

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-540011  
(P2009-540011A)

(43) 公表日 平成21年11月19日(2009.11.19)

(51) Int.Cl.

**A61K 31/713** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)

F 1

A 61 K 31/713  
A 61 P 27/02  
A 61 K 45/00  
A 61 K 39/395  
A 61 P 9/00

テーマコード(参考)

4 B 02 4  
4 C 08 4  
4 C 08 5  
4 C 08 6

N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-515610 (P2009-515610)  
(86) (22) 出願日 平成19年6月12日 (2007.6.12)  
(85) 翻訳文提出日 平成21年2月12日 (2009.2.12)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2007/071029  
(87) 國際公開番号 WO2007/146953  
(87) 國際公開日 平成19年12月21日 (2007.12.21)  
(31) 優先権主張番号 60/804,500  
(32) 優先日 平成18年6月12日 (2006.6.12)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 60/824,972  
(32) 優先日 平成18年9月8日 (2006.9.8)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 60/864,440  
(32) 優先日 平成18年11月6日 (2006.11.6)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 508188732  
エクセジェニックス、インク. ディー／ビ  
ー／エー オブコ ヘルス、インク.  
アメリカ合衆国、33137 フロリダ州  
、マイアミ、4400 ビスケーン ブー  
ルバード  
(74) 代理人 100104411  
弁理士 矢口 太郎  
(74) 代理人 100158621  
弁理士 佐々木 義行  
(74) 代理人 100133503  
弁理士 関口 一哉

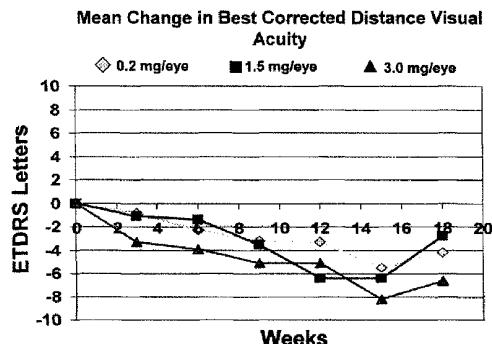
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管新生の siRNA 阻害のための組成物及び方法

## (57) 【要約】

【解決手段】 配列ID番号：77 および配列ID番号：78 によって定義される siRNA (低分子干渉RNA) を含有する、VEGFを標的とする siRNA を、対象の視力を安定化し、脈絡膜血管新生傷害を阻害し、加齢黄斑変性症を治療し、糖尿病黄斑浮腫を治療し、また、対象の網膜中心窩の厚さを縮小するのに使用する方法の実施形態が提供される。更に、VEGFを標的とする siRNA と siRNA でない VEGF拮抗薬とを含む複合治療を投与することによって、加齢黄斑変性症および糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法が記載されている。

【選択図】 図3



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対照における視力を安定化する方法であって、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖及び配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を有する siRNA の有効な量を前記対象に投与する工程を有するものである、方法。

**【請求項 2】**

請求項 1 記載の方法において、前記センス及びアンチセンス RNA 鎖は、ヌクレアーゼ分解に対して安定化されているものである。

**【請求項 3】**

請求項 1 記載の方法において、前記 siRNA は、眼球内投与経路によって投与されるものである。 10

**【請求項 4】**

請求項 3 記載の方法において、前記眼球内投与経路は、硝子体内、網膜内、網膜下、テノン下、眼窩周囲及び後眼窩、トランス - 角膜、及びトランス - 強膜投与から選択されるものである。

**【請求項 5】**

請求項 1 記載の方法において、この方法は、さらに、  
VEGF アンタゴニストを投与する工程を有するものである。

**【請求項 6】**

請求項 5 記載の方法において、前記 VEGF アンタゴニストは、ベバシズマブ及びラニビズマブから選択されるヒト VEGF を標的化したモノクローナル抗体である。 20

**【請求項 7】**

請求項 5 記載の方法において、前記 VEGF アンタゴニストは、ラニビズマブである。

**【請求項 8】**

請求項 1 記載の方法において、前記有効な量は、約 0.5 ~ 約 5 mg である。

**【請求項 9】**

請求項 1 記載の方法において、前記有効な量は、約 2.5 mg である。

**【請求項 10】**

請求項 1 記載の方法において、前記 VEGF siRNA の有効な量は、4 週間毎に投与されるものである。 30

**【請求項 11】**

請求項 1 記載の方法において、前記 VEGF siRNA の有効な量は、8 週間毎に投与されるものである。

**【請求項 12】**

請求項 1 記載の方法において、前記 VEGF siRNA の有効な量は、12 週間毎に投与されるものである。

**【請求項 13】**

対象における脈絡膜新血管新生を阻害する方法であって、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖及び配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を有する siRNA の有効な量を前記対象に投与する工程を有するものである、方法。 40

**【請求項 14】**

請求項 13 記載の方法において、前記センス及びアンチセンス RNA 鎖は、ヌクレアーゼ分解に対して安定化されているものである。

**【請求項 15】**

請求項 13 記載の方法において、前記 siRNA は、眼球内投与経路によって投与されるものである。

**【請求項 16】**

請求項 15 記載の方法において、前記眼球内投与経路は、硝子体内、網膜内、網膜下、テノン下、眼窩周囲及び後眼窩、トランス - 角膜、及びトランス - 強膜投与から選択されるものである。 50

**【請求項 17】**

請求項13記載の方法において、この方法は、さらに、  
VEGFアンタゴニストを投与する工程を有するものである。

**【請求項 18】**

請求項17記載の方法において、前記VEGFアンタゴニストは、ベバシズマブ及びラニビズマブから選択されるヒトVEGFを標的化したモノクローナル抗体である。

**【請求項 19】**

請求項17記載の方法において、前記VEGFアンタゴニストは、ラニビズマブである。  
。

**【請求項 20】**

請求項13記載の方法において、前記有効な量は、約0.5～約5mgである。 10

**【請求項 21】**

請求項13記載の方法において、前記有効な量は、約2.5mgである。

**【請求項 22】**

請求項13記載の方法において、前記VEGFi siRNAの有効な量は、4週間毎に投与されるものである。

**【請求項 23】**

請求項13記載の方法において、前記VEGFi siRNAの有効な量は、8週間毎に投与されるものである。

**【請求項 24】**

請求項13記載の方法において、前記VEGFi siRNAの有効な量は、12週間毎に投与されるものである。 20

**【請求項 25】**

対象における糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法であって、配列ID番号：77のセンスRNA鎖及び配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を有するsiRNAの有効な量を前記対象に投与する工程を有するものである、方法。

**【請求項 26】**

請求項25記載の方法において、前記センス及びアンチセンスRNA鎖は、ヌクレアーゼ分解に対して安定化されているものである。

**【請求項 27】**

請求項25記載の方法において、前記siRNAは、眼球内投与経路によって投与されるものである。 30

**【請求項 28】**

請求項27記載の方法において、前記眼球内投与経路は、硝子体内、網膜内、網膜下、テノン下、眼窩周囲及び後眼窩、トランス・角膜、及びトランス・強膜投与から選択されるものである。

**【請求項 29】**

請求項25記載の方法において、この方法は、さらに、VEGFアンタゴニストを投与する工程を有するものである。

**【請求項 30】**

請求項29記載の方法において、前記VEGFアンタゴニストは、ベバシズマブ及びラニビズマブから選択されるヒトVEGFを標的化したモノクローナル抗体である。 40

**【請求項 31】**

請求項29記載の方法において、前記VEGFアンタゴニストは、ラニビズマブである。  
。

**【請求項 32】**

請求項25の方法において、前記有効な量は、約0.5～約5mgである。

**【請求項 33】**

請求項25記載の方法において、前記有効な量は、約2.5mgである。

**【請求項 34】**

10

20

30

40

50

請求項 2 5 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、4 週間毎に投与されるものである。

【請求項 3 5】

請求項 2 5 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、8 週間毎に投与されるものである。

【請求項 3 6】

請求項 2 5 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、12 週間毎に投与されるものである。

【請求項 3 7】

対象における中心窩厚さを減少する方法であって、配列 ID 番号：77 のセンス R N A 鎖及び配列 ID 番号：78 のアンチセンス R N A 鎖を有する s i R N A の有効な量を前記対象に投与する工程を有するものである、方法。 10

【請求項 3 8】

請求項 3 7 記載の方法において、前記センス及びアンチセンス R N A 鎖は、ヌクレアーゼ分解に対して安定化されているものである。

【請求項 3 9】

請求項 3 7 記載の方法において、前記 s i R N A は、眼球内投与経路によって投与されるものである。

【請求項 4 0】

請求項 3 9 記載の方法において、前記眼球内投与経路は、硝子体内、網膜内、網膜下、テノン下、眼窩周囲及び後眼窩、トランス - 角膜、及びトランス - 強膜投与から選択されるものである。 20

【請求項 4 1】

請求項 3 7 記載の方法において、この方法は、さらに、  
V E G F アンタゴニストを投与する工程を有するものである。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、ベバシズマブ及びラニビズマブから選択されるヒト V E G F を標的化したモノクローナル抗体である。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、ラニビズマブである 30  
。

【請求項 4 4】

請求項 3 7 記載の方法において、前記有効な量は、約 0 . 5 ~ 約 5 m g である。

【請求項 4 5】

請求項 3 7 記載の方法において、前記有効な量は、約 2 . 5 m g である。

【請求項 4 6】

請求項 3 7 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、4 週間毎に投与されるものである。

【請求項 4 7】

請求項 3 7 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、8 週間毎に投与されるものである。 40

【請求項 4 8】

請求項 3 7 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、12 週間毎に投与されるものである。

【請求項 4 9】

加齢性黄斑変性を治療する方法であって、V E G F アンタゴニストの有効な量と、センス R N A 鎖及びアンチセンス R N A 鎖を有する s i R N A の有効な量とを対象に投与する工程を有するものであり、前記センス及びアンチセンス R N A 鎖は R N A 二本鎖を形成し、前記センス R N A 鎖はヒト V E G F m R N A における約 19 ~ 約 25 近接ヌクレオチドの標的配列と同一なヌクレオチド配列を有するものである、方法。 50

**【請求項 5 0】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記センス R N A 鎖は、配列 I D 番号：7 7 を有し、前記アンチセンス R N A 鎖は、配列 I D 番号：7 8 を有するものである。

**【請求項 5 1】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記 s i R N A は、眼球内投与経路によって投与されるものである。

**【請求項 5 2】**

請求項 5 1 記載の方法において、前記眼球内投与経路は、硝子体内、網膜内、網膜下、テノン下、眼窩周囲及び後眼窩、トランス - 角膜、及びトランス - 強膜投与から選択されるものである。

10

**【請求項 5 3】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記有効な量は、約 0 . 5 ~ 約 5 m g である。

**【請求項 5 4】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記有効な量は、約 2 . 5 m g である。

**【請求項 5 5】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、s i R N A の投与前に投与されるものである。

**【請求項 5 6】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、s i R N A の投与後に投与されるものである。

20

**【請求項 5 7】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、s i R N A の投与と同時に投与されるものである。

**【請求項 5 8】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、4 週間毎に投与されるものである。

**【請求項 5 9】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、8 週間毎に投与されるものである。

30

**【請求項 6 0】**

請求項 4 9 の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、12 週間毎に投与されるものである。

**【請求項 6 1】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、ラニビズマブである。

**【請求項 6 2】**

請求項 6 1 記載の方法において、前記ラニビズマブは、前記 s i R N A の投与 2 週間前に投与されるものである。

**【請求項 6 3】**

請求項 6 2 記載の方法において、前記 s i R N A は、4 週間毎に投与され、前記ラニビズマブは、交互に ( o n a n a l t e r n a t i n g b a s i s ) 4 週間毎に投与されるものである。

40

**【請求項 6 4】**

請求項 6 3 記載の方法において、前記ラニビズマブは、8 週間以上の期間で投与されるものである。

**【請求項 6 5】**

請求項 6 4 記載の方法において、前記 s i R N A は、8 週間の期間後に、維持期 ( o n a m a i n t e n a n c e b a s i s ) として投与されるものである。

**【請求項 6 6】**

請求項 4 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、ベバシズマブである

50

。

【請求項 6 7】

請求項 4 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、アフリバセプト ( a f l i b e r c e p t ) である。

【請求項 6 8】

請求項 4 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、ペガプタニブである

。

【請求項 6 9】

糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法であって、V E G F アンタゴニストの有効な量と、センス R N A 鎖及びアンチセンス R N A 鎖を有する s i R N A の有効な量とを対象に投与する工程を有するものであり、前記センス及びアンチセンス R N A 鎖は R N A 二本鎖を形成し、前記センス R N A 鎖はヒト V E G F m R N A における約 19 ~ 約 25 近接ヌクレオチドの標的配列と同一なヌクレオチド配列を有するものである、方法。10

【請求項 7 0】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 s i R N A は、眼球内投与経路によって投与されるものである。

【請求項 7 1】

請求項 7 0 記載の方法において、前記眼球内投与経路は、硝子体内、網膜内、網膜下、テノン下、眼窩周囲及び後眼窩、トランス - 角膜、及びトランス - 強膜投与から選択されるものである。20

【請求項 7 2】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 s i R N A の有効な量は、約 0 . 1 m g ~ 約 5 m g である。

【請求項 7 3】

請求項 6 9 記載の方法において、前記有効な量は、約 2 . 5 m g である。

【請求項 7 4】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、ベバシズマブ及びラニビズマブから選択されるヒト V E G F を標的化したモノクローナル抗体である。

【請求項 7 5】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、ラニビズマブである30

。

【請求項 7 6】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、s i R N A の投与前に投与されるものである。

【請求項 7 7】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、s i R N A の投与後に投与されるものである。

【請求項 7 8】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 V E G F アンタゴニストは、s i R N A の投与と同時に投与されるものである。40

【請求項 7 9】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、4 週間毎に投与されるものである。

【請求項 8 0】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、8 週間毎に投与されるものである。

【請求項 8 1】

請求項 6 9 記載の方法において、前記 V E G F s i R N A の有効な量は、12 週間毎に投与されるものである。

【発明の詳細な説明】50

**【技術分野】****【0001】****関連文献の相互参照**

本出願は、2006年6月12日出願の「目におけるVEGFのsiRNA阻害のための組成物及び方法」という発明の名称である米国仮出願第60/804,500号、2006年9月8日出願の「目におけるVEGFのsiRNA阻害のための組成物及び方法」という発明の名称である米国仮出願第60/824,972号、及び2006年11月6日出願の「目におけるVEGFのsiRNA阻害のための組成物及び方法」という発明の名称である米国仮出願第60/864,440号に対して優先権を主張するものであり、これらはこの参照によってその全体が本明細書に組み込まれるものである。

10

**【発明の概要】****【課題を解決するための手段】****【0002】**

本発明の実施形態は、VEGFを標的化したsiRNAの有効な量を対象へ投与する工程を含む、視力を安定化する方法を提供するものである。好ましくは、前記siRNAは配列ID番号：77のセンスRNA鎖及び配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を有するものである。

**【0003】**

本発明の更なる実施形態は、VEGFを標的化したsiRNAの有効な量を対象へ投与する工程を含む、脈絡膜新生血管新生を阻害する方法を提供するものである。好ましくは、前記siRNAは配列ID番号：77のセンスRNA鎖及び配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を有するものである。

20

**【0004】**

本発明の他の実施形態は、VEGFを標的化したsiRNAの有効な量を対象へ投与する工程を含む、糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法を提供するものである。好ましくは、前記siRNAは配列ID番号：77のセンスRNA鎖及び配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を有するものである。

**【0005】**

本発明の付加的な実施形態は、VEGFを標的化したsiRNAの有効な量を対象へ投与する工程を含む、中心窓厚さを減少させる方法を提供するものである。好ましくは、前記siRNAは配列ID番号：77のセンスRNA鎖及び配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を有するものである。

30

**【0006】**

本発明の更なる実施形態は、VEGFを標的化したsiRNA及びVEGFアンタゴニストを投与する工程を含む、黄斑変性、特に加齢性黄斑変性を治療する方法を提供するものである。好ましくは、前記siRNAは配列ID番号：77のセンスRNA鎖及び配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を有するものである。

**【0007】**

本発明の付加的な実施形態は、VEGFを標的化したsiRNA及びVEGFアンタゴニストを投与する工程を含む、糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法を提供するものである。好ましくは、前記siRNAは配列ID番号：77のセンスRNA鎖及び配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を有するものである。

40

**【0008】**

本発明の付加的な実施形態は、VEGFを標的化したsiRNAを投与する工程を含む、糖尿病性網膜症を治療する方法を提供するものである。好ましくは、前記siRNAは配列ID番号：77のセンスRNA鎖及び配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を有するものである。

**【0009】**

本発明の付加的な実施形態は、VEGFを標的化したsiRNAを投与する工程を含む、増殖性糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法を提供するものである。好ましくは、前記si

50

R N A は配列 I D 番号 : 7 7 のセンス R N A 鎖及び配列 I D 番号 : 7 8 のアンチセンス R N A 鎖を有するものである。

【 0 0 1 0 】

本発明の更なる実施形態において、配列 I D 番号 : 7 7 のセンス R N A 鎖及び配列 I D 番号 : 7 8 のアンチセンス R N A 鎖を含む s i R N A を有する薬学的組成物を提供するものである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 1 】

本出願の書類には、少なくとも 1 つのカラーの写真或いは図面が含まれている。カラー図面或いは写真を含む本出願のコピーは、特許庁へ要求し必要手数料を支払うことによって提供される。

【 0 0 1 2 】

本発明の本質及び利点をより完全に理解するために、付随する図面に関連した以下の詳細な説明は参照されるべきである。

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】図 1 は、ヒト V E G F s i R N A s 、非特異的 s i R N A ( E G F P s i R N A ) を形質移入した 2 9 3 細胞、或いは s i R N A を含まない偽形質移入体における h V E G F タンパク質レベルのグラフである。

【 図 2 】図 2 は、C a n d 5 、h V E G F # 1 、h V E G F # 2 、h V E G F # 3 、h V E G F # 4 、h V E G F # 6 及び h V E G F # 7 での用量反応性研究のグラフである。

【 図 3 】図 3 は、C a n d 5 の異なる用量を投与された 3 研究群のそれぞれにおける初期治療糖尿病性網膜症研究 ( 「 E T D R S 」 ) 方法論によって測定された、ヒト対象における最良矯正距離視力における平均変化のグラフである。

【 図 4 】図 4 は、ベースラインと比較して 1 2 週での、若しくは 3 週目と比較して 1 5 週での E T D R S テストにおいて 1 5 文字以下の損失によって決定された、距離視力の安定化を示した研究群のそれぞれにおけるヒト対象のパーセンテージを示した柱状図である。

【 図 5 】図 5 は、C a n d 5 の異なる用量を投与された 3 研究群のそれぞれにおける E T D R S 方法論によって測定された、ヒト対象における最良矯正接近視力における平均変化のグラフである。

【 図 6 】図 6 は、ベースラインと比較して 1 2 週での、若しくは 3 週目と比較して 1 5 週での E T D R S テストにおいて 1 5 文字以下の損失によって決定された、接近視力の安定化を示した研究群のそれぞれにおけるヒト対象のパーセンテージを示した柱状図である。

【 図 7 A 】図 7 A 及び B は、関連 T A P 研究の対照プラセボ群と比較した、3 つの C a n d 5 研究群のそれぞれにおける最良矯正距離視力における平均変化の一組のグラフである。

【 図 7 B 】図 7 A 及び B は、関連 T A P 研究の対照プラセボ群と比較した、3 つの C a n d 5 研究群のそれぞれにおける最良矯正距離視力における平均変化の一組のグラフである。図 7 B は、データセットに対して、治験実施計画書に適合した対象集団 ( L a s t O b s e r v e d C a r r i e d F o r w a r d ) ( 「 L O C F 」 ) 解析を適用した。

【 図 8 A 】図 8 A 及び B は、3 つの C a n d 5 研究群のそれぞれにおける脈絡膜新血管新生 ( C N V ) 病変の平均サイズにおけるベースラインからの変化の一組のグラフである。

【 図 8 B 】図 8 A 及び B は、3 つの C a n d 5 研究群のそれぞれにおける脈絡膜新血管新生 ( C N V ) 病変の平均サイズにおけるベースラインからの変化の一組のグラフである。図 8 B は、データセットに対して L O C F 解析を適用した。

【 図 9 】図 9 は、C a n d 5 の異なる用量で処理された D M E を有するヒト対象の 3 群における視覚光干渉断層像 ( 「 O C T 」 ) によって測定された、中心窩厚さにおける変化のグラフである。

【 図 1 0 】図 1 0 は、C a n d 5 の異なる用量で処理された D M E を有するヒト対象の 3 群における E D T R S によって測定された、視力の変化のグラフである。

【 発明を実施するための形態 】

10

20

30

40

50

## 【0014】

本発明の組成物及び方法を記載する前に、本発明は記載された特定の工程、組成物或いは方法論に限定されるものでなく変更されるものであるということが理解されるものである。更に、本説明において使用される専門用語は、特定のバージョン或いは実施例を記載することのみを目的としているものであり、添付された請求項によってのみ制限される本発明の観点を制限することを意図するものではないということも理解される。他に定義されない限り、本明細書で使用された全ての技術的及び化学的用語は、本分野の当業者によって共通して理解されているものと同じ意味を持つものである。本明細書に記載されたものと同じ或いは同等の全ての方法及び物質は、本発明の実施例の実施或いはテストにおいて使用され得るが、ここでは好ましい方法、装置及び物質を記載する。本明細書で引用した全ての刊行物は、この参照によってその全てが組み込まれるものである。本明細書には、本発明が先行発明によるそのような開示を先行する権利がないことを認めるものと解釈されるものはない。

10

## 【0015】

本明細書及び添付された請求項で使用されたように、単数形「a」、「a n」及び「the」は、文脈で明らかに指示されていない限り、複数形参照を含むということに注意すべきである。従って、例えば「分子」という意味は、1若しくはそれ以上の分子及び本分野の当業者に知られたその同等物等を意味するものである。

20

## 【0016】

本明細書で使用されたように、「約」という用語は、使用される数の数値的な値のプラス或いはマイナス10%を意味するものである。従って、約50%とは45%～55%の範囲を意味するものである。

## 【0017】

本明細書で使用されたように、「対象」とは、ヒト或いは非ヒト動物を含む。好ましくは、前記対象はヒトである。

## 【0018】

本明細書で使用されたように、siRNAの「有効な量」とは、標的mRNAのRNAi-媒介性分解を引き起こすのに十分な量、若しくは対象における血管新生の進行を阻害するのに十分な量である。

30

## 【0019】

本明細書で使用されたように、「単離された」とは、人の介入を介して天然状態から変える或いは除去することを意味する。例えば、生動物に天然に存在するsiRNAは「単離された」ものではないが、合成siRNA若しくはその天然状態の共存物質から部分的に或いは完全に分離されたsiRNAは「単離された」ものである。

## 【0020】

単離されたsiRNAは、実質的に精製された形態で存在する、若しくは例えば前記siRNAが運搬された細胞などの非天然環境において存在することができる。

40

## 【0021】

本明細書で使用されたように、「標的mRNA」は、ヒトVEGF mRNAを意味する。

## 【0022】

他に指摘されない限り、本明細書の全ての核酸配列は5'から3'方向で記載されている。更に、核酸配列における全てのデオキシリボヌクレオチドは大文字で示されており(例えば、デオキシチミジンは「T」である)、核酸配列におけるリボヌクレオチドは小文字で示されている(例えば、ウリジンは「u」である)。

## 【0023】

新規毛細血管の増殖或いは「新血管新生」として定義される血管新生は、増殖及び発生において基礎的な役割を担っている。成熟したヒトにおいて、血管新生を開始する能力は全ての組織に存在するが、厳格なコントロール下に保持されている。血管新生の鍵となる制御因子は、血管透過性因子(「VPF」)とも呼ばれている、血管内皮増殖因子(「V

50

EGF」)である。VEGFは、ヒトにおいて少なくとも4つの異なる選択的スプライシング形態(VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>189</sub>及びVEGF<sub>206</sub>)で存在し、それら全ては同様な生物学的活性を発揮する。

#### 【0024】

血管新生は、分泌VEGFが、内皮細胞の表面に発現したFlt-1及びFlk-1/KDR受容体(VEGF受容体1及びVEGF受容体2とも呼ばれている)へ結合した場合に開始される。Flk-1/KDRは膜貫通タンパク質チロシンキナーゼであり、VEGFの結合は細胞シグナルカスケードを惹起し、最終的には周囲組織の新血管新生を生じる。

#### 【0025】

異常な血管新生、或いは新規血管の病的増殖は、多数の症状に関連する。これらの症状には、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫(「DME」)、乾癬、滲出性或いは「湿潤性」加齢性黄斑変性症(「ARMD」)、関節リウマチ及び他の炎症性疾患、及びほとんどの癌がある。これらの症状に関連する疾患は、異常に高レベルのVEGFを示し、一般的に高度の血管新生或いは血管透過性を示す。

#### 【0026】

特にARMDは、臨床的に重要な血管新生疾患である。この症状は、高齢者の片方或いは両方の目における脈絡膜新血管新生によって特徴付けされ、先進工業国における失明の主な原因である。

#### 【0027】

糖尿病性網膜症とも呼ばれる糖尿病性黄斑浮腫(DME)は、糖尿病患者を苦しめる慢性高血糖の合併症である。これは、網膜血管の漏れやすさ及び網膜、視神経及び虹彩上の新規血管の増殖によって引き起こされる。漏出性血管は、網膜の膨張及び失明を生じる。視神経及び網膜上に増殖した新規血管は出血しやすく、重篤な失明を生じる。更に、虹彩における新規血管は目の流れを詰まらせ、激烈な痛みと潜在的な失明を伴う目の極度な高圧を生じるものである。DMEは糖尿病を患ったほとんどの人に影響を及ぼす。一般的に、糖尿病をより長く患った人は、DMEを患うリスクがより高い。最終的には、若年発症糖尿病を患ったほとんどの人は、DMEのいくつかの症状を発生するであろう。人生後半で糖尿病を患った患者も、進行型DMEを発生する可能性がいくぶん高くないが、DMEのリスクを有している。

#### 【0028】

VEGFの産生或いは効果を減少させるよう試みた、「VEGFアンタゴニスト」として本明細書では言及されている、異常血管新生を阻害する多くの治療戦略が存在する。例えば、VEGFが結合する内皮細胞受容体と競合する抗-VEGF或いは抗-VEGF受容体抗体、抗-VEGFアブタマー、及び可溶性VEGFトラップが開発されている。VEGF遺伝子発現に対する典型的VEGF「アンチセンス」療法も提案されている。しかしながら、これら療法で使用される抗-血管新生剤は、VEGF或いはVEGF受容体における化学量論的減少のみを産生でき、その薬剤は、疾患組織によるVEGFの異常高産生によって一般的に圧倒される。従って、利用可能な抗-血管新生療法によって達成された結果は不満足なものであった。

#### 【0029】

RNA干渉(以後「RNAi」)は、多くの真核生物を通じて保存されている、転写後遺伝子調節の方法である。RNAiは、細胞内に存在する短い(すなわち<30ヌクレオチド)二本鎖RNA(「dsRNA」)分子によって誘導される。「低分子干渉RNA」或いは「siRNA」と呼ばれるこれらの短いdsRNA分子は、1ヌクレオチド分解能で、siRNAと配列相同性を共有するメッセンジャーRNAs(「mRNAs」)の破壊を引き起こす。siRNA及び標的mRNAは、標的mRNAを切断する「RNA-誘導サイレンシング複合体」或いは「RISC」へ結合する。1つのsiRNA分子は約1000個のmRNA分子の切断を誘導することができるので、前記siRNAは複数代謝回転酵素のように明らかに再利用されている。従って、mRNAのsiRNA-誘導RN

10

20

30

40

50

A<sub>i</sub>分解は、標的遺伝子の発現を阻害するための現在利用可能な技術より有効的である。

#### 【0030】

従って、本発明の1実施形態は、標的mRNAを標的とした約17ヌクレオチド～約29ヌクレオチド長の、好ましくは約19～約25ヌクレオチド長の短い二本鎖RNAを有する単離されたsiRNAを提供するものである。前記siRNAは、標準ワトソン・クリック塩基対相互作用（以後「塩基対」）によってアニーリングされたセンスRNA鎖及び相補的アンチセンスRNA鎖を有する。以下により詳細に記載されるように、前記センス鎖は、標的mRNA内に含まれる標的配列と同一の核酸配列を有する。

#### 【0031】

前記siRNAのセンス及びアンチセンス鎖は、2つの相補的な一本鎖RNA分子を有することができる、若しくは例えば一本鎖「ヘアピン」ループによって、2つの相補的部位が塩基対で共有結合する单一分子を有することができる。あらゆる理論に束縛されることはなく、後者のタイプのsiRNA分子のヘアピンループは、「ダイサー」タンパク質（或いはその同等物）によって細胞内で切断され、2つの個々の塩基対RNA分子のsiRNAを形成すると考えられている。

#### 【0032】

VEGF<sub>1-2-1</sub>（配列ID番号：2）、VEGF<sub>1-6-5</sub>（配列ID番号：3）、VEGF<sub>1-8-9</sub>（配列ID番号：4）及びVEGF<sub>2-0-6</sub>（配列ID番号：5）を含むヒトVEGFのスプライシング変異体が知られている。ヒトVEGF、F1t-1（配列ID番号：6）或いはF1k-1/KDR（ID7）遺伝子から転写されたmRNAは、本分野でよく知られた技術を用いて更なる選択的スプライシング形態を解析され得る。そのような技術には、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法（RT-PCR）、ノーザンプロットティング及びin-situハイブリダイゼーションを含む。mRNA配列を解析するための技術は、例えば、Busting SA（2000），J.Mol.Endocrinol. 25：169-193に記載されており、これに開示されている全てはこの参照によって本明細書に組み込まれるものである。選択的スプライシングを受けたmRNAを同定するための代表的な技術も以下に記載している。

#### 【0033】

例えば、所定の疾患遺伝子に関連したヌクレオチド配列を含むデータベースは、選択的スプライシングを受けたmRNAを同定するために使用され得る。そのようなデータベースは、GenBank、Embase及びCancer Genome Anatomy Project（CGAP）データベースを含む。例えばCGAPデータベースは、様々なタイプのヒト癌からの発現遺伝子配列断片（ESTs）を含む。VEGF遺伝子からのmRNA或いは遺伝子配列は、そのようなデータベースをクエリーするために使用し、選択的スプライシングを受けたmRNAを表すESTsがこの遺伝子に見いだせるかを決定することができる。

#### 【0034】

「RNase（リボヌクレアーゼ）プロテクション」と呼ばれる技術も、選択的スプライシングを受けたVEGF mRNAを同定するために使用され得る。RNaseプロテクションは、他の細胞；例えば新血管新生の部位の組織或いはその近くの組織からの細胞など由来のRNAへハイブリダイズする合成RNAへの遺伝子配列の転写を含む。ハイブリダイズされたRNAは次にRNA:RNAハイブリッドミスマッチを認識する酵素とインキュベーションした。予想されたモノより小さい断片は、選択的スプライシングを受けたmRNAsの存在を示すものである。推定上の選択的スプライシングを受けたmRNAsはクローニングされ、本分野でよく知られている方法によって配列決定される。

#### 【0035】

RT-PCRもまた選択的スプライシングを受けたVEGF mRNAを同定するために使用され得る。RT-PCRにおいて、疾病組織からのmRNAは、本分野の当業者がよく知っている方法を用いて、逆転写酵素によってcDNAへ変換される。次に、前記cDNAの完全なコード化配列を、3'非翻訳領域に位置するフォワードプライマー、及び

10

20

30

40

50

5' 非翻訳領域に位置するリバースプライマーを用いた P C R を介して複製した。例えば正常にスプライシングされた m R N A からの予想産物のサイズと複製産物のサイズとを、例えばアガロースゲル電気泳動によって比較することで、複製産物の選択的スプライシング形態を解析した。前記複製産物のサイズにおけるあらゆる変化は選択的スプライシングを示すものである。

## 【 0 0 3 6 】

変異 V E G F 、 F 1 t - 1 或いは F 1 k - 1 / K D R 遺伝子から產生された m R N A もまた、選択的スプライシング形態を同定するために上述された技術を通じて容易に同定され得る。本明細書で使用されたように、「変異」 V E G F 遺伝子或いは m R N A は、本明細書で説明した V E G F 配列から配列が異なるヒト V E G F 遺伝子或いは m R N A を含む。従って、これらの遺伝子のアレル形態及びそれから產生された m R N A は、本発明の目的としては「変異」と考えられる。10

## 【 0 0 3 7 】

ヒト V E G F m R N A は、そのそれぞれの選択的スプライシング形態、同族体或いは変異体と同じように標的配列を含むことが理解される。従って、そのような共通標的配列を有する単一 s i R N A は、共通標的配列を含む異なる R N A タイプの R N A i - 仲介性分解を誘導することができる。

## 【 0 0 3 8 】

s i R N A は、部分的に精製された R N A 、実質的に純粋な R N A 、合成 R N A 或いは組換え産物 R N A 、更には 1 若しくはそれ以上のヌクレオチドの付加、欠損、置換及び／若しくは変更によって天然由来 R N A とは異なる改変 R N A を有する。そのような変更には、 s i R N A をヌクレアーゼ切斷耐性にする修飾を含む、 s i R N A の末端へ若しくは s i R N A の 1 若しくはそれ以上の内部ヌクレオチドへなどの、非ヌクレオチド物質の付加を含む。20

## 【 0 0 3 9 】

s i R N A の 1 若しくは両鎖は、 3' オーバーハングも有している。本明細書で使用されたように、「 3' オーバーハング」とは、二本鎖 R N A 鎖の 3' 末端から延長した少なくとも 1 つの不対ヌクレオチドを意味する。

## 【 0 0 4 0 】

従って、 1 実施形態において、前記 s i R N A は、 1 ~ 約 6 ヌクレオチド（リボヌクレオチド或いはデオキシヌクレオチドを含む）長、好ましくは 1 ~ 約 5 ヌクレオチド長、より好ましくは 1 ~ 約 4 ヌクレオチド長、及び特に好ましくは約 2 ~ 約 4 ヌクレオチド長の少なくとも 1 つの 3' オーバーハングを有する。30

s i R N A 分子の両鎖が 3' オーバーハングを有する実施形態において、前記オーバーハングの長さは各鎖で同じ或いは異なるものである。最も好ましい実施形態において、前記 3' オーバーハングは、 s i R N A の両鎖上に存在し、 2 ヌクレオチド長である。例えば、前記 s i R N A の各鎖は、ジチミチン酸（「 T T 」）或いはジウリジン酸（「 u u 」）の 3' オーバーハングを有することができる。

## 【 0 0 4 1 】

本発明の s i R N A の安定性を増強するために、前記 3' オーバーハングはさらに分解に対して安定化させることができる。 1 実施形態において、前記オーバーハングは、アデノシン或いはグアノシンヌクレオチドなどのプリンヌクレオチドを含むことによって安定化される。或いは、例えば 2' - デオキシチミジンでの 3' オーバーハングにおけるウリジンヌクレオチドの置換などの修飾類縁体によるピリミジンヌクレオチドの置換は、許容され、 R N A i 分解の有効性に影響を及ぼさない。特に、前記 2' - デオキシチミジンにおける 2' ヒドロキシルの非存在は、組織培養における前記 3' オーバーハングのヌクレアーゼ耐性を有意に増強するものである。40

## 【 0 0 4 2 】

特定の実施形態において、前記 s i R N A は、配列 A A ( N 1 9 ) T T 或いは N A ( N 2 1 ) を有し、ここにおいて N はあらゆるヌクレオチドである。これらの s i R N A は、50

約30～70% G/C含有であり、好ましくは約50% G/C含有である。センス si RNA鎖の配列は、それぞれ(N19)TTN21(すなわち3～23位)に一致する。後者の場合において、前記センス si RNAの3'末端はTTへ変換される。この配列変換に対する理論的根拠は、前記センス及びアンチセンス鎖3'オーバーハングの配列組成に関連した対称性二本鎖を產生することである。次に前記アンチセンスRNA鎖は、センス鎖の1～21位に対する相補鎖として合成される。

#### 【0043】

これらの実施形態における23-n<sub>t</sub>位センス鎖の1位は前記アンチセンス鎖によって配列特異的なやり方で認識されないので、前記アンチセンスの前記3'～最末端ヌクレオチド残基は意図的に選択され得る。しかしながら、前記アンチセンス鎖(他の実施形態において23-n<sub>t</sub>センス鎖の2位と相補的)の最後から2番目のヌクレオチドは、一般的に標的配列に対して相補的である。10

#### 【0044】

別の実施形態において、前記 si RNAは、配列NAR(N17)YNNを有し、ここにおいてRはプリン(例えばA或いはG)であり、Yはピリミジン(例えばC或いはU/T)である。従って、この実施形態のそれぞれの21-n<sub>t</sub>センス及びアンチセンスRNA鎖は一般的に、プリンヌクレオチドで開始する。第一に転写されたヌクレオチドがプリンの場合、pol IIIプロモーターからのRNAsの発現が有効であると考えられているので、そのような si RNAは、標的部位の変更なしにpol III発現ベクターから発現され得る。20

#### 【0045】

更なる実施形態において、前記 si RNAは、5以下の連続プリン或いはピリミジンを持つ配列を有する。更なる実施形態において、前記 si RNAは、同じ核酸塩基(すなわちA、C、G或いはU/T)を持つ5以下の連続ヌクレオチドを持つ配列を有する。

#### 【0046】

前記 si RNAは、あらゆる標的mRNA配列(前記「標的配列」)における一続きの約19～25近接ヌクレオチドを標的とすることができる。si RNAに対する標的配列を選択するための技術は、例えばTuschl Tらの「The siRNA User Guide」に記載されており、この全体の開示はこの参照によって本明細書に組み込まれる。従って、本発明の si RNAのセンス鎖は、前記標的mRNAにおけるあらゆる約19～約25ヌクレオチドの近接配列と同一のヌクレオチド配列を有する。30

#### 【0047】

一般的に、前記標的mRNA上の標的配列は、好ましくは開始コドンから50～100n<sub>t</sub>下流(すなわち3'方向に)に始まる、前記標的mRNAに一致する所定のcDNA配列から選択され得る。しかしながら標的配列は、5'或いは3'非翻訳領域に、或いは開始コドン近くの領域(例えば、VEGF<sub>1-21</sub>cDNAの5'末端の100n<sub>t</sub>以内である、以下の表1における配列ID番号: 73及び74の標的配列を参照のこと)に位置付けられ得る。

#### 【0048】

本発明の更なる実施形態において、前記標的mRNA配列は、5以下の連続プリン或いはピリミジンを有する。例えば、VEGF<sub>1-21</sub>cDNA配列における適切な標的配列は:40

T C A T C A C G A A G T G G T G A A G (配列ID番号: 8)である。

#### 【0049】

従って、この配列を標的化し、各鎖上に3'u uオーバーハング(オーバーハングは太字で示した)を有する si RNAは以下のようになる。

#### 【0050】

## 【化1】

5'-ucaucacgaaguggugaaguu-3' (SEQ ID NO: 9)

3'-uuaguagugcuucaccacuuc-5' (SEQ ID NO: 10)

## 【0051】

この同じ配列を標的化し、各鎖上に3' T T オーバーハング（オーバーハングは太字で示した）を有する s i R N A は以下のようになる。

## 【0052】

## 【化2】

10

5'-ucaucacgaaguggugaagTT-3' (SEQ ID NO: 11)

3'-TTaguagugcuucaccacuuc-5' (SEQ ID NO: 12)

## 【0053】

s i R N A を派生することができる他の V E G F <sub>1 2 1</sub> 標的配列を表1に示した。表1に記載した全ての V E G F <sub>1 2 1</sub> 標的配列は、全てのヒト V E G F 選択的スプライシング形態に共通の V E G F <sub>1 2 1</sub> 選択的スプライシング形態の一部内であることは理解されるものである。従って、表1の V E G F <sub>1 2 1</sub> 標的配列はさらに、V E G F <sub>1 6 5</sub>、V E G F <sub>1 8 9</sub> 及び V E G F <sub>2 0 6</sub> m R N A も標的にすることができる。特異的 V E G F アイソフォームを標的化する標的配列も、容易に同定され得る。例えば、V E G F <sub>1 2 1</sub> m R N A でなく V E G F <sub>1 6 5</sub> m R N A を標的化した標的配列は、A A C G T A C T T G C A G A T G T G A C A (配列ID番号：13) である。

20

## 【0054】

## 【表1】

表1 VEGF 標的配列

標的配列	配列 I D 番号:	標的配列	配列 I D 番号:
cognate VEGF mRNA sequence	1	GATAGAGCAAGACAAGAAA	26
Splice variant VEGF <sub>121</sub> sequence	2	GACAAGAAAATCCCTGTGG	27
Splice variant VEGF <sub>165</sub> sequence	3	GAAAATCCCTGTGGGCCTT	28
Splice variant VEGF <sub>189</sub> sequence	4	AATCCCTGTGGGCCTTGCT	29
Splice variant VEGF <sub>206</sub> sequence	5	TCCCTGTGGGCCTTGCTCA	30
TCATCACGAAGTGGTGAAG	8	GCATTTGTTGTACAAGAT	31
ucaucacgaaguggugaagu <u>u</u>	9	GATCCGCAGACGTGTAAAT	32
<u>u</u> uaguagugcuucaccacuu <u>c</u>	10	ATGTTCCCTGCACAAACACA	33
ucaucacgaaguggugaag <u>TT</u>	11	TGTTCCCTGCACAAACACAG	34
<u>TT</u> Taguagugcuucaccacuu <u>c</u>	12	AAACACAGACTCGCGTTGC	35
AACGTACTTGCAGATGTGACA	13	AACACAGACTCGCGTTGCA	36
GTTCATGGATGTCTATCAG	14	ACACAGACTCGCGTTGCAA	37
TCGAGACCCTGGTGGACAT	15	CACAGACTCGCGTTGCAAG	38
TGACGAGGGCCTGGAGTGT	16	GGCGAGGCAGCTTGAGTTA	39
TGACGAGGGCCTGGAGTGT	17	ACGAACGTACTTGCAGATG	40
CATCACCATGCAGATTATG	18	CGAACGTACTTGCAGATGT	41
ACCTCACCAAGGCCAGCAC	19	CGTACTTGCAGATGTGACA	42
GGCCAGCACATAGGAGAGA	20	GTGGTCCCAGGCTGCACCC	43
CAAATGTGAATGCAGACCA	21	GGAGGAGGGCAGAACATCATC	44
ATGTGAATGCAGACCAAAG	22	GTGGTGAAGTTCATGGATG	45
TGCAGACCAAAGAAAGATA	23	AATCATCACGAAGTGGTAAG	46
AGAAAGATAGAGCAAGACA	24	AAGTTCATGGATGTCTATCAG	47
GAAAGATAGAGCAAGACAA	25	AATCGAGACCCTGGTGGACAT	48
AATGACGAGGGCCTGGAGTGT	49	AATGTTCCCTGCACAAACACAGAC	65

10

20

30

AACATCACCATGCAGATTATG	50	AAAAACACAGACTCGCGTTGCAA	66
AAACCTCACCAAGGCCAGCAC	51	AAAACACAGACTCGCGTTGCAAG	67
AAGGCCAGCACATAGGAGAGA	52	AAACACAGACTCGCGTTGCAAGG	68
AACAAATGTGAATGCAGACCA	53	AACACAGACTCGCGTTGCAAGGC	69
AAATGTGAATGCAGACCAAAG	54	AAGGCGAGGCAGCTTGAGITAA	70
AATGCAGACCAAAGAAAGATA	55	A	
AAAGAAAGATAGAGCAAGACA	56	AAACGAACGTACTTGCAGATGTG	71
AAGAAAGATAGAGCAAGACAA	57	AACGAACGTACTTGCAGATGTGA	72
AAGATAGAGCAAGACAAGAAAA	58	AAGTGGTCCCAGGCTGCACCCAT	73
T		AAGGAGGAGGGCAGAACATCATCA	74
AAGACAAGAAAATCCCTGTGGGC	59	AAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC	75
AAGAAAATCCCTGTGGGCCTTGC	60	AAAATCCCTGTGGGCCTTGCTCA	76
AATCCCTGTGGGCCTTGCTCAGA	61	accuaccaaggccageacTT	77
AAGCATTGTTGTACAAGATCC	62	gugcuggcccuiuggugagguTT	78
AAGATCCGCAGACGTGTAAATGT	63	GGCTACGTCCAGCGCACC	79
AAATGTTCCCTGCAAAAACACAGA	64	AAACCUCACCAAAGCCAGCAC	80

10

20

30

40

50

## 【0055】

本発明の一実施形態は、VEGFを標的とするsiRNAの有効量投与を含む、視力を安定化させる方法を提供する。本発明の特定の一実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAを、対象の視力が長期にわたって減退することがないだけの有効量を投与する。好ましい実施形態では、配列ID番号：77のセンスRNA鎖および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含むsiRNAを、対象の視力が長期にわたって減退することがないだけの有効量を投与する。

## 【0056】

本発明の他の一実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの対象への投与、および好ましくはVEGFのアンタゴニストなど、siRNAとは異なる医薬品の投与によって、視力を安定させる。幾つもの異なる種類の薬剤を含むVEGFのアンタゴニストが既に開発されている。一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、ベバシズマブまたはラニビズマブなどのVEGFタンパク質を標的とするモノクローナル抗体を含む。他の一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、アフリバセプトのようなVEGFトラップである。さらに他の一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、マクジエンのようなアブタマーである。好ましい一実施形態では、VEGFのアンタゴニストと共に投与するsiRNAは、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含む。

## 【0057】

本発明の一実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの、視力を安定させるための有効量は約0.1mg～約20mgである。さらなる実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの有効量は約0.2mg～約10mgである。追加的な実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの有効量は好ましくは約0.5～約5mgである。さらに好ましい実施形態は、VEGFを標的とするsiRNA約1.5mg、2.5mg、または約3mgを含む、約1mg～約3mgの有効量を提供する。好ましい実施形態では、対象へ投与する、VEGFを標的とするsiRNAは、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含む。

## 【0058】

本発明の一実施形態は、siRNAの有効量を週1回投与するところの、VEGFを標的とするsiRNAの有効量の投与を含み、対象の視力を安定させる方法、を含む。本発

明の他の一実施形態は、 siRNA の有効量を 2 週間に 1 回投与するところの、 VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与を含み、対象の視力を安定させる方法、を含む。好ましくは、本発明のさらなる実施形態は、 siRNA の有効量を 4 週間に 1 回投与するところの、 VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与によって、対象の視力を安定させる方法、を含む。本発明の追加的な好ましい実施形態は、 siRNA の有効量を 8 週間に 1 回、 12 週間に 1 回、 16 週間に 1 回、または 20 週間に 1 回投与するところの、 VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与によって、対象の視力を安定させる方法、を含む。

#### 【 0059 】

本発明の他の一実施形態は、 VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与を含む、対象の脈絡膜血管新生の阻害方法、を提供する。好ましい実施形態では、配列 ID 番号： 77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号： 78 のアンチセンス RNA 鎖を含む siRNA を、対象の脈絡膜血管新生を阻害するような有効量で、投与する。

10

#### 【 0060 】

本発明の他の一実施形態では、 VEGF を標的とする siRNA の対象への投与、および前記 siRNA とは異なる薬剤、好ましくは VEGF のアンタゴニスト、の投与によって脈絡膜血管新生を阻害する。幾つもの異なる種類の薬剤を含む VEGF のアンタゴニストが既に開発されている。一実施形態では、 VEGF のアンタゴニストは、ベバシズマブまたはラニビズマブなどの、 VEGF を標的とするモノクローナル抗体、を含む。他の一実施形態では、 VEGF のアンタゴニストは、アフリバセプトのような VEGF トラップである。さらに他の一実施形態では、 VEGF のアンタゴニストは、マクジエンなどのアブタマーである。好ましい実施形態では、 VEGF のアンタゴニストと共に投与する siRNA は、配列 ID 番号： 77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号： 78 のアンチセンス RNA 鎖を含む。

20

#### 【 0061 】

本発明の一実施形態では、脈絡膜血管新生を阻害するための、 VEGF を標的とする siRNA の有効量は、約 0.1 mg ~ 約 20 mg までである。さらなる実施形態では、 VEGF を標的とする siRNA の有効量は約 0.2 mg ~ 約 10 mg である。追加的な実施形態では、 VEGF を標的とする siRNA の有効量は好ましくは約 0.5 mg ~ 約 5 mg である。さらなる好ましい実施形態は、約 1.5 mg 、 2.5 mg 、または約 3 mg の、 VEGF を標的とする siRNA を含む、約 1 mg ~ 約 3 mg の有効量、を提供する。好ましい実施形態では、対象へ投与する VEGF を標的とする siRNA は、配列 ID 番号： 77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号： 78 のアンチセンス RNA 鎖、を含む。

30

#### 【 0062 】

本発明の一実施形態は、 siRNA の有効量を週 1 回投与するところの、 VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与による、対象の脈絡膜血管新生を阻害する方法、を含む。本発明の他の一実施形態は、 siRNA の有効量を 2 週間に 1 回投与するところの、 VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与による、対象の脈絡膜血管新生を阻害する方法、を含む。好ましくは、本発明のさらなる実施形態は、 siRNA の有効量を 4 週間に 1 回投与するところの、 VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与による、対象の脈絡膜血管新生を阻害する方法、を含む。本発明の追加的な好ましい実施形態は、 siRNA の有効量を 8 週間に 1 回、 12 週間に 1 回、 16 週間に 1 回、または 20 週間に 1 回投与するところの、 VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与による、対象の脈絡膜血管新生を阻害する方法、を含む。

40

#### 【 0063 】

本発明の一実施形態は、 VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与を含む、糖尿病性黄斑浮腫の治療方法、を提供する。好ましい一実施形態では、対象の糖尿病性黄斑浮腫を治療するために有効な量だけ、配列 ID 番号： 77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号： 78 のアンチセンス RNA 鎖を含む siRNA を対象へ投与する。

50

## 【0064】

本発明の他の一実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの対象への投与、および前記siRNAとは異なる薬剤、好ましくはVEGFのアンタゴニスト、の投与によって、糖尿病性黄斑浮腫を治療することができる。幾つもの異なる種類の薬剤を含むVEGFのアンタゴニストが既に開発されている。一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、ベバシズマブまたはラニビズマブなどのVEGFを標的とするモノクローナル抗体を含む。他の一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、アフリバセプトのようなVEGFトラップである。さらに他の一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、マクジエンのようなアプタマーである。好ましい一実施形態では、VEGFのアンタゴニストと共に投与するsiRNAは、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含む。

10

## 【0065】

本発明の一実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの、糖尿病性黄斑浮腫を治療するための有効量は約0.1mg～約20mgである。さらなる実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの有効量は約0.2mg～約10mgである。追加的な実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの有効量は好ましくは約0.5～約5mgである。さらに好ましい実施形態では、約1.5mg、2.5mg、または約3mgのVEGFを標的とするsiRNAを含む、約1mg～約3mgの有効量を提供する。好ましい実施形態では、対象へ投与する、VEGFを標的とするsiRNAは、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含む。

20

## 【0066】

本発明の一実施形態は、siRNAの有効量を週1回投与するところの、VEGFを標的とするsiRNAの有効量の投与によって、対象の糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法、を含む。本発明の他の一実施形態は、siRNAの有効量を2週間に1回投与するところの、VEGFを標的とするsiRNAの有効量の投与によって、対象の糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法、を含む。好ましくは、本発明のさらなる実施形態は、siRNAの有効量を4週間に1回投与するところの、VEGFを標的とするsiRNAの有効量の投与によって、対象の糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法、を含む。本発明の追加的な好ましい実施形態は、siRNAの有効量を8週間に1回、12週間に1回、16週間に1回、または20週間に1回投与するところの、VEGFを標的とするsiRNAの有効量の投与によって、対象の糖尿病性黄斑浮腫を治療する方法、を含む。

30

## 【0067】

本発明の一実施形態は、VEGFを標的とするsiRNAの有効量の投与を含む、糖尿病性網膜症の治療方法を提供する。好ましい一実施形態では、対象の糖尿病性網膜症を治療するために有効な量だけ、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含むsiRNAを対象へ投与する。

## 【0068】

本発明の他の一実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの対象への投与、および前記siRNAとは異なる薬剤、好ましくはVEGFのアンタゴニスト、の投与によって、糖尿病性網膜症を治療することができる。幾つもの異なる種類の薬剤を含むVEGFのアンタゴニストが既に開発されている。一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、ベバシズマブまたはラニビズマブなどのVEGFを標的とするモノクローナル抗体を含む。他の一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、アフリバセプトのようなVEGFトラップである。さらに他の一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、マクジエンのようなアプタマーである。好ましい一実施形態では、VEGFのアンタゴニストと共に投与するsiRNAは、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含む。

40

## 【0069】

本発明の一実施形態では、VEGFを標的とするsiRNAの、糖尿病性網膜症を治療するための有効量は約0.1mg～約20mgである。さらなる実施形態では、VEGF

50

を標的とする siRNA の有効量は約 0.2 mg ~ 約 10 mg である。追加的な実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の有効量は好ましくは約 0.5 ~ 約 5 mg である。さらに好ましい実施形態では、VEGF を標的とする siRNA 約 1.5 mg、2.5 mg、または約 3 mg を含む、約 1 mg ~ 約 3 mg の有効量を提供する。好ましい実施形態では、対象へ投与する、VEGF を標的とする siRNA は、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を含む。

#### 【0070】

本発明の一実施形態は、siRNA の有効量を週 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与によって、対象の糖尿病性網膜症を治療する方法、を含む。本発明の他の一実施形態は、siRNA の有効量を 2 週間に 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与によって、対象の糖尿病性網膜症を治療する方法、を含む。好ましくは、本発明のさらなる実施形態は、siRNA の有効量を 4 週間に 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与によって、対象の糖尿病性網膜症を治療する方法、を含む。本発明の追加的な好ましい実施形態は、siRNA の有効量を 8 週間に 1 回、12 週間に 1 回、16 週間に 1 回、または 20 週間に 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与によって、対象の糖尿病性網膜症を治療する方法、を含む。

10

#### 【0071】

本発明の一実施形態は、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与を含む、増殖性糖尿病網膜症の治療方法を提供する。好ましい一実施形態では、対象の増殖性糖尿病網膜症を治療するために有効な量だけ、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を含む siRNA を対象へ投与する。

20

#### 【0072】

本発明の他の一実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の対象への投与、および前記 siRNA とは異なる薬剤、好ましくは VEGF のアンタゴニスト、の投与によって、増殖性糖尿病網膜症を治療することができる。幾つもの異なる種類の薬剤を含む VEGF のアンタゴニストが既に開発されている。一実施形態では、VEGF のアンタゴニストは、ベバシズマブまたはラニビズマブなどの VEGF を標的とするモノクローナル抗体を含む。他の一実施形態では、VEGF のアンタゴニストは、アフリバセプトのような VEGF トラップである。さらに他の一実施形態では、VEGF のアンタゴニストは、マクジエンのようなアブタマーである。好ましい一実施形態では、VEGF のアンタゴニストと共に投与する siRNA は、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を含む。

30

#### 【0073】

本発明の一実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の、増殖性糖尿病網膜症を治療するための有効量は約 0.1 mg ~ 約 20 mg である。さらなる実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の有効量は約 0.2 mg ~ 約 10 mg である。追加的な実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の有効量は好ましくは約 0.5 ~ 約 5 mg である。さらに好ましい実施形態では、VEGF を標的とする siRNA 約 1.5 mg、2.5 mg、または約 3 mg を含む、約 1 mg ~ 約 3 mg の有効量を提供する。好ましい実施形態では、対象へ投与する、VEGF を標的とする siRNA は、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を含む。

40

#### 【0074】

本発明の一実施形態は、siRNA の有効量を週 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与によって、対象の増殖性糖尿病網膜症を治療する方法、を含む。本発明の他の一実施形態は、siRNA の有効量を 2 週間に 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与によって、対象の増殖性糖尿病網膜症を治療する方法、を含む。好ましくは、本発明のさらなる実施形態は、siRNA の有効量を 4 週間に 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与によって、対象の増殖性糖尿病網膜症を治療する方法、を含む。本発明の追加的な好ま

50

しい実施形態は、*s i RNA*の有効量を8週間に1回、12週間に1回、16週間に1回、または20週間に1回投与するところの、VEGFを標的とする*s i RNA*の有効量の投与によって、対象の増殖性糖尿病網膜症を治療する方法、を含む。

#### 【0075】

本発明の一実施形態は、VEGFを標的とする*s i RNA*の有効量の投与を含む、対象の網膜厚を減少させる方法を提供する。本発明の特定の一実施形態では、VEGFを標的とする*s i RNA*を、対象の網膜厚を長期にわたって減少させられる有効量で、対象へ投与する。好ましい一実施形態では、対象の網膜厚を減少させるために有効な量だけ、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含む*s i RNA*を対象へ投与する。

10

#### 【0076】

本発明の他の一実施形態では、VEGFを標的とする*s i RNA*の対象への投与、および前記*s i RNA*とは異なる薬剤、好ましくはVEGFのアンタゴニスト、の投与によって、糖尿病性黄斑浮腫と診断した対象の網膜厚を減少させる。幾つもの異なる種類の薬剤を含むVEGFのアンタゴニストが既に開発されている。一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、ベバシズマブまたはラニビズマブなどのVEGFを標的とするモノクローナル抗体を含む。他の一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、アフリバセプトのようなVEGFトラップである。さらに他の一実施形態では、VEGFのアンタゴニストは、マクジエンのようなアプタマーである。好ましい一実施形態では、VEGFのアンタゴニストと共に投与する*s i RNA*は、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含む。

20

#### 【0077】

本発明の一実施形態では、VEGFを標的とする*s i RNA*の、対象の網膜厚を減少させるための有効量は約0.1mg～約20mgである。さらなる実施形態では、VEGFを標的とする*s i RNA*の有効量は約0.2mg～約10mgである。追加的な実施形態では、VEGFを標的とする*s i RNA*の有効量は好ましくは約0.5～約5mgである。さらに好ましい実施形態では、VEGFを標的とする*s i RNA*約1.5mg、2.5mg、または約3mgを含む、約1mg～約3mgの有効量を提供する。好ましい実施形態では、対象へ投与する、VEGFを標的とする*s i RNA*は、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含む。

30

#### 【0078】

本発明の一実施形態は、*s i RNA*の有効量を週1回投与するところの、VEGFを標的とする*s i RNA*の有効量の投与によって、対象の網膜厚を減少させる方法、を含む。本発明の他の一実施形態は、*s i RNA*の有効量を2週間に1回投与するところの、VEGFを標的とする*s i RNA*の有効量の投与によって、対象の網膜厚を減少させる方法、を含む。好ましくは、本発明のさらなる実施形態は、*s i RNA*の有効量を4週間に1回投与するところの、VEGFを標的とする*s i RNA*の有効量の投与によって、対象の網膜厚を減少させる方法、を含む。本発明の追加的な好ましい実施形態は、*s i RNA*の有効量を8週間に1回、12週間に1回、16週間に1回、または20週間に1回投与するところの、VEGFを標的とする*s i RNA*の有効量の投与によって、対象の網膜厚を減少させる方法、を含む。

40

#### 【0079】

本発明の一実施形態は、VEGFを標的とする*s i RNA*の有効量の投与を含む、対象の加齢黄斑変性症の治療方法を提供する。本発明の特定の一実施形態では、VEGFを標的とする*s i RNA*を、対象の加齢黄斑変性症を治療するための有効量で、対象へ投与する。好ましい実施形態では、対象の加齢黄斑変性症を治療するために有効な量だけ、配列ID番号：77のセンスRNA鎖、および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含む*s i RNA*を対象へ投与する。

#### 【0080】

本発明の他の一実施形態では、VEGFを標的とする*s i RNA*の対象への投与、およ

50

び前記 siRNA とは異なる薬剤、好ましくは VEGF のアンタゴニスト、の投与によって、加齢黄斑変性症を治療する。幾つもの異なる種類の薬剤を含む VEGF のアンタゴニストが既に開発されている。一実施形態では、VEGF のアンタゴニストは、ベバシズマブまたはラニビズマブなどの VEGF を標的とするモノクローナル抗体を含む。他の一実施形態では、VEGF のアンタゴニストは、アフリバセプトのような VEGF トラップである。さらに他の一実施形態では、VEGF のアンタゴニストは、マクジエンのようなアプタマーである。好ましい一実施形態では、VEGF のアンタゴニストと同時に投与する siRNA は、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を含む。

## 【0081】

10

本発明の一実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の、対象の加齢黄斑変性症を治療するための有効量は約 0.1 mg ~ 約 20 mg である。さらなる実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の有効量は約 0.2 mg ~ 約 10 mg である。追加的な実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の有効量は好ましくは約 0.5 ~ 約 5 mg である。さらに好ましい実施形態では、VEGF を標的とする siRNA 約 1.5 mg、2.5 mg、または約 3 mg を含む、約 1 mg ~ 約 3 mg の有効量を提供する。好ましい実施形態では、対象へ投与する、VEGF を標的とする siRNA は、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖、および配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を含む。

## 【0082】

20

本発明の一実施形態は、siRNA の有効量を週 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与による、対象の加齢黄斑変性症の治療方法、を含む。本発明の他の一実施形態は、siRNA の有効量を 2 週間に 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与による、対象の加齢黄斑変性症の治療方法、を含む。好ましくは、本発明のさらなる実施形態は、siRNA の有効量を 4 週間に 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与による、対象の加齢黄斑変性症の治療方法、を含む。本発明の追加的な好ましい実施形態は、siRNA の有効量を 8 週間に 1 回、12 週間に 1 回、16 週間に 1 回、または 20 週間に 1 回投与するところの、VEGF を標的とする siRNA の有効量の投与による、対象の加齢黄斑変性症の治療方法、を含む。

## 【0083】

30

本発明の他の実施形態は、ヒト VEGF の mRNA にある約 19 ~ 約 25 の連続したヌクレオチドの標的配列と同一なヌクレオチド配列をセンス RNA 鎖が含み、センスおよびアンチセンス RNA 鎖が RNA 二重鎖を形成する、センス RNA 鎖およびアンチセンス RNA 鎖を含む siRNA の有効量、および VEGF のアンタゴニストの有効量の、対象への投与を含む、加齢黄斑変性症および糖尿病性黄斑浮腫の治療方法、を提供する。VEGF のアンタゴニストは、siRNA の前に、後に、または同時に投与することができる。好ましい実施形態では、センス RNA 鎖は配列 ID 番号：77 を含み、アンチセンス RNA 鎖は配列 ID 番号：78 を含む。siRNA は、硝子体内、網膜内、網膜下、テノン下、眼窩の周囲および後方、角膜を貫いて、および鞆膜を貫いて、といった方法で眼内投与することができる。そうした方法においては、前記 siRNA の有効量は、約 0.1 mg ~ 約 20 mg とすることができます。さらなる実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の有効量は約 0.2 mg ~ 約 10 mg である。追加的な実施形態では、VEGF を標的とする siRNA の有効量は好ましくは約 0.5 ~ 約 5 mg である。さらに好ましい実施形態では、VEGF を標的とする siRNA 約 1.5 mg、2.5 mg、または約 3 mg を含む、約 1 mg ~ 約 3 mg の有効量を提供する。前記 VEGF siRNA の有効量は週 1 回、2 週間に 1 回、4 週間に 1 回、8 週間に 1 回、12 週間に 1 回、16 週間に 1 回、または 20 週間に 1 回、投与することができる。好ましくは、VEGF siRNA を 4 週間に 1 回投与する。

## 【0084】

40

特定の実施形態では、VEGF のアンタゴニストは、例えばベバシズマブまたはラニビ

50

ズマブといった、ヒト VEGF を標的とするモノクローナル抗体である。他の実施形態では、VEGF のアンタゴニストは、アフリバセプトのような、VEGF トランクである。他の実施形態では、VEGF のアンタゴニストは、マクジエンのような、VEGF のアブタマーである。

#### 【0085】

一実施形態では、そういった方法は、好ましくは、センス RNA 鎖が配列 ID 番号：77 を含み、アンチセンス RNA 鎖が配列 ID 番号：78 を含む VEGF siRNA、およびラニビズマブ、の投与を含む。前記 siRNA は 4 週間に 1 回（すなわち月 1 回）投与することができ、前記ラニビズマブは 4 週間に 1 回（月 1 回）投与することができる。さらなる実施形態では、前記 siRNA の投与と交互に、前記 siRNA の 2 週間前にラニビズマブを投与することができる。例えば、一実施形態は、0 日目のラニビズマブの有効量の投与、そして 2 週間目の VEGF siRNA の有効量の投与、そして 4 週間目のラニビズマブの有効量の投与、そして 6 週目の VEGF siRNA の有効量の投与、そして 8 週目のラニビズマブの有効量の投与、を含む。こうした投与は、加齢黄斑変性症を治療するための急性期治療を含むことができる。さらなる実施形態では、前記急性期治療には、維持療法を続けて行うことができ、その維持療法は 12 週目に始まり、例えば、8 週間に 1 回、または 12 週間に 1 回、siRNA を投与する。

10

#### 【0086】

一実施形態では、そういった方法は、好ましくは、センス RNA 鎖が配列 ID 番号：77 を含み、アンチセンス RNA 鎖が配列 ID 番号：78 を含む VEGF siRNA、およびベバシズマブ、の投与を含む。前記 siRNA は 4 週間に 1 回（すなわち月 1 回）投与することができ、前記ベバシズマブは 4 週間に 1 回（月 1 回）投与することができる。さらなる実施形態では、前記 siRNA の投与と交互に、前記 siRNA の 2 週間前にベバシズマブを投与することができる。例えば、一実施形態は、0 日目のベバシズマブの有効量の投与、そして 2 週間目の VEGF siRNA の有効量の投与、そして 4 週間目のベバシズマブの有効量の投与、そして 6 週目の VEGF siRNA の有効量の投与、そして 8 週目のベバシズマブの有効量の投与、を含む。こうした投与は、加齢黄斑変性症を治療するための急性期治療を含むことができる。さらなる実施形態では、前記急性期治療には、維持療法を続けて行うことができ、その維持療法は 12 週目に始まり、例えば、8 週間に 1 回、または 12 週間に 1 回、siRNA を投与する。

20

30

#### 【0087】

他の一実施形態では、そういった方法は、好ましくは、センス RNA 鎖が配列 ID 番号：77 を含み、アンチセンス RNA 鎖が配列 ID 番号：78 を含む VEGF siRNA、および例えばラニビズマブ、ベバシズマブ、アフリバセプト、またはマクジエンといった VEGF のアンタゴニストの投与を含む。前記 siRNA は 4 週間に 1 回（すなわち月 1 回）投与することができ、前記 VEGF のアンタゴニストは 4 週間に 1 回（月 1 回）投与することができる。さらなる実施形態では、前記 siRNA の投与と交互に、前記 siRNA の 2 週間前に VEGF のアンタゴニストを投与することができる。例えば、一実施形態は、0 日目の VEGF のアンタゴニストの有効量の投与、そして 2 週間目の VEGF siRNA の有効量の投与、そして 4 週間目の VEGF のアンタゴニストの有効量の投与、そして 6 週目の VEGF siRNA の有効量の投与、そして 8 週目の VEGF のアンタゴニストの有効量の投与、を含む。こうした投与は、加齢黄斑変性症を治療するための急性期治療を含むことができる。さらなる実施形態では、前記急性期治療には、維持療法を続けて行うことができ、その維持療法は 12 週目に始まり、例えば、8 週間に 1 回、または 12 週間に 1 回、siRNA を投与する。

40

#### 【0088】

本発明の実施形態はまた、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖および配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を含む siRNA を含み、前記 siRNA が平衡塩類溶液中にあり、医薬組成物も含む。本発明の他の一実施形態は、配列 ID 番号：77 のセンス RNA 鎖および配列 ID 番号：78 のアンチセンス RNA 鎖を含む siRNA、および医薬

50

組成物が眼内投与に適合するような平衡塩類溶液、を含む医薬組成物である。本発明の追加的な実施形態は、配列ID番号：77のセンスRNA鎖および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含むsiRNA、および平衡塩類溶液を含み、医薬組成物が約6.08～約8.0のpH値を有する、医薬組成物である。

## 【0089】

さらなる実施形態は、配列ID番号：77のセンスRNA鎖および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含むsiRNAを含み、前記siRNAの濃度が0.2mg/100μL～約3.0mg/100μLである、医薬組成物を含む。本発明の追加的な実施形態は、配列ID番号：77のセンスRNA鎖および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含むsiRNAを含み、前記siRNAの濃度が1.5mg/100μL、2.5mg/100μL、または3.0mg/100μLである、医薬組成物である。さらなる実施形態は、配列ID番号：77のセンスRNA鎖および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含むsiRNAを含み、前記siRNAの濃度が0.2mg/50μL～約3.0mg/50μLである、医薬組成物を含む。本発明の追加的な実施形態は、配列ID番号：77のセンスRNA鎖および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含むsiRNAを含み、前記siRNAの濃度が1.5mg/50μL、2.5mg/50μL、または3.0mg/50μLである、医薬組成物である。

10

## 【0090】

他の一実施形態は、配列ID番号：77のセンスRNA鎖および配列ID番号：78のアンチセンスRNA鎖を含むsiRNA、酢酸ナトリウム（三水和物）、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム（無水三塩基性）塩化カリウム、塩化カリダム（無水）、塩化マグネシウム（六水和物）、塩酸、水酸化ナトリウム、および水、を含む眼内投与に適した医薬組成物である。

20

## 【0091】

siRNAは、当該技術分野において周知のいくつもの技術によって得ることが可能である。例えば、siRNAを化学的に合成する、または、その開示内容全てが本願明細書に参照として組み込まれるところのTuschl et al.,による米国公開特許第2002/0086356号に記述されているショウジョウバエのインビトロ・システムといった当該技術分野において既知の方法を用いた組み換えによって作製する、ことが可能である。

30

## 【0092】

好ましくは、siRNAは、適切に保護したリボヌクレオシド・ホスホアミダイトおよび古典的なDNA/RNA合成装置を用いて化学的に合成する。siRNAは、2つの相補的な別のRNA分子として、または相補的な2つの領域を有した1つのRNA分子として、合成することが可能である。RNA分子または合成試薬の供給業者には、Prologio（ドイツHamburg）、Dharmacon Research（米国コロラド州Lafayette）、Pierce Chemical（Perbio Science, 米国イリノイ州Rockford、のグループ企業）、Glen Research（米国バージニア州Sterling）、ChemGenes（米国マサチューセッツ州Ashland）、およびCruachem（英国Glasgow）が含まれる。

40

## 【0093】

siRNAはまた、2006年9月8日の出願になり、「siRNAおよび製造方法」と題され、その全体が本願明細書に参照として組み込まれるところの同時係属の米国仮出願第60/824,953号にさらなる詳細が記述されているように、複数の相補的RNA分子として合成することも可能である。

## 【0094】

あるいは、siRNAは、適切なプロモーターを用いて、環状または直線状のDNAプラスミドから発現させることもまた可能である。プラスミドからsiRNAを発現させるのに適切なプロモーターは、例えば、U6またはH1 RNA pol IIIIプロモーター配列、およびサイトメガロウイルス・プロモーターを含む。他の適切なプロモーターの

50

選択は、当該技術分野の範囲内である。本発明の組換えプラスミドは、特定の組織または特定の細胞内環境において siRNA の発現を誘導可能な、または調節可能なものも、また含むことが可能である。

#### 【0095】

組換えプラスミドから発現させる siRNA は、標準的な技術によって培養細胞の発現系から単離すること、または、インビオでの血管新生の領域またはその近傍の細胞内で発現させることの、いずれもが可能である。組換えプラスミドを用いた、インビオでの siRNA の細胞への輸送については、以下でさらに詳細に議論する。

#### 【0096】

siRNA は、2つの相補的な別の RNA 分子として、または相補的な2つの領域を有する1つの RNA 分子として、組換えプラスミドから発現させることが可能である。 10

#### 【0097】

siRNA の発現に適したプラスミドの選択、 siRNA 発現のための核酸配列をプラスミドへ挿入する方法、および興味のある細胞へ組換えプラスミドを輸送する方法は、当該技術分野の範囲内である。例としては、それらの全ての開示内容が本願明細書に参照として組み込まれるところの、 Tuschl , T . ( 2002 ) , Nat . Biotech nol . 20 : 446 - 448 ; Brummelkamp TR et al . ( 2002 ) , Science 296 : 550 - 553 ; Miyagishi M et al . ( 2002 ) , Nat . Biotechnol . 20 : 497 - 500 ; Paddison PJ et al . ( 2002 ) , Genes Dev . 16 : 948 - 958 ; Lee NS et al . ( 2002 ) , Nat . Biotechnol . 20 : 500 - 505 ; および、 Paul CP et al . ( 2002 ) , Nat . Biotechnol . 20 : 505 - 508 を参照されたい。 20

#### 【0098】

siRNA 発現のための核酸配列を含むプラスミドは、後述の実施例 7 に記載してある。 pAAVsiRNA と呼ばれるそのプラスミドは、ヒト U6 RNA プロモーターの制御下でポリ T 終止配列と操作的に関連するセンス RNA 鎖、およびヒト U6 RNA プロモーターの制御下でポリ T 終止配列と操作的に関連するアンチセンス RNA 鎖、を含む。プラスミドである pAAVsiRNA は結局、 siRNA 発現のためのものと同一の核酸配列を含む組換えアデノ随伴ウイルスベクターの作製における利用を意図したものである。 30

#### 【0099】

本願明細書で使用する際、「ポリ T 終止配列と操作的に関連する」とは、センスまたはアンチセンス鎖をコードする核酸配列が前記ポリ T 終止配列の 5' 側のすぐ隣に近接していることを意味する。プラスミドからセンスまたはアンチセンス配列を転写する際、ポリ T 終止シグナルは転写を終止させるように働く。

#### 【0100】

本願明細書で使用する際、プロモーター「の制御下で」とは、センスまたはアンチセンスのコード配列の転写を前記プロモーターが開始することが可能であるように、センスまたはアンチセンス鎖をコードする核酸配列がプロモーターの 3' 側に位置することを意味する。 40

#### 【0101】

siRNA は、インビオにおいて血管新生の領域または近傍で、組換えウイルスベクターから細胞内で発現させることもまた可能である。本発明の組換えウイルスベクターは、 siRNA 、および siRNA 配列の発現のためのあらゆる適切なプロモーターを含む。適切なプロモーターは、例えば、 U6 または H1 RNA pol II I I I プロモーター配列、およびサイトメガロウイルス・プロモーターを含む。他の適切なプロモーターの選択は、当該技術分野の範囲内である。本発明の組換えウイルスベクターは、特定の組織または、特定の細胞内環境における siRNA 発現のための、誘導可能な、または調節可能なプロモーターもまた、含む。インビオにおける siRNA の細胞への輸送のための組換え

10

20

30

40

50

ウイルスベクターの利用は、以下でさらに詳細に議論する。

**【0102】**

s i R N A は、2つの相補的な別のR N A 分子として、または相補的な2つの領域を有する1つのR N A 分子として、組換えウイルスベクターから発現させることが可能である。

**【0103】**

発現させる s i R N A 分子のコード配列を受け入れることができるあらゆるウイルスベクター、例えば、アデノウイルス由来のベクター(A V)；アデノ隨伴ウイルス(A A V)；レトロウイルス(例えば、レンチウイルス(L V)，ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス)；ヘルペスウイルス、およびそれらに類するものを用いることが可能である。ウイルスベクターの向性を、ベクターを他のウイルスのエンベロープ・タンパク質または他の表面抗原でシードタイピングすることによって、修飾することもできる。例えば、本発明のA A Vベクターは、水泡性口内炎ウイルス(V S V)、狂犬病、エボラ、モコラ、およびそれらに類するものの表面タンパク質で、シードタイピングすることが可能である。

10

**【0104】**

本発明での利用に適した組換えウイルスベクターの選択、s i R N A を発現させるための核酸配列のベクターへの挿入方法、および興味のある細胞へのウイルスベクターの輸送方法は、当該技術分野の範囲内である。例えば、それらの全ての開示内容が本願明細書に参照として取り込まれるところの、D o r n b u r g R (1995), G e n e T h e r a p . 2 : 3 0 1 - 3 1 0 ; E g l i t t i s M A (1988), B i o t e c h n i q u e s 6 : 6 0 8 - 6 1 4 ; M i l l e r A D (1990), H u m G e n e T h e r a p . 1 : 5 - 1 4 ; および、A n d e r s o n W F (1998), N a t u r e 3 9 2 : 2 5 - 3 0 を参照されたい。

20

**【0105】**

好ましいウイルスベクターは、A V および A A V 由来のものである。特に好ましい実施形態では、s i R N A は、2つの相補的な1本鎖R N A 分子として、例えば、U 6 または H 1 R N A プロモーター、またはサイトメガロウイルス(C M V)プロモーターを含む組換えA A Vベクターから発現させる。

30

**【0106】**

s i R N A の発現のための適切なA Vベクター、組換えA Vベクターの作製方法、および標的細胞へのベクターの輸送方法は既に記述されている。

**【0107】**

s i R N A の発現のための適切なA A Vベクター、組換えA A Vベクターの作製方法、および標的細胞へのベクターの輸送方法は、それらの全ての開示内容が本願明細書に参照として取り込まれるところの、S a m u l s k i R e t a l . (1987), J . V i r o l . 6 1 : 3 0 9 6 - 3 1 0 1 ; F u s h e r K J e t a l . (1996), J . V i r o l . , 7 0 : 5 2 0 - 5 3 2 ; S a m u l s k i R e t a l . (1989), J . V i r o l . 6 3 : 3 8 2 2 - 3 8 2 6 ; 米国特許第5,252,479号明細書；米国特許第5,139,941号明細書；国際特許出願第W O 9 4 / 1 3 7 8 8 号；および国際特許出願第W O 9 3 / 2 4 6 4 1 号に記述されている。

40

**【0108】**

上述したように、s i R N A はV E G F を標的としてR N A i を介したV E G F , さらに好ましくはヒトV E G F 、の分解を引き起こすことが可能である。前記 s i R N A による標的m R N A の分解は、V E G F の機能的な遺伝子産物の生産を減少させる。従って、本発明の他の一実施形態は、標的m R N A が分解するような対象体内へのs i R N A の有効量の投与を含む、対象体内のV E G F 発現の阻害方法、を提供する。V E G F 遺伝子産物は血管新生の開始および維持に必要とされるので、本発明の他の一実施形態は、本発明のs i R N A による、R N A i を介した標的m R N A の分解による対象体内の血管新生の阻害方法、を提供する。

50

## 【0109】

R N A i を介した標的 m R N A の分解は、上述した m R N A またはタンパク質の単離および定量の標準的技術を用いた、標的 m R N A または対象の細胞内タンパク質の量の測定によって、検出できる。

## 【0110】

血管新生の阻害は、例えば、s i R N A による治療前後の血管新生領域のサイズの観察によって、対象体内の病原性または非病原性の血管新生の進行を直接的に測定することで、評価できる。もし、血管新生領域のサイズが同じまま、または縮小したならば、血管新生の阻害が示唆される。対象体内の血管新生領域のサイズの観察または測定のための技術は当該技術分野の範囲内であり、例えば、脈絡膜血管新生の領域は検眼鏡検査によって観察することが可能である。10

## 【0111】

血管新生の阻害は、血管新生と関連する病原性の症状の変化または快復の観察を通して推定することも、また可能である。例えば、A R M D では、失明の減速、停止、または快復が、脈絡膜における血管新生の阻害を示している。

## 【0112】

s i R N A が標的 m R N A を半化学量論的に分解（および、従って血管新生を阻害）することが可能であることが理解されている。いかなる理論にも束縛されたいと望むことなしに、s i R N A は触媒的に働いて標的 m R N A の分解を引き起こすとされている。従って、標準的な抗血管新生治療と比較して、治療効果を得るためにには、血管新生領域またはその近傍へ輸送する s i R N A は著しく少なくてよい。20

## 【0113】

特定の実施形態では、s i R N A の有効量は約 0 . 1 m g ~ 約 2 0 m g である。他の実施形態では、s i R N A の有効量は約 0 . 2 m g ~ 約 2 0 m g である。好ましい実施形態では、s i R N A の有効量は約 0 . 5 m g ~ 約 5 m g であり、さらに好ましくは、約 1 . 5 m g 、約 2 . 5 m g 、および約 3 . 0 m g を含む、約 1 m g ~ 約 3 m g である。

## 【0114】

他の血管新生関連の疾患は、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症（age - related macular degeneration : A R M D ）、乾癬、関節リウマチ、および他の炎症性疾患、を含む。これら疾患は、血管新生領域における、新たに形成された血管による正常組織の破壊、によって特徴付けられる。例えば A R M D では、脈絡膜が毛細血管によって侵され、破壊される。A R M D における血管新生由来の脈絡膜の破壊は、最終的には部分的な、または完全な失明を引き起こす。30

## 【0115】

さらに好ましくは、加齢黄斑変性症における脈絡膜血管新生を抑制するために s i R N A を用いる。

## 【0116】

血管新生関連の疾患を治療するために、s i R N A を、前記 s i R N A とは異なる医薬品と組み合わせて、対象へ投与することが可能である。あるいは、血管新生関連の疾患を治療するために設計したほかの治療方法と組み合わせて、s i R N A を対象へ投与することが可能である。例えば、加齢黄斑変性症の治療のために現在使用されている治療方法と組み合わせて、s i R N A を投与することが可能である。40

## 【0117】

本発明の方法では、本発明の s i R N A は、裸の s i R N A のまま、デリバリー試薬と結合して、または前記 s i R N A を発現する組換えプラスミドまたはウイルスベクターとして、対象へ投与することが可能である。

## 【0118】

本発明の s i R N A と結合して投与するための適切なデリバリー試薬は、マイラス・トランシット T K O 脂肪親和性試薬（M i r u s T r a n s i t T K O l i p o p h i l i c r e a g e n t ）；リポフェクチン；リポフェクタミン；セルフェクチン；50

またはポリカチオン（例えば、ポリリシン）、またはリポソーム、を含む。好ましいデリバリー試薬はリポソームである。

【0119】

リポソームは、網膜または腫瘍組織など特定の組織への siRNA の輸送において助けとなることが可能であり、siRNA の血中半減期を増加させることもまた可能である。本発明での使用に適したリポソームは、中性または負に帯電した脂質および、コレステロールなどのステロールを含む、ベシクルを形成する標準的な脂質から形成させる。脂質の選択は、リポソームの望ましいサイズ、および血流中のリポソームの半減期といった要素を考慮に入れて行う。リポソームの調製のためには様々な方法が知られており、例えば、それらの開示内容の全てが本願明細書に参照として取り込まれるところの、Szoka et al. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; および米国特許第4,235,871号明細書、同第4,501,728号明細書、同第4,837,028号明細書、および同第5,019,369号明細書に記述されている。

10

【0120】

好ましくは、本発明の siRNA を封入するリポソームは、血管新生の部位またはその近傍の特定の細胞または組織をリポソームの標的とすることが可能なリガンド分子、を含む。腫瘍抗原または内皮細胞の表面抗原に結合するモノクローナル抗体といった、腫瘍または血管内皮細胞に多く見られる受容体に結合するリガンドが好ましい。

20

【0121】

特に好ましくは、本発明の siRNA を封入するリポソームは、単核マクロファージ (mononuclear macrophage) および網膜内皮系による排除を避けるために、例えば、構造の表面に結合したオプソニン化阻害部分を有するように修飾する。一実施形態では、本発明のリポソームは、オプソニン化阻害部分およびリガンドの両方を含むことが可能である。

20

【0122】

本発明のリポソームの調製において使用するオプソニン化阻害部分は、典型的には、リポソーム膜に結合した大きな親水性ポリマーである。本願明細書で用いる場合、オプソニン化阻害部分がリポソーム膜へ「結合している」という場合は、例えば、脂溶性アンカーを膜自体への挿入、または膜脂質の活性基への直接的な結合によって、前記オプソニン化阻害部分が化学的または物理的に膜へ付着していることを意味する。それらのオプソニン化阻害親水性ポリマーは、例えばその開示内容の全てが本願明細書において参考として取り込まれるところの、米国特許第4,920,016号明細書に記述されている通り、マクロファージ・単球系 (macrophage-monocyte system: MMS) および網膜内皮系 (reticuloendothelial system: RES) によるリポソームの取り込みを著しく減少させる、保護的な表層を形成する。従って、オプソニン化阻害部分によって修飾したリポソームは、修飾していないリポソームと比較して、循環系により長く留まる。この理由により、そういうリポソームは時々、「ステルス (stealth)」リポソームと呼ばれる。

30

【0123】

ステルス・リポソームは、多孔質または「漏れ易い (leaky)」微小血管系によって血液供給される組織に蓄積することが知られている。従って、そういう微小血管系の異常、例えば固形腫瘍によって特徴付けられる標的組織は、それらのリポソームを効率的に蓄積する。さらに、RES による取り込みの減少は、肝臓および脾臓への顕著な蓄積を妨げることにより、ステルス・リポソームの毒性を低める。従って、オプソニン化阻害部分によって修飾した本発明のリポソームは、本発明の siRNA を腫瘍細胞へ輸送することが可能である。

40

【0124】

リポソームを修飾するのに適したオプソニン化阻害部分は、好ましくは数平均分子量が約 500 ~ 約 40,000 ダルトン、およびさらに好ましくは約 2,000 ~ 約 20,0

50

00ダルトンの、水溶性ポリマーである。そのようなポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)またはポリプロリエングリコール(PPG)の誘導体を含む；例えば、メトキシPEGまたはPPG、およびステアリン酸PEGまたはPPG；ポリアクリルアミドまたはポリビニルピロリドンといった合成ポリマー；直鎖状、分岐、または樹状ポリアミドアミン；ポリアクリル酸；多価アルコール、例えばガングリオシドGM<sub>1</sub>、といったガングリオシドのようにカルボキシル基またはアミノ基が化学的に結合したポリビニルアルコールおよびポリキシリトール、である。PEG、メトキシPEG、またはメトキシPPG、またはそれらの誘導体の共重合体もまた、適している。さらに、オプソニン化阻害ポリマーは、ポリアミノ酸、多糖、ポリアミドアミン、ポリエチルエナミン、またはポリヌクレオチドと、PEGのブロック共重合体とすることも可能である。オプソニン化阻害ポリマーは、例えばガラクトロン酸、マンヌロン酸、ヒアルロン酸、ペクチン酸、ノイラミン酸、アルギン酸、カラギナンといった、アミノ酸またはカルボン酸を含む天然多糖；アミノ化多糖またはオリゴ糖(直鎖または分岐)；または、例えばカルボキシル基で架橋した合成物とカルボン酸の誘導体と反応させたカルボキシル化した多糖またはオリゴ糖、とすることも可能である。

10

## 【0125】

好みしくは、オプソニン化阻害部分は、PEG、PPG、またはそれらの誘導体である。PEGまたはPEG誘導体で修飾したリポソームは時に「PEG化リポソーム(PEGylated liposomes)」と呼ばれる。

20

## 【0126】

オプソニン化阻害部分は、多くの既知の技術のうちのいずれかによってリポソーム膜へ結合することが可能である。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドのPEGエステルをホスファチジルエタノールアミンの脂溶性アンカーへ結合し、それを膜へ結合することが可能である。同様に、デキストランポリマーは、Na(CN)BH<sub>3</sub>および、テトラヒドロフランおよび水を60で30:12の比率にしたものといった溶媒混合液、を用いた還元的アミノ化を介して、ステアリルアミンの脂溶性アンカーによって誘導体化することが可能である。

20

## 【0127】

siRNAを発現する組換えプラスミドは、上述の通りである。こうした組換えプラスミドは、マイラス・トランシットLT1脂肪親和性試薬(Mirus Transit LT1 lipophilic reagent)；リポフェクチン；リポフェクタミン；セルフェクチン；ポリカチオン(例えば、ポリリシン)またはリポソーム、を含む適切なデリバリー試薬と結合させて、または直接に、投与することもまた可能である。siRNAを発現する組換えウイルスベクターもまた、上述の通りであり、患者体内の血管新生領域へのこうしたベクターの輸送方法は、当該技術分野の範囲内である。

30

## 【0128】

血管新生の領域またはその近傍の組織の細胞へsiRNAを輸送するのに適した、いかなる方法によても、siRNAを対象へ投与することが可能である。例えば、siRNAは、遺伝子銃、エレクトロポレーション、または他の適切な非経口または腸溶性の投与経路によって、投与することが可能である。

40

## 【0129】

適切な腸溶性の投与経路は、経口、直腸、または経鼻投与を含む。

## 【0130】

適切な非経口の投与経路は、血管内投与(例えば静脈内ボーラス注射、静脈内注入、動脈内ボーラス注射、動脈内注入、およびカテーテルから血管系への滴下)；組織内または周辺への投与(例えば、腫瘍周辺および腫瘍内への注射、網膜内への注射、網膜下への注射、または硝子体内への注射)；皮下注射、または皮下注入(浸透圧ポンプによるもののような)を含む注入；例えばカテーテルまたは他の注入器(例えば、角膜用のペレット、または坐薬、目薬、または多孔質、非多孔質、またはゲル状の物質を含むインプラント)などによる、血管新生部位またはその近傍への直接的な(例えば局所の)使用；および吸

50

入剤、を含む。

【0131】

適切な注入器は、米国特許第5,902,598号明細書、および同第6,375,972号明細書に記載されている眼内インプラント、および米国特許第6,331,313号明細書に記載されている生体分解性の眼内インプラントを含み、これらの開示内容の全ては本願明細書に参照として取り込まれるものである。そういう眼内インプラントは、Control Delivery Systems, Inc. (マサチューセッツ州Watertown) およびOculix Pharmaceuticals, Inc. (カリフォルニア州Sunnyvale) から入手できる。

【0132】

好ましい実施形態では、siRNAの注射または注入は、血管新生の部位またはその近傍で行う。さらに好ましくは、本技術分野の範囲内(例えば、その開示内容の全てが本願明細書に参照として組み込まれるところの、Acheampong AA et al., 2002, Drug Metabol. and Disposition 30:421-429を参照)にあるように、例えば下まぶた又は結膜円蓋へ液体またはゲル状にて、siRNAを目に局所的に投与する。

【0133】

典型的には、siRNAは、約5マイクロリットル～約75マイクロリットルの量、例えば約7マイクロリットル～約50マイクロリットル、好ましくは約10マイクロリットル～約30マイクロリットルを、目に局所的に投与する。75マイクロリットル以上の量のsiRNAの目への局所的な滴下は、こぼしたり溢れさせたりすることでsiRNAを無駄にしてしまうことが理解されよう。

【0134】

特に好ましい非経口投与の経路は、眼内投与である。本発明のsiRNAの眼内投与としては、投与経路がsiRNAの目への進入を許すものである限り、注射によるまたは直接的な(例えば局所的な)目への投与が可能であることが理解されよう。上述した目への投与の局所的な経路に加えて、適切な眼内への投与経路は、硝子体内、網膜内、網膜下、テノン下、眼窩の周囲および後方、角膜を貫いた、および鞆膜を貫いた、投与を含む。こうした眼内投与経路は本技術分野の範囲内であり、例えば、それらの開示内容の全てが本願明細書に参照として組み込まれるところの、上記のAcheampong AA et al., 2002, およびBennett et al. (1996), Hum. Gene Ther. 7: 1763-1769、およびAmbati J et al., 2002, Progress in Retinal and Eye Res. 21: 145-151、を参照されたい。他の好ましい一実施形態では、siRNAを硝子体内への注射によって投与する。

【0135】

siRNAは単回投与または複数回投与で投与することが可能である。注入によるsiRNAの投与では、注入は、1回の長い投与または複数回の注入による供給、とすることが可能である。組織への直接的な試薬の注射は、血管新生の部位またはその近傍へすることが好ましい。血管新生の部位またはその近傍の組織への、試薬の複数回の注射が、特に好ましい。

【0136】

血管新生の部位またはその近傍への1回の注射または注入などによって、siRNAを対象へ1回投与することが可能である。あるいは、毎日または毎週ごとに数回、siRNAを対象へ投与することが可能である。例えば、約3週間～約28週間、さらに好ましくは約7週間～約10週間の期間に渡って、siRNAを週1回ずつ対象へ投与することが可能である。好ましい投薬計画では、4週間、8週間、または12週間に1回、血管新生部位またはその近傍にsiRNAを注射する。さらに好ましい投薬計画では、好ましくは約8週間の急性期の間は4週間に1回、血管新生の部位またはその近傍へ(例えば硝子体内へ)siRNAを注射し、それに続く維持療法期には8週間～12週間に1回ずつ前記

10

20

30

40

50

s i R N A を注射する。好ましくは、s i R N A に先んじて、好ましくは前記 s i R N A の投与の 2 週間前に、そして 8 週間の間（すなわち、急性期の間）、V E G F のアンタゴニストを投与する。滲出型の A R M D または糖尿病性網膜症といった慢性的な血管新生病を患う患者に対しては、無期限の期間、定期的な s i R N A の投与が必要となる。

## 【 0 1 3 7 】

投薬計画が複数の投与を含む場合、対象へ投与する s i R N A の有効量は、全体の投薬計画を通して投与した s i R N A の総量を含むことが可能である。

## 【 0 1 3 8 】

対象への投与に先んじて、s i R N A を好ましくは、当該技術分野で既知の技術に従つて、医薬組成物として規格化する。本発明の医薬組成物は少なくとも発熱物質を含まず無菌であることで特徴付けられる。本願明細書で用いる場合、「医薬品としての規格」とは、ヒトおよび動物への使用における規格を含む。本発明の医薬組成物の調製方法は当該技術分野の範囲内であり、例えば、その開示内容の全てが本願明細書に参照として取り込まれるところの、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e , 1 7 t h e d . , M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y , ペンシルバニア州E a s t o n ( 1 9 8 5 ) に記述されている。

10

## 【 0 1 3 9 】

一実施形態では、医薬品としての規格は、s i R N A ( 例えは重量で 0 . 1 ~ 9 0 % ) またはそれの生理学的に許容可能な塩を、生理学的に許容可能なキャリアー媒体と混合したもの、を含む。好ましい生理学的に許容可能なキャリアー媒体としては、水、緩衝液、生理的食塩水 ( 例えは、生理食塩水、またはハンクス液またはアール液といった平衡塩類溶液 ) 、 0 . 4 % 生理食塩水、 0 . 3 % グリシン、ヒアルロン酸、およびそれに類するものが挙げられる。

20

## 【 0 1 4 0 】

医薬組成物は、古典的な医薬賦形剤および / または添加剤もまた、含むことが可能である。適切な医薬賦形剤は、安定剤、酸化防止剤、浸透圧剤、緩衝液、および pH 調節剤、を含む。適切な添加剤は、生理学的に生体適合性のある緩衝液 ( 例えは、塩酸トロメタミン ) 、キレート剤の添加 ( 例えは、D T P A または D T P A - ビスマイド ) またはカルシウムキレート剤複合体 ( 例えは、カルシウム D T P A または C a N a D T P A - ビスマイド ) 、または、選択的に、カルシウムまたはナトリウム塩の添加 ( 例えは、塩化カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、または乳酸カルシウム ) 、を含む。本発明の医薬組成物は、液状でパッケージすることが可能であり、また凍結乾燥することも可能である。

30

## 【 0 1 4 1 】

目への局所的投与のためには、古典的な眼内へのデリバリー試薬を用いることが可能である。例えは、眼内への局所的デリバリーのための本発明の医薬組成物は、上述した生理食塩水、角膜透過促進剤、不溶性粒子、流動パラフィン又は他のゲルをベースとした軟膏、目への滴下における増粘効果のあるポリマー、または粘膜付着性ポリマー、を含むことが可能である。好ましくは、眼内へのデリバリー試薬は、角膜透過性を増加させる、または、粘度による効果を通して又は角膜上皮を覆うムチン層との物理化学的反応の確立によって s i R N A の眼内前方への滞留時間を延長させる、ものである。

40

## 【 0 1 4 2 】

眼内への局所的デリバリーのための適切な不溶性粒子は、その開示内容の全てが本願明細書へ参照として取り込まれるところの、B e l l e t a l . , による米国特許第 6 , 3 5 5 , 2 7 1 号に記載されているリン酸カルシウム粒子、を含む。目への滴下における増粘効果のある適切なポリマーは、ポロキサマー 4 0 7 ( 例えは、濃度 2 5 % ) といったポリエチレンポリオキシプロピレンのブロック共重合体、酢酸フタル酸セルロース ( 例えは、濃度 3 0 % ) 、または G e l r i t e ( 登録商標 ) ( C P K e l c o , デルウェア州W i l m i n g t o n より入手可能 ) といった低アセチル化増粘安定剤、を含む。適切な粘膜付着性ポリマーは、カルボキシル基、水酸基、アミド基、および / または硫酸基

50

といった複数の親水性官能基を有する親水コロイド、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリアクリル酸、高分子量ポリエチレングリコール（例えば、数平均分子量が 200,000 より大きなもの）、デキストラン、ヒアルロン酸、ポリガラクトロン酸、およびキシロカン、を含む。適切な角膜透過促進剤は、シクロデキストリン、塩化ベンザルコニウム、ポリオキシエチレングリコールラウリルエーテル（例えば、ブリッジ（登録商標）35）、ポリオキシエチレングリコールステアリルエーテル（例えば、ブリッジ（登録商標）78）、ポリオキシエチレングリコールオレイルエーテル（例えば、ブリッジ（登録商標）98）、エチレンジアミン四酢酸（ethylene diamine tetraacetic acid : EDTA）、ジギトニン、タウロコール酸ナトリウム、サポニン、および Cremaphor EL といったポリオキシエチル化ひまし油、を含む。

10

## 【0143】

固体組成物では、古典的な非毒性の固体担体を用いることが可能である。例えば、医薬品グレードのマンニトール、乳糖、でんぷん、ステアリン酸マグネシウム、サッカリントリウム、タルカムパウダー、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム、およびそれらに類するもの、である。

## 【0144】

例えば、経口投与のための固体の医薬組成物は、上述の担体および賦形剤のいずれをも含むことが可能であり、10～95%、好ましくは25～75%の1若しくはそれ以上の siRNA を含むことが可能である。エアロゾル（吸入による）投与のための医薬組成物は、重量で 0.01～20%、好ましくは重量で 1%～10% の 1 若しくはそれ以上の siRNA を上述のリポソームに封入したもの、および推進剤、を含むことが可能である。例えば経鼻投与のためのレチシンなどの担体もまた、必要であれば含むことが可能である。

20

## 【0145】

本発明は、以下の限定されない実施例によって、説明されることとする。

## 【実施例 1】

## 【0146】

抗 VEGF（血管内皮細胞増殖因子） siRNA によるサル類の VEGF のインビボ RNA 干渉

siRNA の設計 ヒトの VEGF mRNA の 5' 末端から nt (ヌクレオチド) 329 に所在の 19 nt 配列を標的配列に選んだ： A A A C C T C A C C A A G G C C A G C A C (配列 ID 番号： 51 )。他のどんな遺伝子由来の mRNA にも含まれていないことを確認するために、この標的配列を、NCBI (米国立生物工学情報センター (The National Center for Biotechnology Information : NCBI)) 提供の BLAST 検索エンジンに入力した。BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) アルゴリズムの使用については、Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-410 および Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402、に記載されている。これらの開示は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるものである。前記標的配列を含む mRNA が他に見つからなかったので、この配列を標的とするため、二重鎖 siRNA を合成した (Dharmacon Research, Inc., コロラド州 Laffayette)。

30

## 【0147】

この二重鎖 siRNA は、次のセンスおよびアンチセンス鎖を有するものである。

## 【0148】

センス：

5' - a c c u c a c c a a g g c c a g c a c T T 3' (配列 ID 番号： 77 )

アンチセンス：

5' - g u g c u g g c c u u g g u g a g g u T T 3' (配列 ID 番号： 78 )

40

50

**【0149】**

前記 siRNA センスおよびアンチセンス鎖は、共に TT3' の突出末端（オーバーハング）（ポールド体で示す）を各鎖に備えた nt19 の二本鎖 siRNA を形成したものである。この siRNA を「Candidate (候補 5)」あるいは「Cand5」と名付けた。その他の、ヒトの VEGF mRNA を標的とする siRNA を設計し、Cand5 に記載のようにテストした。

**【0150】**

この治験の目的は、CNV（脈絡膜血管新生）誘発後のオスのカニクイザルに一回硝子体内注入で投与時の Cand5 の安全性および薬効を決定することであった。Cand5 は、次の投与レベルで未試験済オスのカニクイザルに賦形コントロール剤に入れて投与した：0 mg / 目（対照）、0.07 mg / 目、0.18 mg / 目、0.35 mg / 目、および 0.70 mg / 目。  
10

**【0151】**

各動物の両眼の黄斑部にレーザー処理して CNV（脈絡膜血管新生）を誘発し、レーザー処置後短時間内に Cand5 の前記投与量を与えた。動物は、臨床的徴候、体重および視覚状態（広範囲な眼科検査、網電図記録および眼圧測定）の変化に就いて評価した。蛍光眼底血管造影を実施し、血液試料を採集した。本治験（44日目）の終わりに、動物はすべて安樂死させ、また、完全な総体の検屍を行なった。選択した組織は集められ、組織病理学的評価のために保存した。

**【0152】**

サルが、レーザーによる黄斑部損傷後およびその後の CNV（脈絡膜血管新生）の進行中、0.70 mg / 目以下の投与量を両眼の硝子体内に単回注入した場合、全身あるいは局所（眼）に Cand5 による悪影響は、検知されなかった。  
20

**【実施例 2】****【0153】**

ヒトの胚の腎臓 293 セルにおける抗 VEGF siRNA による VEGF のインピトロ RNA 干渉

ヒトの胚の腎臓 293 セル（ATCC、バージニア州 Manassas から入手）を、10% のウシ胎児血清（fetal bovine serum : FBS ; JRH Biosciences, カンザス州 Lenexa から入手）および細胞培養成長汚染物質予防のために使用した（Gibco 社、カリフォルニア州 Carlsbad から入手）抗生素 - 抗真菌性薬剤と共に、ダルベッコ変法イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Cellgro, バージニア州 Herndon から入手) 中で培養した。  
30

**【0154】**

siRNAs は、Integrated DNA Technologies 社（アイオア州 Coralville）で合成された。 siRNA 標的配列は表に示されている。この治験では、増強緑色蛍光蛋白質（Enhanced green fluorescent protein : EGFP）の遺伝子を標的とする補足の siRNA を、陰性对照として使用した。  
40

**【0155】**

## 【表2】

表2

s i RNA名称	GC含量	ヌクレオチド 開始部位	s i RNAの標的配列 5' - 3'
hVEGF#1	58%	92	aaggaggaggcagaatcatc (配列ID番号: 81)
hVEGF#2	42%	124	aagtccatggatgtctatcg (配列ID番号: 47)
hVEGF#3	58%	162	aatcgagaccctggtagacat (配列ID番号: 48)
hVEGF#4	42%	301	aacatcacatgcagattatg (配列ID番号: 50)
hVEGF#5	58%	338	aaggccagcacataggagaga (配列ID番号: 52)
hVEGF#6	42%	380	aatgtgaatgcagaccaaaga (配列ID番号: 82)
hVEGF#7	37%	396	aaagaagatacagcaagaca (配列ID番号: 56)
hVEGF#8	32%	450	aaagcattgttgttacaaga (配列ID番号: 83)
hVEGF#9	42%	467	aagatccgcagacgtgtaaat (配列ID番号: 84)
hVEGF#10	53%	498	aaacacacactcgcggtgcaa (配列ID番号: 85)
Cand5	63%	328	aaacacctccaaggccagcac (配列ID番号: 51)

10

20

30

40

50

## 【0156】

インビトロ s i RNA トランスフェクション（形質移入）および低酸素症誘発 ヒト 293 セルを 24 穴（ウエル）プレート中、5% CO<sub>2</sub>、37°で一晩培養した。翌日、セルが 50% - 70% 密集状態（コンフルエント）に達した時、トランスフェクションを実施した。セルは、ヒトの VEGF に対してつくられた s i RNAs でトランスフェクトした。s i RNAs は Capi 試薬中で混合し、250 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液 20 μl に添加した。前記 s i RNA / CaCl<sub>2</sub> 混合物は 2 倍量のハンクス均衡塩溶液（Hanks Balanced Salt Solution: (HBS)）20 μl に渦を起こして混合しながら滴下した。前記 S i RNA / CaCl<sub>2</sub> / HBS 複合体をそれぞれのウエルの培地に直接（300 μl / ウエル）添加した。37°で 4 時間培養後に、培地を取り出し、セルを、さらに 10% DMSO 含有の無血清培地を用い（300 μl / ウエルで 1 ~ 2 分間室温で）、培養した。次いで、この培地を取り出し、前記セルを再び成長培地で培養した（500 μl / ウエル）。陰性対照は、s i RNAs 不含のトランスフェクション試薬と非特異性 s i RNA (EGFP1 s i RNA) を包含した。スクリーニング実験には、s i RNAs を濃度 25 nM で使用した。投与量依存応答実験については、s i RNAs を、1 nM、5 nM、および 25 nM の濃度で使用した。トランスフェクション実施 4 時間後にデスフェリオキサミン（Desferrioxamine）を最終濃度 130 μM で用いて低酸素症を引き起こした。デスフェリオキサミン（Desferrioxamine）は低酸素症状態を擬態するが、これは、ヘム - Fe<sup>2+</sup> 相互作用を阻害することにより哺乳類セルの正常な酸素検知経路を中断すると提案されているからである。

## 【0157】

## 治験設計

## VEGF 蛋白質の定量化

トランスフェクションから約 48 時間後、上澄み液をすべてのウエルから取り出し、ヒトの VEGF の ELISA（酵素免疫検定法）(R&D systems, ミネソタ州 Minneapolis) を、Quantikine human VEGF ELISA プロトコルに記載のように、前記 293 セルに実施した。VEGF に特有の抗体をそれぞれのプレートに添加すると、プレートに結合した VEGF の量に比例して呈色した。ELISA の結果は、450 nm (ベックマンコールター (Beckman Coulter)) で AD340 プレート・リーダ上で読取った。

## 【0158】

結果 ヒトの VEGF s i RNAs は、293 セルのヒトの VEGF 蛋白質の低酸素症誘発上方調節を抑制する。ヒトの VEGF はデスフェリオキサミン媒介による低酸素症の誘発によって上方調節された。450 nm での OD (光学密度) の読みは、セル試料中

のヒトの V E G F 蛋白質レベルを示した。低酸素症の誘発による h V E G F 蛋白質レベルの上昇は、すべてのヒト V E G F s i R N A s ( 図 1 ) でトランスフェクトしたセルで、激減した。非特異性 s i R N A ( E G F P s i R N A ) を用いたトランスフェクション、あるいは s i R N A なしの模擬トランスフェクションでは、 h V E G F レベルに対する影響は見られなかった。 C a n d 5 、 h V E G F # 1 、 h V E G F # 2 、 h V E G F # 3 、 h V E G F # 4 、 h V E G F # 6 および h V E G F # 7 の投与量に対する応答を調べた ( 図 2 ) 。

### 【実施例 3】

#### 【 0 1 5 9 】

抗 V E G F s i R N A を用いた、 A R M D ( a g e - r e l a t e d m a c u l a r d e g e n e r a t i o n : A R M D ) ( 加齢黄斑変性症 ) 対象の V E G F のインビボ R N A 干渉

治験設計 合計 110 人 ( 最初に登録された 129 人中 ) の治験対象が、 28 箇所の臨床施設で本格的に参加した。 34 人の対象を無作為化して、 0.2 mg の C a n d 5 で治療し、 39 人を 1.5 mg の C a n d 5 で治療するよう割り当て、 37 人を 3.0 mg の C a n d 5 で治療した。

#### 【 0 1 6 0 】

自覚屈折度 ( manifest refraction ) 、最良矯正視力 ( b e s t c o r r e c t e d v i s u a l a c u i t y ) 、細隙灯 ( 顕微鏡 ) 検査 ( s l i t lamp examination ) 、間接検眼鏡検査 ( i n d i r e c t o p hthalmoscopic examination ) 、蛍光眼底血管造影 ( f l u o r e s c e i n angiography ) 、眼底撮影 ( fundus photography ) 、および視覚の統一断層撮影法 ( o c u l a r c o h e r e n c e to m ography : " O C T " ) を含むスクリーニング法を用いて、対象を A R M D ( 加齢黄斑変性症 ) に関する中心窓下の脈絡膜血管新生 ( choroidal neovascularization ( C N V ) ) に対してスクリーニングした。次の基準がすべて満たされた場合、対象は前記治験に適格とした。

#### 【 0 1 6 1 】

1. A R M D ( 加齢黄斑変性症 ) に続発する、中心窓下の典型的 ( クラシック ) 、主として典型的、或いは最低限度典型的傷害であって、全傷害の大きさ ( 血液、萎縮 / 癢痕 , および新生血管を含む ) が全 12 個のディスク面積 30.48 mm<sup>2</sup> ) で、そのうち少なくとも 50 % が活性 C N V ( 脉絡膜血管新生 ) である。最低限度典型的 ( クラシック ) な傷害は次に定義する傷害活性の証拠が無ければならない :

a . 網膜下の出血、および / または体液および / または脂質の存在、あるいは、  
b . 過去 12 週間中で 1 行以上の視力の喪失 ( 糖尿病網膜症の早期治療研究視力図表 ) ( E a r l y T r e a t m e n t D i a b e t i c R e t i n o p a t h y S t u d y v i s u a l a c u i t y c h a r t s : E T D R S ) あるいはこれと同等なもの ) 、あるいは、

c . 過去 12 週間に F A ( 蛍光眼底血管造影 ) で記録した傷害の進行が 10 % ;  
2. E T D R S 最良矯正視力が、治験対象とする眼で 64 ~ 24 個の文字 ( S n e l l e n E

q u i v a l e n t ( スネーレン等価 ) 20 / 50 ~ 20 / 320 ) ;

3. 網膜下の出血 ( もしあれば ) が傷害全体の大きさの 50 % 以下であって、また中心窓下のスペースに関連してはならない ;

5. 50 歳 ;

6. 記入済みインフォームド・コンセント用紙を提出する ;

7. 予定されたフォローアップ ( 追跡 ) 検査に再来する意思があり、可能である

8. 女性の場合には、 1 年閉経後か、不妊手術済み。

#### 【 0 1 6 2 】

対象は、すべて、割り当てられた投与量の C a n d 5 が 100 μ 1 硝子体内に 2 回注入

10

20

30

40

50

された。

【 0 1 6 3 】

前記注入は、6週間置いて、初日（Day 0）および6週目に投与された。対象は、二重盲検調査試料の1回目の注入から3および6週間後、更に2回目の注入の3、6、9、および12週間後検査に戻るよう予定された。各注入後1日および1週目に対象全員に電話連絡を行なうことになっていた。最初の注入後から30、52および104週目に、さらなるフォローアップ（追跡調査）診察が行なわれた。

【 0 1 6 4 】

薬効指標項目については、欠測値がある対象のためのデータの補完方法（インピュテーション）として、時系列データの欠測に最直前のデータを補完する方法（Last Observed Carried Forward : LOCF）を使用することにした。救援治療を受けた対象には、前記救援治療前に観察された薬効値を、LOCF値として使用することにした。LOCF分析に加えて、データの補完（インピュテーション）を実施せずに利用できる観察データを分析した。他に特記しない限り、分析は、利用できるデータについて行なうのである。

10

【 0 1 6 5 】

治験結果 重要薬効および安全性結果の要約は表3に提供される。示されているように、治験集団の約78%で、遠見視力がベースラインから12週まで安定していた；3～15週の期間を考慮すると、この傾向は、治験集団の約83%までに増加した。CNV（脈絡膜血管新生）の大きさは、ほんの僅か変わっただけで、傷害が安定化したことを示唆している。これは、さらにCNV（脈絡膜血管新生）が示す傷害のパーセントの減少に裏づけされている。（表11も併せて参照）

20

【表3】

表3：重要な薬効および安全性の結果

薬効成果	ベースラインから12週目				10
	0.2 mg	1.5 mg	3.0 mg	合計	
視力保持－遠見： BCDVA%喪失<15文字	83.3%	73.0%	78.8%	78.0%	
BCDVA%獲得≥15文字	0.0%	2.7%	6.1%	3.0%	
BCDVA%獲得≥10文字	13.3%	8.1%	6.1%	9.0%	
BCDVA%獲得≥5文字	16.7%	13.5%	12.1%	14.0%	
BCDVA%獲得≥0文字	43.3%	43.2%	30.3%	39.0%	
BCDVAの文字平均変化	-3.3	-6.4	-5.1	-5.1	
視力保持－近見： BCNVA%喪失<15文字	83.3%	75.7%	97.1%	85.3%	
BCNVA文字平均変化	-1.4	-6.2	-0.5	-2.9	
蛍光眼底血管造影： CNVの大きさの平均変化 (mm <sup>2</sup> )	+5.08	+2.04	+1.96	+2.88	20
傷害のCNV%	-4.59	-14.70	-9.83	-10.11	

薬効成果	3週目から15週目				30
	0.2 mg	1.5 mg	3.0 mg	合計	
視力保持－遠見： BCDVA%喪失<15文字	90.9%	78.1%	81.5%	82.7%	
BCDVA%獲得≥15文字	0.0%	0.0%	7.1%	2.4%	
BCDVA%獲得≥10文字	4.3%	6.3%	17.9%	9.6%	
BCDVA%獲得≥5文字	17.4%	28.1%	28.6%	25.3%	
BCDVA%獲得≥0文字	39.1%	50.0%	42.9%	44.6%	
BCDVAの文字平均変化	-4.0	-5.8	-5.6	-5.3	
視力保持－近見： BCNVA%喪失<15文字	95.7%	87.5%	92.9%	91.6%	
BCNVA文字平均変化	-2.6	-2.3	-0.7	-1.9	40
蛍光眼底血管造影： CNVの大きさの平均変化 (mm <sup>2</sup> )	+1.27	+0.65	+1.11	+0.97	
傷害のCNV%	-14.67	-18.65	-8.46	-14.17	

## 【0166】

この結果を見ると、注目すべき重要なことは、Cand5がVEGFのmRNAの分解を誘発し、それによって新規のVEGFタンパク質の産生を阻害するが、VEGFの拮抗剤ではないので、従って以前產生されたVEGFタンパク質にはなんら作用し得ないことがある。VEGF产生を抑制するCand5の前記薬効は、網膜組織中に以前発現された

V E G F のせいで、直ちに明白に現れないかもしれない。

【 0 1 6 7 】

これらの事を考慮するので、遠見および近見両方の視力に対する B C V A ( b e s t c o r r e c t e d v i s u a l a c u i t y : B C V A ) ( 最良矯正視力 ) 文字の変化の平均の分析に加えて、各薬効パラメーターについてベースラインから 12 、 15 、および 18 週目の変化を評価して行なう分析を提出するのである。さらに、 V E G F の拮抗剤としての活性が無く、 V E G F 遺伝子を抑制する C a n d 5 の作用機構に基づき、個々の重要な薬効パラメーターについて、 3 週～ 12 、 15 、および 18 週までの変化の評価が提示される。この分析は、網膜組織にある V E G F の代謝回転 ( ターンオーバー ) および分解が約 3 週間で起こると仮定し、それで V E G F 発現の抑制に関連する C a n d 5 の薬効評価ができるようになるのである。  
10

【 0 1 6 8 】

B C D V A ( 最良矯正遠見視力 ) ( B e s t C o r r e c t e d D i s t a n c e V i s u a l A c u i t y : B C D V A ) ベースラインからの平均最良矯正遠見視力 ( B C D V A ) の変化は、図 3 に示されている。示すように、平均喪失文字数は、ベースラインから、治験期間に亘って増加していったが、前記平均喪失数は、すべての治療グループの B C D V A で 10 個未満の文字 (< 2 行) であった。

【 0 1 6 9 】

ベースラインから 9 , 12 , 15 , 18 週目のフォローアップ診察までの、最良矯正遠見視力を表わす文字の獲得数が表 4 に示されている。  
20

【 0 1 7 0 】

## 【表4】

表4：ベースラインからのBCDVA増加の要約

対象が文字を15個、10個、5個、あるいはいくらかでも獲得

BCDVAの改善	0.2 mg n (%)	1.5 mg n (%)	3.0 mg n (%)	フィッシュヤー の直接P値	合計 n (%)
9週目					
N	32	39	36		107
≥ 15文字	1 ( 3.1%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.8%)	0.5324	2 ( 1.9%)
≥ 10文字	3 ( 9.4%)	2 ( 5.1%)	1 ( 2.8%)	0.5095	6 ( 5.6%)
≥ 5文字	7 ( 21.9%)	5 ( 12.8%)	5 ( 13.9%)	0.6011	17 ( 15.9%)
≥ 0文字	14 ( 43.8%)	16 ( 41.0%)	9 ( 25.0%)	0.2176	39 ( 36.4%)
12週目					
N	30	37	33		100
≥ 15文字	0 ( 0.0%)	1 ( 2.7%)	2 ( 6.1%)	0.5140	3 ( 3.0%)
≥ 10文字	4 ( 13.3%)	3 ( 8.1%)	2 ( 6.1%)	0.6800	9 ( 9.0%)
≥ 5文字	5 ( 16.7%)	5 ( 13.5%)	4 ( 12.1%)	0.8768	14 ( 14.0%)
≥ 0文字	13 ( 43.3%)	16 ( 43.2%)	10 ( 30.3%)	0.4691	39 ( 39.0%)
15週目					
N	22	32	27		81
≥ 15文字	0 ( 0.0%)	1 ( 3.1%)	1 ( 3.7%)	1.0000	2 ( 2.5%)
≥ 10文字	1 ( 4.5%)	2 ( 6.3%)	1 ( 3.7%)	1.0000	4 ( 4.9%)
≥ 5文字	4 ( 18.2%)	6 ( 18.8%)	3 ( 11.1%)	0.7426	13 ( 16.0%)
≥ 0文字	9 ( 40.9%)	12 ( 37.5%)	5 ( 18.5%)	0.1667	26 ( 32.1%)
18週目					
N	19	25	20		64
≥ 15文字	0 ( 0.0%)	0 ( 0.0%)	1 ( 5.0%)	0.6094	1 ( 1.6%)
≥ 10文字	2 ( 10.5%)	1 ( 4.0%)	1 ( 5.0%)	0.6785	4 ( 6.3%)
≥ 5文字	7 ( 36.8%)	5 ( 20.0%)	2 ( 10.0%)	0.1363	14 ( 21.9%)
≥ 0文字	7 ( 36.8%)	11 ( 44.0%)	5 ( 25.0%)	0.4127	23 ( 35.9%)

N=利用可能なデータを有する対象の数。

n=各投与量グループ中の対応するVA応答対象の数。

% = n ÷ N × 100 %

## 【0171】

3週目からフォローアップ診察までのBCDVA（最良矯正遠見視力）の文字の獲得に関する同様な分析は、表5に示されている。比較的に侵攻性、即ち、主として典型的および最低限度典型的（クラシック）であるが、潜在疾患ではない疾患に罹患した対象の治験集団において、C and 5投薬グループの各々の多くの対象がBCDVAの文字を獲得し、中には10および15、またはそれ以上のBCDVAの文字、つまり2~3行、またはそれ以上を獲得した。

## 【0172】

10

20

30

## 【表5】

表5：3週目からのBCDVA増加の要約  
対象が文字を15個、10個、5個、あるいはいくらかでも獲得

BCDVAの改善	0.2 mg n (%)	1.5 mg n (%)	3.0 mg n (%)	フィッシャー の直接P値	合計 n (%)
<b>9週目</b>					
N	32	39	36		107
≥ 15文字	1 ( 3.1%)	0 ( 0.0%)	0 ( 0.0%)	0.2991	1 ( 0.9%)
≥ 10文字	1 ( 3.1%)	0 ( 0.0%)	2 ( 5.6%)	0.3960	3 ( 2.8%)
≥ 5文字	7 ( 21.9%)	5 ( 12.8%)	9 ( 25.0%)	0.3820	21 ( 19.6%)
≥ 0文字	16 ( 50.0%)	17 ( 43.6%)	17 ( 47.2%)	0.8585	50 ( 46.7%)
<b>12週目</b>					
N	30	37	33		100
≥ 15文字	2 ( 6.7%)	1 ( 2.7%)	1 ( 3.0%)	0.6824	4 ( 4.0%)
≥ 10文字	2 ( 6.7%)	2 ( 5.4%)	4 ( 12.1%)	0.6506	8 ( 8.0%)
≥ 5文字	7 ( 23.3%)	6 ( 16.2%)	7 ( 21.2%)	0.7787	20 ( 20.0%)
≥ 0文字	10 ( 33.3%)	13 ( 35.1%)	13 ( 39.4%)	0.8995	36 ( 36.0%)
<b>15週目</b>					
N	22	32	27		81
≥ 15文字	0 ( 0.0%)	1 ( 3.1%)	1 ( 3.7%)	1.0000	2 ( 2.5%)
≥ 10文字	0 ( 0.0%)	1 ( 3.1%)	2 ( 7.4%)	0.6203	3 ( 3.7%)
≥ 5文字	4 ( 18.2%)	5 ( 15.6%)	6 ( 22.2%)	0.9343	15 ( 18.5%)
≥ 0文字	7 ( 31.8%)	11 ( 34.4%)	11 ( 40.7%)	0.8386	29 ( 35.8%)
<b>18週目</b>					
N	19	25	20		64
≥ 15文字	0 ( 0.0%)	0 ( 0.0%)	0 ( 0.0%)		0 ( 0.0%)
≥ 10文字	1 ( 5.3%)	1 ( 4.0%)	2 ( 10.0%)	0.8206	4 ( 6.3%)
≥ 5文字	3 ( 15.8%)	5 ( 20.0%)	3 ( 15.0%)	0.9201	11 ( 17.2%)
≥ 0文字	9 ( 47.4%)	9 ( 36.0%)	7 ( 35.0%)	0.6903	25 ( 39.1%)

N=利用可能なデータを有する対象の数。

n=各投与量グループ中の対応するVA応答対象の数。

%=n ÷ N × 100%

10

20

30

## 【0173】

文字を15個喪失せずとして定義されていて、CNV（脈絡膜血管新生）治療剤の臨床試験における主要な分析値と考えられている最良矯正視力の安定化が、表6および表7、ならびに図4に示されている。表6に示すように、眼は、およそ85%が9週間中安定していたが、12週で78%までに若干減少し、次いで、15および18週で夫々、77%および83%で比較的安定に留まった。

## 【0174】

## 【表6】

表6：ベースラインからのBCDVA減少の要約—  
被験者が文字を15個、10個、5個、あるいは全く喪失せず

BCDVAの減少	0.2 mg n (%)	1.5 mg n (%)	3.0 mg n (%)	フィッシャーの直接P値	合計 n (%)
9週目					
N	32	39	36		107
15文字喪失せず	27 (84.4%)	34 (87.2%)	30 (83.3%)	0.8902	91 (85.0%)
10文字喪失せず	24 (75.0%)	27 (69.2%)	25 (69.4%)	0.8943	76 (71.0%)
5文字喪失せず	17 (53.1%)	25 (64.1%)	22 (61.1%)	0.6415	64 (59.8%)
全く喪失せず	14 (43.8%)	16 (41.0%)	9 (25.0%)	0.2176	39 (36.4%)
12週目					
N	30	37	33		100
15文字喪失せず	25 (83.3%)	27 (73.0%)	26 (78.8%)	0.5947	78 (78.0%)
10文字喪失せず	23 (76.7%)	22 (59.5%)	23 (69.7%)	0.3342	68 (68.0%)
5文字喪失せず	16 (53.3%)	19 (51.4%)	17 (51.5%)	1.0000	52 (52.0%)
全く喪失せず	13 (43.3%)	16 (43.2%)	10 (30.3%)	0.4691	39 (39.0%)
15週目					
N	22	32	27		81
15文字喪失せず	18 (81.8%)	23 (71.9%)	21 (77.8%)	0.7578	62 (76.5%)
10文字喪失せず	14 (63.6%)	19 (59.4%)	17 (63.0%)	0.9185	50 (61.7%)
5文字喪失せず	10 (45.5%)	17 (53.1%)	9 (33.3%)	0.3295	36 (44.4%)
全く喪失せず	9 (40.9%)	12 (37.5%)	5 (18.5%)	0.1667	26 (32.1%)
18週目					
N	19	25	20		64
15文字喪失せず	16 (84.2%)	22 (88.0%)	15 (75.0%)	0.5961	53 (82.8%)
10文字喪失せず	14 (73.7%)	20 (80.0%)	13 (65.0%)	0.5568	47 (73.4%)
5文字喪失せず	9 (47.4%)	17 (68.0%)	7 (35.0%)	0.0833	33 (51.6%)
全く喪失せず	7 (36.8%)	11 (44.0%)	5 (25.0%)	0.4127	23 (35.9%)

N=利用可能なデータを有する対象の数。

n=各投与量グループ中の対応するVA応答対象の数。

%=n ÷ N × 100%

## 【0175】

3週目以降の変化を考慮すると、実質的により多数の治験対象が最良矯正視力の安定化を体験した（表7）、つまり、9週目の対象で約92%、12週目で84%、および15および18週目で80%以上が体験した。この調査結果は、以前に発現した細胞外のVEGFが分解されてしまった時点でCand5の薬効がよりはっきりと明白になるという、VEGFの発現をサイレンス（抑制）するCand5の作用機構と一致するのである（図4）。

## 【0176】

10

20

30

## 【表7】

表7：3週目以降のBCDVA減少の要約—  
対象が文字を15個、10個、5個、あるいは全く喪失せず

BCDVAの減少	0.2 mg n (%)	1.5 mg n (%)	3.0 mg n (%)	フィッシュバーの直接P値	合計 n (%)
9週目					
N	32	39	36		107
15文字喪失せず	28 (87.5%)	37 (94.9%)	33 (91.7%)	0.5642	98 (91.6%)
10文字喪失せず	27 (84.4%)	34 (87.2%)	28 (77.8%)	0.5524	89 (83.2%)
5文字喪失せず	23 (71.9%)	27 (69.2%)	25 (69.4%)	1.0000	75 (70.1%)
全く喪失せず	16 (50.0%)	17 (43.6%)	17 (47.2%)	0.8585	50 (46.7%)
12週目					
N	30	37	33		100
15文字喪失せず	27 (90.0%)	29 (78.4%)	28 (84.8%)	0.4595	84 (84.0%)
10文字喪失せず	24 (80.0%)	24 (64.9%)	25 (75.8%)	0.4353	73 (73.0%)
5文字喪失せず	17 (56.7%)	18 (48.6%)	20 (60.6%)	0.6092	55 (55.0%)
全く喪失せず	10 (33.3%)	13 (35.1%)	13 (39.4%)	0.8995	36 (36.0%)
15週目					
N	22	32	27		81
15文字喪失せず	20 (90.9%)	25 (78.1%)	22 (81.5%)	0.4955	67 (82.7%)
10文字喪失せず	17 (77.3%)	22 (68.8%)	17 (63.0%)	0.5663	56 (69.1%)
5文字喪失せず	13 (59.1%)	19 (59.4%)	13 (48.1%)	0.6907	45 (55.6%)
全く喪失せず	7 (31.8%)	11 (34.4%)	11 (40.7%)	0.8386	29 (35.8%)
18週目					
N	19	25	20		64
15文字喪失せず	16 (84.2%)	24 (96.0%)	16 (80.0%)	0.2394	56 (87.5%)
10文字喪失せず	14 (73.7%)	21 (84.0%)	14 (70.0%)	0.5334	49 (76.6%)
5文字喪失せず	9 (47.4%)	16 (64.0%)	12 (60.0%)	0.5916	37 (57.8%)
全く喪失せず	9 (47.4%)	9 (36.0%)	7 (35.0%)	0.6903	25 (39.1%)

N=利用可能なデータを有する対象の数。

n=各投与量グループ中の対応するVA応答対象の数。

%=n ÷ N × 100%

10

20

30

40

## 【0177】

最良矯正近見視力 ベースラインからの（最良矯正）近見視力（BCNVA）文字の経時変化を表8および表9、ならびに図5、図6に示す。治験のフォローアップ期間中、BCNVAでは、一般に近見視力の文字5個未満あるいは1行未満の、ほんの僅かな変化が見られたに過ぎないので、最良矯正近見視力の安定性がよいことを示唆している（図5）。

## 【0178】

最良矯正近見視力の経時的獲得は、表8に要約されている。治験集団の約5%では、15個または、それ以上の文字、つまり3行、またはそれ以上の改善が見られ、9週目～18週目の間、比較的安定に留まった。ベースラインからのBCNVA（最良矯正近見視力）の增加の分析では、治療グループ間に統計的に有意な差異が見られ、3.0mg C and 5 グループの対象が、投与量のより少ない2つのグループに比して、より多くが近見視力文字を獲得したのである（表8；p<0.05）。

## 【0179】

## 【表8】

表8：ベースラインからのBCNVA（最良矯正近見視力）増加の要約—  
対象が文字を15個、10個、5個、あるいはいかでも獲得

BCNVAの改善	0.2 mg n (%)	1.5 mg n (%)	3.0 mg n (%)	フィッシュマンの直接P値	合計 n (%)
<b>9週目</b>					
N	32	39	36		107
≥ 15文字	2 ( 6.3%)	2 ( 5.1%)	4 ( 11.1%)	0.6537	8 ( 7.5%)
≥ 10文字	3 ( 9.4%)	3 ( 7.7%)	5 ( 13.9%)	0.7260	11 ( 10.3%)
≥ 5文字	10 ( 31.3%)	8 ( 20.5%)	6 ( 16.7%)	0.3652	24 ( 22.4%)
≥ 0文字	21 ( 65.6%)	14 ( 35.9%)	12 ( 33.3%)	0.0142	47 ( 43.9%)
<b>12週目</b>					
N	30	37	35		102
≥ 15文字	1 ( 3.3%)	0 ( 0.0%)	5 ( 14.3%)	0.0182	6 ( 5.9%)
≥ 10文字	5 ( 16.7%)	5 ( 13.5%)	5 ( 14.3%)	0.9407	15 ( 14.7%)
≥ 5文字	10 ( 33.3%)	6 ( 16.2%)	7 ( 20.0%)	0.2521	23 ( 22.5%)
≥ 0文字	15 ( 50.0%)	12 ( 32.4%)	13 ( 37.1%)	0.3524	40 ( 39.2%)
<b>15週目</b>					
N	23	32	28		83
≥ 15文字	0 ( 0.0%)	2 ( 6.3%)	4 ( 14.3%)	0.1954	6 ( 7.2%)
≥ 10文字	3 ( 13.0%)	5 ( 15.6%)	4 ( 14.3%)	1.0000	12 ( 14.5%)
≥ 5文字	9 ( 39.1%)	9 ( 28.1%)	7 ( 25.0%)	0.5704	25 ( 30.1%)
≥ 0文字	10 ( 43.5%)	13 ( 40.6%)	9 ( 32.1%)	0.7154	32 ( 38.6%)
<b>18週目</b>					
N	18	25	20		63
≥ 15文字	2 ( 11.1%)	1 ( 4.0%)	4 ( 20.0%)	0.2753	7 ( 11.1%)
≥ 10文字	3 ( 16.7%)	5 ( 20.0%)	5 ( 25.0%)	0.8579	13 ( 20.6%)
≥ 5文字	4 ( 22.2%)	8 ( 32.0%)	5 ( 25.0%)	0.8226	17 ( 27.0%)
≥ 0文字	8 ( 44.4%)	13 ( 52.0%)	7 ( 35.0%)	0.5384	28 ( 44.4%)

N=利用可能なデータを有する対象の数。

n=各投与量グループ中の対応するVA応答対象の数。

%=n ÷ N × 100%

10

20

30

## 【0180】

最良矯正近見視力の安定化、つまり対象が文字を15個喪失しない割合、およびBCNVA（最良矯正近見視力）文字の喪失は、表9および図6に要約されている。9週目で、治験集団の90%以上は近見視力の文字15個を喪失せず、この応答者区分では、ほんの僅かの減少が12、15、および18週目に見られるだけであった。最良矯正近見視力の安定性は、3週目以降の診察での変化を考慮すると、さらにもっと顕著になった（図6）。

## 【0181】

## 【表9】

表9：ベースラインからのBCNVA（最良矯正近見視力）減少の要約—  
対象が文字を15個、10個、5個、あるいは全く喪失せず

BCDVAの減少	0.2 mg n (%)	1.5 mg n (%)	3.0 mg n (%)	フィッシャーの直接P値	合計 n (%)
<b>9週目</b>					
N	32	39	36		107
15文字喪失せず	29 (90.6%)	36 (92.3%)	34 (94.4%)	0.9007	99 (92.5%)
10文字喪失せず	25 (78.1%)	33 (84.6%)	29 (80.6%)	0.7814	87 (81.3%)
5文字喪失せず	24 (75.0%)	23 (59.0%)	20 (55.6%)	0.2138	67 (62.6%)
全く喪失せず	21 (65.6%)	14 (35.9%)	12 (33.3%)	0.0142	47 (43.9%)
<b>12週目</b>					
N	30	37	35		102
15文字喪失せず	25 (83.3%)	28 (75.7%)	34 (97.1%)	0.0284	87 (85.3%)
10文字喪失せず	23 (76.7%)	23 (62.2%)	30 (85.7%)	0.0758	76 (74.5%)
5文字喪失せず	19 (63.3%)	16 (43.2%)	18 (51.4%)	0.2769	53 (52.0%)
全く喪失せず	15 (50.0%)	12 (32.4%)	13 (37.1%)	0.3524	40 (39.2%)
<b>15週目</b>					
N	23	32	28		83
15文字喪失せず	20 (87.0%)	28 (87.5%)	25 (89.3%)	1.0000	73 (88.0%)
10文字喪失せず	18 (78.3%)	21 (65.6%)	19 (67.9%)	0.6245	58 (69.9%)
5文字喪失せず	17 (73.9%)	18 (56.3%)	14 (50.0%)	0.2035	49 (59.0%)
全く喪失せず	10 (43.5%)	13 (40.6%)	9 (32.1%)	0.7154	32 (38.6%)
<b>18週目</b>					
N	18	25	20		63
15文字喪失せず	15 (83.3%)	22 (88.0%)	18 (90.0%)	0.8015	55 (87.3%)
10文字喪失せず	13 (72.2%)	17 (68.0%)	16 (80.0%)	0.7216	46 (73.0%)
5文字喪失せず	11 (61.1%)	13 (52.0%)	12 (60.0%)	0.8520	36 (57.1%)
全く喪失せず	8 (44.4%)	13 (52.0%)	7 (35.0%)	0.5384	28 (44.4%)

N=利用可能なデータを有する対象の数。

n=各投与量グループ中の対応するVA応答対象の数。

%=n ÷ N × 100 %

10

20

30

40

50

## 【0182】

一回分0.2mg投与したCand5の明らかな臨床効果を考えると、適切な対照群がないので、無治療対象あるいは擬似処置対照についての既報のデータと比較することは、Cand5の臨床的有益性を自然経過に対して評価するのに興味深い。ARMED（加齢黄斑変性症）の光線力学療法（TAP: Blinder KJ et al. (2003) TAP and VIP report No. 1, Amer J Ophthalmol 136: 407-18）治療の際の偽薬（placebo）群は、このCand5臨床試験の主として典型的（クラシック）な集団にもっとも類似しているので、比較には特に適切である。これは、TAP臨床試験の対象集団は、ARMED（加齢黄斑変性症）に対する他の治療選択の余地がなく、（対象の）登録時に治験医師の先入観に左右されず、完全に治療されしていない集団であること考慮すると、控えめな比較であると主張出来よう。対象を競合する治療法で治療したり、あるいは対象を他の臨床試験に参加させようとする治験医師の先入観が、他の治療法では余りよい成績が得られそうもなかった対象に偏った、本治験の集団に導かせたたのかもしれない。主に典型的（クラシック）な疾患に罹患しているTAP研究の偽薬対象は、3箇月で文字を11.7個失った（Bressler NM et al. (2002) Arch Ophthalmol. 120: 1443-54）が、それに較べて、該当するCand5治療集団では、文字を5.5個失った（図7Aおよび7B）（LOCF）。TAPの主に典型的（クラシック）な偽薬対象は、全体の69.0%が視力を保持した（文字の喪失、15未満）が、これに反して本治験では対象の78.3%が保持した。

**【 0 1 8 3 】**

C N V の大きさ 脈絡膜血管新生 ( C N V ) の平均の大きさの、ベースラインからの変化を図 8 A および 8 B ( L O C F ) ) に示す。 V E G F は、動物モデルで、 C N V の成長に必要且つ十分なことが知られている ( Adamis A P et al . ( 1 9 9 6 ) Arch Ophthalmol 114 : 66 - 71 ) ので、傷害で最も V E G F に応答する成分であると予想されている。投与量の効果傾向を示す証拠があり、これが、統計的に有意ではないとしても、ベースラインからの C N V の成長に関して、すべての診察において明白であることを指摘するのは注目に値する。

**【 0 1 8 4 】**

傷害全体の大きさ 傷害全体の大きさのベースラインからの変化を表 1 0 に示す。より適切な パラメーター ( 变数 ) は、 C N V の大きさの変化および、 C N V が表わす傷害の割合の変化であるが、全面的な傷害の大きさのパーセントとして C N V の変化を分析するのに、傷害全体の大きさに関する情報は、背景知識として有用である。さらに、傷害全体の大きさの変化が、特に後期の時点において、 0 . 2 m g のグループおよび 1 . 5 m g のグループより、最高量投薬グループの方が小さかったことは、これらの違いが統計的に有意ではないとしても注目に値する。

**【 0 1 8 5 】**

## 【表10】

表10：蛍光眼底血管造影－傷害全体の大きさ

検査	統計値	0.2 mg	1.5 mg	3.0 mg	合計
3週目	N	34	38	37	109
	平均	2.11	1.17	1.81	1.68
	95% CI	0.73, 3.50	0.07, 2.27	1.10, 2.51	1.07, 2.29
	標準偏差	3.97	3.35	2.12	3.21
	中間値	1.29	1.18	1.62	1.38
6週目 注入前	N	33	39	35	107
	平均	3.61	2.15	2.60	2.74
	95% CI	1.73, 5.49	0.80, 3.50	1.79, 3.40	1.96, 3.53
	標準偏差	5.30	4.16	2.34	4.10
	中間値	1.93	1.91	2.46	2.13
9週目	N	31	38	35	104
	平均	4.03	3.13	2.87	3.31
	95% CI	2.24, 5.83	1.28, 4.99	1.87, 3.87	2.41, 4.21
	標準偏差	4.89	5.65	2.91	4.63
	中間値	2.94	2.70	2.68	2.73
12週目	N	29	37	35	101
	平均	5.92	4.56	3.32	4.52
	95% CI	3.22, 8.62	2.22, 6.90	2.16, 4.48	3.32, 5.72
	標準偏差	7.09	7.03	3.37	6.07
	中間値	3.04	3.00	2.99	3.00
15週目	N	23	33	28	84
	平均	6.64	4.87	3.42	4.87
	95% CI	3.20, 10.07	2.40, 7.34	1.83, 5.01	3.46, 6.29
	標準偏差	7.95	6.98	4.09	6.52
	中間値	3.72	3.89	2.88	3.43
18週目	N	19	24	18	61
	平均	9.13	6.78	4.19	6.75
	95% CI	4.79, 13.47	2.06, 11.49	0.99, 7.38	4.35, 9.14
	標準偏差	9.01	11.17	6.43	9.36
	中間値	6.20	4.92	3.96	4.90
	範囲	-3.9, 24.4	-6.7, 50.1	-8.5, 22.6	-8.5, 50.1

ベースライン＝初日において、治療注入以前、最も最近の欠測していないデータ。

N＝利用可能なデータがある対象の数。

## 【0186】

傷害全体の大きさ中CNVのパーセント。傷害全体の大きさでCNVが占める割合の変化を、表11に示す。示すように3組の治療グループすべての全傷害中のCNV%に全面的な減少があり、この変化の程度は、3週目～18週目に亘って増加した。

## 【0187】

10

20

30

40

## 【表11】

表11： 蛍光眼底血管造影のベースラインからの変化－  
傷害の内中心窓下の脈絡膜血管新生%

検査	統計値	0.2 mg	1.5 mg	3.0 mg	合計
3週目	N	34	38	37	109
	平均	-4.03	1.53	-7.57	-3.29
	95% CI	-11.91, 3.85	-1.30, 4.35	-14.29, -0.85	-6.75, 0.16
	標準偏差	22.57	8.60	20.15	18.19
	中間値	0.00	0.00	0.00	0.00
	範囲	-100.0, 28.0	-17.0, 28.5	-82.5, 14.5	-100.0, 28.5
6週目 注入前	N	33	39	35	107
	平均	-1.36	-0.73	-3.40	-1.80
	95% CI	-8.43, 5.71	-7.15, 5.69	-7.70, 0.90	-5.19, 1.59
	標準偏差	19.94	19.81	12.51	17.67
	中間値	0.00	0.00	0.00	0.00
	範囲	-100.0, 27.5	-100.0, 37.5	-61.5, 21.0	-100.0, 37.5
9週目	N	31	38	35	104
	平均	-3.40	-3.41	-5.56	-4.13
	95% CI	-12.00, 5.19	-11.97, 5.15	-13.08, 1.97	-8.74, 0.48
	標準偏差	23.42	26.04	21.90	23.72
	中間値	0.00	0.00	0.00	0.00
	範囲	-100.0, 25.0	-100.0, 28.5	-82.5, 49.5	-100.0, 49.5
12週目	N	29	37	35	101
	平均	-4.59	-14.70	-9.83	-10.11
	95% CI	-15.90, 6.73	-26.56, -2.85	-19.31, -0.35	-16.28, -3.93
	標準偏差	29.76	35.55	27.59	31.28
	中間値	0.00	0.00	0.00	0.00
	範囲	-100.0, 36.0	-100.0, 34.0	-100.0, 22.5	-100.0, 36.0
15週目	N	23	33	28	84
	平均	-23.04	-16.59	-15.52	-18.00
	95% CI	-41.99, -4.10	-30.46, -2.73	-28.25, -2.79	-26.29, -9.71
	標準偏差	43.80	39.10	32.83	38.19
	中間値	-2.50	0.00	0.00	0.00
	範囲	-100.0, 32.0	-100.0, 34.0	-86.5, 49.5	-100.0, 49.5
18週目	N	19	24	18	61
	平均	-25.16	-25.17	-15.11	-22.20
	95% CI	-45.17, -5.15	-42.53, -7.81	-30.25, 0.03	-31.94, -12.45
	標準偏差	41.51	41.11	30.44	38.06
	中間値	-1.00	0.00	-0.25	0.00
	範囲	-100.0, 12.5	-100.0, 16.0	-82.5, 49.5	-100.0, 49.5

ベースライン=初日において、治療注入以前、最も最近の欠測していないデータ。

N=利用可能なデータがある対象の数。

## 【0188】

3週目～12、15、18週目までの傷害中のCNV%の変化を表12に示す。

ベースラインからの変化の分析と一致していて、傷害の内CNVが占める%は、経時的に減少し、C and Sが傷害全体の%に基づくCNVの大きさを縮小する薬効を示している。この効果は、どの傷害タイプにも全治験集団でも見られたのである。

## 【0189】

10

20

30

40

## 【表12】

表12： 蛍光眼底血管造影の3週目からの変化—  
傷害の内中心窓下の脈絡新生血管%

検査	統計値	0.2 mg	1.5 mg	3.0 mg	合計
6週目 注入前	N	33	39	35	107
	平均	2.79	-2.22	2.23	0.78
	95% CI	-0.56, 6.14	-8.12, 3.68	-1.86, 6.32	-1.91, 3.47
	標準偏差	9.45	18.20	11.90	14.02
	中間値	0.00	0.00	0.00	0.00
	範囲	-6.5, 34.0	-100.0, 22.0	-14.0, 61.5	-100.0, 61.5
9週目	N	31	38	35	104
	平均	-0.45	-4.93	0.44	-1.79
	95% CI	-4.31, 3.41	-13.13, 3.26	-5.97, 6.86	-5.56, 1.99
	標準偏差	10.52	24.94	18.68	19.41
	中間値	0.00	0.00	0.00	0.00
	範囲	-34.5, 23.5	-100.0, 28.5	-69.5, 55.5	-100.0, 55.5
12週目	N	29	37	35	101
	平均	1.03	-16.24	-1.74	-6.26
	95% CI	-6.21, 8.28	-28.22, -4.26	-11.92, 8.44	-12.26, -0.26
	標準偏差	19.04	35.93	29.64	30.40
	中間値	0.00	0.00	0.00	0.00
	範囲	-67.5, 43.0	-100.0, 34.5	-100.0, 72.5	-100.0, 72.5
15週目	N	23	33	28	84
	平均	-14.67	-18.65	-8.46	-14.17
	95% CI	-29.19, -0.16	-32.02, -5.28	-20.52, 3.59	-21.62, -6.71
	標準偏差	33.56	37.71	31.09	34.36
	中間値	-2.00	0.00	0.00	0.00
	範囲	-100.0, 23.5	-100.0, 34.5	-74.5, 55.5	-100.0, 55.5
18週目	N	19	24	18	61
	平均	-14.45	-26.96	-4.61	-16.47
	95% CI	-28.68, -0.22	-43.73, -10.18	-19.76, 10.54	-25.40, -7.53
	標準偏差	29.52	39.72	30.47	34.88
	中間値	0.00	0.00	0.00	0.00
	範囲	-100.0, 16.5	-100.0, 9.0	-67.0, 60.0	-100.0, 60.0

N=利用可能なデータがある対象の数。

## 【0190】

要約と考察 C and 5 は VEGF 発現をサイレンシング（抑制させること）により作用している可能性があるが、これは、抗 VEGF 剤ではなく、以前に產生された VEGF 蛋白質にはなんら作用しない。ウェット型 ARMD（加齢黄斑変性症）対象では、眼の様々な組織中の VEGF の循環レベルの増加で、新しい VEGF 产生がない状態で、前記蛋白質が受容体結合および / あるいは自然異化作用で代謝されてしまう迄、新血管新生および血管の浸透性は、促進続ける。蛋白質のこの「代謝」が起こる迄、VEGF 产生を抑制する C and 5 の薬効は直ちに現れないかもしれない。この細胞外の VEGF 蛋白質集団が代謝するにつれて、新しい VEGF 产生は C and 5 によって阻害されることになる。

## 【0191】

したがって、3週目～12、15、および18週目にかけてのそれぞれの重要な成果の変化の分析が、C and 5 薬効を観察するのにより薬理学的に適切な時間帯（ウィンドウ）を表わしているかもしれない。決定的に確立されているわけではないが、この分析では、およそ3週間で網膜の組織中の細胞外の VEGF の代謝および分解が起きると仮定している。

10

20

30

40

50

## 【0192】

グループ間の著しい違いは識別されなかつたが、主な成果中のいくつかの重要な傾向は注目すべきである。特に、遠見視力は、治験対象のおよそ78%がベースラインから12週目まで安定していた；また、3週目～15週目までの期間について考慮すると、治験集団のおよそ83%にまで増えた。この83%視力安定化は18週目の検査を通じて保持された。これはC and 5で最後に治療して以降12週間にも及んだことになる。

## 【0193】

C NVの大きさは、この18週間の期間にほんの僅か変化しただけであり、これは、傷害が安定化したことを示唆している。重要なことは、C NV傷害の大きさにかなり明瞭な投与量効果が見られ、C NVの大きさの増加がC and 5の0.2mgの投与量で最大で、1.5mgのグループでやや低下し、C and 5の3.0mgの投与量で治療した眼で最小であったことである。動物モデル[3]で、VEGFがC NVの成長に必要、且つ十分なことが知られており、したがって、C NVが傷害の最大のVEGF応答成分であると予想される。このように、この結果は、C and 5効果にとって特に適切なマーカーになる。C NVの大きさの変化の間の違いが、ベースラインから12週目( $p = 0.0582$ )に亘って統計的に有意でなかったが、より大きな集団で調査すると、このことがさらに実証されるであろうと予想される。

10

## 【0194】

視力とC NVの大きさの安定化におけるこれらの発見は、C NV傷害タイプに関する治験集団の特性を考えると、特に注目すべきである。12週間の治療後のC and 5薬効の評価ができるように、侵攻性疾患対象を登録した。この治験集団は、64%が主に典型的（クラシック）傷害で36%が最低度の典型的（クラシック）傷害であったが、潜在性疾患対象は登録から除いた。最低度の典型的（クラシック）傷害は、活性であることが必要で、また、3か月以上、登録に先立って、傷害の大きさの増加が>10%、あるいはBCDVA（最良矯正遠見視力）の>1行の喪失が必要とされた。最後に、複数、つまりMacugen（登録商標）の注射2回以下、トリアムシノロン（triamcinolone）注射1回、および PDT 治療1回という以前の治療は承認された。本治験では、対象の24%は以前に自分の治験対象眼のARMD（加齢黄斑変性症）治療を受けていた。傷害の21%がthe Digital Angiography Reading Center（デジタル血管造影読影センター）で決定されたような網膜内血管腫状増殖（retinal angiomaticous proliferation: RAP）の特性を持つと識別されていたことは、注目に値する。想定外の、高度の侵攻性なRAP傷害の発生があったので、本治験期間において、無作為化層化の導入を追加することになった。この厳しい影響を受けた集団であったにもかかわらず、C and 5は、すべての投与量グループに薬効を持つようであった。

20

## 【0195】

C and 5は、硝子体注入により3.0mgを超えない投与量で、安全、且つ薬効があると結論できる。

30

## 【0196】

前記の事項に基づけば、C and 5の投与と別の治療と組み合わせることが有利かもしれないと考えられる。例えば、最初の3か月間あるいはそれ以上、1月当たりルセンティス（Lusentis）を投与することと、維持療法として既往のVEGFに悪影響を与えないように思われるC and 5を投与することとからなる急性初期療法である。

40

## 【実施例4】

## 【0197】

抗VEGFR siRNAを使用する、DME（糖尿病性黄斑浮腫）罹患のヒトのVEGFのインビボ RNA干渉

治験設計 48人の対象を無作為化し、C and 5を、0.2mg(18人)、1.5mg(12人)、および3.0mg(18人)で治療した。この注入投与は、初日(Day 0)、4週目および8週目に、4週間置いて行なわれた。対象は、少なくとも21歳で

50

、1型あるいは2型糖尿病と診断されている。対象は、視覚統一断層撮影法で中心部分体に黄斑の中心が最低250ミクロン以上の黄斑浮腫を有し、牽引性病因の兆候がなく、検眼鏡診察で臨床的有意な黄斑浮腫(CSME (clinically significant macular edema : CSME))、最良矯正視力の文字成績69~24、およびスネーレン(Snellen equivalent)等価視力(20/40~20/320)を有していた。対象が慢性腎不全、不安定な病状(HbA1C(ヘモグロビンA1C(糖化ヘモグロビン)が10%超過)、PRP(汎網膜光凝固(panretinal photocoagulation : PRP)に12週以内に編入、あるいはその予定、焦点レーザーに12週以内に編入、あるいは6箇月以内にステロイド使用へ編入の場合には排除された。

10

#### 【0198】

ベースライン年齢は、62.7歳、56%が女性、44%が男性、70%が白人で30%が白人以外であった。他眼は、76.7%がDME(糖尿病性黄斑浮腫)(diabetes macular edema : DME)で23.3%はDMEに罹患していなかった。当該平均視力は文字数57.3であった(20/63)。国際臨床糖尿病網膜症の重症分類を使用すると、6人は、軽症非増殖、18人は、中等非増殖、8人は重症非増殖、また、16人は増殖網膜症であった。

20

#### 【0199】

試料は、硝子体注入してから30分、3時間、および24時間後に採集した。血漿試料は検知可能な程度のCand5を含んでいなかった。一次有効性指標(評価項目)(end point)は、12週目のOCT(視覚の統一断層撮影法(ocular coherence tomography : "OCT"))厚さ変化であって、二次有効性指標は、12週目の視力変化であった。一次評価指標(OCT)は、中心下部分野の平均厚さ比べた、網膜厚さの変化として測定された。12週目、投与量3回後のベースラインからの変化は、-8.9μm(範囲、-547μm~310μm)で、さらに図9に図示してある。二次有効性指標は、文字で表わした矯正視力の平均の変化として分析した。12週目、投与量3回後のベースラインからの平均の変化は、文字数0.1(範囲：-39文字~21文字)で、図10に図示してある。

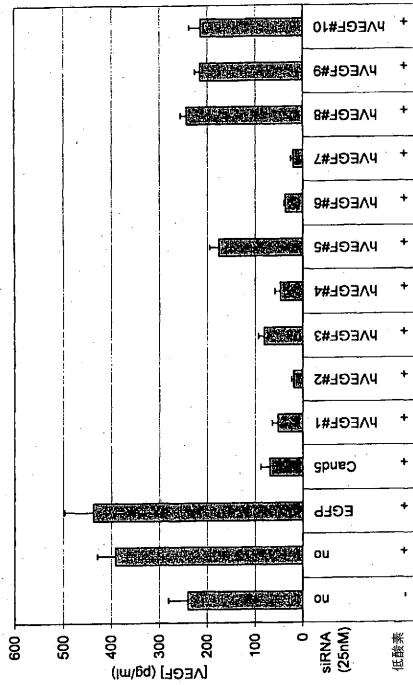
#### 【0200】

Cand5は安全で、DME対象の忍容性は良好である。3箇月目、投与3回後、平均OCT厚さおよび視力変化は少なかつたが、一部(サブセット)の対象らはよくなり、DMEにおける[治療の]生物学的効果を立証した。ARMED(加齢黄斑変性症)で見られるように、既往の細胞外VEGFの中には、治療処理されないものがあるようであるが、新規のVEGFの產生は阻害されている。したがって、前記指標に対する究極の効果は、調査する時間が必要である。

30

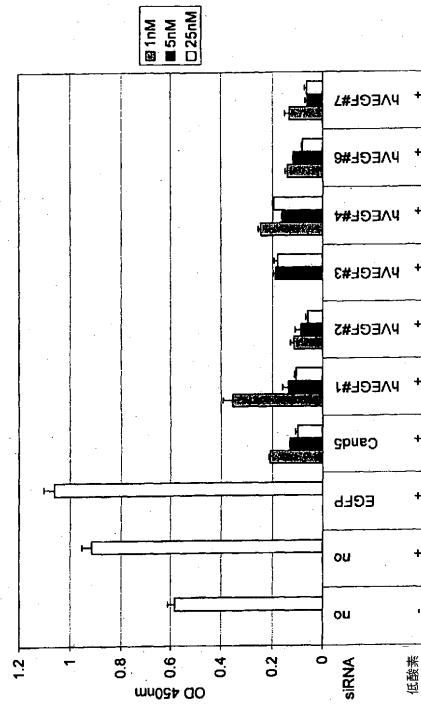
【図1】

hVEGF<sub>165</sub>-siRNA siRNAは、293細胞におけるhVEGF発現を抑制する。

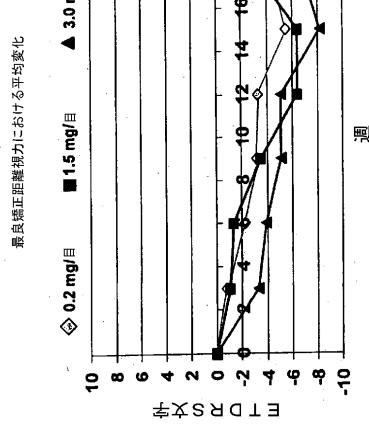


【図2】

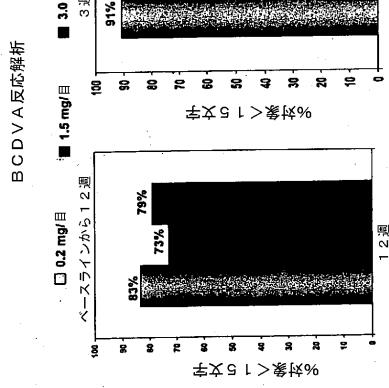
hVEGF siRNA siRNAは、293細胞におけるhVEGF発現を抑制する。



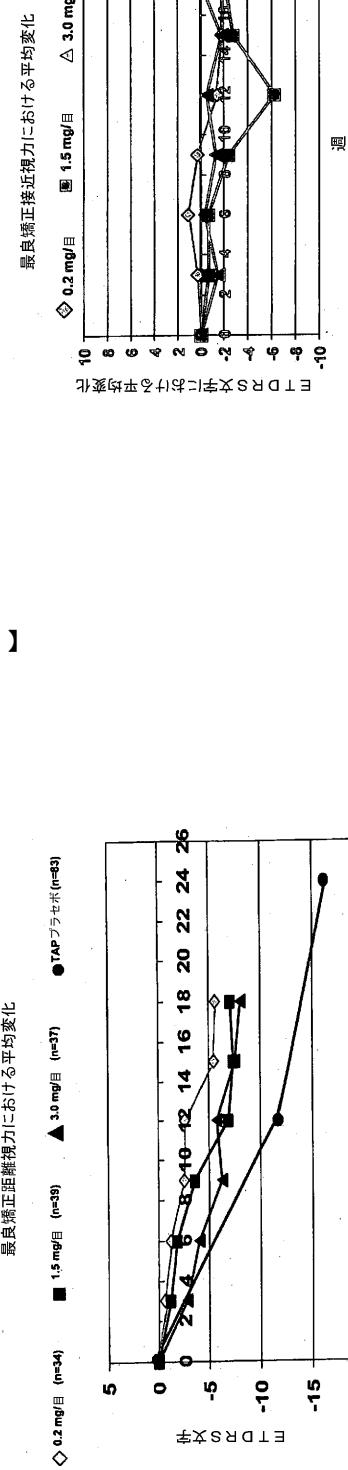
【図3】



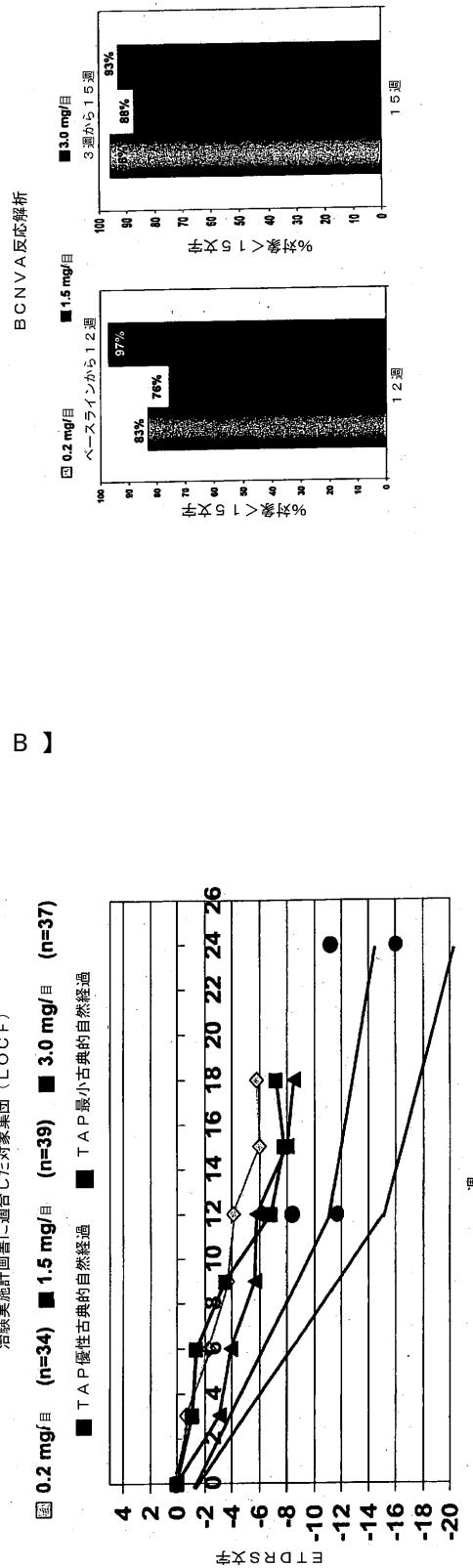
【図4】



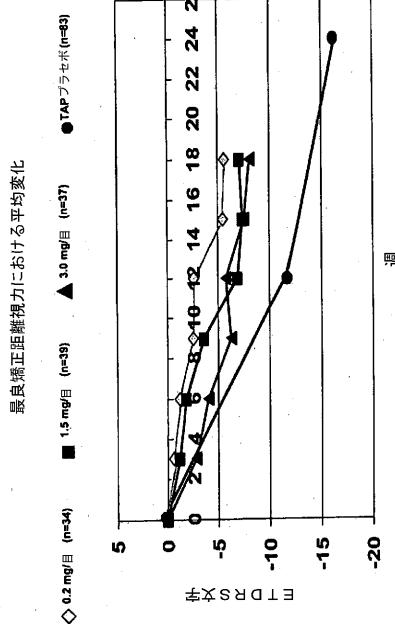
【図5】



【図6】

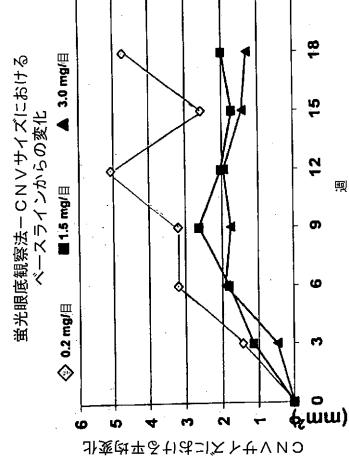


【図7 A】

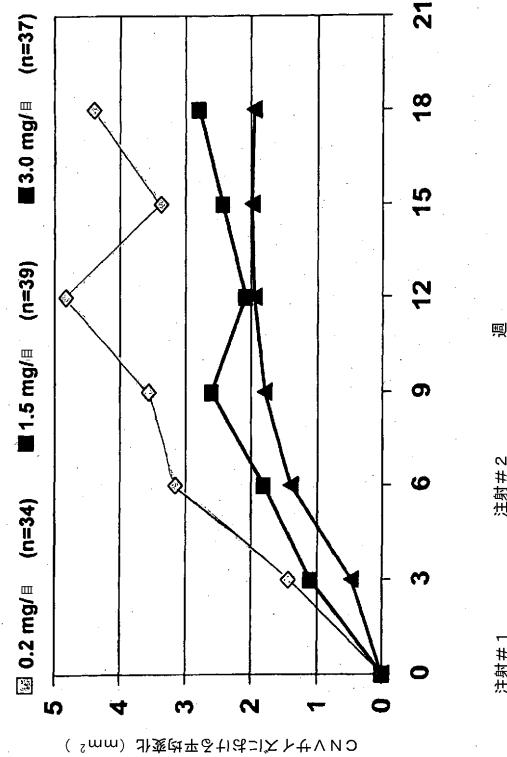


【図7 B】

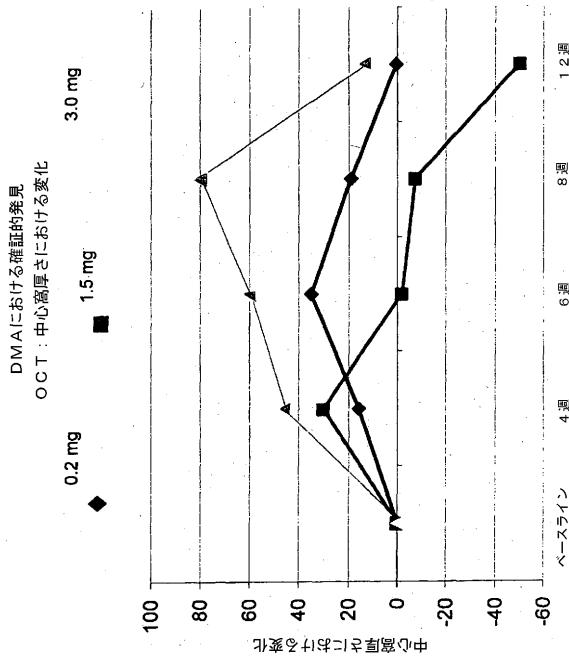
【図 8 A】



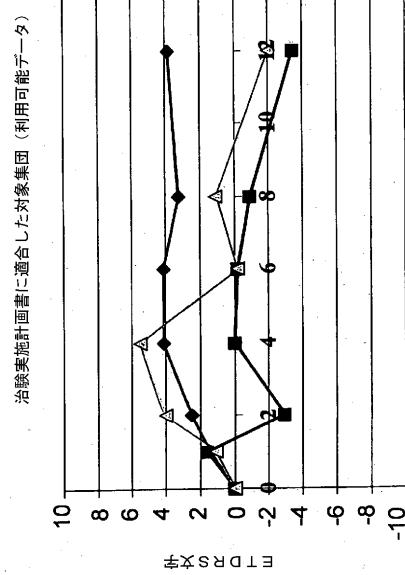
【図 8 B】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

2009540011000001.xml

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2007/071029
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N15/11 A61K31/7105 A61K31/713		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/009769 A (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF [US]; TOLENTINO MICHAEL J [US]; REICH SA) 29 January 2004 (2004-01-29) figures 6,7; examples 6,8,9	13-16, 20-24
Y		17-19, 25-81
X	TOLENTINO M J ET AL: "INTRAVITREAL INJECTION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR SMALL INTERFERING RNA INHIBITS GROWTH AND LEAKAGE IN A NONHUMAN PRIMATE, LASER-INDUCED MODEL OF CHOROIDAL NEOVASCULARIZATION" RETINA, PHILADELPHIA, PA, US, no. 1, February 2004 (2004-02), pages 132-138, XP009063917 ISSN: 0275-004X the whole document	13-16, 20-24
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
*T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report	
11 January 2008	18/01/2008	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Romano, Alper	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/071029

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROSENFELD P J ET AL: "Maximum Tolerated Dose of a Humanized Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody Fragment for Treating Neovascular Age-Related Macular Degeneration" OPHTHALMOLOGY, J. B. LIPPINCOTT CO., PHILADELPHIA, PA, US, vol. 112, no. 6, June 2005 (2005-06), pages 1048-1053, XP004925432 ISSN: 0161-6420 the whole document	1-12
Y	-----	17-19, 25-81
X	SPAIDE RICHARD F ET AL: "Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration" RETINA, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 26, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 383-390, XP009086410 ISSN: 0275-004X the whole document	1-12
Y	-----	17-19, 25-81
A	REICH S J ET AL: "Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model" MOLECULAR VISION, SN, ATLANTA, US, vol. 9, no. 31, 30 May 2003 (2003-05-30), pages 210-216, XP002343182 ISSN: 1090-0535 figure 4	13-24
	-----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2007/071029

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Although claims 1-81 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.**
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/071029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004009769	A 29-01-2004	AU 2003253995 A1	09-02-2004
		CA 2493499 A1	29-01-2004
		EP 1578933 A2	28-09-2005
		JP 2006505251 T	16-02-2006
		KR 20050056944 A	16-06-2005
		MX PA05001000 A	16-05-2005
		US 2004018176 A1	29-01-2004
		US 2007037760 A1	15-02-2007
		US 2006286073 A1	21-12-2006
		US 2006292120 A1	28-12-2006
		US 2007037761 A1	15-02-2007
		US 2007003523 A1	04-01-2007
		US 2007037762 A1	15-02-2007
		US 2007149471 A1	28-06-2007

---

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ライヒ、サミュエル、ジョサム

アメリカ合衆国、19066 ペンシルバニア州、メリオン ステーション、320 ブルックウェイ ロード

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA11 DA02 GA11  
4C084 AA19 MA02 NA05 ZA332 ZA362 ZC412  
4C085 AA14 CC23 EE03 GG01  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA33 ZA36 ZC41