

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成24年8月9日(2012.8.9)

【公開番号】特開2011-200238(P2011-200238A)

【公開日】平成23年10月13日(2011.10.13)

【年通号数】公開・登録公報2011-041

【出願番号】特願2011-106343(P2011-106343)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/113	(2010.01)
A 6 1 P	11/00	(2006.01)
A 6 1 P	27/02	(2006.01)
A 6 1 P	13/10	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/713	(2006.01)
A 6 1 K	9/127	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A G
A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	17/00	
A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	9/127	
A 6 1 P	29/00	

【手続補正書】

【提出日】平成23年6月10日(2011.6.10)

【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】

細胞内のSykキナーゼの発現を阻害する方法であつて、前記細胞内に存在する標的SykキナーゼmRNA配列の切断を導く小さな干渉RNA(siRNA)分子を前記細胞内に導入し、前記阻害を引き起こす方法。

【請求項2】

前記siRNA分子が、約20~23のヌクレオチド長である請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記siRNA分子が、前記細胞内に直接的に導入される請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記siRNA分子をコードするヌクレオチド配列を前記細胞に導入し、前記siRNA分子を細胞内に生成させる請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記siRNA分子が2つの鎖を含み、前記siRNA分子の少なくとも1つ鎖が約1~6ヌクレオチド長の3'オーバーハングを有する請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記siRNA分子の両鎖が、約2~3ヌクレオチド長の3'オーバーハングを有する請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記3'オーバーハングが、ウリジンまたはチミジンを含む請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記siRNA分子が、ステムループ構造を有する請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記ステムループ構造の3'末端が、約1~6ヌクレオチド長の3'オーバーハングを有する請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記3'オーバーハングが、約2~3ヌクレオチド長である請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記標的配列が、SykキナーゼmRNAに特有の配列である請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記標的配列(cDNAとして発現)が、以下の配列からなる群から選択されたヌクレオチド配列を含む請求項11に記載の方法。

【化1】

AATATGTGAAGCAGACATGGA,
AATCAAATCATACTCCTTCCC,
AAGAGAGTACTGTGTCATTCA,
AAGGAAAACCTCATCAGGGAA,
AATCATACTCCTCCCAAAGC,
AATTTGGAGGCCGTCCACAA,
AAGACTGGGCCCTTGAGGAT,
AAGCAGACATGGAACCTGCAG,
AACTTCCAGGTTCCCATCCTG,
AAGCCTGGCACAGAAAGTCC,
AAGCCCTACCCATGGACACAG,
AACCTGCAGGGTCAGGCTCTG,
AAGGGGTGCAGCCCCAAGACTG,
AACTTGCACCCTGGCTGCAG,
AAGTCCTCCCCTGCCAAGGG,
AAGGCCCAAGAGAGAACCCC,
AATCTCAAGAATCAAATCATA,
AATGTTAATTGGAGGCCGT,
AATCCGTATGAGCCAGAACTT,
AATCGGCACACAGGGAAATGT,
AACCGGCAAGAGAGTACTGTG,
AAGGAGGTTACCTGGACCGA, および
AACCTCATCAGGAAATATGTG

【請求項13】

前記細胞が、哺乳類細胞である請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記細胞が、ヒト細胞である請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記細胞が、ヒトの体内に存在する請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記ヒトが炎症状態にある患者であり、かつ前記siRNA分子が前記状態を治療するために十分な量で投与される請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記炎症状態が、前記患者の気管支、肺、眼、膀胱または皮膚の状態である請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

前記炎症状態が気管支または肺の状態であり、かつ前記siRNA分子が吸入によって気管支または肺細胞に導入される請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

以下の配列からなる群から選択される配列に相補的な配列を含むsiRNA分子。

【化 2】

AATATGTGAAGCAGACATGGA,
 AATCAAATCATACTCCTTCCC,
 AAGAGAGTACTGTGTCATTCA,
 AAGGAAAACCTCATCAGGGAA,
 AATCATACTCCTCCCAAAGC,
 AATTTGGAGGCCGTCCACAA,
 AAGACTGGGCCCTTGAGGAT,
 AAGCAGACATGGAACCTGCAG,
 AACTTCCAGGTTCCCATCTG,
 AAGCCTGGCCACAGAAAGTCC,
 AAGCCCTACCCATGGACACAG,
 AACCTGCAGGGTCAGGCTCTG,
 AAGGGGTGCAGCCAAGACTG,
 AACTTGCACCTGGCTGCAG,
 AAGTCCTCCCCTGCCCCAAGGG,
 AAGGCCCCAGAGAGAACCCC,
 AATCTCAAGAATCAAATCATA,
 AATGTTAATTGGAGGCCGT,
 AATCCGTATGAGCCAGAACTT,
 AATCGGCACACAGGGAAATGT,
 AACCGGCAAGAGAGTACTGTG,
 AAGGAGGTTTACCTGGACCGA, および
 AACCTCATCAGGAAATATGTG

【請求項 20】

請求項19に記載のsiRNA分子と担体とを含む組成物。

【請求項 21】

請求項19に記載のsiRNA分子およびリポソームまたはポリマーを含む組成物。

【手続補正 2】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0 0 2 1****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0 0 2 1】**

代わりに、ヘアピン構造をとるRNAは、標的のセンス鎖（例えば、約20 nt）をベクターに挿入し、続いて短いスペーサー（例えば、約4～約10 nt）を挿入し、その後に標的のアンチセンス鎖（例えば、約20 nt）と、例えば約5～6のUを転写終結区として挿入することによって発現され得る。得られたRNA転写産物は折り畳まれて、3'末端に2～3のUをもつ、例えば約20 bpのステムおよび約10 ntのループを含むステムループ構造を形成する(P addison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 1443-1448 (2002)も参照)。インビオでの生成を達成する使用に適した構成（ベクターおよびプロモーターの選択を含む）は、当業者によって容易に設計され得、例えば、細胞／組織のターゲットおよび要求される効果に応じて変化するであろう。

【手続補正 3】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0 0 3 4****【補正方法】変更**

【補正の内容】

【0 0 3 4】

センス 5' - gaagcccuucaaccggccc UU 3'
 アンチセンス 3' - UU cuucgggaaguuggccggg 5'

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 5】

2) siRNA-2: ヒト、bp 364 ~ bp 382; マウスおよびラット、bp 375 ~ bp 393

センス 5' - ccucaucaggaaauaugug UU 3'
 アンチセンス 3' - UU ggaguaguccuuauacac 5'

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 2】

標的領域(1)(cDNA): 5' aagaaggcctcaaccggccc;

標的領域(2)(cDNA): 5' aacctcatcaggaaatatgtg。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 5】

siRNA-1

標的DNA: 5' AAGAAGCCTTCAACCGGCCC

センス siRNA 5' - gaagccuucaaccggccc UU 3'
 アンチセンス siRNA 3' - UU cuucgggaaguuggccggg 5'

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 6】

siRNA-2

標的DNA: 5' AACCTCATCAGGAATATTG

センス 5' - ccucaucaggaaauaugug UU 3'
 アンチセンス 3' - UU ggaguaguccuuauacac 5'

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 5】

標的DNA: 5' AACCTCATCAGGAATATTG

センス 5' - ccucaucaggaaauaugug uu 3'
 アンチセンス 3' - uu ggaguaguccuuauacac 5'

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

【図1】各SykキナーゼsiRNAのセンス鎖は、最初の鑄型アデニン二量体および末端オーバーハングウリジン二量体を除いて、標的配列と同じ配列である。siRNAのアンチセンス鎖は、標的配列の逆の相補的配列である。

【図2】SykキナーゼmRNAに対するsiRNAをトランスフェクトしたRBL-2H3細胞中のSykキナーゼの発現。RBL-2H3細胞にsiRNA-1(レーン2)、siRNA(レーン3)をトランスフェクトし、リポフェクタミンをトランスフェクションしてコントロールとした(レーン1)。細胞溶解液中のタンパク質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。上のパネルはSykキナーゼのイムノプロットであり；下のパネルはアクチンのイムノプロットである。

【図3】SykキナーゼmRNAに対するsiRNAでトランスフェクトされたヒト単球内におけるSykキナーゼの発現。単球をsiRNA(レーン2)で処理し、リポフェクタミンのトランスフェクションをコントロールとした(レーン1)。細胞溶解物中のタンパク質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗Sykキナーゼ抗体でイムノプロットした。

【図4】ウェスタンプロット分析：HS-24細胞中のSykタンパク質の発現。

【図5】図5Aおよび5B。(図5A) siRNA処理後のHS-24細胞を溶解し、HS-24細胞溶解物中の総タンパク質等量を10% SDSゲル電気泳動によって溶解し、Sykまたはアクチンに対するモノクローナル抗体を使用してウェスタンプロットによって分析を行った。レーン1-未処理、レーン2-siRNA-1(対照)で24時間処理、レーン3-siRNA-1で48時間処理、レーン4-siRNA-2で24時間処理、レーン5-siRNA-2で48時間処理。(図5B) RNAを単離し、Sykおよび-アクチンのためにRT-PCRを行った。レーン1-未処理、レーン2-siRNA-1(対照)で48時間処理、レーン3-siRNA-2で48時間処理。

【図6】図6Aおよび6B。ポリリシンでコートされたプレート上に播種されたHS-24細胞(刺激を与えられていない休眠細胞)と、フィブロネクチンでコートされたプレート上に播種されたHS-24細胞(刺激を与えられた細胞)とを、siRNA-2、またはsiRNA-1(対照)、またはピセアタノールで処理した。終夜培養にわたって細胞を10ng/mlのTNFで処理した。(図6A) siRNA(48時間)またはピセアタノール(16時間)処理の後、細胞を取り出し、抗CD54(ICAM-1)で免疫染色してフローサイトメトリーによって分析を行った。(図6B) IL-6 ELISAキットを使用して細胞培養上清をIL-6の放出について分析した。TNFで刺激された未処理の細胞(例えば、siRNAで処理されていない細胞)と比較したときの*P<0.05、**P<0.005。結果は、3~5の独立した実験系の代表的な値である。データは、siRNA-2によるSykの発現の阻害は、炎症反応において重要なTNFで誘導されたICAM-1の発現とIL-6の放出を下方制御する。

【図7】図7Aおよび7B。3回の処理の後、卵白アルブミン(OA)で感作および抗原刺激されたBrown Norwayラットの気管支肺胞洗浄(BAL)液中の総細胞数にエアロゾルを介して送達されたSykキナーゼに対するsiRNAの効果。図7Aは棒グラフとしてデータを提供し、図7Bは個々のデータポイントを示す(個々の動物)。

【図8-1】図8Aおよび8B。3回の処理の後、OAで感作および抗原刺激されたBrown NorwayラットのBAL液中の多数のマクロファージ、好中球、リンパ球および好酸球にエアロゾルを介して送達されたSykキナーゼに対するsiRNAの効果。(図8Aは棒グラフとしてのデータを提供する。図8Bはマクロファージ数についての個々のデータポイントを示す(個々の動物))。

【図8-2】図8Cおよび8D。図8Cは好中球数についての個々のデータポイントを示し、

図8Dは好酸球数についての個々のデータポイントを示す。

【手続補正10】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図1】

siRNA-1 5'ヒト, bp 296 ~ bp 316; マウスおよびラット, bp 307 ~ bp 327

標的領域 (cDNA): 5' aagaagcccttcaaccggccc

センス siRNA	5'-	gaagccccuucaaccggccc	UU 3'
アンチセンス siRNA	3'-UU	cuucgggaaguuggccggg	5'

siRNA-2: ヒト, bp 364 ~ bp 382; マウスおよびラット, bp 375 ~ bp 393

標的領域 (cDNA) 5' aacctcatcaggaaatatgtg

センス siRNA	5' -	ccucaucagggaaauaugug	UU 3'
アンチセンス siRNA	3'-UU	ggaguaguuccuuauacac	5'

各 Syk キナーゼ siRNA のセンス鎖は、鑄型アデニン二量体と末端オーバーハング チミジン二量体を除いて標的配列と同一の配列である。siRNA のアンチセンス鎖は、標的配列の逆の相補的配列である。