

(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2017-526367

(P2017-526367A)

(43) 公表日 平成29年9月14日 (2017.9.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A H	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/66 (2017.01)	A 6 1 K 47/66	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 131 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-511674 (P2017-511674)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月28日 (2015.8.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年4月21日 (2017.4.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/047449
 (87) 国際公開番号 W02016/033472
 (87) 国際公開日 平成28年3月3日 (2016.3.3)
 (31) 優先権主張番号 62/043,803
 (32) 優先日 平成26年8月29日 (2014.8.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596115687
 チルドレンズ メディカル センター コ
 ーポレーション
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
 15, ボストン, シャタック・ストリート
 55
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の処置のための方法および組成物

(57) 【要約】

本明細書において、例えばアプタマー-siRNAキメラ分子を使用する、癌、例えば乳癌の処置に関連する方法および組成物を記載する。

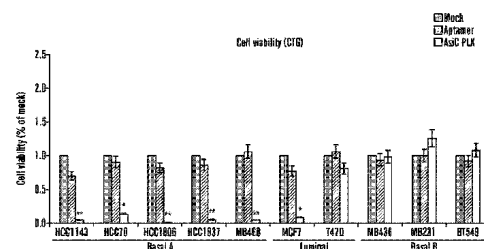
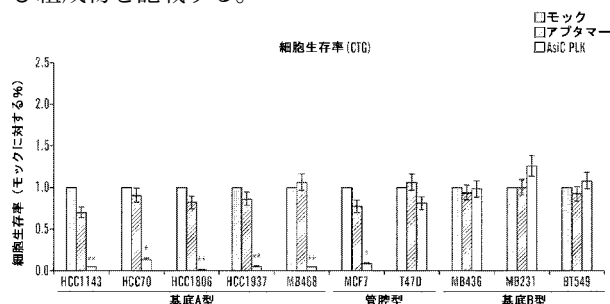


FIG. 28

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌マーカー結合アプタマードメインおよび阻害性核酸ドメインを含む、キメラ分子。

【請求項 2】

癌マーカーが、EpCAMまたはEphA2である、請求項1記載の分子。

【請求項 3】

アプタマー-siRNAキメラ (AsiC) である、請求項1~2のいずれか一項記載の分子。

【請求項 4】

阻害性核酸が、癌細胞においてアップレギュレートされる遺伝子産物と特異的に結合する、請求項1~3のいずれか一項記載の分子。

10

【請求項 5】

阻害性核酸が、

Plk1 ; MCL1 ; EphA2 ; PsmA2 ; MSI1 ; BMI1 ; XBP1 ; PRPF8 ; PF38A ; RBM22 ; USP39 ; RAN ; NUP205 ; およびNDC80

からなる群より選択される遺伝子の発現を阻害する、請求項1~4のいずれか一項記載の分子。

【請求項 6】

癌マーカーが、EpCAMであり、阻害性核酸ドメインが、Plk1の発現を阻害する、請求項1~5のいずれか一項記載の分子。

【請求項 7】

癌マーカー結合アプタマードメインが、SEQ ID NO:33の配列を含む、請求項1~6のいずれか一項記載の分子。

20

【請求項 8】

癌マーカー結合アプタマードメインが、本質的にSEQ ID NO:33の配列からなる、請求項1~6のいずれか一項記載の分子。

【請求項 9】

阻害性核酸ドメインが、SEQ ID NO:2の配列を含む、請求項1~8のいずれか一項記載の分子。

【請求項 10】

阻害性核酸ドメインが、本質的にSEQ ID NO:2の配列からなる、請求項1~8のいずれか一項記載の分子。

30

【請求項 11】

SEQ ID NO:1~3のうちの1つの配列を含む、請求項1~10のいずれか一項記載の分子。

【請求項 12】

本質的にSEQ ID NO:1~3のうちの1つの配列からなる、請求項1~11のいずれか一項記載の分子。

【請求項 13】

その3'末端が、dTdTを含む、請求項1~12のいずれか一項記載の分子。

【請求項 14】

少なくとも1つの2'-Fピリミジンを含む、請求項1~13のいずれか一項記載の分子。

40

【請求項 15】

請求項1~14のいずれか一項記載の分子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 16】

請求項1~14のいずれか一項記載の少なくとも2種類のキメラ分子を含む組成物であって、該キメラ分子が、異なるアプタマードメインまたは阻害性核酸ドメインを有する、請求項15記載の組成物。

【請求項 17】

異なるアプタマーまたは阻害性核酸ドメインが、異なる標的を認識する、請求項16記載の組成物。

50

【請求項 18】

異なるアプタマーまたは阻害性核酸ドメインが、配列を有し、かつ同じ標的を認識する、請求項16記載の組成物。

【請求項 19】

請求項1～18のいずれか一項記載の分子または組成物を投与する工程を含む、癌を処置する方法。

【請求項 20】

癌が、上皮癌または乳癌である、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

乳癌が、トリプルネガティブ乳癌である、請求項20記載の方法。

10

【請求項 22】

投与が、皮下である、請求項19～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項 23】

対象に、追加的な癌処置がさらに施される、請求項19～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項 24】

癌処置が、パクリタキセルである、請求項23記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

20

本願は、35 U.S.C. § 119(e)の下で、2014年8月29日に提出された米国仮出願第62/043,803号の恩典を主張し、その内容は全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

政府による支援

本発明は、国防総省から授与された助成金第W81XWH-09-1-0058号の下で政府の財政支援を受けてなされたものである。米国政府は、本発明に関して一定の権利を保有する。

【0003】

配列表

本願は、ASCII形式で電子的に提出され、全体として参照により本明細書に組み入れられる配列表を含んでいる。2015年8月28日に作成されたこのASCIIコピーは、701039-082401-PCT_SL.txtと命名され、8,984バイトのサイズである。

30

【0004】

技術分野

本明細書に記載される技術は、EpCAM結合分子および阻害性核酸を含むキメラ分子、ならびに癌、例えば上皮癌の処置のためにそのような組成物を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0005】

背景

RNA干渉 (RNAi) は、肝臓での遺伝子発現を減少させることにおける治療的使用のために検討されてきた。しかし、肝臓は、RNAi分子でトランスフェクトすることが容易な点で特有である。他の組織における低分子RNAの送達および結果として生じる遺伝子ノックダウンは、非効率的で、かつ最終的に無効であり続けている。特に、送達妨害は、癌を処置するためにRNAiを利用することの大きな障害である。

40

【発明の概要】

【0006】

概要

本明細書に記載されるように、本発明者らは、新規なアプタマー-siRNAキメラ分子 (AsiC) を開発した。これらのAsiCは、癌細胞マーカーを標的としてsiRNAを癌細胞に特異的に方向付け、送達効力および治療有効性を増加させる一方で、副作用の潜在能を減少させる。

50

【0007】

1つの局面において、癌マーカー結合アプタマードメインおよび阻害性核酸ドメインを含むキメラ分子が、本明細書において記載されている。いくつかの態様において、癌マーカーは、EpCAMまたはEphA2である。いくつかの態様において、阻害性核酸は、癌細胞においてアップレギュレートされる遺伝子産物と特異的に結合する。いくつかの態様において、阻害性核酸は、Plk1；MCL1；EphA2；PsmA2；MSI1；BMI1；XBP1；PRPF8；PF38A；RBM22；USP39；RAN；NUP205；およびNDC80からなる群より選択される遺伝子の発現を阻害する。いくつかの態様において、癌マーカーはEpCAMであり、阻害性核酸ドメインは、Plk1の発現を阻害する。

【0008】

いくつかの態様において、前記分子は、アプタマー-siRNAキメラ（AsiC）である。いくつかの態様において、癌マーカー結合アプタマードメインは、SEQ ID NO:33の配列を含む。いくつかの態様において、癌マーカー結合アプタマードメインは、本質的に、SEQ ID NO:33の配列からなる。いくつかの態様において、阻害性核酸ドメインは、SEQ ID NO:2の配列を含む。いくつかの態様において、阻害性核酸ドメインは、本質的にSEQ ID NO:2の配列からなる。いくつかの態様において、前記分子は、SEQ ID NO:1~3のうちの1つの配列を含む。いくつかの態様において、前記分子は、本質的にSEQ ID NO:1~3のうちの1つの配列からなる。

【0009】

いくつかの態様において、前記分子の3'末端は、dTdTを含む。いくつかの態様において、前記分子は、少なくとも1つの2'-Fピリミジンを含む。

【0010】

1つの局面において、本明細書に記載されるキメラ分子および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物が、本明細書に記載されている。いくつかの態様において、組成物は、本明細書に記載される少なくとも2種類のキメラ分子を含み、その際、キメラ分子は、異なるアプタマードメインおよび／または阻害性核酸ドメインを有する。いくつかの態様において、異なるアプタマードメインまたは阻害性核酸ドメインは、異なる標的を認識する。いくつかの態様において、異なるアプタマードメインまたは阻害性核酸ドメインは、配列を有し、同じ標的を認識する。

【0011】

1つの局面において、癌を処置する方法であって、本明細書に記載されるキメラ分子および／または組成物を投与する工程を含む方法が、本明細書において記載されている。いくつかの態様において、癌は、上皮癌または乳癌である。いくつかの態様において、乳癌は、トリプルネガティブ乳癌である。いくつかの態様において、投与は皮下である。いくつかの態様において、対象には、追加的な癌処置がさらに施される。いくつかの態様において、癌処置は、パクリタキセルである。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1A~1Hに、EpCAMアプタマーが、基底A型乳癌細胞を特異的に標的とすることを示す。EpCAMアプタマーおよびPLK1 siRNA（SEQ ID NO:1として開示されるセンス鎖およびSEQ ID NO:2として開示されるアンチセンス鎖）を含むEpCAM-AsiCの設計（図1C）。上皮性乳癌細胞株（BPLER）は、正常な乳房上皮細胞株（BPE）と比較してEpCAMタンパク質を過剰発現する（図1A~1B）。GFPを標的とするEpCAM-AsiCを、アンチセンスsiRNA鎖の3'末端でAlexa647またはCy3標識し、BPLER細胞およびBPE細胞と共にインキュベートした。24時間後にフローサイトメトリーによって取り込みを評価した（図1D）。データは、3回の独立した実験の代表である。Cy3およびAlexa647標識EpCAM-AsiCは、BPE（EpCAM-）によってではなく、それぞれMB468およびBPLER（EpCAM+細胞）によって取り込まれた。各ピークのMFIを示す。遺伝子サイレンシングについて試験するために、GFPを標的とするEpCAM-AsiC（4 μM）でBPLERおよびBPEを処理し、DharmafectおよびGFP-siRNA（100nM）を使用してトランスフェクション対照と比較した。インキュベーションの72時間後にフローサイトメ

10

20

30

40

50

トリーによってノックダウンを評価した。対照は、モックおよびDhrmafectのみの処理（脂質）であった（ $n=4$ ）（図1D）。AKT1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底B型またはヒト線維芽細胞（hFb）ではなく、基底A型乳癌細胞株および管腔型乳癌細胞株におけるAKT1のmRNA（図1E）およびタンパク質（図1F）の発現を選択的にノックダウンする。AKT1を標的とするsiRNAをトランスフェクトすることによって、すべての細胞株における遺伝子ノックダウンが誘導されるが、一方、GFPを標的とするEpCAM-AsiC標的を用いた処理は、AKT1のmRNAおよびタンパク質レベルに影響しない（* $p<0.05$ 、 $p<0.01$ ）。EpCAM-AsiCの効果をsiRNAトランスフェクションと比較する、AKT1のタンパク質および遺伝子ノックダウンのプロット。EpCAM-AsiCが誘導したノックダウンは、EpCAMの発現と相関する（図1E~H）。（ $n=3$ ；モックに対して標準化した平均 $\pm$ SEM；* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、両側t検定）。 10

【図2】図2A~2Eに、PLK1を標的とするEpCAM AsiCが、基底A型乳癌細胞における細胞増殖を特異的に阻害することを示す。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCが細胞増殖に及ぼす効果を、基底A、B型および管腔型細胞株を代表する10種類の乳癌細胞株で、cell-titer-gloアッセイ（CTG）を使用して試験した。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底A型および管腔型細胞株の両方における細胞増殖を減少させ、一方で基底B型細胞には効果を有さなかった（図2A、2C）。EpCAMの発現レベルと細胞生存率との間に相関関係が見られた（図2B）。基底A型（EpCAM+GFP-）細胞をBPE（EpCAM-GFP+）細胞と共培養し、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCで処理するかまたは未処理とした。未処理の共培養物は、類似の細胞比を示した。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCによる処理後に、EpCAM+細胞の割合は減少し、EpCAM-細胞は増加した。代表的なフローサイトメトリプロット（図2D）、4つの異なる細胞株におけるGFP+/GFP-細胞比を分析した実験の定量（図2E）。（ $n=4$ 、* $p<0.05$ 、 $p<0.01$ ）。 20

【図3】図3A~3Dに、ヒトTNBC組織がCy3-EpCAMアプタマーを特異的に取り込むことを示す。実験計画；GFPを標的とするCy3-EpCAM-AsiC、Alexa647-siRNA-GFPまたはAlexa647-choi-siRNA-GFP（それぞれ2 μ M）を乳癌移植片および対照移植片に添加し、24時間インキュベートし、その後、組織をコラゲナーゼで単細胞懸濁液まで消化し、フローサイトメトリによって分析した（図3A）。腫瘍生検は、EpCAM、および上皮細胞マーカーであるサイトケラチンを過剰発現している（図3B）。3回の独立した実験のうちの1つからの代表的なヒストグラムは、siRNAおよびchoi-siRNAが腫瘍組織および健康組織の両方に類似の効力で浸透したが、一方でEpCAM-AsiCは、健康な対照組織サンプルではなく腫瘍組織生検によって選択的に取り込まれたことを示している（図3C）。3人の異なる患者からの腫瘍で取り込み実験を繰り返し、各処置について各生検の受け入れを3回試験した。患者3人すべての要約（図3D）。（ $n=3$ 、モック：灰色、EpCAM：赤、* $P<0.05$ 、** $P<0.005$ 、CD4-AsiC対モック処置のt検定）。 30

【図4】図4A~4Cに、PLK1を標的とするEpCAM AsiCが、基底A型乳癌細胞において発がんイニシエーション（tumor initiation）を特異的に阻害することを示す。乳癌細胞株のコロニーアッセイを、PLK1もしくはGFPを標的とするEpCAM-AsiC（4 μ M）またはパクリタキセル（100nM）で24時間処理し、無薬物培地中で8日間培養した。パクリタキセル処理は、すべての細胞株でのコロニー形成を減少させ、一方、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCを用いた処理は、管腔型細胞（MCF7）および基底A型細胞（HCC1954）におけるコロニー形成のみ消失させ、GFPを標的とするEpCAM-AsiCを用いた処理は、無効であった（図4A）。3つのさらなる細胞株でアッセイを繰り返したところ、結果には再現性があった（図4B）。スフィア形成アッセイは、類似の結果を示し、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底A型細胞および管腔型細胞においてのみスフィア数を減少させ、基底B型細胞には無効であった（図4C）。MB468-luc細胞を、GFPまたはPLK1のいずれかを標的とするEpCAM-AsiCで24時間処理し、ヌードマウスの側腹部にs.c.（皮下）注射した。マウスを5日毎に20日間イメージングした。未処置のマウスおよびGFPを標的とするEpCAM-AsiCで処置したマウスは、発がんイニシエーションに増加を示し、一方、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCを用いて前処理した細胞を注射したマウスは、発がんイニシエーションを有しない。 40

【図5】図5A~5Cに、EpCAM+腫瘍へのAlexa750-EpCAM-AsiCの選択的取り込みを示す。図5Aに実験設定を示す。ヌードマウスにMB468-luc細胞（左側腹部）およびMB231-luc-mCherr 50

y細胞（右側腹部）を注射し、注射の5日後に、GFPを標的とするAlexa750標識EpCAM-AsiC（0.5mg/kg）を頸部領域にs.c.注射した。注射の直後にマウスをイメージングし、さらに24、48時間および5日後にイメージングした。GFPを標的とするAlexa750標識EpCAM-AsiCは、MB231-luc-mCherry腫瘍（EpCAM-）ではなくMB468-luc腫瘍（EpCAM+）において、ルシフェラーゼ腫瘍と共局在した。マウス7匹の分析は、MB468（EpCAM+）腫瘍におけるAlexa750の有意な増加を示している（図5B）。図5Cに、Alexa750の取り込み速度のグラフを示す。

【図6A】PLK1を標的とするEpCAM AsiCが、基底A型乳癌細胞において腫瘍の成長を特異的に阻害することを示す。図6Aに実験計画を示す。MB231-luc-mCherry細胞（ 5×10^5 個）またはMB468-luc細胞（ 5×10^6 個）のいずれかを注射したヌードマウスを、PLK1もしくはGFPのいずれかを標的とする5mg/KgのEpCAM AsiCで72時間毎に処置するかまたは未処置のままとした。

【図6B】PLK1を標的とするEpCAM AsiCが、基底A型乳癌細胞において腫瘍の成長を特異的に阻害することを示す。図6B：PLK1を標的とするEpCAM-AsiCで処置したMB468-luc腫瘍は、早くも処置の6日後にサイズが縮小し、多くのマウスで14日後に完全に消失した。EpCAM+およびEpCAM-の両方の未処置腫瘍は、14日間にわたりサイズが増加した。

【図7】図7に、EpCAM AsiCがヒトおよびマウス血清中で安定であることを示す。2'-フルオロ-ピリミジンを使用して合成したeGFP EpCAM-AsiC、化学安定化したコレステロール-コンジュゲート型eGFP siRNA（chol-siRNA）、または未修飾eGFP siRNAを等体積のヒトまたはマウス血清と共にインキュベートした。一定分量を規則的な間隔で取り出し、ゲルローディング緩衝液中に再懸濁し、-80℃で保存した後、変性PAGEゲルで電気泳動した。染色後にデンシトメトリーによって定量した、2回の独立した実験からのバンドの平均強度（+S.E.M.）を示す。

【図8A】EpCAM AsiCの注射がマウスにおける自然免疫を刺激しないことを示す。マウスにeGFP EpCAM-AsiC（5mg/kg、n=3）をsc注射またはポリ（I:C）（5もしくは50mg/kg（n=2/用量）を腹腔内注射した。図8A：ベースラインならびに処置の6および16時間後に収集した血清サンプルを、多重免疫アッセイによってIFN β 、IL-6およびIP-10について評価した。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 、ベースラインと比較。

【図8B】EpCAM AsiCの注射がマウスにおける自然免疫を刺激しないことを示す。マウスにeGFP EpCAM-AsiC（5mg/kg、n=3）をsc注射またはポリ（I:C）（5もしくは50mg/kg（n=2/用量）を腹腔内注射した。図8B：処置の16時間後に回収した総脾臓細胞における、gapdhと比較したサイトカインおよびIFN誘導遺伝子のmRNA発現を、qRT-PCRによってアッセイした。 $**p < 0.01$ 、未処置（NT、n=3）と比較。

【図9】図9に配列表を示す。（表示順にそれぞれSEQ ID NO 1~2および23~32）。

【図10】図10A~10Bにアプタマー-siRNAキメラ（AsiC）を示す。図10Aに、癌細胞の表面受容体の特異的に認識するAsiC（アプタマーがsiRNAの一方の鎖に共有結合したもの）がエンドサイトーシスされ、次にサイトゾルに放出され、そこでAsiCが内因性プレmiRNAのようにプロセッシングされて、標的遺伝子をノックダウンする略図を示す。棒線は、細胞取り込みおよびエンドソームからサイトゾルへの放出という2つの送達ハードルを示し、サイトゾルにDicerおよびRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）が局在する。図10Bに、PLK1を標的とするEpCAM AsiCの設計を示す。（SEQ ID NO:1として開示されるセンス鎖およびSEQ ID NO:2として開示されるアンチセンス鎖）。

【図11A】EpCAM-AsiCのノックダウンおよび抗腫瘍効果が、EpCAMレベルと相関し、上皮乳房腫瘍T-ICを阻害することを示す。図11A：代表的な実験（図11A）。

【図11B】EpCAM-AsiCのノックダウンおよび抗腫瘍効果が、EpCAMレベルと相関し、上皮乳房腫瘍T-ICを阻害することを示す。図11B：EpCAM-AsiCを脂質siRNAトランスフェクションと比較するAKT1のノックダウン（図11B）。

【図11C】EpCAM-AsiCのノックダウンおよび抗腫瘍効果が、EpCAMレベルと相関し、上皮乳房腫瘍T-ICを阻害することを示す。図11C：PLK1をノックダウンするEpCAM-AsiCのEpCAM+細胞株のみにおける抗増殖効果。

【図11D】EpCAM-AsiCのノックダウンおよび抗腫瘍効果が、EpCAMレベルと相関し、上

10

20

30

40

50

皮乳房腫瘍T-ICを阻害することを示す。D PLK1 EpCAM-AsiCは、間葉系基底B型MB231細胞ではなく、管腔型MCFおよび基底A型TNBC HCC1143におけるコロニー形成を阻害する。

【図 1 2】図12A～12Bに、機能的EphA2アプタマーの同定を示す。図12A：EphA2アプタマー（EphA2apt）とのEphA2+基底B型MB231細胞のインキュベーションは、EphA2の分解および活性Akt（pAkt）の一過性の減少に繋がる。図12B：非結合性対照アプタマー（ctl）ではなく、EphA2apt（0～100nM）と共に2時間インキュベートしたEphA2+乳癌細胞は、減少したEphA2を示す。エフリンAの添加を、EphA2の分解についての陽性対照として使用した。

【図 1 3】図13A～13C：EpCAM-AsiCは、不死化乳房上皮細胞株（BPE）もしくは間葉系基底B型TNBCまたはヒト線維芽細胞ではなく、EpCAM+細胞株においてのみ、GFPタンパク質（図13A）およびAKT1 mRNA（図13B～13C）をノックダウンする。トランスフェクトされたsiRNAは、そのノックダウンに非特異的である。*、 $P<0.05$

【図 1 4】同じ対象からの正常乳房組織および基底A型TNBC腫瘍生検をCy3標識EpCAM-AsiCと共にインキュベートし、3日後に取り込みについて単細胞懸濁液をフローサイトメトリーによって分析した。裸のsiRNAは、どちらにも取り込まれず、コレステロール-コンジュゲート型siRNAは等しく取り込まれたが、EpCAM-AsiCは腫瘍によって特異的に取り込まれた。代表的な組織を左に示す。

【図 1 5】図15A～15C：EpCAM-乳癌株ではなくEpCAM+乳癌株の、PLK1 EpCAM-AsiCを用いた処置は、T-IC機能のインビトロアッセイにおいてコロニー（図15A、15B）およびマンモスフィア（図15C）の機能を阻害する。

【図 1 6】図16に、PLK1 EpCAM-AsiCを用いたMB468細胞のエキスポ処理が、ヌードマウスに腫瘍を形成するそれらの能力を消失させたことを示す。処理の翌日に等しい数の生存細胞を植え込んだ。

【図 1 7】図17A～17Bに、EpCAM-AsiCが、EpCAM-、TNBC腫瘍でなく、EpCAM+腫瘍に選択的に取り込まれることを示す。図17Aに実験スキームを示す。図17Bに、屠殺時に切除された腫瘍中のEpCAM-AsiC濃度を示す。

【図 1 8】図18A～18Bに、PLK1 EpCAM-AsiCがEpCAM+ TNBC異種移植片の完全な腫瘍退縮を引き起こしたが、EpCAM- 基底B型異種移植片に無効であったことを示す。図18Aに実験計画を示す。2週間にわたり左および右側腹部腫瘍のルシフェラーゼ活性のイメージングを順次行った。図18Bにルシフェラーゼ活性による腫瘍サイズのグラフを示す。PLK1 AsiCで処置したマウスにおいてすべてのEpCAM+腫瘍は急速に退縮し、一方でその他の腫瘍は成長し続けた。

【図 1 9 A】基底細胞依存遺伝子が4つのトリ-snRNPスプライセオソーム複合体遺伝子（PPF8、PRPF38A、RBM22、USP39）、2つの核外搬出遺伝子（NUP205、RAN）、およびキネトコア遺伝子（NDC80）を含むことを示す。図19Aに、ノックダウンの3日後の、対照siRNAに対して標準化した細胞生存率を示す。

【図 1 9 B】基底細胞依存遺伝子が4つのトリ-snRNPスプライセオソーム複合体遺伝子（PPF8、PRPF38A、RBM22、USP39）、2つの核外搬出遺伝子（NUP205、RAN）、およびキネトコア遺伝子（NDC80）を含むことを示す。図19Bに、ノックダウンの2日後に生存細胞を播種することによって評価したコロニー形成を示す。

【図 1 9 C】基底細胞依存遺伝子が4つのトリ-snRNPスプライセオソーム複合体遺伝子（PPF8、PRPF38A、RBM22、USP39）、2つの核外搬出遺伝子（NUP205、RAN）、およびキネトコア遺伝子（NDC80）を含むことを示す。図19Cに、ノックダウンの2日後のカスパーゼ活性化がMB468細胞に特異的であって、BPE細胞では起こらないことを示す。

【図 2 0】図20に、エンドサイトーシスを改善するためのマルチマー化EpCAM-AsiCのためのいくつかの可能な設計を示す。これらの設計において、センス鎖およびアンチセンス鎖を交換することもでき、リンカーを変化させることもできる。

【図 2 1】図21A～21Dに、EpCAMアプタマーが基底A型乳癌細胞を特異的に標的とすることを示す。図21Aに、EpCAMアプタマーおよびPLK1 siRNA（SEQ ID NO:1として開示されるセンス鎖およびSEQ ID NO:2として開示されるアンチセンス鎖）を含むEpCAM-AsiCの設計を

10

20

30

40

50

示す。図21Bに、上皮性乳癌細胞株（BPLER）が正常乳房上皮細胞株（BPE）と比較してEpCAMタンパク質を過剰発現することを実証するグラフを示す。GFPを標的とするEpCAM-AsiCを、アンチセンスsiRNA鎖の3'末端でAlexa647またはCy3標識し、BPLER細胞およびBPE細胞と共にインキュベートした。24時間時間後にフローサイトメトリーによって取り込みを評価した（図21C）。データは3回の独立した実験の代表である。Cy3およびAlexa647標識EpCAM-AsiCは、BPE（EpCAM-）によってではなく、それぞれMB468およびBPLER（EpCAM+細胞）によって取り込まれた。各ピークのMFIを示す（モック、灰色）。図21Dに、遺伝子サイレンシングについて試験するために、GFPを標的とするEpCAM-AsiC（4 μ M）でBPLERおよびBPEを処理し、DharmafectおよびGFP-siRNA（100nM）を使用するトランスフェクション対照と比較した実験のグラフを示す。インキュベーションの72時間後にフローサイトメトリーによってノックダウンを評価した。対照は、モックおよびDharmafectのみの処理（脂質）であった（n=4）。

10

【図22-1】図22に、EpCAMアプタマーがマウスEpCAMと結合しないことを実証するグラフを示す。mCD326抗体を用いるフローサイトメトリーを使用してマウスESA（EpCAM）レベルを測定した。上皮マウス乳癌細胞株である4T1細胞は、EpCAMの高い発現レベルを示した。RAW（マウス単球細胞株）およびMB468（ヒト基底A型細胞株）の両方は、EpCAMの発現増加を示したが、4T1細胞よりもずっと小さな発現を示した。マウス間葉系癌細胞株（67NR）は、EpCAM発現の最小限の増加を示した。取り込み実験は、EpCAMアプタマーが4T1細胞によっても67NR細胞によっても取り込まれなかったことを実証した。

20

【図22-2】図22-1の説明参照。

【図23】図23に、EpCAMが、基底B型ではなく、基底A型および管腔型乳癌細胞株において過剰発現されることを実証するグラフを示す。hEpCAM抗体を使用するフローサイトメトリーによってEpCAMの発現レベルを試験する、8種類の異なる乳癌細胞株の代表的なFACSプロット。EpCAMは、基底B型ではなく、すべての基底A型および管腔型細胞に過剰発現される。（モック：網掛けの灰色、EpCAM：黒）

【図24】図24A~24Fに、EpCAM AsiCが基底A型乳癌細胞における遺伝子発現を特異的にサイレンシングすることを示す。AKT1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底B型またはヒト線維芽細胞（hFb）ではなく、基底A型および管腔型乳癌細胞株におけるAKT1のmRNA（図24A）およびタンパク質（図24B、24C）の発現を選択的にノックダウンする。AKT1を標的とするsiRNAを用いたトランスフェクションは、すべての細胞株において遺伝子ノックダウンを誘導し、一方、GFPを標的とするEpCAM-AsiCを用いた処理は、AKT1のmRNAおよびタンパク質に影響を及ぼさないことを示す（* $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ ）。EpCAM-AsiCの効果とsiRNAのトランスフェクションの効果とを比較するAKT1のタンパク質および遺伝子のノックダウンのプロット。EpCAM-AsiC誘導ノックダウンは、EpCAMの発現と相関する（図24D、24E）。（n=3；モックに対して標準化した平均 $\pm$ SEM；* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、両側t検定）。図24Fにフローサイトメトリー分析の結果を示す。

30

【図25】図25A~25Eに、ヒトTNBC組織がCy3-EpCAMアプタマーを特異的に取り込むことを示す。図25Aに実験計画を示す。GFPを標的とするCy3-EpCAM-AsiC、Alexa647-siRNA-GFPまたはAlexa647-chol-siRNA-GFP（各2 μ M）を乳癌移植片および対照移植片に添加し、24時間インキュベートした後、組織をコラゲナーゼで単細胞懸濁液まで消化し、フローサイトメトリーによって分析した。図25Bに、腫瘍生検がEpCAMおよび上皮細胞マーカーであるサイトケラチンを過剰発現することを実証するグラフを示す。図25Cに、siRNAおよびchol-siRNAが腫瘍組織および健康組織の両方に類似の効力で浸透し、一方、EpCAM-AsiCは、健康対照組織サンプルではなく、腫瘍組織生検によって選択的に取り込まれたことを示す、3回の独立した実験のうちの1回からの代表的なヒストグラムを示す。3人の異なる患者由来の腫瘍で取り込み実験を繰り返し、受け取った各生検を各処置について3回試験した。図25Dに代表的な腫瘍を示す。3人の患者すべての要約を図25Eに示す。（n=3、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、CD4-AsiC 対 モック処置のt検定）。

40

【図26-1】図26に、EpCAM-AsiCが健康生検および結腸癌生検の両方によって取り込まれることを実証するグラフを示す。GFPを標的とするCy3-EpCAM-AsiC、Alexa647-siRNA-GF

50

PまたはAlexa647-cho1-siRNA-GFP（各2 μ M）を結腸癌移植片および対照移植片に添加し、24時間インキュベートした後、組織をコラゲナーゼで単細胞懸濁液まで消化し、フローサイトメトリーによって分析した。代表的なヒストグラムは、EpCAM-AsiC、siRNAおよびcho1-siRNAが腫瘍組織および健康組織の両方に類似の効力で浸透したことを示している。

【図26-2】図26-1の説明参照。

【図27】図27A~27Dに、PLK1を標的とするEpCAM AsiCが、基底A型乳癌細胞において細胞増殖を特異的に阻害することを示す。cell-titer-gloアッセイ（CTG）を使用して、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCが細胞増殖に及ぼす効果を基底A型、基底B型および管腔型細胞株を代表する10種類の乳癌細胞株で試験した。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底A型および管腔型細胞株の両方で細胞増殖を減少させ、一方、基底B型細胞に無効であった（図27A）。EpCAM発現レベルと細胞生存率との間に相関関係が見られた（図27B）。基底A型（EpCAM+GFP-）細胞をBPE（EpCAM-GFP+）細胞と共培養し、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCで処理するかまたは未処理とした。未処理共培養物は、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCによる処理後に類似の細胞比を示し、EpCAM+細胞の割合は減少し、EpCAM-細胞の比は増加した。図27Cに、代表的なフローサイトメトリープロットを示し、図27Dに、4つの異なる細胞株におけるGFP+/GFP-細胞比を分析した実験の定量的グラフを示す。（ $n=4$ 、* $p<0.05$ 、 $p<0.01$ ）。

【図28】図28に、基底A型乳癌細胞株での細胞生存率の特異的減少がPLK1依存性であることを実証するグラフを示す。基底A型、B型および管腔型細胞を代表する10種類の異なる乳癌細胞株を、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCまたは単にEpCAM-アプタマーのみのいずれかで処理し、未処理対照と比較した。EpCAM-アプタマーで処理した細胞株に細胞生存率の減少を示したものは無く、一方、基底A型および管腔型細胞株は、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCによる処理後に細胞生存率の減少を示した。

【図29】図29A~29Cに、PLK1を標的とするEpCAM AsiCが基底A型乳癌細胞における発がんイニシエーションを特異的に阻害することを示す。乳癌細胞株のコロニーアッセイを、PLK1もしくはGFPを標的とするEpCAM-AsiC（4 μ M）またはバクリタキセル（100nM）で24時間処理し、薬物不含培地中で8日間培養した。バクリタキセルを用いた処理は、すべての細胞株でのコロニー形成を減少させ、一方、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCを用いた処理は、管腔型（MCF7）細胞および基底A型（HCC1954）細胞におけるコロニー形成のみ消失させ、GFPを標的とするEpCAM-AsiCを用いた処理は無効であった。図29Aにアッセイ結果の画像を示す。3つのさらなる細胞株でアッセイを繰り返したところ、図29Bに示すグラフに実証されるように結果には再現性があった。図29Cに、スフィア形成が類似の結果を示し、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底A型および管腔型細胞においてのみスフィア数を減少させ、基底B型細胞には無効であったことを実証するグラフを示す。MB468-luc細胞を、GFPまたはPLK1のいずれかを標的とするEpCAM-AsiCで24時間処理し、ヌードマウスの側腹部にs.c.注射した。マウスを5日毎に20日間イメージングした。未処置のマウスおよびGFPを標的とするEpCAM-AsiCで処置したマウスは、発がんイニシエーションの増加を示し、一方、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCで前処理した細胞を注射したマウスは、発がんイニシエーションを有しない。

【図30】図30A~30Bに、EpCAM AsiCがヒトおよびマウス血清中で36時間安定であることを示す。それぞれPBS 100 μ l中に入れた、2'-フルオロ-ピリミジンを使用して合成したGFPを標的とするEpCAM-AsiC、化学安定化した21塩基長コレステロール-コンジュゲート型GFP-siRNA（cho1-siRNA）、および未修飾21塩基長GFP-siRNAを、ヒトまたはマウス血清100 μ lに添加した。規則的な間隔で20 μ Lを取り出し、ゲルローディング緩衝液中に再懸濁し、-80 $^{\circ}$ Cで凍結し、その後、変性PAGEゲルで電気泳動した。図30Aに代表的なPAGEゲルを示し、図30Bにデンストメトリーによって分析した2回の独立した実験からのバンドの平均強度（+S.E.M.）のグラフを示す。安定化コレステロール-コンジュゲート型siRNAおよびEpCAM-AsiCの両方は、36時間の実験にわたり安定である。

【図31】図31A~31Bに、EpCAM+腫瘍へのAlexa750-EpCAM-AsiCの選択的取り込みを示す。図31Aに実験の設定を示す。ヌードマウスにMB468-luc（左側腹部）細胞およびMB231-lu

c-mCherry（右側腹部）細胞を注射し、注射の5日後にGFPを標的とするAlexa750標識EpCAM-AsiC（0.5mg/kg）を頸部領域にs.c.注射した。注射の直後ならびにさらに24、48時間および5日後にマウスをイメージングした。GFPを標的とするAlexa750標識EpCAM-AsiCは、MB231-luc-mCherry（EpCAM-）腫瘍ではなく、MB468-luc腫瘍（EpCAM+）においてルシフェラーゼ腫瘍と共局在した。図31Bに、MB468（EpCAM+）腫瘍におけるAlexa750の有意な増加を示すマウス7匹の分析のグラフを示す。5日目に、腫瘍を取り出し、視覚化して、GFPを標的とするAlexa750標識EpCAM-AsiCが実際に腫瘍に進入したことを検証した。増加したレベルのAlexa750は、mCherryレベルと負の相関関係にあった。（ $n=8$ 、 $*P<0.05$ 、EpCAM+細胞対EpCAM-細胞のt検定）。

【図32】図32A～32Bに、PLK1を標的とするEpCAM AsiCが基底A型乳癌細胞において腫瘍の成長を特異的に阻害することを示す。図32Aに実験の設定を示す。MB231-luc-mCherry細胞（ 5×10^5 個）またはMB468-luc細胞（ 5×10^6 個）のいずれかを注射したヌードマウスを、72時間毎にPLK1もしくはGFPのいずれかを標的とする5mg/KgのEpCAM AsiCで処置するかまたは未処置のままとした。IVISスペクトルイメージングシステムを使用して72時間毎に14日間にわたりマウスをイメージングした。図32Bに、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCで処置したMB468-luc腫瘍は、早くも処置の6日後にサイズを縮小し、多くのマウスで14日後に完全に消失し、EpCAM+およびEpCAM-の両方の未処置腫瘍は14日間にわたりサイズが増加したことを実証するグラフを示す。

【図33-1】図33に、MB468腫瘍がPLK1 EpCAM-AsiCを用いた処置後にのみ退縮することを実証する、腫瘍の成長のグラフを示す。sc MB468腫瘍を有するマウスを、5mg/kgのRNAで、腫瘍が触知可能になったときに開始して1週間に2回処置した。PLK1 EpCAM-AsiC、GFP SpCAM-AsiC、EpCAMアプタマー、PLK1 siRNA、およびモック処置サンプルを、表示のように分析した。

【図33-2】図33-1の説明を参照。

【図33-3】図33-1の説明を参照。

【図34】図34に、PLK1 siRNAが、PLK1 EpCAM-AsiCで処理した細胞においてアルゴノート（AGO）と結合することを実証する。PLK1 EPCAM-AsiCまたはsiRNAで2日間処理したMB-468細胞を溶解させ、細胞溶解物を汎AGO抗体またはIgGアイソタイプ対照で免疫沈降させた。免疫沈降物中のPLK1 siRNAの量をTaqman qRT-PCRによって定量し、miR-16と比較したSEM付き $\log_2$ 平均として表現した。 $**$ 、 $P<0.01$ 、siRNA処理細胞と比較したスチューデントのt検定による。ND、検出不能。PLK1 siRNAは、PLK1 EpCAM-AsiCを用いた処理後にRISC中から見出された。しかし、Ago免疫沈降は、上清からPLK1 siRNAを有意に枯渇させなかった。細胞によって取り込まれる大部分のRNAは、エンドソームからサイトゾルに放出されないもので、これは起こり得る。（A. Wittrup et al., Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. Nature Biotechnology 2015、印刷中）。

【図35】図35に、PLK EpCAM AsiCがMCF10CA1a（CA1a）腫瘍の成長を抑制することを示す。上欄に実験スキームを示す。この実験では、AsiCを腫瘍中ではなく、腫瘍近くの側腹部にsc注射した。下欄に、腫瘍（ $N=4$ ）の $\log_2$ 総発光光子束のグラフを示す； $*$ 、 $P<0.05$ 、スチューデントのt検定による。

【発明を実施するための形態】

【0013】

詳細な説明

本発明者らは、癌の処置におけるAsiC（アプタマー-siRNAキメラ分子）の驚くべき効力を実証した。本明細書に記載されるAsiCは、キメラ分子を癌細胞に特異的に標的指向化するアプタマーを利用し、siRNAの標的とされる遺伝子の効果的での抑制をもたらす。

【0014】

特に、本明細書に記載されるアプタマー、例えばEpCAMおよびEphA2を標的とするものは、癌源細胞（tumor-initiating cell）（癌幹細胞とも呼ばれる）を標的とする治療を可

10

20

30

40

50

能にする。これらの細胞は、発がんイニシエーション、再発、および転移を担うだけでなく、従来の細胞傷害性療法に相対的に耐性でもある。このように、本明細書に記載される組成物および方法は、既存の治療が行えない方法で基礎となる病理の有効な処置を可能にする。抗体を用いたEpCAMの直接ターゲティングが以前に研究されており、有効性が欠如していることが見出されていた点で、本明細書に記載されるAsiCの成功は、特に驚くべきことである。

【0015】

そのうえ、本明細書に記載されるAsiCは、上皮癌、例えば乳癌（例えばトリプルネガティブ乳癌（TNBC））の処置に驚くほど効果的であることが実証されている。TNBCに対する目下の標的指向化された療法はなく、利用できる処置は、典型的には3年以内に転移を招き、死に至る。本明細書に記載されるAsiCは、健康な細胞と比較して管腔型および基底A型TNBC細胞に特異的な、有効な遺伝子ノックダウンを示し、コロニー形成およびマンモスフィア形成をインビトロで抑制し、エクスピボで発がんイニシエーションを打ち消した。AsiCを用いたインビトロ処置は、治療薬の標的指向化された送達および迅速な腫瘍退縮を招いた。

【0016】

1つの局面において、癌マーカー結合ドメインおよび阻害性核酸ドメインを含むキメラ分子が、本明細書において記載されている。本明細書で使用される場合、「癌マーカー結合ドメイン」は、同じ型の健康な細胞と比較して癌細胞の表面により高く発現される分子（癌マーカー）と特異的に結合できるドメインおよび／または分子を表す。いくつかの態様において、癌マーカーは、タンパク質および／またはポリペプチドであることができる。いくつかの態様において、癌マーカーは、EpCAMまたはEphA2より選択することができる。いくつかの態様において、癌マーカー結合ドメインは、アダプターであることができる。

【0017】

本明細書で使用される場合、「EpCAM」または「上皮細胞接着分子」は、上皮細胞におけるCa²⁺非依存性ホモタイプ細胞間接着を媒介する膜貫通糖タンパク質を表す。EpCAMについての配列は、多様な種、例えばヒトEpCAM（例えばNCBI Gene ID:4072；タンパク質配列：NCBI Ref Seq: NP_002345.2を参照されたい）について公知である。

【0018】

本明細書で使用される場合、「EphA2」または「EPH受容体A2」は、エフリン型タンパク質-チロシンキナーゼ受容体を表す。EphA2は、エフリン-Aリガンドに結合し、宿主細胞へのカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの侵入を許す。EphA2についての配列は、多様な種、例えばヒトEphA2（例えばNCBI Gene ID:1969；タンパク質配列：NCBI Ref Seq: NP_004422.2を参照されたい）について公知である。

【0019】

本明細書で使用される場合、「阻害性核酸ドメイン」は、阻害性核酸を含むドメインを表す。いくつかの態様において、阻害性核酸はsiRNAであることができる。

【0020】

阻害性核酸ドメインは、癌細胞においてアップレギュレートされる遺伝子産物の発現ならびに／または細胞の成長および／もしくは生存に必要とされる遺伝子の発現を阻害、例えばそれを標的とすることができる。いくつかの態様において、阻害性核酸ドメインは、Plk1（例えば「polo様キナーゼ1」；NCBI Gene ID:5347）；MCL1（例えば骨髓細胞白血病配列1；NCBI Gene ID:4170）；EphA2（NCBI Gene ID:1969）；PsmA2（例えばプロテアソームサブユニットα2；NCBI Gene ID:5683）；MSI1（例えば、musashi RNA結合タンパク質1；NCBI Gene ID:4440）；BMI1（例えば、Bリンパ腫Mo-MLV挿入配列1、NCBI Gene ID:648）；XBP1（X-box結合タンパク質1；NCBI Gene ID:7494）；PRPF8（例えば、プレmRNAプロセッシング因子8；NCBI Gene ID:10594）；PFPF38A（例えば、プレmRNAプロセッシング因子38A；NCBI Gene ID:84950）；RBM22（例えば、RNA結合モチーフタンパク質22；NCBI Gene ID:55696）；USP39（例えば、ユビキチン特異的ペプチダーゼ39；NCBI Gene ID:10713

10

20

30

40

50

）；RAN（例えば、ras関連核タンパク質；NCBI Gene ID:5901）；NUP205（例えば、ヌクレオポリン205kDa；NCBI Gene ID:23165）、およびNDC80（例えば、NDC80キネトコア複合体成分；NCBI Gene ID:10403）より選択される遺伝子の発現を阻害することができる。これらの遺伝子、例えばヒトmRNAの配列は、NCBIデータベースから容易に得られ、阻害性核酸を設計するために当業者によって使用されることができる。さらに、例示的な阻害性核酸ドメイン、例えばSEQ ID NO:2の配列を有する核酸が、本明細書に提供される。

【0021】

いくつかの態様において、本明細書に記載される組成物は、アプタマーを含む癌マーカー結合ドメインおよびsiRNAを含む阻害性核酸ドメインを含むことができ、例えば、組成物は、アプタマー-siRNAキメラ（AsiC）を含むことができる。

10

【0022】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、癌を有するかまたは癌を有すると診断された対象を、本明細書に記載される組成物で処置することに関する。癌を有する対象は、癌を診断する現行方法を使用して医師によって同定されることができる。これらの状態を特徴づけ、かつ診断を助ける、癌の症状および／または合併症は、当技術分野において周知であり、それらには非限定的に、例えば乳癌の場合、乳房組織のしこりもしくは塊、乳房のすべてもしくは一部の腫脹、皮膚のかぶれ、乳房のくぼみ、乳房もしくは乳頭の疼痛、乳頭退縮、発赤、鱗屑（scaliness）、または乳房もしくは乳頭のかぶれ、および乳頭分泌が含まれる。例えば乳癌の診断の助けとなり得る試験には、非限定的にマンモグラム、X線、MRI、超音波、乳管造影図、生検、および乳管洗浄細胞診が含まれる。癌の家族歴または癌についてのリスク因子への曝露（例えば喫煙、放射線、汚染物、BRCA1変異など）も、対象が癌を有する可能性があるかの判定または癌の診断を助けることができる。

20

【0023】

本明細書で使用される場合、「悪性腫瘍」、「悪性状態」、「癌」、または「腫瘍」という用語は、身体器官および身体システムの正常な機能を妨害する、細胞の無制御な成長を表す。

【0024】

本明細書で使用される場合、「癌」という用語は、一般的に、異常な細胞が制御されずに分裂し、隣接組織に浸潤する可能性がある疾患または状態のうちの1つのクラスに関する。癌細胞は、また、血液およびリンパ系を経由して身体の他の部分に拡散する可能性がある。

30

【0025】

「癌細胞」または「腫瘍細胞」は、癌性成長または癌性組織の個別の細胞を表す。腫瘍は、一般的に、良性、前悪性、または悪性であり得る細胞の異常成長によって形成される腫脹または病変を表す。大部分の癌細胞は腫瘍を形成するが、一部、例えば白血病は、必ずしも腫瘍を形成しない。腫瘍を形成する癌細胞について、癌（細胞）および腫瘍（細胞）という用語は、互換的に使用される。

【0026】

癌または腫瘍を有する対象は、対象の体内に存在する客観的に測定可能な癌細胞を有する対象である。悪性の、活発に増殖する癌と同様に潜在的に休眠状態の腫瘍または微小転移が、この定義に含まれる。その本来の位置から移動して、他の重要器官に播種する癌は、最終的には、罹患器官の機能的悪化を通じて対象を死亡させる可能性がある。白血病のような造血癌は、対象における正常な造血区画を打ち負かす（out-compete）ことによって、造血不全（貧血、血小板減少症および好中球減少症の形態）に繋がり、最終的に死亡を引き起す可能性がある。

40

【0027】

癌の例には、非限定的に、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、基底細胞癌、胆道癌；膀胱癌；骨癌；脳およびCNS癌；乳癌；腹膜癌；子宮頸癌；絨毛癌；結腸直腸癌；結合組織癌；消化器癌；子宮内膜癌；食道癌；眼癌；頭頸部癌；胃癌（胃腸癌を含む）；

50

膠芽腫（GBM）；肝癌；肝細胞癌；上皮内新生物；腎臓または腎癌；喉頭癌；白血病；肝臓癌；肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌）；ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫；黒色腫；骨髓腫；神経芽細胞腫；口腔癌（例えば唇、舌、口、および咽頭）；卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸癌；呼吸器癌；唾液腺癌；肉腫；皮膚癌；扁平上皮癌；胃癌；精巣癌；甲状腺癌；子宮または子宮内膜癌；泌尿器癌；外陰癌；ならびに他の癌腫および肉腫；ならびにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非開裂細胞性NHL；かさばり病変性NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；およびワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症を含む）；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；ヘアリー細胞白血病；慢性骨髓芽球性白血病；および移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、ならびに母斑に関連する異常血管増殖、浮腫（たとえば脳腫瘍に関連する浮腫）、およびメージュ症候群が含まれる。いくつかの態様において、癌は、上皮癌であることができる。いくつかの態様において、癌は、乳癌であることができる。いくつかの態様において、癌は、トリプルネガティブ乳癌であることができる。

【0028】

「癌細胞」は、新たな遺伝子物質の取り込みを必ずしも伴わない、自発的または誘導された表現型の変化を有する、インビボ、エクシビボまたは組織培養のいずれかにおける、癌性、前癌性、または形質転換された細胞である。形質転換は、形質転換ウイルスによる感染、および新たなゲノム核酸の組み込み、または外因性核酸の取り込みにより起こることができるが、それはまた、自発的にまたは発癌物質への曝露後にも起こることができる、それにより内因性遺伝子を変異させる。形質転換／癌は、例えば、形態学的変化、細胞の不死化、異常な成長制御、病巣形成、足場非依存性、悪性腫瘍、成長の接触阻止および密度制限の喪失、成長因子もしくは血清非依存性、腫瘍特異的マーカー、侵襲性もしくは転移、ならびにヌードマウスのような適当な動物宿主における腫瘍成長に関連する。例えば、Freshney, CULTURE ANIMAL CELLS: MANUAL BASIC TECH. (3rd ed., 1994) を参照されたい。

【0029】

本明細書に記載される組成物および方法は、癌を有するかまたは癌を有すると診断された対象に投与することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、癌の症状を軽減するために、対象に有効量の本明細書に記載される組成物を投与する工程を含む。本明細書で使用される場合、「癌の症状を軽減する」は、癌に関連する任意の状態または症状を改善することである。同等の未処置対照と比較して、そのような減少は、任意の標準的な技術によって測定される少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%、またはそれを上回る減少である。本明細書に記載される組成物を対象に投与するための様々な手段が、当業者に公知である。そのような方法は、経口、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、肺、皮膚、局所、注射または腫瘍内投与を含むことができるが、それらに限定されるわけではない。投与は、局所または全身であることができる。いくつかの態様において、投与は皮下である。いくつかの態様において、本明細書に記載されるAsiCの投与は皮下である。

【0030】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、疾患または障害の少なくとも1つまたは複数の症状を軽減するのに必要とされる組成物の量を表し、所望の効果を提供する薬理的組成物の十分量に関連する。したがって「治療有効量」という用語は、典型的な対象に投与された場合に特定の抗癌性効果を提供するのに十分な量を表す。本明細書において様々な文脈で使用される有効量はまた、疾患の症状の進展を遅らせる、疾患の症状の経過を変化させる（例えば、しかしこれに限定されないが、疾患の症状の進行を鈍化させる）または疾患の症状を好転させるのに十分な量を含む。したがって、正確な「有効量」を指定することは通常現実的でない。しかし、任意の特定例ごとに、適当な「有効量」は、慣

用的実験のみを用いて当業者によって決定され得る。

【0031】

有効量、毒性および治療効果は、例えばLD50（集団の50%に対して致死性の用量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するために、細胞培養物または実験動物において標準的な薬学的手順により決定され得る。用量は、用いられる投薬形態および利用される投与経路に依存して異なり得る。毒性と治療効果の間の用量比が治療指数であり、LD50/ED50の比として表され得る。大きな治療指数を示す組成物および方法が好ましい。治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから概算され得る。また、用量は、細胞培養物においてまたは適当な動物モデルにおいて決定されたIC50（すなわち、症状の最大半量阻害を達成する組成物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するよう動物モデルにおいて決定され得る。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され得る。任意の特定の用量の効果は、適当なバイオアッセイ、例えば、特に腫瘍サイズに関するアッセイによってモニタリングされ得る。用量は、医師によって決定され得、必要な場合、観察される処置効果に適合するよう調節され得る。

【0032】

いくつかの態様において、本明細書に記載される技術は、本明細書に記載される薬学的組成物、および任意で薬学的に許容される担体に関連する。薬学的に許容される担体および希釈剤は、生理食塩水、水性緩衝溶液、溶媒および／または分散媒を含む。そのような担体および希釈剤の使用は、当技術分野で周知である。薬学的に許容される担体として機能し得る物質のいくつかの非限定的な例は、（1）糖、例えばラクトース、グルコースおよびスクロース；（2）デンプン、例えばトウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン；（3）セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロースおよび酢酸セルロース；（4）粉末トラガカント；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルク；（8）賦形剤、例えばココアバターおよび坐剤ワックス；（9）油、例えばピーナツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油；（10）グリコール、例えばポリエチレングリコール；（11）ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール（PEG）；（12）エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；（13）寒天；（14）緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；（15）アルギン酸；（16）発熱物質非含有水；（17）等張性生理食塩水；（18）リンガー溶液；（19）エチルアルコール；（20）pH緩衝溶液；（21）ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ無水物；（22）バルク剤、例えばポリペプチドおよびアミノ酸（23）血清成分、例えば血清アルブミン、HDLおよびLDL；（22）C₂～C₁₂アルコール、例えばエタノール；ならびに（23）薬学的配合物において用いられる他の非毒性適合物質を含む。湿潤剤、着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味剤、フレーバー剤、芳香剤、保存剤および抗酸化物質もまた、配合物中に存在し得る。「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」等の用語は、本明細書で言い換え可能に使用される。いくつかの態様において、担体は、例えば本明細書に記載される活性剤の分解を阻害する。

【0033】

いくつかの態様において、本明細書に記載される薬学的組成物は、非経口投薬形態であり得る。非経口投薬形態の投与は典型的に混入物質に対する患者の自然防御を迂回するので、非経口投薬形態は好ましくは滅菌性であるかまたは患者への投与前に滅菌することができるものである。非経口投薬形態の例は、注射可能な溶液、注射用の薬学的に許容されるビヒクルに溶解または懸濁可能な粉末物、注射可能な懸濁物および乳濁物を含むがこれらに限定されない。加えて、DUROS（登録商標）型投薬形態およびドーズ・ダンピング（dose-dumping）を含むがこれらに限定されない制御放出非経口投薬形態が、患者の投与のために調製され得る。

【0034】

開示される非経口投薬形態を提供するために使用され得る適当なビヒクルは、当業者に

周知である。例は、非限定的に、滅菌水；注射用水USP；生理食塩水溶液；グルコース溶液；水性ビヒクル、例えば、非限定的に、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液ならびに硫酸加リンガー注射液；水混和性ビヒクル、例えば、非限定的に、エチルアルコール、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコール；ならびに非水性ビヒクル、例えば、非限定的に、トウモロコシ油、綿実油、ピーナツ油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピルおよび安息香酸ベンジルを含む。薬学的に許容される塩の溶解性を変化させるまたは調整する化合物もまた、従来型および制御放出非経口投薬形態を含む本開示の非経口投薬形態に組み入れられ得る。

【0035】

10

薬学的組成物は、経口投与に適するように、例えば非限定的に、錠剤（非限定的に分割錠またはコーティング錠を含む）、丸剤、カプレット、カプセル剤、咀嚼錠、分包散剤（powder packets）、カシェ剤、トローチ、ウェーハー、エアロゾル噴霧剤、または非限定的に、水性液体、非水性液体、水中油型乳剤、もしくは油中水型乳剤中のシロップ剤、エリキシル剤、液剤もしくは懸濁剤のような液体のような別個の投薬形態として製剤化することもできる。そのような組成物は、開示された化合物の薬学的に許容される塩を所定量含有し、当業者に周知の薬学的方法によって調製され得る。一般的に、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia PA. (2005)を参照されたい。

【0036】

20

従来の投薬形態は、一般に、配合物からの迅速または即時の薬物放出を提供する。薬物の薬理学および薬物動態に依存して、従来型投薬形態の使用は、患者の血液および他の組織において薬物の濃度を大きく変動させ得る。これらの変動は、多くのパラメータ、例えば、投薬頻度、作用発現、効果期間、治療的血中レベルの維持、毒性、副作用等に影響し得る。制御放出配合物は、薬物の作用発現、作用期間、治療ウィンドウ内の血漿レベルおよび最大血中レベルを制御するために使用することができる利点を有する。特に、制御放出または延長放出投薬形態または配合物は、薬物の過少投薬（すなわち、最小治療レベル以下への降下）およびその薬物の毒性レベルの超過の両方から起こり得る、潜在的副作用および安全性の懸念を最小限に抑えつつ薬物の最大効果を達成することを確実にするために使用され得る。いくつかの態様において、組成物は、持続放出配合物として投与され得る。

30

【0037】

制御放出性薬品は、それらの非制御放出対応物により達成されるよりも薬物治療を改善するという共通の目標を有する。理想的には、薬物処置における最適に設計された制御放出調製物の使用は、最小限の時間内にその状態を治癒または制御するために用いられる最小量の薬物物質により特徴付けられる。制御放出配合物の利点は、1) 薬物の活性の長期化；2) 投薬頻度の低下；3) 患者のコンプライアンスの向上；4) より少ない総薬物量の使用；5) 局所または全身性の副作用の減少；6) 薬物蓄積の最小化；7) 血中レベルの変動の減少；8) 処置効果の改善；9) 薬物活性の相乗作用または喪失の減少；および10) 疾患または状態の制御速度の改善を含む。Kim, Cherng-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.:2000)。

40

【0038】

ほとんどの制御放出配合物は、所望の治療効果を即座に生じる薬物（活性成分）量を最初に放出し、そして徐々にかつ継続的に、この治療または予防効果のレベルを維持する別の薬物量を長期間にわたって放出するよう設計される。体内でのこの一定レベルの薬物を維持するために、薬物は、代謝され体内から排出される薬物量と置き換わる速度で投薬形態から放出されなければならない。活性成分の制御放出は、pH、イオン強度、浸透圧、温度、酵素、水および他の生理学的条件または化合物を含むがこれらに限定されない様々な条件によって刺激され得る。

【0039】

50

様々な公知の制御放出または延長放出投薬形態、配合物およびデバイスが、本開示の塩および組成物との使用に適合され得る。例は、各々参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第3,845,770号；同第3,916,899号；同第3,536,809号；同第3,598,123号；同第4,008,719号；同第5,674,533号；同第5,059,595号；同第5,591,767号；同第5,120,548号；同第5,073,543号；同第5,639,476号；同第5,354,556号；同第5,733,566号；および同第6,365,185号B1に記載されるものを含むがこれらに限定されない。これらの投薬形態は、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリクス、ゲル、透過性メンブレン、浸透圧システム（例えば、OROS（登録商標）（Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA）または様々な比率で所望の放出プロファイルを提供するそれらの組み合わせを用いた、1つまたは複数の活性成分の緩やかなまたは制御された放出を提供するために使用され得る。

10

【0040】

本明細書に記載される方法は、さらに、例えば併用療法の一部として、対象に第2の薬剤を投与するおよび／または処置を施す工程を含むことができる。第2の薬剤および／または処置の非限定的な例は、放射線療法、外科手術、ゲムシタビン、シスプラチン、パクリタキセル、カルボプラチン、ボルテゾミブ、AMG479、ポリノスタット、リツキシマブ、テモゾロミド、ラパマイシン、ABT-737、PI-103；チオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、イムプロスルファンおよびピボスルファンのようなアルキルスルホネート；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパのようなアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチロロメラミンを含むエチレンイミンおよびメチラメラミン；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成アナログであるトポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成アナログを含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログ、KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンビシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードのようなナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチンのようなニトロソウレア；エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンガンマII、およびカリケアマイシンオメガII（例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照されたい）のような抗生物質；ジネミシンAを含むジネミシン；クロドロネートのようなビスホスホネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連クロモタンパク質エンジイン抗生物質クロモフォア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN（登録商標）ドキソルビシン（モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルフォリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCのようなマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）のような代謝拮抗剤；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートのような葉酸アナログ；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリンアナログ；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノ

20

30

40

50

シタピン、フロクスウリジンのようなピリミジンアナログ；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンのようなアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸（frolinic acid）のような葉酸補給剤；アセグラトン；アルドホスファミドグルコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルミチン；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシンおよびアンサミトシンのようなメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖類複合体（JHS Natural Products, Eugene, Oreg.）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2毒素、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばTAXOL（登録商標）パクリタキセル（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）、ABRAXANE（登録商標）クレモフォアフリー、パクリタキセルのアルブミンナノ粒子製剤（American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.）、およびTAXOTERE（登録商標）ドキシタキセル（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロラムブシル；GEMZAR（登録商標）ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチンのような白金アナログ；ビンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イフォスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；NAVELBINE（商標）；ビノレルビン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン（Camptosar、CPT-11）（5-FUおよびロイコボリンを伴うイリノテカンの処置レジメンを含む）；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸のようなレチノイド；カベシタピン；コンプレタスタチン；ロイコボリン（LV）；オキサリプラチン処置レジメン（FOLFOX）を含むオキサリプラチン；ラパチニブ（Tykerb（商標））；細胞増殖を減少させる、PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR（例えば、エルロチニブ（Tarceva（登録商標）））およびVEGF-Aの阻害剤、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体を含むことができる。

【0041】

加えて処置方法は、さらに、放射線または放射線療法の使用を含むことができる。さらに処置方法は、さらに外科的処置の使用を含むことができる。

【0042】

本明細書に記載される任意の局面のいくつかの態様において、本明細書に記載されるキメラ分子は、タキサン（例えばドセタキセルまたはパクリタキセル）と組み合わせて投与することができる。本明細書に記載される任意の局面のいくつかの態様において、本明細書に記載されるキメラ分子は、パクリタキセルと組み合わせて投与することができる。本明細書に記載される任意の局面のいくつかの態様において、本明細書に記載されるAsiCは、タキサンと組み合わせて投与することができる。本明細書に記載される任意の局面のいくつかの態様において、本明細書に記載されるAsiCは、パクリタキセルと組み合わせて投与することができる。

【0043】

特定の態様において、有効用量の本明細書に記載される組成物は、患者に一度投与され得る。特定の態様において、有効用量の組成物は、患者に繰り返し投与され得る。全身投与の場合、対象は、例えば0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg、50 mg/kgまたはそれ以上を含む治療量の組成物を投与され得る。

【0044】

いくつかの態様において、初回処置レジメンの後に、処置はより低頻度で実施され得る。例えば、3ヶ月の間の隔週の処置の後に、処置は、6ヶ月または1年またはそれ以上の間、1ヶ月に1度で反復され得る。本明細書に記載される方法にしたがう処置は、状態のマーカーまたは症状のレベルを、例えば少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%またはそれ以上、減少させ得る。

【0045】

本明細書に記載される組成物の用量は、医師によって決定され得、そして必要な場合、観察される処置の効果に適するよう調節され得る。処置の期間および頻度に関して、処置がいつ治療的利益を提供するかを決定するために、および用量を増加もしくは減少させるかどうか、投与頻度を増加もしくは減少させるかどうか、処置を中断するかどうか、処置を再開するかどうかまたはその処置レジメンに対する他の代替処置レジメンを作成するかどうかを決定するために、臨床医が対象をモニタリングするのが典型的である。投薬スケジュールは、多くの臨床的因子、例えば組成物に対する対象の感受性に依存して、週に1回から毎日まで様々であり得る。所望の用量または活性化量は、一度に投与され得、または分割量、例えば2~4分割量に分割され、一定期間にわたって、例えば適切な間隔で一日を通じてもしくは他の適当なスケジュールで投与され得る。いくつかの態様において、投与は、長期的、例えば週または月にまたがる毎日の1または複数の投薬および/または処置、であり得る。投薬および/または処置スケジュールの例は、1週、2週、3週、4週、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月または6ヶ月またはそれを上回る期間にわたる、毎日、1日2回、1日3回、または1日4回もしくはそれ以上の回数の投与である。組成物は、一定期間にわたり、例えば5分間、10分間、15分間、20分間または25分間の時間にわたり投与され得る。

【0046】

利便性を考慮して、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いくつかの用語およびフレーズの意味を以下に提供する。それ以外のことが示されていない限り、または文脈から暗示されていない限り、以下の用語およびフレーズは、以下に提供される意味を含む。定義は、具体的実施態様の説明を補助するために提供され、特許請求の範囲に記載の発明を限定することは意図されておらず、本発明の範囲は、特許請求の範囲によってのみ限定される。それ以外のことが定義されていない限り、本明細書で 사용되는すべての技術および科学用語は、本発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者によって広く理解されているのと同じ意味を有する。当技術分野における用語の用法と本明細書に提供されるその定義の間に明らかな食い違いがあった場合、本明細書内に提供される定義が優先される。

【0047】

利便性を考慮して、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲で用いられる特定の用語をここにまとめる。

【0048】

「減少 (decrease)」、「減少 (reduced)」、「減少 (reduction)」または「阻害」という用語はすべて、統計的に有意な量の減少を意味するよう本明細書で使用される。いくつかの態様において、「減少 (reduce)」、「減少 (reduction)」または「減少 (decrease)」または「阻害 (inhibit)」は典型的に、参照レベル (例えば、特定の処置の非存在) と比較して少なくとも10%の減少を意味し、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%またはそれを上回る減少を含み得る。本明細書で 사용되는場合、「減少」または「阻害」は、参照レベルと比較しての完全な阻害または減少を包含しない。「完全な阻害」は、参照レ

ベルと比較しての100%阻害である。減少は好ましくは、特定の障害を有しない個体にとって正常範囲内として受け入れられるレベルへの低下であり得る。

【0049】

「増加 (increased)」、「増加 (increase)」、「増強」または「活性化」という用語はすべて、統計的に有意な量の増加を意味するよう本明細書で使用される。いくつかの態様において、「増加 (increased)」、「増加 (increase)」、「増強」または「活性化」という用語は、参照レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば、参照レベルと比較して少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、もしくは最大100%の増加、もしくは10~100%の間の任意の増加、または参照レベルと比較して少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍の増加、もしくは2倍~10倍の間の任意の増加もしくはそれ以上を意味し得る。マーカーまたは症状との関係で、「増加」は、そのようなレベルの統計的に有意な増加である。

10

【0050】

本明細書で使用される場合、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は脊椎動物、例えば霊長類、げっ歯類、家畜動物または狩猟動物である。霊長類は、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えばアカゲザルを含む。げっ歯類は、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターを含む。家畜および狩猟動物は、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ種、例えばイエネコ、イヌ種、例えばイヌ、キツネ、オオカミ、トリ種、例えばニワトリ、エミュー、ダチョウ、およびサカナ、例えばマス、ナマズおよびサケを含む。いくつかの態様において、対象は哺乳動物、例えば霊長類、例えばヒトである。「個体」、「患者」および「対象」という用語は、本明細書において言い換え可能に使用される。

20

【0051】

好ましくは、対象は哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、癌の動物モデルに相当する対象として使用することができる利点がある。対象は、雄（男性）または雌（女性）であり得る。

30

【0052】

対象は、処置を必要とする状態（例えば、癌）またはそのような状態に関係する1つもしくは複数の合併症を有すると以前に診断されているか、あるいはそれらを患っているもしくは有すると特定されており、かつ任意で、癌または癌に関係する1つもしくは複数の合併症に対する処置を既に受けた対象であり得る。あるいは、対象はまた、癌または癌に関係する1つもしくは複数の合併症を有すると以前に診断されていない対象であり得る。例えば、対象は、癌または癌に関係する1つもしくは複数の合併症に関する1つまたは複数のリスク因子を示す対象またはリスク因子を示さない対象であり得る。

【0053】

特定の状態に対する処置を「必要とする対象」は、その状態を有する対象、その状態を有すると診断された対象、またはその状態を発生させるリスクがある対象であり得る。

40

【0054】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において言い換え可能に使用され、隣接する残基のアルファ-アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合によって相互に接続された一連のアミノ酸残基を示す。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、そのサイズまたは機能に関わらず、修飾アミノ酸（例えばリン酸化、糖化、グリコシル化など）およびアミノ酸アナログを含むアミノ酸のポリマーを表す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は、多くの場合、比較的大きなポリペプチドに対して使用され、一方「ペプチド」という用語は、多くの場合、小さなポリペプチドに対して使用されるが、当技術分野におけるこれらの用語の使用は重

50

複している。遺伝子産物およびそのフラグメントを表す場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において言い換え可能に使用される。したがって、例示的なポリペプチドまたはタンパク質は、遺伝子産物、天然タンパク質、ホモログ、オルソログ、パラログ、フラグメント、ならびに前記の他の等価物、変種、フラグメントおよびアナログを含む。

【0055】

本明細書で使用される場合、「核酸」または「核酸配列」という用語は、リボ核酸、デオキシリボ核酸またはそのアナログのユニットが組み込まれた任意の分子、好ましくはポリマー分子を表す。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。一本鎖核酸は、変性された二本鎖DNAの一方の核酸鎖であり得る。あるいは、それは、任意の二本鎖DNA由来でない一本鎖核酸であり得る。1つの局面において、核酸は、DNAであり得る。別の局面において、核酸はRNAであり得る。適当な核酸分子は、ゲノムDNAまたはcDNAを含むDNAである。他の適当な核酸分子は、mRNAを含むRNAである。

【0056】

特定の遺伝子の発現の阻害剤は、阻害性核酸または阻害性オリゴヌクレオチドであり得る。いくつかの態様において、阻害性核酸は、阻害性RNA (iRNA) である。いくつかの態様において、阻害性核酸は阻害性DNA (iDNA) である。二本鎖RNA分子 (dsRNA) は、RNA干渉 (RNAi) として公知の高度に保存された調節メカニズムで遺伝子発現を阻止することが示されている。本明細書に記載される阻害性核酸は、標的遺伝子転写物の前駆体または成熟形態の少なくとも一部分に実質的に相補的である、30ヌクレオチド長またはそれ未満、すなわち8~30ヌクレオチド長、通常19~24ヌクレオチド長の領域を有するRNA鎖またはDNA鎖 (アンチセンス鎖) を含む得る。これらの阻害性オリゴヌクレオチドの使用は、標的遺伝子の標的指向化された分解による標的遺伝子の発現および／または活性の減少を可能にする。

【0057】

本明細書で使用される場合、「阻害性オリゴヌクレオチド」、「阻害性核酸」、または「アンチセンスオリゴヌクレオチド」 (ASO) という用語は、RNA転写物の標的指向化された切断を媒介するオリゴヌクレオチド、例えばDNAまたはRNA分子を含む作用物質を表す。1つの態様において、本明細書に記載される阻害性オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の発現および／または活性の阻害をもたらす。本方法および組成物に有用な阻害性核酸には、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列 (EGS) オリゴヌクレオチド、siRNA化合物、一本鎖または二本鎖RNA干渉 (RNAi) 化合物、たとえばsiRNA化合物、修飾塩基／ロックド核酸 (LNA)、アンタゴmir (antagomir)、ペプチド核酸 (PNA)、および標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズしてその機能を調節する他のオリゴマー性化合物またはオリゴヌクレオチド模倣体が含まれる。いくつかの態様において、阻害性核酸には、アンチセンスRNA、アンチセンスDNA、キメラアンチセンスオリゴヌクレオチド、修飾された結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、干渉RNA (RNAi)、低分子干渉RNA (siRNA)；マイクロ干渉RNA (miRNA)；低分子テンポラルRNA (stRNA)；または低分子ヘアピン型RNA (shRNA)；低分子RNA誘導遺伝子活性化 (RNAa)；低分子活性化RNA (saRNA)、またはそれらの組み合わせが含まれる。阻害性核酸に関するさらなる開示については、US2010/0317718 (アンチセンスオリゴ)；US2010/0249052 (二本鎖リボ核酸 (dsRNA))；US2009/0181914およびUS2010/0234451 (LNA)；US2007/0191294 (siRNAアナログ)；US2008/0249039 (修飾siRNA)；ならびにWO2010/129746およびWO2010/040112 (阻害性核酸) を参照されたい。

【0058】

特定の態様において、細胞を阻害剤 (例えば阻害性オリゴヌクレオチド) と接触させる工程は、細胞中の標的RNAレベルにおいて、阻害性オリゴヌクレオチドの不在下で細胞中に見出される標的mRNAレベルの少なくとも約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、および最大100%に相当する減少を招く。

10

20

30

40

50

【0059】

本明細書で使用される場合、「iRNA」という用語は、本明細書で定義されるところのRNAを含み、かつ、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）経路を通じたRNA転写物の標的指向化された切断を媒介する作用物質を表す。1つの態様において、本明細書に記載されるiRNAは、標的遺伝子の発現の阻害および／または活性の阻害をもたらす。1つの局面において、RNA干渉作用物質には、標的RNA配列と相互作用して標的RNAの切断を導く一本鎖RNAが含まれる。理論に縛られることを望むわけではないが、植物および無脊椎動物細胞内に導入された長い二本鎖RNAは、Dicerとして公知のIII型エンドヌクレアーゼによってsiRNAに破壊される（Sharp et al., Genes Dev. 2001, 15:485）。リボヌクレアーゼ-III様酵素であるDicerは、dsRNAを、特徴的な2つの3'オーバーハングを有する19～23塩基対の低分子干渉RNAにプロセシングする（Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363）。次に、siRNAは、1種類または複数種類のヘリカーゼがsiRNA二重鎖を巻き戻し、相補的アンチセンス鎖が標的認識をガイドできるようにするRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）に組み入れられる（Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309）。適当な標的mRNAに結合すると、RISC内の1種類または複数種類のエンドヌクレアーゼが標的を切断してサイレンシングを誘導する（Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188）。したがって、1つの局面において、RNA干渉作用物質は、標的転写物の標的領域での切断のためにRISC複合体をガイドして標的遺伝子のサイレンシングをもたらすRNAの一本鎖を含む該複合体の形成を促進する二本鎖RNAに関する。

【0060】

いくつかの態様において、阻害性オリゴヌクレオチドは、二本鎖核酸（例えばdsRNA）であることができる。二本鎖核酸は、二本鎖核酸が使用される条件でハイブリダイズして二重鎖構造を形成するために十分に相補的な2つの核酸鎖を含む。二本鎖核酸の一方の鎖（アンチセンス鎖）は、標的配列に実質的に相補的な、一般的に完全に相補的な相補性領域を含む。標的配列は、標的遺伝子の発現の間に形成されるmRNAおよび／または成熟miRNAの配列から得ることができる。もう一方の鎖（センス鎖）は、アンチセンス鎖に相補的な領域を含み、その結果、2本の鎖は適当な条件下で組み合わせるとハイブリダイズし、二重鎖構造を形成する。一般的に、二重鎖構造は、8個～30個（記載の数字を含む）、より一般的には18個～25個（記載の数字を含む）、さらにより一般的には19個～24個（記載の数字を含む）、最も一般的には19個～21個（記載の数字を含む）の塩基対の長さである。同様に、標的配列に相補的な領域は、8個～30個（記載の数字を含む）のヌクレオチド、より一般的には18個～25個（記載の数字を含む）のヌクレオチド、さらにより一般的には19個～24個（記載の数字を含む）のヌクレオチド、最も一般的には19個～21個（記載の数字を含む）のヌクレオチドの長さである。いくつかの態様において、dsRNAは15個～20個（記載の数字を含む）のヌクレオチドの長さであり、他の態様において、dsRNAは25個～30個（記載の数字を含む）のヌクレオチドの長さである。当業者が認識するように、切断の標的とされたRNAの標的とされた領域は、最も多くの場合、より大きなRNA分子、多くの場合mRNA分子の一部分である。該当する場合、mRNAおよび／またはmiRNA標的の「一部分」は、アンチセンス鎖を対象とした切断（例えばRISC経路を通じた切断）の基質となるのに十分な長さのmRNA標的の連続配列である。8塩基対と短い二重鎖を有する二本鎖核酸は、いくつかの状況下で、アンチセンス鎖を対象としたRNA切断を媒介することができる。最も多くの場合、標的は、少なくとも15ヌクレオチド長、好ましくは15～30ヌクレオチド長である。

【0061】

当業者は、二重鎖領域、例えば8～36、例えば15～30塩基対の二重鎖領域が、二本鎖阻害性核酸の主な機能的部分であることも認識している。したがって、1つの態様において、プロセシングされて所望のRNAを切断の標的とする、例えば15～30塩基対の機能的二重鎖になる限り、30塩基対よりも大きな二重鎖領域を有する阻害性核酸分子または阻害性核酸分子の複合体は、二本鎖核酸である。このように当業者は、次に、1つの態様においてmiRNAがdsRNAであることを認識している。別の態様において、dsRNAは、非天然miRNAであ

る。別の態様において、標的遺伝子の発現を標的とするために有用な阻害性核酸作用物質は、標的細胞において、より大きな二本鎖核酸分子の切断によって産生されることはない。

【0062】

標的配列は、一般的に15～30ヌクレオチド長であるが、任意の所与の標的RNAの切断を導くことに関して、この範囲内の特定の配列の適合性には、幅広い多様性がある。miRNAが標的指向化される場合、標的配列は、「シード」領域（例えばヌクレオチド2～8つ）を含めてヌクレオチド8つほどの短さであることができる。本明細書において記載される様々なソフトウェアパッケージおよびガイドラインは、任意の所与の遺伝子標的にとって最適な標的配列を同定するためのガイダンスを提供するが、所与のサイズ（非限定的な例として、ヌクレオチド21個）の「ウィンドウ」または「マスク」が標的RNA配列上に文字通りまたは比喩的（例えばインシリコを含む）に配置されて、標的配列として役立ち得るサイズ範囲の配列を同定する、経験的アプローチも採用することができる。選択された任意の所与の標的サイズについて可能な配列の完全なセットが同定されるまで、配列「ウィンドウ」を最初の標的配列の位置から上流または下流に1つのヌクレオチドだけ連続的に移動させることによって、次の潜在的標的配列を同定することができる。同定された配列の系統的合成および最適に機能する配列を同定するための試験（本明細書に記載される、または当技術分野において公知のアッセイを使用する）を伴う上記のプロセスは、阻害性核酸作用物質を用いて標的指向化したときに標的遺伝子発現の最良の阻害を媒介するRNA配列を同定することができる。

10

20

【0063】

本明細書に記載される二本鎖阻害性核酸は、さらに、1つまたは複数の一本鎖ヌクレオチドオーバーハングを含むことができる。二本鎖阻害性核酸は、例えばさらに下に論じるように当技術分野において公知の標準的な方法によって、例えばBiosearch、Applied Biosystems, Inc. から市販されているように自動DNA合成装置を使用することによって、合成することができる。1つの態様において、二本鎖阻害性核酸のアンチセンス鎖は、3'末端および／または5'末端にヌクレオチド1～10個のオーバーハングを有する。1つの態様において、二本鎖阻害性核酸のセンス鎖は、3'末端および／または5'末端にヌクレオチド1～10個のオーバーハングを有する。1つの態様において、二本鎖阻害性核酸の少なくとも一端は、ヌクレオチド1～4つ、一般的に1または2つの一本鎖ヌクレオチドオーバーハングを有する。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二本鎖阻害性核酸は、それらの平滑末端対応物と比較して予想外に優れた阻害特性を有する。

30

【0064】

別の態様において、オーバーハング中の1つまたは複数のヌクレオチドは、ヌクレオシドチオリン酸と置換されている。

【0065】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチドオーバーハング」という用語は、阻害性核酸、例えばdsRNAの二重鎖構造から突出する少なくとも1つの不對ヌクレオチドを表す。例えば、二本鎖阻害性核酸の一方の鎖の3'末端がもう一方の鎖の5'末端を超えて伸長する場合、またはその逆の場合、ヌクレオチドオーバーハングがある。二本鎖阻害性核酸は、少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーハングを含むことができ；あるいは、オーバーハングは、少なくとも2つのヌクレオチド、少なくとも3つのヌクレオチド、少なくとも4つのヌクレオチド、少なくとも5つのヌクレオチド、またはそれ以上含むことができる。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシヌクレオチド／ヌクレオシドを含むヌクレオチド／ヌクレオシドアナログを含む、またはそれからなることができる。オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖またはその任意の組み合わせ上にあり得る。さらに、オーバーハングのヌクレオチドは、二本鎖阻害性核酸のアンチセンス鎖またはセンス鎖のいずれかの5'末端、3'末端または両端に存在することができる。

40

【0066】

二本鎖阻害性核酸に関連して本明細書で使用される「平滑末端化する」または「平滑末

50

端」という用語は、dsRNAの所与の末端に不對のヌクレオチドもヌクレオチドアナログもないこと、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。二本鎖阻害性核酸の一端または両端は、平滑末端化されることができる。二本鎖阻害性核酸の両端が平滑末端の場合、二本鎖阻害性核酸は、平滑末端化されていると言われる。明確にするために言うと、「平滑末端化」された二本鎖阻害性核酸は、両端で平滑な、すなわち分子のどちらの末端にもヌクレオチドオーバーハングがない、二本鎖阻害性核酸である。ほとんどの場合、そのような分子は、その全長にわたり二本鎖である。

【0067】

この局面において、2つの鎖の一方は、2つの鎖のもう一方と相補的であり、鎖の一方は、標的遺伝子前駆体または成熟miRNAの配列と実質的に相補的である。そのように、この局面において、二本鎖阻害性核酸は、一方のオリゴヌクレオチドがセンス鎖として記載され、第2のオリゴヌクレオチドが、センス鎖に対応するアンチセンス鎖として記載される、2つのオリゴヌクレオチドを含む。本明細書のどこか他に記載されるように、および当技術分野に公知のように、別々のオリゴヌクレオチド上にあるのとは対照的に、二本鎖阻害性核酸の相補的配列は、単一核酸分子の自己相補性領域としても含まれることができる。

10

【0068】

当業者は、20から23の間であるが、具体的には21塩基対の二重鎖構造を有する阻害性核酸が、アンチセンス媒介阻害を誘導するのに特に有効であると認められていることを十分に承知している (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888)。しかし、他の当業者は、より短いまたはより長い阻害性核酸が同様に有効であり得ることを見出している。

20

【0069】

さらに、同定された任意の配列について、ヌクレオチドを系統的に付加または除去することにより、より長いまたはより短い配列を産生させ、それらの配列、およびその点から標的RNAの上流または下流により長いまたは短いサイズのウィンドウをウォーキングすることによって産生された配列を試験することによって、さらなる最適化を達成することもできることが、考察されている。また、新たな候補標的を産生するためのこのアプローチを、当技術分野において公知のまたは本明細書に記載される阻害アッセイでそれらの標的配列に基づく阻害性核酸の有効性の試験と結合させることで、阻害効率でのさらなる改善に繋げることができる。なおさらに、そのような最適化された配列を、例えば本明細書に記載される、もしくは当技術分野において公知の修飾ヌクレオチドの導入、オーバーハングの付加もしくは変化、または分子をさらに最適化する（例えば、血清安定性もしくは循環半減期を増加させる、熱安定性を増加させる、膜貫通送達を高める、特定の位置もしくは細胞型に対して標的指向化する、サイレンシング経路の酵素との相互作用を増加させる、エンドソームからの放出を増加させるなど）ための当技術分野において公知および／もしくは本明細書において論じられる他の修飾によって発現阻害剤として調整することができる。

30

【0070】

本明細書に記載される阻害性核酸は、標的配列に対する1つまたは複数のミスマッチを含むことができる。1つの態様において、本明細書に記載される阻害性核酸は、3つ以下のミスマッチを含む。阻害性核酸のアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含むならば、ミスマッチの区域が相補性領域の中心に位置しないことが好ましい。阻害性核酸のアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含むならば、ミスマッチが相補性領域の5'または3'末端のいずれかから最後の5ヌクレオチド内に限定されることが好ましい。例えば、標的遺伝子またはその前駆体の領域に相補的な23ヌクレオチドの阻害性核酸作用物質鎖について、該鎖は、一般的に、中心の13ヌクレオチド内にミスマッチを全く含まない。本明細書に記載される方法または当技術分野において公知の方法は、標的配列とのミスマッチを含む阻害性核酸が標的遺伝子の発現を阻害するのに有効かどうかを判定するために使用することができる。標的遺伝子の発現阻害における、ミスマッチを有する阻害性核酸の効力を考慮することは、特に標的遺伝子中の特定の相補性領域が集団内で多型配列変動を有す

40

50

ることが公知ならば、重要である。

【0071】

さらに別の態様において、阻害性核酸の核酸、例えばdsRNAは、安定性または他の有益な特徴を増強するために化学的に修飾される。本発明において特徴とされる核酸は、当技術分野において十分に確立された方法、例えば、参照により本明細書に組み入れられる "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載される方法によって合成および／または修飾され得る。修飾は、例えば (a) 末端修飾、例えば5'末端修飾（リン酸化、コンジュゲーション、逆結合等）、3'末端修飾（コンジュゲーション、DNAヌクレオチド、逆結合等）、(b) 塩基修飾、例えば安定化塩基、不安定化塩基、もしくは拡張された相手方のレパートリーと塩基対形成する塩基との置換、塩基の除去（脱塩基ヌクレオチド）または共役塩基、(c) 糖修飾（例えば、2'位もしくは4'位における修飾）または糖の置換、および (d) ホスホジエステル結合の修飾または置換を含む骨格修飾を含む。本明細書に記載される態様において有用な核酸化合物の具体例は、非限定的に、修飾骨格を含むまたは天然のヌクレオシド間結合を含まない核酸を含む。修飾骨格を有する核酸は、特に、骨格にリン原子を有しない核酸を含む。本明細書の目的上、およびときどき当技術分野において参照されるように、ヌクレオシド間骨格にリン原子を有しない修飾核酸も、オリゴヌクレオシドであるとみなされ得る。特定の態様では、修飾核酸は、そのヌクレオシド骨格にリン原子を有する。

10

【0072】

20

修飾骨格は、例えば、通常の3'-5'結合を有する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、およびボラノホスフェート、これらの2'-5'結合アナログ、ならびに隣接するヌクレオシドユニットの対が3'-5'から5'-3'に、または2'-5'から5'-2'に連結した逆極性を有するものを含み得る。様々な塩、混合塩および遊離酸形態も含まれる。

【0073】

30

上記のリン含有連結の形成を教示する代表的な米国特許は、各々参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第3,687,808号；同第4,469,863号；同第4,476,301号；同第5,023,243号；同第5,177,195号；同第5,188,897号；同第5,264,423号；同第5,276,019号；同第5,278,302号；同第5,286,717号；同第5,321,131号；同第5,399,676号；同第5,405,939号；同第5,453,496号；同第5,455,233号；同第5,466,677号；同第5,476,925号；同第5,519,126号；同第5,536,821号；同第5,541,316号；同第5,550,111号；同第5,563,253号；同第5,571,799号；同第5,587,361号；同第5,625,050号；同第6,028,188号；同第6,124,445号；同第6,160,109号；同第6,169,170号；同第6,172,209号；同第6,239,265号；同第6,277,603号；同第6,326,199号；同第6,346,614号；同第6,444,423号；同第6,531,590号；同第6,534,639号；同第6,608,035号；同第6,683,167号；同第6,858,715号；同第6,867,294号；同第6,878,805号；同第7,015,315号；同第7,041,816号；同第7,273,933号；同第7,321,029号；および米国再発行特許第39464号を含むがこれらに限定されない。

40

【0074】

リン原子を含まない修飾骨格は、短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、ヘテロ原子とアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合の組み合わせ、または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子性もしくは複素環性ヌクレオシド間結合によって形成された骨格を有する。これらは、モルホリノ結合（部分的にヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサン骨格；スルフィド、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；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレン

50

ヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格を有するもの；ならびにN、O、SおよびCH₂要素部分の組み合わせを有するその他を含む。

【0075】

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は、各々参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,034,506号；同第5,166,315号；同第5,185,444号；同第5,214,134号；同第5,216,141号；同第5,235,033号；同第5,64,562号；同第5,264,564号；同第5,405,938号；同第5,434,257号；同第5,466,677号；同第5,470,967号；同第5,489,677号；同第5,541,307号；同第5,561,225号；同第5,596,086号；同第5,602,240号；同第5,608,046号；同第5,610,289号；同第5,618,704号；同第5,623,070号；同第5,663,312号；同第5,633,360号；同第5,677,437号；および同第5,677,439号を含むがこれらに限定されない。

10

【0076】

阻害性核酸における使用に適したまたはその使用が想定されている他の核酸模倣体では、糖およびヌクレオシド間結合の両方、すなわちヌクレオチドユニットの骨格が、新しい基と置換される。塩基ユニットは、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。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1つのそのようなオリゴマー化合物である核酸模倣体は、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物においては、核酸の糖骨格が、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、かつ骨格のアミド部分のアザ窒素原子と直接または間接的に結合している。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許は、各々参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,539,082号；同第5,714,331号；および同第5,719,262号を含むがこれらに限定されない。PNA化合物のさらなる教示は、例えば、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500において見出すことができる。

20

【0077】

本発明において特徴とされるいくつかの態様は、ホスホロチオエート骨格を有する核酸およびヘテロ原子骨格、特に上記参照の米国特許第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骨格として公知]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--および--N(CH₃)--CH₂--CH₂--[ネイティブのホスホジエステル骨格は--O--P--O--CH₂--で表される]および上記参照の米国特許第5,602,240号のアミド骨格を有するオリゴヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、本明細書において特徴とされる阻害性核酸は、上記参照の米国特許第5,034,506号のモルホリノ骨格構造を有する。

30

【0078】

修飾核酸はまた、1つまたは複数の置換糖部分を含み得る。本明細書において特徴とされる阻害性核酸は、2'位に、以下：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つを含み得、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または非置換の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。例示的な適切な修飾は、nおよびmが1から約10である、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を含む。他の態様において、dsRNAは、2'位に以下：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、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ON₂、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、インターカレーター、阻害性核酸の薬物動態特性を改善するための基または阻害性核酸の薬力学特性を改善するための基、および類似の特性を有する他の置換基のうちの1つを含む。いくつかの態様において、修飾は、2'-メトキシエトキシ（2'-O-（2'-メトキシエチル）または2'-MOEとしても公知の2'-O--CH₂CH₂OCH₃）（Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504）、すなわちアルコキシ-アルコキシ基を含む。別の例示的な修飾は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち本明細書後述の実施例に記載される2'-DMAOEとしても公知の

40

50

O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ（当技術分野において2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても公知）、すなわち本明細書後述の実施例にも記載される2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂である。

【0079】

他の修飾は、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)を含む。同様の修飾は、阻害性核酸の核酸上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上または2'-5'連結dsRNA中の糖の3'位および5'末端ヌクレオチドの5'位においてもなされ得る。阻害性核酸はまた、ペントフラノシル糖の1に糖模倣体、例えばシクロブチル部分を有し得る。そのような修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許は、米国特許第4,981,957号；同第5,118,800号；同第5,319,080号；同第5,359,044号；同第5,393,878号；同第5,446,137号；同第5,466,786号；同第5,514,785号；同第5,519,134号；同第5,567,811号；同第5,576,427号；同第5,591,722号；同第5,597,909号；同第5,610,300号；同第5,627,053号；同第5,639,873号；同第5,646,265号；同第5,658,873号；同第5,670,633号；および同第5,700,920号を含むがこれらに限定されず、それらの中のいくつかは本出願と共に共有されており、これらの各々は参照により本明細書に組み入れられる。

【0080】

阻害性核酸はまた、核酸塩基（当技術分野においてしばしば単に「塩基」と称される）の修飾または置換を含み得る。本明細書で使用される場合、「非修飾」または「天然」核酸塩基は、プリン塩基であるアデニン（A）およびグアニン（G）ならびにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）およびウラシル（U）を含む。修飾核酸塩基は、他の合成および天然核酸塩基、例えば、5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、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-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル（プソイドウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザ（daaza）アデニンならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンを含む。さらなる核酸塩基は、米国特許第3,687,808号に開示されるもの、Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008に開示されるもの；The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されるもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613によって開示されるこれら、およびSanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993によって開示されるものを含む。これらの核酸塩基のいくつかは、本発明において特徴とされるオリゴマー化合物の結合親和性を増加させるのに特に有用である。これらは、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0-6置換プリンを含む。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°C増加させることが示されており（Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）、これらは、より詳細には2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせる場合の、例示的な塩基置換である。

【0081】

上述の修飾核酸塩基および他の修飾核酸塩基のいくつかの調製を教示する代表的な米国特許は、上記の米国特許第3,687,808号、ならびに各々参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,845,205号；同第5,130,30号；同第5,134,066号；同第5,175,273号；同第5,367,066号；同第5,432,272号；同第5,457,187号；同第5,459,255号；同第5,484,908

号；同第5,502,177号；同第5,525,711号；同第5,552,540号；同第5,587,469号；同第5,594,121号；同第5,596,091号；同第5,614,617号；同第5,681,941号；同第6,015,886号；同第6,147,200号；同第6,166,197号；同第6,222,025号；同第6,235,887号；同第6,380,368号；同第6,528,640号；同第6,639,062号；同第6,617,438号；同第7,045,610号；同第7,427,672号；および同第7,495,088号、ならびに同様に参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,750,692号を含むがこれらに限定されない。

【0082】

阻害性核酸の核酸はまた、1つまたは複数のロックド核酸（LNA）を含むよう修飾され得る。ロックド核酸は、リボース部分が2'炭素と4'炭素を接続する追加の架橋を含む修飾リボース部分を有するヌクレオチドである。この構造は、リボースを3'-エンド立体構造内に効果的に「ロック」する。siRNAへのロックド核酸の付加は、血清中でのsiRNAの安定性を増加させ、オフターゲット効果を減少させることが示されている（Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193）。

【0083】

ロックド核酸ヌクレオチドの調製を教示する代表的な米国特許は、各々全体が参照により本明細書に組み入れられる以下が含まれるがこれらに限定されない：米国特許第6,268,490号；同第6,670,461号；同第6,794,499号；同第6,998,484号；同第7,053,207号；同第7,084,125号；および同第7,399,845号。

【0084】

本発明において特徴とされる阻害性核酸の別の核酸修飾は、阻害性核酸の活性、細胞分布、薬物動態特性または細胞取り込みを増強する1つまたは複数のリガンド、部分またはコンジュゲートを核酸に化学的に連結することを伴う。そのような部分は、脂質部分、例えば、コレステロール部分（Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556）、コール酸（Manoharan et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060）、チオエーテル、例えばベリル-S-トリチルチオール（Manoharan et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770）、チオコレステロール（Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538）、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基（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-グリセロールまたはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-ホスホネート（Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973）、またはアダマンタン酢酸（Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654）、パルミチル部分（Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分（Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937）を含むがこれらに限定されない。

【0085】

1つの態様において、リガンドは、それが組み入れられる阻害性核酸作用物質の分布、ターゲティングまたは寿命を変化させる。好ましい態様において、リガンドは、例えばそのようなリガンドを欠く種と比較して、選択された標的、例えば分子、細胞または細胞型、区画、例えば細胞区画もしくは器官区画、組織、器官または身体領域に対する増強した親和性を提供する。好ましいリガンドは、二重鎖核酸における二重鎖対形成に関与しない。

【0086】

リガンドは、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リボタンパク

10

20

30

40

50

質 (LDL)、もしくはグロブリン) ; 糖質 (例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、インスリン、シクロデキストリンまたはヒアルロン酸) ; または脂質のような天然物質を含むことができる。リガンドは、また、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸のような組み換えまたは合成分子であり得る。ポリアミノ酸の例には、ポリリシン (PLL)、ポリLアスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ (L-ラクチド-co-グリコリド) コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル) メタクリルアミドコポリマー (HMPA)、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリウレタン、ポリ (2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、またはポリホスファジンが含まれる。ポリアミンの例には、ポリエチレンイミン、ポリリシン (PLL)、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣体ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、陽イオン脂質、陽イオンポルフィリン、ポリアミンの4級塩、または α ヘリックスペプチドが含まれる。

10

【0087】

リガンドは、また、ターゲティング基、例えば、細胞または組織を標的とする作用物質、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質、例えばとりわけ肝細胞またはマクロファージのような特定化された細胞型に結合する抗体を含むことができる。ターゲティング基は、甲状腺刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質A、ムチン糖質、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸エステル、ポリアスパラギン酸エステル、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸塩、ビタミンB12、ビタミンA、ビオチン、またはRGDペプチドもしくはRGDペプチド模倣体であることができる。

20

【0088】

リガンドの他の例には、色素、挿入剤 (例えばアクリジン)、架橋剤 (例えばソラレン、マイトマイシンC)、ポルフィリン (TPPC4、テキサフィリン、サフィリン)、多環式芳香族炭化水素 (例えばフェナジン、ジヒドロフェナジン)、人工エンドヌクレアーゼ (例えばEDTA)、親油性分子、例えばコレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-0 (ヘキサデシル) グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、03- (オレオイル) リトコール酸、03- (オレオイル) コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン) およびペプチドコンジュゲート (例えばアンテナペディアペプチド、Tatペプチド)、アルキル化剤、リン酸エステル、アミノ、メルカプト、PEG (例えば、PEG-40K)、MPEG、[MPEG]2、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射標識マーカー、酵素、ハプテン (例えばビオチン)、輸送/吸収促進因子 (例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ (例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュゲート、テトラアザ大環状Eu3+錯体)、ジニトロフェニル、HRP、またはAPが含まれる。

30

40

【0089】

リガンドは、タンパク質、例えば糖タンパク質、またはペプチド、例えば、共リガンドに対して特異的親和性を有する分子、または抗体、例えば肝細胞またはマクロファージのような特異的細胞型に結合する抗体であることができる。リガンドは、また、ホルモンおよびホルモン受容体を含み得る。それらはまた、脂質、レクチン、糖質、ビタミン、補助因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノース、または多価フコースのような非ペプチド種を含むこともできる。

【0090】

リガンドは、例えば細胞の細胞骨格を破壊することによって、例えば細胞の微小管、微

50

小線維、および／もしくは中間径フィラメントを破壊することによって、細胞内への阻害性核酸作用物質の取り込みを増加させることができる物質、例えば薬物であることができる。薬物は、例えば、タクソン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、またはミオセルビンであることができる。

【0091】

いくつかの態様において、本明細書に記載される阻害性核酸に結合したリガンドは、薬物動態(PK)モジュレーターとして作用する。本明細書で使用される場合、「PKモジュレーター」は、薬物動態モジュレーターを表す。PKモジュレーターには、親油性物質(lipophile)、胆汁酸、ステロイド、リン脂質アナログ、ペプチド、タンパク質結合作用因子、PEG、ビタミンなどが含まれる。例示的なPKモジュレーターには、非限定的に、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアルキルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンE、ビオチンなどが含まれる。いくつかのホスホロチオエート結合を含むオリゴヌクレオチドも、血清タンパク質と結合することが公知であり、従って、低分子オリゴヌクレオチド、例えば、主鎖に複数のホスホロチオエート結合を含む、約5塩基、10塩基、15塩基または20塩基のオリゴヌクレオチドも、リガンドとして本発明に適用できる(例えばPKを調節するリガンドとして)。加えて、血清成分(例えば血清タンパク質)と結合するアダプターも、本明細書に記載される態様においてPKを調節するリガンドとしての使用に適當である。

【0092】

二重膜を容易に通過できない高分子薬および親水性薬物分子について、細胞のエンドソーム／リソソーム区画内への捕捉が、その作用部位への効果的な送達のための最大のハードルであると考えられる。いくつかのアプローチおよび戦略が、この問題に取り組むように考案されている。リポソーム製剤について、製剤における融合誘発性脂質の使用が、最もよく見られるアプローチである(Singh, R. S., Goncalves, C. et al. (2004). On the Gene Delivery Efficacies of pH-Sensitive Cationic Lipids via Endosomal Protonation. A Chemical Biology Investigation. Chem. Biol. 11, 713-723.)。プロトン化および／またはpH誘導性立体配座変化によりpH感受性エンドソーム溶解活性を示す他の成分には、荷電ポリマーおよびペプチドが含まれる。例は、Hoffman, A. S., Stayton, P. S. et al. (2002). Design of "smart" polymers that can direct intracellular drug delivery. Polymers Adv. Technol. 13, 992-999; Kakudo, Chaki, T., S. et al. (2004). Transferrin-Modified Liposomes Equipped with a pH-Sensitive Fosogenic Peptide: An Artificial Viral-like Delivery System. Biochemistry 436, 5618-5628; Yessine, M. A. and Leroux, J. C. (2004). Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules. Adv. Drug Deliv. Rev. 56, 999-1021; Oliveira, S., van Rooy, I. et al. (2007). Fusogenic peptides enhance endosomal escape improving inhibitory nucleic acid-induced silencing of oncogenes. Int. J. Pharm. 331, 211-4から見出され得る。それらは、一般的に、リポソームまたはリポプレックスのような薬物送達システムに関連して使用されている。リポソーム製剤を使用する葉酸塩受容体媒介送達について、例えばpH感受性融合誘発性ペプチドがリポソームに組み入れられ、取り込みプロセスの間に薬物の荷下ろしを改善することによって活性を高めることが示されている(Turk, M. J., Reddy, J. A. et al. (2002). Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs is described in Biochim. Biophys. Acta 1559, 56-68)。

【0093】

特定の態様において、エンドソーム溶解成分は、pH依存性膜活性および／または融合誘発性を示すポリアニオン性ペプチドまたはペプチド模倣体であることができる。ペプチド模倣体は、ペプチドを模倣するように設計された低分子タンパク質様鎖であることができる。ペプチド模倣体は、分子特性を改変するために既存のペプチドの修飾または非天然ア

【 0 0 9 4 】

【 0 0 9 5 】

【 0 0 9 6 】

【 0 0 9 7 】

して、細胞中のエンドソーム集団における差を判定することができる。被験化合物および

／またはエンドソームを標識して、例えばエンドソームの漏出を定量することができる。

【0098】

別の種類のアッセイでは、本明細書に記載される阻害性核酸作用物質は、1種類または複数種類の被験作用因子または推定上の融合誘発性作用因子を使用して構築される。阻害性核酸作用物質は、容易な視覚化のために標識することができる。阻害性核酸作用物質が細胞によって取り込まれた後、エンドソーム溶解成分がエンドソーム脱出を促進する能力を、例えばエンドソーム調製物の調製によって、または細胞の細胞質中の標識阻害性核酸作用物質を視覚化できるようにする顕微鏡技術によって評価することができる。特定の他の態様において、遺伝子発現の阻害または任意の他の生理学的パラメータがエンドソーム脱出の代替マーカーとして使用され得る。

10

【0099】

他の態様において、pH依存性構造転移を示す化合物を同定するために円偏光二色性分光法を使用することができる。第1のアッセイが、被験化合物が単独でpH変化に応答する能力を評価し、第2のアッセイが、被験化合物を含むモジュール組成物がpH変化に応答する能力を評価する、二段階アッセイも行うことができる。

【0100】

本明細書に記載される局面の1つの態様において、リガンドまたはコンジュゲートは、脂質または脂質ベースの分子である。そのような脂質または脂質ベースの分子は、好ましくは血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン（HSA）と結合する。HSA結合リガンドは、標的組織、例えば身体の高腎臓標的組織へのコンジュゲートの分布を可能にする。HSAと結合できる他の分子もリガンドとして使用することができる。例えば、ネプロキシンまたはアスピリンを使用することができる。脂質または脂質ベースのリガンドは、(a) コンジュゲートの分解に対する耐性を増加させることができ、(b) 標的細胞もしくは細胞膜へのターゲティングもしくは輸送を増加させることができ、かつ／または (c) 血清タンパク質、例えばHSAへの結合を調整するために使用することができる。

20

【0101】

別の局面において、リガンドは、細胞透過作用物質、好ましくはヘリカル細胞透過作用物質である。好ましくは、そのような作用物質は両親媒性である。例示的な作用物質は、tatまたはアンテナペディオのようなペプチドである。作用物質がペプチドの場合、ペプチジル模倣体、インポートマー、非ペプチドまたは擬似ペプチド結合、およびD-アミノ酸の使用でそれを修飾することができる。ヘリカル作用物質は、好ましくは α -ヘリカル作用物質であり、 α -ヘリカル作用物質は、好ましくは、親油相および疎油相を有する。

30

【0102】

本発明での使用に適当なペプチドは、天然ペプチド、例えばtatまたはアンテナペディオペプチド、合成ペプチド、またはペプチド模倣体であることができる。さらに、ペプチドは、修飾ペプチドであることができ、例えばペプチドは、非ペプチドまたは擬似ペプチド結合、およびD-アミノ酸を含むことができる。ペプチド模倣体（本明細書においてオリゴペプチド模倣体とも呼ばれる）は、天然ペプチドに類似した所定の三次元構造にフォールディング可能な分子である。阻害性核酸作用物質へのペプチドおよび模倣体の結合は、例えば細胞認識および吸収を高めることによって、阻害性核酸の薬物動態的分布に影響することができる。ペプチドまたはペプチド模倣体部分は、約5～50アミノ酸長、例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50アミノ酸長であることができる。

40

【0103】

ペプチドまたはペプチド模倣体は、例えば、細胞透過性ペプチド、陽イオンペプチド、両親媒性ペプチド、または疎水性ペプチド（例えば、主としてTyr、TrpまたはPheからなる）であることができる。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、束縛されたペプチドまたは架橋ペプチドであることができる。別の代替において、ペプチド部分は、疎水性膜移行配列（MTS）を含むことができる。例示的な疎水性MTS含有ペプチドは、アミノ酸配列AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 19)

を有するRFGFである。疎水性MTSを含むRFGFアナログ

50

(例えば、アミノ酸配列 AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 20))

は、ターゲティング部分でもあることができる。ペプチド部分は、細胞膜を通過してペプチド、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質を含む大型極性分子を運搬することができる「送達」ペプチドであることができる。例えば、HIV Tatタンパク質

(GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 21))

およびショウジョウバエ (*Drosophila*) アンテナペディアタンパク質

(RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 22))

由来の配列は、送達ペプチドとして機能できることが見出されている。ペプチドまたはペプチド模倣体は、ファージディスプレイライブラリー、または1ビーズ-1化合物 (one-bead-one-compound) (OBOC) コンビナトリアルライブラリーから同定されたペプチドのように、DNAのランダム配列によってコードされることができる (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991)。好ましくは、組み入れられたモノマーユニットを経由してdsRNA作用物質に繋留されるペプチドまたはペプチド模倣体は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) -ペプチドのような細胞ターゲティングペプチド、またはRGD模倣体である。ペプチド部分は、約5アミノ酸長〜約40アミノ酸長の範囲であることができる。ペプチド部分は、例えば安定性を増加させる、または立体配座特性を支配するために、構造修飾を有することができる。下記の任意の構造修飾を利用することができる。

【0104】

「細胞透過性ペプチド」は、細胞、例えば細菌もしくは真菌細胞のような微生物細胞、またはヒト細胞のような哺乳類細胞を透過することが可能である。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば、 α -ヘリカル直鎖ペプチド (例えばLL-37、またはセロピンP1)、ジスルフィド結合含有ペプチド (例えば、 α -デフェンシン、 β -デフェンシンもしくはバクテネシン)、または1種類もしくは2種類のみの支配的アミノ酸を含むペプチド (例えばPR-39またはインドリシジン) であることができる。細胞透過性ペプチドはまた、核局在化シグナル (NLS) を含むことができる。例えば、細胞透過性ペプチドは、HIV-1 gp41とSV40のラージT抗原のNLSとの融合ペプチドドメイン由来のMPGなどの、二分両親媒性ペプチドであることができる (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003)。

【0105】

いくつかの態様において、本明細書に記載される阻害性核酸オリゴヌクレオチドは、さらに、糖質コンジュゲートを含む。糖質コンジュゲートは、核酸のインビボ送達および本明細書に記載されるインビボ治療用途に適当な組成物にとって有利である。本明細書で 사용되는場合、「糖質」は、酸素、窒素もしくは硫黄原子が各炭素原子に結合した少なくとも6つの炭素原子 (直鎖、分枝もしくは環状であり得る) を有する1つもしくは複数の単糖ユニットから作られた糖質自体；または酸素、窒素もしくは硫黄原子が各炭素原子に結合した少なくとも6つの炭素原子 (直鎖、分枝もしくは環状であり得る) をそれぞれ有する1つもしくは複数の単糖ユニットから作られた糖質部分をその一部として有する化合物のいずれかである化合物を表す。代表的な糖質には、糖 (単糖、二糖、三糖および約4〜9つの単糖ユニットを含むオリゴ糖)、ならびにデンプン、グリコーゲン、セルロースおよび多糖ガムのような多糖が含まれる。特定の単糖には、C5以上 (好ましくはC5〜C8) の糖が含まれ；二糖および三糖には、2または3つの単糖ユニット (好ましくはC5〜C8) を有する糖が含まれる。いくつかの態様において、糖質コンジュゲートは、さらに、非限定的にPKモジュレーター、エンドソーム溶解リガンド、および細胞透過性ペプチドのような他のリガンドを含む。

【0106】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるコンジュゲートは、切断可能または切断不可能であることができる様々なリンカーを用いて阻害性核酸オリゴヌクレオチドに結合させることができる。「リンカー」または「連結基」という用語は、化合物の2つの部分を結合する有機部分を意味する。リンカーは、典型的には、直接結合または酸素もしくは硫黄のような原子、NR8、C(0)、C(0)NH、SO、SO2、SO2NHのようなユニット、または非限定的に、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アルケニル、置換もしくは

非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリールのような原子鎖を含み、その際、1つまたは複数のメチレンは、0、S、S(0)、SO₂、N(R₈)、C(0)、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、置換または非置換複素環によって中断または終結されることができ；式中、R₈は、水素、アシル、脂肪族または置換脂肪族である。1つの態様において、リンカーは、1~24個の原子、好ましくは4~24個の原子、好ましくは6~18個の原子、より好ましくは8~18個の原子、最も好ましくは8~16個の間の原子である。

【0107】

切断可能な連結基は、細胞外で十分に安定な基であるが、標的細胞内に進入すると切断されて、リンカーが共に保持している2つの部分を放出する基である。好ましい態様において、切断可能な連結基は、標的細胞中または第1の参照条件（例えば、細胞内条件を模倣または代表するように選択することができる）下で、対象の血中または第2の参照条件（例えば、血液または血清中に見出される条件を模倣または代表するように選択することができる）下よりも少なくとも10倍以上、好ましくは少なくとも100倍速く切断される。

【0108】

切断可能な連結基は、切断作用物質、例えば、pH、酸化還元電位または分解分子の存在に感受性である。一般的に、切断作用物質は、血清もしくは血液中よりも細胞内に豊富に存在するか、またはより高いレベルもしくはより高い活性で見出される。そのような分解作用物質の例には、特定の基質に関して選択される、または基質特異性を有しない酸化還元作用物質、例えば、酸化もしくは還元酵素または酸化還元切断可能な連結基を還元によって分解できる、細胞内に存在するメルカプタンのような還元作用物質を含むもの；エステラーゼ；エンドソームまたは酸性環境を創出できる作用物質、例えばpH5以下を生じるもの；一般酸、ペプチダーゼ（基質特異性であることができる）、およびホスファターゼとして作用することによって酸切断可能な連結基を加水分解または分解することができる酵素が含まれる。

【0109】

ジスルフィド結合のような切断可能な結合基は、pHに感受性であることができる。ヒト血清のpHは7.4であり、一方、平均細胞内pHは約7.1~7.3の範囲でわずかに低い。エンドソームは、5.5~6.0の範囲のより酸性のpHを有し、リソソームは、約5.0のなおいっそう酸性のpHを有する。一部のリンカーは、好ましいpHで切断される切断可能な連結基を有することにより、細胞内または細胞の所望の区画内でリガンドから陽イオン脂質を放出する。

【0110】

リンカーは、特定の酵素によって切断可能な、切断可能な連結基を含むことができる。リンカー内に組み入れられる切断可能な連結基の種類は、標的とされる細胞に依存し得る

。切断可能な連結基のさらなる例には、非限定的に、酸化還元切断可能な連結基（例えばジスルフィド連結基（-S-S-））、リン酸エステルベースの切断可能な結合基、エステルベースの切断可能な連結基、およびペプチドベースの切断可能な連結基が含まれる。RNAコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許には、非限定的に、米国特許第4,828,979号；同第4,948,882号；同第5,218,105号；同第5,525,465号；同第5,541,313号；同第5,545,730号；同第5,552,538号；同第5,578,717、5,580,731号；同第5,591,584号；同第5,109,124号；同第5,118,802号；同第5,138,045号；同第5,414,077号；同第5,486,603号；同第5,512,439号；同第5,578,718号；同第5,608,046号；同第4,587,044号；同第4,605,735号；同第4,667,025号；同第4,762,779号；同第4,789,737号；同第4,824,941号；同第4,835,263号；同第4,876,335号；同第4,904,582号；同第4,958,013号；同第5,082,830号；同第5,112,963号；同第5,214,136号；同第5,082,830号；同第5,112,963号；同第5,214,136号；同第5,245,022号；同第5,254,469号；同第5,258,506号；同第5,262,536号；同第5,272,250号；同第5,292,873号；同第5,317,098号；同第5,371,241、5,391,723号；同第5,416,203、5,451,463号；同第5,510,475号；同第5,512,667号；同第5,514,785号；同第5,565,552号；同第5,567,810号；同第5,574,142号；同第5,585,481号；同第5,587,371号；同第5,595,726号；同第5,597,696号；同第5,599,923号；同第5,599,928および同第5,688,941号；同第6,294,664号；同第6,320,017号；同第6,576,752号；同第6,783,931号；同第6,900,297号；同第7,037,646号が含まれ；それらのそれぞれは、参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0111】

20

一般に、切断可能な連結基の候補の適合性は、分解作用物質（または分解条件）が連結基の候補を切断する能力を試験することによって評価することができる。また、血中または他の非標的組織と接触したときに切断に抵抗する能力について、切断可能な連結基の候補を試験することも望ましい。したがって、第1の条件が標的細胞内での切断を示すように選択され、かつ第2の条件が他の組織または体液中、例えば血液または血清中での切断を示すように選択される場合の、切断に対する第1の条件および第2の条件間の相対的感受性を決定することができる。評価は、無細胞系、細胞、細胞培養物、器官もしくは組織培養、または動物全体で実施することができる。無細胞条件または培養条件で初期評価を行い、動物全体におけるさらなる評価により確認することが有用であり得る。好ましい態様において、有用な候補化合物は、血液または血清中（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件）と比較して、細胞（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件）において少なくとも2、4、10または100倍速く切断される。

30

【0112】

所与の化合物におけるすべての位置が一様に修飾される必要はなく、実際には、複数前述の修飾を1つの化合物に、または阻害性核酸内の1つのヌクレオシドにすら、組み入れることができる。本発明は、キメラ化合物である阻害性核酸化合物も含む。本発明の文脈における「キメラ」阻害性核酸化合物または「キメラ」は、それぞれ少なくとも1つのモノマーユニット、すなわちdsRNA化合物の場合はヌクレオチドから作られた2つ以上の化学的に別個の領域を含む阻害性核酸化合物、例えばdsRNAである。これらの阻害性核酸は、典型的には、阻害性核酸にヌクレアーゼ分解への耐性増加、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付与するように核酸が修飾された、少なくとも1つの領域を含む。阻害性核酸の追加的な領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断する能力がある酵素に対する基質として役立ち得る。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。したがって、RNアーゼHの活性化は、RNA標的の切断を招くことにより、阻害性核酸の遺伝子発現の阻害の効率を大きく高める。その結果、キメラ阻害性核酸が使用される場合、例えば同じ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、より短い阻害性核酸で匹敵する結果が、多くの場合、得られ得る。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動法および必要に応じて当技術分野において公知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技術によって日常的に検出することができる。

40

50

【0113】

場合によっては、阻害性核酸の核酸を、非リガンド基によって修飾することができる。阻害性核酸の活性、細胞分布または細胞取り込みを高めるために、いくつかの非リガンド分子が阻害性核酸にコンジュゲートされており、そのようなコンジュゲーションを行うための手順は、科学文献から入手可能である。そのような非リガンド部分は、コレステロール (Kubo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553)、コール酸 (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053)、チオエーテル、例えばヘキシル-S-トリチルチオール (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765)、チオコレステロール (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533)、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基 (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-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-0-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)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969)、またはアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651)、パルミチル部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923) のような脂質部分を含んでいた。そのような核酸コンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許は、上に挙げられている。典型的なコンジュゲーションプロトコールは、配列の1つまたは複数の位置にアミノリンカーを有する核酸の合成を含む。次に、アミノ基が、適当なカップリング試薬または活性化試薬を使用して、コンジュゲートされる分子と反応される。コンジュゲーション反応は、固体支持体に依然として結合している核酸を用いて、または核酸の切断後の液相中のいずれかで行われ得る。HPLCによる核酸コンジュゲートの精製は、典型的には純粋なコンジュゲートをもたらす。

【0114】

「アプタマー」という用語は、ポリペプチドなどの標的分子と結合する能力がある核酸分子を表す。例えば、本発明のアプタマーは、標的分子、または標的分子の発現および／もしくは活性を調節するシグナル伝達経路内の分子と特異的に結合することができる。アプタマーの産生および治療的使用は、当技術分野において十分に確立されている。例えば米国特許第5,475,096号を参照されたい。

【0115】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」という用語は、2つの分子、化合物、細胞および／または粒子の間の化学相互作用を表し、その際、第1の実体は、それが非標的である第3の実体に結合するよりも大きな特異性および親和性で、第2の標的実体と結合する。いくつかの態様において、特異的結合は、第3の非標的実体に対する親和性よりも少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、またはそれ以上大きい、第2の標的実体に対する第1の実体の親和性を指すことができる。所与の標的に特異的な試薬は、利用されているアッセイの条件下で標的に対する特異的結合を示す試薬である。

【0116】

本明細書で使用される場合、「処置 (treat)」、「処置 (treatment)」、「処置 (treating)」または「改善」という用語は、その目的が疾患または障害、例えば癌に関連する状態の進行または重篤度を好転させる、緩和する、改善する、阻害する、鈍化させるまたは停止させることである治療的処置を表す。「処置 (treating)」という用語は、癌に関連する状態、疾患または障害の少なくとも1つの有害な作用または症状の減少または緩和を含む。処置は、通常、1つまたは複数の症状または臨床マーカーが減少する場合に「有

効」である。あるいは、処置は、疾患の進行が減少または停止する場合に「有効」である。すなわち、「処置 (treatment)」は、処置の非存在下で予想されるものと比較しての、症状またはマーカーの改善だけでなく、症状の進行または悪化の停止または少なくとも鈍化も含む。有益または望ましい臨床結果は、検出可能か検出不可能かによらず、1つもしくは複数の症状の緩和、疾患の規模の縮小、疾患の安定化（すなわち、悪化しない）状態、疾患の進行の遅延もしくは鈍化、疾患状態の改善もしくは緩和、寛解（部分的か完全かによらず）、および／または死亡率の低下を含むがこれらに限定されない。疾患の「処置 (treatment)」という用語はまた、（緩和処置を含む）その疾患の症状または副作用からの解放の提供を含む。

【0117】

10

本明細書で使用される場合、「薬学的組成物」という用語は、薬学的に許容される担体、例えば製薬業において広く使用されている担体と組み合わせられた活性な薬剤を表す。「薬学的に許容される」というフレーズは、本明細書において、妥当な医学的判断の範囲で、合理的な利益／リスク比の下、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応または他の問題もしくは合併症を伴わずに、ヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適している化合物、物質、組成物および／または投薬形態を表すために使用される。

【0118】

本明細書で使用される場合、「投与」という用語は、所望の部位への薬剤の少なくとも部分的な送達を達成する方法または経路による対象への本明細書に開示される化合物の投入を表す。本明細書に開示される化合物を含む薬学的組成物は、対象において有効な処置をもたらす任意の適当な経路によって投与され得る。

20

【0119】

「統計的に有意」または「有意」という用語は、統計的有意性を表し、通常、2標準偏差 (2SD) またはそれを上回る差を意味する。

【0120】

実施例を実施する以外では、またはそうでないことが示されていない限り、本明細書で使用される成分の量または反応条件を表すすべての数値は、すべての例において、「約」という用語によって修飾されていると理解されるべきである。「約」という用語は、百分率に関連して使用される場合、±1%を意味し得る。

【0121】

30

本明細書で使用される場合、「含む (comprising)」または「含む (comprises)」という用語は、それが必須であろうとなかろうと、指定されていない要素を含む余地を残しつつ、その方法または組成物にとって必須である組成物、方法およびそれらの各要素を参照するために使用される。

【0122】

「～からなる」という用語は、その態様の説明の中で言及されていないあらゆる要素に対して排他的である、本明細書に記載される組成物、方法およびそれらの各要素を表す。

【0123】

本明細書で使用される場合、「本質的に～からなる」という用語は、特定の態様に必要とされる要素を表す。この用語は、その態様の基本的かつ新規または機能的な特徴に実質的に影響しない要素の存在を許容する。

40

【0124】

単数形「a」、「an」および「the」は、文脈がそうでないことを明確に示していない限り、複数の参照を含む。同様に、「または、もしくは」という単語は、文脈がそうでないことを明確に示していない限り、「および、ならびに」を含むことが意図されている。本開示を実施または試験する際には本明細書に記載されているのと同様または同等の方法および材料を使用することができるが、以下には適当な方法および材料が記載されている。

「例えば (e.g.)」という略語は、ラテン語の *exempli gratia* に由来し、本明細書で非限定的な例を示すために使用される。したがって、「例えば (e.g.)」という略語は、「例えば (for example)」という用語と同義である。

50

【0125】

細胞生物学および分子生物学における一般用語の定義は、「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」、第19版、Merck Research Laboratories出版、2006年（ISBN 0-911 910-19-0）；Robert S. Porterら（編）、The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Science Ltd.出版、1994年（ISBN 0-632-02182-9）；Benjamin Lewin、Genes X、Jones & Bartlett Publishing出版、2009年（ISBN-10: 0763766321）；Kendrewら（編）、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc.出版、1995年（ISBN 1-56081-569-8）およびCurrent Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coliganら編において見出され得る。

【0126】

それ以外のことが言及されていない限り、本発明は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995);またはMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S.L.Berger and A.R. Kimmel Eds, Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); Current Protocols in Protein Science (CPPS)(John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.)、Current Protocols in Cell Biology (CPCB)(Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.)およびCulture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005)、Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol.57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998)に記載されるような標準的手順を用いて実施され、これらはすべてその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0127】

他の用語は、本発明の様々な局面の説明の中で本明細書で定義されている。

【0128】

本願を通じて引用されている、参考文献、発行された特許、公開された特許出願および同時係属中の特許出願を含む、すべての特許およびその他の刊行物は、明示的に、例えば、本明細書に開示される技術と関連して使用され得るそのような刊行物に記載される方法論を説明および開示する目的で、参照により本明細書に組み入れられる。これらの刊行物は、それらの開示が本願の出願日より以前であるために提供されるにすぎない。これに関するいかなる事情も、本発明者らが、それが先行発明であるためまたは任意のその他の理由によりそのような開示よりも先の日付を主張する資格を有しないことの承認とみなされるべきではない。これらの書類の日付に関する言及または内容に関する表示はすべて、出願人が入手し得た情報に基づいており、これらの書類の日付または内容の正確性に関する承認とはならない。

【0129】

本開示の態様の説明は、排他的であることまたは本開示を開示された正確な形態に限定することを意図していない。本開示の個々の態様および実施例は例示目的で本明細書に記載されており、関連技術分野の当業者が認識するように、様々な等価な変更が本開示の範囲内で可能である。例えば、方法の工程または機能はある順で示されているが、代替の態様は異なる順で機能を実施し得、または機能は実質的に同時に実施され得る。本明細書に提供される開示の技術は、他の手順または方法に適切に適用することができる。本明細書に記載される様々な態様は、さらなる態様を提供するよう組み合わせることができる。本開示の局面は、必要に応じて、本開示のなおさらなる態様を提供するために、上記参考文献および出願の組成、機能およびコンセプトを利用するよう変更され得る。これらおよびその他の変更は、詳細な説明に照らして本開示に対してなされ得る。すべてのそのような変更は、添付の特許請求の範囲内に包含されることが意図されている。

【0130】

上記態様のいずれかの個々の要素は、他の態様の要素と組み合わせることができまた他

の態様の要素で置き換えることができる。さらに、本開示の特定の態様に関連する利点は、これらの態様との関係で記載されているが、他の態様もまたそのような利点を示し得、そしてすべての態様が本開示の範囲に包含されるためにそのような利点を示すことを必要とするものではない。

【0131】

本明細書に記載される技術は、以下の実施例によってさらに例証されるが、これらはいかなる事情によってもさらなる限定とみなされるべきでない。

【0132】

本明細書に記載される技術のいくつかの態様は、以下の番号が付された項のいずれかにしたがって定義することができる。

1. 癌マーカー結合アプタマードメインおよび阻害性核酸ドメインを含む、キメラ分子。
2. 癌マーカーが、EpCAMまたはEphA2である、項1記載の分子。
3. アプタマー-siRNAキメラ (AsiC) である、項1～2のいずれか一項記載の分子。
4. 阻害性核酸が、癌細胞においてアップレギュレートされる遺伝子産物と特異的に結合する、項1～3のいずれか一項記載の分子。

5. 阻害性核酸が、

Plk1 ; MCL1 ; EphA2 ; PsmA2 ; MSI1 ; BMI1 ; XBP1 ; PRPF8 ; PFFP38A ; RBM22 ; USP39 ; RAN ; NUP205 ; およびNDC80

からなる群より選択される遺伝子の発現を阻害する、項1～4のいずれか一項記載の分子。

6. 癌マーカーが、EpCAMであり、阻害性核酸ドメインが、Plk1の発現を阻害する、項1～5のいずれか一項記載の分子。

7. 癌マーカー結合アプタマードメインが、SEQ ID NO:33の配列を含む、項1～6のいずれか一項記載の分子。

8. 癌マーカー結合アプタマードメインが、本質的にSEQ ID NO:33の配列からなる、項1～6のいずれか一項記載の分子。

9. 阻害性核酸ドメインが、SEQ ID NO:2の配列を含む、項1～8のいずれか一項記載の分子。

10. 阻害性核酸ドメインが、本質的にSEQ ID NO:2の配列からなる、項1～8のいずれか一項記載の分子。

11. SEQ ID NO:1～3のうちの1つの配列を含む、項1～10のいずれか一項記載の分子。

12. 本質的にSEQ ID NO:1～3のうちの1つの配列からなる、項1～11のいずれか一項記載の分子。

13. その3'末端が、dTdTを含む、項1～12のいずれか一項記載の分子。

14. 少なくとも1つの2'-Fピリミジンを含む、項1～13のいずれか一項記載の分子。

15. 項1～14のいずれか一項記載の分子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

16. 項1～14のいずれか一項記載の少なくとも2種類のキメラ分子を含む組成物であって、該キメラ分子が、異なるアプタマードメインまたは阻害性核酸ドメインを有する、項15記載の組成物。

17. 異なるアプタマーまたは阻害性核酸ドメインが、異なる標的を認識する、項16記載の組成物。

18. 異なるアプタマーまたは阻害性核酸ドメインが、配列を有し、かつ同じ標的を認識する、項16記載の組成物。

19. 項1～18のいずれか一項記載の分子または組成物を投与する工程を含む、癌を処置する方法。

20. 癌が、上皮癌または乳癌である、項19記載の方法。

21. 乳癌が、トリプルネガティブ乳癌である、項20記載の方法。

22. 投与が、皮下である、項19～21のいずれか一項記載の方法。

23. 対象に、追加的な癌処置がさらに施される、項19～22のいずれか一項記載の方法。

24. 癌処置が、パクリタキセルである、項23記載の方法。

【実施例】

【0133】

実施例1：EpCAMアプタマー-siRNAキメラによる遺伝子ノックダウンは、基底細胞様トリプルネガティブ乳癌およびそれらの癌源細胞を阻害する

肝臓外の細胞における遺伝子をノックダウンするインビボsiRNA送達のための有効な治療戦略は、癌の処置にRNA干渉を利用するために必要である。EpCAMは、一般的な上皮癌およびそれらの癌源細胞（T-IC、癌幹細胞としても公知）に高度に発現される腫瘍関連抗原である。アプタマー-siRNAキメラ（AsiC、siRNAセンス鎖に連結し、かつsiRNAアンチセンス鎖にアニーリングさせたEpCAMアプタマー）は、インビトロEpCAM+癌細胞およびヒト癌生検組織において選択的に取り込まれ、遺伝子発現をノックダウンすることが、本明細書において実証されている。PLK1 EpCAM-AsiCは、ヌードマウスにおいて、EpCAM-間葉系基底B型トリプルネガティブ乳癌（TNBC）ではなく、EpCAM+管腔型および基底A型TNBC細胞株による、コロニーおよびマンモスフィア形成（インビトロT-ICアッセイ）ならびに発がんイニシエーションを阻害する。皮下投与されたEpCAM-AsiCはEpCAM+ Her2+およびTNBC腫瘍に集中し、それらの成長を抑制する。したがって、EpCAM-AsiCは、上皮癌を処置するための魅力的なアプローチを提供する。

【0134】

緒言

RNA干渉（RNAi）は、病原遺伝子をノックダウンすることによって疾患を処置する機会を提供する¹。最近の初期臨床試験から、脂質ナノ粒子に封入したまたはGalNAcにコンジュゲートしたsiRNAを使用して肝臓における一握りの遺伝子標的の強い（75～95%）、持続性の（数週間または最大数ヶ月持続する）、安全なノックダウンが示された²⁻⁵。身体の主要濾過器官である肝臓は粒子を捕捉するので、トランスフェクトが比較的容易である。しかし、大部分の疾患を処置するためにRNAiを利用する大きな障害、すなわち肝臓以外の細胞における低分子RNAの効率的な送達および遺伝子ノックダウンは、まだ解決されていない。特に、送達妨害は、癌の処置にRNAiを利用するための大きな障害である⁶。

【0135】

エストロゲン、プロゲステロンおよびHer2受容体の発現の欠如によって定義される、低分化型癌の不均一な群であるトリプルネガティブ乳癌（TNBC）は、あらゆる乳癌サブタイプで最悪の予後を有する⁷⁻⁹。大部分のTNBCは、上皮特性を有し、基底細胞様として分類されるか、または基底Aサブタイプに属するが、間葉系（基底Bサブタイプ）は、少数派であるとはいえ、かなりの割合を占める。TNBCは、若齢女性を苦しめるが、BRCA1遺伝子変異に関連するサブタイプである。標的指向化された療法は利用可能ではない。大部分のTNBC患者は化学療法に応答するものの、3年以内に約3分の1が転移を発生し、最終的に死亡する。したがって、新しいアプローチが必要とされる。

【0136】

大部分の一般的な（上皮）癌に対する治療にも適し得る、基底細胞様TNBCの遺伝子ノックダウンおよび処置のための柔軟性のある標的指向化されたプラットフォームが本明細書に記載されている。本発明者らは、EpCAM（最初に記載された腫瘍抗原であり、基底細胞様TNBCを含む上皮癌に過剰発現される細胞表面受容体である）と結合するRNAアプタマーと低分子干渉RNA（siRNA）を連結することによって、そのsiRNAを上皮癌細胞内に送達する。アプタマー-siRNAキメラ（AsiC）として公知のアプタマー連結型siRNAは、前立腺癌を処置し、HIV感染を予防するために小型動物モデルにおいて使用されている¹⁰⁻¹⁸。EpCAMが上皮癌に高発現されるので、本発明者らは、基底細胞様TNBCを標的とするためにEpCAMを選択した。高親和性EpCAMアプタマーは、以前に特定された {Shigdar, 2011 #17903}。EpCAMは、癌源細胞（T-IC、癌幹細胞としても公知）も特徴づける²⁰⁻²⁷。これらの細胞は、発がんイニシエーションを担うと考えられるだけでなく、従来の細胞傷害性療法にも比較的耐性であり、腫瘍の再発および転移を担うと考えられる。T-ICを消失させるための治療法を考案することは、まだ対処されていない、癌研究の重要な目標である²⁸。

【0137】

正常な上皮において、EpCAMは、薬物が利用できない側底側ギャップ結合にわずかに発現しているだけである²⁹。上皮癌において、EpCAMは、より豊富（数桁）なだけでなく、細胞膜に沿っても分布している。EpCAMのライゲーションは、接着を促進し、細胞増殖および浸潤性を高める。EpCAMのタンパク質分解性切断は、幹細胞因子の転写を増加させる細胞内フラグメントを放出する^{30,31}。EpCAMの発癌特性は、腫瘍細胞がEpCAMを下方調節することによって耐性を発生することを困難にし得る。ある研究では、TNBCの約2/3、おそらく基底Aサブタイプが、EpCAMについて強く染色された²⁵。EpCAM+循環細胞数は、乳癌における予後不良と関連している³²⁻³⁶。EpCAM抗体は、上皮癌について臨床的に評価されているが、それ自体の有効性は限定的であった³⁷⁻³⁹。転移性乳癌、結腸癌および前立腺癌の処置をモニタリングするためのFDAに承認された方法では、EpCAMの発現が循環腫瘍細胞を同定する³²⁻³⁶。そのうえ、ヒト乳癌の約97%ならびに肺、結腸、膵臓および前立腺を含む他の一般的な上皮癌の実質的に100%が、EpCAMについて明るく染色される。このことは、本明細書で開発されたプラットフォームが一般的な癌のRNAiベースの治療に適用もできることを示唆している。

【0138】

試験されたすべての上皮性乳癌細胞株がEpCAMについて明るく染色され、一方で不死化正常乳房上皮細胞、線維芽細胞および間葉系腫瘍細胞株は染色されなかったことが、本明細書において実証されている。EpCAM-AsiCは、インビトロで正常上皮細胞、間葉系腫瘍細胞または正常ヒト乳房組織ではなく、管腔型および基底A型TNBC癌細胞およびヒト乳癌組織において標的とされた遺伝子のノックダウンを引き起こした。ノックダウンは、EpCAMの発現と比例した。そのうえ、有糸分裂に必要な遺伝子であるPLK1のEpCAM-AsiC媒介ノックダウンは、上皮性乳癌株のインビトロT-IC機能的アッセイ（コロニーおよびマンモスフィア形成）を抑制した。エクスビボ処置は、発がんイニシエーションを特異的に打ち消した。皮下注射したPLK1 EpCAM-AsiCは、予後不良基底A型およびHer2乳癌であるEpCAM+基底A型トリプルネガティブ乳癌（TNBC）の同所性異種移植片によって特異的に取り込まれ、急速な腫瘍退縮を引き起こした。

【0139】

EpCAMは、上皮性乳癌細胞株によって高発現される

最初に、乳癌細胞株におけるEpCAMの発現を調査した。Cancer Cell Line Encyclopedia 40での遺伝子発現データに基づく、EpCAM mRNAは、基底A型TNBCおよび管腔型乳癌細胞株において高発現されるが、基底B型（間葉系）TNBCではあまり発現されない（図1A）。フローサイトメトリーによって評価した表面EpCAM染色は、hTERTで不死化させた正常上皮（BPE）⁴¹、線維芽細胞または間葉系TNBCよりも、試験したすべての管腔型および基底細胞様細胞株の方が2~3log明かった（図1B）。したがって、EpCAMは、正常細胞または間葉系腫瘍と比較して上皮性乳癌細胞株において高発現される。

【0140】

EpCAM-AsiCは、EpCAM+乳癌細胞での遺伝子発現を選択的にノックダウンする

12nMの親和性でヒトEpCAMと結合するヌクレオチド（nt）19個のアプタマー¹⁹をSELEXにより同定した^{42,43}。該アプタマーは、マウスEpCAMには結合しない（データは示さず）。いくつかのリンカーによりアプタマーの3'末端にsiRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかを連結した一握りのEpCAM-AsiCを設計し、インビボ安定性を高め、類似配列を有する部分的相補遺伝子のオフターゲットノックダウンを回避し、自然免疫受容体刺激を制限するために2'-フルオロピリミジン置換および3'-dTdTオーバーハングを有するように合成した。RNA送達、遺伝子ノックダウンおよび抗腫瘍効果を試験するために、siRNAを組み入れて、eGFP（有用なマーカー遺伝子として）；すべての被験細胞株に発現される内因性遺伝子であり、そのノックダウンが致死的でない、AKT1；および有糸分裂に必要なキナーゼであって、そのノックダウンが致死的である、PLK1を、ノックダウンした（図9）。遺伝子ノックダウンの用量反応試験で最も性能が良好であったAsiCは、U-U-Uリンカーを介して19ntのEpCAMアプタマーをsiRNAのセンス（不活性）鎖に結合させたものであった（図1C）。EpCAM-AsiCは、化学合成した約42~44nt長の鎖（19ntのアプタマー+リンカー+

20～22ntのsiRNAセンス鎖)を20～22ntのアンチセンスsiRNA鎖にアニーリングすることによって産生した。2'-フルオロピリミジンを用いて工業的に合成されたので {Jackson, 2003 #11353; Scacheri, 2004 #11912; Jackson, 2006 #13758; Wheeler, 2011 #17906}、これらはRNアーゼ耐性であり、ヒト血清中で非常に安定であり ($T_{1/2} \gg 36$ 時間、図7)、担腫瘍マウスにインビボ注射したときに自然免疫を誘発しない (図7)。

【0141】

EpCAM+腫瘍細胞による選択的取り込みを検証するために、共焦点顕微鏡法を使用して、EpCAM+ MDA-MB-468 TNBC細胞およびEpCAM^{dim}不死化乳房上皮細胞であるBPEにおいて、5'末端をCy3で蛍光標識化したEpCAMアプタマーのインターナリゼーションを比較した (データは示さず)。理論に縛られることを望むわけではなく、AsiCはアプタマーを1種類のみ含むので、それらは、それらが認識する受容体と架橋しない。結果として、細胞インターナリゼーションは、おそらく受容体リサイクリングを介して起きるため、より急速な活性化誘導エンドサイトーシスプロセスよりも低速である。

【0142】

MDA-MB-468細胞のみがアプタマーを取り込んだ。取り込みは22時間で明瞭に検出されたが、43時間後に大きく増加した。EpCAM-AsiCがEpCAM bright細胞株によって特異的に取り込まれるかどうかを試験するために、AsiCのアンチセンス鎖の3'末端を蛍光標識した。ヒトTERT、SV40初期領域およびH-RASV12でトランスフェクトすることによってBPEから形質転換された基底A型TNBC細胞株であるEpCAM+ BPLERは、24時間インキュベーション後に分析したとき、Alexa-647 EpCAM-AsiCを取り込んだが、BPE細胞は取り込まなかった (図1D)。以前の研究は、AsiCが細胞内でDicerによってプロセシングされて、アプタマーからsiRNAを放出することを示した (10、12、15)。放出されたsiRNAがRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) によって取り込まれたことを検証するために、MDA-MB-468細胞をPLK1 EpCAM-AsiCと共にインキュベートした場合にAgoと一緒に免疫沈降したPLK1 siRNAを、qRT-PCRを利用して増幅した (図33)。同じ細胞をPLK1 siRNAと共にインキュベートした場合、PLK1 siRNAはAgoと結合しなかった。

【0143】

TNBC細胞は、Alexa-467 EpCAM-AsiCを取り込んだが、BPE細胞では取り込みは検出不能であった (図1E)。次に、遺伝子ノックダウンがEpCAM+腫瘍に特異的かどうかを評価するために、eGFP EpCAM-AsiCおよびeGFP siRNAの脂質トランスフェクションによってeGFPを安定発現するこれらの同じ細胞株において、eGFPノックダウンを比較した (図1D)。eGFP siRNAのトランスフェクションは、BPEおよびBPLERにおいて等しく遺伝子発現をノックダウンしたが、いかなるトランスフェクション脂質も不在の状態でのEpCAM-AsiCとのインキュベーションは、BPLERにおいてのみ選択的に発現をノックダウンした。AsiCのノックダウンは均質であり、脂質トランスフェクションで達成されたノックダウンに匹敵した。次に、本発明者らは、正常ヒト線維芽細胞と比較した6つの乳癌細胞株において、AKT1 AsiCおよびトランスフェクトされたAKT1 siRNAによる内因性AKT1遺伝子の特異的ノックダウンを比較した (図1E)。間葉系基底B型TNBC、線維芽細胞またはBPE細胞ではなく、EpCAM^{bright}管腔型および基底A型TNBCにおいてのみ、AKT1は、AKT1を標的とするEpCAM-AsiCによって選択的にノックダウンされた (データは示さず)。予想通り、eGFPを標的とするAsiCは、AKT1レベルに効果を有さず、AKT1 siRNAのトランスフェクションは、被験細胞株のすべてで発現を同じ程度にノックダウンした。そのうえ、EpCAM-AsiCによるAKT1のノックダウンは、EpCAMの発現と強く相関した (図1G)。持続的にトランスフェクトされた細胞におけるAKT1タンパク質をフローサイトメトリーによって分析したときに類似の結果が得られた (図1G、1H)。したがって、EpCAM-AsiCによるインビトロノックダウンは有効であり、EpCAM^{bright}腫瘍細胞に特異的である。

【0144】

PLK1 EpCAM-AsiCは、インビトロでEpCAM^{bright}腫瘍細胞を選択的に死滅させる

EpCAM-AsiCが乳癌において抗腫瘍剤として使用できるかどうかを調査するために、本発明者らは、CellTiterGloアッセイによって、有糸分裂に必要なキナーゼであるPLK1に対す

るAsiCが、5つの基底A型TNBC、2つの管腔型細胞株、および3つの基底B型TNBCを含む10種類の乳癌細胞株の生存に及ぼす効果を検討した。eGFPに対する対照AsiCではなく、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底A型および管腔型細胞株における細胞増殖を減少させたが、基底B型細胞を阻害しなかった（図2A）。PLK1 siRNAの脂質トランスフェクションは、すべての細胞株の成長を抑制した。この抗増殖効果は、EpCAMの発現と強く関連した（図2B）。ノックダウン後の生存EpCAM+細胞の減少は、アネキシンV-ヨウ化プロピジウム染色およびカスパーゼ活性化によって評価されたアポトーシス誘導が原因であった（データは示さず）。EpCAMアプタマーの連結がEpCAM-AsiCの抗増殖効果に寄与したかどうかを判定するために、本発明者らは、PLK1 EpCAM-AsiCで処理した細胞の生存を、アプタマーのみで処理した細胞と比較した（図2C）。アプタマー自体は、任意の乳癌細胞株の生存に再現性のある効果を有さなかった。これは、可能性のあることには、アプタマーがモノマー性作用物質としてEpCAM受容体と架橋せず、EpCAMシグナル伝達を改変しないからである。このように、PLK1 EpCAM-AsiCは、EpCAM+乳癌細胞に対するその特異的抗腫瘍効果を遺伝子ノックダウンにより行使する。

【0145】

EpCAM^{dim}非形質転換上皮細胞と混合したときに、EpCAM-AsiCがEpCAM+細胞を特異的に標的とするかどうかを判定するために、本発明者らは、GFP- TNBC細胞とGFP+ BPE細胞との共培養物をPLK1 EpCAM-AsiCまたは培地と共にインキュベートし、GFP蛍光を使用してそれらの相対生存率をフローサイトメトリーによって3日後に測定した（図2D、2E）。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、生存EpCAM+基底A型腫瘍細胞の比率を大きく減少させたが、EpCAM-基底B型細胞株の生存に効果を有さなかった。このように、PLK1 EpCAM-AsiCは、正常細胞と混合した場合、EpCAM+腫瘍細胞に対して選択的に細胞傷害性である。

【0146】

EpCAM-AsiCはEpCAM+乳房腫瘍生検標本中に集中する

次に、EpCAM-AsiCが無傷組織内で正常乳房サンプルと比較してヒト乳房腫瘍中に集中するかどうかを調査した。乳癌患者3人からの正常組織生検および乳房腫瘍生検のペアを、一辺約3mmの立方体に切断し、ペトリ皿に入れた。腫瘍サンプル細胞はすべてEpCAM^{bright}であり、正常組織細胞はEpCAM^{dim}であった（図3A）。蛍光標識Alexa647-siRNA（正常組織または腫瘍のどちらによっても取り込まれると予想されない）、Alexa647-コレステロールコンジュゲート型siRNA（chol-siRNA、両方によって取り込まれると予想される）、またはCy3-EpCAM-AsiCを培地に添加し、組織を24時間インキュベートした後、回収した。肉眼により視覚化できたAsiCのCy3シグナルは、腫瘍標本のみに集中し、正常組織からは検出されなかった（図3B）。RNAの取り込みを定量するために、組織標本の洗浄済み単細胞懸濁液にフローサイトメトリー分析を行った（代表的な腫瘍-正常組織のペア（図3C）、3つのEpCAM^{bright}乳房腫瘍-正常組織サンプルのペアからの3つ組の生検の平均±SD（図3D））。EpCAM-AsiCは、正常組織ではなく腫瘍によって有意に取り込まれたが、一方、どちらも非コンジュゲート型siRNAを取り込まず、両方がchol-siRNAをある程度取り込んだ。したがって、EpCAM-AsiCは、正常組織と比較して無傷組織内でEpCAM^{bright}腫瘍に選択的に送達される。

【0147】

PLK1 EpCAM-AsiCはEpCAM+腫瘍のT-ICを阻害する

EpCAMがT-ICおよび転移開始細胞（M-IC）を特徴づけることから、標的にEpCAMを選択した^{20, 22, 26, 27, 31}。EpCAM-AsiCがT-ICを阻害するかどうかを検討するために、本発明者らは、モック処理、パクリタキセル処理またはeGFPもしくはPLK1に対するEpCAM-AsiC処理後に、コロニーおよびマンモスフィア形成（T-IC機能的代替アッセイ）を比較した。PLK1 EpCAM-AsiCは、EpCAM+基底A型TNBCおよび管腔型細胞株のコロニーおよびマンモスフィア形成をパクリタキセルよりも強く阻害したが、EpCAM-基底B型TNBCに対して不活性であった（図4A～C）。eGFP AsiCが効果を有さなかったので、T-IC阻害は特異的であった。eGFP AsiCではなく、PLK1 EpCAM-AsiCとのインキュベーションはまた、基底A型および管腔型乳癌細胞株に特異的に、T-ICの表現型を有する細胞の比率、すなわちCD44⁺CD24^{low/-}および

ALDH+細胞数も減少させた（データは示さず）。発がんイニシエーションにおよぼすEpCAM-AsiCの効果を評価するために、ルシフェラーゼを安定的に発現しているEpCAM+ MB468細胞を培地またはPLK1 EpCAM-AsiCまたはeGFP EpCAM-AsiCで一晩処理し、次に等しい数の生存細胞をヌードマウスにsc移植した。PLK1 EpCAM-AsiCは、インビボ腫瘍細胞発光によって判断される腫瘍形成を完全にブロックした（データは示さず）。対照的に、基底B型MB436細胞の類似の処理は発がんイニシエーションに効果を有さなかった（データは示さず）。したがって、PLK1 EpCAM-AsiCは、EpCAM+乳癌に選択的にインビトロT-ICアッセイおよび発がんイニシエーションを阻害する。

【0148】

皮下投与されたEpCAM-AsiCは、遠隔EpCAM+ TNBCによって選択的に取り込まれる

臨床的に有用であるために、EpCAM-AsiCは、播種性腫瘍細胞によって取り込まれる必要がある。マウスの尾静脈への蛍光EpCAM-AsiCの静脈内注射は、ヌードマウスの側腹部に植え込んだ皮下腫瘍内の顕著なAsiC蓄積に繋がらなかったが（データは示さず）、それはおそらく、そのサイズ（約25kDa）が腎臓濾過の閾値未満であり、それらが急速に排泄されるからである。ポリエチレングリコールとの連結は、前立腺癌のマウス異種移植モデルにおけるPSMA-AsiCの循環半減期、腫瘍蓄積および抗腫瘍治療効果を大きく高めた¹¹。しかし、この修飾を回避できるかを調べるために、本発明者らは、マウス7匹の頸背部（scruff of the neck）へのAlexa750標識eGFP EpCAM-AsiCのsc注射が、各側腹部にsc植え込みした遠隔EpCAM+ MB468 TNBCおよびEpCAM- MB231 TNBCでの蓄積に繋がったかどうかをライブ動物落射蛍光イメージングによって調査した（図5A、5B）。注射当日内は、EpCAM-AsiCは、EpCAM+腫瘍のみに集中し、そこで少なくとも4日間存続した。EpCAM-AsiCは、2日目に注射部位周囲で検出されたが、4日目にはEpCAM+腫瘍内だけに見出された。

【0149】

PLK1 EpCAM AsiCは、基底A型TNBCおよびHer2乳癌異種移植片の退縮を引き起こす

sc注射したEpCAM-AsiCが遠隔EpCAM+腫瘍に集中したので、本発明者らは、次に、PLK1 EpCAM-AsiCのsc注射がEpCAM+ TNBC異種移植腫瘍の成長を選択的に阻害することができるかどうかを調べた。EpCAM+ MB468-luc細胞をマトリゲルに入れてヌードマウスの片方の側腹部に植え込み、EpCAM- MB231-luc-mCherry細胞を反対側の側腹部に植え込んだ。両方の腫瘍のルシフェラーゼシグナルがバックグラウンドを超えてはっきりと検出された後、マウス5~6匹の群をモック処置するか、またはPLK1もしくはeGFPを標的とする5mg/kg EpCAM-AsiCを3日毎に2週間sc注射した。腫瘍の成長を発光によって経過観察した。PLK1ターゲティングAsiCを受け入れたマウスにおいてのみ、すべてのEpCAM+腫瘍は急速に完全に退縮した（図6A、6B）。eGFPターゲティングAsiCで処置したマウスにおけるEpCAM+ 腫瘍およびすべてのEpCAM- 腫瘍は、成長し続けた。この実験を繰り返し、PLK1 AsiCの注射後に類似の結果が得られた。また、EpCAMアプタマーだけまたはPLK1 siRNAで処置した追加的な群の対照マウスにおいて、および担Her2+ MCF10A-CA1aマウスに投与した場合に、腫瘍は成長し続け、有意な変化を有さなかった（データは示さず）（図34）。このように、sc注射したPLK1 EpCAM-AsiCは、基底A型TNBCおよびEpCAM+ヒト異種移植片に対して特異的抗腫瘍活性を示す。

【0150】

考察

標的指向化された療法は、これまでのところ発癌キナーゼに対する腫瘍特異的抗体または阻害剤を使用することに依存してきた。これまで誰も、非コンジュゲート型AsiCが強力な抗腫瘍効果を有することができることも、AsiCがsc投与できることも示していない。現在、TNBCまたはT-ICに対する標的指向化された療法はない。TNBCに対する標的指向化された療法を開発することおよびT-ICを消失させる方法を開発することは、癌研究のまだ実現されていない重要な目標である。

【0151】

正常上皮細胞および間質でなく上皮性乳癌細胞およびそれらの幹細胞に選択的に遺伝子をノックダウンして、腫瘍退縮を引き起こし、発がんイニシエーションを抑制するために

、EpCAM-AsiCを使用できることが、本明細書において実証される。1つの非常に攻撃的なTNBC異種移植モデルにおいて、EpCAM-AsiCは、わずか3回の注射後に完全な腫瘍退縮を引き起こした。これは、高レベルのEpCAMを一様に発現する、潜在的にすべての一般的な上皮癌のための、標的指向化された療法のための柔軟性のあるプラットフォームである。

【0152】

PLK1を標的とするEpCAM-AsiCが本明細書で使用されたが、siRNAを変化させて、個別患者の腫瘍の腫瘍サブタイプまたは分子的特徴にカスタマイズされる任意の腫瘍依存遺伝子をノックダウンすることができる。複数の遺伝子を標的とするAsiCカクテルは、癌治療が薬物耐性を発生する機会を減らすために理想的であろう。標的指向化された癌療法は、これまでのところ発癌キナーゼに対する腫瘍特異的抗体または低分子阻害剤を使用すること
10
に依存してきた。AsiCリガンドとしてEpCAMを使用して、癌幹細胞を標的とするためにRNAi療法を開発することは、新規である。これまで誰も、非コンジュゲート型AsiCが強力な抗腫瘍効果を有することができることも、AsiCがsc投与できることも示していない。そのうえ、ヒト化マウスにsc投与されたCD4-AsiCの予備的研究から、脾臓および遠隔リンパ節におけるCD4細胞に強いノックダウンが示されたが、このことは、体内のどこか他の場所に位置する細胞上の受容体を標的とするAsiCもsc投与できることを示唆している。現在、TNBCまたはT-ICに対する標的指向化された療法はない。標的指向化された送達は、バースタンダー細胞に対する投薬減少および毒性減少という利点を有する。

【0153】

癌のためにRNAiを利用するための主な障壁は、播種性細胞に低分子RNAを送達すること
20
である。この障害を克服するためのAsiCの使用が、本明細書に記載されている。新しいクラスの強力な抗癌薬が、本明細書に記載されている。AsiCは、異なる細胞表面受容体を標的とし、かつ任意の遺伝子または遺伝子の組み合わせをノックダウンすることができる柔軟性のあるプラットフォームである {Burnett, 2012 #18447; Zhou, 2011 #18448; Thiel, 2010 #18445}。アプタマーを変化させることによって、AsiCプラットフォームは、大部分の疾患へのRNAiベースの治療の適用を邪魔した送達妨害に取り組むことができる。このアプローチは、個別化癌治療のために理想的である。理由は、標的とすべき遺伝子の選択を、腫瘍の分子的特徴に応じて調整できるからである。そのうえ、RNAカクテルは、複数の遺伝子を一度にノックダウンして、薬物耐性を予測し、克服することができる。AsiCは、肝臓外で遺伝子をノックダウンするための最も魅力的な方法である。それらは、RNA
30
を送達する複雑なリポソーム法、ナノ粒子法または複合法よりも優れている。理由は、AsiCが血中で安定で、製造が容易で、非免疫原性で、組織に容易に浸透することができ、かつ濾過器官に捕捉されない、単一の化学実体であるからである。

【0154】

重要な癌の研究目標は、T-IC（癌幹細胞）を消失させることである。T-ICは、化学療法に比較的耐性で、腫瘍の再発および転移を担うと考えられる {Federici, 2011 #19371}。本明細書に記載されるAsiCは、（上皮）T-ICを高い効率で標的とする。そのように、それらは、進行性疾患のリスクのある腫瘍内のこの攻撃的亜集団を消失させ得る（図6A、6B参照）。

【0155】

<60ntのRNAは効率的に合成できるので、本明細書に使用されるEpCAMアプタマーの小さなサイズは、AsiC薬に理想的である。

【0156】

それらの潜在的な治療的使用に加えて、EpCAM-AsiCは、腫瘍およびT-ICの依存遺伝子を同定して、新規な薬物標的を定義するための、強力なインビボ研究ツールでもある。原則として、アプタマーキメラは、siRNAだけでなく、miRNA模倣体もしくはアンタゴミル、RNAi以外の他のメカニズムによって機能するアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはより長いmRNAもしくは非コードRNAであっても送達するように設計することもできる（50、51）。それらは、また、複数のアプタマー、複数のsiRNA、または毒素もしくは低分子抗癌薬であっても組み入れるように設計することもできる。

10

20

30

40

50

【0157】

その小さなサイズは、AsiC薬に理想的である。理由は、 $\leq 60\text{nt}$ のRNAは、効率的に合成できるからである。腫瘍依存遺伝子をノックダウンすることによって、腫瘍のアキレス腱を攻撃するために、腫瘍に標的指向化されたsiRNAだけでなく、薬物標的も選択することができる。この柔軟性は、個別患者の癌の分子脆弱性を標的とする個別化癌治療に利用することができる。

【0158】

材料および方法

細胞培養。ヒトBPEおよびBPLER細胞をWIT培地 (Stemgent) 中で成長させた。MB468にルシフェラーゼレポーターを形質導入した。すべての他のヒト細胞株をATCCから入手し、特に示さない限り、すべて10%FBS、1mM L-グルタミンおよびペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco) を補充したMEM (MCF7、BT474)、マッコイ5A (SKBR3)、RPMI1640 (HCC1806、HCC1143、HCC1937、HCC1954、HCC1187、MB468、T47D) またはDMEM (MB231、BT549、MB436) 中で成長させた。4T1マウス乳癌細胞を10%FBS DMEM中で成長させた。インビボイメージングのために、ホタルルシフェラーゼを安定発現しているMB468細胞 (MB468-luc) を使用し、pLV-Fluc-mCherry-Puroレンチウイルス (Columbia University, Andrew Kungにより提供) を感染させた後にホタルルシフェラーゼおよびmCherryを安定発現しているMB231細胞 (MB231-luc-mCherry) を選択した。MB231細胞をピューロマイシンで選択した。

【0159】

取り込みおよびサイレンシング処理のために、細胞を低密度 (96ウェルプレート中に細胞10,000個/ウェル) で蒔き、直ちに処理した。すべてのAsiCおよびsiRNA処理をOptiMEMまたはWIT培地中のいずれかでを行った。96ウェルプレート中でのCellTiter-Glo (Promega) またはトリパンブルー染色によって細胞生存率を評価した。

【0160】

コロニー形成アッセイのために、丸底96ウェルプレート中で生存細胞1,000個を6時間処理し、次に10cmプレートの血清含有培地中に移した。培地を3日毎に交換した。8~14日後に、細胞をメタノール (-20C) 中で固定し、クリスタルバイオレットで染色した。スフィア形成アッセイのために、1,000個/mlの生存細胞を丸底96ウェルプレート中で6時間処理し、次に、EGF (20ng/ml、BD Biosciences)、B27 (1:50、Invitrogen)、0.4%ウシ血清アルブミン (Sigma) および4 $\mu\text{g/ml}$ インスリン (Sigma) を補充した無血清DMEM/F12 1:1 (Invitrogen) 中で懸濁培養した。スフィアを1または2週間後に計数した。

【0161】

siRNAトランスフェクション。製造業者のプロトコールにより、細胞にDharmafect Iをトランスフェクトした。すべてのsiRNA配列については図9を参照されたい。

【0162】

フローサイトメトリー。フローサイトメトリーのために、以前に記載されたように細胞を染色した (Yu, F. et al (2007). let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. Cell 131, 1109-1123.)。簡潔には、1:50希釈したhAbを使用してEpCAMおよびAKT1の直接免疫染色を4°Cで30~60分間行った (BioLegend/BD)。0.5%FCS、1mM EDTA、および25mM HEPESを含有するPBS中で細胞を染色した。サンプルを同じ緩衝液中で2回洗浄した。FACS-Canto II (BD Biosciences) を使用してデータを取得した。3つ組みで分析を行い、10,000回のゲート事象/サンプルを計数した。すべてのデータ解析は、FlowJo (Treestar Inc.) を使用して行った。

【0163】

RNA分析。記載されたようにqRT-PCR分析を行った (Petrocca, F., et al. (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. Cancer Cell 13, 272-286)。簡潔には、総RNAをTrizol (Invitrogen) で抽出し、製造業者のSYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) によりThermoscript RTキット (Invitrogen) およびBioRad C1000 Thermal Cycler (Biorad) を使用して、総RNA1000ngからcDNAを調製した。相対CT値をGAPDHに対して標準化し、均等目盛に変換

した。

【0164】

ヒト乳房組織のコラゲナーゼ消化。新鮮乳癌または結腸癌生検および対照生検をUMASS Tissue Bankから受け取り、サンプルを $3 \times 3 \times 3$ mmのサンプルに切断し、RPMI 100ulを有する96ウェルプレートに入れた。サンプルをAlexa647-siRNA-GFP、Alexa647-chol-siRNA-GFPまたはCy3-AsiC-GFPのいずれかで24時間処置した。サンプルを写真撮影し、消化した。各処置からの3つのサンプルをプールし、1mg/mlコラゲナーゼII (Sigma-Aldrich) を含有するRPMI 10ml中に37℃で30分間振盪しながら入れた。コラゲナーゼ消化の前後に、gentleMACS分散装置 (Miltenyi) 中で、脾臓プログラムを使用して、サンプルを37℃で30分間破壊した。細胞懸濁物に70 μ m細胞ストレーナー (BD Falcon) を通過させ、細胞懸濁物をRPMI 30mlで洗浄し、フローサイトメトリー用に染色した。

10

【0165】

動物実験。すべての動物手順は、Harvard Medical SchoolおよびBoston Children's Hospitalの実験動物委員会 (Animal Care and Use Committee) の承認を得て行った。Jackson Laboratoryからヌードマウスを購入した。

【0166】

インビボ実験。発がんイニシエーション研究のために、EpCAM-AsiC-GFP、EpCAM-AsiC-PLK1で24時間前処置した、または未処置の8週齢雌性Nu/Jマウス (Stock # 002019, Jackson Laboratories) にMB468-luc (5×10^6 個) 細胞を皮下注射した。細胞をTryple Express (Invitrogen) でトリプシン処理し、WIT培地中に再懸濁し、側腹部に皮下注射した。150 mg/kg D-ルシフェリン (Caliper Life Sciences) の腹腔内注射後に、IVIS Spectraシステム (Caliper Life Sciences) を使用して全身の発光画像を5日毎に合計20日間取得した。

20

【0167】

AsiC取り込み実験のために、Tryple Express (Invitrogen) でトリプシン処理したMB468-luc (5×10^6 個) およびMB231-luc-mCherry (5×10^5 個) 細胞を1:1 WIT-マトリゲル溶液中に再懸濁し、8週齢雌性Nu/Jマウス (Stock # 002019, Jackson Laboratories) の側腹部に皮下注射した。IVIS Spectraシステム (Caliper Life Sciences) を使用して腫瘍のサイズを毎日分析した。腫瘍は、5日後にはっきりと視認可能であり、マウスの頸部領域にAlexa750-EpCAM-AsiC-GFP (0.5mg/kg) を皮下注射した。腫瘍と比較したAsiCの局在を48時間毎に7日間試験した。

30

【0168】

腫瘍阻害研究のために、Tryple Express (Invitrogen) でトリプシン処理したMB468-luc (5×10^6 個) およびMB231-luc-mCherry (5×10^5 個) 細胞を1:1 WIT-マトリゲル溶液中に再懸濁し、8週齢雌性Nu/Jマウス (Stock # 002019, Jackson Laboratories) の側腹部に皮下注射した。IVIS Spectraを使用して腫瘍のサイズを毎日分析し、腫瘍は、5日後にはっきりと視認可能であった。匹敵するサイズの腫瘍を担持するマウスを無作為化して5群にし、5mg/kg EpCAM-AsiC-PLK1、EpCAM-AsiC-GFP、EpCAM-アプタマーもしくはsiRNA-PLK1で処置するか、または未処置とした。マウスを72時間毎に14日間処置した。

【0169】

Living Image (登録商標) ソフトウェア (Caliper Life Sciences) を使用してすべての画像を解析した。

40

【0170】

統計解析。Microsoft Excelを使用して計算したスチューデントのt検定を使用して、処置サンプルと対照との間の有意性を解析した。その際、検定の種類を片側分布 (one-tail distribution) および二標本等分散に設定した。自然免疫刺激を評価するために、Graph Pad Prism 4ソフトウェア (GraphPad Software, San Diego, CA) を使用して、ボンフェローニ多重比較検定を伴う一元配置分散分析 (ANOVA) を行った。P<0.05を有意と見なした。

【0171】

50

自然免疫刺激の測定。マウスにeGFP EpCAM-AsiC (5mg/kg) をsc注射またはポリ(I:C) (5もしくは50mg/kg) を腹腔内注射した。血清サンプルをベースラインならびに処置の6時間後および16時間後に収集し、-80℃で保存し、その後ProcartaPlex Multiplexアッセイ (Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA) を使用してIFN β 、IL-6およびIP-10を測定した。処置の16時間後の屠殺時に回収した脾臓をRNeasy (Qiagen) 中で保存し、その後TRIZOL (Invitrogen) を使用してgentleMACS分散装置 (MACS Miltenyi Biotec, San Diego, CA) を用いてRNAを抽出した。Superscript IIIおよびランダムヘキサマー (Invitrogen) を使用してcDNAを合成し、以下のプライマーを使用して、SsoFast EvaGreen Supermix およびBio-Rad CFX96リアルタイムPCRシステム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いるPCRを行った：

Gapdh フォワード: 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' (SEQ ID NO: 4),

Gapdh リバーズ: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' (SEQ ID NO: 5),

ifnb フォワード: 5'-CTGGAGCAGCTGAATGGAAAG-3' (SEQ ID NO: 6),

ifnb リバーズ: 5'-CTTGAAGTCCGCCCTGTAGGT-3' (SEQ ID NO: 7),

il-6 フォワード: 5'-TGCCTTCATTTATCCCTTGAA-3' (SEQ ID NO: 8),

il-6 リバーズ: 5'-TTACTACATTCAGCCAAAAAGCAC-3' (SEQ ID NO: 9),

ip-10 フォワード: 5'-GCTGCCGTCATTTTCTGC-3' (SEQ ID NO: 10),

ip-10 リバーズ: 5'-TCTCACTGGCCCGTCATC-3' (SEQ ID NO: 11),

oas-1 フォワード: 5'-GGAGGTTGCAGTGCCAACGAAG-3' (SEQ ID NO: 12),

oas-1 リバーズ: 5'-TGGAAGGGAGGCAGGGCATAAC-3' (SEQ ID NO: 13),

stat1 フォワード: 5'-TTTGCCAGACTCGAGCTCCTG-3' (SEQ ID NO: 14),

stat1 リバーズ: 5'-GGGTGCAGGTTCCGGGATTCAAC-3' (SEQ ID NO: 15)

【0172】

EpCAM PLK1 センス	GCG ACU GGU UAC CCG GUC GUU UUG AAG AAG AUC ACC CUC CUU AdTdT	SEQ ID NO: 1
EpCAM PLK1 アンチセンス	UAA GGA GGG UGA UCU UCU UCA dTdT	SEQ ID NO: 2
EpCAM PLK1 アンチセンス	GCG ACU GGU UAC CCG GUC GUU UUA GGA GGG UGA UCU UCU UCA dTdT	SEQ ID NO: 3
EpCAM アプタマー	GCG ACU GGU UAC CCG GUC GUU U	SEQ ID NO: 33

【0173】

EpCAMは、基底B型乳癌細胞株ではなく、基底A型および管腔型乳癌細胞株に過剰発現される（データは示さず）。8つの異なる乳癌細胞株を用いてFACSを行い、hEpCAM抗体を使用するフローサイトメトリーによってEpCAMの発現レベルを試験した。EpCAMは、基底B型ではなく、すべての基底A型および管腔型細胞株に過剰発現されている。

【0174】

基底A型乳癌細胞株における細胞生存率の特異的減少は、PLK1依存性である。基底A型、B型および管腔型細胞を代表する10個の異なる乳癌細胞株を、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCまたはEpCAM-アプタマーだけのいずれかで処理し、未処理対照と比較した。EpCAM-アプタマーで処理した細胞株はどれも細胞生存率の減少を示さなかったが、一方、基底A型および管腔型細胞株は、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCによる処理後に細胞生存率の減少を示した（データは示さず）。

【0175】

EpCAM-AsiCは、健康生検および結腸癌生検の両方によって取り込まれる。GFPを標的とするCy3-EpCAM-AsiC、Alexa647-siRNA-GFPまたはAlexa647-chol-siRNA-GFP（それぞれ2 μ M）を結腸癌および対照移植片に添加し、24時間インキュベートし、その後、組織をコラゲナーゼで単細胞懸濁液になるまで消化し、フローサイトメトリーによって分析した。EpCAM-AsiC、siRNAおよびchol-siRNAは腫瘍および健康組織の両方に類似の効力で浸透した。5日目に、腫瘍を取り出し、視覚化して、GFPを標的とするAlexa750標識EpCAM-AsiCが実際に腫瘍に進入したことを検証した。Alexa750の増加したレベルは、mCherryレベルと負の相関関係にある（ $n=8$ 、 $*P<0.05$ 、EpCAM+細胞対EpCAM-細胞のt検定）（データは示さず）。

10

【0176】

参考文献

1. de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. Nat Rev Drug Discov 2007;6:443-453.

2. Tabernero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov* 2013;3:406-417.
3. Adams D, Coehlo T, Suhr O, Conceicao I, Waddington-Cruz M, Schmidt H et al. Interim Results for Phase II Trial of ALN-TTR02, a Novel RNAi Therapeutic for the Treatment of Familial Amyloidotic Polyneuropathy. Biennial Meeting of the Peripheral Nerve Society, St Malo, France 2013. Available from:
alnylam.com/capella/presentations/aln-ttr02phiidata/. 10
4. Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulga-Morskaya S, Liebow A, Bettencourt BR, Sutherland JE et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet* 2014;383:60-68.
5. Sorensen B, Mant T, Georgiev P, Rangarajan S, Pasi KJ, Creagh D et al. A Subcutaneously Administered Investigational RNAi Therapeutic (ALN-AT3) Targeting Antithrombin for Treatment of Hemophilia: Phase 1 Study Results in Subjects with Hemophilia A or B. International Society of Thrombosis and Hemostasis, Toronto, Canada. 2015. Available from:
alnylam.com/capella/presentations/aln-at3-isth-june2015/. 20
6. Petrocca F, Lieberman J. Promise and challenge of RNA interference-based therapy for cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:747-754.
7. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1938-1948.
8. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750-2767. 30
9. Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:1879-1887.
10. McNamara JO, 2nd, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E et al. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 2006;24:1005-1015.
11. Dassie JP, Liu XY, Thomas GS, Whitaker RM, Thiel KW, Stockdale KR et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat Biotechnol* 2009;27:839-849. 40
12. Zhou J, Li H, Li S, Zaia J, Rossi JJ. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Mol Ther* 2008;16:1481-1489.
13. Neff CP, Zhou J, Remling L, Kuruvilla J, Zhang J, Li H et al. An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. *Sci Transl Med* 2011;3:66ra66.

14. Kim MY, Jeong S. In vitro selection of RNA aptamer and specific targeting of ErbB2 in breast cancer cells. *Nucleic Acid Ther* 2011;21:173-178.
15. Wheeler LA, Trifonova R, Vrbanac V, Basar E, McKernan S, Xu Z et al. Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras. *J Clin Invest* 2011;121:2401-2412.
16. Thiel KW, Hernandez LI, Dassie JP, Thiel WH, Liu X, Stockdale KR et al. Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2+-breast cancer cells using RNA aptamers. *Nucleic Acids Res* 2012;40:6319-6337. 10
17. Pastor F, Kolonias D, Giangrande PH, Gilboa E. Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 2010;465:227-230.
18. Wheeler LA, Vrbanac V, Trifonova R, Brehm MA, Gilboa-Geffen A, Tanno S et al. Durable knockdown and protection from HIV transmission in humanized mice treated with gel-formulated CD4 aptamer-siRNA chimeras. *Mol Ther* 2013;21:1378-1389.
19. Shigdar S, Lin J, Yu Y, Pastuovic M, Wei M, Duan W. RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule. *Cancer Sci* 2011;102:991-998.
20. Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2001;67:93-109.
21. Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 2004;64:5818-5824.
22. Marhaba R, Klingbeil P, Nuebel T, Nazarenko I, Buechler MW, Zoeller M. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med* 2008;8:784-804.
23. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 2011;64:415-420. 30
24. Sarrio D, Franklin CK, Mackay A, Reis-Filho JS, Isacke CM. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells* 2012;30:292-303.
25. Soysal SD, Muenst S, Barbie T, Fleming T, Gao F, Spizzo G et al. EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2(+), basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer. *Br J Cancer* 2013;108:1480-1487.
26. Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr* 2012;6:30-38. 40
27. Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 2009;69:5627-5629.
28. Federici G, Espina V, Liotta L, Edmiston KH. Breast cancer stem cells: a new target for therapy. *Oncology* 2011;25:25-28, 30.

29. Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnolzer M, Fiedler S, Langbein L et al. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res* 2005;309:345-357.
30. Gonzalez B, Denzel S, Mack B, Conrad M, Gires O. EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells* 2009;27:1782-1791.
31. Lu TY, Lu RM, Liao MY, Yu J, Chung CH, Kao CF et al. Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2010;285:8719-8732. 10
32. Schulze K, Gasch C, Staufer K, Nashan B, Lohse AW, Pantel K et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2013.
33. Konigsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol* 2011;50:700-710.
34. Weissenstein U, Schumann A, Reif M, Link S, Toffol-Schmidt UD, Heusser P. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies. *BMC Cancer* 2012;12:206. 20
35. Zhao S, Yang H, Zhang M, Zhang D, Liu Y, Song Y et al. Circulating tumor cells (CTCs) detected by triple-marker EpCAM, CK19, and hMAM RT-PCR and their relation to clinical outcome in metastatic breast cancer patients. *Cell Biochem Biophys* 2013;65:263-273.
36. Chen Q, Ge F, Cui W, Wang F, Yang Z, Guo Y et al. Lung cancer circulating tumor cells isolated by the EpCAM-independent enrichment strategy correlate with Cytokeratin 19-derived CYFRA21-1 and pathological staging. *Clin Chim Acta* 2013;419:57-61. 30
37. Schmidt M, Scheulen ME, Dittrich C, Obrist P, Marschner N, Dirix L et al. An openlabel, randomized phase II study of adecatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2010;21:275-282.
38. Marschner N, Ruttinger D, Zugmaier G, Nemere G, Lehmann J, Obrist P et al. Phase II study of the human anti-epithelial cell adhesion molecule antibody adecatumumab in prostate cancer patients with increasing serum levels of prostatespecific antigen after radical prostatectomy. *Urol Int* 2010;85:386-395.
39. Schmidt M, Ruttinger D, Sebastian M, Hanusch CA, Marschner N, Baeuerle PA et al. Phase IB study of the EpCAM antibody adecatumumab combined with docetaxel in patients with EpCAM-positive relapsed or refractory advanced-stage breast cancer. *Ann Oncol* 2012;23:2306-2313. 40
40. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483:603-607.

41. Ince TA, Richardson AL, Bell GW, Saitoh M, Godar S, Karnoub AE et al. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell* 2007;12:160-170.
42. Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, Swiderek KM, Gold L. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15416-15421.
43. Huang Z, Szostak JW. Evolution of aptamers with a new specificity and new secondary structures from an ATP aptamer. *RNA* 2003;9:1456-1463. 10
44. Gold L, Janjic N, Jarvis T, Schneider D, Walker JJ, Wilcox SK et al. Aptamers and the RNA world, past and present. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012;4.
45. Zimmermann B, Gesell T, Chen D, Lorenz C, Schroeder R. Monitoring genomic sequences during SELEX using high-throughput sequencing: neutral SELEX. *PLoS One* 2010;5:e9169.
46. Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol* 2012;19:60-71.
47. Dassie JP, Giangrande PH. Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics. *Ther Deliv* 2013;4:1527-1546. 20
48. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:537-550.
49. Sundaram P, Kurniawan H, Byrne ME, Wower J. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *Eur J Pharm Sci* 2013;48:259-271.
50. Kotula JW, Pratico ED, Ming X, Nakagawa O, Juliano RL, Sullenger BA. Aptamer-mediated delivery of splice-switching oligonucleotides to the nuclei of cancer cells. *Nucleic Acid Ther* 2012;22:187-195.
51. Esposito CL, Cerchia L, Catuogno S, De Vita G, Dassie JP, Santamaria G et al. Multifunctional aptamer-miRNA conjugates for targeted cancer therapy. *Mol Ther* 2014;22:1151-1163. 30

【 0 1 7 7 】

実施例2

細胞表面タンパク質への高親和性結合について選択されたアプタマーと呼ばれる構造化RNAがsiRNAと共有結合したもので構成されるキメラRNAを使用する、標的指向化されたsiRNA送達（アプタマー-siRNAキメラ（AsiC））の開発が、本明細書に記載されている。これらのAsiCは、アプタマーが認識する受容体を発現している細胞によって取り込まれ、細胞内でプロセッシングされて、活性siRNAを放出する。これは、特異的細胞表面受容体を標的とすることによって異なる細胞を標的とするように修飾することができ、かつ、任意の遺伝子または遺伝子の組み合わせをノックダウンするように設計することができる、柔軟性のあるプラットフォームである。 40

【 0 1 7 8 】

すべての上皮細胞に発現されるが、基底細胞様TNBCなどの低分化型乳癌を含む上皮癌に、より高度に発現されるヒトEpCAM（CD326またはESA）への高親和性結合について、アプタマーを選択した。すべての一般的な癌（肺、膵臓、前立腺、乳房および結腸）は、高いEpCAM発現を有し、潜在的に標的指向化されることができる。

【 0 1 7 9 】

間葉系上皮細胞または正常上皮細胞ではなく、上皮性乳癌細胞がEpCAM-AsiCを選択的に取り込み、インビトロで遺伝子ノックダウンを受けることが本明細書において実証されている。そのうえ、ノックダウンの程度は、EpCAMレベルと強く相関する。EpCAM-AsiCを使 50

用して有糸分裂に必要な遺伝子であるPLK1をノックダウンすることは、癌細胞株の成長ならびにコロニーおよびマンモスフィア形成を含む幹細胞の特性ならびに異種移植片における発がんイニシエーションを消失させる。このプラットフォームは、上皮腫瘍内の癌細胞および悪性癌幹細胞を消失させるために使用することができる。

【0180】

EpCAM AsiCを、基底細胞様腫瘍に特異的に送達し、腫瘍の成長を阻害することができる。これらのAsiCは、T-IC細胞が依存する遺伝子を同定するための強力な研究ツールでもあり、それらの遺伝子は、従来の薬物またはRNAiベースの薬物のいずれかについての優れた標的であることもできる。

【0181】

実施例3

遺伝子発現を調節するための遍在性メカニズムは、RNA干渉と呼ばれる。それは、低分子相補的配列を有する低分子RNAを使用して、遺伝情報からタンパク質への翻訳をブロックする。この内因性プロセスを利用することは、病原遺伝子の発現をノックダウンすることによって、疾患を処置する刺激的な可能性を提供する。主な障壁は、RNA干渉機構が位置する細胞内に低分子RNAを送達することである。昨年、予備臨床試験によって、肝臓における異常な遺伝子発現によって起こる少数の疾患に顕著な毒性なしに非常に有望な結果が示された。しかし、血中の粒子を捕捉する器官である肝臓への送達の方が、転移腫瘍細胞に薬物を送達するよりも達成が容易である。最も攻撃的な種類の乳癌であるトリプルネガティブ乳癌（TNBC）のターゲティングに特に優れた、上皮癌細胞中にRNAをターゲティングするための戦略が、本明細書に記載されている。そのうえ、この戦略は、癌幹細胞と呼ばれる、大部分の乳癌における最も悪性の亜集団も標的とする。これらの細胞は、化学療法薬に耐性であり、腫瘍の再発および転移を担うと考えられる。現在の癌研究の重要な目標は、癌細胞および正常に分裂している細胞（血液形成細胞および腸管の内面を覆う細胞）の両方に対して毒性である細胞傷害性化学療法薬を、腫瘍に対して、特に腫瘍中の癌幹細胞に対して選択的活性を有する作用物質に置換することである。

【0182】

1種類の乳癌（Her2+）に対する標的指向化された療法は、処置に革命を起こし、生存期間をかなり改善した。現在のところ、TNBCまたは乳癌幹細胞に対する標的指向化された療法はない。

【0183】

干渉性RNAを、細胞表面タンパク質を認識する構造化RNA（アプタマー）に連結しているRNAが、攻撃的乳癌細胞における遺伝子発現をノックダウンできることを実証しているデータが、本明細書に記載されている。乳癌幹細胞および大部分のTNBC細胞に高度に発現するタンパク質に結合するアプタマーは、TNBCの最もよく見られるサブタイプにおいて特異的に、癌細胞の分裂または生存に必要なタンパク質をノックダウンすることができる。これらのRNAは、例えば、組織培養物およびTNBCのマウスモデルの両方で試験することができる。予後不良乳癌を処置するためにRNAベースの薬物を利用し、その効力をマウスモデルで実証するためのプラットフォームが、本明細書に記載されている。

【0184】

乳癌を処置するための究極的な適用性（どの患者、患者をどのように助けるか、臨床適用／利益／リスク、患者関連アウトカムまでの予定時間）。この治療が標的とすることができるタンパク質は、すべての上皮癌細胞に発現されるが、最小分化型の、したがって最も悪性な癌細胞に、より強く発現される。このアプローチは、大部分の上皮性乳癌（そして大部分の乳癌細胞は上皮性である）を処置するために使用できるだけでなく、結腸癌、肺癌、膵臓癌、および前立腺癌を含む一般的な癌を処置する潜在能も有する。本発明者らの焦点は、若齢女性および少数集団の女性を優先的に襲う、最も攻撃的で最も予後不良の乳癌であるTNBCに合わせられている。このアプローチは、乳癌治療のための新しいプラットフォームを可能にする。任意の発癌遺伝子もしくは癌促進遺伝子、または遺伝子の組み合わせがノックダウン可能であり、このことは、この戦略を次代の個別化癌治療に理想的

10

20

30

40

50

なものとし、この戦略において、各患者の治療は、患者の個別の腫瘍の分子的特徴に応じてカスタマイズされる。

【0185】

そのうえ、腫瘍が非応答性であるか、または耐性になる場合、標的遺伝子のカクテルを素早く調整することもできる。正常上皮細胞は、標的指向化に使用されるタンパク質を低レベル発現するので、正常上皮細胞への幾分の取り込みおよび毒性があり得、そのことを、本明細書において評価する。しかし、プラットフォームは柔軟性があるので、その結果、正常細胞に対して最小の毒性を有して腫瘍細胞を死滅させるように、治療用siRNA積み荷を選ぶことができる。

【0186】

マウスTNBCモデルにおいて、腫瘍特異的遺伝子ノックダウンおよび腫瘍抑制を引き起こすことが可能ないくつかの分子を設計および試験することが、本明細書に記載されている。

【0187】

TNBCまたは乳癌内の高悪性癌源細胞垂集団のための標的指向化された療法はない。

【0188】

トリプルネガティブ乳癌（TNBC）は、乳癌の最悪の予後を有する 1-4。標的指向化された療法はなく、多くの場合TNBCは再発する。基底細胞様（または基底A型）TNBCにおいて腫瘍依存遺伝子をノックダウンする低分子RNAベースの薬物を開発することが、本明細書に記載されている。原則として、RNA干渉（RNAi）を利用して病原遺伝子をノックダウンして、任意の疾患を処置することができる 5-9。しかし、低分子RNAを薬物に変換することは取り組みがいがある。最近の第Iおよび第II相臨床試験により、肝臓において顕著な毒性なしに劇的で持続性の遺伝子ノックダウンが示された（約80~95%、単回注射後ほぼ1ヶ月間持続する） 10-16。しかし、遺伝子ノックダウンが癌を処置する潜在能を実現することは、肝臓ターゲティングRNAがRNAを送達することができない播種性癌細胞内にRNAを送達するための強靱な方法を必要とする 7。理想的な治療は、正常細胞でなく癌細胞における遺伝子を選択的にノックダウンし、毒性を最小化することである 17。

【0189】

AsiCは、RNAアプタマー（受容体に対して高い親和性を有する構造化RNA）18,19がsiRNAに共有結合したもので構成される（図10A~10B）。

【0190】

EpCAMアプタマーを使用して上皮癌における遺伝子をノックダウンするためのAsiCの使用が、本明細書に記載されている 37。最初に記載された腫瘍抗原であるEpCAMは、一般的な上皮癌に高発現される 38-45。上皮性乳癌では、EpCAMは、正常乳房組織の約400倍豊富に存在する 46。EpCAM 39,45,47-53は、大部分の上皮癌癌源細胞（T-IC、癌幹細胞としても公知）にも高発現される 39,45,47-53。

【0191】

<60ntのRNAは、安価に効率的に合成できるので、EpCAMアプタマーが高親和性（12nM）を有し、かつ短い（19nt）ということは、AsiC薬にとって理想的である。EpCAM-AsiCは、長い42~44ntの鎖（19ntのアプタマー+3ntのリンカー+20~22ntのsiRNAセンス鎖）が、20~22ntのアンチセンス（活性）siRNA鎖（図10B）とアニーリングしたものからなる。それらは、血清安定性（ $T_{1/2} > 3$ 日）を高め、自然免疫認識をブロックする2'-フルオロピリミジンを有するように、工業的に合成される 28,54-56。

【0192】

EpCAMターゲティングは、正常上皮と比較して基底細胞様TNBCに選択的遺伝子ノックダウンを引き起こすことができる。選択的ノックダウンは、薬物用量および正常組織の毒性の両方を減少させる。正常上皮において、EpCAMは、利用できない側底側ギャップ結合上のみ発現される。上皮癌において、EpCAMは、より豊富であり、かつ細胞膜に沿って分布している。EpCAMは、接着を促進し、増殖および浸潤性も高める。EpCAMのタンパク質分解切断により、幹細胞因子の転写を増加させる細胞内フラグメントが放出される。EpCAM

10

20

30

40

50

の発癌特性は、腫瘍細胞がEpCAMを下方調節することによって耐性を発生することを困難にし得る。EpCAM+ 循環細胞数は、乳癌における予後不良と連鎖している。実際、循環EpCAM+ 細胞を数え上げることは、転移性乳癌、結腸癌および前立腺癌の処置をモニタリングするためのFDAに承認された方法の基礎である。本発明者らの研究では、9つの基底A型TNBCおよび管腔型乳癌細胞株の9つが強EpCAM+であり、一方で正常乳癌上皮株および間葉系TNBCは、バックグラウンドレベルに近かった（図1B）。したがって、大部分の基底細胞様TNBCおよび管腔型乳癌は、EpCAM-AsiCによって標的とされる可能性がある。予備データにおいて、EpCAM-AsiCは、正常上皮細胞または間葉系腫瘍細胞ではなく、EpCAM+乳癌細胞株および結腸癌細胞株での発現を選択的にノックダウンし；ノックダウンは、一様であり、脂質トランスフェクションに匹敵したが、脂質トランスフェクションは、すべての細胞株における遺伝子発現を一様にノックダウンした（図3A～3C）。

10

【0193】

有糸分裂に必要なキナーゼであるPLK1に対するEpCAM-AsiCによるAKT1のノックダウンおよび細胞増殖の阻害は、EpCAMレベルと相関した。正常な形質転換上皮細胞（BPE）57を上皮TNBC細胞株と混合した場合、EpCAM-AsiCは、BPE細胞でなく腫瘍細胞においてのみPLK1感受性細胞死を引き起こした（示さず）。そのうえ、腫瘍生検および正常組織生検を蛍光AsiCと同時インキュベートした場合、腫瘍のみがAsiCを取り込み、蛍光を発した（示さず）。これらの結果は、EpCAM-AsiCが正常上皮と比較して上皮腫瘍細胞に特異的であることを示唆している。

【0194】

20

EpCAMは、T-ICも特徴づける 40,45,58。癌研究の重要な目標は、T-ICを標的とする方法を開発することである。幹細胞仮説に議論の余地があり、すべての癌にあてはまるわけではない可能性があるものの、乳癌がT-IC亜集団を含む十分な証拠がある 59-82。T-ICは、化学療法に相対的に耐性であり、腫瘍の再発および転移を担うとも考えられる。本明細書に記載されるAsiCは、（上皮）T-ICを高い効率で標的とするように設計されている。そのように、それらは、再発のリスクがあり患者内でこの攻撃的亜集団を消失させるために適当であり得る。EpCAM-AsiCがTNBC T-ICを阻害するかどうかを検討するために、本発明者らは、モック処理またはeGFPもしくはPLK1に対するEpCAM-AsiCで処理された乳房腫瘍細胞のマノモスフィアおよびコロニー形成（T-IC機能のインビトロ代替）を比較した。対照GFP AsiCではなく、PLK1 EpCAM-AsiCは、乳房管腔型および基底細胞様TNBC細胞株のマノモスフィアおよびコロニー形成を消失させた（図11D）。PLK1 EpCAM-AsiCは、CD44+ CD24lowおよびAldefluor+細胞も減少させた（示さず）。重要なことに、PLK1 EpCAM-AsiCを用いた処理は、基底細胞様TNBCによる発がんイニシエーションを消失させたが、予想通り、基底B型TNBC発がんイニシエーションに効果を有さなかった（データは示さず）。ルシフェラーゼ発現細胞株を、モック処理またはAsiCで一晩処理した後、乳房脂肪体に同所性に植え込んだ。

30

【0195】

EGF受容体シグナル伝達に重要なEphA2を標的とするAsiC 83-92も、本明細書において考察される。EphA2は、上皮および間葉系（それぞれ基底A型および基底B型）TNBC細胞株（それらのT-ICを含む）上に発現されるが、EpCAMよりも少なく、他の乳癌にはほんの弱く発現される。EphA2の阻害は、複数の癌モデルで腫瘍の成長および血管新生を減少させる。さらに、EphA2は、癌細胞上で選択的に利用可能であるが、正常細胞ではそうではない。

40

【0196】

マウス-ヒト交差反応性AsiCも本明細書において考察され、それらは自然発生マウス腫瘍モデルにおける毒性および有効性の評価を可能にするので、将来的な創薬にとって貴重である。

【0197】

EphA2を標的とするAsiCは、EphA2シグナル伝達および細胞増殖の両方を阻害する二重機能RNAを産生し、かつ遺伝子をノックダウンすることができる。

50

【0198】

AsiCは個別化癌治療に理想的である。理由は、ノックダウンの標的とされた遺伝子を、腫瘍の分子的特徴に対して調整できるからである。そのうえ、RNAカクテルを集合させて、コンビナトリアル療法のために複数の遺伝子を一度にノックダウンして、薬物耐性を予測し、克服することができる。AsiCは、腫瘍に薬物をターゲティングするだけでなく、siRNAは、腫瘍の特定のアキレス腱を攻撃するように選択することもできる。siRNAは、「薬物化不能 (undruggable)」遺伝子を標的とする独特の機会も提供する。正常細胞ではなく、腫瘍の生存に必要な腫瘍依存遺伝子をノックダウンするAsiCは、毒性を減少させたはずである。本発明者らがノックダウンできた基底細胞様TNBCの遺伝的依存性を同定するために、本発明者らは、2つのTNBC細胞株、すなわち基底細胞様BPLERおよび筋上皮HMLER細胞、異なる培地中で同じ発癌遺伝子で形質転換されたヒトの10種類の乳房上皮細胞を比較する、ゲノムワイドなsiRNA致死性スクリーニングを行った 57,93。

10

【0199】

本質的に同質遺伝的であるものの、BPLERは高度に悪性であり、T-ICに富み、細胞50個だけでヌードマウスにおいて腫瘍を形成し、一方でHMLERは、発がんイニシエーションのために細胞>105個を必要とする。スクリーニングは、HMLERではなく、BPLERが依存した154種類の遺伝子を同定した。プロテアソーム遺伝子が、高度に豊富であった ($P<10^{-14}$)。BPLER依存遺伝子の発現は、肺または結腸癌ではなく、乳癌における予後不良と関連した。TNBCは不均一性であるので1,3,4,94、基底細胞様TNBCに共通の依存性を同定するために、本発明者らは、別のスクリーニングを行って、154種類のBPLER依存遺伝子への依存性について17種類の乳癌細胞株を試験した (未公表)。BPLER依存性の多くは、基底細胞様TNBC細胞株のサブセットのみと共通であったが、プロテアソーム、MCL1、いくつかのスプライシング遺伝子、および少数の他の新規な遺伝子が目立った。理由は、事実上すべて (9種類中少なくとも8種類) の基底細胞様TNBC株がこれらの遺伝子に依存したが、正常細胞は依存しなかったからである。スクリーニングが予測したように、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブは、基底A型TNBCを死滅させ、かつ、コロニーおよびマンモスフィア形成によって評価されたT-IC機能も、同じく基底細胞様TNBCにおいて最も選択的にブロックした。ボルテゾミブへの短時間曝露は、また、マウス上皮TNBC株のコロニー形成および腫瘍阻害を阻害した。ボルテゾミブは、基底B型または管腔型細胞株ではなく、複数のヒト基底A型株およびTp53+/-マウスに自然に発生した初代TNBCの腫瘍の成長を強く阻害した。ボルテゾミブはまた、静脈内注射したTNBC細胞の転移性肺コロニー形成もブロックした。しかし、ボルテゾミブは、固形腫瘍に十分に浸透しない。プロテアソーム活性を阻害し、腫瘍を抑制するために最大耐用量が必要であった。腫瘍への浸透は、開発中のプロテアソーム阻害剤で改善し得るものの、プロテアソーム遺伝子のノックダウンの方が、より持続的で効率的なプロテアソーム阻害を提供し得るであろう。

20

30

【0200】

EpCAM-AsiCおよびEphA2-AsiCを、正常細胞でなく基底細胞様TNBC癌を処置するための標的指向化された遺伝子ノックダウンのために使用し、その中のT-ICを消失させることができる。EpCAMまたはEphA2を弱く発現する正常上皮細胞にいくらか取り込みがある可能性があるが、遺伝子ノックダウンは、アプタマーリガンド明染腫瘍細胞に集中する。

40

【0201】

どちらの乳癌サブタイプがEpCAM-AsiCおよびEphA2-AsiCの標的であるかを判定し、アプタマーリガンドレベルがどのように遺伝子サイレンシングに影響するかを判定することができる。正常上皮と比較した癌組織における取り込み/ノックダウンも評価することができる。基底細胞様TNBCにノックダウンを引き起こす有効性についてEpCAM-AsiCをEphA2-AsiCと比較することができる。EpCAM-AsiCおよびEphA2-AsiCがT-ICを標的として発がんイニシエーションを阻害できるかどうかを判定することができる。

【0202】

EpCAM-AsiCおよびEphA2-AsiCの薬物動態 (PK) /薬力学 (PD) 研究は、同所性TNBC異種移植マウスのライブ動物イメージングを使用して行うことができる。処置後の組織サンプル

50

ルおよび動物を毒性および自然免疫活性化について調査することができ、必要ならばAsiCを化学修飾してPK/PDを改善または毒性を減少させることができる。原理証明として、PLK1のノックダウンの抗腫瘍効果が評価される。MCL1およびプロテアソーム遺伝子などの最近同定された基底A型TNBC依存遺伝子の抑制を、本明細書に記載される方法に従って実現することができる。

【0203】

本明細書において、以下が考察される：

EpCAMおよびEphA2を認識し、正常上皮細胞と比較して基底A型TNBCに選択的にインターナライズされる種間反応性アプタマー

正常上皮細胞と比較した乳癌細胞株におけるTNBCターゲティングAsiCの選択的取り込み、遺伝子サイレンシングおよびインビトロ細胞傷害効果の検証、それらがトランスフェクトする乳癌細胞株のサブタイプの判定、ならびにそれらが乳房T-Icをトランスフェクトし、消失させる潜在能の評価

インビボ全身送達および腫瘍濃度の評価、PKおよびPDの定義ならびにTNBCターゲティングAsiCの最大耐用量、ならびにPLK1をノックダウンする、最適化されたTNBCターゲティングAsiCの抗腫瘍効果の評価ならびにマウスにおける原発性および転移性癌のヒトTNBC細胞株モデルでの基底細胞様TNBCの依存遺伝子。

【0204】

TNBCターゲティングアプタマーの選択。SELEX（試験管内進化法）と呼ばれるプロセスにより膨大な複雑さのコンビナトリアル核酸配列ライブラリー（典型的には1012～1014種類の別個の配列）の反復スクリーニングによって選ばれた標的に結合するアプタマーを同定する 95,96。古典的方法では、RNAライブラリーをタンパク質標的と共にインキュベートし、結合するRNAを分離し、増幅させて結合RNAのプールを産生する。これらを再び複数のサイクルに適用して、ますます濃縮された高親和性RNAプールを産生する。複数ラウンドのSELEXの後に出現する配列の同定を、＜100種類の個別の配列をクローニングおよび配列決定することによって予め達成した。

【0205】

これは、多くの場合に、アプタマーを同定するために十分な数の勝利配列を提供したが、一方、分析された配列数は、進化したオリゴヌクレオチドプールの配列複雑さと比較して極めて小さかった。多数の選択サイクルを用いると、効率的に増幅されなかった一部の有効なアプタマー配列が枯渇し、失われる可能性がある。次世代のディープシーケンシング法およびパイオインフォマティクスは、初期サイクルのSELEX配列プール内でより多くの配列の評価を可能にして、より早い選択ラウンドで勝利アプタマー配列を同定し、従って、高親和性アプタマーの完全な同定に必要な時間および資源を減らす 30,97-104。

【0206】

AsiCに組み入れるために有用なアプタマーの重要な特性は、細胞内への効率的なインターナライゼーションである。細胞表面タンパク質のリガンドの中には、細胞表面タンパク質標的と結合した後に効率的にインターナライゼーションされるものもあるが、一方、そうでないものもある。別の戦略（「toggle SELEX」）は、異なる種由来の同じリガンドを認識する交差反応性アプタマーについて選択し、これは、前臨床開発に有用な特質である。オルソロガスなタンパク質リガンド（例えば、マウスおよびヒト形態）を用いた選択の間にサイクルを切り替える（toggle）ことによって、異種間反応性のアプタマーを濃縮することが可能である 105。

【0207】

これらのSELEX技術は、正常不死化上皮細胞株ではなく、ヒト（およびマウス）基底細胞様TNBCにインターナライゼーションされるEpCAMおよびEphA2に対する高親和性異種間反応性アプタマーの同定を可能にすることができる。拮抗活性を有し、かつ／または対応するマウス抗原を交差認識する追加的なEpCAMおよびEphA2アプタマーを選択するために（公表されたEpCAMアプタマーはマウスEpCAMを認識しない（データは示さず））、本発明者らは、2'-フルオロピリミジンを含む1012種類のRNA配列のライブラリーから開始して、市販の

マウス精製組み換え標的タンパク質とヒト精製組み換え標的タンパク質との間で切り替えることができる。51nt長オリゴヌクレオチドのこのライブラリーは、各選択ラウンドでPCR増幅するために公知配列の定常領域が隣接するヌクレオチド20個のランダム領域を有するように設計されている。以前に記載された方法を、固定化C末端タグ付きタンパク質に結合する高親和性RNAについて選択するために使用する 37（これは、N末端領域を露出したままにして、細胞外ドメインを認識するアプタマーの選択を促進する）。タグ付き対照タンパク質を使用して、RNAアプタマーライブラリーを予備精製（pre-clear）して、非特異的結合因子を除去することができる 7-10。反復ラウンドのSELEXを行って特異的アプタマーを濃縮することができる。各ラウンド後の濃縮は、表面プラズモン共鳴法によってモニタリングすることができる。特異的結合を示す濃縮されたプールを、高スループットシーケンシング法を用いてシーケンシングすることができる。記載されたように濃縮されたライブラリー配列のバイオインフォマティクス分析を用いて、実験検証用の配列を選ぶことができる 97,98,106。

10

【0208】

比較のために以前に特徴付けられたヒトアプタマーを使用して、ハイスループットシーケンシングおよびバイオインフォマティクス分析からの上位10～15位の配列を表面プラズモン共鳴法によって評価して、記載されたように 99,106、相対結合親和性を評価することができる。

【0209】

高親和性交差反応性アプタマーを同定するための代替的なアプローチは、ヒトまたはマウスEpCAMを発現するようにトランスフェクトされた293T細胞で正の選択をし、対照タンパク質を発現している細胞で予備精製する、細胞インターナリゼーションSELEXである。5種類の最も高親和性のアプタマーがEpCAM/EphA2+細胞にインターナリゼーションされる能力を、以前に記載されたように 37、qRT-PCRおよびフローサイトメトリー（蛍光タグ付きアプタマー使用）によって以前に選択されたアプタマーと比較する。

20

【0210】

これらのアプタマーは、腫瘍細胞株の増殖を特異的に阻害する能力について評価することもできる。この特性を有するアプタマーは、受容体拮抗薬であり得、それは、アプタマーが細胞シグナル伝達に及ぼす効果を調査することによって検証される。ヒトおよびマウスのEphA2細胞外ドメイン間の高い相同性（>90%同一；>90%の構造相同性）を考えれば、ヒトおよびマウスのEphA2と交差反応するアプタマーを同定することは、すでに選択されたアプタマーを、マウスに対する交差反応性について試験するのと同じくらい単純であることができる。したがって、最初に、マウスEphA2と結合する能力について20種類のヒトEphA2アプタマーの既存のセットを評価することができる。あるいは、上記アプローチに従うことができる。少数の上位アプタマーについて、切断型配列（ライブラリーアダプター配列の一方または両方を欠如する）を合成して、結合に必要な最小配列を定義することができる。

30

【0211】

化学合成しやすいAsiCに設計することができる約20～35nt長のアプタマーを各リガンドについて同定することができる。

40

【0212】

TNBCターゲティングAsiCおよびT-Icに対するそれらの活性のインビトロ評価。どの乳癌サブタイプがTNBターゲティングAsiCで効率的にトランスフェクトされるかを定義することができ、かつ、正常組織細胞と比較して腫瘍ノックダウンが特異的であるかどうかを、まず細胞株において、次に10種類の腫瘍標本において評価して、細胞株についての結果が10種類の組織に変換されることを検証することができる。本発明者らは、TNBCターゲティングAsiCが乳房T-ICをトランスフェクトするおよび標的とする潜在能も評価することができる。

【0213】

AsiCの設計および初期試験。上で同定された最も魅力的なアプタマー（正常細胞と比較

50

した予後不良癌における親和性、結合選択性および発現、長さをより短く切断すること、発癌および幹細胞挙動におけるリガンドの重要性、受容体の拮抗性および異種間反応性を考慮して優先順位を付けた)を、本明細書上記の初期EpCAM-AsiCのために使用された、eGFP、AKT1およびPLK1を標的とするsiRNA(対照のスクランブルsiRNAと比較して)に結合させることによってAsiCとして設計することができる。

【0214】

不安定化(d1)EGFP(タンパク質T1/2が約1時間)を安定発現している基底細胞様NBC細胞株が、以前にレンチウイルスを用いて産生された。GFPの発現は、フローおよびイメージングによって容易に定量することができ、そのノックダウンは、生物学的結果を有しない。短いT1/2は、ノックダウンの迅速で高感度の検出を可能にする。すべての細胞に発現しているAKT1は、そのノックダウンが細胞生存率にあまり影響しないので、研究に好適な内因性遺伝子である。

【0215】

PLK1のノックダウンは分裂途中の細胞に細胞傷害性であるので、PLK1をその抗腫瘍効果のために使用する。これらの遺伝子のそれぞれを標的とするEpCAM-AsiCを用いた、強く再現性のある遺伝子ノックダウンが本明細書に記載されている。AsiCは、安定性および自然免疫認識阻害のために2'-フルオロピリミジンならびにエキソヌクレアーゼ消化から防御する目的でその3'末端にdT残基を有するように化学合成される。2つの鎖をアニーリングして、最終RNAを産生する(図10A~10B)。これらのAsiCは、AsiC取り込み(短い鎖の3'末端にコンジュゲーションしたAF-647(AsiCの活性に影響しない)のような蛍光団を使用する)、遺伝子ノックダウンならびに減少した腫瘍細胞株の成長および生存についてのインビトロ用量反応実験で評価して、本来のEpCAM-AsiC(陽性対照として)およびCD4-AsiCまたはPSMA-AsiC(陰性対照として)と比較することができる。少数のヒト基底A型TNBC細胞株(MB468、HCC1937、BPLER 対 不死化上皮細胞)における選択的取り込み、遺伝子ノックダウンおよび抗腫瘍効果を、それぞれフローサイトメトリー;フローサイトメトリーおよびqRT-PCR;ならびにCell-TiterGloおよびアネキシン-PI染色によって定量することができる。これらの実験は、EpCAMおよびEphA2を認識する、一握りの最も性能のよいAsiCの選択を可能にすることができる。

【0216】

TNBCターゲティングAsiCに応答性の乳癌の種類。どの種類の乳癌が、選択されたAsiCでトランスフェクトでき、かつ、遺伝子ノックダウンが正常上皮細胞と比較して腫瘍においてどのくらい特異的であるかを判定することができる。一般的な乳癌サブタイプを代表するがTNBCに重み付けした20種類のヒト乳癌細胞株(14種類のTNBC株に加えて、管腔型およびHer2+細胞株のサンプリング)における選択されたAsiCによるインビトロノックダウンを評価することができる。93. アプタマーリガンドの発現、蛍光標識AsiCの取り込みおよび遺伝子サイレンシングを、陰性対照としてのBPE57および線維芽細胞株と比較することができる。この大きなパネルの細胞株は、細胞表面EpCAMおよびEphA2レベルがRNAの取り込みおよび遺伝子サイレンシングにどのように影響するのか、および効率的なノックダウンに必要な発現閾値があるかどうかの評価を可能にし得る。用量反応実験は、アプタマーの高親和性がAsiCにおいて維持されていることの検証を可能にすることができる。弱く接着したアプタマーを除去するために酸洗浄を使用すること、および結合が非標識アプタマーによって競合しかつ処置前に細胞をトリプシン処理した場合に消失することを示すことによって、取り込みの特異性(非特異的「付着(sticking)」と比較)を検証する。AsiC媒介トランスフェクションを、陽性対照としての脂質トランスフェクションおよび陰性対照としての裸のsiRNAと比較する。AsiC媒介ノックダウンに最適な時間である5日後に、フローサイトメトリーおよびqRT-PCRによってノックダウンを評価する。取り込みおよび遺伝子サイレンシングは、アプタマーリガンドレベルと相関すると予想される。腫瘍細胞に対する特異性がリガンド+ 非形質転換乳房上皮細胞とリガンドdim/- 非形質転換乳房上皮細胞との混合物中で維持されることを検証するために、本発明者らは、PLK1が、異なるアプタマーリガンドレベルを発現している腫瘍細胞と異なる数のGFP+ BPE細胞との混合物に

10

20

30

40

50

おける遺伝子標的である場合の、蛍光AsiCの取り込み、遺伝子ノックダウンおよび生存を、比較することができる。

【0217】

上皮初代乳癌細胞は、優先的にTNBCターゲティングAsiCを取り込み、組織移植片中の正常上皮細胞と比較してノックダウンを示すか？初代腫瘍の取り込みおよびノックダウンを評価し、正常組織細胞への潜在的毒性を予測するために、本発明者らは、次に、10種類の管腔型、Her2+およびTNBC乳癌ならびに周囲の正常組織の移植片におけるインサイチュートランスフェクションおよび遺伝子ノックダウンを評価することができる。本発明者らは、一般的な腫瘍サブタイプを包括的な目で見ると、約25種類の腫瘍からのサンプルを分析することができる。腫瘍タイピングは、組織像ならびにER、PR、Her2およびE-カドヘリンについての免疫組織化学（IHC）染色によって確認することができる。アプタマーがマウスリガンドを認識する場合、本発明者らは、マウス腫瘍／正常組織を使用して正常上皮に対する潜在的毒性も評価することができる。本発明者らは、大きな競合性腫瘍細胞源を有しない正常組織を、腫瘍細胞を含む組織と比較することができる。これは、治療または外科手術後に低／検出不能の腫瘍量を有する患者にAsiCが与えられる状況で、毒性を予測するために重要であり得る。これらの実験は、また、10種類の腫瘍でのノックダウンが細胞株におけるノックダウンに匹敵するかどうか、組織構造が腫瘍細胞における取り込み／ノックダウンに影響するかどうか、および異なる腫瘍サブタイプがどれほど十分にトランスフェクトされるかの評価も可能にすることができる。本明細書において、上皮性乳癌は、効率的な遺伝子ノックダウンを受けるが、正常上皮細胞は受けないと考察される。

【0218】

約3×3×3mm3片に切断された生検を、皮下（SQ）または静脈内注入後のインビボ取り込みを模倣するはずのマイクロタイターウェル中でトランスフェクトすることができる。リポフェクタミン封入siRNAおよびコレステロール-コンジュゲート型siRNAは、両方とも、極性化した円柱および扁平生殖器粘膜における正常上皮細胞の遺伝子ノックダウンに有効であり108,109、一方、裸のsiRNAは取り込まれない。正常乳房上皮組織におけるこれらの対照で類似の結果が予想される。並行して、本発明者らは、コラゲナーゼ消化された10種類の細胞のノックダウンを分析して、組織および癌細胞株で達成されたものとノックダウンを比較することができる。本発明者らは、最初に、siRNAを使用してこれらの対照を検証して、本発明者らが以前にノックダウンした上皮遺伝子（E-カドヘリン、サイトケラチン(CK)-5（基底細胞の優れたマーカー）およびCK-14、ならびにネクチン-1）を標的とすることができる93,108,109。それらの発現は、単離された細胞のIHC、蛍光顕微鏡法（FM）またはフローサイトメトリーによって容易に追跡することができる。標的遺伝子の染色を、表現型マーカーについての染色および蛍光標識siRNAと対比させ、どの細胞型が標的とされているかを判定することができる。汎CK抗体は、間質から上皮細胞（正常および腫瘍）を識別することができる。希少な基底組織幹細胞における送達およびCK5のノックダウンが特に関心対象である。理由は、EpCAM-AsiCがこれらの細胞を標的とし、潜在的に正常組織幹細胞の枯渇に導くことができるからである。組織切片のH&E染色ならびにI型インターフェロンおよび炎症性サイトカイン（IL-1、IL-6、TNF-!）についてのqRT-PCRアッセイによって、組織毒性および炎症を評価する。潜在的に有害な炎症が検出されたならば、RNA配列の追加的な化学修飾（2'-フルオロピリミジン以外）を導入して、それを除去する。

【0219】

TNBCターゲティングAsiCは乳房癌源細胞を標的とできるか？本発明者らは、一部はT-ICをトランスフェクトする潜在能から、EpCAMおよびEphA2をアプタマー標的として選んだ。乳房T-ICは、表現型マーカーによって独特には定義されず（また、それらは、実際に不均一性であり得る93,110-113）、実験を取り組みがいのあるものになっている。理由は、T-ICが、継代移植できる腫瘍を少ない数で起こすそれらの能力によって機能的に定義されるからである。異なる組み合わせでのCD44、CD24、EpCAM、CD133、CD49fまたはALDH1についての染色は、T-ICに対して強い 59,72,78,114-121。異なるプロトコールが、重複するが同

一ではない潜在的T-ICのサブセットを定義する。理論に縛られることを望むわけではないが、本明細書において、EpCAM-AsiCおよびEphA2-AsiCは、T-ICによって取り込まれ、T-ICに遺伝子サイレンシングを引き起こし、腫瘍内のT-IC潜在能を消失または無能にするための標的指向化された療法のために使用することができると考察される。

【0220】

T-IC亜集団におけるAsiCの取り込みおよび遺伝子サイレンシングを分析するために、乳癌株のパネル（管腔型、Her2+、基底A型およびB型TNBC）におけるEpCAM、EphA2、CD44およびCD24のマルチカラーフローサイトメトリーを使用して、どの乳房細胞株が、EpCAMおよび／またはEphA2について明るく染色される細胞を含む推定上のT-IC集団を有するかを同定することができる。本発明者らは、これらの細胞株から産生されたマンモスフィアおよびAldefluor+細胞のEpCAM／EphA2染色も調査することができる121,123-125。本発明者らは、この副目的で研究するために最も魅力的な細胞株として、最も明るく／最も一様なEpCAM/EphA2発現を有する約4～5株をT-ICから選択することができ、安定な（d1）GFP発現変種を産生することができる。これらの細胞株、ならびにそれらのマンモスフィアおよびAldefluor+亜集団をGFP siRNAを有するAF647標識AsiC（および陰性対照として非ターゲティングPSMA-AsiC）と共にインキュベートすることができる。AsiCの取り込みを、EpCAMまたはEphA2、CD44およびCD24ならびにAldefluor染色と一緒にAF-647蛍光によって評価する。AsiCは、EpCAM+またはEphA2+ CD44+ CD24-/dim Aldefluor+ 細胞によって取り込まれることができる。T-IC表現型細胞での遺伝子ノックダウンを評価するために、本発明者らは、eGFPまたは対照siRNA担持AsiCによる処理後に、T-IC集団および残りの細胞におけるGFP発現をフローサイトメトリーおよびqRT-PCRによってモニタリングすることができる。本発明者らは、また、内因性PLK1およびAKT1のノックダウンを評価することができる。

【0221】

これらの実験は、T-ICが異なるサブタイプの乳癌においてEpCAM/EphA2-AsiCによって標的とされるかどうかを示すことができる。その後の実験で本発明者らは、T-ICに富む集団で>80%のノックダウンを有する細胞株に焦点を合わせる。ノックダウンが非効率的である場合、本発明者らは、トランスフェクション条件を修正することができる（AsiCの量、細胞数、体積など）。次に、本発明者らは、AsiCがマンモスフィアおよびコロニー形成を阻害し、CD44およびALDH1発現亜集団ならびにサイドポピュレーションのサイズを減少させるかどうかを評価することができる。PLK1をノックダウンすることに加え、本発明者らは、乳房T-ICが自己再生または多能性の維持のために依存する少数の追加的な遺伝子に対するAsiCを設計および評価することができる。基底細胞様TNBCのT-ICは、プロテアソーム阻害に選択的に感受性である 93。

【0222】

したがって、本発明者らは、プロテアソーム成分（PSMA2）および潜在的に他の選択的なT-IC依存遺伝子（MSI1（Musashi）、WntおよびNotchシグナル伝達を調節する乳房T-ICにおけるRNA結合タンパク質 126-130、またはBMI1、幹細胞の自己再生に必要なポリコーム成分 131-134）のノックダウンを評価することができる。マンモスフィア細胞においてこれらの遺伝子が発現され、ノックダウンされることを検証した後、本発明者らは、PLK1、MSI1、BMI1もしくはPSMA2を標的とするAsiC、または陰性対照としてeGFPを標的とするAsiCで接着細胞およびマンモスフィアの両方を処理し、5～7日後にCD44、CD24、EpCAM、CD133、CD49fおよびALDH1で染色することによってT-IC亜集団のサイズを測定することができる。本発明者らは、また、低分子色素を流出させる細胞（「サイドポピュレーション」）を測定することができる。これらの実験は、コロニー形成細胞およびマンモスフィアの頻度を定量する機能的アッセイによって補完することができる。連続再播種は、T-ICをスフィアとして連続的に増殖させる能力が阻害されるかどうかを評価することができる。本明細書において、PLK1、MSI1、BMI1またはPSMA2をノックダウンすることが、一部の細胞株由来のT-ICにおけるT-ICの数、増殖および機能を減少させることができるが、異なる乳房細胞株に関しては異なる遺伝子がより活性であり得ると考察される。例えばプロテアソームの阻害は、基底細胞様TNBCにおけるT-ICを消失させたが、3つの間葉系TNBC細胞株の

うちの1つにおいてのみであり、より大きく分化した非TNBC腫瘍では消失させなかった 93。

【0223】

T-ICを抑制するノックダウンアプローチを、化学阻害剤（例えばボルテゾミブ）が利用可能な場合はそれを使用する実験によって、または同じ経路の他の遺伝子（MSI1についてNOTCH1、 β -カテニンもしくはWNT1）をノックダウンすることが抗T-IC活性を有するかどうかを調査することによって、さらに検討することができる。次に、本発明者らは、基底細胞様TNBC株をAsiCに短期間エクスピボ曝露することが、T-IC能力の阻害の最終的な尺度としてのTNBC発がんイニシエーションを阻害するかどうかを、インビトロで有望に見えるAsiCを使用して判定することができる。選ばれたAsiC（および陰性対照としてPSMAアプタマーを使用するAsiC、またはeGFP siRNAを含むAsiC）で一晩処理した細胞株を、生存率について評価する。短期siRNA曝露が生存率に影響しないことを検証した後に、エクスピボ処理した細胞を、ある範囲の細胞数でNOD/scid/"c-/-（NSG）マウス（これらのマウスは腫瘍植え込みに関して最高の生着（take）を有する）に同所性に注射する。24時間のボルテゾミブ処理（この時点で約40%の細胞がまだ生存している）は、陽性対照としての役割を果たす。

【0224】

TNBCターゲティングAsiCのインビボ評価

次に、一方にMB468またはHCC1187などのアプタマーリガンド+基底A型TNBC株の乳房脂肪体異種移植片を、比較として他方に基底B型MB231のようなリガンド-乳癌細胞株を担持するヌードマウス（これらのモデルでの本発明者らの経験に基づき再現性のある統計を得るために1群マウス約5~8匹）を使用して、最も性能の良好な少数のAsiCをインビボ評価することができる。インビボイメージングのために、本発明者らは、ルシフェラーゼ-およびmCherry-発現レンチウイルスの感染により安定な発光/蛍光細胞株をすでに作製していた。

【0225】

腫瘍細胞における全身送達およびノックダウン。未修飾AsiCは小型（約30kDa）であるので、静脈内または腹腔内注射したとき、それらは腎臓濾過によって急速に消失する。20 kDaポリエチレングリコール（PEG）を、siRNAの不活性（パッセンジャー）鎖の5'末端に結合させることができる。21種類の静脈内注射したPEG化PSMA-AsiCは皮下腫瘍中に集中し；PEG化は、腹腔内注射したAsiCの循環T_{1/2}を<35分から>30時間に延長し、遺伝子サイレンシングの持続時間を約5日に増加させ、有効腫瘍-阻害用量を250pmol×注射5回に8倍減少させた。本発明者らは、5mg/kg未修飾CD4-AsiCの皮下（SQ）注射は、ヒト化マウスの脾臓ならびに近位および遠位リンパ節におけるCD4+細胞での全身特異的ノックダウンを引き起こしたことも見出した（示さず）。したがって、本発明者らは、AF-790結合型AsiCを使用するインビボイメージングおよびIVISスペクトルによって、ならびに血液、尿、肝臓および腫瘍サンプル中の活性鎖のTaqmanアッセイによって、本来のAsiC構築物およびPEG-AsiCの静脈内および皮下（SQ）投与後のAsiCレベルを比較することができる。サンプルは、1日目に頻繁にサンプルを回収して5日間にわたり分析することができる。組織損傷について組織切片を評価することができ、血液学的毒性、肝毒性および腎毒性について血液を血球の計数および血清化学検査によって分析することができる。自然免疫または炎症の誘導に関連する毒性は、血清インターフェロンおよび炎症性サイトカインのELISAアッセイによって評価することができる。循環T_{1/2}および注射後にEpCAM+腫瘍に局在する薬物の比率を計算することができる。CD4-AsiCの皮下（SQ）および静脈内投与を用いた本発明者らの予備的実験ならびにPSMA-AsiCでのインビボ経験 9,21,25に基づき、理論に縛られることを望むわけではなく、本明細書において、非PEG化AsiCは静脈内投与後に迅速に排泄されるが、SQ EpCAM-AsiCおよびIV PEG-AsiCは、腫瘍異種移植片により好都合な局在を有すると考察される。

【0226】

ある範囲の濃度のAsiCの単回注射後のmCherryおよびPLK1のノックダウンを、インビボ

イメージングによって、ならびに処置の4、7および12日後に回収された腫瘍標本のフローサイトメトリー、FM、およびqRT-PCRによって、評価することができる。これらの実験は、腫瘍遺伝子ノックダウンのピークの50、75および90%に必要な有効用量の推定値（ED50、ED75、ED90）ならびに腫瘍におけるノックダウンの耐久性についての推定値（T-KD50＝腫瘍の発現がノックダウンのピークから対照に向けて半分戻るための時間として定量される）を提供することができる。これらのパラメータを各構築物について求めることができる。本発明者らは、PLK1構築物についての最大耐用量（MTD）も求めることができる。不十分なPK/PDまたは自然免疫刺激の徴候は、化学修飾を調整する（一部の残基に2'-OMeリボースを付加する）よう、またはより長いPEGポリマーを付加して、直接的な方法（straightforward）を使用してこれらのパラメータを改善するよう本発明者らを導く。

10

【0227】

抗腫瘍効果。ヌードマウスの乳房脂肪体に植え込まれるかまたは静脈内注射された（転移モデルとして）基底A型腫瘍に対して最も優れたTNBCターゲティングAsiCがどれほど有効であるかを、インビボイメージングによって試験することができる。本発明者らは、原理証明としてPLK1を標的とすることによって開始することができる。21,107。PLK1-AsiCは、PK/PDの結果に基づき選ばれた投薬スケジュールを使用して、基底A型TNBC脂肪体腫瘍を担持するマウス8匹の群（以前の試験に基づき統計的有意性のために選択された群サイズ）に皮下（SQ）および／または静脈内注射することができる。腫瘍が触知可能になったら速やかにマウスを処置することができる。代表的なリガンド+およびリガンド-腫瘍に及ぼす効果を比較する。対照マウスをPBSまたは裸のsiRNAs、スクランブルsiRNAを有するAsiCおよびPLK1 PSMA-AsiCで処置することができる。腫瘍のサイズは、イメージングおよびノギスによって定量することができる。抗腫瘍効果が最適以下であるならば、投薬レジメンを最大耐用量レジメンに調整することができる。

20

【0228】

本発明者らは、また、単独および組み合わせて投与されたPLK1ノックダウンおよび標準治療化学療法の効果も比較して、潜在的臨床試験を予測することができる。完全な腫瘍退縮があるならば、本発明者らは、減少した用量を評価することができる。他の少数の基底A型TNBC株を植え込んだマウスにおいても、有効なレジメンを評価して、抗腫瘍応答の一般性を検証することができる。本発明者らは、また、遠隔転移に対する有効性を判定するために、腫瘍細胞を静脈内注射した後のAsiC処置を評価することができる。屠殺時には、マウスを屠殺し、残留した顕微鏡的または肉眼的腫瘍について乳房脂肪体をFM、H&EおよびIHCによって視診することができる。残留腫瘍細胞はまたEpCAM/EphA2の発現についても評価して、腫瘍耐性がアプタマーリガンドのダウンレギュレートの結果として発生した可能性があるかどうかを判定することもできる。毒性の臨床徴候について処置後のマウスを観察することもでき、屠殺時には、血球の計数ならびに腸管、骨髄および脾臓の病理調査によって、腸管および骨髄毒性を慎重に調査することができる。交差反応性アプタマーを用いて設計されたAsiCを使用して、正常上皮の毒性を評価することができる。本発明者らの最も優れたAsiCの設計を使用して、本発明者らは、次に、PLK1のノックダウンと、単独またはPLK1と組み合わせて試験した本発明者らのsiRNAスクリーニング 93で同定されたTNBC依存遺伝子（例えばPSMA2またはMCL1）のノックダウンとの比較を開始することができる。

30

40

【0229】

引用文献

- 1.Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010. 363: 1938-1948
- 2.Gusterson B. Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer*. 2009. 9: 128-134.
- 3.Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S, Bradbury I, Bliss JM, Azim HA, Jr., EllisP, Di Leo A, Baselga J, Sotiriou C, Piccart-Gebhart M. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012. 30: 1879-1887.
- 4.Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, Turashvili G, Ding J, Tse K, Haffari G, Bashashati A, Prentice LM, Khattra J, Burleigh A, Yap D, Bernard V, McPherson A, Shumansky K, Crisan A, Giuliany R, Heravi-Moussavi A, Rosner J, Lai D, Birol I, Varhol R, Tam A, Dhalla N, Zeng T, Ma K, Chan SK, Griffith M, Moradian A, Cheng SW, Morin GB, Watson P, Gelmon K, Chia S,

Chin SF, Curtis C, Rueda OM, Pharoah PD, Damaraju S, Mackey J, Hoon K, Harkins T, Tadigotla V, Sigaroudinia M, Gascard P, Tlsty T, Costello JF, Meyer IM, Eaves CJ, Wasserman WW, Jones S, Huntsman D, Hirst M, Caldas C, Marra MA, Aparicio S. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012. 486: 395-399.

5.Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell*. 2006. 126: 231-235.

6.de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007. 6: 443-453.

7.Petrocca F, Lieberman J. Promise and challenge of RNA interference-based therapy for cancer. *J Clin Oncol*. 2011. 29: 747-754.

8.Watts JK, Corey DR. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *J Pathol*. 2012. 226: 365-379.

9.Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol*. 2012. 19:60-71.

10.Tabernero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, Paz-Ares L, Cho DC, Infante JR, Alsina M, Gounder MM, Falzone R, Harrop J, White AC, Toudjarska I, Bumcrot D, Meyers RE, Hinkle G, Svrzikapa N, Hutabarat RM, Clausen VA, Cehelsky J, Nochur SV, Gamba-Vitalo C, Vaishnaw AK, Sah DW, Gollob JA, Burris HA, 3rd. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov*. 2013. 3: 406-417.

11.Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. 2013. 368: 1685-1694.

12.Sehgal A, Vaishnaw A, Fitzgerald K. Liver as a target for oligonucleotide therapeutics. *J Hepatol*. 2013.

13.Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, Perez J, Chiesa J, Warrington S, Tranter E, Munisamy M, Falzone R, Harrop J, Cehelsky J, Bettencourt BR, Geissler M, Butler JS, Sehgal A, Meyers RE, Chen Q, Borland T, Hutabarat RM, Clausen VA, Alvarez R, Fitzgerald K, Gamba-Vitalo C, Nochur SV, Vaishnaw AK, Sah DW, Gollob JA, Suhr OB. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2013. 369: 819-829.

14.Alnylam. Interim Results for Phase II Trial of ALN-TTR02: A Novel RNAi Therapeutic for the Treatment of Familial Amyloidotic Polyneuropathy. Biennial Meeting of the Peripheral Nerve Society, St Malo, France. 2013.

15.Lieberman J, Sarnow P. Micromanaging hepatitis C virus. *N Engl J Med*. 2013. 368: 1741-1743.

16.Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulga-Morskaya S, Liebow A, Bettencourt BR, Sutherland JE, Hutabarat RM, Clausen VA, Karsten V, Cehelsky J, Nochur SV, Kotlianski V, Horton J, Mant T, Chiesa J, Ritter J, Munisamy M, Vaishnaw AK, Gollob JA, Simon A. Effect of an RNA interference

10

20

30

40

drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet*. 2013.

17.Peer D, Lieberman J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. *Gene Ther*. 2011. 18: 1127-1133.

18.Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, Swiderek KM, Gold L. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100: 15416-15421.

10

19.Huang Z, Szostak JW. Evolution of aptamers with a new specificity and new secondary structures from an ATP aptamer. *RNA*. 2003. 9: 1456-1463.

20.McNamara JO, 2nd, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, Sullenger BA, Giangrande PH. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol*. 2006. 24: 1005-1015.

21.Dassie JP, Liu XY, Thomas GS, Whitaker RM, Thiel KW, Stockdale KR, Meyerholz DK, McCaffrey AP, McNamara JO, 2nd, Giangrande PH. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat Biotechnol*. 2009. 27: 839-849.

20

22.Zhou J, Li H, Li S, Zaia J, Rossi JJ. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV1 therapy. *Mol Ther*. 2008. 16: 1481-1489.

23.Zhou J, Rossi JJ. Aptamer-targeted cell-specific RNA interference. *Silence*. 2010. 1: 4.

24.Zhou J, Swiderski P, Li H, Zhang J, Neff CP, Akkina R, Rossi JJ. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic Acids Res*. 2009. 37: 3094-3109.

30

25.Neff CP, Zhou J, Remling L, Kuruvilla J, Zhang J, Li H, Smith DD, Swiderski P, Rossi JJ, Akkina R. An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. *Sci Transl Med*. 2011. 3: 66ra66.

26.McNamara JO, Kolonias D, Pastor F, Mittler RS, Chen L, Giangrande PH, Sullenger B, Gilboa E. Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice. *J Clin Invest*. 2008. 118: 376-386.

27.Kim MY, Jeong S. In vitro selection of RNA aptamer and specific targeting of ErbB2 in breast cancer cells. *Nucleic Acid Ther*. 2011. 21: 173-178.

40

28.Wheeler LA, Trifonova R, Vrbanc V, Basar E, McKernan S, Xu Z, Seung E, Deruaz M, Dudek T, Einarsson JJ, Yang L, Allen TM, Luster AD, Tager AM, Dykxhoorn DM, Lieberman J. Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras. *J Clin Invest*. 2011. 121: 2401-2412.

29. Rockey WM, Hernandez FJ, Huang SY, Cao S, Howell CA, Thomas GS, Liu XY, Lapteva N, Spencer DM, McNamara JO, Zou X, Chen SJ, Giangrande PH. Rational truncation of an RNA aptamer to prostate-specific membrane antigen using computational structural modeling. *Nucleic Acid Ther.* 2011. 21: 299-314.
30. Thiel KW, Hernandez LI, Dassie JP, Thiel WH, Liu X, Stockdale KR, Rothman AM, Hernandez FJ, McNamara JO, 2nd, Giangrande PH. Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2+-breast cancer cells using RNA aptamers. *Nucleic Acids Res.* 2012. 40: 6319-6337.
31. Pastor F, Kolonias D, Giangrande PH, Gilboa E. Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature.* 2010. 465: 227-230. 10
32. Zhou J, Rossi JJ. Cell-specific aptamer-mediated targeted drug delivery. *Oligonucleotides.* 2011. 21: 1-10.
33. Pastor F, Kolonias D, McNamara JO, 2nd, Gilboa E. Targeting 4-1BB costimulation to disseminated tumor lesions with bi-specific oligonucleotide aptamers. *Mol Ther.* 2011. 19: 1878-1886.
34. Wheeler LA, Vrbanc V, Trifonova R, Brehm MA, Gilboa-Geffen A, Tanno S, Greiner DL, Luster AD, Tager AM, Lieberman J. Durable knockdown and protection from HIV transmission in humanized mice treated with gel-formulated CD4 aptamer-siRNA chimeras. *Mol Ther.* 2013. 21: 1378-1389. 20
35. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2010. 9: 537-550.
36. Sundaram P, Kurniawan H, Byrne ME, Wower J. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *Eur J Pharm Sci.* 2013. 48: 259-271.
37. Shigdar S, Lin J, Yu Y, Pastuovic M, Wei M, Duan W. RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule. *Cancer Sci.* 2011. 102: 991-998. 30
38. Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2001. 67: 93-109.
39. Trzpis M, Popa ER, McLaughlin PM, van Goor H, Timmer A, Bosman GW, de Leij LM, Harmsen MC. Spatial and temporal expression patterns of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM/EGP-2) in developing and adult kidneys. *Nephron Exp Nephrol.* 2007. 107: e119-131.
40. Marhaba R, Klingbeil P, Nuebel T, Nazarenko I, Buechler MW, Zoeller M. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med.* 2008. 8: 784-804.
41. Gonzalez B, Denzel S, Mack B, Conrad M, Gires O. EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells.* 2009. 27: 1782-1791. 40
42. Lu TY, Lu RM, Liao MY, Yu J, Chung CH, Kao CF, Wu HC. Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2010. 285: 8719-8732.

43. Martin-Killias P, Stefan N, Rothschild S, Pluckthun A, Zangemeister-Wittke U. A novel fusion toxin derived from an EpCAM-specific designed ankyrin repeat protein has potent antitumor activity. *Clin Cancer Res.* 2011. 17: 100-110.
44. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, Mazzoleni G, Gastl G, Went P. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol.* 2011. 64: 415-420.
45. Keller PJ, Arendt LM, Skibinski A, Logvinenko T, Klebba I, Dong S, Smith AE, Prat A, Perou CM, Gilmore H, Schnitt S, Naber SP, Garlick JA, Kuperwasser C. Defining the cellular precursors to human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. 109: 2772-2777. 10
46. Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2004. 64:5818-5824.
47. Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer.* 2007. 96: 417-423.
48. Carpenter G, Red Brewer M. EpCAM: another surface-to-nucleus missile. *Cancer Cell.* 2009. 15: 165-166. 20
49. Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol.* 2009. 11: 162-171.
50. Schulze K, Gasch C, Staufer K, Nashan B, Lohse AW, Pantel K, Riethdorf S, Wege H. Presence of EpCAMpositive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2013.
51. Konigsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, de Santis M, Zeillinger R, Hudec M, Dittrich C. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2011. 50: 700-710. 30
52. Weissenstein U, Schumann A, Reif M, Link S, Toffol-Schmidt UD, Heusser P. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies. *BMC Cancer.* 2012. 12: 206.
53. Zhao S, Yang H, Zhang M, Zhang D, Liu Y, Song Y, Zhang X, Li H, Ma W, Zhang Q. Circulating tumor cells (CTCs) detected by triple-marker EpCAM, CK19, and hMAM RT-PCR and their relation to clinical outcome in metastatic breast cancer patients. *Cell Biochem Biophys.* 2013. 65: 263-273.
54. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003. 21: 635-637. 40
55. Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M, Collins FS. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. 101: 1892- 1897.

- 56.Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A, Linsley PS. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "offtarget" transcript silencing. *RNA*. 2006. 12: 1197-1205.
- 57.Ince TA, Richardson AL, Bell GW, Saitoh M, Godar S, Karnoub AE, Iglehart JD, Weinberg RA. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell*. 2007. 12: 160-170.
- 58.Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr*. 2012. 6: 30-38. 10
- 59.Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100: 3983-3988.
- 60.Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100: 3547-3549.
- 61.Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101: 14228-14233.
- 62.Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005. 5: 275-284. 20
- 63.Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006. 444:756-760.
- 64.Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. In *Cancer Res*, pp. 9339-9344.
- 65.Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med*. 2006. 355: 1253-1261. 30
- 66.Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*. 2006. 98: 1777-1785.
- 67.Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med*. 2006. 12: 296-300.
- 68.Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R, Jr., Badve S, Nakshatri H. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*. 2006. 8: R59.
- 69.Wicha MS. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds. *Clin Cancer Res*. 2006. 12: 5606-5607.
- 70.Cho RW, Wang X, Diehn M, Shedden K, Chen GY, Sherlock G, Gurney A, Lewicki J, Clarke MF. Isolation and Molecular Characterization of Cancer Stem Cells in MMTV-Wnt-1Murine Breast Tumors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2008. 26: 364-371. 40
- 71.Dalerba P, Clarke M. Cancer Stem Cells and Tumor Metastasis: First Steps into Uncharted Territory. *Cell Stem Cell*. 2007. 1: 241-242.

- 72.Fillmore C, Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Res.* 2007. 9: 303.
- 73.Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science.* 2007. 317: 337.
- 74.O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007. 445: 106-110.
- 75.Shafee N, Smith CR, Wei S, Kim Y, Mills GB, Hortobagyi GN, Stanbridge EJ, Lee EY-HP. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brea1/p53-mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 2008. 68: 3243-3250. 10
- 76.Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur M-H, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Breast Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature. *Cancer Res.* 2009. 69: 1302-1313.
- 77.Rosen JM, Jordan CT. The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science* (New York,NY). 2009. 324: 1670-1673. 20
- 78.Liu H, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A, Qian D, Lin J, Wen S, Chang YF, Bachmann MH, Shimono Y, Dalerba P, Adorno M, Lobo N, Bueno J, Dirbas FM, Goswami S, Somlo G, Condeelis J, Contag CH, Gambhir SS, Clarke MF. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010. 107: 18115-18120.
- 79.McDermott SP, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol.* 2010. 4: 404-419.
- 80.Federici G, Espina V, Liotta L, Edmiston KH. Breast cancer stem cells: a new target for therapy. *Oncology.*2011. 25: 25-28, 30. 30
- 81.Castano Z, Fillmore CM, Kim CF, McAllister SS. The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells. *Semin Cancer Biol.* 2012. 22: 462-470.
- 82.Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, Chomienne C, Ishikawa F, Schuringa JJ, Stassi G, Huntly B, Herrmann H, Soulier J, Roesch A, Schuurhuis GJ, Wohrer S, Arock M, Zuber J, Cerny-Reiterer S, Johnsen HE, Andreeff M, Eaves C. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer.* 2012. 12: 767-775.
- 83.Hiramoto-Yamaki N, Takeuchi S, Ueda S, Harada K, Fujimoto S, Negishi M, Katoh H. Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *J Cell Biol.* 2010. 190: 461-477. 40
- 84.Wykosky J, Palma E, Gibo DM, Ringler S, Turner CP, Debinski W. Soluble monomeric EphrinA1 is released from tumor cells and is a functional ligand for the EphA2 receptor. *Oncogene.* 2008. 27: 7260-7273.

- 85.Brantley-Sieders DM, Zhuang G, Hicks D, Fang WB, Hwang Y, Cates JM, Coffman K, Jackson D, Bruckheimer E, Muraoka-Cook RS, Chen J. The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J Clin Invest.* 2008. 118: 64-78.
- 86.Fang WB, Brantley-Sieders DM, Parker MA, Reith AD, Chen J. A kinase-dependent role for EphA2 receptor in promoting tumor growth and metastasis. *Oncogene.* 2005. 24: 7859-7868.
- 87.Macrae M, Neve RM, Rodriguez-Viciana P, Haqq C, Yeh J, Chen C, Gray JW, McCormick F. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. *Cancer Cell.* 2005. 8: 111-118. 10
- 88.Ireton RC, Chen J. EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005. 5: 149-157.
- 89.Coffman KT, Hu M, Carles-Kinch K, Tice D, Donacki N, Munyon K, Kifle G, Woods R, Langermann S, Kiener PA, Kinch MS. Differential EphA2 epitope display on normal versus malignant cells. *Cancer Res.* 2003. 63: 7907-7912.
- 90.Carles-Kinch K, Kilpatrick KE, Stewart JC, Kinch MS. Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior. *Cancer Res.* 2002. 62: 2840-2847. 20
- 91.Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2001. 61: 2301-2306.
- 92.Zhuang G, Brantley-Sieders DM, Vaught D, Yu J, Xie L, Wells S, Jackson D, Muraoka-Cook R, Arteaga C, Chen J. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res.* 2010. 70: 299-308.
- 93.Petrocca F, Altschuler G, Tan SM, Mendillo ML, Yan H, Jerry DJ, Kung AL, Hide W, Ince TA, Lieberman J. A Genome-wide siRNA Screen Identifies Proteasome Addiction as a Vulnerability of Basal-like Triple- Negative Breast Cancer Cells. *Cancer Cell.* 2013. 24: 182-196. 30
- 94.Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietersen JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011. 121: 2750-2767.
- 95.Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990. 346: 818-822.
- 96.Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990. 249: 505-510.
- 97.Thiel WH, Bair T, Peek AS, Liu X, Dassie J, Stockdale KR, Behlke MA, Miller FJ, Jr., Giangrande PH. Rapid identification of cell-specific, internalizing RNA aptamers with bioinformatics analyses of a cell-based aptamer selection. *PLoS One.* 2012. 7: e43836. 40
- 98.Thiel WH, Bair T, Wyatt Thiel K, Dassie JP, Rockey WM, Howell CA, Liu XY, Dupuy AJ, Huang L, Owczarzy R, Behlke MA, McNamara JO, Giangrande PH. Nucleotide bias observed with a short SELEX RNA aptamer library. *Nucleic Acid Ther.* 2011. 21: 253-263.

- 99.Huang YZ, Hernandez FJ, Gu B, Stockdale KR, Nanapaneni K, Scheetz TE, Behlke MA, Peek AS, Bair T, Giangrande PH, McNamara JO. RNA Aptamer-based Functional Ligands of the Neurotrophin Receptor, TrkB. *Mol Pharmacol*. 2012.
- 100.Meyer S, Maufort JP, Nie J, Stewart R, McIntosh BE, Conti LR, Ahmad KM, Soh HT, Thomson JA. Development of an efficient targeted cell-SELEX procedure for DNA aptamer reagents. *PLoS One*. 2013. 8:e71798.
- 101.Reiss DJ, Howard FM, Mobley HL. A novel approach for transcription factor analysis using SELEX with high-throughput sequencing (TFAST). *PLoS One*. 2012. 7: e42761. 10
- 102.Zimmermann B, Gesell T, Chen D, Lorenz C, Schroeder R. Monitoring genomic sequences during SELEX using high-throughput sequencing: neutral SELEX. *PLoS One*. 2010. 5: e9169.
- 103.Jagannathan V, Roulet E, Delorenzi M, Bucher P. HTPSELEX--a database of high-throughput SELEX libraries for transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res*. 2006. 34: D90-94.
- 104.Roulet E, Busso S, Camargo AA, Simpson AJ, Mermoud N, Bucher P. High-throughput SELEX SAGE method for quantitative modeling of transcription-factor binding sites. *Nat Biotechnol*. 2002. 20: 831-835. 20
- 105.White R, Rusconi C, Scardino E, Wolberg A, Lawson J, Hoffman M, Sullenger B. Generation of speciescross-reactive aptamers using "toggle" SELEX. *Mol Ther*. 2001. 4: 567-573.
- 106.Berezhnoy A, Stewart CA, McNamara I JO, Thiel W, Giangrande P, Trinchieri G, Gilboa E. Isolation and Optimization of Murine IL-10 Receptor Blocking Oligonucleotide Aptamers Using High-throughput Sequencing. *Mol Ther*. 2012. 20: 1242-1250.
- 107.Yao YD, Sun TM, Huang SY, Dou S, Lin L, Chen JN, Ruan JB, Mao CQ, Yu FY, Zeng MS, Zang JY, Liu Q, Su FX, Zhang P, Lieberman J, Wang J, Song E. Targeted delivery of PLK1-siRNA by ScFv suppresses Her2+ breast cancer growth and metastasis. *Sci Transl Med*. 2012. 4: 130ra148. 30
- 108.Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, Lee SJ, Bronson RT, Knipe DM, Lieberman J. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*. 2006. 439: 89-94.
- 109.Wu Y, Navarro F, Lal A, Basar E, Pandey RK, Manoharan M, Feng Y, Lee SJ, Lieberman J, Palliser D. Durable protection from Herpes Simplex Virus-2 transmission following intravaginal application of siRNAs targeting both a viral and host gene. *Cell Host Microbe*. 2009. 5: 84-94.
- 110.Sarrio D, Franklin CK, Mackay A, Reis-Filho JS, Isacke CM. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells*. 2012. 30: 292-303. 40
- 111.Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009. 9: 265-273.

112. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, Costea DE, Mackenzie IC. Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma Switch between Two Distinct Phenotypes That Are Preferentially Migratory or Proliferative. *Cancer Res.* 2011. 71: 5317-5326.
113. Scheel C, Eaton EN, Li SH-J, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah K-J, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA. Paracrine and Autocrine Signals Induce and Maintain Mesenchymal and Stem Cell States in the Breast. *Cell.* 2011. 145: 926-940.
114. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 2003. 17:1253-1270. 10
115. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005. 65: 5506-5511.
116. Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lovgren K, Grabau D, Ferno M, Borg A, Hegardt C. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008. 10: R53. 20
117. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2010.
118. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010. 16: 876-887.
119. Leth-Larsen R, Terp MG, Christensen AG, Elias D, Kuhlwein T, Jensen ON, Petersen OW, Ditzel HJ. Functional heterogeneity within the CD44 high human breast cancer stem cell-like compartment reveals a gene signature predictive of distant metastasis. *Mol Med.* 2012. 18: 1109-1121. 30
120. Ginestier C, Wicha MS. Mammary stem cell number as a determinate of breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2007. 9: 109.
121. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F, Paredes J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol.* 2011. 64: 937-946.
122. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. *let-7* Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell.* 2007. 131: 1109-1123. 40
123. Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem cells and development.* 2009. 18: 17-25.
124. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. *Bracl* breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res.* 2008. 10: R10.

125.Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis*. 2005. 11: 729-737.

126.Clarke RB. Isolation and characterization of human mammary stem cells. *Cell Prolif*. 2005. 38: 375-386.

127.Clarke RB, Anderson E, Howell A, Potten CS. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif*. 2003. 36 Suppl 1: 45-58.

128.Clarke RB, Spence K, Anderson E, Howell A, Okano H, Potten CS. A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev Biol*. 2005. 277: 443-456.

10

129.Kagara N, Huynh KT, Kuo C, Okano H, Sim MS, Elashoff D, Chong K, Giuliano AE, Hoon DS. Epigenetic regulation of cancer stem cell genes in triple-negative breast cancer. *Am J Pathol*. 2012. 181: 257-267.

130.Wang XY, Penalva LO, Yuan H, Linnoila RI, Lu J, Okano H, Glazer RI. Musashi1 regulates breast tumor cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival. *Mol Cancer*. 2010. 9: 221.

131.Liu S. Hedgehog Signaling and Bmi-1 Regulate Self-renewal of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells. *Cancer Res*. 2006. 66: 6063-6071.

20

132.Polytarchou C, Iliopoulos D, Struhl K. An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. 109: 14470-14475.

133.Pietersen A, Evers B, Prasad A, Tanger E, Cornelissensteijger P, Jonkers J, Vanlohuizen M. Bmi1 Regulates Stem Cells and Proliferation and Differentiation of Committed Cells in Mammary Epithelium. *Curr Biol*. 2008. 18: 1094-1099.

134.Hoenerhoff MJ, Chu I, Barkan D, Liu Z-y, Datta S, Dimri GP, Green JE. BMI1 cooperates with H-RAS to induce an aggressive breast cancer phenotype with brain metastases. *Oncogene*. 2009. 28: 3022-3032.

30

【 0 2 3 0 】

実施例4

RNA干渉 (RNAi) は、病原性遺伝子をノックダウンすることによって疾患を処置する絶好の機会を提供する。最近の初期臨床試験から、有望で持続性の遺伝子ノックダウンおよび／または肝臓での異常な遺伝子発現によって起こる一握りの疾患での臨床的利益が示された。癌の処置にRNAiを利用する主な障壁は、播種性癌細胞への低分子RNAの送達である。それらの中の大部分の上皮癌細胞および癌源細胞 (T-IC) は、最初に記載された腫瘍抗原であるEpCAMを高度に発現する。本発明者らが試験したすべての上皮性乳癌細胞株は、EpCAMについて明るく染色され、一方で不死化正常乳房上皮細胞および線維芽細胞は染色されない。上皮癌細胞におけるインビトロでの標的指向化された遺伝子ノックダウンは、EpCAMへの高親和性結合について選択されたアプタマーと呼ばれる構造化RNAをsiRNAと共有結合させたものから構成されるキメラRNAを使用して達成することができる。これらのEpCAMアプタマー-siRNAキメラ (AsiC) は、EpCAM+細胞によって取り込まれ、正常上皮細胞ではなく上皮性乳癌細胞に選択的に遺伝子ノックダウンを引き起こす。そのうえ、EpCAM-AsiCを用いたPLK1のノックダウンは、上皮性乳癌株のコロニーおよびマンモスフィア形成、発がんイニシエーション潜在能のインビトロアッセイ、および発がんイニシエーションを抑制する。

40

【 0 2 3 1 】

皮下注射したPLK1 EpCAM-AsiCは、EpCAM+基底A型トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) の同

50

所性異種移植片によって特異的に取り込まれ、迅速な腫瘍退縮を引き起こす。TNBCは、あらゆる乳癌の最悪の予後を有し、それについての標的指向化された療法はない。正常細胞でなく上皮（基底細胞様）TNBC癌を処置して、それらの中のT-ICを消失させる標的指向化された遺伝子ノックダウンのためにEpCAM-AsiCを使用できることが、本明細書において具体的に考察されている。どの乳癌サブタイプをEpCAM-AsiCの標的とすることができるかを定義し、EpCAMレベルがどのようにに取り込みおよび遺伝子サイレンシングに影響するかを判定することができる。EpCAMを発現する癌細胞および正常上皮における相対的取り込み／ノックダウンを、ヒト乳癌組織移植片で評価することができる。EpCAM-AsiCが乳房T-ICを標的として発がんイニシエーションを中断できるかどうかを判定することもできる。

【0232】

10

EpCAM-AsiCの薬物様特徴を最適化することができる。EpCAM-AsiCを、細胞取り込み、エンドソーム放出、全身送達およびインビボ遺伝子ノックダウンについて最適化することができる。EpCAM-AsiC取り込みの薬物動態（PK）および薬力学（PD）ならびに遺伝子サイレンシングおよび腫瘍抑制を、TNBC細胞株異種移植モデルでのライブ動物イメージングを使用して評価することができる。原理証明として、細胞増殖に必要なPLK1のノックダウンの抗腫瘍効果を評価することができる。加えて、TNBCの遺伝的依存性についてのゲノムワイドsiRNAスクリーニングで同定された新規な遺伝子標的のノックダウンを、マウス異種移植モデルで評価する。最適化されたEpCAM-AsiCならびにそのPK、PDおよび可能な毒性の知識を、さらなる毒性および他の前臨床試験のための実験に使用することができる。

【0233】

20

基底細胞様トリプルネガティブ乳癌および他の上皮癌ならびにそれらの中の癌源細胞での標的指向化された遺伝子ノックダウンのための方法として、EpCAMアプタマー-siRNAキメラを開発することが、本明細書に記載されている。現在のところ、頻繁に再発するトリプルネガティブ乳癌、または薬剤耐性および再発の一部の場合に関与し得る乳癌内の高悪性癌源細胞亜集団についての標的指向化された療法はない。これらのRNAは、RNAベースの薬物が予後不良乳癌を処置するための可変性で柔軟性のあるプラットフォームを提供する。

【0234】

実施例5

本明細書において、以下について実証される：（1）EpCAMアプタマーは、単独ではEpCAM+乳房腫瘍細胞株の細胞成長または生存率に影響しない（示さず）；（2）正常乳房生検をEpCAM+ TNBCヒト乳房腫瘍組織とインビトロで混合すると、蛍光EpCAM-AsiCは腫瘍のみに集中する（図14）；（3）間葉系TNBCではなく、EpCAM+管腔型および基底A型TNBC細胞をPLK1 EpCAM-AsiCで処理すると、癌源細胞（T-IC、コロニーおよびマンモスフィア形成）ならびにインビボ発がんイニシエーション（図15A～15Cおよび16）のインビトロアッセイがブロックされる；（4）いずれかの側腹部にEpCAM+ TNBCおよびEpCAM- TNBCを担持するマウスのEpCAM+腫瘍中に皮下（sc）注射されたEpCAM-AsiCの集中は、注射部位から離れて位置した（図17A～18B）；ならびに（5）最も重要なことには、PLK1 EpCAM-AsiCの皮下（sc）注射は、触知可能な基底A型TNBC異種移植片の完全退縮を導いた（図18A～18B）。加えて、（6）新しいsiRNAスクリーニングは、EpCAM-AsiCのノックダウンについて基底A型TNBCの新規な共通遺伝的依存性を同定した（図19）。

【0235】

理論に縛られることを望むわけではないが、T-ICは、上皮／間葉系遺伝子発現において不均一性でありかつ柔軟性がある。間葉系形質は初期の組織浸潤を促進し得るものの、臨床的に重大な転移の形成（コロニー形成）は、上皮特性を必要とし得る。siRNAのEpCAM媒介送達は、発がんイニシエーションを効果的にブロックするが、これは上皮（基底A型TNBC、管腔型）乳癌についてのみである。

【0236】

細胞の均質集団および混合集団におけるEpCAMアプタマーの高親和性ならびに本発明者の取り込み、遺伝子ノックダウン、および増殖実験は、EpCAM+細胞への特異的標的指向

50

化を示している。正常上皮細胞および線維芽細胞は標的とされない。EpCAM-AsiCが正常ヒト乳房生検によって取り込まれないことを示す新しいデータは、説得力がある。

【0237】

エストロゲン、プロゲステロンおよびHer2受容体を発現しない、多様な群の高悪性癌であるトリプルネガティブ乳癌（TNBC）は、最悪の乳癌予後を有する。細胞傷害療法後に再発することが多いTNBCに対する標的指向化された療法はない。特異的に標的指向化されたRNA干渉（RNAi）を用いた、基底細胞様TNBCのための遺伝子ノックダウン治療薬用のプラットフォームが、本明細書に記載されている。RNAiは、病原遺伝子を選択的にノックダウンすることができる。しかし、癌を処置するための遺伝子ノックダウンの治療的潜在能を実現することは、播種性癌細胞にRNAを送達する強靱な方法を必要とする。細胞膜を通しておよびエンドソームからRNAを得て、RNAi機構が存在する標的細胞の細胞質に運ぶという2つのボトルネックがある。理想的治療は、大部分の正常細胞でなく、癌細胞における遺伝子を選択的にノックダウンする一方で、毒性を最小限にすることである。

【0238】

最初に記載された腫瘍抗原であるEpCAM（CD326またはESAとしても公知）+に対するアプタマー（標的分子に対して高親和性結合であることから選択された構造化核酸）を使用するキメラRNAを用いた、基底細胞様TNBC（過半数のTNBC）における遺伝子のノックダウンが、本明細書に記載されている。EpCAMは、上皮性乳癌（基底細胞様TNBCを含む）上に、正常乳房組織よりも平均で400倍多く、高発現される。それは、他の上皮癌にも高発現され、「癌幹細胞」（癌源細胞（T-IC）とも呼ばれる）のマーカーである。アプタマー-siRNAキメラ（AsiC）は、ターゲティングアプタマーをsiRNAに共有結合させたものである（図10B）。Dicerは、細胞内のアプタマーからsiRNAを切断する。

【0239】

間葉系または正常上皮細胞ではなく、上皮性乳癌細胞は、選択的にEpCAM-AsiCを取り込み、インビトロで遺伝子ノックダウンを受ける。そのうえ、ノックダウンは、EpCAMレベルと強く相関する。EpCAM-AsiCを用いた、有糸分裂に必要な遺伝子であるPLK1のノックダウンは、コロニーおよびマンモスフィア形成（自己再生および発がんイニシエーションと相関するインビトロアッセイ）ならびにインビボ発がんイニシエーションを消失させ、EpCAM-AsiCがT-ICを標的とするために使用され得ることを示唆している。PLK1 EpCAM-AsiCのsc注射は、EpCAM+ TNBC異種移植片の完全退縮を引き起こしたが、EpCAM- 間葉系TNBCに効果を有さなかった。

【0240】

EpCAM-AsiCは、正常細胞でなく基底様TNBC癌を処置して、それらの中のT-ICを消失させる標的指向化された遺伝子ノックダウンのために使用できることが、本明細書に記載されている。標的細胞へのそれらの選択的送達とは別に、AsiCは、ナノ粒子、リボソームまたはRNA結合タンパク質によるRNA送達に比べて癌の処置のために重要な利点を有する—（1）それらは、肝臓および肺の捕捉をバイパスし、腫瘍中に集中する；（2）単一のRNA分子として、それらは多成分薬よりも製造が単純で、安価である；（3）それらは、事実上毒性を有さず、かつ自然免疫または炎症を刺激することも、重大なオフターゲット効果を引き起こすこともない；（4）それらは抗体を誘発しないので、繰り返し使用することができる；（5）それらは血清および他の体液中で安定である。

【0241】

どの乳癌サブタイプをEpCAM-AsiCによって標的指向化できるかを定義し、EpCAMレベルがどのように取り込みおよび遺伝子サイレンシングに影響するかを判定することができる。正常上皮と比較した癌組織における相対的取り込み／ノックダウンを評価することができる。EpCAM-AsiCが乳房T-ICを標的として発がんイニシエーションを阻害できるかどうかにも判定することができる。取り込み、エンドソーム放出、全身送達およびインビボノックダウンのためにEpCAM-AsiCを最適化することが、重要な目標である。EpCAM-AsiCの取り込みの薬物動態（PK）および薬力学（PD）、遺伝子サイレンシングならびに腫瘍抑制は、TNBC同所性異種移植片でのライブ動物イメージングによって評価される。原理証明として、

細胞増殖に必要なPLK1のノックダウンの抗腫瘍効果を評価することができる。本発明者らがゲノムワイドRNAiスクリーニングで基底細胞様TNBCの遺伝的依存性として同定した他の遺伝子のノックダウンを評価することができる。最適化されたEpCAM-AsiCの開発ならびにそのPK、PDおよび可能な毒性の知識ならびに標的とする新規な基底様TNBC依存遺伝子の同定が、本明細書に記載されている。

【0242】

正常上皮と比較した上皮性乳癌でのEpCAM-AsiCの選択的活性の検証、ならびにEpCAM-AsiCが乳房T-IC（すなわち癌幹細胞）をトランスフェクトし、消失させる潜在能の評価；上皮TNBC細胞における遺伝子をインビトロでトランスフェクトおよびノックダウンするための、ならびにインビボ全身送達および腫瘍における集中のための、EpCAM-AsiCの最適化、ならびにPKおよびPDおよび最大耐用量を定義すること；マウスにおける原発癌および転移癌のヒト上皮TNBCモデルでのPLK1および基底細胞様TNBCの新規な依存遺伝子を標的とする、最適化されたEpCAM-AsiCの抗腫瘍効果の評価が、本明細書に記載されている。

【0243】

大部分のTNBC患者は、化学療法に応答するものの、3年以内に約3分の1が転移を発生し、最終的に死亡する。したがって、本発明者らは、新しいアプローチを必要とする。TNBCは、サブタイプ単位で、または個別化治療で処置する必要がある不均一性の低分化型腫瘍である1,3,4,72。大部分のTNBCは、基底細胞様である、または基底A型サブタイプに属する。個別化治療に適した、基底細胞様TNBCを処置するための柔軟性のある標的指向化されたプラットフォームが、本明細書に記載されている。腫瘍依存遺伝子をノックダウンすることによって腫瘍のアキレス腱を攻撃するために、薬物を腫瘍に標的指向化させるだけでなく、薬物標的を選択することもできる。本アプローチは、上皮癌（基底細胞様TNBCを含む）に過剰発現される細胞表面受容体であるEpCAMに結合するRNAアプタマーに低分子干渉RNA（siRNA）を連結することによって（図10B）、上皮癌細胞にsiRNAを送達する。EpCAMは、上皮癌およびそれらのT-ICに高発現される。

【0244】

EpCAMを標的とすることは、正常上皮ではなく、基底細胞様TNBCに選択的遺伝子ノックダウンを引き起こすことができる。選択的ノックダウンは、薬物用量の減少および組織毒性の減少の両方をもたらす。

【0245】

本明細書に記載されるように、9つの基底A型TNBCおよび管腔型乳癌株のうちの9つが強EpCAM+であり、一方で正常乳房上皮細胞株、線維芽細胞および間葉系TNBCは、バックグラウンドに近いEpCAMを有した（図1B）。したがって、事実上すべての基底細胞様TNBC（および恐らく管腔型乳癌）は、EpCAM-AsiCによって標的指向化される。そのうえ、肺、結腸、膵臓および前立腺を含む約100%の上皮癌が、EpCAMについて明るく染色されるので、このプラットフォームは、一般的な癌のRNAiベースの治療のために使用することもできる。

【0246】

RNAiが、哺乳類から見出されたとき、低分子RNAは次の新薬クラスと呼ばれた。研究者らはすぐに、薬物として研究するためにRNAiを得ることは簡単でないと認識した。しかし、RNA治療の主な障害（細胞取り込み）と取り組んだ後、今ではRNAiベース治療に楽観がある。最近の第I/II相試験から、肝臓の異常な遺伝子発現によって起こる高コレステロール血症、トランスフェリン関連アミロイドーシス、C型肝炎、血友病および肝転移で80~95%の遺伝子ノックダウンが示された。しかし、癌治療のためにRNAiを適用することは、まだ夢である。癌のためにRNAiを利用する主な障壁は、播種性細胞内に低分子RNAを送達することである。この問題を、例えばAsiCの使用によって克服する方法および組成物が、本明細書に記載されている。

【0247】

AsiCは、異なる細胞表面受容体を標的とし、任意の遺伝子または遺伝子の組み合わせをノックダウンすることができる柔軟性のあるプラットフォームである。アプタマーを変化させることによって、AsiCプラットフォームは、大部分の疾患へのRNAiベースの治療の適

用を邪魔した送達妨害と取り組むことができる。このアプローチは、個別化癌治療のために理想的である。理由は、標的とすべき遺伝子の選択を、腫瘍の分子特徴に応じて調整できるからである。そのうえ、RNAカクテルは、複数の遺伝子を一度にノックダウンして、薬物耐性を予測し、克服することができる。

【0248】

十分に定義されたPK/PDを有する最適化されたEpCAM-AsiCの開発が、本明細書に記載されている。

【0249】

重要な癌研究の目標は、T-IC（癌幹細胞）を消失させることである。T-ICは、化学療法に相対的に耐性であり、腫瘍の再発および転移を担うと考えられる。本明細書に記載されるAsiCは、高い効率で（上皮）T-ICを標的とするように設計される。そのように、それらは、進行性疾患のリスクがある腫瘍内のこの攻撃的亜集団消失させることができる（図16参照）。

【0250】

EpCAM-AsiCは、また、それらの潜在的治療用途に加えて、腫瘍およびT-ICの依存遺伝子を同定して新規な薬物標的を定義するための強力なインビボ研究ツールであることができる。

【0251】

上皮癌およびそれらのT-ICに広く過剰発現される腫瘍抗原であるEpCAMを標的とすることによる、上皮癌、およびそれらの中のT-ICのための新規な標的指向化された療法が、本明細書に記載されている。今までのところ、標的指向化された療法は、腫瘍特異的抗体または発癌キナーゼに対する阻害剤を使用することに依存していた。以前の誰も、非コンジュゲート型AsiCが潜在的抗腫瘍効果を有し得ることも、AsiCが皮下（sc）投与できることも示していない。現在のところ、TNBCまたはT-ICのための標的指向化された療法はない。TNBCのための標的指向化された療法を開発すること、およびT-ICを消失させる方法を開発することは、癌研究のまだ実現されていない重要な目標である。

【0252】

本明細書に記載される方法は、アプタマーが治療用RNAを腫瘍細胞に特異的に送達し、一方でノックダウンのために選ばれた遺伝子を、標的とされた腫瘍の特異的分子依存性に基づき選択することができるという2つの方法で標的指向化される。インビボノックダウンを試験することによって、基底細胞様TNBCおよびそれらのT-ICが、プロテアソーム、MC L1およびU4/U6-U5トリ-snRNPスプライシング複合体に選択的に依存することを実証することができる。この研究は、従来の薬物およびRNAiベースの薬物の両方に適当な新しいセットの薬物標的を同定することができる。

【0253】

トランスフェクトされた細胞でのsiRNAの輸送を調査することができ、細胞におけるRNAプロセシングの各工程を系統的に最適化してsiRNAの薬物特徴を改善することができる。

【0254】

CD4-AsiCは、持続的にCD4+ Tリンパ球およびマクロファージでの遺伝子発現をノックダウンし、ヒト化マウスへのHIV感染を阻害する。CD4-AsiCは、特異的に極性化ヒト頸腔部組織移植片およびヒト化マウスの雌性生殖器中のCD4+ T細胞およびマクロファージにおける遺伝子発現を抑制した。それらがモノマー性であり、受容体と架橋しないので、CD4-AsiCは、標的とされた細胞を活性化しなかった。それらは、また、自然免疫を刺激しなかった。ヒト化マウスへのHIV遺伝子および／またはCCR5に対するわずか80pmolのCD4-AsiCの腔内適用は、HIVの性感染を完全にブロックした。インビボのRNAi媒介遺伝子ノックダウンは、数週間継続した。誘発の2日前に適用したCCR5 CD4-AsiCによって感染はブロックされた。曝露を4または6日遅らせたとき、有意であるが不十分な防御も発生した。gag/vifを標的とするCD4-AsiCは、曝露後に投与したときに防御をもたらした。したがって、CD4-AsiCは、HIV殺菌剤への使用に有望である。

【0255】

HIV感染防御は、生殖器での局所ノックダウンを必要とする。しかし、全身送達により取り組みがいがあり、癌のために必要である。理由は、AsiCが腎臓によって十分に濾過されるほど小さいので、それらは急速に消失し、遺伝子サイレンシングを効率的に引き起こさない。いくつかの態様において、ポリエチレングリコール（PEG）は、siRNAの不活性（パッシンジャー）鎖の5'末端に結合させることができる。静脈内注射したPEG-AsiCは、皮下（sc）腫瘍に集中する。PEG化は、腹腔内注射したAsiCの循環T_{1/2}を<35分から>30時間に延長し、遺伝子サイレンシングの持続性を約5日に増加させ、必要用量を8倍減少させた。未修飾CD4-AsiCのsc注射は、ヒト化マウスの脾臓、近位および遠位リンパ節でのCD4+細胞において特異的に約80%の遺伝子ノックダウンを引き起こした（示さず）。EpCAM-AsiCのsc注射は、同様に、EpCAM+ 腫瘍における特異的集中／ノックダウンを導いた（下記参照）。 10

【0256】

EpCAM-AsiCは、EpCAM+ 癌細胞における遺伝子発現を選択的にノックダウンする。EpCAM-AsiCは、約42~44nt長の鎖（19ntのアプタマー+リンカー+20~22ntのsiRNA鎖）が20~22ntの相補性siRNA鎖とアニーリングしたものを有する（図10B）。2'-フルオロピリミジン有するように工業的に合成されたので、それらは、RNアーゼ耐性であり（血清中でT_{1/2}>3日、データは示さず）、自然免疫を誘発しない 37,91-93。

【0257】

表面EpCAMは、試験したすべての管腔型および基底細胞様細胞株で高かったが、hTERTで不死化された正常上皮（BPE） 94、線維芽細胞および間葉系TNBCではバックグラウンドに近かった（図1B）。試験した一握りの設計のいくつか（センスおよびアンチセンス鎖が交換されたもの、ならびに数種類のリンカー）は、EpCAM+ 細胞株に特異的に遺伝子発現をノックダウンしたが、最も有効な設計を図10Bに示す。EpCAM-AsiCによるeGFPおよびAKT1の遺伝子ノックダウンは一樣であり、EpCAM+細胞に選択的であり、選択的でなかったsiRNA脂質トランスフェクションと同じように有効であった（図13A~13C）。8つの乳癌細胞株において、PLK1 EpCAM-AsiCによるAKT1のノックダウンおよび細胞増殖阻害は、EpCAMレベルと強く相関した（図11B~11C）。EpCAMアプタマーは、単独で細胞増殖に効果を有さなかった（示さず）。EpCAM- BPE細胞を上皮TNBC細胞株と混合したとき、EpCAM-AsiCはAKT1をノックダウンし、正常上皮細胞でなく腫瘍細胞だけにPLK1感受性細胞死を引き起こした（示さず）。生存している腫瘍細胞の比率は3日後に7倍減少した。本発明者らが正常乳房サンプルおよび腫瘍生検サンプルに蛍光AsiC、コレステロール-コンジュゲート型siRNA（chol-siRNA、正常上皮によって取り込まれる）または裸のsiRNAを添加したとき、EpCAM-AsiCは、腫瘍にのみ集中した（図14）。したがって、EpCAM-AsiCは、上皮腫瘍細胞に特異的である。 20

【0258】

EpCAM-AsiCは、EpCAM+腫瘍のT-ICを阻害する。EpCAMがT-ICおよび転移開始細胞（M-IC）を特徴づけるという理由で、EpCAMを標的に選んだ。EpCAM-AsiCがT-ICを阻害するかどうかを検討するために、本発明者らは、モック処理、パクリタキセルまたはeGFPもしくはPLK1に対するEpCAM-AsiCを用いた処理の後に、コロニーおよびマンモスフィア形成（T-ICの機能的代替）を比較した。PLK1 EpCAM-AsiCは、複数種類のEpCAM+基底細胞様TNBCおよび管腔型細胞株のコロニーおよびマンモスフィア形成をパクリタキセルよりも強く阻害したが、EpCAM-基底B型TNBCに対して不活性であった（図15A~15C）。発がんイニシエーションに及ぼすEpCAM-AsiCの効果を評価するために、培地またはPLK1 EpCAM-AsiCまたはGFP EpCAM-AsiCで一晩処理した、生存したluc+ EpCAM+ MB468細胞およびEpCAM- MB231細胞を、ヌードマウスに皮下（sc）植え込みした。PLK1 EpCAM-AsiCは腫瘍形成をブロックしたが、これはEpCAM+ 腫瘍においてだけであった（図16およびデータは示さず）。このように、EpCAM-AsiCはEpCAM+乳癌において発がんイニシエーションを阻害する。 30

【0259】

EpCAM-AsiCは、EpCAM+ TNBCによって選択的に取り込まれ、腫瘍退縮を引き起こす。EpCAM-AsiCの潜在的臨床有用性を検討するために、本発明者らは、最初に、各側腹部にEpCAM 40 50

+ TNBCおよびEpCAM- TNBCを担持するマウスの頸背部に皮下 (sc) 注射したAlexa750標識EpCAM-AsiCの送達を調査した (図17A~17B)。EpCAM-AsiCは、EpCAM+腫瘍のみに集中した。両側に腫瘍を担持するマウスをモック処置するか、またはPLK1 EpCAM-AsiCもしくはGFP EpCAM-AsiCを週2回 (biweekly) 注射し、腫瘍の成長を発光により追跡した。PLK1ターゲティングAsiCを受け入れたマウスでのみEpCAM+腫瘍が急速に完全に退縮した (図18A~18B)。追加的な対照群でこの実験を繰り返し、EpCAM アプタマー単独またはPLK1 siRNAは、どちらもいかなる抗腫瘍活性も有さなかった (データは示さず)。このように、皮下 (sc) 注射したEpCAM-AsiCは、基底A型TNBCに対して特異的抗腫瘍活性を示す。

【0260】

siRNAの取り込み、エンドソーム放出および遺伝子サイレンシングのライブ細胞イメージング。単一分子検出が可能な、最適化スピニングディスク共焦点顕微鏡法を使用して、放出された蛍光RNAの弱いサイトゾルシグナルを検出した。これは、以前は不可能であった。Alexa647-siRNAリポプレックスと共にインキュベートしたHeLa細胞を3秒毎にイメージングした。RNAを含む後期エンドソームは、それらの積み荷RNAをほんのわずかに放出し、これは迅速に拡散してサイトゾルを満たした (データは示さず)。放出は、エンドサイトーシスの約15~20分後という狭い時間枠の間に起こった。典型的な事象で約104のsiRNAが放出された。HeLa細胞では、安定発現しているeGFP-d1、GFP siRNAは、エンドソームの放出後に約2.5時間のT1/2でGFPの発現を急速に減少させた。効率的な遺伝子サイレンシングのためにわずかに約1000のサイトゾルsiRNAが必要であった。放出は、オートファジーをトリガーし、それは、RNA含有エンドソームをオートファジー二重膜内に隔離した。その後、放出は起こらなかった。

【0261】

本発明者らは、EpCAM+ MB468 TNBCをEpCAM- BPE細胞と比較して、Cy3標識EpCAM-AsiCの取り込み/放出を研究するためにこの方法を適用した。取り込みおよび放出は、BPEでは無視できたが、MB468では明確であった。このイメージング法および本発明者らのsiRNA輸送の理解を使用してEpCAM-AsiCの設計を最適化して、エンドソーム放出およびノックダウンを最適化することができる。

【0262】

基底細胞様TNBC依存遺伝子 (BDG) の同定。EpCAM-AsiCが標的とすることができる基底細胞様TNBCの遺伝的依存性を同定するために、異なる培地中で同じ癌遺伝子で形質転換されたヒト初代乳房上皮細胞である基底細胞様BPLERと筋上皮HMLER細胞を比較する、ゲノムワイドsiRNA致死性スクリーニングを行った。本質的に同質遺伝的であるものの、BPLERは高悪性であり、T-ICに富み、わずかに50個の細胞でヌードマウスに腫瘍を形成し、一方でHMLERは、発がんイニシエーションのために細胞>105個を必要とする。スクリーニングによって遺伝子154個が同定され、それらの遺伝子にHMLERではなくBPLERが依存した。プロテアソーム遺伝子は高度に濃縮されていた ($P<10^{-14}$)。BPLER依存遺伝子の発現は、肺癌または結腸癌ではなく、乳癌での予後不良と相関した。プロテアソーム阻害剤の感受性は、基底A型TNBCの共通の特徴であり、MCL1依存性と相関した。正常乳房上皮細胞、管腔型乳癌株および間葉系TNBC株は、プロテアソームまたはMCL1に依存しなかった。プロテアソーム阻害は、基底A型TNBCを死滅させただけでなく、今度も基底細胞様TNBCに最も選択的に、コロニーおよびマンモスフィアアッセイによるT-IC機能もブロックした。ボルテゾミブへの短時間暴露は、また、マウス基底様TNBC株の発がんイニシエーションを阻害した。

【0263】

本発明者らは、次に、プロテアソーム阻害がマウスにおける基底細胞様TNBC腫瘍の成長を阻害するかどうかを試験した。ボルテゾミブは、固形腫瘍に十分に浸透せず、そのことは、その臨床的使用を限定した。最大耐用静脈内量 (MTD) は、皮下 (sc) 腫瘍におけるプロテアソーム活性を阻害するために必要であった。MTDを用いた処理は、3つのヒトおよび1つのマウス基底A型TNBC細胞株；ならびにTp53+/-マウスに自然に発生した10種類のTNBCの腫瘍の成長を強く阻害したが、基底B型または管腔型細胞株に対して不活性であった。カルフィルゾミブで類似の結果が得られた。ボルテゾミブは、また、静脈内注射したマウ

スTNBC細胞の肺コロニー形成をブロックした。このように、プロテアソームは、上皮TNBCの成長、発がんイニシエーションおよび転移に選択的に必要とされる。腫瘍の浸透およびPDは、より新しいプロテアソーム阻害剤で改善し得るものの、プロテアソーム遺伝子のノックダウンは、より効果的なプロテアソーム阻害を提供し得る。

【0264】

TNBCは不均一性であるので 1,3,4,72、本発明者らは、4つの基底A型TNBCおよび3つの管腔型ヒト癌株における154種類のBPLER依存遺伝子を再スクリーニングした。本発明者らの目標は、基底細胞様TNBC細胞株の追加的な共通依存性を潜在的EpCAM-AsiC標的として同定することであった。154種類のBPLER依存遺伝子のうちの21種類のみが、試験した4つの基底A型細胞株の3つで生存率を少なくとも2倍減少させた。これらの推定上のBDGは、4つの機能群、すなわち4種類のプロテアソーム遺伝子およびMCL1（以前に検証済み）、RNAスプライシングに意味づけられている10種類の遺伝子、有糸分裂に意味づけられている2つの遺伝子、ならびに核外搬出に必要な2つの遺伝子にクラスター形成した。新しいsiRNAセットを使用して21種類のBDG遺伝子のうちの20種類を再試験し、14種類の遺伝子を再確認した（その他の「ヒット」は、オフターゲット効果に二次的であった場合があり、またはそれらのノックダウンは、致死性を引き起こすには不十分であった可能性がある）。10種類のスプライシング遺伝子のうちの9種類を再確認したことに留意されたい。それらは、U4/U6-U5トリ-snRNP複合体、PRPF8、PF38A、RBM22、USP39という4つのメンバーを含んでいた。他の興味深い共通ヒットは、RAN核外搬出Gタンパク質およびヌクレオポリンNUP205、およびキネトコアを紡錘体にアンカーするキネトコア成分のNDC80であった。（紡錘体チェックポイントにUSP39も必要である）。

【0265】

TNBCは、抗有糸分裂剤に特に感受性であることが公知である。USP39は、正常乳房組織と比較して乳癌細胞に過剰発現され、USP39のノックダウンは、管腔型MCF7細胞の増殖およびコロニー形成を阻害した。そのうえゼブラフィッシュにおいて、USP39突然変異は、rblおよびp21のような腫瘍抑制遺伝子のスプライシング欠損に繋がる。基底細胞様TNBCにおけるスプライシングを阻害する治療効果を探究するために、本発明者らは、6つの基底細胞様細胞株および管腔型MCF7細胞における4つのスプライセオソームトリ-snRNP複合体BDG（PRPF8、PRPF38A、RBM22、USP39）をサイレンシングした（図19）。PRPF8、PRPF38AまたはRBM22のノックダウンは、カスパーゼ-3を活性化し、6つの基底細胞様細胞株の6つに致死性であったが、MCF7には致死性でなかった。USP39のノックダウンは、6つの基底細胞様細胞株の3つを死滅させた。スプライセオソームタンパク質は、すべてのサブタイプの乳癌細胞株において多くの場合にアップレギュレートされていた。MCF7細胞ではなく、6つの基底細胞様細胞株すべての生存率は、有糸分裂性キネトコア遺伝子NDC80または核外搬出遺伝子RANもしくはNUP205のノックダウンによって少なくとも2倍減少した。そのうえ、トリ-snRNP複合体遺伝子、RAN、NUP205またはNDC80のそれぞれのノックダウンは、3つの基底細胞様TNBC細胞株のうちの3つでのコロニー形成（T-IC潜在能の代替）をブロックした。

【0266】

EpCAM-AsiCは、EpCAM+腫瘍およびそれらの中のT-ICでの標的指向化された遺伝子ノックダウンを引き起こすことができる。EpCAMを弱く発現する正常上皮細胞において幾分取り込みがあり得るものの、EpCAMbright腫瘍細胞、特にT-ICにおいて、遺伝子ノックダウンが集中する。好都合なPK/PDが、マウスモデルにおいて許容される毒性で基底細胞様TNBCの腫瘍の成長および転移を抑制するために、本明細書に記載されるようにEpCAM-AsiCを最適化することができる。

【0267】

eGFP、AKT1およびPLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、本明細書において、遺伝子ノックダウンを評価し、AsiCの設計を最適化するためのモデルとして使用される。約1時間のタンパク質T1/2で脱安定化（d1）EGFPを安定発現している細胞株を、レンチウイルスを使用して産生することができる。GFPの発現は、フローおよびイメージングによって容易に定量

することができ、そのノックダウンは、生物学的結果を有しない。短いT1/2は、ノックダウンの迅速で高感度の検出を可能にする。本発明者らが試験するすべての細胞に発現されるAKT1は、研究するのに優れた内因性遺伝子である。理由は、TNBCでのそのノックダウンが、細胞生存率にあまり影響しないからである。PLK1は、そのノックダウンが分裂途中の細胞に細胞傷害性であるので、その抗腫瘍効果のための概念立証として使用される。本発明者らは、以前に、PLK1のノックダウンが異なる送達戦略を使用してマウスにおけるHer2+乳癌を劇的に抑制したことを示した。最近のスクリーニングで、PLK1は、そのノックダウンが乳房T-ICを消失させたので、キナーゼ遺伝子の中で独特であった。本発明者らは、これらの遺伝子のそれぞれを標的とするEpCAM-AsiCを用いて強くかつ再現性のある遺伝子ノックダウンを達成した。

10

【0268】

EpCAM-AsiCは、例えばTriLinkまたはNITTO Aveciaから非GMP RNAとして購入することができる。EpCAM-AsiCの各鎖を、2'-フルオロピリミジンおよびエキソヌクレアーゼ消化から防御するためにそれらの3'末端にdT残基を有するように合成し、次にアニーリングさせ、最終RNAを産生させた（図10B）。本発明者らがAsiCを最適化するように、他の化学修飾を置換および試験して、それらが向上した活性を付与するかを判定することができる。アプタマー単独および非ターゲティングsiRNAを有するAsiCは、対照として役立ち得る。AsiCの細胞内取り込みおよび輸送をインビボで定量するために、eGFP EpCAM-AsiCのいくつかも、3'末端が蛍光団で修飾されている（AsiCの活性に影響しない（示さず））アンチセンス鎖とアニーリングさせることができる。

20

【0269】

正常上皮細胞と比較した上皮性乳癌および乳癌T-ICにおけるEpCAM-AsiCの特異的ノックダウン。どの乳癌サブタイプがEpCAM-AsiCでトランスフェクトされるかを判定し、かつ、腫瘍のノックダウンが癌細胞に特異的かどうかを、まず細胞株において、次に10種類の腫瘍組織において評価して、細胞株についての結果がインサイチュー組織に変換されることを検証することができる。EpCAM-AsiCは、正常組織幹細胞もトランスフェクトし得るので、これらの希少な基底細胞へのノックダウンおよび毒性は、組織実験で評価される。本発明者らは、EpCAM-AsiCが乳房T-ICをトランスフェクトおよび標的とする潜在能も評価することができる。

【0270】

EpCAM-AsiCに応答性の乳癌の種類。本発明者らは、最初に、どの種類の乳癌をEpCAM-AsiCでトランスフェクトすることができ、遺伝子ノックダウンが正常上皮細胞と比較して腫瘍においてどのくらい特異的であるかを知必要がある。本発明者らは、一般的な乳癌サブタイプを代表するが、TNBCに重み付けした20種類のヒト乳癌細胞株（14種類のTNBC株に加えて、管腔型およびHer2+細胞株のサンプリング）のパネルにおけるインビトロノックダウンを評価することによって、本発明者らの予備研究を拡張する（図13A~13Cおよび11B~11C）95。EpCAMの発現、Cy3標識AsiCの取り込みおよび腫瘍株での遺伝子サイレンシングを、BPE94および線維芽細胞と比較することができる。この大きな腫瘍パネルは、細胞表面EpCAMレベルが遺伝子サイレンシングにどのように影響するのか、および効率的なノックダウンのためにEpCAMの発現閾値があるかどうかを本発明者らが評価するのを可能にする。本発明者らは、報告されたEpCAMアプタマーの高結合親和性がAsiCにおいて保たれることを、少数のEpCAM+細胞株を使用する用量反応実験においても検証することができる。弱く接着したアプタマーを除去するために酸洗浄を使用すること、および結合が非標識アプタマーによって競合しかつ処理前に細胞をトリプシン処理した場合に消失することを示すことによって、取り込みの特異性（非特異性「付着」と比較）を検証することができる。EpCAM-AsiC媒介トランスフェクションを、対照としての脂質トランスフェクションおよび裸のsiRNAと比較することができる。AsiC媒介ノックダウンに最適な時間である5日後にフローサイトメトリーおよびqRT-PCRによってノックダウンを評価する。本発明者らは、取り込みおよび遺伝子サイレンシングがEpCAMレベルと相関すると予想する。EpCAM+細胞に対する特異性がEpCAM+非形質転換乳房上皮細胞およびEpCAMdim非形質転換乳房上皮

30

40

50

細胞の混合物中で維持されることを検証するために、本発明者らは、PLK1が、異なるレベルのEpCAMを発現している腫瘍細胞（100～1000の間のMFI）と異なる数のGFP+ BPE細胞との混合物における遺伝子標的である場合の、蛍光EpCAM-AsiC取り込み、遺伝子ノックダウンおよび生存を、比較することができる。

【0271】

組織移植片において上皮性乳癌細胞は正常上皮細胞と比較して優先的にEpCAM-AsiCを取り込み、ノックダウンを示すか？原発性腫瘍のノックダウンを評価し、正常組織細胞に対する潜在的毒性を予測するために、本発明者らは、乳房切除標本からの10種類の管腔型、Her2+およびTNBC乳癌ならびに周囲の正常組織の移植片におけるインサイチュートランスフェクションおよび遺伝子ノックダウンを評価することができる。腫瘍サブタイプの包括的見解を得るために、約25個の腫瘍からのサンプルを分析することができる。腫瘍のタイプリングは、組織像およびER、PR、Her2、E-カドヘリンについてのIHC染色によって確認することができる。本発明者らは、EpCAM+細胞の大きな競合性供給源を有しない正常組織を、腫瘍細胞を含む組織と比較することができる。これは、治療および外科手術後の低／検出不能の腫瘍量を有する患者にAsiCが与えられる状況で毒性を予測するために重要であり得る。これらの実験は、10種類の腫瘍でのノックダウンが細胞株におけるノックダウンに匹敵するかどうか、組織構造が腫瘍細胞における取り込み／ノックダウンに影響するかどうか、および異なる腫瘍サブタイプがどれほど十分にトランスフェクトされるかの評価も可能にすることができる。

【0272】

本明細書において提示されたデータ、例えば図14に基づき、正常上皮細胞ではなく、上皮性乳癌が効率的な遺伝子ノックダウンを受けることができると、本明細書において考察される。約3×3×3mm³に切断された組織のサンプルを、マイクロタイターウェルに入れたOptimem溶液中でトランスフェクトすることができる。リボプレックス化siRNAおよびchol-siRNAは、両方とも正常円柱生殖器上皮および扁平生殖器上皮において遺伝子をノックダウンし、一方で裸のsiRNAは、取り込まれない。本発明者らは、最初に、本発明者らが以前にノックダウンし、その発現が、分離された細胞のIHC、蛍光顕微鏡法（FM）またはフローサイトメトリーによって容易に追跡できる、上皮遺伝子（例えばE-カドヘリン、クロロディン3、サイトケラチン（CK）-5（基底細胞の優れたマーカー）、およびネクチン-1）を標的とするためにsiRNAを使用して、これらの対照を検証することができる。標的遺伝子産物の染色によって、表現型マーカーについての染色および蛍光siRNAを対比して、組織内のどの細胞型が標的とされるかを判定することができる。汎CK抗体を使用して、上皮細胞（正常および腫瘍）を間質と識別することができる。本発明者らは、コラゲナーゼ消化した10種類の細胞のノックダウンを組織ノックダウンと比較することもできる。理論に縛られることを望むわけではなく、希少な基底組織幹細胞における送達およびCK5のノックダウンを評価することができ、理由は、EpCAM-AsiCがこれらの細胞を標的とし、潜在的に毒性に繋がり得るからである。GI管への毒性は、抗癌薬について用量制限性であることが多いので、本発明者らは、結腸腫瘍標本を使用してこれらの研究を繰り返して、結腸癌細胞、正常腸管上皮および陰窩幹細胞がトランスフェクトされるかどうかを判定することができる。これらの実験は、臨床毒性およびノックダウンすべき遺伝子の選択に関して有用なデータを提供することができ、すなわち本発明者らは、組織幹細胞が効率的にトランスフェクトされるならば、正常幹細胞にとって必須ではない癌依存遺伝子をノックダウンすることができる。（造血細胞はEpCAMを発現しないので、血液毒性は予想されない。）

【0273】

乳房癌源細胞を標的とするためにEpCAM-AsiCを使用することができるか？本発明者らがEpCAMをアダマー標的として選んだ1つの理由は、それが、T-IC（「癌幹細胞」）をトランスフェクトする潜在能であるからである。T-ICは、薬物耐性であり、発がんイニシエーション、再発および転移を担うと考えられる。乳房T-ICは、表現型により独特には定義されておらず、実験を取り組み甲斐があるものになっている。理由は、T-ICが、継代移植することができる腫瘍を起こすそれらの能力によって機能的に定義されるからである。異なる

組み合わせでのCD44、CD24、EpCAM、CD133、CD49fまたはALDH1についての染色は、T-ICに対して強い 49,61,67,107-111。

【0274】

異なるプロトコルが、潜在的T-ICの重複するが同一ではないサブセットを定義する。T-ICは不均一性であり、それらの間葉系と比較した上皮の特徴に柔軟性を示す（実際、両方の状態の特徴をいくらか有し得る）28,95,112-118。一部の乳房T-ICは、間葉系であり、EpCAMを発現しない。しかし、基底細胞様TNBCが遠隔組織にコロニーを形成し、かつ肉眼的転移を形成する能力（ほぼ間違いなくT-ICの最も臨床的に重要な機能）が、上皮の特性に依存するという証拠がますます増えている。そのうえ、T-ICの機能および発がんイニシエーションに及ぼすEpCAM-AsiCの効果に関する本発明者らの新しいデータ（図15A～15C および16）は、EpCAM-AsiCが基底A型TNBCに対して抗T-IC活性を有することを示している。本発明者らは、EpCAM-AsiCが基底細胞様TNBC T-ICによって取り込まれ、T-ICを無能にするための標的指向化された療法のために使用できると仮説を立てている。

【0275】

T-ICにおけるEpCAM-AsiCの取り込みおよび遺伝子サイレンシングを分析するために、本発明者らは、まず、乳癌株のパネルのEpCAM、CD44およびCD24を染色して、推定上のT-IC集団がEpCAMについて明るく染色される細胞を含む乳房細胞株を同定することができる。本発明者らは、また、これらの細胞株から産生されたマンモスフィアおよびAldefluor+細胞のEpCAM染色 111,123,124も調査することができる。本発明者らは、この副目標において研究すべき最も魅力的な細胞株として、T-IC内で最も均質にEpCAMを発現する約4～5株（および対照として、T-ICがEpCAM染色を欠いているであろう1～2つの基底B型細胞株）を選択することができ、安定なeGFP発現変種を産生させることができる。これらの細胞株、ならびにそれらのマンモスフィアおよびAldefluor+亜集団を蛍光eGFP EpCAM-AsiC（および対照として、非ターゲティングPSMA-AsiC）と共にインキュベートすることができる。AsiCの取り込みは、EpCAM、CD44、CD24およびAldefluor染色と一緒に評価することができる。AsiCは、EpCAM+ CD44+ CD24-/dim Aldefluor+細胞によって取り込まれるはずである。T-IC表現型細胞における遺伝子ノックダウンを評価するために、本発明者らは、eGFP siRNAまたは対照siRNAを有するAsiCによる処理後のT-IC集団および残りの細胞におけるGFPを、（Aldefluor+またはマンモスフィア集団の）フローサイトメトリーおよびqRT-PCRによってモニタリングすることができる。本発明者らはまた、内因性PLK1およびAKT1のノックダウンを評価することもできる。これらの実験は、異なる乳癌サブタイプ中のT-ICがEpCAM-AsiCによって標的とされるかどうかを本発明者らに教えることができる。次に、本発明者らは、AsiCがマンモスフィアおよびコロニー形成を阻害し、表現型T-IC亜集団またはサイドポピュレーションを減少させるかどうかを評価する。

【0276】

本発明者らは、また、自己再生または多能性に必要な追加的な遺伝子に対するAsiCを設計および評価することができる。基底細胞様TNBC T-ICはプロテアソーム阻害に感受性であるので、本発明者らは、プロテアソーム成分（PSMA2）のノックダウンを評価することができる。本発明者らが評価する他の潜在的T-IC依存遺伝子は、乳房T-ICにおいて高発現しかつWntおよびNotchシグナル伝達を調節する遺伝子であるMSI1 125-129、自己再生に必要なポリコム成分であるBMI1 130-133、およびおそらく本発明者らの最近のsiRNAスクリーニングで同定された少数の新規なBDGである（図19）。MSI1のノックダウンは、MCF7およびT47D細胞における幹細胞マーカーおよびマンモスフィア形成を減少させる 129。

【0277】

これらの遺伝子がマンモスフィア細胞において発現およびノックダウンされることを検証した後、本発明者らは、これらの遺伝子または陰性対照としてのeGFPを標的とするAsiCを用いて接着細胞およびマンモスフィアの両方を処理し、5～7日後にCD44、CD24、EpCAM、CD133、CD49fおよびALDH1について染色することによってT-IC亜集団のサイズを測定することができる。本発明者らはまた、小型分子色素を流出させる細胞（「サイドポピュレーション」）の比率を測定することもできる。これらの実験を、コロニー形成細胞および

マンモスフィアを定量する機能的アッセイによって補完することができる。連続的な再播種により、T-ICのスフィアとしての増殖が阻害されるかどうかを検討することができる。

【0278】

PLK1、MSI1、BMI1またはPSMA2のノックダウンは、一部の乳癌サブタイプにおけるT-ICの数、増殖および機能を低下させることができるが、異なる遺伝子は、異なる乳房細胞株に対してより活性であり得る（すなわちプロテアソーム阻害は、基底細胞様TNBCでのT-ICを消失させたが、非TNBC腫瘍では消失させず、3つの基底B型TNBCではそのうちの1つだけで消失させた 95）。T-ICを抑制するノックダウンアプローチは、利用可能な化学阻害剤を使用する実験によって、かつ／または同じ経路の他の遺伝子（例えばMSI1についてNOTCH1、 β -カテニンまたはWNT1）をノックダウンすることによって、さらに検討することができる。EpCAM-AsiCのT-ICに及ぼす効果を、EpCAMアプタマー単独およびEpCAM抗体アダカツムマブ（adecatumumab）（Amgen）と比較することができる。

10

【0279】

次に、本発明者らは、EpCAM-AsiCに対する基底細胞様TNBC株の短期エクスピボ曝露が、T-IC阻害の最終的尺度としての発がんイニシエーションを阻害するかどうかを判定する。最も有望なAsiCをインビボ試験することができる。AsiC（および陰性対照として、PSMAアプタマーを使用するかまたはeGFP siRNAを含むAsiC）で一晩処理した細胞株を生存率について評価することができる。短期siRNA曝露が生存率に影響しないことを検証した後、エクスピボ処理した細胞をある範囲の細胞数で、NOD/scid/!c-/-（NSG）マウス（これらのマウスは、腫瘍植え込みについて最高の生着を有する）に同所性注射する。基底細胞様TNBCにおける発がんイニシエーションを減少させたボルテゾミブまたはアダカツムマブを用いた前処理は、対照である。

20

【0280】

EpCAM-AsiCを最適化する。EpCAM-AsiC薬の特徴を改善するために、本発明者らは、インビトロ遺伝子ノックダウンおよびインビボ送達の各工程を最適化することができる。本発明者らはまた、EpCAM-AsiCの化学的性質を（必要ならば）改変して、オフターゲット効果を最小限にすることもできる。

【0281】

予備的研究および公表された研究において、最適なインビトロノックダウンに必要なAsiC濃度は、脂質トランスフェクションのために使用される約100nM（以下）の濃度よりも何倍も高い約1~4 μ Mである。ノックダウンのために、EpCAM-AsiCは、以下のステップに従う：（1）細胞受容体の結合、（2）エンドサイトーシス、（3）エンドソーム放出、（4）Dicerによるプロセッシング、（5）RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）への組み入れ、および（6）標的mRNAの切断。本発明者らは、ステップ（2）および（3）に焦点を合わせて各ステップを系統的に最適化することができ、その場合、本発明者らは、効力に最大の増加が得られると予想する。AsiCの設計上の変動要因は、EpCAMアプタマー（親和性がステップ1および2に影響する）；アプタマーとsiRNAとの間のリンカー配列（ステップ4を制御する）；siRNA配列（ステップ6を制御する）である。加えて、ホスルアミダイト構成要素からの化学合成のために使用される各残基を化学修飾して、ヌクレアーゼ消化、部分相補的配列のオフターゲット抑制、自然免疫RNAセンサーの結合および刺激を減少させ、かつ細胞取り込みおよびインビボPKを改善することができる。最もよく見られる化学修飾は、リン酸エステル骨格におけるOをSに置換してRNAアーゼ耐性ホスホロチオエート（PS）結合を産生させ、リボースの2'-OHを2'-F、2'-O-メチル（2'OMe）、または2'-O-メトキシエチル（2'MOE）に置換することである。PS、2'-Fおよび2'-OMe修飾は、臨床試験において耐容性良好であり、したがって、本発明者らはそれらに集中する。2'-OMeは、rRNAおよびtRNAに自然に存在し、したがって安全であり、2'-Fも耐容性良好である。重度にPs修飾されたヌクレオチドは接着性であり（血清タンパク質への結合を引き起こし、そのことで循環T1/2を改善することができる）、望まれない副作用を引き起こす可能性があり；軽度

30

40

50

ができる。というのは、修飾が1つのステップで行われるので、以前の候補から学んだ教訓を活かして最も魅力的な修飾候補を他のステップに最適化することができる。本発明者らは、さらなる開発のために選んだ修飾AsiCが自然免疫を刺激せず、または細胞毒性を生じないことを検証することができる。そうした場合、本発明者らは、本発明者らの設計をさらに修飾してこれらの問題を回避することができる。

【0282】

インビトロノックダウンを最適化する

(1) EpCAM結合性。EpCAMアプタマーは12nMの親和性を有する。この親和性がEpCAM-AsiCにおいて保存されることを検証することができる。AsiCがアプタマーよりも低い親和性を有するならば、本発明者らは、組み換えEpCAMを用いるバイオレイヤー干渉法 (OctetRED System, ICCB-Longwood Core) を使用して、アプタマーとAsiCとの親和性を比較することができる。AsiCがより低い結合親和性を有するならば、AsiCは適正にフォールディングしない場合がある。所望の立体配座へのフォールディングを高めるために、本発明者らは、アプタマーとAsiCセンス鎖との間のリンカーの種類および長さを変えてみるることができる (すなわち、本発明者らは、より多くの3Cリンカーまたはトリエチレングリコール Spacer もしくはヘキサエチレングリコールSpacerを組み入れることができる)。

【0283】

(2) エンドサイトーシス。モノマー性AsiCは、構成性受容体リサイクリングによってゆっくりと取り込まれる。このステップを、受容体の架橋によって最適化して、アプタマーのマルチマー化を必要とする能動的エンドサイトーシスをトリガーすることができる。アプタマーのマルチマー化 (連結したsiRNAが存在または不在) は、(価数を増加させることによって) 結合アビディティを増加させるか、またはシグナル伝達を引き起こさないアプタマーをアゴニスト試薬に変換することができる。アプタマーは、ビオチン化 (Bi) アプタマーと結合すべきストレプトアビジン (SA) およびsiRNAを使用すること; 複数の相補性配列がフレキシブルリンカーによって結合したものを含む組織化オリゴヌクレオチドと結合するアダプターでアプタマーを伸長すること; または相補性アダプター配列でアプタマーを伸長してダイマーを産生させることによって、マルチマー化することができる。本発明者らは、抗体を誘導しないすべてのRNA設計に焦点を合わせる。本発明者らが試験することができる一部の設計を図20に示す。(本発明者らは、センス鎖およびアンチセンス鎖を交換した被験構築物も試験することができる)。

【0284】

経時実験および用量反応実験は、蛍光タグ付きマルチマー構築物をモノマー性AsiCと比較して、取り込みおよびGFPノックダウンの程度および迅速性をフローサイトメトリーおよびライブ細胞イメージングによって評価する (データは示さず)。エンドサイトーシスはマルチマー化によって高まるが、ノックダウンは改善しない場合、本発明者らは、Dicerの切断を追跡するためにノーザンブロッティングを使用し、予想されるアンチセンス鎖が産生されるかどうかを判定することができる (下記参照)。そうでないならば、本発明者らは、マルチマー化AsiCが優れたDicer基質 (&) であるように、例えば二重鎖領域を21ntから27ntに延長することによってリンカーの設計を改変することができ、Dicer産物の5'末端が意図された塩基で始まることを検証することができる。マルチマー化は、ノック

【0285】

これらのマルチマーがどれも機能しないならば、本発明者らは、RNAが小型ナノ粒子に自己集合することを可能にする相補性配列を含むモノマー性AsiCまたはより低免疫刺激性のSA変異体を使用するSA-Bi戦略を試験することができる。

【0286】

(3) エンドソーム放出。1000個よりも少ないサイトゾルsiRNA分子がノックダウンのために必要と推定されるものの（示さず）、エンドサイトーシスしたリボソーム中のsiRNAの数パーセントだけがサイトゾル中に放出される。EpCAM-AsiCのエンドソーム放出をライブ細胞イメージングによって評価して、エンドサイトーシスしたAsiCのサイトゾル放出の効率性を測定することができる。これが所望未満のエンドソーム放出を示すならば、放出の改善は、薬物用量を実質的に減少させるはずである。可逆的にマスクされた両親媒性陽イオンペプチド（メリチン）またはポリマー（ブチルビニルエーテル）の予備インキュベーションおよびエンドサイトーシスは、サイトゾルへのsiRNA脱出を高めることができる。マスクは、中性pHでペプチドまたはポリマーが非荷電であり、かつ形質膜と相互作用せずそれを損傷しないが、陰性エンドソームpHで、エンドソーム膜を損傷し、かつ共エンドサイトーシスされたオリゴヌクレオチドを放出する陽イオン分子が産生されることを意味する。これらのマスクされたポリマーの静脈内注射は、マウスおよび非ヒト霊長類においてsiRNA送達2時間以内にchol-siRNAによる肝細胞ノックダウンを500倍増強した。

【0287】

本発明者らは、まず、マスクされた陽イオンポリマーの以前のトランスフェクションがインビトロでEpCAM-AsiC（およびリボプレックスsiRNA）のサイトゾル送達およびeGFPノックダウンを促進するかどうかを、ライブ細胞ビデオ顕微鏡法によって判定することができる。本発明者らはまた、EpCAM-AsiCを塩基性ペプチド／ポリマーと共にインキュベートすることで、プロトンスポンジ理論が予測するように、バフィロマイシンAまたはコンカナマイシンを使用するエンドソーム酸性化の阻害が、EpCAM-AsiCの細胞質放出およびノックダウンを改変するかどうかを判定できるかどうか検討することができる。これらの実験がプロトンスポンジ理論を確認するならば、本発明者らは、EpCAM-AsiCを改変するための戦略を検討することができる。これらには、種々のサイズのポリアルギニン、プロタミン152、メリチン、トランスポートタンまたはペネトラチンを含む細胞浸透ペプチドに対するセンス鎖またはアンチセンス鎖の共有コンジュゲーション（サイトゾルの還元環境で自然に反転するジスルフィド結合を介する）、ならびにブチルおよびアミノビニルエステルに対するAsiCセンス鎖のコンジュゲーション、または異なる長さのホスホスベルミンに対するセンス鎖の結合が含まれる。本発明者らは、これらの修飾が溶解性を改変せず、結果として細胞傷害性もしくは自然免疫刺激を招かず、または特異的EpCAM標的化を妨害しないことを検証することができる。

【0288】

Dicerのプロセッシング、RISCへの組み入れ、標的mRNAの切断。本発明者らは、次に、対照としての最初の設計と共に上から2～3位までのEpCAM-AsiCを採用し、siRNAの機能を最適化できるかどうかを調査する。EpCAM-AsiCのセンス部分、アンチセンス部分およびアプタマー部分について探索したノーザンプロットは、細胞内のEpCAM-AsiC産物を分析することができる。それらの移動を、合成したセンス鎖およびアンチセンス鎖、アプタマーおよび全長EpCAM-AsiCの移動と比較することができる。Dicerが予想通りAsiCを切断するならば、本発明者らは、センス鎖およびアンチセンス鎖（ならびにエンドソームからのプロセッシングされていないEpCAM-AsiCおよびそのリンカーに結合したアプタマーのバンドサイズ）のように泳動するRNAを回収することができる。（Dicer依存性は、機能低下型Dicerを発現しているHCT116細胞を使用して検証することができる）。細胞内RNAが予想されたサイズでないならば、本発明者らは、それらをクローニングしてDicerが切断する場所を判定することができる。バンドが切断されず、または本発明者らが望む場所でないならば、本発明者らは、リンカーおよび二本鎖領域を再設計して所望の切断を作ることができる。本発明者らは、また、1つまたは複数の3Cリンカーまたはトリエチレングリコールスパーサーもしくはヘキサエチレングリコールスパーサーに置換またはそれを付加することによって、UUUリンカーを代替のリンカーまたはリンカーの組み合わせに置換して、siRNAへの細胞内プロセッシングを高めることを検討することができる。本発明者らは、また、アプタマーがsiRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖にジスルフィド結合によって共有結合して

いるDicer非依存性設計が、サイトゾル中で自然に還元され、より効率的なノックダウンに繋がるかどうかを検討することができる。

【0289】

本発明者らが適当なアンチセンス鎖が産生されることを示した後、本発明者らは、次に、RISCへのアンチセンス鎖の組み入れを比較することができる。ノーザンブロッティングおよびTaqman PCRは、細胞全体の溶解物中のインプット活性鎖が汎Ago抗体（2A8）を用いてどれほど多くプルダウンされるかを定量する。Agoの結合、RISC中のsiRNAのT1/2、および標的遺伝子ノックダウンは、センス鎖およびアンチセンス鎖の化学修飾によって影響される。独占の位置および配列に配置された両方の鎖への特異的な2'-Fおよび2'-OMe化学修飾は、ノックダウンを50倍増加させることができ、末端でのPS結合は、遺伝子ノックダウンの持続時間を大きく増加させる。本発明者らは、AsiCのsiRNA部分の異なる共有修飾を有する小さなセットのAsiCを設計し、それらがeGFP、AKT1およびPLK1のノックダウンに及ぼす効果を分析することができる。

【0290】

本発明者らがインビボ評価する追加的な遺伝子を標的とするEpCAM-AsiCを、最も活性なsiRNA配列および最良の化学修飾を有するように設計することができる。ノックダウンについて試験すべき小さな群のsiRNA配列（アプタマーなし、トランスフェクションによる）を、ウェブアルゴリズムによって同定することができる。低い予測融解温度（Tm）も有する最も効率的なsiRNA（pM活性）を使用することができる。理由は、これらがより良好にプロセッシングされるからである。本発明者らがより高いTmを有する配列を使用する必要があるならば、本発明者らは、センス鎖の3'末端にミスマッチを付加して、siRNAの巻き戻しおよびRISCへの活性鎖の組み入れを促進することができる。

【0291】

オフターゲット効果および毒性を消失させる。これらの実験は、本来のAsiCおよび最適化されたAsiCを用いて行うことができる。eGFP siRNAをコードする様々なAsiCの毒性の欠如（そのノックダウンは生存率に影響すべきでない）を、公式に、AsiCと共にインキュベートされたTNBC株のCell Titer-Gloアッセイによって評価することができる。以前の研究に基づき、本発明者らは、有意に減少した生存率を予想しない。脂質トランスフェクションを、細胞傷害性RNA送達についての対照として使用する。最終的に、本発明者らは、炎症応答遺伝子および自然免疫応答遺伝子（IFNB、IFNG、IL1、IL8、IL10、OAS1、STAT1、IP10）のパネルを増幅するためにAsiCのインキュベーションの6および24時間後に行ったqRT-PCRによって、各AsiCが免疫刺激性でないことを検証することができる。qRT-PCRは、免疫刺激のための最も高感度のアッセイであり、本発明者らは、ピーク応答を捕捉する時間を選んだ。ポリ（I:C）で処理した細胞は、陽性対照としての役割を果たし得、モック処理細胞は陰性対照である。任意のAsiCが免疫刺激性ならば（配列および濃度依存性の特性）、本発明者らは、自然免疫センサーの結合を減少させる追加的な化学修飾が、遺伝子ノックダウンを損なわずに免疫刺激を消失させるかどうかを評価することができる。完全AsiCまたはDicer切断産物のいずれかの第2残基の2'-Fまたは2'-OMe修飾は、この目標を達成することができる。

【0292】

CD4-AsiCは、本発明者らの予備研究において免疫刺激性でなく、最適化されたAsiCは、極めて低濃度で活性であるので（オフターゲット効果は濃度依存性である）、自然免疫刺激は起こりそうにないが、もしも検出されたならば、化学修飾によって容易に抑制することができる。組織移植片研究と共に、本発明者らは、組織像を上皮組織構造の破壊および細胞壊死について慎重に調査することもできる。

【0293】

腫瘍濃度を最適化してPK/PDを定義する。次に、本発明者らは、担腫瘍マウスにおける全身T1/2および腫瘍ターゲティングを評価および改善する。本発明者らは、本来のAsiCの設計および少数のインビトロ最適化構築物（それらが同定された場合）に焦点を合わせる
ことができる。本発明者らは、qRT-PCRを使用して循環T1/2および組織分布を測定し、蛍

光AsiCのインビボイメージングを使用して腫瘍の局在化を調べ、遺伝子サイレンシングの読み出しとしてmCherry（バックグラウンドの自己蛍光が原因でGFPは使用しない）を使用して腫瘍細胞のサイレンシングを調べることができる。インビボイメージングでの本発明者らの最近の経験によってEpCAM-AsiCのPK/PDの研究を促進することができる（図16、17A～17B、および18A～18B、データは示さず）。これらの実験は、本発明者らが作製した、M B231のようなEpCAM-間葉系基底B型TNBC細胞株と比較されるMB468またはHCC1187のようなEpCAM+基底A型TNBC株のルシフェラーゼ-mCherry安定トランスフェクタントの乳房脂肪体異種移植片を担持するヌードマウスを使用することができる。本発明者らは、これらのタグについての発現プラスミドを有しており、安定トランスフェクタントを産生するためにレンチウイルス感染を使用する。これらのモデルでの本発明者らの予備データに基づき、1群約5～8匹のマウスを使用して統計的有意性を得る。本発明者らは、まず、本来のAsiC構築物およびインビトロノックダウンについて最適化された構築物の静脈内および皮下（sc）投与後の血中および腫瘍濃度を比較することができる。毒性の臨床徴候についてマウスを頻繁に調査することができる。サンプルは、1日目に頻繁なサンプル収集を行って5日間にわたり分析することができる。各時点で、血液および尿を回収し、Taqmanアッセイによってアンチセンス鎖について分析することができる。安楽死させた動物から腫瘍およびサンプル器官をより少ない時点で回収することができる。血球の計数および血清化学検査によって血液、肝および腎毒性について血液を分析することができる。循環T1/2および注射後にEpCAM+腫瘍に局在化する薬物の比率を計算することができる。理論に縛られることを望むわけではなく、CD4-AsiCのscおよび静脈内投与を行った本発明者らの予備実験ならびにPSMA-AsiCでのインビボ経験に基づき、本発明者らは、これらのEpCAM-AsiCの大部分が静脈内投与後に急速に排泄されるが、皮下（sc）注射したEpCAM-AsiCは腫瘍異種移植片中に集中すると予想する。より大きなマルチマー化構築物（図20）は、腎臓濾過に耐え、静脈内で与えたときにより十分な腫瘍濃度を有し得る。皮下（sc）および静脈内のPK結果を、インビボイメージング（IVISスペクトルを使用）と、処置の4、7および12日後に回収した腫瘍標本のフローサイトメトリー、FM、およびqRT-PCRとの両方によって評価した、ある範囲の濃度のEpCAM-AsiCの単回注射後のmCherryノックダウンと比較する。これらの実験は、腫瘍遺伝子ノックダウンのピークの50、75および90％に必要な有効用量の推定値（ED50、ED75、ED90）および腫瘍におけるノックダウンの持続性についての推定値（T-KD50＝腫瘍の発現がノックダウンのピークから対照に向けて半分戻るための時間として定量される）を提供することができる。これらのパラメータは、選ばれた各構築物について決定することができる。

【0294】

次に、本発明者らは、循環T1/2を改善する方法を評価する。これらには、AsiCのサイズを増加させること（すなわち、毒性であることが公知のPEIのようなポリマーを避けて、10、20および30kDのような数種類のサイズを比較するPEGコンジュゲーションによる）ならびに血清タンパク質との結合を増加させて腎濾過を減少させること（すなわち、血清LDLに結合するコレステロールとのコンジュゲーション158,159、または血清アルブミンとの結合を促進するジアシル尾部を付加することによる）が含まれる。本発明者らは、粒子または凝集物を産生する戦略を避ける。理由は、これらがより乏しい腫瘍浸透を有し、肝臓で捕捉され得るからである。PEGをアプタマーの5'末端に連結した場合、不活性siRNAの3'末端または活性鎖の3'末端は、RNAiを妨害してはならない。インビボPK/PD/毒性の評価は、陽性対照（およびベンチマーク）として非コンジュゲート型AsiCおよび陰性対照としてコンジュゲート型siRNA（アプタマーなし）を使用して、上記のように行うことができる。PLK1 EpCAM-AsiCを使用して、最低のED75またはED90およびGFPについて最長のT-KD50を有する2または3種類の構築物を再試験して、対応するPK/PDパラメータを判定し、抗腫瘍効力実験のための投薬レジメンの設計を助ける。本発明者らは、また、これらのPLK1構築物についての最大耐用量（MTD）を判定することができる。

【0295】

基底細胞様TNBCに対するEpCAM AsiCの抗腫瘍効果。本発明者らの最終目標は、EpCAM-As

iCを同所性乳房脂肪体腫瘍および転移に対して試験することである。本発明者らは、腫瘍が成長しない、またはゆっくりと成長する場合（そのような場合、本発明者らはNSGマウスに切り替える）を除き、ヌードマウスを使用することができる。多色蛍光および生物発光について高感度のIVISスペクトルを使用してライブ動物イメージングを行うことができる。これらの実験は、同定された最良のEpCAM-AsiCの2〜3つを評価することができる。

【0296】

同所性異種移植片に対するPLK1 EpCAM-AsiCの活性。本発明者らは、PLK1を標的とすることによって開始することができ／上記のように最適化した少数のPLK1 EpCAM-AsiCの設計をマウス5〜8匹の群（この群のサイズが統計的に有意な結果を与えた以前の実験に基づく、検出力計算から選んだサイズ）に、上記のPK/PDの結果に基づき選んだ用量および投薬スケジュール／注射経路を使用して、皮下（sc）および／または静脈内注射することができる。例えばED90が、十分にMTDを下回るならば、最初の実験は、T-KD50/2日毎に2ED90を投与することを検討する場合がある。最初、腫瘍が触知可能になったら速やかにマウスを処置することができるが、その後の実験で本発明者らは、複数回投与後に、一定の直径のより大きな腫瘍が退縮するかどうかを検討することができる。代表的なEpCAM+ 基底A型（MB468、HC1187、BPLER）およびEpCAM- 基底B型（MB231）腫瘍を担持するマウスを比較する。いくつかの実験について、本発明者らは、それぞれの側腹部にこれらの腫瘍を担持するマウスを処置することができるが、腫瘍サイズにおける動物内変動のせいで、これらはより多くのマウスを必要とし得る。PBSまたは裸のsiRNA、EpCAMアプタマー単独、スクランブルドsiRNA配列を有するEpCAM-AsiCおよびPLK1 PSMA-AsiCで対照マウスを処置することができる。一部の実験では、本発明者らは、EpCAM-AsiC処置をアデカツムマブまたはパクリタキセルと比較することができる。腫瘍サイズを、3日毎（q3d）に発光測定およびノギス測定により定量する。また、処置したマウスを秤量し、毒性の臨床徴候について観察することができ、屠殺時に、血球の計数ならびに腸管、骨髄および脾臓の病理検査によって腸管および骨髄毒性について慎重に調査することができる。多重比較のための補正を必要に応じて行う一元配置ANOVAによって群間の差を評価することができる。有効なAsiCについて、本発明者らは、また、処置の即時効果を調査して、抗腫瘍活性のメカニズムを評価し、AsiCが自然免疫応答を活性化していないことを検証することができる。単回の治療薬または対照の注射の1〜3日後に担腫瘍マウスを屠殺し、活性化カスパーゼについて腫瘍を染色して、死滅がアポトーシスによるかを判定し、H&Eによって紡錘体を探して、PLK1ノックダウンの予想される効果を追跡することができる。血清インターフェロンおよび炎症性サイトカインをマルチプレックス化ELISAにより評価することができ、対応するmRNAについて脾臓および腫瘍細胞をqRT-PCRによって分析することができる。抗腫瘍効果がない、または最適以下であるならば、投薬レジメンをMTDに調整することができる。抗腫瘍効果が完全ならば（完全腫瘍退縮）、本発明者らは、治療を開始する時に減少した用量および／またはより大きな腫瘍を評価することができる。未処置の腫瘍が許容サイズに達したので対照マウスを屠殺する場合、処置したマウスを屠殺し、残留した顕微鏡的または肉眼的腫瘍についてFM、H&EおよびIHCによって乳房脂肪体を試験することができる。また、EpCAMの発現についても残留腫瘍細胞を評価して、腫瘍耐性がもし存在するなら、それがEpCAMをダウンレギュレートする結果として発生した可能性があるかを判定することができる。残留腫瘍細胞が目に残らない場合、本発明者らは、追加的な実験を行って腫瘍が根絶されたかどうかを判定することができる。ルシフェラーゼの測定値がバックグラウンドレベルに戻った後にマウスを1〜2週間処置し、次に処置なしで1〜2ヶ月間マウスを観察して、腫瘍が再成長するかまたは転移が出現するかを調べることができる。基底A型TNBCについて最も有効なレジメンを、EpCAMが標的とすることを発明者らが期待する他の乳癌サブタイプ（管腔型、Her2+）に対しても評価することができる。

【0297】

転移性腫瘍に対するPLK1 EpCAM-AsiCの活性。転移性癌細胞に対するEpCAM-AsiCの有効性を評価するために、本発明者らは、最も優れた腫瘍生着を有するNSGマウスに静脈内注射した基底A型TNBC細胞株に対するPLK1 EpCAM-AsiCを評価することができる。本発明者ら

は、基底A型（または対照としての基底B型）TNBCの尾静脈注射後に肺がルシフェラーゼ+になるとすぐにマウスの処置を開始することができる。処置投薬は、原発性腫瘍について上に判定された有効な投与スケジュールおよび投与方式を使用することができる。マウスを3日毎にイメージングすることができる。対照は、モック処置群およびパクリタキセルまたは非ターゲティングsiRNAを含むEpCAM-AsiC処置群に減らすことができる。対照マウスを屠殺する必要がある場合、全群をイメージングすることができる。肺、肝臓および脳を解剖、秤量、イメージングして腫瘍量を定量し、切片をH&EおよびEpCAMについての染色によって分析することができ、ヒト／マウスGapdhの相対発現について各動物からの1葉の肺をqRT-PCRにより分析して、腫瘍量を独立して定量する。PLK1 EpCAM-AsiCで処置されたマウスが転移から完全に防御される、または対照群と比較して有意な利点を示すならば、本発明者らは、腫瘍量がより大きくなるまで処置の開始を遅らせることによって、より大きな転移量を有するマウスも防御されるかを判定することができる。

10

【0298】

転移部位でのRNA送達／ノックダウンが原発性腫瘍部位と異なる可能性もあるので、本発明者らは、また、同所性腫瘍を処置するために最も効果的な静脈内レジメンを、上に同定された最も効果的な皮下（sc）レジメンと比較することができる。M-ICの能力はT-ICの機能と相関すると考えられるので、本発明者らは、本発明者らのスクリーニングのBDG遺伝子および本明細書上にエクスピボ発がんイニシエーションに必要と同定された遺伝子のインビボノックダウンを評価するためにこの転移モデルを使用することもできる。

【0299】

BDF遺伝子を標的とするEpCAM-AsiCの活性。本発明者らは、次に、PLK1のノックダウンを、本発明者らのsiRNAスクリーニングまたは文献で同定されたTNBC依存遺伝子（例えばXBP1）のノックダウンと比較することができる。選ばれた各遺伝子標的のためのこれらのインビボ実験は、以下を含むことができる：（1）各遺伝子に対する活性siRNAを同定し、ノックダウンがインビトロ細胞増殖およびT-IC機能に及ぼす効果を評価すること；（2）AsiCを設計およびインビトロ試験して、特異的遺伝子をノックダウンすること；（3）遺伝子ノックダウンが多様な乳癌細胞株におけるインビトロ増殖およびT-IC機能に及ぼす効果を評価すること；ならびに（4）個別のAsiCのオフターゲット免疫刺激の欠如を検証すること。インビトロで最も優れた挙動をした遺伝子を、PLK1について上に記載された同所性および転移モデルでのインビボ試験に進めることができる。これらの実験では、本発明者らは、未処置マウスを、特異的遺伝子またはPLK1を標的とするEpCAM-AsiCで処置されたマウスと比較することができる。特定の遺伝子標的（すなわちプロテアソームについてのボルテゾミブ／カルフィルゾミブ）に特異的な阻害薬があるならば、対照マウスの群も、比較のために薬物で処置することができる。そのような実験について例示的な遺伝子は、プロテアソーム遺伝子およびMCL1、U4/U6-U5トリ-snRNP複合体遺伝子96,97、XBP1およびキネトコア遺伝子NDC80である。単独で最も優れたインビボ活性を有するAsiCはさらに、PLK1 AsiCと組み合わせて、および互いに評価する。プロテアソーム阻害剤の感受性がMCL1依存性とインビトロで強く相関するので（示さず）、本発明者らは、プロテアソーム遺伝子およびMCL1のノックダウンが相乗的であると仮定する。種々のAsiCとAsiC／薬物組み合わせとの相乗性を、異なるRNA用量の組み合わせまたは関連する阻害薬との組み合わせを使用してアイソログラム法によって公式に試験することができる。特に、本発明者らは、EpCAM-AsiCをパクリタキセルのような標準治療薬と組み合わせることが、本来の構築物と相乗的であるかどうかを判定する。

20

30

40

【0300】

引用文献

1. Foulkes WD, Smith IE and Reis-Filho JS. 2010. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363: 1938-1948.
2. Gusterson B. 2009. Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer* 9: 128-134.
3. Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S, Bradbury I, Bliss JM, Azim HA, Jr., Ellis P, Di Leo A, Baselga J, Sotiriou C and Piccart-Gebhart M. 2012. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 30: 1879-1887.
4. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, Turashvili G, Ding J, Tse K, Haffari G, Bashashati A, Prentice LM, Khattra J, Burleigh A, Yap D, Bernard V, McPherson A, Shumansky K, Crisan A, Giuliany R, Heravi-Moussavi A, Rosner J, Lai D, Birol I, Varhol R, Tam A, Dhalla N, Zeng T, Ma K, Chan SK, Griffith M, Moradian A, Cheng SW, Morin GB, Watson P, Gelmon K, Chia S, Chin SF, Curtis C, Rueda OM, Pharoah PD, Damaraju S, Mackey J, Hoon K, Harkins T, Tadigotla V, Sigaroudinia M, Gascard P, Tlsty T, Costello JF, Meyer IM, Eaves CJ, Wasserman WW, Jones S, Huntsman D, Hirst M, Caldas C, Marra MA and Aparicio S. 2012. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 486:395-399.
5. Dykxhoorn DM and Lieberman J. 2006. Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 126: 231-235.
6. de Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J and Lieberman J. 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6: 443-453.
7. Petrocca F and Lieberman J. 2011. Promise and challenge of RNA interference-based therapy for cancer. *J Clin Oncol* 29: 747-754.
8. Watts JK and Corey DR. 2012. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *J Pathol* 226: 365-379.
9. Burnett JC and Rossi JJ. 2012. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol* 19: 60-71.
10. Tabernero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, Paz-Ares L, Cho DC, Infante JR, Alsina M, Gounder MM, Falzone R, Harrop J, White AC, Toudjarska I, Bumcrot D, Meyers RE, Hinkle G, Svrzikapa N, Hutabarat RM, Clausen VA, Cehelsky J, Nochur SV, Gamba-Vitalo C, Vaishnav AK, Sah DW, Gollob JA and Burris HA, 3rd. 2013. First-in-humans trial of an

10

20

30

RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov* 3: 406-417.

11. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kaupinen S, Levin AA and Hodges MR. 2013. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368: 1685-1694.
12. Alnylam. 2013. Interim Results for Phase II Trial of ALN-TTR02: A Novel RNAi Therapeutic for the Treatment of Familial Amyloidotic Polyneuropathy. Biennial Meeting of the Peripheral Nerve Society, St Malo, France 10
13. Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulga-Morskaya S, Liebow A, Bettencourt BR, Sutherland JE, Hutabarat RM, Clausen VA, Karsten V, Cehelsky J, Nochur SV, Kotelianski V, Horton J, Mant T, Chiesa J, Ritter J, Munisamy M, Vaishnav AK, Gollob JA and Simon A. 2014. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet* 383: 60-68. 20
14. Akin A. 2014. ALN-AT3: An investigational RNAi Therapeutic targeting antithrombin for the treatment of hemophilia. presentation at the World Federation of Hemophilia World Congress, Melbourne Australia
15. Peer D and Lieberman J. 2011. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. *Gene Ther* 18: 1127-1133.
16. Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, Swiderek KM and Gold L. 2003. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15416-15421. 30
17. Huang Z and Szostak JW. 2003. Evolution of aptamers with a new specificity and new secondary structures from an ATP aptamer. *RNA* 9: 1456-1463.
18. Shigdar S, Lin J, Yu Y, Pastuovic M, Wei M and Duan W. 2011. RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule. *Cancer Sci* 102: 991-998.
19. Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I and Emerman JT. 2001. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 67: 93-109.
20. Trzpis M, Popa ER, McLaughlin PM, van Goor H, Timmer A, Bosman GW, de Leij LM and Harmsen MC. 2007. Spatial and temporal expression patterns of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM/EGP-2) in developing and adult kidneys. *Nephron Exp Nephrol* 107: e119-131. 40
21. Marhaba R, Klingbeil P, Nuebel T, Nazarenko I, Buechler MW and Zoeller M. 2008. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med* 8: 784-804.
22. Gonzalez B, Denzel S, Mack B, Conrad M and Gires O. 2009. EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells* 27: 1782-1791.

23. Lu TY, Lu RM, Liao MY, Yu J, Chung CH, Kao CF and Wu HC. 2010. Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem* 285: 8719-8732.
24. Martin-Killias P, Stefan N, Rothschild S, Pluckthun A and Zangemeister-Wittke U. 2011. A novel fusion toxin derived from an EpCAM-specific designed ankyrin repeat protein has potent antitumor activity. *Clin Cancer Res* 17: 100-110.
25. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, Mazzoleni G, Gastl G and Went P. 2011. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 64: 415-420. 10
26. Keller PJ, Arendt LM, Skibinski A, Logvinenko T, Klebba I, Dong S, Smith AE, Prat A, Perou CM, Gilmore H, Schnitt S, Naber SP, Garlick JA and Kuperwasser C. 2012. Defining the cellular precursors to human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 2772-2777.
27. Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ and Gillanders WE. 2004. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 64: 5818-5824. 20
28. Sarrio D, Franklin CK, Mackay A, Reis-Filho JS and Isacke CM. 2012. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells* 30: 292-303.
29. McNamara JO, 2nd, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, Sullenger BA and Giangrande PH. 2006. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 24:1005-1015.
30. Dassie JP, Liu XY, Thomas GS, Whitaker RM, Thiel KW, Stockdale KR, Meyerholz DK, McCaffrey AP, McNamara JO, 2nd and Giangrande PH. 2009. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat Biotechnol* 27: 839-849. 30
31. Zhou J, Li H, Li S, Zaia J and Rossi JJ. 2008. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Mol Ther* 16: 1481-1489.
32. Zhou J and Rossi JJ. 2010. Aptamer-targeted cell-specific RNA interference. *Silence* 1: 4.
33. Zhou J, Swiderski P, Li H, Zhang J, Neff CP, Akkina R and Rossi JJ. 2009. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic Acids Res* 37: 3094-3109. 40
34. Neff CP, Zhou J, Remling L, Kuruvilla J, Zhang J, Li H, Smith DD, Swiderski P, Rossi JJ and Akkina R. 2011. An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. *Sci Transl Med* 3: 66ra66.

35. McNamara JO, Kolonias D, Pastor F, Mittler RS, Chen L, Giangrande PH, Sullenger B and Gilboa E. 2008. Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8⁺ T cells and inhibit tumor growth in mice. *J Clin Invest* 118: 376-386.
36. Kim MY and Jeong S. 2011. In vitro selection of RNA aptamer and specific targeting of ErbB2 in breast cancer cells. *Nucleic Acid Ther* 21: 173-178.
37. Wheeler LA, Trifonova R, Vrbanc V, Basar E, McKernan S, Xu Z, Seung E, Deruaz M, Dudek T, Einarsson JJ, Yang L, Allen TM, Luster AD, Tager AM, Dykxhoorn DM and Lieberman J. 2011. Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras. *J Clin Invest* 121: 2401-2412. 10
38. Rockey WM, Hernandez FJ, Huang SY, Cao S, Howell CA, Thomas GS, Liu XY, Lapteva N, Spencer DM, McNamara JO, Zou X, Chen SJ and Giangrande PH. 2011. Rational truncation of an RNA aptamer to prostatespecific membrane antigen using computational structural modeling. *Nucleic Acid Ther* 21: 299-314.
39. Thiel KW, Hernandez LI, Dassie JP, Thiel WH, Liu X, Stockdale KR, Rothman AM, Hernandez FJ, McNamara JO, 2nd and Giangrande PH. 2012. Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2⁺-breast cancer cells using RNA aptamers. *Nucleic Acids Res* 40: 6319-6337. 20
40. Pastor F, Kolonias D, Giangrande PH and Gilboa E. 2010. Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 465: 227-230.
41. Zhou J and Rossi JJ. 2011. Cell-specific aptamer-mediated targeted drug delivery. *Oligonucleotides* 21:1-10.
42. Pastor F, Kolonias D, McNamara JO, 2nd and Gilboa E. 2011. Targeting 4-1BB costimulation to disseminated tumor lesions with bi-specific oligonucleotide aptamers. *Mol Ther* 19: 1878-1886.
43. Wheeler LA, Vrbanc V, Trifonova R, Brehm MA, Gilboa-Geffen A, Tanno S, Greiner DL, Luster AD, Tager AM and Lieberman J. 2013. Durable knockdown and protection from HIV transmission in humanized mice treated with gel-formulated CD4 aptamer-siRNA chimeras. *Mol Ther* 21: 1378-1389. 30
44. Hussain AF, Tur MK and Barth S. 2013. An aptamer-siRNA chimera silences the eukaryotic elongation factor 2 gene and induces apoptosis in cancers expressing alphavbeta3 integrin. *Nucleic Acid Ther* 23: 203-212.
45. Wang CW, Chung WH, Cheng YF, Ying NW, Peck K, Chen YT and Hung SI. 2013. A new nucleic acidbased agent inhibits cytotoxic T lymphocyte-mediated immune disorders. *J Allergy Clin Immunol* 132: 713-722 e711. 40
46. Dassie JP and Giangrande PH. 2013. Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics. *Ther Deliv* 4: 1527-1546.

47. Lai WY, Wang WY, Chang YC, Chang CJ, Yang PC and Peck K. 2014. Synergistic inhibition of lung cancer cell invasion, tumor growth and angiogenesis using aptamer-siRNA chimeras. *Biomaterials* 35: 2905-2914.
48. Yoo H, Jung H, Kim SA and Mok H. 2014. Multivalent comb-type aptamer-siRNA conjugates for efficient and selective intracellular delivery. *Chem Commun (Camb)* 50: 6765-6767.
49. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983-3988.
50. Dick JE. 2003. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3547-3549. 10
51. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA and Brenner MK 2004. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14228-14233.
52. Dean M, Fojo T and Bates S. 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5: 275-284.
53. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD and Rich JN. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760. 20
54. Jordan CT, Guzman ML and Noble M. 2006. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355: 1253-1261.
55. Phillips TM, McBride WH and Pajonk F. 2006. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 98: 1777-1785.
56. Polyak K and Hahn WC. 2006. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 12: 296-300.
57. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R, Jr., Badve S and Nakshatri H. 2006. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 8: R59. 30
58. Wicha MS. 2006. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds. *Clin Cancer Res* 12: 5606-5607.
59. Cho RW, Wang X, Diehn M, Shedden K, Chen GY, Sherlock G, Gurney A, Lewicki J and Clarke MF. 2008. Isolation and Molecular Characterization of Cancer Stem Cells in MMTV-Wnt-1 Murine Breast Tumors. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26: 364-371.
60. Dalerba P and Clarke M. 2007. Cancer Stem Cells and Tumor Metastasis: First Steps into Uncharted Territory. *Cell Stem Cell* 1: 241-242.
61. Fillmore C and Kuperwasser C. 2007. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Res* 9: 303. 40
62. Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL and Strasser A. 2007. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 317: 337.
63. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445: 106-110.

64. Shafee N, Smith CR, Wei S, Kim Y, Mills GB, Hortobagyi GN, Stanbridge EJ and Lee EY-HP. 2008. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res* 68: 3243-3250.
65. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur M-H, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D and Wicha MS. 2009. Breast Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature. *Cancer Res* 69: 1302-1313.
66. Rosen JM and Jordan CT. 2009. The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science* (New York, NY) 324: 1670-1673. 10
67. Liu H, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A, Qian D, Lin J, Wen S, Chang YF, Bachmann MH, Shimono Y, Dalerba P, Adorno M, Lobo N, Bueno J, Dirbas FM, Goswami S, Somlo G, Condeelis J, Contag CH, Gambhir SS and Clarke MF. 2010. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18115-18120.
68. McDermott SP and Wicha MS. 2010. Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol* 4: 404-419. 20
69. Federici G, Espina V, Liotta L and Edmiston KH. 2011. Breast cancer stem cells: a new target for therapy. *Oncology* 25: 25-28, 30.
70. Castano Z, Fillmore CM, Kim CF and McAllister SS. 2012. The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells. *Semin Cancer Biol* 22: 462-470.
71. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, Chomienne C, Ishikawa F, Schuringa JJ, Stassi G, Huntly B, Herrmann H, Soulier J, Roesch A, Schuurhuis GJ, Wohrer S, Arock M, Zuber J, Cerny-Reiterer S, Johnsen HE, Andreeff M and Eaves C. 2012. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* 12: 767-775. 30
72. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y and Pietenpol JA. 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121: 2750-2767.
73. Soysal SD, Muenst S, Barbie T, Fleming T, Gao F, Spizzo G, Oertli D, Viehl CT, Obermann EC and Gillanders WE. 2013. EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2(+), basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer. *Br J Cancer* 108: 1480-1487.
74. Imrich S, Hachmeister M and Gires O. 2012. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr* 6: 30-38. 40
75. Munz M, Baeuerle PA and Gires O. 2009. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 69: 5627-5629.

76. Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnolzer M, Fiedler S, Langbein L, Franke WW, Moldenhauer G and Zoller M. 2005. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin7. *Exp Cell Res* 309: 345-357.
77. Schulze K, Gasch C, Staufer K, Nashan B, Lohse AW, Pantel K, Riethdorf S and Wege H. 2013. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*
78. Konigsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, de Santis M, Zeillinger R, Hudec M and Dittrich C. 2011. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol* 50: 700-710. 10
79. Weissenstein U, Schumann A, Reif M, Link S, Toffol-Schmidt UD and Heusser P. 2012. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies. *BMC Cancer* 12: 206.
80. Zhao S, Yang H, Zhang M, Zhang D, Liu Y, Song Y, Zhang X, Li H, Ma W and Zhang Q. 2013. Circulating tumor cells (CTCs) detected by triple-marker EpCAM, CK19, and hMAM RT-PCR and their relation to clinical outcome in metastatic breast cancer patients. *Cell Biochem Biophys* 65: 263-273. 20
81. Chen Q, Ge F, Cui W, Wang F, Yang Z, Guo Y, Li L, Bremner RM and Lin PP. 2013. Lung cancer circulating tumor cells isolated by the EpCAM-independent enrichment strategy correlate with Cytokeratin 19-derived CYFRA21-1 and pathological staging. *Clin Chim Acta* 419: 57-61.
82. Oberneder R, Weckermann D, Ebner B, Quadl C, Kirchinger P, Raum T, Locher M, Prang N, Baeuerle PA and Leo E. 2006. A phase I study with adecatumumab, a human antibody directed against epithelial cell adhesion molecule, in hormone refractory prostate cancer patients. *Eur J Cancer* 42: 2530-2538. 30
83. Schmidt M, Scheulen ME, Dittrich C, Obrist P, Marschner N, Dirix L, Ruttinger D, Schuler M, Reinhardt C and Awada A. 2010. An open-label, randomized phase II study of adecatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21: 275-282.
84. Kurtz JE and Dufour P. 2010. Adecatumumab: an anti-EpCAM monoclonal antibody, from the bench to the bedside. *Expert Opin Biol Ther* 10: 951-958.
85. Marschner N, Ruttinger D, Zugmaier G, Nemere G, Lehmann J, Obrist P, Baeuerle PA, Wolf A, Schmidt M, Abrahamsson PA, Reinhardt C and Heidenreich A. 2010. Phase II study of the human anti-epithelial cell adhesion molecule antibody adecatumumab in prostate cancer patients with increasing serum levels of prostate-specific antigen after radical prostatectomy. *Urol Int* 85: 386-395. 40
86. Schmidt M, Ruttinger D, Sebastian M, Hanusch CA, Marschner N, Baeuerle PA, Wolf A, Goppel G, Oruzio D, Schlimok G, Steger GG, Wolf C, Eiermann W, Lang A and Schuler M. 2012. Phase IB study of the EpCAM antibody adecatumumab combined with docetaxel in patients with EpCAM-

positive relapsed or refractory advanced-stage breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23: 2306-2313.

87. Munz M, Murr A, Kvesic M, Rau D, Mangold S, Pflanz S, Lumsden J, Volkland J, Fagerberg J, Riethmuller G, Ruttinger D, Kufer P, Baeuerle PA and Raum T. 2010. Side-by-side analysis of five clinically tested anti-EpCAM monoclonal antibodies. *Cancer cell international* 10: 44.

88. Thiel KW and Giangrande PH. 2010. Intracellular delivery of RNA-based therapeutics using aptamers. *Ther Deliv* 1: 849-861.

89. Keefe AD, Pai S and Ellington A. 2010. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9: 537-550.

10

90. Sundaram P, Kurniawan H, Byrne ME and Wower J. 2013. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *Eur J Pharm Sci* 48: 259-271.

91. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G and Linsley PS. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21: 635-637.

92. Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M and Collins FS. 2004. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1892-1897.

20

93. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A and Linsley PS. 2006. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12: 1197-1205.

94. Ince TA, Richardson AL, Bell GW, Saitoh M, Godar S, Karnoub AE, Iglehart JD and Weinberg RA. 2007. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell* 12: 160-170.

30

95. Petrocca F, Altschuler G, Tan SM, Mendillo ML, Yan H, Jerry DJ, Kung AL, Hide W, Ince TA and Lieberman J. 2013. A Genome-wide siRNA Screen Identifies Proteasome Addiction as a Vulnerability of Basallike Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Cancer Cell* 24: 182-196.

96. Behrens SE and Luhrmann R. 1991. Immunoaffinity purification of a [U4/U6.U5] tri-snRNP from human cells. *Genes Dev* 5: 1439-1452.

97. Huang YH, Chung CS, Kao DI, Kao TC and Cheng SC. 2014. Sad1 counteracts Brr2-mediated dissociation of U4/U6.U5 in tri-snRNP homeostasis. *Mol Cell Biol* 34: 210-220.

40

98. van Leuken RJ, Luna-Vargas MP, Sixma TK, Wolthuis RM and Medema RH. 2008. Usp39 is essential for mitotic spindle checkpoint integrity and controls mRNA-levels of aurora B. *Cell Cycle* 7: 2710-2719.

99. Cheng Y, Holloway MP, Nguyen K, McCauley D, Landesman Y, Kauffman MG, Shacham S and Altura RA. 2014. XPO1 (CRM1) inhibition represses STAT3 activation to drive a survivin-dependent oncogenic switch in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* 13: 675-686.
100. Wang H, Ji X, Liu X, Yao R, Chi J, Liu S, Wang Y, Cao W and Zhou Q. 2013. Lentivirus-mediated inhibition of USP39 suppresses the growth of breast cancer cells in vitro. *Oncol Rep* 30: 2871-2877.
101. Rios Y, Melmed S, Lin S and Liu NA. 2011. Zebrafish *usp39* mutation leads to *rb1* mRNA splicing defect and pituitary lineage expansion. *PLoS Genet* 7: e1001271. 10
102. Adler AS, McClelland ML, Yee S, Yaylaoglu M, Hussain S, Cosino E, Quinones G, Modrusan Z, Seshagiri S, Torres E, Chopra VS, Haley B, Zhang Z, Blackwood EM, Singh M, Junttila M, Stephan JP, Liu J, Pau G, Fearon ER, Jiang Z and Firestein R. 2014. An integrative analysis of colon cancer identifies an essential function for PRPF6 in tumor growth. *Genes Dev* 28: 1068-1084.
103. Yao YD, Sun TM, Huang SY, Dou S, Lin L, Chen JN, Ruan JB, Mao CQ, Yu FY, Zeng MS, Zang JY, Liu Q, Su FX, Zhang P, Lieberman J, Wang J and Song E. 2012. Targeted delivery of PLK1-siRNA by ScFv suppresses Her2+ breast cancer growth and metastasis. *Sci Transl Med* 4: 130ra148. 20
104. Hu K, Law JH, Fotovati A and Dunn SE. 2012. Small interfering RNA library screen identified polo-like kinase-1 (PLK1) as a potential therapeutic target for breast cancer that uniquely eliminates tumor-initiating cells. *Breast Cancer Res* 14: R22.
105. Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, Lee SJ, Bronson RT, Knipe DM and Lieberman J. 2006. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 439: 89-94.
106. Wu Y, Navarro F, Lal A, Basar E, Pandey RK, Manoharan M, Feng Y, Lee SJ, Lieberman J and Palliser D. 2009. Durable protection from Herpes Simplex Virus-2 transmission following intravaginal application of siRNAs targeting both a viral and host gene. *Cell Host Microbe* 5: 84-94. 30
107. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ and Wicha MS. 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17: 1253-1270.
108. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA and Daidone MG. 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65: 5506-5511. 40
109. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R and Polyak K. 2010. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res* 16: 876-887.

110. Leth-Larsen R, Terp MG, Christensen AG, Elias D, Kuhlwein T, Jensen ON, Petersen OW and Ditzel HJ. 2012. Functional heterogeneity within the CD44 high human breast cancer stem cell-like compartment reveals a gene signature predictive of distant metastasis. *Mol Med* 18: 1109-1121.
111. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F and Paredes J. 2011. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol* 64: 937-946.
112. Polyak K and Weinberg RA. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265-273. 10
113. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, Costea DE and Mackenzie IC. 2011. Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma Switch between Two Distinct Phenotypes That Are Preferentially Migratory or Proliferative. *Cancer Res* 71: 5317-5326.
114. Scheel C, Eaton EN, Li SH-J, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah K-J, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL and Weinberg RA. 2011. Paracrine and Autocrine Signals Induce and Maintain Mesenchymal and Stem Cell States in the Breast. *Cell* 145: 926-940.
115. Visvader JE and Stingl J. 2014. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev* 28: 1143-1158. 20
116. Smalley M, Piggott L and Clarkson R. 2013. Breast cancer stem cells: Obstacles to therapy. *Cancer Lett* 338: 57-62.
117. Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, D'Alessio AC, Young RA and Weinberg RA. 2013. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* 154: 61-74.
118. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, Hong S, Adams A, D'Angelo R, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Clouthier SG, Birnbaum D, Wong ST, Zhan M, Chang JC and Wicha MS. 2014. Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports* 2: 78-91. 30
119. Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, Petrocca F, Martinvalet D, Song E, Lim B and Lieberman J. 2009. miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. *PLoS One* 4:e7181.
120. Korpai M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celia-Terrassa T, Mercatali L, Khan Z, Goodarzi H, Hua Y, Wei Y, Hu G, Garcia BA, Ragoussis J, Amadori D, Harris AL and Kang Y. 2011. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med* 17: 1101-1108. 40
121. Stankic M, Pavlovic S, Chin Y, Brogi E, Padua D, Norton L, Massague J and Benezra R. 2013. TGF-beta-Id1 signaling opposes Twist1 and promotes metastatic colonization via a mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell Rep* 5: 1228-1242.

122. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J and Song E. 2007. let7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell* 131: 1109-1123.
123. Douville J, Beaulieu R and Balicki D. 2009. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem cells and development* 18: 17-25.
124. Seigel GM, Campbell LM, Narayan M and Gonzalez-Fernandez F. 2005. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis* 11: 729-737.
125. Clarke RB. 2005. Isolation and characterization of human mammary stem cells. *Cell Prolif* 38: 375-386. 10
126. Clarke RB, Anderson E, Howell A and Potten CS. 2003. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif* 36 Suppl 1: 45-58.
127. Clarke RB, Spence K, Anderson E, Howell A, Okano H and Potten CS. 2005. A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev Biol* 277: 443-456.
128. Kagara N, Huynh KT, Kuo C, Okano H, Sim MS, Elashoff D, Chong K, Giuliano AE and Hoon DS. 2012. Epigenetic regulation of cancer stem cell genes in triple-negative breast cancer. *Am J Pathol* 181: 257-267. 20
129. Wang XY, Penalva LO, Yuan H, Linnoila RI, Lu J, Okano H and Glazer RI. 2010. Musashi1 regulates breast tumor cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival. *Mol Cancer* 9: 221.
130. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL and Yu JS. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5: 67.
131. Polytarchou C, Iliopoulos D and Struhl K. 2012. An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 14470-14475. 30
132. Pietersen A, Evers B, Prasad A, Tanger E, Cornelissensteijger P, Jonkers J and Vanlohuizen M. 2008. Bmi1 Regulates Stem Cells and Proliferation and Differentiation of Committed Cells in Mammary Epithelium. *Curr Biol* 18: 1094-1099.
133. Hoenerhoff MJ, Chu I, Barkan D, Liu Z-y, Datta S, Dimri GP and Green JE. 2009. BMI1 cooperates with H-RAS to induce an aggressive breast cancer phenotype with brain metastases. *Oncogene* 28: 3022-3032.
134. Ge Q, Dallas A, Ilves H, Shorestein J, Behlke MA and Johnston BH. 2010. Effects of chemical modification on the potency, serum stability, and immunostimulatory properties of short shRNAs. 40
135. Behlke MA. 2008. Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides* 18: 305-319.

136. Collingwood MA, Rose SD, Huang L, Hillier C, Amarzguioui M, Wiiger MT, Soifer HS, Rossi JJ and Behlke MA. 2008. Chemical modification patterns compatible with high potency dicer-substrate small interfering RNAs. *Oligonucleotides* 18: 187-200.
137. Chu TC, Twu KY, Ellington AD and Levy M. 2006. Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res* 34: e73.
138. Santulli-Marotto S, Nair SK, Rusconi C, Sullenger B and Gilboa E. 2003. Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity. *Cancer Res* 63: 7483-7489.
139. Dollins CM, Nair S, Boczkowski D, Lee J, Layzer JM, Gilboa E and Sullenger BA. 2008. Assembling OX40 aptamers on a molecular scaffold to create a receptor-activating aptamer. *Chem Biol* 15: 675-682. 10
140. Kim Y, Cao Z and Tan W. 2008. Molecular assembly for high-performance bivalent nucleic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5664-5669.
141. Tian L and Heyduk T. 2009. Bivalent ligands with long nanometer-scale flexible linkers. *Biochemistry* 48: 264-275.
142. Wullner U, Neef I, Eller A, Kleines M, Tur MK and Barth S. 2008. Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2. *Curr Cancer Drug Targets* 8: 554-565. 20
143. Zhou J, Neff CP, Swiderski P, Li H, Smith DD, Aboellail T, Remling-Mulder L, Akkina R and Rossi JJ. 2013. Functional in vivo delivery of multiplexed anti-HIV-1 siRNAs via a chemically synthesized aptamer with a sticky bridge. *Mol Ther* 21: 192-200.
144. Zhou J, Tiemann K, Chomchan P, Alluin J, Swiderski P, Burnett J, Zhang X, Forman S, Chen R and Rossi J. 2013. Dual functional BAFF receptor aptamers inhibit ligand-induced proliferation and deliver siRNAs to NHL cells. *Nucleic Acids Res* 41: 4266-4283. 30
145. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S and Rossi JJ. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23: 222-226.
146. Shu Y, Haque F, Shu D, Li W, Zhu Z, Kotb M, Lyubchenko Y and Guo P. 2013. Fabrication of 14 different RNA nanoparticles for specific tumor targeting without accumulation in normal organs. *RNA* 19: 767-777.
147. Guo P. 2011. RNA Nanotechnology: methods for synthesis, conjugation, assembly and application of RNA nanoparticles. *Methods* 54: 201-203.
148. Meyer DL, Schultz J, Lin Y, Henry A, Sanderson J, Jackson JM, Goshorn S, Rees AR and Graves SS. 2001. Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis. *Protein Sci* 10: 491-503. 40
149. Stalder L, Heusermann W, Sokol L, Trojer D, Wirz J, Hean J, Fritzsche A, Aeschmann F, Pfanzagl V, Basselet P, Weiler J, Hintersteiner M, Morrissey DV and Meisner-Kober NC. 2013. The

rough endoplasmatic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. *Embo J* 32: 1115-1127.

150. Rehman ZU, Hockstra D and Zuhorn IS. 2013. Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis. *ACS Nano* 7: 3767-3777.

151. Cho YW, Kim JD and Park K. 2003. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *J Pharm Pharmacol* 55: 721-734.

152. Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA and Lieberman J. 2005. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23: 709-717.

153. Wooddell CI, Rozema DB, Hossbach M, John M, Hamilton HL, Chu Q, Hegge JO, Klein JJ, Wakefield DH, Oropeza CE, Deckert J, Roehl I, Jahn-Hofmann K, Hadwiger P, Vornlocher HP, McLachlan A and Lewis DL. 2013. Hepatocyte-targeted RNAi Therapeutics for the Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Mol Ther* 21: 973-985.

154. Wong SC, Klein JJ, Hamilton HL, Chu Q, Frey CL, Trubetskoy VS, Hegge J, Wakefield D, Rozema DB and Lewis DL. 2012. Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo. *Nucleic Acid Ther* 22: 380-390.

155. Shim MS and Kwon YJ. 2011. Dual mode polyspermine with tunable degradability for plasmid DNA and siRNA delivery. *Biomaterials* 32: 4009-4020.

156. Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P and Sharp PA. 2002. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 8: 681-686.

157. Berezhnoy A, Brenneman R, Bajgelman M, Seales D and Gilboa E. 2012. Thermal Stability of siRNA Modulates Aptamer- conjugated siRNA Inhibition. *Mol Ther Nucleic Acids* 1: e51.

158. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M and Stoffel M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438: 685-689.

159. Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G, Pandey RK, Rajeev KG, Nakayama T, Charrise K, Ndungo EM, Zimmermann T, Kotliansky V, Manoharan M and Stoffel M. 2007. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol* 25: 1149-1157.

160. Liu H, Moynihan KD, Zheng Y, Szeto GL, Li AV, Huang B, Van Egeren DS, Park C and Irvine DJ. 2014. Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines. *Nature* 507: 519-522.

161. Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, Tang Q, Greenblatt MB, Hatziapostolou M, Lim E, Tam WL, Ni M, Chen Y, Mai J, Shen H, Hu DZ, Adoro S, Hu B, Song M, Tan C, Landis MD, Ferrari M, Shin

10

20

30

40

SJ, Brown M, Chang JC, Liu XS and Glimcher LH. 2014. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1alpha pathway. *Nature* 508: 103-107.

162. Tallarida RJ. 2010. Combination analysis. *Adv Exp Med Biol* 678: 133-137.

【0301】

実施例6

材料および方法

細胞培養

ヒトBPEおよびBPLER細胞をWIT培地 (Stemgent) 中で成長させた。MB468にルシフェラーゼレポーターを形質導入した。すべての他のヒト細胞株をATCCから入手し、特に表示しない限りすべて10%FBS、1mM L-グルタミンおよびペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco) を補充したMEM (MCF7、BT474)、マッコイ5A (SKBR3)、RPMI1640 (HCC1806、HCC1143、HCC1937、HCC1954、HCC1187、MB468、T47D) またはDMEM (MB231、BT549、MB436) 中で成長させた。4T1マウス乳癌細胞を10%FBS DMEM中で成長させた。インビボイメージングのために、ホタルルシフェラーゼを安定発現しているMB468細胞 (MB468-luc) を使用し、ホタルルシフェラーゼおよびmCherryを安定発現しているMB231細胞 (MB231-luc-mCherry) は、pLV-Fluc-mCherry-Puroレンチウイルスに感染させた後に選択した。ピューロマイシンを用いてMB231細胞を選択した。

【0302】

取り込みおよびサイレンシング処理のために、細胞を低密度 (96ウェルプレート中に細胞10,000個/ウェル) で播種し、直ちに処理した。すべてのAsiC処理およびsiRNA処理をOptiMEM培地またはWIT培地のいずれかの中で行った。細胞生存率を96ウェルプレート中でCellTiter-Glo (Promega) またはトリパンブルー染色によって評価した。

【0303】

コロニー形成アッセイのために、生存細胞1,000個を丸底96ウェルプレート中で6時間処理し、次に10cmプレートの血清含有培地中に移した。培地を3日毎に交換した。8~14日後に、細胞をメタノール (-20C) 中で固定し、クリスタルバイオレットで染色した。スフィア形成アッセイのために、1,000個/mlの生存細胞を丸底96ウェルプレート中で6時間処理し、次に、EGF (20ng/ml、BD Biosciences)、B27 (1:50、Invitrogen)、0.4%ウシ血清アルブミン (Sigma) および4μg/ml インスリン (Sigma) を補充した無血清DMEM/F12 1:1 (Invitrogen) 中で懸濁培養した。スフィアを1または2週間後に計数した。

【0304】

siRNAのトランスフェクション。製造業者のプロトコールにより細胞をDharmafect Iでトランスフェクトした。すべてのsiRNA配列については本明細書下記を参照されたい。

【0305】

フローサイトメトリー。フローサイトメトリーのために、以前に記載されたように細胞を染色し (Yu, F. et al (2007). let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell* 131, 1109-1123.)、簡潔には、hAbの1:50希釈を使用し、4°Cで30~60分間EpCAMおよびAKT1の直接免疫染色を行った (BioLegend/BD)。0.5%FCS、1mM EDTA、および25mM HEPESを含有するPBS中で細胞を染色した。サンプルを同じ緩衝液中で2回洗浄した。FACS-Canto II (BD Biosciences) を使用してデータを取得した。分析を3つ組で行い、サンプル1つあたりゲート通過事象10,000を計数した。FlowJo (Tree star Inc.) を使用してすべてのデータ解析を行った。

【0306】

RNA分析。記載されたようにqRT-PCR分析を行った (Petrocca, F., et al. (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell- cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 13, 272-286)。簡潔には、総RNAをTrizol (Invitrogen) で抽出し、製造業者のSYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) およびBioRad C1000 Thermal Cycler (Biorad) によりThermoscript RTキット (Invitrogen) を使用して総RNA 1000ngからcDNAを調製した。相対CT値をGAPDHに対して標準化し、均等目盛に変

換した。

【0307】

ヒト乳房組織のコラゲナーゼ消化。新鮮乳癌または結腸癌および対照生検をUMASS Tissue Bankから受け取り、サンプルを3×3×3mmサンプルに切断し、RPMI 100ulを有する96ウェルプレート中に入れた。サンプルをAlexa647-siRNA-GFP、Alexa647-chol-siRNA-GFPまたはCy3-AsiC-GFPのいずれかで24時間処置した。サンプルを写真撮影し、消化した。各処置からのサンプル3つをプールし、1mg/mlコラゲナーゼII (Sigma-Aldrich) を含有するRPMI 10ml中に振盪しながら37℃で30分間入れた。コラゲナーゼ消化の前後にgentleMACS分散装置 (Miltenyi) 中で脾臓プログラムを使用してサンプルを37℃で30分間破壊した。細胞懸濁液に70 μm細胞ストレーナー (BD Falcon) を通過させ、RPMI 30mlで洗浄し、フローサイトメトリー用に染色した。

10

【0308】

動物実験。すべての動物手順は、Harvard Medical SchoolおよびBoston Children's Hospitalの実験動物委員会の承認を得て行った。Jackson Laboratoryからヌードマウスを購入した。

【0309】

インビボ実験。発がんイニシエーション研究のために、8週齢雌性Nu/Jマウス (Stock # 002019, Jackson Laboratories) に、EpCAM-AsiC-GFP、EpCAM-AsiC-PLK1を用いた24時間の前処置を行った、または未処置の、MB468-luc細胞 (5×10^6 個) を皮下注射した。細胞をTryple Express (Invitrogen) でトリプシン処理し、WIT培地中に再懸濁し、側腹部に皮下注射した。150mg/kg D-ルシフェリン (Caliper Life Sciences) の腹腔内注射後に、IVIS Spectraシステム (Caliper Life Sciences) を使用して全身の発光画像を5日毎に合計20日間取得した。

20

【0310】

AsiC取り込み実験のために、Tryple Express (Invitrogen) でトリプシン処理したMB468-luc (5×10^6 個) およびMB231-luc-mCherry (5×10^5 個) 細胞を1:1 WIT-マトリゲル溶液中に再懸濁し、8週齢雌性Nu/Jマウス (Stock # 002019, Jackson Laboratories) の側腹部に皮下注射した。IVIS Spectraシステム (Caliper Life Sciences) を使用して腫瘍のサイズを毎日分析した。5日後、腫瘍は、はっきりと視認可能であり、マウスの頸部領域にAlexa750-EpCAM-AsiC-GFP (0.5mg/kg) を皮下注射した。腫瘍と比較したAsiCの局在を48時間毎に7日間試験した。

30

【0311】

腫瘍阻害研究のために、Tryple Express (Invitrogen) でトリプシン処理したMB468-luc (5×10^6 個) およびMB231-luc-mCherry (5×10^5 個) 細胞を1:1 WIT-マトリゲル溶液中に再懸濁し、8週齢雌性Nu/Jマウス (Stock # 002019, Jackson Laboratories) の側腹部に皮下注射した。IVIS Spectraを使用して腫瘍サイズを毎日分析し、腫瘍は、5日後にははっきりと視認可能であった。匹敵するサイズの腫瘍を担持するマウスを無作為化して5群にし、5mg/kg EpCAM-AsiC-PLK1、EpCAM-AsiC-GFP、EpCAM-アプタマー、siRNA-PLK1で処置するか、または未処置とした。マウスを72時間毎に14日間処置した。

40

【0312】

Living Image (登録商標) ソフトウェア (Caliper Life Sciences) を使用してすべての画像を解析した。

【0313】

統計解析。Microsoft Excelを使用して計算したスチューデントのt検定を使用して、処置サンプルと対照との間の有意性を解析した。その際、検定の種類を片側分布および二標本等分散に設定した。

【0314】

結果：

EpCAM-AsiCは基底A型乳癌細胞を特異的に標的とする

試験管内進化法 (SELEX) によってヒトEpCAMとの結合についてEpCAMアプタマーを選択

50

した。最適化したアプタマーは、わずか19ヌクレオチド (nt) 長であり、ヒトEpCAMと12nMの親和性で結合する (Shigdar S. et. al. RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule affinity Cancer Sci. 2011 May;102(5) :991-8)。それはマウスEpCAMとは結合しない (図22)。長さが約60nt以下のRNAは安価に効率的に化学合成できるので、その短い長さは、AsiC薬にとって理想的である。本発明者らが設計したEpCAM-AsiCは、42~44ntのより長い鎖 (19ntのアプタマー+3ntのリンカー+20~22ntのsiRNAのセンス (不活性) 鎖) が20~22ntのアンチセンス (活性) siRNA鎖にアニリングしたものからなる (図21A)。両方の鎖は、血清および他の体液中での増強した安定性 ($T_{1/2} \gg 3$ 日) を付与し、かつ自然免疫RNAセンサーの刺激を防止する2'-フルオロピリミジン置換を有するように工業的に合成される。本発明者らは、まず、フローサイトメトリーによってヒト乳房細胞株のパネルにおけるEpCAMの細胞表面レベルを評価した (表2、図23)。EpCAMは、基底B型癌細胞株ではなく、試験されたすべての基底A型および管腔型癌細胞株によって高発現された。正常ヒト上皮細胞 (BPE) のEpCAM染色は、バックグラウンドに近く、一方でその形質転換派生株BPLERは、明るいEpCAM染色を有した (図21B)。試験した一握りの設計のいくつか (センス鎖およびアンチセンス鎖が交換されたもの、ならびに数種類のリンカー) は、EpCAM-ではなく、EpCAM+ 細胞株における遺伝子発現をノックダウンしたが、用量反応実験において最もうまく機能した設計を図21Aに示す。EpCAM-AsiCがEpCAM+ 細胞株によって特異的に取り込まれるかどうかを試験するために、本発明者らは、AsiCのアンチセンス鎖の3'末端をAlexa647で標識した。BPLER基底A型TNBC細胞株はEpCAMを過剰発現し、一方で対照上皮乳房細胞株BPEは過剰発現しない (図21B)。BPLER細胞およびBPE細胞の両方を、GFPを標的とするAlexa647-EpCAM-AsiCで処理し、BPLERだけがAsiCの取り込みを示した (図21C)。本発明者らは、さらに、EpCAM+ MDA-MB-468細胞およびBPE対照をCy3標識EpCAM-アプタマー (19ntのアプタマーの5'末端をCy3で標識した) で処理することによってEpCAM-AsiCの選択的取り込みを検証した。22および43時間後に、本発明者らは、EpCAM+細胞における選択的なAsiC取り込みをはっきりと認識した (データは示さず)。EpCAM AsiCが遺伝子ノックダウンを選択的にトリガーする能力を理解するために、本発明者らは、GFPを安定的に過剰発現するBPLER細胞株およびBPE細胞株を選んだ。細胞をGFPを標的とするEpCAM-AsiCで処理するか、または陽性対照としてのGFP-siRNAでトランスフェクトした (図21D)。GFP-siRNAを用いたトランスフェクションはBPEおよびBPLERにおいて遺伝子発現を等しくノックダウンしたものの、EpCAM-AsiCはいかなる脂質もなしにBPLERでの発現を選択的にノックダウンし；ノックダウンは均質であり、脂質トランスフェクションで達成されたノックダウンに匹敵した。

【0315】

これらの結果は、EpCAM-AsiCがEpCAM+ 細胞によって選択的に取り込まれ、これらのEpCAM+ 細胞に特異的に遺伝子ノックダウンを誘導できることをはっきりと示している。また、本発明者らは、異なる位置 (アプタマーの5'またはアンチセンス鎖の3') で異なる蛍光団 (Alexa647またはCy3) を使用することが特異的な取り込みに影響しなかったことを示す。

【0316】

8種類の異なる乳癌細胞株を用いてmRNAおよびタンパク質の特異的なノックダウンをさらに分析した。ここで、本発明者らは、EpCAMを過剰発現する基底A型および管腔型細胞株が、AKT1を標的とするEpCAM-AsiCを用いた処理の後に、AKT1のmRNAおよびタンパク質レベルの減少を示したことを示す。AKT1-siRNAを用いたトランスフェクションは、すべての細胞株に類似的なノックダウン効果を有し、一方で、対照としてのGFPを標的とするEpCAM-AsiCの使用は、いかなる細胞株にも影響しなかった (図24A、24B)。mRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方で、EpCAMの発現レベルとノックダウン効果との間に明らかな相関があった (図24D、24E)。

【0317】

ヒト上皮性乳癌組織が、健康なヒト組織と比較してEpCAM-AsiCを特異的に取り込むことができるか判定するために、本発明者らは、同じ患者からのヒト上皮性乳癌生検および健

康な対照組織を試験した。サンプルをAlexa647-siRNA-GFP、Alexa647-chol-siRNA-GFPまたはCy3-EpCAM-AsiC-GFPで24時間処置した（図25A）。ヒト腫瘍サンプルは、より高いEpCAMレベルおよび上皮細胞マーカーであるより高いサイトケラチンレベルを示す（図25B）。標識siRNAおよびchol-siRNAは、類似の効力で腫瘍および健康組織の両方に浸透し、一方でEpCAM-AsiCは、健康な対象組織サンプルではなく、腫瘍組織によって選択的に取り込まれた（図25C、25D）。3人の異なる患者からの腫瘍で取り込み実験を繰り返し、受け取った各生検を各処置について3回試験した。患者3人すべての要約（図25E）。結腸癌生検を試験し、マッチする健康サンプルと比較した。健康結腸サンプルおよび腫瘍結腸サンプルの両方は、Cy3-EpCAM-AsiC-GFPを取り込むことができた（図26）。

【0318】

PLK1を標的とするEpCAM AsiCは、基底A型乳癌細胞における細胞増殖を特異的に阻害する

EpCAM-AsiCが基底A型および管腔型乳癌細胞を特異的に標的とし、増殖を阻害することができるかどうかを理解するために、本発明者らは、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCを設計した。PLK1は、G2/M移行をトリガーすることが公知である。基底A型、B型および管腔型細胞株を代表する10種類の乳癌細胞を用いて、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCが細胞増殖に及ぼす効果を試験した。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底A型および管腔型細胞株の両方での細胞増殖を減少させ、一方で基底B型細胞に効果を有さなかった（図27A）。EpCAM発現レベルと細胞生存率との間に相関関係が見られた（図27B）。EpCAM-AsiCが混合細胞集団におけるEpCAM+細胞を特異的に標的とするかを理解するために、HCC1937（EpCAM+GFP-）細胞をBPE（EpCAM-GFP+）細胞と共に共培養し、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCで処理するかまたは未処理とした。未処理の共培養物は、類似の比の細胞（41%BPEおよび59%HCC1937）を示した。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCによる処理後に、EpCAM+細胞の比は17%に減少し、EpCAM-細胞は83%に増加し、これは、EpCAM-AsiCがEpCAM+細胞における増殖を特異的に抑制することを示している。他の基底A型細胞株（MB468およびHCC1143）で共培養を繰り返し、類似の結果が得られた。BPE細胞を基底B型細胞（MB231）との共培養で成長させたとき、BPE細胞とMB231細胞との比は、EpCAM-AsiC処理にかかわらず同じままであった（未処理共培養物において66%BPEおよび33%MB231、ならびにEpCAM-AsiC処理後に61%BPEおよび38%MB231）（図27C、27D）。

【0319】

PLK1を標的とするEpCAM-AsiCが基底A型細胞での細胞生存率に及ぼす抑制効果が、EpCAM受容体へのEpCAMアプタマーの結合またはPLK1のサイレンシングによってトリガーされるかを判定するために、本発明者らは、細胞をEpCAMアプタマーで処理し、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCと比較した。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底A型および管腔型細胞株での細胞生存率を抑制し、一方でEpCAM-アプタマーは、いかなる細胞株においても細胞生存率に影響しなかった（図28）。

【0320】

本発明者らの目標の1つは、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCが腫瘍内のT-ICを標的とするために利用することができるかを理解することであった。基底A型および管腔型細胞内の大部分の細胞に対してだけでなく、それらの中のT-ICにも活性であり得るかどうかを調査するために、本発明者らは、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCで基底A型、B型および管腔型細胞株を24時間処理し、インビトロコロニーおよびスフィア形成に及ぼす効果を試験した。コロニーを形成する基底A型および管腔型細胞株（HCC1937、HCC1954、HCC1806およびMCF7）は、クローン密度で播種したとき、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCの処理後にコロニーを形成する能力を失い、一方で、パクリタキセル処理後には耐性クローンが出現した（図29A~29B）。対照的に、PLK1を標的とするEpCAM-AsiCへの曝露は、基底B型（MB231およびBT549）細胞のコロニー形成に影響せず、一方でパクリタキセルは基底A型および管腔型細胞に類似の効果を有し、コロニー形成を減少させたが、それでも耐性クローンが常に出現した。同様に、非接着状態でスフィアを形成する乳癌細胞株の間で、パクリタキセルはすべてでスフィア形成を減少させ（図29C）、一方でPLK1を標的とするEpCAM-AsiCは、基底A型および管腔型でのスフィア形成を特異的に阻害した。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCを用い

た前処理がインビボで発がんイニシエーションを阻害または遅延するかどうかを調査するために、本発明者らは、PLK1もしくはGFPを標的とするEpCAM-AsiCでMB-468-luc細胞を24時間処理するかまたは未処理とし、細胞をヌードマウスの側腹部に注射した。IVIS Spectraイメージングシステムを使用して、本発明者らは、腫瘍の成長を5日毎に20日間追跡した。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCで前処理した細胞は、20日後にいかなる腫瘍の徴候も示さず、一方で未処理の細胞またはGFPを標的とするEpCAM-AsiCで前処理した細胞は、5日後に腫瘍を示し、腫瘍のサイズは20日間成長した（図29D）。

【0321】

PLK1を標的とするEpCAM AsiCは基底A型乳癌細胞での発がんイニシエーションおよび成長を特異的に阻害する

10

本発明者らは、EpCAM-AsiCがインビトロでEpCAM+ 細胞を特異的に標的とできることを示すことができた。この能力がインビボで保持されるかどうかを理解するために、本発明者らは、まず、マウスおよびヒト血清中でのEpCAM-AsiCの経時的安定性を試験した。本発明者らは、EpCAM-AsiCがマウスおよびヒト血清の両方で少なくとも36時間安定であることが分かった（図30A～30B）。本発明者らは、ヌードマウスの相反する側腹部にMB468-luc細胞およびMB231-luc-mCherry細胞の両方を注射した。5日後、IVIS Spectraイメージングシステムを使用して腫瘍がはっきりと視認可能になった時に、本発明者らは、マウスに0.5mg/kgのGFP標的指向化Alexa750標識EpCAM-AsiCを皮下（s.c.）注射した（頸部領域に、腫瘍細胞の注射部位から可能な限り遠く）。注射直後にマウスをイメージングし、24、48時間および5日後にもイメージングしてAsiCの局在を追跡した。GFPを標的とするAlexa750 20 標識EpCAM-AsiCは、MB231-luc-mCherry（EpCAM-）腫瘍ではなくMB468-luc腫瘍（EpCAM+）にはっきりと局在した（図31A）。マウス7匹の分析は、MB468（EpCAM+）腫瘍におけるAlexa750の有意な増加を示している（図31B）。5日目に腫瘍を取り出し、視覚化してGFPを標的とするAlexa750標識EpCAM-AsiCが実際に腫瘍に進入したことを検証した。増加したレベルのAlexa750は、mCherryレベルと負の相関関係にあった（データは示さず）。

【0322】

本発明者らの細胞生存率および発がんイニシエーションのデータは、PLK1を標的とするEpCAM AsiCが基底A型乳癌細胞における腫瘍の成長を特異的に阻害することを示している。この仮説を検定するために、本発明者らは、ヌードマウスにEpCAM-基底B型細胞（MB231-luc-mCherry細胞）またはEpCAM+基底A型細胞（MB468-luc細胞）のいずれかを注射した。腫瘍がIVISイメージングシステムによってはっきりと視認可能になった後、マウスを、PLK1もしくはGFPのいずれかを標的とする5mg/KgのEpCAM AsiCで72時間毎に14日間処置するかまたは未処置のままとした。IVIS Spectraイメージングシステムを使用してマウスを72時間毎に14日間イメージングした。PLK1を標的とするEpCAM-AsiCで処置したMB468-luc腫瘍は、早くも処置の6日後にサイズが萎縮し、多くのマウスでは14日後に完全に消失したが、一方でMB231-luc-mCherry腫瘍は不変のままであった。GFP AsiCで処置した基底A型腫瘍が未処置対照マウスほどにはサイズを増加させなかったもので、本発明者らは、EpCAM-AsiCがGFPを標的としていたにもかかわらず、実際に幾分効果を有したと考える。GFPを標的とするEpCAM-AsiCを用いた処置はEpCAM+腫瘍およびEpCAM-腫瘍の両方で腫瘍の成長を抑制するが、腫瘍を消失させることはなかった。EpCAM+およびEpCAM-の未処置腫瘍は、両方とも14日にわたりサイズを増加させた（図32A～32B）。

30

40

【0323】

（表1）EpCAM-AsiCの配列

AsiC 構築物	配列	SEQ ID NO
EpCAM PLK1 センス	GCG ACU GGU UAC CCG GUC GUU UUG AAG AAG AUC ACC CUC CUU AdTdT	1
EpCAM PLK1 アンチセンス	UAA GGA GGG UGA UCU UCU UCA dTdT	2
EpCAM AKT1 センス	GCG ACU GGU UAC CCG GUC GUU GCU GGA GAA CCU CAU GCU GdTdT	23
EpCAM AKT1 アンチセンス	CAG CAU GAG GUU CUC CAG CdTdT	24
EpCAM GFP センス	GCG ACU GGU UAC CCG GUC GUU UGG CUA CGU CCA GGA GCG CAdTdT	25
EpCAM GFP アンチセンス	UGC GCU CCU GGA CGU AGC CdTdT	26
siGFP センス	UGG CUA CGU CCA GGA GCG	27
siGFP アンチセンス	UGC GCU CCU GGA CGU AGC	28
siAKT1 センス	GCU GGA GAA CCU CAU GCU G	29
siAKT1 アンチセンス	CAG CAU GAG GUU CUC CAG C	30
siPLK1 センス	UGA AGA AGA UCA CCC UCC UUA	31
siPLK1 アンチセンス	UAA GGA GGG UGA UCU UCU UCA	32

10

20

30

【 0 3 2 4 】

(表 2) ヒト乳房細胞株のEpCAMの平均蛍光強度 (MFI)

細胞株	サブタイプ	EpCAM MFI	
BPE	不死化正常上皮	2	
BPLER	基底A型TNBC	109	
HMLER	分類不能 TNBC (筋上皮)	72	
HCC1143	基底A型TNBC	1068	
HCC1937	基底A型TNBC	806	10
HCC1187	基底A型TNBC	289	
HCC1806	基底A型TNBC	558	
HCC70	基底A型TNBC	443	
MB468	基底A型TNBC	340	
MCF7	管腔型	583	
T47D	管腔型	799	20
BT549	基底B型TNBC	2	
MB231	基底B型TNBC	31	
MB436	基底B型TNBC	4	
ヒト線維芽細胞 【0325】	正常組織	14	

実施例7

トリプルネガティブ乳癌は、あらゆる乳癌サブタイプの最悪の予後を有し、標的指向化されたTNBC治療はない。TNBCは、癌幹細胞としても公知の癌源細胞（T-IC）に関連する表現型を有する。T-ICは、化学療法に耐性であり、腫瘍の再発および転移を担うと考えられる。

【0326】

EpCAMは、正常上皮細胞のギャップ結合に低レベル発現されるが、事実上すべての上皮癌の膜全体に極めてより高度に発現され（100～1000倍高い）、そして公知のTI-Cマーカーである。

【0327】

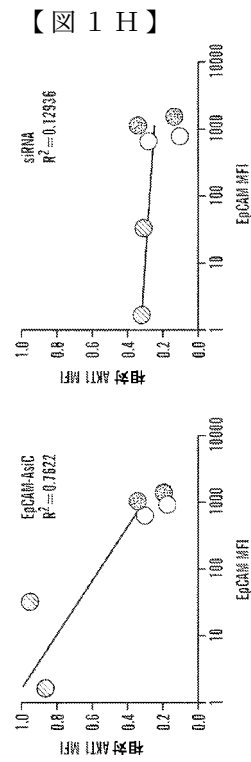
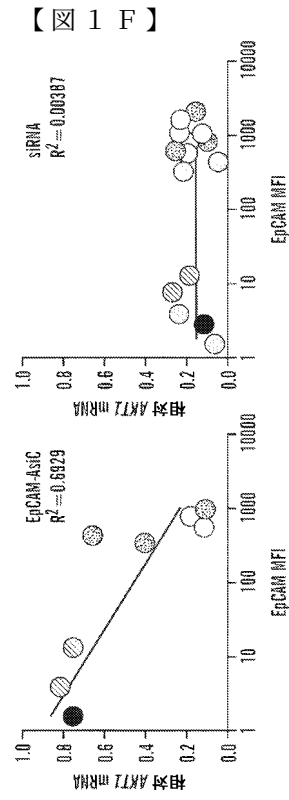
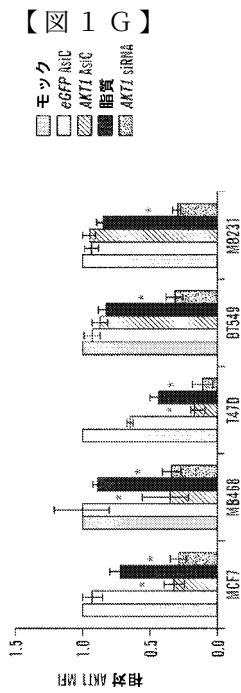
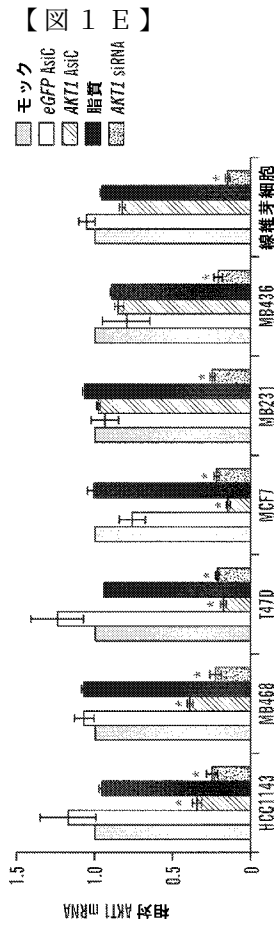
基底細胞様TNBCのための遺伝子ノックダウン治療法のための戦略が、本明細書に記載されている。本明細書に記載されるように、アプタマー-siRNAキメラ（AsiC）プラットフォームは、上皮性乳癌細胞をトランスフェクトする一方で乳房癌源細胞（T-IC）も標的とするよう適応されている。アプタマーは、癌細胞および癌幹細胞に高発現されるEpCAMに結合する。概念立証として、siRNAは、すべての細胞での有糸分裂に必要なキナーゼ（PLK1）に向けられる。

【0328】

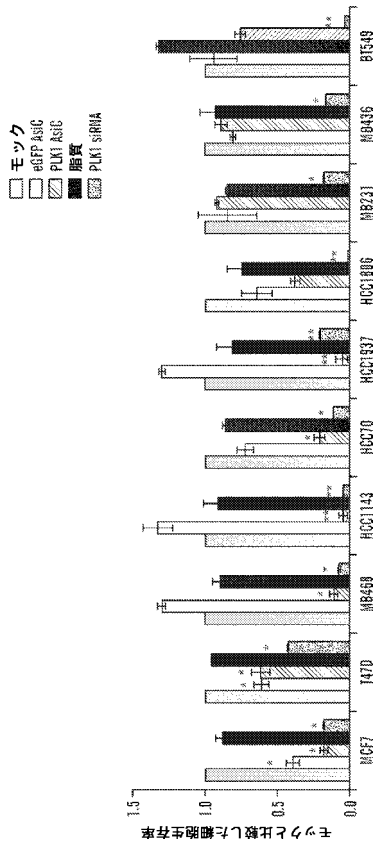
本明細書において実証されるように、EpCAM-AsiCはヒトおよびマウスにおいて安定である。EpCAM AsiCは、2'-Fピリミジンおよび3'末端にdTdTを有するように化学合成することができ、dTdTは、それらをRNアーゼ耐性にし、自然免疫を刺激する可能性を減らす。

【0329】

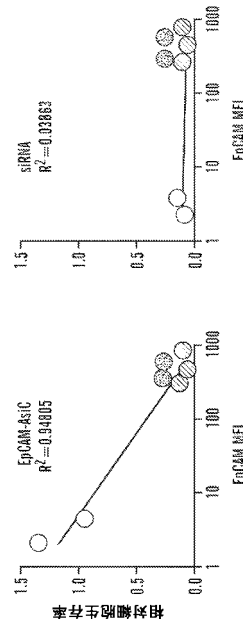
細胞を4mM EpCAM-AsiCで5日間処理し、AKT1-AsiCによるAKT1タンパク質の特異的サイレ



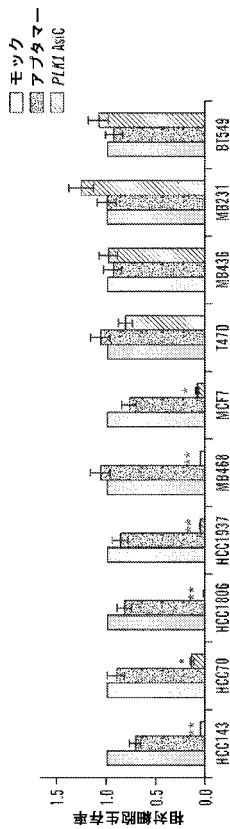
【図 2 A】



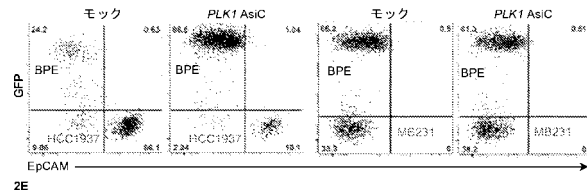
【図 2 B】



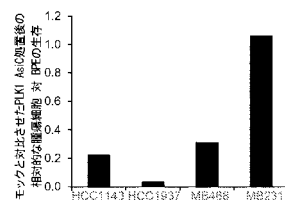
【図 2 C】



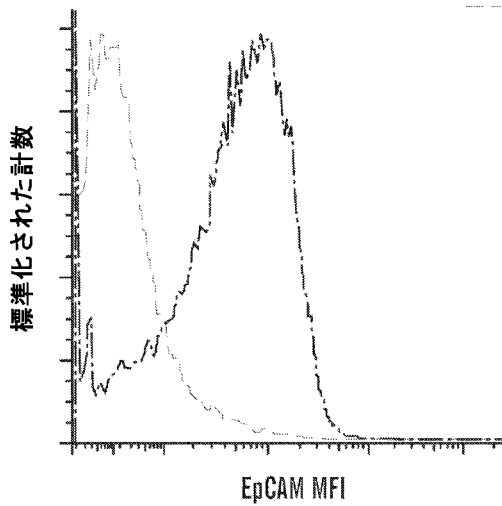
【図 2 D】



【図 2 E】



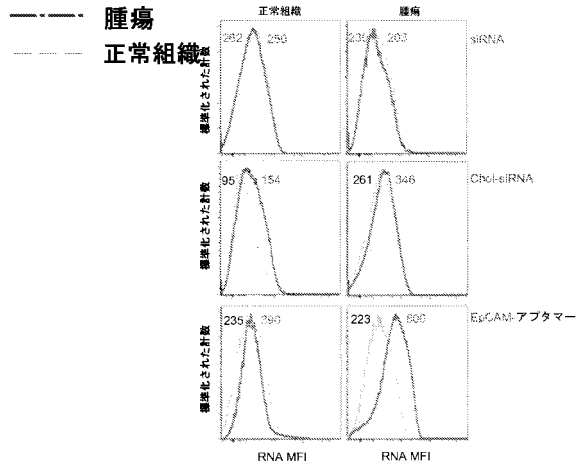
【図 3 A】



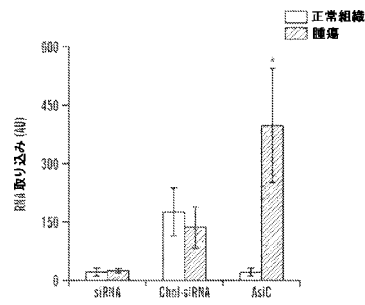
【図 3 B】



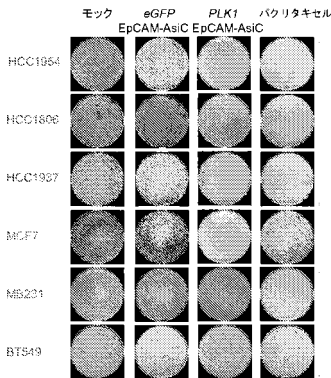
【図 3 C】



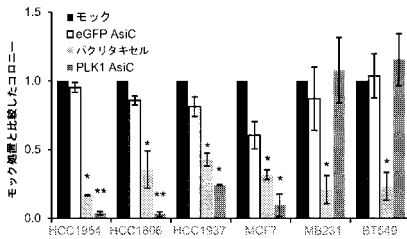
【図 3 D】



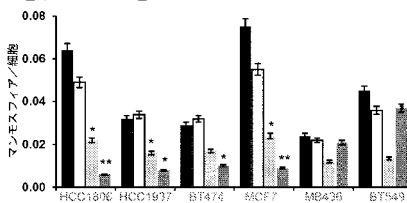
【図 4 A】



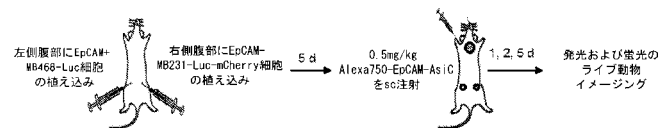
【図 4 B】



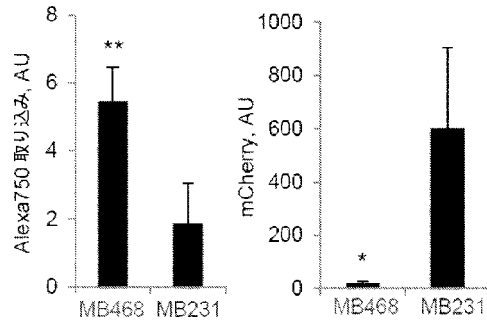
【図 4 C】



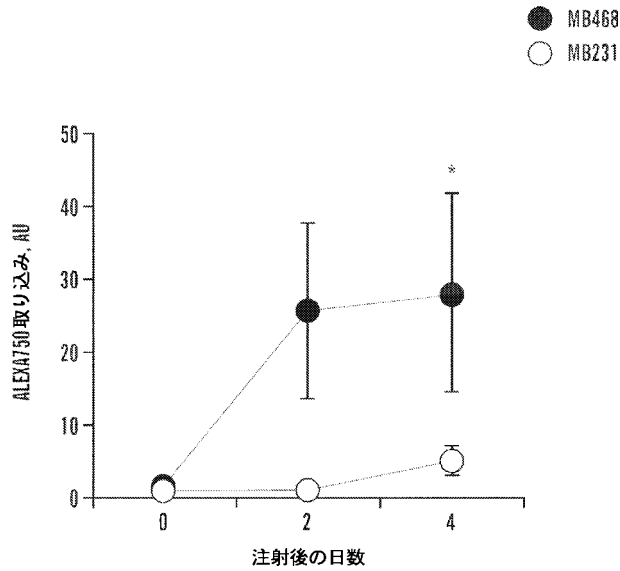
【図 5 A】



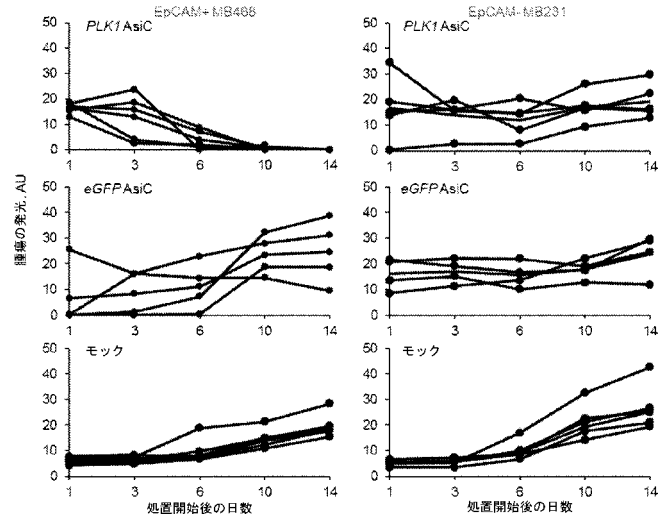
【図 5 B】



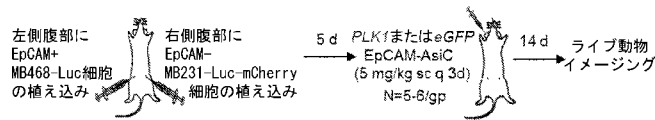
【図 5 C】



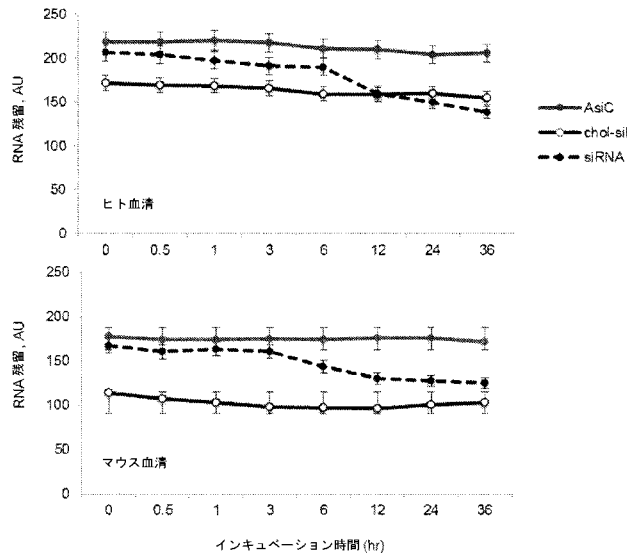
【図 6 B】



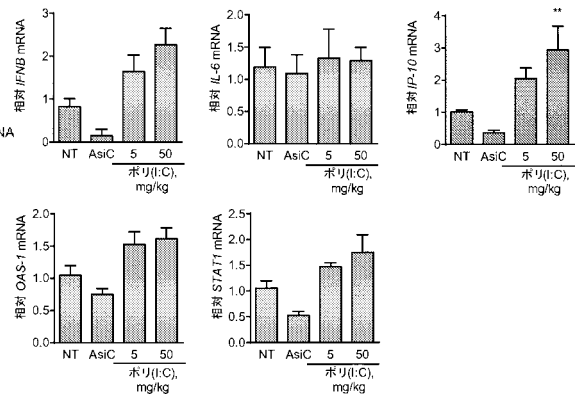
【図 6 A】



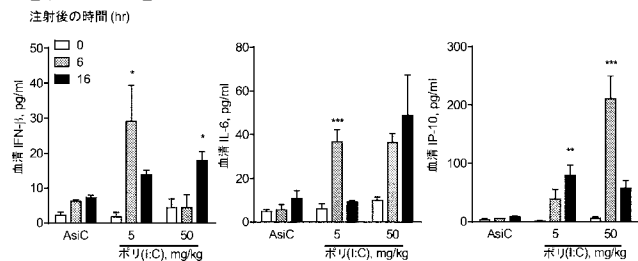
【図 7】



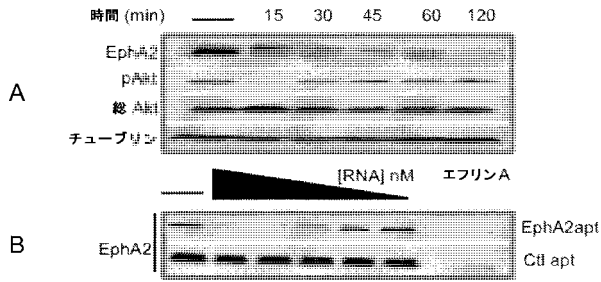
【図 8 B】



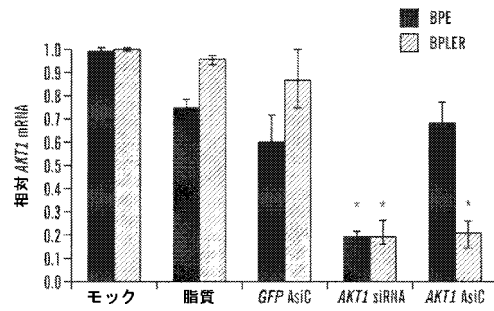
【図 8 A】



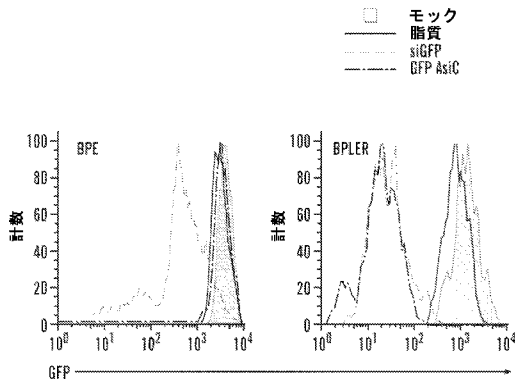
【図 1 2】



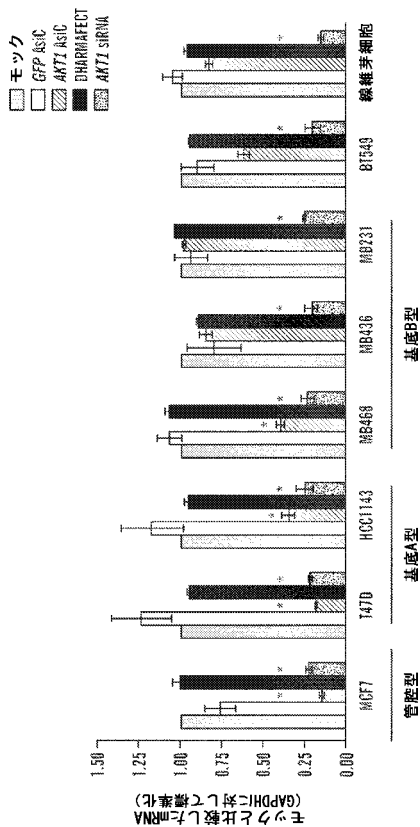
【図 1 3 B】



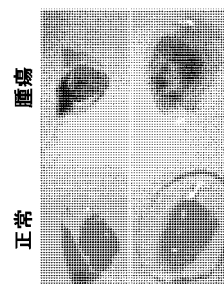
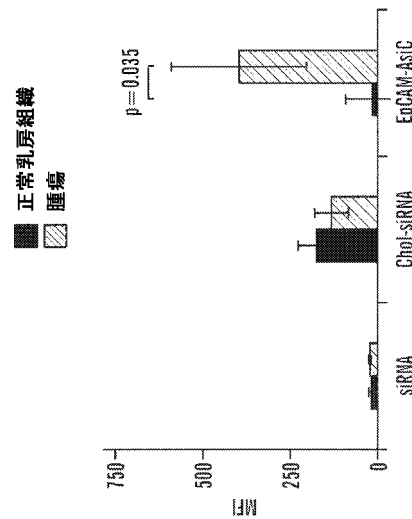
【図 1 3 A】



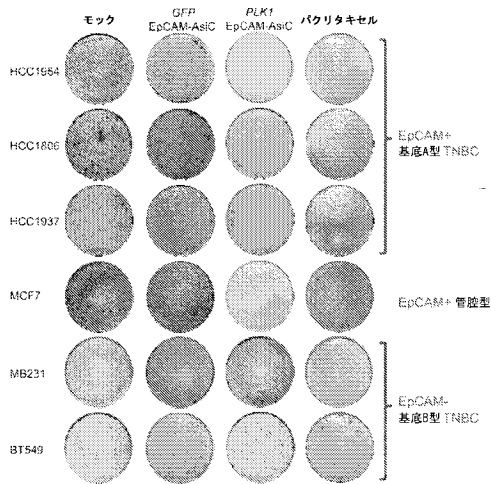
【図 1 3 C】



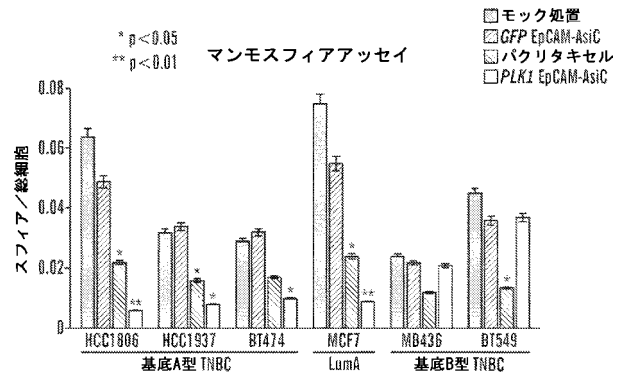
【図 1 4】



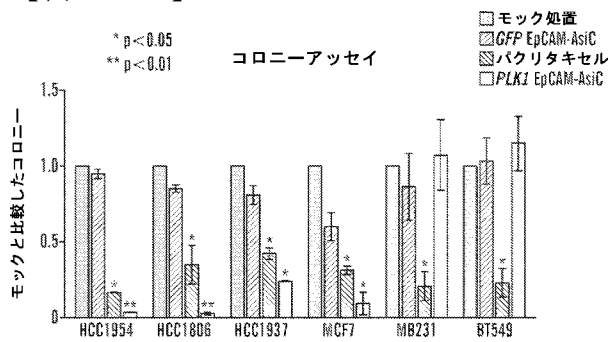
【図 15 A】



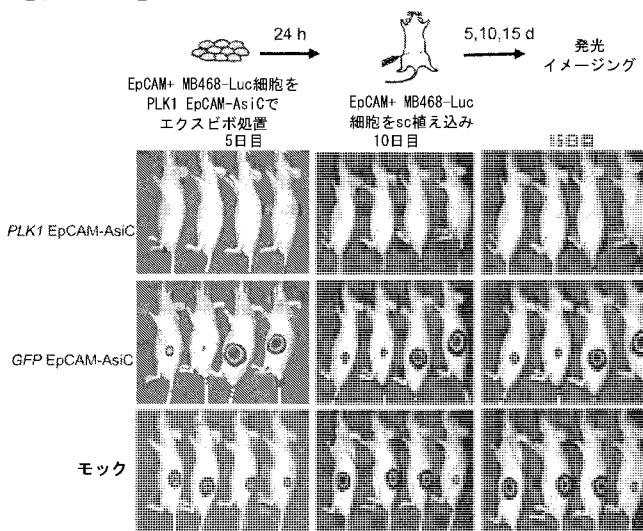
【図 15 C】



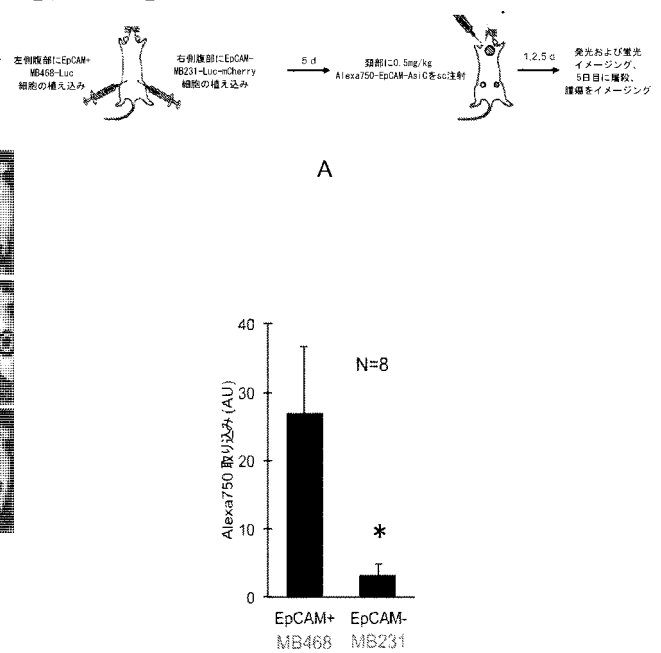
【図 15 B】



【図 16】

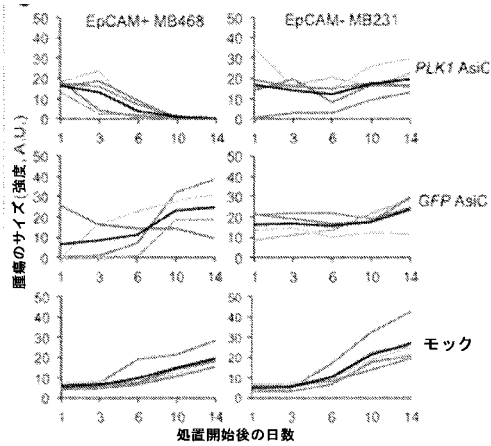
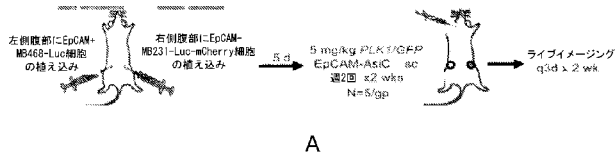


【図 17】



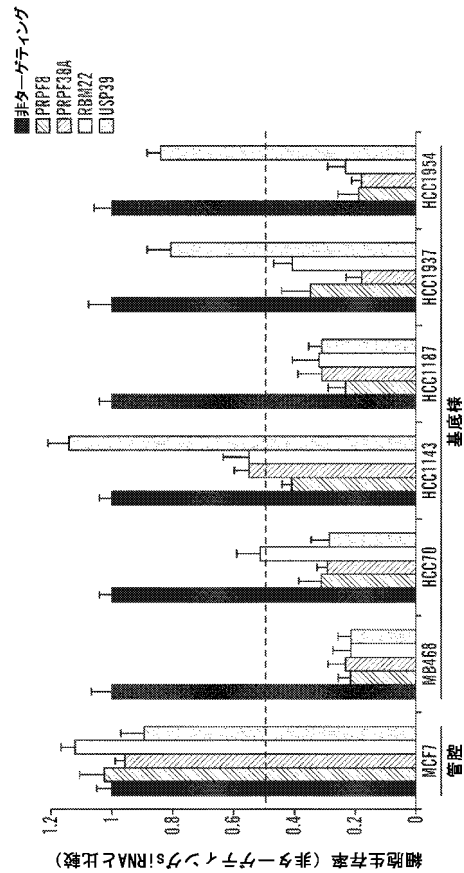
B

【図 18】

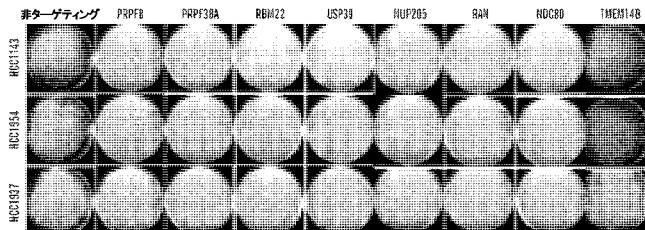


B

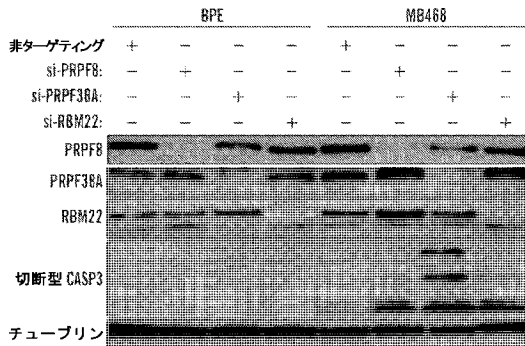
【図 19 A】



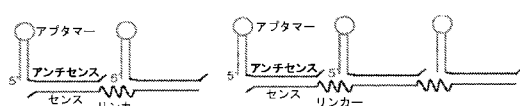
【図 19 B】



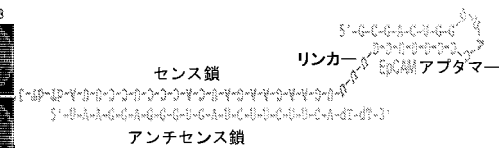
【図 19 C】



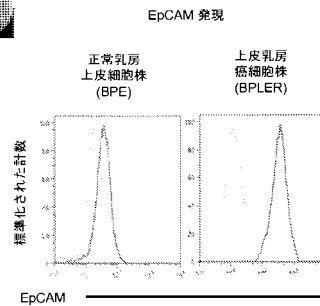
【図 20】



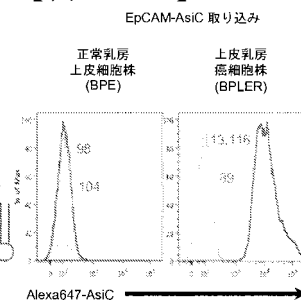
【図 21 A】



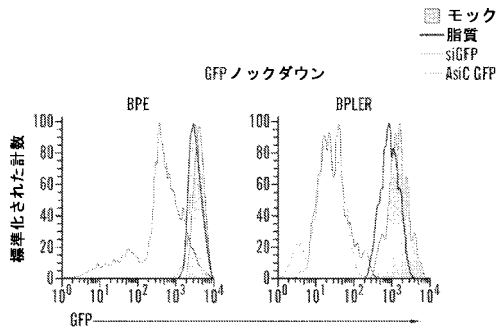
【図 21 B】



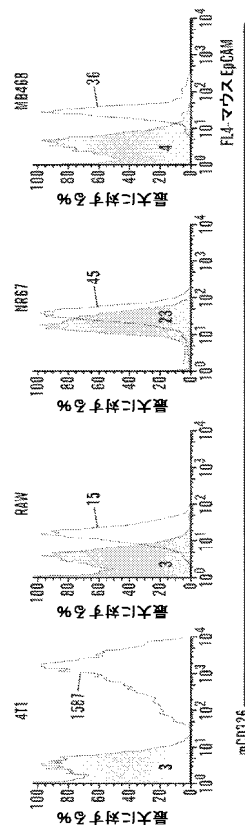
【図 21 C】



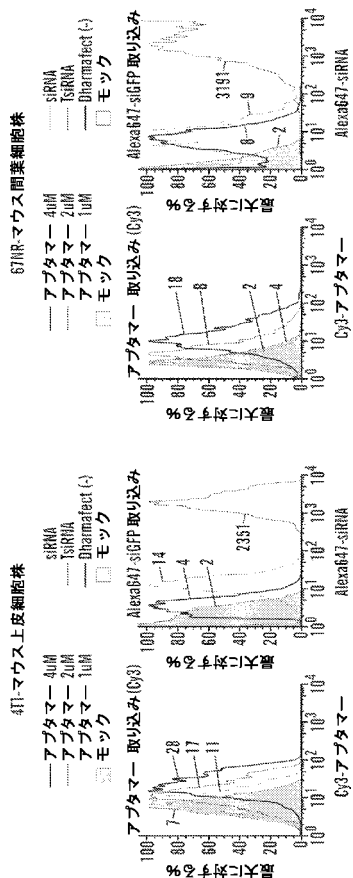
【図 2 1 D】



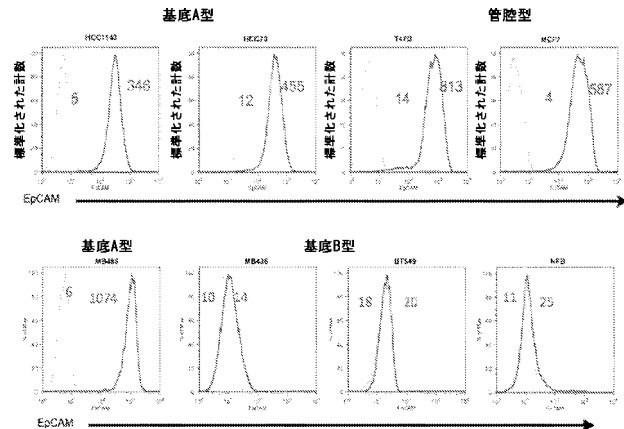
【図 2 2 - 1】



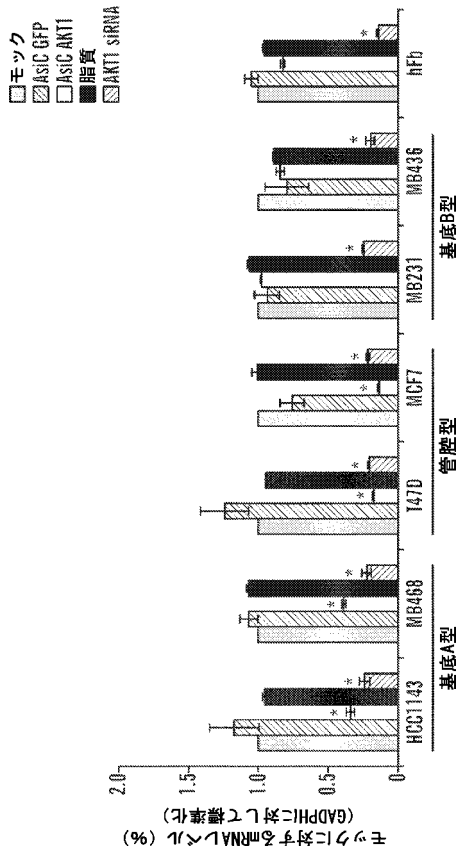
【図 2 2 - 2】



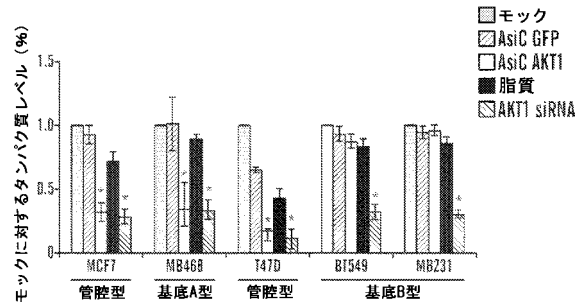
【図 2 3】



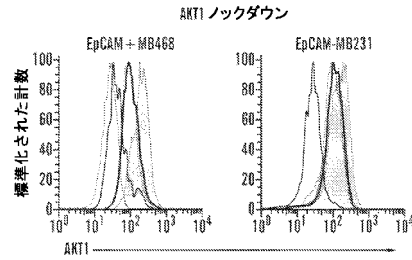
【図 2 4 A】



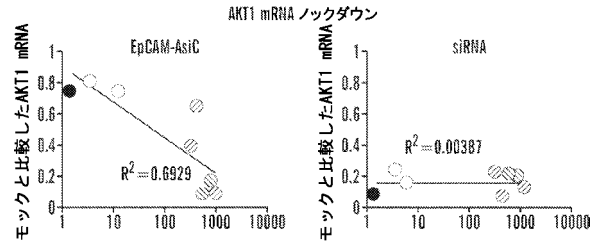
【図 2 4 B】



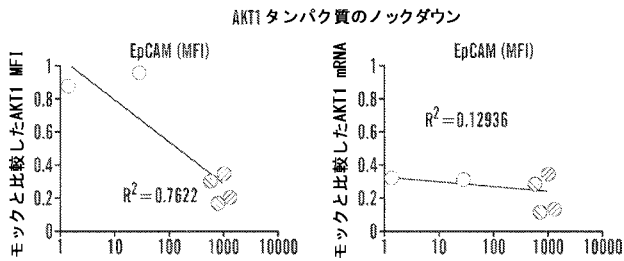
【図 2 4 C】



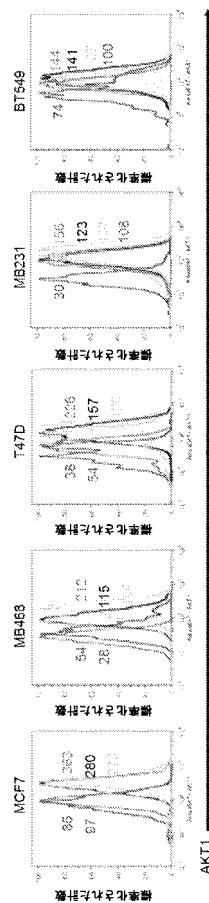
【図 2 4 D】



【図 2 4 E】



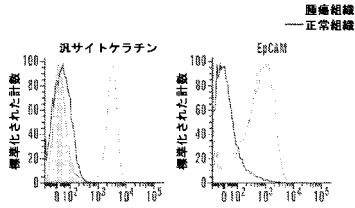
【図 2 4 F】



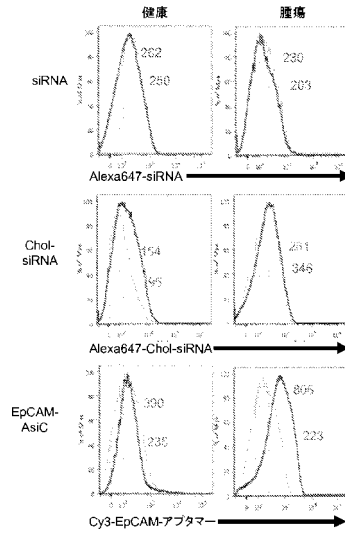
【図 25 A】



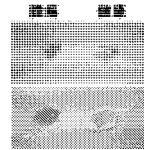
【図 25 B】



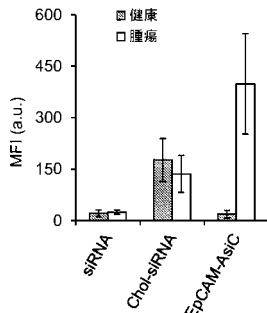
【図 25 C】



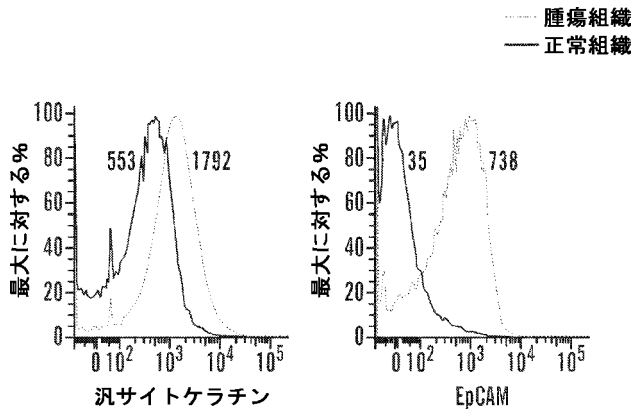
【図 25 D】



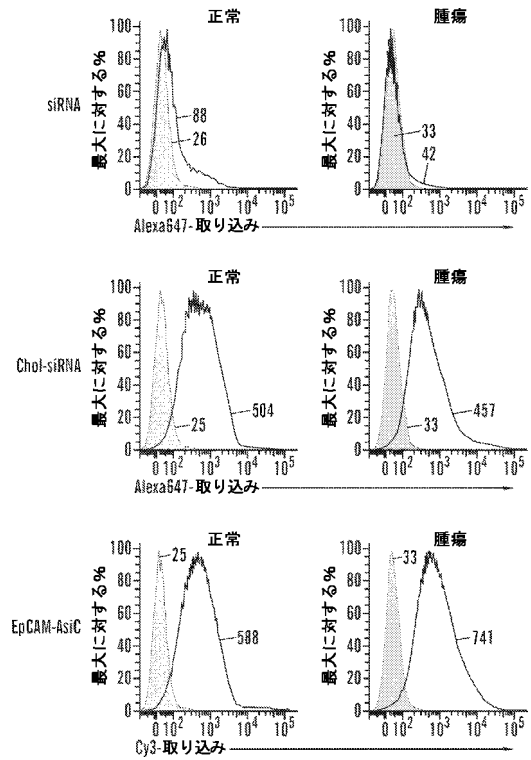
【図 25 E】



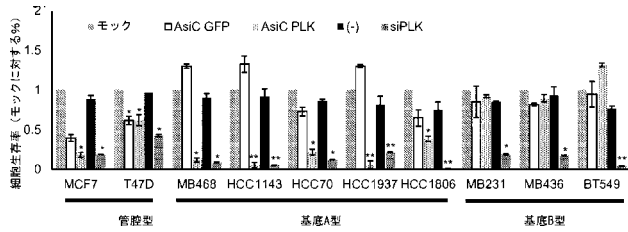
【図 26 - 1】



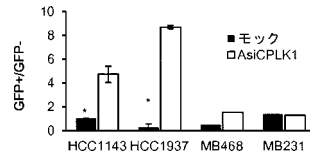
【図 26 - 2】



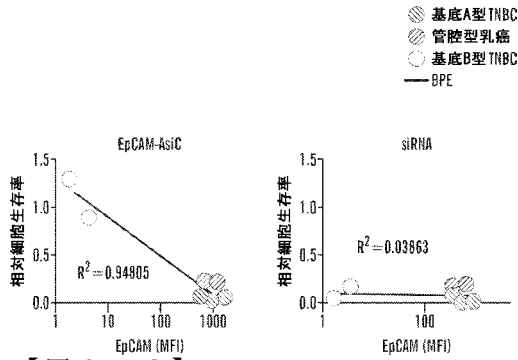
【図 27 A】



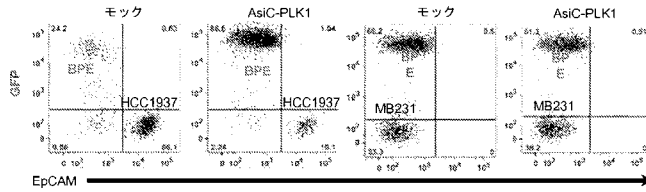
【図 27 D】



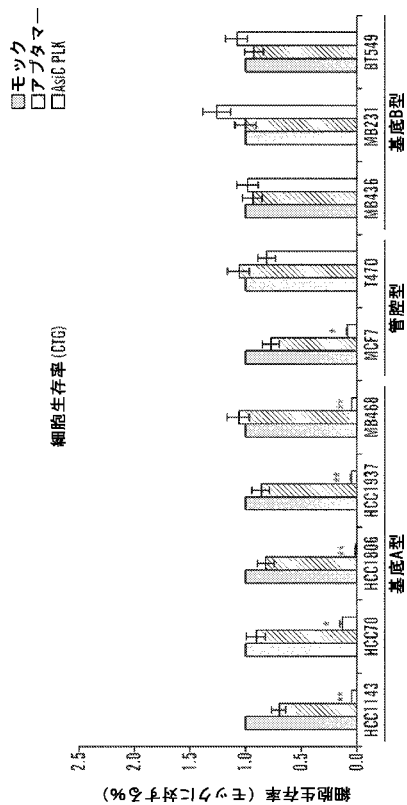
【図 27 B】



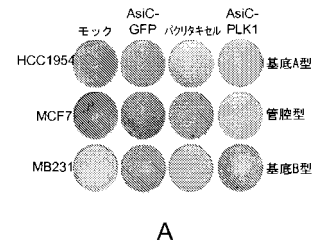
【図 27 C】



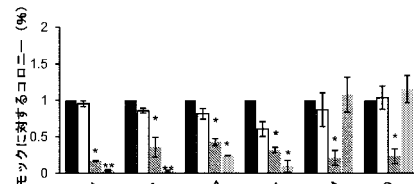
【図 28】



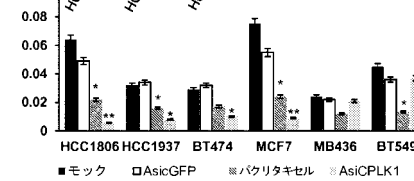
【図 29】



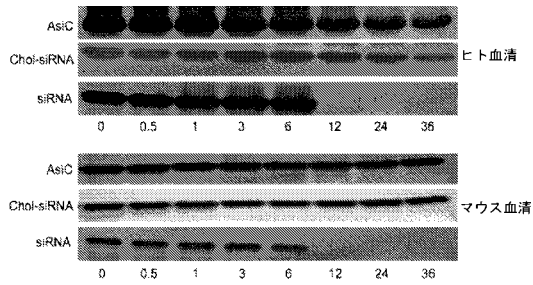
B



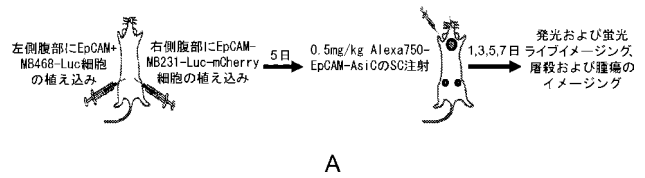
C



【図 30 A】

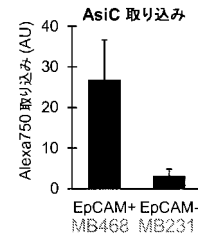
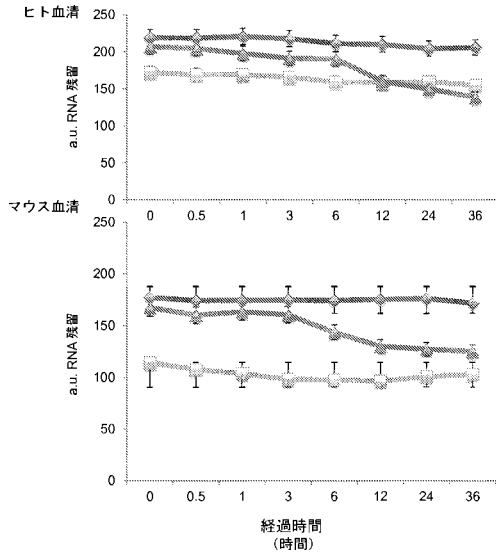


【図 31】



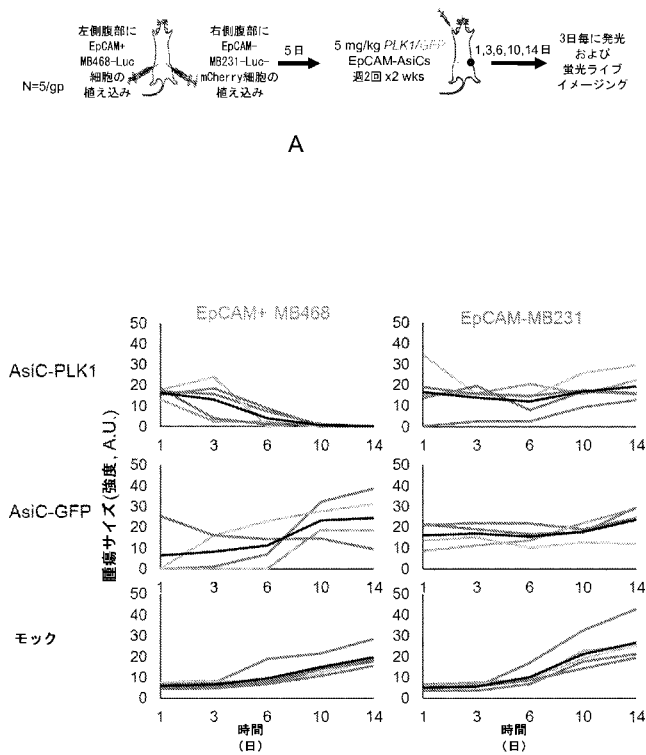
A

【図 30 B】



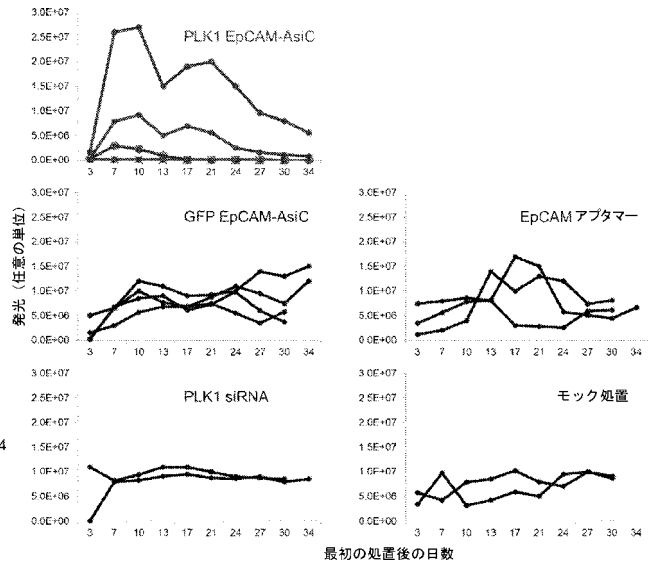
B

【図 32】

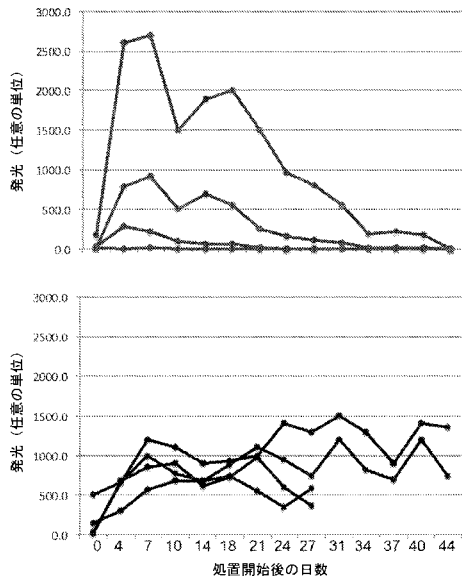


B

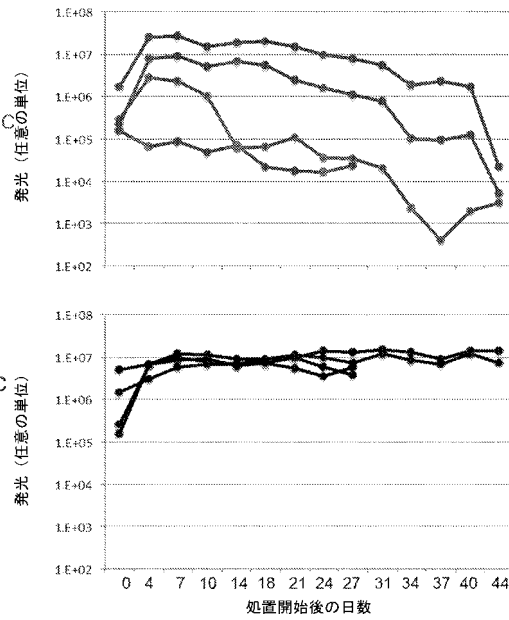
【図 33-1】



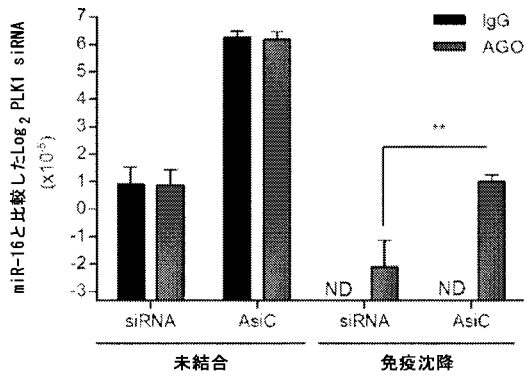
【図 3 3 - 2】



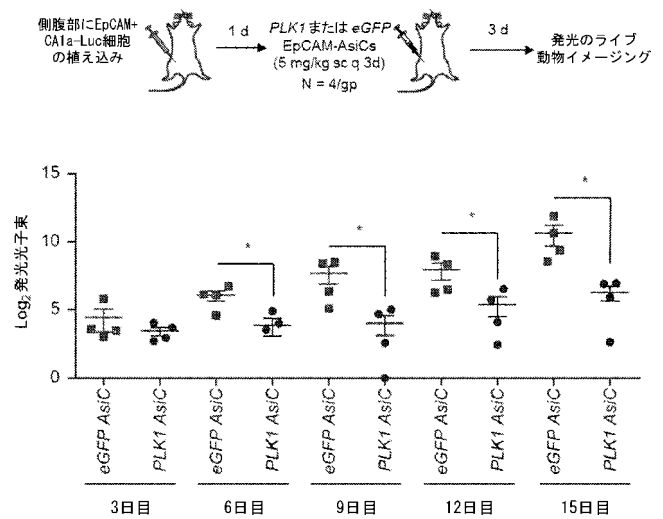
【図 3 3 - 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



【配列表】

2017526367000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年8月3日(2017.8.3)

【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】

癌マーカー結合アプタマードメインおよび阻害性核酸ドメインを含む、キメラ分子。

【請求項2】

癌マーカーが、EpCAMまたはEphA2である、請求項1記載の分子。

【請求項3】

アプタマー-siRNAキメラ(AsiC)である、請求項1～2のいずれか一項記載の分子。

【請求項4】

阻害性核酸が、癌細胞においてアップレギュレートされる遺伝子産物と特異的に結合する、請求項1～3のいずれか一項記載の分子。

【請求項5】

阻害性核酸が、

Plk1；MCL1；EphA2；PsmA2；MSI1；BMI1；XBP1；PRPF8；PFPF38A；RBM22；USP39；RAN；NUP205；およびNDC80

からなる群より選択される遺伝子の発現を阻害する、請求項1～4のいずれか一項記載の分子。

【請求項6】

癌マーカーが、EpCAMであり、阻害性核酸ドメインが、Plk1の発現を阻害する、請求項1～5のいずれか一項記載の分子。

【請求項7】

癌マーカー結合アプタマードメインが、SEQ ID NO:33の配列を含む、請求項1～6のいずれか一項記載の分子。

【請求項8】

癌マーカー結合アプタマードメインが、本質的にSEQ ID NO:33の配列からなる、請求項1～6のいずれか一項記載の分子。

【請求項9】

阻害性核酸ドメインが、SEQ ID NO:2の配列を含む、請求項1～8のいずれか一項記載の分子。

【請求項10】

阻害性核酸ドメインが、本質的にSEQ ID NO:2の配列からなる、請求項1～8のいずれか一項記載の分子。

【請求項11】

SEQ ID NO:1～3のうちの1つの配列を含む、請求項1～10のいずれか一項記載の分子。

【請求項12】

本質的にSEQ ID NO:1～3のうちの1つの配列からなる、請求項1～11のいずれか一項記載の分子。

【請求項13】

その3'末端が、dTdTを含む、請求項1～12のいずれか一項記載の分子。

【請求項14】

少なくとも1つの2'-Fピリミジンを含む、請求項1～13のいずれか一項記載の分子。

【請求項15】

請求項1～14のいずれか一項記載の分子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項16】

請求項1～14のいずれか一項記載の少なくとも2種類のキメラ分子を含む組成物であって、該キメラ分子が、異なるアプタマードメインまたは阻害性核酸ドメインを有する、請求項15記載の組成物。

【請求項17】

異なるアプタマーまたは阻害性核酸ドメインが、異なる標的を認識する、請求項16記載の組成物。

【請求項18】

異なるアプタマーまたは阻害性核酸ドメインが、配列を有し、かつ同じ標的を認識する、請求項16記載の組成物。

【請求項19】

癌を処置するための薬剤の製造における、請求項1～14のいずれか一項記載の分子または請求項15～18のいずれか一項記載の組成物の使用。

【請求項20】

癌が、上皮癌または乳癌である、請求項19記載の使用。

【請求項21】

乳癌が、トリプルネガティブ乳癌である、請求項20記載の使用。

【請求項22】

薬剤が、皮下投与される、請求項19～21のいずれか一項記載の使用。

【請求項23】

薬剤が追加的な癌処置がさらに施される対象に投与される、請求項19～22のいずれか一項記載の使用。

【請求項24】

癌処置が、パクリタキセルである、請求項23記載の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/47449

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 48/00; C12N 15/115 (2015.01) CPC - A61K 48/00; C12N 15/115 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) IPC(8): A61K 48/00, 49/00; C12N 15/113; 15/115 (2015.01) CPC: A61K 48/00, C12N 15/113, 15/115 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 practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Dialog ProQuest; IP.com; Google; Google Scholar; chimeric, molecule, cancer, 'marker-binding,' aptamer, domain, inhibitory, 'nucleic acid,' 'EpCAM,' 'EphA2'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/019025 A1 (DEAKIN UNIVERSITY) February 6, 2014; abstract; page 2, lines 17-19; page 7, lines 19-21; page 10, lines 26-27; page 39, lines 3-4	1-3
A	WO 2014/093698 A1 (THE METHODIST HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE) June 19, 2014; abstract	1-3
A	WO 2013/025930 A1 (RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEW YORK AT ALBANY) February 21, 2013; abstract	1-3
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 October 2015 (27.10.2015)		Date of mailing of the international search report 27 NOV 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/47449

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-24
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	1 0 1
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,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,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,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,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リーバーマン ジュディ
アメリカ合衆国 0 2 4 4 5 マサチューセッツ州 ブルックライン バックミンスター ロード
6 3

(72)発明者 ギルボアーゲフィン アディ
アメリカ合衆国 0 2 4 4 6 マサチューセッツ州 ブルックライン アルトン コート 2 1

(72)発明者 ウィーラー リー アダム
アメリカ合衆国 0 2 1 1 1 マサチューセッツ州 ボストン ハドソン ストリート 7 # 3
エヌ

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC27 EE24 EE59 FF67 FF68
4C084 AA19 NA05 NA06 NA13 ZB261 ZB262 ZC751 ZC752
4C086 AA01 AA02 BA02 MA01 MA02 MA04 NA05 NA06 NA13 NA14
ZB26