

(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2011-518117

(P2011-518117A)

(43) 公表日 平成23年6月23日 (2011.6.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 I I I	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	4 C O 8 6
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 134 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-549893 (P2010-549893)	(71) 出願人	505369158
(86) (22) 出願日	平成21年3月5日 (2009.3.5)		アルナイラム ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成22年10月21日 (2010.10.21)		, インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/036223		A L N Y L A M P H A R M A C E U T I
(87) 国際公開番号	W02009/111658		C A L S , I N C .
(87) 国際公開日	平成21年9月11日 (2009.9.11)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(31) 優先権主張番号	61/034, 019		1 4 2 , ケンブリッジ, サード スト
(32) 優先日	平成20年3月5日 (2008.3.5)		リート 3 0 0
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	61/083, 367		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成20年7月24日 (2008.7.24)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	61/086, 381	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成20年8月5日 (2008.8.5)		弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 E g 5 および V E G F 遺伝子の発現を阻害するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、S N A L P 製剤中に二本鎖リボ核酸 (d s R N A) を含有する組成物、該組成物を使用して、E g 5 および血管内皮成長因子 (V E G F) の発現を阻害する方法、ならびに該組成物を使用して、癌等の、E g 5 および V E G F の発現によって媒介される病理過程を処置する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内のヒトキネシンファミリーメンバー 11 (Eg5 / KSP) 遺伝子の発現を阻害するための、第 1 の二本鎖リボ核酸 (dsRNA) と、細胞内のヒト VEGF の発現を阻害するための第 2 の dsRNA とを含む、組成物であって、

前記第 1 の dsRNA および前記第 2 の dsRNA の両方が、安定な核酸脂質粒子 (SNALP) に製剤化され、

前記第 1 の dsRNA は、第 1 のセンス鎖と第 1 のアンチセンス鎖とからなり、前記第 1 のセンス鎖は、第 1 の配列を含み、前記第 1 のアンチセンス鎖は、配列番号 1311 (5' - UCGAGAAUCUAAACUAACU - 3') の少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドに相補的な第 2 の配列を含み、前記第 1 の配列は、前記第 2 の配列に相補的であり、前記第 1 の dsRNA は、15 ~ 30 塩基対長であり、前記第 2 の dsRNA は、第 2 のセンス鎖と第 2 のアンチセンス鎖とからなり、前記第 2 のセンス鎖は、第 3 の配列を含み、前記第 2 のアンチセンス鎖は、配列番号 1538 (5' - GCACAUAGGAGAGAUAGCUU - 3') の少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドに相補的な第 4 の配列を含み、前記第 3 の配列は、前記第 4 の配列に相補的であり、それぞれの鎖は、15 ~ 30 塩基対長である、組成物。

10

【請求項 2】

前記第 1 のアンチセンス鎖は、配列番号 1311 (5' - UCGAGAAUCUAAACUAACU - 3') に相補的な第 2 の配列を含み、第 2 のアンチセンス鎖は、配列番号 1538 (5' - GCACAUAGGAGAGAUAGCUU - 3') に相補的な第 4 の配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 3】

前記第 1 の dsRNA は、配列番号 1534 (5' - UCGAGAAUCUAAACUAACUUTT - 3') からなるセンス鎖と、配列番号 1535 (5' - AGUUAGUUUAGAUUCUCGATT - 3') からなるアンチセンス鎖とからなり、前記第 2 の dsRNA は、配列番号 1536 (5' - GCACAUAGGAGAGAUAGCUU - 3') からなるセンス鎖と、配列番号 1537 (5' - AAGCUCAUCUCUCCUAUGUGCUG - 3') からなるアンチセンス鎖とからなる、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 4】

それぞれの鎖が、小文字「c」もしくは「u」で示される 2' - O - メチルリボヌクレオチドと、小文字「s」で示されるホスホロチオエートとを含むように、

前記第 1 の dsRNA は、

配列番号 1240 (5' - ucGAGAAucUAACuAACuTsT - 3')

からなるセンス鎖と、

配列番号 1241 (5' - AGUuAGUUuAGAUUCUCGATsT)

からなるアンチセンス鎖とからなり、

前記第 2 の dsRNA は、

配列番号 1242 (5' - GcAcAuAGGAGAGAUgAGCUsU - 3')

からなるセンス鎖と、

配列番号 1243 (5' - AAGCUcAUCUCUCCuAuGuGCusG - 3')

からなるアンチセンス鎖とからなるように修飾される、請求項 3 に記載の組成物。

40

【請求項 5】

前記第 1 の dsRNA および前記第 2 の dsRNA は、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1、2、または 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記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もしくはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される末端ヌクレオチドからなる群から選択される、請求項 5 に記載の組成

50

物。

【請求項 7】

前記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、ロックされたヌクレオチド、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、ホスホルアミデート、およびヌクレオチドを含む非天然塩基からなる群から選択される、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記第 1 の dsRNA および前記第 2 の dsRNA は、それぞれ少なくとも 1 個の 2'-O-メチル修飾リボヌクレオチドと、5'-ホスホロチオエート基を含む少なくとも 1 個のヌクレオチドとを含む、請求項 1、2、および 3 に記載の組成物。

10

【請求項 9】

それぞれの dsRNA のそれぞれの鎖が、19~23 塩基長である、請求項 1~3 および 5~8 に記載の組成物。

【請求項 10】

それぞれの dsRNA のそれぞれの鎖が、21~23 塩基長である、請求項 1~3 および 5~8 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記第 1 の dsRNA のそれぞれの鎖が 21 塩基長であり、前記第 2 の dsRNA の前記センス鎖が 21 塩基長であり、前記第 2 の dsRNA の前記アンチセンス鎖が 23 塩基長である、請求項 1~3 および 5~8 に記載の組成物。

20

【請求項 12】

前記第 1 の dsRNA および前記第 2 の dsRNA は、等モル比で存在する、請求項 1~11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 SNALP は、DLi nDMA、コレステロール、DPPC、およびPEG2000-C-DMAを含む、請求項 1~12 に記載の組成物。

【請求項 14】

表 17 に列記される割合の構成成分を含む、請求項 1~13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記組成物は、Eg5 を発現する細胞と接触すると、Eg5 の発現を少なくとも 40、50、60、70、80、または少なくとも 90% 阻害する、請求項 1~14 に記載の組成物。

30

【請求項 16】

前記組成物は、VEGF を発現する細胞と接触すると、VEGF の発現を少なくとも 40、50、60、70、80、または少なくとも 90% 阻害する、請求項 1~15 に記載の組成物。

【請求項 17】

細胞への前記組成物の投与は、前記細胞内の Eg5 および VEGF の両方の発現を低下させる、請求項 1~16 に記載の組成物。

40

【請求項 18】

前記組成物は、nM 濃度で投与される、請求項 1~17 に記載の組成物。

【請求項 19】

細胞への前記組成物の投与は、前記細胞内の単星 (mono-aster) の形成を増加させる、請求項 1~18 に記載の組成物。

【請求項 20】

哺乳動物への前記組成物の投与は、前記哺乳動物における腫瘍成長の阻止、腫瘍成長の低下、または生存の延長からなる群から選択される、少なくとも 1 つの効果をもたらす、請求項 1~19 に記載の組成物。

【請求項 21】

50

前記効果は、体重の測定、臓器重量の測定、目視検査、mRNA分析、血清AFP分析、および生存の監視からなる群から選択される、少なくとも1つのアッセイを使用して測定される、請求項1～20に記載の組成物。

【請求項22】

ソラフェニブをさらに含む、請求項1～21に記載の組成物。

【請求項23】

前記第1のdsRNAは、2つのオーバーハングを含有し、前記第2のdsRNAは前記アンチセンスの3'にオーバーハングと、前記アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端とを含有する、上記請求項のうちのいずれか1項に記載の組成物。

【請求項24】

細胞内のEg5/KSPおよびVEGFの発現を阻害するための方法であって、前記細胞に、請求項1～22に記載の組成物のうちのいずれかを投与するステップを含む、方法。

10

【請求項25】

癌の処置を必要とする哺乳動物における腫瘍成長を阻止するか、腫瘍成長を低下させるか、または生存を延長させるための方法であって、前記哺乳動物に、請求項1～22に記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項26】

前記哺乳動物は、肝臓癌を有する、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記哺乳動物は、肝臓癌を有するヒトである、請求項25に記載の方法。

20

【請求項28】

ソラフェニブを投与するステップをさらに含む、請求項24または25に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2008年3月5日出願の米国仮出願第61/034,019号、および2008年7月24日出願の米国仮出願第61/083,367号、および2008年8月5日出願の米国仮出願第61/086,381号、および2008年11月6日出願の米国仮出願第61/112,079号、および2009年2月6日出願の米国仮出願第61/150,664号の利益を主張し、当該出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0002】

【技術分野】

本発明は、二本鎖リボ核酸(dsRNA)を含有する組成物、SNALPに製剤化される、遺伝子の組み合わせ、例えば、Eg5および血管内皮成長因子(VEGF)遺伝子の発現を阻害するためのRNA干渉の媒介におけるその使用、ならびに癌等の、Eg5およびVEGFの発現によって媒介される病理過程を処置するための、該組成物の使用に関する。

40

【背景技術】

【0003】

生物内の細胞集団の維持は、細胞分裂およびプログラム細胞死の細胞過程によって司られる。正常な細胞内では、各過程の開始および終了に関連する細胞的事象が高度に調節されている。癌等の増殖性疾患では、これらの過程のうちの1つまたは両方が乱されている可能性がある。例えば、癌細胞は、おそらく突然変異によって、正の調節因子の過剰発現、または負の調節因子の喪失のいずれかを通じて、その細胞分裂周期の調節(チェックポイント制御)を失っている場合がある。

【0004】

あるいは、癌細胞は、負の調節因子の過剰発現を通じてプログラム細胞死を経る能力を

50

失っている場合がある。したがって、癌性細胞に対するチェックポイント制御およびプログラム細胞死の過程を回復する、新規化学療法薬を開発する必要がある。

【0005】

ヒト癌の処置に対する一手法は、細胞周期の進行に必須であるタンパク質を標的とすることである。細胞周期が1つのフェーズから次のフェーズへと進むためには、特定の前提条件的な事象を完了しなければならない。適切な事象およびフェーズの順序を強制する、細胞周期内のチェックポイントが存在する。かかるチェックポイントの1つは、有糸分裂のメタフェーズ段階で生じる紡錘体チェックポイントである。有糸分裂における必須機能を有するタンパク質を標的とする小分子は、紡錘体チェックポイントを開始させて、細胞の有糸分裂を停止させることができる。細胞の有糸分裂を停止する小分子のうち、細胞内で抗腫瘍活性を提示するものも、アポトーシス、すなわちプログラム細胞死に関連する形態的变化を誘発する。したがって、癌の処置に効果的な化学療法薬は、チェックポイント制御およびプログラム細胞死を誘発するものであり得る。残念なことに、細胞内でこれらの過程を制御するために利用可能である化合物はわずかである。有糸分裂停止およびアポトーシスを引き起こすことで知られるほとんどの化合物は、チューブリン結合剤として作用する。これらの化合物は、微小管の動的不安定性を変化させ、有糸分裂紡錘体の機能/構造を間接的に変化させ、それによって有糸分裂の停止を生じさせる。また、これらの化合物のほとんどは、全ての微小管の構成成分であるチューブリンタンパク質を特異的に標的とするため、微小管が役割を有する多くの正常な細胞過程のうちの1つ以上に、影響を及ぼすことができる。したがって、増殖細胞に関連するタンパク質をより特異的に標的とする薬剤も必要である。

10

20

【0006】

E g 5 は、有糸分裂紡錘体に局在し、双極性有糸分裂紡錘体の形成および/または機能に必要であることが知られる、幾つかのキネシン様モータータンパク質のうちの1つである。近年、有糸分裂紡錘体の双極性を妨害する小分子が報告された(Mayer, T. U. et al., 1999, Science 286(5441)971-4、参照により本明細書に組み込まれる)。より具体的には、該小分子は、微小管の単星状アレイ(monoastral array)が中心体の中心対から広がり、染色体が微小管の遠位端に付着する、異常な有糸分裂紡錘体の形成を誘発した。該小分子は、単星状アレイから「モナストロール」と呼ばれる。この単星状アレイの表現型は、E g 5 モータータンパク質を免疫除去された有糸分裂細胞中で、すでに認められていた。この独特の単星状アレイの表現型が、E g 5 の可能性のある阻害剤としてのモナストロールの同定を容易にした。実際、インビトロアッセイで、モナストロールが微小管のE g 5 モーターによって駆動される運動性を阻害することがさらに示された。E g 5 阻害剤であるモナストロールは、関連するキネシンモーター、または細胞内のゴルジ装置の運動を担う単独または複数のモーターに対する明白な効果はない。E g 5 の免疫除去、またはE g 5 のモナストロール阻害のいずれかを通じて、単星状アレイの表現型を提示する細胞は、細胞周期のMフェーズを停止させる。しかしながら、E g 5 の免疫除去または阻害のいずれかによって誘発される有糸分裂停止は、一時的である(Kapoor, T. M., 2000, J Cell Biol 150(5)975-80)。単星状アレイの表現型、およびモナストロールによって誘発される有糸分裂の細胞周期停止は、共に可逆的である。細胞は、正常な双極性の有糸分裂紡錘体を形成するように回復し、有糸分裂を完了して、細胞周期および正常な細胞増殖を継続する。これらのデータは、一時的な有糸分裂停止を誘発したE g 5 の阻害剤は、癌細胞の増殖の処置に効果的ではない可能性を示唆している。それでもなお、モナストロールが有糸分裂停止を生じさせるという発見は興味深く、したがって、ヒト癌の処置に効果的である状態で、E g 5 モータータンパク質を調節するために使用することができる化合物をさらに研究し、同定する必要がある。また、これらの化合物の他の抗新生物剤との併用を考察する必要がある。

30

40

【0007】

V E G F (血管透過性因子、V P Fとしても知られる)は、血管新生、上皮細胞増殖、

50

および内皮細胞生存を刺激する多機能サイトカインである。VEGFは、多岐にわたる組織によって産生され、その過剰発現または異常発現は、癌および加齢黄斑変性等の網膜障害、ならびに他の血管新生障害を含む、種々の障害を生じさせる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

近年、二本鎖RNA分子(dsRNA)が、RNA干渉(RNAi)として知られる、高度に保存された調節機序で遺伝子発現を遮断することが示された。国際公開WO第99/32619号(Fireら)は、線虫における遺伝子の発現を阻害するための、少なくとも25ヌクレオチド長のdsRNAの使用を開示している。また、dsRNAは、植物(例えば、国際公開WO第99/53050号、Waterhouseら、および国際公開WO第99/61631号、Heifetzらを参照)、ショウジョウバエ(例えば、Yang, D., et al., Curr. Biol. (2000) 10:1191-1200を参照)、ならびに哺乳動物(国際公開WO第00/44895号、Limmer、および独国特許DE第101 00 586.5号、Kreutzerらを参照)を含む、他の生物において標的RNAを分解することが示されている。この自然機序は、現在、遺伝子の異常な、または望ましくない調節によって引き起こされる障害を処置するための、新規医薬品群の開発の焦点となっている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

細胞内のヒトキネシンファミリーメンバー11(Eg5/KSP)およびヒトVEGF遺伝子の発現を阻害するための、2個の二本鎖リボ核酸(dsRNA)を有する組成物が開示される。該dsRNAは、安定な核酸脂質粒子(SNALP)に製剤化される。また、該組成物を使用して、細胞内のEg5/KSPおよび/またはVEGFの発現を低下させるための方法、ならびに本発明の組成物を使用する疾患、例えば、肝臓癌の処置方法も開示される。

【0010】

したがって、細胞内のヒトキネシンファミリーメンバー11(Eg5/KSP)遺伝子の発現を阻害するための第1の二本鎖リボ核酸(dsRNA)と、細胞内のヒトVEGFの発現を阻害するための第2のdsRNAとを有する組成物が、本明細書に開示され、前記第1のdsRNAおよび前記第2のdsRNAは共に、安定な核酸脂質粒子(SNALP)に製剤化され、前記第1のdsRNAは、第1のセンス鎖と第1のアンチセンス鎖とからなり、前記第1のセンス鎖は、第1の配列を有し、前記第1のアンチセンス鎖は、配列番号1311(5'-UCGAGAAUCUAAACUAAACU-3')の少なくとも15個の連続するヌクレオチドに相補的な第2の配列を有し、前記第1の配列は、前記第2の配列に相補的であり、前記第1のdsRNAは、15~30塩基対長であり、前記第2のdsRNAは、第2のセンス鎖と第2のアンチセンス鎖とからなり、前記第2のセンス鎖は、第3の配列を有し、前記第2のアンチセンス鎖は、配列番号1538(5'-GCACAUAAGGAGAGAGAUAGAGCUU-3')の少なくとも15個の連続するヌクレオチドに相補的な第4の配列を有し、前記第3の配列は、前記第4の配列に相補的であり、それぞれの鎖は、15~30塩基対長である。

【0011】

幾つかの実施形態において、第1のアンチセンス鎖は、配列番号1311(5'-UCGAGAGAAUCUAAACUAAACU-3')に相補的な第2の配列を有し、第2のアンチセンス鎖は、配列番号1538(5'-GCACAUAAGGAGAGAGAUAGAGCUU-3')に相補的な第4の配列を有する。他の実施形態において、第1のdsRNAは、配列番号1534(5'-UCGAGAGAAUCUAAACUAAACU-3')からなるセンス鎖と、配列番号1535(5'-AGUUAGUUUAGAUUCUCGATT-3')からなるアンチセンス鎖とからなり、第2のdsRNAは、配列番号1536(5'-GCACAUAAGGAGAGAGAUAGAGCUU-3')からなるセンス鎖と、配列

番号 1 5 3 7 (5 ' - A A G C U C A U C U C U C C U A U G U G C U G - 3 ') からなるアンチセンス鎖とからなる。さらなる実施形態において、それぞれの鎖が、小文字「c」または「u」で示される 2 ' - O - メチルリボヌクレオチドと、小文字「s」で示されるホスホリチオエートとを含むように、第 1 の d s R N A は、配列番号 1 2 4 0 (5 ' - u c G A G A A u c u A A A c u A A c u T s T - 3 ') からなるセンス鎖と、配列番号 1 2 4 1 (5 ' - A G U u A G U U u A G A U U C U C G A T s T) からなるアンチセンス鎖とからなり、第 2 の d s R N A は、配列番号 1 2 4 2 (5 ' - G c A c A u A G G A G A G A u G A G C U s U - 3 ') からなるセンス鎖と、配列番号 1 2 4 3 (5 ' - A A G C U c A U C U C U C C u A u G u G C u s G - 3 ') からなるアンチセンス鎖とからなるように、修飾される。

10

【0012】

幾つかの実施形態において、第 1 の d s R N A は、2 つのオーバーハングを含有し、第 2 の d s R N A は、アンチセンスの 3 ' にオーバーハングと、アンチセンス鎖の 5 ' 末端に平滑末端とを含有する。

【0013】

第 1 の d s R N A および第 2 の d s R N A は、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを有することができる。例えば、それぞれの d s R N A は、2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチド、5 ' - ホスホリチオエート基を有するヌクレオチド、およびコレステリル誘導体もしくはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される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 1 個の修飾ヌクレオチドを有することができる。該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、ロックされたヌクレオチド、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、ホスホルアミデート、およびヌクレオチドを有する非天然塩基の群から選択することができる。幾つかの実施形態において、第 1 の d s R N A および第 2 の d s R N A はそれぞれ、少なくとも 1 個の 2 ' - O - メチル修飾リボヌクレオチドと、5 ' - ホスホリチオエート基を有する少なくとも 1 個のヌクレオチドを含む。

20

【0014】

それぞれの d s R N A のそれぞれの鎖が、例えば、19 ~ 23 塩基長、または代替として、21 ~ 23 塩基長であり得る。一実施形態において、第 1 の d s R N A のそれぞれの鎖は 21 塩基長であり、第 2 の d s R N A のセンス鎖は 21 塩基長であり、第 2 の d s R N A のアンチセンス鎖は 23 塩基長である。

30

【0015】

幾つかの実施形態において、第 1 の d s R N A および第 2 の d s R N A は、等モル比で存在する。

【0016】

本明細書に記載されるように、該 d s R N A は、S N A L P S として製剤化される。幾つかの実施形態において、S N A L P 製剤は、D L i n D M A、コレステロール、D P P C、および P E G 2 0 0 0 - C - D M A を含む。例えば、S N A L P は、表 17 に列記される割合の構成成分を有し得る。

40

【0017】

本発明の組成物を使用して、E g 5 および / または V A G F の発現を低下させることができる。幾つかの実施形態において、本発明の組成物は、E g 5 を発現する細胞と接触すると、E g 5 の発現を少なくとも 40、50、60、70、80、または少なくとも 90 % 阻害する。他の実施形態において、本発明の組成物は、V E G F を発現する細胞と接触すると、V E G F の発現を少なくとも 40、50、60、70、80、または少なくとも 90 % 阻害する。細胞への該組成物の投与は、前記細胞内の E g 5 および V E G F の両方の発現を低下させることができる。該組成物は、n M 濃度で投与される、請求項 1 ~ 17 に記載の化合物。

【0018】

50

細胞への本発明の組成物の投与は、例えば、細胞内の単星 (mono-aster) の形成の増加をもたらすことができる。哺乳動物への該組成物の投与は、前記哺乳動物における腫瘍成長の阻止、腫瘍成長の低下、または生存の延長からなる群から選択される、少なくとも1つの効果をもたらすことができる。該効果は、体重の測定、臓器重量の測定、目視検査、mRNA分析、血清AFP分析、および生存の監視からなる群から選択される、少なくとも1つのアッセイを使用して測定することができる。nM濃度で投与された時に、これらの効果を有する組成物が含まれる。

【0019】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、ソラフェニブを含む。

【0020】

また、本発明の組成物を使用する方法も、本発明に含まれる。一実施形態は、細胞に本発明の組成物を投与することによって、細胞内のEg5/KSPおよびVEGFの発現を阻害するための方法である。他の実施形態は、癌の処置を必要とする哺乳動物に該組成物を投与することによって、前記哺乳動物における腫瘍成長を阻止するか、腫瘍成長を低下させるか、または生存を延長させるための方法である。幾つかの実施形態において、哺乳動物は肝臓癌を有し、例えば、哺乳動物は、肝臓癌を有するヒトである。該方法は、ソラフェニブを投与するさらなるステップを含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】Hep3BマウスモデルにおけるSNALP-siRNAの投与後の、体重の割合としての肝重量を示すグラフである。

【図2】図2A~2Dは、Hep3Bマウスモデルにおける、体重に対するSNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図3】Hep3Bマウスモデルにおける、体重に対するSNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図4】未処置対照動物の体重を示すグラフである。

【図5】Hep3Bマウスモデルにおける、体重に対する対照ルシフェラーゼSNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図6】Hep3Bマウスモデルにおける、体重に対するVSP-SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図7A】Hep3Bマウスモデルにおける、マウスGAPDHレベルに基準化したヒトGAPDHレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図7B】Hep3Bマウスモデルにおける、血清ELISAによって測定される血清AFPレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図8】Hep3Bマウスモデルにおける、マウスGAPDHレベルに基準化したヒトGAPDHレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図9】Hep3Bマウスモデルにおける、ヒトGAPDHレベルに基準化したヒトKSPレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図10】Hep3Bマウスモデルにおける、ヒトGAPDHレベルに基準化したヒトVEGFレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図11A】Hep3Bマウスモデルにおける、ヒトGAPDHレベルに基準化したマウスVEGFレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図11B】Hep3Bマウスモデルにおける、ヒトGAPDHレベルおよび血清AFPレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示す一連のグラフである。

【図12】図12A~12Cは、Hep3Bマウスモデルにおける、腫瘍KSP、VEGF、およびGAPDHレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図13】図13Aおよび図13Bは、肝臓腫瘍を有するモデルにおける、生存に対するSNALP-siRNAの効果を示すグラフである。腫瘍細胞の播種後18日(図13A)および26日(図13B)に処置が開始された。

10

20

30

40

50

【図 1 4】血清アルファフェトプロテイン (A F P) レベルに対する S N A L P - s i R N A の効果を示すグラフである。

【図 1 5】図 1 5 A および 1 5 B は、2 m g / k g の S N A L P - V S P (A) または 2 m g / k g の S N A L P - L u c (B) を投与した担腫瘍動物 (H e p 3 B 細胞の埋め込み後 3 週間) の、H E 染色した切片の画像である。2 4 時間後、担腫瘍肝葉を組織学的分析のために処理した。矢印は単星を示す。

【図 1 6】A L N - V S P D S 0 1 の製造過程を図示する流れ図である。

【図 1 7】A L N - V S P 0 2 のクライオ透過型電子顕微鏡 (クライオ - T E M) 画像である。

【図 1 8】A L N - V S P 0 2 の製造過程を図示する流れ図である。

【図 1 9】S N A L P に製剤化された s i R N A およびソラフェニブの投与の、生存に対する効果を図示するグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

本発明は、d s R N A を使用して、細胞もしくは哺乳動物内の E g 5 遺伝子および V E G F 遺伝子の発現を阻害するための、組成物および方法を提供する。該 d s R N A は、好ましくは安定な核酸粒子 (S N A L P) にパッケージ化される。また、本発明は、E g 5 遺伝子および V E G F 遺伝子の発現によって引き起こされる、哺乳動物における肝臓癌等の病態および疾患を処置するための、組成物および方法も提供する。該 d s R N A は、R N A 干渉 (R N A i) として知られる過程を通じて配列特異的分解を導く。

【 0 0 2 3 】

以下の詳細な説明は、E g 5 遺伝子および V E G F 遺伝子それぞれの発現を阻害するための、d s R N A を含有する組成物の作製方法および使用方法、ならびに癌等のこれらの遺伝子の発現によって引き起こされる疾患および障害を処置するための、組成物および方法を開示する。本発明で取り上げられる医薬組成物は、薬剤として許容される担体と共に、3 0 ヌクレオチド長未満、一般に 1 9 ~ 2 4 ヌクレオチド長であり、E g 5 遺伝子の R N A 転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である、相補性の領域を含むアンチセンス鎖を有する d s R N A を含む。また、本発明で取り上げられる医薬組成物は、3 0 ヌクレオチド長未満、一般に 1 9 ~ 2 4 ヌクレオチド長であり、V E G F 遺伝子の R N A 転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である、相補性の領域を有するアンチセンス鎖を有する d s R N A も含む。

【 0 0 2 4 】

したがって、本発明の特定の態様は、E g 5 および V E G F d s R N A と薬剤として許容される担体とを含有する医薬組成物、E g 5 遺伝子および V E G F 遺伝子それぞれの発現を阻害するために該組成物を使用する方法、ならびに E g 5 および V E G F 遺伝子の発現によって引き起こされる疾患を処置するために該医薬組成物を使用する方法を提供する。

【 0 0 2 5 】

I . 定義

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用される、特定の用語および語句の意味を以下に提供する。本明細書の他の部分の用語の用法と、本項で提供されるその定義との間に明らかな相違がある場合、本項の定義が優先される。

【 0 0 2 6 】

「 G 」、「 C 」、「 A 」、および「 U 」のそれぞれは、一般に、塩基としてそれぞれグアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルを含有するヌクレオチドを表す。「 T 」および「 d T 」は、本明細書で交換可能に使用され、核酸塩基がチミン、例えば、デオキシリボチミン (d e o x y r i b o t h y m i n e) である、デオキシリボヌクレオチドを指す。しかしながら、「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語は、以下でさらに詳述する修飾ヌクレオチド、または代替の置換部分も指すことができることが理解されよう。当業者は、グアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルが、かかる置換

10

20

30

40

50

部分を担持するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対形成性を実質的に変化させることなく、他の部分によって置換可能であることを十分認識している。例えば、限定されないが、その塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシン、またはウラシルを含有するヌクレオチドと塩基対を形成することができる。したがって、ウラシル、グアニン、またはアデニンを含有するヌクレオチドは、本発明のヌクレオチド配列において、例えば、イノシンを含有するヌクレオチドと置換され得る。別の例では、オリゴヌクレオチドのいずれかの場所にあるアデニンおよびシトシンをそれぞれグアニンおよびウラシルと置換して、標的 mRNA と塩基対を形成する G - U ゆらぎを形成することができる。かかる置換部分を含む配列が、本発明の実施形態である。

【0027】

本明細書で使用される「Eg5」は、ヒトキネシンファミリーメンバー11を指し、これは、KIF11、Eg5、HKSP、KSP、KNSL1、またはTRIP5としても知られている。Eg5の配列は、NCBI GeneID:3832、HGNC ID:HGNC:6388、およびRefSeq ID番号:NM_004523として見出すことができる。「Eg5」および「KSP」、ならびに「Eg5/KSP」という用語は、交換可能に使用される。

【0028】

本明細書で使用される、VEGFは、血管透過性因子としても知られる、血管新生促進因子である。VEGFは、少なくとも3つの異なるアイソフォームで存在する、ホモ二量体型の45kDaの糖タンパク質である。VEGFのアイソフォームは、内皮細胞内に発現する。VEGF遺伝子は、189アミノ酸のタンパク質アイソフォームを発現する、8個のエクソンを含有する。165アミノ酸のアイソフォームは、エクソン6によってコードされる残基を欠き、一方121アミノ酸のアイソフォームは、エクソン6および7によってコードされる残基を欠く。VEGF145は、145個のアミノ酸を含有し、エクソン7を欠くと予測されるアイソフォームである。VEGFは、Flt-1(VEGFR-1)またはKDR/flk-1(VEGFR-2)等の、内皮のチロシンキナーゼ受容体に結合することによって、内皮細胞に作用することができる。VEGFR-2は、内皮細胞に発現し、内皮細胞の分化および脈管形成に関与する。3つ目の受容体、VEGFR-3は、リンパ球新生に関与するとされている。

【0029】

種々のアイソフォームは、異なる生物活性および臨床的意義を有する。例えば、VEGF145は、血管新生を誘発し、VEGF189と同様(しかしVEGF165とは異なり)、VEGF145は、細胞外マトリックスに関連する硫酸ヘパリンに依存しない機序によって、細胞外マトリックスに効率的に結合する。VEGFは、インビトロで内皮細胞分裂促進因子および化学誘引物質としての活性を提示し、インビボで血管透過性および血管新生を誘発する。VEGFは、多岐にわたる種類の癌細胞によって分泌され、腫瘍に関連する脈管構造の発生を誘発することにより、腫瘍の成長を促進する。VEGFの機能の阻害は、免疫不全モデルにおける、実験的な原発性腫瘍の成長ならびに転移の両方を制限することが示されている。VEGFを対象とする種々のdsRNAが、同時係属の米国出願第11/078,073号および第11/340,080号に記載され、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0030】

本明細書で使用される、「標的配列」は、一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAを含む、Eg5/KSPおよび/またはVEGF遺伝子の転写の間に形成される、mRNA分子のヌクレオチド配列の連続する部分を指す。

【0031】

本明細書で使用される、「配列を含む鎖」という用語は、標準的なヌクレオチド命名法を使用して言及される配列によって説明される、ヌクレオチド鎖を含む、オリゴヌクレオチドを指す。

【0032】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、別途記載のない限り、第2のヌクレオチド配列に関連して第1のヌクレオチド配列を説明するために使用される時の「相補的」は、当業者には理解されるように、特定の条件下で、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドとハイブリダイズして二重鎖構造を形成する、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの能力を指す。かかる条件は、例えば、ストリンジェントな条件であり得、ストリンジェントな条件には、400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA、12～16時間50℃もしくは70℃、その後の洗浄が含まれ得る。生物内で遭遇され得る、生理的に適切な条件等の他の条件を適用することができる。当業者は、ハイブリダイズされたヌクレオチドの最終的な用途に応じて、2つの配列の相補性の試験に最も適切な、一連の条件を決定することができる。

10

【0033】

これには、第1および第2のヌクレオチド配列の全長にわたる、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドに対する、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの塩基対形成が含まれる。かかる配列は、本明細書において、互いに対して「完全に相補的」と言及することができる。しかし、本明細書において、第1の配列が第2の配列に対して「実質的に相補的」とであると言及される場合、2つの配列は完全に相補的であり得るか、あるいはそれらの最終的な用途に最も適した条件下でハイブリダイズする能力を保持しながら、ハイブリダイズ時に、1個以上であるが、一般に4、3、または2個を超えないミスマッチ塩基対を形成してもよい。しかし、2つのオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイズ時に1つ以上の単鎖のオーバーハングを形成するように設計される場合、かかるオーバーハングは、相補性の決定に関してミスマッチとはみなされないものとする。例えば、21ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドと、23ヌクレオチド長の別のオリゴヌクレオチドとを含むdsRNAであって、より長いオリゴヌクレオチドが、より短いオリゴヌクレオチドに完全に相補的である21ヌクレオチドの配列を含むdsRNAは、本発明の目的上、やはり「完全に相補的」とであるとして言及され得る。

20

【0034】

また、本明細書で使用される、「相補的」な配列は、それらのハイブリダイズ能に関する上記の要件が満たされる限り、非ワトソンクリック塩基対、および/または非天然および修飾ヌクレオチドから形成される塩基対を含み得るか、または完全にそれらから形成され得る。かかる非ワトソンクリック塩基対には、G-Uゆらぎまたはフーグスティーン型塩基対が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0035】

本明細書における「相補的」、「完全に相補的」、および「実質的に相補的」という用語は、これらが使用される文脈から理解されるように、dsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との間、またはdsRNAのアンチセンス鎖と標的配列との間の塩基一致に対して使用され得る。

【0036】

本明細書で使用される、メッセンジャーRNA (mRNA)「の少なくとも一部に実質的に相補的」であるポリヌクレオチドは、5' UTR、オープンリーディングフレーム (ORF)、または3' UTRを含む、対象となるmRNA (例えば、Eg5/KSPおよび/またはVEGFをコードする)の連続する部分に実質的に相補的である、ポリヌクレオチドを指す。例えば、ポリヌクレオチドは、配列が、Eg5をコードするmRNAの中断されていない部分に実質的に相補的である場合、Eg5のmRNAの少なくとも一部に相補的である。

40

【0037】

本明細書で使用される、「二本鎖RNA」または「dsRNA」という用語は、逆平行で、上で定義されるように実質的に相補的である、2本の核酸鎖を含む二重鎖構造を指す。二重鎖構造を形成する2本の鎖は、より長い1つのRNA分子の異なる部分であっても

50

よく、あるいはそれらは別個のRNA分子であってもよい。2本の鎖がより長い1つの分子の一部であり、したがって二重鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'末端との間の中断されていないヌクレオチド鎖によって接続される場合、接続するRNA鎖は、「ヘアピンループ」と称される。2本の鎖が、二重鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'末端との間の、中断されていないヌクレオチド鎖以外の手段によって共有結合的に接続される場合、該接続構造は、「リンカー」と称される。該RNA鎖は、同一または異なる数のヌクレオチドを有し得る。塩基対の最大数は、二重鎖内に存在するいずれかのオーバーハングを差し引いた、dsRNAの最も短い鎖内のヌクレオチド数である。二重鎖構造に加えて、dsRNAは、1つ以上のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。一般に、各鎖のヌクレオチドの大半はリボヌクレオチドであるが、本明細書で詳細に説明されるように、それぞれもしくは両方の鎖は、少なくとも1個の非リボヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチドおよび/または修飾ヌクレオチドも含み得る。加えて、本明細書で使用される「dsRNA」は、複数のヌクレオチドでの実質的な修飾を含み、本明細書で開示されるか、または当該技術分野において既知であるあらゆる種類の修飾を含む、リボヌクレオチドへの化学修飾を含むことができる。siRNA型分子内で使用される、このようないずれの修飾も、本明細書および特許請求の範囲の目的上、「dsRNA」によって包含される。

10

【0038】

本明細書で使用される、「ヌクレオチドオーバーハング」とは、不對ヌクレオチド、またはdsRNAの1本の鎖の3'末端がもう一方の鎖の5'末端を越えて延びるか、またはその逆である時に、dsRNAの二重鎖構造から突出するヌクレオチドを指す。「平滑」または「平滑末端」は、dsRNAのその末端に不對ヌクレオチドがない、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングがないことを意味する。「平滑末端の」dsRNAは、その長さ全体にわたって二本鎖であるdsRNAであり、すなわち、該分子のいずれの末端にもヌクレオチドオーバーハングがない。幾つかの実施形態において、該dsRNAは、二重鎖の一端にヌクレオチドオーバーハングを、そしてもう一端に平滑末端を有することができる。

20

【0039】

「アンチセンス鎖」という用語は、標的配列に実質的に相補的である領域を含む、dsRNAの鎖を指す。本明細書で使用される、「相補性の領域」という用語は、配列、例えば本明細書において定義される標的配列に実質的に相補的である、アンチセンス鎖の領域を指す。相補性の領域が標的配列に完全に相補的ではない場合、該ミスマッチは、該分子の内部または末端領域内にあり得る。一般に、最も許容されるミスマッチは、終端領域内、例えば、5'および/または3'終端の6、5、4、3、もしくは2ヌクレオチド内にある。

30

【0040】

本明細書で使用される、「センス鎖」という用語は、アンチセンス鎖の領域に実質的に相補的である領域を含む、dsRNAの鎖を指す。

【0041】

本明細書で使用される、「SNALP」という用語は、安定な核酸脂質粒子を指す。SNALPは、iRNA剤、またはiRNA剤が転写されるプラスミド等の核酸を含む、少量の水性内部をコーティングする、脂質の小胞を表す。

40

【0042】

dsRNAについて言及する際、「細胞への導入」とは、当業者には理解されるように、細胞への取り込みまたは吸収を促進することを意味する。dsRNAの吸収または取り込みは、支援を伴わない拡散過程もしくは細胞の能動的過程を通じて、または補助的な薬剤もしくは装置によって発生し得る。この用語の意味は、インビトロでの細胞に限定されず、dsRNAは、生命体の一部である「細胞に導入」することもできる。そのような場合、細胞への導入は、該生物への送達を含む。例えば、インビボ送達については、dsRNAを組織部位に注射するか、または全身投与することができる。細胞へのインビトロで

50

の導入には、電気穿孔法およびリポフェクション法等の当該技術分野において既知の方法が含まれる。

【0043】

「発現停止させる」、「～の発現を阻害する」、「～の発現を下方制御する」、および「～の発現を抑制する」等の用語は、それらが E g 5 および / または V E G F 遺伝子について言及する限り、本明細書において、第 1 の細胞もしくは細胞群と実質的に同一であるが、そのように処置されていない第 2 の細胞もしくは細胞群（対照細胞）と比較して、E g 5 および / または V E G F 遺伝子が転写され、E g 5 および / または V E G F 遺伝子の発現が阻害されるように処置された第 1 の細胞もしくは細胞群から単離され得る、E g 5 の m R N A および / または V E G F の m R N A の量の低下によって明らかになる、E g 5 遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制を指す。阻害の程度は、通常、以下で表される。

10

【数 1】

$$\frac{(\text{対照細胞内の m R N A}) - (\text{処理細胞内の m R N A})}{(\text{対照細胞内の m R N A})} \bullet 100\%$$

【0044】

代替として、阻害の程度は、E g 5 および / または V E G F 遺伝子の発現に機能的に結び付けられるパラメータ、例えば細胞によって産生される E g 5 および / もしくは V E G F 遺伝子によってコードされるタンパク質の量、または特定の表現型、例えばアポトーシスを提示する細胞の数の低下に関して出されてもよい。原則的に、標的遺伝子の発現停止は、構成的に、またはゲノム工学によってのいずれか、ならびに任意の適切なアッセイによって、該標的を発現する任意の細胞において決定することができる。しかし、ある d s R N A が特定の程度、E g 5 遺伝子の発現を阻害し、したがって本発明に包含されるかどうかを決定するために参照が必要とされる場合、以下の実施例で提供されるアッセイが、かかる参照の役割を果たす。

20

【0045】

例えば、特定の場合において、E g 5 遺伝子（または V E G F 遺伝子）の発現は、本発明の 2 本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって、少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、または 50 % 抑制される。幾つかの実施形態において、E g 5 および / または V E G F 遺伝子は、本発明の 2 本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって、少なくとも約 60 %、70 %、または 80 % 抑制される。他の実施形態において、E g 5 および / または V E G F 遺伝子は、本発明の 2 本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって、少なくとも約 85 %、90 %、または 95 % 抑制される。以下の表および実施例は、種々の E g 5 および / または V E G F d s R N A 分子を種々の濃度で使用した、発現の阻害についての値を提供する。

30

【0046】

E g 5 の発現（または V E G F の発現）の文脈において本明細書で使用される、「処置する」、「処置」等の用語は、E g 5 および / または V E G F の発現によって媒介される病理過程の軽減または緩和を指す。本発明の文脈において、本明細書で以下に列挙される他の病態のうちのいずれかに関連する限り（E g 5 および / または V E G F の発現によって媒介される病理過程以外）、「処置する」、「処置」等の用語は、かかる病態に関連する少なくとも 1 つの症状の軽減もしくは緩和、または肝細胞癌の進行の遅延等の、かかる病態の進行の遅延もしくは逆行を意味する。

40

【0047】

本明細書で使用される、「治療上有効な量」および「予防上有効な量」という句は、E g 5 および / もしくは V E G F の発現によって媒介される病理過程の処置、阻止、もしくは管理、または E g 5 および / もしくは V E G F の発現によって媒介される病理過程の明確な症状において、治療的有用性を提供する量を指す。治療上有効である具体的な量は、普通の開業医が容易に決定することができ、例えば、E g 5 および / または V E G F の発現によって媒介される病理過程の種類、患者の病歴および年齢、E g 5 および / または

50

V E G F の発現によって媒介される病理過程のステージ、ならびに他の E g 5 および / または V E G F の発現によって媒介される病理過程に抗する薬剤の投与等の、当該技術分野において既知の因子に依存して異なり得る。

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用される、「医薬組成物」は、薬理学上有効な量の d s R N A と、薬剤として許容される担体とを含む。本明細書で使用される、「薬理学上有効な量」、「治療上有効な量」、または単に「有効量」は、目的とする薬理学的、治療的、または阻止的結果を産生するのに効果的な R N A の量を指す。例えば、ある臨床的処置が、疾患または障害に関連する測定可能なパラメータにおいて、少なくとも 2 5 % の低下がある時に有効であると見なされる場合、該疾患または障害を処置するための薬物の治療上有効な量は、該パラメータにおける少なくとも 2 5 % の低下をもたらすために必要な量である。

10

【 0 0 4 9 】

「薬剤として許容される担体」という用語は、治療薬を投与するための担体を指す。以下でより詳細に記載されるように、かかる担体には、食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。該用語は、特に細胞培養基を除く。経口投与される薬物について、薬剤として許容される担体には、不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、甘味剤、香味剤、着色剤、および防腐剤等の薬剤として許容される賦形剤が含まれるが、これらに限定されない。好適な不活性希釈剤には、炭酸ナトリウムおよびカルシウム、リン酸ナトリウムおよびカルシウム、ならびにラクトースが含まれ、コーンスターチおよびアルギン酸が好適な崩壊剤である。結合剤にはデンプンおよびゼラチンを含むことができ、一方潤滑剤が存在する場合は、概してステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクであろう。所望の場合、錠剤をモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル等の材料でコーティングして、消化管内での吸収を遅らせることができる。

20

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される、「形質転換細胞」は、ベクターが導入されて、そこから d s R N A 分子を発現することができる細胞である。

【 0 0 5 1 】

I I . 二本鎖リボ核酸 (d s R N A)

以下でより詳細に記載されるように、本発明は、細胞または哺乳動物内の E g 5 および / または V E G F 遺伝子の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 分子を提供し、該 d s R N A は、E g 5 および / または V E G F 遺伝子の発現において形成される m R N A の少なくとも一部に相補的である相補性の領域を含む、アンチセンス鎖を含み、該相補性の領域は、3 0 ヌクレオチド長未満、一般に 1 9 ~ 2 4 ヌクレオチド長であり、前記 d s R N A は、前記 E g 5 および / または V E G F 遺伝子を発現する細胞と接触すると、前記 E g 5 および / または V E G F 遺伝子の発現を阻害する。

30

【 0 0 5 2 】

該 d s R N A は、以下でさらに説明されるように、当該技術分野において既知の標準的な方法、例として、例えば、Bio search , Applied Biosystems , Inc . から市販されるもの等の自動 D N A 合成装置の使用によって、合成することができる。

40

【 0 0 5 3 】

該 d s R N A は、ハイブリダイズして二重鎖構造を形成するのに十分相補的である、2本の鎖を含む。該 d s R N A の 1 本の鎖 (アンチセンス鎖) は、E g 5 および / または V E G F 遺伝子の発現の間に形成された m R N A の配列から派生した標的配列に実質的に相補的であり、概して完全に相補的である、相補性の領域を含み、もう一方の鎖 (センス鎖) は、アンチセンス鎖に相補的である領域を含み、その結果、2本の鎖は、好適な条件下で組み合わせられると、ハイブリダイズして二重鎖構造を形成する。一般に、二重鎖構造は、1 5 ~ 3 0 塩基対長であり、より一般には 1 8 ~ 2 5 、さらに一般には 1 9 ~ 2 4 、そして最も一般には 1 9 ~ 2 1 塩基対長である。他の実施形態において、二重鎖構造は 2 5

50

～ 30 塩基対長である。

【0054】

一実施形態において、二重鎖は19塩基対長である。別の実施形態において、二重鎖は21塩基対長である。2本の異なる*s i R N A*を組み合わせる場合、二重鎖の長さは同一であってもよく、または異なってもよい。例えば、組成物は、19塩基対の長さの二重鎖を有する*E g 5*を標的とする第1の*d s R N A*と、21塩基対の長さの二重鎖を有する*V E G F*を標的とする第2の*d s R N A*とを含むことができる。

【0055】

同様に、標的配列に相補性の領域は、15～30ヌクレオチド長であり、より一般には18～25、さらに一般には19～24、そして最も一般には19～21ヌクレオチド長である。他の実施形態において、相補性の領域は25～30ヌクレオチド長である。

【0056】

一実施形態において、相補性の領域は19ヌクレオチド長である。別の実施形態において、相補性の領域は21ヌクレオチド長である。2本の異なる*s i R N A*を組み合わせる場合、相補性の領域は同一であってもよく、または異なってもよい。例えば、組成物は、19個のヌクレオチドの相補性の領域を有する*E g 5*を標的とする第1の*d s R N A*と、21個のヌクレオチドの相補性の領域を有する*V E G F*を標的とする第2の*d s R N A*とを含むことができる。

【0057】

本発明の*d s R N A*のそれぞれの鎖は、一般には15～30、もしくは18～25、または18、19、20、21、22、23、もしくは24ヌクレオチド長である。他の実施形態において、それぞれの鎖は25～30塩基対長である。二重鎖のそれぞれの鎖は、同一長さであってもよく、または異なる長さであってもよい。2本の異なる*s i R N A*を組み合わせる場合、各*s i R N A*のそれぞれの鎖の長さは、同一であってもよく、または異なってもよい。例えば、組成物は、21個のヌクレオチドのセンス鎖および21個のヌクレオチドのアンチセンス鎖を有する、*E g 5*を標的とする*d s R N A*と、21個のヌクレオチドのセンス鎖および23個のヌクレオチドのアンチセンス鎖を有する、*V E G F*を標的とする第2の*d s R N A*とを含むことができる。

【0058】

本発明の*d s R N A*は、1個以上のヌクレオチドの1つ以上の単鎖のオーバーハングを含むことができる。一実施形態において、該*d s R N A*の少なくとも一端は、1～4、一般には1または2個のヌクレオチドの、単鎖のヌクレオチドオーバーハングを有する。別の実施形態において、該*d s R N A*のアンチセンス鎖は、センス鎖の3'末端および5'末端のそれぞれに、1～10個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。さらなる実施形態において、該*d s R N A*のセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端および5'末端のそれぞれに、1～10個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。

【0059】

少なくとも1つのヌクレオチドオーバーハングを有する*d s R N A*は、平滑末端の対応物より予想外に優れた阻害特性を有し得る。幾つかの実施形態において、1つのみのヌクレオチドオーバーハングの存在により、その全体的な安定性に影響を及ぼすことなく、*d s R N A*の干渉活性が強化される。1つのみのオーバーハングを有する*d s R N A*は、インビボ、ならびに種々の細胞、細胞培養基、血液、および血清内で特に安定および効果的であることが判明している。一般に、単鎖のオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端、または代替として、センス鎖の3'末端に位置する。該*d s R N A*は、一般にアンチセンス鎖の5'末端に位置する、平滑末端も有し得る。かかる*d s R N A*は改善された安定性および阻害活性を有し得、したがって、低投薬量、すなわち、1日当たり受容者の体重1kgにつき5mg未満の投与を可能にする。一般に、該*d s R N A*のアンチセンス鎖は、3'末端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5'末端は平滑である。別の実施形態において、オーバーハング内のヌクレオチドのうちの1つ以上が、ヌクレオシドチオリン酸と置換される。

10

20

30

40

50

【0060】

本明細書でより詳細に記載されるように、本発明の組成物は、Eg5を標的とする第1のdsRNAと、VEGFを標的とする第2のdsRNAとを含む。第1および第2のdsRNAは、同一のオーバーハング構造（例えば、それぞれの鎖のヌクレオチドオーバーハングの数等）を有してもよく、またはそれぞれのdsRNAが異なる構造を有してもよい。一実施形態において、Eg5を標的とする第1のdsRNAは、それぞれの鎖の3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングを含み、VEGFを標的とする第2のdsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングと、アンチセンス鎖の5'末端（例えば、センス鎖の3'末端）に平滑末端とを含む。

【0061】

一実施形態において、本発明のdsRNAによって標的とされるEg5遺伝子は、ヒトEg5遺伝子である。一実施形態において、Eg5を標的とするdsRNAのアンチセンス鎖は、表1～3のアンチセンス配列のうちの1つの、少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む。具体的な実施形態では、該dsRNAの第1の配列は、表1～3のセンス鎖のうちの1つから選択され、第2の配列は、表1～3のアンチセンス配列からなる群から選択される。表1～3に提供される標的配列のいずれかの箇所を標的とする代替のアンチセンス剤を、標的配列および隣接するEg5配列を使用して、容易に決定することができる。幾つかの実施形態において、Eg5を標的とするdsRNAは、表1～3に提供される配列群から選択される、少なくとも2つのヌクレオチド配列を含む。2つの配列のうちの1つは、2つの配列のうちのもう一方に相補的であり、該配列のうちの1つは、Eg5遺伝子の発現において生成されるmRNAの配列に実質的に相補的である。したがって、該dsRNAは2個のオリゴヌクレオチドを含み、1個のオリゴヌクレオチドは、表1～3にセンス鎖として記載され、第2のオリゴヌクレオチドは、表1～3にアンチセンス鎖として記載される。

【0062】

VEGFを標的とする第2のdsRNAを使用する実施形態では、かかる薬剤は、実施例、表4aおよび4b、ならびに同時係属の米国出願第11/078,073号および第11/340,080号で例証され、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、VEGFを標的とするdsRNAは、表4aに記載されるVEGF標的配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドに相補的な、アンチセンス鎖を有する。他の実施形態において、VEGFを標的とするdsRNAは、表4bのアンチセンス配列のうちの1つ、または表4bのセンス配列のうちの1つを含むか、あるいは表4bの二重鎖（センス鎖およびアンチセンス鎖）のうちの1つを含む。

【0063】

当業者は、20～23、しかし具体的には21個の塩基対の二重鎖構造を含むdsRNAが、RNA干渉の誘発に特に効果的であるとして称賛を得ていることをよく認識している（Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888）。しかし、他の者は、より短いもしくはより長いdsRNAが、同様に効果的であり得ることを見出している。上記の実施形態では、表1～3に提供されるオリゴヌクレオチド配列の性質のために、本発明のdsRNAは、最低21ヌクレオチド長の少なくとも1本の鎖を含むことができる。一端または両端のわずかな数のヌクレオチドを差し引いた、表1～3の配列のうちの1つを含むより短いdsRNAが、上記のdsRNAと比較して、同様に効果的であり得ることは、妥当に予想され得る。したがって、表1～3の配列のうちの1つからの、少なくとも15、16、17、18、19、20個以上の連続するヌクレオチドの部分的配列を含み、本明細書で以下に記載されるFACSアッセイにおいて、Eg5遺伝子の発現を阻害するそれらの能力が、完全な配列を含むdsRNAと阻害の5、10、15、20、25、もしくは30%以下異なるdsRNAが、本発明によって企図される。表1～3に提供される標的配列内で切断するさらなるdsRNAを、Eg5配列および提供される標的配列を用いて容易に作製することができる。VEGFを標的とするさらなるdsRNAを、表4aおよび4b、実施例、ならびに同時係属の米国出願第1

10

20

30

40

50

1 / 0 7 8 , 0 7 3 号および第 1 1 / 3 4 0 , 0 8 0 号で開示される配列を使用して同様の材料中に設計することができ、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 4 】

加えて、表 1 ~ 3 に提供される R N A i 剤は、R N A i に基づく切断の影響を受けやすい、E g 5 の m R N A 内の部位を特定する。したがって、本発明は、本発明の薬剤のうちの 1 つによって標的とされる配列内を標的とする R N A i 剤、例えば、d s R N A をさらに含む。本明細書で使用される、第 2 の R N A i 剤は、第 2 の R N A i 剤が、第 1 の R N A i 剤のアンチセンス鎖に相補的である m R N A 内のいずれかの箇所でメッセージを切断する場合、第 1 の R N A i 剤の配列内を標的とすると言われる。かかる第 2 の薬剤は、一般に、E g 5 遺伝子内の選択した配列に隣接する領域から取られたさらなるヌクレオチド配列に連結される、表 1 ~ 3 に提供される配列のうちの 1 つからの少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドからなる。例えば、配列番号 1 の最後の 1 5 ヌクレオチドは、標的 E g 5 遺伝子から次の 6 ヌクレオチドと組み合わせて、表 1 ~ 3 に提供される配列のうちの 1 つに基づく 2 1 ヌクレオチドの単鎖薬剤を産生する。V E G F を標的とするさらなる R N A i 剤、例えば、d s R N A を、表 4 a および 4 b、実施例、ならびに同時係属の米国出願第 1 1 / 0 7 8 , 0 7 3 号および第 1 1 / 3 4 0 , 0 8 0 号で開示される配列を使用して同様の材料中に設計することができ、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【 0 0 6 5 】

本発明の d s R N A は、標的配列との 1 つ以上のミスマッチを含有してもよい。好ましい実施形態において、本発明の d s R N A は、3 つ以下のミスマッチを含有する。d s R N A のアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチの範囲が、相補性の領域の中心に位置しないことが好ましい。該 d s R N A のアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチは、いずれかの末端から 5 ヌクレオチド、例えば、相補性の領域の 5 ' もしくは 3 ' 末端のいずれかから 5、4、3、2、もしくは 1 ヌクレオチドに制限されることが好ましい。例えば、E g 5 遺伝子の領域に相補的である 2 3 ヌクレオチドの d s R N A 鎖について、該 d s R N A は、一般には、中央の 1 3 個のヌクレオチド内にはいずれのミスマッチも含有しない。本発明内で記載される方法を使用して、標的配列とのミスマッチを含有する d s R N A が、E g 5 遺伝子の発現の阻害に効果的であるかどうかを判定することができる。E g 5 遺伝子の発現の阻害における、ミスマッチを有する d s R N A の有効性を考慮することは、特に E g 5 遺伝子内の特定の相補性の領域が、集団内に多型の配列多様性を有することが既知である場合、重要である。

20

30

【 0 0 6 6 】

修飾

また別の実施形態において、該 d s R N A は、安定性を亢進させるために化学修飾される。本発明の核酸は、“ C u r r e n t p r o t o c o l s i n n u c l e i c a c i d c h e m i s t r y ” , B e a u c a g e , S . L . e t a l . (E d r s .) , J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , N e w Y o r k , N Y , U S A に記載されるもの等の、当該技術分野において十分確立された方法によって、合成および/または修飾することができ、該文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明において有用である好ましい d s R N A 化合物の具体例には、修飾された骨格、または非天然のヌクレオシド間結合を含有する d s R N A が含まれる。本明細書で定義されるように、修飾された骨格を有する d s R N A には、該骨格にリン原子を保持するもの、および該骨格にリン原子を有しないものが含まれる。本明細書の目的上、また当該技術分野において時折言及されるように、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を有しない修飾された d s R N A も、オリゴヌクレオシドであると見なすことができる。

40

【 0 0 6 7 】

好ましい修飾された d s R N A 骨格には、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリ

50

エステル、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびに正常な3'-5'結合を有するボラノホスフェート、2'-5'結合したこれらの類似体、そしてヌクレオシド単位の隣接する対が3'-5'から5'-3'へ、または2'-5'から5'-2'へ結合する、逆向きの極性を有するものが含まれる。また、種々の塩、混合塩、および遊離酸形態も含まれる。

【0068】

上記のリン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第3,687,808号、第4,469,863号、第4,476,301号、第5,023,243号、第5,177,195号、第5,188,897号、第5,264,423号、第5,276,019号、第5,278,302号、第5,286,717号、第5,321,131号、第5,399,676号、第5,405,939号、第5,453,496号、第5,455,233号、第5,466,677号、第5,476,925号、第5,519,126号、第5,536,821号、第5,541,316号、第5,550,111号、第5,563,253号、第5,571,799号、第5,587,361号、および第5,625,050号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0069】

その中にリン原子を含まない、好ましい修飾されたdsRNA骨格は、単鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合されたヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1個以上の単鎖ヘテロ原子もしくは複素環式ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合(ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成された)、シロキサ骨格、硫化物、スルホキシド、およびスルホン骨格、ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファミン酸骨格、メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格、スルホネートおよびスルホンアミド骨格、アミド骨格、ならびにN、O、S、およびCH₂を混合した構成成分を有する他のもの、を有するものが含まれる。

20

30

【0070】

上記オリゴヌクレオシドの調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第5,034,506号、第5,166,315号、第5,185,444号、第5,214,134号、第5,216,141号、第5,235,033号、第5,64,562号、第5,264,564号、第5,405,938号、第5,434,257号、第5,466,677号、第5,470,967号、第5,489,677号、第5,541,307号、第5,561,225号、第5,596,086号、第5,602,240号、第5,608,046号、第5,610,289号、第5,618,704号、第5,623,070号、第5,663,312号、第5,633,360号、第5,677,437号、および第5,677,439号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0071】

他の好ましいdsRNA模倣体において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合の両方、すなわち、骨格が、新規の基で置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とハイブリダイズするために維持される。優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているそのようなオリゴマー化合物の1つであるdsRNA模倣体は、ペプチド核酸(PNA)と称される。PNA化合物では、dsRNAの糖骨格が、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格で置換される。核酸塩基は保持され、該骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に結合される。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第5,539,082号、第5,714,331号、

50

および第 5, 719, 262 号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。PNA 化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。

【0072】

本発明の最も好ましい実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有する dsRNA、およびヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオシドであり、特に上述の米国特許第 5, 489, 677 号の $-CH_2-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ [メチレン(メチルイミノ)または MMI 骨格として知られる]、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 、および $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ [式中、天然のホスホジエステル骨格は、 $-O-P-O-CH_2-$ として表される]、および上述の米国特許第 5, 602, 240 号のアミド骨格である。また、上述の米国特許第 5, 034, 506 号のモルホリノ骨格構造を有する dsRNA も好ましい。

【0073】

また、修飾された dsRNA は、1 つ以上の置換糖部分も含有することができる。好ましい dsRNA は、2' 位に、OH; F; O-、S-、もしくは N-アルキル; O-、S-、もしくは N-アルケニル; O-、S-、もしくは N-アルキニル; または O-アルキル-O-アルキルのうちの 1 つを含み、ここで、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{10}$ アルキルまたは $C_2 \sim C_{10}$ アルケニルおよびアルキニルであり得る。 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、および $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ が特に好ましく、式中、n および m は 1 ~ 約 10 である。他の好ましい dsRNA は、2' 位に、 $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラキル、O-アルカリル、もしくは O-アラキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA 切断基、レポーター基、介入物、dsRNA の薬物動態特性を改善するための基、または dsRNA の薬力学的特性を改善するための基、ならびに類似した特性を有する他の置換基のうちの 1 つを含む。好ましい修飾には、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃ であって、2'-O-(2-メトキシエチル)または 2'-MOE としても知られる)(Martinet al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504)すなわち、アルコキシ-アルコキシ基が含まれる。好ましいさらなる修飾には、本明細書において以下の実施例に記載される、2'-DMAOE としても知られる、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、ならびに、同様に、本明細書において以下の実施例に記載される、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該技術分野で 2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルもしくは 2'-DMAEOE としても知られる)、すなわち、 $-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2)_2$ が含まれる。

【0074】

他の好ましい修飾には、2'-メトキシ(2'-OCH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、および 2'-フルオロ(2'-F)が含まれる。同様の修飾を、dsRNA の他の位置、特に 3' 末端ヌクレオチドもしくは 2'-5' 結合 dsRNA 内の糖の 3' 位、および 5' 末端ヌクレオチドの 5' 位で作製することもできる。また、dsRNA は、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分等の糖模倣体を有してもよい。かかる修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第 4, 981, 957 号、第 5, 118, 800 号、第 5, 319, 080 号、第 5, 359, 044 号、第 5, 393, 878 号、第 5, 446, 137 号、第 5, 466, 786 号、第 5, 514, 785 号、第 5, 519, 134 号、第 5, 567, 811

10

20

30

40

50

号、第5,576,427号、第5,591,722号、第5,597,909号、第5,610,300号、第5,627,053号、第5,639,873号、第5,646,265号、第5,658,873号、第5,670,633号、および第5,700,920号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許のうちのあるものは本出願によって共同所有され、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【0075】

また、dsRNAは、核酸塩基（当該技術分野ではしばしば単に「塩基」と称される）修飾または置換を含み得る。本明細書で使用される、「非修飾」もしくは「天然」の核酸塩基には、プリン塩基、アデニン（A）およびグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基、チミン（T）、シトシン（C）、およびウラシル（U）が含まれる。修飾された核酸塩基には、5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾのウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル（シュドウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニン等の、他の合成および天然の核酸塩基が含まれる。さらなる核酸塩基には、米国特許第3,687,808号で開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990で開示されるもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613で開示されるもの、および Sanghvi, Y. S., Chapter 15, DsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993で開示されるものが含まれる。これらの核酸塩基のうちの特定のものは、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を高めるために、特に有用である。これらには、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、および5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6、およびO-6置換プリンが含まれる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6~1.2度C増加させることが示されていて（Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., DsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）、現在好ましい塩基置換であり、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせられると、さらに特に好ましい。

【0076】

上記の修飾された核酸塩基の特定のものの、ならびに他の修飾された核酸塩基の調製を教示する代表的な米国特許には、上記の米国特許第3,687,808号、ならびに米国特許第4,845,205号、第5,130,30号、第5,134,066号、第5,175,273号、第5,367,066号、第5,432,272号、第5,457,187号、第5,459,255号、第5,484,908号、第5,502,177号、第5,525,711号、第5,552,540号、第5,587,469号、第5,594,121号、第5,596,091号、第5,614,617号、および第5,681,941号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれ、米国特許第5,750,692号も、参照により本明細書に組み込ま

10

20

30

40

50

れる。

【0077】

共役体

本発明の dsRNA の別の修飾は、該 dsRNA の活性、細胞分布、または細胞取り込みを亢進させる、1つ以上の部分または共役体の該 dsRNA への化学的結合を伴う。かかる部分には、コレステロール部分 (Lettinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199, 86, 6553 - 6556)、コール酸 (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053 - 1060)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306 - 309、Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765 - 2770)、チオコレステロール (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533 - 538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10, 1111 - 1118、Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327 - 330、Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49 - 54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-Hホスホネート (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651 - 3654、Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777 - 3783)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969 - 973)、またはアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651 - 3654)、パルミチル部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229 - 237)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923 - 937) 等の脂質部分が含まれるが、これらに限定されない。

【0078】

かかる dsRNA 共役体の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第 4,828,979 号、第 4,948,882 号、第 5,218,105 号、第 5,525,465 号、第 5,541,313 号、第 5,545,730 号、第 5,552,538 号、第 5,578,717 号、第 5,580,731 号、第 5,591,584 号、第 5,109,124 号、第 5,118,802 号、第 5,138,045 号、第 5,414,077 号、第 5,486,603 号、第 5,512,439 号、第 5,578,718 号、第 5,608,046 号、第 4,587,044 号、第 4,605,735 号、第 4,667,025 号、第 4,762,779 号、第 4,789,737 号、第 4,824,941 号、第 4,835,263 号、第 4,876,335 号、第 4,904,582 号、第 4,958,013 号、第 5,082,830 号、第 5,112,963 号、第 5,214,136 号、第 5,082,830 号、第 5,112,963 号、第 5,214,136 号、第 5,245,022 号、第 5,254,469 号、第 5,258,506 号、第 5,262,536 号、第 5,272,250 号、第 5,292,873 号、第 5,317,098 号、第 5,371,241 号、第 5,391,723 号、第 5,416,203 号、第 5,451,463 号、第 5,510,475 号、第 5,512,667 号、第 5,514,785 号、第 5,565,552 号、第 5,567,810 号、第 5,574,142 号、第 5,585,481 号、第 5,587,371 号、第 5,595,726 号、第 5,597,696 号、第 5,599,923 号、第 5,599,928 号、および第 5,688,941 号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、

参照により本明細書に組み込まれる。

【0079】

ある化合物の全ての位置が均一に修飾されている必要はなく、実際、前述の修飾のうちの1つ以上を単一化合物に、あるいはさらにはdsRNA内の単一ヌクレオシドに組み込むことができる。また、本発明は、キメラ化合物であるdsRNA化合物も含む。本発明の文脈において、「キメラ(chimeric)」dsRNA化合物または「キメラ(chimera)」は、dsRNA化合物であり、特に2つ以上の化学的にはっきりと異なる領域を含有し、それぞれ、少なくとも1つのモノマー単位、すなわち、dsRNA化合物の場合のヌクレオチドから作製される、dsRNAである。これらのdsRNAは、典型的には少なくとも1つの領域を含有し、該dsRNAは、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、細胞取り込みの増加、および/または標的核酸に対する結合親和性の増加を該dsRNAに付与するように、修飾される。dsRNAのさらなる領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断することができる酵素に対する基質としての役割を果たすことができる。一例として、RNAアーゼHは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。RNAアーゼHの活性化は、したがって、RNA標的の切断をもたらし、それにより遺伝子発現のdsRNA阻害の効率を大きく亢進させる。それ故、キメラdsRNAが使用される場合、同一標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシdsRNAと比較して、しばしばより短いdsRNAによって匹敵する結果を得ることができる。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、および必要であれば、当該技術分野において既知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技法によって、日常的に検出することができる。

10

20

【0080】

特定の場合において、該dsRNAは、非リガンド基によって修飾されてもよい。多くの非リガンド分子が、dsRNAの活性、細胞分布、または細胞取り込みを亢進させるためにdsRNAに共役されており、かかる共役を行うための手順は、科学文献で入手可能である。かかる非リガンド部分には、コレステロール(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553)、コール酸(Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール(Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306、Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765)、チオコレステロール(Oberhaus et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基(Saison-Behmoraras et al., EMBO J., 1991, 10:111、Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327、Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651、Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖(Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969)、またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651)、パルミチル部分(Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分(Croke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923)等の脂質部分が含まれている。かかるdsRNA共役体の調製を教示する代表的な米国特許は、上記に列記されている。典型的な共役プロトコルは、配列の1つ以上

30

40

50

の位置にアミノリンカーを有する d s R N A の合成を伴う。次いで、アミノ基を、適切なカップリングもしくは活性化試薬を使用して、共役される分子と反応させる。共役反応は、依然として固体支持体に結合された d s R N A を用いて、または溶液相中での d s R N A の切断後のいずれかに実行することができる。典型的には、H P L C によって d s R N A 共役体を精製して、純粋な共役体を得られる。

【0081】

一部の場合では、リガンドが多機能性であり得、および/または d s R N A を1つを超えるリガンドに共役することができる。例えば、d s R N A を、取り込みを改善するために1つのリガンドへ、そして遊離を改善するために第2のリガンドへ共役することができる。

10

【0082】

ベクターによりコードされた R N A i 剤

本発明の別の態様では、E g 5 および V E G F に特異的な d s R N A 分子が、D N A もしくは R N A ベクターに挿入された転写単位から発現される(例えば、C o u t u r e , A , e t a l . , T I G (1 9 9 6) , 1 2 : 5 - 1 0 , S k i l l e r n , A らの国際 P C T 公開 W O 第 0 0 / 2 2 1 1 3 号、C o n r a d の国際 P C T 公開 W O 第 0 0 / 2 2 1 1 4 号、および C o n r a d の米国特許第 6 , 0 5 4 , 2 9 9 号を参照されたい)。これらの導入遺伝子は、線状構築物、環状プラスミド、またはウイルスベクターとして導入することができ、宿主ゲノムに統合される導入遺伝子として導入されて、受け継がれる。また、導入遺伝子は、染色体外プラスミドとして受け継がれるのを可能にするように、構築することもできる(G a s s m a n n , e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (1 9 9 5) 9 2 : 1 2 9 2) 。

20

【0083】

d s R N A の個々の鎖を、2つの個別の発現ベクター上のプロモーターを用いて転写し、標的細胞に同時形質移入することができる。あるいは、d s R N A のそれぞれ個々の鎖を、いずれも同一発現プラスミド上に位置するプロモーターを用いて転写してもよい。好ましい実施形態において、d s R N A は、d s R N A がステムアンドループ構造を有するように、リンカーポリヌクレオチド配列によって接合される逆方向反復として発現される。

【0084】

組換え d s R N A 発現ベクターは、一般に、D N A プラスミドまたはウイルスベクターである。d s R N A を発現するウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(概説として、M u z y c z k a , e t a l . , C u r r . T o p i c s M i c r o . I m m u n o l . (1 9 9 2) 1 5 8 : 9 7 - 1 2 9 を参照)、アデノウイルス(例えば、B e r k n e r , e t a l . , B i o T e c h n i q u e s (1 9 9 8) 6 : 6 1 6)、R o s e n f e l d e t a l . (1 9 9 1 , S c i e n c e 2 5 2 : 4 3 1 - 4 3 4)、および R o s e n f e l d e t a l . (1 9 9 2)、C e l l 6 8 : 1 4 3 - 1 5 5 を参照))、またはアルファウイルス、ならびに当該技術分野において既知の他のものに基づいて構築することができるが、これらに限定されない。種々の遺伝子を、上皮細胞を含む多くの異なる細胞型にインビトロおよび/またはインビボで導入するために、レトロウイルスが使用されている(例えば、E g l i t i s , e t a l . , S c i e n c e (1 9 8 5) 2 3 0 : 1 3 9 5 - 1 3 9 8、D a n o s a n d M u l l i g a n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (1 9 9 8) 8 5 : 6 4 6 0 - 6 4 6 4、W i l s o n e t a l . , 1 9 8 8 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 3 0 1 4 - 3 0 1 8、A r m e n t a n o e t a l . , 1 9 9 0 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 7 : 6 1 4 1 6 1 4 5、H u b e r e t a l . , 1 9 9 1 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 8 0 3 9 - 8 0 4 3、F e r r y e t a l . , 1 9 9 1 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 8 3 7 7 - 8 3 8 1、C h o w d h u r y e t a l . , 1 9 9 1 , S c i e n c e 2 5 4 : 1 8 0 2 - 1 8 0 5、v a n B e u s e c h e m . e t

30

40

50

al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-19、Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3:641-647、Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895、Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150:4104-4115、米国特許第4,868,116号、米国特許第4,980,286号、PCT出願WO第89/07136号、PCT出願WO第89/02468号、PCT出願WO第89/05345号、およびPCT出願WO第92/07573号を参照)。細胞のゲノムに挿入された遺伝子を形質導入して発現することができる組換えレトロウイルスベクターは、組換えレトロウイルスゲノムを、PA317およびPsi-CRIP等の好適なパッケージング細胞系に形質移入することによって、産生することができる(Comette et al., 1991, Human Gene Therapy 2:5-10、Cone et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349)。感受性宿主(例えば、ラット、ハムスター、イヌ、およびチンパンジー)内の多岐にわたる細胞および組織を感染させるために、組換えアデノウイルスベクターを使用することができ(Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166:769)、これは、感染に有糸分裂的に活性な細胞を必要としない利点も有する。

10

【0085】

発現されるdsRNA分子のコード配列を受け入れることができる任意のウイルスベクターを使用することができ、例としては、アデノウイルス(AV)、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス(例えば、レンチウイルス(LV)、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス)、ヘルペスウイルス等に由来するベクターである。ウイルスベクターの指向性は、エンベロープタンパク質もしくは他のウイルスからの他の表面抗原を用いて該ベクターをシュードタイピングすることにより、または異なるウイルスのキャプシドタンパク質を適宜置換することによって、修正することができる。

20

【0086】

例えば、本発明のレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、狂犬病、エボラ、モコラ等からの表面タンパク質でシュードタイピングすることができる。本発明のAAVベクターは、ベクターが異なるキャプシドタンパク質の血清型を発現するように操作することにより、異なる細胞を標的とすることができる。例えば、血清型2のゲノム上に血清型2のキャプシドを発現するAAVベクターは、AAV2/2と称される。AAV2/2ベクター内のこの血清型2のキャプシド遺伝子を、血清型5のキャプシド遺伝子と置換して、AAV2/5ベクターを産生することができる。異なるキャプシドタンパク質血清型を発現するAAVベクターを構築するための技法は、当該技術分野の技能内であり、例えば、Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801を参照されたく、その開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0087】

本発明における使用に好適な組換えウイルスベクターの選択、dsRNAの発現のために核酸配列を該ベクターに挿入するための方法、および該ウイルスベクターを対象となる細胞に送達する方法は、当該技術分野の技能内である。例えば、Dornburg R (1995), Gene Therap. 2:301-310、Eglitis M A (1988), Biotechniques 6:608-614、Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1:5-14、Anderson W F (1998), Nature 392:25-30、およびRubinson D A et al., Nat. Genet. 33:401-406を参照されたく、それらの開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0088】

好ましいウイルスベクターは、AVおよびAAVに由来するものである。特に好ましい実施形態において、本発明のdsRNAは、例えば、U6もしくはH1 RNAプロモ-

50

ター、またはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターのいずれかを有する組換え AAV ベクターから、2つの別個の相補的な単鎖 RNA 分子として発現される。

【0089】

本発明の dsRNA を発現するために好適な AAV ベクター、組換え AAV ベクターを構築するための方法、該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010 に記載されている。

【0090】

本発明の dsRNA を発現するために好適な AAV ベクター、組換え AAV ベクターを構築するための方法、該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61:3096-3101、Fisher K J et al. (1996), J. Virol. 70:520-532、Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63:3822-3826、米国特許第 5,252,479 号、米国特許第 5,139,941 号、国際特許出願 WO 第 94/13788 号、および国際特許出願 WO 第 93/24641 号に記載され、それらの開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0091】

本発明の DNA プラスミドもしくはウイルスベクターのいずれか内で dsRNA の発現を駆動するプロモーターは、真核生物 RNA ポリメラーゼ I (例えばリボソーム RNA プロモーター)、RNA ポリメラーゼ II (例えば CMV 初期プロモーター、もしくはアクチンプロモーター、もしくは U1 snRNA プロモーター)、または一般に RNA ポリメラーゼ III プロモーター (例えば U6 snRNA もしくは 7SK RNA プロモーター)、あるいは原核生物プロモーター、例えば、発現プラスミドも T7 プロモーターからの転写に必要な T7 RNA ポリメラーゼをコードするという条件で、T7 プロモーターであり得る。該プロモーターは、臍臓への導入遺伝子の発現を導くこともできる (例えば、the insulin regulatory sequence for pancreas (Bucchini et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515) を参照)。

【0092】

さらに、導入遺伝子の発現は、例えば、特定の生理的調節因子、例えば、循環ブドウ糖レベル、またはホルモンに感受性である調節配列等の、誘発可能な調節配列および発現系を使用することによって、正確に調節することができる (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24)。細胞または哺乳動物内の導入遺伝子の発現を制御するために好適である、かかる誘発可能な発現系には、エクジソン、エストロゲン、プロゲステロン、テトラサイクリン、二量化の化学誘発物質、およびイソプロピル-ベータ-D1-チオガラクトピラノシド (EPTG) による調節が含まれる。当業者は、dsRNA 導入遺伝子の目的とする用途に基づいて、適切な調節/プロモーター配列を選択することができよう。

【0093】

一般に、dsRNA 分子を発現することができる組換えベクターは、以下に記載するように送達され、標的細胞内に生き残る。代替として、dsRNA 分子の一過性発現を提供するウイルスベクターを使用することができる。かかるベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。発現すると、dsRNA は標的 RNA に結合し、その機能または発現を調節する。dsRNA を発現するベクターの送達は、静脈内もしくは筋肉内投与等によって全身的、患者から外植された標的細胞に投与後、該患者へ再導入することによって、または所望の標的細胞への導入を可能にする任意の他の手段等によって、であり得る。

【0094】

dsRNA 発現 DNA プラスミドは、典型的には、カチオン性脂質担体 (例えば Oligofectamine)、または非カチオン性脂質に基づく担体 (例えば Transi

10

20

30

40

50

t - T K O (商 標)) と の 複 合 体 と し て 、 標 的 細 胞 に 形 質 移 入 さ れ る 。 1 週 間 以 上 の 期 間 に わ た っ て 、 単 一 の E g 5 遺 伝 子 (も し く は V E G F 遺 伝 子) の 異 な る 領 域 ま た は 複 数 の E g 5 遺 伝 子 (も し く は V E G F 遺 伝 子) を 標 的 と す る 、 d s R N A に よ っ て 媒 介 さ れ る ノ ッ ク ダ ウ ン の た め の 複 数 回 の 脂 質 の 形 質 移 入 も ま た 、 本 発 明 に よ っ て 企 図 さ れ る 。 本 発 明 の ベ ク タ ー の 宿 主 細 胞 へ の 導 入 の 成 功 は 、 種 々 の 既 知 の 方 法 を 使 用 し て 監 視 す る こ と が で き る 。 例 え ば 、 一 過 性 形 質 移 入 は 、 緑 色 蛍 光 タ ン パ ク 質 (G F P) 等 の 蛍 光 マ ー カ ー 等 の レ ポ ー タ ー を 用 い て 示 す こ と が で き る 。 エ ク ス ビ オ 細 胞 の 安 定 な 形 質 移 入 は 、 形 質 移 入 細 胞 に 、 ハ イ グ ロ マ イ シ ン B 耐 性 等 の 、 特 定 の 環 境 因 子 (例 え ば 、 抗 生 物 質 お よ び 薬 物) に 対 す る 耐 性 を 提 供 す る マ ー カ ー を 使 用 し て 、 保 証 す る こ と が で き る 。

【 0 0 9 5 】

ま た 、 E g 5 に 特 異 的 な d s R N A 分 子 お よ び V E G F に 特 異 的 な d s R N A 分 子 は 、 ベ ク タ ー に 挿 入 し て 、 ヒ ト 患 者 に 対 す る 遺 伝 子 療 法 ベ ク タ ー と し て 使 用 す る こ と が で き る 。 遺 伝 子 療 法 ベ ク タ ー は 、 例 え ば 、 静 脈 内 注 射 、 局 所 投 与 (米 国 特 許 第 5 , 3 2 8 , 4 7 0 号 を 参 照) 、 ま た は 定 位 固 定 注 射 (例 え ば 、 C h e n e t a l . (1 9 9 4) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 1 : 3 0 5 4 - 3 0 5 7 を 参 照) に よ っ て 、 対 象 に 送 達 す る こ と が で き る 。 遺 伝 子 療 法 ベ ク タ ー の 医 薬 調 製 物 は 、 許 容 さ れ る 希 釈 剤 中 の 遺 伝 子 療 法 ベ ク タ ー を 含 ん で も よ く 、 ま た は 遺 伝 子 送 達 媒 体 が 中 に 埋 め 込 ま れ る 徐 放 性 マ ト リ ッ ク ス を 含 ん で も よ い 。 代 替 と し て 、 組 換 え 細 胞 、 例 え ば 、 レ ト ロ ウ イ ル ス ベ ク タ ー か ら 、 完 全 な 遺 伝 子 送 達 ベ ク タ ー を 無 傷 で 産 生 す る こ と が で き る 場 合 、 医 薬 調 製 物 は 、 遺 伝 子 送 達 系 を 産 生 す る 1 つ 以 上 の 細 胞 を 含 ん で も よ い 。

【 0 0 9 6 】

d s R N A を 含 有 す る 医 薬 組 成 物

一 実 施 形 態 に お い て 、 本 発 明 は 、 本 明 細 書 に 記 載 さ れ る d s R N A と 、 薬 剤 と し て 許 容 さ れ る 担 体 と を 含 有 す る 医 薬 組 成 物 、 お よ び そ れ を 投 与 す る た め の 方 法 を 提 供 す る 。 該 d s R N A を 含 有 す る 医 薬 組 成 物 は 、 E g 5 / K S P お よ び / ま た は V E G F の 発 現 に よ っ て 媒 介 さ れ る 病 理 過 程 、 例 え ば 、 肝 臓 癌 等 の 、 E g 5 / K S P お よ び / ま た は V E G F 遺 伝 子 の 発 現 も し く は 活 性 に 関 連 す る 疾 患 も し く は 障 害 の 処 置 に 有 用 で あ る 。 か か る 医 薬 組 成 物 は 、 送 達 様 式 に 基 づ い て 製 剤 化 さ れ る 。

【 0 0 9 7 】

投 薬 量

本 明 細 書 で 取 り 上 げ ら れ る 医 薬 組 成 物 は 、 E G 5 / K S P お よ び / ま た は V E G F 遺 伝 子 の 発 現 を 阻 害 す る た め に 十 分 な 投 薬 量 で 投 与 さ れ る 。 一 般 に 、 d s R N A の 好 適 な 用 量 は 、 1 日 当 た り 受 容 者 の 体 重 1 キ ロ グ ラ ム に つ き 0 . 0 1 ~ 2 0 0 . 0 ミ リ グ ラ ム の 範 囲 、 一 般 に は 、 1 日 当 た り 体 重 1 キ ロ グ ラ ム に つ き 1 ~ 5 0 m g の 範 囲 で あ る べ し 。 例 え ば 、 該 d s R N A は 、 単 回 用 量 当 た り 0 . 0 1 m g / k g 、 0 . 0 5 m g / k g 、 0 . 5 m g / k g 、 1 m g / k g 、 1 . 5 m g / k g 、 2 m g / k g 、 3 m g / k g 、 5 . 0 m g / k g 、 1 0 m g / k g 、 2 0 m g / k g 、 3 0 m g / k g 、 4 0 m g / k g 、 ま た は 5 0 m g / k g で 投 与 す る こ と が で き る 。

【 0 0 9 8 】

該 医 薬 組 成 物 は 、 1 日 1 回 投 与 す る こ と が で き 、 あ る い は 、 該 d s R N A は 、 1 日 に わ た っ て 適 切 な 間 隔 で 、 2 、 3 、 ま た は そ れ 以 上 の 分 割 用 量 (s u b - d o s e) と し て 投 与 さ れ て も よ い 。 E G 5 / K S P お よ び / ま た は V E G F の レ ベ ル に 対 す る 単 回 用 量 の 効 果 は 長 く 続 き 、 そ の 結 果 、 そ の 後 の 用 量 は 、 7 日 以 下 の 間 隔 で 、 ま た は 1 、 2 、 3 、 も し く は 4 週 間 以 下 の 間 隔 で 投 与 さ れ る 。

【 0 0 9 9 】

幾 つか の 実 施 形 態 に お い て 、 該 d s R N A は 、 持 続 注 入 ま た は 放 出 制 御 製 剤 に よ る 送 達 を 用 い て 投 与 さ れ る 。 そ の 場 合 、 各 分 割 用 量 に 含 有 さ れ る d s R N A は 、 1 日 当 た り の 総 投 薬 量 を 達 成 す る よ う に 、 対 応 し て よ り 小 さ く な け れ ば な ら な い 。 投 薬 量 単 位 は 、 例 え ば 、 数 日 間 に わ た っ て 該 d s R N A の 持 続 放 出 を 提 供 す る 、 従 来 の 持 続 放 出 製 剤 を 使 用 し て 、 数 日 間 に わ た る 送 達 用 に 配 合 す る こ と が で き る 。 持 続 放 出 製 剤 は 当 該 技 術 分 野 に お い て

周知であり、本発明の薬剤を用いて使用され得る部位等の特定の部位での薬剤の送達に特に有用である。本実施形態では、投薬量単位は、対応する複数の１日量を含む。

【０１００】

当業者には、限定されないが、疾患もしくは障害の重症度、以前の処置、総体的な健康、および／または対象の年齢、ならびに存在する他の疾患を含む特定の因子が、対象を効果的に処置するために必要とされる投薬量およびタイミングに影響を及ぼし得ることが理解されよう。さらに、治療上有効な量の組成物を用いた対象の処置には、単回処置または一連の処置が含まれ得る。本発明により包含される個々の d s R N A に対する効果的な投薬量およびインビボ半減期の推定は、従来の方法を使用して、または本明細書のいずれかの箇所で記載される適切な動物モデルを使用したインビボ試験に基づいて、行うことができる。

10

【０１０１】

マウス遺伝学における進歩によって、E G 5 / K S P および／または V E G F の発現によって媒介される病理過程等の種々のヒト疾患の研究用に、多くのマウスモデルが生成されている。かかるモデルは、d s R N A のインビボ試験、ならびに治療上有効な用量を決定するために使用される。好適なマウスモデルは、例えば、ヒト E G 5 / K S P および／または V E G F を発現するプラスミドを含有するマウスである。別の好適なマウスモデルは、ヒト E G 5 / K S P および／または V E G F を発現する導入遺伝子を保有する遺伝子導入マウスである。

20

【０１０２】

かかる化合物の毒性および治療効果は、例えば、L D 5 0（集団の 5 0 % に致死的な用量）、および E D 5 0（集団の 5 0 % に治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準的な医薬的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、L D 5 0 / E D 5 0 比として表すことができる。高い治療指数を呈する化合物が好ましい。

【０１０３】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のための一連の投薬量の公式化に使用することができる。本発明で取り上げられる組成物の投薬量は、一般に、ほとんどまたは全く毒性のない E D 5 0 を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で異なってもよい。本発明で取り上げられる方法において使用されるいずれの化合物についても、治療上有効な用量は、まず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定される、I C 5 0（すなわち、症状の半値阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む、化合物、または適切な場合は、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲（例えば、該ポリペプチドの濃度の低下を達成する）を達成するように、公式化することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

30

【０１０４】

それらの投与に加えて、上述のように、本発明で取り上げられる d s R N A は、標的遺伝子の発現によって媒介される病理過程の処置に効果的な他の既知の薬剤と組み合わせて投与することができる。いずれの場合においても、投与する医師は、当該技術分野において既知であるか、または本明細書に記載される、標準的な有効性の測定値を使用して得られた結果に基づいて、d s R N A 投与の量およびタイミングを調整することができる。

40

【０１０５】

投与

本発明の医薬組成物は、局所的または全身的な処置が所望されるか、および処置される範囲に依存して、多くの方法で投与することができる。投与は、局所的、噴霧器によってを含む、例えば、粉末もしくは噴霧剤の吸入もしくは吹送による経肺、気管内、鼻腔内、表皮および経皮、ならびに真皮下、経口もしくは非経口、例えば、皮下であり得る。

50

【0106】

典型的には、高脂血症を有する哺乳動物を処置する場合、該 dsRNA 分子は、非経手段を介して全身的に投与される。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腔内、もしくは筋肉内注射もしくは注入、または頭蓋内、例えば、実質内、くも膜下腔内、もしくは脳室内投与が含まれる。例えば、dsRNA は、共役もしくは非共役、またはリボソームを用いて製剤化されているいにかかわらず、患者に静脈内投与することができる。そのため、dsRNA 分子は、滅菌および非滅菌水溶液、アルコール等の一般的な溶媒中の非水溶液、または液体もしくは固形油基剤の溶液等の組成物に製剤化することができる。かかる溶液は、緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤も含むことができる。非経口、くも膜下腔内、または脳室内投与については、dsRNA 分子を滅菌水溶液等の組成物に製剤化することができ、これも、緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤（例えば、浸透促進剤、担体化合物、および他の薬剤として許容される担体）を含むことができる。製剤については、本明細書でより詳細に記載する。

10

【0107】

該 dsRNA は、肝臓（例えば、肝臓の肝細胞）等の特定の組織を標的とする状態で送達することができる。

【0108】

製剤

本発明の医薬製剤は、簡便に単位剤形で提示することができ、医薬産業において周知である従来の技法によって、調製することができる。かかる技法には、活性成分を1つもしくは複数の医薬用担体または1つもしくは複数の賦形剤と関連させるステップが含まれる。一般に、該製剤は、活性成分を液体担体もしくは微粉化した固体担体、あるいはその両方と均一かつ密接に関連させ、次いで必要であれば該産物を成形することによって調製される。

20

【0109】

本発明の組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、軟質ゲル、坐薬、および浣腸等の考えられる多くの剤形のうちのいずれかに製剤化することができる。また、本発明の組成物は、水性、疎水性、または混合媒体中の懸濁液として製剤化することもできる。水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させる物質をさらに含有することができる。また、懸濁液は、安定剤も含有することができる。

30

【0110】

本発明の医薬組成物には、溶液、エマルジョン、およびリボソームを含有する製剤が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物は、予め形成された液体、自己乳化型固体および、自己乳化型半固体を含む種々の構成成分から生成することができるが、これらに限定されない。一態様には、高脂血症等の肝障害を処置する際に肝臓を標的とする製剤がある。

【0111】

さらに、EG5/KSP および/または VEGF 遺伝子を標的とする dsRNA は、他の分子、分子構造、もしくは核酸の混合物と混合、カプセル化、共役、または別様に関連させた dsRNA を含有する組成物に製剤化することができる。例えば、EG5/KSP および/または VEGF 遺伝子を標的とする1つ以上の dsRNA 剤を含有する組成物は、他の癌治療薬等の他の治療薬、または EG5/KSP および/または VEGF 以外の遺伝子を標的とする1つ以上の dsRNA 化合物を含有することができる。

40

【0112】

経口、非経口、局所、および生物学的製剤

経口投与用の組成物および製剤には、粉末もしくは顆粒、微粒子、ナノ粒子、水もしくは疎水性媒体中の懸濁液もしくは溶液、カプセル、ゲルカプセル、サシエット、錠剤、またはミニタブレットが含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましくあり得る。幾つかの実施形態において、経口製剤とは、本発明で取り上げ

50

られる $dsRNA$ が、1つ以上の浸透促進剤、界面活性剤、およびキレート化剤と併用して投与されるものである。好適な界面活性剤には、脂肪酸および/またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸および/またはその塩が含まれる。好適な胆汁酸/塩には、ケノデオキシコール酸 (CDCA) およびウルソデオキシケノデオキシコール酸 (UDCA)、コール酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸 (glucolic acid)、グリコール酸 (glycolic acid)、グリコデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロデオキシコール酸、タウロ-24, 25-ジヒドロ-フシジン酸ナトリウム、ならびにグリコジヒドロフシジン酸ナトリウムが含まれる。好適な脂肪酸には、アラキドン酸、ウンデカン酸、オレイン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1-モノカプリン酸、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはモノグリセリド、ジグリセリド、もしくはその薬剤として許容される塩 (例えば、ナトリウム) が含まれる。幾つかの実施形態において、浸透促進剤の組み合わせが使用され、例えば、胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩が挙げられる。例示的な1つの組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸、および UDCA のナトリウム塩である。さらなる浸透促進剤には、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが含まれる。本発明で取り上げられる $dsRNA$ は、噴霧乾燥粒子を含む顆粒形態で経口的に送達されるか、または微小もしくはナノ粒子を形成するように複合されてもよい。 $dsRNA$ 複合剤には、ポリ-アミノ酸類; ポリイミン類; ポリアクリレート類; ポリアルキルアクリレート類、ポリオキセタン類、ポリアルキルシアノアクリレート類; カチオン化ゼラチン類、アルブミン類、デンプン類、アクリレート類、ポリエチレングリコール類 (PEG)、およびデンプン類; ポリアルキルシアノアクリレート類; DEAE 誘導体化ポリイミン類、ポルラン (pollulan) 類、セルロース類、およびデンプン類が含まれる。好適な複合剤には、キトサン、N-トリメチルキトサン、ポリ-L-リジン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリスベルミン、プロタミン、ポリビニルピリジン、ポリチオジエチルアミノメチルエチレン P (TDAE)、ポリアミノスチレン (例えば、p-アミノ)、ポリ (メチルシアノアクリレート)、ポリ (エチルシアノアクリレート)、ポリ (ブチルシアノアクリレート)、ポリ (イソブチルシアノアクリレート)、ポリ (イソヘキシルシアノアクリレート)、DEAE-メタクリレート、DEAE-ヘキシルアクリレート、DEAE-アクリルアミド、DEAE-アルブミンおよび DEAE-デキストラン、ポリメチルアクリレート、ポリヘキシルアクリレート、ポリ (D, L-乳酸)、ポリ (DL-乳酸-co-グリコール酸 (PLGA))、アルギン酸塩、ならびにポリエチレングリコール (PEG) が含まれる。 $dsRNA$ 用の経口製剤およびそれらの調製は、米国特許第 6, 887, 906 号、米国特許公開第 20030027780 号、および米国特許第 6, 747, 014 号に詳細に記載され、これらはそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。

【0113】

非経口、実質内 (脳内への)、くも膜下腔内、脳室内、または肝内投与用の組成物および製剤には、滅菌水溶液が含まれてもよく、これも、限定されないが、浸透促進剤、担体化合物、および他の薬剤として許容される担体もしくは賦形剤等の緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤を含有し得る。

【0114】

局所投与用の医薬組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏、ローション、グリーム、ゲル、ドロップ剤、座薬、スプレー、液体、および粉末が含まれ得る。従来の医薬用担体、水性、粉末、もしくは油性基剤、増粘剤等が必要であるか、または望ましくあり得る。好適な局所製剤には、本発明で取り上げられる $dsRNA$ が、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤、および界面活性剤等の局所送達剤と混合されるものが含まれる。好適な脂質およびリポソームには、中性 (例えば、ジオレオイルホスファチジル (DOPE) エタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリン (D

MPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン)、陰性(例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG))、ならびにカチオン性(例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピル(DOTAP)、およびジオレオイルホスファチジエタノールアミン(DOTMA))が含まれる。本発明で取り上げられるdsRNAは、リボソーム内にカプセル化されてもよく、あるいはそれ、特にカチオン性リボソームと複合体を形成してもよい。代替として、dsRNAは、脂質、特にカチオン性脂質と複合されてもよい。好適な脂肪酸およびエステルには、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプリン酸、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはC₁₋₁₀アルキルエステル(例えば、ミリスチン酸イソプロピル(IPM))、モノグリセリド、ジグリセリド、あるいはその薬剤として許容される塩が含まれるが、これらに限定されない。局所製剤は、米国特許第6,747,014号に詳細に記載され、当該特許は、参照により本明細書に組み込まれる。さらに、dsRNA分子は、例えば、米国特許第6,271,359号に記載される生物学的または非生物学的的手段として、哺乳動物に投与することができる。非生物学的送達は、制限されないが、(1)リボソームに本明細書で提供されるdsRNA酸分子を取り込むステップと、(2)dsRNA分子を脂質もしくはリボソームと複合し、核酸-脂質もしくは核酸-リボソーム複合体を形成するステップとを含む、種々の方法によって達成することができる。該リボソームは、細胞をインビトロで形質移入するために一般的に使用される、カチオン性および中性の脂質から構成され得る。カチオン性脂質を負に荷電した核酸と複合(例えば、荷電関連)して、リボソームを形成することができる。カチオン性リボソームの例には、Lipofectin、Lipofectamine、Lipofectace、およびDOTAPが含まれるが、これらに制限されない。リボソームを形成するための手順は、当該技術分野において周知である。リボソーム組成物は、例えば、ホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジバルミトイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、またはジオレオイルホスファチジエタノールアミンから形成することができる。Lipofectin(商標)(Invitrogen/Life Technologies(Carlsbad, Calif.))およびEffectene(商標)(Qiagen(Valencia, Calif.))を含む、多くの親油性薬剤が市販されている。さらに、全身送達方法は、DDABまたはDOTAP等の市販のカチオン性脂質を使用して最適化することができ、これらはそれぞれ、DOPEまたはコレステロール等の中性脂質と混合することができる。場合によっては、Templetonら(Nature Biotechnology, 15:647-652(1997))によって記載されるもの等のリボソームを使用することができる。他の実施形態では、ポリエチレンジイミン等のポリカチオンを使用して、インビボおよびエクスピボ送達を達成することができる(Bolletta et al., J. Am Soc. Nephrol. 7:1728(1996))。核酸を送達するためのリボソームの使用に関するさらなる情報は、米国特許第6,271,359号、PCT公開WO第96/40964号、およびMorrissey, D. et al., 2005, Nat Biotechnol, 23(8):1002-7に見出すことができる。

【0115】

生物学的送達は、制限されないが、ウイルスベクターの使用を含む種々の方法によって達成することができる。例えば、ウイルスベクター(例えば、アデノウイルスおよびヘルペスウイルスベクター)を使用して、dsRNA分子を肝臓細胞へ送達することができる。分子生物学の標準技法を使用して、本明細書で提供されるdsRNAのうちの1つ以上を、核酸を細胞に送達するためにこれまでに開発されている、多くの異なるウイルスベクターのうちの1つに導入することができる。これらの結果として得られたウイルスベクターを使用して、例えば、感染によって、1つ以上のdsRNAを細胞に送達することができる。

10

20

30

40

50

【0116】

製剤化された dsRNA の特徴づけ

インライン混合または押出を伴わない方法のうちのいずれかによって調製された製剤は、同様の状態で特徴づけることができる。例えば製剤は、典型的には、目視検査によって特徴づけられる。それらは、凝集物または沈降物のない、白っぽい半透明の溶液であるべきである。脂質ナノ粒子の粒径および粒径分布は、例えば、Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern (USA)) を使用して、光散乱によって測定することができる。粒子は、40 ~ 100 nm 等の約 20 ~ 300 nm の粒径であるべきである。粒径分布は、単峰型であるべきである。製剤中、ならびに捕捉された画分中の総 siRNA 濃度は、色素排除アッセイを使用して推定される。製剤化された siRNA の試料を、製剤を分裂させる界面活性剤、例えば、0.5% の Triton-X100 の存在または不在下、Ribogreen (Molecular Probes) 等の RNA に結合する色素を用いてインキュベートすることができる。製剤中の総 siRNA は、標準曲線に対する、該界面活性剤を含有する試料からのシグナルによって決定することができる。捕捉された画分は、総 siRNA 含有量から siRNA を「含まない」含有量 (界面活性剤の不在下のシグナルによって測定される) を差し引くことによって決定される。捕捉された siRNA のパーセントは、典型的には > 85% である。SNALP 製剤については、粒径は、少なくとも 30 nm、少なくとも 40 nm、少なくとも 50 nm、少なくとも 60 nm、少なくとも 70 nm、少なくとも 80 nm、少なくとも 90 nm、少なくとも 100 nm、少なくとも 110 nm、および少なくとも 120 nm である。好適な範囲は、典型的には少なくとも約 50 nm ~ 少なくとも約 110 nm、少なくとも約 60 nm ~ 少なくとも約 100 nm、または少なくとも約 80 nm ~ 少なくとも約 90 nm である。

10

20

【0117】

リポソーム製剤

薬物の製剤化用に研究されて、使用されているマイクロエマルジョンの他に、組織立った多くの界面活性剤の構造がある。これらには、単層、ミセル、二重層、および小胞が含まれる。リポソーム等の小胞は、薬物送達の観点からの、それらが提示する特異性および作用の持続時間から、大きな関心を集めている。本発明において使用される、「リポソーム」という用語は、球状の 1 つまたは複数の二重層に配置された両親媒性脂質の小胞を意味する。

30

【0118】

リポソームは、親油性材料および水性の内部から形成される膜を有する、単層状または多層状の小胞である。水性部分が、送達される組成物を含有する。カチオン性リポソームは、細胞壁に融合することができる利点を有する。非カチオン性のリポソームは、細胞壁とさほど効率的に融合することはできないが、マクロファージによってインビボで取り込まれる。

【0119】

哺乳動物の皮膚を無傷で横断するために、脂質小胞は、好適な経皮勾配の影響下、それぞれ 50 nm 未満の直径を有する、一連の微細孔を通過しなければならない。したがって、高度に変形可能で、そのような微細孔を通過することができるリポソームを使用することが望ましい。

40

【0120】

リポソームのさらなる利点には、天然のリン脂質から得られたリポソームは、生体適合性および生分解性である、リポソームは、広範な水溶性および脂溶性の薬物を組み込むことができる、リポソームは、それらの内部区画でカプセル化された薬物を、代謝および分解から保護することができる、が含まれる (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の調製において

50

考慮すべき重要な事項は、脂質の表面電荷、小胞の大きさ、およびリボソームの水性容積である。

【0121】

リボソームは、作用部位への活性成分の移送および送達に有用である。リボソーム膜は、構造的に生体膜と同様であるため、リボソームが組織に適用されると、リボソームは細胞膜との融合を開始し、リボソームと細胞との融合が進行するに従って、リボソームの内容物が細胞内へ出て、そこで活性薬剤が作用し得る。

【0122】

リボソーム製剤は、多くの薬物のための送達様式として、広範な調査の焦点となっている。局所投与について、リボソームが他の製剤に勝る幾つかの利点を提示するという証拠が増えつつある。かかる利点には、投与された薬物の高度な体内吸収に関連する副作用の減少、投与された薬物の所望の標的での蓄積の増加、ならびに親水性および疎水性の両方の多岐にわたる薬物を皮膚へ投与する能力が含まれる。

10

【0123】

幾つかの報告は、高分子量のDNAを含む薬剤を皮膚へ送達するリボソームの能力について詳述している。鎮痛剤、抗体、ホルモン、および高分子量のDNAを含む化合物が、皮膚に投与されている。大半の適用が、表皮上層の標的化をもたらした。

【0124】

リボソームは、広義の2つのクラスに分類される。カチオン性リボソームは、負に荷電したDNA分子と相互に作用し、安定な複合体を形成する、正に荷電したリボソームである。正に荷電したDNA/リボソーム複合体は、負に荷電した細胞表面と結合し、エンドソーム内に取り入れられる。エンドソーム内の酸性pHにより、リボソームが破裂し、その内容物を細胞の細胞質内に放出する(Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985)。

20

【0125】

pH感受性であるか、または負に荷電したリボソームは、DNAと複合するのではなく、それを捕捉する。DNAおよび脂質はともに同様に荷電されているため、複合体形成ではなく反発が生じる。それでもなお、DNAの一部は、これらのリボソームの水性内部内に捕捉される。チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養下の細胞単層へ送達するために、pH感受性リボソームが使用されている。外因性遺伝子の発現が、標的細胞中で検出された(Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274)。

30

【0126】

リボソーム組成物の1つの主要な種類には、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質が含まれる。例えば、中性のリボソーム組成物は、ジミリスティルホスファチジルコリン(DMPC)、またはジパルミティルホスファチジルコリン(DPPC)から形成することができる。アニオン性リボソーム組成物は、一般にジミリスティルホスファチジルグリセロールから形成され、一方アニオン性の膜融合性リボソームは、主にジオレイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)から形成される。リボソーム組成物の別の種類は、例えば、大豆ホスファチジルコリン、および卵ホスファチジルコリン等のホスファチジルコリン(PC)から形成される。別の種類は、リン脂質、および/またはホスファチジルコリン、および/またはコレステロールの混合物から形成される。

40

【0127】

幾つかの研究が、リボソーム製剤の皮膚への局所送達を評価している。インターフェロンを含有するリボソームのモルモット皮膚への適用は、皮膚ヘルペス炎の軽減をもたらし、一方他の手段(例えば、溶液またはエマルジョンとして)を介したインターフェロンの送達は効果がなかった(Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410)。さらに、さらなる研究は、リボソーム製剤の一部として投与されたインターフェロンの、水性系を使用するインターフェロンの投与に対する有効性を試験し、リボソーム製剤は水溶性投与より優れていると結

50

論付けた (du Plessis et al., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265)。

【0128】

また、非イオン性のリポソーム系は、特に非イオン性界面活性剤およびコレステロールを含む系における、薬物の皮膚への送達の実用性を決定するために調べられている。Novasome (商標) I (ジラウリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) および Novasome (商標) II (ジステアリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) を含む非イオン性のリポソーム製剤が、シクロスポリン A をマウス皮膚の真皮に送達するために使用された。結果は、かかる非イオン性のリポソーム系が、皮膚の異なる層へのシクロスポリン A の沈着の促進に効果的であることを示した (Hu et al., S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466)。

10

【0129】

また、リポソームには、「立体的に安定化された」リポソームが含まれ、該用語は、本明細書で使用される場合、1つ以上の特定化された脂質を含むリポソームを指し、リポソームに組み込まれると、かかる特定化された脂質を欠くリポソームと比較して、循環寿命の向上をもたらす。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞を形成する脂質部分の一部が、(A) モノシアロガングリオシド G_{M1} 等の1つ以上の糖脂質を含むか、または (B) ポリエチレングリコール (PEG) 部分等の1つ以上の親水性ポリマーで誘導体化されるものである。いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、少なくともガングリオシド、スフィンゴミエリン、または PEG 誘導体化脂質を含有する立体的に安定化されたリポソームについて、これらの立体的に安定化されたリポソームの循環半減期の増加は、細網内皮系 (RES) の細胞内への取り込みの減少に由来すると、当該技術分野では考えられている (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

20

【0130】

1つ以上の糖脂質を含む種々のリポソームが当該技術分野において既知である。Papahadjopoulos ら (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) は、モノシアロガングリオシド G_{M1} 、ガラクトセレブロシド硫酸、およびホスファチジルイノシトールの、リポソームの血中半減期を改善する能力について報告した。これらの所見は、Gabizon ら (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949) によって詳しく説明されている。ともに Allen らによる、米国特許第 4,837,028 号および国際公開 WO 第 88/04924 号は、(1) スフィンゴミエリン、および (2) ガングリオシド G_{M1} もしくはガラクトセレブロシド硫酸エステルを含むリポソームを開示している。米国特許第 5,543,152 号 (Webb ら) は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示している。1,2-sn-ジミリスチルホスファチジルコリンを含むリポソームは、国際公開 WO 第 97/13499 号 (Lim ら) に開示されている。

30

【0131】

1つ以上の親水性ポリマーによって誘導体化された脂質を含む多くのリポソーム、およびその調製方法は、当該技術分野において既知である。Sunamoto ら (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) は、PEG 部分を含有する非イオン性界面活性剤、 $2C_{12-15}G$ を含むリポソームについて記載している。Illum ら (FEBS Lett., 1984, 167, 79) は、ポリスチレン粒子のポリマー-グリコールによる親水性コーティングが、血中半減期の著しい増加をもたらすことを指摘している。ポリアルキレングリコール (例えば、PEG) のカルボン酸基の結合によって修飾された合成リン脂質が、Sears (米国特許第 4,426,330 号、および第 4,534,899 号) によって記載されている。Klibanov ら (FEBS Lett., 1990, 268, 235) は、PEG またはステアリン酸 PEG によって誘導

40

50

体化されたホスファチジルエタノールアミン (P E) を含むリボソームが、血中循環半減期の著しい増加を有することを示す実験について記載している。Blumeら (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) は、このような観察を、他の P E G 誘導体化リン脂質、例えば、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (D S P E) と P E G との組み合わせから形成される D S P E - P E G に広げた。外部表面に共有結合された P E G 部分を有するリボソームが、欧州特許 E P 第 0 4 4 5 1 3 1 B 1 号および国際公開 W O 第 9 0 / 0 4 3 8 4 号 (F i s h e r) に記載されている。P E G によって誘導体化された 1 ~ 2 0 モルパーセントの P E を含有するリボソーム組成物、およびその使用方法が、Woodleeら (米国特許第 5, 0 1 3, 5 5 6 号、および第 5, 3 5 6, 6 3 3 号)、ならびに Martinら (米国特許第 5, 2 1 3, 8 0 4 号および欧州特許 E P 第 0 4 9 6 8 1 3 B 1 号) によって記載されている。他の多くの脂質 - ポリマー共役体を含むリボソームが、国際公開 W O 第 9 1 / 0 5 5 4 5 号および米国特許第 5, 2 2 5, 2 1 2 号 (ともに Martinらによる)、ならびに国際公開 W O 第 9 4 / 2 0 0 7 3 号 (Z a l i p s k y ら) に開示されている。P E G 修飾セラミド脂質を含むリボソームが、国際公開 W O 第 9 6 / 1 0 3 9 1 号 (C h o i ら) に記載されている。米国特許第 5, 5 4 0, 9 3 5 号 (M i y a z a k i ら) および米国特許第 5, 5 5 6, 9 4 8 号 (T a g a w a ら) は、表面に官能基部分をさらに誘導体化することができる P E G 含有リボソームについて記載している。

10

【 0 1 3 2 】

核酸を含む多くのリボソームが当該技術分野において既知である。Thierryらによる国際公開 W O 第 9 6 / 4 0 0 6 2 号は、高分子量の核酸をリボソーム中にカプセル化するための方法を開示している。Tagawaらによる米国特許第 5, 2 6 4, 2 2 1 号は、タンパク質結合リボソームを開示し、かかるリボソームの内容物には d s R N A が含まれ得ると主張している。Rahmanらによる米国特許第 5, 6 6 5, 7 1 0 号は、オリゴデオキシヌクレオチドをリボソーム中にカプセル化する特定の方法について記載している。Loveらによる国際公開 W O 第 9 7 / 0 4 7 8 7 号は、r a f 遺伝子を標的とする d s R N A を含むリボソームを開示している。

20

【 0 1 3 3 】

トランスファーソームはさらに別の種類のリボソームであり、薬物送達媒体の興味を引く候補者である、高度に変形可能な脂質凝集物である。トランスファーソームは脂質小滴として記載されてもよく、これは、高度に変形可能であるため、この小滴より小さな孔に容易に浸透することができる。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適合可能であり、例えば、自己最適性 (皮膚の孔の形状に適合する)、自己修復性であり、しばしば断片化されることなく標的に到達し、しばしば自己負荷性 (s e l f - l o a d i n g) である。トランスファーソームを作製するために、標準的なリボソーム組成物に対して、表面エッジアクチベータ (s u r f a c e e d g e - a c t i v a t o r)、通常界面活性剤を添加することができる。トランスファーソームは、血清アルブミンを皮膚へ送達するために使用されている。血清アルブミンのトランスファーソームによって媒介される送達は、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注射と同様に効果的であることが示されている。

30

40

【 0 1 3 4 】

界面活性剤は、エマルジョン (マイクロエマルジョンを含む) およびリボソーム等の製剤中に幅広い用途を見出す。天然および合成の両方の、多くの異なる種類の界面活性剤の性質を分類および順位付ける最も一般的な方法は、親水性 / 親油性バランス (H L B) の使用によるものである。親水性基 (「 頭部基 」 としても知られる) の性質が、製剤に使用される異なる界面活性剤を分類するための最も有用な手段を提供する (R i e g e r, i n P h a r m a c e u t i c a l D o s a g e F o r m s, M a r c e l D e k k e r, I n c., N e w Y o r k, N. Y., 1988, p. 285)。

【 0 1 3 5 】

界面活性剤分子がイオン化されていない場合、これは、非イオン性界面活性剤として分

50

類される。非イオン性界面活性剤は、医薬品および化粧品に幅広い用途を見出し、広範な pH 値にわたって使用可能である。一般に、それらの HLB 値は、その構造に依存して、2 ~ 約 18 の範囲である。非イオン性界面活性剤には、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、およびエトキシ化エステル等の非イオン性エステルが含まれる。脂肪アルコールエトキシ化物 (ethoxylate)、プロポキシ化 (propoxylated) アルコール、およびエトキシ化 / プロポキシ化ブロックポリマー等の非イオン性アルカノールアミドおよびエーテルも、このクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤が、非イオン性界面活性剤のクラスのうちに最も一般的な構成物質である。

10

【0136】

界面活性剤分子が水中に溶解または分散された時に負の電荷を保有する場合、その界面活性剤は、アニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤には、石鹸等のカルボン酸塩、アシルラクチレート (lactylate)、アミノ酸のアシルアミド、アルキル硫酸塩およびエトキシ化アルキル硫酸塩等の硫酸のエステル、アルキルベンゼンスルホネート、アシルイセチオネート (isethionate)、アシルタウレート (taurate)、およびスルホコハク酸塩等のスルホネート、ならびにリン酸塩が含まれる。アニオン性界面活性剤のクラスのうちに最も重要な構成物質は、アルキル硫酸塩および石鹸である。

20

【0137】

界面活性剤分子が正の荷電を保有する場合、それが水中に溶解または分散されると、その界面活性剤はカチオン性として分類される。カチオン性界面活性剤には、第四アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが含まれる。第四アンモニウム塩がこのクラスで最も使用される構成物質である。

【0138】

界面活性剤分子が正または負の電荷のいずれをも保有する能力を有する場合、その界面活性剤は、両性として分類される。両性界面活性剤には、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N - アルキルベタイン、およびフォスファチドが含まれる。

【0139】

薬品、製剤、およびエマルジョン中の界面活性剤の使用が概説されている (Riege, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

30

【0140】

SNALP

一実施形態において、本発明で取り上げられる dsRNA は、脂質製剤中に完全にカプセル化されて、SPLP、pSPLP、SNALP、または他の核酸脂質粒子を形成する。本明細書で使用される、「SNALP」という用語は、SPLP を含む安定な核酸脂質粒子を指す。本明細書で使用される、「SPLP」という用語は、脂質小胞内にカプセル化されたプラスミド DNA を含む核酸脂質粒子を指す。SNALP および SPLP は、典型的には、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を阻止する脂質 (例えば、PEG 脂質共役体) を含有する。SNALP および SPLP は、静脈内 (i.v.) 注射後に長時間の循環寿命を呈し、遠位の部位 (例えば、投与部位から物理的に離れた部位) に蓄積するため、全身適用に非常に有用である。SPLP には、「pSPLP」が含まれ、これには、PCT 公開 WO 第 00 / 03683 号に記載されるカプセル化された縮合剤と核酸との複合体が含まれる。本発明の粒子は、典型的には約 50 nm ~ 約 150 nm、より典型的には約 60 nm ~ 約 130 nm、より典型的には約 70 nm ~ 約 110 nm、最も典型的には約 70 ~ 約 90 nm の平均直径を有し、実質的に無毒である。さらに、該核酸は、本発明の核酸脂質粒子中に存在する場合、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に抵抗性である。核酸脂質粒子およびその調製方法は、例えば、米国特許第 5,976,567 号、第 5,981,501 号、第 6,534,484 号、第 6,586,410

40

50

号、第 6, 815, 432 号、および PCT 公開 WO 第 96 / 40964 号に開示されている。

【0141】

一実施形態において、脂質の薬物に対する比率（質量 / 質量比率）（例えば、脂質の dsRNA に対する比率）は、約 1 : 1 ~ 約 50 : 1、約 1 : 1 ~ 約 25 : 1、約 3 : 1 ~ 約 15 : 1、約 4 : 1 ~ 約 10 : 1、約 5 : 1 ~ 約 9 : 1、または約 6 : 1 ~ 約 9 : 1 の範囲内であろう。

【0142】

カチオン性脂質は、例えば、N, N - ジオレイル - N, N - ジメチルククロライド (DDAC)、N, N - ジステアシル - N, N - ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、N - (I - (2, 3 - ジオレオイルオキシ)プロピル) - N, N, N - トリメチルククロライド (DOTAP)、N - (I - (2, 3 - ジオレイルオキシ)プロピル) - N, N, N - トリメチルククロライド (DOTMA)、N, N - ジメチル - 2, 3 - ジオレイルオキシ)プロピルアミン (DODMA)、1, 2 - ジリノレイルオキシ (Dilinoleoyloxy) - N, N - ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1, 2 - ジリノレニルオキシ (Dilinolenyloxy) - N, N - ジメチルアミノプロパン (DLeinDMA)、1, 2 - ジリノレイルカルバモイルオキシ (Dilinoleylcarbamoxyloxy) - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - C - DAP)、1, 2 - ジリノレイオキシ (Dilinoleoxy) - 3 - (ジメチルアミノ)アセトキシプロパン (DLin - DAC)、1, 2 - ジリノレイオキシ - 3 - モルホリノプロパン (DLin - MA)、1, 2 - ジリノレオイル - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLinDAP)、1, 2 - ジリノレイルチオ (Dilinoleylthio) - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - S - DMA)、1 - リノレオイル - 2 - リノレイルオキシ (linoleoyloxy) - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin - 2 - DMAP)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロライド塩 (DLin - TMA . Cl)、1, 2 - ジリノレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロライド塩 (DLin - TAP . Cl)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - (N - メチルピペラジノ)プロパン (DLin - MPZ)、または 3 - (N, N - ジリノレイルアミノ (Dioleylamino) - 1, 2 - プロパンジオール (DLinAP)、3 - (N, N - ジオレイルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオ (propanedio) (DOAP)、1, 2 - ジリノレイルオキシ (Dilinoleyloxo) - 3 - (2 - N, N - ジメチルアミノ)エトキシプロパン (DLin - EG - DMA)、2, 2 - ジリノレイル (Dilinoleyl) - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - DMA)、またはそれらの類似体、あるいはそれらの混合物であり得る。カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約 20 モル % ~ 約 50 モル %、または約 40 モル % からなり得る。

【0143】

別の実施形態では、脂質 siRNA ナノ粒子を調製するために、化合物、2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [1, 3] - ジオキソランを使用することができる。2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [1, 3] - ジオキソランの合成については、2008 年 10 月 23 日出願の米国仮特許出願第 61 / 107, 998 号に記載され、当該特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0144】

一実施形態において、脂質 siRNA 粒子には、40 % の 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [1, 3] - ジオキソラン、10 % の DSPC、40 % のコレステロール、10 % の PEG - C - DOMG (モルパーセント) が含まれ、粒径 63.0 ± 2.0 nm および 0.027 の siRNA / 脂質比である。

【0145】

非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)

)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ジオレオイル-ホスファチジエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジエタノールアミン(POPE)、ジオレオイル-ホスファチジエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(DOPE-mal)、ジパルミトイルホスファチジエタノールアミン(DPPE)、ジミリスチルホスホエタノールアミン(DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジル-エタノールアミン(DSPE)、16-O-モノメチルPE、16-O-ジメチルPE、18-1-トランスPE、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジエタノールアミン(SOPE)、コレステロール、またはそれらの混合物を含むが、これらに限定されない、アニオン性脂質または中性脂質であり得る。非カチオン性脂質は、コレステロールが含まれる場合、粒子中に存在する総脂質の約5モル%~約90モル%、約10モル%、または約58モル%であり得る。

10

【0146】

粒子の凝集を阻害する共役された脂質は、例えば、制限されないが、PEG-ジアシルグリセロール(DAG)、PEG-ジアルキルオキシプロピル(DAA)、PEG-リン脂質、PEG-セラミド(Cer)、またはそれらの混合物を含む、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質であり得る。PEG-DAA共役体は、例えば、PEG-ジラウリルオキシプロピル(Ci₂)、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(Ci₄)、PEG-ジパルミチルオキシプロピル(Ci₆)、またはPEG-ジステアリルオキシプロピル(C₈)であり得る。粒子の凝集を阻止する共役された脂質は、粒子中に存在する総脂質の0モル%~約20モル%、または約2モル%であり得る。

20

【0147】

幾つかの実施形態において、該核酸脂質粒子には、例えば、粒子中に存在する総脂質の約10モル%~約60モル%、または約48モル%のコレステロールがさらに含まれる。

【0148】

LNP01

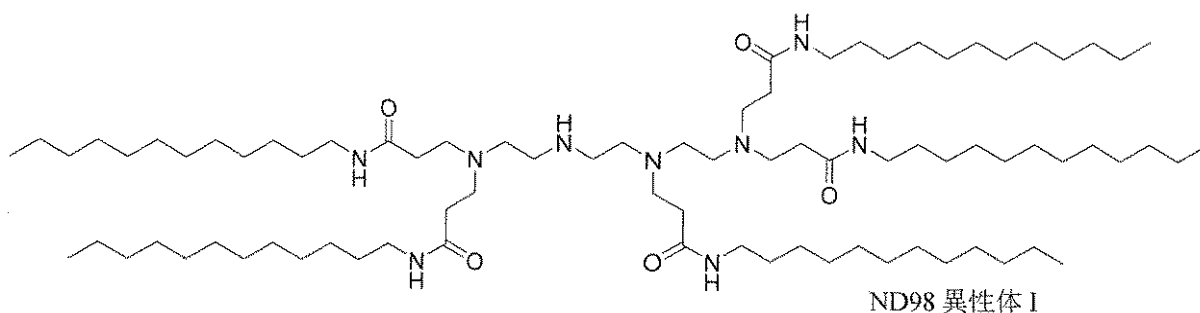
一実施形態において、脂質様(lipidoid)ND98-4HCl(MW1487)(式1)、コレステロール(Sigma-Aldrich)、およびPEG-Ceramide C16(Avanti Polar Lipids)を使用して、脂質siRNAナノ粒子(すなわち、LNP01粒子)を調製することができる。それぞれエタノール中の原液を、ND98、133mg/ml;コレステロール、25mg/ml;PEG-Ceramide C16、100mg/mlのように調製することができる。次いで、ND98、コレステロール、およびPEG-Ceramide C16の原液を、例えば、42:48:10のモル比に混合することができる。混合された脂質溶液は、最終エタノール濃度が約35~45%、および最終酢酸ナトリウム濃度が約100~300mMになるように、(例えば、酢酸ナトリウム(pH5)中の)siRNA水溶液と混合することができる。脂質siRNAナノ粒子は、典型的には、混合時に自然発生的に形成される。所望の粒径分布に依存して、得られたナノ粒子混合物は、例えば、Lipex Extruder(Northern Lipids, Inc)等のサーモバレル押出機(thermobarrel extruder)を使用して、ポリカーボネート膜(例えば、100nmカットオフ)を通して押し出すことができる。場合によっては、押出ステップは割愛されてもよい。エタノール除去および同時の緩衝液交換は、例えば、透析または接線流濾過によって達成することができる。緩衝液は、例えば、約pH7、例えば、約pH6.9、約pH7.0、約pH7.1、約pH7.2、約pH7.3、または約pH7.4のリン酸緩衝食塩水(PBS)と交換することができる。

30

40

【0149】

【化 1】



式 1

10

【 0 1 5 0 】

LNP01 製剤については、例えば、国際出願公開WO第2008/042973号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 5 1 】

エマルジョン

本発明の組成物は、エマルジョンとして調製および製剤化することができる。エマルジョンは、典型的には、1つの液体が、通常直径0.1 μmを超える液滴の形態の別の液体中に分散された多相系である (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199、Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Volume 1, p. 245、Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 2, p. 335、Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301)。エマルジョンは、しばしば、互いに密接に混合および分散される、2つの非混合性の液相を含む二相系である。一般に、エマルジョンは、油中水 (w/o) 型または水中油 (o/w) 型のいずれかの種類であり得る。水相が、大部分を占める油相中に微細に分割されて、微小液滴として分散される場合、得られる組成物は、油中水 (w/o) 型エマルジョンと称される。あるいは、油相が、大部分を占める水相中に微細に分割されて、微小液滴として分散される場合、得られる組成物は、水中油 (o/w) 型エマルジョンと称される。エマルジョンは、分散相に加えてさらなる構成成分と、水相または油相のいずれか中の溶液として、またはそれ自体別個の相として存在し得る、活性薬物とを含有することができる。また、乳化剤、安定剤、染料、および抗酸化剤等の医薬用賦形剤が、必要に応じてエマルジョン中に存在してもよい。また、医薬用エマルジョンは、例えば、油中水中油 (o/w/o) 型および水中油中水 (w/o/w) 型エマルジョンの場合等の、2つを超える相を含む、多重エマルジョンであってもよい。このような複合製剤は、しばしば、単純な二元エマルジョンは提供しない、特定の利点を提供する。o/w型エマルジョンの個々の油滴が小さな水滴を囲む多重エマルジョンは、w/o/w型エマルジョンを構成する。同様に、油の連続相中で安定化された水の小球内に囲まれた油滴の系は、o/w/o型エマルジョンを提供する。

20

30

40

【 0 1 5 2 】

エマルジョンは、熱力学的安定性によってほとんどまたは全く特徴づけられない。しばしば、エマルジョンの分散相または不連続相が、外相または連続相中に良好に分散され、

50

乳化剤の手段または製剤の粘度によってこの形態が維持される。エマルジョンの相のいずれも、エマルジョン型軟膏基剤およびクリームの場合のように、半固体または固体であり得る。エマルジョンを安定化する他の手段は、エマルジョンのいずれかの相に組み込むことができる乳化剤の使用を必要とする。乳化剤は、大きく、合成界面活性剤、天然に存在する乳化剤、吸収基剤、および微細に分散された固体の4つのカテゴリーに分類することができる (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0153】

合成界面活性剤は、表面活性剤としても知られ、エマルジョン製剤における広範な適用性が見出されており、文献で概説されている (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199)。界面活性剤は、典型的には両親媒性であり、親水性および疎水性の部分を含む。界面活性剤の、親水性の疎水性に対する比率は、親水性/親油性バランス (HLB) と称されており、製剤の調製時の界面活性剤の分類および選択における、貴重なツールである。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて、非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両性の異なるクラスに分類することができる (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285)。

【0154】

エマルジョン製剤に使用される天然に存在する乳化剤には、ラノリン、蜜蝋、フォスファチド類、レシチン、およびアカシアが含まれる。吸収基剤は、水を吸収してw/o型エマルジョンを形成するが、依然として無水ラノリンおよび親水性ペトロラタム等のそれらの半固体の稠度を保持することができる、親水性を有する。微細に分割された固体も、特に界面活性剤と組み合わせ、また粘性の調製物中で、良好な乳化剤として使用されている。これらには、極性の無機固体、例えば、重金属水酸化物、非膨張性粘土、例えば、ベントナイト、アタパルジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド性ケイ酸アルミニウムおよびコロイド性ケイ酸アルミニウムマグネシウム、顔料、ならびに非極性固体、例えば、炭素もしくはトリステアリン酸グリセリルが含まれる。

【0155】

また、多岐にわたる非乳化材料もエマルジョン製剤に含まれ、エマルジョンの性質に寄与する。これらには、脂肪、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、防腐剤、および抗酸化剤が含まれる (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0156】

親水性コロイドまたは親水コロイドには、多糖類 (例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲニン、グアーガム、カラヤガム、およびトラガカント)、セルロース誘導体 (例えば、カルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース)、および合

10

20

30

40

50

成ポリマー（例えば、カルボマー、セルロースエーテル、およびカルボキシビニルポリマー）等の、天然に存在するガムおよび合成ポリマーが含まれる。これらは、水中で分散または膨張して、分散相の液滴の周りに強い界面薄膜を形成し、外相の粘度を増加させることによってエマルジョンを安定化させる、コロイド溶液を形成する。

【0157】

エマルジョンは、しばしば、微生物の成長を容易に支持することができる炭水化物、タンパク質、ステロール、およびフォスファチド等の多くの成分を含有するため、これらの製剤には、しばしば防腐剤が組み込まれる。エマルジョン製剤に含まれる一般的に使用される防腐剤には、メチルパラベン、プロピルパラベン、第四アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、およびホウ酸が含まれる。また、製剤の劣化を阻止するために、抗酸化剤も一般的にエマルジョン製剤に添加される。使用される抗酸化剤は、フリーラジカルスカベンジャー、例えば、トコフェロール、アルキルガレート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、または還元剤、例えば、アスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウム、ならびに抗酸化剤シナージスト、例えば、クエン酸、酒石酸、およびレシチンであり得る。

10

【0158】

外皮、経口、および非経口経路を介するエマルジョン製剤の適用、ならびにそれらを製造するための方法は、文献で概説されている（Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199）。経口送達用のエマルジョン製剤は、製剤化の容易さ、ならびに吸収および生物学的利用能の見地からの有効性から、非常に広範に使用されている（Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199）。鉱油基材の緩下剤、油性ビタミン、および高脂肪栄養調製物が、o/w型エマルジョンとして一般的に経口投与されている材料に含まれる。

20

30

【0159】

本発明の一実施形態において、dsRNAおよび核酸の組成物が、マイクロエマルジョンとして製剤化される。マイクロエマルジョンは、水、油、および単一の、光学的に等方性かつ熱力学的に安定な液体溶液である両親媒性物質の系として定義することができる（Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245）。典型的には、マイクロエマルジョンは、まず油を界面活性剤水溶液中に分散し、次に十分な量の第4の構成成分、一般には中間鎖長のアルコールを添加して透明な系を形成することによって調製される、系である。したがって、マイクロエマルジョンは、表面活性分子の界面薄膜によって安定化される、2つの非混和液の熱力学的に安定で等方的な、透明の分散物質としても記載されている（Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215）。マイクロエマルジョンは、一般的に、油、水、界面活性剤、共界面活性剤、および電解質を含む、3~5つの構成成分の組み合わせを通じて調製される。マイクロエマルジョンが油中水（w/o）型、または水中油（o/w）型であるかは、使用される油および界面活性剤の性質、ならびに界面活性剤分子の極性頭部および炭化水素尾部の構造および幾何学的な量

40

50

み込みに依存する (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

【0160】

相図を利用する現象論的手法が広範に研究されており、マイクロエマルジョンを製剤化する方法についての包括的な知識を当業者にもたらしめている (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245、Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335)。従来のエマルジョンと比較して、マイクロエマルジョンは、自然発生的に形成される熱力学的に安定な液滴の製剤において、不水溶性薬物を可溶化する利点を提示する。

【0161】

マイクロエマルジョンの調製に使用される界面活性剤には、単独、または共界面活性剤と組み合わせた、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート (ML310)、テトラグリセロールモノオレエート (MO310)、ヘキサグリセロールモノオレエート (PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレエート (PO500)、デカグリセロールモノカプレート (MCA750)、デカグリセロールモノオレエート (MO750)、デカグリセロールセクイオレエート (sequioleate) (SO750)、デカグリセロールデカオレエート (DAO750) が含まれるが、これらに限定されない。共界面活性剤は、通常、エタノール、1-プロパノール、および1-ブタノール等の短鎖アルコールであるが、界面活性剤の薄膜中に浸透し、その結果、界面活性剤分子の間に生成される空隙のために不規則な薄膜を作製することによって、界面流動性を増加させる役目を果たす。しかしながら、マイクロエマルジョンは、共界面活性剤の使用を伴わずに調製することができ、アルコールを含まない自己乳化型のマイクロエマルジョン系が、当該技術分野において既知である。水相は、典型的には、水、該薬物の水溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびエチレングリコールの誘導体であり得るが、これらに限定されない。油相には、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖 (C8~C12) のモノ、ジ、およびトリ-グリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリ糖化 (polyglycolized) グリセリド、飽和ポリ糖化 C8~C10 グリセリド、植物油、ならびにシリコンオイル等の材料が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0162】

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化および薬物吸収の亢進の見地から、特に興味深い。ペプチドを含む薬物の経口での生物学的利用能を亢進させるために、脂質基剤のマイクロエマルジョン (o/w型およびw/o型の両方) が提案されている (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390、Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205)。マイクロエマルジョンは、改善された薬物の可溶化、酵素的加水分解からの薬物の保護、界面活性剤が誘発する膜流動性および透過性における変化による薬物吸収の潜在的な亢進、調製の容易さ、固形剤形を超える経口投与の容易さ、改善された臨床的効力、および低減した毒性の利点を提供する (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385、Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143)。しばしば、マイクロエマルジョンは、その構成成分が周囲温度で引き合わされると、自然発生的に形成され得る。これは、熱不安

10

20

30

40

50

定性の薬物、ペプチド、またはdsRNAを製剤化する際に特に有利であり得る。また、マイクロエマルジョンは、化粧用途および医薬用途の双方における活性構成成分の経皮送達に効果的である。本発明のマイクロエマルジョン組成物および製剤は、消化管からのdsRNAおよび核酸の向上された体内吸収を促進し、dsRNAおよび核酸の局所的な細胞取り込みを改善することが期待される。

【0163】

また、本発明のマイクロエマルジョンは、製剤の特性を改善し、本発明のdsRNAおよび核酸の吸収を亢進させるための、モノステアリン酸ソルビタン (Grill 3)、Labrasol、および浸透促進剤等のさらなる構成成分および添加剤を含有することができる。本発明のマイクロエマルジョンに使用される浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤の、5つの大きなカテゴリーのうちの1つに属するものとして分類することができる (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。これらのクラスのそれぞれが、上述されている。

【0164】

浸透促進剤

一実施形態において、本発明は、核酸、特にdsRNAの、動物の皮膚への効率的な送達を達成させるために、種々の浸透促進剤を用いる。ほとんどの薬物は、イオン化および非イオン化の両方の形態で溶液中に存在する。しかしながら、通常脂溶性または親油性の薬物のみが、容易に細胞膜を横断する。横断される膜が浸透促進剤で処理されている場合、非親油性薬物でさえも、細胞膜を横断し得ることが発見されている。非親油性薬物の細胞膜を横断する拡散の補助に加えて、浸透促進剤は、親油性薬物の透過性も亢進する。

【0165】

浸透促進剤は、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤の、5つの大きなカテゴリーのうちの1つに属するものとして分類することができる (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。浸透促進剤の前述のクラスのそれぞれについて、以下により詳細に記載する。

【0166】

界面活性剤：本発明に関連して、界面活性剤（または「表面活性剤」）とは、水溶液中に溶解されると、溶液の表面張力または該水溶液と別の液体との間の界面張力を減少させ、粘膜を通るdsRNAの吸収が亢進されるという結果をもたらす、化学物質である。胆汁塩および脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤には、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-20-セチルエーテル (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)、ならびにFC-43等のペルフルオロ化合物エマルジョンが含まれる (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252)。

【0167】

脂肪酸：浸透促進剤として作用する種々の脂肪酸およびそれらの誘導体には、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸 (n-デカン酸)、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン (1-モノオレオイル-rac-グリセロール)、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール1-モノカプリン酸、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、それらのC₁₋₁₀アルキルエステル (例えば、メチル、イソプロピル、およびt-ブチル)、ならびにそれらのモノおよびジ-グリセリド (すなわち、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、カプリン酸塩、ミリスチン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、リノール酸塩等) が含まれる (Lee et al., Critic

al Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92、Muraniishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33、El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654)。

【0168】

胆汁塩：胆汁の生理学的役割には、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進が含まれる (Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935)。種々の天然胆汁塩、およびそれらの合成誘導体は、浸透促進剤として作用する。したがって、「胆汁塩」という用語には、胆汁の天然に存在する構成成分のうちのいずれも、ならびにそれらの合成誘導体のうちのいずれもが含まれる。好適な胆汁塩には、例えば、コール酸（もしくはその薬剤として許容されるナトリウム塩、コール酸ナトリウム）、デヒドロコール酸（デヒドロコール酸ナトリウム）、デオキシコール酸（デオキシコール酸ナトリウム）、グルコール酸（グルコール酸ナトリウム (sodium glucolate)）、グリコール酸（グリココール酸ナトリウム）、グリコデオキシコール酸（グリコデオキシコール酸ナトリウム）、タウロコール酸（タウロコール酸ナトリウム）、タウロデオキシコール酸（タウロデオキシコール酸ナトリウム）、ケノデオキシコール酸（ケノデオキシコール酸ナトリウム）、ウルソデオキシコール酸 (UDCA)、タウロ-24, 25-ジヒドロ-フシジン酸ナトリウム (STDHF)、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム、およびポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル (POE) が含まれる (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783、Muraniishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33、Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25、Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583)。

【0169】

キレート剤：本発明に関連して使用されるキレート剤は、金属イオンとの複合体を形成することによって溶液から金属イオンを除去し、粘膜を通る dsRNA の吸収の亢進という結果をもたらす化合物として、定義することができる。本発明における浸透促進剤としての使用に関して、ほとんどの特徴づけられた DNA ヌクレアーゼは触媒作用に二価金属イオンを必要とすることから、キレート剤によって阻害されるため、キレート剤は、DNA ヌクレアーゼ阻害剤としても機能するさらなる利点を有する (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339)。好適なキレート剤には、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、クエン酸、サリチル酸塩（例えば、サリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチル酸塩、およびホモバニレート (homovanillate)）、コラーゲンの N-アシル誘導体、ラウレス-9、およびベータ-ジケトンの N-アミノアシル誘導体（エナミン）が含まれるが、これらに限定されない (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92、Muraniishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33、Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51)。

【0170】

非キレート非界面活性剤：本明細書で使用する、非キレート非界面活性剤の浸透促進化合物は、キレート剤または界面活性剤としてわずかな活性を示すが、それにもかかわらず消化器粘膜を通じてのdsRNAの吸収を亢進する化合物として、定義することができる(Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33)。このクラスの浸透促進剤には、例えば、不飽和環状尿素、1-アルキル-および1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92)、ならびにジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、およびフェニルブタゾン等の非ステロイド性抗炎症薬(Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626)が含まれる。

10

【0171】

また、細胞レベルでのdsRNAの取り込みを亢進させる薬剤も、本発明の医薬用および他の組成物に添加することができる。また、例えば、カチオン性脂質、例えばLipofectin(Junichira、米国特許第5,705,188号)、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリカチオン性分子、例えばポリリジン(Lolloら、PCT出願WO第97/30731号)も、dsRNAの細胞取り込みを亢進させることが知られている。

20

【0172】

グリコール、例えば、エチレングリコールおよびプロピレングリコール、ピロール、例えば、2-ピロール、アゾン、ならびにテルペン、例えば、リモネンおよびメントンを含む他の薬剤を利用して、投与される核酸の浸透を亢進させてもよい。

【0173】

担体

本発明のdsRNAは、薬剤として許容される担体または希釈剤中に製剤化することができる。「薬剤として許容される担体」(本明細書において「賦形剤」とも称される)とは、薬剤として許容される溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理学的に不活性な媒体である。薬剤として許容される担体は液体または固体であり得、所望の容積、軟度、および他の適切な輸送および化学的性質を提供するように、計画された投与の様態を念頭において選択することができる。典型的な薬剤として許容される担体には、例として、制限されないが、水、食塩液、結合剤(例えば、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース)、充填剤(例えば、ラクトースおよび他の糖、ゼラチン、または硫酸カルシウム)、潤滑剤(例えば、デンプン、ポリエチレングリコール、または酢酸ナトリウム)、崩壊剤(例えば、デンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム)、ならびに湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)が含まれる。

30

【0174】

また、本発明の特定の組成物には、製剤中に担体化合物が組み込まれる。本明細書で使用する、「担体化合物」または「担体」は、不活性(すなわち、それ自体生物活性を有さない)であるが、例えば、生物活性のある核酸の分解、または循環からのその除去の促進によって、生物活性を有する核酸の生物学的利用能を減少させるインビボ過程によって、核酸として認識される、核酸、またはその類似体を指すことができる。核酸と担体化合物との同時投与は、典型的には後者の物質を過剰に伴い、おそらく共通の受容体に対する担体化合物と核酸との間の競合により、肝臓、腎臓、または他の循環外の貯蔵所で回収される核酸の量の著しい減少をもたらし得る。例えば、肝組織中の部分的ホスホロチオエートdsRNAの回収は、それがポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジン酸(polycytidic acid)、または4-アセトアミド-4'イソチオシアノ-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸と同時投与される場合、減少され得る(Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121, Tak

40

50

akura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

【0175】

賦形剤

担体化合物とは対照的に、「医薬用担体」または「賦形剤」は、1つ以上の核酸を動物に送達するための、薬剤として許容される溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理学的に不活性な媒体である。賦形剤は液体または固体であり得、核酸および所定の医薬組成物の他の構成成分と組み合わせられた時に、所望の用量、軟度等を提供するように、計画された投与の様態を念頭において選択される。典型的な医薬用担体には、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース等）、充填剤（例えば、ラクトースおよび他の糖、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、またはリン酸水素カルシウム等）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、硬化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、崩壊剤（例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウム等）、ならびに湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0176】

また、核酸と有害に反応しない、経口（non-parenteral）投与に好適な薬剤として許容される有機または無機賦形剤を、本発明の組成物を製剤化するために使用することができる。好適な薬剤として許容される担体には、水、塩類溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0177】

核酸の局所投与用の製剤には、滅菌および非滅菌水溶液、アルコール等の一般的な溶媒中の非水溶液、または液体もしくは固形の油基剤中の核酸の溶液が含まれ得る。該溶液は、緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤も含有し得る。核酸と有害に反応しない、経口（non-parenteral）投与に好適な薬剤として許容される有機または無機賦形剤を使用することができる。

30

【0178】

好適な薬剤として許容される賦形剤には、水、塩類溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が含まれるが、これらに限定されない。

【0179】

他の構成成分

本発明の組成物は、医薬組成物中に従来認められる他の補助的な構成成分を、それらの当該技術分野において確立された使用量レベルで、さらに含有することができる。したがって、例えば、本組成物は、さらに、例えば、鎮痒薬、収斂薬、局所麻酔薬、または抗炎症薬等の、適合性の、薬剤として活性な材料を含有してもよく、あるいは、染料、香味剤、防腐剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤等の、本発明の組成物の種々の剤形に物理的に製剤化するために有用な、さらなる材料を含有してもよい。しかし、かかる材料は、添加された時に、本発明の組成物の構成成分の生物活性を過度に妨げないべきである。該製剤を滅菌し、所望される場合、補助的な薬剤、例えば、該製剤の1つまたは複数の核酸と有害に相互作用しない潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝液、着色物質、香味物質、および/または芳香物質等と混合してもよい。

40

【0180】

水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、およ

50

び／またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させる物質を含有することができる。また、懸濁液は、安定剤も含有することができる。

【0181】

併用療法

一態様において、本発明の組成物を併用療法に使用することができる。「併用療法」という用語には、他の生物活性を有する成分（限定されないが、第2のおよび異なる抗新生物剤等）および非薬物療法（限定されないが、外科処置または放射線処置等）をさらに併用した、主題の化合物の投与が含まれる。例えば、本発明の化合物は、他の薬剤として活性な化合物、好ましくは本発明の化合物の効果を亢進させることができる化合物と併用して使用することができる。本発明の化合物は、他の薬物療法と同時に（単一調製物もしくは別個の調製物として）、または連続的に投与することができる。一般に、併用療法は、療法の単一周期またはその過程の間に2つ以上の薬物の投与を想定する。

10

【0182】

本発明の一態様において、主題の化合物は、種々の病状に關与するタンパク質キナーゼを調節する、1つ以上の別個の薬剤と併用して投与することができる。かかるキナーゼの例には、セリン／スレオニン特異的キナーゼ、受容体型チロシン特異的キナーゼ、および非受容体型チロシン特異的キナーゼが含まれ得るが、これらに限定されない。セリン／スレオニンキナーゼには、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）、減数分裂特異的キナーゼ（MEK）、RAFおよびオーロラキナーゼが含まれる。受容体キナーゼファミリーの例には、上皮成長因子受容体（EGFR）（例えば、HER2/neu、HER3、HER4、ErbB、ErbB2、ErbB3、ErbB4、Xmrk、DER、Let23）、線維芽細胞成長因子（FGF）受容体（例えば、FGF-R1、FGF-R2/BEK/CEK3、FGF-R3/CEK2、FGF-R4/TKF、KGF-R）、肝細胞成長／散乱因子受容体（HGF-R）（例えば、MET、RON、SEA、SEX）、インスリン受容体（例えば、IGFI-R）、Eph（例えば、CEK5、CEK8、EBK、ECK、EEK、EHK-I、EHK-2、ELK、EPH、ERK、HEK、MDK2、MDK5、SEK）、AxI（例えば、Mer/Nyk、Rse）、RET、ならびに血小板由来成長因子受容体（PDGFR）（例えば、PDGF-R、PDG-R、CSF1-R/FMS、SCF-R/C-KIT、VEGF-R/FLT、NEK/FLK1、FLT3/FLK2/STK-1）が含まれる。非受容体チロシンキナーゼファミリーには、BCR-ABL（例えば、p43^{ab1}、ARG）、BTK（例えば、ITK/EMT、TEC）、CSK、FAK、FPS、JAK、SRC、BMX、FER、CDK、およびSYKが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0183】

本発明の別の態様において、主題の化合物は、キナーゼ以外の生物学的標的または過程を調節する1つ以上の薬剤と併用投与することができる。かかる標的には、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）、DNAメチルトランスフェラーゼ（DNMT）、熱ショックタンパク質（例えば、HSP90）、およびプロテオソームが含まれる。

【0184】

一実施形態において、主題の化合物は、Zolinz、Tarceva、Iressa、Tykerb、Gleevec、Sutent、Sprycel、Nexavar、ソラフェニブ、CNF2024、RG108、BMS387032、Affmitak、Avastin、Herceptin、Erbibitux、AG24322、PD325901、ZD6474、PD184322、Obatodax、ABT737、およびAEE788等の、1つ以上の生物学的標的を阻害する抗新生物剤（例えば、小分子、モノクローナル抗体、アンチセンスRNA、および融合タンパク質）と併用することができる。かかる併用は、該薬剤のうちのいずれか単独によって達成される有効性を超えて、治療効果を亢進させることができ、抵抗性の突然変異体の出現を阻止または遅延させることができる。

40

【0185】

50

特定の好ましい実施形態において、本発明の化合物は、化学療法剤と併用投与される。化学療法剤は、腫瘍学の分野における広範にわたる治療的処置を包含する。これらの薬剤は、腫瘍の縮小、外科処置後に残された残存する癌細胞の破壊、緩解の誘発、緩解の維持、および/または癌もしくはその処置に関連する症状の緩和を目的として、疾患の種々の段階で投与される。かかる薬剤の例には、アルキル化剤、例えば、マスタードガス誘導体（メクロレタミン、シクロホスファミド、クロランブシル、メルファラン、イホスファミド）、エチレンイミン（チオテパ、ヘキサメチルメラミン）、アルキルスルホネート（ブスルファン）、ヒドラジンおよびトリアジン（アルトレタミン、プロカルバジン、ダカルバジン、およびテモゾロマイド）、ニトロソウレア（カルムスチン、ロムスチン、およびストレプトゾシン）、イホスファミドおよび金属塩（カルボプラチン、シスプラチン、およびオキサリプラチン）；植物性アルカロイド、例えば、ポドフィロトキシン（エトポシドおよびテニポシド）、タキサン（バクリタキセルおよびドセタキセル）、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、およびビノレルビン）、ならびにカンプトテカン（Camp to the can）類似体（イリノテカンおよびトポテカン）；抗腫瘍抗生物質、例えば、クロマイシン（ダクチノマイシンおよびブリカマイシン）、アントラサイクリン（ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、バルルビシン、およびイダルビシン）、ならびに種々の抗生物質、例えば、マイトマイシン、アクチノマイシン、およびブレオマイシン；代謝拮抗薬、例えば、葉酸拮抗薬（メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、アミノプテリン）、ピリミジン拮抗薬（5 - フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、カペシタビン、およびゲムシタビン）、プリン拮抗薬（6 - メルカプトプリンおよび6 - チオグアニン）、およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤（クラドリビン、フルダラビン、メルカプトプリン、クロファラビン、チオグアニン、ネララビン、およびペントスタチン）；トポイソメラーゼ阻害剤、例えば、トポイソメラーゼ I 阻害剤（イロノテカン（Ironotecan）、トポテカン）、およびトポイソメラーゼ II 阻害剤（アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド）；モノクローナル抗体（アレムツズマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、リツキシマブ、トラスツズマブ、イブリツモマブ、チウキセタン、セツキシマブ、パニツムマブ、トシツモマブ、ペバシズマブ）；ならびに種々の抗新生物剤、例えば、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤（ヒドロキシウレア）；副腎皮質ステロイド阻害剤（ミトタン）；酵素（アスパラギナーゼおよびペガスパルガーゼ）；微小管阻害剤（エストラムスチン）；ならびにレチノイド（ベキサロテン、イソトレチノイン、トレチノイン（ATRA））が含まれるが、これらに限定されない。特定の好ましい実施形態において、本発明の化合物は、抗癌剤補助療法薬（chemoprotective agent）と併用投与される。抗癌剤補助療法薬は、身体を保護するか、あるいは化学療法の副作用を最小限に抑えるように作用する。かかる薬剤の例には、アミホスチン、メスナ、およびデクスラゾキサンが含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0186】

本発明の一態様において、主題の化合物は、放射線療法と組み合わせて投与される。放射線は、一般的に、内的（癌部位近傍に放射性材料を埋め込む）、あるいは光子（ \times 線もしくはガンマ線）または粒子放射線を用いる機械から外的に送達される。併用療法がさらに放射線治療を含む場合、放射線治療は、該治療薬と放射線治療との組み合わせの同時作用から有益な効果が達成される限り、いずれの好適な時期に行われてもよい。例えば、適切な場合には、有益な効果は、治療薬の投与から、おそらく数日またはさらには数週間、時間的に隔たっている時にも、依然として達成される。

【0187】

本発明の化合物は、免疫療法剤と併用され得ることが理解されよう。免疫療法の一形態は、腫瘍から離れた部位にワクチン組成物を投与することによる、宿主起源の活動性の、全身性腫瘍に特異的な免疫応答の生成である。単離腫瘍抗原ワクチン（isolated tumor - antigen vaccine）および抗イディオタイプワクチンを含む、様々な種類のワクチンが提案されている。別の手法は、処置される対象からの腫瘍細胞

胞、またはかかる細胞の誘導体の使用である (Schirrmacher et al. (1995) J. Cancer Res. Clin. Oncol. 121: 487 によって概説されている)。米国特許第 5,484,596 号では、Hanna Jrらは、腫瘍の外科的除去、コラゲナーゼによる細胞の分散、細胞の照射、および約 10^7 細胞の少なくとも 3 回の連続用量で患者にワクチン接種するステップを含む、切除可能な癌腫を処置して再発または転移を阻止するための方法を主張している。

【0188】

本発明の化合物は、1つ以上の補助治療薬と有利に併用され得ることが理解されよう。補助的療法に好適な薬剤の例には、ステロイド剤、例えば、コルチコステロイド (アムシノニド、ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ブデソニド、クロベタゾール、酢酸クロベタゾール、酪酸クロベタゾール、17-プロピオン酸クロベタゾール、コルチゾン、デフラザコート、デスオキシメタゾン、吉草酸ジフルコルトロン、デキサメサゾン、デキサメタゾンリン酸ナトリウム、デソニド、フロ酸、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、ハルシノニド、ヒドロコルチゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、吉草酸ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、モメタゾン、プレドニカルベート、プレドニゾロン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、およびプロピオン酸ハロベタゾール)；5HT₁作用薬、例えば、トリプタン (例えば、スマトリプタンもしくはナラトリプタン)；アデノシン A₁作用薬；EPリガンド；NMDAモジュレーター、例えば、グリシン拮抗薬；ナトリウムチャネル遮断薬 (例えば、ラモトリジン)；物質 P 拮抗薬 (例えば、NK₁拮抗薬)；カンナビノイド；アセトアミノフェンもしくはフェナセチン；5-リボキシゲナーゼ阻害剤；ロイコトリエン受容体拮抗薬；DMARD (例えば、メトトレキサート)；ガバペンチンおよび関連化合物；三環系抗うつ薬 (例えば、アミトリプチリン)；ニューロン安定化抗てんかん薬 (neurone stabilizing antiepileptic drug)；モノアミン作動性取り込み阻害剤 (例えば、ベンラファキシン)；マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤；一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤、例えば、iNOS もしくは nNOS 阻害剤；腫瘍壊死因子の放出または作用の阻害剤；抗体療法、例えば、モノクローナル抗体療法；抗ウイルス薬、例えば、ヌクレオシド阻害剤 (例えば、ラミブジン) もしくは免疫系調節因子 (例えば、インターフェロン)；オピオイド鎮痛剤；局所麻酔薬；カフェインを含む刺激物質；H₂-拮抗薬 (例えば、ラニチジン)；プロトンポンプ阻害剤 (例えば、オメプラゾール)；制酸薬 (例えば、アルミニウムもしくは水酸化マグネシウム)；整腸剤 (例えば、シメチコン)；充血除去剤 (例えば、フェニレフリン、フェニルプロパノールアミン、偽エフェドリン、オキシメタゾリン、エピネフリン、ナファゾリン、キシロメタゾリン、プロピルヘキセドリン、もしくはレボデソキシエフェドリン (levodexoxyephedrine))；鎮咳薬 (例えば、コデイン、ヒドロコドン、カラミフェン)、カルベタペンタン、もしくはデキストロメトルファン)；利尿薬；または鎮静型もしくは非鎮静型抗ヒスタミン剤が含まれる。

【0189】

本発明の化合物は、他の遺伝子を標的とする siRNA と同時投与することができる。例えば、本発明の化合物は、c-Myc 遺伝子を標的とした siRNA と同時投与することができる。一例では、AD-12115 を c-Myc siRNA と同時投与することができる。c-Myc を標的とした siRNA の例は、米国特許出願第 12/373,039 号に開示されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0190】

Eg5 および VEGF 遺伝子の発現によって引き起こされる疾患を処置するための方法

本発明は、特に、例えば、腫瘍成長および腫瘍転移を阻害するための、肝臓癌等の癌の処置のための、Eg5 遺伝子を標的とした 1 つと、VEGF 遺伝子を標的とした 1 つとの少なくとも 2 つの dsRNA を含有する組成物の使用に関する。例えば、医薬組成物等の組成物は、肝臓の癌中に生じ得るもの等の、肝内腫瘍のような固形腫瘍の処置のために使用することができる。また、Eg5 を標的とする dsRNA と VEGF を標的とする ds

10

20

30

40

50

R N A とを含有する組成物は、乳癌、肺癌、頭頸部癌、脳癌、腹部癌、結腸癌、結腸直腸癌、食道癌、消化管癌、神経膠腫、舌癌、神経芽細胞腫、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、多発性骨髄腫等の他の腫瘍および癌の処置、黒色腫のような皮膚癌の処置、ならびにリンパ腫および血液癌の処置に使用することができる。本発明は、異なる種類の癌、例えば、肝臓癌、乳癌、肺癌、頭部癌、頸部癌、脳癌、腹部癌、結腸癌、結腸直腸癌、食道癌、消化管癌、神経膠腫、舌癌、神経芽細胞腫、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、多発性骨髄腫、皮膚癌、黒色腫、リンパ腫、および血液癌における腹水および胸水の蓄積を阻害するための、E g 5 d s R N A および V E G F d s R N A を含有する組成物の使用にさらに関連する。E g 5 および V E G F の発現に対する阻害効果により、本発明に従う組成物またはそこから調製される医薬組成物は、生活の質を向上させることができる。

10

【0191】

一実施形態において、A F P 発現に関連する腫瘍、または A F P を分泌する腫瘍、例えば、肝癌または奇形腫を有する患者が処置される。特定の実施形態において、患者は、悪性の奇形腫、内胚葉洞腫瘍（卵黄嚢癌）、神経芽細胞腫、肝芽腫、肝細胞癌、精巣癌、または卵巣癌を有する。

【0192】

さらに、本発明は、例えば、癌を処置するため、および/または腫瘍転移を阻止するために現在用いられているもの等の、他の医薬品および/または他の治療方法、例えば、既知の医薬品および/または既知の治療方法と併用して、例えば、癌を処置、または腫瘍転移を阻止するための、d s R N A またはその医薬組成物の使用に関する。放射線療法、ならびにシスプラチン、シクロホスファミド、5 - フルオロウラシル、アドリアマイシン、ダウノルピシン、またはタモキシフェン等の化学療法剤との併用が好ましい。

20

【0193】

また、本発明は、特定の R N A i 剤共に、任意の従来の化学療法剤等の別の抗癌化学療法剤と併用して実践することもできる。特定の結合剤とそのような他の薬剤との組み合わせが、化学療法プロトコルを強化することができる。本発明の方法に組み込むことができる多くの化学療法プロトコルが、当業者の念頭に浮かぶであろう。アルキル化剤、代謝拮抗薬、ホルモンおよび拮抗薬、放射性同位体、ならびに天然産物を含む、いずれの化学療法剤を使用することもできる。例えば、本発明の化合物は、抗生物質、例えば、ドキソルピシンおよび他のアントラサイクリン類似体、ナイトロジェンマスタード、例えば、シクロホスファミド、ピリミジン類似体、例えば、5 - フルオロウラシル、シスプラチン、ヒドロキシウレア、タキソール、およびその天然および合成誘導体等と併用投与することができる。別の例として、腫瘍がゴナドトロピン依存性およびゴナドトロピン非依存性の細胞を含む、乳腺腺癌等の混合腫瘍の場合、本化合物を、リユープロライドまたはゴセレリン（L H - R H の合成ペプチド類似体）と併用投与することができる。他の抗腫瘍プロトコルには、別の処置様式、例えば、外科処置、放射線等とのテトラサイクリン化合物の併用が含まれ、本明細書で「補助抗腫瘍様式」とも称される。したがって、本発明の方法は、副作用を軽減し、有効性を高める利益を有して、このような従来のレジメンと併用することができる。

30

40

【0194】

E g 5 遺伝子および V E G F 遺伝子の発現を阻害するための方法

また別の態様において、本発明は、哺乳動物における E g 5 遺伝子および V E G F 遺伝子の発現を阻害するための方法を提供する。該方法は、標的 E g 5 遺伝子および標的 V E G F 遺伝子の発現が停止されるように、本発明で取り上げられる組成物を該哺乳動物に投与するステップを含む。

【0195】

一実施形態において、E g 5 遺伝子の発現および V E G F 遺伝子の発現を阻害するための方法は、1 つは処置される哺乳動物の E g 5 遺伝子の R N A 転写物の少なくとも一部に相補的であるヌクレオチド配列を有し、もう 1 つは V E G F 遺伝子の R N A 転写物の少な

50

くとも一部に相補的であるヌクレオチド配列を有する、2つの異なるdsRNA分子を含む組成物の投与を含む。処置される生物がヒト等の哺乳動物である場合、本組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（噴霧剤）、経鼻、直腸、ならびに局所（口腔および舌下を含む）投与を含む、経口または非経口の経路を含むが、これらに限定されない、当該技術分野において既知の任意の手段によって投与することができる。好ましい実施形態において、本組成物は、静脈内注入もしくは注射によって投与される。

【0196】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語および化学用語は、本発明が属する分野における当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。本発明の実践または試験に際して、本明細書に記載されるものと同様または等価の方法および材料を使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合は、定義を含み、本明細書が優先される。さらに、材料、方法、および例は例示に過ぎず、限定するものではない。

【実施例】

【0197】

実施例1. dsRNA合成

試薬の供給源

試薬の供給源が本明細書に具体的に与えられていない場合、かかる試薬は、分子生物学の用途に標準的な質/純度で、分子生物学用の試薬の任意の供給業者から得ることができる。

【0198】

siRNA合成

dsRNAのスクリーニングのために、Expedite 8909合成機（Applied Biosystems、Applera Deutschland GmbH、（Darmstadt, Germany））、および固体支持体として制御細孔ガラス（CPG、500、Proligo Biochemie GmbH（Hamburg, Germany））を使用して、1μモルの規模で固相合成によって単鎖RNAを生成した。RNAおよび2'-O-メチルヌクレオチドを含むRNAを、対応するホスホラミダイトおよび2'-O-メチルホスホラミダイト（Proligo Biochemie GmbH（Hamburg, Germany））をそれぞれ用いて、固相合成によって生成した。これらの構成要素を、Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. et al.（Edrs.）, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されるような、標準的なヌクレオシドホスホラミダイト化学反応を用いて、オリゴボヌクレオチド鎖の配列内の選択された部位に組み込んだ。ヨウ素酸化剤溶液を、アセトニトリル（1%）中のBeaucage試薬（Chruachem Ltd（Glasgow, UK））の溶液と置き換えて、ホスホロチオエート結合を導入した。さらなる補助試薬をMallinckrodt Baker（Griesheim, Germany）から入手した。

【0199】

確立された手順に従い、陰イオン交換HPLCによって、粗オリゴボヌクレオチドの脱保護および精製を行った。収率および濃度を、分光光度計（DU 640B、Beckman Coulter GmbH、（Unterschleißheim, Germany））を使用した、260nmの波長でのそれぞれのRNAの溶液のUV吸収によって判定した。アニーリング緩衝液（20mM リン酸ナトリウム（pH 6.8）、100mM 塩化ナトリウム）中で相補鎖の等モル溶液を混合し、3分間85～90℃の水浴中で加温し、3～4時間かけて室温に冷却することによって、二本鎖RNAを生成した。アニールされたRNA溶液は、使用するまで-20℃で保管した。

【0200】

10

20

30

40

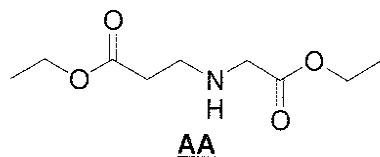
50

共役体

以下は、3'-コレステロールで共役した siRNA（本明細書で -Chol-3' と称される）の合成の予測的記載であり、RNA 合成のために適切に改質された固体支持体
が使用された。改質された固体支持体は、以下のように調製した。

ジエチル - 2 - アザブタン - 1 , 4 - ジカルボキシレート AA

【化 2】



10

【0201】

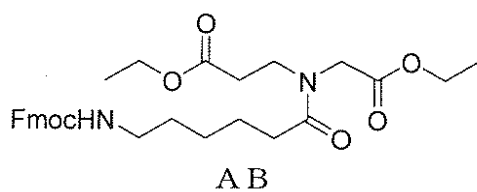
水酸化ナトリウムの 4.7 M の水溶液 (50 mL) を、水 (50 mL) 中のグリシンエチル塩酸塩 (32.19 g、0.23 モル) の、攪拌して氷冷した溶液に添加した。次いで、エチルアクリレート (23.1 g、0.23 モル) を添加し、混合物を、反応の完了が TLC によって確認されるまで、室温で攪拌した。19 時間後、該溶液をジクロロメタン (3 × 100 mL) で分配した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。残渣を蒸留して、AA (28.8 g、61%) を得た。

【0202】

3 - { エトキシカルボニルメチル - [6 - (9 H - フルオレン - 9 - イルメトキシカルボニル - アミノ) - ヘキサノイル] - アミノ } - プロピオン酸エチルエステル AB

20

【化 3】



【0203】

Fmoc - 6 - アミノ - ヘキサン酸 (9.12 g、25.83 ミリモル) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、氷冷した。ジイソプロピルカルボジイミド (3.25 g、3.99 mL、25.83 ミリモル) を該溶液に 0 で添加した。その後、ジエチル - アザブタン - 1 , 4 - ジカルボキシレート (5 g、24.6 ミリモル)、およびジメチルアミノピリジン (0.305 g、2.5 ミリモル) を添加した。該溶液が室温になるようにし、さらに 6 時間攪拌した。反応の完了を TLC で確認した。反応混合物を真空下で濃縮し、酢酸エチルを添加して、ジイソプロピル尿素を沈殿させた。この懸濁液を濾過した。濾液を 5% 塩酸水溶液、5% 飽和重炭酸ナトリウム、および水で洗浄した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させて濃縮し、粗生成物を得て、カラムクロマトグラフィー (50% EtOAc / ヘキサン) で精製し、11.87 g (88%) の AB を得た。

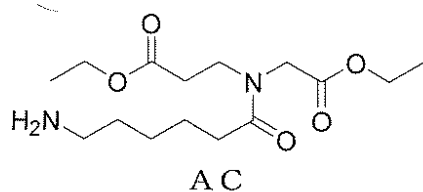
30

【0204】

3 - [(6 - アミノ - ヘキサノイル) - エトキシカルボニルメチル - アミノ] - プロピオン酸エチルエステル AC

40

【化 4】



【0205】

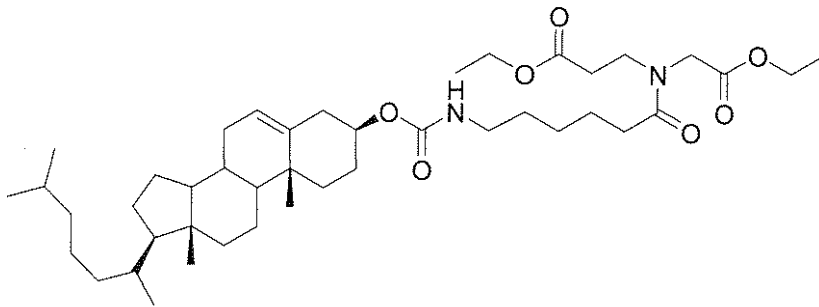
50

3 - { エトキシカルボニルメチル - [6 - (9 H - フルオレン - 9 - イルメトキシカルボニルアミノ) - ヘキサノイル] - アミノ } - プロピオン酸エチルエステル A B (11 . 5 g、21 . 3 ミリモル) を、0 のジメチルホルムアミド中の 20 % ピペリジンに溶解した。この溶液を 1 時間攪拌し続けた。反応混合物を真空下で濃縮し、残渣に水を添加し、酢酸エチルで生成物を抽出した。この粗生成物をその塩酸塩に変換することによって精製した。

【 0 2 0 6 】

3 - ({ 6 - [17 - (1 , 5 - ジメチル - ヘキシル) - 10 , 13 - ジメチル - 2 , 3 , 4 , 7 , 8 , 9 , 10 , 11 , 12 , 13 , 14 , 15 , 16 , 17 - テトラデカヒドロ - 1 H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルオキシカルボニルアミノ] -
ヘキサノイル } エトキシカルボニルメチル - アミノ) - プロピオン酸エチルエステル A D
【化 5 】

10



20

AD

【 0 2 0 7 】

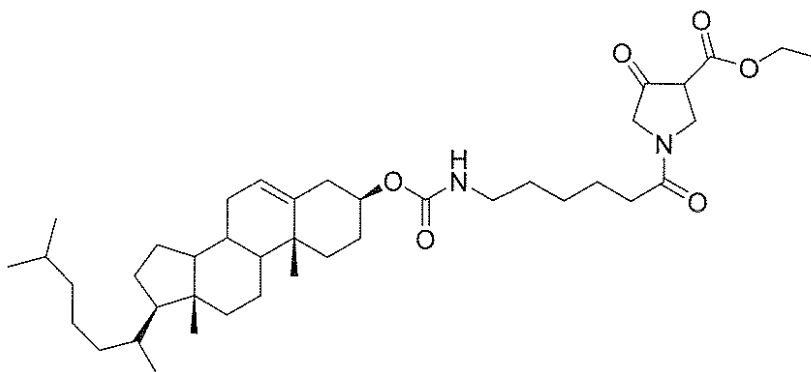
3 - [(6 - アミノ - ヘキサノイル) - エトキシカルボニルメチル - アミノ] - プロピオン酸エチルエステル A C (4 . 7 g、14 . 8 ミリモル) の塩酸塩をジクロロメタンに取り込んだ。この懸濁液を氷上で 0 に冷却した。この懸濁液にジイソプロピルエチルアミン (3 . 87 g、5 . 2 mL、30 ミリモル) を添加した。得られた溶液に、コレステリルクロロホルメート (6 . 675 g、14 . 8 ミリモル) を添加した。反応混合物を終夜攪拌した。反応混合物をジクロロメタンで希釈し、10 % 塩酸で洗浄した。生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製した (10 . 3 g、92 %)。

30

【 0 2 0 8 】

1 - { 6 - [17 - (1 , 5 - ジメチル - ヘキシル) - 10 , 13 - ジメチル - 2 , 3 , 4 , 7 , 8 , 9 , 10 , 11 , 12 , 13 , 14 , 15 , 16 , 17 - テトラデカヒドロ - 1 H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルオキシカルボニルアミノ] - ヘキサノイル } - 4 - オキソ - ピロリジン - 3 - カルボン酸エチルエステル A E

【化 6 】



40

AE

50

【0209】

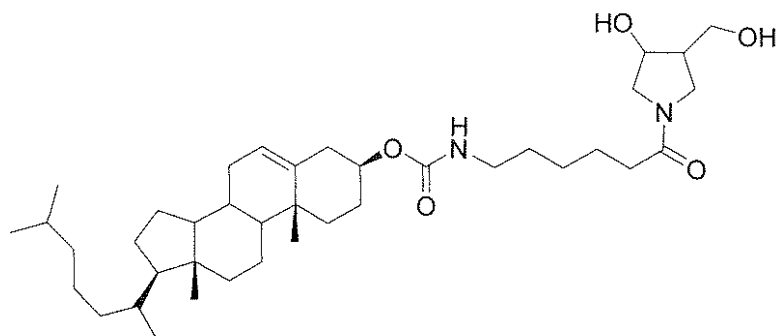
カリウム *t*-ブトキシド (1.1 g、9.8 ミリモル) を 30 mL の乾燥トルエンでスラリーにした。この混合物を氷上で 0 °C に冷却し、5 g (6.6 ミリモル) のジエステル AD を 20 分以内のうちに、攪拌しながらゆっくりと添加した。添加の間、温度は 5 °C 未満に維持した。攪拌を 0 °C で 30 分間継続し、1 mL の氷酢酸、その直後に 40 mL の水中の 4 g の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を添加した。得られた混合物を 2 回、それぞれ 100 mL のジクロロメタンで洗浄し、合わせた有機抽出物を 2 回、それぞれ 10 mL のリン酸緩衝液で洗浄し、乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を 60 mL のトルエンに溶解し、0 °C に冷却し、50 mL の 3 つの部分の冷たい pH 9.5 の炭酸塩緩衝液で抽出した。抽出液をリン酸で pH 3 に調整し、40 mL の 5 つの部分のクロロホルムで抽出し、合わせて乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を 25 % 酢酸エチル/ヘキサンを使用して、カラムクロマトグラフィーで精製し、1.9 g の *b*-ケトエステルを得た (39 %)。

10

【0210】

[6-(3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-ピロリジン-1-イル)-6-オキソ-ヘキシル]-カルバミン酸 17-(1,5-ジメチル-ヘキシル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1*H*-シクロペンタ[*a*]フェナントレン-3-イルエステル AF

【化7】

AF

20

【0211】

メタノール (2 mL) を、*b*-ケトエステル AE (1.5 g、2.2 ミリモル) と、テトラヒドロフラン (10 mL) 中の水素化ホウ素ナトリウム (0.226 g、6 ミリモル) との還流混合物に、1 時間かけて滴下した。攪拌を還流温度で 1 時間継続した。室温に冷却後、1*N* HCl (12.5 mL) を添加し、混合物を酢酸エチルで抽出した (3 × 40 mL)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空下で濃縮して生成物を得て、カラムクロマトグラフィー (10 % MeOH / CHCl₃) で精製した (89 %)。

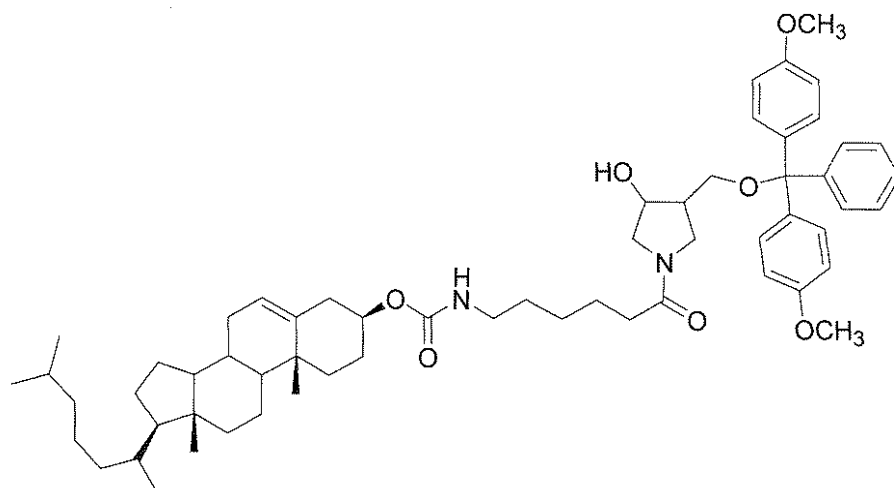
30

【0212】

(6-{3-[ビス-(4-メトキシ-フェニル)-フェニル-メトキシメチル]-4-ヒドロキシ-ピロリジン-1-イル}-6-オキソ-ヘキシル)-カルバミン酸 17-(1,5-ジメチル-ヘキシル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1*H*-シクロペンタ[*a*]フェナントレン-3-イルエステル AG

40

【化 8】



10

AG

【0213】

ジオールAF (1.25 g、1.994ミリモル)を、真空内でピリジン (2 × 5 mL)を用いて蒸発乾固した。無水ピリジン (10 mL)および4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (0.724 g、2.13ミリモル)を攪拌しながら添加した。反応は、終夜室温で行われた。メタノールを添加して反応を停止させた。反応混合物を真空下で濃縮し、残渣にジクロロメタン (50 mL)を添加した。この有機層を1 Mの飽和重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。トルエンを蒸発させて残渣のピリジンを除去した。この粗生成物をカラムクロマトグラフィー (2% MeOH / クロロホルム、5% MeOH / CHCl₃ 中 R_f = 0.5) で精製した (1.75 g、95%)。

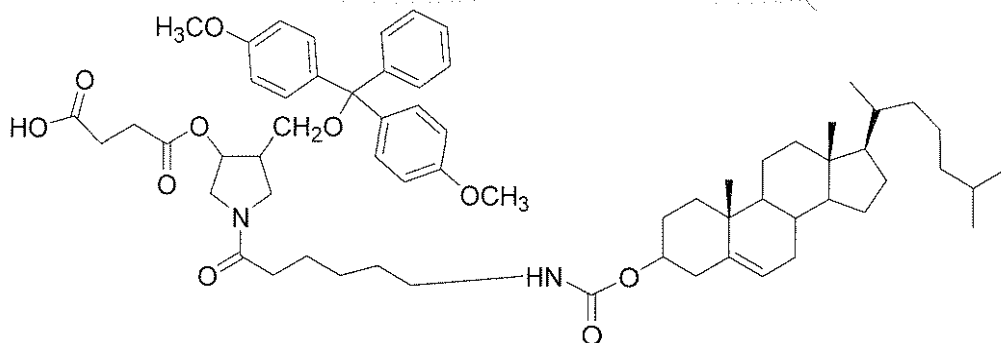
20

【0214】

コハク酸モノ - (4 - [ビス - (4 - メトキシ - フェニル) - フェニル - メトキシメチル] - 1 - {6 - [17 - (1,5 - ジメチル - ヘキシル) - 10,13 - ジメチル2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 - テトラデカヒドロ - 1Hシクロペンタ [a]フェナントレン - 3 - イルオキシカルボニルアミノ] - ヘキサノイル} - ピロリジン - 3 - イル) エステルAH

30

【化 9】



40

AH

【0215】

化合物AG (1.0 g、1.05ミリモル)を無水コハク酸 (0.150 g、1.5ミリモル)およびDMAP (0.073 g、0.6ミリモル)と混合し、終夜40℃の真空内で乾燥させた。該混合物を無水ジクロロエタン (3 mL)に溶解し、トリエチルアミン (0.318 g、0.440 mL、3.15ミリモル)を添加し、この溶液をアルゴン雰囲気下で16時間、室温で攪拌した。次いで、これをジクロロメタン (40 mL)で希釈

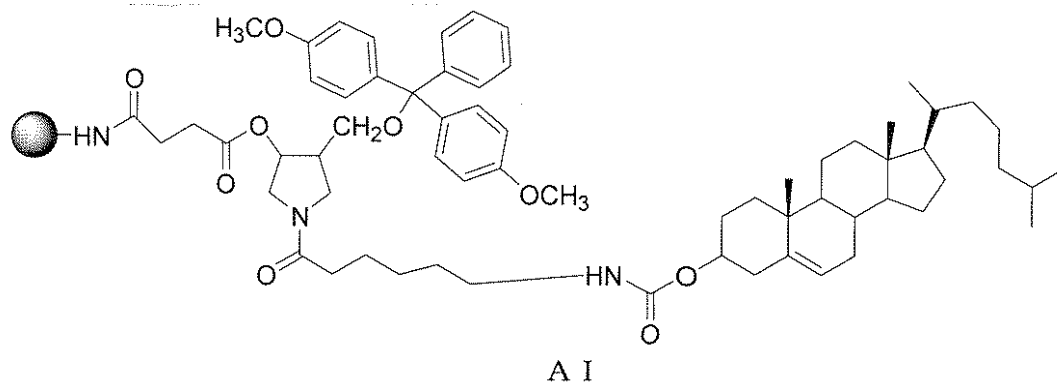
50

し、氷冷クエン酸水溶液（５重量％、３０ｍＬ）および水（２×２０ｍＬ）で洗浄した。該有機相を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮乾固した。残渣をそのまま次のステップに使用した。

【０２１６】

コレステロール誘導体化ＣＰＧ ＡＩ

【化１０】



10

【０２１７】

コハク酸ＡＨ（０．２５４ｇ、０．２４２ミリモル）を、ジクロロメタン／アセトニトリル（３：２、３ｍＬ）の混合物に溶解した。その溶液に、アセトニトリル（１．２５ｍＬ）中のＤＭＡＰ（０．０２９６ｇ、０．２４２ミリモル）、アセトニトリル／ジクロロエタン（３：１、１．２５ｍＬ）中の２，２'-ジチオ-ビス（５-ニトロピリジン）（０．０７５ｇ、０．２４２ミリモル）を連続して添加した。得られた溶液に、アセトニトリル（０．６ｍＬ）中のトリフェニルホスフィン（０．０６４ｇ、０．２４２ミリモル）を添加した。反応混合物の色が鮮やかな橙色に変わった。この溶液を、手首動作式振盪機（wrist-action shaker）を使用して短く攪拌した（５分）。長鎖アルキルアミン-ＣＰＧ（ＬＣＡＡ-ＣＰＧ）（１．５ｇ、６１ｍＭ）を添加した。懸濁液を２時間攪拌した。焼結漏斗を通してＣＰＧを濾過し、アセトニトリル、ジクロロメタン、およびエーテルで連続して洗浄した。無水酢酸／ピリジンを使用して未反応のアミノ基を遮蔽した。達成されたＣＰＧの装填を、ＵＶ測定値を取ることによって測定した（３７ｍＭ／ｇ）。

20

30

【０２１８】

５'-１２-ドデカン酸ビスデシルアミド（bisdecylamide）基（本明細書で「５'-Ｃ３２-」と称される）または５'-コレステリル誘導体基（本明細書で「５'-Ｃｈｏｌ-」と称される）を担持するｓｉＲＮＡの合成は、コレステリル誘導体について、酸化ステップが、核酸オリゴマーの５'末端にホスホロチオエート結合を導入するために、Beaucage試薬を使用して行われたことを除いて、国際公開ＷＯ第２００４／０６５６０１号に記載されるように行った。

【０２１９】

Ｅｇ５遺伝子を標的とするｄｓＲＮＡ

初期スクリーニングセット

40

ｓｉＲＮＡ設計は、Ｅｇ５（ＫＩＦ１１、ＨＳＫＰ、ＫＮＳＬ１、およびＴＲＩＰ５としても知られる）を標的とするｓｉＲＮＡを同定するように行われた。Ｅｇ５に対するヒトｍＲＮＡ配列、RefSeq ID番号：NM_004523を使用した。

【０２２０】

ヒトおよびマウスＥｇ５に交差反応性のｓｉＲＮＡ二重鎖を設計した。スクリーニング用に２４本の二重鎖を合成した。（表１ａ）。第２のスクリーニングセットは、ヒトＥｇ５、ならびにそのアカゲザル相同分子種を標的とする２６６個のｓｉＲＮＡで定義した（表２ａ）。拡大されたスクリーニングセットには、他の種のＥｇ５のいずれのｍＲＮＡにも的中する必要がない、ヒトＥｇ５を標的とする３２８個のｓｉＲＮＡを選択した（表３ａ）。

50

【0221】

ヒトおよび部分的にアカゲの E g 5 mRNA の配列は、NCBIヌクレオチドデータベースからダウンロードし、これより先、このヒト配列を参照配列として使用した(ヒト E G 5 : NM_004523.2、4908塩基対、およびアカゲ E G 5 : XM_001087644.1、878塩基対(ヒト E G 5 の 5' 部分のみ))。

【0222】

表について：凡例：A、G、C、U - リボヌクレオチド、T - デオキシチミジン、u、c - 2' - O - メチルヌクレオチド、s - ホスホロチオエート結合。

【0223】

表 1 a . E g 5 / K S P の d s R N A 二重鎖の配列

【表 1 - 1】

ヒト E g 5 / K S P 配列内の位置	配列 番号	23 量体の標的部位の配列	配列 番号	センス配列 (5'-3')	配列 番号	アンチセンス配列 (3'-5')	二重鎖名
385-407	1244	ACCGAAGGUGUGUGUC CAAUU	1	CGAAGUGUGUGUGUCA ATeT	2	UUGGACAAACAAACUCG TtT	AL-DP- 6226
347-369	1245	UATGGUGUGUGGAGGATC GACGA	3	UGGUGUGUGGAGGAGCA cTgT	4	GuAGAGGCGTCCAAACACCA TgT	AL-DP- 6227
1078-1100	1246	AAUCCGAAACUACUAGAA UCUUC	5	UCUAAACUAAACUAGCAUC cTtT	6	GGAUUCUACGUUAGUUGGA TtT	AL-DP- 6228
1067-1089	1247	UCUUAUCGAGAAUCUAA ACTAA	7	CUUAUCCGAGAAUCUAAAC uTtT	8	ACUUAACAGUUCUGAAAG TtT	AL-DP- 6229
374-396	1248	GGUUAAGGUGUACCGAAG UCUUC	9	UGGAGUGUGAACCGAAGUG uTtT	10	ACACUUCGGUAAACAUCAA TtT	AL-DP- 6230
205-227	1249	UGUUAAGGUGGAGACCAU GUAAU	11	GUAGAAACGAGGACCAUUU ATtT	12	UAAAGUGGUGGCAUUCAC TtT	AL-DP- 6231
1176-1198	1250	ACUUCGAGTACAUUGCAA UACUC	13	UCUGAGUACAUUGGAAUA uTtT	14	AUAATTCcAAUGuACGcAGA TtT	AL-DP- 6232
386-408	1251	CGUAGGUGUGUGUGUCC AAUUC	15	GAGAGUGUGUGUGUGCAA uTtT	16	AUUGGACAAACcAACACUUC TtT	AL-DP- 6233
416-438	1252	AGUUAUUAAGGCUAUA UUUA	17	UUUAUAAGGCUUAUAUU cTtT	18	CAUAUAUAAGCCcAAUAUA TgT	AL-DP- 6234
485-507	1253	GCAGGUGAAAGGUCACC UAAUG	19	AAGCGAAGAGGUCACCUA ATtT	20	UAGGUGAGCCUUUcACCUG TtT	AL-DP- 6235
476-498	1254	UUUUGAAGGAGAGGGA AAGCU	21	UUAGAAAGGAGGcGAA ATtT	22	CUUDGACCUUCCAUUGUA TtT	AL-DP- 6236
486-508	1255	GAAGGAGAAAGGUCACCU AAGUA	23	AGGAGAAAGGUCACCUAA uTtT	24	AUuAGGUGACCUUUCACCU TtT	AL-DP- 6237
487-509	1256	AAGGAGAAAGGUCACCUA AGGUA	25	GGGAAAGGUCACCUAAU cTtT	26	cAUuAGGUGACCUUUCACC TtT	AL-DP- 6238
1066-1088	1257	UUUUGAAGGAGAAUUA AAGUA	27	CUUUAAGGAGAAUUAUA cTtT	28	GUUuAGAGUCCGAAAGG TtT	AL-DP- 6239
1256-1278	1258	ACUUCUUAAGGAGGUA UACUG	29	CUUUAUAAGGAGGUAUA cTtT	30	GUAGGAGUCCGAAUAAGAG TtT	AL-DP- 6240
2329-2351	1259	GAAGGAGAGGUGUGUGUU GUUAC	31	GAGAGAGGUGUGUGUUUG GTtT	32	CCAAAGGAGGAAUUCUC TtT	AL-DP- 6241
1077-1099	1260	GAAGGUAAGUAACUAGA AUUCU	33	AUUAAGUAACUAGGAU cTtT	34	GAUUCUAGUUGGUUAGAU TtT	AL-DP- 6242
1244-1266	1261	ACUUCACAAAGAGUUCU UAUUA	35	uCACCAAAAGAGUcUA uTtT	36	AuAAGAGCUUUUUUGUGA TtT	AL-DP- 6243
637-659	1262	AAAGGCUUUGGAGGUC UUAAU	37	GAGCUUUGGAGGUCUU ATtT	38	UAAGAAGAUcAAAAAGCUC TtT	AL-DP- 6244
1117-1139	1263	GGGUAACAAGACUUA UAAU	39	cGUAcAAGAAACUUAUA ATtT	40	UUUAAGAUUGGUUUUAAG TtT	AL-DP- 6245
373-395	1264	AGAUGGAGUUUACCGAA GUGUU	41	AuuCAUGUUUACCGAA GTtT	42	cACUUCGGUAAACAGCAAG TtT	AL-DP- 6246

1079-1101	1265	AUCUAAACUACUAGAAD OCUCC	43	cuAAACUAAACUAAACcc bTtT	44	ACGAGUcUAGUUAGUUAG TtT	AL-DP- 6247
383-405	1266	GUACCGAAGUUGUUUG UCCAA	45	ACCGAAGUUGUUUGUc cTtT	46	GGACAAACAAACAUUCGCU TtT	AL-DP- 6248
200-222	1267	CGAGUUGGUGAGGAGCAG ACCAU	47	uCGAGUUGAGAGGAGc cTtT	48	GGCCCGAUCUcACGACCA TtT	AL-DP- 6249

【0224】

表 1 b . E g 5 / K S P の d s 二重鎖の分析

【表 1 - 2】

二重鎖名	25 nM で の単回用 量スクリ ーニング [残存 mRNA の%]	第 2 のスクリーニ ングの標準偏差 (4 回の繰り返し 中)	
AL-DP-6226	23%	3%	10
AL-DP-6227	69%	10%	
AL-DP-6228	33%	2%	
AL-DP-6229	2%	2%	

【表 1 - 3】

AL-DP-6230	66%	11%	20
AL-DP-6231	17%	1%	
AL-DP-6232	9%	3%	
AL-DP-6233	24%	6%	
AL-DP-6234	91%	2%	30
AL-DP-6235	112%	4%	
AL-DP-6236	69%	4%	
AL-DP-6237	42%	2%	
AL-DP-6238	45%	2%	40
AL-DP-6239	2%	1%	
AL-DP-6240	48%	2%	
AL-DP-6241	41%	2%	
AL-DP-6242	8%	2%	40
AL-DP-6243	7%	1%	
AL-DP-6244	6%	2%	
AL-DP-6245	12%	2%	
AL-DP-6246	28%	3%	40
AL-DP-6247	71%	4%	
AL-DP-6248	5%	2%	
AL-DP-6249	28%	3%	

【 0 2 2 5 】

表 2 a . E g 5 / K S P の d s R N A 二重鎖の配列

【表 2 - 1】

配列 番号	19 番体の標的部位の配列	配列 番号	センス配列 (2'-3')	配列 番号	アンチセンス配列 (3')	二重鎖名
168	CRURUCUAGUCGUUCCCA	49	cAuAGucuuAGucGUuuccATsT	50	UGGGAAcGAGcuAGAGuAUGTsT	AD-12072
169	AGCGCCACUUCACAAUAGAG	51	AGCGCCcAuucAAuAGuAGTsT	52	CUUcUAUUGAAUGCGGCCUTsT	AD-12073
170	GGAAAGCUGACGCCCAUUC	53	GGAAAGcuAGCGCCcAuucATsT	54	GAUUGUGCGcuAGCUUUCUTsT	AD-12074
171	GAAGCUGAGCGCCCAUCCA	55	GAAGcuAGCGCCcAuucATsT	56	UGAAUGUGCGcuAGCUUUCUTsT	AD-12075
172	AGAAACUACGAGUUGAUGGA	57	AGAAAcuAcGAGuUGAGAGTsT	58	UCcAUcAAUGCGuAGUUCUTsT	AD-12076
173	UGUUCGUUAGUAGAAACCU	59	uGUuCGuuAuCGAAAuucTsT	60	AGAUUCUGAGuAAGGAAcATsT	AD-12077
174	CAGAUACGUCUCCGACGCC	61	cAGAUuAcGUcucCGACGcTsT	62	GGCUCGcAGAGGcAAUCUGTsT	AD-12078
175	GCGCCCAUCCAAUAGUAGA	63	GcGCCcAuucAAuAGuAGATsT	64	UCcACuAUUGRAUGGCCcATsT	AD-12079
176	UGGCACUACUUCUUGCGUAG	65	uGGcACuAucUucUGCGuATsT	66	AuAGCGcAAAGuAUGGcATsT	AD-12080
177	CAGAGCGGAAAUUAGCGCC	67	cAGAGCGGAAAGcuAGCGcTsT	68	CGCGuAGCGUUCGCCCGUTsT	AD-12081
178	AGACCUUAUUGGUUAACU	69	AGAcCuUAuUGGUuAAcTsT	70	CGAUuACcAAuAAAGUcUTsT	AD-12082
179	AGUCUCUUGGAGCGCCGAC	71	AuucCuUucUGGAGCGcATsT	72	GuAGCGCCCGcAAAGAGuATsT	AD-12083
180	GGCUGGUUAUUCUCCACGU	73	GGCuGGuAAuAucUCCAcTsT	74	ACGGCGAAAGuAAAGcAGCGTsT	AD-12084
181	CGGGAAGAGCTAGCGGCCAU	75	GcGGAAAGcAGAGCTAGCGTsT	76	AUGGGCGCGuAGCUUUCGUTsT	AD-12085
182	UGGCACUAGCUUUGCGUAG	77	uGGcACuAucUucUGCGuATsT	78	cAuAGCGcAAAGAGuAGTsT	AD-12086
183	GUUAUAUCCACCUAGCCCU	79	GuAAuAucUCCAcCUAGcTsT	80	AGGGuAGCGGAAuAAAGTsT	AD-12087
184	AGACCUUAUUGGUUAACU	81	AGAcCuUAuUGGUuAAcTsT	82	CGAUuACcAAuAAAGUcUTsT	AD-12088
185	AGGAGCUGAAGUUGCGUAC	83	AGGAGcuGAAuAGCGGuATsT	84	GuAAcCGcuAAUcAGTUCGUTsT	AD-12089
186	GAAGUAUACUAGACCUUAGU	85	GAAGUAUcUAGACCUuATsT	86	AuAAGGUUcUAGUAGCGUTsT	AD-12090
187	GACAGUAGCGUAGUAGAGTA	87	GAcAGUAGCGcAGUAGAGTsT	88	uAGCUuAUGCGcAGUAGTsT	AD-12091
188	AAACCCACUAGAGUAGUCC	89	AAAcCCAcuAGAGUAGcTsT	90	GGAcCUAcCUAGUGGUUcTsT	AD-12092
189	UGCCUAGACUUCUCCUAGU	91	uGCCuAGAcuucUCCuATsT	92	AAuAUGGGAAGCGuAGGATsT	AD-12093
190	UAGAGUUGGCUUUAUUGCCU	93	uAGAGuucGUUAuUUGCGTsT	94	AGCGGAAuAGCGGAGUcATsT	AD-12094
191	GGCUCGCCAGCCAAUUGCU	95	GcGucUcAGCCcAAuUGcTsT	96	ACGAUUGUGCGCGcAGCGTsT	AD-12095
192	ACGUAAGCGCCCAUUCGAA	97	AGCuAGCGCCcAuucAAuATsT	98	uAUUcAAUGCGCGcAGCGTsT	AD-12096
193	GAAGACUACGAGUUGAGAG	99	GAAGAcuAcGAGuUGAGTsT	100	CUcCAUcAAUGCGcAGUUCTsT	AD-12097
194	CGGAUAAGAGUAGAGAUCA	101	cCGUAAGAGuAGAGAuATsT	102	UGAUUCUcAUUcUUAUGCGTsT	AD-12098
195	UAGCGCCCGUUCACAGUA	103	uAGCGCCcGUucAAuAGUATsT	104	uACuAUUGAGUGCGCGcATsT	AD-12099
196	UUGCGGUAUUGGCGAAAGU	105	uUUGCGUAuUGGCGAAAGTsT	106	CAUUGUGCGcAAuACGcAAATsT	AD-12100
197	CACGUAACCUUACUACAAU	107	cACGUAAcCUuACuAAuTsT	108	AUUGGUAUGCGGcAGCGTsT	AD-12101
198	UCUUGCGUAGUGCGAAAC	109	uCUuUGCGuAGUGCGcATsT	110	GUUUGCGcAAuACGcAAAGATsT	AD-12102
199	CGGAAGUGUUGUUGGCGA	111	cCGGAUGUGuUGUUGCGTsT	112	UGGAcAAuCAAGcAGUUGCGTsT	AD-12103
200	AGACCGGAAGAGUAGCGCC	113	AGAcCGGAAGAGuAGCGcTsT	114	CGCGCGcAGCGUUGCGCGTsT	AD-12104
201	CGUAGCGCCCAUUCAGAG	115	GcuAGCGCCcAuucAAuATsT	116	cCAUUGAGUUGCGCGcAGTsT	AD-12105
202	AAcUAGCGUAGCGAAAGCG	117	AAcUuAGCGuAGCGAAAGTsT	118	CGAGUUCGcAGcAGuAAcCGTsT	AD-12106
203	GUAGGAAACUGGAGAGUUG	119	GuAGGAAcUGGAGAGuUGTsT	120	CcAAUUCUcAGUUGGcAGTsT	AD-12107
204	AGGAACUGGAGAGUUGCGU	121	AGGAACUGGAGAGuUGCGTsT	122	AGCGAAUUCGCGcAGUUGTsT	AD-12108
205	AGAUUGAGUUGUACCGGAAG	123	AGAUuGAGuUGUACCGTsT	124	CGUUGGAAuAAAGcAAUUGTsT	AD-12109
206	UAUGGGCGUAAUUGGACU	125	uAUGGGCGuAAuUGGAcTsT	126	AGUGCGAAuAAAGCGcAAATsT	AD-12110
207	AUUUGCGGUAGCGCCAA	127	AuUuUGCGuAGCGCCcAAATsT	128	UGUGGCGcAAuAGCGcAAAGATsT	AD-12111
208	ACUUGAGUGUGUCCACUC	129	AcuUAGUGuUGUCCAcTsT	130	GAUGGCGAAAGAGcAGAGTsT	AD-12112
209	AACUACGAGUUGAUUGAAG	131	AAcUAcGAGuUGAUUGAGTsT	132	UGCGCGcAAuAAUGCGuAGTsT	AD-12113
210	GAUAGAGAGAGCGCGGAAG	133	GAUAGAGAGAGCGcAGAGTsT	134	CUUGCGcAGCGCGcUuAGTsT	AD-12114
211	UGGAGAGACCGAAACCTACU	135	uGGAGAGAcuAAAcCTAcTsT	136	AGUuAGUUGAGAGUUGGATsT	AD-12115
212	AUCUAAACGAGAAUCCGCCA	137	AUCuAAACGAGAAUCCGTsT	138	UGGAGAGUUGcAGUuAGUUGTsT	AD-12116
213	GUAGCGUAGAGAGAGAGU	139	GUAGCGuAGAGAGAGAGTsT	140	AGUUGCGUUGCGcAGAGTsT	AD-12117
214	AGCGUAAGAGAGCGAGUGA	141	AGcGUAAAGAGCGAGuUGTsT	142	UCAGUUGCGUUGcAGAGTsT	AD-12118
215	AGCGAGUGGACGAGACAA	143	AGCGAGuUGGACGAGAcTsT	144	UGUGUGUUGGCGcAGCGTsT	AD-12119
216	UGCGCGAGAAAGUAGAGAG	145	uGGCGAGuAAAGAGAGAGTsT	146	CGUUGcAGUUGcAGCGcATsT	AD-12120
217	UCUAGAGCGAUUAGGCAAG	147	uCUAGAGCGAuUAGGcATsT	148	UGUGGAGCGuAAAGCGUAGTsT	AD-12121
218	ACUAGCGCGAGUUGCGUUG	149	AcuAGCGCGAGuUGCGUUGTsT	150	GAAGCGcAAuAAAGCGUAGTsT	AD-12122
219	GCGCGAGUACAGCUUUAAG	151	GcCGCGAGuAAAGCUUUAAGTsT	152	AUuAAAGGUGGAGUUGCGTsT	AD-12123
220	UUAUUGCGCGAGAGCGGA	153	uUAUUGCGCGAGAGCGTsT	154	UGCGCGCGCGcAAuAAATsT	AD-12124
221	UUAUGGAGAAUCAAACUA	155	uUAUGGAGAAUCAAACUATsT	156	uAGUUGAGAGUUGCGuAAATsT	AD-12125
222	CUAGCGCGCUUUCAAUAGG	157	CUAGCGCGCUUUCAAUAGTsT	158	ACuAAUUGAGUUGCGCGuAGTsT	AD-12126
223	AAUAGUAGAGAGUUGAGUCC	159	AAuAGUAGAGAGUUGAGTsT	160	AGGAGcAGUUGcAGcAAUUTsT	AD-12127
224	UAGCGAAAGAAUUAAGUGU	161	uAGCGAAAGAAUUAAGUUGTsT	162	AcAGCGcAGUUGUUGCGuATsT	AD-12128
225	AGAGUUGAGUGUAGGAAAG	163	AGAGUUGAGUGUAGGAGTsT	164	AGUUGCGcAGCGuAAcUUGTsT	AD-12129
226	ACGAAACAGAUUAGUGGCU	165	AcuAAACAGAUUAGUGGUGTsT	166	AAAcAGUcAAUUGUUGAGTsT	AD-12130
227	CUUUGCGUAGGCGCAAACT	167	CUUUGCGUAGGCGCAAACTTsT	168	AGUUGGCGcAAuACGcAAAGTsT	AD-12131
228	AUAGAGAGAGUAGACUGGG	169	AUAGAGAGAGUAGACUGGTsT	170	CGAGCGcAAuACUUGcAAUUTsT	AD-12132
229	AUAUUGCCACGUAUCCGUG	171	AuAAUUGCCACGUAUCCGUGTsT	172	GAAGCGuACCGUGGAAUUGTsT	AD-12133
230	ACGUAGCCUUGCAUCAAUU	173	AcGUAGCCUUGCAUCAAUUTsT	174	AAUUGGAGUAGAGGCGcAGTsT	AD-12134
231	CGUAGCCUUGCAUCAAUU	175	cGUAGCCUUGCAUCAAUUTsT	176	AAAUUGGAGUAGAGGCGcAGTsT	AD-12135
232	GUAGCCUUGCAUCAAUUUU	177	GuAGCCUUGCAUCAAUUUUTsT	178	AAAUUGGAGUAGAGGCGcAGTsT	AD-12136
233	AAcUAGCGAGUAGAGGAG	179	AAcUuAGCGAGUAGAGGAGTsT	180	GuAGCGcAAUcAGUuAAAGTsT	AD-12137
234	UGGAGUAGAGUUGGCGUG	181	uGGAGUAGAGUUGGCGUGTsT	182	cAGAGcAGUUGGAGUAGTsT	AD-12138
235	UGGUAUAGCGAGUAGCGUG	183	UGGUAUAGCGAGUAGCGUGTsT	184	UCAGAGGAGCGAGUuAAAGATsT	AD-12139
236	ACAGUAGCGAGAGAGAGU	185	AcAGUAGCGAGAGAGAGTsT	186	cAGCGUUGUUGGAGUAGCGTsT	AD-12140
237	AAGAAACUAGAGUAGAGUG	187	AAGAAAcUAGAGUAGAGUGTsT	188	CGAUcAAUcAGUAGUUGUUGTsT	AD-12141

10

20

30

40

【表 2 - 2】

配列 番号	19 量体の標的配列	配列 番号	センス配列	(5'-3')	配列 番号	アンチセンス配列	(3'-5')	二重鎖名
138	AAACUACGAGUUGAGGAGA	189	AAAGUACGAGUUGAGGAGAT	T	190	UCUGCAUCAGUUGAGUUT	T	AD-12142
139	UGGAGGUGUUGAGUAGAGA	191	UGGAGGUGUUGAGUAGAGAT	T	192	CCUCCUUAUUAAGAGGUC	AT	AD-12143
140	CUACUACGAGUUGAGGAGA	193	CUACUACGAGUUGAGGAGAT	T	194	CGGCGAGGAGUUGAGUAGT	T	AD-12144
141	GAAGUACGAGUUGAGGAGA	195	GAAGUACGAGUUGAGGAGAT	T	196	UUGGUGUUGAGUUGAGUUT	T	AD-12145
142	AUGGUGAGUUGAGGAGAGA	197	AUGGUGAGUUGAGGAGAGAT	T	198	UUGGUGUUGAGUUGAGUUT	T	AD-12146
143	AAAAAGUUGGUGUUGAGGAGA	199	AAAAAGUUGGUGUUGAGGAGAT	T	200	CUCAAGAGGAGUUGAGUUT	T	AD-12147
144	GAGGAGGAGUUGAGGAGAGA	201	GAGGAGGAGUUGAGGAGAT	T	202	GAAGCCGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12148
145	GGAGGAGUUGAGGAGAGAGA	203	GGAGGAGUUGAGGAGAGAT	T	204	GGAGAGGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12149
146	GAGGAGGAGUUGAGGAGAGA	205	GAGGAGGAGUUGAGGAGAT	T	206	CUAGAGGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12150
147	AGGAGAGUUGAGGAGAGAGA	207	AGGAGAGUUGAGGAGAGAT	T	208	UUGGAGAGGAGUUGAGGAT	T	AD-12151
148	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGA	209	CGGAGAGUUGAGGAGAGAT	T	210	CUAGAGGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12152
149	CGAAGAGUUGAGGAGAGAGA	211	CGAAGAGUUGAGGAGAGAT	T	212	UUGGAGAGGAGUUGAGGAT	T	AD-12153
150	GAUGGAGUUGAGGAGAGAGA	213	GAUGGAGUUGAGGAGAGAT	T	214	CAAGUUGGAGUUGAGGAT	T	AD-12154
151	ACGUGAGUUGAGGAGAGAGA	215	ACGUGAGUUGAGGAGAGAT	T	216	CGAGAGGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12155
152	UGAGGAGUUGAGGAGAGAGA	217	UGAGGAGUUGAGGAGAGAT	T	218	CGGAGAGUUGAGGAGAGAT	T	AD-12156
153	AUGGAGUUGAGGAGAGAGAGA	219	AUGGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	220	CGGAGAGUUGAGGAGAGAT	T	AD-12157
154	UAGGAGUUGAGGAGAGAGAGA	221	UAGGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	222	CGGAGAGUUGAGGAGAGAT	T	AD-12158
155	AAAGGAGUUGAGGAGAGAGAGA	223	AAAGGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	224	CGGAGAGUUGAGGAGAGAT	T	AD-12159
156	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	225	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	226	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12160
157	UGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	227	UGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	228	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12161
158	UGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	229	UGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	230	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12162
159	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	231	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	232	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12163
160	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	233	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	234	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12164
161	AGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	235	AGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	236	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12165
162	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	237	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	238	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12166
163	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	239	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	240	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12167
164	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	241	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	242	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12168
165	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	243	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	244	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12169
166	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	245	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	246	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12170
167	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	247	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	248	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12171
168	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	249	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	250	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12172
169	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	251	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	252	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12173
170	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	253	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	254	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12174
171	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	255	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	256	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12175
172	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	257	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	258	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12176
173	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	259	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	260	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12177
174	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	261	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	262	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12178
175	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	263	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	264	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12179
176	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	265	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	266	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12180
177	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	267	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	268	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12181
178	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	269	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	270	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12182
179	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	271	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	272	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12183
180	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	273	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	274	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12184
181	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	275	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	276	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12185
182	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	277	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	278	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12186
183	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	279	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	280	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12187
184	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	281	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	282	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12188
185	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	283	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	284	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12189
186	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	285	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	286	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12190
187	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	287	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	288	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12191
188	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	289	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	290	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12192
189	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	291	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	292	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12193
190	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	293	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	294	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12194
191	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	295	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	296	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12195
192	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	297	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	298	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12196
193	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	299	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	300	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12197
194	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	301	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	302	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12198
195	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	303	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	304	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12199
196	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	305	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	306	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12200
197	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	307	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	308	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12201
198	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	309	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	310	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12202
199	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	311	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	312	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12203
200	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	313	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	314	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12204
201	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	315	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	316	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12205
202	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	317	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	318	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12206
203	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	319	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	320	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12207
204	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	321	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	322	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12208
205	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	323	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	324	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12209
206	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	325	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	326	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12210
207	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	327	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	328	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12211
208	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	329	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	330	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12212
209	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAGA	331	CGGAGAGUUGAGGAGAGAGAT	T	332	CGGAGAGAGUUGAGGAGAT	T	AD-12213

10

20

30

40

【表 2 - 3】

配列番号	19 量体の標的部位の配列	配列番号	センス配列 (5'→3')	配列番号	アンチセンス配列 (3'→5')	二重鎖名
110	ACAGCCUGAGCCGUAUAG	333	ACAGCCUGAGCCGUAUAGT	334	CAUUAACAGCCUGAGCCGUAUAGT	AD-12214
111	AAAGAAAGAGACAAUUCGG	335	AAAGAAAGAGACAAUUCGGT	336	CGGAAUUCGACAAUUCGGT	AD-12215
112	CACACUGGAGAGGUCUAAA	337	CACACUGGAGAGGUCUAAAT	338	UUAAGACCCUGGAGAGGUCUAAAT	AD-12216
113	CACUGGAGAGGUCUAAAGU	339	CACUGGAGAGGUCUAAAGUT	340	ACUUAAGAGGUCUAAAGUT	AD-12217
114	ACUGGAGAGGUCUAAAGUG	341	ACUGGAGAGGUCUAAAGUGT	342	CAUUAAGAGGUCUAAAGUGT	AD-12218
115	CGUGGAGAGGUCUAAAGUC	343	CGUGGAGAGGUCUAAAGUC	344	GACGAAUUGGAGAGGUCUAAAGUC	AD-12219
116	GAGGAGAGGUCUAAAGUC	345	GAGGAGAGGUCUAAAGUC	346	GGGUGGAGAGGUCUAAAGUC	AD-12220
117	CAUUGAGAGGUCUAAAGUC	347	CAUUGAGAGGUCUAAAGUC	348	ACUUGGAGAGGUCUAAAGUC	AD-12221
118	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	349	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	350	UGAAUAGAGGUCUAAAGUC	AD-12222
119	GAGAGAGGUCUAAAGUC	351	GAGAGAGGUCUAAAGUC	352	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12223
120	UCCGAGAGGUCUAAAGUC	353	UCCGAGAGGUCUAAAGUC	354	UCUAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12224
121	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	355	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	356	AGUAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12225
122	GAGAGAGGUCUAAAGUC	357	GAGAGAGGUCUAAAGUC	358	CAUAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12226
123	UUAAGAGGUCUAAAGUC	359	UUAAGAGGUCUAAAGUC	360	AGGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12227
124	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	361	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	362	CUUAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12228
125	UCCGAGAGGUCUAAAGUC	363	UCCGAGAGGUCUAAAGUC	364	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12229
126	UCCGAGAGGUCUAAAGUC	365	UCCGAGAGGUCUAAAGUC	366	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12230
127	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	367	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	368	UGGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12231
128	CAUAGAGGAGGUCUAAAGUC	369	CAUAGAGGAGGUCUAAAGUC	370	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12232
129	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	371	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	372	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12233
130	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	373	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	374	GGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12234
131	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	375	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	376	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12235
132	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	377	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	378	UCAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12236
133	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	379	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	380	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12237
134	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	381	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	382	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12238
135	CUUAGAGGAGGUCUAAAGUC	383	CUUAGAGGAGGUCUAAAGUC	384	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12239
136	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	385	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	386	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12240
137	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	387	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	388	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12241
138	UCCGAGAGGAGGUCUAAAGUC	389	UCCGAGAGGAGGUCUAAAGUC	390	GGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12242
139	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	391	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	392	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12243
140	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	393	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	394	CAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12244
141	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	395	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	396	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12245
142	UCCGAGAGGAGGUCUAAAGUC	397	UCCGAGAGGAGGUCUAAAGUC	398	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12246
143	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	399	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	400	UCAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12247
144	UCCGAGAGGAGGUCUAAAGUC	401	UCCGAGAGGAGGUCUAAAGUC	402	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12248
145	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	403	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	404	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12249
146	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	405	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	406	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12250
147	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	407	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	408	GGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12251
148	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	409	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	410	CUAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12252
149	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	411	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	412	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12253
150	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	413	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	414	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12254
151	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	415	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	416	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12255
152	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	417	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	418	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12256
153	GGAGAGGAGGUCUAAAGUC	419	GGAGAGGAGGUCUAAAGUC	420	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12257
154	CAAGAGGAGGUCUAAAGUC	421	CAAGAGGAGGUCUAAAGUC	422	CUAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12258
155	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	423	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	424	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12259
156	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	425	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	426	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12260
157	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	427	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	428	CAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12261
158	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	429	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	430	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12262
159	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	431	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	432	GGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12263
160	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	433	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	434	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12264
161	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	435	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	436	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12265
162	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	437	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	438	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12266
163	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	439	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	440	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12267
164	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	441	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	442	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12268
165	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	443	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	444	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12269
166	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	445	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	446	CUAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12270
167	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	447	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	448	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12271
168	UCCGAGAGGAGGUCUAAAGUC	449	UCCGAGAGGAGGUCUAAAGUC	450	GGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12272
169	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	451	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	452	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12273
170	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	453	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	454	UTAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12274
171	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	455	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	456	CUAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12275
172	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	457	GAAGAGGAGGUCUAAAGUC	458	ACAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12276
173	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	459	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	460	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12277
174	GAGAGGAGGUCUAAAGUC	461	GAGAGGAGGUCUAAAGUC	462	CUAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12278
175	UAGAGGAGGUCUAAAGUC	463	UAGAGGAGGUCUAAAGUC	464	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12279
176	CAGAGGAGGUCUAAAGUC	465	CAGAGGAGGUCUAAAGUC	466	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12280
177	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	467	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	468	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12281
178	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	469	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	470	UGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12282
179	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	471	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	472	CGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12283
180	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	473	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	474	AGAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12284
181	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	475	UUAAGAGGAGGUCUAAAGUC	476	AAAGAGGAGGUCUAAAGUC	AD-12285

10

20

30

40

【表 2 - 4】

配列 番号	19 量体の標的部位の配列	配列 番号	センス配列 (5'→3')	配列 番号	アンチセンス配列 (3'→5')	二重鎖名
102	GAUUGAUUGUUAUUGGAAGU	477	GAUUGAUUGUUAUUGGAAGU	476	ACUUUGGUUAACAUCAAUCTsT	AD-12286
103	GCACUUAUCUUUGGCUAGGG	479	GCACUUAUCUUUGGCUAGGG	480	CCAUACGCCAAAGAUAGUGCTsT	AD-12287
104	UGCUAUAUAUCCACCGTACC	481	UGCUAUAUAUCCACCGTACC	482	GGUACCGUGGAAGUAUACCATsT	AD-12288
105	AGCAAGCUGGUUAACACAG	483	AGCAAGCUGGUUAACACAG	484	CCGUUUUAAGCAAGCUGGUCTsT	AD-12289
106	CAGAAACCAUUAUUAUUG	485	CAGAAACCAUUAUUAUUG	486	CAUUAUUAAGCGGUUUCUGCTsT	AD-12290
107	AAUUAUUGGAGGUGUUGAA	487	AAUUAUUGGAGGUGUUGAA	488	UUAACACCUCCCAUUAAGUUTsT	AD-12291
108	UGGAGAGAGGUUAAGGCG	489	UGGAGAGAGGUUAAGGCG	490	CCACUUUAAGACCTCUCUAGCTsT	AD-12292
109	AAABAAAGUAUAAGGACAG	491	AAABAAAGUAUAAGGACAG	492	ACUUGCCUUAUAUUGUUUUTsT	AD-12293
110	GAUUUUUGAGAGGACCCA	493	GAUUUUUGAGAGGACCCA	494	UGGGUAGAUUAUCAAUUTsT	AD-12294
111	GUUUUUUGGUUUGGCAAC	495	GUUUUUUGGUUUGGCAAC	496	GUUUUUUGGUUUGGCAAC	AD-12295
112	AGGAGGCGUUGGCGUGUAG	497	AGGAGGCGUUGGCGUGUAG	498	AAUUAUUAAGGCGUUGGCG	AD-12296
113	GGAGGCGUUGGCGUGUAG	499	GGAGGCGUUGGCGUGUAG	500	UAUUAUUAAGGCGUUGGCG	AD-12297
114	CAUUAAGGAGAGGUGUAG	501	CAUUAAGGAGAGGUGUAG	502	GGAGGAGAGGAGGUGUAG	AD-12298
115	GUUAUAUUGGAGAGGUGUAG	503	GUUAUAUUGGAGAGGUGUAG	504	AAGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12299
116	UACCGGUGGAGAGGUGUAG	505	UACCGGUGGAGAGGUGUAG	506	AAAUUAUUGGAGAGGUGUAG	AD-12300
117	AGAGAGGAGAGGUGUAG	507	AGAGAGGAGAGGUGUAG	508	GGGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12301
118	AAAUUGGAGAGGUGUAG	509	AAAUUGGAGAGGUGUAG	510	CCGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12302
119	UGAGAGGAGAGGUGUAG	511	UGAGAGGAGAGGUGUAG	512	AAUUAUUGGAGAGGUGUAG	AD-12303
120	AAAGAGGAGAGGUGUAG	513	AAAGAGGAGAGGUGUAG	514	GGGAGGAGAGGUGUAG	AD-12304
121	AAAGAGGAGAGGUGUAG	515	AAAGAGGAGAGGUGUAG	516	GGGAGGAGAGGUGUAG	AD-12305
122	AUAGGAGAGGUGUAG	517	AUAGGAGAGGUGUAG	518	UAUUAUUGGAGAGGUGUAG	AD-12306
123	UGAGAGGAGAGGUGUAG	519	UGAGAGGAGAGGUGUAG	520	CCAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12307
124	UGAGAGGAGAGGUGUAG	521	UGAGAGGAGAGGUGUAG	522	CCAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12308
125	GUUAGGAGAGGUGUAG	523	GUUAGGAGAGGUGUAG	524	AGGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12309
126	AUAGGAGAGGUGUAG	525	AUAGGAGAGGUGUAG	526	CAGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12310
127	AUAGGAGAGGUGUAG	527	AUAGGAGAGGUGUAG	528	AUAGGAGAGGUGUAG	AD-12311
128	GUUAGGAGAGGUGUAG	529	GUUAGGAGAGGUGUAG	530	GAAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12312
129	GAUAGGAGAGGUGUAG	531	GAUAGGAGAGGUGUAG	532	UAAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12313
130	GAUAGGAGAGGUGUAG	533	GAUAGGAGAGGUGUAG	534	CCAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12314
131	CAGAGAGGAGAGGUGUAG	535	CAGAGAGGAGAGGUGUAG	536	UAAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12315
132	GUUAGGAGAGGUGUAG	537	GUUAGGAGAGGUGUAG	538	CCAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12316
133	AAAGAGGAGAGGUGUAG	539	AAAGAGGAGAGGUGUAG	540	GGGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12317
134	AGGAGAGGAGAGGUGUAG	541	AGGAGAGGAGAGGUGUAG	542	UAAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12318
135	GAUAGGAGAGGUGUAG	543	GAUAGGAGAGGUGUAG	544	GGGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12319
136	GUUAGGAGAGGUGUAG	545	GUUAGGAGAGGUGUAG	546	UAAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12320
137	GAUAGGAGAGGUGUAG	547	GAUAGGAGAGGUGUAG	548	GGGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12321
138	ACUAGGAGAGGUGUAG	549	ACUAGGAGAGGUGUAG	550	AGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12322
139	ACCAGGAGAGGUGUAG	551	ACCAGGAGAGGUGUAG	552	AGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12323
140	AGAAGGAGAGGUGUAG	553	AGAAGGAGAGGUGUAG	554	GGGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12324
141	CAUAGGAGAGGUGUAG	555	CAUAGGAGAGGUGUAG	556	CAGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12325
142	ACCAGGAGAGGUGUAG	557	ACCAGGAGAGGUGUAG	558	AAUAGGAGAGGUGUAG	AD-12326
143	GGUAGGAGAGGUGUAG	559	GGUAGGAGAGGUGUAG	560	CUUAGGAGAGGUGUAG	AD-12327
144	GGUAGGAGAGGUGUAG	561	GGUAGGAGAGGUGUAG	562	UUAGGAGAGGUGUAG	AD-12328
145	AGAGGAGAGGUGUAG	563	AGAGGAGAGGUGUAG	564	UGGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12329
146	UGAGGAGAGGUGUAG	565	UGAGGAGAGGUGUAG	566	UGGAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12330
147	AAUAGGAGAGGUGUAG	567	AAUAGGAGAGGUGUAG	568	GAUAGGAGAGGUGUAG	AD-12331
148	CAGAGGAGAGGUGUAG	569	CAGAGGAGAGGUGUAG	570	GAUAGGAGAGGUGUAG	AD-12332
149	UGGAGGAGAGGUGUAG	571	UGGAGGAGAGGUGUAG	572	UGGAGGAGAGGUGUAG	AD-12333
150	AGUAGGAGAGGUGUAG	573	AGUAGGAGAGGUGUAG	574	GAUAGGAGAGGUGUAG	AD-12334
151	UAGAGGAGAGGUGUAG	575	UAGAGGAGAGGUGUAG	576	AGUAGGAGAGGUGUAG	AD-12335
152	AGGAGGAGAGGUGUAG	577	AGGAGGAGAGGUGUAG	578	UAGAGGAGAGGUGUAG	AD-12336
153	UUAGGAGAGGUGUAG	579	UUAGGAGAGGUGUAG	580	UGGAGGAGAGGUGUAG	AD-12337

10

20

30

【0226】

表 2 b . E g 5 / K S P の d s R N A 二重鎖の分析

【表 2 - 5】

Eq5 / KSP 二重 鎖名	50 nM での第 1 の 単回用量スクリー ニング[残存 mRNA の%]	第 1 のスクリーニングの 標準偏差 (4 回の繰り返 し中)	25 nM での第 2 の 単回用量スクリー ニング[残存 mRNA の%]	第 2 のスクリーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)	25 nM での第 3 の単回用量 スクリーニン グ	第 3 のスクリーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)
AD-12072	6.5%	2%	6.0%	5%		
AD-12073	2.6%	2%	2.7%	6%		
AD-12074	5.3%	1%	5.8%	9%		
AD-12075	5.6%	4%	5.2%	4%		
AD-12076	2.1%	4%	1.7%	5%		
AD-12077	2.1%	5%	3%	1%		
AD-12078	2.2%	3%	2%	2%		
AD-12079	2.2%	1.7%	1.5%	7%		
AD-12080	6.2%	4%	5.2%	1.4%		
AD-12081	2.4%	8%	3.0%	2.4%		
AD-12082	2.0%	2%	9.2%	5%		
AD-12083	8.2%	6%	6.5%	1.0%		
AD-12084	2.5%	6%	1.7%	4%		
AD-12085	2.7%	4%	1.2%	4%		
AD-12086	2.6%	5%	1.7%	5%		
AD-12087	9.5%	4%	5.0%	4%		
AD-12088	2.7%	6%	2.9%	2%		
AD-12089	6.9%	5%	6.4%	7%		
AD-12090	4.6%	1.5%	3.4%	3%		
AD-12091	1.4%	6%	1.7%	3%		
AD-12092	9.2%	2.6%	6.0%	5%		
AD-12093	8.4%	6%	7.0%	4%		
AD-12094	4.8%	3%	3.4%	1%		
AD-12095	1.4%	2%	1.5%	1%		
AD-12096	2.4%	1.1%	1.7%	1%		
AD-12097	2.0%	2%	2.1%	1%		
AD-12098	4.7%	1.4%	1.7%	3%		
AD-12099	8.7%	2%	4.8%	4%		
AD-12100	16.1%	1.7%	9.8%	3%		
AD-12101	4.4%	7%	1.7%	2%		
AD-12102	9.6%	1.7%	1.8%	1.6%		
AD-12103	2.9%	5%	2.0%	2%		
AD-12104	4.0%	8%	2.4%	2%		
AD-12105	9.9%	2%	3.6%	1.0%		
AD-12106	8.7%	6%	7.4%	1.9%		
AD-12107	2.9%	2%	3.2%	1.6%		
AD-12108	1.8%	4%	2.0%	3%		
AD-12109	6.9%	3%	4.6%	1.0%		
AD-12110	8.5%	5%	5.0%	1.4%		
AD-12111	6.4%	6%	5.1%	1.8%		
AD-12112	4.8%	4%	4.1%	5%		
AD-12113	1.7%	6%	1.4%	3%		
AD-12114	3.9%	6%	1.6%	4%		
AD-12115	8%	4%	7%	2%		
AD-12116	7.4%	5%	6.1%	7%		
AD-12117	2.1%	4%	2.0%	2%		
AD-12118	4.4%	4%	4.7%	6%		
AD-12119	3.7%	6%	2.4%	3%		
AD-12120	2.2%	5%	1.9%	4%		
AD-12121	3.1%	5%	2.2%	2%		
AD-12122	2.6%	1.6%	1.8%	1%		
AD-12123	1.8%	1%	1.6%			
AD-12124	2.8%	2%	1.6%			
AD-12125	1.5%	2%	1.4%			
AD-12126	1.1%	2.2%	5.7%			
AD-12127	5.4%	4%	4.7%	9%		
AD-12128	2.9%	2%	2.0%	2%		
AD-12129	2.2%	2%	1.9%	3%		
AD-12130	5.5%	6%	4.8%	7%		
AD-12131	3.8%	5%	2.2%	3%		
AD-12132	8.4%	3%	8.0%	1.5%		
AD-12133	3.4%	2%	2.6%	6%		
AD-12134	1.8%	3%	1.4%	2%		
AD-12135	5.6%	6%	5.7%	4%		

【表 2 - 6】

Eq5 / KSP 二重 鎖名	50 nM での第1の 単回用量スクリー ニング [残存 mRNA の %]	第1のスクリーニングの 標準偏差 (4 回の繰り返 し中)	25 nM での第2の 単回用量スクリー ニング [残存 mRNA の %]	第2のスクリーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)	25 nM での第 3の単回用量 スクリーニン グ	第3のスクリーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)
AD-12202	79%	6%	9%	5%		
AD-12203	176%	14%	25%	20%		
AD-12204	14%	7%	20%	5%		
AD-12205	62%	12%	65%	4%		
AD-12206	46%	3%	52%	12%		
AD-12207	57%	3%	40%	6%		
AD-12208	20%	6%	16%	3%		
AD-12209	107%	6%	100%	25%		
AD-12210	139%	11%	17%	14%		
AD-12211	16%	6%	10%	5%		
AD-12212	6%	6%	65%	6%		
AD-12213	24%	9%	12%	2%		
AD-12214	67%	14%	20%	17%		
AD-12215	29%	17%	13%	4%		
AD-12216	26%	4%	13%	1%		
AD-12217	26%	9%	27%	2%		
AD-12218	26%	5%	17%	3%		
AD-12219	47%	9%	24%	1%		
AD-12220	27%	6%	23%	7%		
AD-12221	28%	7%	25%	6%		
AD-12222	74%	9%	55%	5%		
AD-12223	74%	10%	67%	2%		
AD-12224	24%	2%	22%	2%		
AD-12225	7%	6%	74%	14%		
AD-12226	45%	6%	40%	6%		
AD-12227	62%	6%	47%	3%		
AD-12228	28%	7%	25%	6%		
AD-12229	54%	13%	37%	6%		
AD-12230	7%	17%	65%	4%		
AD-12231	32%	12%	23%	6%		
AD-12232	36%	3%	7%	2%		
AD-12233	38%	2%	32%	2%		
AD-12234	90%	5%	98%	7%		
AD-12235	57%	7%	46%	3%		
AD-12236	34%	6%	26%	2%		
AD-12237	42%	9%	22%	6%		
AD-12238	42%	6%	34%	6%		
AD-12239	42%	3%	40%	4%		
AD-12240	47%	6%	36%	5%		
AD-12241	69%	6%	70%	9%		
AD-12242	61%	2%	47%	3%		
AD-12243	36%	7%	33%	1%		
AD-12244	21%	7%	28%	1%		
AD-12245	61%	6%	65%	13%		
AD-12246	29%	2%	53%	6%		
AD-12247	57%	15%	60%	6%		
AD-12248	36%	6%	20%	2%	15%	7%
AD-12249	44%	3%	70%	13%	103%	34%
AD-12250	47%	5%	16%	3%	17%	4%
AD-12251	121%	28%	35%	8%	69%	40%
AD-12252	94%	19%	6%	6%	1%	3%
AD-12253	94%	33%	42%	6%	49%	27%
AD-12254	167%	58%	70%	5%	60%	32%
AD-12255	165%	27%	25%	6%	56%	16%
AD-12256	170%	63%	18%	5%	3%	4%
AD-12257	10%	4%	7%	2%	6%	2%
AD-12258	27%	9%	18%	3%	20%	6%
AD-12259	20%	5%	12%	2%	15%	5%
AD-12260	27%	7%	82%	7%	65%	13%
AD-12261	121%	11%	48%	7%	80%	22%
AD-12262	97%	30%	55%	6%	44%	18%
AD-12263	177%	57%	15%	11%	64%	35%
AD-12264	67%	6%	70%	1%	10%	4%
AD-12265	40%	6%	17%	1%	25%	10%
AD-12266	25%	9%	2%	1%	6%	4%
AD-12267	24%	10%	11%	1%	4%	3%

【表 2 - 7】

Eq5 / KSP 二重 鎖名	50 nMでの第1の 単回用量スクリ ーニング[残存 mRNA の%]	第1のスクリーニングの 標準偏差 (4 回の繰り返 し中)	25 nMでの第2の 単回用量スクリ ーニング [残存 mRNA の%]	第 2 のスクリーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)	25 nM での第 3 の単回用量 スクリーニン グ	第 3 のスクリーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)
AD-12136	62%	10%	52%	10%		
AD-12137	85%	12%	52%	6%		
AD-12138	47%	6%	49%	1%		
AD-12139	45%	5%	70%	4%		
AD-12140	97%	23%	67%	1%		
AD-12141	110%	4%	107%	16%		
AD-12142	52%	18%	53%	4%		
AD-12143	64%	34%	70%	7%		
AD-12144	80%	23%	57%	3%		
AD-12145	37%	11%	36%	2%		
AD-12146	13%	23%	25%	3%		
AD-12147	29%	3%	56%	5%		
AD-12148	50%	3%	66%	1%		
AD-12149	4%	2%	33%	3%		
AD-12150	31%	2%	33%	7%		
AD-12151	9%	5%	14%	2%		
AD-12152	3%	5%	11%	3%		
AD-12153	50%	6%	34%	4%		
AD-12154	23%	7%	44%	3%		
AD-12155	53%	6%	57%	13%		
AD-12156	35%	5%	40%	5%		
AD-12157	1%	5%	23%	4%		
AD-12158	13%	2%	25%	5%		
AD-12159	94%	6%	46%	1%		
AD-12160	19%	3%	13%	4%		
AD-12161	80%	4%	105%	7%		
AD-12162	24%	7%	32%	7%		
AD-12163	55%	9%	40%	5%		
AD-12164			57%	4%		
AD-12165	50%	3%	41%	4%		
AD-12166	9%	10%	52%	9%		
AD-12167	26%	3%	30%	7%		
AD-12168	54%	4%	50%	26%		
AD-12169	41%	4%	53%	18%		
AD-12170	45%	4%	55%	20%		
AD-12171	67%	5%	75%	25%		
AD-12172	53%	15%	57%	2%		
AD-12173	39%	1%	59%	0%		
AD-12174	41%	5%	57%	0%		
AD-12175	29%	0%	36%	14%		
AD-12176	45%	5%	56%	25%		
AD-12177	60%	4%	74%	30%		
AD-12178	41%	4%	42%	8%		
AD-12179	55%	5%	44%	5%		
AD-12180	16%	2%	15%	4%		
AD-12181	19%	3%	34%	2%		
AD-12182	16%	4%	16%	4%		
AD-12183	26%	5%	19%	4%		
AD-12184	24%	2%	77%	8%		
AD-12185	4%	1%	9%	1%		
AD-12186	36%	5%	43%	6%		
AD-12187	34%	13%	37%	1%		
AD-12188	30%	3%	27%	4%		
AD-12189	51%	6%	48%	2%		
AD-12190	39%	2%	26%	4%		
AD-12191	20%	2%	13%	0%		
AD-12192	21%	3%	25%	10%		
AD-12193	64%	0%	95%	6%		
AD-12194	1%	2%	15%	4%		
AD-12195	34%	2%	48%	3%		
AD-12196	34%	2%	51%	5%		
AD-12197	75%	4%	85%	6%		
AD-12198	50%	5%	65%	3%		
AD-12199	103%	6%	115%	2%		
AD-12200	73%	6%	60%	13%		
AD-12201	42%	5%	16%	4%		

10

20

30

40

【表 2 - 8】

Eq5 / KSP 二重 鎖名	50 nMでの第1の 単回用量スクリー ニング[残存 mRNAの%]	第1のスクリーニングの 標準偏差(4回の繰り返 し中)	25 nMでの第2の 単回用量スクリー ニング[残存 mRNAの%]	第2のスクリーニング の標準偏差(4回の繰り 返し中)	25 nMでの第 3の単回用量 スクリーニン グ	第3のスクリーニング の標準偏差(4回の繰り 返し中)
AD-12268	54%	6%	33%	3%	5%	2%
AD-12269	54%	6%	35%	4%	25%	7%
AD-12270	73%	5%	39%	4%	37%	6%
AD-12271	55%	7%	27%	5%	19%	6%
AD-12272	61%	15%	57%	2%	51%	14%
AD-12273	36%	6%	26%	2%	30%	9%
AD-12274	75%	21%	40%	3%	50%	10%
AD-12275	2%	3%	8%	1%	3%	4%
AD-12276	45%	12%	13%	3%	16%	3%
AD-12277	57%	12%	32%	2%	56%	3%
AD-12278	120%	3%	96%	10%	124%	36%
AD-12279	47%	29%	17%	1%	12%	4%
AD-12280	3%	0%	3%	1%		
AD-12281	2%	0%	5%	3%		
AD-12282	3%	0%	38%	8%		
AD-12283	3%	2%	38%	4%		
AD-12284	5%	2%	49%	6%		
AD-12285	7%	7%	23%	26%		
AD-12286	29%	34%	12%	7%		
AD-12287	40%	21%	51%	23%		
AD-12288	24%	7%	155%	146%		
AD-12289	45%	21%	259%	131%		
AD-12290	5%	3%	87%	25%		
AD-12291	4%	5%	70%	3%		
AD-12292	3%	3%	6%	2%		
AD-12293	4%	2%	36%	3%		
AD-12294	10%	6%	38%	5%		
AD-12295	29%	31%	37%	5%		
AD-12296	80%	4%	89%	2%		
AD-12297	74%	3%	60%	2%		
AD-12298	77%	4%	60%	3%		
AD-12299	76%	4%	66%	4%		
AD-12300	36%	2%	15%	1%		
AD-12301	35%	4%	16%	2%		
AD-12302	84%	5%	65%	3%		
AD-12303	34%	4%	17%	2%		
AD-12304	70%	0%	70%	6%		
AD-12305	65%	2%	80%	7%		
AD-12306	23%	6%	20%	3%		
AD-12307	75%	10%	58%	5%		
AD-12308	27%	8%	18%	2%		
AD-12309	52%	11%	42%	3%		
AD-12310	106%	25%	80%	2%		
AD-12311	73%	15%	60%	2%		
AD-12312	39%	3%	34%	3%		
AD-12313	64%	9%	49%	6%		
AD-12314	39%	2%	34%	6%		
AD-12315	32%	7%	15%	3%		
AD-12316	40%	5%	14%	2%		
AD-12317	34%	9%	16%	3%		
AD-12318	46%	4%	20%	4%		
AD-12319	77%	3%	66%	4%		
AD-12320	50%	7%	41%	3%		
AD-12321	21%	3%	16%	2%		
AD-12322	27%	9%	30%	10%		
AD-12323	26%	7%	35%	16%		
AD-12324	27%	8%	27%	14%		
AD-12325	30%	12%	32%	20%		
AD-12326	42%	20%	49%	43%		
AD-12327	36%	14%	37%	32%		
AD-12328	45%	2%	31%	3%		
AD-12329	63%	4%	34%	3%		
AD-12330	63%	6%	36%	4%		
AD-12331	50%	2%	36%	5%		
AD-12332	30%	4%	32%	7%		
AD-12333	34%	6%	32%	2%		

10

20

30

40

【表 2 - 9】

Eq5 / KSP 二重鎖名	50 nM での第 1 の単回用量スクリーニング [残存 mRNA の %]	第 1 のスクリーニングの標準偏差 (4 回の繰り返し中)	25 nM での第 2 の単回用量スクリーニング [残存 mRNA の %]	第 2 のスクリーニングの標準偏差 (4 回の繰り返し中)	25 nM での第 3 の単回用量スクリーニング	第 3 のスクリーニングの標準偏差 (4 回の繰り返し中)
AD-12334	27%	2%	11%	5%		
AD-12335	34%	6%	10%	7%		
AD-12336	41%	4%	9%	4%		
AD-12337	39%	7%	12%	2%		

【0227】

10

表 3 . E g 5 / K S P の d s R N A 二重鎖の配列および分析

【表 3 - 1】

センス配列 (5'→3')	配列 番号	アンチセンス配列 (3'→5')	5'→	配列 番号	二重鎖名	25 nM での 単回用量ス クリーニン グ [残存 mRNA の %]	第 2 のス クリーニン の標準偏 差 (4 回の繰 返し中)
ccAuuAcuAcAuAGcAcuTtT	583	AGUCCuAcUGuAGuAAUCCtT	583	AD-14085	19%	2%	
AuuGGcAAcGAcAuuuCuTtT	584	AGAAuAAUGGUUGCCAGAUtT	585	AD-14086	38%	3%	
GauAGGcuAAuuAAaccAATtT	586	UGGUUuAAGUuAGCuAUCtT	587	AD-14087	75%	10%	
ABAAccAuuaGuAcAGuATtT	588	uACUGuAGuAAUGGAAUCtT	589	AD-14088	22%	8%	
GauGGuuAuAAuuGGCCTtT	589	CBCcAAUGGAGuAAcAAUCtT	591	AD-14089	70%	12%	
GUuuuCuGUuGGGcuAcuTtT	592	AGuGAGCCGAGGAGAAAGCTtT	593	AD-14090	79%	11%	
GGAGGAuuGGcuGAcAGATtT	594	UCUGGtAcGCuAAUCCUCCTtT	595	AD-14091	29%	3%	
uAAuGAAAGGGuAAuAcuGCTtT	596	CcAGGuAAuACUCUcAAUATtT	597	AD-14092	23%	2%	
uuuCAcGAAAcAuuuGuATtT	598	uACAAAGGGuUUGGGAAATtT	599	AD-14093	60%	2%	
cuuAuuAAAGGAGuAAuGCTtT	600	CCGuAAuACUCUcAAuAAATtT	601	AD-14094	11%	3%	
GAAuAcAGAAuGGAuGuAGTtT	602	CuuAGGUGcAUUGGAAUUCtT	603	AD-14095	10%	2%	
cAGAuGuAcAGGAAuAGcATtT	604	UCCGUuAUGGUcAcACUCGTtT	605	AD-14096	27%	2%	
AuuAAcccuAGuuGuAUCtT	606	GGuAAcAAcAAcGGUuAGAUtT	607	AD-14097	49%	6%	
AAAGGcuuGuuAAAAuGCTtT	608	CCGAUUuAAcAAAGCUCUUTtT	609	AD-14098	50%	10%	
uAAAGGAGuAAuAcGGAGGATtT	610	UCUCCGuAAuACUCCUuATtT	611	AD-14099	12%	4%	
uuGCAuGuAAuAAuAcGuATtT	612	AuACGuAUuAAcAUUGcAATtT	613	AD-14100	49%	7%	
uccuAAcccuAGuuGuAUCtT	614	GGAAuAAcAAcAGGGUcAGATtT	615	AD-14101	36%	1%	
cAuAuAuAuuuuuuGuATtT	616	AUCGAGAAAGAGAAcAUUCtT	617	AD-14102	49%	3%	
GAUUGcAGcAAuAGcGAUCtT	618	cAUCCGUuAAUGGUcAAUCtT	619	AD-14103	74%	6%	
ucccAAcAGGAAcGAcAcTtT	620	GGUGUGuACUUGUUGGATtT	621	AD-14104	27%	3%	
uGUcAcAGGAAuAAuAGUATtT	622	AAuAAACUcAUCCUGGAGATtT	623	AD-14105	34%	4%	
AGAGcuuGuuAAAAuGATtT	624	UCCGAUUuAAcAAAGCUCUUTtT	625	AD-14106	9%	2%	
GGUAAcAGAGAAcAuAuATtT	626	uAAAGAUUGUUGuAACCTtT	627	AD-14107	5%	1%	
GAGGuuGuAAAGcAAuGuTtT	628	AAcAUUGGUuAAcAAACUCtT	629	AD-14108	15%	1%	
AAcAGGAAcGcAcAcAcAGTtT	630	CGGAGGUGGUuACCCGUUCtT	631	AD-14109	91%	2%	
AAccuAGGuuGuAAuGcGCTtT	632	GAGGAGuAAcAAcAAAGGUUUTtT	633	AD-14110	66%	5%	
CQuAAAGGGAUGGAAuAAATtT	634	uAUuAUCCuACUGGUuAGGCTtT	635	AD-14111	33%	3%	
AAAGGAAuGGAAuAAuAcuATtT	636	uAGGAAuAAcAAcAAUGGCUUTtT	637	AD-14112	51%	3%	
uGAAcGuAAcGAAAGATtT	638	UUCUUUUGGAAcAGGAAUCtT	639	AD-14113	22%	3%	
AAAAAuGGGcGuuucGCTtT	640	CcAGAAAGGcAAuAGUUUUUTtT	641	AD-14114	117%	6%	
uuuGGAGGAGuAAcAGATtT	642	UUCUUuAAcAAcAAcAAAGTtT	643	AD-14115	59%	8%	
GGGAAcAGGAAcAuAuATtT	644	AuAGAUUUCUUuAGCCCTtT	645	AD-14116	14%	3%	
AAuGuAGAAuAAuAGGAAuTtT	646	AUUCcAAUcAAcAAAGAUATtT	647	AD-14117	12%	4%	
uuAAuAAAGGAAuAAcGATtT	648	UCCGuAAuACUCCGUAAuAAATtT	649	AD-14118	26%	4%	
uAAGGAAuAAcGGAGGATtT	650	CUCCUCCGuAAcUCCUuATtT	651	AD-14119	24%	5%	
AAuAAuAAuAAcAAuAAATtT	652	UUuAGUUcAAcAAuAGUUUTtT	653	AD-14120	8%	1%	
AAuCAAAuGAAcAAuAAATtT	654	CUuAAUUcAAcAAuAGAUUTtT	655	AD-14121	24%	2%	
uuucAAuAAcGuAAATtT	656	UUuAAcAGAAuAAcAGAAATtT	657	AD-14122	10%	1%	
uGUAAAcAAcGuAAATtT	658	UUuAAcAGAAuAAcAGAAATtT	659	AD-14123	8%	1%	
AGAAuGAAuucGuAAATtT	660	GGUuAAcAGAAuAAcAAUCtT	661	AD-14124	9%	2%	
AGGuuAAuAAcAAuAAuGCTtT	662	cAAcAAUGGCUuAAcAAUCtT	663	AD-14125	114%	6%	
uGAGAAuAAcAAuAGGAGCTtT	664	ACGUcAAUcAAcAAuAGUUTtT	665	AD-14126	9%	1%	
AGAAuAAcAGAAuGGAuAAATtT	666	UuAAcGUcAAcAAuAGUUTtT	667	AD-14127	57%	6%	
AuAAuAAcAAcAGGAAuAAATtT	668	GUcAAcAAcAAcAAuAAuATtT	669	AD-14128	104%	6%	
cccAAcAGGAAcAAcAAATtT	670	UUGGUGGAAcAAcAAuAGGCTtT	671	AD-14129	21%	2%	
AGuAAuAAcGAAAGAAuAAATtT	672	AGAGGUUUCuAAuAAuATtT	673	AD-14130	57%	6%	
AuAAuAAcAGAGAAuAAATtT	674	CGCCCGGCGAAcAAuAAuATtT	675	AD-14131	93%	6%	
AAuAAcAAcccuAGuuGuATtT	676	AuAAcAAcAAcAAuAAuATtT	677	AD-14132	75%	6%	
uuAAcAAcAAcAAuAAuATtT	678	GGAAuAAcAAcAAcAAuATtT	679	AD-14133	66%	4%	
cuAAcAAcAAcAAuAAuATtT	680	AAAGGAGGAAcAAcAAuATtT	681	AD-14134	44%	4%	
AGAAuAAcAAcAAuAAuGCTtT	682	AGcAAuAAcAAcAAuAGUUTtT	683	AD-14135	55%	6%	
GAAAGcAAcAAuAAuAAATtT	684	UUuAAuAAuAAuAAuAGUUTtT	685	AD-14136	39%	3%	
AAuAAuAAcAAcAAuAAuATtT	686	UcGAGAAcAAcAAuAAuATtT	687	AD-14137	40%	3%	
uCGAAuAAcAAcAAuAAuATtT	688	GGGAAuAAcAAuAAuAAuATtT	689	AD-14138	39%	5%	

20

30

40

【表 3 - 2】

センス配列 (5'→3')	配列 番号	アンチセンス配列 (3'→5')	配列 番号	二重鎖名	25 nM での 単回用量ス クリーニング [残存 mRNA の%]	第 2 のスク リーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)
ucuuuAAGccuuAGGAGcuTtT	690	AGAGUCCuAAGGGUuAAGATtT	691	AD-14139	71%	11%
GoucAAGGauGAGuuuAGuGTtT	692	cACuAAACUcAUCCUGAGCTtT	693	AD-14140	43%	15%
cAuAAGcGAuGGAuAAuAcTtT	694	GuAUuAUCCAUCCGUuAUGTtT	695	AD-14141	33%	8%
AuAAGcGAuGGAuAAuAcTtT	696	GUuAUuAUCCAUCCGUuAUGTtT	697	AD-14142	51%	14%
ccuAAuAAAGcGccuucAGTtT	698	CUAGGGGcAGUuAAuAAAGTtT	699	AD-14143	42%	3%
ucGGAAAGcucGAGuuGGuTtT	700	ACcAAGGUcAACUUUCCGATtT	701	AD-14144	4%	4%
GAAAGcAuGGccGuucGCTtT	702	cAGAACGGcAAUUGUUUCTtT	703	AD-14145	92%	5%
AGAGcuGGuucuuAAOuTtT	704	AACUuAGAGAGuAGUUCUUTtT	705	AD-14146	13%	2%
GAGcuuGuuAAAAGcGAGTtT	706	UUCGGAGUuAAAcAGCUCTtT	707	AD-14147	9%	3%
AcAuGGccGuucGAGAGTtT	708	GCUCcAGAGCCGCcAAUGUTtT	709	AD-14148	80%	7%
AAGAGcAycuAAuAAuGcATtT	710	UGcAAuAAuAGUUGUUCUUTtT	711	AD-14149	44%	7%
AAAGcGGuuAGuAGuGUTtT	712	AACAGAGcAGAGcAGUUTtT	713	AD-14150	32%	29%
uGuAAcucAGuGuucucATtT	714	UGAGAAAcAGAGuAGAGATtT	715	AD-14151	79%	11%
GuAAAGcGGuAAAGcAAAGUTtT	716	AGAUUGGUuAAcAGAGAACTtT	717	AD-14152	8%	5%
uAuAGcGGuAAAGcAAuATtT	718	uAGAUUCUuAAcAGcAAuATtT	719	AD-14153	17%	11%
cuuAGuAGuGucAGGAAATtT	720	UUUCCUGGACcUcAAAGATtT	721	AD-14154	16%	4%
ucAGAGGAGcGAAAGcAGTtT	722	CUCCUuAGCCUcAUCCGATtT	723	AD-14155	11%	1%
AGAGAAuGGuAGGcAAATtT	724	UUGGCGcAGcAAUUAUCCUTtT	725	AD-14156	10%	1%
cAAAGGGAGcAGAGcAGATtT	726	UGUGGGGcGAGUCCUGUGTtT	727	AD-14157	29%	5%
uGcAAuGAAuAAAGcAGuATtT	728	AAuACGcAAUuAAcAUUGcATtT	729	AD-14158	51%	3%
AGuAGAAuAAuAAuAGATtT	730	UCuAGAcAAANuUUGAGUTtT	731	AD-14159	53%	5%
cuAGAAuAAuAAuAAcATtT	732	GGUGGuAAAGAUUUGAGTtT	733	AD-14160	40%	3%
AAuAAuAAuAAcAGuAGUTtT	734	AAcUAGGGUuAGAUuAAUUTtT	735	AD-14161	63%	7%
AAuAAuAAuAAcAGuAGATtT	736	UCuAGcUUGAGGAGAGAAUUTtT	737	AD-14162	44%	6%
GccuAGcAGuAAAGcAGGUTtT	738	CcAUAGGAGUuAGUAGGCGCTtT	739	AD-14163	57%	3%
AcGuuAAAGcAGAGcAGuATtT	740	AGAGUUCGGuuAAAGGUTtT	741	AD-14164	4%	1%
AGGAGuAAAGcAGUuAAATtT	742	GUuAAAGGGuuAGUUGGCTtT	743	AD-14165	11%	1%
GAGcGcAGuGccGucGAGTtT	744	CUCCGAGCGcAGAGcGGUCTtT	745	AD-14166	90%	9%
AGGAGuAGGcGucGcAGCTtT	746	GCUCGAGCGcAGAGcGGUTtT	747	AD-14167	49%	1%
GAGcGGuuAAAGcAGAGuATtT	748	GAUcUGGGuuAAAGcAGUCTtT	749	AD-14168	12%	2%
uuGAGcGuAAAGcAGGAAATtT	750	UuAGCcuAGGGuAAAGcAGATtT	751	AD-14169	66%	4%
ACUAAuAGAGcGcAGATtT	752	UCuAGGAGUcAAUuAGUTtT	753	AD-14170	52%	6%
ucGAGAAuAAAGcAGuATtT	754	uAUuAAAGuAAUuAGGATtT	755	AD-14171	42%	4%
GGAGAGuAGAGcGGuuAAATtT	756	UUuAAAGcGUGUcAUUCCCTtT	757	AD-14172	3%	1%
AcAAcGuAAAGcAGGGuATtT	758	AcAAcGUcAAuAAAGGUGUTtT	759	AD-14173	29%	2%
uGAGcGuAAAGcAGGGuAAATtT	760	UUuAGCcuAGGGuAAAGcAGATtT	761	AD-14174	69%	2%
AUcGcGAGAGAGuAAuAGATtT	762	uAGAGuAAUuAGAGAGATtT	763	AD-14175	53%	3%
cuGcGcGAGAGGcGcGcGATtT	764	GAGGAGCGAGcGAGcGAGTtT	765	AD-14176	113%	4%
GAAGcAGcGcGcGAGAGATtT	766	uACUCUGGGGcGUGGUGGATtT	767	AD-14177	87%	8%
AGUAGcAGGAGAGcGcGCTtT	768	CCGAGGUGUCCUGGUGACUTtT	769	AD-14178	59%	2%
AGGAGGAGAGuAGAGcGUTtT	770	AAGCGUCCuAGUCCUGGCTtT	771	AD-14179	9%	2%
AGAGcGGuuAAAGcAGAGATtT	772	AUCUCGUUuAAAGcGUGUTtT	773	AD-14180	45%	2%
AAAGcGuuAAAGcAGAGcUTtT	774	ACAUcUGGUUuAAAGcGUTtT	775	AD-14181	70%	10%
AGGcGAGcGuuAAAGcAGGATtT	776	CCuAGGGuAAAGcGAGGCTtT	777	AD-14182	100%	7%
AGGcAAAGcAGAGuAAAGATtT	778	uAUuAGCCcAGGGuAAAGCTtT	779	AD-14183	60%	5%
uAGAGcGuAAAGcAGGATtT	780	GAAAGGGuuAGGAGGcGATtT	781	AD-14184	129%	6%
uAGAGcGuAAAGcAGGATtT	782	uAAAGGAGGAGuAAAGcAGATtT	783	AD-14185	62%	4%
AcAGcGAGAGcAGGAGATtT	784	AGGcAGAGGcUGGUGGCTtT	785	AD-14186	42%	3%
AGAGcGuAAAGcAGGAGATtT	786	CGAGAGcAAUuAGUUCUTtT	787	AD-14187	123%	12%
uGAGcAGAGAGuAAAGATtT	788	GUuAGAGuAAUuAGAGGATtT	789	AD-14188	38%	2%
GAAGcGuuAGGAGGGuATtT	790	uACAGCCUcAAAGcAGGUTtT	791	AD-14189	13%	1%
uGAGcGcGcGcGcGcGATtT	792	ACUuAAAGGAGGAGuAAAGATtT	793	AD-14190	59%	3%
uGAGcGcGcGcGcGcGATtT	794	AACUCUcAAAGcAGGAGATtT	795	AD-14191	93%	3%
AGAGcGuuAGGAGGGuATtT	796	CUAGAGAGAGuAAAGGUTtT	797	AD-14192	45%	5%
GAGcGcGcGcGcGcGATtT	798	AUuAGCCuAGGGuAAAGGCTtT	799	AD-14193	57%	3%
GAAGcGuuAGGAGGGuATtT	800	CUuAGGAGcAGAGGUTtT	801	AD-14194	51%	4%
AAAGcGcGcGcGcGcGATtT	802	AAAGCUCuAAAGGAGGCTtT	803	AD-14195	77%	5%
AAAGcGcGcGcGcGcGATtT	804	uAGAGCUCuAAAGGAGGCTtT	805	AD-14196	42%	6%
GAAGcGuuAGGAGGGuATtT	806	GAAGuAAAGcAAAGcAGGCTtT	807	AD-14197	15%	2%
GAAGcGuuAGGAGGGuATtT	808	AGUcUGGAGcAGAGuAAAGCTtT	809	AD-14198	12%	3%
uuuAGAGGcGuAAAGcAGATtT	810	UGAGUuAGGCGUcAAAGATtT	811	AD-14199	18%	2%
uuuAGAGcAAAGcGcGcGATtT	812	UCuAAAGGAGGUGGGuAAAGTtT	813	AD-14200	72%	9%
uuuAGAGcGcGcGcGcGATtT	814	AUuAAAGAGGUGcAAAGGATtT	815	AD-14201	9%	3%
uuuAGAGcGcGcGcGcGATtT	816	AGUcUGGAGcAGAGcAGGCTtT	817	AD-14202	25%	3%
uuuAGAGcGcGcGcGcGATtT	818	GGAGcGAGcAGAGcAGGCTtT	819	AD-14203	21%	1%
uuuAGAGcGcGcGcGcGATtT	820	uAGAGUcGCGAGuAAAGGATtT	821	AD-14204	4%	2%
uuuAGAGcGcGcGcGcGATtT	822	AGGAGAGAGGUGcAAAGGCTtT	823	AD-14205	5%	1%
uuuAGAGcGcGcGcGcGATtT	824	GCAGUcAGUcUGGUGGUTtT	825	AD-14206	75%	6%

10

20

30

40

【表 3 - 3】

センス配列 (5'→3')	配列 番号	アンチセンス配列 (3'→5')	配列 番号	二重鎖名	25 nM での 単回用量ス クリーニング [残存 mRNA の%]	第 2 のスク リーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)
AGAGCAGAAUAAUCCUUCGCTAT	826	CGCAGAGGUAUUCUCUCUUTAT	827	AD-14207	55%	2%
AGCAGAAUAAUCCUUCGCTAT	828	CGCGCAGAGGUAUUCUCUCUUTAT	829	AD-14208	100%	4%
CCUUGACAGAAUAAUCCUUCGCTAT	830	UUUGUGAAUCCUUCUUCAGGCTAT	831	AD-14209	34%	3%
UUUUAAGGAAUAAUCCUUCGCTAT	832	AAACAAUACUUCGGAUAACTAT	833	AD-14210	13%	2%
UUUAAGAAUAAUCCUUCGCTAT	834	UCCUUKUUGUUAUUCUUAATAT	835	AD-14211	9%	1%
ACUUGAAUAAUCCUUCGCTAT	836	UCCUUCUUAUCCUUCUUAATAT	837	AD-14212	20%	1%
GAGCAGAAUAAUCCUUCGCTAT	838	UCCGAGAGGUAUUCUCUCUUTAT	839	AD-14213	48%	5%
AAAGGAAUAAUCCUUCGCTAT	840	UCGUACAUAAUUCUUAATAT	841	AD-14214	28%	10%
GACCAUAAUCCUUCGCTAT	842	UCUCCGAAAUAAUUCGCTAT	843	AD-14215	132%	0%
GAGAGGAAUAAUCCUUCGCTAT	844	UUUAUUUAUACUUCUUCUUTAT	845	AD-14216	3%	0%
CUUGAGAAUAAUCCUUCGCTAT	846	UUUUUAGGUAUUCUUCUAGTAT	847	AD-14217	15%	1%
CUUUAUAAUCCUUCGCTAT	848	UGAGUUGGAGAGCAUAGAGTAT	849	AD-14218	67%	8%
GAUAAUAAUCCUUCGCTAT	850	CUACUGUAUAAUUGUAUUTAT	851	AD-14219	76%	4%
UUUUAUAAUCCUUCGCTAT	852	UUUUUUUUGGUAUUCAGGCTAT	853	AD-14220	33%	8%
GAAGGAAUAAUCCUUCGCTAT	854	CGUACAUAAUUCUUCUUTAT	855	AD-14221	25%	2%
UUUAUAAUCCUUCGCTAT	856	AAACAUUCGGAUAAUAACTAT	857	AD-14222	7%	2%
UUUUUAUAAUCCUUCGCTAT	858	AUCGAGAAUUGGCAAAUAACTAT	859	AD-14223	19%	2%
UUUAAGGAAUAAUCCUUCGCTAT	860	UCCGAGGUAUACUUCUUAATAT	861	AD-14224	13%	1%
CUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	862	AGGUAUUAUAGAGGUAUAGCTAT	863	AD-14225	15%	3%
CUUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	864	CUUUUUUUUUUAUAGGCTAT	865	AD-14226	11%	0%
UUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	866	UUUUUUUAUAGGAAUAAUAACTAT	867	AD-14227	5%	1%
GAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	868	GAACUUGUAUAAUAAUAACTAT	869	AD-14228	34%	3%
GAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	870	CUUUUAUAGGUAUAAUAACTAT	871	AD-14229	15%	2%
CUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	872	CAACAGGUAUAAUAAUAACTAT	873	AD-14230	20%	1%
AGCAUAAUAAUCCUUCGCTAT	874	GUUAAGGUAUAAUAAUAACTAT	875	AD-14231	15%	1%
GAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	876	AAAGGUAUAAUAAUAAUAACTAT	877	AD-14232	21%	1%
AAUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	878	UGGAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	879	AD-14233	156%	12%
AGUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	880	CUUAAGGUAUAAUAAUAAUAACTAT	881	AD-14234	35%	3%
CUUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	882	AAUUAAGGUAUAAUAAUAAUAACTAT	883	AD-14235	42%	4%
AAUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	884	UUUUGGUAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	885	AD-14236	23%	3%
UUUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	886	CGGGAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	887	AD-14237	79%	8%
UUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	888	ACAGGUAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	889	AD-14238	92%	7%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	890	CGGAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	891	AD-14239	25%	2%
UUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	892	UUUUGGUAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	893	AD-14240	71%	6%
CUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	894	UUGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	895	AD-14241	14%	1%
CUUAUAAUAAUCCUUCGCTAT	896	AAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	897	AD-14242	11%	2%
AAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	898	UUUUUAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	899	AD-14243	11%	1%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	900	GACGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	901	AD-14244	15%	2%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	902	CAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	903	AD-14245	80%	7%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	904	GUUGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	905	AD-14246	57%	5%
GAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	906	UGAUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	907	AD-14247	9%	3%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	908	GAUUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	909	AD-14248	33%	4%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	910	AGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	911	AD-14249	64%	2%
GAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	912	UGGAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	913	AD-14250	13%	2%
GAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	914	AGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	915	AD-14251	55%	6%
GAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	916	UUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	917	AD-14252	48%	6%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	918	AAUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	919	AD-14253	39%	5%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	920	CAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	921	AD-14254	44%	6%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	922	UAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	923	AD-14255	100%	8%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	924	GGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	925	AD-14256	100%	6%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	926	UGAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	927	AD-14257	23%	2%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	928	AAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	929	AD-14258	21%	3%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	930	AUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	931	AD-14259	19%	2%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	932	GAUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	933	AD-14260	10%	1%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	934	CAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	935	AD-14261	76%	3%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	936	UUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	937	AD-14262	15%	2%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	938	UUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	939	AD-14263	14%	2%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	940	CCUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	941	AD-14264	85%	3%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	942	UUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	943	AD-14265	13%	1%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	944	UUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	945	AD-14266	18%	3%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	946	CAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	947	AD-14267	50%	8%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	948	CUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	949	AD-14268	15%	3%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	950	AAUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	951	AD-14269	19%	4%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	952	CAUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	953	AD-14270	11%	2%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	954	AAUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	955	AD-14271	11%	1%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	956	CUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	957	AD-14272	7%	1%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	958	AUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	959	AD-14273	14%	2%
AAUUAAGGUAUAAUCCUUCGCTAT	960	UUUAAGGUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAACTAT	961	AD-14274	73%	4%

10

20

30

40

【表 3 - 4】

センス配列 (5'→3')	配列 番号	アンチセンス配列 (3'→5')	配列 番号	二重鎖名	25 nM での 単回用量ス クリーニング グ [残存 mRNA の%]	第 2 のスク リーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)
AGGUAAGAGUAAGUAAGAGATAT	962	GUCUUAAGUAAGUUCUAGCATAT	963	AD-14275	10%	1%
AAUGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	964	GAUCUAGUAAGUAAGUAAGATAT	965	AD-14276	99%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	966	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	967	AD-14277	7%	1%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	968	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	969	AD-14278	12%	1%
AAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	970	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	971	AD-14279	104%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	972	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	973	AD-14280	21%	2%
AAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	974	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	975	AD-14281	43%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	976	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	977	AD-14282	48%	6%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	978	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	979	AD-14283	35%	5%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	980	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	981	AD-14284	58%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	982	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	983	AD-14285	48%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	984	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	985	AD-14286	49%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	986	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	987	AD-14287	6%	1%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	988	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	989	AD-14288	50%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	990	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	991	AD-14289	48%	1%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	992	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	993	AD-14290	112%	7%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	994	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	995	AD-14291	77%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	996	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	997	AD-14292	80%	6%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	998	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	999	AD-14293	58%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1000	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1001	AD-14294	77%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1002	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1003	AD-14295	62%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1004	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1005	AD-14296	59%	4%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1006	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1007	AD-14297	37%	1%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1008	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1009	AD-14298	21%	1%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1010	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1011	AD-14299	6%	1%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1012	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1013	AD-14300	17%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1014	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1015	AD-14301	97%	6%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1016	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1017	AD-14302	13%	1%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1018	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1019	AD-14303	13%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1020	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1021	AD-14304	38%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1022	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1023	AD-14305	14%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1024	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1025	AD-14306	22%	4%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1026	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1027	AD-14307	26%	6%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1028	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1029	AD-14308	62%	9%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1030	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1031	AD-14309	52%	5%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1032	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1033	AD-14310	32%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1034	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1035	AD-14311	23%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1036	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1037	AD-14312	49%	6%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1038	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1039	AD-14313	69%	4%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1040	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1041	AD-14314	52%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1042	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1043	AD-14315	66%	4%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1044	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1045	AD-14316	19%	4%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1046	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1047	AD-14317	16%	5%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1048	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1049	AD-14318	52%	11%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1050	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1051	AD-14319	28%	11%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1052	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1053	AD-14320	52%	10%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1054	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1055	AD-14321	53%	6%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1056	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1057	AD-14322	20%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1058	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1059	AD-14323	116%	6%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1060	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1061	AD-14324	14%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1062	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1063	AD-14325	50%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1064	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1065	AD-14326	47%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1066	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1067	AD-14327	18%	2%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1068	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1069	AD-14328	19%	1%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1070	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1071	AD-14329	94%	10%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1072	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1073	AD-14330	60%	4%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1074	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1075	AD-14331	54%	7%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1076	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1077	AD-14332	23%	4%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1078	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1079	AD-14333	70%	10%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1080	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1081	AD-14334	78%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1082	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1083	AD-14335	38%	6%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1084	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1085	AD-14336	16%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1086	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1087	AD-14337	65%	4%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1088	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1089	AD-14338	18%	0%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1090	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1091	AD-14339	20%	4%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1092	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1093	AD-14340	24%	1%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1094	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1095	AD-14341	27%	3%
GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1096	GAAGUAAGUAAGUAAGUAAGATAT	1097	AD-14342	13%	1%

10

20

30

40

40

[illegible]

【表 3 - 6】

センス配列 (5'-3')	配列 番号	アンチセンス配列 (3'-5')	配列 番号	二重鎖名	25 nMでの単 回用量スク リーニング [残存 mRNA の%]	第 2 のスク リーニング の標準偏差 (4 回の繰り 返し中)
UGAGAGACAUCCGACUUUGTGT	1234	CAAGGTCAGAUUCUCUAATAT	1235	AD-14411	29%	3%
AAUUGAUCUCGUGAAGUAATGT	1236	UAAUUCUACGACAUCAAUUTAT	1237	AD-14412	31%	4%

【0228】

VEGF 遺伝子を標的とする dsRNA

VEGF - A 121 の mRNA 配列のエクソン 1 ~ 5 内で 400 個の標的配列を同定した。参照転写物は、NM_003376 である。

【化 11】

```

1  augaacuucc ugcugucuuug ggugcauugg agccuugccu ugcugcucua ccuccaccau
61  gccaaaguggu cccaggcugc acccauggca gaaggaggag ggcagaauca ucacgaagug
121 gugaaguuca uggaugucua ucagcgcagc uacugccauc caaucgagac ccugggaggac
181 aucuuccagg aguaccuuga ugagaucgag uacauucuca agccauccug ugugccccug
241 augcgauugcg gggggcugcug caaugacgag ggccuaggagu gugugcccac ugaggagucc
301 aacaucacca ugcagauuau gcggaucaaa ccucaccaag gccagcacau aggagagaug
361 agcuuccuac agcacaacaa augugaauugc agaccaaaga aagauagagc aagacaagaa
421 aaaugugaca agccgaggcg guga (SEQ ID NO:1539)

```

【0229】

表 4 a には、同定された標的配列が含まれる。これらの配列を標的とする対応する siRNA を、生物情報学的スクリーニングに付した。

【0230】

該配列が、VEGF 配列に対して特異的であり、いずれの他の遺伝子からの配列にも特異的でないことを確実にするために、NCBI によって提供される BLAST 検索エンジンを使用して、Genbank の該配列に対して標的配列を確認した。BLAST アルゴリズムの使用については、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990、および Altschul and Gish, Meth. Enzymol. 266:460, 1996 に記載される。

【0231】

また、siRNA は、サル、ラット、およびヒト VEGF 配列と交差反応するそれらの能力について、優先順位を付けた。

【0232】

これらの 400 個の潜在的標的配列のうち、少数の主要候補を同定するために、80 個を実験的スクリーニングによる分析用に選択した。これらの 80 個の標的配列に対して、合計 114 個の siRNA 分子を設計した (表 4 b)。

【0233】

表 4 a . VEGF - 121 の標的配列

10

20

30

40

【表 4 - 1】

配列番号	VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'	配列番号	VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'
1540	1	AUGAACUUCUGUGUCUUGGGU	1584	45	GCUCUACCUCCACCAUGCCAGU
1541	2	UGAACUUCUGUGUCUUGGGUG	1585	46	CUCUACCUCCACCAUGCCAGUG
1542	3	GAACUUCUGUGUCUUGGGUGC	1586	47	UCUACCUCCACCAUGCCAGUGG
1543	4	AACUUCUGUGUCUUGGGUGCA	1587	48	CUACCUCCACCAUGCCAGUGGU
1544	5	ACUUCUGUGUCUUGGGUGCAU	1588	49	UACCUCCACCAUGCCAGUGGUC
1545	6	CUUUCUGUGUCUUGGGUGCAUU	1589	50	ACCUCCACCAUGCCAGUGGUCC
1546	7	UUUCUGUGUCUUGGGUGCAUUG	1590	51	CCUCCACCAUGCCAGUGGUUCCC
1547	8	UUCUGUGUCUUGGGUGCAUUGG	1591	52	CUCCACCAUGCCAGUGGUCCCA
1548	9	UCUGUGUCUUGGGUGCAUUGGA	1592	53	UCCACCAUGCCAGUGGUCCCAG
1549	10	CUGUGUCUUGGGUGCAUUGGAG	1593	54	CCACCAUGCCAGUGGUCCCAGG
1550	11	UGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGC	1594	55	CACCAUGCCAGUGGUCCCAGGC
1551	12	GCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCC	1595	56	ACCAUGCCAGUGGUCCCAGGCU
1552	13	CUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCU	1596	57	CCAUGCCAGUGGUCCCAGGCUG
1553	14	UGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUU	1597	58	CAUGCCAGUGGUCCCAGGCUGC
1554	15	GUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUG	1598	59	AUGCCAGUGGUCCCAGGCUGCA
1555	16	UCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGC	1599	60	UGCCAGUGGUCCCAGGCUGCAC
1556	17	CUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCC	1600	61	GCCAGUGGUCCCAGGCUGCACC
1557	18	UUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCU	1601	62	CCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCC
1558	19	UGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUU	1602	63	CAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCA
1559	20	GGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUG	1603	64	AAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAU
1560	21	GGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGC	1604	65	AGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUG
1561	22	GUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCU	1605	66	GUUGUCCCAGGCUGCACCCAUGG
1562	23	UGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUG	1606	67	UGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGC
1563	24	GCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGC	1607	68	GGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCCA
1564	25	CAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCU	1608	69	GUCCCAGGCUGCACCCAUGGCCAG
1565	26	AUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUC	1609	70	UCCCAGGCUGCACCCAUGGCCAGA
1566	27	UUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCU	1610	71	CCCAGGCUGCACCCAUGGCCAGAA
1567	28	UGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUA	1611	72	CCAGGCUGCACCCAUGGCCAGAAG
1568	29	GGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUAC	1612	73	CAGGCUGCACCCAUGGCCAGAAAG
1569	30	GAGCCUUGCCUUGCUGCUCUACC	1613	74	AGGCUGCACCCAUGGCCAGAAAGGA
1570	31	AGCCUUGCCUUGCUGCUCUACCU	1614	75	GGCUGCACCCAUGGCCAGAAAGGAG
1571	32	GCCUUGCCUUGCUGCUCUACCCU	1615	76	GCUGCACCCAUGGCCAGAAAGGAGG
1572	33	CCUUGCCUUGCUGCUCUACCCUC	1616	77	CUGCACCCAUGGCCAGAAAGGAGGA
1573	34	CUUGCCUUGCUGCUCUACCCUCCA	1617	78	UGCACCCAUGGCCAGAAAGGAGGAG
1574	35	UUGCCUUGCUGCUCUACCCUCCAC	1618	79	GCACCCAUGGCCAGAAAGGAGGAGG
1575	36	UGCCUUGCUGCUCUACCCUCCACC	1619	80	CACCCAUGGCCAGAAAGGAGGAGGG
1576	37	GCCUUGCUGCUCUACCCUCCACCA	1620	81	ACCCAUGGCCAGAAAGGAGGAGGGC
1577	38	CCUUGCUGCUCUACCCUCCACCAU	1621	82	CCCAUGGCCAGAAAGGAGGAGGGCA
1578	39	CUUGCUGCUCUACCCUCCACCAUG	1622	83	CCAUGGCCAGAAAGGAGGAGGGCAG
1579	40	UUGCUGCUCUACCCUCCACCAUGC	1623	84	CAUGGCCAGAAAGGAGGAGGGCAGA
1580	41	UGCUGCUCUACCCUCCACCAUGCC	1624	85	AUGGCCAGAAAGGAGGAGGGCAGAA
1581	42	GCUGCUCUACCCUCCACCAUGCCA	1625	86	UGGCAGAAAGGAGGAGGGCAGAAU
1582	43	CUGCUCUACCCUCCACCAUGCCAA	1626	87	GGCAGAAAGGAGGAGGGCAGAAUC
1583	44	UGCUCUACCCUCCACCAUGCCAAAG	1627	88	GCAGAAAGGAGGAGGGCAGAAUCA

10

20

30

40

【表 4 - 2】

配列番号	VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'	配列番号	VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'
1628	89	CAGAAGGAGGAGGGCAGAAUCAU	1674	135	UGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCC
1629	90	AGAAGGAGGAGGGCAGAAUCAUC	1675	136	GUCUAUCAGCGCAGCUACUGCCA
1630	91	GAAGGAGGAGGGCAGAAUCAUCA	1676	137	UCUAUCAGCGCAGCUACUGCCAU
1631	92	AAGGAGGAGGGCAGAAUCAUCAC	1677	138	CUAUCAGCGCAGCUACUGCCAUC
1632	93	AGGAGGAGGGCAGAAUCAUCACG	1678	139	UAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCC
1633	94	GGAGGAGGGCAGAAUCAUCACGA	1679	140	AUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCA
1634	95	GAGGAGGGCAGAAUCAUCACGAA	1680	141	UCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAA
1635	96	AGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAG	1681	142	CAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAU
1636	97	GGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGU	1682	143	AGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUC
1637	98	GAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUG	1683	144	GCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCG
1638	99	AGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGG	1684	145	CGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGA
1639	100	GGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGU	1685	146	GCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAG
1640	101	GGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUG	1686	147	CAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGA
1641	102	GCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGA	1687	148	AGCUACUGCCAUCCAAUCGAGAC
1642	103	CAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAA	1688	149	CCUACUGCCAUCCAAUCGAGACC
1643	104	AGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAG	1689	150	CUACUGCCAUCCAAUCGAGACCC
1644	105	GAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGU	1690	151	UACUGCCAUCCAAUCGAGACCCU
1645	106	AAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUU	1691	152	ACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUG
1646	107	AUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUC	1692	153	CUGCCAUCCAAUCGAGACCCUGG
1647	108	UCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCA	1693	154	UGCCAUCCAAUCGAGACCCUGGU
1648	109	CAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAU	1694	155	GCCAUCCAAUCGAGACCCUGGUG
1649	110	AUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUG	1695	156	CCAUCCAAUCGAGACCCUGGUGG
1650	111	UCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGG	1696	157	CAUCCAAUCGAGACCCUGGUGGA
1651	112	CACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGA	1697	158	AUCCAAUCGAGACCCUGGUGGAC
1652	113	ACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAA	1698	159	UCCAAUCGAGACCCUGGUGGACA
1653	114	CGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUG	1699	160	CCAAUCGAGACCCUGGUGGACAU
1654	115	GAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGU	1700	161	CAAUCGAGACCCUGGUGGACAUC
1655	116	AAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUC	1701	162	AAUCGAGACCCUGGUGGACAUCU
1656	117	AGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCU	1702	163	AUCGAGACCCUGGUGGACAUUU
1657	118	GUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUA	1703	164	UCGAGACCCUGGUGGACAUCUUC
1658	119	UGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAU	1704	165	CGAGACCCUGGUGGACAUCUUC
1659	120	GGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUC	1705	166	GAGACCCUGGUGGACAUCUCCA
1660	121	GUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCA	1706	167	AGACCCUGGUGGACAUCUCCAG
1661	122	UGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAG	1707	168	GACCCUGGUGGACAUCUCCAGG
1662	123	GAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGC	1708	169	ACCCUGGUGGACAUCUCCAGGA
1663	124	AAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCG	1709	170	CCCUGGUGGACAUCUCCAGGAG
1664	125	AGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGC	1710	171	CCUGGUGGACAUCUCCAGGAGU
1665	126	GUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCA	1711	172	CUGGUGGACAUCUCCAGGAGUA
1666	127	UUCAGGAUGUCUAUCAGCGCAG	1712	173	UGGUGGACAUCUCCAGGAGUAC
1667	128	UCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGC	1713	174	GGUGGACAUCUCCAGGAGUACC
1668	129	CAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCU	1714	175	GUGGACAUCUCCAGGAGUACCC
1669	130	AUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUA	1715	176	UGGACAUCUCCAGGAGUACCCU
1670	131	UGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUAC	1716	177	GGACAUCUCCAGGAGUACCCUG
1671	132	GGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACU	1717	178	GACAUCUCCAGGAGUACCCUGA
1672	133	GAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUG	1718	179	ACAUCUCCAGGAGUACCCUGAU
1673	134	AUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGC	1719	180	CAUCUCCAGGAGUACCCUGAUG

10

20

30

40

【表 4 - 3】

配列番号	VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'	配列番号	VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'
1720	181	AUCUUCOAGGAGUACCCUGAUGA	1766	227	CCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGC
1721	182	UCUUCACAGGAGUACCCUGAUGAG	1767	228	CUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCG
1722	183	CUUCCAGGAGUACCCUGAUGAGA	1768	229	UGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGG
1723	184	UUCACAGGAGUACCCUGAUGAGAU	1769	230	GUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGG
1724	185	UCCAGGAGUACCCUGAUGAGAU	1770	231	UGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGG
1725	186	CCAGGAGUACCCUGAUGAGAU	1771	232	GUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGG
1726	187	CAGGAGUACCCUGAUGAGAU	1772	233	UGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGC
1727	188	AGGAGUACCCUGAUGAGAU	1773	234	GCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCU
1728	189	GGAGUACCCUGAUGAGAU	1774	235	CCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUG
1729	190	GAGUACCCUGAUGAGAU	1775	236	CCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGC
1730	191	AGUACCCUGAUGAGAU	1776	237	CCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCU
1731	192	GUACCCUGAUGAGAU	1777	238	CUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUG
1732	193	UACCCUGAUGAGAU	1778	239	UGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGC
1733	194	ACCCUGAUGAGAU	1779	240	GAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCA
1734	195	CCCUGAUGAGAU	1780	241	AUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCAA
1735	196	CCUGAUGAGAU	1781	242	UGCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAU
1736	197	CUGAUGAGAU	1782	243	GCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUG
1737	198	UGAUGAGAU	1783	244	CGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUGA
1738	199	GAUGAGAU	1784	245	GAUGCGGGGGCUGCUGCAAUGAC
1739	200	AUGAGAU	1785	246	AUGCGGGGGCUGCUGCAAUGACG
1740	201	UGAGAU	1786	247	UGCGGGGGCUGCUGCAAUGACGA
1741	202	GAGAU	1787	248	GCGGGGGCUGCUGCAAUGACGAG
1742	203	AGAU	1788	249	CGGGGGCUGCUGCAAUGACGAGG
1743	204	GAU	1789	250	GGGGGCUGCUGCAAUGACGAGGG
1744	205	AUCGAGUACAUCUUCUUAAGCCAU	1790	251	GGGGCUGCUGCAAUGACGAGGGC
1745	206	UCGAGUACAUCUUCUUAAGCCAU	1791	252	GGGCUGCUGCAAUGACGAGGGCC
1746	207	CGAGUACAUCUUCUUAAGCCAU	1792	253	GGCUGCUGCAAUGACGAGGGCCU
1747	208	GAGUACAUCUUCUUAAGCCAU	1793	254	GCUGCUGCAAUGACGAGGGCCUG
1748	209	AGUACAUCUUCUUAAGCCAU	1794	255	CUGCUGCAAUGACGAGGGCCUGG
1749	210	GUACAUCUUCUUAAGCCAU	1795	256	UGCUGCAAUGACGAGGGCCUGGA
1750	211	UACAUCUUCUUAAGCCAU	1796	257	GCUGCAAUGACGAGGGCCUGGAG
1751	212	ACAUCUUCUUAAGCCAU	1797	258	CUGCAAUGACGAGGGCCUGGAGU
1752	213	CAUCUUCUUAAGCCAU	1798	259	UGCAAUGACGAGGGCCUGGAGUG
1753	214	AUCUUCUUAAGCCAU	1799	260	GCAAUGACGAGGGCCUGGAGUGU
1754	215	UCUUCUUAAGCCAU	1800	261	CAAUGACGAGGGCCUGGAGUGUG
1755	216	CUUCUUAAGCCAU	1801	262	AAUGACGAGGGCCUGGAGUGUGU
1756	217	UUCUUAAGCCAU	1802	263	AUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUG
1757	218	UCAAGCCAU	1803	264	UGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGC
1758	219	CAAGCCAU	1804	265	GACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCC
1759	220	AAGCCAU	1805	266	ACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCC
1760	221	AGCCAU	1806	267	CGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCA
1761	222	GCCAU	1807	268	GAGGGCCUGGAGUGUGUGCCAC
1762	223	CCAU	1808	269	AGGGCCUGGAGUGUGUGCCACU
1763	224	CAU	1809	270	GGGGCCUGGAGUGUGUGCCACUG
1764	225	AU	1810	271	GGCCUGGAGUGUGUGCCACUGA
1765	226	U	1811	272	GCCUGGAGUGUGUGCCACUGAG

10

20

30

40

【表 4 - 4】

配列番号	VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'	配列番号	E-VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'
1812	273	CCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGG	1858	319	AUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGG
1813	274	CUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGA	1859	320	UGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGC
1814	275	UGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAG	1860	321	GCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCC
1815	276	GGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGU	1861	322	CGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCA
1816	277	GAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUC	1862	323	GAUCAAAACCUCACCAAGGCCAG
1817	278	AGUGUGUGCCCACUGAGGAGUCC	1863	324	CAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGC
1818	279	GUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCA	1864	325	AUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCA
1819	280	UGUGUGCCCACUGAGGAGUCCAA	1865	326	UCAAAACCUCACCAAGGCCAGCAC
1820	281	GUGUGCCCACUGAGGAGUCCAAC	1866	327	CAAACCUCACCAAGGCCAGCACAC
1821	282	UGUGCCCACUGAGGAGUCCAACA	1867	328	AAACCUCACCAAGGCCAGCACAU
1822	283	GUGCCCACUGAGGAGUCCAACAU	1868	329	AACCUCACCAAGGCCAGCACAU
1823	284	UGCCCACUGAGGAGUCCAACAUC	1869	330	ACCUCACCAAGGCCAGCACAUAG
1824	285	GCCCACUGAGGAGUCCAACAUCA	1870	331	CCUCACCAAGGCCAGCACAUAGG
1825	286	CCCACUGAGGAGUCCAACAUCAC	1871	332	CUCACCAAGGCCAGCACAUAGGA
1826	287	CCACUGAGGAGUCCAACAUCACC	1872	333	UCACCAAGGCCAGCACAUAGGAG
1827	288	CACUGAGGAGUCCAACAUCACCA	1873	334	CACCAAGGCCAGCACAUAGGAGA
1828	289	ACUGAGGAGUCCAACAUCACCAU	1874	335	ACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAG
1829	290	CUGAGGAGUCCAACAUCACCAUG	1875	336	CCAAGGCCAGCACAUAGGAGAGA
1830	291	UGAGGAGUCCAACAUCACCAUGC	1876	337	CAAGGCCAGCACAUAGGAGAGAU
1831	292	GAGGAGUCCAACAUCACCAUGCA	1877	338	AAGGCCAGCACAUAGGAGAGAU
1832	293	AGGAGUCCAACAUCACCAUGCAG	1878	339	AGGCCAGCACAUAGGAGAGAU
1833	294	GGAGUCCAACAUCACCAUGCAGA	1879	340	GGCCAGCACAUAGGAGAGAU
1834	295	GAGUCCAACAUCACCAUGCAGAU	1880	341	GCCAGCACAUAGGAGAGAU
1835	296	AGUCCAACAUCACCAUGCAGAUU	1881	342	CCAGCACAUAGGAGAGAU
1836	297	GUCCAACAUCACCAUGCAGAUUA	1882	343	CAGCACAUAGGAGAGAU
1837	298	UCCAACAUCACCAUGCAGAUUAU	1883	344	AGCACAUAGGAGAGAU
1838	299	CCAACAUCACCAUGCAGAUUAUG	1884	345	GCACAUAGGAGAGAU
1839	300	CAACAUCACCAUGCAGAUUAUGC	1885	346	CACAUAGGAGAGAU
1840	301	AACAUCACCAUGCAGAUUAUGCG	1886	347	ACAUGGAGAGAU
1841	302	ACAUACCAUGCAGAUUAUGCGG	1887	348	CAUAGGAGAGAU
1842	303	CAUACCAUGCAGAUUAUGCGGA	1888	349	AUAGGAGAGAU
1843	304	AUACCAUGCAGAUUAUGCGGAU	1889	350	UAGGAGAGAU
1844	305	UCACCAUGCAGAUUAUGCGGAUC	1890	351	AGGAGAGAU
1845	306	CACCAUGCAGAUUAUGCGGAUCA	1891	352	GGAGAGAU
1846	307	ACCAUGCAGAUUAUGCGGAUCAA	1892	353	GAGAGAU
1847	308	CCAUGCAGAUUAUGCGGAUCAA	1893	354	AGAGAU
1848	309	CAUGCAGAUUAUGCGGAUCAAAC	1894	355	GAGAU
1849	310	AUGCAGAUUAUGCGGAUCAAAAC	1895	356	AGAUGAU
1850	311	UGCAGAUUAUGCGGAUCAAAACCU	1896	357	GAUGAU
1851	312	GCAGAUUAUGCGGAUCAAAACCU	1897	358	AUGAU
1852	313	CAGAUUAUGCGGAUCAAAACCU	1898	359	UGAU
1853	314	AGAUUAUGCGGAUCAAAACCU	1899	360	GAGU
1854	315	GAUUAUGCGGAUCAAAACCU	1900	361	AGU
1855	316	AUUAUGCGGAUCAAAACCU	1901	362	GCU
1856	317	UUAUGCGGAUCAAAACCU	1902	363	CUU
1857	318	UAUGCGGAUCAAAACCU	1903	364	UUCU

10

20

30

40

【表 4 - 5】

配列番号	VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'	配列番号	VEGF-121 の ORF 内の位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'
1904	365	UCCUACAGCACACAAAUGUGAA			
1905	366	CCUACAGCACACAAAUGUGAAU			
1906	367	CUACAGCACACAAAUGUGAAUG			
1907	368	UACAGCACACACAAAUGUGAAUGC			
1908	369	ACAGCACACACAAAUGUGAAUGCA			
1909	370	CAGCACACACAAAUGUGAAUGCAG			
1910	371	AGCACACACAAAUGUGAAUGCAGA			
1911	372	GCACACACAAAUGUGAAUGCAGAC			
1912	373	CACACACAAAUGUGAAUGCAGACC			
1913	374	ACAACACAAAUGUGAAUGCAGACCA			
1914	375	CAACACAAAUGUGAAUGCAGACCAA			
1915	376	AACACAAAUGUGAAUGCAGACCAAA			
1916	377	ACAAAUGUGAAUGCAGACCAAAAG			
1917	378	CAAAUGUGAAUGCAGACCAAAAGA			
1918	379	AAAUGUGAAUGCAGACCAAAAGAA			
1919	380	AAUGUGAAUGCAGACCAAAAGAAA			
1920	381	AUGUGAAUGCAGACCAAAAGAAAG			
1921	382	UGUGAAUGCAGACCAAAAGAAAGA			
1922	383	GUGAAUGCAGACCAAAAGAAAGAU			
1923	384	UGAAUGCAGACCAAAAGAAAGAU			
1924	385	GAAUGCAGACCAAAAGAAAGAUAG			
1925	386	AAUGCAGACCAAAAGAAAGAUAGA			
1926	387	AUGCAGACCAAAAGAAAGAUAGAG			
1927	388	UGCAGACCAAAAGAAAGAUAGAGC			
1928	389	GCAGACCAAAAGAAAGAUAGAGCA			
1929	390	CAGACCAAAAGAAAGAUAGAGCAA			
1930	391	AGACCAAAAGAAAGAUAGAGCAAG			
1931	392	GACCAAAAGAAAGAUAGAGCAAGA			
1932	393	ACCAAAAGAAAGAUAGAGCAAGAC			
1933	394	CCAAAGAAAGAUAGAGCAAGACA			
1934	395	CAAAGAAAGAUAGAGCAAGACAA			
1935	396	AAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAG			
1936	397	AAGAAAGAUAGAGCAAGACAAGA			
1937	398	AGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAA			
1938	399	GAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAA			
1939	400	AAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAA			

10

20

30

【 0 2 3 4 】

表 4 b : V E G F を標的とする二重鎖
鎖 : S = センス、A S = アンチセンス

【表 4 - 6】

ORF 内 の 位置	配 列 番 号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖	配 列 番 号	鎖配列
1	2184	AUGAACUUUCUGCUGCCUUGGGU	AL-DP-4043	S	1940	5 GAACUUUCUGCUGCCUUGGGU 3
				AS	1941	3 UACUUGARAGACGACRGAACCCA 5
22	2185	GUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCU	AL-DP-4077	S	1942	5 GCAUUGGAGCCUUGCCUUGCU 3
				AS	1943	3 CACGUAACCUCGGAACGGACGA 5
47	2186	UCUACCUCCACCAUGCCAAGUGG	AL-DP-4021	S	1944	5 UACCUCCACCAUGCCAAGUTT 3
				AS	1945	3 TTAUGGAGGUGGUACGGUUC 5
48	2187	CUACCUCCACCAUGCCAAGUGGU	AL-DP-4109	S	1946	5 ACCUCCACCAUGCCAAGUGTT 3
				AS	1947	3 TTUGGAGGUGGUACGGUUCAC 5
50	2188	ACCUCCACCAUGCCAAGUGGUCC	AL-DP-4006	S	1948	5 CCCCACCAUGCCAAGUGGUCC 3
				AS	1949	3 UGGAGGUGGUACGGUUCACCAGG 5
			AL-DP-4083	S	1950	5 CUCCACCAUGCCAAGUGGUTT 3
				AS	1951	3 TTGAGGUGGUACGGUUCACCA 5
51	2189	CCUCCACCAUGCCAAGUGGUCCC	AL-DP-4047	S	1952	5 UCCACCAUGCCAAGUGGUCCC 3
				AS	1953	3 GGAGGUGGUACGGUUCACCAGGG 5
			AL-DP-4017	S	1954	5 UCCACCAUGCCAAGUGGUCTT 3
				AS	1955	3 TTAGGUGGUACGGUUCACCAG 5
52	2190	CUCCACCAUGCCAAGUGGUCCCA	AL-DP-4048	S	1956	5 CCACCAUGCCAAGUGGUCCCA 3
				AS	1957	3 GAGGUGGUACGGUUCACCAGGGU 5
			AL-DP-4103	S	1958	5 CCACCAUGCCAAGUGGUCCCTT 3
				AS	1959	3 TTGGUGGUACGGUUCACCAGG 5
53	2191	UCCACCAUGCCAAGUGGUCCCAG	AL-DP-4035	S	1960	5 CACCAUGCCAAGUGGUCCCAG 3
				AS	1961	3 AGGUGGUACGGUUCACCAGGGUC 5
			AL-DP-4018	S	1962	5 CACCAUGCCAAGUGGUCCCTT 3
				AS	1963	3 TTGUGGUACGGUUCACCAGGG 5
54	2192	CCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGG	AL-DP-4036	S	1964	5 ACCAUGCCAAGUGGUCCCAGG 3
				AS	1965	3 GGUGGUACGGUUCACCAGGGUCC 5
			AL-DP-4084	S	1966	5 ACCAUGCCAAGUGGUCCCATT 3
				AS	1967	3 TTUGGUACGGUUCACCAGGGU 5

10

20

30

40

【表 4 - 7】

ORF 内 の 位置	配 列 番号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖	配 列 番号	鎖配列
55	2193	CACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGC	AL-DP-4093	S	1968	5 CCAUGCCAAGUGGUCCCAGGC 3
				AS	1969	3 GUGGUACGGUUCACCAGGGUCCG 5
			AL-DP-4085	S	1970	5 CCAUGCCAAGUGGUCCCAGTT 3
				AS	1971	3 TTGGUACGGUUCACCAGGGUC 5
56	2194	ACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCU	AL-DP-4037	S	1972	5 CAUGCCAAGUGGUCCCAGGCU 3
				AS	1973	3 UGGUACGGUUCACCAGGGUCCGA 5
			AL-DP-4054	S	1974	5 CAUGCCAAGUGGUCCCAGTT 3
				AS	1975	3 TTGUACGGUUCACCAGGGUCC 5
57	2195	CCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUG	AL-DP-4038	S	1976	5 AUGCCAAGUGGUCCCAGGCUG 3
				AS	1977	3 GGUACGGUUCACCAGGGUCCGAC 5
			AL-DP-4086	S	1978	5 AUGCCAAGUGGUCCCAGGCTT 3
				AS	1979	3 TTUACGGUUCACCAGGGUCCG 5
58	2196	CAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGC	AL-DP-4049	S	1980	5 UGCCAAGUGGUCCCAGGCUGC 3
				AS	1981	3 GUACGGUUCACCAGGGUCCGACG 5
			AL-DP-4087	S	1982	5 UGCCAAGUGGUCCCAGGCUTT 3
				AS	1983	3 TTACGGUUCACCAGGGUCCGA 5
59	2197	AUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCA	AL-DP-4001	S	1984	5 GCCAAGUGGUCCCAGGCUGCA 3
				AS	1985	3 UACGGUUCACCAGGGUCCGACGU 5
			AL-DP-4052	A	1986	5 GCCAAGUGGUCCCAGGCUGTT 3
				AS	1987	3 TTGGUUCACCAGGGUCCGAC 5
60	2198	UGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCAC	AL-DP-4007	S	1988	5 CCAAGUGGUCCCAGGCUGCAC 3
				AS	1989	3 ACGGUUCACCAGGGUCCGACGUG 5
			AL-DP-4088	S	1990	5 CCAAGUGGUCCCAGGCUGCTT 3
				AS	1991	3 TTGGUUCACCAGGGUCCGACG 5
61	2199	GCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACC	AL-DP-4070	S	1992	5 CAAGUGGUCCCAGGCUGCACC 3
				AS	1993	3 CGGUUCACCAGGGUCCGACGUG 5
			AL-DP-4055	S	1994	5 CAAGUGGUCCCAGGCUGCATT 3
				AS	1995	3 TTGUUCACCAGGGUCCGACGU 5
62	2200	CCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCC	AL-DP-4071	S	1996	5 AAGUGGUCCCAGGCUGCACCC 3
				AS	1997	3 GGUUCACCAGGGUCCGACGUGGG 5

10

20

30

40

【表 4 - 8】

ORF 内 の 位置	配 列 番号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖	配 列 番号	鎖配列
			AL-DP-4056	S	1998	5 AAGUGGUCCCAGGCUGCACTT 3
				AS	1999	3 TTUACACCAGGGUCCGACGUG 5
63	2201	CAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCA	AL-DP-4072	S	2000	5 AGUGGUCCCAGGCUGCACCCA 3
				AS	2001	3 GUUCACCAGGGUCCGACGUGGGU 5
			AL-DP-4057	S	2002	5 AGUGGUCCCAGGCUGCACCTT 3
				AS	2003	3 TTUACACCAGGGUCCGACGUGG 5
64	2202	AAGUGGUCCCAGGCUGCACCCA	AL-DP-4066	S	2004	5 GUGGUCCCAGGCUGCACCTT 3
				AS	2005	3 TTCACCAGGGUCCGACGUGGG 5
99	2203	AGGCAGAAUCAUCACGAAGUGG	AL-DP-4022	S	2006	5 GGCAGAAUCAUCACGAAGUTT 3
				AS	2007	3 TTCCGUCUUAGUAGUGCUUCA 5
100	2204	GGCAGAAUCAUCACGAAGUGGU	AL-DP-4023	S	2008	5 GCAGAAUCAUCACGAAGUGTT 3
				AS	2009	3 TTCGUCUUAGUAGUGCUUCAC 5
101	2205	GGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUG	AL-DP-4024	S	2010	5 CAGAAUCAUCACGAAGUGGTT 3
				AS	2011	3 TTGUCUUAGUAGUGCUUCACC 5
102	2206	GCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGA	AL-DP-4076	S	2012	5 AGAAUCAUCACGAAGUGGUGA 3
				AS	2013	3 CGUCUUAGUAGUGCUUCACCACU 5
			AL-DP-4019	S	2014	5 AGAAUCAUCACGAAGUGGUTT 3
				AS	2015	3 TTUCUUAGUAGUGCUUCACCA 5
103	2207	CAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAA	AL-DP-4025	S	2016	5 GAAUCAUCACGAAGUGGUGTT 3
				AS	2017	3 TTCUUAGUAGUGCUUCACCAC 5
104	2208	AGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAG	AL-DP-4110	S	2018	5 AAUCAUCACGAAGUGGUGATT 3
				AS	2019	3 TTUAGUAGUGCUUCACCACU 5
105	2209	GAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGU	AL-DP-4068	S	2020	5 AUCAUCACGAAGUGGUGAATT 3
				AS	2021	3 TTUAGUAGUGCUUCACCACUU 5
113	2210	ACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAU	AL-DP-4078	S	2022	5 GAAGUGGUGAAGUUCAUGGAU 3
				AS	2023	3 UGCUUCACCACUUCAGUACCUA 5
121	2211	GUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCA	AL-DP-4080	S	2024	5 GAAGUUCAUGGAUGUCUAUCA 3
				AS	2025	3 CACUUCAGUACCUACAGAUAGU 5
129	2212	CAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCU	AL-DP-4111	S	2026	5 UGGAUGUCUAUCAGCGCAGTT 3
				AS	2027	3 TTACCUACAGAUAGUCGCGUC 5

10

20

30

40

【表 4 - 9】

ORF 内 の 位置	配 列 番号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖	配 列 番号	鎖配列
130	2213	AUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUA	AL-DP-4041	S	2028	5 GGAUGUCUAUCAGCGCAGCUA 3
				AS	2029	3 UACCUACAGAUAGUCGCGUCGAU 5
			AL-DP-4062	S	2030	5 GGAUGUCUAUCAGCGCAGCTT 3
				AS	2031	3 TTCCUACAGAUAGUCGCGUCG 5
131	2214	UGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUAC	AL-DP-4069	S	2032	5 GAUGUCUAUCAGCGCAGCUTT 3
				AS	2033	3 TTCUACAGAUAGUCGCGUCGA 5
132	2215	GGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACU	AL-DP-4112	S	2034	5 AUGUCUAUCAGCGCAGCUATT 3
				AS	2035	3 TTUACAGAUAGUCGCGUCGAU 5
133	2216	GAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUG	AL-DP-4026	S	2036	5 UGUCUAUCAGCGCAGCUACTT 3
				AS	2037	3 TTACAGAUAGUCGCGUCGAUG 5
134	2217	AUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGC	AL-DP-4095	S	2038	5 GUCUAUCAGCGCAGCUACUGC 3
				AS	2039	3 UACAGAUAGUCGCGUCGAUGACG 5
			AL-DP-4020	S	2040	5 GUCUAUCAGCGCAGCUACUTT 3
				AS	2041	3 TTCAGAUAGUCGCGUCGAUGA 5
135	2218	UGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCC	AL-DP-4027	S	2042	5 UCUAUCAGCGCAGCUACUGTT 3
				AS	2043	3 TTAGAUAGUCGCGUCGAUGAC 5
144	2219	GCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCG	AL-DP-4081	S	2044	5 GCAGCUACUGCCAUCCAAUCG 3
				AS	2045	3 CGCGUCGAUGACGGUAGGUUAGC 5
146	2220	GCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAG	AL-DP-4098	S	2046	5 AGCUACUGCCAUCCAAUCGAG 3
				AS	2047	3 CGUCGAUGACGGUAGGUUAGCUC 5
149	2221	GCUACUGCCAUCCAAUCGAGACC	AL-DP-4028	S	2048	5 UACUGCCAUCCAAUCGAGATT 3
				AS	2049	3 TTAUGACGGUAGGUUAGCUCU 5
150	2222	CUACUGCCAUCCAAUCGAGACCC	AL-DP-4029	S	2050	5 ACUGCCAUCCAAUCGAGACTT 3
				AS	2051	3 TTUGACGGUAGGUUAGCUCUG 5
151	2223	UACUGCCAUCCAAUCGAGACCCU	AL-DP-4030	S	2052	5 CUGCCAUCCAAUCGAGACCTT 3
				AS	2053	3 TTGACGGUAGGUUAGCUCUGG 5
152	2224	ACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUG	AL-DP-4031	S	2054	5 UGCCAUCCAAUCGAGACCTT 3
				AS	2055	3 TTACGGUAGGUUAGCUCUGGG 5
166	2225	GAGACCCUGGUGGACAUCUUCCA	AL-DP-4008	S	2056	5 GACCCUGGUGGACAUCUUCCA 3
				AS	2057	3 CUCUGGGACCACCUGUAGAAGGU 5

10

20

30

40

【表 4 - 10】

ORF 内 の 位置	配 列 番号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖	配 列 番号	鎖配列
			AL-DP-4058	S	2058	5 GACCCUGGUGGACAUCUUCTT 3
				AS	2059	3 TTCUGGGACCACCUGUAGAAG 5
167	2226	AGACCCUGGUGGACAUCUCCAG	AL-DP-4009	S	2060	5 ACCCUGGUGGACAUCUCCAG 3
				AS	2061	3 UCUGGGACCACCUGUAGAAGGUC 5
			AL-DP-4059	S	2062	5 ACCCUGGUGGACAUCUUCTT 3
				AS	2063	3 TTUGGGACCACCUGUAGAAGG 5
168	2227	GACCCUGGUGGACAUCUCCAGG	AL-DP-4010	S	2064	5 CCCUGGUGGACAUCUCCAGG 3
				AS	2065	3 CUGGGACCACCUGUAGAAGGUCC 5
			AL-DP-4060	S	2066	5 CCCUGGUGGACAUCUCCATT 3
				AS	2067	3 TTGGGACCACCUGUAGAAGGU 5
169	2228	ACCCUGGUGGACAUCUCCAGGA	AL-DP-4073	S	2068	5 CCUGGUGGACAUCUCCAGGA 3
				AS	2069	3 UGGGACCACCUGUAGAAGGUCCU 5
			AL-DP-4104	S	2070	5 CCUGGUGGACAUCUCCAGTT 3
				AS	2071	3 TTGGACCACCUGUAGAAGGUC 5
170	2229	CCUGGUGGACAUCUCCAGGAG	AL-DP-4011	S	2072	5 CUGGUGGACAUCUCCAGGAG 3
				AS	2073	3 GGGACCACCUGUAGAAGGUCCUC 5
			AL-DP-4089	S	2074	5 CUGGUGGACAUCUCCAGGTT 3
				AS	2075	3 TTGACCACCUGUAGAAGGUCC 5
171	2230	CCUGGUGGACAUCUCCAGGAGU	AL-DP-4074	S	2076	5 UGGUGGACAUCUCCAGGAGU 3
				AS	2077	3 GGACCACCUGUAGAAGGUCCUCA 5
			AL-DP-4090	S	2078	5 UGGUGGACAUCUCCAGGATT 3
				AS	2079	3 TTACCACCUGUAGAAGGUCCU 5
172	2231	CUGGUGGACAUCUCCAGGAGUA	AL-DP-4039	S	2080	5 GGUGGACAUCUCCAGGAGUA 3
				AS	2081	3 GACCACCUGUAGAAGGUCCUCAU 5
			AL-DP-4091	S	2082	5 GGUGGACAUCUCCAGGAGTT 3
				AS	2083	3 TTCCACCUGUAGAAGGUCCUC 5
175	2232	GUGGACAUCUCCAGGAGUACCC	AL-DP-4003	S	2084	5 GGACAUCUCCAGGAGUACCC 3
				AS	2085	3 CCUGUAGAAGGUCCUCAUGGG 5
			AL-DP-4116	S	2086	5 GGACAUCUCCAGGAGUACCC 3
				AS	2087	3 CCUGUAGAAGGUCCUCAUGGG 5

10

20

30

40

【表 4 - 1 1】

ORF 内 の 位置	配 列 番号	標的配列 (5'→3')	二重鎖 ID	鎖	配 列 番号	鎖配列
			AL-DP-4015	S	2088	5 GGACAUCUCCAGGAGUACTT 3
				AS	2089	3 TTCCUGUAGAAGGUCCUCAUG 5
			AL-DP-4120	S	2090	5 GGACAUCUCCAGGAGUAC 3
				AS	2091	3 CCUGUAGAAGGUCCUCAUG 5
179	2233	ACAUCUCCAGGAGUACCCUGAU	AL-DP-4099	S	2092	5 AUCUCCAGGAGUACCCUGAU 3
				AS	2093	3 DGUAGAAGGUCCUCAUGGGACUA 5
191	2234	AGUACCCUGAUGAGAUCCGAGUAC	AL-DP-4032	S	2094	5 UACCCUGAUGAGAUCCGAGUTT 3
				AS	2095	3 TTAUGGGACUACUCUAGCUCA 5
192	2235	GUACCCUGAUGAGAUCCGAGUACA	AL-DP-4042	S	2096	5 ACCCUGAUGAGAUCCGAGUACA 3
				AS	2097	3 CAUGGGACUACUCUAGCUCAUGU 5
			AL-DP-4063	S	2098	5 ACCCUGAUGAGAUCCGAGUATT 3
				AS	2099	3 TTUGGGACUACUCUAGCUCAU 5
209	2236	AGUACAUCUCCAAGCCAUCUUGU	AL-DP-4064	S	2100	5 UACAUCUCCAAGCCAUCUUTT 3
				AS	2101	3 TTAUGUAGAAGUUCGGUAGGA 5
260	2237	GCAAUGACGAGGGCCUGGAGUGU	AL-DP-4044	S	2102	5 AAUGACGAGGGCCUGGAGUGU 3
				AS	2103	3 CGUUAUGUCUCCCGGACCUCACA 5
263	2238	AUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUG	AL-DP-4045	S	2104	5 GACGAGGGCCUGGAGUGUGUG 3
				AS	2105	3 UACUGCUCCCGGACCUCACACAC 5
279	2239	GUGUGUGCCACUGAGGAGUCCA	AL-DP-4046	S	2106	5 GUGUGCCACUGAGGAGUCCA 3
				AS	2107	3 CACACACGGGUGACUCCUCAGGU 5
281	2240	GUGUGCCACUGAGGAGUCCAAC	AL-DP-4096	S	2108	5 GUGCCACUGAGGAGUCCAAC 3
				AS	2109	3 CACACGGGUGACUCCUCAGGUUG 5
283	2241	GUGCCACUGAGGAGUCCAACAU	AL-DP-4040	S	2110	5 GCCCACUGAGGAGUCCAACAU 3
				AS	2111	3 CACGGGUGACUCCUCAGGUUGUA 5
289	2242	ACUGAGGAGUCCAACAUCACCAU	AL-DP-4065	S	2112	5 UGAGGAGUCCAACAUCACCTT 3
				AS	2113	3 TTACUCCUCAGGUUGUAGUGG 5
302	2243	ACAUCACCAUGCAGAUUAUGCGG	AL-DP-4100	S	2114	5 AUCACCAUGCAGAUUAUGCGG 3
				AS	2115	3 UGUAGUGGUACGUCUAAUACGCC 5
305	2244	UCACCAUGCAGAUUAUGCGGAUC	AL-DP-4033	S	2116	5 ACCAUGCAGAUUAUGCGGATT 3
				AS	2117	3 TTUGGUACGUCUAAUACGCCU 5

10

20

30

40

【表 4 - 1 2】

ORF 内 の 位置	配 列 番号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖	配 列 番号	鎖配列
310	2245	AUGCAGAUUAUGCGGAUCAAACC	AL-DP-4101	S	2118	5 GCAGAUUAUGCGGAUCAAACC 3
				AS	2119	3 UACGUCUAAUACGCCUAGUUUGG 5
312	2246	GCAGAUUAUGCGGAUCAAACCUC	AL-DP-4102	S	2120	5 AGAUUAUGCGGAUCAAACCUC 3
				AS	2121	3 CGUCUAAUACGCCUAGUUUGGAG 5
315	2247	GAUUAUGCGGAUCAAACCUCACC	AL-DP-4034	S	2122	5 UUAUGCGGAUCAAACCUCATT 3
				AS	2123	3 TTAUACGCCUAGUUUGGAGU 5
316	2248	AUUAUGCGGAUCAAACCUCACCA	AL-DP-4113	S	2124	5 UAUGCGGAUCAAACCUCACTT 3
				AS	2125	3 TTAUACGCCUAGUUUGGAGUG 5
317	2249	UUAUGCGGAUCAAACCUCACCAA	AL-DP-4114	S	2126	5 AUGCGGAUCAAACCUCACCTT 3
				AS	2127	3 TTUACGCCUAGUUUGGAGUGG 5
319	2250	AUGCGGAUCAAACCUCACCAAGG	AL-DP-4002	S	2128	5 GCGGAUCAAACCUCACCAAGG 3
				AS	2129	3 UACGCCUAGUUUGGAGUGGUCC 5
			AL-DP-4115	S	2130	5 GCGGAUCAAACCUCACCAA 3
				AS	2131	3 CGCCUAGUUUGGAGUGGUU 5
			AL-DP-4014	S	2132	5 GCGGAUCAAACCUCACCAATT 3
				AS	2133	3 TTCGCCUAGUUUGGAGUGGUU 5
			AL-DP-4119	S	2134	5 GCGGAUCAAACCUCACCAA 3
				AS	2135	3 CGCCUAGUUUGGAGUGGUU 5
321	2251	GCGGAUCAAACCUCACCAAGGCC	AL-DP-4013	S	2136	5 GGAUCAAACCUCACCAAGGCC 3
				AS	2137	3 CGCCUAGUUUGGAGUGGUUCCGG 5
341	2252	GCCAGCACAUAGGAGAGAUGAGC	AL-DP-4075	S	2138	5 CAGCACAUAGGAGAGAUGAGC 3
				AS	2139	3 CGGUCGUGUAUCCUCUCUACUCG 5
			AL-DP-4105	S	2140	5 CAGCACAUAGGAGAGAUGATT 3
				AS	2141	3 TTGUCGUGUAUCCUCUCUACU 5
342	2253	CCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCU	AL-DP-4050	S	2142	5 AGCACAUAGGAGAGAUGAGCU 3
				AS	2143	3 GGUCGUGUAUCCUCUCUACUCGA 5
			AL-DP-4106	S	2144	5 AGCACAUAGGAGAGAUGAGTT 3
				AS	2145	3 TTUCGUGUAUCCUCUCUACUC 5
343	2254	CAGCACAUAGGAGAGAUGAGCUU	AL-DP-4094	S	2146	5 GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU 3
				AS	2147	3 GUUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAA 5

10

20

30

40

【表 4 - 1 3】

ORF 内 の 位置	配 列 番 号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖 配 列 番 号	鎖配列
			AL-DP-4118	S 2148	5 GCACAUAGGAGAGAGAGCUU 3
				AS 2149	3 CGUGUAUCCUCUCUACUCGAA 5
			AL-DP-4107	S 2150	5 GCACAUAGGAGAGAGAGCCTT 3
				AS 2151	3 TTCGUGUAUCCUCUCUACUCG 5
			AL-DP-4122	S 2152	5 GCACAUAGGAGAGAGAGAGC 3
				AS 2153	3 CGUGUAUCCUCUCUACUCG 5
344	2255	AGCACAUAAGGAGAGAGAGCUUC	AL-DP-4012	S 2154	5 CACAUAAGGAGAGAGAGCUUC 3
				AS 2155	3 UCGUGUAUCCUCUCUACUCGAAG 5
			AL-DP-4108	S 2156	5 CACAUAAGGAGAGAGAGCUTT 3
				AS 2157	3 TTGUGUAUCCUCUCUACUCGA 5
346	2256	CACAUAAGGAGAGAGAGCUUCCU	AL-DP-4051	S 2158	5 CAUAAGGAGAGAGAGCUUCCU 3
				AS 2159	3 GUGUAUCCUCUCUACUCGAAGGA 5
			AL-DP-4061	S 2160	5 CAUAAGGAGAGAGAGCUUCTT 3
				AS 2161	3 TTGUAUCCUCUCUACUCGAAG 5
349	2257	AUAGGAGAGAGAGAGCUUCCUACA	AL-DP-4082	S 2162	5 AGGAGAGAGAGAGCUUCCUACA 3
				AS 2163	3 UAUCCUCUCUACUCGAAGGAUGU 5
369	2258	ACAGCACAACAAAUGUGAAUGCA	AL-DP-4079	S 2164	5 AGCACAACAAAUGUGAAUGCA 3
				AS 2165	3 UGUCGUGUUGUUACACUUACGU 5
372	2259	GCACAACAAAUGUGAAUGCAGAC	AL-DP-4097	S 2166	5 ACAACAAAUGUGAAUGCAGAC 3
				AS 2167	3 CGUGUUGUUUACACUUACGUCUG 5
379	2260	AAUGUGAAUGCAGACCAAAGAA	AL-DP-4067	S 2168	5 AUGUGAAUGCAGACCAAAGTT 3
				AS 2169	3 TTUACACUUACGUCUGGUUUC 5
380	2261	AAUGUGAAUGCAGACCAAAGAAA	AL-DP-4092	S 2170	5 UGUGAAUGCAGACCAAAGATT 3
				AS 2171	3 TTACACUUACGUCUGGUUUCU 5
381	2262	AUGUGAAUGCAGACCAAAGAAAG	AL-DP-4004	S 2172	5 GUGAAUGCAGACCAAAGAAAG 3
				AS 2173	3 UACACUUACGUCUGGUUUCUUC 5
			AL-DP-4117	S 2174	5 GUGAAUGCAGACCAAAGAAAG 3
				AS 2175	3 CACUACGUCUGGUUUCUUC 5
			AL-DP-4016	S 2176	5 GUGAAUGCAGACCAAAGAATT 3
				AS 2177	3 TTCACUACGUCUGGUUUCUU 5

10

20

30

40

【表 4 - 1 4】

ORF 内 の 位置	配 列 番号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖 番号	鎖配列
			AL-DP-4121	S 2178	5 GUGAUGCAGACCAAAGAA 3
				AS 2179	3 CACUACGUCUGGUUUCUG 5
383	2263	GUGAUGCAGACCAAAGAAAGAU	AL-DP-4005	S 2180	5 GAAUGCAGACCAAAGAAAGAU 3
				AS 2181	3 CACUACGUCUGGUUUCUUCUA 5
			AL-DP-4053	S 2182	5 GAAUGCAGACCAAAGAAAGTT 3
				AS 2183	3 TTCUACGUCUGGUUUCUUC 5

10

【 0 2 3 5】

実施例 2 . 細胞増殖を介した E g 5 s i R N A のインビトロスクリーニング

E g 5 の発現停止が、有糸分裂の停止を引き起こすことが示されているため (Weil, D, et al [2002] Biotechniques 33:1244-8)、s i R N A 活性のスクリーニングに細胞生死判別アッセイを使用した。HeLa 細胞 (ウェル当たり 14000 個 [スクリーニング 1 および 3]、またはウェル当たり 10000 個 [スクリーニング 2]) を 96 ウェルプレートに播種し、30 nM のウェル中最終 s i R N A 濃度、ならびに 50 nM (第 1 のスクリーニング) および 25 nM (第 2 のスクリーニング) の最終濃度で、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を同時に形質移入した。第 3 のスクリーニングで、二重鎖のサブセットを 25 nM で試験した (表 5)。

20

【 0 2 3 6】

形質移入の 72 時間後、WST-1 試薬 (Roche) を培養基に添加し、その後 450 nm での吸光測定により、細胞増殖をアッセイした。対照 (非形質移入) 細胞の吸光度値を 100 パーセントと見なし、s i R N A を形質移入したウェルの吸光度を対照の値と比較した。アッセイは、3 回のスクリーニングのそれぞれについて、6 回繰り返して行った。s i R N A のサブセットを種々の s i R N A 濃度でさらに試験した。アッセイを HeLa 細胞に行った (ウェル当たり 14000 個、上記と同一の方法、表 5)。

30

【 0 2 3 7】

表 5 : 25 nM での細胞生存率に対する E g 5 標的 二重鎖 の効果。

【表 5】

二重鎖	450 nm での相対吸光度					
	スクリーニング I		スクリーニング II		スクリーニング III	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
AL-DP-6226	20	10	28	11	43	9
AL-DP-6227	66	27	96	41	108	33
AL-DP-6228	56	28	76	22	78	18
AL-DP-6229	17	3	31	9	48	13
AL-DP-6230	48	8	75	11	73	7
AL-DP-6231	8	1	21	4	41	10
AL-DP-6232	16	2	37	7	52	14
AL-DP-6233	31	9	37	6	49	12
AL-DP-6234	103	40	141	29	164	45
AL-DP-6235	107	34	140	27	195	75
AL-DP-6236	48	12	54	12	56	12
AL-DP-6237	73	14	108	18	154	37
AL-DP-6238	64	9	103	10	105	24
AL-DP-6239	9	1	20	4	31	11
AL-DP-6240	99	7	139	16	194	43
AL-DP-6241	43	9	54	12	66	19
AL-DP-6242	6	1	15	7	36	8
AL-DP-6243	7	2	19	5	33	13
AL-DP-6244	7	2	19	3	37	13
AL-DP-6245	25	4	45	10	58	9
AL-DP-6246	34	8	65	10	66	13
AL-DP-6247	53	6	78	14	105	20
AL-DP-6248	7	0	22	7	39	12
AL-DP-6249	36	8	48	13	61	7

【0238】

表 5 中で最も高い成長阻害を示した 9 つの siRNA 二重鎖を、HeLa 細胞中の種々の siRNA 濃度で再試験した。試験した siRNA 濃度は、100 nM、33.3 nM、11.1 nM、3.70 nM、1.23 nM、0.41 nM、0.14 nM、および 0.046 nM であった。アッセイは、6 回繰り返して行い、細胞増殖の 50 パーセントの阻害をもたらす各 siRNA の濃度 (IC₅₀) を算出した。この用量反応分析は、各二重鎖について 2 回から 4 回行った。平均 IC₅₀ 値 (nM) を表 6 に示す。

【0239】

表 6 : siRNA の IC₅₀ : HeLa 細胞中の細胞増殖

【表 6】

二重鎖	平均 IC ₅₀
AL-DP-6226	15.5
AL-DP-6229	3.4
AL-DP-6231	4.2
AL-DP-6232	17.5
AL-DP-6239	4.4
AL-DP-6242	5.2
AL-DP-6243	2.6
AL-DP-6244	8.3
AL-DP-6248	1.9

10

【0240】

実施例 3 . mRNA 阻害を介した E g 5 s i RNA のインビトロスクリーニング

形質移入の直前に、HeLa S3 (ATCC 番号: CCL-2.2、LCG Pro
mochem GmbH (Wesel, Germany)) 細胞を、75 µl の成長培地
(Ham の F12、10% ウシ胎仔血清、100 u のペニシリン / 100 µg / ml のス
トレプトマイシン、全て Bookroom AG (Berlin, Germany) より
) 中、96 ウェルプレート (Greiner Bio-One GmbH (Fricke
nhausen, Germany)) に 1.5×10^4 細胞 / ウェルで播種した。形質移
入は 4 回繰り返して行った。各ウェルについて、0.5 µl の Lipofectamin
e 2000 (Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Germany)) を 12 µl の Opti-MEM (Invitrogen) と混合し、室温で 15 分間イ
ンキュベートした。100 µl の形質移入容量中 50 nM である siRNA 濃度について
、1 µl の 5 µM の siRNA をウェル当たり 11.5 µl の Opti-MEM と混合し
、Lipofectamine 2000 - Opti-MEM 混合物と合わせて、再度室温
で 15 分間インキュベートした。siRNA - Lipofectamine 2000 複合
体を完全に細胞に適用し (ウェル当たりそれぞれ 25 µl)、細胞を 24 時間、37 お
よび加湿インキュベーター (Heroes GmbH (Hanau)) 中 5% CO₂ で
インキュベートした。単回用量スクリーニングを一旦それぞれ 50 nM および 25 nM で
行った。

20

30

【0241】

100 µl の成長培地を含有する各ウェルに 50 µl の溶解混合物 (Genospec
tra (Fremont, USA) からの QuantiGene bDNA キットの内容
物) を適用することによって細胞を収集し、53 で 30 分間溶解した。その後、50 µ
l の溶菌液をヒト E g 5 およびヒト GAPDH に特異的なプローブセットでインキュベ
ートし、製造業者の QuantiGene 用のプロトコルに従って進めた。最後に化学発光
を RLU (相対光単位) として Victor 2 - Light (Perkin Elmer
(Wiesbaden, Germany)) で測定し、hEg5 プローブセットで得られ
た値を、各ウェルについてそれぞれの GAPDH 値に基準化した。Eg5 を対象とした s
iRNA で得られた値を、100% に設定された非特異的 siRNA (HCV を対象とし
た) と関連付けた (表 1 b、2 b、および 3 b)。

40

【0242】

スクリーニングからの効果的な siRNA を、用量反応曲線によってさらに特徴づけた
。用量反応曲線の形質移入は、100 nM、16.7 nM、2.8 nM、0.46 nM、

50

77 p i c o M、12.8 p i c o M、2.1 p i c o M、0.35 p i c o M、59.5 f M、9.9 f M、および偽 (s i R N A なし) の濃度で行い、上記プロトコルに従って、O p t i - M E M を用いて 12.5 μ l の最終濃度に希釈した。データ分析は、M i c r o s o f t E x c e l の拡張ソフトウェアである X L - f i t 4.2 (I D B S (G u i l d f o r d , S u r r e y , U K)) を使用し、用量反応モデル番号 205 を適用して行った (表 1 b、2 b、および 3 b)。

【 0 2 4 3 】

優位な s i R N A である A D 1 2 1 1 5 を、R o c h e から W S T - 増殖アッセイ (前述の通り) を適用することによって、さらに分析した。

【 0 2 4 4 】

最も高い活性を示した表 2 からの 34 個の二重鎖のサブセットを、100 n M ~ 10 f M の範囲の最終濃度で H e L a 細胞に形質移入することによってアッセイした。形質移入は 4 回繰り返して行った。各二重鎖について 2 回の用量反応アッセイを行った。各二重鎖について、K S P m R N A の 20 % (I C 20)、50 % (I C 50)、および 80 % (I C 80) の低下を示す濃度を算出した (表 7)。

【 0 2 4 5 】

表 7 : H e L a 細胞中の E g 5 / K S P 二重鎖の用量反応性 m R N A 阻害
p M で示される濃度

【表 7】

	IC20		IC50		IC80	
二重鎖名	第1のスクリーニン	第2のスクリーニン	第1のスクリーニン	第2のスクリーニン	第1のスクリーニン	第2のスクリーニン
AD12077	1.19	0.80	6.14	10.16	38.63	76.16
AD12078	25.43	25.43	156.18	156.18	ND	ND
AD12085	9.08	1.24	40.57	8.52	257.68	81.26
AD12095	1.03	0.97	9.84	4.94	90.31	60.47
AD12113	4.00	5.94	17.18	28.14	490.83	441.30
AD12115	0.60	0.41	3.79	3.39	23.45	23.45
AD12125	31.21	22.02	184.28	166.15	896.85	1008.11
AD12134	2.59	5.51	17.87	22.00	116.36	107.03
AD12149	0.72	0.50	4.51	3.91	30.29	40.89
AD12151	0.53	6.84	4.27	10.72	22.88	43.01
AD12152	155.45	7.56	867.36	66.69	13165.27	ND
AD12157	0.30	26.23	14.60	92.08	14399.22	693.31
AD12166	0.20	0.93	3.71	3.86	46.28	20.59
AD12180	28.85	28.85	101.06	101.06	847.21	847.21
AD12185	2.60	0.42	15.55	13.91	109.80	120.63
AD12194	2.08	1.11	5.37	5.09	53.03	30.92
AD12211	5.27	4.52	11.73	18.93	26.74	191.07
AD12257	4.56	5.20	21.68	22.75	124.69	135.82
AD12280	2.37	4.53	6.89	20.23	64.80	104.82
AD12281	8.81	8.65	19.68	42.89	119.01	356.08
AD12282	7.71	456.42	20.09	558.00	ND	ND
AD12285	ND	1.28	57.30	7.31	261.79	42.53
AD12292	40.23	12.00	929.11	109.10	ND	ND
AD12252	0.02	18.63	6.35	68.24	138.09	404.91
AD12275	25.76	25.04	123.89	133.10	1054.54	776.25
AD12266	4.85	7.80	10.00	32.94	41.67	162.65
AD12267	1.39	1.21	12.00	4.67	283.03	51.12
AD12264	0.92	2.07	8.56	15.12	56.36	196.78
AD12268	2.29	3.67	22.16	25.64	258.27	150.84
AD12279	1.11	28.54	23.19	96.87	327.28	607.27
AD12256	7.20	33.52	46.49	138.04	775.54	1076.76
AD12259	2.16	8.31	8.96	40.12	50.05	219.42
AD12276	19.49	6.14	89.60	59.60	672.51	736.72
AD12321	4.67	4.91	24.88	19.43	139.50	89.49

(ND－判定されず)

【 0 2 4 6 】

実施例 4 . L N P 0 1 製剤化 s i R N A の単回ボ－ラス投与後の幼若ラットにおける肝臓 E g 5 / K S P の発現停止

出生から約 2 3 日齢まで、成長期ラット肝臓に E g 5 / K S P 発現を検出することができる。二重鎖 A D - 6 2 4 8 を使用して、幼若ラットにおける、製剤化 E g 5 / K S P s i R N A を用いた標的の発現停止を評価した。

【 0 2 4 7 】

試験した K S P 二重鎖

【 化 1 2 】

二重鎖 ID	標的	センス	アンチセンス
AD6248	KSP	AccGAAAGuGuaGuaGuaGuaTtT (SEQ ID NO:1238)	GGAcAAAcAAcACUUCGGUTtT (SEQ ID NO:1239)

【 0 2 4 8 】

方法

動物の投薬。雄の幼若 S p r a g u e - D a w l e y ラット (1 9 日 齢) に、尾静脈注射を介して単回用量の脂質様 (「 L N P 0 1 」) 製剤化 s i R N A を投与した。10匹の動物の群に、10ミリグラム / 体重1キログラム (m g / k g) の用量の、A D 6 2 4 8 または非特異的 s i R N A のいずれかを与えた。用量レベルとは、製剤中の、投与された s i R N A 二重鎖の量を指す。第3の群には、リン酸緩衝食塩水を与えた。動物は、s i R N A 投与の2日後に殺処理した。肝臓を解剖し、液体窒素中で急速冷凍し、粉末に微粉砕した。

10

【 0 2 4 9 】

m R N A 測定。全ての処置群からの肝臓の、E g 5 / K S P m R N A のレベルを測定した。各肝臓粉末の試料 (約 1 0 ミリグラム) を、プロテイナーゼ K を含有する組織溶解緩衝液中で均質化した。各試料について、Q u a n t i g e n e 分岐 D N A アッセイ (G e n o S p e c t r a) を使用して、E g 5 / K S P および G A P D H の m R N A のレベルを3回繰り返して測定した。各試料について、E g 5 / K S P の平均値を平均 G A P D H 値に基準化した。各実験について、群平均を決定し、P B S 群に基準化した。

20

【 0 2 5 0 】

統計分析。有意性は、A N O V A 、その後 T u k e y の事後検定によって決定した。

【 0 2 5 1 】

結果

データ要約

E g 5 / K S P m R N A の平均値 (± 標準偏差) を示す。P B S 群に対する統計的有意性 (p 値) を示す (n s 、有意でない [p > 0 . 0 5]) 。

30

【 0 2 5 2 】

表 8 . 実験 1

【 表 8 】

		KSP/GAPDH	p 値
PBS		1.0±0.47	
AD6248	10 mg/kg	0.47±0.12	<0.001
非特異的	10 mg/kg	1.0±0.26	ns

【 0 2 5 3 】

肝臓 E g 5 / K S P m R N A における統計的に有意な低下が、10 m g / k g の用量の製剤化 A D 6 2 4 8 を用いた処置後に得られた。

40

【 0 2 5 4 】

実施例 5 . L N P 0 1 製剤化 V S P の静脈内注入後のラット肝臓 V E G F の発現停止

2 つの s i R N A の等モル混合物を含む「脂質様」製剤をラットに投与した。本明細書で使用される V S P とは、1 つは E g 5 / K S P を対象とし、1 つは V E G F を対象とする、2 つの s i R N A を有する組成物を指す。本実験には、V E G F を対象とする A D 3 1 3 3 、および E g 5 / K S P を対象とする A D 1 2 1 1 5 の二重鎖を使用した。E g 5 / K S P の発現は、成熟ラット肝臓ではほとんど検出不可能であるため、V E G F のレベルのみを s i R N A 処置後に測定した。

【 0 2 5 5 】

50

投与された s i R N A 二重鎖 (V S P)

【化 1 3】

二重鎖 ID	標的	センス	アンチセンス
AD12115	Eg5/KSP	ucGAGAAucuaAAacuAAcuTsT (配列番号 1240)	AGUuAGUuUAGAUCUCGATsT (配列番号 1241)
AD3133	VEGF	GcAcAuAGGAGAGAGAGAGCUsU (配列番号 1242)	AAGCUcAUCUCUCUcCuAuGuGCUsG (配列番号 1243)

凡例：A、G、C、U - リボヌクレオチド、c、u - 2' - O - Me リボヌクレオチド、s - ホスホロチオエート。 10

【0 2 5 6】

各鎖の非修飾型および各 s i R N A の標的は、以下の通りである。

【化 1 4】

Eg5/KSP	非修飾センス	5' UCGAGAAUCUAAACUAAACUTT 3'	配列番号 1534
	非修飾アンチセンス	3' TTAGUCCUUAGAUUUGAUUGA 5'	配列番号 1535
	標的	5' UCGAGAAUCUAAACUAAACU 3'	配列番号 1311
VEGF	非修飾センス	5' GCACAUAGGAGAGAGAUGAGCUU 3'	配列番号 1536
	非修飾アンチセンス	3' GUCCUGUAUCCUCUCUACUCGAA 5'	配列番号 1537
	標的	5' GCACAUAGGAGAGAGAUGAGCUU 3'	配列番号 1538

20

【0 2 5 7】

方法

動物の投薬。成熟した雌の Sprague - Dawley ラットに、大腿静脈への 2 時間の注入によって、脂質様 (「LNP01」) 製剤化 s i R N A を投与した。4 匹の動物の群に、5、10、および 15 ミリグラム / 体重 1 キログラム (mg / kg) の用量の製剤化 s i R N A を与えた。用量レベルとは、製剤中の、投与された s i R N A 二重鎖の総量を指す。第 4 の群には、リン酸緩衝食塩水を与えた。動物は、s i R N A の注入の終了から 72 時間後に殺処理した。肝臓を解剖し、液体窒素中で急速冷凍し、粉末に微粉碎した。 30

【0 2 5 8】

製剤化手順

脂質様 ND98・4HCl (MW 1487) (式 1、上記)、コレステロール (Sigma - Aldrich)、および PEG - Ceramide C16 (Avanti Polar Lipids) を使用して、脂質 s i R N A ナノ粒子を調製した。それぞれエタノール中の原液、ND98 (133 mg / mL)、コレステロール (25 mg / mL)、PEG - Ceramide C16 (100 mg / mL) を調製した。次いで、ND98、コレステロール、および PEG - Ceramide C16 の原液を、42 : 48 : 10 モル比で合わせた。合わせた脂質溶液を、最終エタノール濃度が 35 ~ 45 %、かつ最終酢酸ナトリウム濃度が 100 ~ 300 mM となるように、s i R N A 水溶液 (酢酸ナトリウム、pH 5 中) と迅速に混合した。混合すると、脂質 s i R N A ナノ粒子が自然発生的に形成された。所望の粒径分布に依存して、得られたナノ粒子混合物は、場合によっては、サーモパレル押出機 (Lipex Extruder、Northern Lipids, Inc) を使用して、ポリカーボネート膜 (例えば、100 nm カットオフ) を通して押し出した。別の場合には、押出ステップは割愛された。エタノールおよび同時の緩衝液交換は、透析または接線流濾過のいずれかによって達成した。緩衝液は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) pH 7.2 に交換した。 40

【0 2 5 9】

製剤の特徴づけ

標準的な方法、または押出を伴わない方法のうちのいずれかによって調製された製剤を 50

同様に特徴づける。製剤は、まず目視検査によって特徴づける。それらは、凝集物または沈降物のない、白っぽい半透明の溶液であるべきである。脂質ナノ粒子の粒径および粒径分布は、Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern (USA)) を使用して、動的光散乱によって測定する。粒子は、20 ~ 300 nm、理想的には40 ~ 100 nmの粒径であるべきである。粒径分布は、単峰型であるべきである。製剤中、ならびに捕捉された画分中の総 siRNA 濃度は、色素排除アッセイを使用して推定される。製剤化された siRNA の試料を、製剤を分裂させる界面活性剤、0.5% の Triton-X100 の存在または不在下、RNA に結合する色素、Ribogreen (Molecular Probes) を用いてインキュベートする。製剤中の総 siRNA を、標準曲線に対する、該界面活性剤を含有する試料からのシグナルによって決定する。捕捉された画分を、総 siRNA 含有量から siRNA を「含まない」含有量 (界面活性剤の不在下のシグナルによって測定される) を差し引くことによって決定する。捕捉された siRNA のパーセントは、典型的には > 85% である。SNALP 製剤については、粒径は、少なくとも 30 nm、少なくとも 40 nm、少なくとも 50 nm、少なくとも 60 nm、少なくとも 70 nm、少なくとも 80 nm、少なくとも 90 nm、少なくとも 100 nm、少なくとも 110 nm、および少なくとも 120 nm である。好ましい範囲は、少なくとも約 50 nm ~ 少なくとも約 110 nm、好ましくは少なくとも約 60 nm ~ 少なくとも約 100 nm、最も好ましくは少なくとも約 80 nm ~ 少なくとも約 90 nm である。一例において、粒径のそれぞれは、Eg5 dsRNA 対 VEGF dsRNA の少なくとも約 1 : 1 の比率を含む。

10

20

【0260】

mRNA 測定。各肝臓粉末の試料 (約 10 ミリグラム) を、プロテイナーゼ K を含有する組織溶解緩衝液中で均質化した。各試料について、Quantigene 分岐 DNA アッセイ (Genospectra) を使用して、VEGF および GAPDH の mRNA のレベルを 3 回繰り返して測定した。各試料について、VEGF の平均値を平均 GAPDH 値に基準化した。各実験について、群平均を決定し、PBS 群に基準化した。

【0261】

タンパク質測定。各肝臓粉末の試料 (約 60 ミリグラム) を、1 ml の RIPA 緩衝液中で均質化した。総タンパク質濃度は、Micro BCA タンパク質アッセイキット (Pierce) を使用して決定した。各動物からの総タンパク質の試料を用い、VEGF ELISA アッセイ (R&D systems) を使用して、VEGF のタンパク質レベルを決定した。各実験について、群平均を決定し、PBS 群に基準化した。

30

【0262】

統計分析。有意性は、ANOVA、その後 Tukey の事後検定によって決定した。

【0263】

結果

データ要約

各処置群について、mRNA (VEGF / GAPDH) およびタンパク質 (相対 VEGF) の平均値 (± 標準偏差) を示す。各実験についての、PBS 群に対する統計的有意性 (p 値) を示す。

40

【0264】

表 9 .

【表 9】

	VEGF/GAPDH	p 値	相対 VEGF	p 値
PBS	1.0±0.17		1.0±0.17	
5 mg/kg	0.74±0.12	<0.05	0.23±0.03	<0.001
10 mg/kg	0.65±0.12	<0.005	0.22±0.03	<0.001
15 mg/kg	0.49±0.17	<0.001	0.20±0.04	<0.001

【0265】

10

肝臓 VEGF mRNA およびタンパク質における統計的に有意な低下が、全ての 3 つの siRNA 用量レベルで測定された。

【0266】

実施例 6 . ヒト肝腫瘍のマウスモデルにおける VSP SNALP の評価。

これらの研究は、KSP / Eg5 を標的とする dsRNA および VEGF を標的とする dsRNA を含有する VSP siRNA カクテルを利用した。本明細書で使用される VSP とは、1 つは Eg5 / KSP を対象とし、1 つは VEGF を対象とする、2 つの siRNA を有する組成物を指す。本実験には、AD3133 (VEGF を対象とする) および AD12115 (Eg5 / KSP を対象とする) の二重鎖を使用した。siRNA カクテルを SNALP に製剤化した。

20

【0267】

研究の最大規模では、20 ~ 25 匹のマウスを利用した。肝臓癌を処置する siRNA SNALP カクテルの有効性を試験するために、 1×10^6 の腫瘍細胞を試験マウスの左側葉に直接注射した。切り込みを縫合によって閉じ、マウスを 2 ~ 5 時間回復させた。マウスは 48 ~ 72 時間以内に完全に回復した。SNALP siRNA 処置は、腫瘍の播種から 8 ~ 11 日後に開始した。

【0268】

利用した SNALP 製剤は、(i) VSP (KSP + VEGF siRNA カクテル (1 : 1 モル比))、(ii) KSP (KSP + Luc siRNA カクテル)、および (iii) VEGF (VEGF + Luc siRNA カクテル) であった。全ての製剤が、等量 (mg) の各活性 siRNA を含有した。全てのマウスが総 siRNA / 脂質用量を与えられ、本来のクエン酸塩緩衝液条件を使用して、各カクテルを 1 : 57 cDMA SNALP (1.4% PEG-cDMA、57.1% DLindMA、7.1% DPPC、および 34.3% コレステロール)、6 : 1 の脂質 : 薬物に製剤化した。

30

【0269】

ヒト Hep3B 研究 A : VSP - SNALP の抗腫瘍活性

肝内播種によって、ヒト肝癌 Hep3B 腫瘍を SCID (重症複合免疫不全) / ベージュマウス内に確立した。群 A (n = 6) の動物には PBS を投与し、群 B (n = 6) の動物には VSP SNALP を投与し、群 C (n = 5) の動物には KSP / Luc SNALP を投与し、群 D (n = 5) の動物には VEGF / Luc SNALP を投与した。

40

【0270】

SNALP 処置は、腫瘍の播種から 8 日後に開始した。SNALP は、3 mg / kg の総 siRNA を週 2 回 (月曜日および木曜日)、合計 6 用量 (累積で 18 mg / kg の siRNA) を投与した。最後の用量は、25 日目に投与され、最終エンドポイントは 27 日目であった。

【0271】

腫瘍量は、(a) 体重、(b) 肝重量、(c) 27 日目に目視検査 + 写真、(d) ヒト特異的 mRNA の分析、および (e) 27 日目に血中アルファフェトプロテインレベルをアッセイした。

【0272】

50

以下の表 10 は、播種した（左側）肝葉内で測定された腫瘍量の目視によるスコア化の結果を示す。スコア：「-」= 目に見える腫瘍はない、「+」= 注射部位に腫瘍組織の形跡、「++」= 肝葉から突出する個別的な腫瘍小結節、「+++」= 肝葉の両側に突出する大きな腫瘍、「++++」= 大きな腫瘍、肝葉全体に複数の小結節。

【0273】

表 10 .

【表 10 - 1】

	マウス	腫瘍量
群 A: PBS、27 日目	1	++++
	2	++++
	3	++
	4	+++
	5	++++
	6	++++
群 B: VSP (VEGF + KSP/Eg5)、27 日目	1	+
	2	-
	3	-
	4	-
	5	++
	6	-
群 C: KSP (Luc + KSP)、27 日目	1	+
	2	++
	3	-
	4	+
	5	++
群 D: VEGF	1	++++

10

20

30

【表 10 - 2】

(Luc + VEGF)、27 日目	2	-
	3	++++
	4	+++
	5	++++

40

【0274】

体重の割合としての肝重量を図 1 に示す。

【0275】

体重を図 2 A ~ 2 D に示す。

【0276】

本研究から、以下が結論付けられた。(1) VSP SNALP は、Hep3B 1H

50

モデルにおいて、強力な抗腫瘍効果を示した、(2) VSPカクテルの抗腫瘍活性は、主としてKSP構成成分に関連すると見られる、(3) 抗KSP活性は、単回用量の組織学的分析によって確認された、および(4) VEGF siRNAは、本モデルにおける腫瘍成長の阻害に対して測定可能な効果を示さなかった。

【0277】

ヒトHep3B研究B：VSP処置による生存の延長

第2のHep3B研究では、SCID / ベージュマウスへの肝内播種によって、ヒト肝癌Hep3B腫瘍を確立した。これらのマウスは、免疫介在性抗腫瘍効果に対する最低限の範囲である、リンパ球およびナチュラルキラー(NK)細胞を欠失していた。群A(n=6)のマウスは無処置であり、群B(n=6)のマウスにはルシフェラーゼ(luc) 1955 SNALP(ロット番号AP10-02)を投与し、群C(n=7)のマウスには、VSP SNALP(ロット番号AP10-01)を投与した。SNALPは、1:57 cDMA SNALP、および6:1の脂質:薬物であった。

【0278】

SNALP処置は、腫瘍の播種から8日後に開始した。SNALPは、3mg/kgのsiRNAを週2回(月曜日および木曜日)、合計6用量(累積で18mg/kgのsiRNA)を投与した。最後の用量は25日目に送達され、本研究の最終エンドポイントは27日目であった。

【0279】

腫瘍量は、(1) 体重、(2) 27日目に目視検査+写真、(3) ヒト特異的mRNAの分析、および(4) 27日目に測定される血中アルファフェトプロテインによってアッセイした。

【0280】

体重は、各投薬日(8、11、14、18、21、および25日目)、および殺処理の日(図3)に測定した。

【0281】

表11.

【表11-1】

	マウス	巨視的観察による腫瘍量
群A: 無処置、 27日目	A1R	++
	A1G	++++
	A1W	-
	A2R	++++
	A2G	+++

10

20

30

【表 1 1 - 2】

	A2W	++++
群 B: 1955 Luc SNALP、27 日目	B1R	++++
	B1G	++++
	B1W	+++
	B2R	++
	B2G	+++
	B2W	++++
群 C: VSP SNALP、27 日目	C1R	-
	C1G	-
	C1B	-
	C1W	+
	C2R	+
	C2G	+
	C2W	-

10

20

スコア：「-」= 目に見える腫瘍はない、「+」= 注射部位に腫瘍組織の形跡、「++」= 肝葉から突出する個別的な腫瘍小結節、「+++」= 肝葉の両側に突出する大きな腫瘍、「++++」= 大きな腫瘍、肝葉全体に複数の小結節。

【0282】

体重と腫瘍量との間の相関を図4、5、および6に示す。

【0283】

Hep3Bマウスへの単回用量のVSP SNALP (2 mg/kg) も、組織学的染色によって検査された肝臓組織試料において、有糸分裂紡錘体の形成をもたらした。

30

【0284】

腫瘍量を、定量的RT-PCR (pRT-PCR) (Taqman) によって定量化した。種特異的Taqmanアッセイによって、ヒトGAPDHをマウスGAPDHに基準化した。上記表中で巨視的観察によって示される腫瘍スコアは、GAPDHレベルと相関した (図7A)。

【0285】

腫瘍によって分泌されるアルファフェトプロテイン (AFP) を測定するために、血清ELISAを行った。以下に記載するように、AFPのレベルが処置後に低下すると、腫瘍は成長していない。VSPを用いた処置は、対照を用いた処置と比較して、数匹の動物においてAFPレベルを低下させた (図7B)。

40

【0286】

ヒトHepB3研究C:

第3の研究では、ヒトHCC細胞 (HepB3) をSCID / ベージュマウスの肝臓に直接注射し、20日後に処置を開始した。群Aの動物にはPBSを投与し、群Bの動物には4 mg/kgのLuc-1955 SNALPを投与し、群Cの動物には4 mg/kgのSNALP-VSPを投与し、群Dの動物には、2 mg/kgのSNALP-VSPを投与し、群Eの動物には1 mg/kgのSNALP-VSPを投与した。処置には単回の静脈内 (iv) 用量を用い、24時間後にマウスを殺処理した。

【0287】

腫瘍量および標的の発現停止を、qRT-PCR (Taqman) によってアッセイし

50

た。また、腫瘍スコアを上記のように目視で測定し、その結果を以下の表に示す。図 8 に示される h G A P D H レベルは、以下の表に示される巨視的腫瘍スコアと相関する。

【 0 2 8 8 】

表 1 2 .

【表 1 2】

	マウス	巨視的観察による腫瘍量
群 A: PBS	A2	+++
	A3	+++
	A4	+++
群 B: 4 mg/kg の Luc-1955 SNALP	B1	+
	B2	+++
	B3	+++
	B4	+++
群 C: 4 mg/kg の SNALP-VSP	C1	++
	C2	++
	C3	++
	C4	+++
群 D: 2 mg/kg の SNALP-VSP	D1	++
	D2	+
	D3	+
	D4	++
群 E: 1 mg/kg の SNALP-VSP	E1	+++
	E2	+
	E3	++
	E4	+

10

20

30

スコア：「+」= 不定の腫瘍取り込み / 幾つかの小さな腫瘍、「++」= 肝葉から突出する個別的な腫瘍小結節、「+++」= 肝葉の両側に突出する大きな腫瘍。

【 0 2 8 9 】

ヒト（腫瘍由来）K S P の発現停止を T a q m a n 分析によってアッセイし、結果を図 1 0 に示す。h K S P 発現は、h G A P D H に基準化した。約 8 0 % の腫瘍の K S P の発現停止が、4 m g / k g の S N A L P - V S P で観察され、有効性は 1 m g / k g で明白であった。図 9 の透明のバーは、小さな（低 G A P D H）腫瘍からの結果を表す。

【 0 2 9 0 】

ヒト（腫瘍由来）V E G F の発現停止を T a q m a n 分析によってアッセイし、結果を図 1 0 に示す。h V E G F 発現は、h G A P D H に基準化した。約 6 0 % の腫瘍の V E G F の発現停止が、4 m g / k g の S N A L P - V S P で観察され、有効性は 1 m g / k g で明白であった。図 1 0 の透明のバーは、小さな（低 G A P D H）腫瘍からの結果を表す。

40

【 0 2 9 1 】

マウス（肝臓由来）V E G F の発現停止を T a q m a n 分析によってアッセイし、結果を図 1 1 A に示す。m V E G F 発現は、h G A P D H に基準化した。約 5 0 % の肝臓の V E G F の発現停止が、4 m g / k g の S N A L P - V S P で観察され、有効性は 1 m g / k g で明白であった。

【 0 2 9 2 】

50

ヒト Hep B 3 研究 D : 各 dsRNA の腫瘍成長への寄与

第 4 の研究では、ヒト HCC 細胞 (Hep B 3) を SCID / ベージュマウスの肝臓に直接注射し、8 日後に処置を開始した。処置には、週 2 回、合計 6 用量の静脈内 (iv) ボーラス注射を用いた。最後の用量は、25 日目に投与され、最終エンドポイントは 27 日目であった。

【0293】

腫瘍量を、巨視的組織学、ヒト特異的 mRNA 分析 (h GAPDH qPCR)、および血中アルファフェトプロテインレベル (ELISA による血清 AFP) によってアッセイした。

【0294】

研究 1 では、群 A を PBS で処理し、群 B を SNALP - KSP + Luc (3 mg / kg) で処理し、群 C を SNALP - VEGF + Luc (3 mg / kg) で処理し、群 D を ALN - VSP02 (3 mg / kg) で処理した。

【0295】

研究 2 では、群 A を PBS で処理し、群 B を SNALP - KSP + Luc (1 mg / kg) で処理し、群 C を ALN - VSP02 (1 mg / kg) で処理した。

【0296】

GAPDH の mRNA レベルおよび血清 AFP レベルの両方が、ALN - VSP02 での処置後に低下することが示された (図 11B)。

【0297】

組織学研究:

肝内播種によって、ヒト肝癌 Hep 3 B 腫瘍をマウス内に確立した。SNALP 処置は、腫瘍の播種から 20 日後に開始した。腫瘍担持マウス (群当たり 3 匹) を、2 mg / kg の総 siRNA の (i) VSP SNALP、または (ii) 対照 (Luc) SNALP の単回静脈 (IV) 用量で処置した。

【0298】

肝臓 / 腫瘍試料を、単回 SNALP 投与の 24 時間後、従来の HE 組織学用に収集した。

【0299】

大きな巨視的腫瘍小結節 (5 ~ 10 mm) が、剖検において明白であった。

【0300】

Hep 3 B マウスにおける ALN - VSP の効果:

ALN - VSP (KSP dsRNA と VEGF dsRNA とのカクテル) 処置は、腫瘍由来の KSP および VEGF の腫瘍量および発現を低下させた。腫瘍量の尺度である、GAPDH の mRNA レベルも、ALN - VSP dsRNA の投与後下降することが観察された (図 12A ~ 12C を参照)。目視での巨視的観察による腫瘍量の減少も、ALN - VSP の投与後明白であった。

【0301】

ALN - VSP の単回 IV ボーラス注射も、有糸分裂紡錘体の形成をもたらし、これは、Hep 3 B マウスからの肝臓組織試料中ではっきりと検出された。この観察は、細胞周期の停止を示した。

【0302】

実施例 7 . SNALP - Luc 処置動物に対する SNALP - VSP 動物の生存

癌対象の生存率に対する siRNA SNALP の効果を試験するために、マウスの肝内播種によって腫瘍を確立し、マウスを SNALP - siRNA で処置した。これらの研究は、KSP / Eg5 および VEGF を標的とする dsRNA を含有する、VSP siRNA カクテルを利用した。対照は、dsRNA を標的とする Luc であった。この siRNA カクテルを SNALP に製剤化した。

【0303】

腫瘍細胞 (ヒト肝癌 Hep 3 B、 1×10^6) を、SCID / ベージュマウスの左側

10

20

30

40

50

葉に直接注射した。これらのマウスは、免疫介在性抗腫瘍効果に対する最低限の範囲である、リンパ球およびナチュラルキラー（NK）細胞を欠失していた。切り込みを縫合によって閉じ、マウスを2～5時間回復させた。マウスは48～72時間以内に完全に回復した。

【0304】

全てのマウスが総 siRNA / 脂質静脈内（iv）用量を与えられ、本来のクエン酸塩緩衝液条件を使用して、各カクテルを 1 : 57 cDMA SNALP（1.4% PEG-cDMA、57.1% DLinDMA、7.1% DPPC、および 34.3% コレステロール）、6 : 1 の脂質 : 薬物に製剤化した。

【0305】

siRNA-SNALP 処置は、腫瘍の播種後、以下に示す日（18日目または26日目）に開始した。siRNA-SNALP は、18日目または26日目から3週間の間、週に2回、4 mg / kg の用量で投与した。生存を監視し、動物は、ヒト代替エンドポイント（例えば、動物の体重、腹部膨満 / 変色、および全般的な健康）に基づいて、安楽死させた。

【0306】

腫瘍の播種後18日目に開始した処置に関する生存データを、表13、表14、および図13Aにまとめる。

【0307】

表13. Kaplan-Meier（生存）データ（生存の%）

【表13-1】

日	SNALP-L uc	SNALP- VSP
18	100%	100%
22	100%	100%
25	100%	100%
27	100%	100%
28	100%	100%
28	86%	100%
29	86%	100%
32	86%	100%
33	86%	100%

10

20

30

40

【表 1 3 - 2】

33	43%	100%
35	43%	100%
36	43%	100%
36	29%	100%
38	29%	100%
38	14%	100%
38	14%	88%
40	14%	88%
43	14%	88%
45	14%	88%
49	14%	88%
51	14%	88%
51	14%	50%
53	14%	50%
53	14%	25%
55	14%	25%
57	14%	25%
57	0%	0%

10

20

【 0 3 0 8 】

表 1 4 . 各動物についての生存日数。

30

【表 1 4 - 1】

動物	処置群	生存	
1	SNALP-Luc	28	日
2	SNALP-Luc	33	日
3	SNALP-Luc	33	日
4	SNALP-Luc	33	日
5	SNALP-Luc	36	日
6	SNALP-Luc	38	日
7	SNALP-Luc	57	日
8	SNALP-VSP	38	日
9	SNALP-VSP	51	日
10	SNALP-VSP	51	日
11	SNALP-VSP	51	日
12	SNALP-VSP	53	日
13	SNALP-VSP	53	日
14	SNALP-VSP	57	日

10

20

【表 1 4 - 2】

15	SNALP-VSP	57	日
----	-----------	----	---

【 0 3 0 9 】

図 1 3 A は、腫瘍の播種後の日数と対比した、S N A L P - V S P 動物および S N A L P - L u c 処置動物の平均生存率を示す。S N A L P - V S P 動物の平均生存率は、S N A L P - L u c 処置動物に対して約 1 5 日延びた。

30

【 0 3 1 0 】

表 1 5 . 処置前および処置の終了時の各動物の血清アルファフェトプロテイン (A F P) 濃度 ($\mu\text{g} / \text{ml}$ での濃度)

【表 15 - 1】

		処置前	処置終了時
1	SNALP-Luc	30.858	454.454
2	SNALP-Luc	10.088	202.082
3	SNALP-Luc	23.736	648.952
4	SNALP-Luc	1.696	13.308
5	SNALP-Luc	4.778	338.688
6	SNALP-Luc	15.004	826.972
7	SNALP-Luc	11.036	245.01
8	SNALP-VSP	37.514	182.35
9	SNALP-VSP	91.516	248.06
10	SNALP-VSP	25.448	243.13
11	SNALP-VSP	24.862	45.514
12	SNALP-VSP	57.774	149.352
13	SNALP-VSP	12.446	78.724
14	SNALP-VSP	2.912	9.61
15	SNALP-VSP	4.516	11.524

10

20

【0311】

実験の経過中、血清AFPレベルを使用して腫瘍量を監視した。アルファフェトプロテイン（AFP）は、胎児期の間に卵黄嚢および肝臓によって生成される主要な血漿タンパク質である。該タンパク質は、血清アルブミンの胎児対応物であると考えられており、ヒトAFPおよびアルブミン遺伝子は、第4染色体上で同一転写方向に直列に存在する。AFPは、単量体型、ならびに二量体および三量体型で認められ、銅、ニッケル、脂肪酸、およびビリルビンに結合する。AFPレベルは、出生後徐々に低下し、8～12ヶ月で成人レベルに達する。正常成人のAFPレベルは、低いが検出可能である。正常成人におけるAFPの機能は知られておらず、成人におけるAFPの発現は、しばしば肝癌および奇形腫等の一部の腫瘍と関連する。AFPは、精巣癌、卵巣癌、および悪性奇形腫を監視するために使用される腫瘍マーカーである。AFPを分泌する主な腫瘍には、内胚葉洞腫瘍（卵黄嚢癌）、神経芽細胞腫、肝芽腫、および肝細胞癌が含まれる。AFPを分泌する腫瘍を有する患者において、AFPの血清レベルは、しばしば腫瘍の大きさと相関する。血清レベルは、処置に対する応答の評価に有用である。典型的には、AFPレベルが処置後に低下すれば、腫瘍は成長していない。化学療法の直後のAFPの一時的な増加は、腫瘍が成長しているのではなく、むしろ縮小している（そして腫瘍細胞が死ぬに従って、AFPを放出している）ことを示す場合がある。切除は、通常血清レベルの低下と関連する。図14に示すように、SNALP-VSP処置動物の腫瘍量は、有意に減少した。

30

40

【0312】

埋め込み後26、29、32、35、39、および42日目に、SNALP-siRNA処置を用いて実験を繰り返した。そのデータを図13Bに示す。SNALP-VSP動物の平均生存率は、約19日、すなわち38%、SNALP-Luc処置動物に対して約15日延びた。

【0313】

実施例8．確立された腫瘍中での単星（Mono-aster）の誘発

KSPの細胞分割の阻害は、組織切片中で容易に観察可能な単星の形成に通じる。SN

50

A L P - V S P 処置腫瘍中に単星形成が生じたかどうかを判定するために、腫瘍担持動物（Hep3B細胞の埋め込みの3週間後）に、尾静脈注射を介して2mg/kgのSNALP-VSPを投与した。対照動物には、2mg/kgのSNALP-Lucが与えられた。24時間後、動物を殺処理し、腫瘍を担持する肝臓を組織学的分析用に処理した。HE染色した組織切片の典型的な画像を図15に示す。広範な単星形成が、ALN-VSP02処置（A）腫瘍では明白であるが、SNALP-Luc処置（B）腫瘍では明白でない。後者では、正常な有糸分裂像が明白であった。単星の生成は、KSP阻害に特有の特徴であり、SNALP-VSPが、確立された肝臓腫瘍中で有意な活性を有することのさらなる根拠を提供する。

【0314】

実施例9．ALN-VSP02（SNALP-VSP）の製造過程および製品仕様

ALN-VSP02製品は、注入を介するIV投与用の滅菌脂質粒子製剤（SNALPと称される）に製剤化された、2mg/mLの原体ALN-VSPDS01を含有する。原体ALN-VSPDS01は、等モル比の2つのsiRNA（KSPを標的とするALN-12115およびVEGFを標的とするALN-3133）からなる。該薬品は、10mLのガラス製バイアル中に5mLの充填容積でパッケージ化される。

【0315】

本明細書では、以下の用語が使用される。

【表15-2】

原体	siRNA 二重鎖	単鎖中間体
ALN-VSPDS01	ALN-12115*	センス: A-19562
		アンチセンス: A-19563
	ALN-3133**	センス: A-3981
		アンチセンス: A-3982

*代替名称 = AD-12115、AD12115、**代替名称 = AD-3133、AD3133

【0316】

9.1 原体ALN-VSPDS01の調製

原体ALN-VSPDS01の2つのsiRNA構成成分である、ALN-12115およびALN-3133を、市販の合成機および原料を使用して化学的に合成する。製造過程は、ホスホラミダイト化学反応および5'オジメトキシトリフェニルメチル（DMT）保護基を使用し、2'ヒドロキシルをtertブチルジメチルシリル（TBDMS）で保護するか、または2'ヒドロキシルを2'メトキシ基（2'OMe）で置換する、従来の固相オリゴヌクレオチド合成によって、各二重鎖の2つの単鎖オリゴヌクレオチド（ALN-12115のA-19562センスおよびA-19563アンチセンス、ならびにALN-3133のA-3981センスおよびA-3982アンチセンス）を合成するステップからなる。制御細孔ガラスまたはポリスチレン等の固体支持体上でのホスホラミダイト法による、オリゴヌクレオチド鎖の構築。この周期は、5'脱保護、カップリング、酸化、およびキャップ形成からなる。それぞれのカップリング反応は、5（エチルチオ）1Hテトラゾール試薬を使用した、適切に保護されたりボ、2'OMe、またはデオキシリボヌクレオシドアミダイトの活性化、その後の固定化し保護された支持ヌクレオシドまたはオリゴヌクレオチドの遊離5'ヒドロキシル基のカップリングによって、行われる。適切な数の周期後、最後の5'保護基を酸処理によって除去する。粗オリゴヌクレオチドを、シアノエチル保護基、ならびに核酸塩基保護基を同時に除去しながら、メチルアミン水溶液処理によって固体支持体から切断する。次いで、試薬を含有するフッ化水素を使用して2'OTBDMS基を切断して、粗オリゴリボヌクレオチドを得、これを強力な陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用して精製し、その後、限外濾

過を使用して脱塩する。精製された単鎖を分析して、二重鎖にアニールする前に、正確な分子量、分子配列、不純物プロファイル、およびオリゴヌクレオチド含有量を確認する。アニールした二重鎖中間体、ALN 12115およびALN 3133を、凍結乾燥して20 で保管するか、または1：1のモル比に混合し、該溶液を凍結乾燥して原体ALN VSPDS01を得るかのうちのいずれかを行う。二重鎖中間体を乾燥粉末として保管する場合は、混合前に水に再溶解する。等モル比は、HPLC法によって混合過程を監視することによって達成される。

【0317】

製造過程の流れ図を図16に示す。

【0318】

仕様例を表16aに示す。

【0319】

ALN - VSPDS01原体の最高12ヶ月の安定試験の結果を、表16cに示す。アッセイ方法は、物理的性質（外観、pH、水分）、純度（SECおよび変性陰イオン交換クロマトグラフィーにより）、および効力（変性陰イオン交換クロマトグラフィー [AX - HPLC] により）を評価するように選択された。

【0320】

表16a . ALN - VSPDS01の仕様例

【表 1 6 - 1】

試験	方法	許容基準
外観	目視	白色からオフホワイトの粉末
識別名、ALN-VSPDS01 ALN-3133 ALN-12115	二重鎖 AX-HPLC	二重鎖保持時間は、参照鎖のものと一致する。
識別名、ALN-VSPDS01	MS	単鎖の分子量は、以下の範囲内である。 A-3981: 6869～6873 Da A-3982: 7305～7309 Da A-19562: 6762～6766 Da A-19563: 6675～6679 Da
ナトリウム対イオン (無水ベースの%w/w)	炎光 AAS または ICP-OES	報告データ
ALN-VSPDS01 アッセイ	変性 AX-HPLC	90～110%
ALN-VSPDS01 の純度	SEC	≥ 90.0 領域%
単鎖純度、ALN-VSPDS01	変性 AX-HPLC	報告データ 総不純度に対する報告領域%
siRNA モル比	二重鎖 AX-HPLC	1.0 ± 0.1
含水量	Karl Fischer 滴定	≤ 15%
残留溶媒 アセトニトリル エタノール イソプロパノール	HS-キャピラリーGC	≤ 410 ppm ≤ 5000 ppm ≤ 5000 ppm
1%溶液の pH	USP <791>	報告データ
重金属 As、Cd、Cu、Cr、Fe、Ni、 Pb、Sn	ICP-MS	報告データ
細菌内毒素	USP <85>	≤ 0.5 EU/mg
バイオーバーデン	修正 USP <61>	< 100 CFU/g

10

20

30

40

【 0 3 2 1 】

表 1 6 b : 原体の安定性

【表 16 - 2】

ロット番号: A05M07001N			研究保管条件: -20℃ (保管条件)				
試験	方法	許容基準	結果				
			初期	1 ヶ月	3 ヶ月	6 ヶ月	12 ヶ月
外観	目視	白色からオフホワイトの粉末	合格	合格	合格	合格	合格
pH	USP <791>	報告データ	6.7	6.4	6.6	6.4	6.8
含水量 (%w/w)	Karl Fischer 滴定	≤ 15%	3.6*	6.7	6.2	5.6	5.0
純度 (領域%)	SEC	≥ 90.0 領域%	95	95	94	92	95
A-3981 (センス) (領域%)	変性 AX-HPLC	報告データ	24	23	23	23	23
A-3982 (アンチセンス) (領域%)	変性 AX-HPLC	報告データ	23	23	23	23	24
A-19562 (センス) (領域%)	変性 AX-HPLC	報告データ	22	21	21	21	21
A-19563 (アンチセンス) (領域%)	変性 AX-HPLC	報告データ	23	22	22	22	22

【0322】

9.2 薬品 ALN - VSP02 (SNALP - VSP) の調製

ALN VSP02 は、2つの siRNA (1:1 のモル比の) と、等張緩衝液中の脂質賦形剤との滅菌製剤である。脂質賦形剤は、2つの siRNA と会合し、循環系での分解からそれらを保護し、標的組織へのそれらの送達を補助する。特定の脂質賦形剤およびそれぞれの定量的割合 (表 17 に示す) を、物理化学的性質、安定性、薬力学、毒性、および多数の異なる製剤の製品製造可能性を比較する反復的な一連の実験を通じて選択した。賦形剤 DLIN DMA は、哺乳類細胞のエンドソーム中で認められように、低 pH で正に荷電されるが、全血のより中性の pH では比較的荷電されない、滴定可能なアミノ脂質である。この特徴によって、低 pH で負に荷電した siRNA の効率的なカプセル化が容易になり、中空粒子の形成を阻止するが、なお、製剤緩衝液を使用前により中性の保存緩衝液と置き換えることによって、粒子荷電の調整 (減少) が可能になる。粒子に物理化学的安定性を提供するために、コレステロールおよび中性脂質 DPPC を組み込む。ポリエチレングリコール脂質共役 PEG2000 DMA は、薬品の安定性を補助し、使用案に最適な循環時間を提供する。ALN VSP02 脂質粒子は、低い多分散値の、約 8

0 ~ 90 nmの平均直径を有する。典型的なクライオ透過型電子顕微鏡（クライオTEM）の画像を図17に示す。中性pHでは、粒子は6 mV未満のゼータ電位値を有し、本質的に荷電されていない。製造過程に基づく中空（取り込まれていない）粒子の証拠はない。

【0323】

表17：ALN-VSP02の定量的組成

【表17】

構成成分、等級	割合 (mg/mL)
ALN-VSPDS01、cGMP	2.0*
DLinDMA (1,2-ジリノレイルオキシ- N,N-ジメチル-3-アミノプロパン)、 cGMP	7.3
DPPC (R-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3- ホスホコリン)、cGMP	1.1
コレステロール、合成、cGMP	2.8
PEG2000-C-DMA (3-N-[(ω-メトキシポリ(エチレングリコー ル)2000)カルバモイル]-1,2-ジミリストイル- プロピルアミン)、 cGMP	0.8
リン酸緩衝食塩水、cGMP	適量

* 薬品中の2つのsiRNAの1：1のモル比を、薬品粒子の粒経分布全体に維持する。

【0324】

脂質の溶液（エタノール中）およびALN-VSPDS01原体（水性緩衝液中）を混合して希釈し、約80～90 nmの平均粒経を有するsiRNA脂質粒子のコロイド分散液を形成する。次いで、この分散液を、0.45/0.2 μmのフィルタを通して濾過し、濃縮し、接線流濾過で透析濾過（diafilter）した。製造過程中の試験および2.0 mg/mLへの濃度調整後、製品を滅菌濾過し、ガラス製バイアルに無菌充填し、栓をし、キャップをして、5 ± 3 に静置する。エタノールおよび全ての水性緩衝液の構成成分はUSP等級であり、使用された全ての水は、USPの注射用蒸留水等級である。典型的なALN-VSP02の過程を、図18に流れ図で示す。

【0325】

表18a：ALN-VSP02仕様例

【表 18 - 1】

試験	分析法	許容基準
外観	目視	白色からオフホワイト、均質な乳白色の液体、異物なし
pH	USP <791>	6.8～7.8
浸透圧	USP <785>	250～350 mOsm/kg
識別名、ALN-VSPDS01 ALN-3133 ALN-12115	二重鎖 陰イオン交換(AX)-HPLC	参照鎖のものと一致する保持時間
識別名、ALN-VSPDS01 A-3981 A-3982 A-19562 A-19563	変性 AX-HPLC	参照鎖のものと一致する保持時間
脂質識別名 DLinDMA PEG ₂₀₀₀ -C-DMA DPPC コレステロール	蒸発光散乱 (ELS) 検出を用いた逆相 (RP)-HPLC	参照鎖のものと一致する保持時間
ALN-VSPDS01 表示ラベル (label claim) (強度/効力)	変性 AX-HPLC	1.7～2.3 mg/mL
二重鎖のモル比	二重鎖 AX-HPLC	1.0 ± 0.1
DLinDMA 含有量	ELS 検出を用いた RP-HPLC	5.6～10.3 mg/mL
PEG ₂₀₀₀ -C-DMA 含有量	ELS 検出を用いた RP-HPLC	0.6～1.1 mg/mL
DPPC 含有量	ELS 検出を用いた RP-HPLC	0.8～1.5 mg/mL
コレステロール含有量	ELS 検出を用いた RP-HPLC	2.1～3.9 mg/mL
総脂質:ALN-VSPDS01 比	総脂質アッセイおよび原体の表示ラベルから算出	4.9～8.1 mg/mg
ALN-VSPDS01 のカプセル化	蛍光アッセイ	≥ 90.0%

10

20

30

40

【表 18 - 2】

試験	分析法	許容基準
純度	変性 AX-HPLC	≥ 80.0 領域%
不純物プロファイル	変性 AX-HPLC	報告保持時間 (A-19563 に対する) および全てのピークの領域% ≥ 0.20%
残留エタノール	USP <467>	≤ 5000 ppm
残留 EDTA	UV 検出を用いたイオン対 (IP)-HPLC	≤ 2000 µg/mL
粒径 Z 平均	動的光散乱	60~120 nm
多分散性	動的光散乱	≤ 0.15
粒径分布 D ₁₀ D ₅₀ D ₉₀	動的光散乱	報告データ
微粒子状物質 ≥ 25 µm ≥ 10 µm	修正 USP <788>	≤ 容器当たり 300 ≤ 容器当たり 3000
細菌内毒素	修正 USP <85>	≤ 5.0 EU/mL
無菌性	USP <71>	合格
容器中の容積	USP <1>	≥ 5.0 mL
用量の均一性	USP <905>	合格
重金属分析	誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS)	報告データ

10

20

30

【0326】

9.4 容器 / 閉鎖システム

A L N V S P 0 2 薬品を、5 mL の充填容積で 10 mL のガラス製バイアル中にパッケージ化する。容器の閉鎖システムは、U S P / E P の I 型ホウケイ酸塩ガラスバイアル、テフロン表面加工ブチルゴム栓、およびアルミニウム製フリップオフキャップからなる。該薬品は、5 ± 3 で保管される。

【0327】

9.5 薬品 A L N - V S P 0 2 の安定性

安定性データ (25 / 60 % R H) を表 18 b および 18 c に示す。

【0328】

表 18 b : 保管条件での A L N - V S P 0 2 安定性例

40

【表 18 - 3】

ロット番号: IC097			研究保管条件: 2～8℃					
試験	方法	許容基準	結果					
			初期	1 ヶ月	2 ヶ月	3 ヶ月	4 ヶ月	6 ヶ月
外観	目視	白色からオフホワイト、均質な乳白色の液体、異物なし	合格	合格	合格	合格	合格	合格
pH	USP <791>	6.8～7.8	7.4	7.4	7.4	7.3	7.4	7.3
浸透圧	USP <785>	250～350 mOsm/kg	308	307	305	306	309	305
ALN-VS PDS01 識 別名、 ALN-313 3 ALN-121 15	二重鎖 AX-HPL C	参照鎖のものと 一致する保持時 間	合格	合格	合格	合格	合格	合格
ALN-VS PDS01 識 別名、 A-3981 A-3982 A-19562 A-19563	変性 AX-HPL C	参照鎖のものと 一致する保持時 間	合格	合格	合格	合格	合格	合格
脂質識別 名、 DLinDM A PEG ₂₀₀₀ - C-DMA DPPC コレステ ロール	ELS 検出 を用いた RP-HPLC	参照鎖のものと 一致する保持時 間	合格	合格	合格	合格	合格	合格

10

20

30

40

【表 18 - 4】

ロット番号: IC097			研究保管条件: 2~8℃					
試験	方法	許容基準	結果					
			初期	1 ヶ月	2 ヶ月	3 ヶ月	4 ヶ月	6 ヶ月
ALN-VS PDS01 強度/効 力	変性 AX-HPL C	1.7~2.3 mg/mL	2.1	2.2	2.1	2.1	2.1	2.1
二重鎖 モル比	二重鎖 AX-HPL C	1.0 ± 0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
DLinDM A 含有量	ELS 検出 を用いた RP-HPLC	5.6~10.3 mg/mL	9.1	9.4	9.1	9.6	9.1	9.2
コレステ ロール含 有量	ELS 検出 を用いた RP-HPLC	2.1~3.9 mg/mL	3.4	3.5	3.4	3.5	3.4	3.5
DPPC 含 有量	ELS 検出 を用いた RP-HPLC	0.8~1.5 mg/mL	1.3	1.3	1.4	1.4	1.2	1.3
PEG ₂₀₀₀ - C-DMA 含有量	ELS 検出 を用いた RP-HPLC	0.6~1.1 mg/mL	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
総脂 質:ALN- VSPDS01 比	算出	4.9~8.1 mg/mg	7.0	6.9	7.1	7.4	7.0	7.1
ALN-VS PDS01 の カプセル 化	蛍光アッ セイ	≥ 90.0%	95.9	96.5	94.4	98.1	97.8	96.4
純度	変性 AX-HPL C	≥ 80.0%	90.7	89.6	90.8	91.3	92.4	90.8
粒径、 Z-平均	光散乱	60~120 nm	86	87	87	87	87	87
多分散性	光散乱	≤ 0.15	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03

10

20

30

40

【表 18 - 5】

ロット番号: IC097			研究保管条件: 2~8℃					
試験	方法	許容基準	結果					
			初期	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	6ヶ月
粒径分布、D ₁₀	光散乱	報告データ (nm)	56	56	56	56	56	56
粒径分布、D ₅₀	光散乱	報告データ (nm)	76	77	77	77	78	77
粒径分布、D ₉₀	光散乱	報告データ (nm)	110	112	112	113	112	113
微粒子状物質、 ≥ 25 μm ≥ 10 μm	修正 USP <788>	(容器当たり) ≤ 300 ≤ 3000	18 48	有意 でない	有意 でない	有意 でない	有意 でない	3 11
細菌内毒素	USP <85>	≤ 5.0 EU/mL	0.50	有意 でない	有意 でない	有意 でない	有意 でない	有意 でない
無菌性	USP <71>	合格	合格	有意 でない	有意 でない	有意 でない	有意 でない	有意 でない

【 0 3 2 9 】

表 18 c : 25 / 周囲湿度での ALN - VSP 02 の安定性例

【表 18 - 6】

ロット番号: IC097			研究保管条件: 25℃/周囲湿度					
試験	方法	許容基準	結果					
			初期	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	6ヶ月
外観	目視	白色からオフホワイト、均質な乳白色の液体、異物なし	合格	合格	合格	合格	合格	合格
pH	USP <791>	6.8~7.8	7.4	7.3	7.2	7.1	7.2	7.1
浸透圧	USP <785>	250~350 mOsm/kg	308	306	304	307	307	304

【表 18 - 7】

ロット番号: IC097			研究保管条件: 25°C/周囲湿度					
試験	方法	許容基準	結果					
			初期	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	6ヶ月
ALN-VS PDS01 識 別名、 ALN-313 3 ALN-121 15	二重鎖 AX-HPL C	参照鎖のものと一致する保持時間	合格	合格	合格	合格	合格	合格
ALN-VS PDS01 識 別名、 A-3981 A-3982 A-19562 A-19563	変性 AX-HPL C	参照鎖のものと一致する保持時間	合格	合格	合格	合格	合格	合格
脂質識別名、 DLinDMA A PEG ₂₀₀₀ - C-DMA DPPC コレステロール	ELS 検出 を用いた RP-HPL C	参照鎖のものと一致する保持時間	合格	合格	合格	合格	合格	合格
ALN-VS PDS01 強度/効力	変性 AX-HPL C	1.7~2.3 mg/mL	2.1	2.1	2.0	2.0	2.0	2.0
二重鎖 モル比	二重鎖 AX-HPL C	1.0 ± 0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

10

20

30

40

【表 18 - 8】

ロット番号: IC097			研究保管条件: 25°C/周囲湿度					
試験	方法	許容基準	結果					
			初期	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	6ヶ月
DLinDM A含有量	ELS検出 を用い た RP-HPL C	5.6~10.3 mg/mL	9.1	9.6	9.0	9.3	9.2	9.3
コレステ ロール含 有量	ELS検出 を用い た RP-HPL C	2.1~3.9 mg/mL	3.4	3.5	3.4	3.5	3.4	3.5
DPPC 含 有量	ELS検出 を用い た RP-HPL C	0.8~1.5 mg/mL	1.3	1.3	1.3	1.2	1.2	1.1
PEG ₂₀₀₀ - C-DMA 含有量	ELS検出 を用い た RP-HPL C	0.6~1.1 mg/mL	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
総脂 質:ALN- VSPDS0 1比	算出	4.9~8.1 mg/mg	7.0	7.3	7.4	7.6	7.4	7.5
ALN-VS PDS01の カプセル 化	蛍光ア ッセイ	≥ 90.0%	95.9	97.2	94.6	97.9	97.9	96.7
純度	変性 AX-HPL C	≥ 80.0%	90.7	88.0	88.9	88.4	89.0	85.3
粒径、 Z-平均	光散乱	60~120 nm	86	85	86	89	87	87

10

20

30

40

【表 18 - 9】

ロット番号: IC097			研究保管条件: 25°C/周囲湿度					
試験	方法	許容基準	結果					
			初期	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	6ヶ月
多分散性	光散乱	≤ 0.15	0.02	0.05	0.03	0.04	0.04	0.03
粒径分布、 D_{10}	光散乱	報告データ (nm)	56	54	56	58	56	57
粒径分布、 D_{50}	光散乱	報告データ (nm)	76	75	77	79	77	78
粒径分布、 D_{90}	光散乱	報告データ (nm)	110	110	111	116	113	113
微粒子状物質、 $\geq 25 \mu\text{m}$ $\geq 10 \mu\text{m}$	修正 USP <788>	(容器当たり) ≤ 300 ≤ 3000	18 48	有意 でない	有意 でない	有意 でない	有意 でない	1 16
細菌内毒素	USP <85>	$\leq 5.0 \text{ EU/mL}$	0.50	有意 でない	有意 でない	有意 でない	有意 でない	<0.50
無菌性	USP <71>	合格	合格	有意 でない	有意 でない	有意 でない	有意 でない	合格

【0330】

実施例 10 . ヒト癌細胞系における ALN - VSP02 のインビトロ有効性

ヒト癌細胞系における ALN - VSP02 処置の有効性を、KSP mRNA、VEGF mRNA、および処置後の細胞生存率の測定によって決定した。各細胞系中の KSP および VEGF について、IC50 (nM) 値を決定した。

【0331】

表 19 : 細胞系

【表 19 - 1】

試験した細胞系	ATCC カタログ番号
HELA	ATCC カタログ番号: CCL-2
KB	ATCC カタログ番号: CCL-17
HEP3B	ATCC カタログ番号: HB-8064

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

SKOV-3	ATCC カタログ番号: HTB-77
HCT-116	ATCC カタログ番号: CCL-247
HT-29	ATCC カタログ番号: HTB-38
PC-3	ATCC カタログ番号: CRL-1435
A549	ATCC カタログ番号: CCL-185
MDA-MB-231	ATCC カタログ番号: HTB-26

10

【0332】

20

1 日目に完全培地中に、2 日目に 70 % の密度に達するように、細胞を 96 ウェルプレートに蒔いた。2 日目、培地を Opti-MEM 血清減少培地 (Invitrogen カタログ番号: 11058-021) と交換し、細胞に、ALN-VSP02 または対照 SNALP-Luc のいずれかを、1.8 μ M で開始し、10 pM に至るまでの濃度範囲で形質移入した。6 時間後、培地を完全培地に変えた。各実験について、各細胞系に対して 3 つのプレートを複製した。

【0333】

形質移入の 24 時間後に細胞を収集した。KSP レベルは bDNA を使用して測定し、VEGF の mRNA レベルは、ヒト TaqMan アッセイを使用して測定した。

【0334】

30

生存率は、製造業者の推奨に従って、48 および / または 72 時間後に Cell Titer Blue 試薬 (Promega カタログ番号: G8080) を使用して測定した。

【0335】

表 20 に示すように、VSP02 の nM 濃度は、複数のヒト細胞系における KSP および VEGF の両方の発現の低下に効果的である。処置細胞の生存率は、

表 20 : 結果

【表 20 - 1】

細胞系	IC50 (nM)	IC50 (nM)
	KSP	VEGF
HeLa	8.79	672
SKOV-3	142	1347
HCT116	31.6	27.5
Hep3B	1.3	14.5
HT-29	262	測定せず

40

50

【表 20 - 2】

PC3	127	測定せず
KB	50.6	測定せず
A549	201	測定せず
MB231	187	測定せず

【0336】

実施例 11 . 確立された H e p 3 B 肝内腫瘍における、ソラフェニブに対する V S P S N A L P の抗腫瘍有効性

10

確立された H e p 3 B 肝内腫瘍を担持する S C I D / ベージュマウスにおいて、ソラフェニブに対する反復投与の V S P S N A L P の抗腫瘍効果について研究した。ソラフェニブは、肝細胞癌 (H C C) の処置用に承認された、タンパク質キナーゼの小分子阻害剤である。

【0337】

本明細書に記載の通り、S C I D / ベージュマウスにおける肝内播種によって、腫瘍を確立した。処置は、播種の 11 日後に開始した。マウスに、ソラフェニブおよび対照 s i R N A - S N A L P、ソラフェニブおよび V S P s i R N A - S N A L P、または V S P s i R N A - S N A L P のみを処置した。対照マウスには、緩衝液のみ (ソラフェニブの代わりに D M S O、および s i R N A - S N A L P の代わりに P B S) を処置した。ソラフェニブは、月曜日から金曜日まで 3 週間の間、体重に従って 15 m g / k g を合計 15 回の注射で腹腔内に投与した。ソラフェニブは、S N A L P の注射後、最低 1 時間投与した。s i R N A - S N A L P は、3 週間の間 (合計 6 用量)、1、4、7、10、14、および 17 日目に、直前に記録された体重 (10 m l / k g) に基づく 3 m g / k g に従って、側部尾静脈を介して投与した。

20

【0338】

段階的な体重の減少、ならびに病態、腹部膨満 / 変色、および運動性を含む臨床的兆候を含む、腫瘍量の評価に基づいて、マウスを安楽死させた。

【0339】

生存率のデータを図 21 に示す。ソラフェニブまたは V S P s i R N A - S N A L P のみの投与と比較して、V S P s i R N A - S N A L P とソラフェニブとの同時投与によって、生存割合が増加した。ソラフェニブと比較して、V S P s i R N A - S N A L P によって生存割合が増加した。

30

【0340】

実施例 12 . A D - 12115 および A D - 3133 の変異体を使用した V S P のインビトロ有効性

E g 5 / K S P および V E G F を標的とした 2 セットの二重鎖を設計し、合成した。各セットは、A D - 12115 および A D - 3133 のいずれかの標的部位の各方向に 10 個のヌクレオチドを並べた二重鎖を含む。

40

【0341】

各二重鎖の標的、センス鎖、およびアンチセンス鎖の配列を、以下の表に示す。

【0342】

本明細書に記載されるアッセイを使用して、発現の阻害について各二重鎖をアッセイする。該二重鎖は、単独で、および / または組み合わせて、例えば、E g 5 / K S P d s R N A を V E G F d s R N A と組み合わせて投与される。幾つかの実施形態では、該 d s R N A は、本明細書に記載される S N A L P 製剤中で投与される。

【0343】

表 21 : V E G F および E g 5 / K S P を標的とする d s R N A の配列 (タイリング)

【表 2 1 - 1】

二重鎖 ID	標的遺伝子	標的配列 5'から 3'	配列番号	センス鎖 アンチセンス鎖 5'から 3'	配列番号
AD- 20447.1	VEGFA	ACCAAGGCCAGCACAUAGG	2264	AccAAGGccAGcAcAuAGGTsT	2304
				CCuAUGUGCUGGCCUUGGUTsT	2305
AD- 20448.1	VEGFA	CCAAGGCCAGCACAUAGGA	2265	ccAAGGccAGcAcAuAGGATsT	2306
				UCCuAUGUGCUGGCCUUGGTsT	2307
AD- 20449.1	VEGFA	CCAAGGCCAGCACAUAGGA	2266	ccAAGGccAGcAcAuAGGATsT	2308
				CUCCuAUGUGCUGGCCUUGTsT	2309
AD- 20450.1	VEGFA	AAGGCCAGCACAUAGGAGA	2267	AAGGccAGcAcAuAGGAGATsT	2310
				UCUCCuAUGUGCUGGCCUUTsT	2311
AD- 20451.1	VEGFA	AGGCCAGCACAUAGGAGAG	2268	AGGccAGcAcAuAGSAGAGTsT	2312
				CUCUCCuAUGUGCUGGCCUTsT	2313
AD- 20452.1	VEGFA	GGCCAGCACAUAGGAGAGA	2269	GGccAGcAcAuAGGAGAGATsT	2314
				UCUCUCCuAUGUGCUGGCCTsT	2315
AD-	VEGFA	GCCAGCACAUAGGAGACAU	2270	GccAGcAcAuAGGAGACAUtsT	2316

10

20

【表 2 1 - 2】

二重鎖 ID	標的遺伝子	標的配列 5'から 3'	配列番号	センス鎖 アンチセンス鎖 5'から 3'	配列番号
20453.1					2317
AD- 20454.1	VEGFA	CCAGCACAUAGGAGAGAUG	2271	ccAGcAcAuAGGAGAGAuGTsT	2318
				cAUCUCUCCuAUGUGCUGGTsT	2319
AD- 20455.1	VEGFA	CAGCACAUAGGAGAGAUGA	2272	cAGcAcAuAGGAGAGAuGATsT	2320
				UcAUCUCUCCuAUGUGCUGTsT	2321
AD- 20456.1	VEGFA	AGCACAUAGGAGAGAUGAG	2273	AGcAcAuAGGAGAGAuGAGTsT	2322
				CUcAUCUCUCCuAUGUGCUTsT	2323
AD- 20457.1	VEGFA	CACAUAGGAGAGAUGAGCU	2274	cAcAuAGGAGAGAuGAGcuTsT	2324
				AGCUcAUCUCUCCuAUGUGTsT	2325
AD- 20458.1	VEGFA	ACAUAGGAGAGAUGAGCUU	2275	AcAuAGGAGAGAuGAGcuuTsT	2326
				AAGCUcAUCUCUCCuAUGUTsT	2327
AD- 20459.1	VEGFA	CAUAGGAGAGAUGAGCUUC	2276	cAuAGGAGAGAuGAGcuucTsT	2328
				GAAGCUcAUCUCUCCuAUGTsT	2329
AD- 20460.1	VEGFA	AUAGGAGAGAUGAGCUUCC	2277	AuAGGAGAGAuGAGcuuccTsT	2330
				GGAAGCUcAUCUCUCCuAUTsT	2331
AD- 20461.1	VEGFA	UAGGAGAGAUGAGCUUCCU	2278	uAGGAGAGAuGAGcuuccuTsT	2332
				AGGAAGCUcAUCUCUCCuATsT	2333
AD- 20462.1	VEGFA	AGGAGAGAUGAGCUUCCUA	2279	AGGAGAGAuGAGcuuccuATsT	2334
				uAGGAAGCUcAUCUCUCCUTsT	2335
AD- 20463.1	VEGFA	GGAGAGAUGAGCUUCCUAC	2280	GGAGAGAuGAGcuuccuAcTsT	2336
				GuAGGAAGCUcAUCUCUCCTsT	2337
AD- 20464.1	VEGFA	GAGAGAUGAGCUUCCUACA	2281	GAGAGAuGAGcuuccuAcATsT	2338
				UGuAGGAAGCUcAUCUCUCTsT	2339
AD- 20465.1	VEGFA	AGAGAUGAGCUUCCUACAG	2282	AGAGAuGAGcuuccuAcAGTsT	2340
				CUGuAGGAAGCUcAUCUCUTsT	2341
AD- 20466.1	VEGFA	GAGAUGAGCUUCCUACAGC	2283	GAGAuGAGcuuccuAcAGcTsT	2342
				GCUGuAGGAAGCUcAUCUCTsT	2343
AD- 20467.1	KSP	AUGUCCUUAUCGAGAAUC	2284	AUGuuccuuAucGAGAAucTsT	2344
				GAUUCUCGAuAAGGAAcAUTsT	2345
AD- 20468.1	KSP	UGUCCUUAUCGAGAAUCU	2285	uGuuccuuAucGAGAAucTsT	2346

10

20

30

40

【表 2 1 - 3】

に重鎖 ID	標的遺伝子	標的配列 5'から3'	配列番号	センス鎖 アンチセンス鎖 5'から3'	配列番号
20468.1					2347
AD- 20469.1	KSP	GUUCCUUAUCGAGAAUCUA	2286	GuuccuuAucGAGAAucUAATsT uAGAUCUCUGAuAAGGAActTsT	2348 2349
AD- 20470.1	KSP	UUCUUAUCGAGAAUCUAA	2287	uuccuuAucGAGAAucUAATsT UuAGAUUCUCGAuAAGGAATsT	2350 2351
AD- 20471.1	KSP	UCCUUAUCGAGAAUCUAAA	2288	uccuuAucGAGAAucUAAATsT UUuAGAUUCUCGAuAAGGATsT	2352 2353
AD- 20472.1	KSP	CCUUAUCGAGAAUCUAAAC	2289	ccuuAucGAGAAucUAAAcTsT GUUuAGAUUCUCGAuAAGGTsT	2354 2355
AD- 20473.1	KSP	CUUAUCGAGAAUCUAAACU	2290	cuuAucGAGAAucUAAAcUtsT AGUUuAGAUUCUCGAuAAGTsT	2356 2357
AD- 20474.1	KSP	UUAUCGAGAAUCUAAACUA	2291	uuAucGAGAAucUAAAcUAATsT uAGUUuAGAUUCUCGAuAATsT	2358 2359
AD- 20475.1	KSP	UAUCGAGAAUCUAAACUAA	2292	uAucGAGAAucUAAAcUAATsT UuAGUUuAGAUUCUCGAuATsT	2360 2361
AD- 20476.1	KSP	AUCGAGAAUCUAAACUAAAC	2293	AucGAGAAucUAAAcUAAAcTsT GUuAGUUuAGAUUCUCGAUTsT	2362 2363
AD- 20477.1	KSP	CGAGAAUCUAAACUAAACUA	2294	cGAGAAucUAAAcUAAAcUAATsT uAGUUuAGUUuAGAUUCUCGTsT	2364 2365
AD- 20478.1	KSP	GAGAAUCUAAACUAAACUAG	2295	GAGAAucUAAAcUAAAcUAcTsT CuAGUUuAGUUuAGAUUCUCTsT	2366 2367
AD- 20479.1	KSP	AGAAUCUAAACUAAACUAGA	2296	AGAAucUAAAcUAAAcUAGATsT UCuAGUUuAGUUuAGAUUCUTsT	2368 2369
AD- 20480.1	KSP	GAAUCUAAACUAAACUAGAA	2297	GAAucUAAAcUAAAcUAGAAATsT UUCuAGUUuAGUUuAGAUUCTsT	2370 2371
AD- 20481.1	KSP	AAUCUAAACUAAACUAGAAU	2298	AAucUAAAcUAAAcUAGAAATsT AUUCuAGUUuAGUUuAGAUUTsT	2372 2373
AD- 20482.1	KSP	AUCUAAACUAAACUAGAAUC	2299	AucUAAAcUAAAcUAGAAATsT GAUUCuAGUUuAGUUuAGAUTsT	2374 2375
AD-	KSP	UCUAAACUAAACUAGAAUCC	2300	ucuAAAcUAAAcUAGAAAcTsT	2376

10

20

30

40

【表 2 1 - 4】

二重鎖 ID	標的遺伝	標的配列 5'から 3'	配列番 号	センス鎖 アンチセンス鎖 5'から 3'	配列番 号
20483.1					2377
AD- 20484.1	KSP	CUAAACUAAACUAGAAUCCU	2301	CUAAACUAAACUAGAAUCCUTsT AGGAUUCUAGUUAGUUUAGTsT	2378 2379
AD- 20485.1	KSP	UAAACUAAACUAGAAUCCUC	2302	UAAACUAAACUAGAAUCCUCtsT GAGGAUUCUAGUUAGUUUATsT	2380 2381
AD- 20486.1	KSP	AAACUAAACUAGAAUCCUCC	2303	AAACUAAACUAGAAUCCUCCtsT GGAGGAUUCUAGUUAGUUUTsT	2382 2383

10

【0344】

実施例 13 . 単一平滑末端を有する VEGF を標的とする dsRNA

VEGF を標的とした二重鎖のセットを設計し、合成した。セットは、AD - 3133 の標的部位の各方向に 10 個のヌクレオチドを並べた二重鎖を含む。各二重鎖は、アンチセンス鎖の 3' 末端に対応する末端に 2 塩基のオーバーハングを含み、アンチセンス鎖の 5' 末端に対応する末端にはオーバーハングがなく、例えば平滑末端である。

20

【0345】

これらの二重鎖のそれぞれの鎖の配列を、以下の表に示す。

【0346】

本明細書に記載されるアッセイを使用して、発現の阻害について各二重鎖をアッセイする。VEGF 二重鎖は、単独で、および / または Eg5 / KSP dsRNA (例えば、AD - 12115) と組み合わせて投与される。幾つかの実施形態では、該 dsRNA は、本明細書に記載される SNALP 製剤中で投与される。

【0347】

表 22 : VEGF を標的とした平滑末端 dsRNA の標的配列

30

【表 2 2】

二重鎖 ID	配 列 番号	VEGF 標的配列 5'から 3'	VEGF 遺伝子上 の位置
AD-20447.1	2384	ACCAAGGCCAGCACAUAGG	1365
AD-20448.1	2385	CCAAGGCCAGCACAUAGGA	1366
AD-20449.1	2386	CAAGGCCAGCACAUAGGAG	1367
AD-20450.1	2387	AAGGCCAGCACAUAGGAGA	1368
AD-20451.1	2388	AGGCCAGCACAUAGGAGAG	1369
AD-20452.1	2389	GGCCAGCACAUAGGAGAGA	1370
AD-20453.1	2390	GCCAGCACAUAGGAGAGAU	1371
AD-20454.1	2391	CCAGCACAUAGGAGAGAU	1372
AD-20455.1	2392	CAGCACAUAGGAGAGAU	1373
AD-20456.1	2393	AGCACAUAGGAGAGAU	1374
AD-20457.1	2394	CACAUAGGAGAGAU	1376
AD-20458.1	2395	ACAUAGGAGAGAU	1377
AD-20459.1	2396	CAUAGGAGAGAU	1378
AD-20460.1	2397	AUAGGAGAGAU	1379
AD-20461.1	2398	UAGGAGAGAU	1380
AD-20462.1	2399	AGGAGAGAU	1381

10

20

AD-20463.1	2400	GGAGAGAU	1382
AD-20464.1	2401	GAGAGAU	1383
AD-20465.1	2402	AGAGAU	1384
AD-20466.1	2403	GAGAU	1385

【 0 3 4 8 】

30

表 2 3 : V E G F を標的とした平滑末端 d s R N A の鎖配列

【表 2 3】

二重鎖 ID	センス鎖 (5'から 3')	配 列 番号	アンチセンス鎖 (5'から 3')	配 列 番号
AD-20447.1	ACCAAGGCCAGCACAUAGGAG	2404	CUCCUAUGUGCUGGCCUUGGUGA	2424
AD-20448.1	CCAAGGCCAGCACAUAGGAGA	2405	UCUCCUAUGUGCUGGCCUUGGUG	2425
AD-20449.1	CAAGGCCAGCACAUAGGAGAG	2406	CUCUCCUAUGUGCUGGCCUUGGU	2426
AD-20450.1	AAGGCCAGCACAUAGGAGAGA	2407	UCUCUCCUAUGUGCUGGCCUUGG	2427
AD-20451.1	AGGCCAGCACAUAGGAGAGAU	2408	AUCUCUCCUAUGUGCUGGCCUUG	2428
AD-20452.1	GGCCAGCACAUAGGAGAGAU	2409	CAUCUCUCCUAUGUGCUGGCCU	2429
AD-20453.1	GCCAGCACAUAGGAGAGAU	2410	UCAUCUCUCCUAUGUGCUGGCCU	2430
AD-20454.1	CCAGCACAUAGGAGAGAU	2411	CUCAUCUCUCCUAUGUGCUGGCC	2431
AD-20455.1	CAGCACAUAGGAGAGAU	2412	GCUCAUCUCUCCUAUGUGCUGGC	2432
AD-20456.1	AGCACAUAGGAGAGAU	2413	AGCUCUCCUAUGUGCUGG	2433
AD-20457.1	CACAUAGGAGAGAU	2414	GAAGCUCUCCUAUGUGCU	2434
AD-20458.1	ACAUAGGAGAGAU	2415	GGAAGCUCUCCUAUGUGC	2435
AD-20459.1	CAUAGGAGAGAU	2416	AGGAAGCUCUCCUAUGUG	2436
AD-20460.1	AUAGGAGAGAU	2417	UAGGAAGCUCUCCUAUGU	2437
AD-20461.1	UAGGAGAGAU	2418	GUAGGAAGCUCUCCUAUG	2438
AD-20462.1	AGGAGAGAU	2419	UGUAGGAAGCUCUCCUAU	2439
AD-20463.1	GGAGAGAU	2420	CUGUAGGAAGCUCUCCUA	2440
AD-20464.1	GAGAGAU	2421	GCUGUAGGAAGCUCUCCU	2441
AD-20465.1	AGAGAU	2422	UGCUGUAGGAAGCUCUCC	2442
AD-20466.1	GAGAU	2423	GUGCUGUAGGAAGCUCUC	2443

10

20

30

40

【0349】

実施例 14 . ヒトにおける E g 5 / K S P および V E G F 発現の阻害

ヒト対象に、E g 5 / K S P および V E G F 遺伝子の発現を阻害するために、E g 5 / K S P 遺伝子を標的とする S N A L P に製剤化した d s R N A、および V E G F 遺伝子を標的とする S N A L P に製剤化した d s R N A の両方を有する医薬組成物、例えば、A L N V S P 0 2 を投与する。

【0350】

処置を必要とする対象を選択または同定する。対象は、癌、例えば、肝臓癌の処置を必要としていてもよい。

【0351】

ゼロ時点で、好適な第 1 の用量の組成物を対象に皮下投与する。組成物は、本明細書に記載の通り製剤化する。しばらくしてから、例えば、腫瘍成長の測定、血清 A F P レベルの測定等によって、対象の病態を評価する。この測定には、前記対象における E g 5 / K S P および / もしくは V E G F の発現、ならびに / または E g 5 / K S P および / もしくは V E G F m R N A の成功した s i R N A 標的の産物の測定を伴ってもよい。また、他の関連する基準を測定してもよい。用量の回数および強度は、対象の必要性に従って調整する。

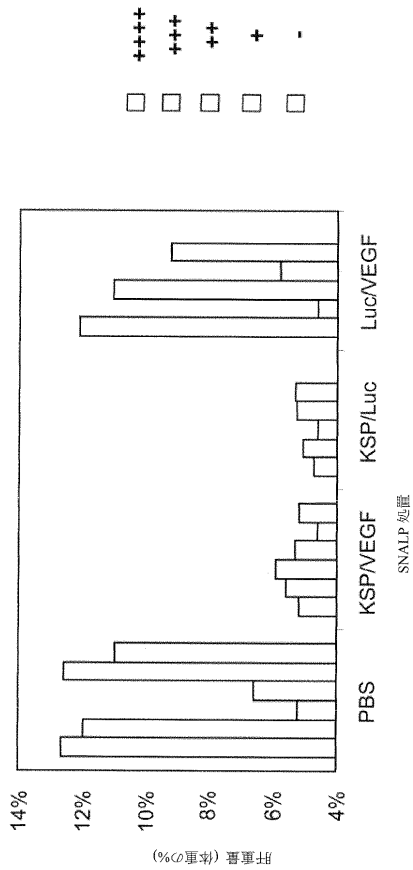
【0352】

処置後、対象の病態を、処置前に既存の病態と、または同様に罹患するが、無処置である対象の病態と比較する。

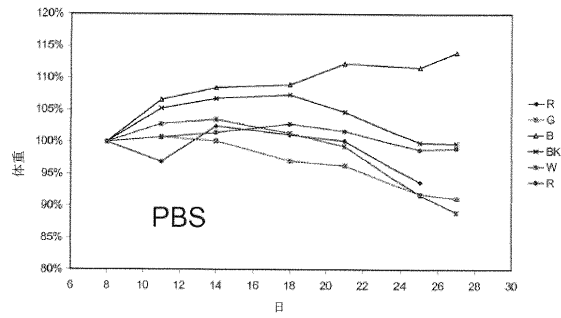
【0353】

当業者は、以下に添付する特許請求の完全な範囲において本発明を実践することを可能にする本開示内に具体的に記載されたものに加えて、方法および組成物に精通する。

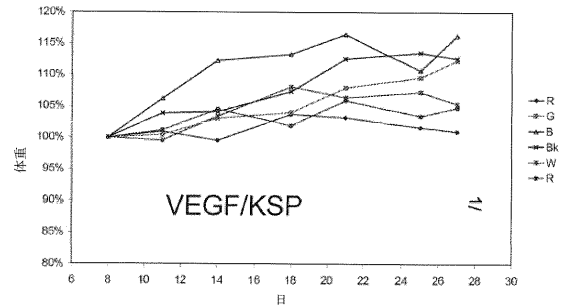
【図 1】



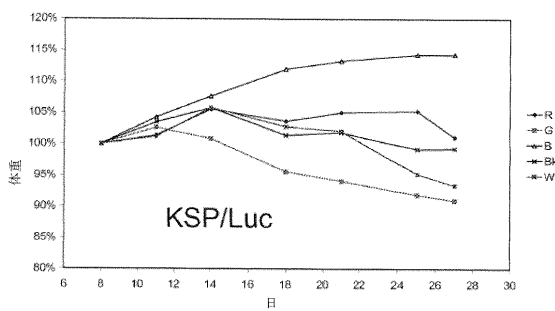
【図 2 A】



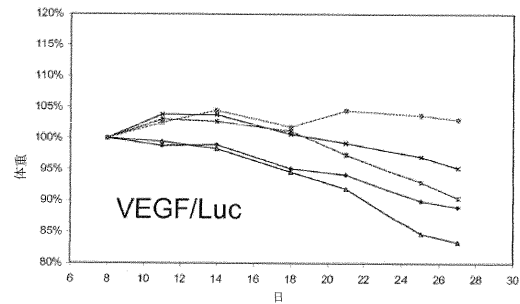
【図 2 B】



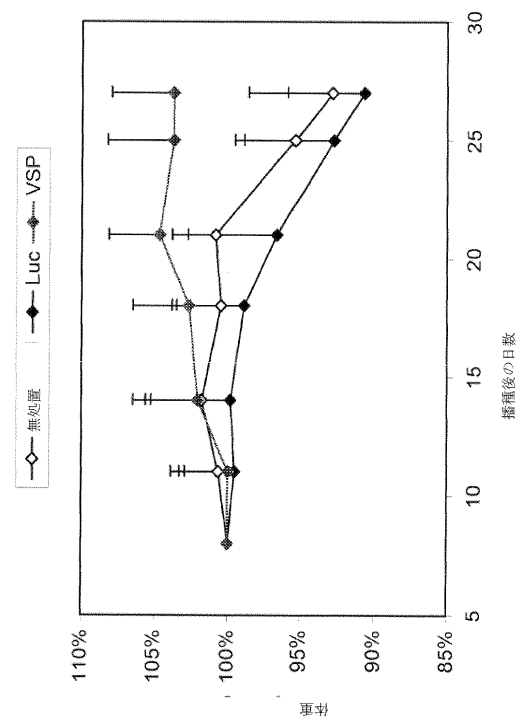
【図 2 C】



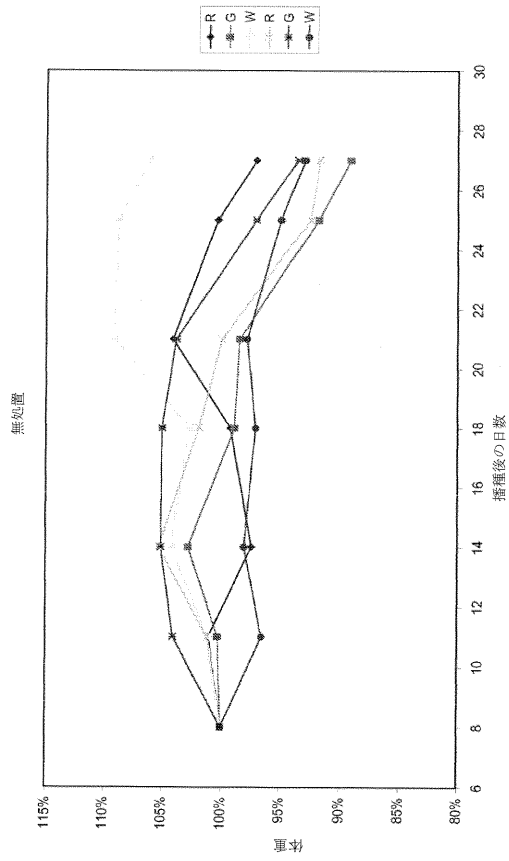
【図 2 D】



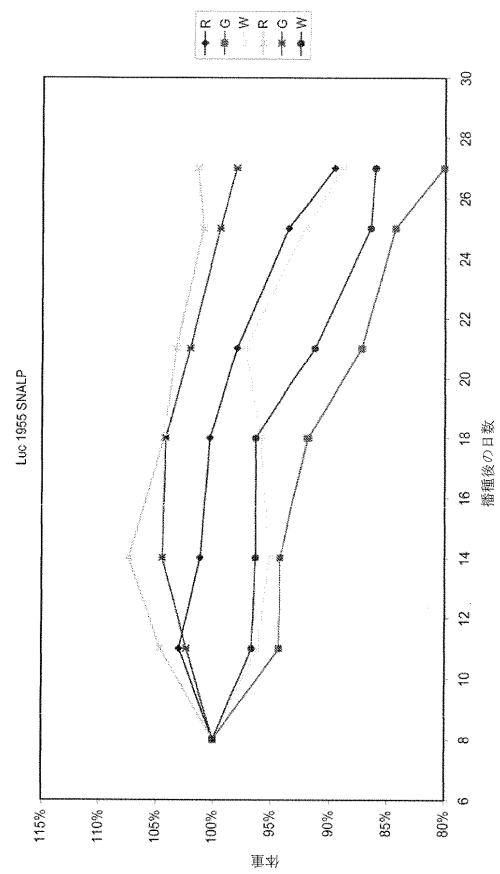
【図 3】



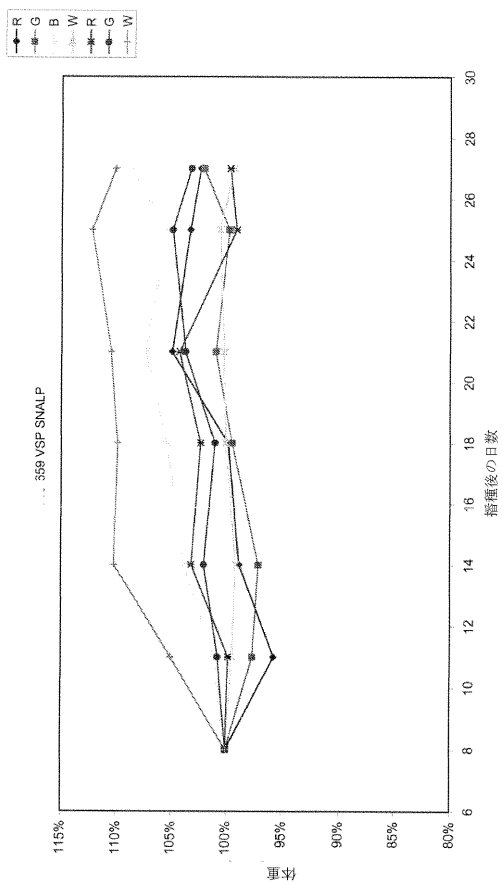
【図 4】



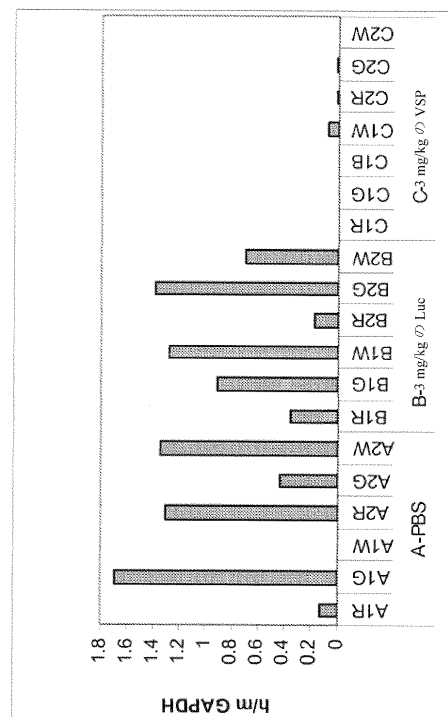
【図 5】



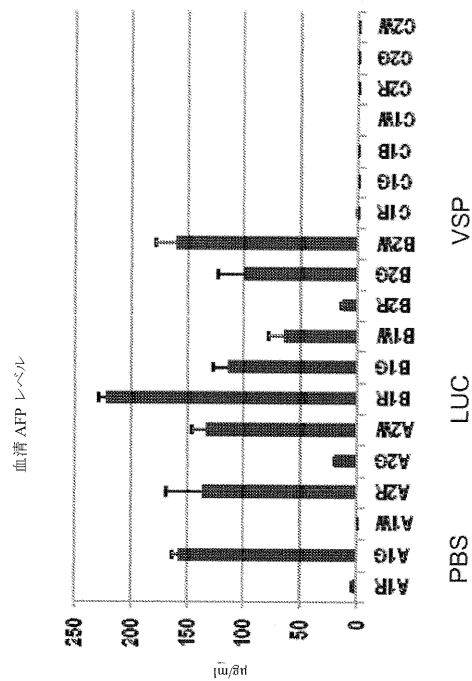
【図 6】



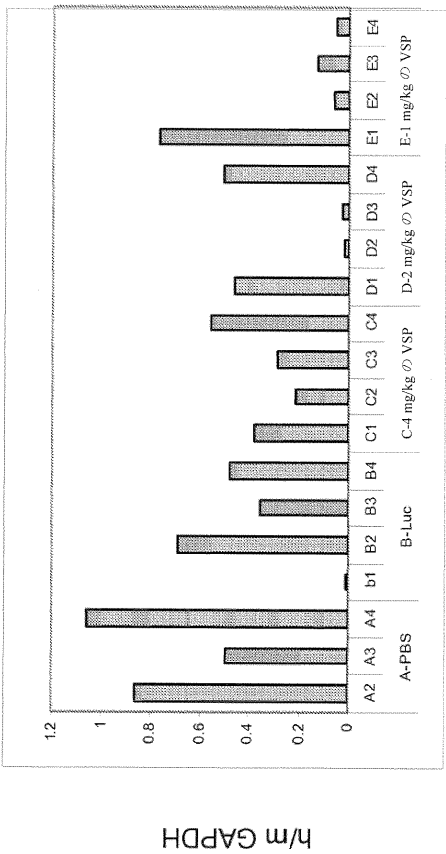
【図 7 A】



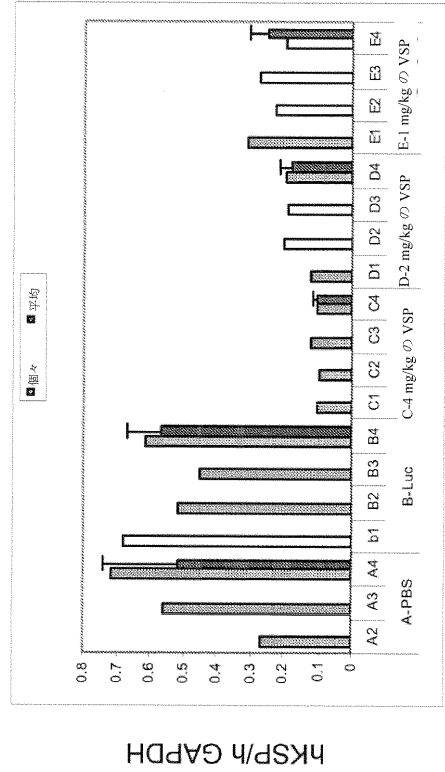
【図 7 B】



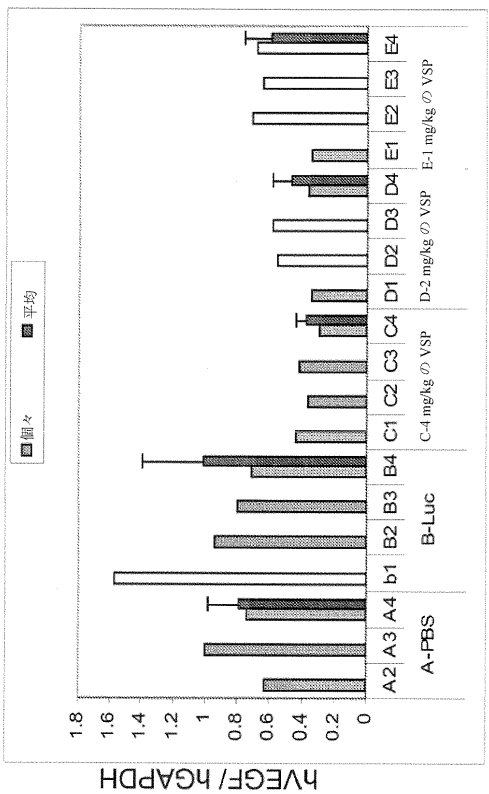
【図 8】



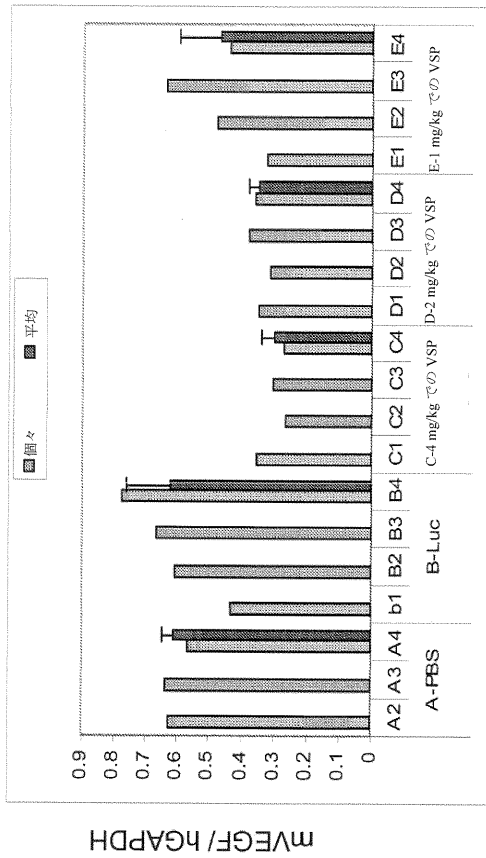
【図 9】



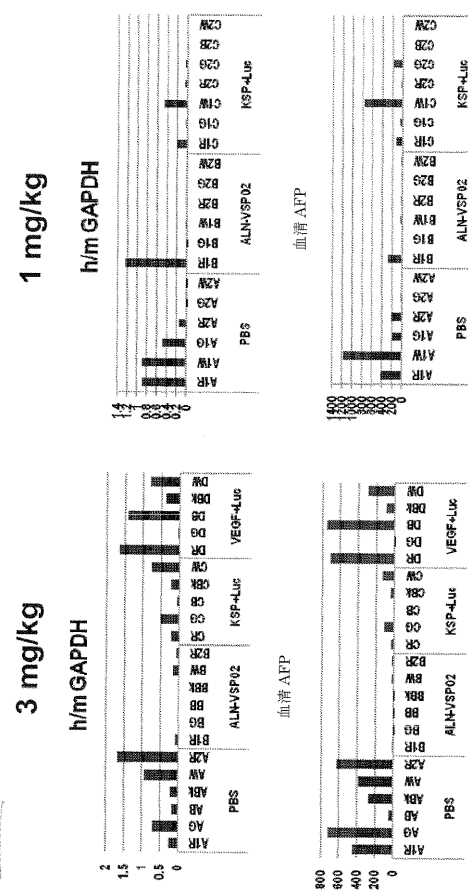
【図 10】



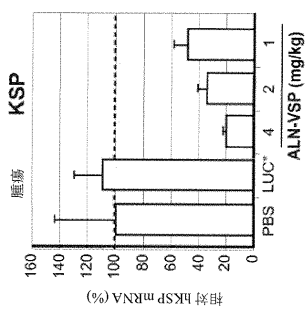
【図 1 1 A】



【図 1 1 B】

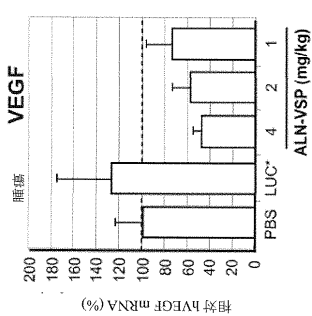


【図 1 2 A】

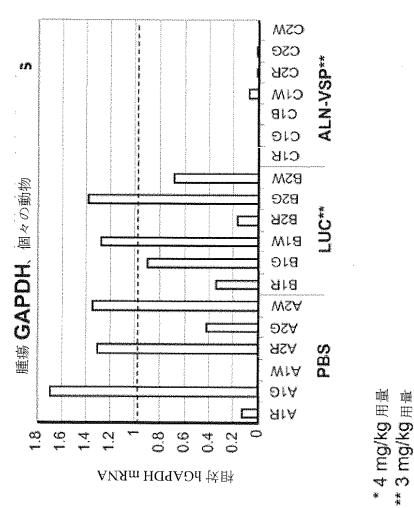


* 4 mg/kg 用量
** 3 mg/kg 用量

【図 1 2 B】

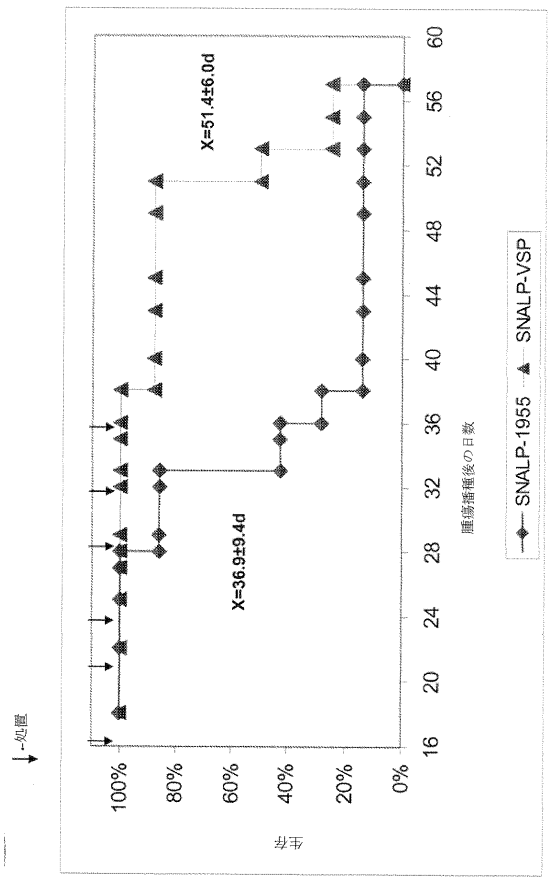


【図 1 2 C】

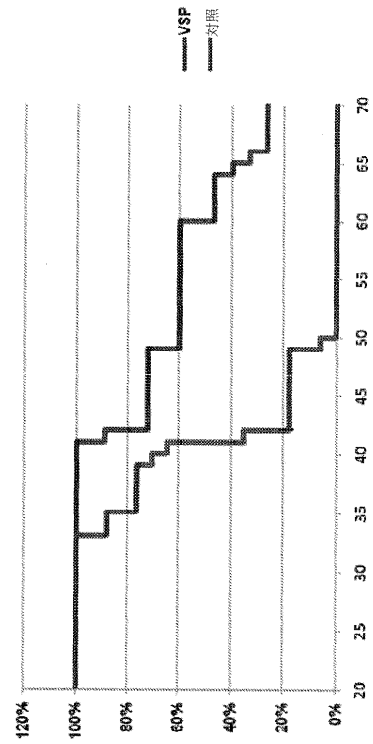


* 4 mg/kg 用量
** 3 mg/kg 用量

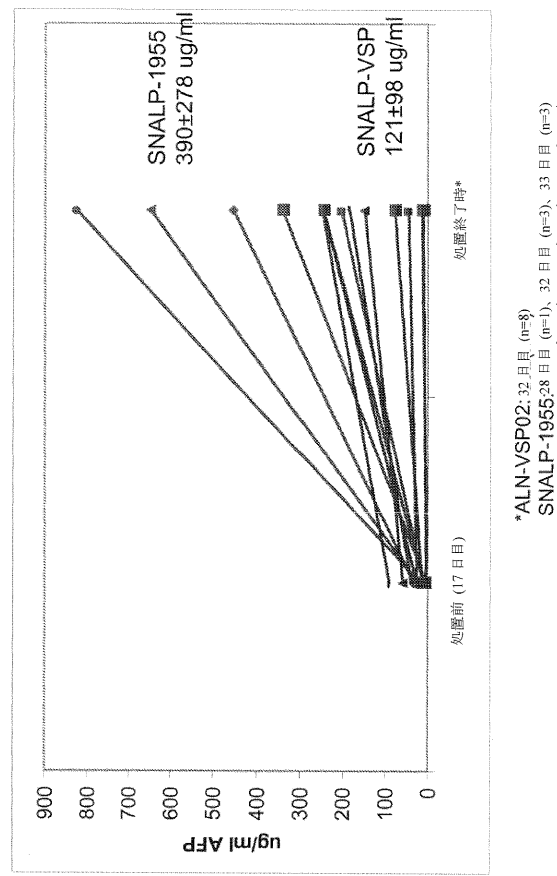
【図 1 3 A】



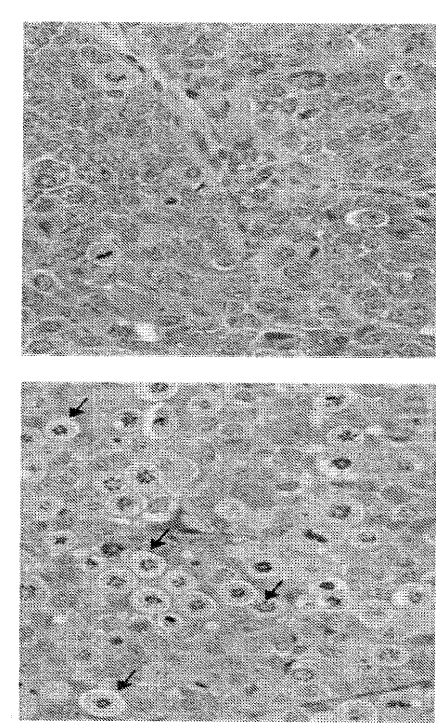
【図 1 3 B】



【図 1 4】

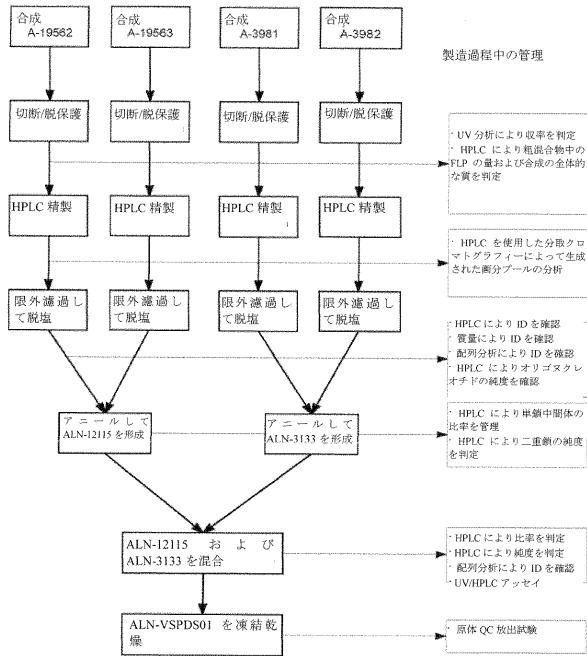


【図 1 5】

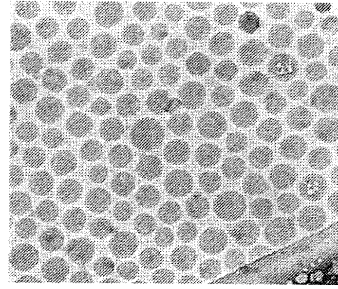


A. SNALP-VSP 処置 B. SNALP-Luc 処置

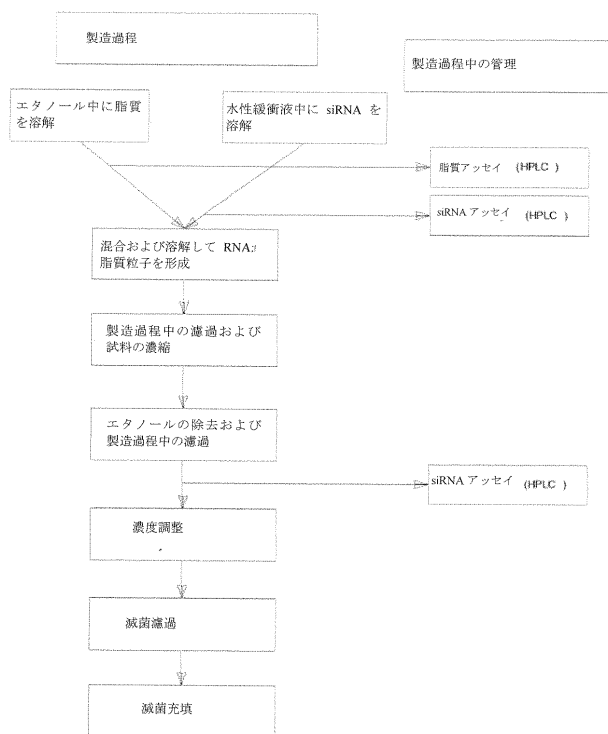
【図 16】



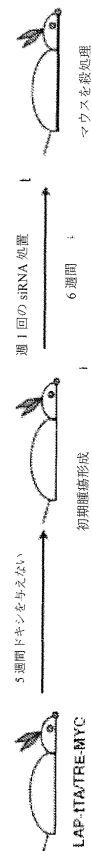
【図 17】



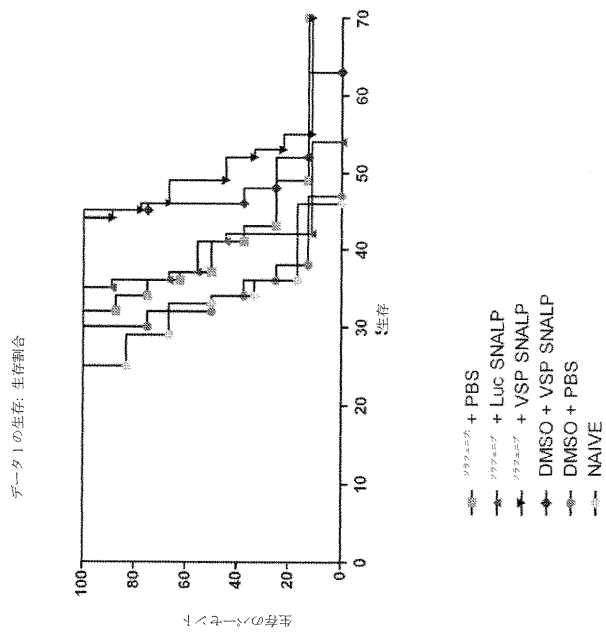
【図 18】



【図 19】



【図 20】



【手続補正書】

【提出日】平成22年11月10日(2010.11.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2011518117000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/036223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/11 A61K31/713 C07H21/00 ADD. A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K C07H		
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/115168 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; BUMCROT DAVID [US]; TAN PAMELA [DE]) 11 October 2007 (2007-10-11)	1-21, 23-27
Y	the whole document	1-28
Y	ZIMMERMANN TRACY S; ET AL: "RNAi-mediated gene silencing in non-human primates" NATURE, vol. 441, no. 7089, 4 May 2006 (2006-05-04), pages 111-114, XP002412249 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-21, 23-27
-/--		
<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
1 September 2009		08/09/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Andres, Serge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/036223

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAKIMOTO CHRIS H; AWADA AHMAD: "Safety and anti-tumor activity of sorafenib (Nexavar((R))) in combination with other anti-cancer agents: a review of clinical trials" CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY, vol. 61, no. 4, April 2008 (2008-04), pages 535-548, XP002543476 ISSN: 0344-5704 the whole document	22,28
A	WO 2007/012191 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC [CA]; MACLACHLAN IAN [CA]; JEFFS LLOYD B []) 1 February 2007 (2007-02-01) the whole document	1-28
A	ZHU ANDREW X: "Development of sorafenib and other molecularly targeted agents in hepatocellular carcinoma" CANCER, vol. 112, no. 2, January 2008 (2008-01), pages 250-259, XP002543477 ISSN: 0008-543X	22,28
A	WO 2004/065601 A2 (RIBOPHARMA AG [DE]; PHILIPP HADWIGER [DE]; MATTHIAS JOHN [DE]; LORENZ) 5 August 2004 (2004-08-05) cited in the application the whole document	1-28
A	WO 2005/089224 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; DE FOUGEROLLES ANTONIN [US]; FRANK-) 29 September 2005 (2005-09-29) cited in the application	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/036223

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007115168 A2	11-10-2007	AU 2007233109 A1	11-10-2007
		CA 2647728 A1	11-10-2007
		EP 2008274 A2	31-12-2008
		KR 20090010174 A	29-01-2009
		US 2007281899 A1	06-12-2007
WO 2007012191 A1	01-02-2007	AU 2006274413 A1	01-02-2007
		CA 2616877 A1	01-02-2007
		CN 101267805 A	17-09-2008
		EP 1937213 A1	02-07-2008
		JP 2009505957 T	12-02-2009
WO 2004065601 A2	05-08-2004	AT 367441 T	15-08-2007
		AU 2004206255 A1	05-08-2004
		AU 2008203538 A1	28-08-2008
		CA 2513809 A1	05-08-2004
		DE 10302421 A1	29-07-2004
		DE 602004007620 T2	10-04-2008
		DK 1587926 T3	19-11-2007
		EP 1587926 A2	26-10-2005
		ES 2289474 T3	01-02-2008
		PT 1587926 E	26-10-2007
		US 2006178324 A1	10-08-2006
WO 2005089224 A2	29-09-2005	AU 2005222902 A1	29-09-2005
		CA 2559161 A1	29-09-2005
		EP 1735009 A2	27-12-2006
		JP 2007528736 T	18-10-2007
		US 2006094032 A1	04-05-2006
		US 2006223770 A1	05-10-2006

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/00
				G

(31)優先権主張番号 61/112,079
 (32)優先日 平成20年11月6日(2008.11.6)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/150,664
 (32)優先日 平成21年2月6日(2009.2.6)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,S K,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,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,K E,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,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(74)代理人 100127638
 弁理士 志賀 美苗
 (74)代理人 100144923
 弁理士 中川 将之
 (74)代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生
 (74)代理人 100170520
 弁理士 澤本 真奈美
 (72)発明者 デイビッド・バムクロット
 アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、サード・ストリート 3 0 0 番、アルナイル・ファーマシューティカルス・インコーポレイテッド内
 (72)発明者 ディナー・ウェン・イー・サー
 アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、サード・ストリート 3 0 0 番、アルナイル・ファーマシューティカルス・インコーポレイテッド内
 (72)発明者 イバンカ・トウジャースカ
 アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、サード・ストリート 3 0 0 番、アルナイル・ファーマシューティカルス・インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA11 DA02 HA17
 4C076 AA19 CC27 DD49 DD63 DD70
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA05 NA14 ZB26