【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】平成19年9月27日(2007.9.27)

【公表番号】特表2007-502284(P2007-502284A)
【公表日】平成19年2月8日(2007.2.8)
【年通号数】公開・登録公報2007-005
【出願番号】特願2006-523325(P2006-523325)
【国際特許分類】
*Ａ６１Ｋ　31/7105　(2006.01)*
*Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)*
*Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)*
*Ａ６１Ｐ　17/02　(2006.01)*
*Ａ６１Ｐ　19/04　(2006.01)*
*Ａ６１Ｐ　27/06　(2006.01)*
*Ａ６１Ｐ　27/02　(2006.01)*
*Ａ６１Ｐ　9/10　(2006.01)*
*Ａ６１Ｐ　9/00　(2006.01)*
【ＦＩ】
Ａ６１Ｋ　31/7105
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ａ６１Ｋ　48/00
Ａ６１Ｐ　17/02
Ａ６１Ｐ　19/04
Ａ６１Ｐ　27/06
Ａ６１Ｐ　27/02
Ａ６１Ｐ　9/10
Ａ６１Ｐ　9/00

【手続補正書】
【提出日】平成19年8月9日(2007.8.9)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＴＧＦβII型受容体の発現を低減させるｓｉＲＮＡ分子であって、１９～２５塩基対の長さであり、下記（ａ）または（ｂ）の核酸分子の少なくとも部分を標的とする、前記ｓｉＲＮＡ分子。
（ａ）核酸配列番号１５９の核酸分子、
（ｂ）核酸配列番号１５９における１もしくは数個の塩基の置換、欠失または付加によって（ａ）の核酸分子から導かれ、ＴＧＦβII型受容体の活性を有するタンパク質をコードする、核酸分子。
【請求項２】
請求項1に記載のｓｉＲＮＡ分子および薬学的に許容しうる担体を含む組成物。
【請求項３】
創傷治癒剤をさらに含む、請求項2に記載の組成物。
【請求項４】

請求項１に記載のｓｉＲＮＡ分子の、ＴＧＦβII型受容体を介するシグナリングに関連する障害の処置のための医薬の製造における使用。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００７】
しかしながら、これらの技術は、多くの緑内障において生じる衰弱性乱切(debilitating scarification)の処置のためには依然不十分である。例えば、アンチセンス治療の使用は、様々な障害を処置するのに効果的ではない。なぜなら、アンチセンス分子は、患者内のインターフェロン反応を誘導するからである。抗体ベースの治療の使用は、ある抗原の特定のエピトープに対する特異抗体を生み出す必要性により減る。したがって、過剰発現またはさらにＴＧＦβII型受容体の存在からもらたされる障害に介入する新しい方法を、依然確認する必要がある。
【特許文献１】米国特許出願公開第２００４／０２２９２６６号明細書
【特許文献２】米国特許出願公開第２００５／０２８７１２８号明細書
【特許文献３】米国特許出願公開第２００５／０２２７９３６号明細書
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２３】
図２。角膜線維芽細胞内のｓｉＲＮＡによる、ＴＧＦβII型受容体タンパク質の発現の抑制。異なる濃度のＴＧＦβＲII受容体ｓｉＲＮＡまたは対照、スクランブルｓｉＲＮＡにより１６時間（上のパネル）または４８時間（下のパネル）処置したヒト角膜線維芽細胞からの溶解物を、１０％のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル上で分離し、ＴＧＦβＲII受容体抗体により免疫ブロットした。レーン１は、ＴｒａｎｓＩＴ－ＴＫＯ試薬のみと共に（ｓｉＲＮＡなし）インキュベートした細胞からの溶解物を含有する。レーン２および８は、１００ｎＭのスクランブルｓｉＲＮＡで処置した細胞からの溶解物を含有する。レーン３、４、９および１０は、最終濃度５０ｎＭ（レーン３および９）または１００ｎＭ（レーン４および１０）で、ＮＫ１　ｓｉＲＮＡで処置した細胞の溶解物を含有する。
レーン５、６、１１および１２は、５０ｎＭ（レーン５および１１）または１００ｎＭ（レーン６および１２）で、ＳＳ１　ｓｉＲＮＡで処置した細胞の溶解物を含有する。レーン７において、ＴＧＦβＲII受容体抗体を、正常な細胞溶解物を精査する前に、抗原ペプチドで予めインキュベートした。似た量の全タンパク質を、各レーンに取り込んだ。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５９】
走化性検定
ＴＧＦβは、サイトカインであり、当業者は、周知の走化性検定を通してかかる剤の活性を監視する。行ってもよい模範的走化性検定は、Martinet et al., J. Immunol Meth., 174:209, 1994およびKeller et al., J. Immunol. Meth., 1:165, 1972に記載されている。簡潔には、２０ｍｌの末梢血液を、医療(health)ボランティアから１０ｍｌのヘパリン化チューブに収集する。血液を、１０ｍｌのHistopaque（Sigma）で１：１に希釈し、そして置く(under laid)。４００ｇで２５分間遠心分離した後、界面にある細胞を収集し

、ＰＢＳ中で２回洗浄する。細胞を、１０$^{6}$／ｍｌで１００Ｕ／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（組織培養抗生物質、Life Technologies）と共にＤＭＥＭ（Life Technologies, Gaithersburg, MD）中に再懸濁する。無菌ウシ血清アルブミン（Sigma）を、０．２ｍｇ／ｍｌの最終濃度に添加する。

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６０】
１００μｌのこの細胞懸濁液を、各トランスウェルインサート(transwell insert)（Costar）に添加する。ｓｉＲＮＡ分子を含むまたは含まない抗生物質および０．２％のＢＳＡを含むＤＭＥＭを、２４ウェルプレート内のウェルの下部に添加する。トランスウェルインサートを下壁内に置き、３７℃で９０分間インキュベートする。インキュベーション期間の完了時に、インサートを除去し、接着細胞を除去する。そしてインサート全部をライト・ギムザ(Wright-Giemsa)で染色する。インサートの下面に接着した細胞およびウェルの下部に移動した細胞を顕微鏡下で数え、加算し、移動細胞の総数を得る。

【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６３】
骨髄性前駆細胞への効果の検定
造血のＴＧＦβ誘導抑制の阻害を、幹／前駆細胞機能および数の検定において試験してもよく、ＬＴＣ－ＩＣ、ＣＦＵ－ＧＥＭＭ、ＣＦＵ－ＧＭ、ＢＦＵ－Ｅを含む。これらの検定は、当業者に周知であり、例えばBroxmeyer et al., Blood, 76: 1110 (1990)に記載のように比較的容易に設定できる。簡潔には、骨髄細胞を、インフォームドコンセントを得た後に、ヒトのドナーから収集する。５×１０$^{4}$／ｍｌの低密度のヒト骨髄細胞を、コロニー形成単位顆粒球／マクロファージ（ＣＦＵ－ＧＭ）、コロニー形成単位顆粒球／赤血球／マクロファージ／巨核球（ＣＦＵ－ＧＥＭＭ）またはバースト(burst)形成単位－赤血球（ＢＦＵ－Ｅ）分析のために、３０％ＦＣＳ（Hyclone）、組み換えヒトエリスロポエチン（EPO, 1U/ml, Amgen, Thousand Oaks, CA）、組み換えヒトインターロイキン－３（IL-3,100U/ml, Immune, Seattle, WA）、および組み換えヒト幹細胞因子（SCF, 50ng/ml, Amgen）を補ったIscove's改変必須培地（Biowhitaker, Walkersville, MD）中１％メチルセルロースに平板培養する。培養物を、５％$CO_2$および低酸素圧（５％）で１４日間インキュベートし、そして盲検法で、倒立顕微鏡を使用

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】
2007502284000001.app

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８３】

「単位用量」は、好適な担体中に分散した別個の量の治療組成物と定義される。例えば、ｓｉＲＮＡ分子を非経口投与する際、ｓｉＲＮＡ組成物を一般的に、１日あたり体重１ｋｇあたり０．１ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇの範囲の用量で、好ましくは１日あたり体重１ｋｇあたり１ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇの範囲の用量で注射する。非経口投与を、薬剤製品の治療循環レベルを維持するために、最初はボーラスで、続いて連続注入により、行ってもよい。当業者は、良好な医療行為および個々の患者の臨床条件により決定されるように、効果的な投薬量および投与規制を直ちに最適化するだろう。

【手続補正９】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図３Ｄ
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図３Ｄ】

図3D

標的配列 23: AACATCAACCACAACACAGAG ( 配列番号：78)
遺伝子配列における位置：1035
GC 含有量 ：42.9%
センス鎖 siRNA: CAUCAACCACAACACAGAGtt ( 配列番号：79)
アンチセンス鎖 siRNA: CUCUGUGUUGUGGUUGAUGtt ( 配列番号：80)

標的配列 24: AAGCTGAAGCAGAACACTTCA ( 配列番号：81)
遺伝子配列における位置：1119
GC 含有量 ：42.9%
センス鎖 siRNA: GCUGAAGCAGAACACUUCAtt ( 配列番号：161 )
アンチセンス鎖 siRNA: UGAAGUGUUCUGCUUCAGCtt ( 配列番号：82)

標的配列 25: AAGCAGAACACTTCAGAGCAG ( 配列番号：83)
遺伝子配列における位置: 1125
GC 含有量：47.6%
センス鎖 siRNA: GCAGAACACUUCAGAGCAGtt ( 配列番号：84)
アンチセンス鎖 siRNA: CUGCUCUGAAGUGUUCUGCtt ( 配列番号：85)

標的配列 26: AACACTTCAGAGCAGTTTGAG ( 配列番号：86)
遺伝子配列における位置：1131
GC 含有量：42.9%
センス鎖 siRNA: CACUUCAGAGCAGUUUGAGtt ( 配列番号：87)
アンチセンス鎖 siRNA: CUCAAACUGCUCUGAAGUGtt ( 配列番号：88)

標的配列 27: AAGATCTTTCCCTATGAGGAG ( 配列番号：89)
遺伝子配列における位置：1164
GC 含有量：42.9%
センス鎖 siRNA: GAUCUUUCCCUAUGAGGAGtt ( 配列番号：90)
アンチセンス鎖 siRNA: CUCCUCAUAGGGAAAGAUCtt ( 配列番号：91)

標的配列 28: AAGACAGAGAAGGACATCTTC ( 配列番号：92)
遺伝子配列における位置：1197
GC 含有量：42.9%
センス鎖 siRNA: GACAGAGAAGGACAUCUUCtt ( 配列番号：93)
アンチセンス鎖 siRNA: GAAGAUGUCCUUCUCUGUCtt ( 配列番号：94)

標的配列 29: AAGGACATCTTCTCAGACATC ( 配列番号：95)
遺伝子配列における位置: 1206
GC 含有量：42.9%
センス鎖 siRNA: GGACAUCUUCUCAGACAUCtt ( 配列番号：96)
アンチセンス鎖 siRNA: GAUGUCUGAGAAGAUGUCCtt ( 配列番号：97)