

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-536518

(P2009-536518A)

(43) 公表日 平成21年10月15日(2009.10.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C O 8 6
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-508057 (P2009-508057)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月11日 (2007.5.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年1月9日 (2009.1.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2007/000638
 (87) 国際公開番号 W02007/131274
 (87) 国際公開日 平成19年11月22日 (2007.11.22)
 (31) 優先権主張番号 2006902491
 (32) 優先日 平成18年5月11日 (2006.5.11)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 508277081
 ホールサム バイオファーム ピーティー
 ワイ エルティーディー
 WHOLESOME BIOPHARM
 PTY LTD
 オーストラリア ヴィクトリア州 314
 2、トゥーラック、ウォレス アヴェニュー
 ー 26
 26 Wallace Avenue, T
 oorak, Victoria, 3142
 (AU)
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー疾患を治療する短鎖干渉RNA

(57) 【要約】

本発明は、アレルギー疾患を治療することを目的とする化合物、方法および組成物を提供する。特に、遺伝子、g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 1 3またはエオタキシンに対する短鎖干渉リボ核酸 (s i R N A) であって、発現した標的RNAをRNA干渉機構により切断するものを提供する。かかる s i R N A は、対象の気道炎症を軽減または予防することにより、アレルギーを治療するための薬物として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

RNA 干渉により、g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13 またはエオタキシンの遺伝子の RNA を切断する単離された二本鎖短鎖干渉リボ核酸 (s i R N A) 分子であって、(a) 前記 s i R N A 分子のそれぞれの鎖は約 19 ~ 21 リボヌクレオチドの長さであり、(b) 前記 s i R N A 分子の一本の鎖は、RNA 干渉により、g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13 またはエオタキシンの RNA を切断するための、前記 g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13 またはエオタキシンの RNA またはその部分に相補的なリボヌクレオチド配列を含む、前記単離された二本鎖短鎖干渉リボ核酸分子。

【請求項 2】

s i R N A 分子が、配列番号 1 ~ 15 から選ばれる核酸配列のいずれかでコードされる RNA 配列に相補的なリボヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 3】

s i R N A 分子がマウス由来である、請求項 2 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 4】

s i R N A 分子が、配列番号 1 ~ 15 から選ばれる核酸配列のいずれかでコードされる RNA 配列に相補的な s i R N A 1 ~ 15 のいずれかと少なくとも 80 % 同一である、請求項 2 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 5】

s i R N A 分子が、配列番号 16 ~ 30 のいずれかから選ばれるリボ核酸配列を含む、請求項 4 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 6】

s i R N A 分子が、配列番号 31 ~ 45 から選ばれる核酸配列のいずれかでコードされる RNA 配列に相補的なリボヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 7】

s i R N A 分子がヒト由来である、請求項 6 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 8】

s i R N A 分子が、配列番号 31 ~ 45 から選ばれる核酸配列のいずれかでコードされる RNA 配列に相補的な s i R N A 16 ~ 30 のいずれかと少なくとも 80 % 同一である、請求項 6 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 9】

s i R N A 分子が、配列番号 46 ~ 60 のいずれかから選ばれるリボ核酸配列を含む、請求項 8 に記載の s i R N A 分子。

【請求項 10】

薬学的に受容可能な担体において請求項 2 または 6 に記載の s i R N A 分子を含む、アレルギー疾患を治療するための組成物。

【請求項 11】

アレルギー疾患が、花粉症、気管支喘息、副鼻腔炎、呼吸窮迫症候群またはアレルギー性鼻炎である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13 またはエオタキシンの遺伝子の発現を抑制することにより、気道炎症を緩和するため、請求項 10 に記載の組成物の有効量を対象に投与することを含む、アレルギー疾患を治療する方法。

【請求項 13】

アレルギー疾患が、花粉症、気管支喘息、副鼻腔炎、呼吸窮迫症候群またはアレルギー性鼻炎である、請求項 12 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、アレルギー疾患の治療に関するものである。さらに詳しくは、本発明は、RNA干渉 (RNA mediated interference、RNAi) により、気道炎症関連遺伝子の発現を抑制することでアレルギー疾患を治療することを目的とする化合物、方法および組成物を提供する。

【背景技術】

【0002】

殆どの先進国および発展途上国において、アレルギー疾患の蔓延が益々顕著になっている。アレルギー疾患は、I型過敏症、即ちIgEに媒介されるI型免疫反応により引き起こされる機能障害と定義される。その症状は、花粉症、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、呼吸窮迫症候群、アトピー性皮膚炎およびアナフィラキシーショックを包含する。現在、アレルギー疾患は、文明社会において、より深刻になる傾向があり、多大な費用がかかる。人々が患っているアレルギーの様々な症状のうち、アレルギー性鼻炎は最も一般的なアレルギーの形態である。更に、アレルゲンの攻撃は、致命的になる可能性もある。国立台湾大学附属病院小児科による1994年の統計データによると、台北市(台湾)の学生のうち、アレルギー性鼻炎の有病率は33%を超え、喘息の有病率(10~11%)の3倍に近いものである。患者数も毎年増加している。特に、幼児の患者が急速に増加している。よって、多くの研究者が、アレルギー患者の経済的・身体的負担をより一層軽減し、改良された解決策を開発しようと専念している。

10

【0003】

近年、転写後遺伝子サイレンシングという新興技術、特に、RNA干渉 (RNAi) を、様々な有機体における特定の遺伝子をノックアウトする道具として利用することにより (例えば、非特許文献1および非特許文献2を参照)、今では、機能遺伝子を系統的にサイレンシングすることで、細胞内シグナル伝達経路におけるタンパク質間相互作用をマッピングすることが可能になり、それによって、無数の疾患に対して治療法を開発する新しい方法を提供している。本発明者らは、長期間にわたる臨床研究および実験を行った結果、生体外または生体内において、RNA干渉により気道炎症関連遺伝子の発現を抑制できる短い非コードRNAを同定した。これらの同定された短いRNA分子は、対象の気道炎症を軽減または最小限にするアレルギーを治療するための薬物として有用である。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【0004】

【非特許文献1】Mello and Conte, "Revealing the world of RNA interference", (2004) Nature 431, 338-342

【非特許文献2】Scherer and Rossi, "Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA", (2003) Nature Biotechnology, 21, 1457-1465

【発明の概要】

【0005】

本発明は、短鎖干渉RNA (siRNA) 分子を用いることで、気道炎症関連遺伝子の発現を抑制する化合物、組成物および方法を提供することを目的とする。特に、本発明は、小分子RNA、例えば、短鎖干渉二本鎖または一本鎖RNA分子など、および、これらのsiRNAを用いた気道炎症関連遺伝子の発現を抑制する方法を特徴とする。

40

【0006】

従って、一態様において、本発明は一つまたは複数のsiRNA分子およびその利用方法を特徴とし、前記siRNA分子は、単独または組み合わせて、気道炎症に関連するタンパク質をコードする遺伝子の発現、例えばgata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシン遺伝子などの気道炎症に関連するタンパク質をコードする遺伝子の発現などを、RNA干渉により抑制する。

【0007】

本発明は、一実施形態において、gata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシン遺伝子などの気道炎症関連遺伝子の発現を下方制御する単離された二本鎖

50

s i R N A分子であって、前記 s i R N A分子が、約 19 ~ 21 個の塩基対を含むものを特徴とする。

【 0 0 0 8 】

本発明は、一実施形態において、RNA干渉により、g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13またはエオタキシンのRNAの切断を導く単離された二本鎖 s i R N A分子を提供し、ここで、(a)前記 s i R N A分子のそれぞれの鎖は約 19 ~ 21ヌクレオチド長であり、かつ(b)前記 s i R N A分子の一本の鎖は、RNA干渉により、g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13またはエオタキシンのRNAを切断するために、g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13またはエオタキシンのRNAに相補的なリボヌクレオチド配列を含む。本発明の一実施形態では、単離された s i R N A分子はマウス由来であって、配列番号 1 ~ 15のいずれかから選ばれる核酸配列でコードされるRNA配列に相補的なリボヌクレオチド配列を含むものであり、ここで、配列番号 1 ~ 3は、それぞれ位置 316 ~ 336、位置 1733 ~ 1753および位置 1306 ~ 1324における g a t a - 3遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号 4 ~ 6は、それぞれ位置 263 ~ 283、位置 636 ~ 656および位置 1166 ~ 1186における I L - 5遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号 7 ~ 9は、それぞれ位置 134 ~ 152、位置 282 ~ 294および位置 583 ~ 594におけるエオタキシン遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号 10 ~ 12は、それぞれ位置 47 ~ 67、位置 181 ~ 201および位置 336 ~ 356における I L - 4遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号 13 ~ 15は、それぞれ位置 100 ~ 120、位置 154 ~ 174および位置 238 ~ 258における I L - 13遺伝子のヌクレオチド配列を表す。本発明の別の実施形態では、本発明の単離された s i R N A分子はヒト由来であって、配列番号 31 ~ 45のいずれかから選ばれる核酸配列でコードされるRNA配列に相補的なリボヌクレオチド配列を含むものであり、ここで、配列番号 31 ~ 33は、それぞれ位置 537 ~ 557、位置 1080 ~ 1100および位置 185 ~ 205における g a t a - 3遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号 34 ~ 36は、それぞれ位置 196 ~ 216、位置 328 ~ 348および位置 457 ~ 477における I L - 5遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号 37 ~ 39は、それぞれ位置 749 ~ 769、位置 269 ~ 289および位置 335 ~ 355におけるエオタキシン遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号 40 ~ 42は、それぞれ位置 133 ~ 153、位置 355 ~ 375および位置 87 ~ 107における I L - 4遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号 43 ~ 45は、それぞれ位置 389 ~ 409、位置 137 ~ 157および位置 431 ~ 451における I L - 13遺伝子のヌクレオチド配列を表す。

【 0 0 0 9 】

本発明は、一実施形態において、g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13またはエオタキシンのRNAに対するRNAi活性を有する単離された s i R N A分子を特徴とする。前記 s i R N A分子は、生体外または生体内において、g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13またはエオタキシンのRNAの切断をもたらすRNA干渉を媒介することができる。本発明の一実施形態では、本発明の単離された s i R N A分子はマウス由来であり、標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、前記標的遺伝子の核酸配列は、配列番号 1 ~ 15のいずれかである。本発明の別の実施形態では、本発明の単離された s i R N A分子はヒト由来であり、標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、前記標的遺伝子の核酸配列は配列番号 31 ~ 45のいずれかである。配列番号 1 ~ 15または 31 ~ 45で示された配列は限定的ではない。本発明の単離された s i R N A分子は、連続する g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13またはエオタキシンの遺伝子配列に相補的な任意の配列、例えば、約 19 ~ 21個または 22個以上の連続する g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13またはエオタキシンのヌクレオチドに相補的な配列などを含んでもよい。本発明の好ましいマウス s i R N A分子は、実施例 1 ~ 6に記載の方法により調製された s i R N A 1 ~ 15のいずれかと少なくとも 80%同一である配列を含み、ここで、前記 s i R N A 1 ~ 15は、それぞれ配列番号 1 ~ 15から選ばれる標的核

酸配列によりコードされるものである。本発明の好ましいヒト *siRNA* 分子は、実施例 7 に記載の方法により調製された *siRNA* 16 ~ 30 のいずれかと少なくとも 80 % 同一である配列を含み、ここで、前記 *siRNA* 16 ~ 30 は、それぞれ配列番号 31 ~ 45 から選ばれる標的核酸配列によりコードされるものである。

【0010】

一実施形態では、本発明の *siRNA* 分子は、生体外または生体内において *RNAi* 活性を媒介する一本鎖 *siRNA* であってもよく、これは、標的遺伝子の *RNA* 配列に相補的な一本鎖ポリリボヌクレオチドを含む。前記標的遺伝子は、気道炎症関連遺伝子、例えば、*gata-3*、*IL-4*、*IL-5*、*IL-13* またはエオタキシン遺伝子などであってもよい。

10

【0011】

別の態様では、本発明は、短鎖干渉核酸分子を使用することで、気道炎症関連遺伝子の発現、例えば、*gata-3*、*IL-4*、*IL-5*、*IL-13* またはエオタキシン遺伝子の発現などを抑制することにより、アレルギー、例えば、花粉症、気管支喘息、副鼻腔炎、呼吸窮迫症候群またはアレルギー性鼻炎などを治療する医薬組成物を提供する。

【0012】

本発明の一実施形態では、薬学的に受容可能な担体において本発明の *siRNA* 分子を含む医薬組成物を特徴とする。

【0013】

一実施形態において、本発明は、少なくとも一つの本発明の *siRNA* 分子の発現ベクターであって、対象となる標的遺伝子の一部を、前記 *siRNA* 分子を発現させ、生体外または生体内において、*RNA* 干渉 (*RNAi*) により、前記標的遺伝子の発現を抑制または妨害し得る形で含むものを提供する。前記標的遺伝子は、気道炎症関連遺伝子、例えば、*gata-3*、*IL-4*、*IL-5*、*IL-13* またはエオタキシン遺伝子などであってもよい。

20

【0014】

本発明の一実施形態では、少なくとも一つの本発明の *siRNA* 分子の発現ベクターを対象に導入することにより、花粉症、気管支喘息、副鼻腔炎、呼吸窮迫症候群またはアレルギー性鼻炎などのアレルギーを患っている対象を治療する方法を特徴とし、ここで、前記 *siRNA* 分子は、気道炎症関連遺伝子 *RNA* の一部に相補的なポリリボヌクレオチド配列を、前記 *siRNA* 分子を発現させ、生体外または生体内において、*RNA* 干渉 (*RNAi*) により、前記気道炎症関連遺伝子の発現を抑制し、それによって、対象のアレルギー症状を軽減および/または最小化する目的を達成し得る形で含む。

30

【0015】

これらおよび他の態様および利点は、本説明が実施例と共に読まれたとき、更に明らかとなるであろう。上記の概略的な説明および以下の詳細な説明はいずれも本発明の例であり、特許請求の範囲に記載された本発明の更なる説明の提供を意図していることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0016】

添付の図面は、本発明について更に一層の理解を提供するために含まれ、本明細書に組み入れられ、その一部を構成するものである。これらの図面は、本発明の実施形態を例証するものであり、本説明と共に、本発明の原理を説明する役目を果たす。

40

【図1】 *pSEC hygro* プラスミドおよびレンチウイルスベクターにおけるマウス *gata-3 siRNA* の模式図であり、そのうち (A) は、*siRNA* 発現カセットの概略図、(B) は、*siRNA* を発現する安定クローンを選択するためのハイグロマイシン選択部位を含む *pSEC hygro* プラスミドの概略図、および (C) は、*siRNA* 発現レンチウイルスベクターの概略図である。

【図2A】 *PMA* (5 ng/ml) および *cAMP* (500 mM) を 24 時間併用投与した *EL-4* 細胞に、*gata-3 siRNA* を形質導入した後の *gata-3* 遺伝子発

50

現の減少を示した図であり、*gata-3* 遺伝子の発現は、リアルタイムPCRにより確認した。図中、“Mock”は、Ambion社からの*siRNA*陰性対照を含む偽形質導入対照群であり、“pTYリンカー”は、空のベクターである。*a*^{**}は、前処理無しの対照群と比べて $p < 0.01$ であり、*b*^{**}は、PMA 5 ng/ml + cAMP 500 mM 対照群と比べて $p < 0.01$ であり、*c*^{**}は、PMA 5 ng/ml + cAMP 500 mM Mock群と比べて $p < 0.01$ であり、*d*^{**}は、PMA 5 ng/ml + cAMP 500 mM pTYリンカー群と比べて $p < 0.01$ である。

【図2B】PMA (5 ng/ml) およびcAMP (500 mM) を24時間併用投与したEL-4細胞に、*gata-3 siRNA*を形質導入した後の*gata-3* 遺伝子発現の減少を示した図であり、*gata-3* タンパク質の発現は、ウエスタンブロットにより確認した。図中、“Mock”は、Ambion社からの*siRNA*陰性対照を含む偽形質導入対照群であり、“pTYリンカー”は、空のベクターである。

【図2C】PMA (5 ng/ml) およびcAMP (500 mM) を24時間併用投与したEL-4細胞に、*gata-3 siRNA*を形質導入した後のTh2サイトカイン放出の減少を示した図であり、Th2サイトカイン放出は(C)サンドイッチELISA法により検出した。図中、“Mock”は、Ambion社からの*siRNA*陰性対照を含む偽形質導入対照群であり、“pTYリンカー”は、空のベクターである。*a*^{**}は、前処理無しの対照群と比べて $p < 0.01$ であり、*b*^{**}は、PMA 5 ng/ml + cAMP 500 mM 対照群と比べて $p < 0.01$ であり、*c*^{**}は、PMA 5 ng/ml + cAMP 500 mM Mock群と比べて $p < 0.01$ であり、*d*^{**}は、PMA 5 ng/ml + cAMP 500 mM pTYリンカー群と比べて $p < 0.01$ である。

【図3】マウス喘息モデルを作製するための本発明の一つの好適な実施形態によって使用される、OVAプロトコルのスケジュールを示した図である。

【図4】本発明の一実施形態による、*gata-3 siRNA*で処置したBALB/cマウスにおける(A) IgE、(B) IgG1および(C) IgG_{2a}を含むOVA特異的抗体の血清レベルを示した棒グラフである。

【図5】ELISAにより測定された、実施例3.2のマウスのBAL液におけるエオタキシンのレベルを示した図である。

【図6】本発明の一実施形態による、マウスから収集されたBALFにおける細胞プロフィールを示した図である。総細胞数は、HBS 1 mlで測定し、そのデータは平均値 ± SEMとして表し、生理食塩水の対照群と比べて、*a*^{**}は $p < 0.01$ 、*a*^{***}は $p < 0.001$ である。

【図7】本発明の一つの好適な実施形態による、OVA感作したマウスにおけるMCh誘導気道反応性の*gata-3 siRNA*による抑制を示した図である。AHRは、全身プレシモグラフィにより測定し、そのデータは、3回の独立試験から得られた、PBS噴霧後のPenh値に対する比率としてのPenh値の平均値 ± SEMとして表した。*a*^{*} および *a*^{**} は、それぞれ陰性対照群と比べて $p < 0.05$ および $p < 0.001$ であり、*a*^{***} は、各々の陽性対照群と比べて $p < 0.001$ であり、*b*^{***} は、各々のMock群と比べて $p < 0.001$ である。

【図8】PMA (5 ng/ml) およびcAMP (500 mM) を24時間併用投与したEL-4細胞に、IL-5 *siRNA*を形質導入した後のIL-5 遺伝子発現の減少を示した図であり、IL-5 遺伝子の発現の検出は、ELISA法により確認した。図中、“EL4”は、PMAおよびcAMPで処理したEL-4細胞であり、“S Neg”は、マウスのいずれの遺伝子にも関連がない*siRNA*断片を含むpSECNegをトランスフェクトしたEL-4細胞であり、“S1、S4およびS7”は、それぞれ*siRNA* 4、*siRNA* 5 および *siRNA* 6 を含むベクターをトランスフェクトしたEL-4細胞である。

【図9】本発明の一つの好適な実施形態による、(A)培地、または(B) *siRNA* 7、*siRNA* 8 および *siRNA* 9 を含む合成エオタキシン*siRNA*をトランスフェクトした細胞のいずれかにおいて発現したエオタキシンのレベルを示した図である。

10

20

30

40

50

【図10】本発明の一つの好適な実施形態による、IL-5 siRNAおよび/またはエオタキシン siRNAによる、OVA感作したマウスにおけるMCh誘導気道反応性の抑制を示した図である。AHRは、全身プレチスモグラフィにより測定した。

【0017】

【図11A】本発明の一実施形態による、マウスから収集したBALFにおける、単球の細胞比を示した図である。総細胞数は、HBSS 1mlで測定し、そのデータは、平均値±SEMとして表し、*は、生理食塩水の対照群と比べて $p < 0.01$ である。

【図11B】本発明の一実施形態による、マウスから収集したBALFにおける、好中球の細胞比を示した図である。総細胞数は、HBSS 1mlで測定し、そのデータは、平均値±SEMとして表し、*は、生理食塩水の対照群と比べて $p < 0.01$ である。

10

【図11C】本発明の一実施形態による、マウスから収集したBALFにおける、リンパ球の細胞比を示した図である。総細胞数は、HBSS 1mlで測定し、そのデータは、平均値±SEMとして表し、*は、生理食塩水の対照群と比べて $p < 0.01$ である。

【図11D】本発明の一実施形態による、マウスから収集したBALFにおける、好酸球の細胞比を示した図である。総細胞数は、HBSS 1mlで測定し、そのデータは、平均値±SEMとして表し、*は、生理食塩水の対照群と比べて $p < 0.01$ である。

【図12】ELISAにより測定された、実施例4のマウスのBAL液における(A)IL-5および(B)エオタキシンのレベルを示した図である。

【図13A】本発明の一実施形態による、IL-5および/またはエオタキシン siRNAで処置したBALB/cマウスにおけるOVA特異的IgEの血清中のレベルを示した棒グラフである。

20

【図13B】本発明の一実施形態による、IL-5および/またはエオタキシン siRNAで処置したBALB/cマウスにおけるOVA特異的IgG1の血清中のレベルを示した棒グラフである。

【図13C】本発明の一実施形態による、IL-5および/またはエオタキシン siRNAで処置したBALB/cマウスにおけるOVA特異的IgG_{2a}の血清中のレベルを示した棒グラフである。

【図14】本発明の一つの好適な実施形態による、OVA感作したマウスにおける、高用量、中用量、または低用量のsiRNA5によるMCh誘導気道反応性の抑制を示した図である。AHRは、全身プレチスモグラフィにより測定した。図中、“S4低用量”は、低用量のsiRNA5 (3×10^5 IFU/匹)で処置した動物、“S4中用量”は、中用量のsiRNA5 (1.5×10^6 IFU/匹)で処置した動物、且つ、“S4高用量”は、高用量のsiRNA5 (3×10^6 IFU/匹)で処置した動物、“S Neg”は、マウスのいずれの遺伝子にも関連がないsiRNA断片を含むpSECNegをトランスフェクトした動物である。

30

【図15】それぞれ高用量、中用量、または低用量のsiRNA5で処置した実施例5のマウスから収集したBALFにおける、単球、リンパ球、好塩基球および好酸球を含む細胞プロファイルを示した図である。総細胞数は、HBSS 1mlで測定し、そのデータは、平均値±SEMとして表し、*および**は、それぞれ対照群と比べて $p < 0.01$ および $p < 0.001$ である。

40

【図16】それぞれ高用量、中用量、または低用量のsiRNA5で処置した実施例5のマウスから収集したBAL液におけるエオタキシンの濃度を示した図である。データは、平均値±SEMとして表し、*は対照群と比べて $p < 0.01$ である。

【図17】それぞれ高用量、中用量、または低用量のsiRNA5で処置した、実施例5のBALB/cマウスにおける(A)IgE、(B)IgG1および(C)IgG_{2a}を含むOVA特異的抗体の血清中のレベルを示した棒グラフである。

【図18】ヒトsiRNAベクターを示す概略図であり、同ベクターにおいては、望ましいヒト遺伝子を標的とする短鎖ヘアピンRNAをコードする小さなDNAインサートを、このベクターのMlu IおよびXho Iサイトの間にクローニングすることができ、且つsiRNAの発現のためにH1プロモーターを用いた。このベクターは、レポーター

50

遺伝子としてのサンゴ GFP (coral GFP、c GFP)、および選択のためのネオマイシン耐性遺伝子を含む。

【図19】リポフェクタミンにより、(A)空の、(B) siRNA 22、(C) siRNA 23または(D) siRNA 24を含むベクターをトランスフェクトし、且つ G418 (500 μg/ml) により14日間選択した BEAS-2B 細胞における、ヒトのエオタキシン-1 siRNA の導入効率を示した図である。トランスフェクトされた細胞 (GFP⁺) の頻度は、FACS により分析した。

【図20】空の (V)、siRNA 22 (SE-749)、siRNA 23 (SE-269) または siRNA 24 (SE-335) を含むベクターをトランスフェクトし、且つヒト TNF- (50 ng/ml) およびヒト IL-4 (50 ng/ml) により、それぞれ24時間または48時間刺激した BEAS-2B 細胞における、エオタキシンを標的とするヒト siRNA の抑制効果を示した図である。対照群 (空のベクターをトランスフェクトした BEAS-2B 細胞) のエオタキシン-1 の発現を100%とした。* および ** は、それぞれ対照群が産生したエオタキシン-1 と比べて $p < 0.01$ および $p < 0.001$ である。

【図21】Jurkat 細胞における shRNA の形質導入の後の、gata-3、IL-4 および IL-13 遺伝子発現の抑制を示した図である。5 × 10⁵ 個の細胞は24穴プレートにおいて培養し、gata-3、IL-4 または IL-13 shRNA を発現する pRNAin-H1.2/Retro プラスミドを4時間トランスフェクトし、且つ、PMA (50 ng/ml) および PHA (1 μg/ml) により48時間処理した。細胞を、新たな24穴プレートに移し、PMA (50 ng/ml) およびイオノマイシン (1 μg/ml) により48時間処理し、その後、細胞を回収して、リアルタイムPCRにより、RNA 発現を解析した。* * は、各々の対照群と比べて $p < 0.05$ である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

記載した実施形態、および本明細書で用いた用語は、例示の実施形態を説明することのみを目的とするものであり、限定的なものではない。本発明の範囲は、本明細書に具体的に述べられていないが、本開示を読んで、本発明を実行する当業者にとって明らかである追加の実施形態を含む。

【0019】

本発明は、短鎖干渉リボ核酸 (siRNA) 分子の利用による、アレルギー疾患、例えば、花粉症、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、呼吸窮迫症候群、アトピー性皮膚炎またはアナフィラキシーショックなどを治療する新しい解決策に関する。本発明者らは、ここで、気道炎症関連遺伝子 RNA などの標的遺伝子 RNA の、少なくとも一部に相補的なリボヌクレオチド配列を有する特定の単離された短鎖干渉リボ核酸が、RNA 干渉により、発現した標的遺伝子 RNA の切断を導くことができることを証明する。

【0020】

RNA 干渉は、動物における、短鎖干渉 RNA (siRNA) により媒介された配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを指す (Fire et al., "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*" (1998) Nature 391, 806-811)。配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防ぐために用いられる進化的に保存された細胞の防御機構であると考えられている (Andrew Fire, "RNA-triggered gene silencing" (1999), Trends Genet. 15(9), 358-363)。このような外来遺伝子の発現からの保護は、ウイルス感染に由来する二本鎖 RNA (dsRNA) の産生、または宿主ゲノムへのトランスポゾンのランダムな挿入に反応して、相同的な一本鎖 RNA またはウイルスのゲノム RNA を特異的に破壊する細胞応答に進化したものと思われる。細胞内の dsRNA の存在は、未だに完全に特定できない機構を介して、RNAi 応答を誘発する。

【0021】

細胞における dsRNA の存在は、ダイサー (Dicer) と呼ばれるリボヌクレアー

ゼ酵素の活性化を導く。ダイサーは、dsRNAの、短鎖干渉RNA (siRNA) として知られているdsRNAの短い断片へのプロセッシングに關与する (Berstein et al., "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference" (2001) Nature, 409, 363-366)。ダイサーの作用に由来する短鎖干渉RNAは、一般には長さ約21~23ヌクレオチドであり、約19塩基対の二本鎖を有する。RNAi応答はまた、一般にRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) と呼ばれる、siRNAを含有するエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これがsiRNAに配列相同性を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAの切断は、前記二本鎖siRNAのガイド配列に相補的な領域の中央において起こる。このように、本発明のsiRNA分子は、RNA転写物との相互作用を介して、または特定の遺伝子配列との相互作用により、遺伝子サイレンシングを媒介するのに用いることができ、そのような相互作用は、転写レベル或いは転写後レベルで、遺伝子サイレンシングを導く。RNA干渉技術の概説については、下記を参照のこと：「Mello and Conte, "Revealing the world of RNA interference", (2004) Nature 431, 338-342; and Scherer and Rossi, "Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA", (2003) Nature Biotechnology, 21, 1457-1465.」。

10

20

30

40

50

【0022】

従って、一実施形態において、本発明は、一つまたは複数のsiRNA分子を提供し、前記siRNA分子は、単独または組み合わせて、RNA干渉により、対象の気道炎症関連遺伝子の発現を抑制し、それによって気道炎症関連遺伝子、例えばgata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシン遺伝子などの発現を抑制または遅延し、対象の炎症反応を最小化および/もしくは軽減する。

【0023】

一実施形態において、本発明は、RNA干渉により、gata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシンのRNAを切断する単離された二本鎖siRNA分子を提供し、ここで、(a)前記siRNA分子のそれぞれの鎖は長さ約19~21ヌクレオチドであり、(b)前記siRNA分子の一本の鎖は、RNA干渉により、gata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシンのRNAの切断を導くため、前記gata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシンのRNAに相補的なリボヌクレオチド配列を含む。

【0024】

本発明の単離されたsiRNA分子は、マウス由来でもヒト由来でもよい。具体的には、本発明の単離されたマウスsiRNA分子は、配列番号1~15から選ばれる核酸によってコードされたりボヌクレオチド配列を標的とし、ここで、配列番号1~3は、それぞれ位置316~336、位置1733~1753および位置1306~1324におけるgata-3遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号4~6は、それぞれ位置263~283、位置636~656および位置1166~1186におけるIL-5遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号7~9は、それぞれ位置134~152、位置282~294および位置583~594におけるエオタキシン遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号10~12は、それぞれ位置47~67、位置181~201および位置336~356におけるIL-4遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号13~15は、それぞれ位置100~120、位置154~174および位置238~258におけるIL-13遺伝子のヌクレオチド配列を表す。本発明の単離されたヒトsiRNA分子は、配列番号31~45から選ばれる核酸によってコードされたりボヌクレオチド配列を標的とし、ここで、配列番号31~33は、それぞれ位置537~557、位置1080~1100および位置185~205におけるgata-3遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号34~36は、それぞれ位置196~216、位置328~348および位置457~477におけるIL-5遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号37~39は、それぞれ位置749~769、位置269~289および位置335~355におけるエオタキシン遺伝子のヌクレオチド配列を表し、配列番号40~42は、それぞれ位置133~153、位置355~375および位置87~107におけるIL-4遺伝子

のヌクレオチド配列を表し、および配列番号 43 ~ 45 は、それぞれ位置 389 ~ 409、位置 137 ~ 157 および位置 431 ~ 451 における IL-13 遺伝子のヌクレオチド配列を表す。

【0025】

本発明の好ましいマウス siRNA 分子は、標的遺伝子の RNA に相補的な配列、または実施例 1 ~ 6 に記載の方法により調製された siRNA 1 ~ 15 (それぞれ配列番号 16 ~ 30 で表される) のいずれかと、少なくとも 80% 同一である配列を含み、前記 siRNA は、それぞれ配列番号 1 ~ 15 から選ばれるいずれかの核酸配列でコードされるものである。正確な配列番号 1 ~ 15 のマウス核酸配列、および配列番号 16 ~ 30 のリボ核酸配列は、表 1 に記載してある。本発明の好ましいヒト siRNA 分子は、標的遺伝子の RNA に相補的な配列、または実施例 7 に記載の方法により調製された siRNA 16 ~ siRNA 30 (それぞれ配列番号 46 ~ 60 で表される) のいずれかと、少なくとも 80% 同一である配列を含み、前記 siRNA は、それぞれ配列番号 31 ~ 45 から選ばれるいずれかの核酸配列でコードされるものである。正確な配列番号 31 ~ 45 のヒト核酸配列、および配列番号 46 ~ 60 のリボ核酸配列は、表 2 に記載してある。

10

【0026】

本発明の siRNA 分子は、標的遺伝子の RNA 配列に相補的な一本鎖のポリリボヌクレオチドを含み、生体外または生体内において RNAi 活性を媒介する一本鎖の siRNA であってもよい。好ましくは、前記 siRNA 分子は、標的遺伝子の RNAi に係る siRNA と少なくとも 80% 同一であり、前記標的遺伝子は、配列番号 1 ~ 15、または配列番号 31 ~ 45 から選ばれたいずれかの核酸配列を含む。前記標的遺伝子は、例えば、gata-3、IL-4、IL-5、IL-13 またはエオタキシン遺伝子などの気道炎症関連遺伝子であってもよい。

20

【0027】

現在、遺伝子サイレンシング研究の siRNA を作製するには五つの方法があり、これは、化学合成、生体外転写、リボヌクレアーゼ III ファミリーの酵素による長い dsRNA の切断、siRNA 発現プラスミドまたはウイルスベクターの細胞内における発現、およびリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) に由来する siRNA 発現カセットの細胞内における発現を含む。前三者の方法は、生体外において siRNA を調製してから、これをリポフェクション、電気穿孔法または他の技術により直接細胞に導入することを含み。後二者の方法は、細胞内において siRNA を発現できる、DNA ベースのベクターおよびカセットの導入による。

30

【0028】

本発明の siRNA 分子は、鋳型として選択された標的遺伝子配列を用いて、本発明の実施例に記載の RT-PCR 由来の発現カセットによりクローニングした。あるいは、それらは、前述の生体外の調製および/または化学合成により、当該技術分野で既知のプロトコルにより得ることができる。この siRNA 分子は、その後適切なベクターに入れ、発現のために細胞内に送達される。一旦発現されると、siRNA 分子は、標的 mRNA と相互作用して、RNA 干渉反応を発生させる。

【0029】

本発明の siRNA 分子は、単独で、または他の治療法と組み合わせて用い、アレルギー疾患、例えば、花粉症、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、呼吸窮迫症候群、アトピー性皮膚炎およびアナフィラキシーショックなどを予防または治療できる。本 siRNA 分子は、対象に投与するための送達ビヒクル、例えばリポソームなど、担体、および希釈液を含んでもよく、且つ/または薬学的に受容可能な製剤で存在することができる。核酸分子を送達する方法は、当該技術分野でよく知られているものであり、リポソームへのカプセル化、イオントフォレーシス、または他のビヒクル、例えば、生分解性ポリマー、ハイドロゲル、シクロデキストリンなどへの組み込みによるもの、あるいはタンパク質性のベクターによるものを含むが、これらに限らない。核酸分子の送達により一般的なアプローチについては、例えば、米国特許第 6,395,713 号を参照でき、その全ての

40

50

内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 3 0 】

従って、本発明は受容可能な担体における一つまたはそれ以上の s i R N A 分子を含む医薬組成物を特徴とする。本発明の s i R N A は、任意の標準的な手段により対象に投与および導入することができる。リボソーム送達機構を利用することを希望する場合、本発明の実施例において例証されたように、リボフェクタミンのリボソーム製剤が好ましく、標準的なプロトコルに従って投与される。

【 0 0 3 1 】

本発明のリボ核酸分子および組成物は、従来の無毒の薬学的に受容可能な担体、アジュバントおよび/またはビヒクルを含む投与単位製剤にて、経口投与、局所投与、非経口投与、吸入またはスプレーにより投与されてもよい。本明細書で用いられる「非経口投与」という用語は、経皮的な、皮下の、血管内の、筋肉内の、または髄腔内の注射あるいは注入技術などを含む。経口用、局所用、非経口用、および/または吸入用の組成物は、当技術分野で既知の任意の方法に従って調製することができる。好ましくは、本発明の s i R N A 分子は、気道組織への核酸分子の速やかな局所的取り込みをもたらす、吸入装置、例えば、噴霧器 (nebulizer)、定量噴霧式吸入器 (metered dose inhaler) または吸入器 (insufflator) などで使用するエアロゾルまたはスプレー製剤に製剤される。

【 0 0 3 2 】

別段の定義がない限り、本明細書で用いる全ての技術的および科学的な用語は、本発明の属する技術分野における当業者が通常理解しているのと同じ意味を有する。本明細書に記載したのと類似または均等の任意の方法および材料を、本発明の実験または実施に用いることができるが、好ましい方法および材料を下記に記載する。言及した全ての刊行物は、参照により本明細書に組み込む。別段の言及がない限り、ここで用いるまたは意図する技術は、当業者によく知られた標準的な手法である。材料、方法および実施例は、例示的であるにすぎず、限定的ではない。

【 0 0 3 3 】

本明細書において、単数形である「a」、「and」および「the」は、文脈が特に明確に示さない限り、複数の指示対象を包含して用いられる。作業例または別段の指示がある場合を除き、本出願において用いられる、成分、反応条件などの量を表す数の全ては、用語「約」により、全ての場合において修正されると理解すべきである。従って、反対のことが示されない限り、本出願に記載された数字パラメータは近似値であり、本発明により得ようとする所望の特性に応じて変化し得る。

[実施例]

【 0 0 3 4 】

以下の実施例は、本発明のいくつかの態様を例証するため、および当業者が本発明を実施する助けとなるように提供される。これらの実施例は本発明の範囲をなんら限定するものではない。

【 0 0 3 5 】

《 統計解析 》

本研究の全ての数値は、少なくとも三つの独立した実験の、平均値 ± S . E . M . (平均値の標準誤差) である。実験群間の統計学的な有意差は、S P S S ソフトウェアを用いて、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と、引き続くシェッフエの事後比較 (Scheffe for Post Hoc comparison) により分析した。最小の有意水準は、0 . 0 5 未満の p 値である。

【 0 0 3 6 】

《 マウス s i R N A の構築および気道炎症抑制におけるそれらの利用 》

[実施例 1] マウス G a t a - 3 s i R N A コンストラクトの作製および得られた G a t a - 3 s i R N A の E L - 4 細胞へのトランスフェクション

< マウス G a t a - 3 s i R N A の構築 >

g a t a - 3 s i R N A の調製に選ばれた三つのマウス g a t a - 3 標的配列は、位

置 3 1 6 ~ 3 3 6 における標的配列、G A A G C T C A G T A T C C G C T G A C G (配列番号 1) を用いた s i R N A 1、位置 1 7 3 3 ~ 1 7 5 3 における標的配列、C C A C T G A A T C C G G A T C C C A T T (配列番号 2) を用いた s i R N A 2、および位置 1 3 0 6 ~ 1 3 2 4 における標的配列、G A T G T C T A G C A A A T C G A A A (配列番号 3) を用いた s i R N A 3 であった。陰性対照 s i R N A (Ambion社、Austin、Texas、USA から提供された市販キット) は、製造者の説明書 (Ambion社) に従い、P C R 由来の s i R N A 発現カセットにより合成し、次いで、p S E C^T M h y g r o プラスミド (Ambion社) にクローニングした。s i R N A 発現カセット、およびマウス g a t a - 3 s i R N A の p S E C^T M h y g r o プラスミドにおける構築を、それぞれ図 1 A および図 1 B に示す。

10

【 0 0 3 7 】

< 合成マウス g a t a - 3 s i R N A コンストラクトを E L - 4 細胞にトランスフェクトする >

マウスリンパ腫細胞系である E L - 4 細胞 (American Type Cell Culture から取得、 4×10^5 細胞 / m l) を 6 穴プレートにおいて維持および培養し、次の日に、リポフェクタミン 2 0 0 0 (Invitrogen社、Carlsbad、CA USA) を用いて、実施例 1 のプラスミドをトランスフェクトした。具体的には、マウス g a t a - 3 s i R N A を含有する p S E C^T M h y g r o プラスミド 5 μ g およびリポフェクタミン 2 0 0 0 9 μ l を、抗生物質無添加の D M E M 培地中、室温で 2 5 分間放置し、複合体を形成させた。次いで、6 穴プレートにおいて維持および培養している E L - 4 細胞にこの複合体を加え、更に 2 4 時間培養した。s i R N A の発現率が高い細胞を選択するために、マウス g a t a - 3 s i R N A を発現する細胞の安定したクローン、および陰性対照の s i R N A の安定したクローンを、ハイグロマイシン 5 0 0 μ g / m l を含有する培地を用いて選択し、選択されたクローンを、ハイグロマイシン 2 5 0 μ g / m l を含有する培地で維持した。E L - 4 細胞におけるマウス g a t a - 3 s i R N A のトランスフェクションは、R T - P C R 分析による R N A レベルでの、または E L I S A 法によるタンパク質のレベルでのマウス g a t a - 3 遺伝子の発現の検出によって確認した。

20

【 0 0 3 8 】

(R T - P C R)

マウス g a t a - 3 s i R N A をトランスフェクトした E L - 4 細胞の全 R N A は、R N A b e e (AMS Biotechnology社製、Abingdon、UK) を用いて、製造者の説明書に従って単離した。G A T A - 3 と β -アクトチンの相対量を定量するために、R T - P C R を行った。R N A の逆転写は、終体積 2 0 μ l で行った。反応チューブには、5 倍の第一鎖緩衝液 (5 0 m M の T r i s - H C l、3 m M の M g C l₂) 4 μ l、1 0 m M の 4 種類のデオキシヌクレオチドの混合物 1 μ l、0 . 1 M のジチオトレイトール 1 μ l、およびスーパースクリプト逆転写酵素 1 μ l が入っていた。終体積 1 2 μ l の R N A および脱イオン水を、1 0 分間 7 0 °C で加熱し、その後、氷上で冷却した。R N A サンプルを反応チューブに添加し、5 0 分間 4 2 °C でインキュベートし、1 0 分間、7 0 °C まで加熱して逆転写酵素を変性させ、次いで - 2 0 °C で保存した。マウス G A T A - 3 のプライマー配列は、センス鎖が G A A G G C A T C C A G A C C C G A A A C (配列番号 6 1) であり、アンチセンス鎖が A C C C A T G G C G G T G A C C A T G C (配列番号 6 2) であり、マウス β -アクトチンの方は、センス鎖が A A G G T G T G A T G G T G G G A A T G (配列番号 6 3) であり、アンチセンス鎖が A T G G C T A C G T A C A T G G C T G G (配列番号 6 4) であった。P C R 反応混合物に、次の構成成分を添加した：2 . 5 μ M の d N T P 0 . 5 μ l、センスプライマーおよびアンチセンスプライマー 2 . 5 μ l、1 0 倍の P C R 緩衝液 2 . 5 μ l、c D N A 1 μ l、T a q ポリメラーゼ 0 . 1 μ l、および脱イオン水 1 5 . 9 μ l。3 分間 9 4 °C の初期インキュベーションの後、これらのプライマーを、以下のようなサイクルにより増幅した： β -アクトチンについては (1) 3 0 秒間 9 4 °C、(2) 4 5 秒間 5 6 °C、(3) 4 0 秒間 7 2 °C、および、G A T A - 3 については (1) 1 分間 9 4 °C、(2) 1 分間 6 2 °C、(3) 1 分間 7 2 °C、最終インキュベ

30

40

50

ションは10分間72。

【0039】

増幅の後に、PCR産物を、TBE緩衝液(80mMのTris-ホウ酸、2mMのEDTA、pH8.0)中に調製した2%のアガロースゲルにおいて、100ボルトで0.5時間行う電気泳動に供した。電気泳動の後に、ゲルを0.1 μ g/mlの臭化エチジウムで染色し、紫外線で観察し、撮影した。

【0040】

(ELISA法)

実施例1のEL-4細胞(1 \times 10⁷細胞/ml)を、氷冷リン酸緩衝食塩水で二度洗浄した。次に、それぞれのディッシュに溶解緩衝液(50mMのTris-HCl、1%のNP-40、150mMのNaCl、1mMのEGTA、1mMのフッ化フェニルメチルスルホニル、1mg/mlのロイペプチン、1mg/mlのペプスタチン、0.5MのNaVO₄、pH7.4)200 μ lを添加し、溶解された細胞をディッシュからスクレーピングし、次いでエッペンドルフチューブ中、30分間4でインキュベートした。次に、これらのエッペンドルフチューブを14,000rpmの回転速度で、4にて20分間遠心し、それぞれのエッペンドルフチューブから上清を収集した。収集した上清のアリコートをし、4倍のタンパク質サンプル緩衝液(31.25mMのTris-HCl pH6.8、1%のSDS、25%の β -メルカプトエタノール、0.00625%のプロモフェノールブルー、および50%(v/v)のグリセリン)と混合し、5分間煮沸した。タンパク質サンプルは、10%のSDS-PAGEゲルにかけ、電気泳動したタンパク質をPVDF膜に転写した。次に、膜を、0.1%のツイーンを含有するトリス緩衝生理食塩水中の5%のミルクによりブロッキングし、一次抗体と共にインキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体を用い、バンドを、製造者の説明書(PerkinElmer Life Science社、Boston、MA)に従って、化学発光試薬により検出した後、X線フィルムに暴露した。

10

20

[実施例2]

【0041】

実施例1のEL-4細胞におけるサイトカイン放出に対するマウスgata-3 RNAiの効果

gata-3 siRNAコンストラクトのアレルギー関連Th2サイトカイン遺伝子発現の抑制における効果を更に確認するために、実施例1のEL-4細胞により分泌されたサイトカインのレベルを測定した。この目的のために、3日間の感染の後、実施例1のEL-4細胞を、ホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA、5ng/ml)およびcAMP(500 μ M)の併用投与有りまたは無しで24時間刺激し、次いで、gata-3遺伝子発現およびGATA-3タンパク質発現の測定のため、細胞の培地を実施例1に記載の手順に従って収集し、サイトカイン(IL-4およびIL-5を含む)放出を以下に述べる手順に従って測定した。

30

【0042】

(サイトカインの測定)

サイトカインのレベルは、サンドイッチELISA法により検出した。簡潔に述べると、NaHCO₃緩衝液(pH9.6)で希釈した抗サイトカイン抗体(抗IL-4抗体または抗IL-5抗体)を96穴培養ディッシュに添加し、4で一晩インキュベートした。翌日、培養ディッシュを、室温で一時間以内に、3%BSAを含むPBSで3回リンスした。次に、検査するサンプルを添加して、37で2時間、または4で一晩反応させた。反応終了後、1%BSAを含むPBSで希釈したビオチン共役抗サイトカイン抗体を培養ディッシュに添加し、室温で1時間インキュベートした後に、ストレプトアビジン共役ペルオキシダーゼを添加し、更に1時間反応させた。最後に、酵素基質液(o-フェニレンジアミン4mgを、0.001% H₂O₂を含む0.1Mのリン酸-クエン酸緩衝液20mlに溶解したもの)0.2mlをそれぞれのウェルに添加して、室温で30分間、暗所に放置した。各ウェルの450nmの吸光度は、マイクロプレートオトリーダーで

40

50

検出し、読み込んだ。このサンドイッチELISA法の感度は、それぞれIL-4が15 pg/ml、IL-5が20 pg/mlであった。

【0043】

結果を図2に示す。対照群と比べると、gata-3遺伝子(図2A)およびGATA-3タンパク質(図2B)の両者のレベルは、PMAおよびcAMPの併用投与有りです著しく抑制されており、gata-3のRNAiが、PMA依存のおよびcAMP依存的な遺伝子およびタンパク質の両者の発現を妨害するのに有効であることが示された。更に、PMAおよびcAMPの併用投与の刺激により放出されたIL-4およびIL-5の両者のレベルも、gata-3遺伝子の発現を介したgata-3 RNAiにより抑制された。

10

[実施例3]

【0044】

マウス喘息モデルに対するGata-3 RNAiの効果

<3.1 レンチウイルスベクターへのマウスgata-3 siRNAのクローニング>

実施例1に記載のsiRNA1、siRNA2およびsiRNA3を含むマウスgata-3 siRNAを、TAクローニング法により、pGEM-T Easyベクター(Promega社、Madison、WI)にクローニングし、制限酵素により、siRNAを含むpGEM-T EasyベクターをEcoRIサイトで切断した。両端にEcoRIサイトを有するsiRNA断片をpTYリンカー(図1C)にクローニングした。この実験に用いるレンチウイルスベクターは、Dr. Li-Hua Hwang(国立台湾大学附属病院肝臓病研究センター)により提供された三代目の自己不活性化ベクター(self-inactivated vector、SIV)であった。siRNAレンチウイルスベクターは、HEK-293T細胞のリン酸カルシウム媒介性の一過性トランスフェクションにより産生した。簡潔に述べると、HEK-293T細胞に、ヘルパーコンストラクト、エンベローププラスミド、tatプラスミド、およびレンチウイルスベクタープラスミドを含む適切な量のベクタープラスミドを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの翌日、ウイルスを培養上清から収集し、超遠心分離法により33倍濃縮した。EL-4における形質導入に用いた種々のウイルスベクターの濃度は、MOI=1.4であった。

20

【0045】

<3.2 Gata-3 siRNAレンチウイルスのマウス喘息モデルにおける適用>(マウス喘息モデル)

雌のBALB/cマウスは、国立台湾大学医学部実験動物センター(台湾、R.O.C.)から購入し、そこで維持した。動物は、6~10週齢で使用し、各実験において年齢を一致させた。動物実験プロトコルは、国立台湾大学医学部動物委員会(台湾、R.O.C.)で認可されており、以下に簡単に述べる。第0日に、マウスを、卵白アルブミン(OVA)(Grade V、Sigma chemical co.、St. Louis、MO)50 µgを水酸化アルミニウム(AlumImject、Pierce Chemical、Rockford、IL)4 mgに乳化して総容積200 µlとしたものを腹腔内(i.p.)に注射することにより感作した。全てのマウスを、それぞれ第14日および第28日に、水酸化アルミニウム4 mgに乳化した卵白アルブミン25 µgを再度注射することにより追加免疫した。陰性対照群のマウスには、リン酸緩衝液(PBS)を注射した。第35日に、各動物の血清中のOVA-IgEを測定した。第40日に、実施例3.1のレンチウイルスsiRNA(siRNA1、siRNA2およびsiRNA3を含み、それぞれ 2.2×10^6 IFU)を、麻酔した動物の気管内に(i.t.)送達し、第42~44日に、鼻腔内でOVA(100 µg)によりチャレンジした。偽ウイルス(mock virus)(陰性対照のsiRNAレンチウイルスベクター)または生理食塩水を対照として用いた。予備的な力価測定の結果(データ示さず)により、 1×10^5 PFUのレンチウイルスが選択された。気管内注入のために、生理食塩水50 µl中のウイルスを、0.61 mm(OD)のポリエチレン管が装備されたカテーテルにより注入した。第45日に、各動物の気道過敏性(airway hyperresponsiveness、AHR)

30

40

50

を測定し、第46日に全てのマウスを出血させ犠牲にし、実験を終わらせ、肺胞洗浄液 (BALF) における細胞プロファイルおよびサイトカインレベルの測定を含む更なる分析のために、肺細胞を単離した。図3は、本研究に用いた上記のプロトコルのスケジュールを示す。

【0046】

(OVA特異的IgE、IgG1およびIgG_{2a}の測定)

OVA特異的IgE、IgG1 (Th2反応を示す) およびIgG_{2a} (Th1反応を示す) は、既述のように、サンドイッチELISA法により測定した (Lee et al., "Construction of single chain interleukin 12 plasmid to treat airway hyper-responsiveness in an animal model of asthma", Human Gene Therapy (2001) 12:2065-2079) 。OVA 2 μg/ml をELISAプレートにコートし、4 で一晩インキュベートした。ELISAプレートを、0.05% ツイーン20を含むPBSにより洗浄し、希釈した血清 (OVA特異的IgE抗体は10倍希釈、OVA特異的IgG1およびIgG_{2a}抗体は100倍希釈) をプレートに添加し、室温で2時間インキュベートした。その後、ビオチン共役抗IgE、抗IgG1および抗IgG_{2a}抗体、およびアルカリフォスファターゼ共役アビジン (Sigma社、St.Louis、MI、USA) を添加した。酵素活性は、TMB緩衝液 (KPL Gaithersburg社、MI、USA) を基質として用い、酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) リーダー (MRX-TC、Dynex Technology社、Chantilly、VA、USA) を使用して評価した。450 nmでの測定値を、検量線から得た数値により、1ミリリットル当たりのナノグラムに換算した。検量線は、既知濃度の精製されたマウスIgE、IgG1およびIgG_{2a} (Pharmingen社、San Diego、CA) を、系列希釈することで得た。結果を図4に示す。陽性対照と比べると、siRNAの投与により、単独投与でも併用投与でも、IgE、IgG1およびIgG_{2a}を含むOVA特異的抗体の全てが同程度に誘導されたことが明らかである。

【0047】

(サイトカインの測定)

実施例3.2の動物から収集したBALFにおけるサイトカインのレベルは、実施例2に記載の手順に従って、ELISA法により検出した。結果は図5に示す。gata-3 siRNA2またはgata-3 siRNA3を投与した動物において、単独投与でも併用投与でも、エオタキシンのレベルは、陽性対照群の動物のエオタキシンのレベルより顕著に低かった (図5)。

【0048】

(BALFにおける細胞プロファイルの測定)

実施例3.2の動物から収集したBALFにおける、マクロファージ、好酸球、好中球およびリンパ球を含む細胞プロファイルは、劉氏染色法 (Lee et al., "Administration of IL-12 exerts therapeutic instead of longterm preventive effect on Der p1 allergen-induced animal model of airway inflammation". (1999) Immunology 97: 232-240.) により確認し、結果は図6に示す。gata-3 siRNA2またはgata-3 siRNA3を投与された動物において、単独投与でも併用投与でも、好酸球の数が顕著に減少しており、それは、実施例3.1のsiRNAが、炎症の指標となる好酸球の活性化をうまく抑制したことを示している。

【0049】

(AHRの測定)

バロメトリック全身プレチスモグラフィ (barometric whole body plethysmography) (Buxco、Troy、NY、USA) により、無拘束の動物のAHRを測定した。簡潔に述べると、マウスをメインチャンパーに置いて、ベースライン値を取得し、3分間平均化した。漸増濃度のエアロゾル化したPBSまたはメタコリン (MCh) (3.125 ~ 25 mg/ml) を、メインチャンパーの入口から3分間噴霧し、毎回の噴霧後、測定値を取得し、3分間平均化した。毎分の呼吸回数を決定するために、十呼吸毎の記録値を外挿した。気道反応性は、増大する休止 (enhanced pause、Penh) として表現され、データは、Ho

10

20

30

40

50

ganらが記載した手順 (“ Aeroallergen-induced eosinophilic inflammation, lung damages and airway hyper-reactivity in mice can occur independently of IL-4 and allergen-specific immunoglobulins ”, (1997) J. Clin. Invest. 99:1329-1339.) により、3回の独立実験から得られた $P_{enh_{MCh}}$ 値の $P_{enh_{PBS}}$ 値に対する比率として表した。

【0050】

結果を、図7に示す。対照動物と比べると、*siRNA* 1、*siRNA* 2または*siRNA* 3を投与した動物では、*MCh* 誘導 *AHR* が顕著に減少していることがわかり、*IL-5* およびエオタキシン遺伝子の発現の抑制が、アレルギー関連症状を緩和するのに有効であることを更に確認した。

10

[実施例4]

【0051】

マウス *RNAi* による *IL-5* およびエオタキシンの発現の抑制

実施例1に記載したのと同様の手順によって、*IL-5 RNAi* およびエオタキシン *RNAi* の標的配列を選択して合成した。具体的には、マウス *IL-5 siRNA* の産生のために、位置263~283における標的配列、*AAGAATCAAACTGTCCGTGGG* (配列番号4)を用いた *siRNA* 4、位置636~656における標的配列、*AAGAAATTCCTGTAGCGCAGG* (配列番号5)を用いた *siRNA* 5、および位置1166~1186における標的配列、*AATCAGACTGTGCCATGACTG* (配列番号6)を用いた *siRNA* 6を含む、*IL-5* の三つの標的配列を選択した。位置134~152における標的配列、*CTTCCTGCTGCTTTATCAT* (配列番号7)を用いた *siRNA* 7、位置282~294における標的配列、*GTGGGTCCAGGATGCCACA* (配列番号8)を用いた *siRNA* 8、および位置583~595における標的配列、*CACAATGGGACGAGTTAGG* (配列番号9)を用いた *siRNA* 9を含む、エオタキシンの三つの標的配列が、マウスエオタキシン *siRNA* の産生のために、選択され使用された。

20

【0052】

選ばれたマウス *siRNA* (即ち、*siRNA* 4、*siRNA* 5および *siRNA* 6) による、*EL-4* 細胞における *IL-5* の発現の抑制は、実施例2に記載した手順に従って、*ELISA* により検出し、結果は図8に示す。*IL-5* の発現は、合成されたマウス *siRNA* のいずれかにより顕著に抑制された。

30

【0053】

同様に、*siRNA* (即ち、*siRNA* 7、*siRNA* 8および *siRNA* 9) によるエオタキシンの発現の抑制を図9に示す。簡潔に述べると、雌 *BALB/C* マウスの初代培養肺細胞を調製し、48穴プレートで培養し、37℃ でインキュベートした。次いで、培養肺細胞に、エオタキシン *siRNA* を含むベクターをトランスフェクトし、発現したエオタキシンを *ELISA* により検出した。その結果は、エオタキシン/*IL-4* の発現が、両方とも、選ばれた合成マウスエオタキシン *siRNA* により顕著に抑制されたことを示した。

40

【0054】

IL-5 RNAi およびエオタキシン *RNAi* に係る *siRNA* は、実施例3.1の手順に従って、レンチウイルスベクターにクローニングし、次いで、実施例3.2のマウス喘息モデルに、同様の方法で適用し、*AHR*、*BALF* における細胞集団、およびサイトカインレベルを、実施例3.2に記載した手順に従って測定した。結果は、図10~13に示す。

【0055】

図10は、気道過敏性の *IL-5* /エオタキシン *siRNA* による影響を示す。図11は、*IL-5* /エオタキシン *siRNA* で前処置した動物から収集した *BALF* における、単球 (図11A)、好中球 (図11B)、リンパ球 (図11C) および好酸球 (図11D) を含む細胞集団を示す。図12は、*IL-5* /エオタキシン *siRNA* で前処置した

50

動物から収集したBALFにおける、IL-5（図12A）およびエオタキシン（図12B）を含むサイトカインの濃度を示す。図13は、IL-5/エオタキシン*siRNA*で前処置した動物における、IgE、IgG1、およびIgG_{2a}を含むOVA特異的抗体の血清レベルを示す。

[実施例5]

【0056】

IL-4およびIL-13*RNAi*のためのマウス*siRNA*の単離、および気道炎症の抑制におけるそれらの利用

実施例1に記載したのと同様の手順に従って、*siRNA*を産生するために、IL-4*RNAi*およびIL-13*RNAi*の標的配列を選び、用いた。具体的には、マウスIL-4*siRNA*の産生のために、位置336~356における標的配列、AAGCTGCACCATGAATGAGTC（配列番号10）を用いた*siRNA*10、位置181~201における標的配列、AACACCACAGAGAGTGAAGCTC（配列番号11）を用いた*siRNA*11、および位置47~67における標的配列、AATGTACCAGGAGCCATATCC（配列番号12）を用いた*siRNA*12を含む、三つのIL-4配列を用いた。位置238~258における標的配列、AATGCCATCTACAGGACCCAG（配列番号13）を用いた*siRNA*13、位置154~174における標的配列、ACGGCAGCATGGTATGGAGT（配列番号14）を用いた*siRNA*14、および位置100~120における標的配列、AAGGAGCTTATTGAGGAGCTG（配列番号15）を用いた*siRNA*15を含む、三つのIL-13のマウス*siRNA*を合成した。

【0057】

単離されたマウスIL-4および/またはIL-13*siRNA*は、上記と同様の方法で試験し、その結果により、これらの単離されたマウスIL-4および/またはIL-13*siRNA*が、IL-4および/またはIL-13遺伝子の発現を抑制し、且つアレルギー関連症状の緩和にも有効であることが確認された（結果は記載せず）。

[実施例6]

【0058】

気道炎症の抑制におけるマウス*siRNA*の用量効果

マウス*siRNA*、特に*siRNA*5（配列番号5によりコードされるRNA配列に相補的な配列を有する）を、実施例3.1の手順に従って、レンチウイルスにクローニングし、高用量（ 3×10^6 IFU/匹）、中用量（ 1.5×10^6 IFU/匹）および低用量（ 3×10^5 IFU/匹）の3種類の用量の、*siRNA*5を含むウイルスベクターを、それぞれ実施例3.2のマウス喘息モデルに適用し、AHR、BALFにおける細胞集団、サイトカインレベル、および血清抗体レベルを、実施例3.2に記載した手順に従って測定した。結果は図14~17に示す。

【0059】

図14は、気道過敏性におけるマウス*siRNA*5の用量効果を示す。図15は、それぞれ高用量、中用量、および低用量の*siRNA*5で前処置した動物から収集したBALFにおける、単球、リンパ球、好塩基球および好酸球を含む細胞集団を示す。図16は、それぞれ高用量、中用量、および低用量の*siRNA*5で前処置した動物から収集したBALFにおける、エオタキシンの濃度を示す。図17は、それぞれ高用量、中用量、および低用量の*siRNA*5で前処置した動物の、IgE、IgG1およびIgG_{2a}を含むOVA特異的抗体の血清レベルを示す。結果は、マウス*siRNA*5の全ての選ばれた用量は、アレルギー関連症状の緩和に有効であり、中用量の*siRNA*5が最も顕著な効果を表す好ましい用量であることを示す。

[実施例7]

【0060】

《ヒト*siRNA*の構築および気道炎症の抑制におけるそれらの利用》

ヒト*siRNA*の単離

10

20

30

40

50

< 7.1 ヒト siRNA 発現ベクターの構築 >

ヒト siRNA が pRNA T-H1.1/Retro (SD1255, GenScript 社、NJ、USA) プラスミド (図 18) にクローニングされ、また、これらのヒト siRNA 発現プラスミドが リポフェクタミン (Invitrogen 社、Gaithersburg, MD) により A549 細胞 (ヒト肺胞基底上皮細胞系 (alveolar basal epithelial cell line)) または BEAS-2B 細胞 (ヒト気管支上皮細胞系) にトランスフェクトされ、且つトランスフェクトされた 48 時間後に、選択のために G418 ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$) を 14 日に亘って添加した以外は、実施例 1 に記載したのと同様の手順に従って、siRNA を産生するために、ヒト RNAi の標的配列を選び、用いた。例えば、ヒト siRNA の産生のために、三つの IL-5 配列を使用した。それらは、位置 196 ~ 216 における標的配列、GGATTCTGTTCCTGTACATA (配列番号 34) を用いた siRNA 19、位置 328 ~ 348 における標的配列、AGAAATACATTGACGGCCAAA (配列番号 35) を用いた siRNA 20、および位置 457 ~ 477 における標的配列、CTGGTTTGTTCAGCCAAAAGA (配列番号 36) を用いた siRNA 21 を含む。それぞれ gata-3、エオタキシン、IL-4、IL-5 および IL-13 についてこのように産生された siRNA 16 ~ 30 を含むヒト siRNA を表 2 に示す。

10

【0061】

< 7.2 リアルタイム定量 PCR >

GeneStripTM ハイブリダイゼーションチューブ (RNAure 社、CA、USA) を使用し、選ばれた siRNA の発現ベクターをトランスフェクトした A549 細胞から、mRNA を抽出した。ランダムヘキサマープライマーおよび SuperScriptTM II RNase H⁻ 逆転写酵素 (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) により、製造者の説明書に従って、cDNA 合成を行った。ABI PRISM 7700 サイクルアンプ (Applied Biosystems 社、Foster City, CA, USA) において、ヒト IL-5 またはエオタキシンの TaqMan 遺伝子発現アッセイ (Applied Biosystems 社、Foster City, CA, USA) を用いて、定量リアルタイム PCR を行った。全ての報告された mRNA のレベルは、GAPDH mRNA のレベルで標準化した。例として、siRNA 22、23 および 24 を含むエオタキシン-1 に対するヒト siRNA の BEAS-2B 細胞へのトランスフェクション効率を図 19 に示す。

20

【0062】

< 7.3 ヒトエオタキシン-1 を標的とする siRNA の抑制効果 >

ウイルスで形質転換したヒト気管支上皮細胞系 BEAS-2B は、ヒト TNF- α およびヒト IL-4 の刺激により、エオタキシン-1 を分泌することができる。ヒトエオタキシン-1 を標的とする siRNA の抑制効果を研究するために、siRNA をトランスフェクトした BEAS-2B 細胞を、ヒト TNF- α ($50 \text{ ng}/\text{ml}$) およびヒト IL-4 ($50 \text{ ng}/\text{ml}$) により、各々 24 時間および 48 時間刺激した。上清におけるエオタキシン-1 の濃度を、ELISA により検出した。BEAS-2B 細胞におけるヒトエオタキシン-1 を標的とする siRNA の抑制効果は、図 20 に示す。刺激の 24 時間後、siRNA 23 をトランスフェクトした BEAS-2B 細胞におけるエオタキシン-1 の産生は、対照細胞 (即ち、空のベクターをトランスフェクトした BDAS-2B 細胞) と比べると、 $9 \pm 14\%$ という低レベルに減少した。刺激の 48 時間後、siRNA 23 または siRNA 24 をトランスフェクトした BEAS-2B 細胞におけるエオタキシン-1 の産生は、対照群と比べると、それぞれ $29 \pm 4\%$ または $55 \pm 3\%$ に減少した。

30

40

【0063】

< 7.4 ヒト gata-3、IL-4 または IL-13 を標的とする siRNA の抑制効果 >

Jurkat 細胞には、実施例 7.1 に記載の手順に従って構築したヒト siRNA をトランスフェクトし、gata-3、IL-4 または IL-13 の遺伝子発現に対する抑制効果は、実施例 7.2 に記載の手順によって、リアルタイム PCR を用いてモニターした。結果は図 21 に示す。

50

【 0 0 6 4 】

【 表 1 】

表 1 選ばれた標的遺伝子およびマウス s i R N A の配列

標的 遺伝子	位置	核酸配列 (センス鎖)	s i R N A の番号	リボ核酸配列 (センス鎖)
Gata-3	316-336	GAAGCTCAGTATCCGCTGACG (配列番号 1)	1	GAAGCUCAGUAUCCGCUGACG (配列番号 16)
	1733-1753	CCACTGAATCCGGATCCCATT (配列番号 2)	2	CCACUGAAUCCGGAUCCCAU (配列番号 17)
	1306-1324	GATGTCTAGCAAATCGAAA (配列番号 3)	3	GAUGUCUAGCAAUUCGAAA (配列番号 18)
IL-5	263-283	AAGAATCAAACGTCCGTGGG (配列番号 4)	4	AAGAAUCAAACUGUCCGUGGG (配列番号 19)
	636-656	AAGAAATTCCTGTAGCGCAGG (配列番号 5)	5	AAGAAUUCUUGUAGCGCAGG (配列番号 20)
	1166-1186	AATCAGACTGTGCCATGACTG (配列番号 6)	6	AAUCAGACUGGCCAUGACUG (配列番号 21)
エオタキ シン	134-152	CTTCCTGCTGCTTTATCAT (配列番号 7)	7	CUUCCUGCUGUUUAUCAU (配列番号 22)
	282-294	GTGGGTCCAGGATGCCACA (配列番号 8)	8	GUGGGUCCAGGAUGCCACA (配列番号 23)
	583-595	CACAATGGGACGAGTTAGG (配列番号 9)	9	CACAAUGGGACGAGUUAGG (配列番号 24)
IL-4	47-67	AAGCTGCACCATGAATGAGTC (配列番号 10)	10	AAGCUGCACCAUGAAUGAGUC (配列番号 25)
	181-201	AACACCACAGAGAGTGAGCTC (配列番号 11)	11	AACACCACAGAGAGUGAGCUC (配列番号 26)
	336-356	AATGTACCAGGAGCCATATCC (配列番号 12)	12	AAUGUACCAGGAGCCAUUCC (配列番号 27)
IL 13	100-120	AATGCCATCTACAGGACCCAG (配列番号 13)	13	AAUGCCAUCUACAGGACCCAG (配列番号 28)
	154-174	AACGGCAGCATGATGGAGT (配列番号 14)	14	AACGGCAGCAUGGUAUGGAGU (配列番号 29)
	238-258	AAGGAGCTTATTGAGGAGCTG (配列番号 15)	15	AAGGAGCUUAUUGAGGAGCUG (配列番号 30)

10

20

30

【 0 0 6 5 】

【表 2】

表 2 選ばれた標的遺伝子およびヒト s i R N A の配列

標的 遺伝子	位置	核酸配列 (センス鎖)	s i R N A の番号	リボ核酸配列 (センス鎖)
Gata-3	537-557	CGAGAAAGAGTGCCTCAAGTA (配列番号 31)	16	CGAGAAAGAGUGCCUCAAGUA (配列番号 46)
	1080-1100	CATCCAGACCAGAAACCGAAA (配列番号 32)	17	CAUCCAGACCAGAAACCGAAA (配列番号 47)
	185-205	CCTACTACGGAACTCGGTCA (配列番号 33)	18	CCUACUACGGAAACUCGGUCA (配列番号 48)
IL-5	196-216	GGATTCCTGTTCTGTACATA (配列番号 34)	19	GGAUUCCUGUCCUGUACAUA (配列番号 49)
	328-348	AGAAATACATTGACGGCCAAA (配列番号 35)	20	AGAAAUACAUUGACGGCCAAA (配列番号 50)
	457-477	CTGTTTGTTCAGCCAAAGA (配列番号 36)	21	CUGGUUUGUUGCAGCCAAAGA (配列番号 51)
エオタキシ ン	749-769	TTGTAAGGTCTGGCAAAGA (配列番号 37)	22	UUGUAAAGGUCCUGGCAAAGA (配列番号 52)
	269-289	TTCAGCGACTAGAGAGCTACA (配列番号 38)	23	UUCAGCGACUAGAGAGCUACA (配列番号 53)
	335-355	AGACCAAACCTGGCCAAGGATA (配列番号 39)	24	AGACCAAACUGGCCAAGGAUA (配列番号 54)
IL-4	133-153	AAGAACAACAAGTGAAGGAA (配列番号 40)	25	AAGAACAACAACUGAGAAGGAA (配列番号 55)
	355-375	AACTTCTTGAAAGGCTAAAG (配列番号 41)	26	AACUUCUUGGAAAGGCUAAAG (配列番号 56)
	87-107	CACCTTACAGGAGATCATCAA (配列番号 42)	27	CACCUUACAGGAGAUCAUCA (配列番号 57)
IL-13	389-409	AGGACCTGCTCTTACATTTAA (配列番号 43)	28	AGGACCTGCTCTTACATTTAA (配列番号 58)
	137-157	TCATTGAGGAGCTGGTCAACA (配列番号 44)	29	UCAUUGAGGAGCUGGUCAACA (配列番号 59)
	431-451	AGTTCAACCGAAACTTCGAAA (配列番号 45)	30	AGUUCAACCGAAACUUCGAAA (配列番号 60)

10

20

30

40

50

【産業上の利用可能性】

【0066】

本発明の利点は、g a t a - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 13またはエオタキシ
ン遺伝子などの気道炎症関連遺伝子の少なくとも一種の発現を妨害するように特別に設計
された s i R N A の利用により、アレルギー疾患を治療する新規な方法を提供すること
である。本発明による s i R N A、方法および組成物は、炎症を阻害し、アレルギーを抑制
するように、宿主の免疫を高めることができ、それによって、対象の気道炎症を最小化お
よび/もしくは軽減することにより、花粉症、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、
呼吸窮迫症候群、アトピー性皮膚炎およびアナフィラキシーショックなどのアレルギー疾
患を患っている対象に治療を提供する。

【0067】

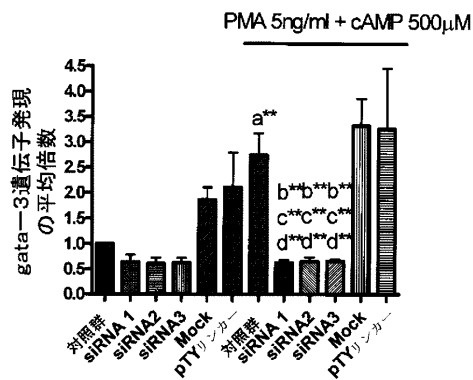
前述の本発明の様々な実施形態の記述は、例示および説明を目的として提示した。それ
は完全であること、または、本発明を開示した実施形態にだけに限定することを意図する
ものではない。数多くの修正または変更が上記教示に照らして可能である。論じた実施形
態は、本発明の原理の最適な例示、およびその実用的な用途を提供して、当業者が、本発
明を、意図する特定の用途に適した様々な実施形態で、および様々な修正を伴って利用で
きるように選択し、記述した。全てのかかる修正および変更は、適正、適法、且つ公正に

与えられた範囲に従って解釈した添付の特許請求の範囲により決定される本発明の範囲内にある。

【図2A】

【図2】

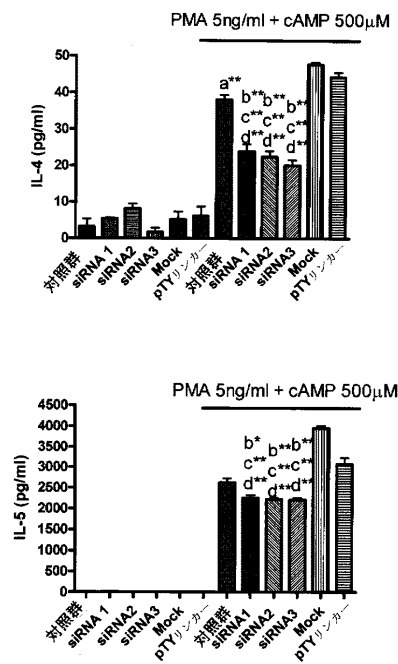
(A)



【図2C】

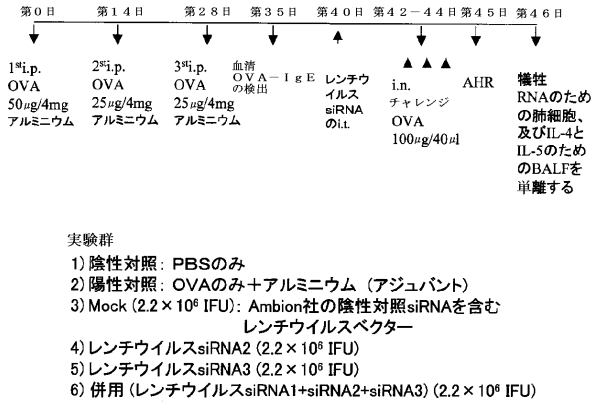
【図2】

(C)



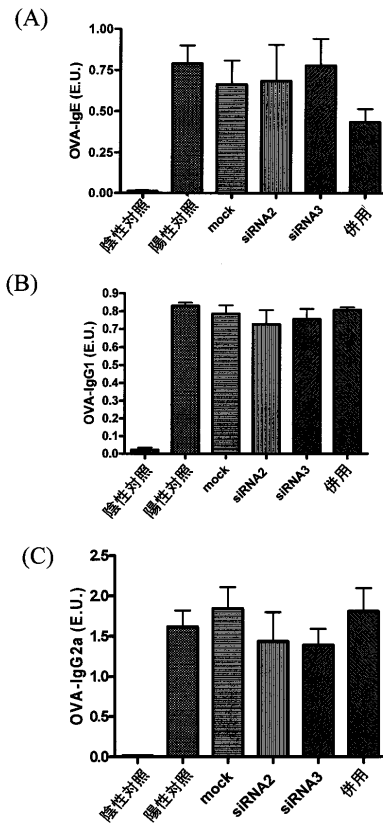
【 図 3 】

【図3】



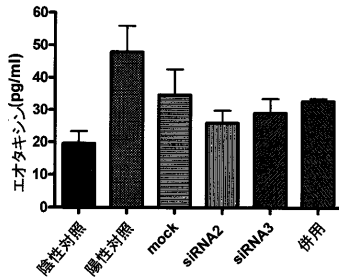
【 図 4 】

【図4】



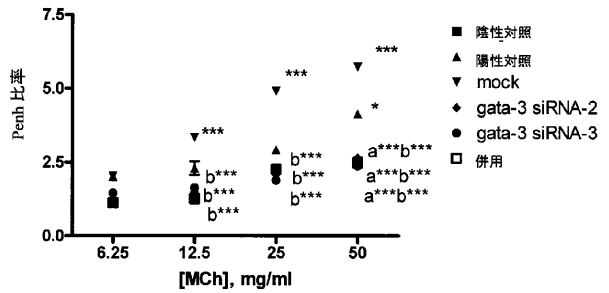
【 図 5 】

【図5】



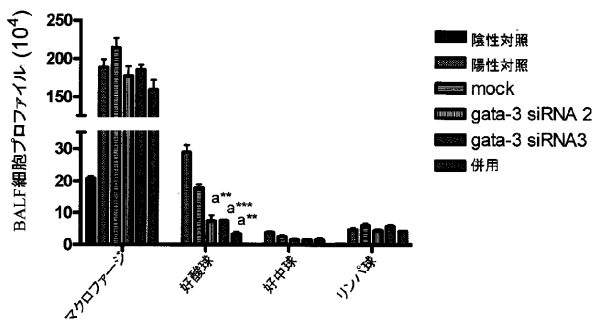
【 図 7 】

【図7】



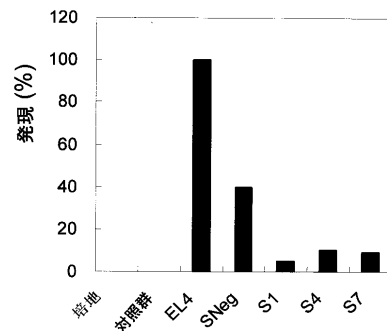
【 図 6 】

【図6】



【 図 8 】

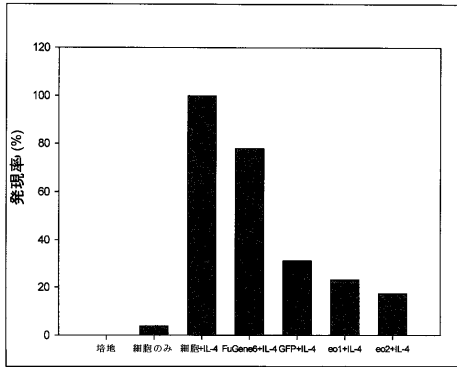
【図8】



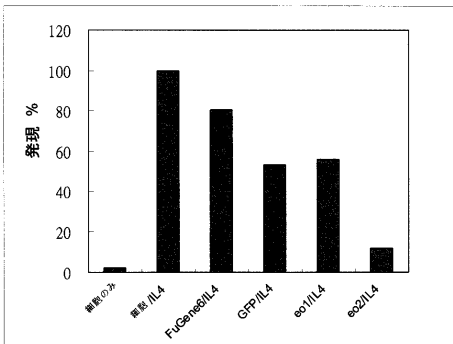
【図9】

【図9】

(A)

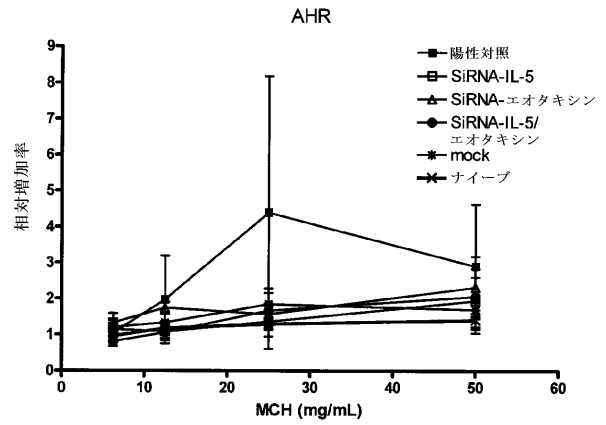


(B)



【図10】

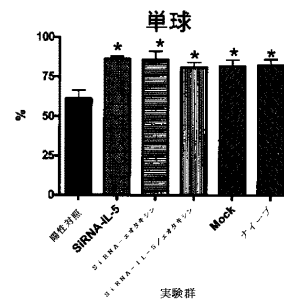
【図10】



【図11A】

【図11】

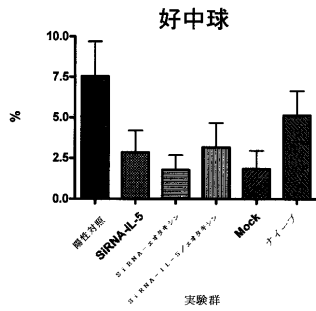
(A)



【図11B】

【図11】

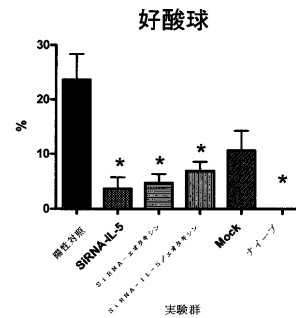
(B)



【図11D】

【図11】

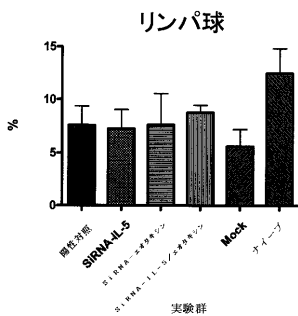
(D)



【図11C】

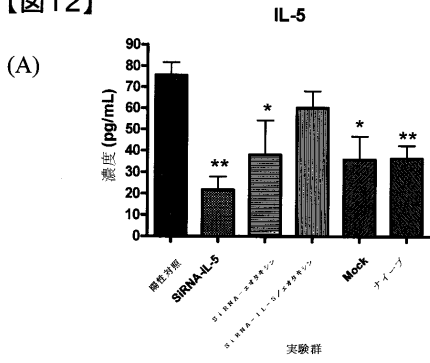
【図11】

(C)

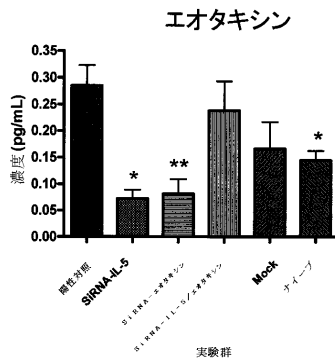


【 図 1 2 】

【 図 12 】

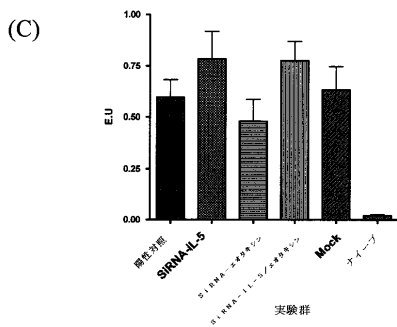


(B)



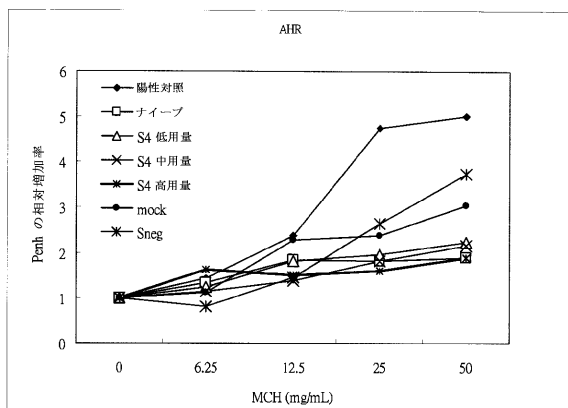
【 図 1 3 C 】

【 図 13 】



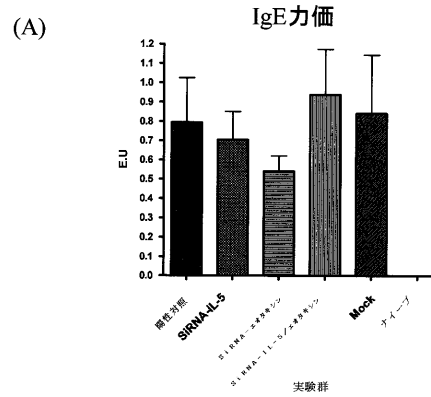
【 図 1 4 】

【 図 14 】



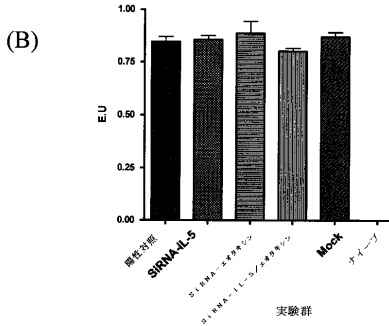
【 図 1 3 A 】

【 図 13 】



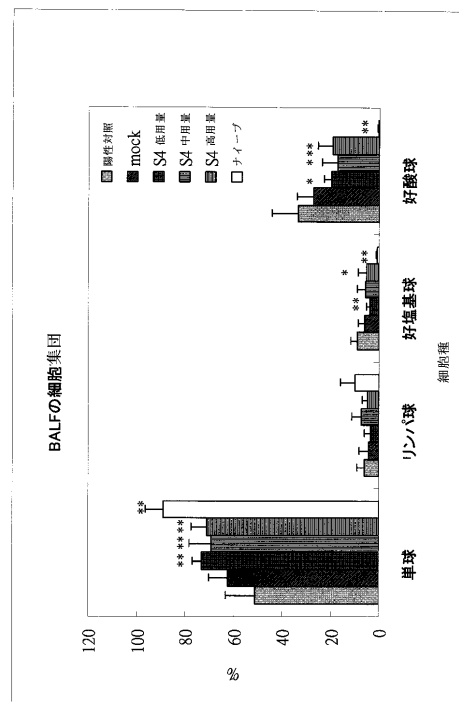
【 図 1 3 B 】

【 図 13 】

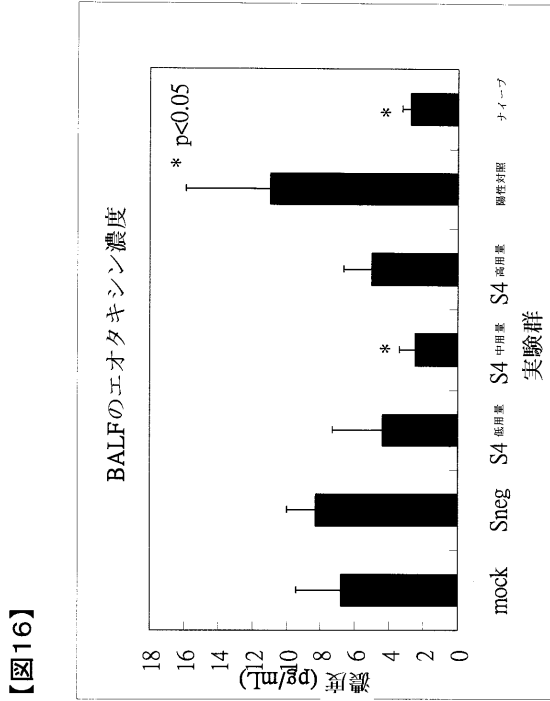


【 図 1 5 】

【 図 15 】

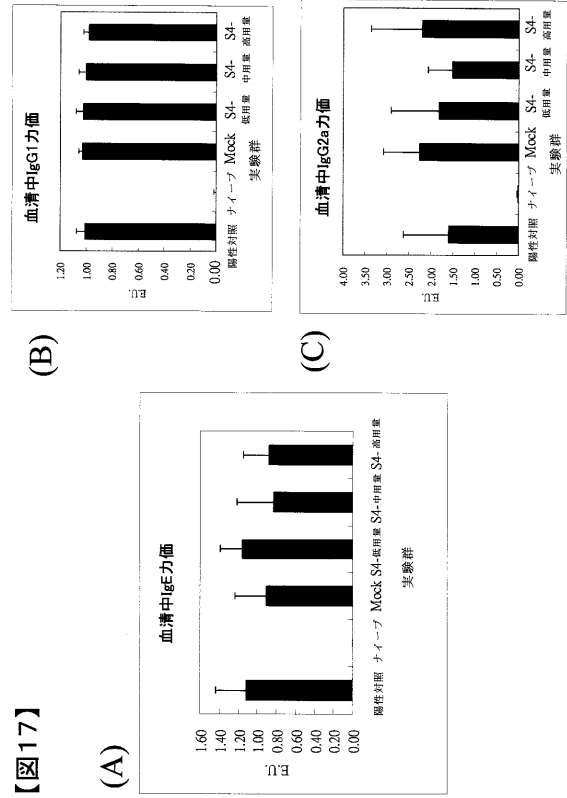


【 図 1 6 】



【 図 1 6 】

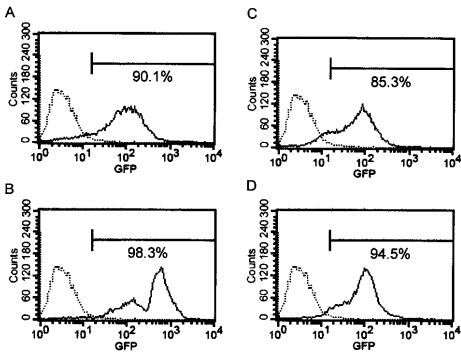
【 図 1 7 】



【 図 1 7 】

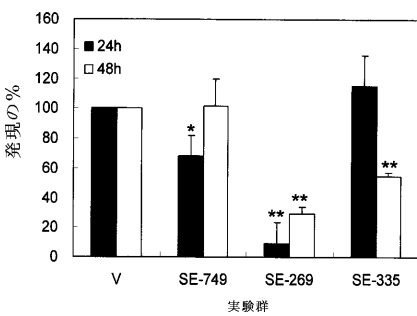
【 図 1 9 】

【 図 1 9 】



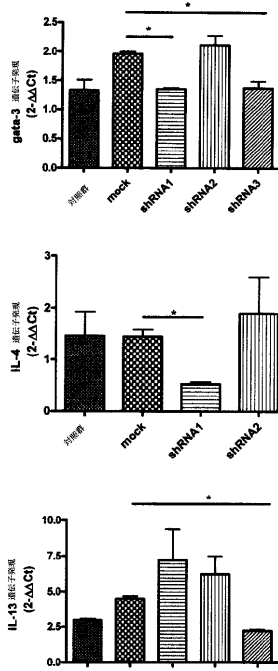
【 図 2 0 】

【 図 2 0 】



【 図 2 1 】

【 図 2 1 】



【図1】

【図1】

(A)

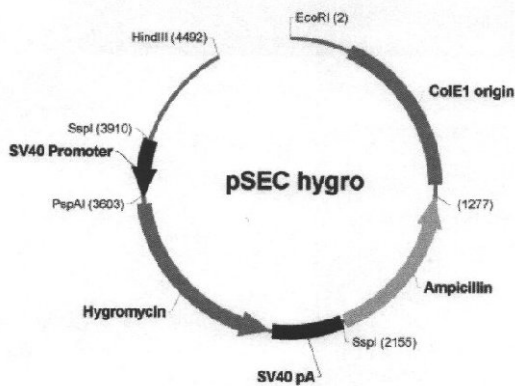


gata-3 標的配列313-336に対するsiRNA1:
GAAGCTCAGTATCCGCTGACG

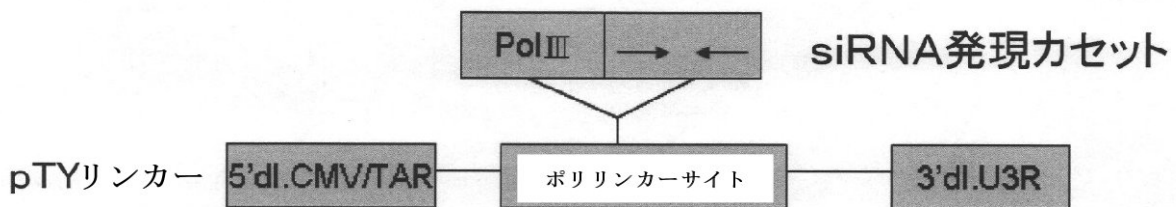
gata-3 標的配列1733-1753に対するsiRNA2:
CCACTGAATCCGGATCCCATT

gata-3 標的配列1306-1324に対するsiRNA3:
GATGTCTAGCAAATCGAAA

(B)



(C)

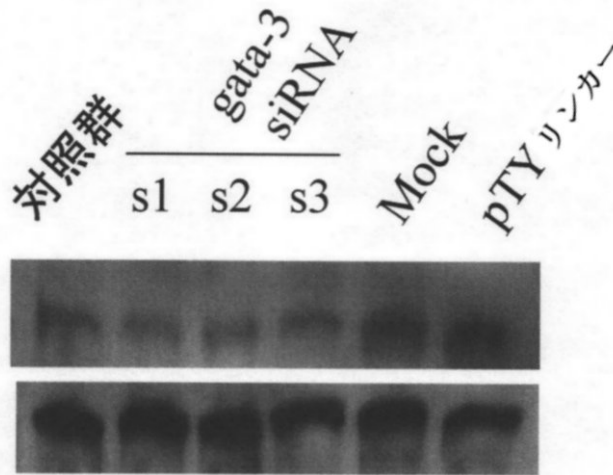


【図2B】

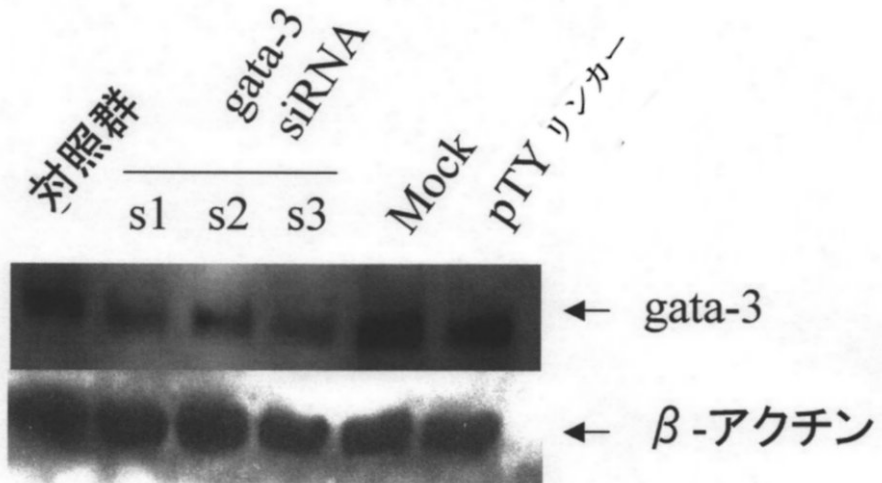
【図2】

(B)

(a) 前処理なし

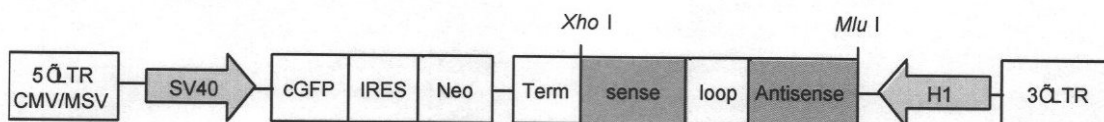


(b) PMA 5ng/ml + cAMP 500μM



【図18】

【図18】



【配列表】

2009536518000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成21年1月9日(2009.1.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

RNA干渉により、gata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシン遺伝子のRNAを切断する単離された二本鎖短鎖干渉リボ核酸(sRNA)分子であって、(a)前記sRNA分子のそれぞれの鎖は約19~21リボヌクレオチドの長さであり、(b)前記sRNA分子の一本の鎖は、RNA干渉により、gata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシンのRNAを切断するための、配列番号32、33、36、38、41、44または45から選ばれる、前記gata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシンのRNAまたはその部分に相補的なりボヌクレオチド配列を含む、前記単離された二本鎖短鎖干渉リボ核酸分子。

【請求項2】

ヒト由来である、請求項1に記載のsRNA分子。

【請求項3】

sRNA17、18、21、23、26、29または30のいずれかと少なくとも80%同一である、請求項2に記載のsRNA分子。

【請求項4】

配列番号47、48、51、53、56または59のいずれかから選ばれるリボ核酸配列を含む、請求項3に記載のsRNA分子。

【請求項5】

薬学的に受容可能な担体において請求項1に記載のsRNA分子を含む、アレルギー疾患を治療するための組成物。

【請求項6】

アレルギー疾患が、花粉症、気管支喘息、副鼻腔炎、呼吸窮迫症候群またはアレルギー性鼻炎である、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

sRNA分子がヒト由来である、請求項5または6に記載の組成物。

【請求項8】

sRNA分子が、sRNA17、18、21、23、26、29または30のいずれかと少なくとも80%同一である、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

sRNA分子が、配列番号47、48、51、53、56または59のいずれかから選ばれるリボ核酸配列を含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

gata-3、IL-4、IL-5、IL-13またはエオタキシンの遺伝子の発現を抑制することにより、アレルギーを緩和する、アレルギー疾患を治療するための薬物を調製するための請求項1に記載のsRNAの使用。

【請求項11】

sRNA分子がヒト由来である、請求項10に記載の使用。

【請求項12】

sRNA分子が、sRNA17、18、21、23、26、29または30のいずれかと少なくとも80%同一である、請求項11に記載の使用。

【請求項13】

sRNA分子が、配列番号47、48、51、53、56または59のいずれかから選ばれるリボ核酸配列を含む、請求項12に記載の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2007/000638
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
<i>C07H 21/04</i> (2006.01) <i>A61K 31/711</i> (2006.01) <i>C07H 21/02</i> (2006.01) <i>A61K 31/7105</i> (2006.01) <i>A61P 11/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/12</i> (2006.01)		
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)		
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) STN: MEDLINE, CA, WPIDS, BIOSIS. KEYWORDS (SIRNA IRNA, RNAI, SHRNA, INTERFERING RNA, GATA-3, EOTAXIN, IL-5, IL-4, IL-13, ASTHMA) GENOMEQUEST: SEQ IDS 1-60		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenomeQuest Database GQPAT, Identifiers US20050255487-641480, US20050255487-61953, US20050255487-1825887, US20050255487-2235335, US20050255487-181037, US20050255487-1274291, US20050255487-2492487, US20050255487-1395552. & US 2005-0255487 (Khvorova et al) 17 November 2005.	1-10
X	GenomeQuest Database GQPAT, Identifiers US20050246794-1282864, US20050246794-193793, US20050246794-251467, US20050246794-449806, US20050246794-449808, US20050246794-251261, US20050246794-254077. & US 2005-0246794 (Khvorova et al) 3 November 2005.	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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 "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) "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 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "&" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 07 June 2007		Date of mailing of the international search report 29 JUN 2007
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer KIERAN WILLIAMS AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : (02) 6283 62256123

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2007/000638

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenomeQuest Database GQPAT, Identifiers WO2005116204-444356, WO2005116204-564361, WO2005116204-581186, WO2005116204-167493, & WO 2005/116204 (RNAi Co., LTD) 8 December 2005	1-10
X	GenomeQuest Database GQPAT, Identifiers US6136603-13, US6136603-129 and US6136603-54, & US 6,136,603 (Dean et al) 24 October 2000	1-13
X	GenomeQuest Database GQPAT, Identifiers WO9634887-33, & WO 1996/034887 (Imperial College of Science, Technology & Medicine) 7 November 1996	1, 7-10
X	GenomeQuest Database GQPAT, Identifiers US20050182007-1297, & US 2005-0182007 (McSwiggen et al) 18 August 2005	1-6, 13
X	GenomeQuest Database GQPAT, Identifiers WO0285308-13067, & WO 2002/085308 (Epigenesis Pharmaceuticals INC) 31 October 2002	1, 7-13
X	Finotto et al. "Treatment of allergic airway inflammation and hyper-responsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression", J Exp Med 2001 193(11): 1247-1260. Refer to whole document	1-13
X	Kline. "DNA therapy for asthma", Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology 2002 2:69-73. Refer to page 69.	1-13
X	Popescu. "New asthma drugs acting on gene expression", J Cell Mol Med 2003 7(4): 475-486 Refer to page 475 and fig 3	1-13
X	Popescu. "Antisense- and RNA interference-based therapeutic strategies in allergy", J Cell Mol Med 2005 9(4): 840-853 Refer to page 840 and Tables 3&4	1-13
X	Skapenko et al. "GATA-3 in human T cell helper type 2 development", J Exp Med 2004 199(3): 423-428 Refer to page 423 and figure 1	1-13
X	Fiset et al. "Modulation of allergic response in nasal mucosa by antisense oligodeoxynucleotides for IL-4", J Allergy and Clinical Immunology 2003 111(3): 580-586 Refer to page 580 and Figures 2&3	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2007/000638

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.:
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. Short interfering ribonucleic acid (siRNA) that directs cleavage of gata-3
2. siRNA that directs cleavage of IL-4
3. siRNA that directs cleavage of IL-5
4. siRNA that directs cleavage of IL-13
5. siRNA that directs cleavage of ectaxin

(continued on supplementary sheet)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2007/000638**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: III

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

The groups of nucleotide sequences identified above do not share a common consensus sequence which could be considered to be a "special technical feature", therefore the sequences of the nucleotides do not establish a technical relationship between the claimed inventions.

The nucleotide sequences have the common feature that all the genes to which the siRNAs are directed are associated with airway inflammation. None of these genes are novel. In consequence, the common feature identified above does not constitute a "special technical feature" within the meaning of PCT Rule 13.2, since it makes no contribution over the prior art. Because the common feature does not satisfy the requirement for being special technical features it follows that it cannot provide the necessary technical relationship between the identified inventions. Therefore the claims do not satisfy the requirement of unity of invention *a posteriori*.

While each group of siRNA is considered a separate invention the searching all these siRNA is not considered to involve significant additional search effort. Therefore the International Searching Authority will search the invention relating to all nucleotide sequences.

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 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	

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

(72) 発明者 チャン, ポー - ルエン
台湾 タイペイ 100、ゲー - リン ストリート、ナンバー 61、8 エフ

(72) 発明者 ホアン, チュン - シェン
オーストラリア ヴィクトリア州 3142、トゥーラック、ウォレス アヴェニュー 26

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11 DA02 EA10 GA11 HA17
4C084 AA13 NA14 ZA342 ZA592 ZB132 ZC412
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA34 ZA59 ZB13 ZC41