

(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.

A61K 31/713 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)

F 1

A 6 1 K 31/713 Z N A
A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/28
A 6 1 K 47/18

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 C 07 6
4 C 08 6

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)
(86) (22) 出願日 平成21年3月5日 (2009.3.5)
(85) 翻訳文提出日 平成22年10月21日 (2010.10.21)
(86) 國際出願番号 PCT/US2009/036223
(87) 國際公開番号 WO2009/111658
(87) 國際公開日 平成21年9月11日 (2009.9.11)
(31) 優先権主張番号 61/034,019
(32) 優先日 平成20年3月5日 (2008.3.5)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/083,367
(32) 優先日 平成20年7月24日 (2008.7.24)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/086,381
(32) 優先日 平成20年8月5日 (2008.8.5)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 505369158
アルナイラム ファーマシューティカルズ
, インコーポレイテッド
A L N Y L A M P H A R M A C E U T I
C A L S, I N C.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
1 4 2, ケンブリッジ, サード スト
リート 300
(74) 代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
(74) 代理人 100084146
弁理士 山崎 宏
(74) 代理人 100122301
弁理士 富田 憲史

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 (E g 5 / K S P) 遺伝子の発現を阻害するための、第 1 の二本鎖リボ核酸 (d s R N A) と、細胞内のヒト V E G F の発現を阻害するための第 2 の d s R N A とを含む、組成物であって、

前記第 1 の d s R N A および前記第 2 の d s R N A の両方が、安定な核酸脂質粒子 (S N A L P) に製剤化され、

前記第 1 の d s R N A 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 1 3 1 1 (5 ' - U C G A G A A U C U A A A C U A A C U - 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 d s R N A は、15 ~ 30 塩基対長であり、前記第 2 の d s R N A 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 1 5 3 8 (5 ' - G C A C A U A G G A G A G A U G A G C U U - 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。

【請求項 2】

前記第 1 のアンチセンス鎖は、配列番号 1 3 1 1 (5 ' - U C G A G A A U C U A A A C U A A C U - 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 1 5 3 8 (5 ' - G C A C A U A G G A G A G A U G A G C U U - 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。

【請求項 3】

前記第 1 の d s R N A は、配列番号 1 5 3 4 (5 ' - U C G A G A A U C U A A A C U A A C U T T - 3 ') からなるセンス鎖と、配列番号 1 5 3 5 (5 ' - A G U U A G U U U A G A U U U C U C G A T T - 3 ') からなるアンチセンス鎖とからなり、前記第 2 の d s R N A は、配列番号 1 5 3 6 (5 ' - G C A C A U A G G A G A G A U G A G C U U - 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、請求項 1 に記載の組成物。

【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 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、

前記第 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、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記第 1 の d s R N A および前記第 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終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

10

20

30

40

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 d s R N A および前記第 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 d s R N A 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 d s R N A 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 d s R N A のそれぞれの鎖が 21 塩基長であり、前記第 2 の d s R N A の前記センス鎖が 21 塩基長であり、前記第 2 の d s R N A 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 d s R N A および前記第 2 の d s R N A 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 S N A L P 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、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、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、請求項 1 ~ 14 に記載の組成物。
30

【請求項 16】

前記組成物は、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、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 E g 5 および V E G F 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、前記細胞内の单星 (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】

10

20

30

40

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。

【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。

【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。

【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。

【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

10

20

30

40

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

30

40

【0006】

Eg5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、微小管の单星状アレイ(monopolar 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、单星状アレイから「モナストロール」と呼ばれる。この单星状アレイの表現型は、Eg5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。この独特の单星状アレイの表現型が、Eg5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Eg5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。Eg5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。Eg5の免疫除去、またはEg5のモナストロール阻害のいずれかを通じて、单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、Eg5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)。单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Eg5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様態で、Eg5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。

【0007】

VEGF(血管透過性因子、VPF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。

10

【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。

20

【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' - 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' - GCACAUAGGAGAGAUGAGCuu - 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。

30

【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' - UCGAGAAUCUAAACUAACU - 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' - GCACAUAGGAGAGAUGAGCuu - 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' - UCGAGAAUCUAAACUAACUTT - 3')からなるセンス鎖と、配列番号1535(5' - AGUUAGUUAGAUUCUCGATT - 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' - GCACAUAGGAGAGAUGAGCuu - 3')からなるセンス鎖と、配列

40

50

番号 1537 (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」で示されるホスホロチオエートとを含むように、第1の dsRNA は、配列番号 1240 (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 1241 (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 dsRNA は、配列番号 1242 (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 1243 (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 dsRNA は、2つのオーバーハングを含有し、第2の dsRNA 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 dsRNA および第2の dsRNA 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 dsRNA 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終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 dsRNA および第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有する少なくとも1個のヌクレオチドとを含む。

20

【0014】

それぞれの dsRNA 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 dsRNA のそれぞれの鎖は 21 塩基長であり、第2の dsRNA のセンス鎖は 21 塩基長であり、第2の dsRNA 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 dsRNA および第2の dsRNA 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 dsRNA は、SNALPS として製剤化される。幾つかの実施形態において、SNALP 製剤は、DLinDMA、コレステロール、DPPC、およびPEG2000-C-DMA を含む。例えば、SNALP 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、Eg5 および / または VEGF 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、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。他の実施形態において、本発明の組成物は、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。細胞への該組成物の投与は、前記細胞内の Eg5 および VEGF の両方の発現を低下させることができる。該組成物は、nM 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、細胞内の单星 (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。

20

【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。

30

【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。

40

【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。

50

【図14】血清アルファフェトプロテイン(AFP)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15】図15Aおよび15Bは、2mg / kgのS N A L P - V S P (A)または2mg / kg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。24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16】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17】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18】A L N - V S P 0 2 の製造過程を図示する流れ図である。

10

【図19】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】

【0022】

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。

20

【0023】

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、30ヌクレオチド長未満、一般に19~24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、30ヌクレオチド長未満、一般に19~24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。

30

【0024】

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。

【0025】

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。

40

【0026】

「 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(de 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ところが理解されよう。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

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】

10

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 Gene ID: 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】

20

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】

30

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、VEGFR145は、血管新生を誘発し、VEGF189と同様（しかしVEGFR165とは異なり）、VEGFR145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、参考によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【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】

50

本明細書で使用される場合、別途記載のない限り、第2のスクレオチド配列に関連して第1のス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のスクレオチド配列を含むオリゴスクレオチドもしくはポリス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のスクレオチド配列を含むオリゴスクレオチドもしくはポリスクレオチドの能力を指す。かかる条件は、例えば、ストリンジエントな条件であり得、ストリンジエントな条件には、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ス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よう。

【0033】

これには、第1および第2のスクレオチド配列の全長にわたる、第2のスクレオチド配列を含むオリゴスクレオチドもしくはポリスクレオチドに対する、第1のスクレオチド配列を含むオリゴスクレオチドもしくはポリス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」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つのオリゴスクレオチドが、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スクレオチド長のオリゴスクレオチドと、23スクレオチド長の別のオリゴスクレオチドとを含むdsRNAであって、より長いオリゴスクレオチドが、より短いオリゴスクレオチドに完全に相補的である21ス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」であるとして言及され得る。

【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ス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。

【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」であるポリスクレオチドは、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、ポリスクレオチドを指す。例えば、ポリスクレオチドは、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。

【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

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'末端との間の中斷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、中斷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、「リンクー」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、不対ヌクレオチド、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のその末端に不対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、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、インビオ送達については、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Eg5および/またはVEGF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、Eg5および/またはVEGF遺伝子が転写され、Eg5および/またはVEGF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、Eg5のmRNAおよび/またはVEGFのmRNAの量の低下によって明らかになる、Eg5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】

$$\frac{(\text{対照細胞内のmRNA}) - (\text{処理細胞内のmRNA})}{(\text{対照細胞内のmRNA})} \times 100\%$$

【0044】

代替として、阻害の程度は、Eg5および/またはVEGF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Eg5および/もしくはVEGF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dsRNAが特定の程度、Eg5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考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、かかる参考の役割を果たす。

20

【0045】

例えば、特定の場合において、Eg5遺伝子（またはVEGF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、Eg5および/またはVEGF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、Eg5および/またはVEGF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Eg5および/またはVEGF dsRNA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】

Eg5の発現（またはVEGF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、Eg5および/またはVEGF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（Eg5および/またはVEGF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、Eg5および/もしくはVEGF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Eg5および/もしくはVEGFの発現によって媒介される病理過程の明らかな症状において、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、Eg5および/またはVEGF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、Eg5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產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、コーンスターク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、B i o s e a r c h , A p p l i e d B i o s y s t e m s , I n c . 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されると、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 siRNA を組み合わせて使用する場合、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 Eg5 を標的とする第 1 の dsRNA と、21 塩基対の長さの二重鎖を有する VEGF を標的とする第 2 の dsRNA 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。

10

【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 siRNA を組み合わせて使用する場合、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 Eg5 を標的とする第 1 の dsRNA と、21 個のヌクレオチドの相補性の領域を有する VEGF を標的とする第 2 の dsRNA とを含むことができる。

【0057】

本発明の dsRNA 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 siRNA を組み合わせて使用する場合、各 siRNA 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、Eg5 を標的とする dsRNA 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、VEGF を標的とする第 2 の dsRNA とを含むことができる。

20

【0058】

本発明の dsRNA 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 dsRNA 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 dsRNA 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 dsRNA のセンス鎖は、アンチセンス鎖の 3' 末端および 5' 末端のそれに、1 ~ 10 個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。

30

【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 dsRNA 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、dsRNA 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 dsRNA 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' 終端、または代替として、センス鎖の 3' 終端に位置する。該 dsRNA 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 dsRNA 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 1 kg につき 5 mg 未満の投与を可能にする。一般に、該 dsRNA 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。

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】

10

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。

20

【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。

30

【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（El bashir 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

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產生する。 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 鎮について、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

【 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、“ 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。

30

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。

【0069】

その中にリン原子を含まない、好ましい修飾されたd s R N A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)、シロキサン骨格、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ニアミド骨格、アミド骨格、ならびにN、O、S、およびC H 2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。

【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。

【0071】

他の好ましいd s R N A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d s R N A模倣体は、ペプチド核酸(P N A)と称される。P N A化合物では、d s R N A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。P N A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、

10

20

30

40

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--CH₂--NH--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[メチレン(メチルイミノ)またはMMI骨格として知られる]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--、および--N(CH₃)--CH₂--CH₂--[式中、天然のホスホジエステル骨格は、--O--P--O--CH₂--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C₁~C₁₀アルキルまたはC₂~C₁₀アルケニルおよびアルキニルであり得る。O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]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、C₁~C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、もしくはO-アラルキル、SH、SC_H₃、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)(Martin et 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(CH₂)₂ON(CH₃)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' - DMAE OEとしても知られる)、すなわち、2' - O - CH₂ - O - CH₂ - N(CH₂)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'終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'終端ヌクレオチドの5'位で作製することもできる。また、dsRNAは、ペントフラノシリル糖の代わりに、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つて共同所有され、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（シュードウラシル）、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-ブロモ、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., Eds., 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されると、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、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 (Lettsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 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、ヘキシリ-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リアミノ-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。
30

【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 5,608,046 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 5,022 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、
40
50

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内の单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化合物または「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、RN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。RN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

30

40

50

【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、ヘキシリ-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(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533)、脂肪族鎖、例えば、ドеканジオールもしくはウンデシル残基(Saison-Behmoaras 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ギリコール鎖(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., Biophys. Acta, 1995, 1264:229)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシリアミノ-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)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

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、純粋な共役体が得られる。

【 0 0 8 1 】

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

【 0 0 8 2 】

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、Couture, A , et al . , 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、Conrad の国際P C T 公開W O 第 0 0 / 2 2 1 1 4 号、および Conrad 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、受け継がれ得る。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構築することもできる（Gassmann, et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A (1 9 9 5) 9 2 : 1 2 9 2 ）。

20

【 0 0 8 3 】

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。好みの実施形態において、d s R N A は、d s R N A がシ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。

30

【 0 0 8 4 】

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、Muzyczka, et al . , Curr . Topics Microbiol . Immunol . (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、Berkner, et al . , Biotechniques (1 9 9 8) 6 : 6 1 6 ）、Rosenfeld et al . (1 9 9 1 , Science 2 5 2 : 4 3 1 - 4 3 4)、および Rosenfeld et al . (1 9 9 2)、Cell 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、Eglitis, et al . , Science (1 9 8 5) 2 3 0 : 1 3 9 5 - 1 3 9 8 、Danos and Mulligan, Proc . Natl . Acad . Sci . U S A (1 9 9 8) 8 5 : 6 4 6 0 - 6 4 6 4 、Wilson et al . , 1 9 8 8 , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 8 5 : 3 0 1 4 - 3 0 1 8 、Armentano et al . , 1 9 9 0 , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 8 7 : 6 1 4 1 6 1 4 5 、Huber et al . , 1 9 9 1 , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 8 8 : 8 0 3 9 - 8 0 4 3 、Ferry et al . , 1 9 9 1 , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 8 8 : 8 3 7 7 - 8 3 8 1 、Chowdhury et al . , 1 9 9 1 , Science 2 5 4 : 1 8 0 2 - 1 8 0 5 、van Beusechem et

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、产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ようにすることができる。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 、 Egliitis 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】

好み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。特に好み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プロモー

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AV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AVベクター、組換えAV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 Het 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AV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 Ret 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。10

【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)。20

【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、プログステロン、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(EP TG)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。30

【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。40

【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Transi50

t-TKO(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Eg5遺伝子(もしくはVEGF遺伝子)の異なる領域または複数のEg5遺伝子(もしくはVEGF遺伝子)を標的とする、dsRNA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(GFP)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。エクスピボ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。

【0095】

10

また、Eg5に特異的なdsRNA分子およびVEGFに特異的なdsRNA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5,328,470号を参照)、または定位固定注射(例えば、Chen et al.(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057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。

20

【0096】

dsRNA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dsRNA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dsRNAを含有する医薬組成物は、Eg5/KSPおよび/またはVEGFの発現によって媒介される病理過程、例えば、肝臓癌等の、Eg5/KSPおよび/またはVEGF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。

【0097】

30

投薬量

本明細書で取り上げられる医薬組成物は、Eg5/KSPおよび/またはVEGF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、dsRNA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0.01~200.0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1~50mgの範囲であろう。例えば、該dsRNAは、単回用量当たり0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5.0mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、または50mg/kgで投与することができる。

【0098】

40

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dsRNA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(sub-dose)として投与されてもよい。Eg5/KSPおよび/またはVEGF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。

【0099】

50

幾つかの実施形態において、該dsRNA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dsRNA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dsRNA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dsRNA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、EG5/KSPおよび／またはVEGF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、dsRNA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EG5/KSPおよび／またはVEGF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EG5/KSPおよび／またはVEGF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、LD50（集団の50%に致死的な用量）、およびED50（集団の50%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、LD50/ED50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。

20

【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ED50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、IC50（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dsRNA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、dsRNA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 d s R N A 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、d s R N A は、共役もしくは非共役、またはリポ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、d s R N A 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体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、d s R N A 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。

【0107】

該 d s R N A 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様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。

【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。

【0110】

本発明の医薬組成物には、溶液、エマルジョン、およびリポ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、E G 5 / K S P および／またはV E G F 遺伝子を標的とする d s R N A 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 d s R N A を含有する組成物に製剤化することができる。例えば、E G 5 / K S P および／またはV E G F 遺伝子を標的とする1つ以上の d s R N A 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E G 5 / K S P および／またはV E G F 以外の遺伝子を標的とする1つ以上の d s R N A 化合物を含有することができる。

【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、サシェット、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

られる d s R N A 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（C D C A）およびウルソデオキシケノデオキシコール酸（U D C A）、コレ酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸（g l u c h o l i c a c i d）、グリコール酸（g l y c h o l i c a c i d）、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、カブリル酸、カブリン酸、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、ジカブリン酸、トリカブリン酸、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1 - モノカブリン酸、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、カブリン酸、および U D C A 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 d s R N A 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。d s R N A 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（P E G）、およびデンプン類；ポリアルキルシアノアクリレート類；D E A E 誘導体化ポリイミン類、ポルラン（p o l l u l a n）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、ポリスペルミン、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（T D A E）、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）、D E A E - メタクリレート、D E A E - ヘキシルアクリレート、D E A E - アクリルアミド、D E A E - アルブミンおよびD E A E - 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（D L - 乳酸 - c o - グリコール酸（P L G A）、アルギン酸塩、ならびにポリエチレングリコール（P E G）が含まれる。d s R N A 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 d s R N A 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（D O P E）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

10

20

30

40

50

M P C) 、ジステアロイルホスファチジルコリン) 、陰性 (例えは、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (D M P G)) 、ならびにカチオン性 (例えは、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピル (D O T A P) 、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (D O T M A)) が含まれる。本発明で取り上げられる d s R N A は、リポソーム内にカプセル化されてもよく、あるいはそれ、特にカチオン性リポソームと複合体を形成してもよい。代替として、d s R N A 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、カブリル酸、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 ~ C₁₀ アルキルエステル (例えは、ミリスチン酸イソプロピル (I P M)) 、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、d s R N A 分子は、例えは、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) リポソームに本明細書で提供される d s R N A 酸分子を取り込むステップと、(2) d s R N A 分子を脂質もしくはリポソームと複合し、核酸 - 脂質もしくは核酸 - リポ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。該リポソームは、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 (例えは、荷電関連) して、リポソームを形成することができる。カチオン性リポソームの例には、Lipofectin、Lipofectamine、Lipofectace、および D O T A P が含まれるが、これらに制限されない。リポ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。リポソーム組成物は、例えは、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、ジパルミトイー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ル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、D D A B または D O T A P 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、D O P E 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、Templletonら (Nature Biotechnology, 15 : 647 - 652 (1997)) によって記載されるもの等のリポ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 (Boletta et al., J. Am Soc. Nephrol. 7 : 1728 (1996)) 。核酸を送達するためのリポ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。例えは、ウイルスベクター (例えは、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、d s R N A 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 d s R N A 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、例えは、感染によって、1 つ以上の d s R N A 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d s R N A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、同様の様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

30

【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。

【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、およびリポソームの水性容積である。

【0121】

リポソームは、作用部位への活性成分の移送および送達に有用である。リポソーム膜は、構造的に生体膜と同様であるため、リポソームが組織に適用されると、リポソームは細胞膜との融合を開始し、リポソームと細胞との融合が進行するに従って、リポ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】

リポソーム製剤は、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、リポ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ポ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】

リポソームは、広義の2つのクラスに分類される。カチオン性リポソームは、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、正に荷電したリポソームである。正に荷電したDNA／リポソーム複合体は、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、リポソームが破裂し、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ポソームは、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、これらのリポ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感受性リポ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】

リポソーム組成物の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、中性のリポソーム組成物は、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、またはジパルミトイールホスファチジルコリン(DPPC)から形成することができる。アニオン性のリポソーム組成物は、一般にジミリストイ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ポソームは、主にジオレオ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。リポ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、リポ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ポ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、リポ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、リポ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、シクロスボリン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ボリン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GM₁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GM₁、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GM₁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-ジミリストイ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、2C₁₂15G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ゲ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(PE)を含むリポソームが、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(Biochemical et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91)は、このような観察を、他のPEG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(DSPE)とPEGとの組み合わせから形成されるDSPE-PEGに広げた。外部表面に共有結合されたPEG部分を有するリポソームが、欧州特許EP第0445131B1号および国際公開WO第90/04384号(Fisher)に記載されている。PEGによって誘導体化された1~20モルパーセントのPEを含有するリポソーム組成物、およびその使用方法が、Woodleら(米国特許第5,013,556号、および第5,356,633号)、ならびにMartinら(米国特許第5,213,804号および欧州特許EP第0496813B1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ポソームが、国際公開WO第91/05545号および米国特許第5,225,212号(ともにMartinらによる)、ならびに国際公開WO第94/20073号(Zalipskyら)に開示されている。PEG修飾セラミド脂質を含むリポソームが、国際公開WO第96/10391号(Choiら)に記載されている。米国特許第5,540,935号(Miyazakiら)および米国特許第5,556,948号(Tagawa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PEG含有リポソームについて記載している。

10

20

30

40

【0132】

核酸を含む多くのリポ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WO第96/40062号は、高分子量の核酸をリポ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5,264,221号は、タンパク質結合リポソームを開示し、かかるリポソームの内容物にはdsRNAが含まれると主張している。Rahmanらによる米国特許第5,665,710号は、オリゴデオキシヌクレオチドをリポ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WO第97/04787号は、raf遺伝子を標的とするdsRNAを含むリポソームを開示している。

【0133】

トランスファーソームはさらに別の種類のリポソームであり、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(self-loading)である。トランスファーソームを作製するために、標準的なリポソーム組成物に対して、表面エッジアクチベータ(surface edge-activator)、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。

【0134】

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)およびリポ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(HLB)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(Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p.285)。

【0135】

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で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、石鹼等のカルボン酸塩、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で最も重要な構成物質は、アルキル硫酸塩および石鹼である。

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(Rieger, 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50nm～約150nm、より典型的には約60nm～約130nm、より典型的には約70nm～約110nm、最も典型的には約70～約90nm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号。

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d_sRNA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-ジメチルクロライド(DO-DAC)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムプロミド(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(Dilinoleyl oxy) - 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(Dilinolenyl oxy) - 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(Dilinoleyl carbamoyl oxy) - 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(Dilinoleyoxy) - 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(DLinDA-P)、1,2-ジリノレイルチオ(Dilinoleyl thio) - 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(linoleyl oxy) - 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.C1)、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.C1)、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)(Dioleyl amino) - 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-ジリノレイルオキソ(Dilinoleyl oxo) - 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±20nm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)、ジパルミトイロホスファチジルコリン(DPPC)

10

20

30

40

50

)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(D O P G)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(D P P G)、ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン(D O P E)、パルミトイylオレオイルホスファチジルコリン(P O P C)、パルミトイylオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン(P O P E)、ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン 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(D O P E - m a l)、ジパルミトイylホスファチジルエタノールアミン(D P P E)、ジミリストイルホスホエタノールアミン(D M P E)、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)、16 - O - モノメチル P E 、16 - O - ジメチル P E 、18 - 1 - トランス P E 、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(S O P E)、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、 P E G - ジアシルグリセロール(D A G)、 P E G - ジアルキルオキシプロピル(D A A)、 P E G - リン脂質、 P E G - セラミド(C e r)、またはそれらの混合物を含む、ポリエチレングリコール(P E G) - 脂質であり得る。 P E G - D A A 共役体は、例えば、 P E G - ジラウリオキシプロピル(C i₂)、 P E G - ジミリストイルオキシプロピル(C i₄)、 P E G - ジパルミチルオキシプロピル(C i₆)、または P E G - ジステアリルオキシプロピル(C]₈)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 】

L N P 0 1

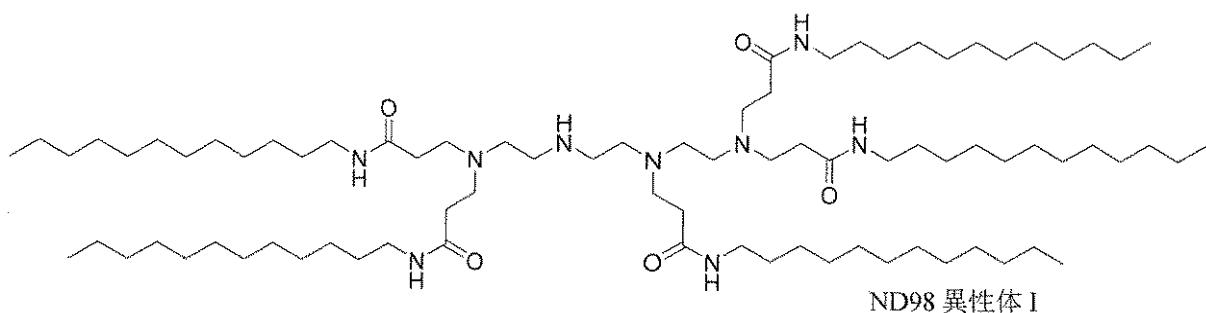
一実施形態において、脂質様(l i p i d o i d) N D 9 8 - 4 H C l (M W 1 4 8 7)(式 1)、コレステロール(Sigma - A l d r i c h)、および P E G - C e r a m i d e C 1 6 (A v a n t i P o l a r L i p i d s)を使用して、脂質 s i R N A ナノ粒子(すなわち、 L N P 0 1 粒子)を調製することができる。それぞれエタノール中の原液を、 N D 9 8 、 1 3 3 m g / m l ; コlesteroール、 2 5 m g / m l ; P E G - C e r a m i d e C 1 6 、 1 0 0 m g / m l のように調製することができる。次いで、 N D 9 8 、コレステロール、および P E G - C e r a m i d e C 1 6 の原液を、例えば、 4 2 : 4 8 : 1 0 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 ~ 300 mM になるように、(例えば、酢酸ナトリウム(p H 5)中の) s i R N A 水溶液と混合することができる。脂質 s i R N A 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、 L i p e x E x t r u d e r (N o r t h e r n L i p i d s , I n c) 等のサーモバレル押出機(t hermobarrel extruder)を使用して、ポリカーボネート膜(例えば、 1 0 0 n m 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、透析または接線流過によって達成することができる。緩衝液は、例えば、約 p H 7 、 例えは、約 p H 6 . 9 、約 p H 7 . 0 、約 p H 7 . 1 、約 p H 7 . 2 、約 p H 7 . 3 、または約 p H 7 . 4 のリン酸緩衝食塩水(P B S)と交換することができる。

30

【 0149 】

40

【化1】



10

式1

【0150】

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。

【0151】

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 $0.1\mu\text{m}$ 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つの非混溶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。

【0152】

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、

20

30

40

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】

10

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)。

20

【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、蜜蠟、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て、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。

30

【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、潤滑剤、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)。

40

【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

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、油溶性ビタミン、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

【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置

30

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。
10

【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、Brig 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トオレエート (PO500)、デカグリセロールモノカブレート (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、ならびにシリコー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。
20
30

【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
40
50

定性の薬物、ペプチド、またはd s R N A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d s R N Aおよび核酸の向上された体内吸収を促進し、d s R N A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d s R N A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 (G r i l l 3)、L a b r a s o l、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。

10

【0164】

浸透促進剤

一実施形態において、本発明は、核酸、特にd s R N A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。

20

【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。

30

【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d s R N A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F C - 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)。

40

【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 - r a c - グリセロール)、ジラウリン、カブリル酸、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 ~ C₁₀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., Critical

50

al Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92、Muranishi, 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、Muranishi, 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ス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(homovanilate))、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、Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33、Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51)。

10

20

30

40

50

【0170】

非キレート非界面活性剤：本明細書で使用される、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 (Muraniishi, 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。

【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 (Junichiら、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できる。

10

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ブ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。本明細書で使用される、「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に投与される場合、減少され得る (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121, Tak

40

50

akura et al., D s R N A & N u c l . A c i d D r u g D e v . , 1996, 6, 177 - 183).

【 0 1 7 5 】

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された時に、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、デンブ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。

【 0 1 7 6 】

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。

【 0 1 7 7 】

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。

【 0 1 7 8 】

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。

【 0 1 7 9 】

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。

【 0 1 8 0 】

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

10

20

30

40

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、療法の单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。

【0182】

本発明の一態様において、主題の化合物は、種々の病状に関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。受容体型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、ErbbB、Erbb2、Erbb3、Erbb4、Xmrk、DER、Let23）、線維芽細胞成長因子（FGF）受容体（例えば、FGF-R1、GFF-R2/BEK/Cek3、FGF-R3/Cek2、FGF-R4/TKF、KGFR-R）、肝細胞成長／散乱因子受容体（HGF）（例えば、MET、RON、SEA、SEX）、インスリン受容体（例えば、IGF1-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、PDGFR、CSF1-R/FMS、SCF-R/C-KIT、VEGFR/FLT、NEK/FLK1、FLT3/FLK2/STK-1）が含まれる。非受容体型チロシンキナーゼファミリーには、BCR-ABL（例えば、p43^ab^b1、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。

【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、Zolinda、Tarceva、Iressa、Tykerb、Gleevec、Sutent、Sprycel、Nexavar、ソラフェニブ、CNF2024、RG108、BMS387032、Affmitak、Avastin、Herceptin、Erbitux、AG24322、PD325901、ZD6474、PD184322、Obatodax、ABT737、およびAE-E788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。

【0185】

10

20

30

40

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（チオテバ、ヘキサメチルメラミン）、アルキルスルホネート（ブルファン）、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（カルボプラチニン、シスプラチニン、およびオキサリプラチニン）；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（パ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、ビンプラスチン、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（Campototecan）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、クロモマイシン（ダクチノマイシンおよびプリカマイシン）、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tron、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、アミノブテリン）、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（Irootecan）、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、リノ酸エトポシド、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、ベバシズマブ）；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。

【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（X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、種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

10

20

30

40

50

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-プロピオニ酸クロベタゾール、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、およびプロピオニ酸ハロベタゾール）；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-リポ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）；ガバベ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ptylin）；ニューロン安定化抗てんかん薬（neurone stabilizing anti epileptic 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）；マトリックスマ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；腫瘍壞死因子 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、もしくはレボデスオキシエフェドリン（levodesoxyephedrine））；鎮咳薬（例えば、コデイン、ヒドロコドン、カラミフェン）、カルベタベンタン、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 と同時に投与することができる。一例では、AD-12115 を c-Myc siRNA と同時に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、膀胱癌、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、膀胱癌、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。

20

【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ニン、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、ダウノルビシン、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。

30

【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、ドキソルビシンおよび他のアントラサイクリン類似体、ナイトロジエンマスター、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、シスプラチニン、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、乳腺癌等の混合腫瘍の場合、本化合物を、リュ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。

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。

40

【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d s RNA分子を含有する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。

10

【実施例】

【0197】

実施例1. d s RNA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。

20

【0198】

s i RNA合成

d s RNAのスクリーニングのために、Expedite 8909合成機（Applied Biosystems、Appera 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、1 μモルの規模で固相合成によって单鎖RNAを生成した。RNAおよび2'-O-メチルヌクレオチドを含有する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、オリゴリ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。

30

【0199】

確立された手順に従い、陰イオン交換HPLCによって、粗オリゴリ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、260 nm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（20 mM リン酸ナトリウム（pH 6.8）、100 mM 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。

40

【0200】

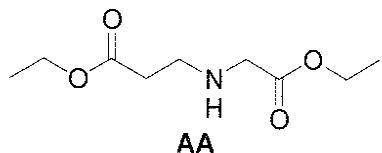
50

共役体

以下は、3' - コルステロールで共役した s i R N A (本明細書で - C h o l - 3' と称される)の合成の予測的記載であり、R N A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 A A

【化 2】



10

【0201】

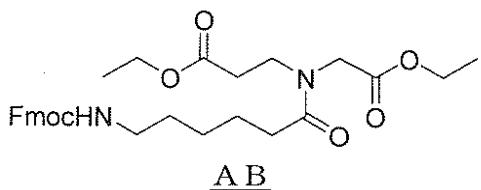
水酸化ナトリウムの4 . 7 Mの水溶液(50 mL)を、水(50 mL)中のグリシンエチル塩酸塩(32 . 19 g、0 . 23 モル)の、攪拌して氷冷した溶液に添加した。次いで、エチルアクリレート(23 . 1 g、0 . 23 モル)を添加し、混合物を、反応の完了がTLCによって確認されるまで、室温で攪拌した。19時間後、該溶液をジクロロメタン(3 × 100 mL)で分配した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。残渣を蒸留して、AA(28 . 8 g、61%)を得た。

【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 A B

20

【化 3】



【0203】

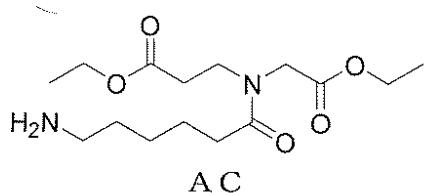
F m o c - 6 - アミノ - ヘキサン酸(9 . 12 g、25 . 83 ミリモル)をジクロロメタン(50 mL)に溶解し、氷冷した。ジイソプロピルカルボジイミド(3 . 25 g、3 . 99 mL、25 . 83 ミリモル)を該溶液に0°で添加した。その後、ジエチル - アザブタン - 1 , 4 - ジカルボキシレート(5 g、24 . 6 ミリモル)、およびジメチルアミノビリジン(0 . 305 g、2 . 5 ミリモル)を添加した。該溶液が室温になるようにし、さらに6時間攪拌した。反応の完了をTLCで確認した。反応混合物を真空下で濃縮し、酢酸エチルを添加して、ジイソプロピ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% E t O A C / ヘキサン)で精製し、11 . 87 g(88%)のABを得た。

【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 A C

30

【化 4】



40

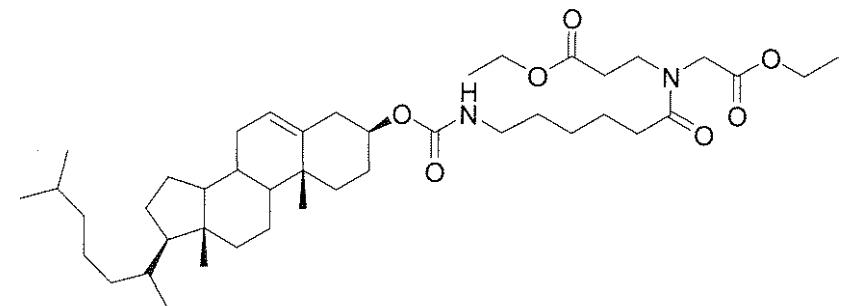
【0205】

50

3 - {エトキシカルボニルメチル - [6 - (9H - 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。

【0206】

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 - 1H - シクロ펜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

A D

【0207】

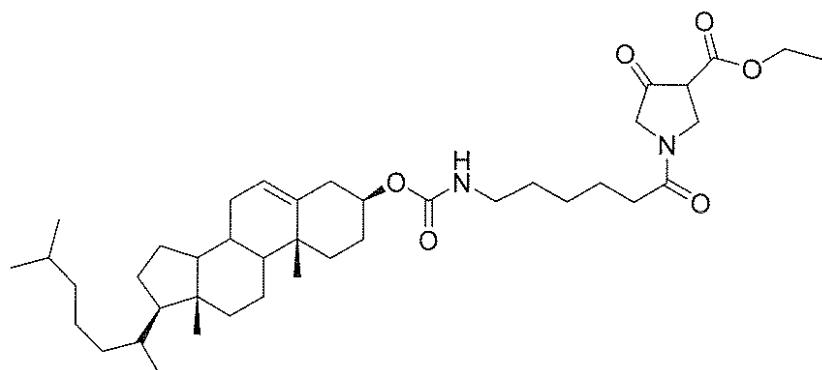
3 - [(6 - アミノ - ヘキサノイル) - エトキシカルボニルメチル - アミノ] - プロピオン酸エチルエステル A C (4.7 g、14.8ミリモル)の塩酸塩をジクロロメタンに取り込んだ。この懸濁液を氷上で0 に冷却した。この懸濁液にジイソプロピルエチルアミン (3.87 g、5.2 mL、30ミリモル)を添加した。得られた溶液に、コレステリルクロロホルメート (6.675 g、14.8ミリモル)を添加した。反応混合物を終夜攪拌した。反応混合物をジクロロメタンで希釈し、10%塩酸で洗浄した。生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製した (10.3 g、92%)。

30

【0208】

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펜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

A E

50

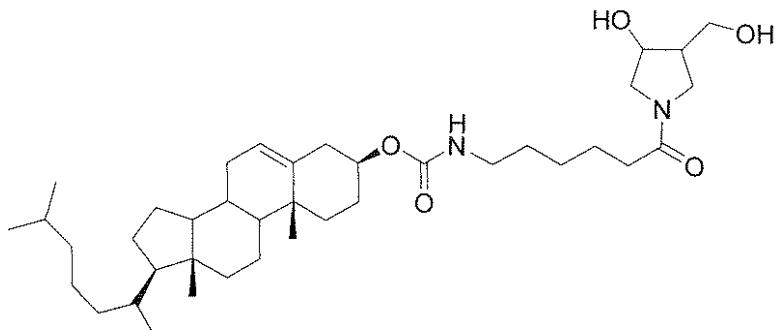
【0209】

カリウムt-ブトキシド(1.1g、9.8ミリモル)を30mL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℃に冷却し、5g(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℃未満に維持した。攪拌を0℃で30分間継続し、1mLの氷酢酸、その後に40mLの水中の4gのNaH₂PO₄H₂Oを添加した。得られた混合物を2回、それぞれ100mL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10mL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60mLのトルエンに溶解し、0℃に冷却し、50mLの3つの部分の冷たいpH9.5の炭酸塩緩衝液で抽出した。抽出液をリン酸でpH3に調整し、40mL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、1.9gのb-ケトエステルを得た(39%)。

【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-ヘキシリ]カルバミン酸17-(1,5-ジメチル-ヘキシリ)-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-イルエステルAF

【化7】

AF

【0211】

メタノール(2mL)を、b-ケトエステルAE(1.5g、2.2ミリモル)と、テトラヒドロフラン(10mL)中の水素化ホウ素ナトリウム(0.226g、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、1N HCl(12.5mL)を添加し、混合物を酢酸エチルで抽出した(3×40mL)。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%)。

【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-ヘキシリ]カルバミン酸17-(1,5-ジメチル-ヘキシリ)-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-イルエステルAG

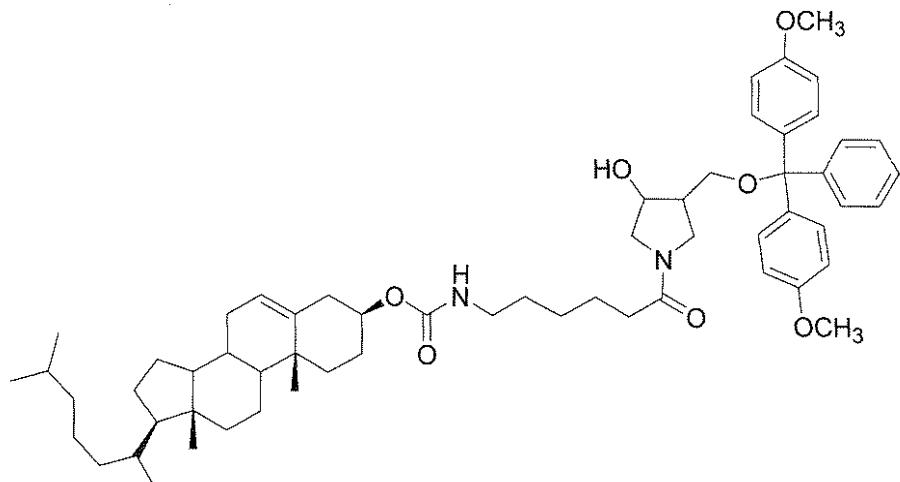
10

20

30

40

【化 8】



10

AG

【0213】

ジオール A F (1.25 g、1.994ミリモル)を、真空中でピリジン (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'-ジメトキシトリフルクロリド (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。反応混合物を真空中で濃縮し、残渣にジクロロメタン (50 mL)を添加した。この有機層を1M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%)。

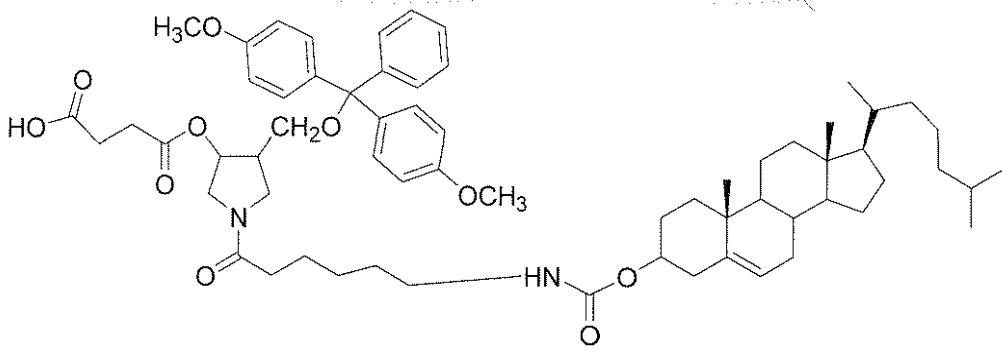
20

【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-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 pentata [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の真空中で乾燥させた。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

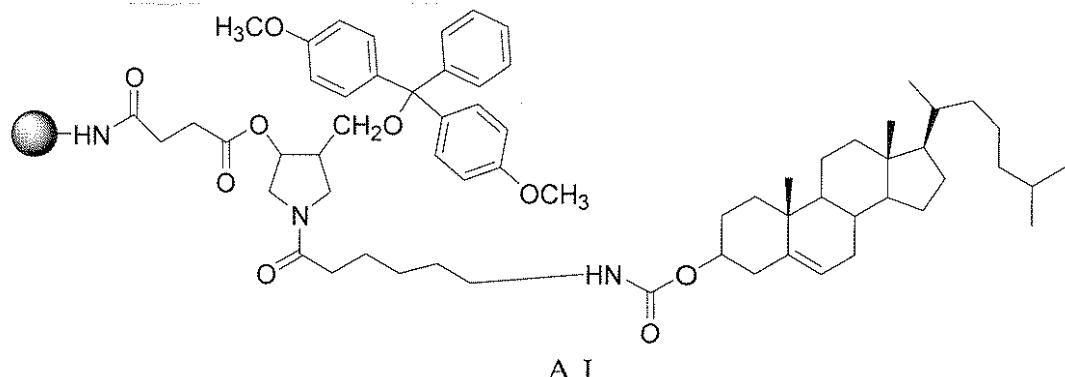
50

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D MAP（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

【0218】

5'-12-ドデカン酸ビスデシルアミド（bis decyl amide）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行った。

30

【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Eg5 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Eg5:NM_004523.2、4908塩基対、およびアカゲEg5:XM_001087644.1、878塩基対（ヒトEg5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1a. Eg5/KSPのdsRNA二重鎖の配列

【表1-1】

ヒトEg5/KSP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 (5'-3')	二重鎖名
385-407	1244	ACCGAUAGUUGUUGUUUCU CAAUU	1	CCAGGUUGUUGUUGUCCCA ATTT	2	UUGGACAAACAAACACUCCG TGT	AL-DP-6226
347-369	1245	UAUJGGGUUJUUGGAGGAUC GCUAA	3	UCCGUUGUUGGAGCAUCUA UUGT?	4	GUAGKUGCUCGAAACGCA TGT	AL-DP-6227
1078-1100	1246	AAUCAAACTAACUUCGAA UCCUP	5	UCCUAAACUACUUCGAAUC CTTT	6	GGAUUCUAGAUACUUGCA TGT	AL-DP-6228
1067-1089	1247	UCUUCACGCAAAUUA ACTAA	7	CUAUUCGAGAUUCUAAA UTST	8	AGUUAAGAUUCUGGAGAG TGT	AL-DP-6229
374-396	1248	GCUUGUGGUUACUUAAG GCUGU	9	GUUAGGUUACUUGAAGUG UTAT	10	ACGUUCUGGUUAAACUCAA TGT	AL-DP-6230
205-227	1249	UGGUAACUGGAGGACAU GUAAT	11	GUAGAGUGGAGGACAUUU ATST	12	UAAAUGGUCUSCAUCUAC TGT	AL-DP-6231
1176-1198	1250	ACUCUCGAGUACAUUCCAA GAGTC	13	UCAAGAGACAUUCCAA UTST	14	AUAIXCCCAAUuGACUAGA TGT	AL-DP-6232
386-408	1251	CGUAGGUUGUUGUUGCC AAUUC	15	CAAGGUUGUUGUUGCCAA UTGT	16	AUUGGAAACAAACACUUC TGT	AL-DP-6233
416-438	1252	AGUUAUCAAGGGCUUAAC UAGUA	17	UUAUUAUAGGCUUAACAU CTST	18	CAAUAAuAGCCAAuAA TGT	AL-DP-6234
485-507	1253	GGAGGUGAAGGGUAC UAGUC	19	UAGGUGAAGGGUAC ATAT	20	UUAAGGUACCUUUCACCUU TGT	AL-DP-6235
476-498	1254	UUUUAACAUGGAAGGUGA AAGGU	21	UUACAAGGGAAGG-GAAA CTST	22	GUUDACCUUCAUUGuAA TGT	AL-DP-6236
486-508	1255	CAACCHCAAAACGCUACU AAUUA	23	ACGGGAAGGCAACCUAA UTST	24	AUUAAGGUACCUUdACC TGT	AL-DP-6237
487-509	1256	AAUUCGAAAGGUACCUA ACUUA	25	GUUAGGAGGACCCUAA CTTT	26	CAUuAGGUGACCCUUC TGT	AL-DP-6238
1066-1088	1257	UUCUUAUCCGGAACUUA AAUUA	27	GUUUAUAGGAGGUACUAA CTST	28	GUUFLAGAGUUCUCCAUAGG TGT	AL-DP-6239
1256-1278	1258	ACUUCUAAUAAAGGAGA UATGG	29	GUUUAUAAAGGAGGAA CTAT	30	GUAGACUUCUAAUAAAG TGT	AL-DP-6240
2329-2351	1259	CAUAGAGAUCUUCGUUU GCCAU	31	GUAGAGAUCUUCGUUUC CTST	32	CCAAAGGCAAGAAUUCUC TGT	AL-DP-6241
1077-1099	1260	CAUCAUAAGUAAUAGA AUUUA	33	ACUUAACAUACUUCGAA CTAT	34	GAUUCUAGUUAAGUUAAG TGT	AL-DP-6242
1244-1266	1261	ACUACCAAAAAAGGUUC UAAUA	35	UCACCAAAAAAGGUUC UTST	36	AGAGAGACTUUCUURGUGA TGT	AL-DP-6243
637-659	1262	AAAGCUCUUCUUGACUUC UUAUJ	37	GUCCUUCUUCUUGACUUC ATGT?	38	GUAGAAGRIJAAAGCCJC TGT	AL-DP-6244
1117-1139	1263	GGGUUACACAAACCUUA UAAUJ	39	GUUACACAAACCUUA ATST	40	GUAGAGAGGUUCGUUROG TGT	AL-DP-6245
373-395	1264	ACAGUAGGUUUAACCAA GUGUU	41	AuGUuGauAcuAcGAG CTAT	42	GUACUCGGAAACAUUAA TGT	AL-DP-6246

1079-1101	1265	AUCUAACAUACUUCGAAU GUUCG	43	GUACACUACUACUACU CTST	44	AUGAGCAGUUAAGUAG TGT	AL-DP-6247
383-405	1266	GUACGUAGGUUGUUGUG UCCAA	45	ACGGAGAGGUUGUUGUG CTST	46	GUACGUAGGUUGUUGUG TGT	AL-DP-6248
200-222	1267	GUUGGUUGUGAAGGUAG ACCUA	47	GUUGGUUGUGAAGGUAG CTTG?	48	GUUCGUAGGUUGUUGUG TGT	AL-DP-6249

【0224】

表1b. Eg5/KSPのds二重鎖の分析

10

20

30

40

【表1-2】

二重鎖名	[残存 mRNA の%]	25 nM で の単回用 量スクリ ーニング 第2のスクリーニ ングの標準偏差 (4回の繰り返し 中)	10
AL-DP-6226	23%	3%	
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%	
AL-DP-6235	112%	4%	
AL-DP-6236	69%	4%	
AL-DP-6237	42%	2%	
AL-DP-6238	45%	2%	
AL-DP-6239	2%	1%	30
AL-DP-6240	48%	2%	
AL-DP-6241	41%	2%	
AL-DP-6242	8%	2%	
AL-DP-6243	7%	1%	
AL-DP-6244	6%	2%	
AL-DP-6245	12%	2%	
AL-DP-6246	28%	3%	
AL-DP-6247	71%	4%	40
AL-DP-6248	5%	2%	
AL-DP-6249	28%	3%	

【0225】

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 個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
168	CNUACUCUAGUCGUUCGCCA	49	CANACUCUAGUCGUUCGCCA	59	GGGGAACGACUAGAGAUAT	AD-12072
169	AGCCGCGCUUCAAAAGGAG	51	AGCAGCGCUUCAAAAGGAG	62	CACLAUUGAUAGGGGCT	AD-12073
170	GGAAAGGCUUCCGCGAAC	53	GGAAAGGCUUCCGCGAAC	64	GAAGKICGCGCUUCCGCGAAC	AD-12074
171	GAARGCUUCCGCGAAC	55	GAARGCUUCCGCGAAC	66	UGAAUUGGCGCGCUUCCGCGAAC	AD-12075
172	ACAAACUACGAGUAGGGA	57	ACAAACUACGAGUAGGGA	68	ACGAGUUCGAGUAGGGA	AD-12076
173	UGURGGCDUUCGAGAAUCC	59	uGucGucAAuGcGAAUCC	70	ACGAGUUCGAGUAGGGA	AD-12077
174	CGAAUCACUCCGCGAGGC	61	CGAAUCACUCCGCGAGGC	72	GGGCGCAGAGGGAACUCCG	AD-12078
175	GCGGCGAGTAAAGUAGGAA	63	GCGGCGAGTAAAGUAGGAA	74	UGGAGAUAGGAAACGCGGT	AD-12079
176	UGGCGACGUUUCGUUGGUU	65	UGGCGACGUUUCGUUGGUU	76	AAAGGGAAGGUAGGCAAT	AD-12080
177	CAAGGCGGAAAGUAGGGA	67	CAAGGCGGAAAGUAGGGA	78	GGCGGAGGUUCGUUGGUU	AD-12081
178	AGACCCUUUUCGUUAAUCC	69	AGACCCUUUUCGUUAAUCC	80	ACGAAACAAKAAAAGGUC	AD-12082
179	AUUCUUCUUGGAGGCGGUAC	71	AUUCUUCUUGGAGGCGGUAC	82	GUACGUCCCGAAAGGAAU	AD-12083
180	GGGUGGUAGUAAUCCACGG	73	GGGUGGUAGUAAUCCACGG	84	ACGUUAGGUAAUCCACGG	AD-12084
181	GGGGAAACGCGACCGCCAA	75	GGGGAAACGCGACCGCCAA	86	UGGGGGGUAAGGUUCGCT	AD-12085
182	UGCACAUUCGUUGGCGGAU	77	UGCACAUUCGUUGGCGGAU	88	GUACGCGAAAGGAAUCCG	AD-12086
183	GUUAAUUCGUUCGUACCG	79	GUUAAUUCGUUCGUACCG	90	ACGAGCGCGAAUCCG	AD-12087
184	ACGAACTAAACGUACUAGA	91	ACGAACTAAACGUACUAGA	92	UGAGUUCGUUCGUUCG	AD-12088
185	AGGAAUCUGAAUUGGCGTAC	93	AGGAAUCUGAAUUGGCGTAC	94	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12089
186	GAAGUACAUAGGACCUUZ	95	GAAGUACAUAGGACCUUZ	96	AAUAGGUUCGUUGGUUC	AD-12090
187	GGAGTGCGCGAUAGAGAA	97	GGAGTGCGCGAUAGAGAA	98	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12091
188	AAACCACTTAUAGGUUGGC	99	AAACCACTTAUAGGUUGGC	100	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12092
189	UCCGUAGCUUCCGUUCCU	101	UCCGUAGCUUCCGUUCCU	102	AAUAGGUUCGUUCG	AD-12093
190	UAGAGUUCGUUCGUUCGUU	103	UAGAGUUCGUUCGUUCGUU	104	AGCGAAUUCGUUCGUUCGUU	AD-12094
191	GUUCGGCGAGCAAUUCGUU	105	GUUCGGCGAGCAAUUCGUU	105	ACGAAUUCGUUCGUUCGUU	AD-12095
192	AGGUAGGCGGUUCGUUCGUU	107	AGGUAGGCGGUUCGUUCGUU	106	AAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	AD-12096
193	GAACUACGUAGUAGGAGA	109	GAACUACGUAGUAGGAGA	109	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12097
194	CCGAAUAAUAAUAGAACAGA	111	CCGAAUAAUAAUAGAACAGA	113	UCAUZUUCAUCCUURUGG	AD-12098
195	UACGCGGUUCGUACGUACG	113	UACGCGGUUCGUACGUACG	114	UACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	AD-12099
196	UUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	115	UUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	116	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12100
197	CGGUAGCCGUUCGUACGUU	117	CGGUAGCCGUUCGUACGUU	118	AUHGUAGUAAAGGUCGUUCGUU	AD-12101
198	UUCUUGGUUCGUUCGUACG	119	UUCUUGGUUCGUUCGUACG	119	GUUUDGCACACCGCAAAGAT	AD-12102
199	CCGAGUUCGUUCGUUCGUU	121	CCGAGUUCGUUCGUUCGUU	122	UGGAGAAACAAAGACGUUCGUU	AD-12103
200	AGAUUAGGAGUUCGUUCGUU	123	AGAUUAGGAGUUCGUUCGUU	124	GUCCGUACGUACGUACGUU	AD-12104
201	GUUAGCGCCGUUCGUUCGUU	125	GUUAGCGCCGUUCGUUCGUU	125	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12105
202	AACUUCGUUCGUUCGUUCGUU	127	AACUUCGUUCGUUCGUUCGUU	127	CCAUUUCGUACGUACGUU	AD-12106
203	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	129	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	129	UCAUUCGUACGUACGUU	AD-12107
204	ACGACGUUCGUUCGUUCGUU	131	ACGACGUUCGUUCGUUCGUU	132	AGCAGGUUCGUUCGUUCGUU	AD-12108
205	AGAUUAGGAGUUCGUUCGUU	133	AGAUUAGGAGUUCGUUCGUU	134	GUCCGUACGUACGUACGUU	AD-12109
206	UAGGGGUUCGUUCGUUCGUU	135	UAGGGGUUCGUUCGUUCGUU	135	AGUGUACGUACGUACGUU	AD-12110
207	AUUCUUCGUUCGUUCGUU	137	AUUCUUCGUUCGUUCGUU	137	UUGGGGUUCGUUCGUUCGUU	AD-12111
208	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	139	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	139	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12112
209	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	141	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	142	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12113
210	ACGAGGUUCGUUCGUUCGUU	143	ACGAGGUUCGUUCGUUCGUU	144	UUGGGGUUCGUUCGUUCGUU	AD-12114
211	UCAUUCGUUCGUUCGUUCGUU	145	UCAUUCGUUCGUUCGUUCGUU	145	GUCCGUACGUACGUACGUU	AD-12115
212	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	147	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	146	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12116
213	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	149	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	149	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12117
214	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	151	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	152	AUHAGGUUCGUACGUACGUU	AD-12118
215	UCCGAGGUUCGUUCGUUCGUU	153	UCCGAGGUUCGUUCGUUCGUU	154	GUCCGUACGUACGUACGUU	AD-12119
216	UUAUUCGUUCGUUCGUUCGUU	155	UUAUUCGUUCGUUCGUUCGUU	156	UGGUUAGGUUCGUUCGUU	AD-12120
217	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	157	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	158	ACGUACGUACGUACGUU	AD-12121
218	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	159	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	159	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12122
219	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	161	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	162	AUHAGGUUCGUACGUACGUU	AD-12123
220	ACGAGGUUCGUUCGUUCGUU	163	ACGAGGUUCGUUCGUUCGUU	164	GUCCGUACGUACGUACGUU	AD-12124
221	ACAUACGUUCGUUCGUUCGUU	165	ACAUACGUUCGUUCGUUCGUU	166	AAUUCGUUCGUUCGUUCGUU	AD-12125
222	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	167	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	168	ACGUACGUACGUACGUU	AD-12126
223	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	169	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	169	ACGUACGUACGUACGUU	AD-12127
224	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	171	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	170	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12128
225	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	173	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	174	AUHAGGUUCGUACGUACGUU	AD-12129
226	ACAUACGUUCGUUCGUUCGUU	175	ACAUACGUUCGUUCGUUCGUU	176	GUCCGUACGUACGUACGUU	AD-12130
227	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	177	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	178	AAUUCGUUCGUUCGUUCGUU	AD-12131
228	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	179	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	179	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12132
229	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	181	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	180	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12133
230	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	183	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	184	ACGUACGUACGUACGUU	AD-12134
231	ACAUACGUUCGUUCGUUCGUU	185	ACAUACGUUCGUUCGUUCGUU	185	GUCCGUACGUACGUACGUU	AD-12135
232	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	187	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	188	AAUUCGUUCGUUCGUUCGUU	AD-12136
233	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	189	ACAUAGGUUCGUUCGUUCGUU	189	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12137
234	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	191	GUUCGGCGAGGUUCGUUCGUU	192	GUACGUCCCGAAAGGUC	AD-12138
235	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	193	ACGUUCGUUCGUUCGUUCGUU	194	ACGUACGUACGUACGUU	AD-12139
236	ACAUACGUUCGUUCGUUCGUU	195	ACAUACGUUCGUUCGUUCGUU	196	GUCCGUACGUACGUACGUU	AD-12140
237	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	197	GUUAGGUUCGUUCGUUCGUU	198	AAUUCGUUCGUUCGUUCGUU	AD-12141

【表2-2】

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
138	AAACURCGAUUGAUGGAGA	189	AAA <u>gu</u> AccGauu <u>ca</u> uGGAGAT <u>t</u>	190	U <u>GU</u> GA <u>CA</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>AG</u> u <u>AT</u> <u>T</u>	AD-12142
139	UGG <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> A <u>AG</u> AGA	191	u <u>GG</u> AG <u>G</u> u <u>G</u> u <u>GU</u> A <u>AG</u> AG <u>A</u> T <u>t</u>	192	U <u>CC</u> u <u>GU</u> A <u>u</u> A <u>AC</u> AG <u>GU</u> C <u>U</u> T <u>t</u>	AD-12143
140	CUAACURGA <u>AA</u> CCUC <u>GG</u> G	193	u <u>CA</u> AC <u>u</u> u <u>GU</u> A <u>u</u> u <u>GU</u> C <u>GG</u> T <u>t</u>	194	U <u>CC</u> u <u>GU</u> A <u>u</u> A <u>AC</u> AG <u>GU</u> C <u>U</u> T <u>t</u>	AD-12144
141	CAAA <u>AG</u> GU <u>GU</u> A <u>u</u> u <u>AG</u> GA	195	GU <u>AA</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> A <u>u</u> u <u>AG</u> GA <u>AT</u> <u>T</u>	196	U <u>GG</u> u <u>GU</u> A <u>u</u> A <u>AC</u> AG <u>GU</u> C <u>U</u> T <u>t</u>	AD-12145
142	A <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> A <u>AG</u> GA	197	A <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> A <u>AG</u> GA <u>AT</u> <u>T</u>	198	U <u>GU</u> u <u>GU</u> A <u>u</u> A <u>AC</u> AG <u>GU</u> C <u>U</u> T <u>t</u>	AD-12146
143	AAA <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG	199	AAA <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>AT</u> <u>T</u>	200	U <u>CA</u> AC <u>u</u> u <u>GU</u> A <u>u</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>T</u> <u>t</u>	AD-12147
144	GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u>	201	GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> T <u>t</u>	202	u <u>AA</u> CC <u>CH</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> GG <u>GG</u> T <u>t</u>	AD-12148
145	GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u>	203	GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> T <u>t</u>	204	U <u>GG</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> GG <u>GG</u> T <u>t</u>	AD-12149
146	GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u>	205	GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> GG <u>GG</u> T <u>t</u>	206	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> GG <u>GG</u> T <u>t</u>	AD-12150
147	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG	207	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>AT</u> <u>T</u>	208	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>AT</u> <u>T</u>	AD-12151
148	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG	209	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>AT</u> <u>T</u>	210	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>AT</u> <u>T</u>	AD-12152
149	CCAA <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG	211	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>AT</u> <u>T</u>	212	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>T</u> <u>t</u>	AD-12153
150	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG	213	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>AT</u> <u>T</u>	214	u <u>AA</u> CC <u>CH</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>T</u> <u>t</u>	AD-12154
151	ACC <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> GC	215	ACC <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	216	GG <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AG <u>T</u> <u>t</u>	AD-12155
152	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	217	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	218	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12156
153	A <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	219	A <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	220	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12157
154	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	221	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	222	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12158
155	AA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	223	AA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	224	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12159
156	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	225	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	226	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12160
157	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	227	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	228	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12161
158	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	229	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	230	A <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12162
159	GC <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	231	GC <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	232	A <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12163
160	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	233	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	234	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12164
161	AD <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	235	AD <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	236	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12165
162	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	237	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	238	A <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12166
163	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	239	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	240	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12167
164	UC <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	241	UC <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	242	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12168
165	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	243	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	244	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12169
166	CA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	245	CA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	246	AA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12170
167	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	247	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	248	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12171
168	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	249	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	250	GG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12172
169	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	251	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	252	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12173
170	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	253	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	254	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12174
171	UU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	255	UU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	256	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12175
172	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	257	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	258	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12176
173	GG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	259	GG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	260	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12177
174	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	261	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	262	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12178
175	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	263	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	264	AA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12179
176	GC <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	265	GC <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	266	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12180
177	AA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	267	AA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	268	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12181
178	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	269	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	270	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12182
179	C <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	271	C <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	272	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12183
180	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	273	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	274	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12184
181	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	275	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	276	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12185
182	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	277	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	278	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12186
183	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	279	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	280	CC <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12187
184	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	281	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	282	CC <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12188
185	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	283	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	284	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12189
186	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	285	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	286	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12190
187	AA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	287	AA <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	288	U <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12191
188	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	289	UG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	290	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12192
189	GG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	291	GG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	292	C <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12193
190	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	293	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	294	AG <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	AD-12194
191	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AC	295	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u> AT <u>T</u>	296	GU <u>GU</u> u <u>AC</u> u <u>GU</u> u <u>GU</u</u>	

【表2-3】

配列番号	19 塩基の標的部位の配列	配列番号	センス配列	(5' - 3')	配列番号	アンチセンス配列	(5' - 3')	二重鎖名
310	ACAGCCUGACGCGGCUAAAG	353	ACAGCCUGACGCGGCUAAAGT	T	334	CATUARCAACCUCAGGGCUCUT	T	AD-12214
311	AAAGGAGAGACRAUTUCCGG	355	TAAGAGAGAGACRAUTUCCGGT	T	336	CGGGAUUCGUUCUUCUUCUUT	T	AD-12215
312	CACACUGGAGACGCGTAA	357	CACACUGGAGACGCGTAAAT	T	328	UUAACACACUGGAGACGCGTAA	T	AD-12216
313	CACUGGAGAGCGCTAAAGUG	359	CACUGGAGAGCGCTAAAGUGT	T	340	ACUUUAAGACCGCGTAAAGUG	T	AD-12217
314	ACUGGAGAGCGCTAAAGUG	341	ACUGGAGAGCGCTAAAGUGT	T	342	CACTUUAGACGCGTAAAGUG	T	AD-12218
315	CGUCCAGCGCAAAUUCGUC	343	CGUCCAGCGCAAAUUCGUCT	T	344	GACGAAUUCGUUCGCGACT	T	AD-12219
316	GAAGCGAGUACACAAACAT	345	GAAGCGAGUACACAAACAT	T	346	GGUUCGGGCAACUCCUUCCT	T	AD-12220
317	CAUUCACCCUGACACAGGT	347	CAUUCACCCUGACACAGGT	T	348	AAUCUUGUCAAGGGGGAACAT	T	AD-12221
318	AAAGGCCCACAUCAUCA	349	AAAGGCCCACAUCAUCAAT	T	350	UGAAUGAGUUAAGGCCUCU	T	AD-12222
319	CACCAAUUUCGGAGUCCG	351	CACCAAUUUCGGAGUCCGAT	T	352	CGAACAUCCGAGAUCCGAT	T	AD-12223
320	UUCGCGAUGGUUAGGTTACA	353	UUCGCGAUGGUUAGGTTACA	T	354	UCAACAUUCAACAUCCGAT	T	AD-12224
321	AACCUAGCCGCGCATUCA	355	AACCUAGCCGCGCATUCA	T	356	AUUCAAUUCGGGCGUACGTT	T	AD-12225
322	GAACUUAGCUACUACUACG	357	GAACUUAGCUACUACUACG	T	358	CGAGUUCUAcACUACUACG	T	AD-12226
323	UUAUAUUCCACGUACGUG	359	UUAUAUUCCACGUACGUGT	T	360	AGGGAAUCCGGGAAUACGAT	T	AD-12227
324	ACAGUGGCCAGUAGAGUAG	361	ACAGUGGCCAGUAGAGUAGT	T	362	CHACUCAUCCGACACUACG	T	AD-12228
325	UCCUGCAUCCUUAAGUAGC	363	UCCUGCAUCCUUAAGUAGC	T	364	CAACUACGUACGUACAGAT	T	AD-12229
326	UUCUUGGUUAGACUUGUO	365	UUCUUGGUUAGACUUGUO	T	366	ACACRAGUCAAGGAAAGAT	T	AD-12230
327	SUUAAGAGGGAGGUAGGACCA	367	SUUAAGAGGGAGGUAGGACCA	T	368	UGGUUAGUAGGUUAGGUUAC	T	AD-12231
328	CAUUCACAUUCCGCGCAUCA	369	CAUUCACAUUCCGCGCAUCA	T	370	UUCUUCGGUACGUUACGAT	T	AD-12232
329	AGAAACCACTAUAGUAGU	371	AGAAACCACTAUAGUAGU	T	372	ACACUACAUAGGCGUUCU	T	AD-12233
330	GGAUUQUUCAUCAAUURGC	373	GGAUUQUUCAUCAAUURGC	T	374	GGGAUUAAGUAGGAGACAU	T	AD-12234
331	UAAGGAGGCAUACUCAUUC	375	UAAGGAGGCAUACUCAUUC	T	376	CAUUGACUUAAGGCUUCA	T	AD-12235
332	AGUUNGDDUACAUACUUGG	377	AGUUNGDDUACAUACUUGG	T	378	UCCAUUQUUCAUCAUACU	T	AD-12236
333	AUUACLUACAUACUUVAUU	379	AUUACLUACAUACUUVAUU	T	380	MAUAAUUGAUUAGUAGAT	T	AD-12237
334	UAGAGCUCUUGUATAGAUU	381	UAGAGCUCUUGUATAGAUU	T	382	AUUCUAAUCAACGGCUUAC	T	AD-12238
335	CCUUUAAGGUCCUAAACG	383	CCUUUAAGGUCCUAAACG	T	384	GAUUGACCCUUCUUAAGG	T	AD-12239
336	ACCACUACGUAGGUUCCAG	385	ACCACUACGUAGGUUCCAG	T	386	CCGGGACGUACGUACGUU	T	AD-12240
337	GAACACUUCACAUUAUUCU	387	GAACACUUCACAUUAUUCU	T	388	AGACAUUACGUACGUUAC	T	AD-12241
338	UCCAUACUUCACGUUCUCC	389	UCCAUACUUCACGUUCUCC	T	390	GGACGGACAGAGUUAAGG	T	AD-12242
339	AGRAAGGCAUGUACAAAC	391	AGRAAGGCAUGUACAAAC	T	392	UGUUGGUACACUCCUCU	T	AD-12243
340	GUACAUAAACGUCCUUNJG	393	GUACAUAAACGUCCUUNJG	T	394	GAAGAAACGUUCAUAGUAC	T	AD-12244
341	UAUUAUUCCGUUUCUUUCG	395	UAUUAUUCCGUUUCUUUCG	T	396	CAAGACGUACGUACGUUAC	T	AD-12245
342	UCCUCGUUACAUACUACU	397	UCCUCGUUACAUACUACU	T	398	AAUAGUAGUAGUAGUAGAT	T	AD-12246
343	UAUUCGUCUACGUACUAC	399	UAUUCGUCUACGUACUAC	T	400	UCCUUCGUUACAUACUAC	T	AD-12247
344	UGUUGGUUCCUACGUACU	401	UGUUGGUUCCUACGUACU	T	401	AGAAUUUGAGAAAACAC	T	AD-12248
345	ACUACUACGUACGUACU	403	ACUACUACGUACGUACU	T	404	CGUAGACGUACGUACGUAC	T	AD-12249
346	UCCUGGUUCAUACUUCGAA	405	UCCUGGUUCAUACUUCGAA	T	406	UUCUAGGUACGUACGUAC	T	AD-12250
347	UAUUAUUGGAGACGUACCC	407	UAUUAUUGGAGACGUACCC	T	408	UGGUUCGUUCCUACGUUAC	T	AD-12251
348	AAGGAUAGGUACUACUAA	409	AAGGAUAGGUACUACUAA	T	410	GUUGACAGACUUAACGUU	T	AD-12252
349	UUUAAUAGGUAGUUCUGG	411	UUUAAUAGGUAGUUCUGG	T	412	UCCGGACGUUCCUACGUAC	T	AD-12253
350	AGUUCUCCUACGUACGUAC	413	AGUUCUCCUACGUACGUAC	T	414	GAUUCUACGUACGUACGUAC	T	AD-12254
351	CGAAUAAUCCUACGUAC	415	CGAAUAAUCCUACGUAC	T	416	UCCUCLACGUACGUACGUAC	T	AD-12255
352	CAUUCACAAACGUACGUAC	417	CAUUCACAAACGUACGUAC	T	418	ACGAUACGUACGUACGUAC	T	AD-12256
353	GGCAGUUCACGUACGUAC	419	GGCAGUUCACGUACGUAC	T	420	AUUGGUUGGUACGUACGUAC	T	AD-12257
354	CAUCUACGUACGUACUAC	421	CAUCUACGUACGUACUAC	T	422	CUAUUACGUACGUACGUAC	T	AD-12258
355	GUAGGUACGUACGUACGU	423	GUAGGUACGUACGUACGU	T	424	ACGUUCUACGUACGUACGU	T	AD-12259
356	UCCGUACGUACGUACGU	425	UCCGUACGUACGUACGU	T	426	AUACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12260
357	AAUCUACGUACGUACGU	427	AAUCUACGUACGUACGU	T	428	CAACUACGUACGUACGUAC	T	AD-12261
358	UCCAUACGUACGUACGU	429	UCCAUACGUACGUACGU	T	430	GUACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12262
359	ADAAAGGACACCUACGUAC	431	ADAAAGGACACCUACGUAC	T	432	GGUAGGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12263
360	ACAGAAACGUACGUACGU	433	ACAGAAACGUACGUACGU	T	434	ACUCAUACGUACGUACGUAC	T	AD-12264
361	GUAGGUACGUACGUACGU	435	GUAGGUACGUACGUACGU	T	436	GGACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12265
362	AAACUACGUACGUACGU	437	AAACUACGUACGUACGU	T	438	UGACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12266
363	UCCUACGUACGUACGUAC	439	UCCUACGUACGUACGUAC	T	440	UGGUAGGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12267
364	AUCAGGUACGUACGUACGU	441	AUCAGGUACGUACGUACGU	T	442	AGUGGUUUAACGUACGUACGUAC	T	AD-12268
365	ACACACUACGUACGUACU	443	ACACACUACGUACGUACU	T	444	UAGACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12269
366	ACACTGAGGUACGUACGU	445	ACACTGAGGUACGUACGU	T	446	GUUAGGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12270
367	CGAGCCACGUACGUACGU	447	CGAGCCACGUACGUACGU	T	448	AAACGUACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12271
368	UCCGUACGUACGUACGUAC	449	UCCGUACGUACGUACGUAC	T	450	GGAGAAACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12272
369	UCCAUACGUACGUACGUAC	451	UCCAUACGUACGUACGUAC	T	452	UGUUGACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12273
370	ACCCAUACGUACGUACGU	453	ACCCAUACGUACGUACGU	T	454	UUCGACACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12274
371	CCAUUACGUACGUACGUAC	455	CCAUUACGUACGUACGUAC	T	456	GUUUCACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12275
372	GAUAGGUACGUACGUACGU	457	GAUAGGUACGUACGUACGU	T	458	AUAGAGGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12276
373	CUCAGGUACGUACGUACGU	459	CUCAGGUACGUACGUACGU	T	460	UCUCGUACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12277
374	GAGAAUCGUACGUACGUAC	461	GAGAAUCGUACGUACGUAC	T	462	GUAGGUACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12278
375	UAGAGGUACGUACGUACGU	463	UAGAGGUACGUACGUACGU	T	464	AAUGGUUUAACGUACGUACGUAC	T	AD-12279
376	CACCCUGACGUACGUACGU	465	CACCCUGACGUACGUACGU	T	466	UCAUUAACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12280
377	AAAGAAGACAAUUCGUACGU	467	AAAGAAGACAAUUCGUACGU	T	468	UCCGUACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12281
378	UCCUGGUACGUACGUACGU	469	UCCUGGUACGUACGUACGU	T	470	UGAAACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12282
379	AAAUUCGUACGUACGUACGU	471	AAAUUCGUACGUACGUACGU	T	472	GUUCGUACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12283
380	UUCUGGUACGUACGUACGU	473	UUCUGGUACGUACGUACGU	T	474	AGACGUACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12284
381	UACUAAACAGAUUAGGUACGU	475	UACUAAACAGAUUAGGUACGU	T	476	AAACGUACGUACGUACGUACGUAC	T	AD-12285

10

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	(5'~3')	二重鎖名
182	GAUUGAUGGUUUAACGGAAAU	477	GATUGAGGttttttttttttttttt	478	ACUUCCGGAAAGAAACAUUUC	AD-12286		
183	GCACUAUCUUUCCGUUUG	479	GCAuuAuAuuAuGGuAuGGT	480	CCACACCCAAAGAAAGUGU	AD-12287		
184	UGCUAUAAUUDCAAGUACC	481	uGGuAuAuuAuGGuAUUCC	482	GGUACGUUCAAGUuAUAC	AD-12288		
185	ACCAAGCUGGUUUAACACAG	483	ACGAAAGGttttttttttttttt	484	CGUGUUAAGGAGGttttttttt	AD-12289		
186	CAGAACGCCAUUACGUACG	485	CGAAACCAACttttttttttttt	486	CAUCACUACUUGGUUUC	AD-12290		
187	AACUUAUUSCGGUUUA	487	AACUUAUUGGAGGUUUA	488	UAAAACCUUCAAAAGU	AD-12291		
188	CGUGAGAGGUUAAAGGGG	489	CGUGAGGttttttttttttttt	490	CCACUUCAGCCUCCUCA	AD-12292		
189	AAAAGAGAAUABGGCAAC	491	AAAAGAGAAUACGGttttttt	492	AUUGGCUUAAUUCUUUC	AD-12293		
190	CAJUUUUGAUAAUCCACCA	493	GAUuUuUuAUuAUuAUuAUu	494	USSGUAGAGGAAAUUUC	AD-12294		
191	GUADUUTUUCGUUCCAAAT	495	GtAuAuAuGGuGttttttttt	496	GUACACAGUAAACAAAGG	AD-12295		
192	AGGAUCCUUCGUUCCGUUA	497	AGGAAUCCUUCGUUCCG	498	AACACAGGAGGGAUCC	AD-12296		
193	GGAACTTCGGGUUCAATA	499	GGAAcccccGGGccccGATA	500	UAAACCCACAAAGGGAAU	AD-12297		
194	CAAUAGUAGAUAGUGGUCC	501	CAuAUAGAAUAGUGAU	502	CGAUCAACAUUCAUUC	AD-12298		
195	GUUARAUUACAUUACUUC	503	GGUAAAUUAGGAGGAGG	504	AAAGAGUUCGAAUUAAC	AD-12299		
196	UACCCUCAUCAAUAAUUC	505	UACCCUCAUCAAUAAUUC	506	AAAUAUUTGAAUAGGGAU	AD-12300		
197	AGAAUUAUUGGUAAAGGCG	507	AGAAUUAUUGGUAAAGGCG	508	CGUGUUAAGAAAGGUUUC	AD-12301		
198	AAAUGGUGGUUUGUAGGGA	509	AAAUGGUGGUUUGUAGGGA	510	UCCUACAGGACCAAUUUC	AD-12302		
199	UGAAAGGUGUUAACAGAUU	511	UUGAAAGGUGUUAACAGAUU	512	AACUCUUAACCCUUAUUC	AD-12303		
200	AGAGCUGGUUACACACUA	513	AGAGCUGGUUACACACUA	514	UGACGUGUUCGGGUUUC	AD-12304		
201	AAUAAAACGAGACCCAUUC	515	AAuAAAACGAGACCCAUUC	516	GGAGGGGUGUUCGGGUUUC	AD-12305		
202	AUACCCAUUACACACUGGU	517	AUACCCAUUACACACUGGU	518	UACGACUUCGUUUCGGGUU	AD-12306		
203	UGGUUGGUCAUCACGUU	519	UGGUUGGUCAUCACGUU	520	CCANNUGAUGAAAUUC	AD-12307		
204	UGGAGACGUUCAAAUGGGA	521	UGGAGACGUUCAAAUGGGA	522	UCCACUUAGACCCUCC	AD-12308		
205	GUCAUCCUUCGUUUCACU	523	GUCAUCCUUCGUUUCACU	524	ATGGAAUUAAGGGAUUC	AD-12309		
206	AUAAUOGGUUAAUAUUUC	525	AUAAUOGGUUAAUAUUUC	526	GAGAAAUUAAGGGAUUC	AD-12310		
207	AUCCCUUUCGUUUCGUUAA	527	AUCCCUUUCGUUUCGUUAA	528	AUuAUACAGGGAAGGK	AD-12311		
208	GGGTTTAAUAAUCCUUC	529	GGGTTTAAUAAUCCUUC	530	GUAGGUUCAUUAACCC	AD-12312		
209	GAUUCUCUUCGAGBGGUA	531	GAUUCUCUUCGAGBGGUA	532	UACGCCCUUCAAGGAAU	AD-12313		
210	CCACUUCUCAAAUCUDAGG	533	CCACUUCUCAAAUCUDAGG	534	CCUCAAUUUCGGGUUUC	AD-12314		
211	CAGCAGAAACUUAAGGAA	535	CAGCAGAAACUUAAGGAA	536	UACCCUUAAGAUUUC	AD-12315		
212	GUCAAGACGUUACUGUGUA	537	GUCAAGACGUUACUGUGUA	538	UCAACAUUACGGGUUUC	AD-12316		
213	AAACAGAGGUUAAUACAC	539	AAACAGAGGUUAAUACAC	540	UUGGGAAAGGCGUUC	AD-12317		
214	AGCCCCAGAUCAACCUUAA	541	AGCCCCAGAUCAACCUUAA	542	UUAAGGUUCAUUCGGGUU	AD-12318		
215	UAIUUUUAGGUUACGGGAA	543	UAIUUUUAGGUUACGGGAA	544	GGUUGCAGAUUAAAAT	AD-12319		
216	UGGUUGGUCAUCACUUA	545	UGGUUGGUCAUCACUUA	546	UAGUAGGUUCAACCAT	AD-12320		
217	GAUUUUACGUUACUACAA	547	GAUUUUACGUUACUACAA	548	UGUGUGUAGACTGAAUUC	AD-12321		
218	ACUUGACAGGUUAAAUCU	549	ACUUGACAGGUUAAAUCU	550	AAUUUAACAGGUUAAUUC	AD-12322		
219	ACCAUGGUUAAUUCUGGUU	551	ACCAUGGUUAAUUCUGGUU	552	AGGUUAGAUUUAACGIC	AD-12323		
220	AGACAAUUCUUAACGGGA	553	AGACAAUUCUUAACGGGA	554	UGCGGUUAAUAGGUUUC	AD-12324		
221	CAUUGGUUAAACCUUACU	555	CAUUGGUUAAACCUUACU	556	CAUGUAGGUUCCACAUUC	AD-12325		
222	ACCCAGAGGUUACAAAUC	557	ACCCAGAGGUUACAAAUC	558	AAUUUAACGUUUC	AD-12326		
223	GGUCAAAAUUUGGUUUGAG	559	GGUCAAAAUUUGGUUUGAG	560	GUUACACCAAAUUUC	AD-12327		
224	GGUGGGGAGGUUUCACCAA	561	GGUGGGGAGGUUUCACCAA	562	UGGUUGGUAAUCCAC	AD-12328		
225	ACAGGUUCAAAUACGGGCA	563	ACAGGUUCAAAUACGGGCA	564	UCCGCUUUUUGGUUACUCU	AD-12329		
226	UGAUAGGUUAAUUAACCA	565	UGAUAGGUUAAUUAACCA	566	UGGUUUAUUAACGUUAC	AD-12330		
227	AAUAAGCCUUAAGGAAUC	567	AAUAAGCCUUAAGGAAUC	568	GAUUAACGUUACGCAUUC	AD-12331		
228	CAUUGGUUACACUAAUUC	569	CAUUGGUUACACUAAUUC	570	GGAUUGGUUUCGUUAC	AD-12332		
229	UGGUUGGUUACGUUACUCA	571	UGGUUGGUUACGUUACUCA	572	UGAUAGGUUAAUCCAC	AD-12333		
230	AGUCACGUUACAGAGGUU	573	AGUCACGUUACAGAGGUU	574	GAACGUUAGGUUACGUUAC	AD-12334		
231	UAAACCCUURUUCGGUAAU	575	UAAACCCUURUUCGGUAAU	576	AUACAAUAAUAGGUUAC	AD-12335		
232	AAAGCAUUGGUUAAACCUA	577	AAAGCAUUGGUUAAACCUA	578	UAGGUUUCACGUUAC	AD-12336		
233	UCUAAAACGUUCAUUC	579	UCUAAAACGUUCAUUC	579	GGGAAUACGUUAC	AD-12337		

【0226】

表2b. Eg5/KSPのdsRNA二重鎖の分析

10

20

30

【表2-5】

Eq5 / KSP 二重 鎖名	50 nMでの第1の 單回用量スクリー 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 單回用量スクリー 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の單回用量 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	4.7%	1.8%	1.8%	1.8%		
AD-12073	2.6%	1.0%	2.3%	1.6%		
AD-12074	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12075	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12076	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12077	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12078	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12079	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%		
AD-12080	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12081	1.5%	0.6%	1.5%	2.2%		
AD-12082	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12083	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12084	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12085	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12086	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12087	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12088	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12089	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12090	4.4%	1.5%	4.4%	1.5%		
AD-12091	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12092	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12093	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12094	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12095	1.5%	0.6%	1.5%	1.5%		
AD-12096	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%		
AD-12097	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12098	4.5%	1.5%	4.5%	1.5%		
AD-12099	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12100	7.6%	2.5%	7.6%	2.5%		
AD-12101	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12102	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%		
AD-12103	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12104	4.5%	1.5%	4.5%	2.0%		
AD-12105	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12106	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12107	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12108	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12109	4.9%	1.5%	4.9%	1.5%		
AD-12110	8.5%	2.5%	8.5%	1.5%		
AD-12111	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12112	4.5%	1.5%	4.5%	1.5%		
AD-12113	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12114	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12115	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12116	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12117	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12118	4.5%	1.5%	4.5%	1.5%		
AD-12119	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12120	2.5%	1.0%	2.5%	1.5%		
AD-12121	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12122	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12123	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12124	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12125	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12126	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12127	5.4%	1.5%	4.5%	2.0%		
AD-12128	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12129	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12130	5.5%	1.5%	6.0%	2.0%		
AD-12131	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12132	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12133	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12134	2.5%	1.0%	2.5%	2.0%		
AD-12135	5.5%	1.5%	5.5%	2.0%		

10

20

30

40

【表2-6】

EqS / KSP 二重 鎖名	50 nM での第1の 単回用最スクリー 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 単回用最スクリー 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 の単回用最 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	1.9%	1.8%	3.8%	3.8%		
AD-12203	1.7%	1.6%	3.3%	3.3%		
AD-12204	1.6%	1.5%	3.8%	3.8%		
AD-12205	1.6%	1.5%	4.4%	4.4%		
AD-12206	1.6%	1.5%	3.2%	3.2%		
AD-12207	1.7%	1.6%	3.0%	3.0%		
AD-12208	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12209	1.0%	0.9%	1.0%	1.0%		
AD-12210	1.5%	1.4%	3.4%	3.4%		
AD-12211	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12212	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12213	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12214	1.7%	1.6%	3.0%	3.0%		
AD-12215	1.9%	1.8%	3.0%	3.0%		
AD-12216	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12217	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12218	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12219	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12220	1.7%	1.6%	3.0%	3.0%		
AD-12221	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12222	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12223	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12224	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12225	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12226	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12227	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12228	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12229	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12230	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12231	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12232	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12233	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12234	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12235	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12236	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12237	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12238	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12239	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12240	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12241	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12242	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12243	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12244	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12245	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12246	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12247	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12248	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12249	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12250	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12251	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12252	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12253	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12254	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12255	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12256	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12257	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12258	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12259	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12260	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12261	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12262	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12263	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12264	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12265	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12266	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		
AD-12267	1.6%	1.5%	3.0%	3.0%		

10

20

30

40

【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	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12137	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12138	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12139	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12140	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12141	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12142	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12143	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12144	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12145	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12146	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12147	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12148	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12149	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12150	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12151	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12152	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12153	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12154	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12155	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12156	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12157	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12158	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12159	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12160	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12161	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12162	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12163	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12164	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12165	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12166	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12167	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12168	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12169	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12170	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12171	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12172	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12173	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12174	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12175	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12176	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12177	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12178	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12179	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12180	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12181	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12182	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12183	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12184	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12185	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12186	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12187	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12188	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12189	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12190	85%	7%	85%	7%	85%	7%
AD-12191	20%	2%	20%	2%	20%	2%
AD-12192	21%	2%	21%	2%	21%	2%
AD-12193	64%	6%	64%	6%	64%	6%
AD-12194	7%	1%	7%	1%	7%	1%
AD-12195	34%	3%	34%	3%	34%	3%
AD-12196	34%	3%	34%	3%	34%	3%
AD-12197	75%	5%	75%	5%	75%	5%
AD-12198	66%	6%	66%	6%	66%	6%
AD-12199	103%	6%	103%	6%	103%	6%
AD-12200	7%	1%	6%	1%	7%	1%
AD-12201	42%	5%	38%	4%	44%	4%

10

20

30

40

【表2-8】

EqS / 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	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12269	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12270	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12271	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12272	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12273	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12274	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12275	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12276	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12277	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12278	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12279	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12280	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12281	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12282	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12283	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12284	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12285	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12286	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12287	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12288	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12289	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12290	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12291	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12292	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12293	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12294	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12295	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12296	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12297	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12298	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12299	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12300	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12301	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12302	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12303	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12304	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12305	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12306	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12307	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12308	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12309	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12310	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12311	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12312	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12313	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12314	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12315	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12316	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12317	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12318	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12319	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12320	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12321	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12322	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12323	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12324	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12325	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12326	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12327	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12328	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12329	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12330	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12331	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12332	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%
AD-12333	53%	±2%	53%	±2%	51%	±2%

10

20

30

40

【表2-9】

EqS / 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%	3%	11%	5%		
AD-12335	86%	6%	81%	5%		
AD-12336	51%	4%	36%	3%		
AD-12337	30%	7%	11%	3%		

【0227】

10

表3. Eg5 / KSP の dsRNA 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	配列 3')	アンチセンス配列 5')	配列番号	二重鎖名	25 nM での第2のスクリーニングの標準偏差 単回用量スクリーニング [残存 mRNA の %] (4 回の繰り返し中)
CGAUAUACUACAGCUAGGACUTST	583	ACUGCCACUUCUAGUAAUCUTST	583	AD-14085	19%	3%
AUCUUGGCAAGGAAUAAUUCUTST	584	AQAAAATMGGUUGGCCAGUTST	585	AD-14086	38%	3%
GUAGGCUAAAUuAAuAAccAAATST	586	UUGGUUUAUUuAGCAGUTST	587	AD-14087	75%	10%
AGAUAACGAAUAAUACAGUATST	588	UACUGUAGAUAAUUGGAGCUTST	589	AD-14088	22%	8%
GAAcGAAcAAUAAUACAGCTST	590	CUCGACGUAAUAAUACAGCTST	591	AD-14089	70%	12%
GcuuucuccGGGucuAcuUTST	592	AGuGAGSCCGAGGAGAAACUTST	593	AD-14090	79%	11%
GGAGGAuugGcuGAGAGATST	594	UUCGKuAGGcAAUCCUCUTST	595	AD-14091	28%	3%
uAAuGAGAAuAuAcuGGuUTST	596	CcAGGAAuACUUCUcMRAuTST	597	AD-14092	23%	2%
uUuCAcGAAUAcuAuuGUATST	598	UACAAuAAGGUGGUGGAGATST	599	AD-14093	60%	2%
cuaAUuAAGGGuuAGGGuuGGTST	600	CCGUAuACUCCUuAAuAGTST	601	AD-14094	11%	3%
GAAGcAGAGUuGGuXGUuGTST	602	CuAGGUCuACUUGAUuUTST	603	AD-14095	10%	2%
cAGAGuGAGGAAuAGGCGATST	604	UCCGucuRUGUGuAGuCGTST	605	AD-14096	27%	2%
AucaAAccuAAuGuuGuuAcuATST	606	GAGAGAGAGGAGGAGuAcuTST	607	AD-14097	49%	6%
AAcAGGGuuGuuAAuAGGCTST	608	UCCGAGUuACAGCUCUTST	609	AD-14098	50%	10%
uAAAGAGuAGGAGGAGGATST	610	UCCGUCCuAGAGCUCUTST	611	AD-14099	33%	4%
uUGCAAUuGuAAuAcuGuuTST	612	AuAGGAAuUAGAGUuGGATST	613	AD-14100	49%	7%
uGGAGGcAGGGuuAGGGuuGTST	614	GGAGAGAACAGGGGUuAGATST	615	AD-14101	36%	1%
cAUuAUuGuuGuuGuuGuuATST	616	uAGGAGAGAGAGAGuAcuTST	617	AD-14102	49%	3%
GAuGcAGGGuuAGGGuuGTST	618	GUAGGUuUAGCAGCUCUTST	619	AD-14103	74%	6%
uCCcAAcAGGcAAcAcAcGTST	620	GGGGGUuACGGGUuGGGATST	621	AD-14104	27%	3%
uGGcAGcGuuAGGGuuAGuTST	622	ACuAAACuGAuCGUGRoATST	623	AD-14105	34%	4%
AGAGUuGGuuAAuAGGGuuGTST	624	UCCGATuUuAAcAGuCuUTST	625	AD-14106	9%	2%
GGuAGcAGGGuuAGGGuuGTST	626	uAGAGAGuACuGGuAGGATST	627	AD-14107	5%	1%
GAuGcAGGGuuAGGGuuGTST	628	AAcAGUuGGGuuAAcAGuTST	629	AD-14108	15%	1%
AAcAGGGuuAGGGuuGTST	630	UUGGGGGGUuACGGGuuGGTST	631	AD-14109	31%	2%
AAcGAGGGuuAGGGuuGTST	632	GAGGGuuAAcAGuAGTST	633	AD-14110	66%	5%
GuAUAGGGuuAGGGuuGTST	634	uAGuAGGGuuACuGGGuuGTST	635	AD-14111	33%	3%
AAcGGGuuAGGGuuGTST	636	uAGGuuAGuACuGGGuuGTST	637	AD-14112	51%	3%
uGAuGGuuAGGGuuGTST	638	UUCUuUuGGGuuAGGGuAGTST	639	AD-14113	22%	3%
AAAAGAuuGGcGuuGGTST	640	CcAGAACGGCcAAuGUuUTST	641	AD-14114	117%	8%
uGGcAGGGuuAGGGuuGTST	642	UUCUuAGuACuGGGuuGTST	643	AD-14115	50%	8%
GGcGAGGGuuAGGGuuGTST	644	AAcAGAGuACuGGGuuGTST	645	AD-14116	14%	3%
AcuAGAGuACuGGGuuGTST	646	uAGuAGGGuuACuGGGuuGTST	647	AD-14117	12%	4%
uGAuGGuuAGGGuuGTST	648	UCCGGuuACuGGGuuGTST	649	AD-14118	26%	4%
uGAuGGuuAGGGuuGTST	650	UCCGUCCuAAcUCCuUTST	651	AD-14119	24%	5%
AAuAcAAuGuuGuuAAuATST	652	UuAGGUuAGuAAuGuuUTST	653	AD-14120	8%	1%
AAuAcAAuGuuGuuAAuATST	654	CUuAGGUuAGuAAuGuuUTST	655	AD-14121	24%	2%
uGGcAGGGuuAGGGuuGTST	656	uAGcAGAGuACuGGGuuGTST	657	AD-14122	10%	2%
uGGcAGGGuuAGGGuuGTST	658	UuAGuAGGGuuGGGuuGTST	659	AD-14123	8%	1%
uGAuGGuuAGGGuuGTST	660	uGUuAGAGGuuACuGGGuuGTST	661	AD-14124	9%	2%
AGGUuAGuACuGGGuuGTST	662	AAcAGAGuACuGGGuuGTST	663	AD-14125	114%	6%
uGAGAAuAGAGGuuGGGuuGTST	664	AGGUuAGuACuGGGuuGTST	665	AD-14126	9%	1%
AGAAuAGAGGuuGGGuuGTST	666	uAGcAGAGuACuGGGuuGTST	667	AD-14127	50%	6%
uAGcAGAGGuuGGGuuGTST	668	GGGUuACGUuGGGuuGTST	669	AD-14128	104%	6%
GGGUuACGUuGGGuuGTST	670	GGGUuACGUuGGGuuGTST	671	AD-14129	21%	3%
AGGUuAGuACuGGGuuGTST	672	AGAGGUuACGUuGGGuuGTST	673	AD-14130	57%	6%
AGGUuAGuACuGGGuuGTST	674	GGGGGGGGGuuAGuAAuUTST	675	AD-14131	93%	6%
AAuAcAAuGuuGuuAAuATST	676	uAGcAGAGuACuGGGuuGTST	677	AD-14132	75%	8%
uGGcAGGGuuAGGGuuGTST	678	GGGUuACGUuGGGuuGTST	679	AD-14133	65%	6%
uGGcAGGGuuAGGGuuGTST	680	AAAGGGGGAGAGACuAGTST	681	AD-14134	44%	6%
AGGUuAGuACuGGGuuGTST	682	AGGUuAGuACuGGGuuGTST	683	AD-14135	55%	6%
GAAGGUuAGuACuGGGuuGTST	684	uAGGUuAGuACuGGGuuGTST	685	AD-14136	29%	3%
AGAGGUuAGuACuGGGuuGTST	686	GGGGAAAAGAGuACuGGGuuGTST	687	AD-14137	40%	3%
uGGGUuACGUuGGGuuGTST	688	GGGUuACGUuGGGuuGTST	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)
UCGUUACCCGUAGGAGCUTST	690	AGAGUCCUAKGGGUUAGCTT	691	AD-14139	71%	11%
GoucGCAuCAuCAuGuGAT	692	UACUAAUCUACUGGAGCTT	693	AD-14140	43%	15%
GAuAAGGcGAuUGAUuAUACTST	694	GUAUuUCCCAUCGCCUAGCTT	695	AD-14141	33%	6%
AuAAcGAsGGAuAAAAGCTT	696	GUUAuAUCoAUCCGUuUAT	697	AD-14142	51%	14%
CCuAuAAGGcGccucAGT	698	CUGAGGcGAGUuAUuGCTT	699	AD-14143	42%	3%
uCGGAAGGcGAGAcuGuT	700	ACCAACGUuACAUuUCCGAT	701	AD-14144	4%	6%
CAAAcAuAAGGcGuuGuCTT	702	CAGAACGGCAGAUuGUuCTT	703	AD-14145	92%	0%
AAAGAcGAGuGuuGuuGuuT	704	AACuGGAGAGAUuAGuUuCTT	705	AD-14146	13%	2%
GUuGuuGuuAAAAGGAT	706	UUCGGGTTuGuuAcuAGGCTT	707	AD-14147	8%	1%
AChuGGGcGGuuGGAGCTT	708	SCUCCAGAAACGGCAGAUGT	709	AD-14148	80%	7%
AAAGAcAuGuAuAAGuGAT	710	UGcAUuAuGuAGAUuGUuCTT	711	AD-14149	44%	7%
AAAGcGuGuuAcuGuGuT	712	AAGAGGAGAGcAGuAGUuCTT	713	AD-14150	32%	29%
uGuuAcuGuuGuuGuuCTT	714	UGAGAAuACAGAGuAGuUuCTT	715	AD-14151	78%	11%
GUuAUuGUuGUuACAAuGTT	716	AGAUuGGTAuGAGuAGuUuCTT	717	AD-14152	8%	5%
uAuuGuGuuAAuGuuGuuAT	718	uAGAUuGUuAGACAGuAGuUuCTT	719	AD-14153	17%	31%
CUuGuGuuGuuGuuAAuAT	720	UUuCCuGGAGACAGuAGuUuCTT	721	AD-14154	16%	4%
uCCuGuGGAGuAGGAGCTT	722	UUGCCuGuuACGUuAGuUuCTT	723	AD-14155	11%	1%
AGuAAAAGuAGuAGuAGuAT	724	UUGGGcAGuAGuAGuAGuUuCTT	725	AD-14156	1%	1%
CAAGGGGUuACAcuACAT	726	UGUGGGGCGuACCCGUGT	727	AD-14157	2%	5%
uGGuGuGuuAAuGuuGuuAT	728	AAuAGGAAuGuACAGuAGuUuCTT	729	AD-14158	51%	3%
AGuAGAAuGuuGuuAGAT	730	UCCAGAGuAAuAAGuAGuUuCTT	731	AD-14159	53%	5%
GUuAAAuGuuGuuAAuGuuAT	732	UuAAAAGGUuAAuAGuUuGuuCTT	733	AD-14160	40%	3%
AAuAAAguuAAuGuuGuuAT	734	AAuGuAGGGuuAGuAGuUuCTT	735	AD-14161	83%	7%
AAuGuuGuuGuuAcGuuGAT	736	uGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	737	AD-14162	44%	6%
GccuGAGuAGuAGuAGuAT	738	CCAGGAGuAGuAGuAGuUuCTT	739	AD-14163	5%	3%
ActGuuAAAAGAGAGuUuCTT	740	AAGAUuGUuAAuAGuUuGuuCTT	741	AD-14164	4%	1%
ABAGAGAUuAAuGuuGuuAAuAT	742	UuAAAAGGUuAAuAGuUuGuuCTT	743	AD-14165	13%	3%
GAcGuuGuuGGGGuuGACTT	744	CCGGGAGCCuAGuAGuUuCTT	745	AD-14166	20%	5%
AcGuuGuuGuuGuuAGGAGT	746	CCGGGGAGGcAGuAGuUuCTT	747	AD-14167	49%	1%
GuAGuGuuAAuGuuGuuAT	748	GAuGGuuGUuAAuAGuUuGuuCTT	749	AD-14168	12%	2%
uGGAGuGuuAAuGuuGuuAT	750	UuACCuGuuAAuAGuUuGuuCTT	751	AD-14169	66%	4%
ACuAAuGuuGuuGuuAAuAT	752	UuGAGGAGuAAuAGuUuGuuCTT	753	AD-14170	52%	6%
uAGAGAAuGuuGuuAAuAT	754	UuUuAGAGuAAuAGuUuGuuCTT	755	AD-14171	43%	4%
GUACGuuAGuGuuGuuAAuAT	756	UuUuAAACGUuAAuAGuUuGuuCTT	757	AD-14172	3%	1%
AGuACGuuAGuGuuGuuAAuAT	758	AcAAuGGGuuAAuAGuUuGuuCTT	759	AD-14173	2%	2%
uGAGGuuAAuGuuGuuAAuAT	760	UuUuACGUuAAuAGuUuGuuCTT	761	AD-14174	62%	2%
AuGuuGuuAAuGuuGuuAAuAT	762	uAAAGGuuAAuAGuUuGuuCTT	763	AD-14175	53%	3%
uGuGuGuuGuuGuuGuuGuuAT	764	GGAGGAGGGuuAGuUuGuuCTT	765	AD-14176	113%	6%
uAcGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	766	uACuUCCuGGGGGuuGuuGuuCTT	767	AD-14177	87%	6%
AGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	768	CCGGAGGUuACCCGuuGuuCTT	769	AD-14178	52%	2%
AGuAGGGuuAAuAGuUuGuuCTT	770	AAAGGUuGuuAAuAGuUuGuuCTT	771	AD-14179	9%	2%
AGuAcGuuAAAAGAGAGuUuCTT	772	AUCuGGGuuAAuAGuUuGuuCTT	773	AD-14180	43%	2%
AGuGuuGuuAAuGuuGuuGuuAT	774	AGAUuGGGuuAAuAGuUuGuuCTT	775	AD-14181	70%	10%
AGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	776	CCGGGuuAAuGuuGuuGuuGuuCTT	777	AD-14182	100%	7%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	778	uAUuGGGuuAAuAGuUuGuuGuuCTT	779	AD-14183	6%	5%
uAGAGGuuAAuGuuGuuGuuGuuAT	780	GUuAGGUuAAuAGuUuGuuGuuCTT	781	AD-14184	129%	6%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	782	uAAGGGAGGuuAAuAGuUuGuuCTT	783	AD-14185	62%	6%
AccACCCuAGuGuuGuuGuuGuuAT	784	AGuAGAGGuuAAuAGuUuGuuGuuCTT	785	AD-14186	42%	3%
AGuACGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	786	CGAGAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	787	AD-14187	123%	12%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	788	GUuAGGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuCTT	789	AD-14188	38%	2%
uAGAGGuuAAuGuuGuuGuuGuuGuuAT	790	uACuACCCuGuuAAuAGuUuGuuGuuCTT	791	AD-14189	13%	1%
uGuGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	792	AGuGuuAGGGuuAAuAGuUuGuuGuuCTT	793	AD-14190	59%	3%
uGAGAGGuuAAuGuuGuuGuuGuuGuuAT	794	uACuCCuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuCTT	795	AD-14191	93%	3%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	796	CGAGAGAGGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuCTT	797	AD-14192	43%	6%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	798	uGUuACCCuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuCTT	799	AD-14193	57%	3%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	800	GUuAGGGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuCTT	801	AD-14194	51%	4%
uAGAGGuuAAuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	802	uAGuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	803	AD-14195	77%	5%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	804	uAGuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	805	AD-14196	42%	6%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	806	uAGuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	807	AD-14197	15%	2%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	808	AGUCuGGAGGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuCTT	809	AD-14198	12%	2%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	810	uGAGuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	811	AD-14199	18%	2%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	812	uCAuAGGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	813	AD-14200	72%	5%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	814	uAGuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	815	AD-14201	9%	3%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	816	uAGuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	817	AD-14202	25%	3%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	818	uGAGAGAGGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	819	AD-14203	21%	1%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	820	uAGuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	821	AD-14204	4%	2%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	822	uAGuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	823	AD-14205	5%	3%
uAGuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuGuuAT	824	uGUuAGuGuuAAuAGuUuGuuGuuGuuGuuGuuGuuCTT	825	AD-14206	79%	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 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)
AAGAGCAGAuuAaccuuGccTtt	826	CGCAGAGGUuAUUCUGCUUCUtt	827	AD-14207	55%	2%
ACGAGAuuAaccuuGGGAGTTt	828	CCGCGAGGGAAuCDGCGtt	829	AD-14208	100%	4%
CCCGCAcAGGguuAcAAATtt	830	UUUCUGAAuCCUGUuAGCGtt	831	AD-14209	34%	3%
GouuAccGGAGuGuGGuuTtt	832	AAACGACAUUCUGGAAACtt	833	AD-14210	10%	2%
GUuAAGuAGuAcAAcAAGGtt	834	UCCUuGUGuAGuACGUuAATt	835	AD-14211	9%	1%
ACUCAuAAGGAAAGGAGGtt	836	UCCUuGUGuAGuAGGAGGtt	837	AD-14212	20%	3%
CACAGAuuAaccuuGGGAGTTt	838	UCCGAGAGGAAuCUUCUtt	839	AD-14213	48%	5%
AAAGGAAGuAGuAGGAGGtt	840	UCCGAGAGGAAuCUUCUtt	841	AD-14214	28%	10%
GACGAGuAuuAuuUUGGAGGtt	842	UCUUCGAAAGuAAAAGGtt	843	AD-14215	132%	0%
GAGAGGAGGAGuAuuAAATtt	844	UuGAuAUuAUuACUCCUCUtt	845	AD-14216	3%	0%
CCGAGGGuuGGGCGuAAATtt	846	UUGuAGGCGuAUuCCGtt	847	AD-14217	15%	1%
CCuGAuGucGucuGucuGtt	848	UGAGUGGGAAuGGAGAGGtt	849	AD-14218	67%	2%
GAGAccAuuAuuACuAGuAATt	850	GUACuGAGuAAGGGuAUtt	851	AD-14219	76%	4%
uauGucuGccAAuAAGAAATt	852	GUUCuACUUCGAGGAGGtt	853	AD-14220	33%	0%
CAAAAGAGuAGuAGGAGGtt	854	GUuACAGuAACUUCUtt	855	AD-14221	25%	2%
uGuuGuuAuuAccGAGuAATt	856	AAcACuUCGGuAAuACtt	857	AD-14222	7%	2%
uGuuGuuGucGAGuAGGtt	858	AUCTAGANuGAGGAGGtt	859	AD-14223	19%	2%
AUGAGAGGuuAUuAccGGGtt	860	UCCGAGGUuACuCDGtt	861	AD-14224	13%	1%
GUuACuGAGuAGGAGGtt	862	ADuHGuuAUuAUuAGAGGtt	863	AD-14225	15%	2%
GuuGucuGucuAAGAACTt	864	GUuGUuGUuACAGGAGGtt	865	AD-14226	11%	0%
uGuuGucuGucuAAGAACTt	866	UUCUuGAGuAAGGAGGtt	867	AD-14227	5%	1%
CAuAGGGuAAGAGGAGGtt	868	AAACuUCGGuAACCtt	869	AD-14228	34%	3%
CAuACuGAGGAGuAGAGGtt	870	GUuCuACGGuuCCGUuUtt	871	AD-14229	10%	2%
GUuACuGAGGAGuAGAGGtt	872	GUAGAGRuACAAuAAGGtt	873	AD-14230	20%	1%
AGuAGuGUGGAGAAAGGtt	874	GUuAGGUuGAGGAGGtt	875	AD-14231	16%	1%
AuAuuAuuAAGAGAGGtt	876	AAuGGGGuuAUuAUuAGGtt	877	AD-14232	21%	1%
AACGACuAuuAuuGucuGtt	878	GUuGAGAGuAAGGAGGtt	879	AD-14233	106%	12%
AGuAGAGGAGGAGGAGGtt	880	GUuACAGAGGAGGAGGtt	881	AD-14234	35%	3%
GUuACuGAGGAGGAGGtt	882	AAuGGGGuuAGGAGGAGGtt	883	AD-14235	42%	4%
AuACuGAGGAGGAGGAGGtt	884	UuGGGGuuAUuAUuAGGtt	885	AD-14236	23%	3%
UCCGAGGUuACuGGGtt	886	GUuGGGGuuAUuACGAGGtt	887	AD-14237	79%	7%
uGuuGguuAuuGucuGtt	888	AAGGAGAGuAACCtt	889	AD-14238	93%	7%
AuGuAGuAGGAGGAGGtt	890	GUuGGGGuuAUuAGGtt	891	AD-14239	26%	2%
uGuuGguuAuuGucuGtt	892	GUuGGGGuuAUuAGGtt	893	AD-14240	71%	6%
AuGuAGuAGGAGGAGGtt	894	UGuACGGuuAUuAGGtt	895	AD-14241	16%	1%
GUuACuGAGGAGGAGGtt	896	AAAGuAGGUuAAuAUuAGGtt	897	AD-14242	11%	2%
AAAGGGuuAuuAAGAGGtt	898	UCUuCuuAGGUuAGGtt	899	AD-14243	11%	1%
GuuGAGuAGGAGGAGGtt	900	GUuGGGGuuAUuAGGtt	901	AD-14244	15%	2%
AAGACuGuuGAGuAGGtt	902	GUuGGGGuuAUuAGGtt	903	AD-14245	80%	7%
AAGAAGGAGGAGGAGGtt	904	GUuGGGGuuAUuAGGtt	905	AD-14246	57%	5%
GuuACuAAAAGAAuAAGtt	906	GUuGGGGuuAUuAGGtt	907	AD-14247	9%	3%
AuAuuGAAAuuAuuAGtt	908	GUuGGGGuuAUuAGGtt	909	AD-14248	39%	4%
AAAAAGGGuuAuuAAGtt	910	GUuGGGGuuAUuAGGtt	911	AD-14249	64%	2%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	912	GUuGGGGuuAUuAGGtt	913	AD-14250	18%	2%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	914	GUuGGGGuuAUuAGGtt	915	AD-14251	56%	6%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	916	GUuGGGGuuAUuAGGtt	917	AD-14252	48%	6%
GuuGGGGuuAUuAGGtt	918	GUuGGGGuuAUuAGGtt	919	AD-14253	39%	5%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	920	GUuGGGGuuAUuAGGtt	921	AD-14254	44%	6%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	922	GUuGGGGuuAUuAGGtt	923	AD-14255	108%	8%
AGuAuuAccuGAGGtt	924	GUuGGGGuuAUuAGGtt	925	AD-14256	108%	6%
uGuuGGGGuuAUuAGGtt	926	UGuACGGuuAUuAGGtt	927	AD-14257	23%	2%
GuuGGGGuuAUuAGGtt	928	AAAAGuAGGuGGGAGGtt	929	AD-14258	21%	3%
AAuGuAGuAGGAGGtt	930	AQuuACAGGUuAGGtt	931	AD-14259	19%	2%
uGuuGGGGuuAUuAGGtt	932	GUuGGGGuuAUuAGGtt	933	AD-14260	10%	1%
uGuuGGGGuuAUuAGGtt	934	GUuGGGGuuAUuAGGtt	935	AD-14261	78%	3%
GuuGGGGuuAUuAGGtt	936	UGuACGGuuAUuAGGtt	937	AD-14262	15%	2%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	938	GUuGGGGuuAUuAGGtt	939	AD-14263	14%	3%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	940	GUuGGGGuuAUuAGGtt	941	AD-14264	65%	3%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	942	GUuGGGGuuAUuAGGtt	943	AD-14265	13%	1%
AGAGGGuuAuuAAGuGGtt	944	GUuGGGGuuAUuAGGtt	945	AD-14266	18%	3%
AuAuuAccuGAGGtt	946	GUuGGGGuuAUuAGGtt	947	AD-14267	50%	2%
AGuGuAGuAGGAGGtt	948	GUuGGGGuuAUuAGGtt	949	AD-14268	13%	3%
AGuGuGuuGAGGtt	950	AAuAAAAGGGuuAUuAGGtt	951	AD-14269	19%	4%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	952	GUuGGGGuuAUuAGGtt	953	AD-14270	11%	2%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	954	AAAAGGUuACuGuuAGGtt	955	AD-14271	11%	1%
AGAGGGuuAuuAAGuGGtt	956	GUuGGGGuuAUuAGGtt	957	AD-14272	7%	1%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	958	AQuuAGGuuACAGAGtt	959	AD-14273	14%	2%
GUuGGGGuuAUuAGGtt	960	GUuGGGGuuAUuAGGtt	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 (5'-3')	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)
GGCUAUAAGAUuACauAAcAATdT	962	GUUUAAGAGACGUuAGCCTdT	968	AD-14275	10%	1%
AuGuAchtGAGAGuCuGuuATdT	964	CAuGAGCUGAGuAGuAUuTdT	969	AD-14276	89%	2%
GuAcoCAGAcuGuuGucuTdT	966	GAAGAGuAGGUuUGAGuACTdT	970	AD-14277	7%	3%
AcGucuGAAACuCAuAAcGTdT	968	GAuGAGuAUuAGAGuGCTdT	970	AD-14278	12%	1%
AAGAGuAGGAAuGucuGucuTdT	970	GGAGAGuAAuGUCGCGuUuTdT	971	AD-14279	104%	3%
uGGuGAGGAGGAGuAAcAATdT	972	GUuGAuGUGGCGuCGuAAuTdT	973	AD-14280	21%	2%
AAGuAAuGAGGAGuGuuATdT	974	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	975	AD-14281	43%	3%
GAuAuaAuuAuAuGAGGdT	976	CCGGuXGAuAuuAuAAGuTdT	977	AD-14282	45%	6%
uGGuAAGGAGuGuuGucuTdT	978	GUuGAuGAGGAGuAGAGuTdT	979	AD-14283	3%	5%
GAGuAGGAGGAGuAAcAATdT	980	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	981	AD-14284	58%	3%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	982	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	983	AD-14285	4%	3%
GuGuuAAGGAGGAGuAAcAATdT	984	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	985	AD-14286	42%	3%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	986	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	987	AD-14287	6%	3%
AGGAGuAGGAGGAGuAAcAATdT	988	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	989	AD-14288	50%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	990	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	991	AD-14289	4%	1%
GucAAGGAGGAGuAAcAATdT	992	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	993	AD-14290	11.2%	7%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	994	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	995	AD-14291	77%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	996	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	997	AD-14292	80%	6%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	998	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	999	AD-14293	58%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1000	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1001	AD-14294	77%	2%
GGcAAGGAGGAGuAAcAATdT	1002	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1003	AD-14295	62%	2%
AuGuAchGAGAGuGuuATdT	1004	AGAGuAGGUuGAGuAAuGAGuTdT	1005	AD-14296	59%	4%
GuAGcGAGGAGGAGuAAcAATdT	1006	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1007	AD-14297	37%	1%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1008	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1009	AD-14298	21%	1%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1010	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1011	AD-14299	6%	1%
GGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1012	ACeAAAuuAAGGAGuAAuGAGuTdT	1013	AD-14300	17%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1014	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1015	AD-14301	97%	6%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1016	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1017	AD-14302	13%	1%
AGAGcAuuuGAGAGuGuuATdT	1018	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1019	AD-14303	13%	3%
GAAGcGAGGAGGAGuAAcAATdT	1020	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1021	AD-14304	38%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1022	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1023	AD-14305	14%	2%
GGAGAGGAGGAGuAAcAATdT	1024	CCCAuAAGAGuAAuGAGuTdT	1025	AD-14306	22%	4%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1026	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1027	AD-14307	26%	6%
GGuAuuuGAGAGuGuuATdT	1028	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1029	AD-14308	62%	8%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1030	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1031	AD-14309	52%	5%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1032	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1033	AD-14310	32%	3%
GGAGAGGAGGAGuAAcAATdT	1034	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1035	AD-14311	23%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1036	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1037	AD-14312	49%	6%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1038	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1039	AD-14313	69%	4%
GuAGuAAGuAAGuAAGuAATdT	1040	AUGGAGAGuAAuGAGuAAuGAGuTdT	1041	AD-14314	52%	3%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1042	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1043	AD-14315	66%	6%
GuGuGAGuAAGAGGAGuAAcAATdT	1044	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1045	AD-14316	19%	4%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1046	AAuKuGAGAGuAAuGAGuTdT	1047	AD-14317	16%	5%
GGAGAGGAGGAGuAAcAATdT	1048	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1049	AD-14318	52%	11%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1050	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1051	AD-14319	26%	11%
GGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1052	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1053	AD-14320	52%	10%
GGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1054	ACcAGuGAGuAAcAAGGdT	1055	AD-14321	53%	6%
GGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1056	uAGAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1057	AD-14322	20%	3%
AAcAGuAAuAAGAGuAAuGAGuTdT	1058	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1059	AD-14323	11.6%	6%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1060	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1061	AD-14324	14%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1062	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1063	AD-14325	50%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1064	AMGUuGAGAGuAAuGAGuTdT	1065	AD-14326	47%	3%
GuAGuAAGuAAGuAAGuAATdT	1066	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1067	AD-14327	18%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1068	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1069	AD-14328	1%	1%
GuAGuAAGuAAGuAAGuAATdT	1070	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1071	AD-14329	94%	10%
GuAGuAAGuAAGuAAGuAATdT	1072	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1073	AD-14330	60%	4%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1074	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1075	AD-14331	54%	7%
GGAGAGGAGGAGuAAcAATdT	1076	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1077	AD-14332	22%	4%
AGAGcAuuuGAGAGuGuuATdT	1078	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1079	AD-14333	70%	10%
GuAGuAAGuAAGuAAGuAATdT	1080	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1081	AD-14334	19%	3%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1082	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1083	AD-14335	38%	6%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1084	CUCGAGuAAuGAGuAAuGAGuTdT	1085	AD-14336	16%	3%
GGAGAGGAGGAGuAAcAATdT	1086	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1087	AD-14337	65%	2%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1088	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1089	AD-14338	18%	0%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1090	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1091	AD-14339	20%	4%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1092	AAAGAGuAAuGAGuAAuGAGuTdT	1093	AD-14340	24%	1%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1094	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1095	AD-14341	27%	3%
uGGuAAGGAGGAGuAAcAATdT	1096	GUuAAGAGGAGuAAuGAGuTdT	1097	AD-14342	13%	2%

10

20

40

【表3-5】

センス配列 (5'-3')	配列番号	アンチセンス配列 (3'-5')	番号	配列番号	二重鎖名	25 nMでの 单回用量ス クリーニング グ [残存 mRNAの%] 1 返し中)	第2のスク リーニング の標準偏差 (4回の繰り 返し)
GUUCGAAACAGUGGGGCGGCGTAT	1098	AGAUACCCACUCUUCUAGAATST	1099	AD-14343	19%	1%	1%
AGucuAuuAuAcoocuAcoGATst	1100	UUGAUCCGGAAUAAAACAUtST	1101	AD-14344	23%	3%	3%
AuGcuAAMcuGauCAGAAATst	1102	UUUCUGAAACGUuAAGcAUtST	1102	AD-14345	21%	4%	4%
GUAcAGAGGchenuGGuuKctst	1104	GUAAcGAGGGCUUcUQAUtST	1105	AD-14346	18%	2%	2%
uAUuAuucAGccGGGcGcGTst	1106	GGGCGCCGCGCUGauAAGAUtST	1107	AD-14347	67%	2%	2%
AuGuaAuuAcoGauAuuGcaATst	1108	UAGAAuAAGGUuAUuACAUtST	1109	AD-14348	39%	3%	3%
uuuuucuGAuuCAAAAUuTst	1110	AGAUuAGGUuGGAGAAARAUtST	1111	AD-14349	83%	6%	6%
AuGuuAUAcocuuAGGAcuTst	1112	AGUCCGUuAGGGuuAAGAUtST	1113	AD-14350	54%	3%	3%
ccGUAGGAacuuGGuuAuuTst	1114	AAAUAcGAGAGGUuAGGUtST	1115	AD-14351	57%	3%	3%
AAuAAuAAGGccuAGuAuuTst	1116	UuACUGAGGGGcAGGUuAAGAUtST	1117	AD-14352	82%	3%	3%
GauGauUAAGAAAGAAAGACTst	1118	CUCUuUUCGUuACAGAUtST	1118	AD-14353	2%	1%	1%
AAuGUGAuuccuGuuAuuGATst	1120	UUUCGUuACAGAUuACAUtST	1121	AD-14354	18%	11%	11%
GUAAAACAUuGGuuGGuuGTst	1122	GAACGGGcAAUGuuUuAUtST	1123	AD-14355	2%	1%	1%
GUuGAGGAAGGUuAGGUuAGAUtst	1124	UACUcAGAGGUuUCCGcAUtST	1125	AD-14356	8%	2%	2%
GUuAAAAGCAGAAuGuuGTst	1126	GAAGAUUCUcGUuUuAAACGTst	1127	AD-14357	6%	3%	3%
GUAAAAGAUuGGuuGGuuGTst	1128	GACGAGAGGUuUCCGUuUuAUtST	1129	AD-14358	98%	17%	17%
AAuGAAuGGuuGGuuGGuuGTst	1130	GUAGAGcAGGUuAcAUUuAUtST	1131	AD-14359	10%	1%	1%
cAGAAAAGuGuuGGuuAcuAUtst	1132	UGAGAGcAGGUuAcAUUuAUtST	1133	AD-14360	6%	4%	4%
cAGGAAuGGuuAAGGUuAGAUtst	1134	GUuCAuGuuAAuGuuAUuUcGTst	1135	AD-14361	30%	3%	3%
AGuCAuGuuAAuGuuAUuUcGTst	1136	AAAUuAGGUuAAuGuuAUuUcGTst	1137	AD-14362	28%	2%	2%
uGuGuuAAuGuuAUuGuuAUtst	1138	UcAGuAGGUuAAuGuuAUuUcGTst	1139	AD-14363	85%	6%	6%
AAuGAAuGuuGuuAUuGuuAUtst	1140	ACCAAGGAAcAAAUuGGAUtST	1141	AD-14364	12%	9%	9%
GUAGAAuGuuGuuAGGUuAUtst	1142	GUuAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1143	AD-14365	5%	2%	2%
uGGGpuuAcAGGAAcuAUtst	1144	GAGGUuUcUGUGAGAAAGGUtST	1145	AD-14366	28%	5%	5%
GUuGUuGAuGuuGGuuGGuuAUtst	1146	GUuCAGAGGUuAcAUUuAUtST	1147	AD-14367	42%	4%	4%
GUuAGGcAAuGuuGuuGUuGACTst	1148	CUCuACAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1149	AD-14368	93%	12%	12%
AGcAAuGuuGuuGuuGuuAUtst	1150	AAuGCUuACAAcAAuGuuAUtST	1151	AD-14369	65%	4%	4%
uuGuGAGGGuuGuuAAuGuuAUtst	1152	UGAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1153	AD-14370	5%	2%	2%
GGcAACGUuGuuGGuuAAuGuuAUtst	1154	UGGUuUcUGAGGUuAGGUtST	1155	AD-14371	54%	5%	5%
AGuAAuGuuAAuGuuAUuAUtst	1156	UuUuGGGUuAAuGuuAUuAUtST	1157	AD-14372	4%	1%	1%
AGuAAuGuuAAuGuuAUuAUtst	1158	GUuAAuGUuAAuGuuAUuAUtST	1159	AD-14373	5%	2%	2%
GUuGUuAAcAGGUuAGGUtST	1160	UGGUuACGUuAAuGuuAUuAUtST	1161	AD-14374	92%	6%	6%
AGuGuuAUuGuuAUuGuuAUtst	1162	UGuAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1163	AD-14375	76%	4%	4%
uGuAAuGuuAUuGuuAUuAUtst	1164	GUAGAAuAAuGuuAUuAUtST	1165	AD-14376	70%	5%	5%
uGuAGGuuAAuGuuAUuAUtst	1166	ACGUuAAuAAuGuuAUuAUtST	1167	AD-14377	48%	4%	4%
GuuAGGuuAAuGuuAUuAUtst	1168	GUuAAAAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1169	AD-14378	48%	3%	3%
GUuGUuAAcGUuAAuGuuAUtst	1170	UUDGUuAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1171	AD-14379	44%	5%	5%
uGuuGuuAAuGuuAUuAUtst	1172	AUUCUGACuAAUcGUuAAuAUtST	1173	AD-14380	36%	16%	16%
AAuGuuAAcGuuAUuAUtst	1174	uAcAAuGuuAGGGGUuAGAUuAUtST	1175	AD-14381	44%	5%	5%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1176	ACGUuAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1177	AD-14382	28%	1%	1%
GuuGUuAAuGuuAUuAUtst	1178	ACAGAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1179	AD-14383	55%	11%	11%
cAcAAuGuuAAuGuuAUuAUtst	1180	cAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1181	AD-14384	48%	9%	9%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1182	AuGuGUuAAuGuuAUuAUtST	1183	AD-14385	36%	2%	2%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1184	GUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1185	AD-14386	41%	7%	7%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1186	GUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1187	AD-14387	38%	3%	3%
AGAGGUuAAuGuuAUuAUtst	1188	AAuGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1189	AD-14388	50%	4%	4%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1190	GUuGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1191	AD-14389	98%	6%	6%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1192	AGGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1193	AD-14390	43%	9%	9%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1194	GUuGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1195	AD-14391	48%	4%	4%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1196	GUuGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1197	AD-14392	44%	3%	3%
AGGUuAAuGuuAUuAUtst	1198	AUGGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1199	AD-14393	37%	2%	2%
AGuGuuAUuAUuAUtst	1200	AAGGUuAGGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1201	AD-14394	114%	7%	7%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1202	GUuGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1203	AD-14395	55%	4%	4%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1204	GUuGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1205	AD-14396	4%	5%	5%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1206	GUuGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1207	AD-14397	71%	6%	6%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1208	UACGUuAGGUuAAuGuuAUuAUtST	1209	AD-14398	81%	7%	7%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1210	AGGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1211	AD-14399	38%	4%	4%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1212	UGGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1213	AD-14400	106%	6%	6%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1214	UcGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1215	AD-14401	47%	3%	3%
GUuGUuAAcGUuAAuAUuAUtst	1216	UuGUuGUuAAuGuuAUuAUtST	1217	AD-14402	31%	1%	1%
GGcccAGAGGUuAGGGAUtST	1218	UCCGUuGUuAAuGUuGUuGUuAUtST	1219	AD-14403	105%	4%	4%
GGGGAGAGGUuAGGGAUtST	1220	AAAGGUuGUuAAuGUuGUuGUuAUtST	1221	AD-14404	3%	1%	1%
AGAGAGGUuAGGGAUtST	1222	GGGUuGUuAAAGGUuGUuGUuAUtST	1223	AD-14405	15%	1%	1%
GGRAcGGRAcGUuGUuGUuAUtST	1224	GUuGUuGUuAAuGUuGUuGUuAUtST	1225	AD-14406	44%	5%	5%
GUuGUuAAAGGUuAGGGAUtST	1226	UuGUuGUuAAuGUuGUuGUuAUtST	1227	AD-14407	41%	4%	4%
GUuGUuAAAGGUuAGGGAUtST	1228	AGGUuGUuAAuGUuGUuGUuAUtST	1229	AD-14408	104%	3%	3%
GUuGUuAAAGGUuAGGGAUtST	1230	GUuGUuGUuAAuGUuGUuGUuAUtST	1231	AD-14409	67%	4%	4%
ACAGAGGAuAUuGUuGUuAUtST	1232	UUGGUuGUuAAuGUuGUuGUuAUtST	1233	AD-14410	22%	1%	1%

10

30

40

【表3-6】

センス配列	(S'-3')	配列	アンチセンス配列 (3'-5')	(S'-3')	配列	二重鎖名	25 nM での単回用量	スクリーニングの標準偏差 [残存 mRNA (%)]	第 2 のスクリーニングの標準偏差 [4 回の繰り返し中]
uAAGGAAUACAUUCUAGAUUAGT	1234	CAAAUCAGAUGUCUCAAT	T	1235	AD-14411	2.9%	3%		
UAUUGGAAUCCGUAGAAUAT	1236	uAUUUCuACGGAGAUAAU	T	1237	AD-14412	3.1%	4%		

〔 0 2 2 8 〕

V E G F 遺伝子を標的とする d s R N A

V E G F - A 1 2 1 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 1 1】

1 augaacuuuc ugcugucuuug ggugcuaugg agccuugccu ugcugcucua ccuccaccau
61 gcca&guggu cccaggcugc acccauggca gaaggagggag ggcaagaauca ucacgaagug
121 gugaaguuca uggaugucua ucagcgccgc uacugccauc caaucqsgac ccugguggac
181 aucuuccagg aquaccuga ugaqaucgag uacaucuuca agccauccug ugugccccug
241 augcgaugcg ggggcugcug caaugacgag ggccuqgqau guqugcccac ugaggagucc
301 aacaucacca ugcagauuau qcggaucaaa ccucaccaaq qccagcacau aggagagaaug
361 agcuuccuac agcacaacaa augugaaugc agaccaaaga aageuaagac aagacaagaa
421 aaaaquqaca agccqagqqcq quqa (SEQ ID NO:1539)

【 0 2 2 9 】

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。

[0 2 3 0]

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。

[0 2 3 1]

また、s i R N A は、サル、ラット、およびヒト V E G F 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。

[0 2 3 2]

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4b）。

[0 2 3 3]

表 4 a . V E G F - 1 2 1 の標的配列

【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	AUGAACUUUCUGCUGCUUUGGGU	1584	45	CCUCUACCUCCACCAUGCCAAU
1541	2	UGAACUUUCUGCUGCUUUGGGUG	1585	46	CUCUACCUCCACCAUGCCAAAGUG
1542	3	GAACUUUCUGCUGCUUUGGGUGG	1586	47	UCUACCUCCACCAUGCCAAAGUGG
1543	4	AACUUUCUGCUGCUUUGGGUGCA	1587	48	CUACCUCCACCAUGCCAAAGUGGU
1544	5	ACUUUCUGCUGCUUUGGGUGCAU	1588	49	UACCUCCACCAUGCCAAAGUGGU
1545	6	CUUUCUGCUGCUUUGGGUGCAU	1589	50	ACCUCCACCAUGCCAAAGUGGUCC
1546	7	UUCUGCUGCUUUGGGUGCAJUG	1590	51	CCUCUACCUCCACCAUGCCAAAGUGGUCC
1547	8	UUCUGCUGCUUUGGGUGCAUUGG	1591	52	CUCCACCAUGCCAAAGUGGUCCOCA
1548	9	UCUGCUGCUUUGGGUGCAUUGGA	1592	53	UCCACCAUGCCAAAGUGGUCCAG
1549	10	CUGCUGCUUUGGGUGCAUUGGAG	1593	54	CCACCAUGCCAAAGUGGUCCAGG
1550	11	UGCUGCUUUGGGUGCAUUGGAGC	1594	55	CACCAUGCCAAAGUGGUCCUCCAGGC
1551	12	GCUGCUUUGGGUGCAUUGGAGCC	1595	56	ACCAUGCCAAAGUGGUCCAGGCC
1552	13	CUGCUUUGGGUGCAUUGGAGCCU	1596	57	CCAUGCCAAAGUGGUCCAGGCUG
1553	14	UGCUUUGGGUGCAUUGGAGCCUU	1597	58	CAUGCCAAAGUGGUCCAGGCUGC
1554	15	GUCURGGGUGCAUUGGAGCCUUG	1598	59	AUGCCAAAGUGGUCCAGGCUGCA
1555	16	UCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGC	1599	60	UGCCAAAGUGGUCCAGGCUGCAC
1556	17	CUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCC	1600	61	GCCAAGUGGUCCAGGCUGCACCC
1557	18	UUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCU	1601	62	CCAAGUGGUCCAGGCUGCACCC
1558	19	UGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUU	1602	63	CAAGUGGUCCAGGCUGCACCC
1559	20	GGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUG	1603	64	AAGUGGUCCAGGCUGCACCCAU
1560	21	GGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGC	1604	65	AGUGGUCCAGGCUGCACCCAU
1561	22	GUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCU	1605	66	GUGGUCCAGGCUGCACCCAU
1562	23	UGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUG	1606	67	UGGUCCAGGCUGCACCCAU
1563	24	GCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGC	1607	68	GGUCCAGGCUGCACCCAU
1564	25	CAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCU	1608	69	GUCCAGGCUGCACCCAU
1565	26	AUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUC	1609	70	UCCCAGGCUGCACCCAU
1566	27	UUGGGAGCCUUGCCUUGCUGCUC	1610	71	CCCAGGCUGCACCCAU
1567	28	UCCAGCCUUGCCUUGCUGCUCUA	1611	72	CCAGGCUGCACCCAU
1568	29	GGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUAC	1612	73	CAGGCUGCACCCAU
1569	30	GAGCCUUGCCUUGCUCUACUACC	1613	74	AGGCUGCACCCAU
1570	31	ACCCUUGOCUUGCUGCUCUACCU	1614	75	GGCUGCACCCAU
1571	32	GCCUUGCCUUGCUGCUCUACCU	1615	76	GCUGCACCCAU
1572	33	CCUUGCCUUGCUGCUCUACCUCC	1616	77	CUGCACCCAU
1573	34	CUUGCCUUGCUGCUCUACCUCC	1617	78	UGCACCCAU
1574	35	UUGCCUUGCCUUGCUCUACCUCCAC	1618	79	GCACCCAU
1575	36	UGCCUUGCUGCUCUACCUCCACC	1619	80	CACCAUGGCAGAAGGAGGAGGG
1576	37	GCCUUGCUGCUCUACCUCCACCA	1620	81	ACCAUGGCAGAAGGAGGAGGG
1577	38	CCUUGCUGCUCUACCUCCACCAU	1621	82	CCCAUGGCAGAAGGAGGAGGGCA
1578	39	CUUGCUGCUCUACCUCCACCAUG	1622	83	CCAUGGCAGAAGGAGGAGGGCAG
1579	40	UUGCUGCUCUACCUCCACCAUGC	1623	84	CAUGGCAGAAGGAGGAGGGCAGA
1580	41	UGCUGCUCUACCUCCACCAUGCC	1624	85	AUGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAA
1581	42	GCUGCUCUACCUCCACCAUGCC	1625	86	UGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAAU
1582	43	CUGCUCUACCUCCACCAUGCCAA	1626	87	GGCAGAAGGAGGAGGGCAGAAUC
1583	44	UGCUCUACCUCCACCAUGCCAG	1627	88	GCAGAAGGAGGAGGGCAGAAUCA

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	CAGAAGGAGGGAGGGCAGAAUCAU	1674	135	UGUCUAUCAGCGCAGCUACUGC
1629	90	AGAAGGAGGGAGGGCAGAAUCAUC	1675	136	GUCUAUCAGCGCAGCUACUGC
1630	91	GAAGGAGGGAGGGCAGAAUCAUC	1676	137	UCUAUCAGCGCAGCUACUGC
1631	92	AAGGAGGGAGGGCAGAAUCAUCAC	1677	138	CUAUCAUCAGCGCAGCUACUGC
1632	93	AGGAGGGAGGGCAGAAUCAUCACG	1678	139	UAUCAGCGCAGCUACUGC
1633	94	GGAGGAGGGCAGAAUCAUCACGA	1679	140	AUCAGCGCAGCUACUGC
1634	95	GAGGAGGGCAGAAUCAUCACGAA	1680	141	UCAGCGCAGCUACUGC
1635	96	AGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAG	1681	142	CAGCGCAGCUACUGC
1636	97	GGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGU	1682	143	AGCGCAGCUACUGC
1637	98	GAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUG	1683	144	GCGCAGCUACUGC
1638	99	AGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGG	1684	145	CGCAGCUACUGC
1639	100	GGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGU	1685	146	GCAGCUACUGC
1640	101	GGCAGAAUCAUCACGAAGUGGU	1686	147	CAGCUACUGC
1641	102	GCAGAAUCAUCACGAAGUGGU	1687	148	AGCUACUGC
1642	103	CAGAAUCAUCACGAAGUGGU	1688	149	CCUACUGC
1643	104	AGAAUCAUCACGAAGUGGU	1689	150	CUACUGC
1644	105	GAAUCAUCACGAAGUGGU	1690	151	UACUGC
1645	106	AAUCAUCACGAAGUGGU	1691	152	ACUGC
1646	107	AUCAUCACGAAGUGGU	1692	153	CUGC
1647	108	UCAUCACGAAGUGGU	1693	154	GGCAUC
1648	109	CAUCACGAAGUGGU	1694	155	CCAUC
1649	110	AUCACGAAGUGGU	1695	156	CCAU
1650	111	UCACGAAGUGGU	1696	157	CAUC
1651	112	CACGAAGUGGU	1697	158	AUCCA
1652	113	ACGAAGUGGU	1698	159	UCCAAUC
1653	114	CGAACUGUGGU	1699	160	CCAAUC
1654	115	GAAGUGGU	1700	161	CAUC
1655	116	AGUGGU	1701	162	AUUC
1656	117	AGUGGU	1702	163	UOGAGA
1657	118	GUGGU	1703	164	CCGAGACC
1658	119	UGGU	1704	165	CGAGACC
1659	120	GGUGU	1705	166	GAGACC
1660	121	GUGU	1706	167	AGACC
1661	122	UGAAGU	1707	168	GACCC
1662	123	GAAGU	1708	169	ACCC
1663	124	AAGU	1709	170	CCC
1664	125	AGUU	1710	171	CCU
1665	126	GUU	1711	172	UGG
1666	127	UUC	1712	173	UGG
1667	128	UCAU	1713	174	GGUGG
1668	129	CAU	1714	175	GGUGG
1669	130	AUG	1715	176	GGG
1670	131	UGG	1716	177	GGG
1671	132	GG	1717	178	GGG
1672	133	GAU	1718	179	ACA
1673	134	AUG	1719	180	CAU

10

20

30

40

【表4-3】

配列番号	VEGF121 の ORF 内の位 置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'	配列番号	VEGF121 の ORF 内の 位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'
1720	181	AUCUUCCAGGAGUACCCUGAUGA	1766	227	CCUGUGUGCCCCUGAUCCGAUGC
1721	182	UCUUCCAGGAGUACCCUGAUGAG	1767	228	CUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGC
1722	183	CUUCCAGGAGUACCCUGAUGAGA	1768	229	UGUGUGCCCCUGAUGCGAUGC
1723	184	UCCAGGAGUACCCUGAUGAGAU	1769	230	GUGUGCCCCUGAUGCGAUGC
1724	185	UCCAGGAGUACCCUGAUGAGAU	1770	231	UGUGCCCCUGAUGCGAUGC
1725	186	CCAGGAGUACCCUGAUGAGAU	1771	232	GUGCCCCUGAUGCGAUGC
1726	187	CAGGAGUACCCUGAUGAGAU	1772	233	UGCCCCUGAUGCGAUGC
1727	188	AGGAGUACCCUGAUGAGAU	1773	234	GCCCCUGAUGCGAUGC
1728	189	GGAGUACCCUGAUGAGAU	1774	235	CCCCUGAUGCGAUGC
1729	190	GAGUACCCUGAUGAGAU	1775	236	CCCUGAUGCGAUGC
1730	191	AGUACCCUGAUGAGAU	1776	237	CCUGAUGCGAUGC
1731	192	GUACCCUGAUGAGAU	1777	238	CUGADCGAUGC
1732	193	UACCCUGAUGAGAU	1778	239	UGAUGC
1733	194	ACCCUGAUGAGAU	1779	240	GAUGCGAUGC
1734	195	CCUCUGAGAU	1780	241	AUGCGAUGC
1735	196	CCUCUGAGAU	1781	242	UGCGAUGC
1736	197	CUGAUGAGAU	1782	243	GCAGAUGC
1737	198	UGAUGAGAU	1783	244	CGAUGC
1738	199	GAUGAGAU	1784	245	GAUGC
1739	200	AUGAGAU	1785	246	AUGCG
1740	201	UGAGAU	1786	247	UGCGGSGGC
1741	202	GAGAUGC	1787	248	GGGGGGC
1742	203	AGAUGC	1788	249	GGGGGC
1743	204	GAUCG	1789	250	GGGGGC
1744	205	AUCGAGAU	1790	251	GGGGC
1745	206	UCCAGAU	1791	252	GGG
1746	207	CGAGUACAU	1792	253	GGC
1747	208	GAGUACAU	1793	254	GC
1748	209	AGUACAU	1794	255	CUG
1749	210	GUACAU	1795	256	UGC
1750	211	UACAU	1796	257	CUG
1751	212	ACAUCU	1797	258	CGA
1752	213	CAUCU	1798	259	CGA
1753	214	AUCU	1799	260	CGA
1754	215	UCUUC	1800	261	CAA
1755	216	CUUCA	1801	262	AUGAC
1756	217	UUCAAG	1802	263	ACGAG
1757	218	UCAAG	1803	264	UGACG
1758	219	CAAGC	1804	265	GACGAG
1759	220	AAGCC	1805	266	ACGAG
1760	221	AGCCA	1806	267	CGAGGGC
1761	222	GCCAUC	1807	268	GAAGGCC
1762	223	CCAUCC	1808	269	AGGGCC
1763	224	CAUCC	1809	270	GGGC
1764	225	AUCCU	1810	271	GGCC
1765	226	UCCU	1811	272	GCC

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 S t	VEGF-121 の ORF 内の 位置	VEGF121 の mRNA 内の標的配列 5'から 3'
1812	273	CCUGGAGUGUGUGGCCACUGAGG	1858	319	AUGCGGAUCAAACCUCACCAAGG
1813	274	CUGGAGUGUGUGGCCACUGAGG	1859	320	UGCGGAUCAAACCUCACCAAGGC
1814	275	UGGAGUGUGUGGCCACUGAGGAG	1860	321	GCGGAUCAAACCUCACCAAGGCC
1815	276	GGAGUGUGUGGCCACUGAGGAGU	1861	322	CGGAUCAAACCUCACCAAGGCCA
1816	277	GAGUGUGUGGCCACUSAGGAGUC	1862	323	GGAUCAAACCUCACCAAGGCCAG
1817	278	AGUGUGUGGCCACUGAGGAGUCC	1863	324	GAUCAAACCUCACCAAGGCCAGC
1818	279	GUGUGUGGCCACUGAGGAGUCC	1864	325	AUCAAACCUCACCAAGGCCAGCA
1819	280	UGUGUGGCCACUGAGGAGUCCAA	1865	326	UCAAACCUCACCAAGGCCAGCAC
1820	281	GUGUGCCCACUGAGGAGUCCAAAC	1866	327	CAAACCUCACCAAGGCCAGCAC
1821	282	UGUGGCCACUGAGGAGUCCAAAC	1867	328	AAACCUCACCAAGGCCAGCACAU
1822	283	GUGGCCACUGAGGAGUCCAAACAU	1868	329	AACCUCACCAAGGCCAGCACAU
1823	284	UGCCCACOGAGGAGUCCAAACAU	1869	330	ACCUCACCAAGGCCAGCACAUAG
1824	285	GCCACUGAGGAGUCCAAACAUCA	1870	331	CCUCACCAAGGCCAGCACAUAGG
1825	286	CCCACUGAGGAGUCCAAACAUCA	1871	332	CUCACCAAGGCCAGCACAUAGGA
1826	287	CCACUGAGGAGUCCAAACAUCA	1872	333	UCACCAAGGCCAGCACAUAGGAG
1827	288	CACUGAGGAGUCCAAACAUCA	1873	334	CACCAAGGCCAGCACAUAGGAGA
1828	289	ACUGAGGAGUCCAAACAUCA	1874	335	ACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAG
1829	290	CUGAGGAGUCCAAACAUCA	1875	336	CCAAGGCCAGCACAUAGGAGAGA
1830	291	UGAGGAGUCCAAACAUCA	1876	337	CAAGGCCAGCACAUAGGAGAGAU
1831	292	GAGGAGUCCAAACAUCA	1877	338	AAGGCCAGCACAUAGGAGAGAUG
1832	293	AGGAGUCCAAACAUCA	1878	339	AGGCCAGCACAUAGGAGAGAUGA
1833	294	GGAGUCCAAACAUCA	1879	340	GGCCAGCACAUAGGAGAGAUGAG
1834	295	GAGUCCAAACAUCA	1880	341	GCCAGCACAUAGGAGAGAUGAGC
1835	296	AGUCCAAACAUCA	1881	342	CCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCU
1836	297	GUCCAACAUCA	1882	343	CAGCACAUAGGAGAGAUGAGCUU
1837	298	UCCAACAUCA	1883	344	AGCACAUAGGAGAGAUGAGCUUC
1838	299	CCAACAUCA	1884	345	GCACAUAGGAGAGAUGAGCUUCC
1839	300	CAACAUCA	1885	346	CACAUAGGAGAGAUGAGCUUCCU
1840	301	AACAUCA	1886	347	ACAUAGGAGAGAUGAGCUUCCUA
1841	302	ACAUCA	1887	348	CAUAGGAGAGAUGAGCUUCCUAC
1842	303	CAUCACCA	1888	349	AUAGGAGAGAUGAGCUUCCUACACA
1843	304	AUCACCA	1889	350	UAGGAGAGAUGAGCUUCCUACAG
1844	305	UCACCA	1890	351	AGCAGAGAUGAGCUUCCUACAGC
1845	306	CACCA	1891	352	GGAGAGAUGAGCUUCCUACAGCAC
1846	307	ACCA	1892	353	GAGAGAUGAGCUUCCUACAGCAC
1847	308	CCAU	1893	354	AGAGAGAUGAGCUUCCUACAGCAC
1848	309	CAUC	1894	355	GAGAGAUGAGCUUCCUACAGCACAA
1849	310	AUGC	1895	356	AGAUGAGCUUCCUACAGCACAAAC
1850	311	GAUC	1896	357	GAUGAGCUUCCUACAGCACACAA
1851	312	GGAG	1897	358	AUGAGCUUCCUACAGCACACAA
1852	313	CAUUA	1898	359	UGAGCUUCCUACAGCACACAAA
1853	314	AGAUUA	1899	360	GAGCUUCCUACAGCACACAAAU
1854	315	GAUUA	1900	361	AGCUUCCUACAGCACACAAUG
1855	316	AUUA	1901	362	GCUCUCCUACAGCACACAAU
1856	317	UUAU	1902	363	CUUCUACAGCACACAAU
1857	318	UAU	1903	364	UUCCUACAGCACACAAU

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	UCCUACAGOACACAAAGUGUGAA			
1905	366	CCUACAGCACAACAAAUGUGAUU			
1906	367	CUACAGCACAACAAAUGUGUAUG			
1907	368	UACAGCACAACAAAUGUGUAUGC			
1908	369	ACAGCACAACAAAUGUGUAUCCA			
1909	370	CAGCACAACAAAUGUGUAUCCAG			
1910	371	AGCACAACAAAUGUGUAUGCAGA			
1911	372	GCACAAACAAAUGUGUAUCCAGAC			
1912	373	CACAAACAAAUGUGUAUGCAGACC			
1913	374	ACAACAAAUGUGUAUCCAGACCA			
1914	375	CAACAAAUGUGUAUCCAGACCAA			
1915	376	AAACAAUUGUGARUGCAGACCAAA			
1916	377	ACAAAUGUGUAUCCAGACCAAAG			
1917	378	CAAAUUGUGUAUCCAGACCAAAGA			
1918	379	AAAUGUGUAUCCAGACCAAAGAA			
1919	380	AAUUGUGUAUCCAGACCAAAGAAA			
1920	381	AUGUGAUGCAGACCAAAGAAAAG			
1921	382	UGUGAAUCCAGACCAAAGAAAAGA			
1922	383	GUGAAUCCAGACCAAAGAAAAGAU			
1923	384	UGAAUCCAGACCAAAGAAAAGAU			
1924	385	GAAUCCAGACCAAAGAAAAGAUAG			
1925	386	AAUCCAGACCAAAGAAAAGAUAGA			
1926	387	AUGCAGACCAAAGAAAAGAUAGAG			
1927	388	UGCAGACCAAAGAAAAGAUAGAGC			
1928	389	GCAGACCAAAGAAAAGAUAGAGCA			
1929	390	CAGACCAAAGAAAAGAUAGAGCAA			
1930	391	AGACCAAAGAAAAGAUAGAGCAAG			
1931	392	GACCAAAGAAAAGAUAGAGCAAG			
1932	393	ACCAAAGAAAAGAUAGAGCAAGAC			
1933	394	CCAAAGAAAAGAUAGAGCAAGACAA			
1934	395	CAAAAGAAAAGAUAGAGCAAGACAA			
1935	396	AAAGAAAAGAUAGAGCAAGACAAAG			
1936	397	AAGAAAAGAUAGAGCAAGACAAAGA			
1937	398	AGAAAAGAUAGAGCAAGACAAAGAA			
1938	399	GAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAAGA			
1939	400	AAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAAGAAAA			

10

20

30

【0234】

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	AUGAACUUUCUGCUGUCUUGGGU	AL-DP-4043	S	1940	5 GAACUUUCUGCUGUCUUGGGU 3
				AS	1941	3 UACUUGAAGACGACAGAACCCA 5
22	2185	GUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCU	AL-DP-4077	S	1942	5 GCAUUGGAGCCUUGCCUUGCU 3
				AS	1943	3 CACGUAAACCUCCGAACCGAACGA 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 CUCCACCAUGCCAAGUGGUCC 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 UCCACCAUGCCAAGUGGUTT 3
				AS	1955	3 TTAGGUGGUACGGUUCACCAAG 5
52	2190	CUCCACCAUGCCAAGUGGUCCCA	AL-DP-4048	S	1956	5 CCACCAUGCCAAGUGGUCCCA 3
				AS	1957	3 GAGGUGGUACGGUUCACCAGGG 5
			AL-DP-4103	S	1958	5 CCACCAUGCCAAGUGGUCCCTT 3
				AS	1959	3 TTGGUGGUACGGUUCACCAAGGG 5
53	2191	UCCACCAUGCCAAGUGGUCCAG	AL-DP-4035	S	1960	5 CACCAUGCCAAGUGGUCCAG 3
				AS	1961	3 AGGUGGUACGGUUCACCAGGGUC 5
			AL-DP-4018	S	1962	5 CACCAUGCCAAGUGGUCCCTT 3
				AS	1963	3 TTGUGGUACGGUUCACCAAGGG 5
54	2192	CCACCAUGCCAAGUGGUCCAGG	AL-DP-4036	S	1964	5 ACCAUGCCAAGUGGUCCAGG 3
				AS	1965	3 GGUGGUACGGUUCACCAGGGUCC 5
			AL-DP-4084	S	1966	5 ACCAUGCCAAGUGGUCCATT 3
				AS	1967	3 TTUGGUACGGUUCACCAAGGGU 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	CACCAUGCCAAGUGGUUCCCAGGC	AL-DP-4093	S	1968	5 CCAUGCCAAGUGGUUCCCAGGC 3
				AS	1969	3 GUCCUACGGUUCACCAGGGUCCG 5
56	2194	ACCAUGCCAAGUGGUUCCCAGGC	AL-DP-4037	S	1972	5 CAUGCCAAGUGGUUCCCAGGC 3
				AS	1973	3 UGGUACGGUUCACCAGGGUCCG 5
57	2195	CCAUUGCCAAGUGGUUCCCAGGC	AL-DP-4038	S	1976	5 AUGCCAAGUGGUUCCCAGGCUG 3
				AS	1977	3 GGUACGGUUCACCAGGGUCCGAC 5
58	2196	CAUGCCAAGUGGUUCCCAGGC	AL-DP-4049	S	1980	5 UGCCAAGUGGUUCCCAGGCUGC 3
				AS	1981	3 GUACGGUUCACCAGGGUCCGACG 5
59	2197	AUGCCAAGUGGUUCCCAGGC	AL-DP-4001	S	1984	5 GCCAAGUGGUUCCCAGGCUGCA 3
				AS	1985	3 UACGGUUCACCAGGGUCCGACGU 5
60	2198	UGCCAAGUGGUUCCCAGGC	AL-DP-4007	S	1988	5 CCAAGUGGUUCCCAGGCUGCAC 3
				AS	1989	3 ACGGUUCACCAGGGUCCGACGUG 5
61	2199	GCCAAGUGGUUCCCAGGC	AL-DP-4070	S	1992	5 CAAGUGGUUCCCAGGCUGCACC 3
				AS	1993	3 CGGUUCACCAGGGUCCGACGUGG 5
62	2200	GCCAAGUGGUUCCCAGGC	AL-DP-4071	S	1996	5 AAGUGGUUCCCAGGCUGCACCC 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
63	2201	CAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCA	AL-DP-4072	AS	1999	3 TTUUCACCAGGGUCCGACGUG 5
				S	2000	5 AGUGGUCCCAGGCUGCACCCA 3
			AL-DP-4057	AS	2001	3 GUUCACCAGGGUCCGACGUGGG 5
				S	2002	5 AGUGGUCCCAGGCUGCACCTT 3
64	2202	AAGUGGUCCCAGGCUGCACCAU	AL-DP-4066	S	2004	5 GUGGUCCCAGGCUGCACCCCTT 3
				AS	2005	3 TTCACCAGGGUCCGACGUGGG 5
99	2203	AGGCAGAAUCAUCACGAAGUGG	AL-DP-4022	S	2006	5 GGCAGAAUCAUCACGAAGUTT 3
				AS	2007	3 TTCCGUCUUAGUAGUGGUCA 5
100	2204	GGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGU	AL-DP-4023	S	2008	5 GCAGAAUCAUCACGAAGUGTT 3
				AS	2009	3 TTTCGUCUUAGUAGUGGUUCAC 5
101	2205	GGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUG	AL-DP-4024	S	2010	5 CAGAAUCAUCACGAAGUGGTT 3
				AS	2011	3 TTGUCUUAGUAGUGGUUCACCC 5
102	2206	GCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGA	AL-DP-4076	S	2012	5 AGAAUCAUCACGAAGUGGUGA 3
				AS	2013	3 CGUCUUAGUAGUGGUUCACCAC 5
			AL-DP-4019	S	2014	5 AGAAUCAUCACGAAGUGGUTT 3
				AS	2015	3 TTUCUUAGUAGUGGUUCACCA 5
103	2207	CAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAA	AL-DP-4025	S	2016	5 GAAUCAUCACGAAGUGGUGTT 3
				AS	2017	3 TTCUUAGUAGUGGUUCACCCAC 5
104	2208	AGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAG	AL-DP-4110	S	2018	5 AAUCAUCACGAAGUGGUGATT 3
				AS	2019	3 TTUUAGUAGUGGUUCACCCACU 5
105	2209	GAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGU	AL-DP-4068	S	2020	5 AUCAUCACGAAGUGGUGAATT 3
				AS	2021	3 TTUAGUAGUGGUUCACCCACUU 5
113	2210	ACGAAGUGGUGAAGUCAUGGAU	AL-DP-4078	S	2022	5 GAAGUGGUGAAGUCAUGGAU 3
				AS	2023	3 UGCUUCACCACUUCAAGUACUA 5
121	2211	GUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCA	AL-DP-4080	S	2024	5 GAAGUUCAUGGAUGUCUAUCA 3
				AS	2025	3 CACUUCAAGUACCUACAGAUAGU 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	AUGGAUGUCUUAUCAGCGCAGCUA	AL-DP-4041	S	2028	5 GGAUGUCUUAUCAGCGCAGCUA 3
				AS	2029	3 UACCUACAGAUAGUCGCGUCGAU 5
			AL-DP-4062	S	2030	5 GGAUGUCUUAUCAGCGCAGCTT 3
				AS	2031	3 TTCCUACAGAUAGUCGCGUCG 5
131	2214	UGGAUGUCUUAUCAGCGCAGCUAC	AL-DP-4069	S	2032	5 GAUGUCUUAUCAGCGCAGCUATT 3
				AS	2033	3 TTCUACAGAUAGUCGCCGUCCA 5
132	2215	GGAUGUCUUAUCAGCGCAGCUACU	AL-DP-4112	S	2034	5 AUGUCUUAUCAGCGCAGCUATT 3
				AS	2035	3 TTUACAGAUAGUCGCCGUCGAU 5
133	2216	GAUGUCUUAUCAGCGCAGCUACUG	AL-DP-4026	S	2036	5 UGUCUUAUCAGCGCAGCUACTT 3
				AS	2037	3 TTACAGAUAGUCGCCGUCGAUG 5
134	2217	AUGUCUUAUCAGCGCAGCUACUGC	AL-DP-4095	S	2038	5 GUCUAUCAGCGCAGCUACUGC 3
				AS	2039	3 UACAGAUAGUCGCCGUUCGAUGACG 5
			AL-DP-4020	S	2040	5 GUCUAUCAGCGCAGCUACUTT 3
				AS	2041	3 TTCAGAUAGUCGCGUCGAUGA 5
135	2218	UGUCUUAUCAGCGCAGCUACUGCC	AL-DP-4027	S	2042	5 UCUAUCAGCGCAGCUACUGTT 3
				AS	2043	3 TTAGAUAGUCGCCGUCCGAUGAC 5
144	2219	GCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCG	AL-DP-4081	S	2044	5 GCAGCUACUGCCAUCCAAUCG 3
				AS	2045	3 CGCGUUCGAUGACGGUAGGUUAGC 5
146	2220	GCACCUACUGCCAUCCAAUCGAG	AL-DP-4098	S	2046	5 AGCUACUGCCAUCCAAUCGAG 3
				AS	2047	3 CGUCCGAUGACGGUAGGUUAGCUC 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 ACUGCCAUCCRAUCGAGACTT 3
				AS	2051	3 TTUGACGGUAGGUUAGCUCUG 5
151	2223	UACUGCCAUCCAAUCGAGACCCU	AL-DP-4030	S	2052	5 CUGCCAUCCAAUCGAGACOTT 3
				AS	2053	3 TTGACGGUAGGUUAGCUCUGG 5
152	2224	ACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUG	AL-DP-4031	S	2054	5 UGCCAUCCAAUCGAGACCCCTT 3
				AS	2055	3 TTACGGUAGGUUAGCUCUGGG 5
166	2225	GAGACCCUGGUGGACAUCUUCCA	AL-DP-4008	S	2056	5 GACCCUGGUGGACAUCUUCCA 3
				AS	2057	3 CUCUGGGGACCACCUUGUAGAAGGU 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 GACCCUGGUGGGACAUCUUCCTT 3
				AS	2059	3 TTCUGGGACCACCUGUAGAAGG 5
167	2226	AGACCCUGGUGGGACAUCUUCAG	AL-DP-4009	S	2060	5 ACCCUGGUGGGACAUCUUCAG 3
				AS	2061	3 UCUGGGACCACCUGUAGAAGGU 5
			AL-DP-4059	S	2062	5 ACCCUGGUGGGACAUCUUCCTT 3
				AS	2063	3 TTUGGGACCACCUGUAGAAGG 5
168	2227	GACCCUGGUGGGACAUCUUCAGG	AL-DP-4010	S	2064	5 CCCUGGUGGGACAUCUUCAGG 3
				AS	2065	3 CUGGGACCACCUGUAGAAGGUCC 5
			AL-DP-4060	S	2066	5 CCCUGGUGGGACAUCUUCATT 3
				AS	2067	3 TTGGGACCAACCUGUAGAAGGU 5
169	2228	ACCCUGGUGGGACAUCUUCAGGA	AL-DP-4073	S	2068	5 CCUGGUGGGACAUCUUCAGGA 3
				AS	2069	3 UGGGACCACCUGUAGAAGGUCCU 5
			AL-DP-4104	S	2070	5 CCUGGUGGGACAUCUUCAGTT 3
				AS	2071	3 TTGGGACCAACCUGUAGAAGGU 5
170	2229	CCCUGGUGGGACAUCUUCAGGAG	AL-DP-4011	S	2072	5 CUUGGUGGGACAUCUUCAGGAG 3
				AS	2073	3 GGGACCACCUGUAGAAGGUCCUC 5
			AL-DP-4089	S	2074	5 CUUGGUGGGACAUCUUCAGGTT 3
				AS	2075	3 TTGACCACCUGUAGAAGGUCC 5
171	2230	CCUGGUGGGACAUCUUCAGGAGU	AL-DP-4074	S	2076	5 UGGUGGGACAUCUUCAGGAGU 3
				AS	2077	3 GGACCACCUGUAGAAGGUCCUCA 5
			AL-DP-4090	S	2078	5 UGGUGGGACAUCUUCAGGATT 3
				AS	2079	3 TTACCAACCUGUAGAAGGUCCU 5
172	2231	CUGGUGGGACAUCUUCAGGAGUA	AL-DP-4039	S	2080	5 GGUGGGACAUCUUCAGGAGUA 3
				AS	2081	3 GACCACCUGUAGAAGGUCCUAU 5
			AL-DP-4091	S	2082	5 GGUGGGACAUCUUCAGGAGTT 3
				AS	2083	3 TTCCACCUGUAGAAGGUCCUC 5
175	2232	GUGGACAUUCUGGCCAGGAGUACCC	AL-DP-4003	S	2084	5 GGACAUUCAGGAGUACCC 3
				AS	2085	3 CCUGUAGAAGGUCCUCAGGG 5
			AL-DP-4116	S	2086	5 GGACAUUCAGGAGUACCC 3
				AS	2087	3 CCUGUAGAAGGUCCUCAGGG 5

10

20

30

40

【表4-11】

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
179	2233	ACAUCAUCCAGGAGUACCCUGAU	AL-DP-4015	S	2088	5 GGACAUCAUCCAGGAGUACTT 3
				AS	2089	3 TTCCUGUAGAAGGUCCUCAUG 5
			AL-DP-4120	S	2090	5 GGACAUCAUCCAGGAGUAC 3
				AS	2091	3 CCUGUAGAAGGUCCUCAUG 5
191	2234	AGUACCCUGAUGAGAGAUCGAGUAC	AL-DP-4032	S	2092	5 AUCUCCAGGAGUACCCUGAU 3
				AS	2093	3 UGUAGAAGGUCCUCAUGGGACUA 5
192	2235	GUACCCUGAUGAGAGAUCGAGUACA	AL-DP-4042	S	2094	5 UACCCUGAUGAGAGAUCGGAGTT 3
				AS	2095	3 TTAUGGGACUACUCUAGCUCA 5
			AL-DP-4063	S	2096	5 ACCCUGAUGAGAGAUCGAGUACA 3
				AS	2097	3 CAUAGGGACUACUCUAGCUAUGU 5
209	2236	AGUACAUCAUCAAGCCAUCUGU	AL-DP-4064	S	2100	5 UACAUCAUCAAGCCAUCCTT 3
				AS	2101	3 TTAUGUAGAAGGUUCGGUAGGA 5
260	2237	GCAAUGACCGAGGCCUGGGAGUGU	AL-DP-4044	S	2102	5 AAUGACGAGGGCCUGGGAGUGU 3
				AS	2103	3 CGUUACUGGUUCGGGACCUACACA 5
263	2238	AUGACGAGGCCUGGGAGUGUGUG	AL-DP-4045	S	2104	5 GACGAGGCCUGGGAGUGUGUG 3
				AS	2105	3 UACUGGUUCGGGACCUACACAC 5
279	2239	GUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCA	AL-DP-4046	S	2106	5 GUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCA 3
				AS	2107	3 CACACACGGGUAGACUCCUCAGGU 5
281	2240	GUGUGCCCACUGAGGAGUCCAAC	AL-DP-4096	S	2108	5 GUGGCCACUGAGGAGUCCAAC 3
				AS	2109	3 CACACGGGUAGACUCCUCAGGUUG 5
283	2241	GUGCCCACUGAGGAGUCCAACAU	AL-DP-4040	S	2110	5 GCCCACUGAGGAGUCCAACAU 3
				AS	2111	3 CACGGGUAGACUCCUCAGGUUGUA 5
289	2242	ACUGAGGAGUCCAACAUCAACCACAU	AL-DP-4065	S	2112	5 UGAGGAGUCCAACAUCAACCTT 3
				AS	2113	3 TTACUCUCAGGUUGUAGUGG 5
302	2243	ACAUCACCAUGCAGAUUAUGCAG	AL-DP-4100	S	2114	5 AUCACCAUGCAGAUUAUGCAG 3
				AS	2115	3 UGUAGUGGUACGUUAUACGCC 5
305	2244	UCACCAUGCAGAUUAUGCAGAAC	AL-DP-4033	S	2116	5 ACCAUGCAGAUUAUGCAGGATT 3
				AS	2117	3 TTUGGUACGUUAUACGCCU 5

10

20

30

40

【表4-12】

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	AUGCAGAUUAUGC GG AUCA AACCC	AL-DP-4101	S	2118	5 GCAGAUUAUGC GG AUCA AACCC 3
				AS	2119	3 UACGUCUAAUACGCCUAGUUU JGG 5
312	2246	GCAGAUUAUGC GG AUCA AACCCUC	AL-DP-4102	S	2120	5 AGAUUAUGC GG AUCA AACCCUC 3
				AS	2121	3 CGUCUAAUACGCCUAGUUU JGGAG 5
315	2247	GAUUAUGC GG AUCA AACCU CACC	AL-DP-4034	S	2122	5 UGAUGC GG AUCA AACCU CATT 3
				AS	2123	3 TTAAUACGCCUAGUUU JGGAGU 5
316	2248	AUUAUGCGG AUCA AACCU CACCA	AL-DP-4113	S	2124	5 UAUGC GG AUCA AACCU CACTT 3
				AS	2125	3 TTAAUACGCCUAGUUU JGGAGUG 5
317	2249	UUAUGC GG AUCA AACCU CACCAA	AL-DP-4114	S	2126	5 AUGCGG AUCA AACCU CACCTT 3
				AS	2127	3 TTUACGCCUAGUUU JGGAGUGGG 5
319	2250	AUGCGG AUCA AACCU CACCA AGG	AL-DP-4002	S	2128	5 GCGGAUCA AACCU CACCA AGG 3
				AS	2129	3 UACGCCUAGUUU JGGAGUGGUUCC 5
			AL-DP-4115	S	2130	5 GCGGAUCA AACCU CACCAA 3
				AS	2131	3 CGCCUAGUUU JGGAGUGGUU 5
			AL-DP-4014	S	2132	5 GCGGAUCA AACCU CACCA ATT 3
				AS	2133	3 TTCGCCUAGUUU JGGAGUGGUU 5
			AL-DP-4119	S	2134	5 GCGGAUCA AACCU CACCAA 3
				AS	2135	3 CGCCUAGUUU JGGAGUGGUU 5
321	2251	GCGGAUCA AACCU CACCA AGGCC	AL-DP-4013	S	2136	5 GGAUCA AACCU CACCA AGGCC 3
				AS	2137	3 CGCCUAGUUU JGGAGUGGUUCCGG 5
341	2252	GCCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCC	AL-DP-4075	S	2138	5 CAGCACAUAGGAGAGAUGAGC 3
				AS	2139	3 CGGUUCGUGUAUCCUCUCUACUCG 5
			AL-DP-4105	S	2140	5 CAGCACAUAGGAGAGAUGAGATT 3
				AS	2141	3 TTGUCGUGUAUCCUCUCUACU 5
342	2253	CCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCU	AL-DP-4050	S	2142	5 ACCACAUAGGAGAGAUGAGCU 3
				AS	2143	3 GGUUCGUGUAUCCUCUCUACUCG 5
			AL-DP-4106	S	2144	5 ACCACAUAGGAGAGAUGAGTT 3
				AS	2145	3 TTUUCGUGUAUCCUCUCUACUC 5
343	2254	CAGCACAUAGGAGAGAUGAGCUU	AL-DP-4094	S	2146	5 CCACAUAGGAGAGAUGAGCUU 3
				AS	2147	3 GUUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAA 5

10

20

30

40

【表4-13】

ORF 内 の 位 置	配列 番号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖 番号	配列 番号	鎖配列
			AL-DP-4118	S 2148	5 GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU 3	
				AS 2149	3 CGUGUAUCCUCUACUCGGAA 5	
			AL-DP-4107	S 2150	5 GCACAUAGGAGAGAUGAGCTT 3	
				AS 2151	3 TTGUGUAUCCUCUACUCUG 5	
			AL-DP-4122	S 2152	5 GCACAUAGGAGAGAUGAGC 3	
				AS 2153	3 CGUGUAUCCUCUACUCUG 5	
344	2255	AGCACAUAGGAGAGAUGAGCUUC	AL-DP-4012	S 2154	5 CACAUAGGAGAGAUGAGCUUC 3	
				AS 2155	3 UCGUGUAUCCUCUACUCGAAG 5	
			AL-DP-4108	S 2156	5 CACAUAGGAGAGAUGAGCTT 3	
				AS 2157	3 TTGUGUAUCCUCUACUCUGA 5	
346	2256	CACAUAGGAGAGAUGAGCUUCCU	AL-DP-4051	S 2158	5 CAUAGGAGAGAUGAGCUUCCU 3	
				AS 2159	3 GUGUAUCCUCUACUCGAAGGA 5	
			AL-DP-4061	S 2160	5 CAUAGGAGAGAUGAGCUUCTT 3	
				AS 2161	3 TTGUAUCCUCUACUCUGAAG 5	
349	2257	AUAGGGAGAGAUGAGCUUCCUACA	AL-DP-4082	S 2162	5 AGGAGAGAUGAGCUUCCUACA 3	
				AS 2163	3 UAUCCUCUACUCCAGGAUCU 5	
369	2258	ACAGCACACAAAUGUGAAUGCA	AL-DP-4079	S 2164	5 AGCACACAAAUGUGAAUGCA 3	
				AS 2165	3 UGUCCUGUUGUUUACACUUACGU 5	
372	2259	GCACACACAAAUGUGAAUGCAGAC	AL-DP-4097	S 2166	5 ACACACACAAAUGUGAAUGCAGAC 3	
				AS 2167	3 CGUGUUGUUUACACUUACGUCUG 5	
379	2260	AAAUGUGAAUGCAGACCAAAGAA	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 CACUUACGUCUGGUUUCUUC 5	
			AL-DP-4016	S 2176	5 GUGAAUGCAGACCAAAGAATT 3	
				AS 2177	3 TTACACUUACGUCUGGUUUCU 5	

10

20

30

40

【表4-14】

ORF 内 の 位置	配列 番号	標的配列 (5'-3')	二重鎖 ID	鎖 番号	配列 番号	鎖配列
			AL-DP-4121	S 2178	5 GUGAAUGCAGACCAAGAA 3	
383 2263	SUGAAUGCAGACCAAAGAAAGAU		AL-DP-4005	AS 2179	3 CACUUACGUCUGGUUUCUU 5	
				S 2180	5 GAAUGCAGACCAAAGAAAGAU 3	
			AL-DP-4053	AS 2181	3 CACUUACGUCUGGUUUCUUUCUA 5	
				S 2182	5 GAAUGCAGACCAAAGAAAGTT 3	
				AS 2183	3 TTCCUUACGUCUGGUUUCUUUC 5	

10

20

30

【0235】

実施例2. 細胞増殖を介した Eg5 siRNA のインピトロスクリーニング

Eg5 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)、siRNA 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 siRNA 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)。

【0236】

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、siRNA 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。siRNA のサブセットを種々の siRNA 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)。

【0237】

表 5 : 25 nM での細胞生存率に対する Eg5 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	標準偏差	スクリーニング II	標準偏差	スクリーニング III	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回繰り返してを行い、細胞増殖の50パーセントの阻害をもたらす各siRNAの濃度($I_{C_{50}}$)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 $I_{C_{50}}$ 値(nM)を表6に示す。

【0239】

表6：siRNAの $I_{C_{50}}$ ：HeLa細胞中の細胞増殖

10

20

30

【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Eg5 siRNA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 Promochem 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 (Frickelnhausen, 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 Lipofectamine 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 °C 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

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 (Genospectra (Freemont, 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 °C で 30 分間溶解した。その後、50 µl の溶菌液をヒト Eg5 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 siRNA 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 1b、2b、および 3b)。

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つて、Opti-MEMを用いて12.5 μlの最終濃度に希釀した。データ分析は、Microsoft Excelの拡張ソフトウェアであるXL-fit 4.2 (IDBS (Guilford, Surrey, UK))を使用し、用量反応モデル番号205を適用して行った(表1b、2b、および3b)。

【0243】

優位なs i R N AであるAD12115を、R o c h eからの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。

【0244】

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 nM ~ 10 f Mの範囲の最終濃度でHeLa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)。

【0245】

表7：HeLa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

10

20

30

40

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 の単回ボー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23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。

50

【0247】

試験したKSP二重鎖

【化12】

二重鎖ID:	標的	センス	アンチセンス
AD6248	KSP	Ac-GAA-Ga-Gau-Guu-Guc-TsT (SEQ ID NO:1238)	GGAcAAA-AcAAcACUUCGGUTsT (SEQ ID NO:1239)

【0248】

方法

動物の投薬。雄の幼若 Sprague-Dawleyラット(19日齢)に、尾静脈注射を介して単回用量の脂質様(「LNP01」)製剤化siRNA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(mg/kg)の用量の、AD6248または非特異的siRNA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siRNA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、siRNA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。

【0249】

mRNA測定。全ての処置群からの肝臓の、Eg5/KSP mRNAのレベルを測定した。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、Eg5/KSP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、Eg5/KSP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。

【0250】

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。

【0251】

結果データ要約

Eg5/KSP mRNAの平均値(±標準偏差)を示す。PBS群に対する統計的有意性(p値)を示す(ns、有意でない[p > 0.05])。

【0252】

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

【0253】

肝臓Eg5/KSP mRNAにおける統計的に有意な低下が、10mg/kgの用量の製剤化AD6248を用いた処置後に得られた。

【0254】

実施例5. LNP01製剤化VSPの静脈内注入後のラット肝臓VEGFの発現停止

2つのsiRNA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、VEGFを対象とするAD3133、およびEg5/KSPを対象とするAD12115の二重鎖を使用した。Eg5/KSP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、VEGFのレベルのみをsiRNA処置後に測定した。

【0255】

10

20

30

40

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	ucGAGAAUCUAACUAAACUTT (配列番号 1240)	AGGUAGUUAGAUUCUCGATsT (配列番号 1241)
AD3133	VEGF	GcAcAuAGGAGAGAuGAGCusU (配列番号 1242)	AAGCUcAUCUCUCCuAuGuGCusG (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' UCGAGAAUCUAACUAACUTT 3'	配列番号 : 1534
	非修飾アンチセンス 標的	3' TTAGUCUUAGAUUUGAUJUGA 5' 5' UCGAGAAUCUAACUAACU 3'	配列番号 : 1535 配列番号 : 1311
VEGF	非修飾センス	5' GCACAUAGGGAGAGAUGAGCUU 3'	配列番号 : 1536
	非修飾アンチセンス 標的	3' GUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAA 5' 5' GCACAUACGGAGAGAUGAGCUU 3'	配列番号 : 1537 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 (「 L N P 0 1 」) 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 (m g / k g) 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 N D 9 8 · 4 H C l (M W 1 4 8 7) (式 1 、上記) 、コレステロール (S i g m a - A l d r i c h) 、および P E G - C e r a m i d e C 1 6 (A v a n t i P o l a r L i p i d s) 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、N D 9 8 (1 3 3 m g / m L) 、コレステロール (2 5 m g / m L) 、 P E G - C e r a m i d e C 1 6 (1 0 0 m g / m L) を調製した。次いで、 N D 9 8 、コレステロール、および P E G - C e r a m i d e C 1 6 の原液を、 4 2 : 4 8 : 1 0 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 3 5 ~ 4 5 % 、かつ最終酢酸ナトリウム濃度が 1 0 0 ~ 3 0 0 m M となるように、 s i R N A 水溶液 (酢酸ナトリウム、 p H 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、サーモバレル押出機 (L i p e x E x t r u d e r 、 N o r t h e r n L i p i d s , I n c) を使用して、ポリカーボネート膜 (例えば、 1 0 0 n m 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 (P B S) p H 7 . 2 に交換した。 40

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

30

40

【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 (Geno Spectra) 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。

【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。

【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 V E G F m R N A 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 s i R N A 用量レベルで測定された。

【0266】

20

実施例 6 . ヒト肝腫瘍のマウスモデルにおける V S P S N A L P の評価。

これらの研究は、K S P / E g 5 を標的とする d s R N A および V E G F を標的とする d s R N A を含有する V S P s i R N A カクテルを利用した。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、A D 3 1 3 3 (V E G F を対象とする) および A D 1 2 1 1 5 (E g 5 / K S P を対象とする) の二重鎖を使用した。s i R N A カクテルを S N A L P に製剤化した。

【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 s i R N A S N A L P カクテルの有効性を試験するために、1 × 1 0 ^ 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 4 8 ~ 7 2 時間以内に完全に回復した。S N A L P s i R N A 処置は、腫瘍の播種から 8 ~ 1 1 日後に開始した。

【0268】

利用した S N A L P 製剤は、(i) V S P (K S P + V E G F s i R N A カクテル (1 : 1 モル比))、(i i) K S P (K S P + L u c s i R N A カクテル)、および (i i i) V E G F (V E G F + L u c s i R N A カクテル) であった。全ての製剤が、等量 (m g) の各活性 s i R N A を含有した。全てのマウスが総 s i R N A / 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 : 5 7 c D M A S N A L P (1 . 4 % P E G - c D M A 、 5 7 . 1 % D L i n D M A 、 7 . 1 % D P P C 、および 3 4 . 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 H e p 3 B 研究 A : V S P - S N A L P の抗腫瘍活性

肝内播種によって、ヒト肝癌 H e p 3 B 腫瘍を S C I D (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 P B S を投与し、群 B (n = 6) の動物には V S P S N A L P を投与し、群 C (n = 5) の動物には K S P / L u c S N A L P を投与し、群 D (n = 5) の動物には V E G F / L u c S N A L P を投与した。

40

【0270】

S N A L P 処置は、腫瘍の播種から 8 日後に開始した。S N A L P は、3 m g / k g の総 s i R N A を週 2 回 (月曜日および木曜日) 、合計 6 用量 (累積で 1 8 m g / k g 的 s i R N A) を投薬した。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 m R N A 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	++++	10
	2	++++	
	3	++	
	4	+++	
	5	++++	
	6	++++	
群B: VSP (VEGF + KSP/Eg5)、27日目	1	+	20
	2	-	
	3	-	
	4	-	
	5	++	
	6	-	
群C: KSP (Luc + KSP)、27日目	1	+	30
	2	++	
	3	-	
	4	+	
	5	++	
群D: VEGF	1	++++	

【表10-2】

(Luc + VEGF)、27日目	2	-	40
	3	++++	
	4	+++	
	5	++++	

【0274】

体重の割合としての肝重量を図1に示す。

【0275】

体重を図2A～2D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)VEGFiRNA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)1955SNALP(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、1:57cDMA SNALP、および6:1の脂質:薬物であった。

10

【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)を投薬した。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。

20

【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】

30

	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	+++

【表11-2】

	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

30

40

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 (2mg/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。

【0284】

腫瘍量を、定量的RT-PCR (qRT-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、GADPHレベルと相關した(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)。

【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4mg/kgのLuc-1955 SNALPを投与し、群Cの動物には4mg/kgのSNALP-VSPを投与し、群Dの動物には、2mg/kgのSNALP-VSPを投与し、群Eの動物には1mg/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hGAPDH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。

【0288】

表12.

【表12】

	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。

【0289】

ヒト（腫瘍由来）KSPの発現停止をTaqman分析によってアッセイし、結果を図10に示す。hKSP発現は、hGAPDHに基準化した。約80%の腫瘍のKSPの発現停止が、4mg/kgのSNALP-VSPで観察され、有効性は1mg/kgで明白であった。図9の透明のバーは、小さな（低GAPDH）腫瘍からの結果を表す。

【0290】

ヒト（腫瘍由来）VEGFの発現停止をTaqman分析によってアッセイし、結果を図10に示す。hVEGF発現は、hGAPDHに基準化した。約60%の腫瘍のVEGFの発現停止が、4mg/kgのSNALP-VSPで観察され、有効性は1mg/kgで明白であった。図10の透明のバーは、小さな（低GAPDH）腫瘍からの結果を表す。

40

【0291】

マウス（肝臓由来）VEGFの発現停止をTaqman分析によってアッセイし、結果を図11Aに示す。mVEGF発現は、hGAPDHに基準化した。約50%の肝臓のVEGFの発現停止が、4mg/kgのSNALP-VSPで観察され、有効性は1mg/kgで明白であった。

【0292】

50

ヒトHepB3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(HepB3)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(i.v.)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(hGAPDH 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(3mg/kg)で処理し、群CをSNALP-VEGF+Luc(3mg/kg)で処理し、群DをALN-VSP02(3mg/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(1mg/kg)で処理し、群CをALN-VSP02(1mg/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Hep3B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、2mg/kgの総siRNAの(i)VSP SNALP、または(ii)対照(Luc)SNALPの単回静脈(I.V.)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(5~10mm)が、剖検において明白であった。

【0300】

Hep3B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I.V.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、Hep3B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Hep3B、 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（i.v.）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% PE G - cDMA、57.1% DLindDMA、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、4mg/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13-2】

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

30

【0308】

表14. 各動物についての生存日数。

【表14-1】

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

30

【表14-2】

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

【0309】

図13Aは、腫瘍の播種後の日数と対比した、SNALP-VSP動物およびSNALP-Luc処置動物の平均生存率を示す。SNALP-VSP動物の平均生存率は、SNALP-Luc処置動物に対して約15日延びた。

【0310】

表15. 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(AFP)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

【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。

【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. 確立された腫瘍中の单星 (Monosatir) 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单星の形成に通じる。SN

10

20

30

40

50

ALP-VSP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（Hept3B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、腫瘍を担持する肝葉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】

10

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】

20

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-VSPDS01	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】

30

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、従来の固相オリゴスクレオチド合成によって、各二重鎖の2つの単鎖オリゴスクレオチド(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のホスホラミダイト法による、オリゴス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、適切に保護されたリボ、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スクレオチドの遊離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。粗オリゴスクレオチドを、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'TBDMS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

40

50

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 16 - 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
バイオバーデン	修正 USP <61>	< 100 CFU/g

【0321】

表 16 b : 原体の安定性

10

20

30

40

【表16-2】

ロット番号: A05M07001N			研究保管条件: -20°C (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、標的組織へのこ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DLinDMA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。ポリエチレンギリコール脂質共役PEG2000-C DMAは、薬品の安定性を補助し、使用案に最適な循環時間を探する。ALN-VSP02脂質粒子は、低い多分散値の、約8

10

20

30

40

50

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6mV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-VSPD02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-ジパルミトイール-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

10

20

30

40

* 薬品中の2つのsiRNAの1:1のモル比を、薬品粒子の粒径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80~90nmの平均粒径を有する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、0.45/0.2μm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（diafiltration）した。製造過程中の試験および2.0mg/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-VSPD02の過程を、図18に流れ図で示す。

【0325】

表18a：ALN-VSPD02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°C					
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-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
ALN-VS PDS01識別名、 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	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°C					
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-HPLC	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-HPLC	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-HPLC	≥ 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°C					
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

【0329】

表 18 c : 25 / 周囲湿度での A L N - V S P 0 2 の安定性例

【表 18 - 6】

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
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

10

20

30

40

【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、 DLinDM 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	10
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、 ≥ 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	1 16	20
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	<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	

10

20

30

【0330】

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

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 ATCC カタログ番号

系

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

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

20

30

【0332】

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SNA LP-Lucのいずれかを、1.8μMで開始し、10pM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】

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CellTiter 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Hep3B肝内腫瘍における、ソラフェニブに対するVSP-SNALPの抗腫瘍有効性

確立されたHep3B肝内腫瘍を担持するSCID/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VSP-SNALP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(HCC)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、SCID/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siRNA-SNALP、ソラフェニブおよびVSP-siRNA-SNALP、またはVSP-siRNA-SNALP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DMSO、およびsiRNA-SNALPの代わりにPBS)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15mg/kgを合計15回の注射で腹腔内に投与した。ソラフェニブは、SNALPの注射後、最低1時間投与した。siRNA-SNALP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(10ml/kg)に基づく3mg/kgに従って、側部尾静脈を介して投与した。

【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VSP-siRNA-SNALPのみの投与と比較して、VSP-siRNA-SNALP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、VSP-siRNA-SNALPによって生存割合が増加した。

【0340】

実施例12.AD-12115およびAD-3133の変異体を使用したVSPのインピトロ有効性

Eg5/KSPおよびVEGF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、AD-12115およびAD-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。

【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、Eg5/KSP dsRNAをVEGF dsRNA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。

【0343】

表21: VEGFおよびEg5/KSPを標的とするdsRNAの配列(タイリング)

10

20

30

40

【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	AGGCCAGCACAUAGGAGAGTsT	2312
				CUCUCCuAUGUGCUGGCCUTsT	2313
AD-20452.1	VEGFA	GGCCAGCACAUAGGAGAGA	2269	GGCCAGCACAUAGGAGAGATsT	2314
				UCUCUCCuAUGUGCUGGCCCTsT	2315
AD-	VEGFA	GGCAGCACAUAGGAGAGA	2270	GccAGccauAGCACAGAATsT	2316

10

20

【表 21 - 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	ccAGcAcAuAGGRGAGAGuGTsT	2318
				cAUCUCUCCuAUGUGCUGGTsT	2319
AD- 20455.1	VEGFA	CAGCACAUAGGAGAGAUGA	2272	cAGcAcAuAGGAGAGAGuGATsT	2320
				UcAUCUCUCCuAUGUGCUGTsT	2321
AD- 20456.1	VEGFA	AGCACAUAGGAGAGAUGAG	2273	AGcAcAuAGGAGAGAGuGAGTsT	2322
				CuAUCUCUCCuAUGUGCUTsT	2323
AD- 20457.1	VEGFA	CACAUAGGAGAGAUGACCU	2274	cACAUAGGAGAGAGuGAGcuTsT	2324
				AGCuCAUCUCUCCuAUGUGTsT	2325
AD- 20458.1	VEGFA	ACAUAGGAGAGAUGAGCUU	2275	AcAUAGGAGAGAGuGAGcuuTsT	2326
				AAGCuCAUCUCUCCuAUGUTsT	2327
AD- 20459.1	VEGFA	CAUAGGAGAGAUGAGCUUC	2276	cAuAGGAGAGAGuGAGcuuCTsT	2328
				GAAGCUCAUCUCUCCuAUGTsT	2329
AD- 20460.1	VEGFA	AUAGGAGAGAUGAGCUUCC	2277	AuAGGAGAGAGuGAGCuuccTsT	2330
				GGAAGCUCAUCUCUCCuAUTsT	2331
AD- 20461.1	VEGFA	UAGGAGAGAUGAGCUUCCU	2278	uAGGAGAGAGuGAGCuuccuTsT	2332
				AGGAAGCUCAUCUCUCCuATsT	2333
AD- 20462.1	VEGFA	AGGAGAGAGAUGAGCUUCCUA	2279	AGGAGAGAGuGAGcuuccuATsT	2334
				uAGGAAGCUCAUCUCUCCUTsT	2335
AD- 20463.1	VEGFA	GGAGAGAGAUGAGCUUCCUAC	2280	GGAGAGAGuGAGcuuccuAcTsT	2336
				GuAGGAAGCUCAUCUCUCCTsT	2337
AD- 20464.1	VEGFA	GAGAGAGAGCUUCCUACACA	2281	GAGAGAGuGAGcuuccuAcATsT	2338
				UGuAGGAAGCUCAUCUCUCTsT	2339
AD- 20465.1	VEGFA	AGAGAUGAGCUUCCUACAG	2282	AGAGAGuGAGcuuccuAcAGTsT	2340
				CUGuAGGAAGCUCAUCUCUTsT	2341
AD- 20466.1	VEGFA	GAGAUGAGCUUCCUACAGC	2283	GAGAGuGAGcuuccuAcAGCsT	2342
				GCUGuAGGAAGCUCAUCUCUTsT	2343
AD- 20467.1	KSP	AUGUUCUUUAUCGAGAAUC	2284	AuGuuccuuAucGAGAAuCTsT	2344
				GAUUCUCGAGuAAGGAACAUTsT	2345
AD-	KSP	UGUUCUUUAUCGAGAAUC	2285	uGuuccuuAucGAGAAuCTsT	2346

10

20

30

40

【表 21 - 3】

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
20468.1					2347
AD- 20469.1	KSP	GUUCCUUUAUCGAGAAUCUA	2286	GuuccuuAucGAGAAucuATsT	2348
				uAGAUUCUCGAuAAGGAActsT	2349
AD- 20470.1	KSP	UUCUUUAUCGAGAAUCUA	2287	UuccuuAucGAGAAucuAATsT	2350
				UuAGAGUCUCGAuAAGGAAtsT	2351
AD- 20471.1	KSP	UCCUUAUOGAGAAUCUAAA	2288	uccuuAucGAGAAucuAAAtsT	2352
				UUuAGAUUCUCGAuAAGGAtsT	2353
AD- 20472.1	KSP	CCUUAUCGAGAAUCUAAAC	2289	ccuuAucGAGAAucuAAAcTsT	2354
				GUUuAGAUUCUCGAuAAGGTsT	2355
AD- 20473.1	KSP	CUUAUCGAGAAUCUAAACU	2290	CuuAucGAGAAucuAAAcUTsT	2356
				AGUuAGAUUCUCGAuAAGTstT	2357
AD- 20474.1	KSP	UUAUCGAGAAUCUAAACUA	2291	UuAucGAGAAucuAAAcuATsT	2358
				uAGUUuAGAUUCUCGAuAATsT	2359
AD- 20475.1	KSP	UUAUCGAGAAUCUAAACUA	2292	UuAucGAGAAucuAAAcuAATsT	2360
				UuAGUUuAGAUUCUCGAuATsT	2361
AD- 20476.1	KSP	AUCCGAGAAUCUAAACUAAC	2293	AucGAGAAucuAAAcuAAActstT	2362
				GUuAGUUuAGAUUCUCGAUTsT	2363
AD- 20477.1	KSP	CGAGAAUCUAAACUAACUA	2294	cGAGAAucuAAAcuAAcuATsT	2364
				uAGUuAGUUuAGAUUCUCGTsT	2365
AD- 20478.1	KSP	GAGAAUCUAAACUAACUAG	2295	GAGAAucuAAAcuAAAcuAGTsT	2366
				CuAGUuAGUUuAGAUUCUCTsT	2367
AD- 20479.1	KSP	AGAAUCUAAACUAACUAGA	2296	AGAAucuAAAcuAAAcuAGATsT	2368
				UCuAGUuAGUUuAGAUUCUTsT	2369
AD- 20480.1	KSP	GAAUCUAAACUAACUAGAA	2297	GAAucuAAAcuAAAcuAGAAATsT	2370
				UUUAcuAGUuAGUUuAGAUUCUTsT	2371
AD- 20481.1	KSP	AAUCUAAACUAACUAGAAU	2298	AAucuAAAcuAAAcuAGAAutstT	2372
				AAUUCuAGUuAGUUuAGAUUTsT	2373
AD- 20482.1	KSP	AUCUAAACUAACUAGAAUC	2299	AucuAAAcuAAAcuAGAAuctstT	2374
				GAUUCuAGUuAGUUuAGAUTsT	2375
AD-	KSP	UCUAAACUAACUAGAAC	2300	UCUAAACUAACUAGAACCT	2376

10

20

30

40

【表 2 1 - 4】

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
20483.1					2377
AD-20484.1	KSP	CUAAACUAACUAGAAUCCU	2301	CUAAACUAACUAGAAUccUTsT	2378
				ACGGAUUCuAGUuAGUuAGTsT	2379
AD-20485.1	KSP	UAAACUAACUAGAAUCCUC	2302	uAAAACuAACuAGAAUccuctsT	2380
				GAGGAUUCuAGUuAGUuATsT	2381
AD-20486.1	KSP	AAACUAACUAGAAUCCUCC	2303	AAAcuAACuAGAAUccuccTsT	2382
				GGAGGAUUCuAGUuAGUUUTsT	2383

【0 3 4 4】

実施例 1 3 . 単一平滑末端を有する V E G F を標的とする d s R N A

V E G F 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、A D - 3 1 3 3 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。

【0 3 4 5】

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。

【0 3 4 6】

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。V E G F 二重鎖は、単独で、および / または E g 5 / K S P d s R N A (例えば、A D - 1 2 1 1 5) 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。

【0 3 4 7】

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

【表22】

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	CCAGGCCAGCACAUAGGA	1366
AD-20449.1	2386	CAAGGCCAGCACAUAGGAG	1367
AD-20450.1	2387	AAGGCCAGCACAUAGGAGA	1368
AD-20451.1	2388	AGGCCAGCACAUAGGAGAG	1369
AD-20452.1	2389	GGCCAGGCACAUAGGAGAGA	1370
AD-20453.1	2390	GCCAGCACAUAGGAGAGAU	1371
AD-20454.1	2391	CCAGCACAUAGGAGAGAUG	1372
AD-20455.1	2392	CAGCACAUAGGAGAGAUGA	1373
AD-20456.1	2393	AGCACAUAGGAGAGAUGAG	1374
AD-20457.1	2394	CACAUAGGAGAGAUGAGCU	1376
AD-20458.1	2395	ACAUAGGAGAGAUGAGCUU	1377
AD-20459.1	2396	CAUAGGAGAGAUGACCUUC	1378
AD-20460.1	2397	AUAGGAGAGAUGAGCUUCC	1379
AD-20461.1	2398	UAGGAGAGAUGAGCUUCCU	1380
AD-20462.1	2399	AGGAGAGAUGAGCUUCCUA	1381

10

20

30

AD-20463.1	2400	GGAGAGAUGAGCUUCCUAC	1382
AD-20464.1	2401	GAGAGAUGAGCUUCCUACA	1383
AD-20465.1	2402	AGAGAGAUGAGCUUCCUACAG	1384
AD-20466.1	2403	GAGAUGAGCUUCCUACAGC	1385

【0348】

表23：VEGFを標的とした平滑末端d s RNAの鎖配列

【表23】

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	CUCUCUCAUGUGCUGGCCUUGGU	2426
AD-20450.1	AAGGCCAGCACAUAGGAGAGA	2407	UCUCUCCUAUGUGCUGGCCUUGG	2427
AD-20451.1	AGGCCAGCACAUAGGAGAGAU	2408	AUCUCUCCUAUGUGCUGGCCUUG	2428
AD-20452.1	GGCCAGCACAUAGGAGAGAUG	2409	CAUCUCUCCUAUGUGCUGGCCUU	2429
AD-20453.1	GCCAGCACAUAGGAGAGAUGA	2410	UCAUCUCUCCUAUGUGCUGGCCU	2430
AD-20454.1	CCAGCACAUAGGAGAGAUGAG	2411	CUCAUCUCUCCUAUGUGCUGGCC	2431
AD-20455.1	CAGCACAUAGGAGAGAUGAGC	2412	GCUCAUUCUCUCCUAUGUGCUGGC	2432
AD-20456.1	AGCACAUAGGAGAGAUGAGCU	2413	AGCUCAUCUCUCCUAUGUGCUGG	2433
AD-20457.1	CACAUAGGAGAGAUGAGCUUC	2414	GAAGCUCAUCUCUCCUAUGUGCU	2434
AD-20458.1	ACAUAGGAGAGAUGAGCUUCC	2415	GGAAGCUCAUCUCUCCUAUGUGC	2435
AD-20459.1	CAUAGGAGAGAUGAGCUUCCU	2416	AGGAAGCUCAUCUCUCCUAUGUG	2436
AD-20460.1	AUAGGAGAGAUGAGCUUCCUA	2417	UAGGAAGCUCAUCUCUCCUAUGU	2437
AD-20461.1	UAGGAGAGAUGAGCUUCCUAC	2418	GUAGGAAGCUCAUCUCUCCUAUG	2438
AD-20462.1	AGGAGAGAUGAGCUUCCUACACA	2419	UGUAGGAAGCUCAUCUCUCCUAU	2439
AD-20463.1	GGAGAGAUGAGCUUCCUACAG	2420	CUGUAGGAAGCUCAUCUCUCCUA	2440
AD-20464.1	GAGAGAUGAGCUUCCUACAGC	2421	GCUGUAGGAAGCUCAUCUCUCCU	2441
AD-20465.1	AGAGAUGAGCUUCCUACACCA	2422	UGCUGUAGGAAGCUCAUCUCUCC	2442
AD-20466.1	GAGAUGAGCUUCCUACAGCAC	2423	GUGCUGUAGGAAGCUCAUCUCUC	2443

【0349】

実施例14.ヒトにおけるEg5/KSPおよびVEGF発現の阻害

ヒト対象に、Eg5/KSPおよびVEGF遺伝子の発現を阻害するために、Eg5/KSP遺伝子を標的とするSNALPに製剤化したdsRNA、およびVEGF遺伝子を標的とするSNALPに製剤化したdsRNAの両方を有する医薬組成物、例えば、ALNVSP02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AFP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Eg5/KSPおよび/もしくはVEGFの発現、ならびに/またはEg5/KSPおよび/もしくはVEGF mRNAの成功したsiRNA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。

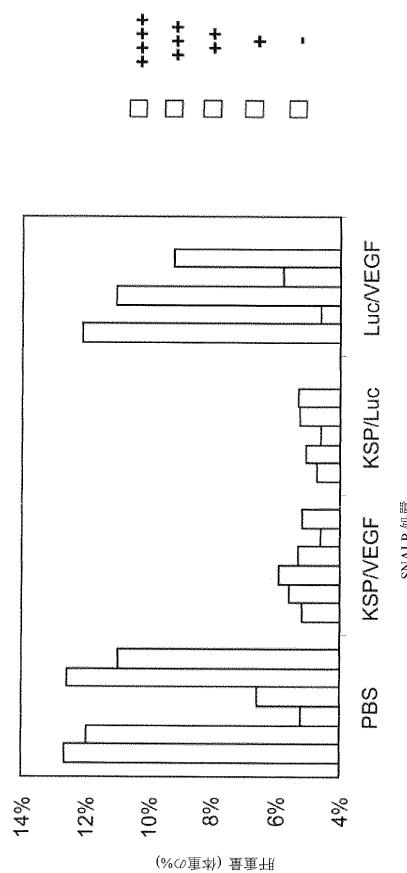
10

20

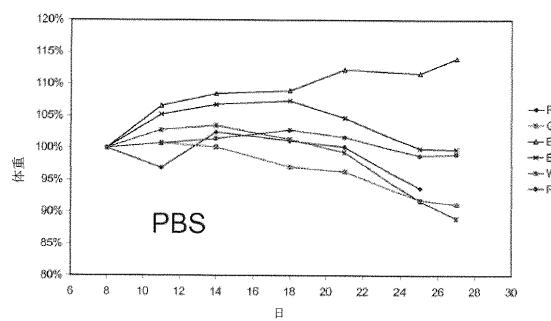
30

40

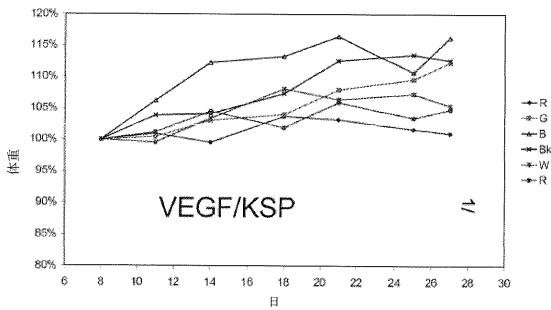
【図1】



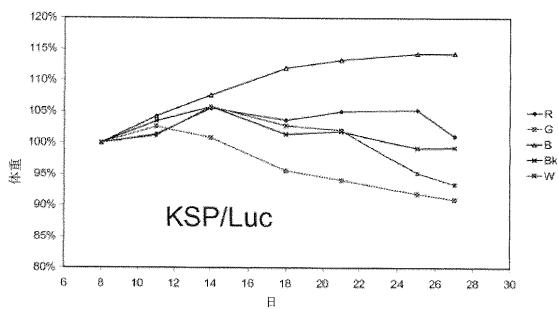
【図2 A】



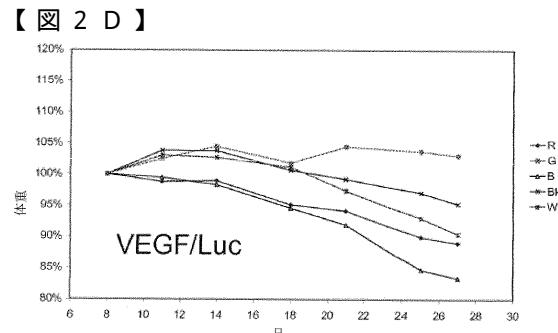
【図2 B】



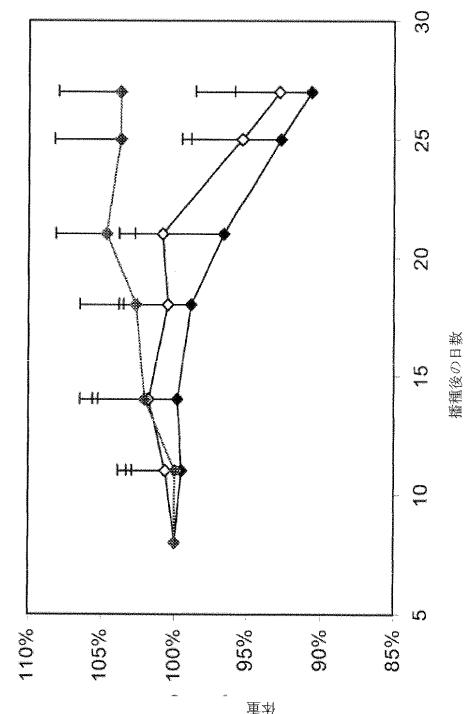
【図2 C】



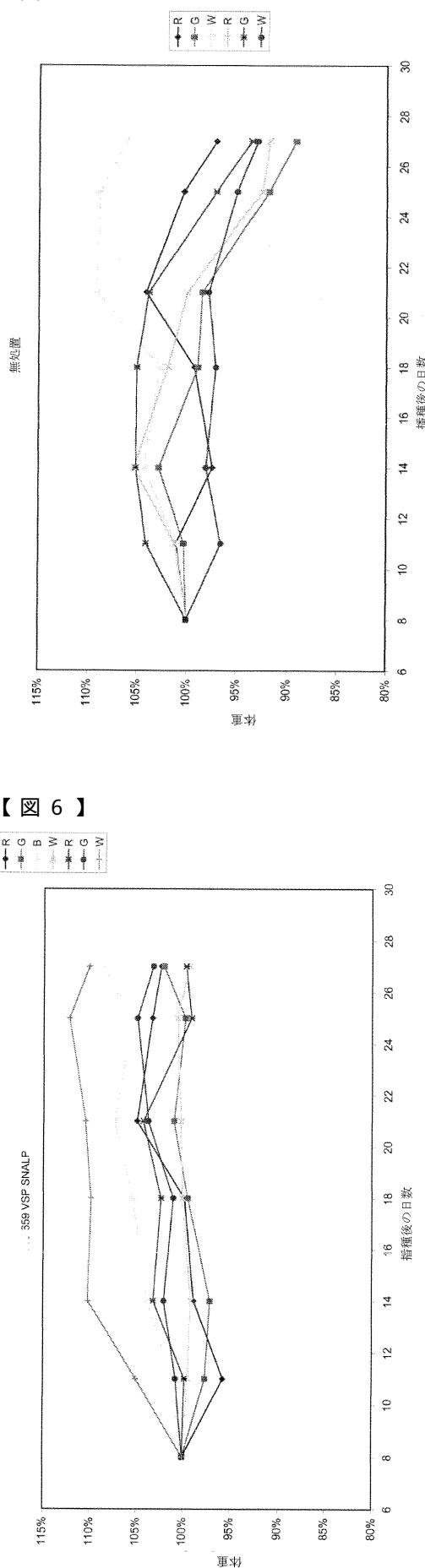
【図2 D】



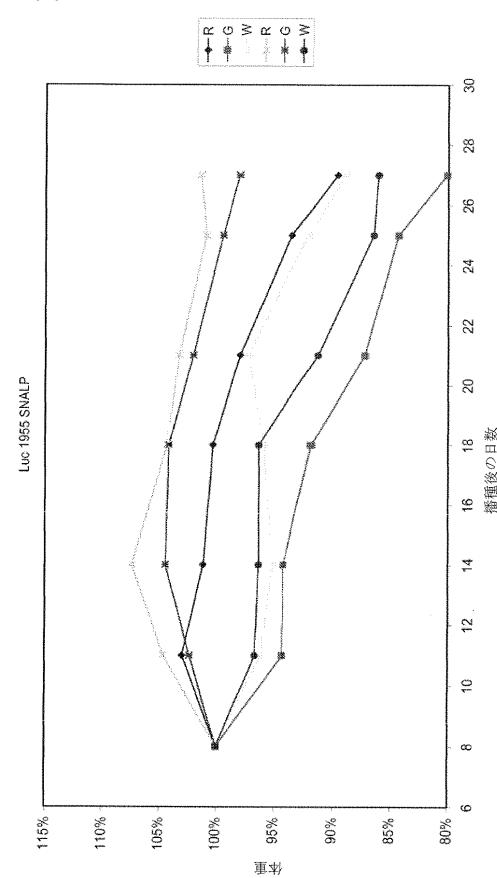
【図3】



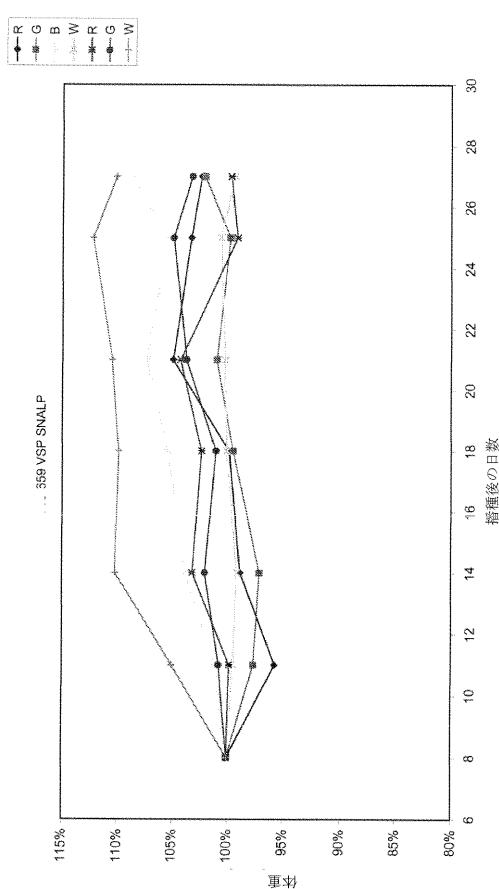
【図4】



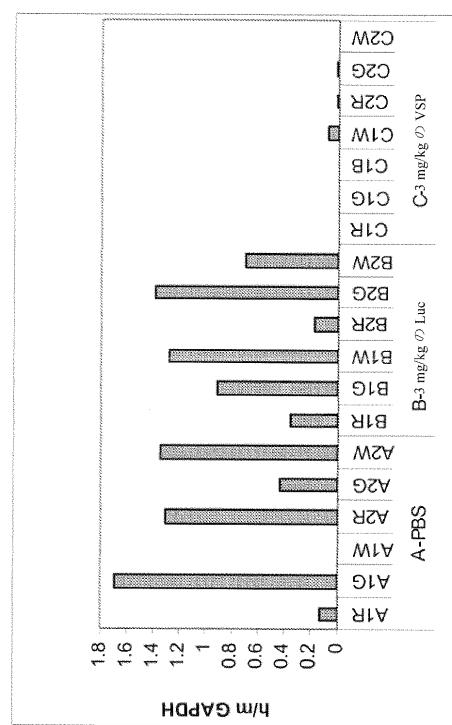
【図5】



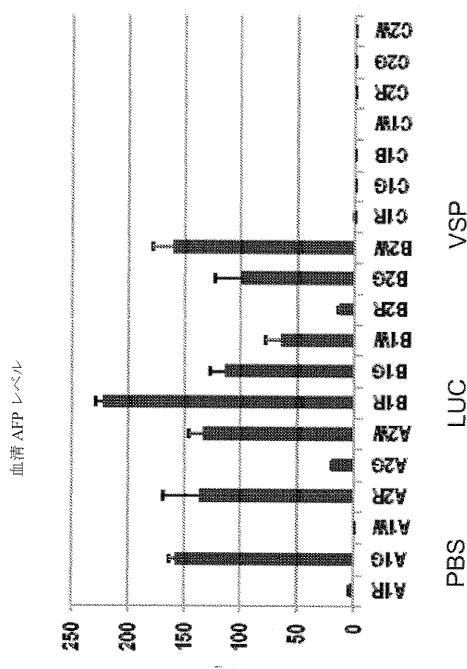
【図6】



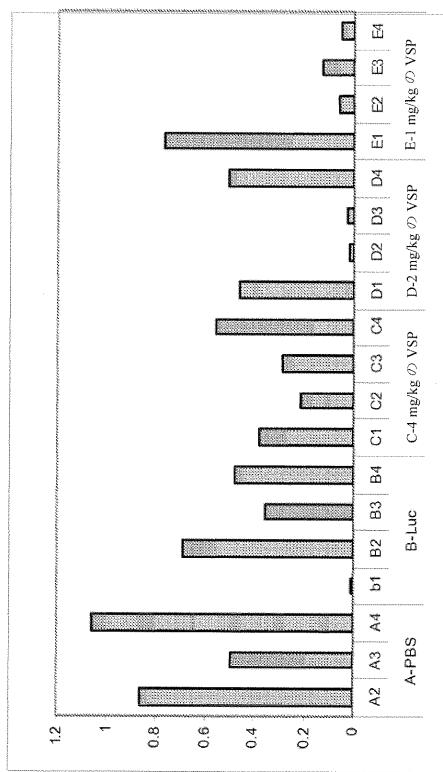
【図7 A】



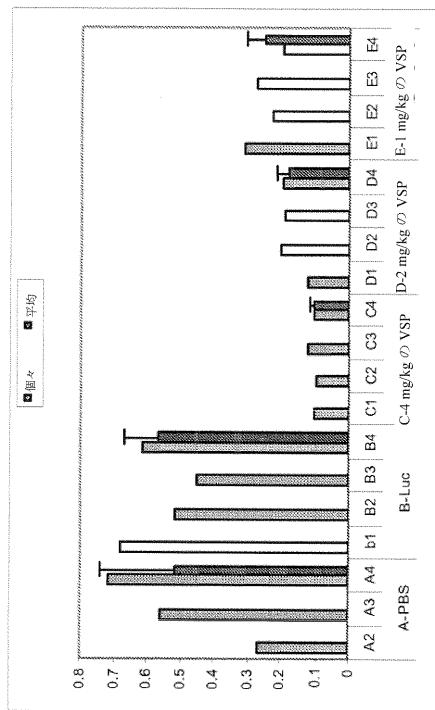
【図 7 B】



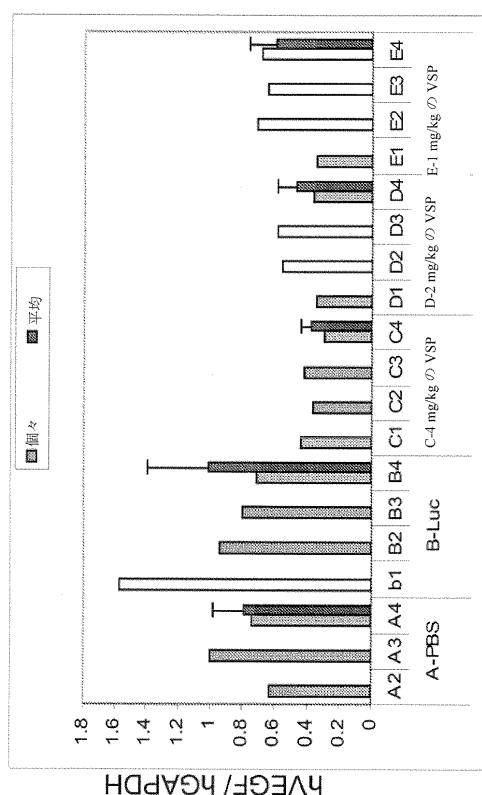
【図 8】



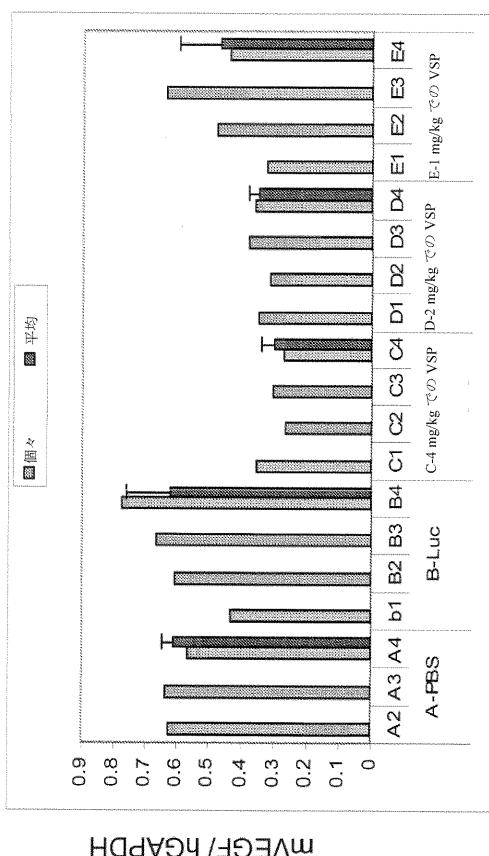
【図 9】



【図 10】

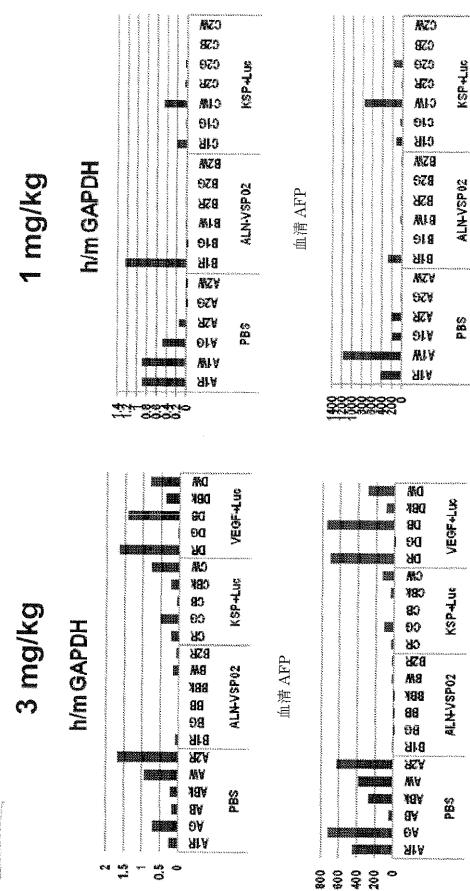


【図 1 1 A】

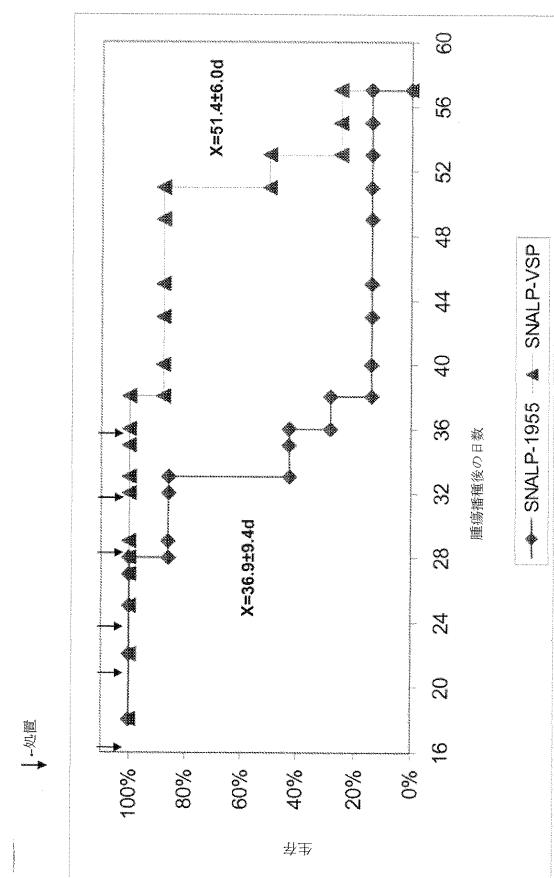


mVEGF/hGAPDH

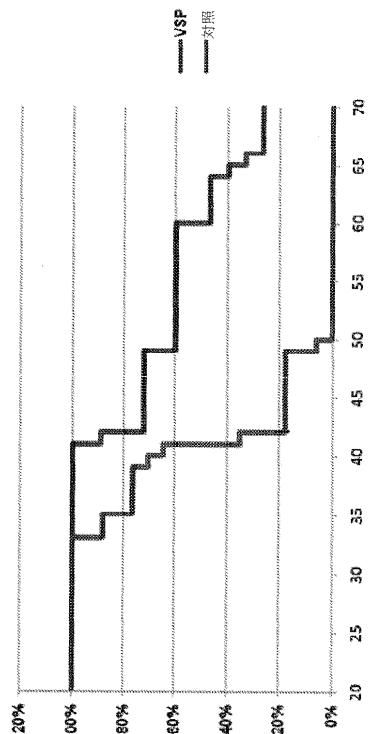
【図 1 1 B】



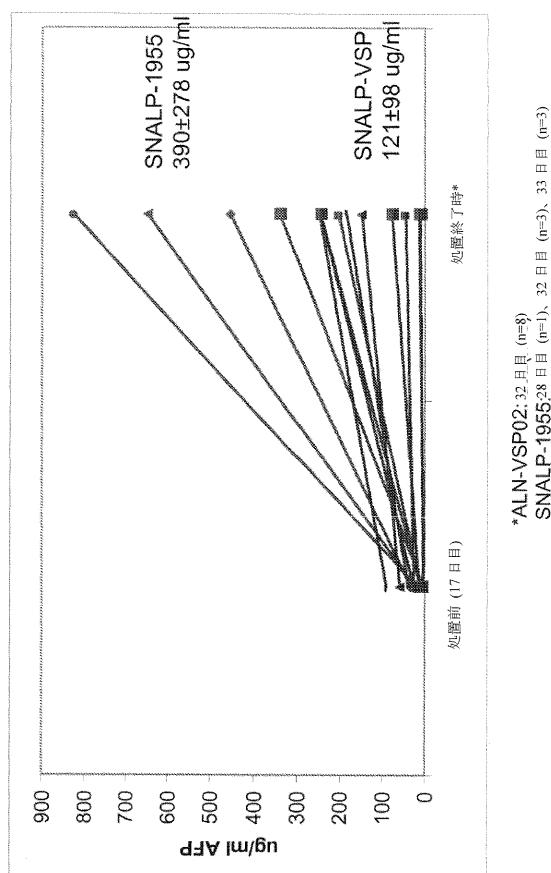
【図 13 A】



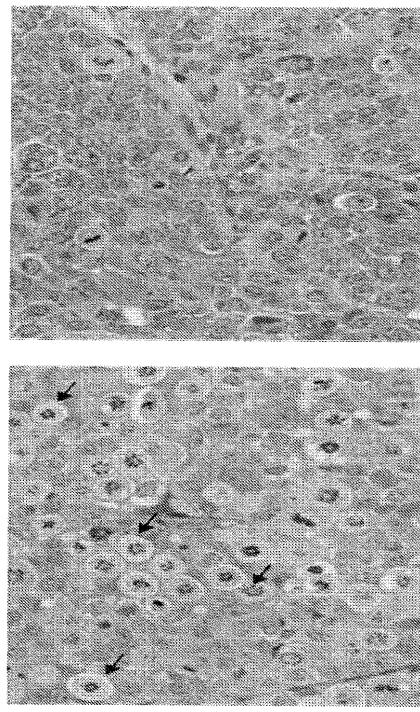
【図 13 B】



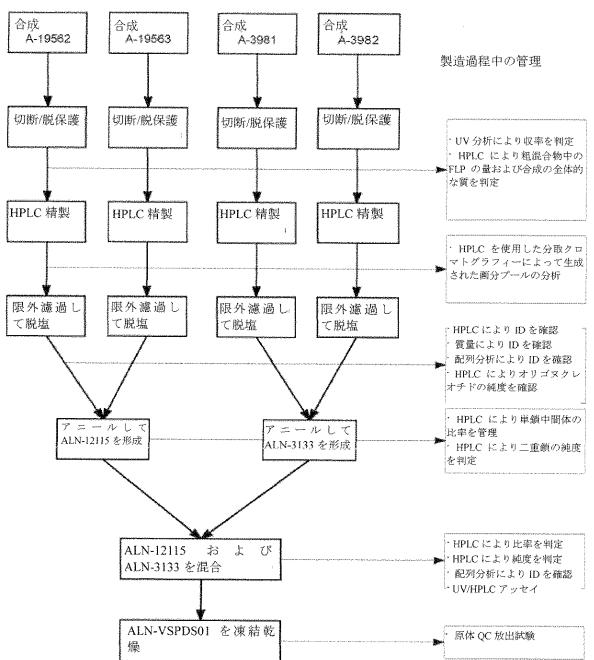
【図 14】



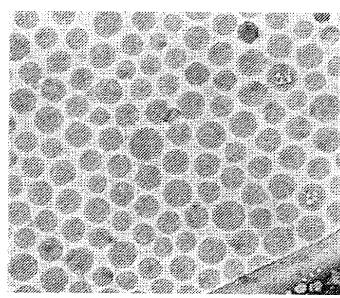
【図 15】



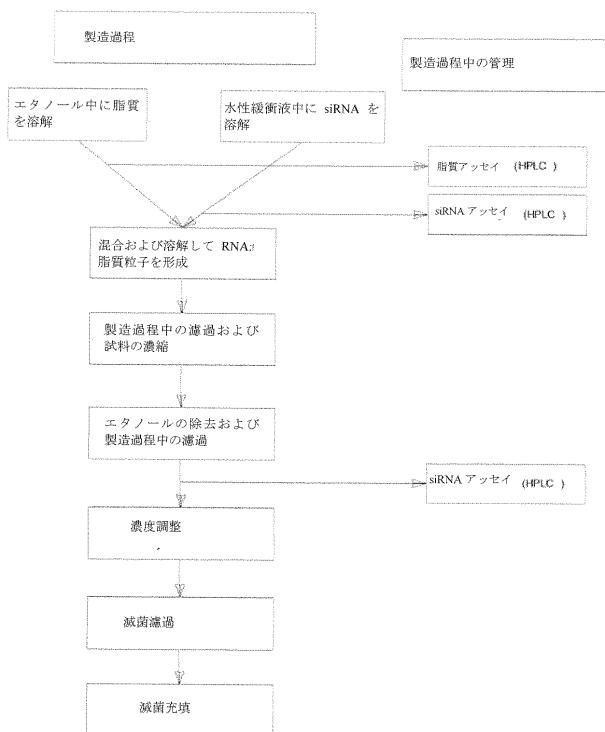
【図16】



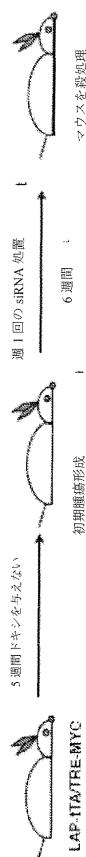
【図17】



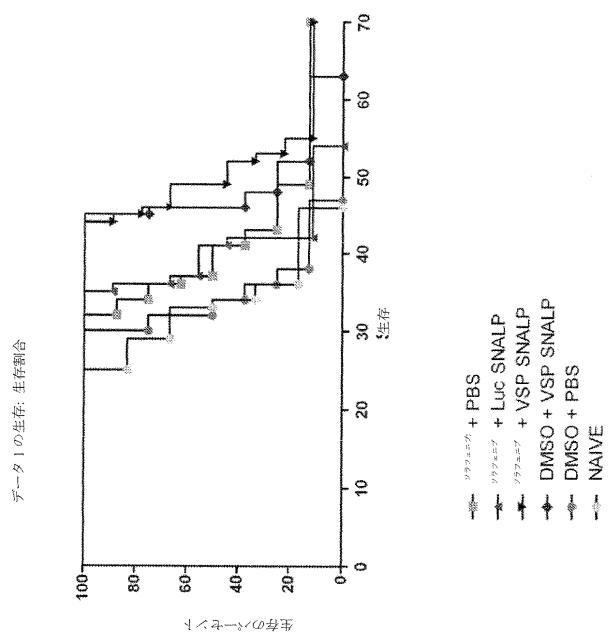
【図18】



【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) the whole document	1-21, 23-27
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	1-28
		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		
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.O. 5016 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*	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 CA EP KR US	2007233109 A1 2647728 A1 2008274 A2 20090010174 A 2007281899 A1		11-10-2007 11-10-2007 31-12-2008 29-01-2009 06-12-2007
WO 2007012191	A1	01-02-2007	AU CA CN EP JP	2006274413 A1 2616877 A1 101267805 A 1937213 A1 2009505957 T		01-02-2007 01-02-2007 17-09-2008 02-07-2008 12-02-2009
WO 2004065601	A2	05-08-2004	AT AU AU CA DE DE DK EP ES PT US	367441 T 2004206255 A1 2008203538 A1 2513809 A1 10302421 A1 602004007620 T2 1587926 T3 1587926 A2 2289474 T3 1587926 E 2006178324 A1		15-08-2007 05-08-2004 28-08-2008 05-08-2004 29-07-2004 10-04-2008 19-11-2007 26-10-2005 01-02-2008 26-10-2007 10-08-2006
WO 2005089224	A2	29-09-2005	AU CA EP JP US US	2005222902 A1 2559161 A1 1735009 A2 2007528736 T 2006094032 A1 2006223770 A1		29-09-2005 29-09-2005 27-12-2006 18-10-2007 04-05-2006 05-10-2006

フロントページの続き

(51) Int.CI.	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,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 ディビッド・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、サード・ストリート 300 番、アルナイラム・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、サード・ストリート 300 番、アルナイラム・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、サード・ストリート 300 番、アルナイラム・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