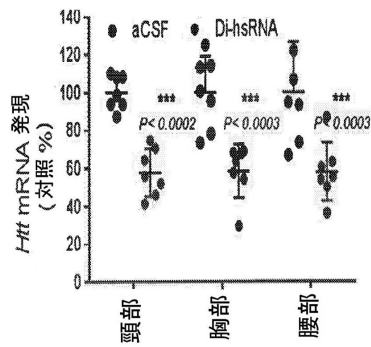
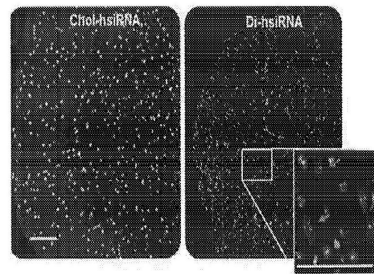
【 図 1 0 3 - 2 】



【 図 1 0 4 】



【 図 1 0 5 】



10

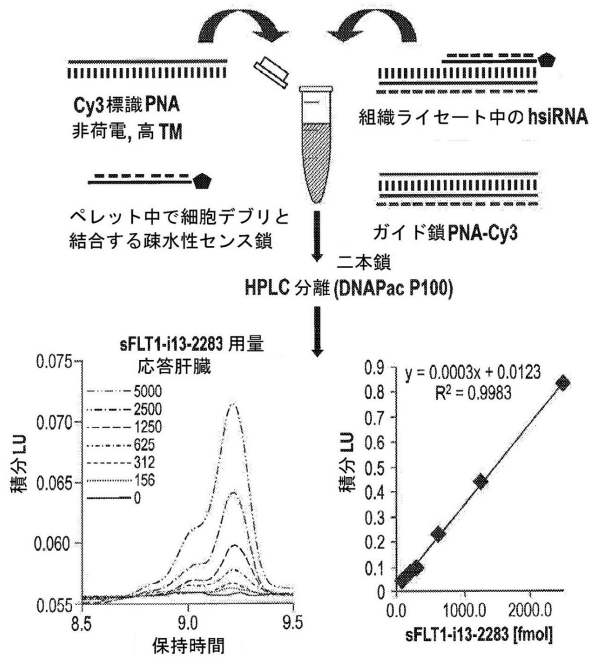
20

30

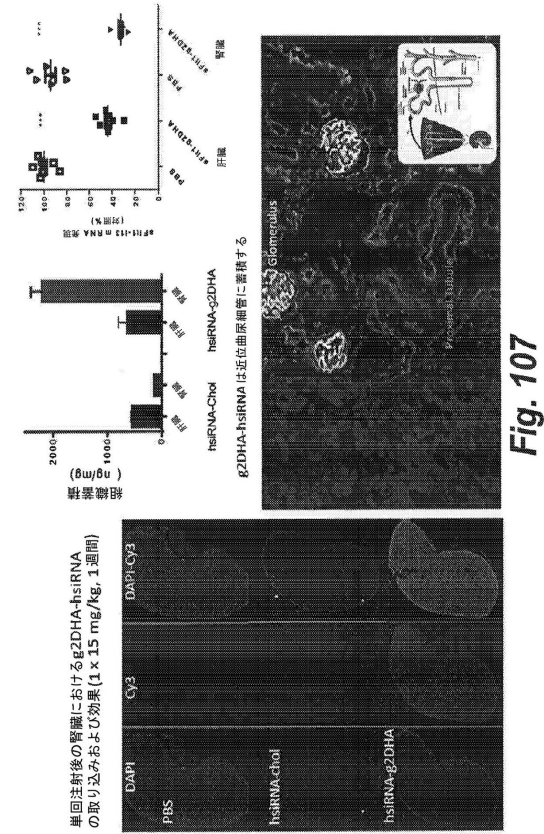
40

50

【図 106】



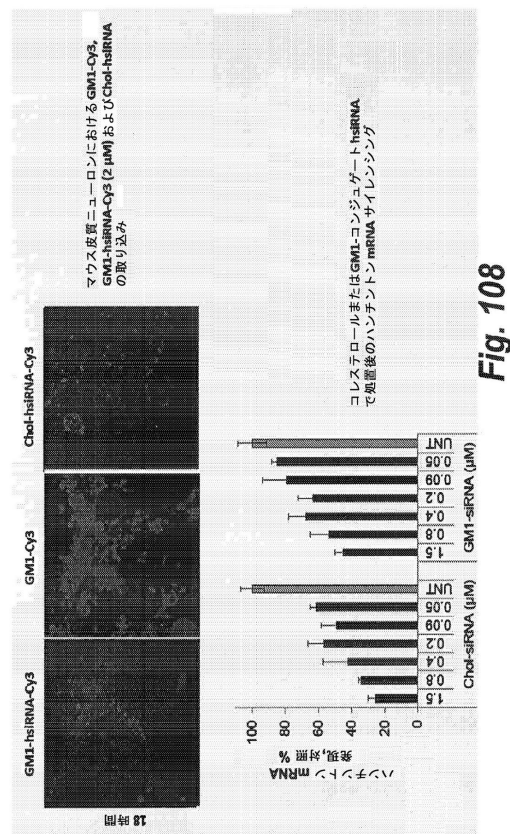
【図 107】



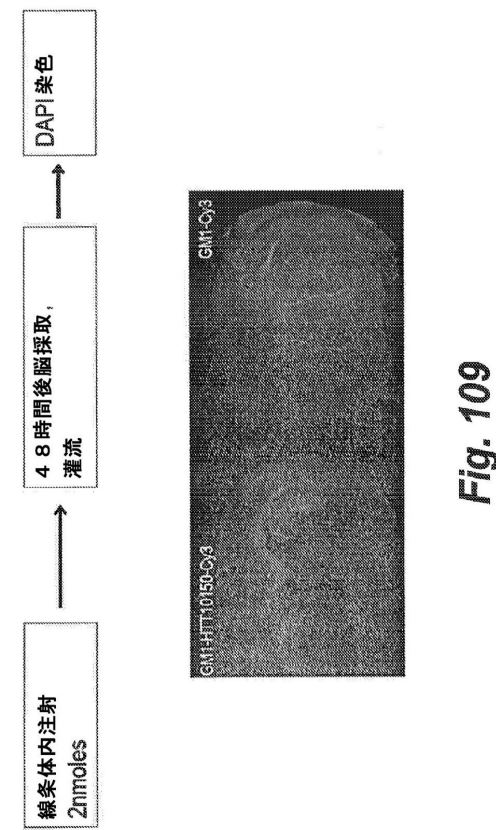
10

20

【図 108】



【図 109】



30

40

50

【 110 - 1 】

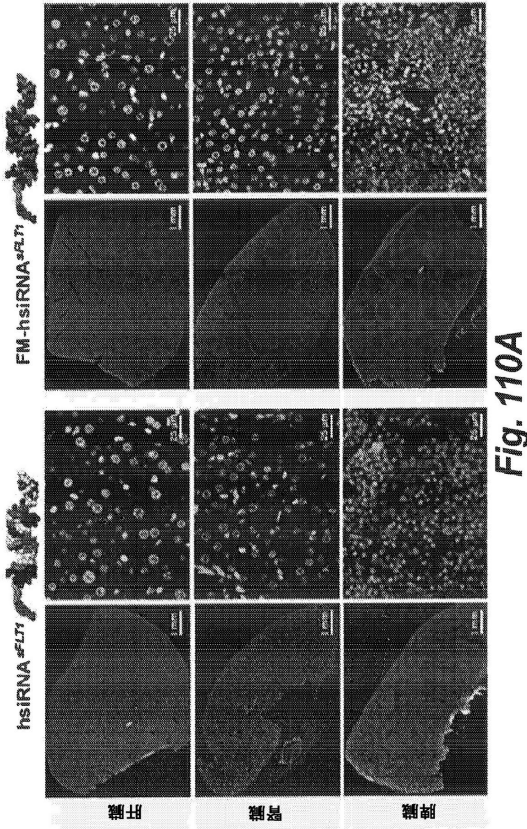


Fig. 110A

【 110 - 2 】

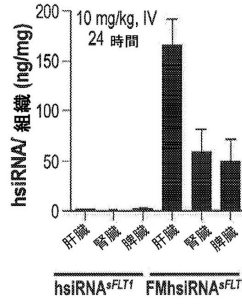


Fig. 110B

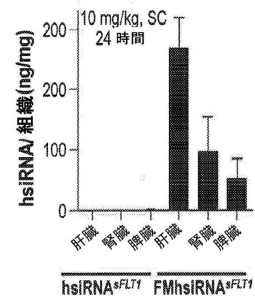


Fig. 110C

10

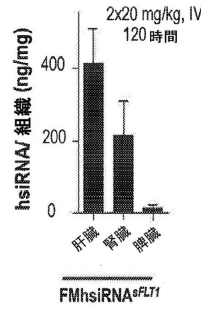


Fig. 110D

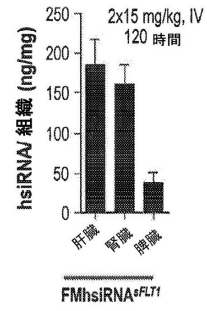


Fig. 110E

20

【 110 - 3 】

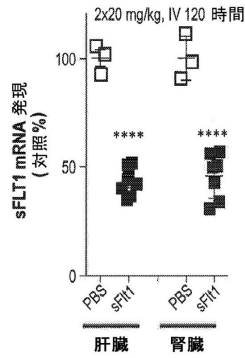


Fig. 110F

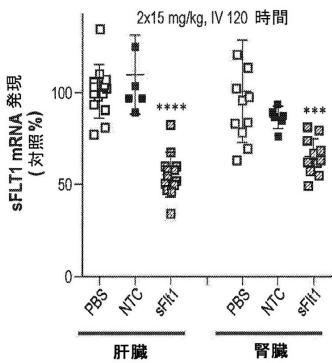


Fig. 110G

【 111 - 1 】

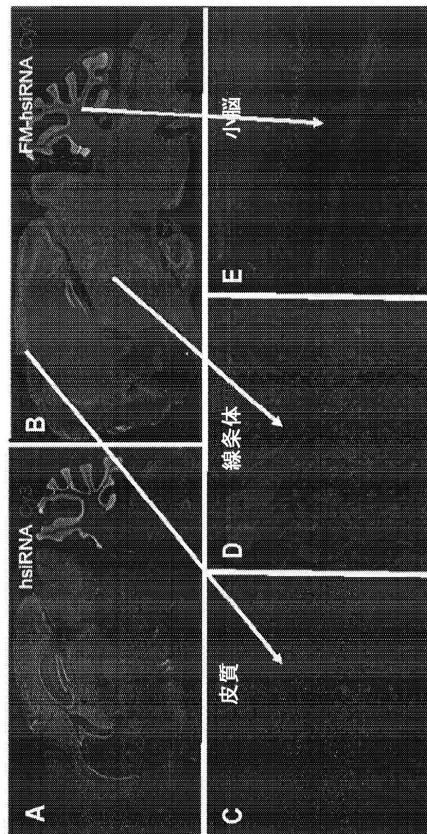


Fig. 111A-E

30

40

50

【 1 1 1 - 2 】

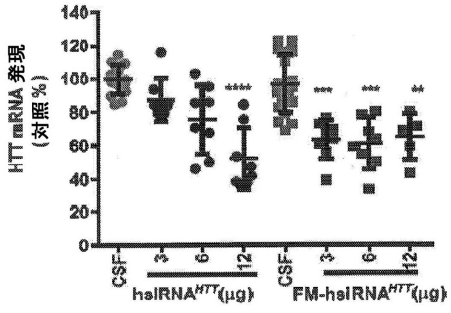


Fig. 111F

10

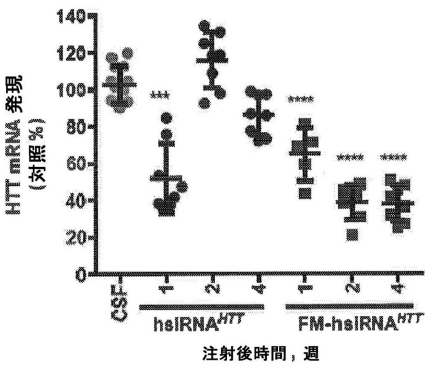


Fig. 111G

20

【 配列表 】

0007009356000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P 25/14 (2006.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)

## F I

A 6 1 P 25/14  
 A 6 1 K 48/00  
 C 1 2 N 15/63

Z

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 笹倉 真奈美

## (72)発明者 アナスタシア・コボロバ

アメリカ合衆国 0 1 5 8 1 マサチューセッツ州ウエストボロー、ロックローン・ロード 1 0 番

## (72)発明者 ニール・アロニン

アメリカ合衆国 0 2 4 6 0 マサチューセッツ州ニュートンビル、ホイッター・ロード 1 9 番

## (72)発明者 ジュリア・オルターマン

アメリカ合衆国 0 1 6 0 4 マサチューセッツ州ウースター、ハミルトン・ストリート 1 2 5 番、アパートメント 3

## (72)発明者 マシュー・ハスラー

アメリカ合衆国 0 2 4 6 0 マサチューセッツ州ニュートンビル、ホイッター・ロード 1 9 番

## (72)発明者 ブルーノ・ミゲル・ダ・クルス・ゴディーニョ

アメリカ合衆国 0 1 6 0 5 マサチューセッツ州ウースター、ノーマル・ストリート 1 番、アパートメント 3

審査官 齊藤 貴子

## (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 0 0 5 8 9 8 ( W O , A 2 )

特表 2 0 0 9 - 5 0 4 7 8 2 ( J P , A )

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P  
I D S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q