

(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2008-537551

(P2008-537551A)

(43) 公表日 平成20年9月18日 (2008.9.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/40 (2006.01)	A 6 1 K 47/40	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁) 最終頁に続く		

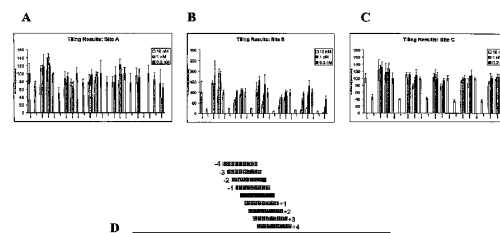
(21) 出願番号	特願2008-504405 (P2008-504405)	(71) 出願人	507324234
(86) (22) 出願日	平成18年3月31日 (2006.3.31)		カランド ファーマシューティカルズ,
(85) 翻訳文提出日	平成19年11月27日 (2007.11.27)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/011812		アメリカ合衆国 カリフォルニア 910
(87) 国際公開番号	W02006/105361		10, デュアルテ, フラワー アベニ
(87) 国際公開日	平成18年10月5日 (2006.10.5)		ュー 1710, スイート 100
(31) 優先権主張番号	60/667, 362	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成17年3月31日 (2005.3.31)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/695, 931		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成17年6月30日 (2005.6.30)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/742, 100		
(32) 優先日	平成17年12月2日 (2005.12.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リボヌクレオチドレダクターゼサブユニット2の阻害剤およびその使用

(57) 【要約】

本出願はリボヌクレオチドレダクターゼサブユニット2 (R2) の阻害剤及びR2阻害剤に関連する方法及び組成物に関する。特定の実施形態においては、R2阻害剤は核酸、例えばs i RNAを含む。本出願は、R2阻害剤、ならびに標的細胞においてR2の阻害を達成することができるR2阻害剤に関連する方法及び組成物を提供する。この標的細胞は、望ましくない増殖を起こしている細胞、例えば、癌又は腫瘍の細胞、特定の疾患又は症状 (例えば自己免疫疾患又は移植片拒絶におけるT細胞) 及び病原体に関連する過剰な成育及び／又は増殖を起こしている細胞を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

(i) 配列番号 4～6 よりなる群から選択される配列を含む 15～30ヌクレオチド長の第 1 の鎖；及び、

(ii) 15～30ヌクレオチド長の第 2 の鎖；

を含む核酸であって、

ここで該第 1 及び第 2 の鎖の少なくとも 12ヌクレオチドは相互に相補であり、そして生理学的条件下にて 2 本鎖核酸を形成し、そしてここで、該 2 本鎖核酸は RNA 干渉機序により細胞内でリボヌクレオチドレダクターゼサブユニット 2 (R2) の発現を低減できる、核酸。

10

【請求項 2】

前記核酸が 2 本鎖 RNA である請求項 1 記載の核酸。

【請求項 3】

前記核酸がヘアピン RNA である請求項 1 記載の核酸。

【請求項 4】

前記ヘアピン RNA のループ領域が 4～10ヌクレオチド長である請求項 3 記載の核酸。

【請求項 5】

前記 RNA の 2 本鎖部分が約 15～約 30ヌクレオチド長である請求項 1 記載の核酸。

【請求項 6】

前記第 1 の鎖が DNA ポリヌクレオチドであり、そして第 2 の鎖が RNA ポリヌクレオチドである請求項 1 記載の核酸。

20

【請求項 7】

前記第 1 及び／又は第 2 の鎖が更に 3' オーバーハング領域、5' オーバーハング領域又は 3' オーバーハング領域及び 5' オーバーハング領域の両方を含む請求項 1 記載の核酸。

【請求項 8】

前記オーバーハング領域が 1～10ヌクレオチド長である請求項 7 記載の核酸。

【請求項 9】

前記核酸が 1 つ以上の改変された骨格又は塩基部分を含む請求項 1 記載の核酸。

30

【請求項 10】

前記改変された骨格又は塩基部分が、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスフェートエステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシルメチルエステル、カーボネート及びホスフェートトリエステルの 1 つ以上である請求項 9 記載の核酸。

【請求項 11】

前記核酸が少なくとも 1 つの 2'-O-アルキル化リボヌクレオチドを含む請求項 9 記載の核酸。

【請求項 12】

前記第 1 の鎖が配列番号 7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93 及び 95 よりなる群から選択される配列を含む請求項 1 記載の核酸。

40

【請求項 13】

前記第 2 の鎖が配列番号 8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94 及び 96 よりなる群から選択される配列を含む請求項 1 記載の核酸。

50

【請求項 14】

10 ナノモルの濃度において生理学的条件下にて細胞と接触した場合に、前記核酸が該細胞による R2 発現を 50% 以上阻害する請求項 1 記載の核酸。

【請求項 15】

生理学的条件下にて配列番号 1 のヌクレオチド 422～485、616～667 又は 907～968 に相当する R2 転写物の領域にハイブリダイズし、そして、細胞内の R2 の発現を低減する配列を含む、単離された核酸。

【請求項 16】

前記核酸が配列番号 1 のヌクレオチド 432～475、626～657 又は 917～958 に相当する R2 転写物の領域にハイブリダイズする配列を含む請求項 15 記載の単離された核酸。

10

【請求項 17】

前記核酸が配列番号 1 のヌクレオチド 437～470、631～652 又は 921～953 に相当する R2 転写物の領域にハイブリダイズする配列を含む請求項 15 記載の単離された核酸。

【請求項 18】

前記核酸が R2 の前記領域の 1 つに相補的な少なくとも 10 連続ヌクレオチドを含む請求項 15 記載の核酸。

【請求項 19】

前記核酸が約 14～約 50 ヌクレオチド長である請求項 15 記載の核酸。

20

【請求項 20】

前記核酸が 1 本鎖である請求項 15 記載の核酸。

【請求項 21】

前記核酸が 2 本鎖である請求項 15 記載の核酸。

【請求項 22】

前記核酸が改変された骨格又は塩基部分 1 つ以上を場合により含む DNA 分子である請求項 15 記載の核酸。

【請求項 23】

前記核酸が改変された骨格又は塩基部分 1 つ以上を場合により含む RNA 分子である請求項 15 記載の核酸。

30

【請求項 24】

前記核酸が DNA 鎖及び RNA 鎖を含み、そして改変された骨格又は塩基部分 1 つ以上を場合により含む請求項 15 記載の核酸。

【請求項 25】

前記核酸が RNA i コンストラクトである請求項 15 記載の核酸。

【請求項 26】

前記 RNA i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分 1 つ以上を場合により含む dsRNA である請求項 25 記載の核酸。

【請求項 27】

前記 RNA i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分 1 つ以上を場合により含むヘアピン RNA である請求項 25 記載の核酸。

40

【請求項 28】

前記 RNA i コンストラクトのデュプレックス部分が約 15～約 30 ヌクレオチド長である請求項 25 記載の核酸。

【請求項 29】

前記 RNA i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分 1 つ以上を場合により含む配列番号 4～6 よりなる群から選択される配列を含む請求項 25 記載の核酸。

【請求項 30】

前記 RNA i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分 1 つ以上を場合により含む配列番号 7～96 よりなる群から選択される配列を含む請求項 25 記載の核酸。

50

【請求項 3 1】

前記 R N A i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分 1 つ以上を含む請求項 2 5 記載の核酸。

【請求項 3 2】

前記 R N A i コンストラクトがアルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスフェートエステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシルメチルエステル、カーボネート及びホスフェートトリエステルよりなる群から選択されるヌクレオチド間連結少なくとも 1 つを含む請求項 3 1 記載の核酸。

【請求項 3 3】

前記改変された R N A i コンストラクトが 2' - O - アルキル化リボヌクレオチド少なくとも 1 つを含む請求項 3 1 記載の核酸。

【請求項 3 4】

前記核酸が酵素的核酸である請求項 1 5 記載の核酸。

【請求項 3 5】

前記酵素的核酸がリボザイムである請求項 3 4 記載の核酸。

【請求項 3 6】

前記酵素的核酸が D N A 酵素である請求項 3 4 記載の核酸。

【請求項 3 7】

1 0 ナノモルの濃度において生理学的条件下にて細胞と接触した場合に前記核酸が該細胞による R 2 発現を 5 0 % 以上阻害する請求項 1 5 記載の核酸。

【請求項 3 8】

請求項 1 または請求項 1 5 記載の核酸及び製薬上許容しうる担体を含む医薬組成物。

【請求項 3 9】

前記製薬上許容しうる担体がカチオン性重合体を含有する請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 0】

前記製薬上許容しうる担体がシクロデキストリン重合体を含有する請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 1】

前記シクロデキストリン構造が図 2 7 に示す i m - C D P である請求項 4 0 記載の医薬組成物。

【請求項 4 2】

シクロデキストリン重合体及び請求項 1 又は 1 5 記載の核酸を含有し、そして P E G 化されている粒子を含む請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 3】

前記粒子が更にアダマンタンを含む請求項 4 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4 4】

更に特定の組織又は細胞型をターゲティングするリガンドを含む請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 5】

前記リガンドがガラクトースを含む請求項 4 4 記載の医薬組成物。

【請求項 4 6】

ナノ粒子を含み、そして該ナノ粒子が直径 1 0 ~ 1 0 0 n m である請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 7】

前記ナノ粒子が直径約 5 0 ~ 7 0 n m である請求項 4 6 記載の医薬組成物。

【請求項 4 8】

ナノ粒子が直径約 5 0 n m である請求項 4 7 記載の医薬組成物。

【請求項 4 9】

請求項 3 8 記載の医薬組成物であって、ここで前記製薬上許容しうる担体が、以下：

10

20

30

40

50

イミダゾール改変シクロデキストリン含有カチオン性重合体、及び、
アダマンタン－PEG－リガンドを含むターゲティング部分、
を含み、

ここで該重合体及びターゲティング部分が前記核酸をカプセル化するナノ粒子を形成する、医薬組成物。

【請求項 50】

前記ナノ粒子が約 50～120 nm の直径を有する請求項 49 記載の医薬組成物。

【請求項 51】

前記ナノ粒子が約 50～100 nm の直径を有する請求項 50 記載の医薬組成物。

【請求項 52】

ナノ粒子が約 50～70 nm の直径を有する請求項 51 記載の医薬組成物。

【請求項 53】

前記ナノ粒子が約 50 nm の直径を有する請求項 49 記載の医薬組成物。

【請求項 54】

前記ターゲティングリガンドがガラクトースを含む請求項 49 記載の医薬組成物。

【請求項 55】

前記ターゲティングリガンドがトランスフェリンを含む請求項 49 記載の医薬組成物。

【請求項 56】

細胞の望ましくない増殖に関連する疾患又は症状の治療のための医薬の製造における請求項 1 又は 15 記載の核酸の使用。

【請求項 57】

前記細胞が癌性又は腫瘍の細胞である請求項 56 記載の使用。

【請求項 58】

前記細胞が病原体細胞である請求項 56 記載の使用。

【請求項 59】

前記細胞が正常細胞であり、該細胞の前記望ましくない増殖が疾患状態をもたらす、請求項 56 記載の使用。

【請求項 60】

請求項 1 又は 15 記載の 2 本鎖核酸の治療有効量を患者に投与することを含む癌を有する患者を治療するための方法。

【請求項 61】

前記核酸が製薬上許容しうる担体とともに製剤される請求項 60 記載の方法。

【請求項 62】

前記核酸が癌細胞をターゲティングするリガンドとともに製剤される請求項 60 記載の方法。

【請求項 63】

前記リガンドがトランスフェリンである請求項 62 記載の方法。

【請求項 64】

前記癌細胞が肝細胞であり、そして前記リガンドがガラクトースを含む請求項 62 記載の方法。

【請求項 65】

前記核酸が重合体ナノ粒子の成分として製剤される請求項 60 記載の方法。

【請求項 66】

前記ナノ粒子が直径 10～120 nm である請求項 65 記載の方法。

【請求項 67】

前記ナノ粒子が直径 50～120 nm である請求項 65 記載の方法。

【請求項 68】

前記ナノ粒子が直径 50～100 nm である請求項 67 記載の方法。

【請求項 69】

前記ナノ粒子が直径 50 nm である請求項 65 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 0】

投与経路が全身性である請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 7 1】

投与経路が肝動脈内投与である請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 7 2】

前記癌が肝臓癌である請求項 7 1 記載の方法。

【請求項 7 3】

前記癌細胞が比較可能な組織に由来する非癌性の細胞と比較してより高レベルの R 2 を発現する請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 7 4】

前記核酸と相加的又は相乗的な態様において癌細胞を阻害する追加的抗癌化学療法剤少なくとも 1 つを更に含有する請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 7 5】

化学療法剤がフルオロウラシル (5 F U) である請求項 7 4 記載の方法。

【請求項 7 6】

以下：

肝臓治療薬、及び、

(i) イミダゾール改変シクロデキストリン含有カチオン性重合体、及び (i i) アダマンタン- P E G - リガンドを含むターゲティング部分を含む送達ビヒクルであって、ここで該重合体及びターゲティング部分が核酸をカプセル化するナノ粒子を形成する、送達ビヒクル、
を含む肝特異的送達医薬組成物。

【請求項 7 7】

前記ナノ粒子が直径 1 0 ～ 1 0 0 n m である請求項 7 6 記載の医薬組成物。

【請求項 7 8】

前記ナノ粒子が直径約 5 0 ～ 7 0 n m である請求項 7 7 記載の医薬組成物。

【請求項 7 9】

前記ナノ粒子が直径約 5 0 n m である請求項 7 7 記載の医薬組成物。

【請求項 8 0】

前記肝臓治療薬が小分子、ポリペプチド又は核酸である請求項 7 6 記載の医薬組成物。

【請求項 8 1】

前記肝臓治療薬が請求項 1 又は 1 5 記載の核酸である請求項 8 0 記載の医薬組成物。

【請求項 8 2】

以下：

肝臓治療薬、及び、

(i) イミダゾール改変シクロデキストリン含有カチオン性重合体、及び (i i) アダマンタン- P E G - リガンドを含むターゲティング部分を含む送達ビヒクルであって、ここで該重合体及びターゲティング部分が核酸をカプセル化するナノ粒子を形成する、送達ビヒクル、
を含む組成物を肝臓の疾患又は障害の治療の必要な対象に投与することを含む該治療のための方法。

【請求項 8 3】

前記肝臓の疾患又は障害が肝細胞癌である請求項 8 2 記載の方法。

【請求項 8 4】

投与経路が肝動脈内投与である請求項 8 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1】

(関連出願)

本出願は、米国仮特許出願第 6 0 / 6 6 7 , 3 6 2 号 (2 0 0 5 年 3 月 3 1 日出願) 、

10

20

30

40

50

同第60/695, 931号(2005年6月30日出願)および同第60/742, 100号(2005年12月2日出願)の優先権を主張し、これらの出願は、本明細書中でその全体が参考として援用される。

【背景技術】

【0002】

(背景)

リボヌクレオチドレダクターゼ(RNR)は2'-デオキシリボヌクレオチドをその相当するリボヌクレオシド5'-ジホスフェートから生成する反応を触媒する。この反応は2'-デオキシリボヌクレオシド5'-トリホスフェートの生成のための経路における律速段階であり、そして、DNA複製の為に必要である。ヒトRNRは2つのサブユニット、R1及びR2よりなり、両方の蛋白の発現が酵素活性の為に必要である。R1及びR2は別個の染色体上の異なる遺伝子によりコードされており、そして、最も重要な点として、そのmRNAは細胞周期を通じて示差的に発現される。R1蛋白は全細胞周期に渡って安定であるが、R2はDNA複製が起こる後期G1/初期S期の間に発現されるのみである(非特許文献1)。

【非特許文献1】Engstrom, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Skog, S., Thelander, L. および Tribukait, B., 「Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase.」, J. Biol. Chem., 1985年, 第260巻, p. 9114-9116

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

R2の阻害は抗癌及び抗ウィルス剤の目的となっている。しかしながら癌又は病原体感染のような細胞増殖性の疾患の治療のためのR2の新しくターゲティングされた阻害剤が望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0004】

(本出願の簡単な説明)

従って、本出願はR2阻害剤及び標的細胞においてR2の阻害を達成することができるその関連する方法及び組成物を提供する。特に、標的細胞は望ましくない増殖を起こしている細胞、例えば、癌又は腫瘍の細胞、特定の疾患又は症状(例えば自己免疫疾患又は移植片拒絶におけるT細胞)及び病原体に関連する過剰な成育及び/又は増殖を起こしている細胞を含む。本出願のR2阻害剤はR2発現又はR2の生物学的機能(例えばR2の酵素活性)を低下させることによりR2を阻害してよい。

【0005】

R2阻害剤は核酸、小分子、ペプチド、例えば抗体、ペプチド誘導体又はペプチドミメティックであることができる。

【0006】

特定の実施形態は核酸であるR2阻害剤に関する。出願は特定の条件下(例えば生理学的又は細胞内)においてR2転写産物にハイブリダイズし、細胞内の標的遺伝子の発現を低減する少なくとも一部分を含む単離された核酸を提供する。標的遺伝子転写産物は何れかのスプライシング前転写産物(即ちイントロンを含有)、スプライシング後転写産物、並びに何れかのスプライス変異体であってよい。特定の実施形態においては、標的遺伝子転写産物は配列番号1~3のいずれかに示す配列を有する。核酸のカテゴリーの例は例えばRNA iコンストラクト及び触媒性核酸コンストラクトを含む。核酸は1本鎖又は2本鎖であってよい。2本鎖核酸はまた鎖の一方又はもう一方が1本鎖であるオーバーハング又は非相補の領域を含んでよい。1本鎖核酸は二重螺旋構造の領域と、所謂、「ヘアピン」又は「ステムループ」の構造を化合物が形成することを意味する、自己相補性の領域を含んでよい。核酸は配列番号1~3(図1~2)に示すものの何れかのような標的遺伝

子核酸配列のヌクレオチド1000個以下、500個以下、250個以下、100個以下又は、50個以下よりなる領域に相補であるヌクレオチド配列、又はその何れかの相合体（例えばオーソログ及びパラログ）又は変異体を含んでよい。相補性の領域は好ましくは少なくとも8ヌクレオチド、そして場合により少なくとも10、15、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30ヌクレオチドである。相補性の領域は標的遺伝子転写産物のイントロン、コーディング配列又は非コーディング配列内に含まれてよい。一般的に、核酸は約8～約500ヌクレオチド又は塩基対長の長さを有し、そして場合により長さは約14～約50ヌクレオチドとなる。核酸はDNA、RNA又はRNA：DNAハイブリッドであってよい。何れの1つの鎖も、DNAとRNAの混合物、並びに、DNA又はRNAの何れかとして容易に分類することができない改変された形態を含んでよい。同様に、2本鎖核酸はDNA：DNA、DNA：RNA又はRNA：RNAであってよく、そして、何れの1つの鎖も又、DNAとRNAの混合物、並びに、DNA又はRNAの何れかとして容易に分類することができない改変された形態を含んでよい。核酸は種々の改変、例えば骨格（天然の核酸の糖-ホスフェート部分。例えばヌクレオチド内連結部）又は塩基部分（天然の核酸のプリン又はピリミジン部分）への改変の何れを含んでもよい。核酸は好ましくは約15～約30ヌクレオチドの長さを有し、そして頻繁には血清中、細胞中、又は、核酸が送達される可能性のある場所、例えば経口送達核酸の場合は胃、そして吸入された核酸の場合は肺における安定性のような特性を向上させるために改変1つ以上を含有する。RNA iコンストラクトの場合は、標的転写産物に相補な鎖は一般的にRNA又はその改変物となる。他の鎖はRNA、DNA又は何れかの他の変異物であってよい。2本鎖又は1本鎖の「ヘアピン」RNA iコンストラクトのデュプレックス部分は好ましくは18～30ヌクレオチド長、そして場合により約21～27ヌクレオチド長の長さを有する。触媒性又は酵素性の核酸はリボザイム又はDNA酵素であってよく、そして、改変された形態を含有してもよい。本発明においては核酸は生理学的条件下において、そして非センス又はセンスの制御の影響が極僅か又は皆無である濃度において細胞に接触させた場合に約50%、75%、90%以上標的R2遺伝子の発現を阻害してよい。核酸の作用を試験するための好ましい濃度は1、5又は10マイクロモルである。核酸は本発明においては細胞の表現型に対する作用に関しても試験してよい。特定の癌細胞系統においては、細胞死又は増殖速度低下はターゲティングされた核酸の投与時に測定してよい。好ましくは、細胞の増殖は核酸の実験的に意味のある濃度において50%を超えて阻害される。

【0007】

特定の実施形態においては、出願は種々のR2阻害剤、例えばR2遺伝子をターゲティングする核酸（又はターゲティングされた核酸）のいずれかを含む医薬組成物を提供する。医薬組成物は一般的に製薬上許容しうる担体を含む。医薬組成物は生理学的条件下にて標的遺伝子転写産物にハイブリダイズし、そして細胞内の標的遺伝子の発現を低減する核酸を含んでよい。

【0008】

特定の特徴において、出願は細胞におけるR2遺伝子の発現を阻害するための方法を提供する。方法は生理学的条件下において標的R2転写産物にハイブリダイズして細胞内の標的遺伝子の発現を低減する核酸の有効量に細胞を接触させることを含んでよい。開示したR2をターゲティングする核酸の何れかをそのような方法において使用してよい。細胞は腫瘍又は癌性の細胞、病原体細胞又は正常細胞であってよい。特定の実施形態においては、正常細胞は、患者において特定の疾患又は症状をもたらす望ましくない増殖を起こす。

【0009】

特定の特徴において、出願は腫瘍の成長速度を低減するために十分な本明細書に記載のR2阻害剤の量を投与することを含む、対象における腫瘍の成長速度を低減するための方法を提供する。出願は本明細書に記載のR2を患者に投与することを含む癌に罹患した患者を治療するための方法を提供する。R2阻害剤は核酸、例えばRNA i核酸又は触媒性

核酸であってよく、そして製薬上許容しうる担体と共に製剤されてよい。場合により、腫瘍は核酸がターゲティングする遺伝子を発現する癌細胞1つ以上を含む。標的R2遺伝子は比較可能な組織に由来する非癌性の細胞と相対比較して過剰発現されてよい。そのような治療は核酸と相加的又は相乗的な態様において癌細胞を阻害する追加的抗癌化学療法剤少なくとも1つと組み合わせるとよい。核酸及び追加的な抗癌剤は複合製剤として前もって製剤してよく、或いは、独立して製剤し、そして複合作用が達成されるような態様（例えば時点、用量）において投与してよい。

【0010】

特定の特徴において、出願は例えば癌又は病原体による感染の治療のための医薬の製造における核酸の使用を提供する。

10

【0011】

特定の特徴において、出願は（a）目的の遺伝子を発現する癌細胞の複数を有する腫瘍を患者において発見すること；及び（b）目的の遺伝子をターゲティングする核酸を適宜患者に投与することを含む、癌に罹患した患者を治療するための方法を提供する。方法は診断的部分として、標的遺伝子の遺伝子増幅を有する癌細胞の複数を有する腫瘍を患者において発見することを含む。遺伝子増幅は種々の方法、例えば蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）又はリプレゼンテーションオリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析（ROMA）において検出してよい。

【0012】

特定の特徴において、出願は病原体に感染した患者又は汚染された目標物から病原体を除去又は低減するための方法及び組成物を提供する。

20

【0013】

本発明の別の特徴はパッケージされた医薬品を提供する。そのようなパッケージされた医薬品は（i）R2遺伝子をターゲティングする本明細書に開示した阻害剤の治療有効量；及び（ii）R2遺伝子を発現する腫瘍を有する患者の治療のためのR2阻害剤の投与に関する説明書及び／又はラベルを含む。

【0014】

本発明の別の特徴はパッケージされた消毒薬を提供する。パッケージされた消毒薬は病原体のような感染性の物質1つ以上に対抗して特異的であることができる。このようなパッケージされた消毒薬は（i）感染性物質においてR2遺伝子をターゲティングするR2阻害剤の治療有効量；及び（ii）感染性物質を除去又は減量するためのR2阻害剤の投与に関する説明書及び／又はラベルを含む。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

（本出願の詳細な説明）

概説

リボヌクレオチドレダクターゼ（RNase）のR2サブユニットは、R2発現が細胞周期全体に渡って調節され、R2は必須な遺伝子であると考えられ（Kittler et al. (2004) Nature 432:1036-1040）、そして、R2蛋白の構造が報告されている（Cerqueria et al. (2005) Curr. Med. Chem. 12:1283）ことから、望ましい治療標的である。細胞周期全体に渡って比較的一定のレベルにおいて過剰であるRNaseのR1サブユニットとは対照的に、R2の合成は早期のS期に開始し、そして細胞内で緩徐に蓄積し、後期の有糸分裂において急速に分解する。R2の発現は種々のヒト組織及び腫瘍細胞系統（Zhou et al. (2003) Cancer Research 63:6583-6594）において検出されている。特定の組織において、R2発現はそのような組織の正常細胞においては検出可能なレベル未満であるが、そのような組織の異常な（例えば腫瘍又は癌性の）細胞においては検出可能又は増量となる。例えば、R2発現は正常な肝細胞においてはウエスタンブロット又は免疫染色によればほぼ検出不能であるが、肝細胞癌においては検出することができる（図3）。従って、R2の阻害は細胞増殖に関連する疾患又は障害、例えば

40

50

癌、病原体感染等を治療するためには有用である。

【0016】

R2の阻害は細胞におけるR2の生物学的活性、例えばその酵素活性を阻害することにより達成してよい。或いは、R2の阻害は細胞におけるR2遺伝子の発現を阻害することにより達成してよい。小分子及び核酸はR2の活性及び／又は発現をダウンレギュレーションするために使用される。例示されるものは、ペプチド又はペプチド誘導体である2量阻害剤（例えば米国特許第6,030,942号又は米国特許第4,845,195号に記載のペプチドVal Val Asn Asp Leu）、触媒性阻害剤（例えばフリーラジカルスカベンジャー又は鉄キレート形成剤）、アンチセンス分子（例えばGTI-2040、Lorus Therapeutics, Inc.）、Lin et al. (2003) J. Biol. Chem. 279:27030及びDuxbury et al. (2004) Oncogene 28:1539に記載のsiRNA分子を含む。しかしなお、新規で向上したR2阻害剤はR2をダウンレギュレートするための新しい手段として必要とされ続けている。

10

【0017】

核酸R2阻害剤

特定の特徴において、本出願はR2遺伝子の核酸阻害剤、及び、例えばR2遺伝子の発現を低減又はダウンレギュレートすることによりR2遺伝子又は蛋白の活性を阻害又は低減するための方法を提供する。「阻害する」又は「低減する」とは、遺伝子の発現、又は、核酸又は1つ以上の蛋白又は蛋白サブユニットをコードする等価な核酸のレベルが本出願の核酸剤の非存在下で観察されるものよりも低値に低減されることを意味する。

20

【0018】

本明細書においては、「核酸」又は「核酸剤」という用語は、ヌクレオチドを含有し、そしてR2遺伝子に対する所望の作用を有する何れかの核酸系の化合物を指す。核酸は1本鎖、2本鎖又は多重鎖であることができ、そして、改変された、又は未改変のヌクレオチド又は非ヌクレオチド又は種々の混合物及びそれらの組合せを含むことができる。本出願の核酸剤の例は限定しないが、dsRNA、siRNA及び酵素的核酸を含む。

【0019】

特定の実施形態においては、本出願は真核生物又は原核生物を含む1つ以上の種に由来するR2遺伝子又はmRNAにターゲティングされる核酸阻害剤を提供する。特定の実施形態においては、核酸阻害剤は特定の種に由来するR2遺伝子又はmRNA配列の発現を特異的に阻害するが、他の種に由来するR2遺伝子又はmRNAの発現は阻害しないように設計してよい。例えば、病原体感染の治療の為に有用な核酸阻害剤は病原体におけるR2遺伝子又はmRNAの発現を特異的に阻害するが、宿主のR2遺伝子又はmRNAの発現は阻害しないように設計してよい。細菌感染の治療の為に有用な核酸阻害剤は、原核生物のR2遺伝子又はmRNAの発現を阻害してよいが、真核生物のR2遺伝子又はmRNAの発現は阻害しない。幾つかの種に由来するR2 cDNA配列の例を図1及び2に示す。

30

【0020】

特定の実施形態においては、本出願はR2遺伝子内の特定の領域1つ以上にターゲティングされているR2遺伝子の核酸阻害剤を提供する。ヒトR2遺伝子内の例示される領域は以下の表1に示されるコア標的領域を含む（図1も参照）。コア標的配列は一般的には例えばdsRNA、siRNA及び酵素的核酸のような阻害剤核酸による配列特異的結合によりR2発現を効果的に阻害する標的R2遺伝子又は相当するmRNAの一部を指す。一般的に、核酸阻害剤は、コア標的配列を含むR2蛋白の領域、又は、例えば片方又は両方の末端のコア標的部位＋／－5、＋／－10又は＋／－20ヌクレオチドのような、R2遺伝子又はmRNA配列内のコア標的領域の片方又は両方の末端にフランキングする5、10又は20ヌクレオチドを含むR2遺伝子又はmRNAの一部に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる。表1に示すコア標的配列はヒトR2配列から得たが、他の種、例えば他の真核生物、例えば他の哺乳類に由来するR2配列内の等価な領域

40

50

も本発明は意図している。

【0021】

(表1. R2のコア標的配列)

【0022】

【化15】

標記	配列	配列番号
RRM2-444 コア	5' cgaguaccaug 3'	配列番号 4
RRM2-632 コア	5' gauuuagccaa 3'	配列番号 5
RRM2-928 コア	5' aagaaacgagg 3'	配列番号 6

10

dsRNA及びRNAiコンストラクト

特定の実施形態においては、本出願は2本鎖RNA (dsRNA) 及びRNAiコンストラクトに関する。「dsRNA」という用語は本明細書においては、siRNAを含むRNA干渉 (RNAi) が可能な2本鎖RNA分子を指す (例えばBass, 2001, Nature, 411, 428-429; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494-498; 及びKreutzer等のPCT公開WO00/44895; Zernicka-Goetz等のPCT公開WO01/36646; FireのPCT公開WO99/32619; Plaetnick等のPCT公開WO00/01846; Mello及びFireのPCT公開WO01/29058; Deschamps-DepailletteのPCT公開WO99/07409; 及びLi等のPCT公開WO00/44914を参照)。更に又、RNAiは当初は2本鎖RNA (dsRNA) が特異的な転写後の態様において遺伝子発現をブロックする植物及び蠕虫において観察される現象に適用されていた用語である。RNAiはインビトロ又はインビボの遺伝子発現を阻害又は低減する有用な方法である。

20

【0023】

「短鎖干渉RNA」、「siRNA」又は「短鎖干渉核酸」という用語は本明細書においては、細胞により適切にプロセシングされた場合にRNAi又は遺伝子サイレンシングを媒介することができる何れかの核酸を指す。例えば、siRNAは自己相補のセンス及びアンチセンスの領域を含む2本鎖ポリヌクレオチド分子であることができ、ここでアンチセンス領域は標的遺伝子に対する相補性を含む。siRNAは自己相補センス及びアンチセンス領域を有する1本鎖ヘアピンポリヌクレオチドであることができ、ここで、アンチセンス領域は標的遺伝子に対する相補性を含む。siRNAは2つ以上のループ構造及び自己相補センス及びアンチセンス領域を含むステムを有する環状1本鎖ポリヌクレオチドであることができ、ここで、アンチセンス領域は標的遺伝子に対する相補性を含み、そして環状ポリヌクレオチドはインビボ又はインビトロの何れかでプロセシングされてRNAiを媒介できる活性なsiRNAを形成することができる。siRNAは標的遺伝子への相補性を有する1本鎖ポリヌクレオチドを含むことができ、ここで1本鎖ポリヌクレオチドは更に末端のホスフェート基、例えば5'-ホスフェート (例えばMartinez et al., 2002, Cell, 110, 563-574参照) 又は5', 3'-ジホスフェートを含むことができる。特定の実施形態においては、siRNAは標的核酸に結合して標的核酸の活性を改変する非酵素性の核酸である。siRNAの結合及び/又は活性はRNA誘導サイレンシング複合体 (即ちRISC) のような1つ以上の蛋白又は蛋白複合体との相互作用により促進してよい。特定の実施形態においては、siRNAはsiRNA分子の一方の鎖の単一の隣接配列に沿って標的配列に相補な配列を含む。

30

40

【0024】

場合により、本出願のsiRNAは阻害すべき遺伝子 (「標的」遺伝子) に関するmR

50

RNA転写産物の少なくとも1部分のヌクレオチド配列に生理学的条件下（例えば細胞環境において）ハイブリダイズするヌクレオチド配列を含有する。2本鎖RNAはそれがRNAiを媒介する能力を有するために十分天然のRNAと同様であることのみを必要とする。即ち、本出願は遺伝子突然変異、系統の多形又は進化的分岐により予測される配列の変異を耐容できるという利点を有する。標的配列とsiRNA配列の間の耐容されるヌクレオチドのミスマッチの数は5塩基対中1、又は10塩基対中1、又は20塩基対中1つ、又は50塩基対中1つ未満である。siRNAデュプレックスの中心におけるミスマッチは最も重要であり、標的RNAの切断を本質的に根絶する場合がある。これとは対照的に、標的RNAに相補なsiRNA鎖の3'末端のヌクレオチドは標的認識の特異性には大きく寄与しない。配列同一性は当該分野で知られた配列比較及びアライメントアルゴリズム（Gribnikov and Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991及びその引用文献参照）及び例えばデフォルトパラメーターを用いたBESTFITソフトウェアプログラムにおいて実施されるSmith-Watermanアルゴリズムによるヌクレオチド配列間のパーセント相違の計算（例えばウィスコンシン大学遺伝子計算グループ）により最適化してよい。siRNAと標的遺伝子の部分との間の90%、95%、96%、97%、98%又は99%超の配列同一性、又は、更には100%の配列同一性が好ましい。或いは、RNAのデュプレックス領域は機能的にはストリンジェントな条件下（例えば400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、50℃又は70℃ハイブリダイゼーションを12～16時間；その後洗浄）に標的遺伝子転写産物の一部分とハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列として定義してよい。

10

20

【0025】

dsRNAの2本鎖構造は単一の自己相補RNA鎖、2つの相補RNA鎖、又は、DNA鎖及び相補RNA鎖により形成してよい。場合によりRNAデュプレックス形成は細胞の内部又は外部のいずれかにおいて開始してよい。RNAは細胞当たり少なくとも1コピーの送達を可能にする量において導入してよい。より高用量（例えば細胞当たり少なくとも5、10、100、500又は1000コピー）の2本鎖物質はより効果的な阻害をもたらすが、特定の用途にはより低用量でも有用である場合がある。阻害はRNAのデュプレックス領域に相当するヌクレオチド配列が阻害の為にターゲティングされるという点において配列特異的である。

30

【0026】

本明細書に記載する通り、発明要件のsiRNAは約19～30ヌクレオチド長、約21～27ヌクレオチド長、約21～25ヌクレオチド長、又は、約21～23ヌクレオチド長のデュプレックス領域を含む。siRNAはヌクレアーゼ複合体をリクルートし、そして、特異的配列との対形成により標的遺伝子転写産物まで複合体を案内すると理解される。結果として、標的遺伝子転写産物は蛋白複体内のヌクレアーゼにより分解される。特定の実施形態においては、siRNA分子は3'ヒドロキシル基を含む。特定の実施形態においては、siRNAコンストラクトは例えば酵素ダイサーの存在下により長い2本鎖RNAをプロセッシングすることにより形成することができる。1つの実施形態において、ショウジョウバエのインビトロの系を使用する。この実施形態においては、dsRNAをショウジョウバエから誘導した可溶性抽出物と組合せ、これにより複合物を形成する。複合物はdsRNAが約21～約27ヌクレオチドのRNA分子にまでプロセッシングされるような条件化に維持する。siRNA分子は当該分野で知られた多くの手法を用いて精製できる。例えばゲル電気泳動を用いてsiRNAを精製できる。或いは、非変性の方法、例えば非変性カラムクロマトグラフィーを用いてsiRNAを精製できる。更に又、クロマトグラフィー（例えばサイズエクスクルージョンクロマトグラフィー）、グリセロール勾配遠心分離、抗体を用いたアフィニティー精製を使用することによりsiRNAを精製できる。

40

【0027】

要件のdsRNA（例えばsiRNA）の製造は化学合成法によるか、又は、組み換え

50

核酸手法により実施できる。投与細胞の内因性RNAポリメラーゼはインビボの転写を媒介する場合があり、或いは、クローニングされたRNAポリメラーゼをインビトロの転写の為に使用できる。本明細書においては、本出願のdsRNA又はsiRNA分子はRNAのみを含有する分子に限定する必要はなく、むしろ化学改変されたヌクレオチド及び非ヌクレオチドも含む。例えば、dsRNAは例えば細胞ヌクレアーゼに対する感受性を低減するため、生体利用性を向上させるため、製剤特性を向上させるため、及び／又は他の薬物動態特性を変化させるために、ホスフェート糖骨格又はヌクレオシドの何れかの改変も含んでよい。例示すれば、天然のRNAのホスホジエステル連結部を改変して少なくとも1つの窒素又はイオウのヘテロ原子が含まれるようにしてよい。RNA構造の改変はdsRNAへの全般的応答を回避しつつ、特定の遺伝子の阻害が可能となるように適宜調節してよい。同様に塩基を改変することによりアデノシンデアミナーゼの活性をブロックしてよい。dsRNAは酵素的に、又は、部分的／全体的有機合成により製造してよく、何れかの改変されたりボヌクレオチドをインビボの酵素的又は有機合成により導入できる。RNA分子を化学改変する方法をdsRNAを改変するために採用することができる（例えばHeidenreich et al., (1997)、Nucleic Acids Res. 25:776-780; Wilson et al., (1994)、J. Mol. Recogn. 7:89-98; Chen et al., (1995)、Nucleic Acids Res. 23:2661-2668; Hirschbein et al., (1997)、Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:55-61を参照）。単に例示すれば、dsRNA又はsiRNAの骨格をホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスホジチオエート、キメラメチルホスホネートホスホジエステル、ペプチド核酸、5-プロピニルピリミジン含有オリゴマー又は糖改変（例えば2'-置換リボヌクレオシド、α配置）を用いて改変できる。特定の場合において、本出願のdsRNAは2'-ヒドロキシ（2'-OH）含有ヌクレオチドを欠失している。特定の実施形態においては、siRNA分子はホスホロチオエートセンス鎖を含む。特定の実施形態においては、siRNA分子はホスホジエステルアンチセンス鎖を含む。

【0028】

特定の実施形態において、siRNA分子の少なくとも1つの鎖は約1～約10ヌクレオチド長、約1～5ヌクレオチド長、約1～3ヌクレオチド長、又は約2～4ヌクレオチド長の3'オーバーハングを有する。特定の実施形態においては、siRNAは3'オーバーハングを有する1つの鎖を含んでよく、そしてもう一方の鎖は3'末端でブラント末端となっている（例えば3'オーバーハングを有さない）。別の実施形態においては、siRNAは両方の鎖に3'オーバーハングを含んでよい。オーバーハングの長さは各鎖につき同じかまたは異なっていてよい。siRNAの安定性を更に増強するためには、3'オーバーハングは分解に対して安定化させることができる。1つの実施形態において、RNAはプリンヌクレオチド、例えばアデノシン又はグアノシンヌクレオチドを含めることにより安定化される。或いは、ピリミジンヌクレオチドの改変類縁体による置換、例えば2'-デオキシチミジンによるウリジンヌクレオチド3'オーバーハングの置換は耐容性を示し、そしてRNAiの効率に影響しない。2'ヒドロキシルが非存在であることは、組織培養の培地におけるオーバーハングのヌクレアーゼ耐性を大きく増強し、そしてインビボで有益である場合がある。

【0029】

別の実施形態においては、要件のdsRNAはまた長い2本鎖RNAの形態であることができる。例えば、dsRNAは少なくとも25、50、100、200、300又は400塩基である。一部の場合においては、dsRNAは400～800塩基長である。場合により、dsRNAは例えば細胞内でsiRNA配列を生成するために細胞内で消化される。しかしながら、インビボの長2本鎖RNAの使用は、恐らくは配列非依存性のdsRNA応答により誘発される場合がある有害な作用の為に、常時現実的であるわけではない。そのような実施形態においては、インターフェロン又はPKRの作用を低減す

る局所送達系及び／又は薬剤の使用が好ましい。

【0030】

別の特定の実施形態においては、dsRNA又はsiRNAはヘアピン構造（又はヘアピンRNA）の形態である。ヘアピンRNAは外因性に合成することができ、或いは、インビボRNAポリメラーゼIIIプロモーター転写により形成できる。哺乳類細胞における遺伝子サイレンシングのためのそのようなヘアピンRNAの作成及び使用の例は例えば Paddison et al., Genes Dev. 2002, 16:948-58; McCaffrey et al., Nature, 2002, 418:38-9; McManus et al., RNA, 2002, 8:842-50; Yu et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2002, 99:6047-52 に記載されている。好ましくは、このようなヘアピンRNAを細胞内又は動物内で操作することにより標的遺伝子の持続的で安定な抑制を確保する。siRNAは細胞内でヘアピンRNAをプロセッシングすることにより生成できることが当該分野で知られている。

10

【0031】

PCT出願WO01/77350はトランスジーンの二重指向性転写により真核生物の細胞において同じトランスジーンセンス及びアンチセンスRNA転写産物の両方を生じさせるための例示されるベクターを記載している。従って、特定の実施形態においては、本出願は以下の独特な特徴を有する、即ち、逆方向に配置した2つのオーバーラップ転写単位を有し、そして、目的のdsRNAに関するトランスジーンにフランキングしているウィルスレプリコンを含み、ここで2つのオーバーラップ転写単位は宿主細胞内で同じトランスジーンフラグメントからセンス及びアンチセンスのRNA転写産物の両方を生じさせる組み換えベクターを提供する。

20

【0032】

例示される実施形態においては、本出願は上記表1に示すコア標的配列、又は、片側又は両側でコア標的配列にフランキングしている+/-5、+/-10又は+/-20ヌクレオチドを有するコア標的配列に相当するR2遺伝子又はmRNAの領域に相当する領域に指向されたsiRNAを提供する。種々の例示されるsiRNAデュプレックスの配列を以下の表2～8に示す。

【0033】

（表2．標的部位A、B及びCに指向されたsiRNAデュプレックス。下線残基は3'オーバーハングを示す。）

30

【0034】

【化 2 1】

標記	配列	鎖	配列番号
siRRM2A (または RRM2-444)	5' <u>cccaucgaguaccaugauauc</u> 3'	センス	配列番号 7
	3' <u>agggguagcucaugguacuau</u> 5'	アンチセンス	配列番号 8
siRRM2B (または RRM2-632)	5' <u>ggagcgauuuagccaagaagu</u> 3'	センス	配列番号 9
	3' <u>caccucgcuaaaucgguucuu</u> 5'	アンチセンス	配列番号 10
siRRM2C (または RRM2-928)	5' <u>ggcucaagaaacgaggacuga</u> 3'	センス	配列番号 11
	3' <u>gaccgaguucuuugcuccuga</u> 5'	アンチセンス	配列番号 12

10

20

上記表 2 に示した 3 種の 21 量体の相当する 27 量体の siRNA もまた提供される。より詳細には、「27R」及び「27L」変異体は R2 発現のダウンレギュレーションにおいてより強力である場合がある。Kim et al., “Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy”, Nature Biotechnology 23:222-226 (2005); Rose et al., “Functional Polarity is Introduced by Dicer Processing of Short Substrate RNAs”, Nucleic Acids Research, 33(13):4140-56 (2005) を参照できる。「R」27 量体は初期標的配列の右側（標的に対して 3'）に伸長する追加的塩基を有し、「L」27 量体は初期標的配列の左側（標的に対して 5'）に伸長する追加的塩基を有する。27 量体 siRNA の例は以下の表 3 に示す。

30

【0035】

（表 3. 上記表 2 に示す 21 量体 siRNA に相当する 27 量体 siRNA。大文字は DNA 残基を示し、小文字は RNA 残基を示し、[5' phos] は 5' ホスフェートを示し、そして下線を付した残基は 3' オーバーハングを示す。）

【0036】

40

【化 2 2】

標記	配列	鎖	配列番号
siRRM2A1 (または RRM2- 444-27R)	5' [5'phos]cccaucgaguaccaugauaucugGC 3'	センス	配列番号 13
	3' agggguagcucaugguacuauagaccg 5'	アンチ センス	配列番号 14
siRRM2A2" (または "RRM2- 444-27L)	5' aucuuccccaucgaguaccaugauauc 3'	センス	配列番号 15
	3' TAgaggguagcucaugguacuau[5'phos] 5'	アンチ センス	配列番号 16
siRRM2B1 (または RRM2- 632-27R)	5' [5'phos]ggagcgauuuagccaagaaguucAG 3'	センス	配列番号 17
	3' caccucgcuaaaucgguucuuaaguc 5'	アンチ センス	配列番号 18
siRRM2B2 (または RRM2- 632-27L)	5' cuugguggagcgauuuagccaagaagu 3'	センス	配列番号 19
	3' GAaccaccucgcuaaaucgguucuu[5'phos] 5'	アンチ センス	配列番号 20
siRRM2C1 (または RRM2- 928-27R)	5' [5'phos]ggcucaagaaacgaggacugagaTG 3'	センス	配列番号 21
	3' gaccgaguucuuugcuccugacucuaac 5'	アンチ センス	配列番号 22
siRRM2C2 (または RRM2- 928-27L)	5' uauucuggcucaagaaacgaggacuga 3'	センス	配列番号 23
	3' ATaagaccgaguucuuugcuccuga[5'phos] 5'	アンチ センス	配列番号 24

本出願はまたコア標的配列の-20～+20塩基内又は本出願のsiRNAの-10～+10塩基内でターゲティングするsiRNAを提供する。例えば、3種の21量体のsiRNAの各々の-5～+5塩基内に標的部位を有する21量体デュプレックスが示されるか、又は、3種のコア標的配列の各々の-10～+10塩基が以下の表4～8において示される。

【0037】

10

20

30

40

50

(表4. 標的部位Aに対して指向され、siRRM2A siRNAデュプレックスの-5～+5塩基からタイリングされたsiRNAデュプレックス。下線を付した残基は3'オーバーハングを示す。)

【0038】

【化23】

標記	配列	鎖	配列番号
siRRM2A-5 (または RRM2-439)	5' ucu <u>u</u> ccccaucgaguacca <u>u</u> g 3'	センス	配列番号 25
	3' <u>g</u> uagaagggguagcucauggu 5'	アンチ センス	配列番号 26
siRRM2A-4 (または RRM2-440)	5' cu <u>u</u> ccccaucgaguacca <u>u</u> a 3'	センス	配列番号 27
	3' <u>u</u> agaagggguagcucauggua 5'	アンチ センス	配列番号 28
siRRM2A-3 (または RRM2-441)	5' uu <u>u</u> ccccaucgaguacca <u>u</u> gau 3'	センス	配列番号 29
	3' <u>a</u> gaagggguagcucaugguac 5'	アンチ センス	配列番号 30
siRRM2A-2 (または RRM2-442)	5' u <u>u</u> ccccaucgaguacca <u>u</u> gaua 3'	センス	配列番号 31
	3' <u>g</u> aagggguagcucaugguacu 5'	アンチ センス	配列番号 32
siRRM2A-1 (または RRM2-443)	5' c <u>u</u> ccccaucgaguacca <u>u</u> gauau 3'	センス	配列番号 33

【0039】

10

20

30

【化 2 4】

標記	配列	鎖	配列番号
	3' <u>a</u> agggguagcucaugguacua 5'	アンチセンス	配列番号 34
siRRM2A+1 (または RRM2-445)	5' ccaucgaguaccaugauauc <u>u</u> 3'	センス	配列番号 35
	3' gggguagcucaugguacuaua 5'	アンチセンス	配列番号 36
siRRM2A+2 (または RRM2-446)	5' caucgaguaccaugauauc <u>g</u> 3'	センス	配列番号 37
	3' gggguagcucaugguacuauag 5'	アンチセンス	配列番号 38
siRRM2A+3 (または RRM2-447)	5' aucgaguaccaugauauc <u>gg</u> 3'	センス	配列番号 39
	3' gguagcucaugguacuauaga 5'	アンチセンス	配列番号 40
siRRM2A+4 (または RRM2-448)	5' ucgaguaccaugauauc <u>ggc</u> 3'	センス	配列番号 41
	3' <u>g</u> uagcucaugguacuauagac 5'	アンチセンス	配列番号 42
siRRM2A+5 (または RRM2-449)	5' cgaguaccaugauauc <u>ggca</u> 3'	センス	配列番号 43
	3' <u>u</u> agcucaugguacuauagacc 5'	アンチセンス	配列番号 44

(表 5. 標的部位 B に対して指向され、s i R R M 2 B s i R N A デュプレックスの -5 ~ +5 塩基からタイリングされた s i R N A デュプレックス。下線を付した残基は 3' オーバーハングを示す。)

【0040】

10

20

30

40

【化 2 5】

標記	配列	鎖	配列番号
siRRM2B-5 (または RRM2-627)	5' <u>u</u> ugguggagcgauuuagccaa 3'	センス	配列番号 45
	3' <u>u</u> gaaccaccucgcuaaaucgg 5'	アンチ センス	配列番号 46
siRRM2B-4 (または RRM2-628)	5' ugguggagcgauuuagccaag 3'	センス	配列番号 47
	3' <u>g</u> aaccaccucgcuaaaucggu 5'	アンチ センス	配列番号 48
siRRM2B-3 (または RRM2-629)	5' gguggagcgauuuagccaaga 3'	センス	配列番号 49
	3' <u>a</u> accaccucgcuaaaucgguu 5'	アンチ センス	配列番号 50
siRRM2B-2 (または RRM2-630)	5' guggagcgauuuagccaagaa 3'	センス	配列番号 51
	3' <u>a</u> ccaccucgcuaaaucgguuc 5'	アンチ センス	配列番号 52
siRRM2B-1 (または RRM2-631)	5' uggagcgauuuagccaagaag 3'	センス	配列番号 53
	3' <u>c</u> caccucgcuaaaucgguucu 5'	アンチ センス	配列番号 54
siRRM2B+1 (または RRM2-633)	5' gagcgauuuagccaagaagu 3'	センス	配列番号 55
	3' <u>a</u> ccucgcuaaaucgguucuuc 5'	アンチ センス	配列番号 56
siRRM2B+2 (または RRM2-634)	5' agcgauuuagccaagaagu <u>c</u> 3'	センス	配列番号 57

【0041】

10

20

30

40

【化 2 6 - 1】

標記	配列	鎖	配列番号
	3' <u>ccucgc</u> uaaaucgguucu <u>ca</u> 5'	アンチセンス	配列番号 58
siRRM2B+3 (または RRM2-635)	5' gcga <u>uuuagccaagaagu</u> <u>ca</u> 3'	センス	配列番号 59
	3' <u>cucgc</u> uaaaucgguucu <u>caa</u> 5'	アンチセンス	配列番号 60
siRRM2B+4 (または RRM2-636)	5' cga <u>uuuagccaagaagu</u> <u>cag</u> 3'	センス	配列番号 61
	3' <u>ucgc</u> uaaaucgguucu <u>caag</u> 5'	アンチセンス	配列番号 62
siRRM2B+5 (または RRM2-637) (または siR2B+5) (または siRRM2B+5 21mer)	5' ga <u>uuuagccaagaagu</u> <u>caga</u> 3'	センス	配列番号 63
	3' <u>cgc</u> uaaaucgguucu <u>caagu</u> 5'	アンチセンス	配列番号 64

10

20

(表 6. 標的部位 C に対して指向され、s i R R M 2 C s i R N A デュプレックスの -5 ~ +5 塩基からタイリングされた s i R N A デュプレックス。下線を付した残基は 3' オーバーハングを示す。)

30

【 0 0 4 2】

【化 2 6 - 2】

標記	配列	鎖	配列番号
siRRM2C-5 (または RRM2-923)	5' auucuggcucaagaaacgagg 3'	センス	配列番号 65
	3' <u>ua</u> uaagaccgaguuc <u>uu</u> gc <u>u</u> 5'	アンチセンス	配列番号 66
siRRM2C-4 (または RRM2-924)	5' uucuggcucaagaaacgagga 3'	センス	配列番号 67
	3' <u>aa</u> aagaccgaguuc <u>uu</u> gc <u>c</u> 5'	アンチセンス	配列番号

40

【 0 0 4 3】

【化 2 7】

標記	配列	鎖	配列番号
			68
siRRM2C-3 (または RRM2-925)	5' ucuggcucaagaaacgaggac 3'	センス	配列番号 69
	3' <u>ua</u> agaccgaguucuuugcucc 5'	アンチ センス	配列番号 70
siRRM2C-2 (または RRM2-926)	5' cuggcucaagaaacgaggacu 3'	センス	配列番号 71
	3' <u>aag</u> accgaguucuuugcuccu 5'	アンチ センス	配列番号 72
siRRM2C-1 (または RRM2-927)	5' uggcucaagaaacgaggacug 3'	センス	配列番号 73
	3' <u>ag</u> accgaguucuuugcuccug 5'	アンチ センス	配列番号 74
siRRM2C+1 (または RRM2-929)	5' gcucaagaaacgaggacugau 3'	センス	配列番号 75
	3' <u>acc</u> gaguucuuugcuccugac 5'	アンチ センス	配列番号 76
siRRM2C+2 (または RRM2-930)	5' cucaagaaacgaggacugaug 3'	センス	配列番号 77
	3' <u>ccg</u> aguucuuugcuccugacu 5'	アンチ センス	配列番号 78
siRRM2C+3 (または RRM2-931)	5' ucaagaaacgaggacugaugc 3'	センス	配列番号 79
	3' <u>cg</u> aguucuuugcuccugacua 5'	アンチ センス	配列番号 80
siRRM2C+4 (または RRM2-932)	5' caagaaacgaggacugaugcc 3'	センス	配列番号

10

20

30

40

【 0 0 4 4】

【化 2 8 - 1】

標記	配列	鎖	配列番号
			81
	3' <u>g</u> aguucu <u>u</u> ngcuccugacuac 5'	アンチセンス	配列番号 82
siRRM2C+5 (または RRM2-933)	5' aagaaacgaggacugaug <u>ccu</u> 3'	センス	配列番号 83
	3' <u>a</u> guucu <u>u</u> ngcuccugacuacg 5'	アンチセンス	配列番号 84

10

これ等の 21 量体デュプレックスの相当する 27 量体（「27 R」又は「27 L」）変異体もまた提供される。例を以下の表 7 に示す。

【0045】

（表 7. siRRM2B+5 siRNA デュプレックスに相当する 27 量体（又は 25 / 27 量体）siRNA。下線を付した残基は 3' オーバーハングを示す。）

20

【0046】

【化 2 8 - 2】

標記	配列	鎖	配列番号
siRRM2B+5 27mer (または siR2B+5-27)	5'[5'phos]gauuuagccaagaaguucagauuAC 3'	センス	配列番号 85
	3' <u>c</u> gcuaaaucgguucuuaagucuaaug 5'	アンチセンス	配列番号 86

30

表 8 はコア標的配列の -20 ~ +20 塩基内又は本出願の siRNA の -10 ~ +10 塩基内でターゲティングする siRNA の例を示す。

【0047】

（表 8. 標的部位 B に対して指向され、siRRM2B siRNA デュプレックスの +6 ~ +10 塩基からタイリングされた siRNA デュプレックス。下線を付した残基は 3' オーバーハングを示す。）

40

【0048】

【化 2 9】

標記	配列	鎖	配列番号
siRRM2B+6 (または RRM2-638) (または siR2B+6)	5' auuagccaagaaguucagau 3'	センス	配列番号 87
	3' gcuaaaucgguucucaaguc 5'	アンチ センス	配列番号 88
siRRM2B+7 (または RRM2-639) (または siR2B+7)	5' uuuagccaagaaguucagauu 3'	センス	配列番号 89
	3' cuaaaucgguucucaagucu 5'	アンチ センス	配列番号 90
siRRM2B+8 (または RRM2-640) (または siR2B+8)	5' uuagccaagaaguucagauua 3'	センス	配列番号 91
	3' uaaaucgguucucaagucua 5'	アンチ センス	配列番号 92
siRRM2B+9 (または RRM2-641) (または siR2B+9)	5' uagccaagaaguucagauuac 3'	センス	配列番号 93
	3' aaucgguucucaagucuaa 5'	アンチ センス	配列番号 94
siRRM2B+10 (または RRM2-642) (または siR2B+10)	5' agccaagaaguucagauuaca 3'	センス	配列番号 95
	3' aaucgguucucaagucuaau 5'	アンチ センス	配列番号 96

酵素核酸

特定の実施形態においては、本出願は R 2 遺伝子又は mRNA の発現を阻害する酵素核酸に関する。例示される酵素核酸は上記表 1 に示したコア標的配列の 1 つにターゲティングされるもの、又はコア標的配列の片方又は両方にフランキングする 5、10 又は 20ヌクレオチドを有するコア標的配列を含む領域を含む。「酵素核酸」とは、特定の標的遺伝子に対して基質結合領域において相補性を有し、そして更に標的核酸を特異的に切断する作用を示す酵素活性を有する核酸を意味する。酵素核酸は核酸を分子相互で切断することにより標的核酸を不活性化することができると理解される。これ等の相補領域は標的核酸への酵素核酸の十分なハイブリダイゼーションを可能にし、これにより切断が可能となる。100 パーセントの相補性（同一性）が好ましいが、50～75%もの低値の相補性もまた本出願においては有用であることができる（例えば Werner and Uhlenbeck, 1995, Nucleic Acids Research, 23, 2092-2096; Hammann et al., 1999, Antisense and Nucleic Acid Drug Dev., 9, 25-31 参照）。酵素核酸は

10

20

30

40

50

塩基、糖及び／又はホスフェート基において改変できる。本明細書に記載する通り、「酵素核酸」という用語はリボザイム、触媒RNA、酵素RNA、触媒DNA、アプタザイム又はアプタマー結合リボザイム、調節可能なリボザイム、触媒オリゴヌクレオチド、ヌクレオザイム、DNAザイム、RNA酵素、エンドリボヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、ミニザイム、リードザイム、オリゴザイム又はDNA酵素のような表現と互換的に使用する。これらの用語は全て、酵素活性を有する核酸を説明するものである。本出願において記載する特定の酵素核酸は出願において限定されるものではなく、当業者の知る通り、本出願の酵素核酸において重要な点は、それが標的核酸領域の1つ以上に相補である特異的基質結合部位を有すること、及び、それがその基質結合部位の内部又は周囲に分子に核酸切断及び／又はライゲーション活性を付与するヌクレオチド配列を有することのみである（Cech等、米国特許第4,987,071号；Cech et al., 1988, 260 JAMA 3030）。

10

【0049】

天然に存在する酵素核酸の数種類が現在知られている。各々は生理学的条件下にてトランスに結合している核酸ホスホジエステルの加水分解を触媒することができる（そしてそのため他の核酸を切断できる）。一般的に酵素核酸は最初に標的核酸に結合することにより作用する。そのような結合は標的核酸を切断する作用を有する分子の酵素部分に近接して保持されている酵素核酸の標的結合部分を介して生じる。即ち、酵素核酸は標的核酸を先ず認識し、次に相補塩基対形成を介して結合し、そして正しい部位に結合した後は標的核酸を切断するために酵素的に作用する。このような標的核酸の戦略的切断はコードされた蛋白の合成を指向するその能力を破壊することになる。酵素核酸が結合し、その核酸標的を切断した後、それはその核酸から遊離し、別の標的を探し、そして新しい標的に反復的に結合して切断することができる。

20

【0050】

特定の実施形態において、要件の酵素核酸はmRNAの翻訳を防止するためにR2mRNAを触媒的に切断するように設計されたリボザイムである（例えば1990年10月4日公開のPCT国際公開WO90/11364；Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225；及び米国特許第5,093,246号参照）。部位特異的認識配列においてmRNAを切断するリボザイムを特定のmRNAを破壊するために使用できるが、ハンマーヘッドリボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッドリボザイムは標的mRNAと相補塩基対を形成する領域にフランキングすることにより決定される位置においてmRNAを切断する。唯一の条件は以下の2塩基配列、即ち5'-UG-3'を標的mRNAが有することである。ハンマーヘッドリボザイムの構築及び製造は当該分野で良く知られており、そして、Haseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334:585-591においてより詳細に説明されている。本出願のリボザイムはまたRNAエンドリボヌクレアーゼ（以後「Cech型リボザイム」と称する）、例えばテトラヒメナ・サーモフィリア中に天然に存在（IVS又はL-19 IVS RNAとして知られる）し、広く報告されているもの（例えばZaug et al., 1984, Science, 224:574-578；Zaug and Cech, 1986, Science, 231:470-475；Zaug et al., 1986, Nature, 324:429-433；University Patents Inc.の公開国際特許出願WO88/04300；Been and Cech, 1986, Cell, 47:207-216）を含む。

30

40

【0051】

別の特定の実施形態において、要件の酵素核酸はDNA酵素である。DNA酵素はアンチセンス及びリボザイムの手法の両方の機械的特徴の一部を組み込んでいる。DNA酵素はアンチセンスオリゴヌクレオチドのような特定の標的核酸配列を認識するように設計されるが、リボザイムと同様、それらは触媒的であり、そして標的核酸を特異的に切断する。概すれば、標的核酸を特異的に認識して切断する理想的なDNA酵素を設計するためには、当業者は先ず独特の標的配列を発見しなければならない。好ましくは、独特の、又は

50

実質的には、配列は約18～22ヌクレオチドのG/Cリッチである。高いG/C含有量はDNA酵素と標的遺伝子配列の間のより強力な相互作用を確保する。DNA酵素を合成する場合、酵素をメッセージにターゲティングする特定のアンチセンス認識配列は、それがDNA酵素の2アームを含み、そしてDNA酵素ループが2つの特異的なアームの間に位置するように分割する。DNA酵素を製造し、そして投与方法は例えば米国特許第6,110,462号に記載されている。

【0052】

特定の実施形態においては、本出願の核酸剤は12～200ヌクレオチド長であることができる。1つの実施形態において、本出願の例示される酵素核酸は15～50ヌクレオチド長、例えば25～40ヌクレオチド長である（例えばJarvis et al., 1996, J. Biol. Chem., 271, 29107-29112参照）。別の実施形態においては、本出願の例示されるアンチセンス分子は15～75ヌクレオチド長、例えば20～35ヌクレオチド長である（例えばWoolf et al., 1992, PNAS., 89, 7305-7309; Milner et al., 1997, Nature Biotechnology, 15, 537-541参照）。別の実施形態においては本出願の例示されるsiRNAは20～30ヌクレオチド長、例えば21～27ヌクレオチド長である。当業者の知る通り、要件の核酸剤は本明細書において意図するその活性の為に十分でありかつ適している長さ及びコンホメーションのものであることが必要となるのみである。本出願の核酸剤の長さは、記載した一般的な限度内に限定されない。

【0053】

核酸剤の合成

100ヌクレオチド長を超える核酸の合成は自動化方法を用いた場合は困難であり、そしてそのような分子の治療上の費用は法外なものとなる。本出願においては、小型核酸モチーフ（小型とは約100ヌクレオチド長未満、好ましくは約80ヌクレオチド長未満、より好ましくは約50ヌクレオチド長未満の核酸モチーフ（例えば酵素核酸及びRNA iコンストラクト））を外因性送達の為に好ましく使用する。これ等の分子の単純な構造はRNA構造のターゲティングされた領域に侵入する核酸の能力を増大させる。

【0054】

本出願の例示される核酸阻害剤分子、例えばRNA及びDNA分子は化学合成できる。説明すれば、オリゴヌクレオチド（例えばDNA）をCaruthers, et al., 1992 Methods in Enzymology 211:3-19; Thompson, et al., International PCT Publication No. WO 99/54459, Wincott, et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:2677-2684; Wincott, et al., 1997, Methods Mol. Bio. 74:59; Brennan, et al., 1998, Biotechnol Bioeng. 61:33-45; 及びBrennanの米国特許第6,001,311号に記載の通り当該分野で知られたプロトコルを用いて合成する。オリゴヌクレオチドの合成は共通の核酸保護及びカップリング基、例えば5'末端のジメトキシトリチル及び3'末端のホスホロアミダイトを使用する。非限定的な例においては、小規模の合成を394 Applied Biosystems, Inc. の合成装置上で、2'-O-メチル化ヌクレオチドに対しては2.5分のカップリング工程、そして2'-デオキシヌクレオチドに対しては45秒のカップリング工程を用いて実施する。或いは、合成は96穴プレート合成装置、例えばProtogene (Palo Alto, CA) により製造された装置上で、サイクルに最小限の修正を加えながら実施できる。

【0055】

場合により、本明細書の核酸の部分は別個に合成し、そして合成後に、例えばライゲーションにより接合することができる（Moore, et al., 1992, Science 256:9923; Draper等、国際PCT公開WO93/23569; Sh

abarova, et al., 1991, Nucleic Acids Research 19:4247; Bellon, et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides 16:951; Bellon, et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8:204)。

【0056】

好ましくは、本明細書に記載した核酸はヌクレアーゼ耐性の基、例えば2'-アミノ、2'-C-アシル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-Hで改変することにより安定性を増強するために広範に改変される(解説についてはUsman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163を参照)。リボザイムは一般的方法を用いてゲル電気泳動により精製するか、又は、高速液体クロマトグラフィーにより精製し(HPLC; 上出Wincott et al. 参照)、そして水に再懸濁する。

【0057】

核酸の活性の最適化

改変(例えば塩基、糖及び/又はホスフェート)を有する核酸は血清中のリボヌクレアーゼによるその分解を防止するため、その力価を増大することができる。自身のヌクレアーゼ安定性及び薬効を顕著に増強するような、核酸に導入できる塩基、糖及び/又はホスフェートの改変を説明する当該分野の数例が存在する。例えば、オリゴヌクレオチドはヌクレアーゼ耐性の基、例えば2'-アミノ、2'-C-アシル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-Hによる改変、ヌクレオチド塩基改変により、安定性増強及び/又は生物学的活性増強の為に改変される(解説についてはUsman and Cedergren, 1992, TIBS. 17, 34; Usman et al., 1994 Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163; Burgin et al., 1996 Biochemistry 35, 14090を参照)。核酸の糖改変は当該分野で広範に報告されている(Eckstein et al., PCT公開WO92/07065; Perrault et al. Nature 1990, 344, 565-568; Pieken et al. Science, 1991, 253, 314-317; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 1992, 17, 334-339; Usman et al. PCT公開WO93/15187; Sproat, 米国特許第5,334,711号 and Beigelman et al., 1995, J. Biol. Chem. 270, 25702; Beigelman et al., PCT公開WO97/26270; Beigelman et al., 米国特許第5,716,824号; Usman et al., 米国特許第5,627,053号; Woolf et al., PCT公開WO98/13526; 1998年4月20日出願のThompson et al., U. S. SNo. 60/082,404; Karpeisky et al., 1998, Tetrahedron Lett., 39, 1131; Earnshaw and Gait, 1998, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences), 48, 39-55; Verma and Eckstein, 1998, Annu. Rev. Biochem., 67, 99-134; 及び and Burlina et al., 1997, Bioorg. Med. Chem., 5, 1999-2010を参照)。同様の改変を用いて本出願の核酸を改変できる。

【0058】

ホスホロチオエート、ホスホロチオエート及び/又は5'-メチルホスホネート連結によるオリゴヌクレオチド分子間連結の化学改変は安定性を向上させるが、これ等の改変の過剰量は毒性を誘発する場合がある。従って、核酸を設計する場合には、これ等のヌクレオチド間連結の量を評価し、適宜最小限化することが必要である。これ等の連結の濃度を低下させれば毒性は低下するはずであり、これによりこれ等の分子の薬効が増大し、特異性が上昇する。

10

20

30

40

50

【0059】

1つの実施形態において、本出願の核酸は1つ以上のG-クランプヌクレオチドを含む。G-クランプヌクレオチドは改変されたシトシン類縁体であり、ここで、改変はデュプレックス内の相補グアニンのワトソンクリック及びフーグスティーン面の両方に水素結合する能力を付与する（例えばLin and Matteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc., 120, 8531-8532参照）。オリゴヌクレオチド内の単一のGクランプ類縁体置換は相補オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした場合に実質的に増強された螺旋熱安定性及びミスマッチ判別性をもたらすことができる。本出願の核酸におけるこのようなヌクレオチドの存在は増強されたアフィニティー及び核酸標的への特異性の両方をもたらす。別の実施形態においては、本出願の核酸は1つ以上LNA（10
ロックド核酸）ヌクレオチド、例えば2', 4'-Cミチレンビスクロヌクレオチドを含む（例えばWengel等、PCT公開WO 00/66604及びWO 99/14226参照）。

【0060】

別の実施形態においては、本出願はR2遺伝子をターゲティングする核酸のコンジュゲート及び／又は複合体を特徴とする。このようなコンジュゲート及び／又は複合体は細胞のような生物学的な系内への核酸の送達を促進するために使用することができる。本出願により提供されるコンジュゲート及び複合体は、細胞膜を經由して標的組織又は細胞型に治療薬を輸送又は転移させること、薬物動態を改変すること、及び／又は本出願の核酸の局在性をモジュレートすることにより治療活性を付与することができる。このようなコン
20
ジュゲート及び／又は複合体もまた以下に記載する。

【0061】

本出願は細胞膜を通過する分子、例えば限定しないが、小分子、脂質、リン脂質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、抗体、毒素、負荷電重合体及び他の重合体、例えば蛋白、ペプチド、ホルモン、炭水化物、ポリエチレングリコール又はポリアミンの送達のための新しいコンジュゲート及び複合体の設計及び合成を含む。一般的に、記載した輸送物質は独立して、又は、他成分系の部分として、分解性リンカーを伴うか伴うことなく使用されるように設計されている。これ等の化合物は血清の存在下又は非存在下に異なる組織に起源する多くの細胞型への本出願の核酸の送達及び／又は局在化を向上させることが期待される（Sullenger及びCechの米国特許第5, 854, 038号参照）。本
30
明細書に記載した分子のコンジュゲートは生体分解性のリンカー、例えば生体分解性の核酸リンカー分子を介して生物学的活性分子に結合することができる。

【0062】

「生体分解性核酸リンカー分子」という用語は本明細書においては、ひとつの分子を別の分子、例えば生物学的に活性な分子に連結するための生体分解性リンカーとして設計された核酸分子を指す。生体分解性核酸リンカー分子の安定性はリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド及び化学改変されたヌクレオチド、例えば2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-アミノ、2'-O-アミノ、2'-C-アリル、2'-O-アリル及び他の2'-改変又は塩基改変されたヌクレオチドの種々の組合せを用いることによりモジュレートすることができる。生体分解性核酸リンカー分子は2量体、3量体、4量体又は
40
より長い核酸、例えば約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであることができ、或いは、リン系の結合、例えばホスホロアミデート又はホスホジエステル結合を有する単一のヌクレオチドを含むことができる。生体分解性核酸リンカー分子はまた核酸骨格、核酸糖又は核酸塩基の改変を含むこともできる。「生体分解性」という用語は本明細書においては、生物学的系における分解、例えば酵素的分解又は化学的分解を指す。

【0063】

外因性に送達される治療用の核酸剤、例えば本明細書に記載した分子は場合により、望ましくない蛋白のレベルを低下させるために十分長く標的RNAの翻訳が抑制されるまで
50

、細胞内で安定である。この期間は疾患の状態に応じて数時間～数日の範囲となる。これ等の核酸剤は有効な細胞内治療薬として機能するためにはヌクレアーゼに耐性で無ければならない。本明細書に記載した、及び当該分野で知られた核酸の化学合成の向上により、核酸を上記した通りそのヌクレアーゼ安定性を増大させるためのヌクレオチド改変を導入することにより改変する能力が拡張した。

【0064】

別の特徴において、核酸は5'及び／又は3'キャップ構造を含む。「キャップ構造」とは、オリゴヌクレオチドの何れかの末端に取り込まれている化学改変を意味する（例えばWincott et al., WO97/26270参照）。これ等の末端改変は核酸をエキソヌクレアーゼ分解から保護し、そして細胞内の送達及び／又は局在化を支援することができる。キャップは5'末端（5'キャップ）又は3'末端（3'キャップ）に存在することができるか、又は両方の末端に存在することができる。非限定的な例においては、5'キャップは、反転無塩基残基（部分）、4', 5'-メチレンヌクレオチド、1-（ベータ-D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、炭素環ヌクレオチド、1, 5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；改変塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート連結部；スレオペンチフラノシルヌクレオチド；非環状3', 4'-セコヌクレオチド；非環状3', 4'-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；非環状3, 5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-反転ヌクレオチド部分；3'-3'-反転無塩基部分；3'-2'-反転ヌクレオチド部分；3'-2'-反転無塩基部分；1, 4-ブタンジオールホスフェート；3'-ホスホロアミデート；ヘキシルホスフェート；アミノヘキシルホスフェート；3'-ホスフェート；3'-ホスホロチオエート；ホスホロジチオエート；又は架橋又は非架橋メチルホスホネート部分を含む（より詳細な説明は上出Wincott等参照）。他の非限定的な例においては、3'キャップは、例えば4', 5'-メチレンヌクレオチド、1-（ベータ-D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、炭素環ヌクレオチド、5'-アミノアルキルホスフェート；1, 3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート、3-アミノプロピルホスフェート；6-アミノヘキシルホスフェート；1, 2-アミノドデシルホスフェート；ヒドロキシプロピルホスフェート；1, 5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；改変塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート；スレオペンチフラノシルヌクレオチド；非環状3', 4'-セコヌクレオチド；3, 4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；3, 5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、5'-5'-反転ヌクレオチド部分；5'-5'-反転無塩基部分；5'-ホスホロアミデート；5'-ホスホロチオエート；1, 4-ブタンジオールホスフェート；5'-アミノ；架橋又は非架橋の5'-ホスホロアミデート、ホスホロチオエート及び／又はホスホロジチオエート、架橋又は非架橋のメチルホスホネート及び5'-メルカプト部分を含む（より詳細な説明はBeaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925参照）。

【0065】

R2阻害剤の使用

特定の実施形態においては、本出願は1つ以上の細胞、例えば腫瘍又は癌性の細胞、又は病原体細胞の望ましくない増殖を阻害する方法を提供する。特定の実施形態においては、本出願は腫瘍の成長を阻害又は低減する方法及び癌に罹患した個体を治療する方法を提供する。これ等の方法は上記したR2阻害剤（例えばsiRNA）1つ以上の有効量を個体患者に投与することを含む。特定の実施形態においては、本出願は転移性の癌の治療及び／又は転移の防止のための方法を提供する。特定の実施形態においては、本出願は例えば化学療法剤のような伝統的治療薬に抵抗性である癌を治療するための方法を提供する。特定の方法は、動物、特にヒトの施療的及び予防的な治療を特に目標としており、そしてそのような方法においては、R2阻害剤の治療有効量を動物又はヒトの患者に投与する。

【0066】

「治療する」という用語は予防的及び／又は施療的な治療を意味する。「予防的又は施

療的な」治療という用語は当該分野で知られる通りであり、そして要件の組成物の1つ以上の宿主への投与を含む。望ましくない状態（例えば宿主動物の疾患又は他の望ましくない状況）の臨床的顕在化の前に投与する場合には治療は予防的（即ち望ましくない状態の発症に対抗して宿主を保護する）となるのに対し、望ましくない状態の顕在化の後に投与する場合には治療は施療的（即ち既存の望ましくない状態又はその副作用を減衰、緩解又は安定化させる）となる。

【0067】

本明細書に記載する通り、腫瘍又は癌は個体内部の腫瘍、腫瘍の異種移植片又はインビトロで培養されている腫瘍を含む。特に、本出願の核酸剤は癌を治療又は予防するために有用である。要件の方法により治療してよい癌の例示される形態は、限定しないが、前立腺癌、膀胱癌、肺癌（小細胞又は非小細胞癌を含む）、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、子宮頸癌、子宮内膜又は他の子宮癌、卵巣癌、精巣癌、陰茎癌、陰癌、尿道癌、胆嚢癌、食道癌又は膵臓癌を含む。要件の方法により治療してよい癌の別の例示される形態は、限定しないが、骨格筋又は平滑筋の癌、胃癌、小腸癌、唾液腺癌、肛門癌、直腸癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、下垂体癌及び鼻咽頭癌を含む。本発明のR2阻害剤で治療できる癌の別の例示される形態はヘッジホッグ発現細胞を含む癌を含む。本出願のR2阻害剤で治療できる癌の更に別の例示される形態はR2発現細胞を含む癌を含む。特定のそのような実施形態においては、癌細胞と同じ組織型の正常又は非癌性の細胞は当該分野の手法により検出可能なレベルでR2を発現しない場合があり；例えば、正常な肝組織又は肝細胞は、肝細胞癌の細胞におけるR2の発現とは対照的に、R2の検出可能なレベルを発現しない。本出願は本明細書に記載したR2阻害剤が単独で使用できること、又は、他の治療薬及び／又は他の伝統的又は非伝統的な療法を含む全体的治療用法の部分として投与することができることを意図している。

【0068】

本明細書に記載したR2阻害剤核酸を用いて治療できる癌の別の例は、以下のもの、即ち、白血病、例えば限定しないが急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、例えば骨髄芽球性、前骨髄性、骨髄単球性、単球性及び赤白血病および骨髄形成異常症候群；慢性白血病、例えば限定しないが、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病；真性赤血球増加症；リンパ腫、例えば限定しないがホジキン病、非ホジキン病；多発性骨髄腫、例えば限定しないが、伏在性多発性骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞性白血病、孤立性形質細胞腫及び骨髄外形質細胞腫；ヴァルデンスト্রেームマクログロブリン血症；意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症；良性単クローン性高ガンマグロブリン血症；重鎖疾患；骨及び結合組織の肉腫、例えば限定しないが骨の肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫瘍、骨の線維肉腫、軟骨腫、骨膜性骨肉腫、軟組織骨肉腫、血管肉腫（血管の肉腫）、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫；脳腫瘍、例えば限定しないが、神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣細胞腫、希突起神経膠腫、非神経膠腫瘍、聴覚神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽細胞腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽腫、原発性脳リンパ腫；乳癌、例えば限定しないが腺癌、小葉（小細胞）癌、腺管内癌、髄様乳癌、粘液性乳癌、管状乳癌、乳頭状乳癌、パジェット病及び炎症性乳癌；副腎癌、例えば限定しないが、褐色細胞腫及び副腎皮質癌；甲状腺癌、例えば限定しないが乳頭状又は小胞状の甲状腺癌、髄様甲状腺癌及び未分化甲状腺癌；膵臓癌、例えば限定しないが、インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、ビポーマ、ソマトスタチン分泌腫瘍およびカルチノイド腫瘍又は島細胞腫瘍；下垂体癌、例えば限定しないが、クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、尖端巨大症及び尿崩症；眼の癌、例えば限定しないが、眼の黒色腫、例えば虹彩黒色腫、脈絡膜の黒色腫及び毛様体黒色腫及び網膜芽腫；陰癌、例えば扁平上皮細胞癌、腺癌及び黒色腫；外陰部癌、例えば扁平上皮細胞癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫及びパジェット病；子宮頸癌、例えば限定しないが扁平上皮細胞癌及び腺癌；子宮癌、例えば限定しないが子宮内膜癌及び子宮肉腫；卵巣癌、例えば限定しないが、卵巣上皮癌、ボーダーライン腫瘍、生殖細胞癌及び間質癌；食道癌

、例えば限定しないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘液性類表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、形質細胞腫、疣贅癌及び燕麦細胞（小細胞）癌；胃癌、例えば限定しないが、腺癌、肉芽腫性（ポリープ）、潰瘍性、表在拡張性、播種拡張性、悪性のリンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫及び癌肉腫；結腸癌；直腸癌；肝臓癌、例えば限定しないが、肝細胞癌及び胚芽細胞腫；胆嚢癌、例えば腺癌；胆管癌、例えば限定しないが、乳頭状、結節状及び播種性のもの；肺癌、例えば非小細胞肺癌、扁平上皮細胞癌（上皮様癌）、腺癌、大細胞癌及び小細胞肺癌；精巣癌、例えば限定しないが胚腫瘍、精上皮腫、未分化、古典的（典型的）、精母細胞、非精上皮腫、胎生期癌、奇形腫癌、絨毛癌（卵黄嚢腫瘍）、前立腺癌、例えば限定しないが腺癌、平滑筋肉腫及び横紋筋肉腫；陰茎癌；口腔癌、例えば限定しないが、扁平上皮細胞癌；基底癌；唾液腺癌、例えば限定しないが、腺癌、粘膜上皮様癌及び腺様嚢胞癌；咽頭癌、例えば限定しないが、扁平上皮細胞癌及び疣贅癌；皮膚癌、例えば限定しないが、基底細胞癌、扁平上皮細胞癌及び黒色腫、表在拡張性黒色腫、結節性黒色腫、悪性黒子黒色腫、末端部黒子黒色腫；腎臓癌、例えば限定しないが、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行上皮癌（腎盂及び／又は尿管）；ウィルス腫瘍；膀胱癌、例えば限定しないが移行上皮癌、扁平上皮細胞癌、腺癌、癌肉腫を含む。更に又、癌は粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、骨膜腫、血管芽細胞腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支原生癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌及び乳頭状腺癌を含む（これ等の疾患の解説については、Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin Inc., USA 参照）。

【0069】

特定の実施形態においては、本出願は例えば病原体細胞による感染に罹患した患者における、又は、病原性細胞により汚染された物体（例えば実験用又は医療用の装置、キッチンカウンター又は病原体汚染に付される何れかの物体等）の内部又は上部における病原性細胞の増殖を阻害する方法を提供する。病原体の例はウィルス、細菌、カビ等を含む。広範な種類の病原体に関する広範なゲノム情報は公的なデータベースから入手できる。このようなゲノム情報を用いて種々の病原体のR2遺伝子にターゲティングされる核酸阻害剤を設計することができる。

【0070】

本明細書に記載した方法に従って使用してよい疾患誘発ウィルスの例は、レトロウィルス科（例えばヒト免疫不全ウィルス、例えばHIV-1（別称HTLV-III、LAV又はHTLV-III/LAV、Ratner, L. et al., Nature, Vol. 313, Pp. 227-284 (1985)；Wain Hobson, S. et al., Cell, Vol. 40: Pp. 9-17 (1985) 参照）；HIV-2（Guyader et al., Nature, Vol. 328, Pp. 662-669 (1987)；欧州特許公開0269520；Chakraborti et al., Nature, Vol. 328, Pp. 543-547 (1987)；及び欧州特許出願0655501 参照）；及び他の単離体、例えばHIV-LP（国際公開WO94/00562、表題”A Novel Human Immunodeficiency Virus”；ピコナウイルス科（例えばポリオウイルス、A型肝炎ウィルス（Gust, I. D., et al., Intervirology, Vol. 20, Pp. 1-7 (1983)；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウィルス、ライノウィルス、エコーウィルス）；カルシウィルス科（例えば胃腸炎を誘発する菌株）；トガウィルス科（例えばウマ脳炎ウィルス、風疹ウィルス）；フラウィルス科（例えばデングウィルス、脳炎ウィルス、黄熱病ウィルス）；コロナウィルス科（例えばコロナウィルス）；ラブドウィルス科（例えば水疱性口内炎ウィルス；狂犬病ウィルス）；フィロウィルス科（例えばエボラウィルス）；パラミクソウィルス科（例えばパラインフルエンザウィルス、おたふくかぜウィ

ルス、麻疹ウィルス、呼吸器シンシチウム症ウィルス）；オルトミクソウィルス科（例えばインフルエンザウィルス）；ブングウィルス科（例えばハンターウィルス、ブングウィルス、フレボウィルス及びナリオウィルス）；アレナウィルス科（出血性発熱ウィルス）；レオウィルス科（例えばレオウィルス、オルビウィルス及びロタウィルス）；ビルナウィルス科；ヘパドナウィルス科（B型肝炎ウィルス）；パルボウィルス科（パルボウィルス）；パポバウィルス科（パピローマウィルス、ポリオーマウィルス）；アデノウィルス科（大部分のアデノウィルス）；ヘルペスウィルス科（単純疱疹ウィルス（HSV）1及び2、帯状疱疹ウィルス、サイトメガロウィルス（CMV）、ヘルペスウィルス）；ポックスウィルス科（痘瘡ウィルス、ワクシニアウィルス、ポックスウィルス）；及びイリドウィルス科（例えばアフリカブタ熱病ウィルス）；及び未分類のウィルス（例えば海綿状脳障害の病因物質、デルタ肝炎の物質（B型肝炎ウィルスの欠損性衛星株と考えられている）、非A、非B肝炎の物質（クラス1＝内部伝染；クラス2＝非経腸伝染（即ちC型肝炎））；ノーウォークウィルス及び関連ウィルス及び星状ウィルス）を含む。

10

【0071】

感染性の細菌の例は、ヘリコバクター・ピロリ、ボレリア・ブルグドルフェリ、レジオネラ・ニューモフィリア、マイコバクテリウム *sp.*（例えばM・ツベルクロシス、M・アビウム、M・イントラセルラエ、M・カンサイ、M・ゴールドナエ）、スタフィロコッカス・アウレウス、ナイセリア・ゴノレア、ナイセリア・メニンギチジス、リステリア・モノサイトゲネス、ストレプトコッカス・ピオゲネス（A群ストレプトコッカス）、ストレプトコッカス・アガラクチアエ（B群ストレプトコッカス）、ストレプトコッカス（ビリダンス群）、ストレプトコッカス・フェカリス、ストレプトコッカス・ボビス、ストレプトコッカス（嫌気性菌 *sp.*）、ストレプトコッカス・ニューモニア、病原性カンピロバクター・*sp.*、エンテロコッカス・*sp.*、ヘモフィルス・インフルエンザ、バチルス・アントラシス、コリネバクテリウム・ジフテリア、コリネバクテリウム・*sp.*、エリシペロスリックス・ルシオパシエ、クロストリジウム・パーフリンゲン、クロストリジウム・テタニー、エンテロバクター・アエロゲネス、クレブシエラ・ニューモニア、パスツレラ・ムルトシダ、バクテリオイデス・*sp.*、フソバクテリウム・ヌクレアタム、ストレプトバチルス・モニリフォルミス、トレポネーマ・パリジウム、トレポネーマ・ペルテヌエ、レプトスピラ及びアクチノマイセス・イスラエリを含む。

20

【0072】

感染性のカビの例は、クリプトコッカス・ネオフォルマンس、ヒストプラズマ・カプスラタム、コクシジオイデス・イミティス、ブラストマイセス・デルマチチディス、クラミジア・トラコマチス、カンジダ・アルビカンスを含む。他の感染性生物（すなわち原生生物）はプラズモジウム・ファルシパルム及びトキソプラズマ・ゴンジを含む。

30

【0073】

種々の微生物に関するゲノム情報（ヌクレオチド配列、アミノ酸配列、蛋白発現情報、及び／又は、蛋白構造情報を含む）はThe Institute for Genomic Research (TIGR) (www.tigr.org)及び／又はNational Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov)により維持されているデータベース中に記載されている。ゲノム情報が入手できる細菌の例は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス *str.* C58 (Cereon) (NC_003062&NC_003063)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス *str.* C58 (U. Washington) (NC_003304&NC_003305)、アキフェックス・アエイオリカス (NC_000918)、バチルス・halodurans (NC_002570)、バチルス・subtilis (NC_000964)、ボレリア・ブルグドルフェリ (NC_001318)、ブルセラ・メリテンシス (NC_003317&NC_003318)、ブクネラ・*sp.* APS (NC_002528)、カンピロバクター・ジェジュニ (NC_002163)、カウロバクター・クレセンタス—CB15 (NC_002696)、クラミジア・ムリダウム (NC_002620)、クラミジア・トラコマテ

40

50

イス (NC__000117)、クラミドフィラ・ニューモニアAR39 (NC__0002179)、クラミドフィラ・ニューモニアCWL029 (NC__000922)、クラミドフィラ・ニューモニアJ138 (NC__0002491)、クロストリジウム・アセトブチリカム (NC__0003030)、クロストリジウム・パーフリンゲンス (NC__0003366)、コリネバクテリウム・グルタミカム (NC__0003450)、デイノコッカス・ラジオツランス (NC__0001263&NC__0001264)、E・コリK-12 (NC__000913)、E・コリO157:H7 (NC__0002695)、E・コリO157:H7EDL933 (NC__0002655)、フソバクテリウム・スクレアタムsubsp. スクレアタムATCC25586 (NC__0003454)、ヘモフィルス・インフルエンザRd (NC__000907)、ヘリコバクター・ピロリ26695 (NC__000915)、ヘリコバクター・ピロリJ99 (NC__000921)、ラクトコッカス・ラクチスsubsp. ラクチス (NC__0002662)、リステリア・イノキュラ (NC__0003212)、リステリア・モノサイトゲネスEGD-e (NC__0003210)、メソリゾビウム・ロチ (NC__0002678)、マイコバクテリウム・leprae (NC__0002677)、マイコバクテリウム・ツベルクロシスCDC1551 (NC__0002755)、マイコバクテリウム・ツベルクロシスH37Rv (NC__000962)、マイコプラズマ・ゲニタリウム (NC__000908)、マイコプラズマ・ニューモニア (NC__000912)、マイコプラズマ・パルモニス (NC__0002771)、ナイセリア・メニンギチジスMC58 (NC__0003112)、ナイセリア・メニンギチジス (NC__0003116)、ノストックsp. (NC__0003272)、パスツレラ・マルトシダ (NC__0002663)、シュードモナス・アエルギノーサ (NC__0002516)、ラルストニア・ソラナセラム (NC__0003295&NC__0003296)、リケッチア・コノリ (NC__0003103)、リケッチア・プロワゼキ (NC__000963)、サルモネラ・エンテリカsubsp. エンテリカserovarTyphi (NC__0003198)、サルモネラ・チフィ (NC__0002305)、サルモネラ・チフムリウムLT2 (NC__0003197)、シノリゾビウム・メリロチ (NC__0003047)、スタフィロコッカス・アウレウスsubsp. アウレウスMW2 (NC__0003923)、スタフィロコッカス・アウレウスsubsp. アウレウスMu50 (NC__0002758)、スタフィロコッカス・アウレウスsubsp. アウレウスN315 (NC__0002745)、ストレプトコッカス・ニューモニアR6 (NC__0003098)、ストレプトコッカス・ニューモニアTIGR4 (NC__0003028)、ストレプトコッカス・ピオゲネスM1GAS (NC__0002737)、ストレプトコッカス・ピオゲネスMGAS8232 (NC__0003485)、ストレプトマイセス・コエリコラA3 (2) (NC__0003888)、シネコシスティスsp. PCC6803 (NC__000911)、サーモアナエロバクター・テングコンジェンシス (NC__0003869)、サーモトガ・マリチマ (NC__000853)、トレボネーマ・パリジウム (NC__000919)、ウレアプラズマ・ウレアリチカム (NC__0002162)、ビブリオ・コレラ (NC__0002505&NC__0002506)、キサントモナス・アキノノボジスpv. シトリstr. 306 (NC__0003919)、キサントモナス・カンペストリスpv. カンペストリスstr. ATCC33913 (NC__0003902)、キシレラ・ファスチジオーサ9a5c (NC__0002488) 及びイエルシニア・ペスチス (NC__0003143) を含む。

【0074】

TIGR及び／又はNCBIからゲノム情報が入手できる原始生物の例はアエロピルム・ペルニックス (NC__000854)、アルカエオグロブス・フルギダス (NC__000917)、ハロバクテリウムsp. NRC-1 (NC__0002607)、メタノコッカス・ジャナシ (NC__000909)、メタノピルス・カンドレリアV19 (NC__0003551)、メタノサルシナ・アセチボランスstr. C2A (NC__0003552)、メタノサルシナ・メザイGoel (NC__0003901)、メタノサーモバクテル・サーマウトトロフィカス (NC__000916)、ピロバクラム・アエロフィラム (NC__0003364)、ピロコッカス・アビシ (NC__000868)、ピロコッカス・フリオサ

スDSM3638 (NC__003413)、ピロコッカス・ホリコシ (NC__000961)、スルホロブス・ソルファタリカス (NC__002754)、スルホロブス・トコダイ (NC__003106)、サーモプラズマ・アシドフィラム (NC__002578) 及びサーモプラズマ・ボルカニウム (NC__002689) を含む。

【0075】

TIGR及び／又はNCBIからゲノム情報が入手できる真核生物の例は、アノフェリス・ガンピエ、アラビドプシス・サリアナ、ケノルハブジチス・エレガンシス、ドロソフィリア・メラノガスター、エンセファリトゾン・クニクリ、ギラルジア・シータ・ヌクレオモルフ、サッカロマイセス・セレビスシアエ及びスキゾサッカロマイセス・ポンベを含む。

【0076】

900超のウィルス種、例えばデルタウィルス、レトロイドウィルス、衛星株、dsDNAウィルス、dsRNAウィルス、ssDNAウィルス、ssRNA陰性鎖ウィルス、ssRNA陽性鎖ウィルス、未分類バクテリオファージ及び他の未分類ウィルスに関するゲノム情報がTIGR及び／又はNCBIから入手可能である。

【0077】

特定の実施形態においては、本出願は正常細胞（例えば非癌性及び／又は非病原性の細胞）の望ましくない増殖を防止する方法を提供する。例えば、正常細胞は体毛の成育の為に必要な細胞であり、そして望ましくない体毛の成育は本明細書に記載した方法により治療してよく；細胞の望ましくない増殖は正常な体毛の成長において、異所発毛、過剰発毛、多毛症又は毛嚢炎、例えば脱毛性毛嚢炎、網状瘢痕性紅斑性毛嚢炎、ケロイド性毛嚢炎および偽性毛嚢炎において起こる場合がある。別の例においては、正常細胞は自己免疫応答、移植片拒絶等の望ましくない免疫応答に関与する免疫細胞であってよい。例示される実施形態においては、正常細胞は正常T細胞であってよく、そしてT細胞の過剰な活性又は増殖は多くの疾患又は症状、例えば、真性糖尿病、関節炎（例えば慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、骨関節炎及び乾癬性関節炎）、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎（例えばアトピー性皮膚炎及び湿疹性の皮膚炎）、乾癬、シェーグレン症候群、クローン病、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、I型糖尿病、炎症性腸疾患、潰瘍性結腸炎、喘息、アレルギー性喘息、皮膚エリテマトーデス、硬皮症、膣炎、直腸炎、蕁麻疹、ハンセン病の逆転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳症、特発性両側性進行性感音難聴、再生不良性貧血、赤芽球ろう、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ウェーゲナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スティーブンス・ジョンソン症候群、特発性スプルー、扁平苔癬、グレーブス病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、間質性肺線維症、対宿主性移植片病、移植時症例（例えば同種又は異種組織を用いた移植）、例えば骨髄移植、肝臓移植又は何れかの臓器又は組織の移植、アレルギー、例えばアトピー性アレルギー、及び、T細胞新生物、例えば白血病及び／又はリンパ腫の原因となる。

【0078】

本明細書に記載した方法の特定の実施形態においては、R2の核酸阻害剤1つ以上を共に（同時に）、又は、異なる時点で（逐次的に）投与することができる。例えば2種以上のdsRNA、siRNA又は酵素核酸又はこれ等の組合せを本明細書に記載した方法に従って使用してよい。

【0079】

特定の実施形態においては、本出願の要件の阻害剤核酸は単独で使用できる。或いは、要件の阻害剤核酸は他の従来の抗癌剤、抗病原体剤又は望ましくない細胞増殖の治療又は防止を指向した他の治療方法と組み合わせて投与してよい。例えば、そのような方法は予防的な癌の防止、手術後の癌の再発及び転移の防止において、そして他の従来の癌療法の補助薬として、使用することができる。本出願は従来の癌療法（例えば化学療法、放射線療法、光学的療法、免疫療法及び手術）の有効性は要件の核酸剤の使用を介して増強できると認識する。R2阻害剤核酸及び他の治療薬を含む複合療法を使用する場合、そのよう

10

20

30

40

50

な治療薬は別個に、又は連帯して投与してよい。特定の実施形態においては、複合療法ではR 2 阻害剤核酸及び共に製剤されるか別個の製剤として投与される他の治療薬を使用する。

【0080】

広範な種類の従来の化合物が抗新生物活性を有することがわかっている。これ等の化合物は固形癌を収縮させ、転移及び追加的成長を防止し、或いは、白血病又は骨髄悪性疾患における悪性細胞の数を低減させるための化学療法における医薬品として使用されている。化学療法は種々の型の悪性疾患の治療において有効であるが、多くの抗新生物化合物は望ましくない副作用を誘導する。2種以上の治療法を組み合わせると治療は相乗効果的に作用し、そして治療の各々の用量の低減を可能にし、これにより、より高用量で各化合物により誘発される有害副作用を低減できる。他の場合においては、治療に対して抵抗性の悪性疾患は2種以上の治療の複合療法に対して応答する場合がある。

【0081】

複合療法、特に抗腫瘍療法の為に使用してよい医薬品化合物は、一例を挙げれば、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、b c g、ビカルタミド、プレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンボテシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、クロドロネート、コルヒチン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエンストロール、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタビン、ゲニステイン、ゴセレリン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン、イロノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミソール、ロムスチン、メクロレタミン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキセート、マイトマイシン、ミトタン、マイトキサントロン、ニルタミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、スラミン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストステロン、チオグアニン、チオテパ、チタノセン、ジクロリド、トポテカン、トラスツズマブ、トレチノイン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン及びビノレルビンを含む。

【0082】

これ等の化学療法抗腫瘍化合物はそれらの作用機序により例えば以下のグループ、即ち、代謝拮抗物質／抗癌剤、例えばピリミジン類縁体（5-フルオロウラシル、フロキシウリジン、カペシタビン、ゲムシタビン及びシタラビン）及びプリン類縁体、フォレート拮抗剤及び関連の阻害剤（メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン及び2-クロロデオキシシアデノシン（クラドリビン））；抗増殖／抗有糸分裂剤、例えば天然産物、例えばピンカアルカロイド（ビンブラスチン、ビンクリスチン及びビノレルビン）、微小管破壊物質、例えばタキサン（パクリタキセル、ドセタキセル）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン及びナベルピン、エピチポドフィロトキシン（エトポシド、テニポシド）、DNA損傷剤（ダクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン、プレオマイシン、ブスルファン、カンボトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メクロレタミン、マイトマイシン、マイトキサントロン、ニトロソ尿素、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテレ、テニポシド、トリエチレンチオホスホロアミド及びエトポシド（VP 16））；抗生物質、例えばダクチノマイシン（ダクチノマイシンD）、ダウノルビシン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、イダルビシン、アントラサイクリン、マイトキサントロン、プレオマイシン、プリ

カマイシン（ミスラマイシン）及びマイトマイシン；酵素類（L-アスパラギンを全身的に代謝し、自身のアスパラギンを合成する能力を有さない細胞を枯渇させるL-アスパラギナーゼ）；抗血小板剤；抗増殖／抗有糸分裂アルキル化剤、例えば窒素マスタード（メクロレタミン、シクロホスファミド及び類縁体、メルファラン、クロラムブシル）、エチレンイミン及びメチルメラミン（ヘキサメチルメラミン及びチオテパ）、アルキルスルホネートブスルファン、ニトロソ尿素（カルムスチン（BCNU）及び類縁体、ストレプトゾシン）、トラゼン-ダカルバジン（DTIC）；抗増殖／抗有糸分裂代謝拮抗剤、例えば葉酸類縁体（メトトレキセート）；白金配位複合体（シスプラチン、カルボプラチン）、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、ミトタン、アミノグルテチミド；ホルモン類、ホルモン類縁体（エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ビカルタミド、ニルタミド）及びアロマターゼ阻害剤（レトロゾール、アナストロゾール）；抗凝固剤（ヘパリン、合成ヘパリン塩及び他のトロンビン阻害剤）；線維溶解剤（例えば組織プラスミノゲン活性化物質、ストレプトキナーゼ及びウロキナーゼ）、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；抗遊走剤；抗分泌剤（プレヴェルジン）；免疫抑制剤（シクロスポリン、タクロリムス（FK-506）、シロリムス（ラパマイシン）、アザチオプリン、マイコフェノレートモフェチル）；抗血管形成化合物（TNF-470、ゲニステイン）及び成長因子阻害剤（血管内皮成長因子（VEGF）阻害剤、線維芽細胞成長因子（FGF）阻害剤）；アンジオテンシン受容体ブロッカー；酸化窒素ドナー；アンチセンスオリゴヌクレオチド；抗体（トラツズマブ）；細胞周期阻害剤及び分化誘導剤（トレチノイン）；mTOR阻害剤；トポイソメラーゼ阻害剤（ドキソルビシン（アドリアマイシン）、アムサクリン、カンプトテシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エニポシド、エピルビシン、エトポシド、イダルビシン及びミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン）、コルチコステロイド（コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルペドニソロン、プレドニソン及びプレニソロン）；成長因子シグナル伝達キナーゼ阻害剤；ミトコンドリア機能不全誘導剤及びカスパーゼ活性化剤；及びクロマチン破壊剤に分類してよい。

【0083】

特定の実施形態においては、本明細書に記載したR2阻害剤核酸は他の治療薬、例えば抗炎症剤、免疫抑制剤及び／又は抗感染症剤（例えば抗生物質、抗ウィルス及び／又は抗カビ化合物等）と組み合わせて投与してよい。例示される抗炎症剤は、例えばステロイド剤（例えばコルチゾール、アルドステロン、プレドニソン、メチルプレドニソン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、デオキシコルチコステロン及びフルオロコルチゾール）及び非ステロイド抗炎症剤（例えばイブプロフェン、ナプロキセン及びピロキシカム）を含む。例示される免疫抑制剤は、例えばプレドニソン、アザチオプリン（イムラン）、シクロスポリン（サンドイミュン、ネオラル）、ラパマイシン、抗胸腺細胞グロブリン、ダクリズマブ、OKT3及びALG、マイコフェノレートモフェチル（セルセプト）及びタクロリムス（プログラフ、FK506）を含む。例示される抗生物質は、例えばサルファ剤（例えばスルファニラミド）、葉酸類縁体（例えばトリメトプリン）、ベータラクタム（例えばペナシリン、セファロスポリン）、アミノグリコシド（例えばストレプトマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ゲンタマイシン）、テトラサイクリン（例えばクロロテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン）、マクロリド（例えばエリスロマイシン、アジスロマイシン及びクラリスロマイシン）、リンコサミド（例えばクリンダマイシン）、ストレプトグラミン（例えばキヌプリスチン及びダルフォプリスチン）、フルオロキノロン（例えばシプロフロキサシン、レボフロキサシン及びモキシフロキサシン）、ポリペプチド（例えばポリミキシン）、リファンピン、ムピロシン、シクロセリン、アミノシクリトール（例えばスペクチノマイシン）、糖ペプチド（例えばバンコマイシン）及びオキサゾリジノン（例えばリネゾリド）を含む。例示される抗ウィルス剤は、例えばビダラビン、アシクロビル、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、ヌクレオシド類縁体逆転写酵素阻害剤（例えばZAT、ddI、ddC、D4T、3TC）、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（例えばネビラピン、デラビルジン）、プロテアーゼ阻害

剤（例えばサキナビル、リトナビル、インジナビル、ネルフィナビル）、リバビリン、アマンタジン、リマンタジン、レレンザ、タミフル、プレコナシル及びインターフェロンを含む。例示される抗カビ剤は、例えば、ポリエン抗カビ剤（例えばアンホテリシン及びニスタチン）、イミダゾール抗カビ剤（ケトコナゾール及びミコナゾール）、トリアゾール抗カビ剤（例えばフコナゾール及びイトラコナゾール）、フルシトシン、グリセオフルビン及びテルビナフィンを含む。

【0084】

複合療法の性質に応じて、本出願の核酸治療薬の投与は、他剤の投与中にも継続するか、又はその後に行ってもよい。核酸治療薬の投与は単回において、又は複数回において行ってもよい。一部の例においては、核酸治療薬の投与は従来の療法よりも少なくとも数日前に開始するが、別の例においては投与を従来療法の投与の直前又は同時に開始する。

10

【0085】

投与方法及び組成物

特定の実施形態においては、本出願は本明細書に記載したR2阻害剤1つ以上を含む組成物を提供する。特定の実施形態においては、組成物は患者における治療用途に適する医薬品である。特定の実施形態においては、組成物は動物又はヒトにおける化粧品用途に適する化粧品である。別の実施形態においては、組成物は非医薬品及び非化粧品である。一般的に、化粧品と医薬品の相違は後者がヒト及び動物で使用するためには規制当局の認可（例えば食品医薬品局による）を要する点である。

【0086】

R2阻害剤、特に核酸を送達するための方法は当該分野で知られる方法に基づいてよい（例えばAkhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; 及びDelivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Sullivan等のPCT公開WO94/02595参照）。これ等のプロトコルは実質的に如何なる核酸の送達のためにも利用、訂正又は改善することができる。核酸は当該分野で知られた種々の方法、例えば限定しないが、リボソーム内へのカプセル化、イオントフォoresisによるか、又は他のビヒクル、例えばヒドロゲル、シクロデキストリン、生体分解性ナノカプセル及び生体接着性微小球内への取り込みによるなどして、細胞に投与することができる。或いは、核酸／ビヒクルの組合せを直接注射によるか、又は注入ポンプの使用により局所送達する。送達他の経路は限定しないが経口（錠剤又は丸薬の形態）及び／又は髄腔内送達を含む（Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158）。他の方法は、例えばコンジュゲート及び生体分解性重合体の使用を介した種々の輸送系及び担体系の使用を含む。特定の実施形態においては、要件のR2阻害剤及びビヒクルは、投与前に、最終投与形態で組合わせられて製剤される。別の実施形態では、要件のR2阻害剤及びビヒクルは、それらが投与時に組み合わせられるように別個に製剤する。例えば、要件のR2阻害剤とビヒクルを送達キット又はパッケージの別個のコンパートメントに保存してよく、そして所望の部位に対する、又は、所望の経路を介した投与の時点において、要件R2阻害剤およびビヒクルを混合して送達に付す。別個のコンパートメントはキット内の別個のバイアル、医薬送達ペン中の別個のカートリッジ（米国特許第5,542,760号参照）、別個のカニューレ又はシリンジ内の別個のコンパートメント等であることができる。

30

40

【0087】

特定の実施形態においては、要件R2阻害剤は送達ビヒクルとして重合体の微粒子又はナノ粒子を含む分子レベル以上の複合体として提供される。「微粒子」又は「ナノ粒子」という用語は本明細書においては、微小球又はナノ小球（均一な小球）、マイクロカプセル又はナノカプセル（コア及び重合体外層を有する）及び不規則な形状の粒子を含む。

【0088】

本出願は一般的には1年、より典型的には数ヶ月、更に典型的には数日～数週間の範囲にあるR2阻害剤の放出が望まれる時間帯内又はその比較的直ぐ後の好ましくは生体分解

50

性である重合体の使用を意図する。生体分解とは微粒子の破壊、即ち微粒子／ナノ粒子を形成する重合体及び／又は重合体自身の解離の何れかを意味する。これはジケトピペラジンの場合のような放出部位 pH への粒子投与用担体の pH からの変化、ポリ（ヒドロキシ酸）の場合のような加水分解の結果として、アルギネートのような重合体のイオン結合により形成された微粒子又はナノ粒子の場合のような微粒子のからのカルシウムのようなイオンの拡散により、および、多糖類及び蛋白の多くの場合のような酵素的作用により生じる可能性がある。一部の場合においては、一次的な放出が最も有用であるが、別の場合にはパルスの放出又は「バルク放出」がより効果的な結果をもたらす場合がある。

【0089】

代表的な合成物質は、ジケトピペラジン、ポリ（ヒドロキシ酸）、例えばポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）及びこれ等の共重合体、ポリ無水物、ポリエステル、例えばポリオルトエステル、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリビニル化合物、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアセテート及びポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリシロキサン、アクリル及びメタクリル酸の重合体、例えばポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）、ポリウレタン及びその共重合体、セルロース、例えばアルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシエチルセルロース、セルローストリアセテート及びセルローススルフェートナトリウム塩、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）及びポリ（ラクチドコカプロラクトン）である。

【0090】

天然重合体は、アルギネート及び他の多糖類、例えばデキストラン及びセルロース、コラーゲン、アルブミン及び他の親水性蛋白、ゼインおよび他のプロラミンおよび疎水性蛋白、それらの共重合体及び混合物を含む。本明細書においては、その化学的誘導体とは、置換、例えばアルキル、アルキレンのような化学基の付加、ヒドロキシル化、酸化及び当該分野で通常行われる他の改変を指す。

【0091】

生体接着性の重合体は H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubell, *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587 に記載の生体腐食性ヒドロゲル、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギネート、キトサン及びポリアクリレートを含む。

【0092】

薬剤送達法に関する包括的な考察については、Ho et al., 1999, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 1, 336-343 及び Jain, *Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities*, Decision Resources, 1998 及び Groothuis et al., 1997, *J. NeuroVirol.*, 3, 387-400 を参照できる。核酸の送達及び投与のより詳細な説明は上出 Sullivan 等、Draper 等の PCTWO93/23569、Beigelman 等の PCT 公開WO99/05094 及び Klimuk 等の PCT 公開WO99/04819 に記載されている。

【0093】

「非経腸投与」及び「非経腸投与された」という表現は本明細書においては、経腸及び局所投与以外の、通常は注射による投与の様式を意味し、そして限定しないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢胞内、眼内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、胸骨下の注射及び注入、及び、肝動脈内投与（肝動脈内注射及び肝動脈内注入を含む）を含む。

【0094】

「全身投与」、「全身投与された」、「末梢投与」及び「末梢投与された」という表現は本明細書においては、化合物、薬剤又は他の物質が中枢神経系に直接ではなく、患者の全身系に侵入し、そしてこれにより代謝及び他の類似の過程に付されるようにした、その投与、例えば皮下投与を意味する。

10

【0095】

特定の実施形態においては、本出願の要件の核酸（例えばRNAiコンストラクト及び酵素核酸）は製薬上許容しうる担体と共に製剤する。そのような治療薬は単独又は医薬品製剤（組成物）の成分として投与できる。薬剤はヒト又は家畜の医薬中の使用のための何れかの好都合な方法における投与の為に製剤してよい。水和剤、乳化剤及び潤滑剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウム、並びに着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味料、フレーバー及び芳香剤、保存料及び抗酸化剤もまた組成物中に存在できる。

【0096】

20

要件の核酸の製剤は全身、局所、経口、経鼻、患部、非経腸、直腸及び／又は腔内の投与に適するものを含む。製剤は単位剤型で好都合に提供してよく、そして製薬の当該分野で良く知られている何れかの方法により製造してよい。単回投与形態を製造するために担体物質と組み合わせてよい活性成分の量は治療すべき宿主、投与の特定の様式に応じて変動する。単回投与形態を製造するために担体物質と組み合わせてよい活性成分の量は一般的に治療効果をもたらす化合物の量となる。

【0097】

特定の実施形態においては、これ等の製剤又は組成物を製造する方法は、別の型の治療薬又は抗感染剤及び担体、及び、場合により1つ以上の副次的成分を組み合わせることを含む。一般的に、製剤は液体担体又は微細分割固体担体又は両方と共に製造し、そして次に必要に応じて生成物を成型する。

30

【0098】

経口投与用の製剤はカプセル、カシェ剤、丸薬、錠剤、ロゼンジ（フレーバー基剤、通常はスクロース及びアカシア又はトラガカントを使用）、粉末、顆粒の形態、又は、水性又は非水性の液体中の溶液又は懸濁液として、又は、水中油又は油中水のエマルジョンとして、又は、エリキシル又はシロップとして、又は、香錠（不活性基剤、例えばゼラチン及びグリセリン又はスクロース及びアカシアを使用）及び／又はマウスウオッシュ等として存在してよく、各々が所定量の要件核酸治療薬を活性成分として含有する。

【0099】

経口投与用の固体剤型（カプセル、錠剤、丸薬、ドラジェ剤、粉末、顆粒等）においては、1つ以上の本出願の核酸治療薬を1つ以上の製薬上許容しうる担体、例えばクエン酸ナトリウム又はリン酸2カルシウム及び／又は以下のもの、即ち（1）充填剤又は増量剤、例えば澱粉、乳糖、スクロース、グルコース、マンニトール及び／又はケイ酸；（2）バインダー、例えばカルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及び／又はアカシア；（3）湿潤剤、例えばグリセロール；（4）崩壊剤、例えば寒天、炭酸カルシウム、バレイショ又はタピオカ澱粉、アルギン酸、特定のケイ酸塩及び炭酸ナトリウム；（5）溶解遅延剤、例えばパラフィン；（6）吸収加速剤、例えば第4アンモニウム化合物；（7）水和剤、例えばセチルアルコール及びグリセロールモノステアレート；（8）吸収剤、例えばカオリン及びベントナイト粘土；（9）潤滑剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ボ

40

50

リエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム及びこれ等の混合物；及び（１０）着色剤と混合してよい。カプセル、錠剤及び丸薬の場合は、医薬組成物は又緩衝剤も含んでよい。同様の型の固体組成物はまた、乳糖又はミルクシュガーのような賦形剤並びに高分子量ポリエチレングリコールを用いるソフト及びハードゼラチンカプセルにおける充填剤としても使用してよい。

【０１００】

経口投与用の液体剤型は製薬上許容しうる乳液、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルを含む。活性成分の他に、液体剤型は当該分野で一般的に使用されている不活性の希釈剤、例えば水又は他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、油脂（特に綿実油、落花生油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル及びこれ等の混合物を含有してよい。不活性希釈剤の他に、経口用組成物は又、水和剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味料、フレーバー、着色料、芳香剤及び保存料のような補助剤を含むことができる。

10

【０１０１】

懸濁液は、活性化合物の他に、懸濁剤、例えばエトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天及びトラガカント及びこれ等の混合物を含有してよい。

20

【０１０２】

本出願の方法及び組成物は皮膚又は子宮頸部及び膈部のような粘膜の何れかに局所投与できる。これにより、副作用を誘導する可能性を最低限としながら、皮膚又は粘膜に局在する望ましくない細胞増殖への直接の送達の最大の可能性がもたらされる。局所用製剤は更に皮膚又は角質層の浸透増強剤として効果的であることが知られている広範な種類の物質１つ以上を含んでよい。これ等の例は、２－ピロリドン、Ｎ－メチル－２－ピロリドン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、プロピレングリコール、メチル又はイソプロピルアルコール、ジメチルスルホキシド及びアゾンである。追加的物質を更に含有させることにより製剤を化粧品として適合させてよい。これ等の例は、脂肪、ワックス、油脂、染料、芳香剤、保存料、安定化剤及び界面活性剤である。当該分野で知られた角質溶解剤も含んでよい。例としてはサリチル酸及びイオウが挙げられる。

30

【０１０３】

局所又は経皮投与用の剤型は粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ及び吸入剤を含む。要件の核酸は滅菌下、製薬上許容しうる担体と、そして必要とされる何れかの保存料、緩衝剤又は高圧ガスと、混合してよい。軟膏、ペースト、クリーム及びゲルは要件の核酸分子の他に、賦形剤、例えば動物性及び植物性の脂肪、油脂、ワックス、パラフィン、澱粉、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルク及び酸化亜鉛又はこれ等の混合物を含有してよい。

40

【０１０４】

粉末及びスプレーは要件の核酸治療薬の他に、賦形剤、例えば乳糖、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム及びポリアミド粉末又はこれ等の物質の混合物を含有できる。スプレーは更に慣用的な高圧ガス、例えばクロロフルオロハイドロカーボン及び揮発性の未置換の炭化水素、例えばブタン及びプロパンを含有できる。

【０１０５】

吸入に適する製剤も提供され、そしてそのような製剤は肺への送達に使用でき、これは肺系に局在化するか、又は全身性となることができる。肺送達のための医薬品装置の例は、計量用量吸入器（ＭＤＩ）及び乾燥粉末吸入器（ＤＰＩ）を含む。要件のＲ２阻害剤及び／又は活性剤の送達に適合できる吸入による送達系の例は例えば米国特許第５，７５６

50

、353号；第5、858、784号；及びPCT出願WO98/31346；WO98/10796；WO00/27359；WO01/54664；WO02/060412に記載されている。R2阻害剤及び／又は活性剤の送達に使用してよい他のエアロゾル製剤は米国特許第6、294、153号；第6、344、194号；第6、071、497号；米国特許出願2004/0063654及びPCT出願WO02/066078；WO02/053190；WO01/60420；WO00/66206に記載されている。

【0106】

加圧計量用量吸入器（pMDI）は全世界で最も一般的に使用されている吸入器である。エアロゾルは弁の開放時（通常は高圧ガスキャニスターを押し下げることによる）に形成され、これにより液体高圧ガスがキャニスターから噴出する。典型的には薬剤又は治療薬は、液体高圧ガス中に懸濁させた小粒子（通常は直径数ミクロン）内に含有させるが、一部の製剤においては、薬剤又は治療薬は高圧ガス中に溶解させてよい。高圧ガスはエアロゾルが装置を離れると急速に気化し、薬剤又は治療薬の小粒子が形成されて吸入される。このようなpMDIにおいて典型的に使用される高圧ガスは例えば限定しないがハイドロフルオロアルカン類（HFA）である。界面活性剤もまた、例えばpMDIと共に薬剤又は治療薬を製剤するために使用してよい。他の溶媒又は賦形剤もまたpMDIと共に使用してよく、それらにはエタノール、アスコルビン酸、メタ重硫酸ナトリウム、グリセリン、クロロブタノール及び塩化セチルピリジニウムが含有される。そのようなpMDIはまた例えばスプレー、保持チャンバー及び他の変形例のようなアドオン型の装置も含んでよい。

【0107】

第3の型の吸入器は乾燥粉末吸入器（DPI）である。DPIにおいては、エアロゾルは通常は吸入時まで装置内に含有される粉末である。治療薬又は薬剤は小型の粉末粒子（通常は直径数100万分の1メートル、又はマイクロメートル）として粉末形態に製造される。多くのDPIにおいて、薬剤又は治療薬は典型的には直径50～100マイクロメートルのより大型の糖粒子（例えば乳糖の1水和物）と混合される。乳糖／薬剤凝集塊上の増大した空気力学的力が吸入時の薬剤粒子の運搬を向上させると同時に、少量の個別の粉末用量の充填をより容易なものとする。吸入時、乱流及び／又は機械的装置、例えば粒子凝集塊が衝突する回転表面の助けにより、粉末はその構成粒子にまで分解され、小型の個々の薬剤粉末粒子を肺内に吸入される空气中に放出する。糖粒子は通常は装置内及び／又は口腔－咽頭部に留まることを意図される。

【0108】

本出願の1つの特徴はR2阻害剤を含むエアロゾル組成物を提供する。エアロゾル組成物はエアロゾル化したR2阻害剤を含む組成物又はエアロゾル化に適する製剤中にR2阻害剤を含む組成物であることができる。R2阻害剤は別の活性剤と組み合わせて製剤してよく、そして組み合わせた製剤がエアロゾル化に適するものとなる。或いは、R2阻害剤及び別の活性剤は、エアロゾル化が起こった後、又は、対象に投与された後にそれらが組み合わされるように、別個に製剤してよい。

【0109】

非経腸投与に適する医薬組成物は、抗酸化剤、緩衝物質、静菌剤、製剤を意図するレシピエントの血液と等張性とするための溶質又は懸濁剤又は濃厚化剤を含有してよい、1つ以上の製薬上許容しうる滅菌等張性の水性又は非水性の溶液、分散液、懸濁液又は乳液、又は、使用直前に希釈再調整して滅菌された注射可能な溶液又は分散液としてよい滅菌粉末と組み合わせて1つ以上の核酸剤を含んでよい。本出願の医薬組成物において使用してよい適当な水性又は非水性の担体の例は、水、エタノール、ポリオール類（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）及びこれ等の適当な混合物、植物油、例えばオリーブ油、及び注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルを含む。適当な流動性は例えばコーティング物質、例えばレシチンの使用により、分散体の場合は必要な粒径を維持することにより、そして界面活性剤の使用により維持することが

できる。

【0110】

これ等の組成物は又補助剤、例えば保存料、水和剤、乳化剤及び分散剤を含有してよい。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌剤及び抗カビ剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等を含有させることにより確保してよい。等張性付与剤、例えば糖類、塩化ナトリウム等を組成物に含有させることが望ましい場合がある。更に又、注射可能な医薬品の形態の延長された吸収は、吸収を遅延させる物質、例えば1ステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含有させることにより、達成してよい。

【0111】

注射可能なデポ剤形態はポリラクチドーポリグリコリドのような生体分解性の重合体内に核酸剤1つ以上のマイクロカプセルマトリックスを形成することにより作成する。薬剤の重合体に対する比及び使用される特定の重合体の性質に応じて、薬剤放出の速度を制御することができる。他の生体分解性重合体の例はポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）を含む。デポ剤の注射可能な製剤はまた身体組織と適合性のあるリポソーム又はマイクロエマルジョン中に薬剤を捕獲することによっても製造される。

【0112】

腔内又は直腸投与用の製剤は坐剤として提供してよく、これは1つ以上の本出願の化合物を、例えばカカオ脂、ポリエチレングリコール、坐剤用ワックス又はサリシレートを含む1つ以上の適当な非刺激性の賦形剤又は担体と混合することにより製造してよく、そしてこれは、室温では固体であるが、体温では液体となり、これにより直腸又は腔内において溶解し、活性化合物を放出することになる。

【0113】

特定の実施形態においては、本出願の核酸は、その所望の活性に最も適する生理学的位位置への核酸の効果的な分布を可能にする製薬上許容しうる物質と共に製剤する。そのような製薬上許容しうる物質の非限定的な例は、PEG、リン脂質、ホスホロチオエート、種々の組織への薬剤の進入を増強できるP-糖蛋白阻害剤（例えばブルロニックP85）、生体分解性重合体、例えば移植後の除放射性送達のためのポリ（DL-ラクチドーコグリコリド）微小球（Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58）、及び、血液脳関門を通過して薬剤を送達することができるポリブチルシアノアクリレートで作成したもののような担持型ナノ粒子（Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999）を含む。

【0114】

他の実施形態においては、本出願の核酸の特定のものは真核生物プロモーターから細胞内で発現させることができる（例えば Izant and Weintraub, 1985, Science, 229, 345; McGarry and Lindquist, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 399; Scanlon et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591-5; Kashani-Sabet et al., 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Dropulic et al., 1992, J. Virol., 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991, J. Virol., 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarver et al., 1990 Science, 247, 1222-1225; Thompson et al, 1995, Nucleic Acids Res., 23, 2259; Good et al., 1997, Gene Therapy, 4, 45）。当業者の知る通り何れかの核酸は適切なDNA/RNAベクターから真核生物の細胞中で発現させることができる。このような核酸の活性は酵素核酸による一

10

20

30

40

50

次転写産物からのそれらの放出により増強することができる (Draper et al., PCTWO93/23569, and Sullivan et al., PCTWO94/02595; Ohkawa et al., 1992, Nucleic Acids Symp. Ser., 27, 15-16; Taira et al., 1991, Nucleic Acids Res., 19, 5125-30; Ventura et al., 1993, Nucleic Acids Res., 21, 3249-55; Chowrira et al., 1994, J. Biol. Chem., 269, 25856; 参照により全体が本明細書に組み込まれる)。CNSに特異的な遺伝子療法の試みはBlesch et al., 2000, Drug News Perspect., 13, 269-280; Peterson et al., 2000, Cent. Nerv. Syst. Dis., 485-508; Peel and Klein, 2000, J. Neurosci. Methods, 98, 95-104; Hagiwara et al., 2000, Gene Ther., 7, 759-763; and Herrlinger et al., 2000, Methods Mol. Med., 35, 287-312により記載されている。神経系細胞への核酸のAAV媒介送達は更にKaplit et al.等の米国特許第6,180,613号に記載されている。

10

【0115】

本出願の別の特徴においては、本出願のRNA分子は好ましくはDNA又はRNAベクターに挿入された転写単位 (例えばCouture et al., 1996, TIG., 12, 510参照) から発現される。組み換えベクターは好ましくはDNAプラスミド又はウィルスベクターである。リボザイム発現ウィルスベクターは例えば限定しないがアデノ関連ウィルス、レトロウィルス、アデノウィルス又はアルファウィルスに基づいて構築できる。好ましくは、核酸を発現することができる組み換えベクターを上記した通り送達し、標的細胞内に存続させる。或いは、核酸の一過性の発現をもたらすウィルスベクターを使用できる。そのようなベクターは必要に応じて反復して投与できる。発現された後、核酸は標的mRNAに結合する。核酸発現ベクターの送達は全身性、例えば静脈内又は筋肉内投与によるか、患者から外植した標的細胞への投与とその後の患者への再導入によるか、又は、所望の標的細胞内への導入を可能にする何れかの別の手段により行うことができる (考察についてはCouture et al., 1996, TIG., 12, 510参照)。

20

30

【0116】

1つの特徴において、本出願は、本出願の核酸の少なくとも1つをコードする核酸配列を含む発現ベクターを意図している。核酸配列は本出願の核酸の発現を可能にする態様において作動可能に連結している。例えば、本出願はa) 転写開始領域 (例えば真核生物p o l I、I I又はI I I開始領域); b) 転写終止領域 (例えば真核生物p o l I、I I又はI I I終止領域); c) 本出願の核酸触媒少なくとも1つをコードする核酸配列を含む発現ベクターを特徴としており; そしてここで該配列は、該核酸の発現及び/又は送達を可能にする態様において該開始領域及び該終止領域に作動可能に連結している。ベクターは場合により、本出願の核酸触媒をコードする配列の5'側又は3'側に作動可能に連結した蛋白に関するオープンリーディングフレーム (ORF); 及び/又はイントロン (介在配列) を含むことができる。

40

【0117】

2本鎖核酸を含む特定の実施形態においては、その2つの鎖は別個に発現させ、そして後に細胞内でハイブリダイズさせることができる。そのような別個の発現は別個の発現コンストラクトを介するか、又は、単一の発現コンストラクトを介するものであってよい。或いは、2つの鎖を共に発現させることができ、例えばヘアピンRNAの2つの鎖を共に発現させてよい。

【0118】

選択される投与経路とは関わりなく、適当な水和型で使用するよい本出願のR2阻害剤は及び/又は本出願の医薬組成物は後述する通り、又は他の従来の方法により製薬上許容

50

しうる剤型に製剤される。

【0119】

本発明の医薬組成物の活性成分の実際の用量レベルは、患者に毒性となることなく、特定の患者、組成物及び投与様式に対する所望の治療応答を達成するために有効な活性成分の量が得られるように変動してよい。

【0120】

選択される用量レベルは種々の要因、例えば使用する本出願の特定の R 2 阻害剤又はそのエステル、塩又はアミドの活性、投与経路、投与時間、使用する特定の化合物の排出速度、投与の継続期間、使用する特定の R 2 阻害剤と組み合わせて使用される他の薬剤、化合物及び／又は物質、治療する患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康度及び過去の病歴、及び、医療の当該分野で良く知られている同様の要因に応じたものとなる。

10

【0121】

医師又は獣医師は必要な医薬組成物の有効量を容易に決定及び処方することができる。例えば、医師又は獣医師は所望の治療効果を達成するために必要なレベルより低いレベルで医薬組成物中に用いられる本出願の R 2 阻害剤の投薬を開始し、そして所望の効果が達成されるまで用量を漸増することができる。

【0122】

一般的に本出願の R 2 阻害剤の適当な一日当たり用量は治療効果をもたらすために有効な最低の用量である化合物の量となる。そのような有効用量は一般的に上記した要因に応じたものとなる。一般的に、患者に対する静脈内、脳室内及び皮下の用量は一日当たりキログラム体重当たり約 0.0001～約 100 mg の範囲となる。

20

【0123】

所望により、活性化合物の有効な一日当たり用量を、場合により単位剤型において、一日に渡って適切な間隔を置いて個別に投与される 2、3、4、5、6 回分以上のサブ用量として投与してよい。

【0124】

本出願の医薬品製剤は獣医科用の組成物、例えば、牧畜又は家畜動物、例えばイヌの治療のための獣医科用途に適する R 2 阻害剤の医薬調製品も含む。この治療を受ける患者は必要とする何れかの動物、例えば霊長類、特にヒト、及び他の非ヒト哺乳類、例えばウマ、ウシ、ブタ及びヒツジ；及び一般的には家禽類及び愛玩動物である。

30

【0125】

R 2 阻害剤はまた非医薬品用途のため、例えば何れかの病原体汚染物体から病原体を除去するための消毒剤として使用するため、又は、望ましくない体毛の成長を除去するための化粧品として使用するために製剤してもよい。化粧品組成物は本明細書に記載した特定の医薬組成物（例えばローション、軟膏、フィルム、パッチ等）と同様に製剤できる。

【0126】

本出願の RNA i コンストラクトのような R 2 阻害剤はまた、取り込み、分布及び／又は吸収を支援するために、例えばリポソーム、重合体、受容体標的分子、経口、直腸、局所又は他の製剤として、他の分子、分子構造又は化合物の混合物との添加混合、カプセル化、コンジュゲート又は他の会合状態としてよい。要件の RNA i コンストラクトは、浸透増強剤、担体化合物及び／又はトランスフェクション剤も含む製剤中に提供することができる。

40

【0127】

RNA i コンストラクト、特に siRNA 分子の送達に適合することができる、このような取り込み、分布及び／又は吸収を支援する製剤の製造を教示した代表的米国特許は、限定しないが、第 5,108,921 号；第 5,354,844 号；第 5,416,016 号；第 5,459,127 号；第 5,521,291 号；第 5,543,158 号；第 5,547,932 号；第 5,583,020 号；第 5,591,721 号；第 4,426,330 号；第 4,534,899 号；第 5,013,556 号；第 5,108,921 号；第 5,213,804 号；第 5,227,170 号；第 5,264,221 号；第

50

5, 356, 633号;第5, 395, 619号;第5, 416, 016号;第5, 417, 978号;第5, 462, 854号;第5, 469, 854号;第5, 512, 295号;第5, 527, 528号;第5, 534, 259号;第5, 543, 152号;第5, 556, 948号;第5, 580, 575号;及び第5, 595, 756号を含む。
【0128】

本出願のRNAiコンストラクトはまた、ヒトを含む動物への投与時に生物学的に活性な自身の代謝産物又は残基を（直接又は間接的に）与えることができる、何れかの製薬上許容しうる塩、エステル又はそのようなエステルの塩、又は何れかの他の化合物を含む。従って、例えば、本開示は又RNAiコンストラクト及びsiRNAの製薬上許容しうる塩、そのようなRNAiコンストラクトの製薬上許容しうる塩及び他の生物学的等価物にも着目している。

10

【0129】

製薬上許容しうる塩基付加塩は金属又はアミン、例えばアルカリ及びアルカリ土類金属又は有機アミンを用いて形成する。カチオンとして使用する金属の例はナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等である。適当なアミンの例はN, N1-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン及びプロカインである（例えばBerg et al., "Pharmaceutical Salts", J. of Pharma. Sci., 1977, 66, 1-19参照）。該酸性化合物の塩基付加塩は、従来の態様において遊離の酸の形態を十分な量の所望の塩基と接触させて塩を生成することにより製造する。遊離の酸の形態は従来の態様において塩形態を酸と接触させ遊離の酸を単離することにより再生してよい。遊離の酸の形態は、極性溶媒中の溶解度のような特定の物理的性質において幾分その対応する塩形態とは異なるが、他の点においては塩は本発明の目的のためにはその対応する遊離酸と等価である。本明細書においては、「薬学的な付加塩」とは本発明の組成物の成分の1つの酸の形態の製薬上許容しうる塩を含む。これ等にはアミンの有機又は無機酸の塩が含有される。好ましい酸塩は塩酸塩、酢酸塩、サリチル酸塩、硝酸塩及びリン酸塩である。他の適当な製薬上許容しうる塩は当該分野で良く知られているものであり、種々の無機酸及び有機酸の塩基塩を含む。

20

【0130】

siRNAに関しては、製薬上許容しうる塩の例は限定しないが、(a) カチオン、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、ポリアミン、例えばスベルミン及びスベルミジン等と共に形成された塩; (b) 無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸等と共に形成された酸付加塩; (c) 有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトロン酸等と共に形成された塩; 及び (d) 元素アニオン、例えば塩素、臭素及びヨウ素と共に形成された塩を含む。

30

【0131】

例示される組成物は送達系、例えばリポソーム系と混合され、そして場合により許容される賦形剤を含むRNAiコンストラクトを含む。特定の実施形態においては、組成物は例えばヘルペスウィルス感染に対する局所投与の為に製剤される。

40

【0132】

特定の実施形態においては、要件の核酸は重合体ビヒクルを用いて送達される。重合体ビヒクルは要件核酸1つ以上と微粒子を形成してよい。特定の実施形態において、特に全身投与が望ましい場合は、ナノ粒子は直径約10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、120nm、150nm、200nm又以上の大きさを有してよい。特定の実施形態においては、ナノ粒子は直径約10~120nm、10~100nm、50~120nm、50~100nm、10~70nm、50~70nm又は約50nmの大きさを有してよい。特定の実施形態に

50

においては、ナノ粒子はシクロデキストリンを含む。特別の実施形態においては、ナノ粒子はシクロデキストリン共重合体、例えば米国特許第6,509,323号及び米国特許出願2002/0151523に記載の線状シクロデキストリン共重合体及び米国特許出願2004/0077595及び2004/0109888に記載のシクロデキストリン系重合体を含む。特別の実施形態においては、シクロデキストリンは例えば図27及び42に示すような本明細書に記載のim-CDPのような官能性末端を有するように改変される。特定の実施形態においては、核酸は米国特許出願2003/0008818、2003/0017972及び2004/0063654に記載のもののような封入複合体を用いて送達される。特定の実施形態においては、送達系又はビヒクルは更に1つ以上のモディファイアー又は改変成分、例えば微粒子の表面化学を変化させることができるモディファイアーを含んでよい。モディファイアーはアニオン性の成分であってよい。モディファイアーは後述するとおり特定の組織又は細胞の型をターゲティングするリガンドであってよい。モディファイアーはポリエチレングリコール(PEG)分子、例えばPEG5000分子であってよい。

【0133】

特定の実施形態においては、R2阻害剤又はその医薬組成物は標的細胞上の特定の細胞表面蛋白又はマトリックスに結合するために有効であるリガンド1つ以上と会合していることができ、これにより標的細胞への複合体の封鎖を促進し、そして一部の例においては細胞によるRNAiコンストラクトの取り込みを増強する。例示に過ぎないが、特定の細胞型への本発明の分子レベル以上の複合体及びリボソームのターゲティングにおける使用に適するリガンドの例を以下の表に列挙する。

【0134】

(表9. 種々の細胞型へのターゲティング送達のための適当なリガンド)

【0135】

【化65】

リガンド	受容体	細胞型
フォレート	フォレート受容体	上皮癌、骨髄幹細胞
水溶性ビタミン	ビタミン受容体	種々の細胞
ピリドキシルホスフェート	CD4	CD4+リンパ球
アポリポ蛋白	LDL	肝細胞、血管内皮細胞
インスリン	インスリン受容体	
トランスフェリン	トランスフェリン受容体	内皮細胞
ガラクトース	アシアロ糖蛋白受容体	肝細胞
シアリル路易斯x	E、Pセレクチン	活性化内皮細胞
Mac-1	Lセレクチン	好中球、白血球
VEGF	Fik-1, 2	腫瘍上皮細胞
塩基性FGF	FGF受容体	腫瘍上皮細胞
EGF	EGF受容体	上皮細胞
VCAM-1	a ₄ b ₁ インテグリン	血管内皮細胞
ICAM-1	a _L b ₂ インテグリン	血管内皮細胞
PECAM-1/CD31	a _v b ₃ インテグリン	血管内皮細胞、 活性化血小板
オステオポンチン	a _v b ₁ インテグリン a _v b ₅ インテグリン	アテローム性動脈硬化 プラーク中の内皮細胞 及び平滑筋
RGD配列	a _v b ₃ インテグリン	腫瘍内皮細胞、 血管平滑筋細胞
HIV GP 120/41 またはGP 120	CD4	CD4+リンパ球

特定の実施形態においては、R2阻害剤又はその医薬組成物はガラクトースを含むターゲティングリガンド1つ以上と会合していることができる。ガラクトースを含む例示され

るリガンドは例えば乳糖及び同様の分子を含む。肝アシアロ糖蛋白受容体 (ASGPR) は肝細胞の表面上で発現される C 型のレクチンである。ASGPR は末端 β -D-ガラクトース (Gal) 又は N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を有する糖蛋白に結合する。ASGPR に対するリガンドの親和性は多重触角型の残基の型 (Gal vs. GalNAc)、数 (4 触角 > 3 触角 >> 2 触角 >> 1 触角) 及び配置により異なる。ASGPR の各ポリペプチドサブユニット (ヒト型は 4 量体である) は単一の末端 Gal 又は GalNAc に結合できる。

【0136】

他の実施形態

特定の実施形態においては、本出願は治療薬、例えば本明細書に記載した阻害剤核酸の肝臓特異的送達に適する送達ビヒクルを提供する。肝臓特異的送達ビヒクルは (1) 図 27 に示す重合体を含むイミダゾール改変シクロデキストリンを含むホスト成分、及び (2) 図 32 に示すアダマンタン-PEG-ガラクトース分子を含むゲスト成分、を含む。治療薬 1 つ以上と混合されると、ゲスト及びホスト成分は、封入複合体又はポリプレックスを形成し、これは重合体内に治療薬をカプセル化して粒状の組成物を形成したものである (図 31 参照)。特定の実施形態においては、送達ビヒクルは約 30~100 nm、約 40~70 nm、約 50~70 nm、約 50~60 nm 又は約 50 nm の平均直径を有する粒状組成物を提供するように製剤される。

【0137】

種々の実施形態において、肝臓特異的送達ビヒクルは、例えば肝臓特異的な疾患又は障害を治療するため、又は肝臓が関与するか影響を受ける疾患又は障害を治療するために、肝臓に何れかの型の治療薬を送達するために用いてよい。

【0138】

本発明の肝臓治療薬は小分子、ペプチド又はペプチド類縁体、例えばペプチドミメティック及び核酸であることができる。本発明の核酸肝臓治療薬はアンチセンス RNA、RNA i コンストラクト (例えば siRNA) 又はリボザイムであることができる。核酸肝臓治療薬はまた、遺伝子療法コンストラクト、例えば肝細胞内で発現されるべき遺伝子を送達する発現コンストラクトであってもよい。

【0139】

本発明の肝臓治療薬は肝臓の疾患又は症状、例えばヒトの肝臓の疾患又は症状に対して有効である。肝臓の疾患又は症状は、例えば肝細胞又は肝臓内の病原体のような細胞の望ましくない増殖により生じる場合がある。本発明の方法及び組成物は何れかの肝臓の疾患又は症状、例えば限定しないが、肝臓癌 (例えば肝細胞癌、又は他の癌、例えば膵臓癌の肝臓転移)、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、D 型肝炎、E 型肝炎、G 型肝炎、自己免疫性肝炎、肝硬変、アラジール症候群、アルコール性肝臓病、アルファ-1-抗トリプシン欠損症、バッド・キアリ症候群、胆道閉鎖症、バイラー病、カロリ病、クリグラ-ナジャー症候群、デュービン-ジョンソン症候群、脂肪肝、ガラクトース血症、ジルベール症候群、I 型糖原病、血管腫、ヘモクロマトーシス、肝疾患に伴う掻痒症、肝臓移植、晩発性皮膚ポルフィリン症、原発性胆汁性肝硬変、プロトポルフィリン症、紅色肝症、ローター症候群、硬化性胆管炎及びウィルソン病に対して有用又は有効であってよい。従って、本発明の医薬組成物は本明細書に記載したもののような肝臓の疾患又は症状の 1 つ以上に対して有効であることができる。

【0140】

特定の実施形態においては、本発明の肝臓治療薬は肝細胞特異的遺伝子を、例えば肝細胞特異的遺伝子の発現を調節する (阻害又は促進する) ことにより、ターゲティングする。肝細胞特異的遺伝子は一般的に他の細胞 (例えばクプファー細胞) 又は組織よりも肝細胞において高値の発現レベルを有する何れかの遺伝子を含む。

【0141】

特定の実施形態においては、肝臓治療薬は肝臓の疾患又は症状を有する患者の肝細胞において調節不全となる遺伝子をターゲティングする。遺伝子は肝細胞特異的遺伝子であっ

てよい。或いは、遺伝子は、例えば他の細胞及び組織と比較して肝細胞における発現が同じか低値である遺伝子のような肝細胞特異的遺伝子ではなく、そして、その遺伝子の発現及び／又は活性は正常な肝臓に由来する肝細胞と比較して肝臓疾患又は症状を有する患者の肝細胞において改変される。例えば、リボヌクレオチドレダクターゼサブユニット I I (R 2) は肝細胞癌において調節不全となり、即ち、R 2 は細胞周期を進行させている肝細胞癌では発現されるが、一般的に休止状態の正常な肝細胞では発現されない。R 2 をターゲティングする肝臓治療薬は R 2 の発現を特異的に低減又は阻害する核酸剤であってよく、そしてそのような核酸剤はアンチセンス分子、RNA i コンストラクト (例えば si RNA コンストラクト) 又はリボザイムであることができる。

【0142】

肝臓治療薬は又肝臓特異的な分子又はゲノム領域、例えば肝臓癌特異的な転写調節エレメント (TRE)、好ましくは米国特許出願 20050124068 に記載の CRG-L 2 調節配列をターゲティングしてもよい。肝臓治療薬はまた肝臓疾患又は症状 1 つ以上に関連する核酸 (遺伝子又はゲノム領域)、例えば米国特許出願 20040241657 に記載の核酸をターゲティングしてもよい。

【0143】

肝臓治療薬は例えば肝細胞増殖を阻害又は促進することにより肝臓の成長を阻害又は促進してよい。そのような薬剤は肝臓の保護において有用であることができ、その例は米国特許出願 20040170613 に記載されている。

【0144】

本発明の別の特徴は肝臓の疾患又は症状を有する患者を治療するための方法を提供する。方法は一般的に本発明の医薬組成物の治療有効量を患者に全身投与することを含む。全身投与は種々の送達経路、例えば iv 又は ip 注射、経皮送達、肺送達又は経口の取り込みを介して達成できる。

【0145】

本発明の方法及び組成物は何れかの肝臓の疾患又は症状、例えば限定しないが、肝臓癌 (例えば肝細胞癌、又は他の癌、例えば膵臓癌の肝臓転移)、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、D 型肝炎、E 型肝炎、G 型肝炎、自己免疫性肝炎、肝硬変、アラジール症候群、アルコール性肝臓病、アルファ-1-抗トリプシン欠損症、バッド・キアリ症候群、胆道閉鎖症、バイラー病、カロリ病、クリグラー-ナジャー症候群、デュービン-ジョンソン症候群、脂肪肝、ガラクトース血症、ジルベール症候群、I 型糖原病、血管腫、ヘモクロマトーシス、肝疾患に伴う掻痒症、肝臓移植、晩発性皮膚ポルフィリン症、原発性胆汁性肝硬変、プロトポルフィリン症、紅色肝症、ローター症候群、硬化性胆管炎及びウィルソン病に対して有用又は有効であってよい。

【0146】

本発明の方法及び組成物は、現在使用可能又は開発中 (例えば臨床治験において) の医薬品を含めて、肝臓治療薬の送達において有用である。本発明は種々の肝臓治療薬、例えば限定しないが小分子薬剤、ペプチド又はペプチド類縁体 (例えばペプチドミメティック)、核酸剤 (例えば RNA i コンストラクト、例えば si RNA コンストラクト、アンチセンス分子、酵素核酸又は他の遺伝子療法コンストラクト) 又はワクチンを意図している。

【0147】

アラジール症候群、即ち AGS は重度の病的状態及び 10~20% の死亡率を有する小児における慢性肝臓疾患の主要な形態の 1 つである。AGS は Jagged-1 遺伝子 (JAG1) における突然変異により生じると報告されている。例えば Alagille et al., J. Pediatr. 86:63-71, 1975; Anad et al., J. Med. Genet. 27:729-737, 1990; Kamath et al., J. Med. Genet. 40:891-895, 2003 を参照できる。従って、肝臓治療薬は AGS 治療薬 (又は AGS に対して有効な医薬) であってよく、AGS 治療薬は突然変異した JAG1 遺伝子をターゲティングする遺伝子療法コンストラクトを

10

20

30

40

50

含んでよい。

【0148】

アルコール乱用は全世界を通じて病的状態及び死亡例の先導的原因である。アルコールは身体の多くの臓器系に影響するが、最も顕著に影響されるものは恐らくは中枢神経系及び肝臓である。摂取されたアルコールのほぼ全ては肝臓で代謝され、過剰なアルコールの使用は急性及び慢性の肝疾患をもたらす場合がある。アルコール乱用に起因する肝硬変は合衆国の死亡原因10位内の1つである。アルコール乱用は一般的に3つの病理学的に異なる肝臓疾患をもたらす。臨床慣行においては、これ等の3つの症状の何れか又は全ては同じ患者において同じ時期に共に生じる場合がある。これ等の3つの症状は(1)脂肪肝(脂肪変性)：アルコール乱用は肝臓の主な細胞型である肝細胞の内部の脂肪の蓄積をもたらす場合がある。同様の症状はアルコール乱用者ではない一部の肥満者等においても観察されえる。脂肪肝は患者が飲酒を中止すれば逆行するが、脂肪肝は脂肪変性肝炎をもたらす場合がある。脂肪変性肝炎は炎症を伴った脂肪肝であり、そしてこの症状は肝臓の瘢痕形成及び肝硬変をもたらす場合がある。(2)肝炎：アルコールは急性及び慢性の肝炎をもたらす場合がある。アルコール性肝炎を呈する患者は通常は例外的に多大な消費の最近の事例を有する慢性的な飲酒者である。他の所見もあり得る。アルコール性肝炎は異常な臨床検査数値が唯一の疾患の指標である軽度の肝炎から、黄疸(ビリルビン貯留により生じる黄色の皮膚)、肝性脳症(肝不全により生じる神経学的機能不全)、腹水(腹部の体液貯留)、出血性食道静脈瘤(食道の拡張蛇行静脈)、異常な血液の凝固及び昏睡のような合併症を伴う重度の肝不全にまで至る。組織学的には、アルコール性肝炎は肝細胞のバルーン状変性、好中球及び場合によってはマロリー体を伴った炎症を有する特徴的な外観を有する(細胞の中間フィラメント蛋白の異常な凝集)。(3)肝硬変は線維症と組み合わせられた肝臓の広範な結節を解剖学的特徴とする。線維症及び結節の形成は正常な肝臓の構造を歪曲させ、これが肝臓を経由する血流を妨害する。肝硬変により肝臓はまたその生化学的機能を実行することが不可能となる。合衆国においては、アルコール乱用は肝硬変の主要原因である。解剖学的には、アルコール性肝硬変はほぼ常時、微小結節性である(即ち、再生されている肝臓結節は小型である)。

10

20

【0149】

肝硬変はまた何れかの慢性の肝臓疾患、例えば慢性B、CおよびD型肝炎、慢性自己免疫性肝炎、遺伝性の代謝疾患(例えばヘモクロマトーシス、ウィルソン病)、慢性胆管疾患、慢性鬱血性心不全、寄生虫感染症(例えば住血吸虫症)、非アルコール性脂肪変性肝炎(脂肪肝により生じる場合がある肝臓の炎症)又は毒素又は薬物への長期曝露によっても誘発されえる。

30

【0150】

肝硬変の治療は一般的に伏在する病因により変動する。アルコール摂取の停止によりアルコール性肝硬変の進行は停止し、そしてこの理由により、慢性のアルコール乱用者においては早期の診断が重要である。同様に、肝毒性の薬物の中止又は環境の毒素の除去が進行を停止させる。ヘモクロマトーシスにおける鉄の過剰負荷及びウィルソン病における銅の過剰負荷の治療のような代謝性疾患の治療もまた有効な治療法である。慢性のウィルス製のB型及びC型の肝炎はインターフェロンによる治療に応答する場合があります、そして自己免疫性の肝炎はプレドニソン及びアザチオプリン(イムラン)により改善する場合があります。ウルソジオール(アクチガル)のような薬剤は原発性胆汁性肝硬変及び恐らくは硬化性胆管炎の進行を遅延させる場合がある。肝臓移植は末期の肝硬変の治療のためには高度に有効である。

40

【0151】

胆汁鬱滞、即ち進行性家族性肝臓内1型のもの、即ちPFIC1、及び、良性的再発性の肝臓内胆汁鬱滞(BRIC)はATP8B1遺伝子の突然変異により誘発される。進行性家族性肝臓内胆汁鬱滞の第2の型(PFIC2)は肝臓特異的なATP結合カセット(ABC)輸送物質(BSEP)の突然変異により誘発される。PFIC3はクラスIIIの多剤耐性P糖蛋白(MDR3)の突然変異により誘発される。PFIC4は3-ベータ

50

ーヒドロキシデルター5-C27ステロイドオキシドレダクターゼ (HSD3B7) の突然変異により誘発される。例えば Ghent et al., J. Pediat. 93:127-132, 1978; Trauner et al., New Eng. J. Med. 339:1217-1227, 1998; Whittington et al., J. Pediat. Gastroent. Nutr. 18:134-141, 1994 を参照できる。

【0152】

肝臓癌は以下の非限定的な例、即ち肝臓の転移癌、胆管癌又は肝細胞癌の何れかであることができる。

【0153】

転移癌は臓器又は起源から拡張する腫瘍である。その血流供給のため、肝臓は一部の癌が拡張するための共通の部位となる。肝臓に拡張してくる最も一般的な癌の一部は結腸、膵臓、肺及び乳房を起源とするものである。リンパ腫及び白血病もまた肝臓を侵襲する場合がある。胆管癌は肝臓内部の胆管の細胞から生じる癌である。胆管癌はまた、固有肝の外部の胆管に生じる場合もある。

【0154】

肝細胞癌は肝臓の主要な細胞の型である肝細胞から生じる癌である。世界的には、肝細胞癌は癌の死亡例の最大2原因に属している。アジア及びアフリカの一部で特に蔓延している。肝細胞癌を有する者の約80%が肝硬変を有している。B型肝炎ウィルス及びC型肝炎ウィルスによる慢性の感染もまた肝細胞癌を発症する危険性を増大させる。木の実類 (最も一般的にはピーナツ)、穀類及び豆類の汚染物質であるカビにより生産されるアフラトキシンもまた肝細胞癌を誘発させる主要危険因子として関与を示唆されている。合衆国においては実質的には非存在であるが、アフラトキシンは世界の他の一部では一般的なものであり、そして、しばしば食品を汚染している。

【0155】

デュービン-ジョンソン症候群は、多剤耐性関連蛋白2 (MRP2) ととも称され、胆管の有機アニオン輸送において重要な役割を果たしている管状 (肝細胞の先端部分) の多重特異性の臓器アニオン輸送物質 (CMOAT) における突然変異により誘発される。Wada et al., Hum. Molec. Genet. 7:203-207, 1988。

【0156】

遺伝性の高ビリルビン血症 (Wolkoff et al., The Metabolic Basis of Inherited Disease, New York: McGraw-Hill (出版) (第5版), 1983, pp. 1385-1420) は (1) 主に未結合型の高ビリルビン血症をもたらすもの: ジルベール-アリアス症候群、クリグラー-ナジャー症候群I型及びクリグラー-ナジャー症候群II型; (2) 主に結合型の高ビリルビン血症をもたらすもの: デュービン-ジョンソン症候群、ローター症候群及び肝臓内胆汁鬱滞の数種の型を含む。詳細な研究によれば、ジルベール症候群を有する患者はビリルビングルクロノシルトランスフェラーゼの低減した活性を有することがわかっている。Bosma et al., New Eng. J. Med. 333:1171-1175, 1995。しかしながらジルベール症候群はUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ遺伝子 (UGT1A1) の突然変異により生じることがわかっている。同じ遺伝子における突然変異はクリグラー-ナジャー症候群I型及びクリグラー-ナジャー症候群II型を誘発する。従って、UGT1A1をターゲティングする肝臓治療薬はこれ等の遺伝性の高ビリルビン血症に対して有効である場合がある。

【0157】

脂肪肝の状態は脂肪変性とも称され、そして肝臓の炎症を伴った脂肪肝は脂肪変性肝炎と称される。脂肪変性及び脂肪変性肝炎はアルコール及び他の薬物により誘発される場合があり、そして場合によっては真性糖尿病患者においても生じる。アルコールにより誘発されていない脂肪変性肝炎は場合により非アルコール性脂肪変性肝炎、即ち「NASH」

10

20

30

40

50

とも称される。

【0158】

古典的なガラクトース血症はガラクトース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ遺伝子 (GALT) の突然変異により誘発される。

【0159】

糖原病はグルコース-6-ホスファターゼの欠損により誘発される。肝臓及び腎臓がこの障害に関与しており、そして低血糖症が主要な問題である。この障害は又、肝細胞腺腫にも関連付けられている。Bianchi, Eur J Pediatr. 1993; 152 Suppl 1: S63-70。

【0160】

肝血管腫には2つの型、即ち海綿状のもの及び血管内皮腫が存在する。血管内皮腫は一般的に小児においてのみ観察される。海綿状血管腫は成人における最も一般的な良性の肝臓腫瘍であるが、全年齢及び全世界における個体において生じる。

【0161】

古典的なヘモクロマトーシス (HFE)、即ち常染色体劣性障害は染色体6p21.3上のHFEと表記される遺伝子における突然変異により最も頻繁に生じる。1q21にマッピングされているヘモジュベリン (HJV) をコードする遺伝子における突然変異によって誘発されることもわかっている。若年性ヘモクロマトーシス即ちヘモクロマトーシス2型 (HFE2) もまた常染色体劣性である。HFE2Aと表記される1つの型はHJV遺伝子における突然変異により誘発される。HFE2Bと表記される第2の型は19q13にマッピングされているヘプシジン抗微生物ペプチド (HAMP) をコードする遺伝子における突然変異によって誘発される。常染色体劣性障害のヘモクロマトーシス3型 (HFE3) は7q22にマッピングされているトランスフェリン受容体2 (TFR2) をコードする遺伝子における突然変異によって誘発される。常染色体優性障害のヘモクロマトーシス4型 (HFE4) は、フェロポルチンをコードし、そして2q32にマッピングされているSLC40A1遺伝子における突然変異によって誘発される。ヘモクロマトーシスの臨床的特徴は肝硬変、糖尿病、皮膚黒色素沈着亢進及び心不全を含む。肝硬変に合併する原発性肝細胞癌 (HCC) は、罹患したホモ接合体における死亡例の約三分の一の原因となっている。ヘモクロマトーシスは診断されれば比較的容易に治療される障害であるため、防止可能な癌の形態である。

【0162】

A型肝炎 (HA) 又はA型ウイルス性肝炎という用語は、全ての以前の表記、即ち、感染性肝炎、流行性肝炎、流行性黄疸、カタル性黄疸、感染性黄疸、ボトキンス病及びMS-1肝炎を置き換えている。A型肝炎は疾患の急性又は早期の回復期の間に採取された血清中にIgMクラスの抗HAVを検出することにより診断される。A型肝炎ウイルス (HAV) は、ピコルナウイルス科ファミリーのエンテロウイルス属として分類される。HAVは小型 (直径27nm) の蛋白カプシドにより包囲されたRNAの単一の分子および1.33g/mlのCsCl中の浮遊密度を有する。

【0163】

B型肝炎はヘパドナウイルス科の大部分は2本鎖DNAウイルスであるB型肝炎ウイルス (HBV) により一般的には誘発される。HBVはヒトにおいて肝炎を生じさせ、このファミリーの関連ウイルスはアヒル、ジリス及びウッドチャックにおいて肝炎を誘発する。HBVのゲノムは4つの遺伝子、即ち、pol、env、pre-core及びXを有し、それぞれがウイルスDNAポリメラーゼ、エンベロープ蛋白、プレコア蛋白 (プロセシングされてウイルスカプシドになる) 及びプロテインXをコードしている。プロテインXの機能は明らかではないが、宿主細胞遺伝子の活性化及び癌の発症に関与している可能性がある。

【0164】

アルファインターフェロンは慢性B型肝炎の治療の為に合衆国で認可された最初の薬剤であった。インターフェロン治療は「複製疾患」を有する (HBeAg陽性) 個体に対

10

20

30

40

50

して推奨される。このような個体の約40%がインターフェロンアルファによる治療の16週間後には血清中HBeAgを消失させることになる。HBeAgの消失は良好化した予後と相関している。数人の治療患者(10%未満)はHBeAgの消失により判断して治癒している場合もある。慢性B型肝炎の他の治療はヌクレオシド類縁体を含む。1998年12月、合衆国食品医薬品局は(FDA)は慢性B型肝炎(HBeAg陽性患者)の治療に関して、3TCとしても知られHIVに対しても有効であるラミブジンを認可している。ラミブジンは慢性B型肝炎に対し100mg/日で経口服用される。それらを比較した試験では、血清中HBeAgの消失の誘導においてラミブジンはインターフェロンアルファと等しく効果的であった。1年間治療を受けた患者において肝生検所見を改善することも知られている。2002年9月、FDAはB型肝炎の治療に関してHIVに対しても有効である別のヌクレオシド類縁体であるアデボフィルジピボキシルを認可した。用量は慢性B型肝炎に対して10mg/日である。現時点において、他のヌクレオシド類縁体が臨床試験において試験中である。インターフェロンアルファとヌクレオシド類縁体の組合せ、二種のヌクレオシド類縁体の併用(例えばラミブジン及びアデフォビル)もまた検討中である。他のヌクレオシド類縁体、例えばファミシクロビル、ロブカビル及びアドフォビルもまた慢性B型肝炎を治療するための複合療法に関して試験されている。Yao and Gishi, Current Gastroenterology Reports 1999, 1:20-26。

10

【0165】

全世界で約170,000,000人、合衆国で4,000,000人がC型肝炎ウイルス(HCV)に感染している。ウイルスは血液及び血液製剤により主に伝染する。HCVに急性感染している個体の約85%が慢性感染となる。従って、HCVは慢性(6ヶ月より長く持続する)肝炎の主要原因である。慢性感染後は、ウイルスは治療非存在下ではほぼ全く浄化されない。稀少な例においてはHCV感染は臨床的に急性の疾患、更には肝不全を誘発するが、急性感染の大部分の例は臨床的には検出不可能である。HCVはフラビウィルス科のファミリーにおいて陽性の1本鎖RNAウイルスである。ゲノムは約10,000ヌクレオチドであり、そして約3,000アミノ酸の単一のポリ蛋白をコードする。ポリ蛋白は宿主細胞及びウィルスプロテアーゼによりプロセッシングされてウィルスの複製に必要な3種の主要な構造蛋白及び数種の非構造蛋白となる。僅かに異なるゲノム配列を有するHCVの数種の異なる遺伝子型が発見されており、それらはインターフェロンアルファにより治療への応答の相違に相関している。C型肝炎に対する全ての現在の治療プロトコルは筋肉内又は皮下注射により投与されるインターフェロンアルファの種々の調製品の使用に基づいている。インターフェロンアルファ-2a(ロフェロン-A; Hoffmann-La Roche)、インターフェロンアルファ-2b(イントロン-A; Schering-Plough)及びインターフェロンアルファコン-1(インフェルゲン; InterMune)は全て単剤として慢性C型肝炎を有する成人の治療に関して合衆国で認可されている。場合によりpeg化インターフェロンとも称されるpegインターフェロンアルファもまた慢性C型肝炎の治療の為に使用可能となっている。C型肝炎を有する患者において検討されているpegインターフェロンアルファには2種の製剤、即ち、pegインターフェロンアルファ-2b(Peg-イントロン; Schering-Plough)及びpegインターフェロンアルファ-2a(Pegアシス; Hoffmann-La Roche)が存在する。pegインターフェロンアルファ-2a単独では、患者の約30%~40%が24~48週間治療への持続的応答を達成する。Zeuzem et al., New England Journal of Medicine, 2000; 343:1666-1172; Heathcote et al., New England Journal of Medicine, 2000; 343:673-1680。リバビリンをインターフェロンアルファに追加すると、インターフェロンアルファ単独よりも慢性C型肝炎の治療において優れたものとなる。リバビリンは広範なウィルススペクトルに対して活性を有する合成ヌクレオシドである。FDAはまた過去のインターフェロンアルファ治療の後に回帰した慢性C型肝炎を有する個体の治療に関してイ

20

30

40

50

インターフェロンアルファ-2b+リバビリンを認可している。更に又、インターフェロンアルファ-2b+リバビリンの組合せは、インターフェロンによる治療歴のない慢性C型肝炎患者の治療においては、インターフェロンアルファ-2b単独の場合よりも持続応答の達成においてより有効であり、そしてこのことは1998年12月のこの適応症に対するFDA認可をもたらした。FDAはまた慢性C型肝炎の治療に関してpegインターフェロンアルファ+リバビリンの組合せを認可している。

【0166】

pegインターフェロンアルファのVX-497 (Vertex Pharmaceuticals) と称される化合物との臨床試験もまた進行中である。VX-497はリバビリンと同様の一部特徴を有し、そしてその作用の一部に関わるイノシンモノホスフェートデヒドロゲナーゼとして知られた細胞内酵素を阻害する。C型肝炎を治療する薬剤又は治療薬の新しい世代は、C型肝炎ウィルスの機能を阻害するように特に設計されたものを含む。このような薬剤の1つの標的はC型肝炎ウィルスRNAゲノムである。リボザイム (ヘパタザイム、Ribozyme Pharmaceuticals) はウィルスが生存するために必要とする領域においてC型肝炎ウィルスRNAゲノムを切断するために設計されている。C型肝炎ウィルスRNAを切断する場合のその効力は試験管内では確立されており、薬剤は現在、初期臨床試験に付されている。ISIS-14803 (ISIS Pharmaceuticals) はC型肝炎ウィルスRNAの保存された配列に相補なアンチセンス阻害剤である。分子はウィルスRNAに結合し、そして複製に必要な蛋白の発現を阻害する。ISIS-14803は現在、初期臨床試験に付されている。VP-50406 (ViroPharma) として知られている小分子もまた実験室においてC型肝炎ウィルスRNAを阻害することが明らかにされており、初期の臨床開発に付されている。内部リボソーム進入部位、即ちIRESとして知られている蛋白合成のために必要なC型肝炎ウィルスRNAの独特の構造の阻害剤もまた、実験室における研究に付されている。

【0167】

D型肝炎ウィルス (デルタウィルスとも称する) は小型の環状RNAウィルスである。D型肝炎ウィルスは複製欠損であり、従って別のウィルスの非存在下に増殖することはできない。ヒトにおいては、D型肝炎ウィルスの感染はB型肝炎感染の存在下においてのみ起こる。慢性のB型肝炎及びD型肝炎の感染を有する患者を治療するためにはインターフェロンアルファが使用される。

【0168】

E型肝炎ウィルス (HEV) は約8kbの1本鎖ポリアデニル化RNAゲノムを有する。その物理化学的特性に基づいて、カリシ様ウィルスであると推測されている。HEVにより誘発される疾患はE型肝炎又は経腸伝染非A非B型肝炎 (ET-NANBH) と称される。他の名称は糞口感染非A非B型及びA様非A非B型肝炎を含む。

【0169】

G型肝炎ウィルス (HGV) はHCVに関連するフラビウィルスである。

【0170】

現時点で肝疾患に伴う掻痒症の治療の為に使用される数種の医薬品が存在する。これ等の医薬品はコレステルアミン、抗生物質リファンピシン、アヘン拮抗剤ナロキソン及びナルトレキソン、及び、セロトニン3型受容体拮抗剤を含む。肝臓疾患に起因する掻痒症の治療のための薬剤ガバペンチンの使用に関する臨床試験 (IRBプロトコル#9618) 。

【0171】

晩発性皮膚ポルフィリン症は光感受性の皮膚炎を特徴とする常染色体優性障害であり、尿中のウロポルフィリンの大量排出を伴う。低減した肝臓及び赤血球のウロポルフィリンーゲンデカルボキシラーゼ活性が晩発性皮膚ポルフィリン症の家族性 (Kushner et al., 1976 Clin. Invest. 58:1089-1097; Leher and Doss, 1981, Dtsch. Med. Wschr. 106:241-2

45) 及び散発性 (Elder et al., 1978, New Eng. J. Med. 299: 274-278; Felscher et al., 1978, New Eng. J. Med. 299: 1095-1098) の症例において報告されている。

【0172】

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は肝臓内部の小型胆管の炎症性の破壊を特徴とする疾患である。PBCは最終的には肝硬変に至る。PBCの原因は不明であるが、自己抗体の存在により一般的には自己免疫疾患と考えられている。他の病因、例えば感染性物質も完全には排除されていない。PBC患者はこの疾患の共通した合併症である骨粗鬆症 (骨損失) の防止の為にビタミン及びカルシウムの摂取を推奨される。コルヒチンは肝線維症の抑制において役割を果たし、そして検査値を改善するが、兆候や症状は改善しない。種々の免疫抑制剤がPBC患者で検討されている。コルチコステロイドは恐らくは有効ではなく、PBC患者に共通して存在する骨粗鬆症を悪化させる場合がある。アザチオプリン (イヌラン)、メトトレキセート及びシクロスポリンAが数例の研究において調べられている。胆汁酸であるウルソジオール (アクチガル又はウルソ) はPBC患者の検査値及び臨床パラメーターを改善することがわかっており、そして1つの研究の結果は疾患の進行を遅延することを示唆している。正常位肝移植はPBCに起因する末期肝臓疾患の患者においては高度に良好な結果を示す。

10

【0173】

紅色肝性プロトポルフィリン症即ちEPPは不完全浸透度の常染色体優性として遺伝する。ハプロタイプ分離比分析を用いてGouya等 (2002) はイントロン性の単一ヌクレオチド多形 (SNP)、IVS3-48T-C (177000.0015) を発見しており、これは正常なものの63bp上流にある構成的異常アクセプタースプライス部位の使用をモジュレートする。異常にスプライスされたmRNAは非センス媒介崩壊機序 (NMD) により分解され、mRNAの低減した定常状態レベル及びEPP表現型発現に必要な追加的FECH酵素欠損をもたらす。

20

【0174】

原発性硬化性胆管炎 (PSC) は肝硬変をもたらす肝内及び肝外の胆管の炎症、破壊及び線維症を特徴とする慢性の肝臓疾患である。PSCは細菌性の胆管炎 (細菌による胆管の感染) の再発性のエピソードと合併する場合が多い。PSC患者はまた胆管癌 (胆管の癌) の増大した危険性を有する。正常位肝臓移植はPSCにより誘発された進行肝臓疾患を有する患者の治療において高度に有効である。

30

【0175】

ウィルソン病は劇的な肝細胞内銅蓄積とその後の肝臓及び神経の異常を特徴とする常染色体劣性障害である。ウィルソン病においては、基底核及び肝臓は、それぞれ神経学的な顕在性及び硬変の兆候においてそれら自身を発現する変化を起こす。銅代謝の攪乱が機序にある程度関与している。Bearn, Stanbury et al., The Metabolic Basis of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill (出版) (第3版) 1972、Pp. 1033-1050。

【0176】

肝臓移植は他の治療が不成功となった特定の肝臓の疾患又は症状に対して推奨される場合がある。そのような肝臓の疾患又は症状の例は、B型肝炎、C型肝炎、尿素回路欠損、家族性高コレステロール血症、アルコール誘導肝硬変、糖原病、自己免疫性肝炎、I型原発性高シュウ酸尿症、特発性肝硬変、I型クリグラーナジャー症候群、先天性肝線維症、ニーマンピック病、原発性胆汁性肝硬変、家族性アミロイドーシス、胆道閉鎖症、肝細胞癌、原発性硬化性胆管炎、胚芽細胞腫、アラジール症候群、血管内皮腫、家族性胆汁鬱滞症、非カルチノイド神経内分泌、薬剤誘導肝不全、肝臓腫瘍、急性／劇症肝不全、バッドキーリー症候群、アルファー1-抗トリプシン欠損、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、チロシン血症、プロトポルフィリン症又は嚢胞性線維症を含む。

40

【実施例】

50

【0177】

本開示内容はここでは一般的に説明するが、本開示の特定の特徴及び実施形態の説明を目的とするためのみに包含され、そして開示内容を限定する意図の無い以下の実施例を参照すればより容易に理解される。

【0178】

実施例1：s i R N A の設計及び試験

R N A 干渉、即ちR N A i は植物（転写後の遺伝子サイレンシング即ちP T G Sとして知られる）、C・エレガンス及びショウジョウバエにおいて最初に説明された遺伝子サイレンシング機序である（B e r n s t e i n e t a l . , 2001; C a r m e l l e t a l . , 2002において考察されている）。現在のモデルにおいては、R N A i の経路は2本鎖R N A（d s R N A）「トリガー」により活性化され、これが次に細胞酵素ダイサーによりプロセッシングされ、小型干渉R N A（s i R N A）と称される短い21～23ヌクレオチドのd s R N Aとなる。s i R N AはR N A誘導サイレンシング複合体（R I S C）内に取り込まれ、そこでs i R N Aアンチセンス鎖は、s i R N Aガイドの5'末端から約10塩基のs i R N A／標的デュプレックス内にエンドヌクレアーゼ切断に関して相同m R N Aをターゲティングするためのガイドとして機能する。哺乳類細胞においては30ヌクレオチドを超えるd s R N AはR N A iではなく非特異的なインターフェロン経路をトリガーする。しかしながら、T u s c h l 等（E l b a s h i r e t a l . , 2001a; H a r b o r t h e t a l . , 2001; C a p l e n e t a l . , 2002）によれば哺乳類細胞に外因性に導入されたより短いs i R N Aはダイサー工程を迂回し、インターフェロン応答を開始させることなく相同m R N A分解を直接活性化する。その後、多くの研究期間がヒトウィルス及び細胞標的に対してインビボでs i R N A及び関連の短鎖ヘアピンR N A（s h R N A）を発現することの実現可能性を明らかにした。R N A iの進歩は急速に進んでおり、そして治療用途に向けた多大な進展が既に存在している（Z a m o r e , 2001; K i t a b w a l l a a n d R u p r e c h t , 2002; M a r t i n e z e t a l . , 2002; C o u z i n , 2003; S c h e r r e t a l . , 2003; W i l s o n e t a l . , 2003; H a n n o n a n d R o s s i , 2004）。

【0179】

合成s i R N Aは外因性の短期使用のために選択される方法である。現在、未改変のs i R N Aは典型的にはトランスフェクション後2～3日に最大となるR N A i作用を媒介する。合成s i R N Aに関する最も一般的な設計はトリガーd s R N Aのダイサー切断により生じる内因性s i R N Aを模倣している（E l b a s h i r e t a l . , 2001a）のに対し、センス及びアンチセンスの鎖は21～23ヌクレオチド長である。デュプレックスのアニーリング部分は両方の3'末端の2ヌクレオチドオーバーハングを除いて完全に相補である。合成s i R N Aについては、3'ジヌクレオチドオーバーハングは標的配列から、その天然の対応物の場合のように誘導することができる。21～23量体から構築されたs i R N Aが大部分の目的の為に十分であるが、29ヌクレオチドまでのオリゴマーをインターフェロンの応答の開始を伴うことなく使用できる。本発明者等はダイサーの作用により細胞内でより長い2本鎖R N Aから生成したs i R N Aは外因性に提供される21量体よりも100倍まで強力であり得ることを観察している（K i m e t a l . , 2005）。S i o l a s等（2005）による共同著書は同様の結論を示しているが、これ等の研究者等はダイサー基質として合成ヘアピンを使用している。本明細書において提案される試験は、動物試験において使用するための強力なs i R N Aを形成するために、これ等の重要な発見を利用することになる。ダイサー基質デュプレックスR N Aから形成されるs i R N Aの厳密な予測を可能にする新しい設計の規則を以下に述べる。

【0180】

s i R N Aアンチセンス鎖と標的との間のミスマッチはそれらの数及び位置に応じて、様々な程度にまで活性を低下させる傾向を有する。s i R N A／標的ミスマッチとR N A

i 活性の間の関連性を支配する規則は完全には樹立されていないが、s i R N A 及び単純な s h R N A の両方に恐らくは適用される一部の一般化を行うことができる。エンドヌクレアーゼ切断部位の近傍の突然変異は常時ではないが頻繁に R N A i 作用を低下させる。更にまた、アンチセンス鎖の前半 (5' 末端) における突然変異は極めて有害である (R a n d a l l a n d R i c e, 2001; H o l e n e t a l., 2002; A m a r z g u i o u i e t a l., 2003)。エンドヌクレアーゼ切断はアンチセンス s i R N A 鎖の 5' 末端から「採寸」されるため、ガイド鎖の 5' 末端における突然変異は活性化 R I S C 複合体におけるアンチセンス/m R N A 標的デュプレックスを脱安定化させ、切断を阻害する。総括すれば、これ等の結果は、特定のアイソフォームをターゲットにするために R N A i コンストラクトを設計する場合には、その相当する s i R N A と非ターゲットのアイソフォームとの間のミスマッチがデュプレックスの 5' 末端内に属するように標的アイソフォーム内の標的部位を選択することが望ましいことを示唆している。これが不可能な場合、例えば切断の為の接触が不可能な標的の場合 (S c h e r e r a n d R o s s i, 2003b) には、交差反応性を試験することが重要である。

【0181】

21~23 量体から構築された s i R N A が大部分の目的の為に十分であるが、29ヌクレオチドまでのオリゴマーをインターフェロンの作用の開始を伴うことなく使用できる。本発明者等はダイサーの作用により細胞内でより長い 2 本鎖 R N A から生成した s i R N A は外因性に提供される 21 量体よりも 100 倍まで強力であり得ることを観察している (K i m e t a l., 2005)。S i o l a s 等 (2005) による共同著書は同様の結論を示しているが、これ等の研究者等はダイサー基質として合成ヘアピンを使用している。提案される試験は、動物試験において使用するための強力な s i R N A を形成するために、これ等の重要な発見を利用することになる。ダイサー基質デュプレックス R N A から形成される s i R N A の厳密な予測を可能にする新しい設計の規則を述べる。

【0182】

ショウジョウバエの胚の溶解物における実験によれば、合成 s i R N A 鎖上の遊離の 5'-OH 又は 5'-ホスフェートの何れかの必要性が示された (E l b a s h i r e t a l., 2001b; N y k a n e n e t a l., 2001)。同様の結果が H e L a 抽出物 (S c h w a r z e t a l., 2002) 又は未損傷細胞 (C h i u a n d R a n a, 2002) においても観察されている。一方又は他方の s i R N A 鎖の非対称 5'-アミノ改変は、アンチセンス鎖の 5'-アミノ改変は R N A i を消滅させるが、センス鎖のみの同様の改変は R N A i 作用を阻害しないことを示している。更に又、細胞内にトランスフェクトされ、その後再度単離された非ホスホリル化合成 s i R N A はホスファターゼにより予め処理しない限り、インビトロでキナーゼ作用を受けることができない (C h i u a n d R a n a, 2002)。総括すれば、これはアンチセンス鎖上の 5'-ホスフェートについてインビボの強力な必要性を示唆している。このことは、このヌクレオチドの改変はアンチセンス鎖が活性化 R I S C 複合体のエンドヌクレアーゼ切断に関するガイドとして機能する能力を妨害するという仮説に合致する。一方、3' 末端をブロックする改変はデュプレックス s i R N A に対しては、何れの鎖に対しても、大部分の場合においては殆ど影響しない (A m a r z g u i o u i e t a l., 2003)。

【0183】

s i R N A デュプレックスに対する骨格の改変の試験によれば、5' 及び 3' 末端の間に分布している s i R N A 鎖当たり 6 つまでの 2'-O-メチル、又は、3' 末端における 2 つの 2'-O-アリル改変は R N A i に悪影響を与えないことがわかった (A m a r z g u i o u i e t a l., 2003)。この点を超えた改変の数の増大又は 5' 末端におけるアリル改変は R N A i を低減する (A m a r z g u i o u i e t a l., 2003; H o l e n e t a l., 2003)。逆に、2 つより多いホスホロチオレート改変は細胞毒性であるが力価の有意な増大は促進しない (A m a r z g u i o u i

【 0 1 8 4 】

【 0 1 8 5 】

【 0 1 8 6 】

【 0 1 8 7 】

5'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNdNdN3'

3' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN N N5'

インビボダイサー処理及びダイサー処理産物の質量スペクトル分析を用いることにより、本発明者等はダイサーが2塩基3プライムオーバーハングを認識し、センス鎖の5'末端から21塩基、そして、2塩基オーバーハングから21塩基を切断して1つのみの21量体を形成することを測定した。センス鎖の3'末端に2つのデオキシリボヌクレオチドを含ませることにより(dN)、ダイサーはこのデュプレックスの右側から進入しなくなり、即ち目的の21量体のみの形成が確保されるのである。図6A~6Cもまた1塩基が異なる21量体のシリーズを抽出液と共にインキュベートした抽出液結合試験の結果を示す。siRNAの結合親和性は標的のノックダウンと緊密に相関している。本発明者等は20種の異なるsiRNAについてこの試験を反復し、そして相関は維持されている。

【0188】

ヒト及びマウスのR2配列を本発明者等のアルゴリズムに付した(Heale et al., 2005)。上位5種の予測siRNA及び標的について他のネズミ配列との潜在的相補性に関して分析し、アンチセンス鎖の5'末端における伸長されたマッチを探した。他の標的に関して伸長された5'相同性を共有しない配列を抽出液結合試験で試験することになり、最高結合物質を使用することになる。21量体の配列は上記した27/29量体のフォーマット内に組み込まれ、伸長配列は標的mRNAから誘導する。dsRNAを細胞培養物中5nM~5pMの範囲の濃度において滴定する。最低のIC50値を有するdsRNAを後のインビボ実験において使用した。オフターゲットが潜在的に問題となるため、プレスクリーニングした配列であっても、アルファ及びベータインターフェロンの活性化をELISA試験及びネズミマイクロアレイ分析により日常的に試験する(Kim et al., 2005)。

【0189】

材料及び方法

図6A:RNAi試験。同時トランスフェクション試験については、HEK293細胞をトランスフェクションの前日に60%コンフルエントとなっている24穴プレートに播種した。各RNAの少量をレポーターベクターを含有するOpti-MEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)50µL中に希釈し、リポフェクタミン2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)1.5µLを含有するOpti-MEM50µLと混合した。混合物を室温で15分間インキュベートし、培地の終容量500µLとなるように細胞に添加した。トランスフェクション効率を規格化するために、各試験では標的及び/又はデュプレックスRNAと赤色蛍光蛋白(RFP)レポータープラスミドの同時トランスフェクションを行った。トランスフェクション効率の変動が10%未満(RFP発現により測定)であった実験のみを評価した。EGFP発現のレベルはトランスフェクション後24時間に測定した。EGFP発現は蛍光スペクトル分析器で測定した。

【0190】

図6B:ゲルシフト分析。10cmプレート中のコンフルエントのHEK293細胞を採取しPBSで洗浄した。細胞ペレットを緩衝液D(20mM HEPES、pH7.9、0.2mM EDTA、0.5mM DTT、50mM KCl、10%グリセロール、0.2mM PMSF)0.5µL中に再懸濁し、15秒間超音波処理した。マイクロ遠心分離5分後に上澄みを採取した。各試験につき、抽出液10µLを30分間標識siRNA10fmolと共にインキュベートした。試料をネイティブのローディング染料と混合し、低温室中200Vで2時間、5%ポリアクリルアミドゲル(29:1)上で分離した。(c)(b)におけるレーンA~Eにおいて使用した配列。

【0191】

実施例2:siRNAを用いたR2発現のダウンレギュレーション

本発明者等は今回R2配列に特異的な多数のsiRNAを設計し、それらがインビトロ及びインビボの両方においてR2の発現をダウンレギュレートする能力に関して試験した。特定のsiRNAに関する配列を配列番号7~96(上記表2~8)として本明細書に記載する。

10

20

30

40

50

【0192】

図7に示す通り、R2に対して指向されたsiRNAは多重培養細胞系統においてR2の発現をダウンレギュレートすることができた。R2に対する3種のsiRNAデュプレックス（配列番号7～12として表2に示したsiRRM2-A、siRRM2-B及びsiRRM2-C）の各々は試験した3細胞系統の各々においてR2蛋白のレベルを低減した。これとは対照的に、GTI-2040アンチセンスデオキシヌクレオチドは最小限のダウンレギュレーションしか示していない。

【0193】

図7に示す実験を実施するために、HeLa（ヒト頸部腺癌）、HepG2（肝細胞癌）及びCCD-1074Sk（ヒト線維芽細胞）細胞をAmerican Type Culture Collectionから入手した。トランスフェクションの24時間前に細胞を6穴の組織培養プレート中にプレーティング（ウェル当たり250,000個）した。トランスフェクションに際しては、オリゴフェクタミン（Invitrogen）及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地（OptiMEM, Invitrogen）中に製造した。

【0194】

「siCONTROL」又は「siCON1」：以下の表10における配列番号97及び98として示す非ターゲティング対照siRNA#1（Dharmacon）；

「siRRM2-A」：上記表2の配列番号7及び8として示したhRRM2の「A」部位に対するsiRNA；

「siRRM2-B」：上記表2の配列番号9及び10として示したhRRM2の「B」部位に対するsiRNA；

「siRRM2-C」：上記表2の配列番号11及び12として示したhRRM2の「C」部位に対するsiRNA；及び、

「GTI-2040」：以下の表10における配列番号99として示すhRRM2に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド（Lee et al., Cancer Research 63:2802-2811（2003））。

【0195】

（表10．本明細書に記載した実施例において使用した対照核酸の配列。下線の残基は3'オーバーハングを示す。）

【0196】

【化85】

標記	配列	鎖	配列番号
siCONTROL (または siCON1)	5' uagecgacuaaacacauca <u>uu</u> 3'	センス	配列番号 97
	3' <u>uu</u> aucgcugauuuguguagu 5'	アンチ センス	配列番号 98
GTI-2040	5' cuugguggagcgauuuagcc 3'		配列番号 99

核酸複合体を4時間50nMの最終核酸濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。トランスフェクション後2日（48時間）に細胞を溶解し、1：250の希釈度の一次ヤギポリクローナル抗R2抗体（sc-10846、Santa Cruz）及び1：5000希釈度の二次HRPコンジュゲートロバ抗ヤギIgG抗体（Santa Cruz）を用いながらウエスタンブロットによりR2蛋白のレベ

ルを測定した。プロットはECL検出キット (GE/Amersham Biosciences) を用いて発色させ、そしてImageQuantTLソフトウェア (GE/Amersham Biosciences) を用いて定量した。

【0197】

実施例3：各標的部位におけるR2 siRNAの発見のためのタイリング実験

図10に示す通り、増大した力価を有するR2に対して指向されたsiRNAを発見するためにタイリング実験を使用した。R2に対する3種のsiRNAデュプレックス (配列番号7~12として表2に示したsiRRM2A、siRRM2B及びsiRRM2C) の各々はR2ルシフェラーゼ融合蛋白レベルを低減した。siRRM2B+3及びsiRRM2B+5デュプレックスの両方は3種の元のデュプレックスの各々よりも優れたダウンレギュレーションを示し、siRRM2B+5が最も強力なダウンレギュレーションを示した。これとは対照的に、GTI-2040アンチセンスデオキシヌクレオチド及び同じ標的を有するsiRNA (「si (GTI-2040)」) は如何なるダウンレギュレーションも示すことができなかった。最後に、以前に報告されたRRM2に対するsiRNA (「si (JBC, 2400)」) により達成されたダウンレギュレーションを比較の為に示す。

【0198】

図10に示す実験を実施するために、HepG2 (肝細胞癌) 細胞をAmerican Type Culture Collection から入手した。トランスフェクションの24時間前に細胞を24穴の組織培養プレート中にプレーティング (ウエル当たり50,000個) した。トランスフェクションに際しては、リポフェクチン (Invitrogen)、pR2Lucプラスミド (1 µg/ウエル) 及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地 (OptiMEM, Invitrogen) 中に製造した。

【0199】

「siRRM2A」：上記表2の配列番号7及び8として示したhRRM2の「A」部位に対するsiRNA；

「siRRM2B」：上記表2の配列番号9及び10として示したhRRM2の「B」部位に対するsiRNA；

「siRRM2C」：上記表2の配列番号11及び12として示したhRRM2の「C」部位に対するsiRNA；

「siRRM2B+3」：上記表5の配列番号59及び60として示したhRRM2の元の「B」部位の3ヌクレオチド下流のsiRNA；

「siRRM2B+5」：上記表5の配列番号63及び64として示したhRRM2の元の「B」部位の5ヌクレオチド下流のsiRNA；

「GTI-2040」：上記の表10における配列番号99として示すhRRM2に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド；

「si (GTI-2040)」：hRRM2に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドと同じ標的部位を有するsiRNAデュプレックス (以下の表11において配列番号100及び101として示す)；及び、

「si (JBC, 2004)」：以前に報告されたhRRM2に対するsiRNAデュプレックス (J. Biol. Chem. 279 (26) : 27030-27038, 2004) (以下の表11において配列番号102及び103として示す)。

【0200】

(表11. 本明細書に記載した実施例において使用したsi (GTI-2040) 及びsi (JBC, 2004) の配列。下線の残基は3'オーバーハングを示す。)

【0201】

【化 8 7】

標記	配列	鎖	配列番号
si(GTI-2040)	5' cuugguggagcga <u>uuuagccaa</u> 3'	センス	配列番号 100
	3' <u>uugaaccaccucgcuaaaucgg</u> 5'	アンチ センス	配列番号 101
si(JBC 2004)	5' gaggcuaaccuaugggugaac <u>gu</u> 3'	センス	配列番号 102
	3' <u>uucuccgaugggauaccacuug</u> 5'	アンチ センス	配列番号 103

10

これ等の核酸複合体を4時間10nMの最終核酸濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。トランスフェクション後2日(48時間)に細胞を溶解し、R2-ルシフェラーゼ融合蛋白のレベルをルシフェラーゼ試験(ルシフェラーゼ試験システム、Promega)を用いて製造元の説明書に従って測定した。

20

【0202】

実施例4：標的部位BにおけるR2 siRNAの発見のための追加的タイリング実験

図11は増大した力価を有するR2に指向されたsiRNAを発見するために実施した追加的タイリング実験の結果を示す。図10に示す結果と同様、siRRM2B+5は最も強力なダウンレギュレーションをもたらしている。siRRM2B+9及びsiRRM2B+3デュプレックスもまた強力なダウンレギュレーションをもたらしているが、siRRM2B+5ほど強力ではない。

【0203】

図11に示す実験を実施するために、HepG2(肝細胞癌)細胞をAmerican Type Culture Collectionから入手した。トランスフェクションの24時間前に細胞を24穴の組織培養プレート中にプレーティング(ウェル当たり50,000個)した。トランスフェクションに際しては、リポフェクチン(Invitrogen)、pR2Lucプラスミド(1μg/ウェル)及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地(OptiMEM, Invitrogen)中に製造した。

30

【0204】

「siGL3」：Dharmaconにより販売されているsiRNAターゲティングルシフェラーゼ(「ルシフェラーゼGL3デュプレックス」)；

「siRRM2B+3」：上記表5の配列番号59及び60として示したhRRM2の元の「B」部位の3ヌクレオチド下流のsiRNA；

40

「siRRM2B+4」：上記表5の配列番号61及び62として示したhRRM2の元の「B」部位の4ヌクレオチド下流のsiRNA；

「siRRM2B+5」：上記表5の配列番号63及び64として示したhRRM2の元の「B」部位の5ヌクレオチド下流のsiRNA；

「siRRM2B+6」：上記表8の配列番号87及び88として示したhRRM2の元の「B」部位の6ヌクレオチド下流のsiRNA；

「siRRM2B+7」：上記表8の配列番号89及び90として示したhRRM2の元の「B」部位の7ヌクレオチド下流のsiRNA；

「siRRM2B+8」：上記表8の配列番号91及び92として示したhRRM2の

50

元の「B」部位の8ヌクレオチド下流の s i R N A ；

「s i R R M 2 B + 9」：上記表8の配列番号93及び94として示した h R R M 2 の元の「B」部位9ヌクレオチド下流の s i R N A ；及び、

「s i R R M 2 B + 10」：上記表8の配列番号95及び96として示した h R R M 2 の元の「B」部位の10ヌクレオチド下流の s i R N A 。

【0205】

これ等の複合体を4時間10 nM、1 nM又は0.2 nMの最終 s i R N A 濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。トランスフェクション後2日（48時間）に細胞を溶解し、R2-ルシフェラーゼ融合蛋白のレベルをルシフェラーゼ試験（ルシフェラーゼ試験システム、Promega）を用いて製造元の説明書に従って測定した。

10

【0206】

実施例5：21量体及び27量体の s i R N A 活性の試験

図12に示す通り、増大した力価を有するR2に指向された s i R N A を発見するために、B+5標的部位におけるRNAデュプレックス（21量体又は27量体の何れか）を用いた用量依存性同時トランスフェクション試験を実施した。s i R R M 2 B + 5 の21量体及び27量体の両方とも、同時リポフェクションされたR2Lucの強力なダウンレギュレーションをもたらしている。試験した最高濃度（10 nM及び1 nM）において、21量体は27量体より僅かに高値の力価を示したが、試験した最低濃度（0.2 nM）においては27量体が僅かに高値の力価を示した。

20

【0207】

図12に示す試験を実施するために、HepG2（肝細胞癌）細胞をAmerican Type Culture Collection から入手した。トランスフェクションの24時間前に細胞を24穴の組織培養プレート中にプレーティング（ウエル当たり50,000個）した。トランスフェクションに際しては、リポフェクション（Invitrogen）、pR2Lucプラスミド（1 µg / ウエル）及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地（OptiMEM, Invitrogen）中に製造した。

【0208】

「s i R R M 2 B + 5 の21量体」：上記表5の配列番号63及び64として示した h R R M 2 の元の「B」部位の5ヌクレオチド下流の s i R N A ；及び、

30

「s i R R M 2 B + 5 の27量体」：s i R R M 2 B + 5 の21量体と同じ標的部位を有し、そしてs i R R M 2 B + 5 の21量体と同一のダイサー切断産物を有すると予測される27量体のRNAデュプレックス（上記表7の配列番号85及び86として示す）。

【0209】

これ等の複合体を4時間10 nM、1 nM又は0.2 nMの最終 s i R N A 濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。トランスフェクション後2日（48時間）に細胞を溶解し、R2-ルシフェラーゼ融合蛋白のレベルをルシフェラーゼ試験（ルシフェラーゼ試験システム、Promega）を用いて製造元の説明書に従って測定した。

40

【0210】

実施例6：s i R N A を用いた内因性R2発現のダウンレギュレーション

図13に示す通り、R2ルシフェラーゼ融合の s i R N A 誘導ダウンレギュレーションは内因性R2発現のノックダウンに相関している。試験した4時点の全てにおいて、s i R R M 2 B + 5 は非ターゲティング対照（s i C O N 1）s i R N A では観察されなかった内因性R2蛋白の強力なダウンレギュレーションを誘導している。このことはR2ルシフェラーゼ融合蛋白を用いた「タイリング実験」において最初に検討された s i R R M 2 B + 5 デュプレックスが実際に肝細胞癌の細胞において内因性R2の強力なダウンレギュレーターであることを確認するものである。

【0211】

50

図13に示す実験を実施するために、Hep3B（肝細胞癌）細胞をAmerican Type Culture Collection から入手した。トランスフェクションの24時間前に細胞を6穴の組織培養プレート中にプレーティング（ウェル当たり250,000個）した。トランスフェクションに際しては、オリゴフェクタミン（Invitrogen）及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地（OptiMEM, Invitrogen）中に製造した。

【0212】

「siCONTROL」：非ターゲティング対照siRNA#1（Dharmacon）（上記表10における配列番号97及び98として示す）；及び、

「siRRM2B+5」：hRRM2の元の「B」部位の5ヌクレオチド下流のsiRNA（上記表5の配列番号63及び64として示す）。 10

【0213】

これ等の複合体を4時間50nMの最終siRNA濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。トランスフェクション後1日（24時間）、2日（48時間）、3日（72時間）又は3.25日（78時間）に細胞を溶解し、R2蛋白のレベルをウエスタンブロットにより測定した。ウエスタンブロットでは1:250の希釈度の一次ヤギポリクローナル抗R2抗体（sc-10846, Santa Cruz）及び1:5000希釈度の二次HRPコンジュゲートロバ抗ヤギIgG抗体（Santa Cruz）を用いた。ウエスタンブロットはECL検出キット（GE/Amersham Biosciences）を用いて発色させた。その後、膜を剥離し（Restore剥離緩衝液、Pierce）、ローディング対照としてGAPDHについてブロットした。ウエスタンブロットの定量はImageQuantTLソフトウエア（GE/Amersham Biosciences）を用いて実施した。 20

【0214】

実施例7：R2に対するsiRNAはHepG2細胞においてアポトーシスを誘導する
図14に示す通り、R2に対するsiRNAはHepG2細胞においてアポトーシスを誘導する。検討した3時点の全てにおいて、ただし最も顕著にはトランスフェクション後3日において、siRRM2B+5でトランスフェクトしたHepG2細胞はsiCON1でトランスフェクトしたものよりも高値の程度の蛍光（より高範囲のアポトーシスを示す）を呈していた。 30

【0215】

図14に示す実験を実施するために、HepG2（肝細胞癌）細胞をAmerican Type Culture Collection から入手した。トランスフェクションの24時間前に細胞を6穴の組織培養プレート中にプレーティング（ウェル当たり250,000個）した。トランスフェクションに際しては、オリゴフェクタミン（Invitrogen）及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地（OptiMEM, Invitrogen）中に製造した。

【0216】

「siCONTROL」：非ターゲティング対照siRNA#1（Dharmacon）（上記表10における配列番号97及び98として示す）；及び、 40

「siRRM2B+5」：hRRM2の元の「B」部位の5ヌクレオチド下流のsiRNA（上記表5の配列番号63及び64として示す）。

【0217】

これ等の複合体を4時間50nMの最終siRNA濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。トランスフェクション後1日（24時間）、2日（48時間）又は3日（72時間）に、Vybrantアポトーシス試験#2（Invitrogen）及びフローサイトメトリーを用いてアポトーシスについて細胞を分析した。データはAlexaFluor488標識アネキシンVへの曝露後の集団平均蛍光として報告した。

【0218】 50

実施例 8 : R 2 に対する s i R N A は H C C 細胞の薬剤誘導アポトーシスを増強する

図 1 5 に示す通り R 2 に対する s i R N A は H C C の薬剤誘導アポトーシスを増強する。アドリアマイシン曝露の前に s i R R M 2 B + 5 によるリポフェクションに付してある H e p G 2 細胞は、s i R N A を投与されていないか、又は非ターゲティング対照 (s i C O N 1) s i R N A によるリポフェクションに付されているものよりも、有意に高度な程度のアポトーシスを示した。

【0219】

図 1 5 に示す実験を実施するために、H e p G 2 (肝細胞癌) 細胞を A m e r i c a n Type Culture Collection から入手した。トランスフェクションの 2 4 時間前に細胞を 6 穴の組織培養プレート中にプレーティング (ウェル当たり 2 5 0 , 0 0 0 個) した。トランスフェクションに際しては、オリゴフェクタミン (I n v i t r o g e n) 及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地 (O p t i M E M , I n v i t r o g e n) 中に製造した。

【0220】

「s i C O N T R O L」: 非ターゲティング対照 s i R N A # 1 (D h a r m a c o n) (上記表 1 0 における配列番号 9 7 及び 9 8 として示す) ; 及び、

「s i R R M 2 B + 5」: h R R M 2 の元の「B」部位の 5 ヌクレオチド下流の s i R N A (上記表 5 の配列番号 6 3 及び 6 4 として示す) 。

【0221】

これ等の複合体を 4 時間 5 0 n M の最終 s i R N A 濃度で細胞に曝露し、その後吸引によりそれらを除去し、そして細胞 (リボプレックス処理並びに未予備投与の細胞) を 3 日間アドリアマイシン (1 0 0 n M) と共にインキュベートした。次に細胞を V y b r a n t アポトーシス試験 # 2 (I n v i t r o g e n) 及びフローサイトメトリーを用いてアポトーシスについて細胞を分析した。データは A l e x a F l u o r 4 8 8 標識アネキシン V への曝露後の集団平均蛍光として報告した。

【0222】

実施例 9 : R 2 に対する s i R N A はインビボの R 2 ルシフェラーゼ融合蛋白の発現を低減する

図 1 6 に示す通り、R 2 に対する s i R N A はインビボの R 2 ルシフェラーゼ融合蛋白の発現を低減する。全時点において、s i R R M 2 B + 5 デュプレックス (上記表 5 の配列番号 6 3 及び 6 4 として示す) を投与されたマウスは p R 2 L u c プラスミド単独又は s i C O N 1 デュプレックスを有するプラスミドを投与されたマウスと比較して顕著に低減したルミネセンスを呈した。

【0223】

図 1 6 に示す実験を実施するために、雌性 B A L B / c マウス (~ 6 週齢、J a c k s o n L a b s , n = 5 の群) に、p R 2 L u c プラスミド (0 . 2 5 m g / k g) を単独又は R 2 に対する s i R N A (s i R R M 2 B + 5) (1 . 2 5 m g / k g) 、ルシフェラーゼ (L u c 1 0 5 - 2 1) 又は非ターゲティング対照 (s i C O N 1) s i R N A と組み合わせて単回高圧 (1 0 % v / w) 尾静脈注射により投与した。注射後の種々の時点 (2 、 6 、 1 1 及び 1 7 日) において、マウスを麻酔 (イソフランガス) し、D - ルシフェリン (X e n o g e n ; 腹腔内 P B S 中 1 5 0 m g / k g) を注射し、そして 1 0 分後に撮影することにより、全動物バイオルミネセンスを測定した (使用機器 : I V I S 1 0 0 画像化システム、X e n o g e n) 。棒グラフのデータは、各時点において p R 2 L u c プラスミドのみを投与されたマウスの平均値のパーセントとして全動物バイオルミネセンスとして提示した。更に又、t = 注射後 2 日に撮影したマウスの代表的画像も示す (図 1 6) 。

【0224】

実施例 1 0 : R 2 に対する s i R N A は培養 H C C 細胞の成育能力を低減する

図 1 7 に示す通り R 2 に対して最適化された s i R N A (s i R 2 B + 5) は培養ヒト H C C 細胞 (H e p 3 B 細胞) の成育能力を低減する。R 2 に対して最適化された s i R

10

20

30

40

50

NA (s i R 2 B + 5) による Hep 3 B 細胞のリポフェクションは非ターゲティング対照 s i RNA (s i CON 1) の同様の投与と比較してコロニー形成能力を顕著に低減している。このことは、これ等の細胞における R 2 のダウンレギュレーション (抗 R 2 s i RNA によるリポフェクションのみに起因) はその成長能力を低減することを示唆している。

【0225】

図 17 に示す実験を実施するために、Hep 3 B (ヒト肝細胞癌) 細胞を American Type Culture Collection から入手した。トランスフェクションの 24 時間前に細胞を 6 穴の組織培養プレート中に希釈しながらプレーティング (ウェル当たり 1, 000 個) した。トランスフェクションに際しては、オリゴフェクタミン (Invitrogen) 及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地 (OptiMEM, Invitrogen) 中に製造した。

【0226】

「s i R 2 B + 5」: hRRM2 に対して最適化された s i RNA (上記表 5 の配列番号 63 及び 64 として示す) ; 及び、

「s i CON 1」: 非ターゲティング対照 s i RNA # 1 (Dharmacon) (上記表 10 における配列番号 97 及び 98 として示す) 。

【0227】

これ等の複合体を 4 時間 5 nM の最終 s i RNA 濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。トランスフェクション後 5 日 (120 時間)、細胞をエタノールで固定 (10 分) し、そしてメチレンブルーで染色した (水中)。コロニー (~50 個以上の細胞を有するもの) を手作業で計数した。3 連のウェル (n = 3) を各投与に使用し; 柱状グラフは平均を示し、エラーバーは標準偏差を表す (図 17) 。

【0228】

実施例 11: s i RNA の力価は成長能力を低減する能力に相関する

図 18 に示す通り、R 2 に対する s i RNA の能力は培養ヒト HCC 細胞の成長能力を低減する s i RNA の能力と相関する。R 2 の強力なダウンレギュレーターであることがわかっている 3 種の s i RNA (s i R 2 B + 3、s i R 2 B + 5 及び s i R 2 B + 9) の何れかによる Hep 3 B 細胞のリポフェクションは R 2 の弱いダウンレギュレーターであることがわかっている 2 種の s i RNA (s i R 2 B + 6 及び s i R 2 B + 7) の何れかによる同様の投与と比較してコロニー形成能を顕著に低減している。この結果は、図 17 の結果に関連すれば、Hep 3 B 細胞における R 2 のダウンレギュレーション (抗 R 2 s i RNA によるリポフェクションのみに起因) がその成長能力を低減することを示唆している。

【0229】

図 18 に示す実験を実施するために、Hep 3 B (ヒト肝細胞癌) 細胞を American Type Culture Collection から入手した。トランスフェクションの 24 時間前に細胞を 6 穴の組織培養プレート中に希釈しながらプレーティング (ウェル当たり 500 個) した。トランスフェクションに際しては、オリゴフェクタミン (Invitrogen) 及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地 (OptiMEM, Invitrogen) 中に製造した。

【0230】

「s i R 2 B + 3」: hRRM2 に対する相対的に強力な s i RNA (上記表 5 の配列番号 59 及び 60 として示す) ; 、

「s i R 2 B + 5」: hRRM2 に対する相対的に強力な s i RNA (上記表 5 の配列番号 63 及び 64 として示す) ; 、

「s i R 2 B + 6」: hRRM2 に対する低強度の s i RNA (上記表 8 の配列番号 87 及び 88 として示す) ;

「s i R 2 B + 7」: hRRM2 に対する低強度の s i RNA (上記表 8 の配列番号 89 及び 90 として示す) ; 及び、

「s i R 2 B + 9」：h R R M 2 に対する相対的に強力な s i R N A （上記表 5 の配列番号 9 3 及び 9 4 として示す）。

【0 2 3 1】

これ等の複合体を 4 時間 5 n M の最終 s i R N A 濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。トランスフェクション後 5 日（1 2 0 時間）、細胞をエタノールで固定（1 0 分）し、そしてメチレンブルーで染色した（水中）。コロニー（～5 0 個以上の細胞を有するもの）を手作業で計数した。3 連のウェル（n = 3）を各投与に使用し；柱状グラフは平均を示し、エラーバーは標準偏差を表す（図 1 8）。比較目的の為に、同時トランスフェクション試験（R 2 に対するこれ等の s i R N A デュプレックスの相対力価を評価するため）の結果を図 1 1 に示す。

10

【0 2 3 2】

実施例 1 2：R 2 s i R N A による成長能力の低減は 5 - F U により増強される

図 1 9 に示す通り、R 2 に対する s i R N A （s i R 2 B + 5）による H e p 3 B 細胞の成長能力の低下は 5 - フルオロウラシル（5 - F U）曝露により増強される。上記した通り（図 1 7 参照）、R 2 に対して最適化された s i R N A （s i R 2 B + 5）による H e p 3 B 細胞のリポフェクションは陰性対照 s i R N A （本明細書においてはその s i R N A は L u c 1 0 5 - 2 1 であり、これはホタルルシフェラーゼをターゲティングする）による同様の投与と比較してコロニー形成能力を顕著に低減する。更に又、化学療法剤 5 - フルオロウラシル（7 2 時間 5 μ M）への細胞の曝露は未投与細胞と相対比較してコロニー数を低減し、そして、s i R 2 B + 5 の抗増殖作用を増強する。

20

【0 2 3 3】

図 1 9 に示す実験を実施するために、H e p 3 B（ヒト肝細胞癌）細胞を A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n から入手した。トランスフェクションの 2 4 時間前に細胞を 6 穴の組織培養プレート中に希釈しながらプレーティング（ウェル当たり 5 0 0 個）した。トランスフェクションに際しては、オリゴフェクタミン（I n v i t r o g e n）及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地（O p t i M E M, I n v i t r o g e n）中に製造した。

【0 2 3 4】

「s i R 2 B + 5」：h R R M 2 に対する強力な s i R N A （上記表 5 の配列番号 6 3 及び 6 4 として示す）；及び、

30

「L u c 1 0 5 - 2 1」：ホタルルシフェラーゼに対する s i R N A （本発明において陰性対照として使用；下記表 1 2 の配列番号 1 0 4 及び 1 0 5 として示す）。

【0 2 3 5】

（表 1 2．本明細書に記載した実施例において使用した L u c 1 0 5 - 2 1 の配列。大文字は D N A 残基、小文字は R N A 残基、下線残基は 3' オーバーハングを示す。）

【0 2 3 6】

【化 9 5】

標記	配列	鎖	配列番号
Luc105-21	5' gguuccuggaacaauugcu <u>TT</u> 3'	センス	配列番号 104
	3' <u>TT</u> ccaaggaccuuguuaacga 5'	アンチ センス	配列番号 105

40

これらの複合体を 4 時間 5 n M の最終核酸濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。5 - F U 投与試料については、トランスフェクション 4 8 時間後に成長培地に 5 μ M の 5 - フルオロウラシル（5 - F U）を添加し、そして細

50

胞を更に3日間インキュベートした。トランスフェクション後5日(120時間)、細胞をエタノールで固定(10分)し、そしてメチレンブルーで染色した(水中)。コロニー(約50個以上の細胞を有するもの)を手作業で計数した。3連のウェル(n=3)を各投与に使用し;柱状グラフは平均を示し、エラーバーは標準偏差を表す(図19)。

【0237】

実施例13: R2に対するsiRNAはマウスにおいて腫瘍中のR2蛋白レベルを低減する

図20に示す通り、R2に対するsiRNAはマウスにおいて皮下Hep3B腫瘍内部のR2蛋白レベルを低減する。抗R2 siRNA (siR2B+5)を含有する製剤を投与したマウス3匹中2匹において、腫瘍R2蛋白レベルは非ターゲティング対照siRNA (siCON1)を投与したマウスのものと比較して急激に低下している。このことは、siR2B+5を含有する製剤の3回連続毎日腫瘍内注射はこれ等の腫瘍内においてR2蛋白のダウンレギュレーションを達成することを示唆している。

10

【0238】

図20に示す実験を実施するために、Hep3B(ヒト肝細胞癌)細胞をHRLN雌性nu/nuマウスに皮下注射した。腫瘍が平均質量約200~300mgに達した時点で、アダマンタン-ポリ(エチレングリコール)-トランスフェリン(AD-PEG-Tf)ターゲティングリガンド(注射当たり2.5mg/kgのsiRNA)を保有するシクロデキストリン含有ポリカチオン(CDP)送達系内で、R2に対して最適化されたsiRNA (siR2B+5)(表5において配列番号63及び64として示す)又は非ターゲティング対照siRNA (siCON1)(表10において配列番号97及び98として示す)をマウスに3回連続毎日腫瘍内(IT)注射した。3回目の注射の2日後、マウスを安楽死させ、腫瘍を採取し、ホルマリン固定し、パラフィン包埋し、切片化し、そして免疫組織化学(IHC)を介してヒトR2蛋白発現に関してプローブした。切片は相対R2発現に関して採点した(+;低、++:中等度、+++ :高)。

20

【0239】

実施例14: R2に対するsiRNAはラットヘパトーマ細胞における蛋白レベルを低減する

図21に示す通り、R2に対するsiRNAは培養ラットヘパトーマ細胞(McA-RH7777)におけるR2蛋白レベルを低減する。R2に対して指向された分子(GTI-2040アンチセンス、siR2B+5の21量体及びsiR2B+5-27の25/27量体)は全て、陰性対照(Luc105-21、ルシフェラーゼに対するsiRNA)よりも優れたR2蛋白レベルの用量依存的低減を示している。siR2B+5の21量体及びsiR2B+5-27の25/27量体によるR2低下は相互に同等であり、そしてGTI-2040アンチセンス分子で観察されたものより良好となっている。最後に、このデータは当初はhRRM2に対して開発されたこれら2デュプレックスもR2蛋白のラットオーソログ(rRRM2)のダウンレギュレーションを達成することができることを示唆している。

30

【0240】

図21に示した実験を実施するために、McA-RH7777(ラットヘパトーマ)細胞をAmerican Type Culture Collectionから入手した。トランスフェクションの24時間前に細胞を6穴の組織培養プレート中にプレーティング(ウェル当たり250,000個)した。トランスフェクションに際しては、オリゴフェクタミン(Invitrogen)及び以下の核酸の各々を用いて、製造元の指示に従って、複合体を血清非含有培地(OptiMEM, Invitrogen)中に製造した。

40

【0241】

「Luc105-21」: ホタルルシフェラーゼに対する最適化されたsiRNA(陰性対照);

「GTI-2040」: hRRM2に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド;

50

「s i R 2 B + 5」：h R R M 2 に対する最適化された s i R N A （ 2 1 量体 ） ；

「s i R 2 B + 5 - 2 7」：h R R M 2 に対する最適化されたダイサー基質 R N A （ 2 5 / 2 7 量体 ）。

【 0 2 4 2 】

これらの複合体を 4 時間 1 n M 又は 2 0 n M の最終核酸濃度で細胞に曝露し、その後吸引により複合体を除去し、完全培地と交換した。トランスフェクション後 2 日（ 4 8 時間）に細胞を溶解し、一次抗体としての 1 : 2 5 0 の希釈度のヤギポリクローナル抗 R 2 抗体（ s c - 1 0 8 4 6、S a n t a C r u z ）及び二次抗体としての 1 : 1 0 0 0 0 希釈度の H R P コンジュゲートロバ抗ヤギ I g G 抗体（ S a n t a C r u z ）を用いながらウェスタンブロットにより R 2 蛋白のレベルを測定した。ブロットは E C L 検出キット（ G E / A m e r s h a m B i o s c i e n c e s ）を用いて発色させた。ウェスタンブロットの定量は I m a g e Q u a n t T L ソフトウェア（ G E / A m e r s h a m B i o s c i e n c e s ）を用いて実施した。

【 0 2 4 3 】

実施例 1 5 : s i R N A のための送達系

本発明者等は短鎖のシクロデキストリン含有ポリカチオン（ C D P ）を基剤とする非ウイルス系の核酸送達系を開発した。このビヒクルは自己組立により完全に形成された重合体系の核酸送達系の最初の例であり、そして現在使用可能な最も調節しやすいベクターである（ D a v i s e t a l . , 2 0 0 4 ）。この送達系はインビトロ及びインビボで極めて低毒性であることがわかっており（インビトロ： G o n z a l e z e t a l . , 1 9 9 9 ; H w a n g e t a l . , 2 0 0 1 ; P u n a n d D a v i s , 2 0 0 2 ; R e i n e k e a n d D a v i s , 2 0 0 3 a , b ; インビボ： B e l l o c q e t a l . , 2 0 0 3 b ; D a v i s e t a l . , 2 0 0 4 ; P u n e t a l . , 2 0 0 4 ）、そして動物へのオリゴヌクレオチド（ P u n e t a l . , 2 0 0 4 ）、 s i R N A （ H u - L i e s k o v a n e t a l . , 2 0 0 5 ）及びプラスミド（ B e l l o c q e t a l . , 2 0 0 3 b ）の全身投与を可能にする。マウス及びウサギを用いた初期の研究によれば送達系は免疫応答をもたらし、そして動物内における送達された核酸の生体内分布を改変する能力を有することが判っている（ P u n e t a l . , 2 0 0 4 ; H u - L i e s k o v a n e t a l . , 2 0 0 5 ）。送達系は自己組立粒子よりなり、調節可能な約 5 0 n m の直径及び表面電荷を有する。これ等のナノ粒子は自己組立により完全に調製され、再現性のある測定可能な送達ビヒクルを与える。ナノ粒子はそれらが細胞内環境の低 p H を「感知する」まで組み立てられた状態を持続するように設計され、感知後はそれらは細胞内運搬を支援するように自身を改変する。ナノ粒子は細胞表面受容体への結合のためのターゲティングリガンドを収容することができ、そして、その使用は動物におけるターゲティングされた送達に寄与している（ B e l l o c q e t a l . , 2 0 0 3 b ; P u n e t a l . , 2 0 0 4 ; H u - L i e s k o v a n e t a l . , 2 0 0 5 ）。従って、本発明者等は（ i ）定量的方法で特徴付けられる調節可能な特性を有する明確に定義された核酸送達ビヒクルを創作し、そして、（ i i ）げっ歯類動物モデルにおいて有効な送達及び機能を提供することができるのである。

【 0 2 4 4 】

肝臓癌

肝臓癌は多くの形態であることができる。肝臓の細胞の癌、即ち肝細胞癌は肝臓内に存在する結腸直腸癌、乳癌、肺癌等のような他の組織型の転移腫瘍とは顕著に異なっている。原発の肝臓癌は世界中で第 6 番目の頻発癌である（ G e r o l a m i e t a l . , 2 0 0 3 ）。本明細書において提案される研究は肝細胞癌を用いるものであり、従って、肝細胞の癌を含む。米国癌学会の 2 0 0 4 年の統計によれば肝臓に限定された肝臓癌に関する 1 9 9 2 ~ 1 9 9 9 年の 5 年相対生存率は 1 6 . 3 % であったのに対し、他の限定組織に関しては、乳癌（ 9 7 . 0 % ）、結腸及び直腸癌（ 9 0 . 1 % ）、前立腺癌（ 1 0 0 . 0 % ）及び膵臓癌（ 1 6 . 6 % ）であった。即ち、肝臓及び膵臓は遥かに致命的な局所

限定されたヒトの癌であり、そしてこのような事実はこれ等の癌に対する遥かに良好な新規治療法の必要性を示している。今回本発明者等は、肝臓癌の治療のための新規治療薬を提案する。即ち本発明者等は非ウィルスの送達される短鎖の干渉RNA (siRNA) によるリボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) サブユニット2 (R2) の阻害が肝臓癌のための新しい効果的な治療法を提供することになると提案する。R2阻害は、単独及び低用量化学療法剤との組合せにおいて、の治療法に対し、予測される優れた安全性の側面を有する肝臓癌の新しい治療的作用機序を現在の治療法に与えることになる。

【0245】

肝臓癌に対するリボヌクレオチドレダクターゼサブユニット2の阻害

リボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) は2'-デオキシリボヌクレオチドをその相当するリボヌクレオチド5'-ジホスフェートから生成する反応を触媒する。この反応は2'-デオキシリボヌクレオチド5'-トリホスフェートの生成のための経路における律速段階であり、そしてDNA複製に必要である。ヒトRNRは2つのサブユニット、即ちR1及びR2よりなり、そして両方の蛋白の発現が酵素活性には必要である。R1およびR2は別個の染色体上の異なる遺伝子によりコードされており、そして最も重要な点はそれらのmRNAは細胞周期に渡って示差的に発現される点である。R1蛋白は全細胞周期を通じて安定であるのに対し、R2はDNA複製が起こる後期G1/初期S期に発現されるのみである (Engstrom et al., 1985)。

【0246】

RNRは抗癌治療薬の興味深い標的である。文献記載の証拠によれば、網膜芽細胞腫の腫瘍サプレッサは細胞周期への進行を制御するための機序の1つとしてR1及びR2を抑制する (Angus et al., 2002)。R2蛋白はまた多くの活性化された癌遺伝子との相互作用を介して腫瘍細胞の悪性能を決定する場合に役割を果たすことができる。例えば、Fan等はv-fms、v-src、A-raf、c-myc及び他のもので形質転換された細胞の足場依存性の成長はR2が過剰発現されている場合に顕著に増強されることを明らかにしている (Fan et al., 1998)。R2の過剰発現はゲムシタビン耐性を誘発する因子として示されている (Liu et al., 2004)。最近Liu等 (2004) はsiRNAによるR2の抑制がDNA損傷剤及びRNR阻害剤に対してHCT-116を感受性とすることを報告している。これ等及びその他の問題点によりR2の阻害は抗癌剤療法の有用な目標となっている (Yen, 2003)。

【0247】

Yen等 (Chen et al., 2000) 及びLee et al. (2003) はR2に対するアンチセンス分子がインビトロ及びインビボの両方でヒト癌細胞の成育を顕著に低減できることを明らかにしている。Lee等はインビトロで200nMにおいてR2の生産を阻害することがわかっている (Orr and Dorr, 2004) 20量体のホスホロチオエートオリゴヌクレオチド (PS-ODN) であるGTI-2040がヒト結腸、膵臓、肝臓、肺、乳房、腎臓、卵巣、脳、前立腺等のヌードマウスにおける皮下腫瘍を顕著に阻害することを明らかにしている。この研究者等はまた癌細胞系統においてR2蛋白のレベルが上昇しており、そしてこれ等の結果は腫瘍及び腫瘍細胞系統におけるRNRの上昇したレベルを明らかにした早期の研究と合致している (Jensen et al., 1994)。ヒトにおける抗癌の方策としてR2阻害剤を使用することの概念は、現在GTI-2040で第II相臨床試験を実施中であるLorus Therapeuticsにおいて研究者等 (Lee et al., 2003) により試験されている (Orr and Dorr, 2004)。第I相の結果 (進行がんを有する患者27人に3週間連続静注投与の後サイクル間休薬1週間) によれば、第II相試験の推奨用量は185mg/m²/d (5mg/kg/d) であった (Orr and Dorr, 2004)。第II相試験は腎細胞癌の治療の為にカベシタビンと組み合わせてGTI-2040を使用している。試験の初期のデータによれば疾患の安定化及び一部の腫瘍の応答が評価21患者の一部で明らかになった (Orr and Dorr, 2004)。RNA干渉 (RNAi) は遺伝子発現の配列特異的阻害のためにはアンチセンス分子よ

りも遥かに強力であることがわかっており、そして、急速に、アンチセンス、リボザイム又はDNAザイム手法を超えた遺伝子発現調節のための選択肢となりつつある。極めて最近において、Whang等は(i)ゲムシタビンに対する膵臓腺癌の化学感受性を増強するためにR2に対するsiRNA(Duxbury et al., 2004a)を、及び(ii)膵臓腺癌の細胞侵襲性を減衰させ、そのゲムシタビン耐性を減少させるためにR2に対するレトロウィルス発現siRNAを使用している(Duxbury et al., 2004b)。

【0248】

これ等の研究及び本明細書に報告していない他のものは肝臓癌に関してR2が優れた標的であることを示している。肝臓癌に関して特に重要な点は、正常な肝細胞は休止状態の間も癌細胞は腫瘍の成育に従って細胞周期を進行させる。即ち、正常な肝細胞へのオフターゲットの送達は無効な副作用をもたらすとは考えにくい。今回本発明者等は、R2の発現を阻害するために肝細胞にR2に対するsiRNAを送達する肝細胞ターゲティング粒子を創作することにより肝臓癌に対する新規で有効な治療法を提供する。

【0249】

治療薬の効果的な全身送達のための50～100nm大きさの重要性

10ナノメートルの長さのスケールが腫瘍内の顕著な蓄積及び運搬を可能にするための十分な循環時間を有さなければならない薬剤にとっては、数10ナノメートルの長さのスケールが適切である。直径10nm未満の薬剤は腎臓により循環系から急速(数分内)に浄化される(Jorgensen and Moller 1979)。小分子治療薬はこの態様により主に除去される。薬剤が直径10nmを超えると、それらは物理的に腎臓を経由しては退出できない。即ち、10nmが長い(数時間)循環時間を必要とする薬剤のための最低限の大きさである。循環のための大きさの上限は毛細管の直径である。しかしながら、この大きさは腫瘍の効果的浸透のためには大きすぎる。大部分の固形腫瘍は正常組織においては観察されない特徴を有する。これ等の特徴の一部は(i)旺盛な血管形成及びそれにより生じる高い血管密度(Matre et al., 1999)、(ii)旺盛な血管の浸透性、(iii)欠損性の血管の構造、及び(iv)間質部からのリンパクリアランスの減損である(Fang et al., 2003)。腫瘍の特徴(i)～(iv)の結果である所謂「増強された浸透性及び貯留性」(EPR)の作用はよく知られており、そして生物学的及び合成による巨大分子が循環系から出て腫瘍内に蓄積することを可能とする(Fang et al., 2003; Tanaka et al., 2004)。従来の低分子量の薬剤は通常は血漿中半減期は数分である。EPR作用は顕著な蓄積が起こるためには数時間を必要とする。即ち、EPR作用による腫瘍内への取り込みは腎臓を経由して浄化されない実体(10nm超の大きさ)に対しては増強される。直径数100nm内の実体は循環系から退出し、そして、腫瘍に進入する。この大きさの薬剤は循環系から接触可能なその他の部位をほとんど有さないが、1つの他の組織は肝臓である(内皮の開窓は約100～150nm)。循環系から退出し、腫瘍塊内に進入した時点で、薬剤は腫瘍内である程度の運動性を有することが必要である。本発明者等は実験(後述)を通じて直系約50nmの薬剤が大きさにおいて良好な妥協点を示すことを発見した。即ち、薬剤が10nmであれば、それらは治療薬を十分担持することができず、そして100nmを超える大きさでは組織内の運動性が制限される。肝臓癌に関しては、この大きさは又、粒子が肝臓の開窓(約150nm; Guyton, 1981)を通過しなければならず、そしてASGPRに係留しなければならない(70nm未満の大きさ; Rensen et al., 2001)という点において、極めて腫瘍細胞への送達に適切なものである。

【0250】

Davis等は、全身注射から肝細胞の細胞内位置に到達することに対する、大きさとターゲティングリガンドの影響を検討している。蛍光標識単分散重合体ビーズを使用しながら、図22に模式的に示す方法により4種の型の粒子を合成している。ビーズの特性を表1に示し、そして、ビーズが治療薬粒子に関する良好なモデルであることを示すために

10

20

30

40

50

、製剤した s i R N A 粒子（詳細は後のセクション）と共に典型的な粒径分布を図 2 3 に示す。

【0251】

（表 1 1．取り込み実験用のビーズ）

【0252】

【化 1 0 2】

ビーズ名	平均直径 (nm)	z-電位 (mV)	ガラクトース表面密度 (pmol/cm ²)
Gal-50	51.5	-2.7	25.4
MeO-50	53.5	-2.7	0
Gal-140	138.1	-2.6	30.6
MeO-140	138.7	-3.2	0

10

尾静脈注射によりマウスに同じ数のビーズを曝露した場合の肝臓内に収集された用量のパーセントを図 2 4 に示す。ガラクトース非存在の粒子は意味のある量までは蓄積しないことに留意しなければならない。肝臓切片（図 2 5）によれば、G a l - 1 4 0 粒子は実際には肝細胞には到達せず（図 2 5 A）、個々の粒子としてクプファー細胞に取り込まれ（図 2 6）、そしてこの結果は粒子が血液、組織及び細胞内で凝集しないことを示している。一方 G a l - 5 0 粒子は試料全体に渡って肝細胞中に細胞内に位置している（図 2 5 B）。核は青色染色により可視化し、ビーズは緑色に可視化した。

20

【0253】

これ等のデータは約 5 0 n m の大きさの粒子は組織全体に渡って顕著な運動を呈することができ、そして細胞に進入できることを示唆している。これ等の試験は肝細胞のターゲティングを用いていたが、本発明者等は腫瘍内においても同様の挙動を観察している。5 0 n m の大きさの蛍光標識 D N A ザイムを担持したトランスフェリンターゲティング粒子はマウスの尾静脈注射により腫瘍細胞内部に位置しているが、トランスフェリンターゲティングリガンドを有さない 5 0 n m 粒子は E P R 作用により腫瘍に局在したが腫瘍細胞には進入していなかった（P u n e t a l . , 2 0 0 4）。即ち、これ等の 2 つの試験は直径 5 0 n m 程度の粒径が全身投与から肝細胞及び腫瘍内の細胞内局在を効果的に達成するためには適切であることを明らかにしている。

30

【0254】

自己組立核酸送達系の設計及び機能

本発明者等の非ウィルス系の送達系（G o n z a l e z e t a l . , 1 9 9 9 ; H w a n g e t a l . , 2 0 0 1 ; P u n a n d D a v i s , 2 0 0 2 ; R e i n e k e a n d D a v i s , 2 0 0 3 a , b）は 2 つの成分を用いている。第 1 の成分はシクロデキストリン含有ポリカチオンである（図 2 7 参照）。電荷間隔、電荷中心型及び疎水性（重合体骨格の疎水性を変化させることによる）において変動する多くのポリカチオンを製造することにより、インビトロ毒性はポリカチオンの疎水性に相関することがわかった（図 2 8 参照）。C D 含有ポリカチオンは短鎖の 1 本鎖オリゴから長鎖のプラスミド（本発明者等は 1 0 k b p まで使用した）までの大きさの核酸と相互作用をし、静電的相互作用（重合体は正荷電、核酸は負荷電）を介して核酸と自己組立を起こして混合物中に核酸の 1 0 0 % を含有する 5 0 ~ 1 0 0 n m のポリプレックスを形成し、そして、ヌクレアーゼ分解から核酸を完全に保護する（H w a n g e t a l . , 2 0 0 1 ; P u n a n d D a v i s , 2 0 0 2）。T E M 画像化はポリプレックスが球状の形態を有することを示唆している（H w a n g e t a l . , 2 0 0 1）。F E - S E M 及び T E M ステロペアは粒子が球状の形態を有することを確認するものであり、そしてクリオ T E M 画像はこれ等の粒子が緻密であることを示している。ポリカチオンは低毒性を呈する（ポリカチオン単独：インビトロ I C ₅₀ は 1 m M 超であり、1 0 0 m g / k g 超の量で

40

50

マウスで良好な耐容性 (Hwang et al., 2001) ; 完全製剤粒子 : CDP 量はマウスにおいて 500mg/kg 超であることができ、急性毒性を伴わない (Pun et al., 2004))。明らかに、シクロデキストリンは低毒性を呈するための重要な特徴である。

【0255】

プラスミド DNA (pDNA) のインビトロ送達を図 30 に示すデータにより説明する。pH7 未満で緩衝作用を示す他のポリカチオンは増強された遺伝子発現にある程度寄与する (Zuber et al., 2001 ; Putnam et al., 2001) 。CDP にこの種の緩衝能を有させ、そしてインビボ試験に適切なものとするために、イミダゾール (pKa 約 6.2) 基を図 27 に説明するように CDP の末端にコンジュゲートした。

10

【0256】

イミダゾール含有 CDP はエンドサイトーシス小胞の pH を実際に緩衝している (生存細胞における他の pH 感受性蛍光プローブを用いた最近の測定は pH が緩衝されていることを決定的に示している—データ示さず)。エンドソームの緩衝作用は浸透圧性の膨潤を誘発し、これは最終的には小胞の破壊をもたらし、核酸の放出を起こさせる。更に又、CDP 上のイミダゾールのプロトン化は重合体に核酸を放出させる。図 31 はこの点を説明する TEM を示す。

【0257】

CDP 又は im-CDP による上記ポリプレックスは、それらが生理学的条件において凝集する正荷電のコロイド状粒子であるという意味において、他のポリプレックスと同様の問題点を孕んでいる。PEG 化 (PEG : ポリエチレングリコール) によるポリプレックスの塩及び血清安定化を達成する試みの結果は様々である。PEG 化は pDNA の結合及び縮合を防止 (Garrett et al., 2000) するか、又はポリプレックスの形態を変化させることができる (Nguyen et al., 2000) 。しかしながら、ポリカチオンの PEG 化後の pDNA 縮合の良好な例は存在する (Kwok et al., 1999) 。Davis 等はシクロデキストリンを含有するポリプレックスの EG 化の新しい方法を開発している。図 31 は方法を説明する (Pun and Davis, 2002) 。

20

【0258】

改変成分 (例は図 32 に示す) は表面シクロデキストリン、荷電セグメント、PEG のセグメント及びターゲティングリガンドとともに封入複合体を形成するための末端アダマンタン (AD) を有している。Pun and Davis によれば、モディファイアーは粒子表面をデコレートし、そしてそのようにするに際して (i) 生理学的塩状態で安定であり (図 33 及び 34) (Pun and Davis, (2002))、(ii) 細胞表面受容体をターゲティングすることができ (図 35)、そして (iii) 所定の表面電荷 (図 36) 及びターゲティングリガンド数 (Pun and Davis, 2002) を有する粒子の創作を可能とする。

30

【0259】

現在、安定化された粒子の製剤化はポリカチオンとモディファイアーを混合した後にそれらを核酸に添加することにより行われる。全体の系は自発的に自己組立を起こし、3 成分が混合された後数秒以内に均一な大きさの粒子 (核酸の 100% が粒子中にある) となり (図 37 参照)、そしてこの製剤化は 10mg pDNA/mL もの高い pDNA 濃度で行うことができる。

40

【0260】

遺伝子送達粒子の物理化学的挙動はモデル生物学的流体において試験されている。上記した通り、粒子は 150mM の NaCl 中で安定である。更に又、本発明者等は濁度試験を用いて血液及び血液成分の存在下の安定性について試験している。即ち、凝集が起これば、凝集した実体は定量的に測定できるより多くの光を散乱する。図 38 はこの試験を示しており、そして未 PEG 化ポリプレックスは培地中 (a) 又は 100% 活性ウシ胎児血

50

清 (FBS) 中 (b) で凝集するが、PEG化粒子は凝集しないことを示している。

【0261】

カチオン性脂質及び重合体は補体を活性化することが判っている (Plank et al., 1996)。図39はPlank等 (1996) により報告されたデータと合致してPEI及びCDPのようなポリカチオンが実際に補体活性化を呈することを示している。しかしながら、完全に製剤化された粒子 (Tf-PEG-AD、AD-PEG、CDP及びpDNA) は、遊離の成分が除去されていない場合でも動物において使用される濃度では補体を活性化しない (Tf-PEG-AD; トランスフェリン (Tf) 含有PEG-AD、ここでTfは腫瘍をターゲティングするために使用される (Pun et al., 2004))。

10

【0262】

マウスにおける核酸の全身送達

siRNAを用いた肝臓へのガラクトースのターゲティング

ネイキッドのsiRNAは培養細胞には取り込まれないが、CDP製剤化物質 (粒径50nm、図23b) は本質的には全ての細胞に進入する (図40)。本発明者等の場合は、ネイキッドのsiRNAは血清中安定ではないが、CDP製剤はヌクレアーゼ分解からの保護をもたらす (本発明者等は72時間までの保護を示している)。即ち、CDP/siRNA製剤は血清中で安定であり、細胞にsiRNAを送達する。

【0263】

マウスにおいて肝細胞をターゲティングした試験において、本発明者等はFAS遺伝子をダウンレギュレートするためにSong等 (2003) のsiRNA配列を使用した。Song等 (2003) は流体力学的注射 (尾静脈において急速に注射された溶液約1mL) がFASmRNAレベルを低下させたことを示している。流体力学的注射法はsiRNAを含めて肝細胞 (Liu et al., 1999; Zhang et al., 1999; Yant et al., 2000) に核酸を送達することがよく知られている (McCaffrey et al., 2002; Lewis et al., 2002; Song et al., 2003)。BALB/cマウス及びsiRNA50µg注射を用いて、定量的RT-PCRにより図41に示すデータが得られた。Song等 (2003) により報告された通り、流体力学的注射法 (標識HPTV) はFASmRNAレベルを低減したが、ネイキッドsiRNAの標準的な低容量 (200µL) 注射は低減しなかった。しかしながら、ガラクトース含有im-CDP製剤化粒子はHPTV法で観察されたものと同様のFASmRNA低下 (標準的な低容量 (200µL) 注射を使用) をもたらした。

20

30

【0264】

siRNAを用いた腫瘍へのトランスフェリンターゲティング

癌細胞への核酸の送達を促進するために、標的リガンドとして本発明者等の送達系内にトランスフェリン (Tf) が取り込まれている (Bellloq等., 2003a)。トランスフェリン受容体 (TfR) は正常細胞よりも遥かに高値のレベルで悪性細胞表面上に存在している。

【0265】

ルシフェラーゼ遺伝子の取り込みを可能にするためにレンチウィルスで形質導入したTC-71細胞 (TC71-LUC) の尾静脈注射によりNOD/scidマウス中に播種性腫瘍モデルが創作されている。TC-71細胞はEWS-FLI1と称される融合遺伝子を含むし、その表面上にTfRを有するユーイング肉腫細胞である。この融合遺伝子由来の蛋白産物は細胞増殖に関与することが知られている。

40

【0266】

第1に、機能性siRNAは通常の尾静脈注射を用いて腫瘍に送達することができることが明確化した。図43はTf含有粒子を用いたルシフェラーゼに対するsiRNAの送達により、ルシフェラーゼシグナルの極めて大きい低減が可能であったことを示している (ネイキッドのsiRNAでは観察されていない)。次に、本発明者等はEWS-FLI

50

10

20

30

40

【 0 2 7 1 】

【化 1 0 7】

Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E. and Prydz, H. (2003) Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* 31, 589-595.

Angus, S.P., Wheeler, L.J., Ranmal, S.A., Zhang, X., Markey, M.P., Matthews, C.K. and Knudsen, E.S. (2002). The retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. *J. Biol. Chem.* 277, 44376-44384.

10

Baenziger, J.U. and Maynard, Y. (1980) Human Hepatic Lectin – Physicochemical Properties and Specificity. *J. Biol. Chem.* 255, 4607-4613.

Bellocq, N.C., Pun, S.H., Jensen, G.S. and Davis, M.E. (2003a) Transferrin-Containing, Cyclodextrin Polymer-Based Particles for Tumor-Targeted Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* 14, 1122-1132.

Bellocq, N.C., Davis, M.E., Engler, H., Jensen, G.S., Liu, A., Machemer, T., Maneval, D.C., Quijano, E., Schluep, T. and Wen, S. (2003b). Transferrin-Targeted, Cyclodextrin Polycation-Based Gene Vector for Systemic Delivery. *Mol. Therapy* 3, 750.

20

【 0 2 7 2】

【化 1 0 8】

Bernstein, E., Denli, A.M. and Hannon, G.J. (2001) The rest is silence. *RNA* 7, 1509-1521.

Caplen, N.J., Taylor, J.P., Statham, V.S., Tanaka, F., Fire, A. and Morgan, R.A. (2002) Rescue of poyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum. Mol. Genet.* 11, 175-184.

Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. and Hannon, G.J. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Gene. Dev.* 16, 2733-2742.

Chen, S., Zhou, B., He, F. and Yen, Y. (2000) Inhibition of Human Cancer Cell Growth by Inducible Expression of Human Ribonucleotide Reductase Antisense cDNA. *Antisense Nucleic A.* 10, 111-116.

Chiu, Y.-L. and Rana, T.M. (2002) RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell* 10, 549-561.

Connolly, D.T., Townsend, R.R., Kawaguchi, K., Bell, W.R. and Lee, Y.C. (1982) Binding and Endocytosis of Cluster Glycosides by Rabbit Hepatocytes – Evidence for a Short-Circuit Pathway That Does Not Lead to Degradation. *J. Biol. Chem.* 257, 939-945.

Couzin, J. (2003) RNA interference. Mini RNA molecules shield mouse liver from hepatitis. *Science* 299, 995.

Davis, M.E. and Brewster, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present, future. *Nat. Rev. Drug Disc.* 3, 1023-1035 (2004).

Davis, M.E., Pun, S.H., Bellocoq, N.C., Reineke, T.M., Popielarski, S.R., Mishra, S. and Heidel, J. (2004). Self-Assembling Nucleic Acid Delivery Vehicles via Linear, Water-Soluble, Cyclodextrin-Containing Polymers. *Curr. Med. Chem.* 11, 1241-1253.

Dohjima, T., Lee, N.S., Li, H., Ohno, T. and Rossi, J.J. (2003). Small Interfering RNAs Expressed from a Pol III Promoter Suppress the EWS/Fli-1 Transcript in an Ewing Sarcoma Cell Line. *Mol. Ther.* 7, 811-816.

Duxbury, M.S., Ito, H., Zinner, M.J., Ashley, S.W. and Whang, E.E. (2004a) RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene* 23, 1539-1548.

【 0 2 7 3】

【化 1 0 9】

Duxbury, M.S., Ito, H., Benoit, E., Zinner, M.J., Ashley, S.W. and Whang, E.E. (2004b) Retrovirally mediated RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase: A novel therapeutic strategy in pancreatic cancer. *Surgery* 136, 261-269.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

10

Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.

Engstrom, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Skog, S., Thelander, L. and Tribukait, B. (1985) Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 260, 9114-9116.

20

Fadden, A.J., Holt, O.J. and Drickamer, K. (2003) Molecular characterization of the rat Kupffer cell glycoprotein receptor. *Glycobiology* 13, 529-537.

Fan, H., Villegas, C., Huang, A. and Wright, J.A. (1998) The mammalian ribonucleotide reductase R2 component cooperates with a variety of oncogenes in mechanisms of cellular transformation. *Cancer Res.* 58, 1650-1653.

Fang, J., Sawa, T. and Maeda, H. (2003) Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor of macromolecular drugs including SMANCS. *Adv. Exp. Med. Biol.* 519, 29-49.

30

Garrett, S.W., Davies, O.R., Milroy, D.A., Wood, P.J., Pouton, C.W. and Threadgill, M.D. (2000). Synthesis and Characterisation of Polyamine-Poly(ethylene glycol) Constructs for DNA Binding and Gene Delivery. *Bioorg. Med. Chem.* 8, 1779-1797.

Gerolami, R., Uch, R., Brechot, C., Mannoni, P. and Bagnis, C. (2003) Gene therapy of hepatocarcinoma: a long way from the concept to the therapeutical impact. *Cancer Gene Ther.* 10, 649-660.

40

Gonzalez, H., Hwang, S.J. and Davis, M.E. (1999). New Class of Polymers for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Bioconj. Chem.* 10, 1068-1074.

Guyton, A.C. (1981). Medical Physiology, 6th edition. W.B. Saunders Co.

【 0 2 7 4】

【化 1 1 0】

Hannon, G.J. and Rossi, J.J. (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-378.

Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T. and Weber, K. (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114, 4557-4565.

Heale, B.S., Soifer, H.S., Bowers, C. and Rossi, J.J. (2005) siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res.* 33, e30.

10

Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E. and Prysz, H. (2002) Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30, 1757-1766.

Holen, T., Amarzguioui, M., Babaie, E. and Prydz, H. (2003) Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res.* 31, 2401-2407.

20

Hu-Lieskovan, S., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E. and Triche, T.J. (2005) Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, non-viral delivery of siRNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.*, Oct 1; 65(19):8984-92.

Gonzalez, H., Hwang, S.J. and Davis, M.E. (1999). New Class of Polymers for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Bioconj. Chem.* 10, 1068-1074..

30

Jensen, R.A., Page, D.L. and Holt, J.T. (1994) Identification of genes expressed in premalignant breast disease by microscopy-directed cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9257-9261.

Jorgensen, K.E. and Moller, J.V. (1979) Use of flexible polymers as probes of glomerular pore-size. *Am. J. Physiol.* 236, F103-F111.

Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.

40

Kim, D.-H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S.S. and Rossi, J.J. (2005) Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotech.* 23, 222-226.

Kirchheis, R., Wightman, L., Schreiber, A., Robitza, B., Rössler, V., Kurs, M., and Wagner, E. (2001). Polyethylenimine/DNA Complexes Shielded by

【 0 2 7 5】

【化 1 1 1】

Transferrin Target Gene Expression to Tumors After Systemic Application. *Gene Ther.* 8, 28-40.

Kitabwalla, M. and Ruprecht, R.M. (2002) RNA interference – a new weapon against HIV and beyond. *New Engl. J. Med.* 347, 1364-1367.

Kolatkhar, A.R., Leung, A.K., Isecke, R., Brossmer, R., Drickamer, K. and Weis, W.I. (1998) Mechanism of N-acetylgalactosamine binding to a C-type animal lectin carbohydrate-recognition domain. *J. Biol. Chem.* 273, 19502-19508.

10

Kwoh, D.Y., Coffin, C.C., Lollo, C.P., Jovenal, J., Banaszczyk, M.G., Mullen, P., Phillips, A., Amini, A., Fabrycki, J., Bartholomew, R.M., Brostoff, S.W. and Carlo, D.J. (1999). Stabilization of Poly-L-Lysine/DNA Polyplexes for *In Vivo* Gene Delivery to the Liver. *Biochem. Biophys. Acta* 1444, 171-190.

Layzer, J.M., McCaffrey, A.P., Tanner, A.K., Huang, Z., Kay, M.A. and Sullenger, B.A. (2004) In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 10, 766-771.

20

Lee, R.T. and Lee, Y.C. (1997) Facile synthesis of a high-affinity ligand for mammalian hepatic lectin containing three terminal N-acetylgalactosamine residues. *Bioconjugate Chem.* 8, 762-765.

Lee, Y.C., Townsend, R.R., Hardy, M.R., Lonngren, J., Arnap, J., Haraldsson, M. and Lonn, H. (1983) Binding of Synthetic Oligosaccharides to the Hepatic Gal Galnac Lectin – Dependence on Fine-Structural Features. *J. Biol. Chem.* 258, 199-202.

30

Lee, Y., Vassilakos, A., Feng, N., Lam, V., Xie, H., Wang, M., Jin, H., Xiong, K., Liu, C., Wright, J. and Young, A. (2003) GTI-2040, an Antisense Agent Targeting the Small Subunit Component (R2) of Human Ribonucleotide Reductase, Shows Potent Antitumor Activity against a Variety of Tumors. *Cancer Res.* 63, 2802-2811.

Lewis, D.L., Hagstrom, J.E., Loomis, A.G., Wolff, J.A. and Herweijer, H. (2002). Efficient Delivery of siRNA for Inhibition of Gene Expression in Postnatal Mice. *Nat. Genet.* 32, 107-108.

40

Lin, Z.P., Belcourt, M.F., Cory, J.G. and Sartorelli, A.C. (2004) Stable Suppression of the R2 Subunit of Ribonucleotide Reductase by R2-targeted Short Interference RNA Sensitizes p53(-/-) HCT-116 Colon Cancer Cells to DNA-

【 0 2 7 6】

【化 1 1 2】

damaging Agents and Ribonucleotide Reductase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 279, 27030-27038.

Liu, F., Song, Y. and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based Transfection in Animals by Systemic Administration of Plasmid DNA. *Gene Ther.* 6, 1258-1266.

Liu, X., Zhou, B., Xue, L., Qiu, W., Shih, J., Zheng, S. and Yen, Y. (2004) Nuclear factor Y regulation and promoter transactivation of human ribonucleotide reductase subunit M2 gene in a Gemcitabine resistant KB clone. *Biochem. Pharm.* 67, 1499-1511. 10

Martinez, M.A., Clotet, B. and Este, J.A. (2002) RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol.* 23, 559-591.

Matre, D.A., Sinkjaer, T., Knardahl, S., Andersen, J.B., Arendt-Nielsen, L. and Duncan, R. (1999) Polymer conjugates for tumour targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway? *Pharm. Sci. Technol. Today* 2, 441-449. 20

McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.-T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J. and Kay, M.A. (2002) RNA Interference in Adult Mice. *Nature* 418, 38-39.

Nguyen, H.-K., Lemieux, P., Vinogradov, S.V., Gebhart, C.L., Guerin, N., Paradis, G., Bronich, T.K., Alakhov, V.Y., Kabanov, A.V. (2000). Evaluation of Polyether-Polyethyleneimine Graft Copolymers as Gene Transfer Agents. *Gene Ther.* 7, 129-138. 30

Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.

Orr, R.M. and Dorr, F.A. (2004) Clinical Studies of Antisense Oligonucleotides for Cancer Therapy. From *Methods in Molecular Medicine, Vol. 106: Antisense Therapeutics, Second Edition*, M.I. Phillips, ed., Humana Press.

Ozaki, K., Lee, R.T., Lee, Y.C. and Kawasaki, T. (1995) The Differences in Structural Specificity for Recognition and Binding between Asialoglycoprotein Receptors of Liver and Macrophages. *Glycoconjugate J.* 12, 268-274. 40

Popielarski, S. and Davis, M.E. (2005) A Nanoparticle-Based Model Delivery System to Guide the Rational Design of Gene Delivery to the Liver. In preparation.

【 0 2 7 7】

【化 1 1 3】

Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F.C. and Wagner, E. (1996). Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.* 7, 1437-1446.

Pun, S.H. and Davis, M.E. (2002). Development of a Non-Viral Gene Delivery Vehicle for Systemic Application. *Bioconjugate Chem.* 13, 630-639.

Pun, S.H., Bellocq, N.C., Cheng, J., Grubbs, B.H., Jensen, G.S., Davis, M.E., Tack, F., Brewster, M., Janicot, M., Janssens, B., Floren, W. and Bakker, A. (2004). Targeted Delivery of RNA-Cleaving DNA Enzyme (DNAzyme) to Tumor Tissue by Transferrin-Modified, Cyclodextrin-Based Particles. *Cancer Biol. Ther.* 3, 641-650.

10

Putnam, D., Gentry, C.A., Pack, D.W. and Langer, R. (2001). Polymer-Based Gene Delivery with Low Cytotoxicity by a Unique Balance of Side-Chain Termini. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 1200-1205.

Randall, G. and Rice, C.M. (2001) Hepatitis C virus cell culture replication systems: their potential use for the development of antiviral therapies. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14, 743-747.

20

Reineke, T.M. and Davis, M.E. (2003a). Structural Effects of Carbohydrate-Containing Polycations on Gene Delivery. Part 1: Carbohydrate Size and Its Distance from Charge Centers. *Bioconjugate Chem.* 14, 243-254.

Reineke, T.M. and Davis, M.E. (2003b). Structural Effects of Carbohydrate-Containing Polycations on Gene Delivery. Part 2: Charge Center Types. *Bioconjugate Chem.* 14, 255-261.

30

Rensen, P.C.N., Slidregt, L.A.J.M., Ferns, M., Kieviet, E., van Rossenberg, S.M.W., van Berkel, T.J.C. and Biessen, E.A.I. (2001). Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Biol. Chem.* 276, 37577-37584.

Sagara, K. and Kim, S.W. (2002). A New Synthesis of Galactose-Poly(ethylene glycol)-Polyethylenimine for Gene Delivery to Hepatocytes. *J. Control. Rel.* 79, 271-281.

40

Sarkar, M., Liao, J., Kabat, E.A., Tanabe, T. and Ashwell, G. (1979) Binding-Site of Rabbit Hepatic Lectin. *J. Biol. Chem.* 254, 3170-3174.

Scherer, L.J. and Rossi, J.J. (2003a) Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotech.* 21, 1457-1465.

【 0 2 7 8】

【化 1 1 4】

Scherer, L.J. and Rossi, J.J. (2003b) Recent Applications of RNAi in Mammalian Systems. In: During, H., ed., *Peptide Nucleic Acids, Morpholinos, and Related Antisense Biomolecules*, Landes Bioscience.

Scherr, M., Morgan, M.A. and Eder, M. (2003) Gene Silencing Mediated by Small Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Curr. Med. Chem.* 10, 245-256.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B. and Zamore, P.D. (2002) Evidence that siRNAs function as guides, not primers in the Drosophila and human RNAi pathways. *Mol. Cell* 10, 537-548. 10

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.

Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P.S., Paddison, P.J., Hannon, G.J. and Cleary, M.A. (2005) Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat. Biotech.* 23, 227-231. 20

Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P. and Lieberman, J. (2003). RNA Interference Targeting FAS Protects Mice from Fulminant Hepatitis. *Nat. Med.* 9, 347-351.

Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotellansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. and Vornlocher, H.-P. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178. 30

Tanaka, T., Shiramoto, S., Miyashita, M., Fujishima, Y. and Kaneo, Y. (2004) Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). *Int. J. Pharm.* 277, 39-61. 40

Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. and Zamore, P.D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377-1380.

Westerlind, U., Westman, J., Törnquist, Smith, C.I.E., Oscarson, S., Lahmann, M. and Norberg, T. (2004). Ligands of the asialoglycoprotein receptor

【 0 2 7 9】

【化 1 1 5】

for targeted gene delivery, part 1: Synthesis of and binding studies with biotinylated cluster glycosides containing N-acetylgalactosamine. *Glycoconjugate J.* 21, 227-241.

Wilson, J.A., Jayasena, S., Khvorova, A., Sabatino, S., Rodrigue-Gervais, I.G., Arya, S., Sarangi, F., Harris-Brandts, M., Beaulieu, S. and Richardson, C.D. (2003) RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100, 2783-2788.

10

Yant, S.R., Meuse, L., Chiu, W., Ivics, Z., Izsvak, Z. and Kay, M.A. (2000). Somatic Integration and Long-term Transgene Expression in Normal and Hemophilic Mice Using a DNA Transposon System. *Nat. Genet.* 25, 35-41.

Yen, Y. (2003) Ribonucleotide Reductase Subunit One as Gene Therapy Target. *Clin. Cancer Res.* 9, 4304-4308.

20

Zamore, P.D. (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat. Struct. Biol.* 8, 746-750.

Zhang, G.F., Budker, V. and Wolff, J.A. (1999). High Levels of Foreign Gene Expression in Hepatocytes after Tail Vein Injections of Naked Plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* 10, 1735-1737.

Zuber, G., Dauty, E., Nothisen, M., Belguise, P. and Behr, J.P. (2001). Towards Synthetic Viruses. *Adv. Drug Del. Rev.* 52, 245-253.

30

当業者は、本明細書に記載した本発明の特定の実施形態の多くの等価物を、日常の実験を超えることなく、認識又は確認することができるはずである。このような等価物は後述する請求項により包含されることを意図している。

【0 2 8 0】

上記引用した参考文献及び公開物の全ては、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0 2 8 1】

【図 1】図 1 はヒトリボヌクレオチドレダクターゼ M 2 に関する c D N A 配列を示す (G e n B a n k 受託番号 N M _ 0 0 1 0 3 4) (配列番号 1) 。下線を付した太字の 3 つの 1 1 塩基ストレッチは配列番号 4 ~ 6 により示されるコア標的配列に相当する。

40

【図 2】図 2 はマイコバクテリウム・ツベルクロシス H 3 7 R v のリボヌクレオチドレダクターゼ小型サブユニット (図 2 A) (配列番号 2) 及びヒトヘルペスウィルス 4 のリボヌクレオチドレダクターゼ小型サブユニット (図 2 B) (配列番号 3) に関する c D N A 配列を示す。

【図 3】図 3 は正常ヒト肝臓組織 (図 3 A) 及び肝細胞癌 (H C C) 組織 (図 3 B) における R 2 の免疫組織化学的染色を示す。画像は 4 0 0 X の倍率で撮影した。R 2 発現は H C C 肝臓組織においては検出可能にアップレギュレートされていた。新しく切除されたヒト H C C 組織を 4 % パラホルムアルデヒド中に固定し、パラフィン包埋し、そして 2 ~ 5 μ m 切片を切り出した。脱パラフィンし、等級付けされたアルコールを介して再水和した

50

後、スライドをマイクロ波抗原回復（抗原脱マスクング溶液；Vector Laboratories, Burlingame, CA）に付し、そしてマウスIgM（1：400希釈、Vector Laboratories）を用いながらマウス抗ヒト抗RRM2抗体（1：400希釈、Covance, Philadelphia, PA）及び二次抗体で標識した。画像は冷却した電荷結合デバイスカメラ（MagnaFire；Olympus, Melville, NY）を用いてキャプチャーし、そしてTIFFファイルとしてAdobe Photoshop（Adobe Systems, Mountain View, CA）にインポートし、そしてXerox Phaser 860DPプリンター上に印刷した。ヘマトキシリン及びエオシン（H&E）染色は標準的なプロトコルを用いて実施した。

10

【図4】図4はR2をターゲティングするsiRNAの設計を示す。ヒトR2（hRRM2）mRNA内の標的部位の位置は本出願による新規な標的部位に関してはA、B及びCで、そして公開されている標的部位に関してはX、Y及びZで標記する。

【図5】図5はR2標的に対するsiRNAの結合を試験するゲルシフト試験を示す。レーン3、4及び5は図4に示す通り、それぞれ領域A、B及びCに対するsiRNA標的を用いたR2のゲルシフトを示す。使用したsiRNAの配列は配列番号7及び8（標的部位A）、配列番号9及び10（標的部位B）及び配列番号11及び12（標的部位C）とした。部位AにターゲティングされたsiRNAデュプレックスは強力な結合（レーン3）を示していた。

【図6】図6A及び6BはsiRNAの細胞内力価（図6A）が標的に対するそれらの結合親和性（図6B）に相関することを示している。図6CはEGFPをターゲティングしている種々のsiRNAを示す。

20

【図7】図7は本出願の特定のsiRNAによる種々の細胞系統におけるR2のダウンレギュレーションを示す。図7Aは記載した種々のsiRNAを投与したHeLa細胞由来のhRRM2蛋白のレベルのウェスタンブロットを示す。図7BはA、B及びC部位にターゲティングされたsiRNA、対照siRNA及びhRRM2に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドでトランスフェクトされた種々の細胞型由来の溶解物を用いたウェスタンブロット実験の結果を示す。

【図8】図8はR2に対するsiRNAのスクリーニングのためのR2ルシフェラーゼ融合コンストラクト（「pR2Lucプラスミド」）を示す。細胞はpR2LucプラスミドとR2に対するsiRNAで同時トランスフェクトしてよい。ルシフェラーゼレベルの定量はR2発現のダウンレギュレーションと相関していた。

30

【図9】図9はタイリング実験の結果を示す。図9A、9B及び9Cはそれぞれ標的部位A、B及びCにおいて実施されたタイリング実験の結果を示す。各標的部位に関し、3つの元来発見されている標的部位の各々に隣接（＋又は－）する8つ以上の異なる21量体の配列を合成し、そして3用量の各々（10nM、1nM及び0.2nM）において比較した。図9Dはタイリング実験の実験設計を示す。

【図10】図10はタイリング実験におけるpR2Lucの使用が高度に強力なsiRNAの発見をもたらしたことを示している。siRRM2A、siRRM2B、siRRM2Cはそれぞれ標的部位A（配列番号7及び8を有する）、標的部位B（配列番号9及び10を有する）及び標的部位C（配列番号11及び12を有する）に対して指向されたsiRNAであり；siRRM2B+3及びsiRRM2B+5は元の部位B siRNAデュプレックスと比較した場合に増大した力価を有する標的部位Bからタイリングされたデュプレックスであり；GTI-2040はR2に対してターゲティングされたアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドであり；si（GTI-2040）はGTI-2040アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドと同様の部位にターゲティングされたsiRNAであり；si（JBC, 2004）はR2に対する以前に公開されたsiRNAである。

40

【図11】図11は標的部位Bの周囲（タイリングB+3～B+10）のデュプレックスを用いた追加的タイリング実験の結果を示す。B+5デュプレックスは検討対象として最も強力なデュプレックスのままであり続け、そしてB+9デュプレックスは二番目に強力

50

なデュプレックスとして出現した。

【図12】図12は21量体及び27量体のRNAによるR2-ルシフェラーゼ融合蛋白の用量依存的ダウンレギュレーションを示す。

【図13】図13はR2-ルシフェラーゼ融合のsiRNA誘導ダウンレギュレーションが内因性R2のダウンレギュレーションに相関することを示している。siRRM2B+5デュプレックスはpRLucを用いた同時トランスフェクション試験において高度に強力であるものとして発見された。図に示される通り、Hep3B細胞におけるsiRRM2B+5デュプレックス単独のトランスフェクションはトランスフェクション後1日、2日及び3日において、内因性R2の配列特異的ノックダウンをもたらした。細胞をsiRRM2B+5又はsiCON1 (Dharmaconの非ターゲティング対照デュプレックス#1) 20nMでトランスフェクトした。

10

【図14】図14はR2に対するsiRNAがリポフェクションされた細胞のアポトーシスを誘導することを示している。培養されたヒトHCC細胞 (HepG2) をR2に対するsiRNA (siRRM2B+5) 又は非ターゲティング対照siRNA (siCON1) でトランスフェクトし、次にトランスフェクションの1、2又は3日後にアポトーシスについて分析した。

【図15】図15はR2に対するsiRNAがヒトHCC細胞の薬剤誘導アポトーシスを増強することを示している。培養されたヒトHCC細胞 (HepG2) をR2に対するsiRNA (siRRM2B+5) 又は非ターゲティング対照siRNA (siCON1) でトランスフェクトし、その後、3日間アドリアマイシン (100nM) を投与した。次にアポトーシスのレベルを測定した。

20

【図16】図16はR2に対するsiRNAがインビボのR2発現を低減することを示している。R2-ルシフェラーゼ融合遺伝子をコードするプラスミド (pRLuc) をBALB/cマウスにおいてR2に対するsiRNA (siRRM2B+5) 又は非ターゲティング対照siRNA (siCON1) と同時注射した。融合遺伝子発現は全動物バイオルミネセンス画像化により追跡した。図16Aは17日間に渡る融合遺伝子発現の総括的プロットを示す。図16Bは注射後2日において撮影された代表的画像を示す。

【図17】図17はR2に対するsiRNA (siR2B+5) が培養ヒトHCC細胞 (Hep3B細胞) の成長能力を低減することを示している。ヒト肝細胞癌 (HCC) の細胞 (Hep3B) を希釈しながらプレーティングし、そして次に非ターゲティング対照siRNA (siCON1) 又はR2に対するsiRNA (siR2B+5) (5nM) でトランスフェクトする。トランスフェクションの5日後、細胞を固定し、染色 (メチレンブルー) し、そしてコロニー (50以上の細胞) を計数する。記載する通り、R2に対するsiRNA (siR2B+5) は非ターゲティング対照siRNA (siCON1) と比較してHep3B細胞のコロニー形成能力を有意に低減する。コラムはn=3連のウェルの平均を示し；エラーバーは標準偏差を示す。

30

【図18】図18はR2に対するsiRNAの力価は培養ヒトHCC細胞 (Hep3B細胞) の成長能力を低減する能力と相関していることを示している。ヒト肝細胞癌 (HCC) の細胞 (Hep3B) を希釈しながらプレーティングし、そして次にR2に対して種々の力価を有することが予めわかっている5種のsiRNA (siR2B+3、siR2B+5、siR2B+6、siR2B+7、siR2B+9) (5nM) の1つでトランスフェクトした (例えば図11参照)。トランスフェクションの5日後、細胞を固定し、染色 (メチレンブルー) し、そしてコロニー (50以上の細胞) を計数する。記載する通り、コロニー形成を低減するsiRNAの能力 (本図) はR2のダウンレギュレーションに関するその力価に強力に相関しており (図11参照)、例えばsiR2B+3、siR2B+5、siR2B+9 >> siR2B+6、siR2B+7であった。コラムはn=3連のウェルの平均を示し；エラーバーは標準偏差を示す。

40

【図19】図19はR2に対するsiRNA (siR2B+5) によるHep3B細胞の成育能力の低減が5-フルオロウラシル (5-FU) 曝露により増強されることを示している。ヒト肝細胞癌 (HCC) の細胞 (Hep3B) を希釈しながらプレーティングし、

50

そして次に (1) 4 時間ルシフェラーゼターゲットイング s i R N A (L u c 1 0 5 - 2 1) 又は R 2 に対する s i R N A (s i R 2 B + 5) (5 n M) でトランスフェクト、及び / 又は (2) トランスフェクション後 4 8 時間から開始して 3 日間 5 m M の 5 - フルオロウラシル (5 - F U) に曝露する。トランスフェクションの 5 日後、細胞を固定し、染色 (メチレンブルー) し、そしてコロニー (- 5 0 以上の細胞) を計数する。前に観察された通り、s i R 2 B + 5 は非 R 2 ターゲティング対照と比較してコロニー数を低減している (今回 L u c 1 0 5 - 2 1) 。 5 - F U 単独 (s i R N A 曝露を伴わない) は未投与細胞と比較してコロニー数を低減し、そして s i R 2 B + 5 投与後の 5 - F U 曝露は更にコロニー数を低減する。コラムは n = 3 連のウエルの平均を示し; エラーバーは標準偏差を示す。

10

【図 2 0】図 2 0 は R 2 に対する s i R N A がマウスにおいて皮下 H e p 3 B 腫瘍内の R 2 蛋白レベルを低下させることを示している。皮下ヒト肝細胞癌 (H e p 3 B) 腫瘍を有するマウスに重合体系の送達系内において 2 . 5 m g / k g の s i R N A (非ターゲット対照 s i R N A (s i C O N 1) 又は R 2 に対する s i R N A (s i R 2 B + 5) の何れか) を 3 回連続で毎日腫瘍内 (I T) に注射する。3 回目の注射の 2 日後、マウスを屠殺し、腫瘍を固定し、パラフィン包埋し、切片化し、そして免疫組織化学的 (I H C) に操作して腫瘍 R 2 蛋白レベルを試験する。R 2 に対する s i R N A を含有する製剤を投与されたマウス 3 匹中 2 匹において、腫瘍 R 2 蛋白レベルは、非ターゲット対照 s i R N A を投与したマウスの場合と比較して急激に低下する。このことは、s i R 2 B + 5 を含有する製剤の 3 回連続毎日腫瘍内注射はこれ等の腫瘍内において R 2 蛋白のダウレギュレーションを達成することを示唆している。採点は以下の尺度、即ち、+ = 低 R 2 蛋白レベル、++ = 中等度 R 2 蛋白レベル、及び +++ = 高 R 2 蛋白レベルを用いて実施した。

20

【図 2 1】図 2 1 は R 2 に対する s i R N A が培養ラットヘパトーマ細胞 (M c A - R H 7 7 7 7) における R 2 蛋白レベルを低下させることを示している。ラットヘパトーマ細胞 (M c A - R H 7 7 7 7) をプレーティングし、次に R 2 に対するアンチセンス分子 (G T I - 2 0 4 0 ; 1 n M 又は 2 0 n M) 、ルシフェラーゼに対する s i R N A (L u c 1 0 5 - 2 1 ; 2 0 m M のみ) 、R 2 に対する 2 1 量体の s i R N A (s i R 2 B + 5 ; 1 n M 又は 2 0 n M) 又は R 2 に対する 2 5 / 2 7 量体 (s i R 2 B + 5 - 2 7 ; 1 n M 又は 2 0 n M) でトランスフェクトする。トランスフェクション後 4 8 時間において、細胞を溶解し、R 2 蛋白レベルをウェスタンブロットで測定し、I m a g e Q u a n t ソフトウェアを用いて定量する。R 2 に指向された全ての分子 (G T I - 2 0 4 0 アンチセンス、s i R 2 B + 5 の 2 1 量体及び 2 5 / 2 7 量体) は陰性対照 (L u c 1 0 5 - 2 1 、ルシフェラーゼに対する s i R N A) の場合よりも優れた R 2 蛋白レベルの用量依存的低下を示す。s i R 2 B + 5 の 2 1 量体及び 2 5 / 2 7 量体からの R 2 の低下は相互に同等であり、そして G T I - 2 0 4 0 アンチセンス分子で観察されたものより優れている。

30

【図 2 2】図 2 2 は肝細胞への送達のためのモデル粒子を製造するための方法の模式図である。ガラクトース- P E G 化合物の存在又は非存在によりガラクトース含有又は単に P E G 化されたビーズがそれぞれ形成される。

【図 2 3】図 2 3 は s i R N A の送達の為に製造された粒子の動的光散乱 (D L S) による粒径分布を示す。図 2 3 (a) はモデルビーズ G a l - 5 0 に関する粒径分布を示す。図 2 3 (b) は線状シクロデキストリン含有ポリカチオン及びガラクトース含有 P E G 系モディファイアーを用いた自己組立により形成された製剤化 s i R N A 粒子に関する粒径分布を示す。

40

【図 2 4】図 2 4 は注射後 2 0 分にマウス尾静脈を介して注入した G a l - 5 0 、 M e O - 5 0 、 G a l - 1 4 0 及び M e O - 1 4 0 粒子の肝取り込みを示す。

【図 2 5】図 2 5 は種々の粒径の粒子の尾静脈注射に付されたマウスに由来する肝切片を示す。左側パネルは G a l - 1 4 0 ビーズ (直径 1 4 0 n m) は大部分が肝臓切片には非存在であることを示している (図 2 5 A) 。右側パネルは G a l - 5 0 ビーズ (直径 5 0 n m) は肝臓切片に存在していることを示している (図 2 5 B) 。

50

【図 26】図 26 は Gal-140 粒子が Kupfer 細胞内に位置し、肝細胞内部には到達しないことを示している TEM 画像である。

【図 27】図 27 は im-CDP (イミダゾール含有 CDP) を生成するための CDP 末端基官能性付与の模式図である。

【図 28】図 28 は毒性に対するポリカチオンの疎水性の影響を示す。図示される AP5 のシクロデキストリン成分が細胞毒性を低減している。

【図 29】図 29 はインビトロの細胞への siRNA 送達のための送達ビヒクルとしての im-CDP を示す。培養されたヒトユーイング肉腫 (TC-71) 細胞を 4 時間オリゴフェクタミン (OFA) 又はシクロデキストリン含有ポリカチオン (im-CDP) を用いて作成した siEFBP2 含有製剤 (EWS-FLI1 融合蛋白をターゲティングするための配列) に曝露した。感染の 48 時間後、細胞を溶解し、全細胞蛋白を変性し、電気泳動に付し、そして PVDF メンブレンに転移させ、これを EWS-FLI1 又はアクチンに対する抗体でプロービングし、そしてウェスタンブロット分析による定量を行った。平均バンド強度は密度測定により求め、そして EWS-FLI1 のアクチンに対する強度の比を計算した。siEFBP2 mut は陰性対照として使用したスクランブルド siEFBP2 siRNA である。

【図 30】図 30 は CDP/pDNA (パネル a、c 及び d) 又は im-CDP/pDNA (パネル b、e 及び f) のポリプレックスに曝露した BHK 細胞の TEM 画像である。

(a) 及び (b) において、細胞内小胞は細胞膜に接近し、低 pH ではない。(c~f) においては、小胞は核膜の近傍にあり、f に近似した pH 値にある。(e) 及び (f) においては、複合体脱パッケージングが観察されるのに対し、(c) 及び (d) においては観察されない。

【図 31】図 31 はシクロデキストリン含有ポリプレックス表面改変 (例えば PEG 化又はターゲティング) 及びアダマンタン (AD)-PEG コンジュゲート及び β -シクロデキストリンを用いた封入複合体形成の模式図である。図 31 A はシクロデキストリン含有ポリプレックス表面改変の模式図を示す。図 31 B はアダマンタン (AD)-PEG コンジュゲート (系の第 2 の成分) 及び β -シクロデキストリンを用いた封入複合体形成の模式図である。リガンド (L) は細胞表面受容体との相互作用に供する。改変された粒子は明確に識別され、インビトロのトランスフェクション並びにインビボの試験の為に使用される条件に対して安定である。

【図 32】図 32 は図 31 に示した成分の改変の例を示す。グルコースモディファイアーをガラクトースターゲティング試験のための対照として使用する。

【図 33】図 33 は 50 mM 塩溶液中のポリプレックス粒子の安定化を示す。完全な安定化は AD-PEG 5K (PEG 5K は分子量 5000 の PEG を意味する) を用いた場合に達成される。PEG 5K の添加 (対照) は如何なる安定化ももたらさない。粒径の増大は粒子の再構造化に起因するものではなく、むしろ 60 nm 原料粒子の凝集である (TEM 画像により確認)。

【図 34】図 34 はプラスミド DNA (pDNA) の添加前に CDP と AD-PEG 5000 (AD-PEG 5K) を組み合わせることにより形成される粒子の粒径を示す。粒子は PBS 中に希釈された 1 mg DNA/mL において製剤した。1000 倍超の希釈度による 150 mM 塩中の完全な安定化は AD-PEG 5K を用いた場合に達成される。

【図 35】図 35 は記載した種々のポリプレックスを用いたルシフェラーゼ遺伝子の送達を示す。(a) 表面アシアロ糖蛋白 (ASGP) 受容体を含有する HepG2 細胞。(b) 表面受容体を含有しない HELA 細胞。細胞の取り込みは表面受容体を介して媒介され得る。

【図 36】図 36 は改変剤においてアニオン性のセグメントを使用することによる粒子上のチューニング可能な表面電荷の例を示す。100% AD-アニオン性 PEG は系におけるアダマンタン (AD) のシクロデキストリン (CD) に対する 1:1 モル比を示す。

【図 37】図 37 はポリプレックス粒子の自己組立の模式図である。

【図 38】図 38 は 1 時間後の種々のポリプレックス粒子の培地 (A) 又は 100% FB

10

20

30

40

50

S (B) 中の濁度試験を示す。未 PEG 化ポリプレックスが凝集するのに対し、PEG 化ポリプレックスは製剤時又は未結合成分除去後に凝集しない。

【図 39】図 39 は完全に製剤された粒子が補体系を活性化しないことを示す。CDPP EGTf は 3.18 又は 5.3 (+/-) の何れかの電荷比を有する完全に製剤された粒子を指す。

【図 40】図 40 は CD P が培養中の細胞に siRNA を送達することを示す。図 40 A は HeLa 細胞におけるネイキッド及び CD P 製剤の FITC 標識 siRNA の FACS 分析を示す (100 nM の siRNA を 2 時間 HeLa 細胞に曝露した)。図 40 B は HeLa 細胞における FITC 標識 siRNA の CD P 送達の共焦点画像を示す (100 nM の siRNA を 4 時間 HeLa 細胞に曝露した)。

10

【図 41】図 41 は高圧尾静脈注射 (HPTV; 2 mL 容量を注射) 又は低圧尾静脈注射 (LPTV; 0.2 mL 容量を注射) による異なる送達製剤中の siRNA 50 µg を注射した BALB/c マウスから得られた定量的 RT-PCR の結果を比較したものである。

【図 42】図 42 は siRNA の送達のためのトランスフェリン (Tf) - ターゲティング粒子の組立を示す。図 42 A は送達系の成分を示す。図 42 B は未ターゲティング及びターゲティングされた粒子の組立を示す。

【図 43】図 43 はトランスフェリン (Tf) - 含有粒子によるルシフェラーゼに対抗した siRNA の送達を示す。

【図 44】図 44 は記載した種々の投与に付した NOD/scid マウスにおける移植された腫瘍の成長曲線を示す。各投与群 [n = 8 ~ 10] に関するメジアン積分腫瘍バイオルミネセントシグナル (光子/秒) を注射後の時間に対してプロットしている (全て 50 µg siRNA において)。群: (A) 対照 D5W、(B) ネイキッド siEFBP2、(C) 対照配列を用いて完全に製剤 (CON#1)、(D) siEFBP2 を用いて完全に製剤、及び (E) siEFBP2 を用いてトランスフェリンリガンドは使用せずに製剤。

20

【図 45】図 45 は siRNA による Tf 含有粒子 (左側パネル) における腫瘍成長の阻害及び siRNA による標的 mRNA の配列特異的阻害を示す。図 45 A は Tf 含有粒子における EWS-FLI1 に関する 50 µg siRNA の 3 回毎日注射 (第 34 日、35 日、36 日) を用いた樹立 TC-71 腫瘍を用いた腫瘍成長の阻害を示す。図 45 B は EWS-FLI1-mRNA の配列特異的阻害を示す 2 回毎日注射後の腫瘍から得られた PCR データを示す。

30

【図 5】

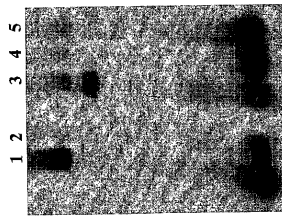


FIGURE 5

【図 7】

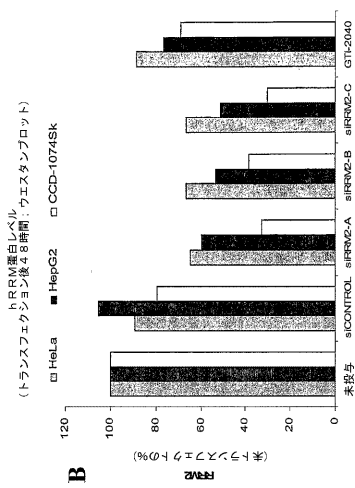


FIGURE 7



- 1: 未トランスフェクト
- 2: siCONTROL
- 3: siRRM2-A
- 4: siRRM2-B
- 5: siRRM2-C
- 6: GTI-2040

【図 6】

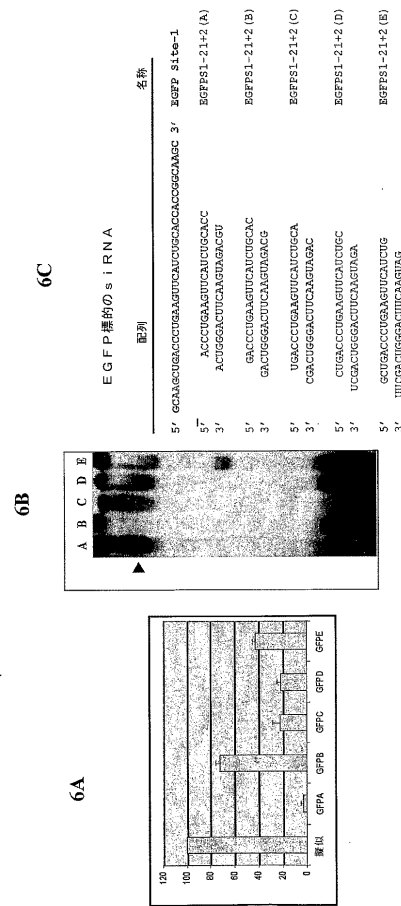


FIGURE 6

【図 8】

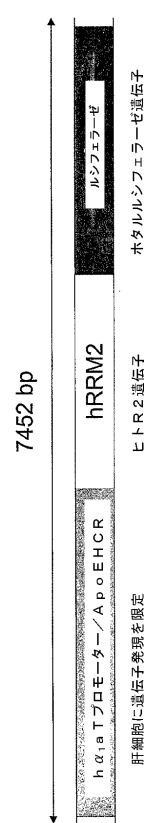


FIGURE 8

【図 9】

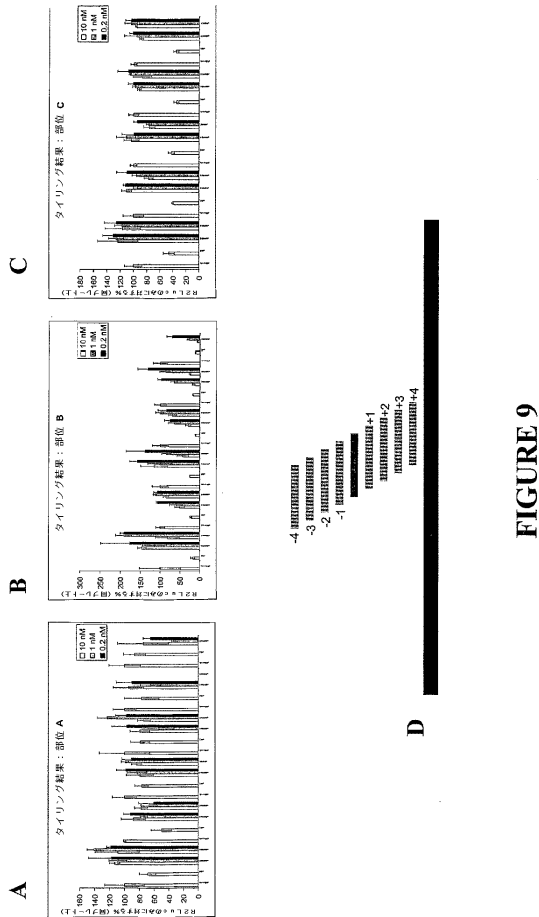


FIGURE 9

【図 10】

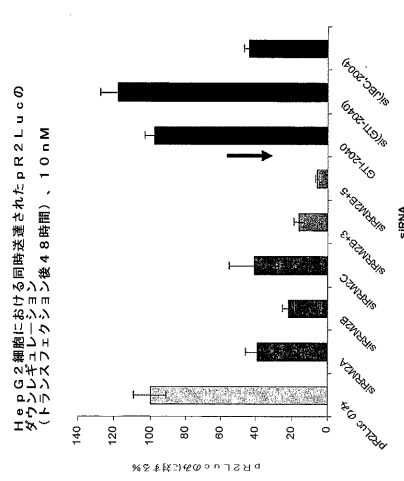


FIGURE 10

【図 11】

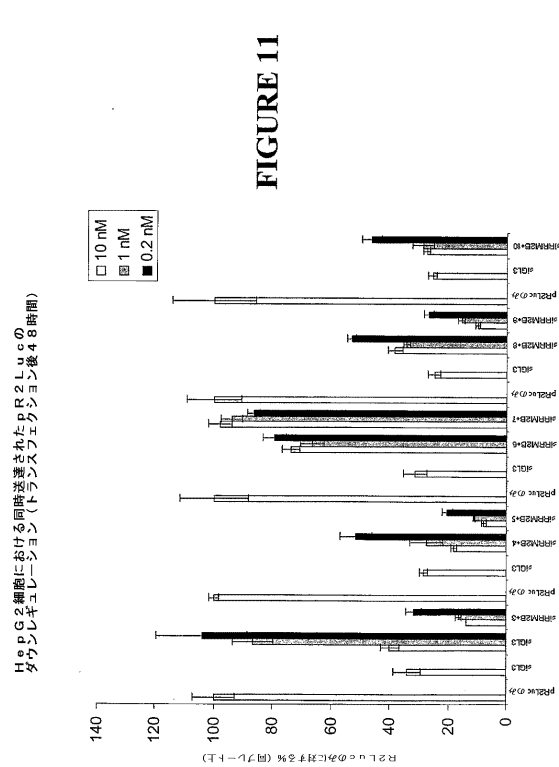


FIGURE 11

【図 12】

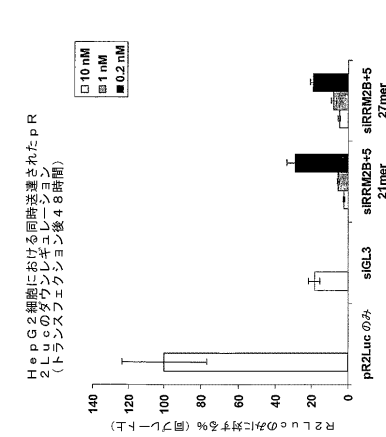


FIGURE 12

【図 13】

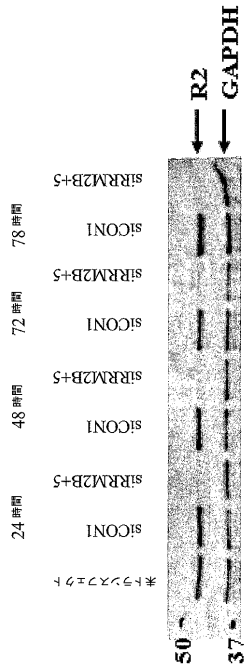


FIGURE 13

【図 15】

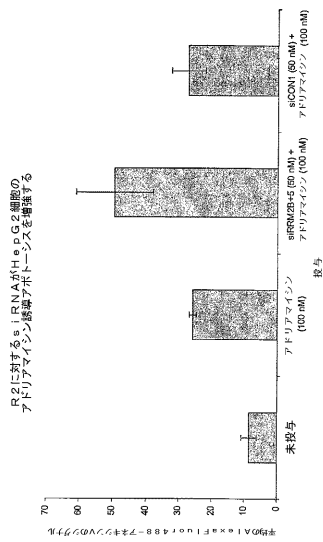


FIGURE 15

【図 14】

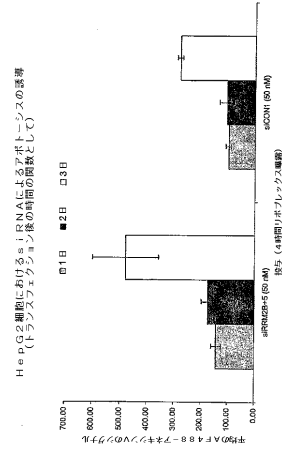


FIGURE 14

【図 16】

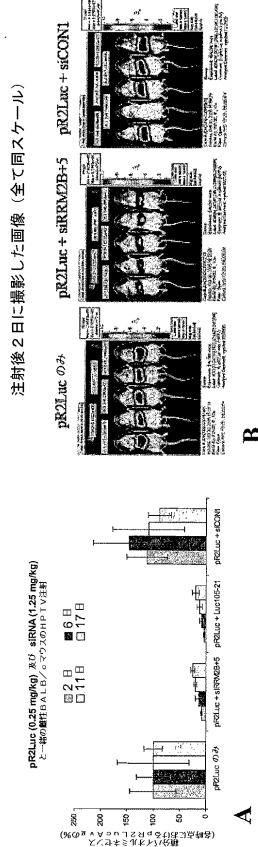


FIGURE 16

【図 17】

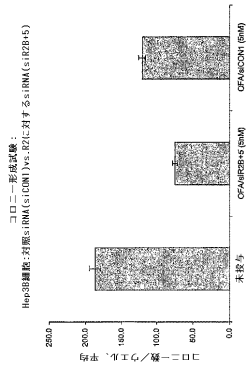


FIGURE 17

【図 18】

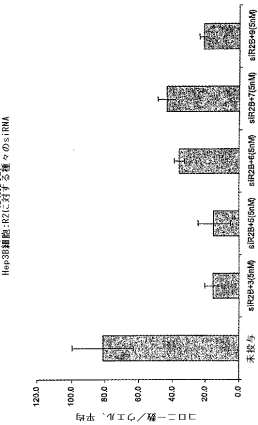


FIGURE 18

【図 19】

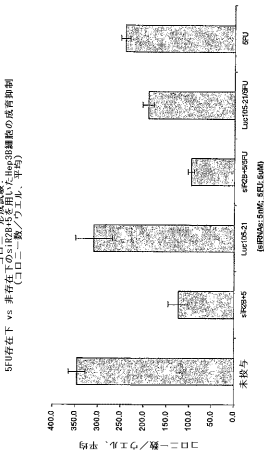


FIGURE 19

【図 20】

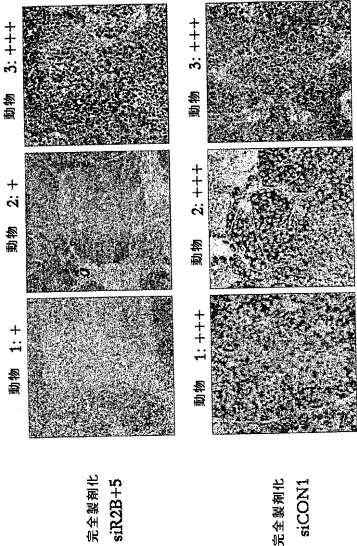


FIGURE 20

【図 2 1】

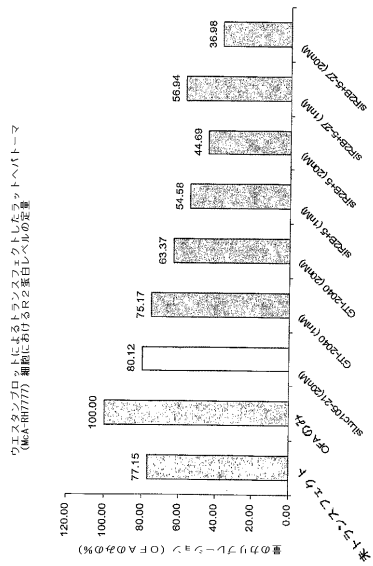


FIGURE 21

【図 2 2】

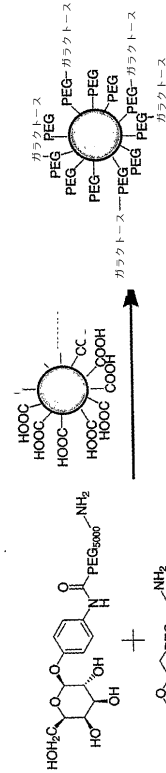


FIGURE 22

【图 2 3】

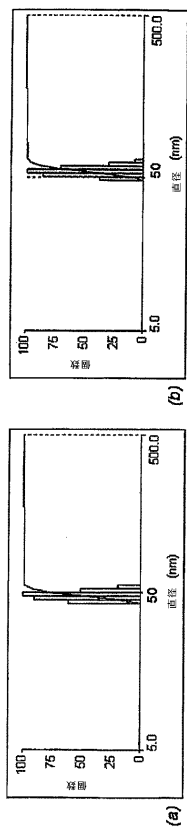


FIGURE 23

【図 24】

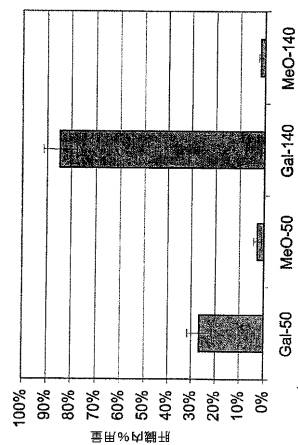


FIGURE 24

【図 25】

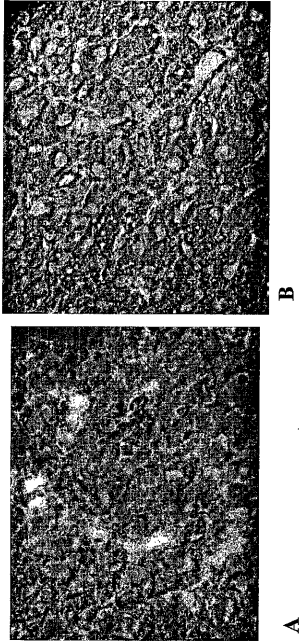


FIGURE 25

【図 26】

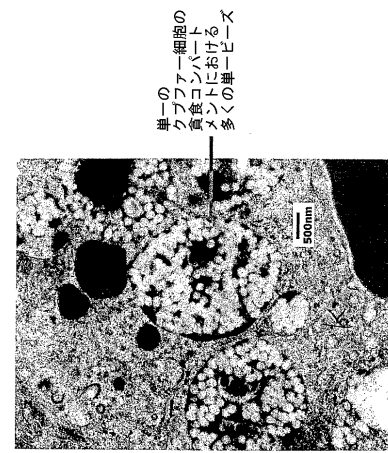


FIGURE 26

【図 27】

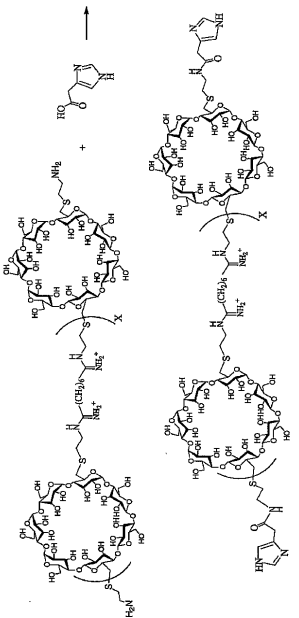


FIGURE 27

【図 28】

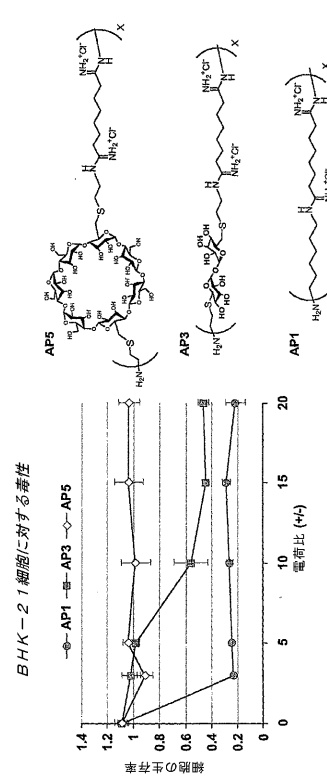


FIGURE 28

【図 3 3】

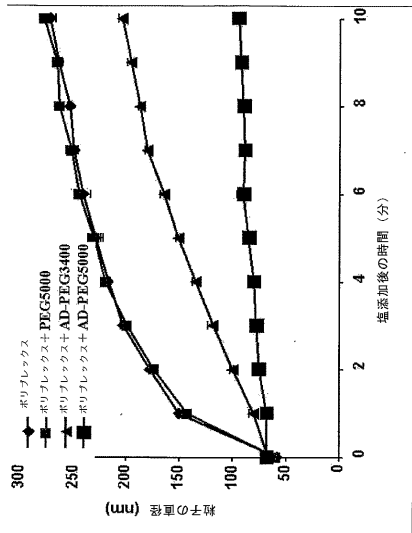


FIGURE 33

【図 3 4】

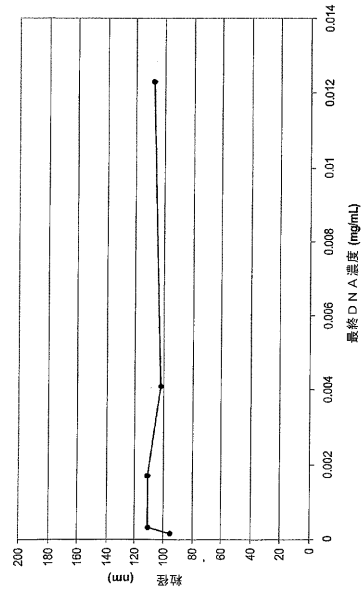


FIGURE 34

【図 3 5】

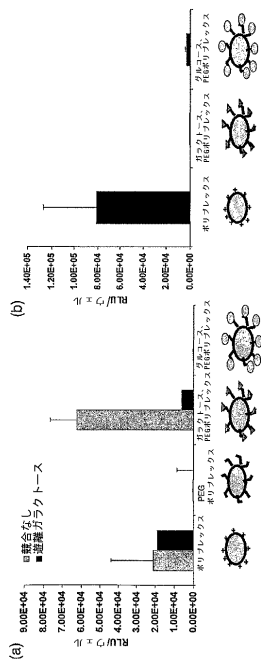


FIGURE 35

【図 3 6】

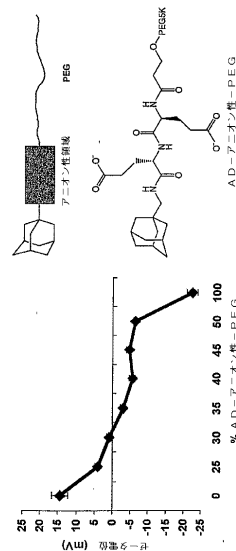


FIGURE 36

【図 37】

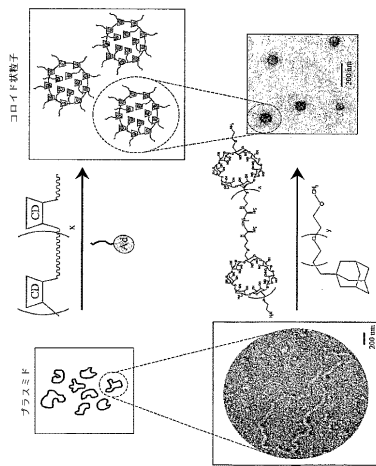


FIGURE 37

【図 38】

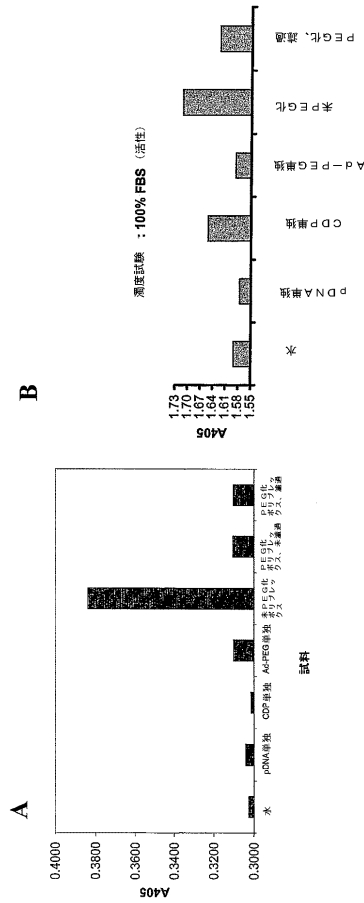


FIGURE 38

【図 39】

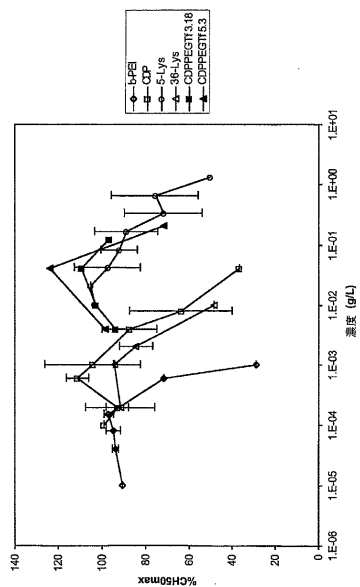


FIGURE 39

【図 40】

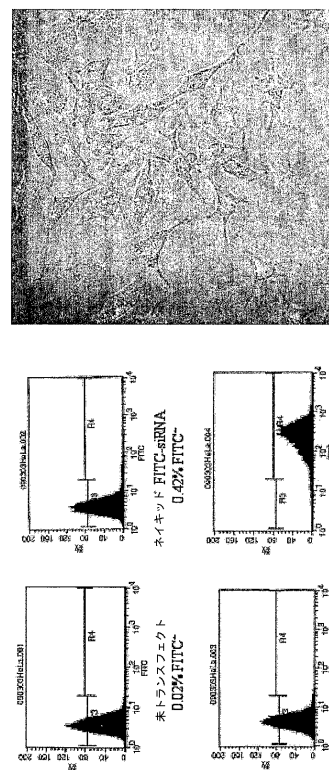


FIGURE 40

【図 4 1】

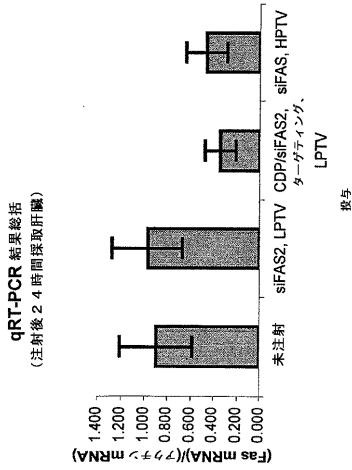


FIGURE 41

【図 4 2】

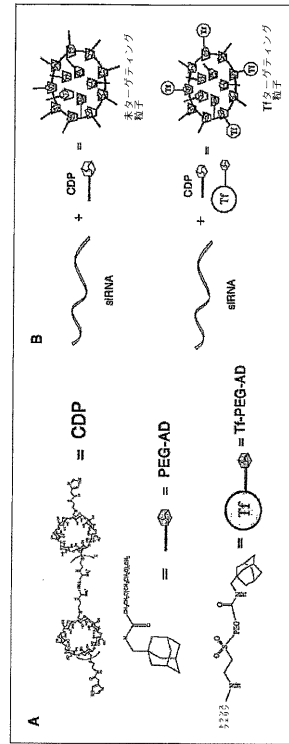


FIGURE 42

【図 4 3】

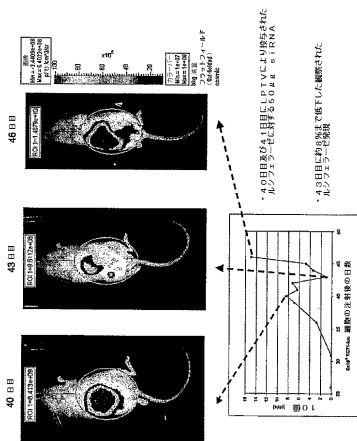


FIGURE 43

【図 4 4】

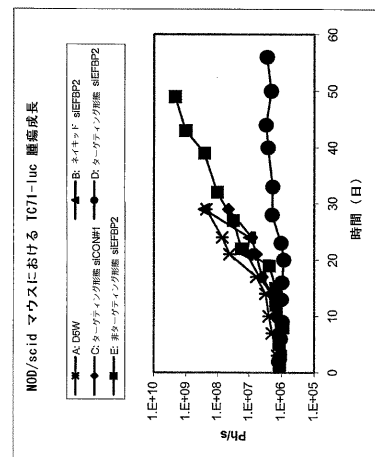


FIGURE 44

【図 45】

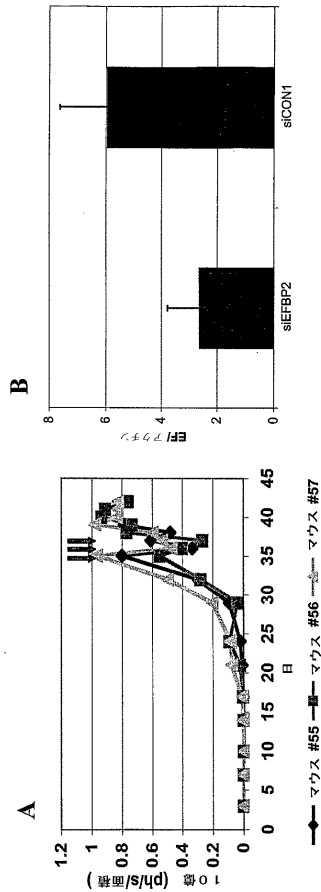


FIGURE 45

【手続補正書】

【提出日】平成19年12月19日(2007.12.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2008537551000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/011812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/11		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 12 August 2002 (2002-08-12), XP002407222 retrieved from EBI Database accession no. BQ670934 the whole document	15-24, 34,36,37
X	DATABASE EMBL 9 March 2002 (2002-03-09), KIM ET AL: XP002407223 retrieved from EBI Database accession no. BM754277 the whole document	15-24, 34,36,37
X	WO 02/24864 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; MONIA BRETT P [US]; FREIER SUSAN M [US]) 28 March 2002 (2002-03-28) sequence 129	15-24, 34,36,37
-/-		
☒ 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 24 November 2006		Date of mailing of the international search report 09.02.2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Hoff, Céline

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/011812

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIN Z PING ET AL: "Stable suppression of the R2 subunit of ribonucleotide reductase by R2-targeted short interference RNA sensitizes p53(-/-) HCT-116 colon cancer cells to DNA-damaging agents and ribonucleotide reductase inhibitors" 25 June 2004 (2004-06-25), JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 279, NR. 26, PAGE(S) 27030-27038, XP002407218 ISSN: 0021-9258	1-75,81
A	DUXBURY MARK S ET AL: "RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine." 26 February 2004 (2004-02-26), ONCOGENE. 26 FEB 2004, VOL. 23, NR. 8, PAGE(S) 1539 - 1548, XP002407219 ISSN: 0950-9232	1-75,81
A	DUXBURY M S ET AL: "Retrovirally mediated RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase: A novel therapeutic strategy in pancreatic cancer" SURGERY, C.V. MOSBY CO., ST. LOUIS,, US, vol. 136, no. 2, August 2004 (2004-08), pages 261-269, XP004541864 ISSN: 0039-6060 the whole document	1-75,81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/011812

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0224864	A2	28-03-2002	AU	9279001 A	02-04-2002
			EP	1327002 A2	16-07-2003
			US	6503756 B1	07-01-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/011812**Box 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.: 1-75 (all partially), 81 (partially) 76-80, 82-84
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 60-75 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

see additional 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:
1-75, 81 (all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /011812

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-75, 81 (all partially)

It relates to a nucleic acid as disclosed in claim 1 comprising seq ID NO:4, a pharmaceutical compound comprising said nucleic acid and the therapeutical use of said nucleic acid.

2. claims: 1-75, 81 (all partially)

It relates to a nucleic acid as disclosed in claim 1 comprising seq ID NO:5, a pharmaceutical compound comprising said nucleic acid and the therapeutical use of said nucleic acid.

3. claims: 1-75, 81 (all partially)

It relates to a nucleic acid as disclosed in claim 1 comprising seq ID NO:6, a pharmaceutical compound comprising said nucleic acid and the therapeutical use of said nucleic acid.

4. claims: 76-80, 82-84

it relates to a liver specific pharamceutical composition and the therapeutical use of said pharmaceutical composition.

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 K	47/06	(2006.01)	A 6 1 K 47/06
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K	47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/10
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
			C 1 2 N 15/00 A

(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,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,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,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 デイビス, マーク イー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 1 0 5, パサディナ, ラグナ ロード 5 7 5

(72)発明者 ハイデル, ジェレミー ディー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 1 0 7, パサディナ, ブランチ ストリート 1 1 5 5

(72)発明者 ルージ, ジョン ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 7 3 7, アルタローマ, ブライドル プレイス 5 0 4 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11 DA02 GA11 HA17

4C076 AA65 BB13 BB14 CC26 CC27 DD67 EE39 EE41 FF68

4C084 AA13 AA19 MA05 MA65 NA14 ZA752 ZB262 ZC751

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA03 MA05 MA65 NA14 ZA75

ZB26