

(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2021-534101

(P2021-534101A)

(43) 公表日 令和3年12月9日 (2021. 12. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)	A 6 1 K 31/7115	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	4 C 0 8 7
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 248 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2021-506632 (P2021-506632)	(71) 出願人	520505386
(86) (22) 出願日	令和1年8月9日 (2019. 8. 9)		ヴェルソー セラピューティクス, イン
(85) 翻訳文提出日	令和3年3月23日 (2021. 3. 23)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/045841		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01
(87) 国際公開番号	W02020/033791		730, ベッドフォード, ウィギンス
(87) 国際公開日	令和2年2月13日 (2020. 2. 13)		アベニュー 47
(31) 優先権主張番号	62/716, 671	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成30年8月9日 (2018. 8. 9)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

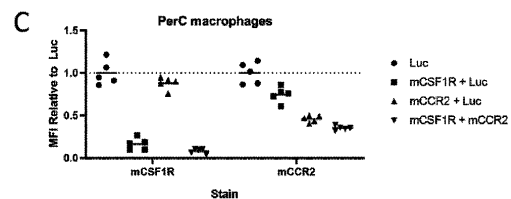
(54) 【発明の名称】 C C R 2 及び C S F 1 R を標的とするためのオリゴヌクレオチド組成物ならびにその使用

(57) 【要約】

本発明は、一部、C C R 2、C S F 1 R、及び／または C C R 2 及び C S F 1 R の両方を標的とするためのオリゴヌクレオチド組成物を提供すること、ならびに骨髓由来細胞の炎症性表現型及びそのような細胞により媒介される免疫応答を調節するためなどのそれらの使用方法に基づく。

【選択図】 図 3 - 2

Figure 3 (cont.)



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) C C R 2 をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも 1 つの s i R N A 分子、b) C S F 1 R をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも 1 つの s i R N A 分子、または c) a) 及び b) の組み合わせを含む、組成物。

【請求項 2】

C C R 2 をコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも 1 つの s i R N A 分子が、配列番号 6 ～配列番号 6 7 から選択される核酸配列を有するセンス鎖と、配列番号 6 8 ～配列番号 1 2 9 から選択される核酸配列を有するアンチセンス鎖とを含む、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 3】

C S F 1 R をコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも 1 つの s i R N A 分子が、配列番号 1 3 0 ～配列番号 2 4 8 から選択される核酸配列を有するセンス鎖と、配列番号 2 4 9 ～配列番号 3 6 7 から選択される核酸配列を有するアンチセンス鎖とを含む、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

C C R 2 または C S F 1 R をコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも 1 つの s i R N A 分子が、少なくとも 1 つの修飾をさらに含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記修飾が、前記核酸配列の糖部分への修飾、核酸塩基修飾、ヌクレオシド間リンカー修飾、人工ヌクレオチド、末端キャップ修飾、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 4 に記載の組成物。

20

【請求項 6】

前記修飾が、前記少なくとも 1 つの s i R N A 分子の前記センス鎖に位置する、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記修飾が、前記少なくとも 1 つの s i R N A 分子の前記アンチセンス鎖に位置する、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記修飾が、前記少なくとも 1 つの s i R N A 分子の前記センス及びアンチセンス鎖に位置する、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

30

【請求項 9】

C C R 2 をコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも 1 つの s i R N A 分子が、配列番号 3 6 8 ～配列番号 4 8 6 及び配列番号 8 8 3 ～配列番号 9 2 1 から選択される修飾核酸配列を有するセンス鎖と、配列番号 4 8 7 ～配列番号 6 0 5 及び配列番号 9 2 2 ～配列番号 9 6 0 から選択される修飾核酸配列を有するアンチセンス鎖とを含む、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

【請求項 10】

C C R 2 をコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも 1 つの s i R N A 分子が、配列番号 6 0 6 ～配列番号 7 4 3 及び配列番号 9 6 1 ～配列番号 1 0 0 1 から選択される修飾核酸配列を有するセンス鎖と、配列番号 7 4 4 ～配列番号 8 8 1 及び配列番号 1 0 0 2 ～配列番号 1 0 4 2 から選択される修飾核酸配列を有するアンチセンス鎖とを含む、請求項 4、5、または 9 に記載の組成物。

40

【請求項 11】

a) C C R 2 をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも 1 つの s i R N A 二本鎖、b) C S F 1 R をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも 1 つの s i R N A 二本鎖、または c) a) 及び b) の組み合わせを含む組成物であって、

C C R 2 をコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも 1 つの s i R N A 二本鎖が、配列番号 6 ～配列番号 6 7 から選択される核酸配列、または配列番号 6 0

50

6～配列番号743から選択される修飾核酸配列、または配列番号961～配列番号1001から選択される修飾バリエーションを有するセンス鎖と、配列番号68～配列番号129から選択される核酸配列、または配列番号744～配列番号881から選択される修飾核酸配列、または配列番号1002～配列番号1042から選択される修飾バリエーションを有するアンチセンス鎖とを含み、及び／または

CSF1Rをコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも1つのsiRNA二本鎖が、配列番号130～配列番号248から選択される核酸配列、または配列番号368～配列番号486から選択される修飾核酸配列、または配列番号883～配列番号921から選択される修飾バリエーションを有するセンス鎖と、配列番号249～配列番号367から選択される核酸配列、または配列番号487～配列番号605から選択される修飾核酸配列、または配列番号922～配列番号960から選択される修飾バリエーションを有するアンチセンス鎖とを含む、前記組成物。

10

【請求項 1 2】

CCR2をコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも1つのsiRNA二本鎖が、二本鎖XD-09048、XD-09050、XD-09098、XD-09117、XD-09127、XD-09043、XD-09045、XD-09060、XD-09062、XD-09086、XD-09094、XD-09095、XD-09107、XD-09112、XD-09113、XD-09115、XD-09121、XD-09138、XD-09143、もしくはXD-09149、またはそれらのバリエーションである、請求項11に記載の組成物。

20

【請求項 13】

CCR2をコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも1つのsiRNA二本鎖が、二本鎖XD-09048、XD-09050、XD-09098、XD-09117、もしくはXD-09127、またはそれらのバリエーションである、請求項12に記載の組成物。

【請求項 14】

CSF1Rをコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも1つのsiRNA二本鎖が、二本鎖XD-08944、XD-08947、XD-08988、XD-08993もしくはXD-08916、XD-08917、XD-08922、XD-08923、XD-08936、XD-08963、XD-08969、XD-08975、XD-08982、XD-08985、XD-08986、XD-08989、XD-09003、XD-09006、XD-09015、もしくはXD-09021、またはそれらのバリエーションである、請求項11～13のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項 15】

CSF1Rをコードする前記核酸分子にハイブリダイズする前記少なくとも1つのsiRNA二本鎖が、二本鎖XD-08944、XD-08947、XD-08988、XD-08993、もしくはXD-08916、またはそれらのバリエーションである、請求項14に記載の組成物。

【請求項 16】

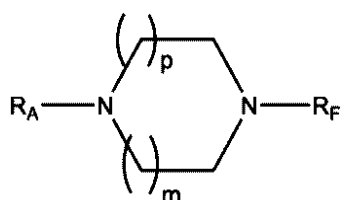
前記組成物が、脂質及び／またはリピドイドをさらに含む、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 17】

前記リポドイドが、式 (V I) のものであって、

【化 3 6】



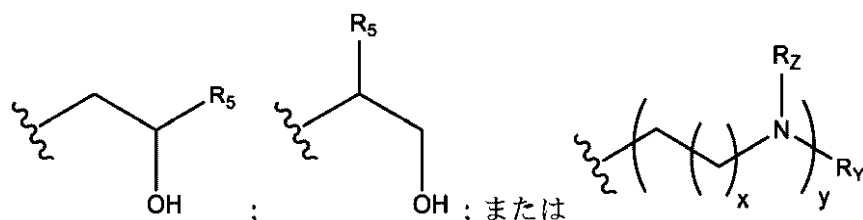
(V I)

式中、

p が、1～3（境界値を含む）の整数であり、

m が、1～3（境界値を含む）の整数であり、

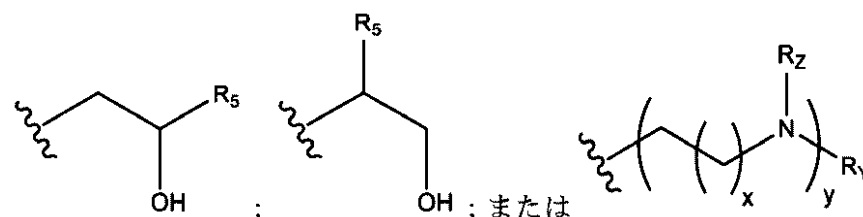
R_A が、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；
【化37】



10

であり、

R_F が、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；
【化38】



20

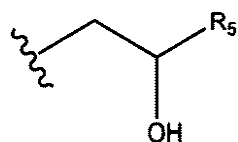
であり、

R_5 の各出現が独立して、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

式中、 R_A 、 R_F 、 R_Y 、及び R_Z のうちの少なくとも1つが、

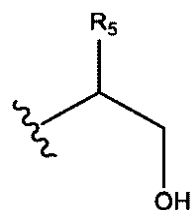
30

【化39】



または

【化40】



40

であり、

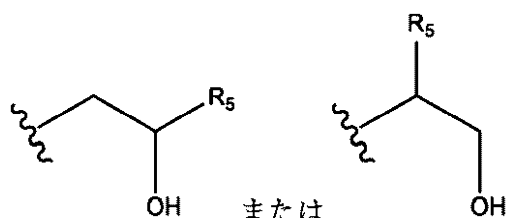
x の各出現が、1～10（境界値を含む）の整数であり、

y の各出現が、1～10（境界値を含む）の整数であり、

R_Y の各出現が、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

50

【化 4 1】

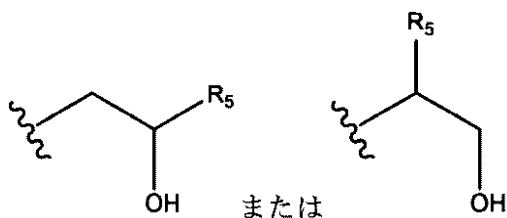


であり、

R_Z の各出現が、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

10

【化 4 2】



である、前記式 (V I) のもの、

20

あるいはその薬学的に許容される塩である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

p が、1 である、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

m が、1 である、請求項 17 または 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

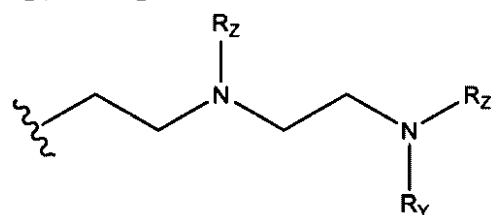
p 及び m の各々が、1 である、請求項 17 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 21】

R_F が、

30

【化 4 3】



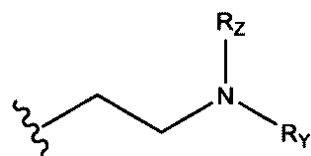
である、請求項 17 ～ 20 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 22】

R_A が、

40

【化 4 4】

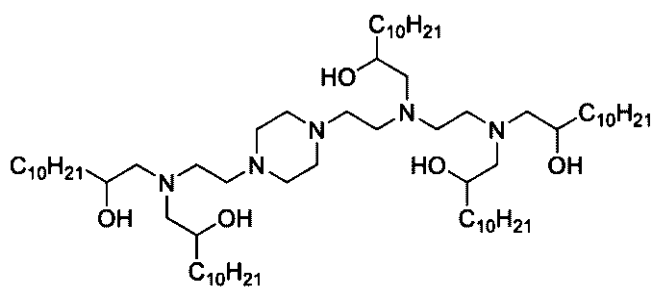


である、請求項 17 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 23】

前記式 (V I) の化合物が、以下の式のもの、

【化 4 5】



またはその塩である、請求項 17 に記載の組成物。

10

【請求項 24】

前記組成物が、脂質ナノ粒子の形態である、請求項 17～23 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 25】

前記脂質ナノ粒子が、約 1.0 モル%～約 60.0 モル%の C 1 2 - 2 0 0 を含む、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記脂質ナノ粒子が、1 つ以上の共脂質をさらに含む、請求項 24 または 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

20

各共脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C)、コレステロール、及び D M G - P E G から選択される、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

D S P C の濃度が、約 1.0 モル%～約 20.0 モル%である、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

コレステロールの濃度が、約 10.0 モル%～約 50.0 モル%である、請求項 27 または 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

D M G - P E G の濃度が、約 0.1 モル%～約 5.0 モル%である、請求項 27～29 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 31】

D S P C が、約 1.0 モル%～約 20.0 モル%の濃度で存在し、コレステロールが、約 10.0 モル%～約 50.0 モル%の濃度で存在し、D M G - P E G が、約 0.1 モル%～約 5.0 モル%の濃度で存在する、請求項 27～30 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 32】

C 1 2 - 2 0 0、D S P C、コレステロール、及び D M G - P E G が、それぞれ 50% : 10% : 38.5% : 1.5% の比率で存在する、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 33】

40

前記 s i R N A 分子と比較して、L N P の前記脂質及びリピドドイドが、約 20 : 1～約 5 : 1 の重量の比率で存在する、請求項 16～32 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 34】

前記 s i R N A 分子と比較して、前記 L N P の前記脂質及びリピドドイドが、9 : 1 の重量の比率で存在する、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記組成物が、薬学的に許容される製剤中にある、請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 36】

請求物 1～35 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの組成物と接触した後に増加し

50

た炎症性表現型を有する骨髓由来細胞を生成する方法であって、前記骨髓由来細胞を有効量の前記少なくとも1つの組成物と接触させることを含む、前記方法。

【請求項37】

増加した炎症性表現型を有する前記骨髓由来細胞が、前記少なくとも1つの組成物と接触した後に、以下：

a) 表面抗原分類80 (CD80)、CD86、MHCII、MHC I、インターロイキン1-ベータ (IL-1 β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF、及び／または腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α) の増加した発現、

b) CD206、CD163、CD16、CD53、VSI G4、PSGL-1、TG Fb、及び／またはIL-10の減少した発現、 10

c) IL-1 β 、TNF- α 、IL-12、IL-18、GM-CSF、CCL3、CCL4、及びIL-23からなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインもしくはケモカインの増加した分泌、

d) IL-1 β 、IL-6、及び／またはTNF- α の発現対IL-10の発現の増加した比率、

e) 増加したCD8+細胞傷害性T細胞活性化、

f) CD8+細胞傷害性T細胞活性化の増加した動員、

g) 増加したCD4+ヘルパーT細胞活性、

h) CD4+ヘルパーT細胞活性の増加した動員、 20

i) 増加したNK細胞活性、

j) NK細胞の増加した動員、

k) 増加した好中球活性、

l) 増加したマクロファージ活性、及び／または

m) 顕微鏡法で評価した場合の、増加した紡錘形の形態、外観の平坦性、及び／または樹状突起の数、のうちの1つ以上を呈する、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記少なくとも1つの組成物と接触した前記骨髓由来細胞が、細胞の集団内に含まれ、前記少なくとも1つの組成物が、前記細胞の集団内の1型及び／またはM1マクロファージの数を増加させ、及び／または2型及び／またはM2マクロファージの数を減少させる、請求項36または37に記載の方法。 30

【請求項39】

前記少なくとも1つの組成物と接触した前記骨髓由来細胞が、細胞の集団内に含まれ、前記少なくとも1つの組成物が、i) 対ii) の比率を増加させ、前記細胞の集団内のi) が、1型及び／またはM1マクロファージであり、ii) が、2型及び／またはM2マクロファージである、請求項36～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】

前記骨髓由来細胞が、インビトロまたはエキスピボで接触する、請求項36～39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】 40

前記骨髓由来細胞が、一次骨髓由来細胞である、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記骨髓由来細胞が、前記少なくとも1つの組成物と接触する前に精製及び／または培養される、請求項36～41のいずれか1項に記載の方法。

【請求項43】

前記骨髓由来細胞が、インビボで接触する、請求項36～39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項44】

前記骨髓由来細胞が、前記組成物の全身、腫瘍周囲、または腫瘍内投与によってインビボで接触する、請求項43に記載の方法。 50

【請求項 45】

前記骨髓由来細胞が、それを必要とする対象において接触し、任意に、前記接触が、組織微小環境にある、請求項 43 または 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記骨髓由来細胞を、少なくとも 1 つの追加の治療薬と接触させることをさらに含む、請求項 36 ～ 45 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

前記少なくとも 1 つの追加の治療薬が、CCL2 のアンタゴニスト及び／または CSF1 のアンタゴニストである、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記少なくとも 1 つの追加の治療薬が、前記炎症性表現型を調節する免疫療法剤を含み、任意に、前記免疫療法剤が、免疫チェックポイント阻害剤、免疫刺激アゴニスト、炎症剤、細胞、がんワクチン、及び／またはウイルスを含む、請求項 46 または 47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 49】

請求物 1 ～ 35 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの組成物と接触した後に、対象における骨髓由来細胞の炎症性表現型を増加させる方法であって、前記骨髓由来細胞に接触する有効量の前記少なくとも 1 つの組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 50】

前記増加した炎症性表現型を有する前記骨髓由来細胞が、前記少なくとも 1 つの組成物と接触した後に、以下：

a) 表面抗原分類 80 (CD80)、CD86、MHCI I、MHCI、インターロイキン 1-β (IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF、及び／または腫瘍壊死因子アルファ (TNF-α) の増加した発現、

b) CD206、CD163、CD16、CD53、VSI G4、PSGL-1、及び／または IL-10 の減少した発現、

c) IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18、及び IL-23 からなる群から選択される少なくとも 1 つのサイトカインの増加した分泌、

d) IL-10 の発現に対する IL-1β、IL-6、及び／または TNF-α の発現の増加した比率、

e) 増加した CD8+細胞傷害性 T 細胞活性化、

f) 増加した CD4+ヘルパー T 細胞活性、

g) 増加した NK 細胞活性、

h) 増加した好中球活性、

i) 増加したマクロファージ活性、及び／または

j) 顕微鏡法で評価した場合の、増加した紡錘形の形態、外観の平坦性、及び／または樹状突起の数、のうちの 1 つ以上を呈する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記少なくとも 1 つの組成物が、1 型及び／または M1 マクロファージの数を増加させ、2 型及び／または M2 マクロファージの数を減少させ、及び／または i) 対 ii) の比率を増加させ、前記対象における i) が、1 型及び／または M1 マクロファージであり、ii) が、2 型及び／または M2 マクロファージである、請求項 49 または 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記対象における細胞傷害性 CD8+T 細胞の数及び／または活性が、前記少なくとも 1 つの組成物の投与後に増加される、請求項 49 ～ 51 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 53】

前記少なくとも 1 つの組成物が、全身、腫瘍周囲、または腫瘍内に投与される、請求項

10

20

30

40

50

49～52のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】

前記少なくとも1つの組成物が、組織微小環境で前記骨髓由来細胞と接触する、請求項49～53のいずれか1項に記載の方法。

【請求項55】

前記骨髓由来細胞を、少なくとも1つの追加の治療薬と接触させることをさらに含む、請求項49～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項56】

前記少なくとも1つの追加の治療薬が、CCl₂のアンタゴニスト及び／またはCSF1のアンタゴニストである、請求項55に記載の方法。

10

【請求項57】

前記少なくとも1つの追加の治療薬が、前記炎症性表現型を調節する免疫療法剤を含み、任意に、前記免疫療法剤が、免疫チェックポイント阻害剤、免疫刺激アゴニスト、炎症剤、細胞、がんワクチン、及び／またはウイルスを含む、請求項55または56に記載の方法。

【請求項58】

前記免疫チェックポイントが、PD-1、PD-L1、PD-L2、及びCTLA-4からなる群から選択される、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

前記免疫チェックポイントが、PD-1である、請求項58に記載の方法。

20

【請求項60】

前記少なくとも1つの追加の治療薬またはレジメンが、前記少なくとも1つの組成物の前、それと同時、またはその後投与される、請求項55～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項61】

対象におけるがん細胞を細胞傷害性CD8+T細胞媒介性殺傷及び／または免疫チェックポイント療法に対して増感させる方法であって、前記対象において骨髓由来細胞を接触させるために、請求項1～35のいずれか1項に記載の治療有効量の少なくとも1つの組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項62】

前記少なくとも1つの組成物が、全身、腫瘍周囲、または腫瘍内に投与される、請求項61に記載の方法。

30

【請求項63】

有効量の少なくとも1つの追加の治療薬を前記対象に投与することによって、前記対象における前記がんを治療することをさらに含む、請求項61または62に記載の方法。

【請求項64】

前記少なくとも1つの追加の治療薬が、CCl₂のアンタゴニスト及び／またはCSF1のアンタゴニストである、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

前記少なくとも1つの追加の治療薬が、前記骨髓由来細胞の前記炎症性表現型を調節する免疫療法剤を含み、任意に、前記免疫療法剤が、免疫チェックポイント阻害剤、免疫刺激アゴニスト、炎症剤、細胞、がんワクチン、及び／またはウイルスを含む、請求項63または64に記載の方法。

40

【請求項66】

前記免疫チェックポイントが、PD-1、PD-L1、PD-L2、及びCTLA-4からなる群から選択される、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記免疫チェックポイントが、PD-1である、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

前記少なくとも1つの追加の治療薬またはレジメンが、前記少なくとも1つの組成物の

50

前、それと同時に、またはその後に投与される、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記少なくとも 1 つの組成物が、前記がんにおける増殖細胞の数を低減し、及び／または前記がん細胞を含む腫瘍の体積もしくはサイズを低減する、請求項 61～68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 70】

前記少なくとも 1 つの組成物が、前記がん細胞を含む腫瘍に浸潤する CD8+T 細胞の量及び／または活性を増加させる、請求項 61～69 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 71】

前記少なくとも 1 つの組成物が、a) 前記がん細胞を含む腫瘍に浸潤する M1 マクロファージの量及び／または活性を増加させる、及び／または b) 前記がん細胞を含む腫瘍に浸潤する M2 マクロファージの量及び／または活性を減少させる、請求項 61～70 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 72】

前記少なくとも 1 つの組成物と接触した前記骨髓由来細胞が、以下：

a) 単球及び／またはマクロファージによる CCR2 及び／または CSF1R 受容体の減少した発現、

b) 単球及び／またはマクロファージによる、表面抗原分類 80 (CD80)、CD86、MHC II、MHC I、インターロイキン 1-β (IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF、及び／または腫瘍壊死因子アルファ (TNF-α) の増加した発現、

20

c) 単球及び／またはマクロファージによる、CD206、CD163、CD16、CD53、VSG4、PSGL-1、TGFB、及び／または IL-10 の減少した発現、

d) 単球及び／またはマクロファージによる、IL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18、GM-CSF、CCL3、CCL4、及び IL-2 からなる群から選択される少なくとも 1 つのサイトカインもしくはケモカインの増加した分泌、

e) 単球及び／またはマクロファージによる、IL-1β、IL-6、及び／または TNF-α の発現対 IL-10 の発現の増加した比率、

f) 増加した CD8+細胞傷害性 T 細胞活性化、

30

g) CD8+細胞傷害性 T 細胞活性化の増加した動員、

h) 増加した CD4+ヘルパー T 細胞活性、

i) CD4+ヘルパー T 細胞活性の増加した動員、

j) 増加した NK 細胞活性、

k) NK 細胞の増加した動員、

l) 増加した好中球活性、

m) 増加したマクロファージ活性、及び／または

n) 顕微鏡法で評価した場合の、増加した紡錘形の形態、外観の平坦性、及び／または樹状突起の数、のうちの 1 つ以上を呈する調節された炎症性表現型を有する、請求項 36～71 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 73】

前記骨髓由来細胞が、マクロファージ、単球、循環骨髓由来単球、組織常駐マクロファージ、臨床状態に関連するマクロファージ、1 型マクロファージ、M1 マクロファージ、2 型マクロファージ、M2 マクロファージ、M2c マクロファージ、M2d マクロファージ、及び／または腫瘍関連マクロファージ (TAM) である、請求項 36～72 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 74】

前記がんが、中皮腫、腎臓腎明細胞癌、膠芽腫、肺腺癌、肺扁平上皮癌、膵臓腺癌、乳房浸潤癌、急性骨髓性白血病、副腎皮質癌、膀胱尿路上皮癌、脳低悪性度神経膠腫、乳房浸潤癌、子宮頸部扁平上皮癌及び子宮頸部腺癌、胆管癌、結腸腺癌、食道癌、多形性膠芽

50

腫、頭頸部扁平上皮癌、嫌色素性腎臓、腎臓腎明細胞癌、腎臓腎乳頭細胞癌、肝臓肝細胞癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、リンパ系新生物びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、中皮腫、卵巣漿液性、嚢胞腺癌、膵臓腺癌、褐色細胞腫、傍神経節腫、前立腺腺癌、直腸腺癌、肉腫、皮膚皮膚黒色腫、胃腺癌、精巣胚細胞腫瘍、胸腺腫、甲状腺癌、子宮癌肉腫、子宮体子宮内膜癌、及びブドウ膜黒色腫からなる群から選択される、請求項36～73のいずれか1項に記載の方法。

【請求項75】

前記骨髓由来細胞が、ヒト腫瘍モデル、がんの動物モデル、及び／またはチグリコール腹膜炎モデル内に含まれる、請求項36～74のいずれか1項に記載の方法。

【請求項76】

前記対象が、哺乳動物である、請求項36～75のいずれか1項に記載の方法。

【請求項77】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

前記ヒトが、がん罹患している、請求項77に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2018年8月9日出願された米国仮出願第62／716, 671号の利益を主張するものであり、当該出願の内容全体が、それらの全体においてこの参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

単球及びマクロファージを含む骨髓由来細胞は、自然免疫系の重要な役割を果たすものである。循環する単球（例えば、骨髓から遊出する単球）及び組織常駐マクロファージは、領域から発せられる環境シグナル（例えば、局所増殖因子、炎症誘発性サイトカイン、及び微生物化合物）に応答して領域に移動し、成熟／分極化マクロファージに分化する。非病理学的条件下では、免疫刺激性及び免疫抑制マクロファージのバランスの取れた集団が免疫系に存在する。いくつかの疾患状態では、バランスが崩れ、不均衡が多く臨床状態を引き起こす。例えば、腫瘍組織に浸潤するマクロファージは、腫瘍細胞の影響下で炎症誘発性から腫瘍形成に切り替えることができる。ある種のがんは、腫瘍関連マクロファージ（TAM）または腫瘍浸潤マクロファージとしばしば呼ばれる腫瘍内の抗炎症マクロファージの上昇したレベルを呈することが示されている。腫瘍微小環境におけるTAMは、良くも悪くも、がんの進行及び転移の重要な調節因子である（Pollard et al. (2004) Nat. Rev. Cancer 4: 71-78）。マクロファージのバランス取れていない分極化は、感染症、慢性炎症、炎症性神経疾患、心血管疾患、アレルギー及びシステム自己免疫疾患、多発性硬化症、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、I型糖尿病、II型糖尿病、ならびに肥満などの他の多くの炎症関連疾患の重要な危険因子として認識されている。マクロファージの表現型は、古典的または代替的な経路を介する活性化に依存する（例えば、Classen et al. (2009) Methods Mol. Biol. 531: 29-43を参照されたい）。古典的に活性化されたマクロファージは、インターフェロンガンマ（IFN γ ）またはリポ多糖（LPS）によって活性化され、M1表現型を示す。この炎症誘発性表現型は、炎症の増加及び免疫系の刺激に関連する。代替的に、活性化されたマクロファージは、IL-4、IL-10、及びIL-13などのサイトカインによって活性化され、M2表現型を示す。この抗炎症表現型は、免疫応答の減少、創傷治癒の増加、組織修復の増加、及び胚発生に関連する。

【0003】

単球及びマクロファージは、ケモカインなどのそれらの対応するリガンドによって活性

化することができる様々な表面受容体を発現する。リガンド結合は、細胞内のシグナル伝達ネットワークを活性化し、単球及びマクロファージの活性化及び分極化を調節する。リガンドー受容体アンタゴニストなどの、単球及びマクロファージにおけるリガンドー受容体対の相互作用を遮断する薬剤は、がんのような疾患において有望な治療効果を示している。そのような薬剤は、単球及び／またはマクロファージの動員、マクロファージの発達及び分極化／活性化などの骨髄由来細胞の機能を調節することができる。例えば、いくつかの疾患状態では、マクロファージ集団のバランスを取り直し、及び／または免疫刺激マクロファージの数及び／または活性を増加させることが有用である。

【0004】

CCR2及びCSF1Rは、環境シグナルに応答して単球及びマクロファージによって発現される2つの表面受容体である。リガンド(CCL2)によるCCR2の活性化は、走化性応答を媒介する細胞内シグナル伝達カスケードの活性化をもたらし、腫瘍微小環境への単球及びマクロファージの動員を誘導する。受容体阻害剤を用いたCSF1R遮断は、局所疾患部位へのマクロファージ浸潤を低減することができ、いくつかの疾患状態における疾患の進行を遅らせることができる(Patel et al. (2009) Curr, Top. Med. Chem. 9:599-610)。そのリガンド(CSF1L)によるCSF1R活性化によって媒介されるシグナル伝達は、骨髄細胞、及び特にマクロファージシステムの生存、増殖、及び分化を調節する。CCR2アンタゴニストは、関節リウマチ、多発性硬化症、喘息、及び肥満などがん及び他のマクロファージ媒介性炎症性疾患における治療薬として調査されている(例えば、Zimmermann et al. (2014) Curr, Top. Med. Chem. 14:1539-1552)。

しかしながら、マクロファージ生物学の分野では進歩しているにもかかわらず、炎症表現型を調節し、免疫応答を調節するためにそのような薬剤を使用するために、CCR2及びCSF1Rのような骨髄由来細胞表面受容体を効果的に標的にするために単独で及び組み合わせて使用される薬剤を同定する必要性が残っている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Pollard et al. (2004) Nat. Rev. Cancer 4:71-78

【非特許文献2】Classen et al. (2009) Methods Mol. Biol. 531:29-43

【非特許文献3】Patel et al. (2009) Curr, Top. Med. Chem. 9:599-610

【非特許文献4】Zimmermann et al. (2014) Curr, Top. Med. Chem. 14:1539-1552

【発明の概要】

【0006】

本発明は、一部、CCR2、CSF1R、またはCCR2及びCSF1Rの両方を標的とするためのオリゴヌクレオチド組成物、ならびにそれらの使用に注目する。本発明により包含される組成物は、CCR2またはCSF1Rを特異的に標的とするsiRNA分子を提供し、骨髄由来細胞の活性を調節する。siRNA分子は、オフターゲット効果なしでCCR2またはCSF1Rを効果的に標的とし、これらの標的を阻害するのに有用ないくつかの他の因子を最適化するために選択されている。さらに、本発明はまた、単球及びマクロファージのような骨髄由来細胞への送達を増強するためのそのようなsiRNA分子を含む製剤を提供する。また、理論に束縛されるものではないが、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド組成物と、それを含む製剤との組み合わせの使用は、腫瘍細胞からの成長因子などの環境シグナルに応答して、単球及びマクロファージの輸送、分極化、及び活性化を同時に阻害するために、CCR2及びCSF1R活性化を阻害するために特に効果的であると考えられる。CCR2及びCSF1R受容体機能を阻害するため、骨髄由

来細胞の動員、分極化、及び活性化を調節するため、ならびに癌などのマクロファージ媒介性疾患を治療するための方法も提供される。

【0007】

一態様では、a) CCR2をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 分子、b) CSF1Rをコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 分子、またはc) a) 及びb) の組み合わせを含む組成物が提供される。

【0008】

本発明により包含される任意の態様に適用することができ、及び／または本明細書に記載される他の任意の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態がさらに提供される。例えば、一実施形態では、CCR2をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 分子は、配列番号6～配列番号67から選択される核酸配列を有するセンス鎖と、配列番号68～配列番号129から選択される核酸配列を有するアンチセンス鎖とを含む。別の実施形態では、CSF1Rをコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 分子は、配列番号130～配列番号248から選択される核酸配列を有するセンス鎖と、配列番号249～配列番号367から選択される核酸配列を有するアンチセンス鎖とを含む。さらに別の実施形態では、CCR2またはCSF1Rをコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 分子は、少なくとも1つの修飾をさらに含む。さらに別の実施形態では、修飾は、核酸配列の糖部分への修飾、核酸塩基修飾、ヌクレオシド間リンカー修飾、人工ヌクレオチド、末端キャップ修飾、またはそれらの任意の組み合わせである。別の実施形態では、修飾は、少なくとも1つの siRNA 分子のセンス鎖に位置する。さらに別の実施形態では、修飾は、少なくとも1つの siRNA 分子のアンチセンス鎖に位置する。さらに別の実施形態では、修飾は、少なくとも1つの siRNA 分子のセンス及びアンチセンス鎖に位置する。別の実施形態では、CCR2をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 分子は、配列番号368～配列番号486及び配列番号883～配列番号921から選択される修飾核酸配列を有するセンス鎖と、配列番号487～配列番号605及び配列番号922～配列番号960から選択される修飾核酸配列を有するアンチセンス鎖とを含む。さらに別の実施形態では、CCR2をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 分子は、配列番号606～配列番号743及び配列番号961～配列番号1001から選択される修飾核酸配列を有するセンス鎖と、配列番号744～配列番号881及び配列番号1002～配列番号1042から選択される修飾核酸配列を有するアンチセンス鎖とを含む。

【0009】

別の態様では、a) CCR2をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 二本鎖、b) CSF1Rをコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 二本鎖、またはc) a) 及びb) の組み合わせを含む組成物が提供され、CCR2をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 二本鎖は、配列番号6～配列番号67から選択される核酸配列、もしくは配列番号606～配列番号743から選択される修飾核酸配列、もしくは配列番号961～配列番号1001から選択される修飾バリエーションを有するセンス鎖と、配列番号68～配列番号129から選択される核酸配列、もしくは配列番号744～配列番号881から選択される修飾核酸配列、もしくは配列番号1002～配列番号1042から選択される修飾バリエーションを有するアンチセンス鎖とを含み、及び／またはCSF1Rをコードする核酸配列にハイブリダイズする少なくとも1つの siRNA 二本鎖は、配列番号130～配列番号248から選択される核酸配列、もしくは配列番号368～配列番号486から選択される修飾核酸配列、もしくは配列番号883～配列番号921から選択される修飾バリエーションを有するセンス鎖と、配列番号249～配列番号367から選択される核酸配列、もしくは配列番号487～配列番号605から選択される修飾核酸配列、もしくは配列番号922～配列番号960から選択される修飾バリエーションを有するアンチセンス鎖とを含む。

【0010】

上述のように、本発明の任意の態様に適用することができ、及び／または本明細書に記載される他の任意の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態がさらに提供される。例えば、一実施形態では、CCR2をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つのsiRNA二本鎖は、二本鎖XD-09048、XD-09050、XD-09098、XD-09117、XD-09127、XD-09043、XD-09045、XD-09060、XD-09062、XD-09086、XD-09094、XD-09095、XD-09107、XD-09112、XD-09113、XD-09115、XD-09121、XD-09138、XD-09143、もしくはXD-09149、またはそれらのバリエーションである。別の実施形態では、CCR2をコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つのsiRNA二本鎖は、二本鎖XD-09048、XD-09050、XD-09098、XD-09117、もしくはXD-09127、またはそれらのバリエーションである。さらに別の実施形態では、CSF1Rをコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つのsiRNA二本鎖は、二本鎖XD-08944、XD-08947、XD-08988、XD-08993もしくはXD-08916、XD-08917、XD-08922、XD-08923、XD-08936、XD-08963、XD-08969、XD-08975、XD-08982、XD-08985、XD-08986、XD-08989、XD-09003、XD-09006、XD-09015、もしくはXD-09021、またはそれらのバリエーションである。さらに別の実施形態では、CSF1Rをコードする核酸分子にハイブリダイズする少なくとも1つのsiRNA二本鎖は、二本鎖XD-08944、XD-08947、XD-08988、XD-08993、もしくはXD-08916、またはそれらのバリエーションである。

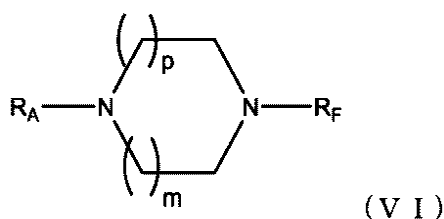
10

20

【0011】

いくつかの実施形態では、組成物は、脂質及び／またはリポイドをさらに含む。例えば、一実施形態では、リポイドは、式(VI)のものであって、

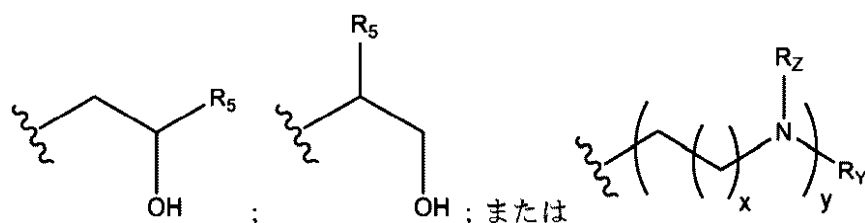
【化1】



30

式中、pが、1～3（境界値を含む）の整数であり、mが、1～3（境界値を含む）の整数であり、R_Aが、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐C₁₋₂₀脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐C₁₋₂₀ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

【化2】

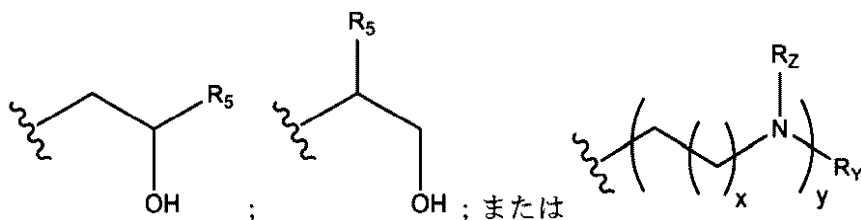


40

R_Fが、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐C₁₋₂₀脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐C₁₋₂₀ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

50

【化 3】



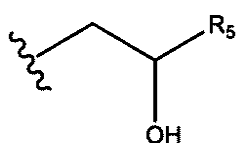
であり、

R_5 の各出現が独立して、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

10

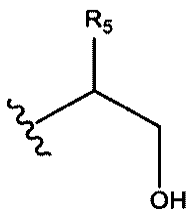
式中、 R_A 、 R_F 、 R_Y 、及び R_Z のうちの少なくとも 1 つが、

【化 4】



または

【化 5】



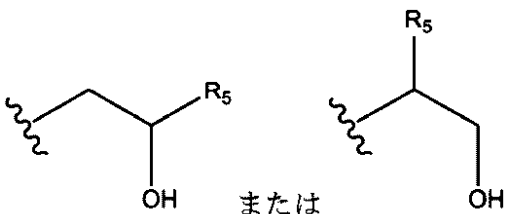
20

であり、

x の各出現が、1～10（境界値を含む）の整数であり、 y の各出現が、1～10（境界値を含む）の整数であり、 R_Y の各出現が、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

30

【化 6】

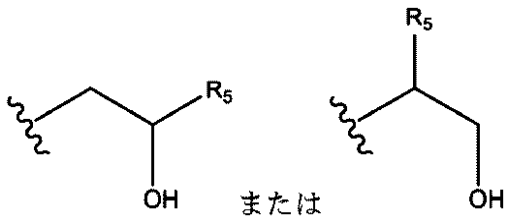


であり、

R_Z の各出現が、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

40

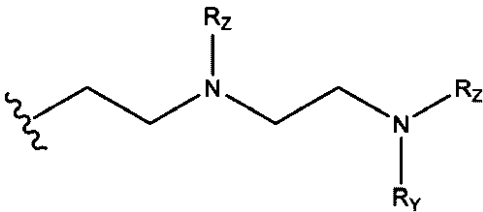
【化 7】



である、式 (V I) のもの、

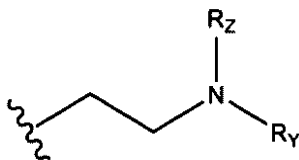
あるいはその薬学的に許容される塩である。別の実施形態では、 p は、1 である。さらに別の実施形態では、 m は、1 である。さらに別の実施形態では、 p 及び m の各々は、1 である。別の実施形態では、 R_F は、

【化 8】



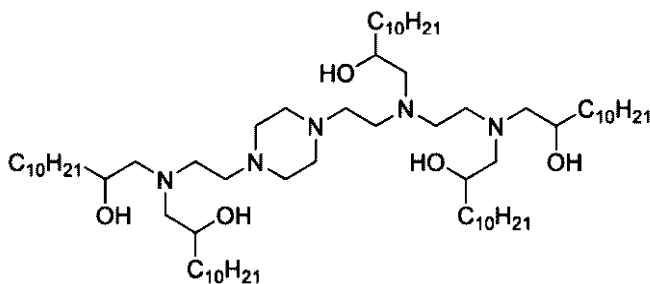
である。さらに別の実施形態では、 R_A は、

【化 9】



である。さらに別の実施形態では、式 (V I) の化合物は、以下の式のもの、

【化 10】



(C 1 2 - 2 0 0)

またはその塩である。別の実施形態では、組成物は、脂質ナノ粒子の形態である。さらに別の実施形態では、脂質ナノ粒子は、約 1.0 モル%～約 60.0 モル%の C 1 2 - 2 0 0 を含む。さらに別の実施形態では、脂質ナノ粒子は、1 つ以上の共脂質をさらに含む。別の実施形態では、各共脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C)、コレステロール、及び D M G - P E G から選択される。さらに別の実施形態では、D S P C の濃度は、約 1.0 モル%～約 20.0 モル%である。さらに別の実施形態では、コレステロールの濃度は、約 10.0 モル%～約 50.0 モル%である。別の実施形態では、D M G - P E G の濃度は、約 0.1 モル%～約 5.0 モル%である。さらに別の実施形態では、D S P C は、約 1.0 モル%～約 20.0 モル%の濃度で存在し、コレステロールは、約 10.0 モル%～約 50.0 モル%の濃度で存在し、D M G - P E G は、約 0.1 モル%～約 5.0 モル%の濃度で存在する。さらに別の実施形態では、C 1 2 - 2 0 0、D S P C、コレステロール、及び D M G - P E G は、それぞれ 50%：10%：38.5%：1.5% の比率で存在する。別の実施形態では、s i R N A 分子と比較して、L N P の脂質及びリピドロイドは、約 20：1～約 5：1 の重量の比率で存在する。さらに別の実施形態では、s i R N A 分子と比較して、L N P の脂質及びリピドロイドは、9：1 の

10

20

30

40

50

重量の比率で存在する。さらに別の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される製剤である。

【0012】

さらに別の態様では、骨髄由来細胞を有効量の少なくとも1つの組成物と接触させることを含む、本発明により包含される少なくとも1つの組成物と接触した後に、増加した炎症性表現型を有する骨髄由来細胞を生成する方法が提供される。

【0013】

上述のように、本発明の任意の態様に適用することができ、及び／または本明細書に記載される他の任意の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態がさらに提供される。例えば、一実施形態では、増加した炎症性表現型を有する骨髄由来細胞は、少なくとも1つの組成物と接触した後に、以下：a) 表面抗原分類80 (CD80)、CD86、MHC II、MHC I、インターロイキン1-ベータ (IL-1 β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF、及び／または腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α) の増加した発現、b) CD206、CD163、CD16、CD53、VSG4、PSGL-1、TGFB、及び／またはIL-10の減少した発現、c) IL-1 β 、TNF- α 、IL-12、IL-18、GM-CSF、CCL3、CCL4、及びIL-23からなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインもしくはケモカインの増加した分泌、d) IL-10の発現に対するIL-1 β 、IL-6、及び／またはTNF- α の発現の増加した比率、e) 増加したCD8+細胞傷害性T細胞活性化、f) CD8+細胞傷害性T細胞活性化の増加した動員、g) 増加したCD4+ヘルパーT細胞活性、h) CD4+ヘルパーT細胞活性の増加した動員、i) 増加したNK細胞活性、j) NK細胞の増加した動員、k) 増加した好中球活性、l) 増加したマクロファージ活性、及び／またはm) 顕微鏡法で評価した場合の、増加した紡錘形の形態、外観の平坦性、及び／または樹状突起の数のうちの1つ以上を呈する。別の実施形態では、少なくとも1つの組成物と接触した骨髄由来細胞は、細胞の集団内に含まれ、少なくとも1つの組成物は、細胞の集団内の、1型及び／またはM1マクロファージの数を増加させ、かつ／または2型及び／またはM2マクロファージの数を減少させる。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの組成物と接触した骨髄由来細胞は、細胞の集団内に含まれ、少なくとも1つの組成物は、i) 対i i) の比率を増加させ、細胞の集団内のi) が、1型及び／またはM1マクロファージであり、i i) は、2型及び／またはM2マクロファージである。さらに別の実施形態では、骨髄由来細胞は、インビトロまたはエキスビボで接触する。別の実施形態では、骨髄由来細胞は、一次骨髄由来細胞である。さらに別の実施形態では、骨髄由来細胞は、少なくとも1つの組成物と接触する前に精製及び／または培養される。さらに別の実施形態では、骨髄由来細胞は、インビボで接触する。別の実施形態では、骨髄由来細胞は、組成物の全身、腫瘍周囲、または腫瘍内投与によってインビボで接触する。さらに別の実施形態では、骨髄由来細胞は、それを必要とする対象において接触し、任意に、接触は、組織微小環境にある。さらに別の実施形態では、方法は、骨髄由来細胞を、少なくとも1つの追加の治療薬と接触させることをさらに含む。別の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬は、CCL2のアンタゴニスト及び／またはCSF1のアンタゴニストである。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬は、炎症性表現型を調節する免疫療法剤を含み、任意に、免疫療法剤は、免疫チェックポイント阻害剤、免疫刺激アゴニスト、炎症剤、細胞、がんワクチン、及び／またはウイルスを含む。

【0014】

さらに別の態様では、骨髄由来細胞に接触する有効量の少なくとも1つの組成物を対象に投与することを含む、本発明により包含される少なくとも1つの組成物と接触した後に、対象における骨髄由来細胞の炎症性表現型を増加させる方法が提供される。

【0015】

上述のように、本発明の任意の態様に適用することができ、及び／または本明細書に記載される他の任意の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態がさらに提供さ

10

20

30

40

50

れる。例えば、一実施形態では、増加した炎症性表現型を有する骨髄由来細胞は、少なくとも1つの組成物と接触した後に、a) 表面抗原分類80 (CD80)、CD86、MHC II、MHC I、インターロイキン1-ベータ (IL-1 β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF、及び/または腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α) の増加した発現、b) CD206、CD163、CD16、CD53、VSG4、PSGL-1、及び/またはIL-10の低減した発現、c) IL-1 β 、TNF- α 、IL-12、IL-18、及びIL-23からなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインの増加した分泌、d) IL-10の発現に対するIL-1 β 、IL-6、及び/またはTNF- α の発現の増加した比率、e) 増加したCD8+細胞傷害性T細胞活性化、f) 増加したCD4+ヘルパーT細胞活性、g) 増加したNK細胞活性、h) 増加した好中球活性、i) 増加したマクロファージ活性、及び/またはj) 顕微鏡法で評価した際の、増加した紡錘形の形態、外観の平坦性、及び/または樹状突起の数のうちの1つ以上を呈する。別の実施形態では、少なくとも1つの組成物は、1型及び/またはM1マクロファージの数を増加させ、2型及び/またはM2マクロファージの数を減少させ、及び/またはi) 対i i) の比率を増加させ、対象におけるi) は、1型及び/またはM1マクロファージであり、i i) は、2型及び/またはM2マクロファージである。さらに別の実施形態では、対象における細胞傷害性CD8+T細胞の数及び/または活性は、少なくとも1つの組成物の投与後に増加される。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの組成物は、全身、腫瘍周囲、または腫瘍内に投与される。別の実施形態では、少なくとも1つの組成物は、組織微小環境で骨髄由来細胞と接触する。さらに別の実施形態では、方法は、骨髄由来細胞を、少なくとも1つの追加の治療薬と接触させることをさらに含む。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬は、CCL2のアンタゴニスト及び/またはCSF1のアンタゴニストである。別の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬は、炎症性表現型を調節する免疫療法剤を含み、任意に、免疫療法剤は、免疫チェックポイント阻害剤、免疫刺激アゴニスト、炎症剤、細胞、がんワクチン、及び/またはウイルスを含む。さらに別の実施形態では、免疫チェックポイントは、PD-1、PD-L1、PD-L2、及びCTLA-4からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、免疫チェックポイントは、PD-1である。別の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬またはレジメンは、少なくとも1つの組成物の前、それと同時に、またはその後に投与される。

【0016】

別の態様では、対象において骨髄由来細胞を接触させるために、本発明により包含される治療有効量の少なくとも1つの組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがん細胞を細胞傷害性CD8+T細胞媒介性殺傷及び/または免疫チェックポイント療法に対して増感させる方法が提供される。

【0017】

上述のように、本発明の任意の態様に適用することができ、及び/または本明細書に記載される他の任意の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態がさらに提供される。例えば、一実施形態では、少なくとも1つの組成物は、全身、腫瘍周囲、または腫瘍内に投与される。別の実施形態では、方法は、有効量の少なくとも1つの追加の治療薬を対象に投与することによって、対象におけるがんを治療することをさらに含む。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬は、CCL2のアンタゴニスト及び/またはCSF1のアンタゴニストである。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬は、骨髄由来細胞の炎症性表現型を調節する免疫療法剤を含み、任意に、免疫療法剤は、免疫チェックポイント阻害剤、免疫刺激アゴニスト、炎症剤、細胞、がんワクチン、及び/またはウイルスを含む。別の実施形態では、免疫チェックポイントは、PD-1、PD-L1、PD-L2、及びCTLA-4からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、免疫チェックポイントは、PD-1である。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬またはレジメンは、少なくとも1つの組成物の前、それと同時に、またはその後に投与される。別の実施形態では、少なくとも1つの組成物は、がん

における増殖細胞の数を低減し、及び／またはがん細胞を含む腫瘍の体積もしくはサイズを低減する。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの組成物は、がん細胞を含む腫瘍に浸潤するCD8+T細胞の量及び／または活性を増加させる。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの組成物は、a)がん細胞を含む腫瘍に浸潤するM1マクロファージの量及び／または活性を増加させ、及び／またはb)がん細胞を含む腫瘍に浸潤するM2マクロファージの量及び／または活性を減少させる。

【0018】

一実施形態では、少なくとも1つの組成物と接触した骨髓由来細胞は、以下：a)単球及び／またはマクロファージによるCCR2及び／またはCSF1R受容体の減少した発現、b)単球及び／またはマクロファージによる表面抗原分類80(CD80)、CD86、MHCI、MHCI、インターロイキン1-ベータ(IL-1β)、IL-6、CCL3、CCL4、CXCL10、CXCL9、GM-CSF、及び／または腫瘍壊死因子アルファ(TNF-α)の増加した発現、c)単球及び／またはマクロファージによるCD206、CD163、CD16、CD53、VSG4、PSGL-1、TGFB、及び／またはIL-10の減少した発現、d)単球及び／またはマクロファージによるIL-1β、TNF-α、IL-12、IL-18、GM-CSF、CCL3、CCL4、及びIL-2からなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインもしくはケモカインの増加した分泌、e)単球及び／またはマクロファージによるIL-10の発現に対するIL-1β、IL-6、及び／またはTNF-αの発現の増加した比率、f)増加したCD8+細胞傷害性T細胞活性化、g)CD8+細胞傷害性T細胞活性化の増加した動員、h)増加したCD4+ヘルパーT細胞活性、i)CD4+ヘルパーT細胞活性の増加した動員、j)増加したNK細胞活性、k)NK細胞の増加した動員、l)増加した好中球活性、m)増加したマクロファージ活性、及び／またはn)顕微鏡法で評価した場合の、増加した紡錘形の形態、外観の平坦性、及び／または樹状突起の数のうちの1つ以上を呈する調節された炎症性表現型を有する。一実施形態では、骨髓由来細胞は、マクロファージ、単球、循環骨髓由来単球、組織常駐マクロファージ、臨床状態に関連するマクロファージ、1型マクロファージ、M1マクロファージ、2型マクロファージ、M2マクロファージ、M2cマクロファージ、M2dマクロファージ、及び／または腫瘍関連マクロファージ(TAM)である。別の実施形態では、がんは、中皮腫、腎臓腎明細胞癌、膠芽腫、肺腺癌、肺扁平上皮癌、膵臓腺癌、乳房浸潤癌、急性骨髓性白血病、副腎皮質癌、膀胱尿路上皮癌、脳低悪性度神経膠腫、乳房浸潤癌、子宮頸部扁平上皮癌及び子宮頸部腺癌、胆管癌、結腸腺癌、食道癌、多形性膠芽腫、頭頸部扁平上皮癌、嫌色素性腎臓、腎臓腎明細胞癌、腎臓腎乳頭細胞癌、肝臓肝細胞癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、リンパ系新生物びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、中皮腫、卵巣漿液性、嚢胞腺癌、膵臓腺癌、褐色細胞腫、傍神経節腫、前立腺腺癌、直腸腺癌、肉腫、皮膚皮膚黒色腫、胃腺癌、精巣胚細胞腫瘍、胸腺腫、甲状腺癌、子宮癌肉腫、子宮体子宮内膜癌、及びブドウ膜黒色腫からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、骨髓由来細胞は、ヒト腫瘍モデル、がんの動物モデル、及び／またはチグリコール腹膜炎モデル内に含まれる。さらに別の実施形態では、対象は、哺乳動物である。別の実施形態では、哺乳動物は、がんを煩うヒトなどのヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A-1】図1A～図1Dは、CSF1R(図1A)及びCCR2(図1B)を標的とするための選択されたオリゴヌクレオチド組成物に対する用量応答曲線を示し、CSF1R siRNA二本鎖及びバリエーション(図1C)、ならびにCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーション(図1D)を含む。

【図1A-2】図1A～図1Dは、CSF1R(図1A)及びCCR2(図1B)を標的とするための選択されたオリゴヌクレオチド組成物に対する用量応答曲線を示し、CSF1R siRNA二本鎖及びバリエーション(図1C)、ならびにCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーション(図1D)を含む。

【図1B-1】図1A～図1Dは、CSF1R（図1A）及びCCR2（図1B）を標的とするための選択されたオリゴヌクレオチド組成物に対する用量応答曲線を示し、CSF1R siRNA二本鎖及びバリエーション（図1C）、ならびにCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーション（図1D）を含む。

【図1B-2】図1A～図1Dは、CSF1R（図1A）及びCCR2（図1B）を標的とするための選択されたオリゴヌクレオチド組成物に対する用量応答曲線を示し、CSF1R siRNA二本鎖及びバリエーション（図1C）、ならびにCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーション（図1D）を含む。

【図1C-1】図1A～図1Dは、CSF1R（図1A）及びCCR2（図1B）を標的とするための選択されたオリゴヌクレオチド組成物に対する用量応答曲線を示し、CSF1R siRNA二本鎖及びバリエーション（図1C）、ならびにCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーション（図1D）を含む。

【図1C-2】図1A～図1Dは、CSF1R（図1A）及びCCR2（図1B）を標的とするための選択されたオリゴヌクレオチド組成物に対する用量応答曲線を示し、CSF1R siRNA二本鎖及びバリエーション（図1C）、ならびにCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーション（図1D）を含む。

【図1D-1】図1A～図1Dは、CSF1R（図1A）及びCCR2（図1B）を標的とするための選択されたオリゴヌクレオチド組成物に対する用量応答曲線を示し、CSF1R siRNA二本鎖及びバリエーション（図1C）、ならびにCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーション（図1D）を含む。

【図1D-2】図1A～図1Dは、CSF1R（図1A）及びCCR2（図1B）を標的とするための選択されたオリゴヌクレオチド組成物に対する用量応答曲線を示し、CSF1R siRNA二本鎖及びバリエーション（図1C）、ならびにCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーション（図1D）を含む。

【図2】図2は、siRNA二本鎖の組合せを用いてCSF1R及びCCR2の両方をサイレンシングした結果を示す。

【図3-1】図3A～図3Cは、mCSF1R及び／またはmCCR2 siRNAとともに製剤化したLNPの腹腔内投与後のマウスの腹腔マクロファージにおけるmCSF1R及びmCCR2発現サイレンシングを示す。図3A及び3Bは、グループあたりn=1の代表マウスに対するフローサイトメトリ発現プロットを示す。図3Cは、グループあたりn=5のマウスに対する正規化されたmCSF1R及びmCCR2 MFIを示す。

【図3-2】図3A～図3Cは、mCSF1R及び／またはmCCR2 siRNAとともに製剤化したLNPの腹腔内投与後のマウスの腹腔マクロファージにおけるmCSF1R及びmCCR2発現サイレンシングを示す。図3A及び3Bは、グループあたりn=1の代表マウスに対するフローサイトメトリ発現プロットを示す。図3Cは、グループあたりn=5のマウスに対する正規化されたmCSF1R及びmCCR2 MFIを示す。

【図4-1】図4A～Cは、mCSF1R及びmCCR2 siRNAとともに製剤化したLNPの静脈内投与後のマウスの血中単球におけるmCSF1R及びmCCR2サイレンシングを示す。図4A～Cは、n=1つの代表的マウスに対するグループごとのフローサイトメトリ式プロットを示す。

【図4-2】図4A～Cは、mCSF1R及びmCCR2 siRNAとともに製剤化したLNPの静脈内投与後のマウスの血中単球におけるmCSF1R及びmCCR2サイレンシングを示す。図4A～Cは、n=1つの代表的マウスに対するグループごとのフローサイトメトリ式プロットを示す。図4Dは、n=3のマウスに対するグループごとの正規化されたmCSF1R及びmCCR2 MFIを示す。

【図5】CSF1R/CCR2 psCHECK（商標）-2ベクターを用いた単一読み出しインビトロモデル受容体システムの結果を示す。ウミシイタケ／ホタル発光は、Dual-Glo（登録商標）ルシフェラーゼアッセイでプラスミドでトランスフェクトされた未処理の無細胞に正規化してプロットする。データは、平均±標準偏差（n=4）として提示され、4点シグモイド曲線がデータに適合した。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明は、単独または組み合わせてのいずれかの、CCR2及びCSF1Rを標的とするオリゴヌクレオチド組成物を含む組成物、ならびにそのような組成物を含む製剤を特徴とする。このような組成物及び製剤は、疾患状態における抗炎症性マクロファージを炎症誘発性マクロファージに変換するなど、骨髄細胞由来細胞の状態を調節するため、またはCD8+T細胞活性を増加することなどによる免疫応答を促進するために含む、いくつかの方法で使用することができる。組成物及び製剤はまた、腫瘍形成マクロファージを抗腫瘍性マクロファージに変換することによってがんを治療するような、骨髄細胞由来細胞によって媒介される免疫応答を調節するためにも使用することができる。

10

【0021】

特に、本発明は、単球及びマクロファージを含む骨髄由来細胞におけるCCR2及び／またはCSF1Rの機能に拮抗するためにCCR2及び／またはCSF1Rにハイブリダイズする低分子干渉RNA (siRNA) 分子を提供する。低分子干渉RNA分子（当該技術分野では「短干渉RNA」としても知られている）は、RNA干渉 (RNAi) を誘導または媒介することができる。RNAiは、クロマチン再構築、タンパク質翻訳の阻害、または直接mRNA分解により、低分子RNA分子が、標的化mRNA分子を中和することによって遺伝子発現を阻害する転写後プロセスであり、配列特異的遺伝子サイレンシングをもたらす。投与時に、siRNA分子は、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に動員される。この複合体は、siRNA分子を介して、実質的に相補的な構造（すなわち、転写された遺伝子のmRNA）と結合し、エンドヌクレアーゼ活性によってそれらを分解することができる。これは最終的に、siRNA分子と相補的なmRNAをコードする対応する遺伝子の発現の阻害につながる（例えば、McManus and Sharp (2002) Nat. Rev. Genet. 3: 737-747）。ある特定のsiRNA分子は、標的遺伝子の特異的なオンターゲットサイレンシングを可能にする。従来の小さな治療用分子と比較して、siRNA分子は、目的の事実上いかなる遺伝子にも影響を与えるように設計することができるため、非常に強力な「非薬物性」の標的に作用することができるという利点を提供する。siRNA分子はゲノムに統合せず、それらは優れた安全性を示すため、複数の疾患を引き起こす遺伝子を標的とするsiRNA分子のカクテルを、単一の送達システムで送達して、複雑な疾患（例えば、がん）を制御することが可能である。本発明に従って、CCR2及び／またはCSF1Rを標的とするsiRNA分子のカクテルを、単球及びマクロファージを含む骨髄由来細胞に送達することができる。

20

30

【0022】

I. 定義

いくつかの実施形態では、「約」という用語は、測定された値の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%の範囲内、またはその間の任意の範囲（例えば、プラスまたはマイナス2%〜6%）の値を包含する。いくつかの実施形態では、「約」という用語は、実験間に存在する変動など、方法、アッセイ、または測定した値における誤差の固有の変動を指す。

40

【0023】

「活性化受容体」という用語は、抗原、複合体化抗原（例えば、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) ポリペプチドの文脈において）と結合する、または抗体と結合する免疫細胞受容体を含む。かかる活性化受容体には、T細胞受容体 (TCR)、B細胞受容体 (BCR)、サイトカイン受容体、LPS受容体、補体受容体、Fc受容体、及び他のITAM含有受容体が含まれる。例えば、T細胞受容体は、T細胞上に存在し、CD3ポリペプチドと関連する。T細胞受容体は、MHCポリペプチドとの関連で抗原によって（及びポリクローナルT細胞活性化試薬によって）刺激される。TCRを介したT細胞活性化は、例えば、タンパク質リン酸化、膜脂質変化、イオンフラックス、環状ヌクレオチド改変、RNA転写変化、タンパク質合成変化、及び細胞体積変化など、多くの変化をもたらす。

50

サイトカイン受容体または病原体関連分子パターン（PAMP）受容体などの活性化受容体を介したマクロファージのT細胞活性化と同様に、タンパク質リン酸化、表面受容体表現型に対する改変、タンパク質合成及び放出、ならびに形態学的変化などの変化をもたらす。

【0024】

「投与する」という用語は、宿主及び／または対象などの目的の生物学的標的への、または（必要に応じて）その上への薬剤の実際の物理的導入に関する。組成物は、インビトロまたはインビボで細胞に投与することができる（例えば、「接触する」）。組成物は、適切な投与経路を介してインビボで対象に投与することができる。組成物を宿主に導入する任意のすべての方法が、本発明に従って企図される。本方法は、任意の特定の導入手段に依存するものではなく、そのように解釈されるべきではない。導入手段は当業者に周知であり、本明細書でも例示されている。この用語には、代理人が意図した機能を実行できるようにする投与経路が含まれる。使用できる身体の治療のための投与経路の例には、注入（皮下、静脈内、非経口、腹腔内、髄腔内など）、経口、吸入、及び経皮経路が含まれる。注入は、ボーラス注入であり得るか、または持続注入であり得る。投与経路に応じて、薬剤は、その意図された機能を実行する能力に有害な影響を及ぼし得る自然条件から薬剤を保護するために、選択された材料でコーティングする、またはその中に配置することができる。薬剤は、単独で、または薬学的に許容される担体と組み合わせて投与することができる。薬剤はまた、インビボでその活性形態に変換されるプロドラッグとして投与することができる。

【0025】

「薬剤」という用語は、化合物、超分子複合体、材料、及び／またはそれらの組み合わせもしくは混合物を指す。化合物（例えば、分子）は、化学式、化学構造、または配列で表すことができる。薬剤の代表的な非限定的な例には、例えば、低分子、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド（例えば、RNAi剤、siRNA、miRNA、piRNA、mRNA、アンチセンスポリヌクレオチド、アプタマーなど）、脂質、及び多糖が含まれる。一般に、薬剤は、当該技術分野で即知の任意の好適な方法を使用して得ることができる。いくつかの実施形態では、薬剤は、対象（例えば、ヒト）における疾患または障害（例えば、がん）を治療する際に使用するための「治療剤」であり得る。

【0026】

「アゴニスト」という用語は、標的（複数可）（例えば、受容体）と結合し、かつ標的（複数可）の生物学的活性を活性化または増加させる薬剤を指す。例えば、「アゴニスト」抗体は、それが結合する抗原（複数可）の生物学的活性を活性化または増加させる抗体である。

【0027】

「アンタゴニスト」または「拮抗的」という用語は、CCR2及び／またはCSF1Rなどの標的タンパク質、ならびにアイソフォーム、バリエーション、及びそれらのオソログの生物学的活性または活性化を、直接的または間接的に、実質的に反作用、低減、または阻害することができる分子を指す。CCR2またはCSF1RにハイブリダイズするsiRNA分子に加えて、アンタゴニストは、モノクローナル抗体、競合ペプチド、ならびにCCR2及び／またはCSF1Rの活性を減少させる低分子を含むことができる。例えば、CCR2アンタゴニストは、CCR2シグナル伝達を阻害する化合物であり得、CSF1Rアンタゴニストは、CSF1Rシグナル伝達を阻害する化合物であり得る。

【0028】

「がん」または「腫瘍」または「過剰増殖性」という用語は、制御されていない増殖、不死、浸潤性または転移性の能力、急速な成長、及びある特定の特徴的な形態学的特性など、がんを引き起こす細胞に典型的な特徴を有する細胞の存在を指す。いくつかの実施形態では、かかる細胞は、PD-1、PD-L1、PD-L2、及び／またはCTLA-4などの免疫チェックポイントタンパク質の発現及び活性のために、かかる特徴を部分的または完全に示す。

【0029】

がん細胞は、腫瘍の形態であることが多いが、かかる細胞は、動物内に単独で存在し得るか、または非腫瘍化がん細胞、例えば、白血病細胞などであり得る。本明細書で 사용되는場合、「がん」という用語は、前悪性、ならびに悪性のがんを含む。がんには、これらに限定されないが、様々ながん、膀胱（進行性及び転移性膀胱癌を含む）、乳房、結腸（結腸直腸癌を含む）、腎臓、肝臓、肺（小細胞及び非小細胞肺癌ならびに肺腺癌を含む）、卵巣、前立腺、精巣、泌尿生殖器、リンパ系、直腸、喉頭、膵臓（外分泌性膵臓癌を含む）、食道、胃、胆嚢、頸部、甲状腺、及び皮膚（扁平上皮癌を含む）を含むがん腫；白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、毛細胞リンパ腫、組織球性リンパ腫、及びパーキットリンパ腫を含むリンパ球系の造血腫瘍；急性及び慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、ならびに前骨髄球性白血病を含む骨髄系の造血腫瘍；星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、及び神経鞘腫を含む中枢神経系ならびに末梢神経系の腫瘍；線維肉腫、横紋筋肉腫、及び骨肉腫を含む間葉系腫瘍；黒色腫、色素性乾皮症、角膜直腸腫、セミノーマ、甲状腺濾胞癌、及び奇形腫を含む他の腫瘍；黒色腫、切除不能なステージⅢⅢまたはⅣⅣの悪性黒色腫、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、胃腸癌、腎癌、卵巣癌、肝臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、膵臓癌、多形性膠芽腫、頸部癌、胃癌（stomach cancer）、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、頭頸部癌、胃癌（gastric cancer）、胚細胞腫瘍、骨癌、骨腫瘍、成人の骨の悪性線維性組織球腫；小児の骨の悪性線維性組織球腫、肉腫、小児肉腫、鼻副鼻腔ナチュラルキラー、新生物、形質細胞新生物；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；精巣胚細胞腫瘍、眼内黒色腫、骨髄異形成症候群；骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、滑膜肉腫、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病（Ph+ALL）、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、肥満細胞症及び肥満細胞症に関連する症状、ならびにあらゆるその転移が含まれる。さらに、障害には、他のがんに加えて、ヒトにおける色素性蕁麻疹、びまん性皮膚肥満細胞症、孤立性肥満細胞腫などの肥満細胞症、ならびにイヌの肥満細胞腫、及び水疱性紅皮症及び遠隔血管拡張性肥満細胞腫、関連する血液学的障害を伴う肥満細胞腫などのいくつかの希少なサブタイプ、例えば骨髄増殖性もしくは骨髄異形成症候群、または急性白血病、肥満細胞症に関連する骨髄増殖性障害、肥満細胞白血病などが含まれる。他のがんもまた、膀胱、尿路上皮癌、乳房、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、胃、子宮頸部、甲状腺、精巣、特に精巣セミノーマ、及び扁平上皮癌を含む皮膚を含む癌腫；消化管間質腫瘍（「GIST」）；白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、有毛細胞リンパ腫、及びパーキットリンパ腫を含むリンパ球系の造血腫瘍；急性及び慢性骨髄性白血病ならびに前骨髄球性白血病を含む骨髄系の造血腫瘍；線維肉腫及び横紋筋肉腫を含む間葉起源の腫瘍；黒色腫、セミノーマ、テトラトカルシノーマ、神経芽細胞腫、及び神経膠腫を含む他の腫瘍；星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、及び神経鞘腫を含む中枢ならびに末梢神経系の腫瘍；線維肉腫、横紋筋肉腫、及び骨肉腫を含む間葉起源の腫瘍；黒色腫、色素性乾皮症、角膜直腸腫、セミノーマ、甲状腺濾胞癌、奇形腫、化学療法抵抗性の非セミノーマ性胚細胞腫瘍、カボジ肉腫を含む他の腫瘍、ならびにあらゆるその転移を含むがこれらに限定されない障害の範囲に含まれる。本発明により包含される方法に適用可能ながんの種類他の非限定的な例には、ヒト肉腫及びがん腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、軟骨腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜肉腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胚性癌、ウィルムス腫瘍、骨癌、脳腫瘍、肺癌（肺腺癌を含む）、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫瘍、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫；白血病、例えば、

10

20

30

40

50

急性リンパ性白血病及び急性骨髄球性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性及び赤白血病）；慢性白血病（慢性骨髄性（顆粒球）白血病及び慢性リンパ性白血病）；真性多血症、リンパ腫（ホジキン病及び非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ワルデンストレーママクログロブリン血症、及び重鎖疾患が含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、本質的に上皮性であり、これらに限定されないが、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、婦人科癌、腎癌、喉頭癌、肺癌、口腔癌、頭頸部癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、または皮膚癌が含まれる。いくつかの実施形態では、上皮癌は、非小細胞肺癌、非乳頭状腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌（例えば、漿液性卵巣癌）、または乳癌である。上皮癌は、漿膜、類内膜、粘液性、明細胞、プレナー、または未分化を含むがこれらに限定されない他の様々な方法で特徴付けすることができる。

10

【0030】

「コード領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を指し、一方、「非コード領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域を指す（例えば、5'及び3'非翻訳領域）。

【0031】

「相補的」という用語は、2つの核酸鎖の領域間または同じ核酸鎖の2つの領域間の配列相補性の広い概念を指す。第1の核酸領域のアデニン残基は、残基がチミンまたはウラシルである場合、第1の領域に対して逆平行である第2の核酸領域の残基と特異的な水素結合を形成（「塩基対形成」）できることが知られている。同様に、第1の核酸鎖のシトシン残基は、残基がグアニンである場合、第1の鎖に対して逆平行である第2の核酸鎖の残基と塩基対形成できることが知られている。核酸の第1の領域は、2つの領域が逆平行な様式で配置されるときに第1の領域の少なくとも1個のヌクレオチド残基が、第2の領域の残基と塩基対形成できる場合、同じかまたは異なる核酸の第2の領域と相補的である。好ましくは、第1の領域は第1の部分を含み、第2の領域は第2の部分を含み、それにより、第1及び第2の部分が逆平行の様式で配置される場合、第1の部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%、またはそれ以上が、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対形成できる。より好ましくは、第1の部分のすべてのヌクレオチド残基は、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対形成できる。いくつかの実施形態では、相補的ポリヌクレオチドは、「十分に相補的」であり得るか、または「十分な相補性」、すなわち、二本鎖を維持するのに十分な相補性及び／または所望の活性を有することができる。例えば、RNAi剤の場合、かかる相補性は、mRNAの翻訳を部分的または完全に防ぐのに十分な、薬剤と標的mRNAとの間の相補性である。例えば、「標的特異的RNA干渉（RNAi）を指示するために標的mRNA配列に十分に相補的な配列」を有するsiRNAは、siRNAが、RNAi機構またはプロセスによる標的mRNAの破壊を誘発するのに十分な配列を有することを意味する。

20

30

【0032】

「実質的に相補的」という用語は、2つの核酸間の塩基対二本鎖領域における相補性を指し、末端オーバーハングまたは2つの二本鎖領域間のギャップ領域などの任意の一本鎖領域ではない。相補性は完全である必要はなく、塩基対の不一致はいくつあってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書において2つの配列が「実質的に相補的」と称される場合、その配列は、選択された反応条件下でハイブリダイズするために互いに十分に相補的であることを意味する。したがって、実質的に相補的な配列は、二本鎖領域において、少なくとも100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、70、65、60パーセント以上、またはその間の任意の数の塩基対相補性を有する配列を指し得る。

40

【0033】

本明細書で使用される場合、「合同療法」及び「併用療法」という用語は、2つ以上の治療薬の投与を指し、例えば、CCR2及びCSF1Rの調節因子の組み合わせ、CCL2またはCSF1の阻害剤などの少なくとも1つの追加の治療薬とのCCR2またはCS

50

F 1 R の調節因子の組み合わせ、免疫チェックポイント療法などの追加の薬剤とさらに組み合わせた C C R 2 及び C S F 1 R の調節因子の組み合わせなどを指す。併用療法を構成する異なる薬剤は、1つの他のものまたは複数の他のものの投与と同時に、その前、またはその後に投与することができる。併用療法は、これらの治療薬の併用から有益な（相加的または相乗的）効果を提供することを目的とする。これらの治療薬の組み合わせの投与は、定義された期間（通常、選択される組み合わせに応じて、数分間、数時間、数日間、または数週間）にわたって実施することができる。併用療法では、併用治療薬は、連続様式で、または実質的に同時に適用することによって適用することができる。

【0034】

「サイトカイン」という用語は、免疫系のある特定の細胞によって分泌される物質を指し、他の細胞に生物学的影響を有する。サイトカインは、インターフェロン、インターロイキン、及び成長因子など、いくつかの様々な物質であり得る。

【0035】

「遺伝子」という用語は、機能を有する分子（例えば、RNA、タンパク質など）をコードするヌクレオチド（例えば、DNA）配列を包含する。遺伝子は一般に、2つの相補的なヌクレオチド鎖（すなわち、dsDNA）、コード鎖及び非コード鎖を含む。DNA転写について言及する場合、コード鎖は、その塩基配列が生成されたRNA転写物の塩基配列に対応するDNA鎖である（但し、チミンはウラシルに置き換えられる）。コード鎖にはコドンが含まれ、一方で非コード鎖にはアンチコドンが含まれる。転写中、RNA Pol II は非コード鎖と結合し、アンチコドンを読み取り、その配列を転写して、相補的な塩基を有数RNA転写物を合成する。いくつかの実施形態では、列挙される遺伝子配列（すなわち、DNA配列）は、コード鎖の配列である。

【0036】

「遺伝子産物」（本明細書では「遺伝子発現産物」または「発現産物」とも称される）という用語は、遺伝子から転写された核酸（例えば、mRNA）などの遺伝子の発現から生じる産物、及びかかるmRNAの翻訳から生じるポリペプチドまたはタンパク質を包含する。特定の遺伝子産物は、例えば細胞中でプロセッシングまたは修飾を受けることができることが理解されよう。例えば、mRNA転写物は、翻訳前にスプライシング、ポリアデニル化などをすることができ、及び／またはポリペプチドは、分泌シグナル配列の除去、オルガネラ標的配列の除去、もしくはリン酸化、グリコシル化、メチル化、脂肪アシル化などの修飾などの同時翻訳または翻訳後プロセッシングを受けることができる。「遺伝子産物」という用語は、かかるプロセッシングまたは修飾された形態を包含する。ヒトを含む様々な種のゲノムmRNA及びポリペプチド配列は当該技術分野で即知であり、National Center for Biotechnology Information (ncbi.nih.gov) または Universal Protein Resource (uniprot.org) で利用可能なデータベースなど、公的にアクセス可能なデータベースで利用可能である。他のデータベースには、例えば、GenBank、RefSeq、Gene、UniProtKB/SwissProt、UniProtKB/Tremblなどが含まれる。一般に、NCBI 参照配列データベースの配列は、目的の遺伝子についての遺伝子産物配列として使用できる。遺伝子の複数の対立遺伝子が同じ種の個体間に存在し得ることが理解されよう。特定のタンパク質の複数のアイソフォームは、選択的RNAスプライシングまたは編集の結果として、存在し得る。一般に、本開示の態様が遺伝子または遺伝子産物に関連する場合、特に明記しない限り、該当する場合、対立遺伝子バリエーションまたはアイソフォームに関連する実施形態が包含される。特定の実施形態は、特定の配列（複数可）、例えば、特定の対立遺伝子（複数可）またはアイソフォーム（複数可）に向けることができる。

【0037】

「生成する」という用語は、直接的または間接的な作用などによって、所望の結果が達成される任意の様式を包含する。例えば、本明細書に記載される調節された表現型を有する細胞は、本明細書に記載される1つ以上のバイオマーカーを調節する少なくとも1つの

薬剤との接触などによる直接的な作用によって、及び／または所望の物理的、遺伝的、及び／または表現型属性を有する細胞を増殖させることなどによる間接的な作用によって生成することができる。

【0038】

細胞性バイオマーカー発現に関連する「高」、「低」、「中間」、及び「陰性」という用語は、1つ以上の参照細胞によるバイオマーカーの細胞発現と比較して発現されるバイオマーカーの量を指す。バイオマーカー発現は、1つ以上のバイオマーカーゲノム核酸、リボ核酸、及び／またはポリペプチドの細胞レベル、活性、構造などの分析を含むがこれらに限定されない、本明細書に記載される任意の方法に従って決定することができる。一実施形態では、用語は、それぞれ最高、中間、または最低レベルでバイオマーカーを発現する細胞の集団の定義された割合を指す。かかる割合は、バイオマーカーを高度に発現するかまたは弱く発現する細胞の集団の上位0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%以上、またはその間の任意の範囲として定義することができる。「低」という用語は、バイオマーカー発現が「陰性」であるため、バイオマーカーを検出可能に発現しない細胞は除外する。「中間」という用語は、バイオマーカーを発現するが、「高」レベルでそれを発現する集団よりも低いレベルの細胞を含む。別の実施形態では、用語は、定性的または統計的プロット領域によって同定されるバイオマーカー発現の細胞集団を指すこともあり、または代替的に指すこともある。例えば、フローサイトメトリを使用して分類された細胞集団は、当該技術分野で周知の方法に従って、平均蛍光強度などに基づいてなど、検出可能な部分的分析に基づいて別個のプロットを同定することにより、バイオマーカー発現レベルに基づいて決定することができる。かかるプロット領域は、目的のバイオマーカーのための当該技術分野で周知の方法に基づいて、数、形状、重複などに従って洗練することができる。さらに別の実施形態では、用語はまた、追加のバイオマーカーの発現の存在または不在に従って決定することができる。

【0039】

「実質的に同一」という用語は、例えば以下に記載される方法を使用して最適に整列された場合に、第2の核酸またはアミノ酸配列と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%配列同一性を共有する核酸またはアミノ酸配列を指す。「実質的同一性」は、全長配列、機能ドメイン、コード及び／または制御配列、エクソン、イントロン、プロモーター、ならびにゲノム配列などの、様々な種類及び長さの配列を指すために使用することができる。2つのポリペプチドまたは核酸配列間の配列同一性パーセントは、例えば、BLASTプログラム(Basic Local Alignment Search Tool; (Altschul et al. (1995) J. Mol. Biol. 215: 403-410)、BLAST-2、BLAST-P、BLAST-N、BLAST-X、WU-BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、CLUSTAL、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当該技術分野の範囲内である様々な方法で決定される。さらに、当該技術分野の当業者は、比較される配列の長さによって最大の整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、整列を測定するための適切なパラメータを決定することができる。DNA配列をRNA配列と比較する場合に配列同一性を決定する目的で、チミンヌクレオチドはウラシルヌクレオチドと同等であることが理解される。保存的置換は、通常、以下の群、すなわち、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、リジン、アルギニン、及びフェニルアラニン、チロシン内の置換を含む。

【0040】

「免疫細胞」という用語は、免疫応答に直接的または間接的に関与することが可能な細

胞を指す。免疫細胞には、これらに限定されないが、T細胞、B細胞、抗原提示細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NK）細胞、リンホカイン活性化キラー（LAK）細胞、単球、マクロファージ、好酸球、好塩基球、好中球、顆粒球、肥満細胞、血小板、ランゲルハンス細胞、幹細胞、末梢血単核細胞、細胞傷害性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）などが含まれる。「抗原提示細胞」（APC）は、T細胞を活性化することができる細胞であり、これらに限定されないが、単球／マクロファージ、B細胞、及び樹状細胞（DC）を含む。「樹状細胞」または「DC」という用語は、リンパ組織または非リンパ組織に見られる形態学的に類似した細胞型の多様な集団の任意のメンバーを指す。これらの細胞は、その特有の形態及び高レベルの表面MHCクラスII発現を特徴とする。DCは、多くの組織源から単離できる。DCは、MHC制限T細胞を感作する高い能力を有し、原位置でT細胞に抗原を提示するのに非常に有効である。抗原は、T細胞の発達及び寛容の間に発現される自己抗原、ならびに正常な免疫過程の間に存在する外来抗原であり得る。「好中球」という用語は、一般に、自然免疫系の一部を構成する白血球を指す。好中球は、典型的には、約2～5個の葉を含む分割型の核を有する。好中球は、外傷後数分以内に傷害部位に頻繁に遊走される。好中球は、傷害または感染部位で、酸化剤、プロテアーゼ、及びサイトカインを含む細胞傷害性化合物を放出することによって機能する。「活性化DC」という用語は、抗原でパルスされており、免疫細胞を活性化することが可能なDCである。「NK細胞」という用語は、当該技術分野でその一般的な意味を有し、ナチュラルキラー（NK）細胞を指す。当業者は、例えば特定の表現型マーカー（例えば、CD56）の発現を決定することによってNK細胞を容易に同定し、例えば、異なる種類のサイトカインを発現する能力または細胞傷害性を誘導する能力に基づいてその機能を同定することができる。「B細胞」という用語は、骨髄及び／または脾臓に由来する免疫細胞を指す。B細胞は、抗体を生成する形質細胞に発達することができる。「T細胞」という用語は、CD8＋T細胞及びCD4＋T細胞を含む、様々な細胞性免疫応答に関与する胸腺由来の免疫細胞を指す。TconvまたはTeffとしても知られる従来のT細胞は、エフェクター機能（例えば、サイトカイン分泌、細胞傷害性活性、抗自己認識など）を有し、1つ以上のT細胞受容体のその発現により免疫応答を増加させる。TconvまたはTeffは一般に、Tregではない任意のT細胞集団として定義され、例えば、ナイーブT細胞、活性化T細胞、メモリーT細胞、休止Tconv、または例えば、Th1もしくはTh2系統に分化したTconvが含まれる。いくつかの実施形態では、Teffは、非制御性T細胞（Treg）のサブセットである。いくつかの実施形態では、Teffは、CD4＋ヘルパーTリンパ球（例えば、Th0、Th1、Tfh、またはTh17など）及びCD8＋細胞傷害性T細胞（リンパ球）などのCD4＋TeffまたはCD8＋Teffである。本明細書でさらに記載されるように、細胞傷害性T細胞は、CD8＋Tリンパ球である。「ナイーブTconv」は、CD4＋T細胞であり、骨髄中で分化されており、胸腺中で中枢選択の正及び負のプロセスを首尾よく受けるが、抗原への曝露によってまだ活性化されていない。ナイーブTconvは一般に、L-セレクチン（CD62L）の表面発現、CD25、CD44、またはCD69などの活性化マーカーの不在、及びCD45ROなどのメモリーマーカーの不在を特徴とする。したがって、ナイーブTconvは、静止状態で非分裂性であると考えられており、恒常性生存のためにインターロイキン-7（IL-7）及びインターロイキン-15（IL-15）を必要とする（少なくともWO2010/101870を参照されたい）。かかる細胞の存在及び活性は、免疫応答を抑制するという文脈において望ましくない。Tregとは異なり、Tconvはアネルギー性ではなく、抗原系T細胞受容体の活性化に応答して増殖することができる（Lechler et al. (2001) Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 356: 625-637）。腫瘍では、疲労した細胞がアネルギーの特徴を表し得る。

【0041】

「免疫調節因子」という用語は、免疫応答を調節する物質、薬剤、シグナル伝達経路、またはそれらの構成成分を指す。免疫応答に関する「制御する」、「修飾する」、または

10

20

30

40

50

「調節する」という用語は、免疫系の細胞またはかかる細胞の活性における任意の改変を指す。かかる制御には、免疫系（またはその別個の部分）の刺激または抑制が含まれ、これは、様々な細胞型の数の増加もしくは減少、これらの細胞の活性の増加もしくは減少、または免疫系内で発生し得る任意の他の変化によって現れ得る。阻害性及び刺激性の両方の免疫調節因子が同定されており、そのうちのいくつかはがんの微小環境で増強された機能を有し得る。

【0042】

「免疫応答」という用語は、細菌、ウイルス、ならびに異物及び有害に見える物質などの「異物」に対して身体が発症する防御的応答を意味する。特に免疫応答は、免疫系の細胞（例えば、Tリンパ球、Bリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞、及び好中球）及びこれらの細胞または肝臓のいずれかによって生成される可溶性高分子（抗体（体液性応答）、サイトカイン、及び補体を含む）の活性化及び／または作用であり、脊椎動物の身体に侵入する病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、がん性もしくは他の異常な細胞、または自己免疫もしくは病理学的炎症の場合は正常なヒト細胞もしくは組織から選択的な標的化、結合、損傷、破壊、及び／または排除が生じる。抗がん免疫応答は、身体が異常な腫瘍細胞を認識し、免疫系の自然免疫及び適応の両方を開始して危険ながん細胞を排除する免疫監視メカニズムを指す。

【0043】

自然免疫系は、他の生物による感染から宿主を守る細胞（例えば、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好酸球、好塩基球、ならびにマクロファージ、好中球、及び樹状細胞を含む食細胞）及びメカニズムを含む非特異的免疫系である。自然免疫応答は、サイトカインの生成、及び活性補体カスケード及び適応免疫応答を開始することができる。適応免疫システムは、抗原提示細胞による抗原提示、抗原特異的T細胞の活性化及び細胞毒性効果など、高度に特殊化された全身細胞の活性化及びプロセスに必要であり、関与する特定の免疫系である。

【0044】

「免疫療法剤」という用語は、宿主免疫系を刺激して対象の腫瘍またはがんに対する免疫応答を生成することができる任意の分子、ペプチド、抗体または他の薬剤を含むことができる。様々な免疫療法剤が、本明細書に記載される組成物及び方法において有用である。

【0045】

「阻害」または「下方制御」という用語は、例えば、特定の作用、機能、または相互作用の低減、制限、または遮断を含む。いくつかの実施形態では、がんの少なくとも1つの症状が軽減、終結、減速、または予防される場合、がんは「阻害」される。本明細書で 사용되는場合、さらに、がんの再発または転移が減少、減速、遅延、または予防される場合、がんは「阻害」される。同様に、タンパク質の機能などの生物学的機能は、野生型状態のような対照などの参照状態と比較して低減すると阻害される。かかる阻害または欠乏は、特定の時間及び／または位置での薬剤の適用などによって誘発され得るか、または遺伝性変異などによって構成的であり得る。かかる阻害または欠乏はまた、部分的または完全であり得る（例えば、野生型状態のような対照などの参照状態と比較して本質的に測定可能な活性がない）。本質的に完全な阻害または欠乏は、遮断されたとして称される。「促進」または「上方制御」という用語は、反対の意味を有する。

【0046】

「相互作用」という用語は、2つの分子間の相互作用を指す場合、互いの分子同士の物理的接触（例えば、結合）を指す。一般に、かかる相互作用は、該分子の一方または両方の活性（生物学的効果を生成する）をもたらす。活性は、分子の一方または両方の直接的な活性であり得る（例えば、シグナル伝達）。代替的に、相互作用の一方または両方の分子は、そのリガンドと結合するのを防ぐことができ、したがって、リガンド結合活性に関して不活性に保つことができる（例えば、そのリガンドと結合し、共刺激を誘発または阻害する）。かかる相互作用を阻害すると、相互作用に関与する1つ以上の分子の活性の崩

壊をもたらす。かかる相互作用を増強することは、当該物理的接触の可能性を延長または増加させ、当該活性の可能性を延長または増加させる。

【0047】

「微小環境」という用語は、一般に、目的の組織領域内の局所領域を指し、例えば、「腫瘍微小環境」を指すことができる。「腫瘍微小環境」または「TME」という用語は、腫瘍細胞とその環境との間のクロストークを可能にするのに役立つ腫瘍細胞と絶えず相互作用する周囲の微小環境を指す。腫瘍微小環境には、腫瘍の細胞環境、周囲の血管、免疫細胞、線維芽細胞、骨髄由来の炎症細胞、リンパ球、シグナル伝達分子、及び細胞外マトリックスが含まれ得る。腫瘍環境は、成長及び生存を確実にするために腫瘍微小環境によって支援及び影響を受ける腫瘍細胞または悪性細胞を含み得る。腫瘍微小環境には、リンパ球及び骨髄細胞などの腫瘍浸潤免疫細胞も含まれ、これは、抗腫瘍免疫応答、ならびに腫瘍の構造的完全性に寄与する腫瘍関連線維芽細胞及び内皮細胞などの間質細胞を刺激または阻害することができる。間質細胞には、内皮細胞及び周皮細胞など、腫瘍に関連する血管を構成する細胞が含まれ、これらは、構造的完全性（線維芽細胞）に寄与する細胞、ならびに腫瘍関連マクロファージ（TAM）、及び単球、好中球（PMN）、樹状細胞（DC）、T及びB細胞、肥満細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞を含む浸潤する免疫細胞である。間質細胞は、腫瘍細胞性の大部分を構成するが、固形腫瘍の主要な細胞型はマクロファージである。

10

【0048】

「調節する」という用語及びその文法上の同等物は、増加または減少（例えば、サイレンシング）のいずれか、言い換えれば、上方制御または下方制御のいずれかを指す。

20

【0049】

「末梢血細胞サブタイプ」という用語は、これらに限定されないが、好酸球、好中球、T細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、顆粒球、及びB細胞を含む末梢血に通常見られる細胞型を指す。

【0050】

「予防（prevent）」、「予防する（preventing）」、「予防（prevention）」、「予防的治療」などの用語は、疾患、障害、もしくは状態を有さないが、それらを発症するリスクがある、または発症しやすい対象において疾患、障害、または状態を発症する可能性を低減することを指す。

30

【0051】

「プローブ」という用語は、特に意図された標的分子、例えば、バイオマーカー核酸によってコードされるかまたはそれに対応するヌクレオチド転写物もしくはタンパク質と選択的に結合することができる任意の分子を指す。プローブは、当業者によって合成されるか、または適切な生物学的調製物から誘導され得る。標的分子を検出する目的で、本明細書に記載されているように、プローブを標識するように特異的に設計することができる。プローブとして利用できる分子の例には、これらに限定されないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体、及び有機分子が含まれる。

【0052】

「比率」という用語は、2つの数値（例えば、スコア、合計など）間の関係を指す。しかし、比率は特定の順序（例えば、a対bまたはa:b）で表すことができ、当該技術分野の通常の知識を有する者は、比率に基づく傾向の観察及び相関を逆転させることができるが、数の間の基礎となる関係は、基礎となる関係の重要性を失うことなく任意の順序で表現できることを認識するであろう。

40

【0053】

「受容体」という用語は、標的器官、組織、または細胞型の細胞の表面に一般的に存在する、天然に存在する分子または分子の複合体を指す。

【0054】

「がん応答」、「免疫療法への応答」、または「T細胞を媒介した細胞傷害性／免疫療法の併用療法の調節因子への応答」という用語は、T細胞を媒介した細胞傷害性の調節因

50

子などのがん媒介物に対する過剰増殖性障害（例えば、がん）の任意の応答、ならびに免疫療法など、好ましくはネオアジュバントもしくはアジュバント療法の開始後の腫瘍の質量及び／または体積の変化に関連する。過剰増殖性障害応答は、例えば、有効性について、またはネオアジュバントもしくはアジュバントの状況で評価することができ、全身介入後の腫瘍のサイズは、CT、PET、マンモグラム、超音波、または触診によって測定された初期のサイズ及び寸法と比較できる。応答は、生検もしくは外科的切除後の腫瘍のノギス測定または病理学的検査によって評価することもできる。応答は、腫瘍体積の変化率のような定量的な方法で、または「病理学的完全奏効」（pCR）、「臨床的完全寛解」（cCR）、「臨床的部分寛解」（cPR）、「臨床的安定疾患」（cSD）、「臨床的進行性疾患」（cPD）、もしくは他の定性的基準のような定性的な方法で記録できる。

過剰増殖性障害応答の評価は、ネオアジュバント療法またはアジュバント療法の開始後早期に、例えば、数時間、数日間、数週間後、または好ましくは数ヶ月後に行うことができる。応答評価の典型的なエンドポイントは、ネオアジュバント化学療法の終了時、または残存腫瘍細胞及び／または腫瘍床の外科的除去時である。これは通常、ネオアジュバント療法の開始後3ヶ月である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療的処置の臨床的有效性は、臨床的利益率（CBR）を測定することによって決定することができる。臨床的有益率は、完全寛解（CR）にある患者の割合、治療終了後少なくとも6ヶ月の時点で部分寛解（PR）にある患者の数及び安定した疾患（SD）を有する患者の数の合計を決定することによって測定される。この式の簡略表記は、6ヶ月にわたる $CBR = CR + PR + SD$ である。いくつかの実施形態では、特定のがん治療レジメンについてのCBRは、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、またはそれ以上である。がん治療への応答を評価するための追加の基準は、「生存期間」に関連しており、全生存期間としても知られる死亡までの生存期間（該死亡は、原因または腫瘍に関連するもののいずれかに関係し得ない）、「無再発生存期間」（再発という用語には、局在性及び遠隔再発の両方が含まれる）、転移のない生存期間、無疾患生存期間（疾患という用語には、がん及びそれに関連する疾患が含まれる）のすべてが含まれる。該生存期間の長さは、定義された開始点（例えば、診断または治療の開始の時点）及び終了点（例えば、死亡、再発、または転移）を参照することによって計算することができる。さらに、治療の有効性の基準は、化学療法への応答、生存期間の蓋然性、所与の期間内の転移の蓋然性、及び腫瘍再発の蓋然性を含むように拡張することができる。例えば、適切な閾値を決定するために、特定のがん治療レジメンを対象の集団に施すことができ、転帰は、任意のがん治療を施す前に決定されたバイオマーカー測定値と相関させることができる。転帰の測定は、ネオアジュバント設定で与えられた治療に対する病理学的奏効であり得る。代替的に、全生存期間及び無疾患生存期間などの転帰指標は、バイオマーカーの測定値が即知であるがん治療後の対象について、一定期間にわたってモニタリングすることができる。特定の実施形態では、投与される用量は、がん治療薬について当該技術分野で即知である標準的な用量である。対象がモニタリングされる期間は様々であり得る。例えば、対象は、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、または60ヶ月間モニタリングされ得る。がん治療の転帰に相関するバイオマーカー測定閾値は、実施例のセクションに記載されているものなど、当該技術分野で周知の方法を使用して決定することができる。

【0055】

「耐性」という用語は（すなわち、治療的処置に応答しないか、または応答が減少または制限されている）、がん治療に対する応答が5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、もしくはそれ以上、例えば、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、もしくはそれ以上、またはその間（境界値を含む）の任意の範囲で減少するなど、がん試料もしくは哺乳動物のがん治療に対する後天的または自然の耐性を指す。応答の減少は、耐性が獲得される前に同じがん試料もしくは哺乳

10

20

30

40

50

動物と比較することによって、または治療的処置に耐性を有しないとして即知である異なるがん試料もしくは哺乳動物と比較することによって測定することができる。化学療法に対する典型的な後天性耐性は、「多剤耐性」と称される。多剤耐性は、P糖タンパク質によって媒介され得るか、または他のメカニズムによって媒介され得るか、または哺乳類が多剤耐性微生物もしくは微生物の組み合わせに感染した場合に発生し得る。治療的処置に対する耐性の決定は当該技術分野で通例であり、通常の熟練した臨床医の技能の範囲内で、例えば、本明細書で「感作」として記載される細胞増殖アッセイ及び細胞死アッセイによって測定することができる。いくつかの実施形態では、「耐性を逆転させる」という用語は、一次がん治療（例えば、化学療法または放射線療法）単独では、未治療腫瘍の腫瘍体積と比較して統計的に有意な腫瘍体積の減少をもたらすことができない状況での未治療腫瘍の腫瘍体積と比較した場合に、一次がん治療（例えば、化学療法または放射線療法）と組み合わせた第2の薬剤の使用が、統計的有意性のレベル（例えば、 $p < 0.05$ ）で腫瘍体積の有意な低減を生成することができることを意味する。これは概して、未治療の腫瘍が対数的に律動的に成長しているときに行われる腫瘍体積測定に適用される。

10

【0056】

「応答」または「応答性」という用語は、例えば、腫瘍サイズの縮小または腫瘍増殖の阻害という意味でのがん応答を指す。これらの用語は、例えば、再発までの期間の増加によって反映されるように、予後の改善を指すこともあり、これは、再発の証拠がない、または全生存期間の延長がない、第1の事象または死亡としての第2の原発性がんについての第1の再発を検閲するまでの期間であり、これは、治療から何らかの原因による死亡までの期間である。応答する、または応答を有するとは、刺激に曝露された場合に達成される有益なエンドポイントがあることを意味する。代替的に、負または有害な症状は、刺激に曝露されると最小限に抑えられるか、軽減されるか、または減弱される。腫瘍または対象が好ましい応答を示す可能性を評価することは、腫瘍または対象が好ましい応答を示さない（すなわち、応答の欠如を示すか、または応答しない）可能性を評価することと同等であることが理解されよう。

20

【0057】

「RNA干渉（RNAi）」は、進化的に保存されたプロセスであり、それにより、標的バイオマーカー核酸と同一もしくは非常に類似する配列のRNAの発現または導入は、その標的遺伝子から転写されたメッセンジャーRNA（mRNA）の配列特異的分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）をもたらす（Coburn and Cullen（2002）J. Virol. 76:9225を参照されたい）、それにより、標的バイオマーカー核酸の発現を阻害する。一実施形態では、RNAは、二本鎖RNA（dsRNA）である。このプロセスは、植物、無脊椎動物、及び哺乳類細胞において説明されている。自然界では、RNAiは、dsRNA特異的エンドヌクレアーゼであるダイサーによって開始され、これは、長いdsRNAのsiRNAと称される二本鎖断片への連続的な切断を促進する。siRNAは、標的mRNAを認識して切断するタンパク質複合体に組み込まれる。RNAiは、標的バイオマーカー核酸の発現を阻害またはサイレンシングするために、核酸分子、例えば、合成siRNAまたはRNA干渉剤を導入することによって開始することもできる。本明細書で使用される場合、「標的バイオマーカー核酸発現の阻害」または「マーカー遺伝子発現の阻害」は、標的バイオマーカー核酸もしくは標的バイオマーカー核酸によってコードされるタンパク質の発現またはタンパク質活性またはレベルの低減を含む。減少は、RNA干渉剤によって標的化されていない標的バイオマーカー核酸の発現、または標的バイオマーカー核酸によってコードされるタンパク質の活性もしくはレベルと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、またはそれ以上であり得る。

30

40

【0058】

本明細書で使用される場合、「RNA干渉剤」は、RNA干渉（RNAi）によって標的バイオマーカー遺伝子の発現を干渉または阻害する任意の薬剤として定義される。かかるRNA干渉剤には、これらに限定されないが、RNA干渉（RNAi）によって標的バ

50

バイオマーカー核酸の発現を妨害もしくは阻害する、本発明により包含される標的バイオマーカー遺伝子に相同であるRNA分子、またはその断片、短鎖干渉RNA (siRNA)、及び低分子を含む核酸分子が含まれる。

【0059】

少なくとも1つのバイオマーカーの存在もしくはレベルを検出または決定するために使用される「試料」という用語は、通常、脳組織、脳脊髄液、全血、血漿、血清、唾液、尿、便（例えば、糞便）、涙、及び任意の他の体液（例えば、上述の「体液」の定義で記載したもの）、または小腸、結腸試料、もしくは外科的切除組織などの組織試料（例えば、生検）である。特定の事例では、本発明により包含される方法は、試料中の少なくとも1つのマーカーの存在もしくはレベルを検出または決定する前に、個体から試料を取得することをさらに含む。

10

【0060】

「感作」という用語は、がん治療（例えば、抗免疫チェックポイント、化学療法、及び／または放射線療法）による関連するがんのより効果的な治療を可能にする方法でがん細胞または腫瘍細胞を改変することを意味する。いくつかの実施形態では、正常細胞は、正常細胞が治療によって過度に損傷を受けるほどの影響を受けない。治療的処置に対する感受性の増加または感受性の減少は、細胞増殖アッセイ (Tanigawa et al. (1982) Cancer Res. 42:2159-2164) 及び細胞死アッセイ (Weisenthal et al. (1984) Cancer Res. 94:161-173、Weisenthal et al. (1985) Cancer Treat Rep. 69:615-632、Weisenthal et al., In: Kaspers G J L, Pieters R, Twentymann P R, Weisenthal L M, Veerman A J P, eds. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Langhorne, PA: Harwood Academic Publishers, 1993:415-432、Weisenthal (1994) Contrib. Gynecol. Obstet. 19:82-90) を含むがこれらに限定されない、特定の治療及び以下の本明細書に記載される方法についての当該技術分野で既知の方法に従って測定される。感受性または耐性は、一定期間、例えば、ヒトの場合は6ヶ月間、マウスの場合は4～6週間にわたって腫瘍サイズ減少を測定することにより、動物においても測定できる。組成物または方法は、かかる組成物または方法が不在である場合の治療感受性または耐性と比較して、治療感受性の増加または耐性の減少が5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、もしくはそれ以上、例えば2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、もしくはそれ以上、またはその間（境界値を含む）の任意の範囲である場合、治療的処置に対する応答を感作する。治療的処置に対する感受性または耐性の決定は、当該技術分野において通例であり、通常、熟練した臨床医の技能の範囲内である。がん治療の有効性を増強するための本明細書に記載される任意の方法は、がん治療に対して過剰増殖性またはそうでなければがん性細胞（例えば、耐性細胞）を感作するための方法と同等に適用できることを理解されたい。

20

30

40

【0061】

本明細書で「低分子干渉RNA」とも称される「短鎖干渉RNA」(siRNA)は、例えば、RNAiによる標的バイオマーカー核酸の発現を阻害するように機能する薬剤として定義される。siRNAは、化学的に合成され得るか、インビトロ転写によって生成され得るか、または宿主細胞内で生成され得る。一実施形態では、siRNAは、約15～約40ヌクレオチドの長さ、好ましくは約15～約28ヌクレオチド、より好ましくは約19～約25ヌクレオチドの長さ、さらにより好ましくは約19、20、21、または22ヌクレオチドの長さの二本鎖RNA (dsRNA) 分子であり、約0、1、2、3、4、または5ヌクレオチドの長さを有する各鎖上に3'及び／または5'のオーバーハングを含めることができる。オーバーハングの長さは、2つの鎖間で独立しており、すなわ

50

ち、1つの鎖上のオーバーハングの長さは、第2の鎖上のオーバーハングの長さに依存しない。好ましくは、s i R N Aは、標的メッセンジャーRNA (m R N A) の分解または特定の転写後遺伝子サイレンシング (P T G S) を介してRNA干渉を促進することができる。

【0062】

別の実施形態では、s i R N Aは、低分子ヘアピン (ステムループとも称される) R N A (s h R N A) である。一実施形態では、これらのs h R N Aは、短い (例えば、17~29ヌクレオチド、19~25ヌクレオチドなどの領域) アンチセンス鎖と、それに続く4~10ヌクレオチドループ (例えば、4、5、6、7、8、9、または10塩基リンカー領域)、及び類似性センス鎖で構成される。代替的に、センス鎖は、ヌクレオチドループ構造に先行することができ、アンチセンス鎖は後に続くことができる。これらのs h R N Aは、プラスミド、レトロウイルス、及びレンチウイルス内に含まれることができ、例えば、p o l I I I U 6プロモーターまたは別のプロモーターから発現され得る (例えば、Stewart, et al. (2003) RNA 9: 493-501を参照されたい)。

【0063】

RNA干渉剤、例えば、s i R N A分子は、がんを有するか、またはがんを有するリスクのある患者に投与して、がんで過剰発現されるバイオマーカー遺伝子の発現を阻害し、それにより、対象のがんを治療、予防、または阻害することができる。

【0064】

生物学的に活性な薬剤に適用される「選択的調節因子」または「選択的調節」という用語は、標的との直接または相互作用を介して、標的外の細胞集団、シグナル伝達活性などと比較して、細胞集団、シグナル伝達活性などの標的を調節する薬剤の能力を指す。例えば、タンパク質と別の結合パートナーとの間の別の相互作用、及び／または目的の細胞集団に対するかかる相互作用 (複数可) にわたって、タンパク質と1つの天然結合パートナーとの間の相互作用を選択的に阻害する薬剤は、少なくとも1つの他の結合パートナーに指向して、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、2x (倍)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、15x、20x、25x、30x、35x、40x、45x、50x、55x、60x、65x、70x、75x、80x、85x、90x、95x、100x、105x、110x、120x、125x、150x、200x、250x、300x、350x、400x、450x、500x、600x、700x、800x、900x、1000x、1500x、2000x、2500x、3000x、3500x、4000x、4500x、5000x、5500x、6000x、6500x、7000x、7500x、8000x、8500x、9000x、9500x、10000x、もしくはそれ以上、またはその間 (境界値を含む) の任意の範囲で相互作用を阻害する。かかる測定基準は、通常、相互作用／活性を半分に減少させるために必要な薬剤の相対量で表される。かかる測定基準は、核酸分子の1つ以上の標的配列との結合などの他の選択性配置に適用される。

【0065】

より一般的には、「選択的」という用語は、優先的な作用または機能を指す。「選択的」という用語は、他の標的と比較した目的の特定の対象における優先的な効果の観点から定量化することができる。例えば、測定された変数 (例えば、所望の細胞対他の細胞におけるバイオマーカー発現の調節、所望の細胞対他の細胞の濃縮及び／または欠失など) は、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍

、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、もしくはそれ以上、またはその間（境界値を含む）の任意の範囲（例えば、50%～16倍）であり得、目的の標的対意図しないまたは所望でない標的において異なる。同じ倍数分析を使用して、所定の組織、細胞集団、測定された変数、及び／または測定された効果など、例えば、細胞比率、過剰増殖性細胞増殖速度または体積、細胞増殖速度、細胞数などにおける効果の程度を確認できる。

【0066】

対照的に、「特異的」という用語は、排他的な作用または機能を指す。例えば、タンパク質と1つの結合パートナーとの間の相互作用の特異的調節は、その相互作用の排他的調節を指し、タンパク質と別の結合パートナーとの間の相互作用の有意な調節を指すものではない。別の例では、予め決定された抗原との抗体の特異的結合は、他の抗原と結合することなく、目的の抗原と結合する抗体の能力を指す。通常、抗体は、およそ 1×10^{-7} M未満、例えば、およそ 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M、または分析物として目的の抗原を使用し、リガンドとして抗体を使用する B I A C O R E（登録商標）アッセイ機器における表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって決定される場合、さらに低い親和性（ K_D ）で結合し、予め決定された抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）との結合に対する親和性よりも少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、もしくは10.0倍、またはそれ以上の親和性で予め決定された抗原と結合する。加えて、 K_D は、 K_A の逆である。「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」という句は、本明細書では「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換的に使用される。

【0067】

「低分子」という用語は当該技術分野の用語であり、約1000分子量未満または約500分子量未満の分子を含む。一実施形態では、低分子は、ペプチド結合を排他的に含まない。別の実施形態では、低分子は、オリゴマーではない。活性についてスクリーニングすることができる例示的な低分子化合物には、これらに限定されないが、ペプチド、ペプチド模倣体、核酸、炭水化物、低有機分子（例えば、ポリケチド）（Cane et al. (1998) Science 282:63）、及び天然生成物抽出物ライブラリが含まれる。別の実施形態では、化合物は、小さな有機非ペプチド化合物である。用語は、特に明記しない限り、目的の化学構造のすべての立体異性体、幾何異性体、互変異性体、及び同位体を包含することを意図する。

【0068】

「対象」という用語は、動物、脊椎動物、哺乳動物、またはヒト、特に、例えば、実験、診断、及び／または治療の目的で薬剤が投与されるか、または試料が得られるか、または手順が実行されるものを指す。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳類、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、またはラマ及びラクダなどの他の動物である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、がんを有するヒト対象である。「対象」という用語は、「患者」と互換的である。

【0069】

「生存期間」という用語には、全生存期間としても知られる死亡までの生存期間（該死亡は、原因または腫瘍に関連するもののいずれかに関係し得ない）、「無再発生存期間」（再発という用語には、局在性及び遠隔再発の両方が含まれる）、転移のない生存期間、無疾患生存期間（疾患という用語には、がん及びそれに関連する疾患が含まれる）のすべてが含まれる。該生存期間の長さは、定義された開始点（例えば、診断または治療の開始の時点）及び終了点（例えば、死亡、再発、または転移）を参照することによって計算することができる。さらに、治療の有効性の基準は、化学療法への応答、生存期間の蓋然性

10

20

30

40

50

、所与の期間内の転移の蓋然性、及び腫瘍再発の蓋然性を含むように拡張することができる。

【0070】

「相乗効果」という用語は、がん剤／療法単独の個別の効果の合計よりも大きい場合がある、2つ以上のがん薬剤（例えば、表1及び／または表2に記載されるバイオマーカーの調節因子ならびに免疫療法の併用療法）の組み合わせた効果を指す。

【0071】

「標的」という用語は、本明細書に記載される薬剤、組成物、及び／または製剤によって調節、阻害、もしくはサイレンシングされる遺伝子または遺伝子生成物を指す。標的遺伝子または遺伝子産物には、野生型及び変異型が含まれる。本発明により包含される標的の非限定的で代表的なリストを表1及び表2に提供する。同様に、動詞として使用される「標的」、「標的（複数可）」、または「標的化」という用語は、標的遺伝子または遺伝子産物の活性を調節することを指す。標的化とは、標的遺伝子もしくは遺伝子産物の活性を上方制御または下方制御することを指す。

【0072】

「治療効果」という用語は、薬理学的に活性な物質によって引き起こされる、動物、特に哺乳動物、より詳細にはヒトにおける局所的または全身的な効果を包含する。したがって、この用語は、動物またはヒトにおける疾患の診断、治療、緩和、治療、または予防、あるいは所望の身体的または精神的発達及び状態の増強に使用することを目的とした任意の物質を意味する。用語に包括される予防効果は、疾患もしくは状態の出現を遅延または排除すること、疾患もしくは状態の症状の発症を遅延または排除すること、疾患もしくは状態の進行を減速、停止、または逆転させること、あるいはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0073】

薬剤（かかる薬剤を含む組成物及び／または製剤を含む）の「有効量」または「有効用量」という用語は、例えば、選択される投与形態、経路、及び／またはスケジュールに従って細胞または生物に送達される場合に、所望の生物学的及び／または薬理学的効果を達成するのに十分な量を指す。当業者によって理解されるように、有効である特定の薬剤または組成物の絶対量は、所望の生物学的または薬理学的エンドポイント、送達される薬剤、標的組織などのような要因に応じて変化し得る。当業者は、様々な実施形態において、「有効量」が細胞と接触されるか、または単回用量で、もしくは複数回用量の使用を通じて対象に投与され得ることをさらに理解するであろう。「有効量」という用語は、「治療有効量」であり得る。

【0074】

「治療有効量」という用語は、任意の医学的治療に適用可能な合理的な利益／リスク比率で、動物における細胞の少なくとも亜集団において何らかの所望の治療効果を生成するのに有効な薬剤の量を指す。対象化合物の毒性及び治療有効性は、例えば、LD₅₀及びED₅₀を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。大きな治療指数を示す組成物が好ましい。いくつかの実施形態では、LD₅₀（致死量）を測定することができ、例えば、薬剤を投与しない場合と比較して、薬剤について少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、またはそれ以上で減少させることができる。同様に、ED₅₀（すなわち、症状の最大の半分の阻害を達成する濃度）を測定することができ、例えば、薬剤を投与しない場合と比較して、薬剤について少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、またはそれ以上で増加させることができる。さらに同様に、IC₅₀（すなわち、がん細胞に対して最大の半分の細胞傷害性または細胞増殖抑制効果を達成する濃度）を測定することができ、例えば、薬剤を投与しない場合と比較して、薬剤について少なくとも

10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、またはそれ以上で増加させることができる。いくつかの実施形態では、アッセイにおけるがん細胞増殖は、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはさらには100%で阻害することができる。別の実施形態では、固形悪性腫瘍において少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはさらには100%の低減を達成することができる。

【0075】

「寛容」または「無応答性」という用語は、刺激、例えば、活性化受容体またはサイトカインを介した刺激に対する、免疫細胞などの細胞の屈折性を含む。無応答は、例えば、免疫抑制剤への曝露または高用量の抗原への曝露のために発生し得る。いくつかの独立した方法が寛容を誘発し得る。1つのメカニズムは「アネルギー」と称され、エフェクター機能を有する細胞に分化するのではなく、細胞が無応答の細胞としてインビボで存続する状態として定義される。かかる屈折性は一般に抗原特異的であり、寛容化抗原への曝露が停止している後も持続する。例えば、T細胞におけるアネルギーは、例えば、IL-2などのサイトカイン生成の欠如を特徴とする。T細胞アネルギーは、T細胞が抗原に曝露され、第2のシグナル（共刺激シグナル）の不在の状態で第1のシグナル（T細胞受容体またはCD-3を媒介したシグナル）を受け取ると生じる。これらの条件下で、同じ抗原への細胞の再曝露は（共刺激ポリペプチドの存在下で再曝露が生じたとしても）、サイトカイン生成に対する失敗を生じさせ、したがって増殖に失敗する。しかしながら、アネルギーT細胞は、サイトカイン（例えば、IL-2など）と共に培養すると増殖することができる。例えば、T細胞アネルギーは、ELISAによって、または指標細胞株を使用した増殖アッセイによって測定されるTリンパ球によるIL-2生成の欠如によっても観察できる。代替的に、レポーター遺伝子構築物が使用され得る。例えば、アネルギーT細胞は、5' IL-2 遺伝子エンハンサーの制御下にある異種プロモーターまたはエンハンサー内に見ることができるAP1配列の多量体によって誘導されるIL-2 遺伝子転写の開始に失敗する（Kang et al. (1992) Science 257:1134）。別のメカニズムは「疲弊」と称される。T細胞の疲弊は、多くの慢性感染症及びがんの間に発生するT細胞機能障害の状態である。これは、機能的エフェクターまたはメモリーT細胞とは異なるエフェクター機能不良、阻害性受容体の持続的発現、及び転写状態によって定義される。

【0076】

「転写されたポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド転写物」は、バイオマーカー核酸の転写及び正常な転写後プロセッシング（例えば、スプライシング）、存在する場合、RNA転写物、RNA転写物の逆転写によって作製された成熟mRNAのすべてもしくは一部に相補的または相同であるポリヌクレオチド（例えば、mRNA、hnRNA、cDNA、またはかかるRNAもしくはcDNAの類似体）である。

【0077】

「治療」という用語は、目的の状態（例えば、疾患または障害）の治療的管理または改善を指す。治療には、対象への薬剤または組成物（例えば、薬学的組成物）の投与が含まれ得るが、これらに限定されない。治療は、通常、対象に有益な様式で、疾患の経過を改善するための試みとして行われる（この用語は、治療を正当化する、もしくは潜在的に正当化する疾患、障害、症候群、または望ましくない状態を示すために使用される）。治療の効果には、疾患または疾患の1つ以上の症状または徴候の逆転、緩和、重症度の軽減、発症の遅延、治癒、進行の阻害、及び／または発生または再発の可能性の低減が含まれ得る。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患進行速度の低減、病状の回復または一次緩和、及び寛解または予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。治

療剤は、一般集団のメンバーと比較して、疾患を有するか、または疾患を発症するリスクが高い対象に投与することができる。いくつかの実施形態では、治療剤は、疾患を患ったが、もはや疾患の証拠を示さない対象に投与することができる。薬剤は、例えば、明らかな疾患の再発の可能性を低減するために投与することができる。治療剤は、予防的に、すなわち、任意の症状の発症または疾患の発現の前に投与することができる。「予防的治療」は、例えば、疾患が発生する可能性を低減するため、または疾患が発生した場合の重症度を低減するためなど、疾患を発症していない、または疾患の証拠を順番に示さない対象に医学的及び／または外科的管理を提供することを指す。対象は、疾患を発症するリスクがある（例えば、一般集団と比較した増加したリスク、または疾患を発症する可能性を高める危険因子を有する）として同定することができる。

10

【0078】

「無応答」という用語は、治療に対するがん細胞の屈折性、または刺激、例えば、活性化受容体もしくはサイトカインを介した刺激に対する免疫細胞などの治療細胞の屈折性を含む。無応答は、例えば、免疫抑制剤への曝露または高用量の抗原への曝露のために発生し得る。本明細書で使用される場合、「アネルギー」または「寛容」という用語は、受容体を媒介した刺激を活性化することに対する屈折性を含む。かかる屈折性は一般に抗原特異的であり、寛容化抗原への曝露が停止している後も持続する。例えば、T細胞におけるアネルギー（無応答とは対照的に）は、例えば、IL-2などのサイトカイン生成の欠如を特徴とする。T細胞アネルギーは、T細胞が抗原に曝露され、第2のシグナル（共刺激シグナル）の不在の状態で第1のシグナル（T細胞受容体またはCD-3を媒介したシグナル）を受け取ると生じる。これらの条件下で、同じ抗原への細胞の再曝露は（共刺激ポリペプチドの存在下で再曝露が生じたとしても）、サイトカイン生成に対する失敗を生じさせ、したがって増殖に失敗する。しかしながら、アネルギーT細胞は、サイトカイン（例えば、IL-2など）と共に培養すると増殖することができる。例えば、T細胞アネルギーは、ELISAによって、または指標細胞株を使用した増殖アッセイによって測定されるTリンパ球によるIL-2生成の欠如によっても観察できる。代替的に、レポーター遺伝子構築物が使用され得る。例えば、アネルギーT細胞は、5' IL-2 遺伝子エンハンサーの制御下にある異種プロモーターまたはエンハンサー内に見ることができるAP1配列の多量体によって誘導されるIL-2 遺伝子転写の開始に失敗する（Kang et al. (1992) Science 257:1134）。

20

30

【0079】

「ワクチン」という用語は、疾患の予防及び／または治療のための免疫を生成するための組成物を指す。

【0080】

II. 骨髄由来細胞、CCR2、及びCSF1R

骨髄由来細胞

造血幹細胞（HSC）は、コミットされたリンパ球または骨髄前駆細胞を生み出す。骨髄前駆細胞は、単球、骨髄樹状、骨髄赤血球、赤血球、巨核球、顆粒球／マクロファージ、顆粒球、及びマクロファージ細胞を含む骨髄由来細胞を生じさせる。「骨髄由来細胞」という用語は、骨髄もしくは脊髄中の顆粒球または単球の前駆細胞、あるいは骨髄または脊髄中に見られるものの類似性を指すことできる。骨髄細胞系統には、末梢血中の循環単球細胞、ならびにそれらが成熟、分化、及び／または活性化の後になる細胞集団が含まれる。これらの集団には、非最終分化骨髄細胞、骨髄由来サブレッサー細胞、及び分化マクロファージが含まれる。分化マクロファージには、非分極化及び分極化マクロファージ、休止及び活性化マクロファージが含まれる。限定するものではないが、骨髄系統には、顆粒球前駆体、多形核由来サブレッサー細胞、分化多形核白血球、好中球、顆粒球、好塩基球、好酸球、単球、マクロファージ、ミクログリア、骨髄由来サブレッサー細胞、樹状細胞、及び赤血球も含まれ得る。

40

【0081】

「コミットされた骨髄前駆細胞」という用語は、骨髄系統の末端分化細胞のいずれかに

50

分化することができる細胞集団を指す。骨髓前駆細胞内に包含されるのは、一般的な骨髓前駆細胞（CMP）であり、細胞集団は、限られたまたは非自己再生能力によって特徴付けられるが、細胞分裂が可能であり、顆粒球／マクロファージ前駆細胞（GMP）及び巨核球／赤血球前駆細胞（MEP）を形成することができる。CMPを同定するのに有用なマーカー表現型には、当該技術分野で一般に知られているものが含まれる。マウス由来のCMP細胞の場合、細胞集団は、マーカー表現型 $c-Kit^{high}$ （CD117）CD116^{low} CD34^{low} Sca-1^{neg} Lin^{neg} によって特徴付けられ、マーカー表現型 $FcyR^{low}$ IL-7R α^{neg} （CD127）によってさらに特徴付けられる。また、マウスCMP細胞集団は、B220、CD4、CD8、CD3、Ter119、Gr-1及びMac-1を含むマーカーの発現の不在によっても特徴付けられる。ヒト由来のCMP細胞に関しては、細胞集団はCD34⁺CD38⁺によって特徴付けられ、マーカー表現型CD123⁺（IL-3R α ）CD45RA^{neg}によってさらに特徴付けられる。ヒトCMP細胞集団はまた、細胞マーカーCD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56、及びCD234aの不在によって特徴付けられる。様々な骨髓前駆細胞に対するマーカー表現型の説明は、例えば、米国特許第6,465,247号及び第6,761,883号に記載されている。

【0082】

顆粒球／マクロファージ前駆細胞（GMP）。この前駆細胞集団の細胞は、顆粒球（例えば、好塩基球、好酸球、及び好中球）及びマクロファージを生じるその能力によって特徴付けられる。他のコミットされた前駆細胞と同様に、GMPは自己再生能力を欠いている。マウスGMPは、マーカー表現型 $c-Kit^{hi}$ （CD117）Sca-1^{neg} $Fc\gamma R^{hi}$ （CD16）IL-7R γ^{neg} CD34^{pos} によって特徴付けられる。マウスGMPはまた、マーカーB220、CD4、CD8、CD3、Gr-1、Mac-1、及びCD90の発現を欠いている。ヒトGMPは、マーカー表現型CD34⁺CD38⁺CD123⁺CD45RA⁺によって特徴付けられる。ヒトGMP細胞集団はまた、マーカーCD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56、及びCD235aの不在によって特徴付けられる。

【0083】

CMPに由来する巨核球／赤血球前駆細胞（MEP）は、コミットされた巨核球前駆細胞及び赤血球前駆細胞に分化するその能力によって特徴付けられる。成熟した巨核球は、血小板形成の前駆体である多倍化細胞であり、血栓ポエチンによって調節される発達過程である。赤血球細胞は、エリスロポエチンによって調節されるプロセスを通じて、コミットされた赤血球前駆細胞から形成され、最終的には成熟した赤血球に分化する。マウスMEPは、細胞マーカー表現型 $c-Kit^{hi}$ 及び IL-7R α^{neg} によって特徴付けられ、マーカー表現型 $FcyR^{low}$ 及び CD34^{low} によってさらに特徴付けられる。マウスMEP細胞集団はまた、マーカーB220、CD4、CD8、CD3、Gr-1、及びCD90の不在によって特徴付けられる。マウスMEP用の別の例示的なマーカー表現型は、 $c-kit^{high}$ Sca-1^{neg} Lin^{neg} / ^{low} CD116^{low} CD34^{low} である。ヒトMEPは、マーカーの表現型CD34⁺CD38⁺CD123^{neg} CD45RA^{neg} によって特徴付けられる。ヒトMEP細胞集団はまた、マーカーCD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56、及びCD235aの存在を特徴とする。

【0084】

骨髓系統におけるさらに制限された前駆細胞は、顆粒球前駆細胞、マクロファージ前駆細胞、巨核球前駆細胞、及び赤血球前駆細胞である。顆粒球前駆細胞は、好酸球、好塩基球、好中球を含む末端分化顆粒球に分化するその能力によって特徴付けられる。GPは、典型的には、骨髓系統の他の細胞に分化しない。巨核球前駆細胞（MKP）に関しては、これらの細胞は、末端分化された巨核球に分化するその能力を特徴とするが、一般的には骨髓系統の他の細胞ではない（例えば、PCT公開第WO2004/024875号を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0085】

単球及びマクロファージ

いくつかの実施形態では、目的の骨髄由来細胞は、単球及び／またはマクロファージである。

【0086】

「単球」という用語は、マクロファージ及び骨髄性樹状細胞に分化し得る白血球を指す。単球は末梢血単核細胞（P B M C）の間に見られ、B細胞、T細胞、NK細胞などの他の造血細胞及び免疫細胞も含む。単球は、単芽球と称される造血幹細胞前駆細胞から骨髄によって生成される。単球は、免疫系で2つの主要な機能を有する：（1）血流を出て、正常な状態で常在するマクロファージ及び樹状細胞（D C）を補充することができ、（2）それらが組織内の感染部位に迅速に移動し、マクロファージ及び炎症性樹状細胞に分裂／分化して、炎症シグナルに応答して免疫応答を誘発することができる。単球は通常、染色された塗抹標本で大きな二葉核によって同定される。単球はまた、感染中に血液から組織への遊走を媒介するケモカイン受容体及び病原体認識受容体を発現する。それらは炎症性サイトカイン及び貪食細胞を生成する。ヒトには少なくとも3種類の単球があり、1）C D 1 4 細胞表面受容体の高レベル発現を特徴とする古典的な単球（C D 1 4 + + C D 1 6 - 単球）、2）C D 1 4 の低レベル発現及びC D 1 6 受容体の付加的な共発現を特徴とする非古典的な単球（C D 1 4 + C D 1 6 + + 単球）、ならびに3）C D 1 4 の高レベル発現及びC D 1 6 の低レベル発現を特徴とする中間単球（C D 1 4 + + C D 1 6 + 単球）を含む。

【0087】

マクロファージは、炎症及び自然免疫応答の重要な免疫エフェクター及び制御因子である。マクロファージは、不均一で、組織に常駐し、最終分化した、先天性骨髄細胞であり、顕著な可塑性を有し、微小環境からの局所的な合図に応答して生理機能を変化させることができ、宿主防御から組織恒常性までの機能的要求のスペクトルを想定することができる（G i n h o u x e t a l . （2016）N a t . I m m u n o l . 17：34－40）。マクロファージは、体内のほぼすべての組織内に存在する。それらは、組織常駐マクロファージ、例えば、肝臓に常駐するクッパー細胞、または循環する単球前駆体（すなわち、単球）に由来するかのいずれかであり、主に骨髄及び脾臓の貯蔵所に由来し、定常状態で、または炎症もしくは他の刺激性の合図に応答して組織に移動する。例えば、単球を血液から組織に動員して、骨、肺胞（肺）、中枢神経系、結合組織、胃腸管、肝臓、脾臓、及び腹膜の組織特異的マクロファージを補充することができる。

【0088】

「組織常駐マクロファージ」という用語は、組織免疫監視、感染への応答及び炎症の解消、及び固有の恒常性機能などの組織特異的及び／または微小解剖学的ニッチ特異的機能を果たす免疫細胞の不均一な集団を指す。組織常駐マクロファージコロニー形成能力を維持する組織常駐マクロファージの局所増殖は、組織中の成熟したマクロファージの集団を直接生じさせることができる。組織常駐マクロファージは、それらが占有する組織に応じて同定及び命名され得る。例えば、脂肪組織マクロファージは脂肪組織を占有し、クッパー細胞は肝臓組織を占有し、洞組織球はリンパ節を占有し、肺胞マクロファージ（ダスト細胞）は肺胞を占有し、ランゲルハンス細胞は皮膚及び粘膜組織を占有し、巨細胞につながる組織球は結合組織を占有し、ミクログリアは中枢神経系（C N S）組織を占有し、ホフバウアー細胞は胎盤組織を占有し、糸球体内メサンギウム細胞は腎臓組織を占有し、破骨細胞は骨組織を占有し、類上皮細胞は肉芽腫を占有し、赤脾髄マクロファージ（類洞内層細胞）は脾臓組織の赤脾髄を占有し、腹腔マクロファージは腹腔組織を占有し、リソマック細胞はパイエル板組織を占有し、膵臓マクロファージは膵臓組織を占有する。

【0089】

マクロファージは、感染性病原体及び他の炎症応答に対する宿主の防御に加えて、発達、創傷治癒、及び組織修復、ならびに免疫応答の調節を含むがこれらに限定されない、異なる恒常性機能を実行することができる。マクロファージは、貪食作用を介して感染を防

御する体内の貪食作用細胞として最初に認識され、自然免疫の必須の構成要素である。病原体及び他の炎症刺激に応答して、活性化されたマクロファージは感染した細菌及び他の微生物を貪食することができ、炎症を刺激し、炎症誘発性分子のカクテルをこれらの細胞内微生物に放出する。病原体を貪食した後、マクロファージは病原性抗原をT細胞に提示し、防御のための適応免疫応答をさらに活性化する。例示的な炎症誘発性分子には、サイトカインIL-1 β 、IL-6、及びTNF- α 、ケモカインMCP-1、CXCL-5、及びCXCL-6、ならびにCD40Lが含まれる。

【0090】

マクロファージは、感染に対する宿主の防御への貢献に加えて、免疫応答への関与とは関係なく、重要な恒常性の役割を果たす。マクロファージは、赤血球を排除する巨大な貪食細胞であり、鉄及びヘモグロビンなどの放出された物質は、宿主が再利用するためにリサイクルすることができる。この排除するプロセスは、それなしでは宿主が生き残れない重要な代謝の寄与である。

10

【0091】

マクロファージは、組織再構築中に生成される細胞破片の排除にも関与し、アポトーシスを起こした細胞を迅速かつ効率的に排除する。マクロファージは、アポトーシス細胞の排除を介して定常状態の組織恒常性に関与していると考えられる。これらの恒常性排除プロセスは、一般に、スカベンジャー受容体、ホスファチジルセリン受容体、トロンプスポンジン受容体、インテグリン及び補体受容体を含むマクロファージ上の表面受容体によって媒介される。貪食作用を媒介するこれらの受容体は、サイトカイン遺伝子の転写を誘導するシグナル伝達に失敗するか、または抑制性シグナル及び／またはサイトカインを積極的に生成するかのいずれかである。マクロファージの恒常性機能は、他の免疫細胞から独立している。

20

【0092】

マクロファージはまた、外傷または細胞への他の損傷から生じる細胞破片／壊死細胞を排除することができる。マクロファージは、トル様受容体(TLR)、細胞内パターン認識受容体、及びインターロイキン-1受容体(IL-1R)を介して、壊死細胞の破片内に存在する内因性の危険シグナルを検出し、そのほとんどは、アダプタ分子骨髄分化一次応答遺伝子88(MyD88)を介してシグナルを伝達する。細胞破片の排除は、マクロファージの生理機能を著しく改変することができる。壊死を排除するマクロファージは、表面タンパク質の発現の改変、ならびにサイトカイン及び炎症誘発性媒介物の生成を含む、生理機能に劇的な変化を起こすことができる。これらの刺激に応答したマクロファージ表面タンパク質発現の改変は、これらの変化した細胞に固有の生化学的マーカーを同定するために使用できる可能性がある。

30

【0093】

マクロファージは、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓、膵臓などの多くの組織の恒常性を維持する上で重要な機能を有する。組織マクロファージは、変化のカスケードを引き起こして組織細胞を適応させる細胞シグナル伝達分子を放出することにより、組織の状態の変化に迅速に応答することができる。例えば、脂肪組織内のマクロファージは、食事の変化(例えば、白色脂肪組織内のマクロファージ)または低温への曝露(例えば、褐色脂肪組織内のマクロファージ)に応答して、新しい脂肪細胞の生成を調節する。クッパー細胞として知られる肝臓内のマクロファージは、食事の変化に応じてブドウ糖及び脂質の分解を調節する。膵臓内のマクロファージは、高脂肪食に応答してインスリン生成を調節することができる。

40

【0094】

マクロファージはまた、創傷治癒及び組織修復に寄与することができる。例えば、マクロファージは、損傷した組織及び細胞に由来するシグナルに応答して、活性化され、損傷した組織を修復するための組織修復応答を誘発することができる(Minutti et al. (2017) Science 356:1076-1080)。

【0095】

50

胚発生の間、マクロファージは、組織再構築及び器官発達においても重要な役割を果たす。例えば、常駐マクロファージは、新生児マウスの心臓の血管の発達を積極的に形成する (Leid et al. (2016) *Circ. Res.* 118:1498-1511)。脳内のミクログリアは、胚発生の際に脳の発達においてニューロン及び血管を導く成長因子を生成することができる。同様に、マクロファージが生成するタンパク質である CD95L は、ニューロンの表面上にある CD95 受容体と結合し、マウス胚の脳内で血管を発達させ、ニューロン及び血管の発達を促進する (Chen et al. (2017) *Cell Rep.* 19:1378-1393)。リガンドがないと、ニューロンの分岐頻度が低くなり、結果として生じる成人の脳は、より少ない電気的活性を示し、破骨細胞として知られる単球由来細胞は骨の発達に関与し、これらの細胞を欠くマウスは、大理石骨病として知られるまれな状態である、緻密で硬化した骨を発達させる。マクロファージはまた、乳腺の発達を調整し、出生後初期の網膜の発達を助ける (Wynn et al. (2013) *Nature* 496:445-455)。

10

【0096】

上述のように、マクロファージは免疫系を制御する。T細胞への抗原提示に加えて、マクロファージは、いくつかの条件下で免疫細胞に免疫抑制／抑制シグナルを提供することができる。例えば、精巣では、マクロファージは精子が免疫系によって攻撃されるのを防ぐ環境を作るのを助ける。精巣内の組織常駐マクロファージは、精子に対する免疫細胞の応答を防ぐ免疫抑制分子を生成する (Mossadegh-Keller et al. (2017) *J. Exp. Med.* 214:10.1084/jem.20170829)。

20

【0097】

異なる環境シグナルに応答し、それらの機能的要求と一致するマクロファージの可塑性は、連続体の2つの極端な、すなわち「古典的に活性化された」M1及び「代替的に活性化された」M2マクロファージを含む、一連のマクロファージ活性化状態をもたらした。

【0098】

「活性化」という用語は、検出可能な細胞増殖を誘導するために十分に刺激された、及び／または誘導されたサイトカインの発現及び分泌、貪食作用、細胞シグナル伝達、抗原のプロセッシング及び提示、標的細胞の死滅、炎症誘発性機能などのエフェクター機能を発揮するように刺激されている単球及び／またはマクロファージの状態を指す。

30

【0099】

「M1マクロファージ」または「古典的に活性化されたマクロファージ」という用語は、炎症誘発性表現型を有するマクロファージを指す。「マクロファージ活性化」という用語（「古典的活性化」とも称される）は、病原体への二次曝露時のBCG (*bacillus Calmette-Guerin*) 及び *Listeria* に対するマクロファージの抗原依存性であるが非特異的な増強された殺菌活性を説明するために、1960年代に感染の状況下でMackannessによって導入された (Mackanness (1962) *J. Exp. Med.* 116:381-406)。増強は後に、抗原活性化免疫細胞によるTh1応答及びIFN- γ 生成と関連し (Nathan et al. (1983) *J. Exp. Med.* 158:670-689)、細胞傷害性及び抗腫瘍特性に拡張された (Pace et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:3782-3786、Celada et al. (1984) *J. Exp. Med.* 160:55-74)。したがって、サイトカイン分泌、抗原提示、貪食作用、細胞間相互作用、遊走などによって炎症を増強するマクロファージ機能は、炎症誘発性で見なされる。インビトロ及びインビボアッセイは異なるエンドポイントを測定できる：一般的なインビトロ測定には、増殖、遊走、炎症誘発性Th1サイトカイン／ケモカイン分泌及び／または遊走によって測定される炎症誘発性細胞刺激が含まれ、一方で一般的なインビボ測定には、病原体との戦い、組織損傷の即時応答者、他の細胞活性化因子、遊走誘導物質などの分析がさらに含まれる。インビトロ及びインビボの両方で、炎症誘発性抗原提示を評価することができる。リポ多糖 (LPS)、ある特定のToll様受容

40

50

体 (T L R) アゴニスト、T h 1 サイトカインインターフェロンガンマ (I F N γ) (例えば、ストレス及び感染に応答してNK細胞によって生成されるI F N γ 、ならびに持続的な生成を伴うTヘルパー細胞)、及びT N Fは、M 1 経路に沿ってマクロファージを分極する。活性化されたM 1 マクロファージは、微生物を貪食して破壊し、損傷した細胞 (腫瘍細胞及びアポトーシス細胞など) を排除し、適応免疫応答を増加させるためにT細胞に抗原を提示し、高レベルの炎症誘発性サイトカイン (例えば、I L - 1、I L - 6、及びI L - 2 3)、活性酸素種 (R O S)、及び一酸化窒素 (N O) を生成し、ならびに他の免疫細胞及び非免疫細胞を活性化する。誘導型一酸化窒素シンターゼ (i N O S)、活性酸素種 (R O S) の発現、及びT h 1 関連サイトカインであるI L - 1 2 の生成を特徴とするM 1 マクロファージは、強力な免疫応答を促進するように良好に適応される。M 1 マクロファージの代謝は、好気性糖分解の増強、グルコースの乳酸への変換、ペントースリン酸経路 (P P P) を介したフラックスの増加、脂肪酸合成、ならびにコハク酸及びクエン酸の蓄積につながる短縮型トリカルボン酸 (T C A) 回路によって特徴付けられる。

【0100】

「1型」または「M 1 様」単球及び／またはマクロファージは、少なくとも1つの炎症誘発性サイトカインを分泌することによって炎症性刺激を生成すること、少なくとも1つの細胞表面活性化分子／その表面上の活性化分子のリガンドを発現すること、炎症誘発性応答を刺激するために、少なくとも1つの他の細胞 (他のマクロファージ及び／またはT細胞を含む) を動員／指示／相互作用すること、炎症誘発性の状況で抗原を提示すること、炎症誘発性応答の開始を可能にする部位への移動、または炎症誘発性機能につながると予想される少なくとも1つの遺伝子の発現を開始することのうちの少なくとも1つを特徴とする炎症誘発性応答に寄与することができる単球及び／またはマクロファージである。いくつかの実施形態では、用語には、細胞傷害性C D 8 + T細胞を活性化すること、免疫チェックポイント療法などの免疫療法に対するがん細胞の増加された感受性を媒介すること、及び／または耐性に対するがん細胞の逆転を媒介することが含まれる。ある特定の実施形態では、炎症誘発性状態へのかかる調節は、これらに限定されないが、a) 増加した表面抗原分類80 (C D 8 0)、C D 8 6、M H C I I、M H C I、インターロイキン1 - ベータ (I L - 1 β 、I L - 6、C C L 3、C C L 4、C X C L 1 0、C X C L 9、G M - C S F、及び／または腫瘍壊死因子アルファ (T N F - α)、b) C D 2 0 6、C D 1 6 3、C D 1 6、C D 5 3、V S I G 4、P S G L - 1、T G F b、及び／またはI L - 1 0 の減少した発現、c) I L - 1 β 、T N F - α 、I L - 1 2、I L - 1 8、G M - C S F、C C L 3、C C L 4、及びI L - 2 3 からなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインもしくはケモカインの増加した分泌、d) I L - 1 0 の発現に対するI L - 1 β 、I L - 6、及び／またはT N F - α の発現の増加した比率、e) 増加したC D 8 + 細胞傷害性T細胞活性化、f) C D 8 + 細胞傷害性T細胞活性化の増加した動員、g) 増加したC D 4 + ヘルパーT細胞活性、h) C D 4 + ヘルパーT細胞活性の増加した動員、i) 増加したNK細胞活性、j) NK細胞の増加した動員、k) 増加した好中球活性、l) 増加したマクロファージ活性、及び／またはm) 顕微鏡法で評価した場合の、増加した紡錘形の形態、外観の平坦性、及び／または樹状突起の数のうちの1つ以上を含む、いくつかの既知の様式で測定することができる。

【0101】

すでに炎症誘発性である細胞では、炎症性表現型の増加は、さらなる炎症誘発性状態を指す。

【0102】

対照的に、「M 2 マクロファージ」という用語は、抗炎症性の表現型を有するマクロファージを指す。T h 2 及び腫瘍由来のサイトカイン、例えば、I L - 4、I L - 1 0、I L - 1 3、トランスフォーミング増殖因子ベータ (T G F - β)、プロスタグランジンE 2 (P G E 2) などは、M 2 分極化を促進することができる。M 2 マクロファージの代謝プロファイルは、O X P H O S、F A O、解糖系の低減、及びP P Pによって定義される。マンノース受容体がマウスマクロファージのT h 2 I L - 4 及びI L - 1 3によって

選択的に増強され、マンノシル化リガンドの高いエンドサイトーシス排除を誘導し、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II 抗原の発現を増加させ、炎症誘発性サイトカイン分泌を減少するという発見は、Stein、Doyle、及び同僚らの IL-4 及び IL-13 が、IFN- γ の活性化とはまったく異なるが非活性化にはほど遠い状態である、代替的な活性化表現型を誘導するという提唱から導かれた (Martinez and Gordon (2014) F1000 Prime Reports 6:13) 。インビトロ及びインビボの定義/アッセイは、異なるエンドポイントを測定できる：一般的なインビトロエンドポイントには、増殖、遊走、抗炎症性 Th2 サイトカイン/ケモカイン分泌及び/または遊走によって測定される抗炎症性細胞刺激が含まれ、一方で一般的なインビボ M2 エンドポイントには、病原体との戦い、組織損傷の遅延/線維化促進応答、他の細胞の Th2 分極化、遊走誘導物質などを分析することがさらに含まれる。インビトロ及びインビボの両方で、寛容原性抗原提示を評価することができる。

10

【0103】

「2 型」または「M2 様」単球及び/またはマクロファージは、少なくとも 1 つの抗炎症性サイトカインを分泌することによって抗炎症性刺激を生成すること、その表面上の阻害分子に対して少なくとも 1 つの細胞表面阻害分子/リガンドを発現すること、抗炎症反応を刺激するために少なくとも 1 つの他の細胞を動員/指示/相互作用すること、寛容原性の状況下で抗原を提示すること、寛容原性応答の開始を可能にする部位への移動、または寛容原性/抗炎症機能につながると予想される少なくとも 1 つの遺伝子の発現を開始することのうちの少なくとも 1 つを特徴とする抗炎症応答に寄与することができる単球及び/またはマクロファージである。特定の実施形態では、炎症誘発性状態へのかかる調節は、上述の 1 型炎症誘発性状態測定の反対を含むがこれに限定されない、いくつかの周知の方法で測定することができる。

20

【0104】

「増加した炎症性表現型」を有する細胞は、例えば、本発明の少なくとも 1 つのバイオマーカー (例えば、表 1 及び/または表 2 に列挙される少なくとも 1 つの標的) を調節する薬剤による接触など、本発明の少なくとも 1 つのバイオマーカー (例えば、表 1 及び/または表 2 に列挙される少なくとも 1 つの標的) の調節後、a) 1 つ以上の 1 型の列挙される基準における増加、及び/または b) 1 つ以上の 2 型の列挙される基準における低減に関連するより高い炎症誘発性応答能力を有する細胞である。

30

【0105】

「低減した炎症性表現型」を有する細胞は、例えば、本発明の少なくとも 1 つのバイオマーカー (例えば、表 1 及び/または表 2 に列挙される少なくとも 1 つの標的) を調節する薬剤による接触など、本発明の少なくとも 1 つのバイオマーカー (例えば、表 1 及び/または表 2 に列挙される少なくとも 1 つの標的) の調節後、a) 1 つ以上の 1 型の列挙される基準における低減、及び/または b) 1 つ以上の 2 型の列挙される基準における増加に関連するより高い抗炎症応答能力を有する細胞である。

【0106】

したがって、マクロファージは、1 型及び 2 型状態の間の中間表現型を有する代替的に活性化された状態の連続体を採用することができ (例えば、Biswas et al. (2010) Nat. Immunol. 11:889-896、Mosser and Edwards (2008) Nat. Rev. Immunol. 8:958-969、Mantovani et al. (2009) Hum. Immunol. 70:325-330 を参照されたい)、かかる増加または減少した炎症性表現型は上述のように決定することができる。

40

【0107】

本明細書で使用される場合、「代替的に活性化されたマクロファージ」または「代替的に活性化された状態」という用語は、古典的に活性化された M1 炎症誘発性マクロファージ以外の本質的にすべての型のマクロファージ集団を指す。本来、代替的に活性化された状態は、M2 型抗炎症性マクロファージにのみ指定される。用語は、生化学、生理学、機

50

能に劇的な違いがあるマクロファージの他のすべての代替的に活性化された状態を含むように拡張されている。

【0108】

例えば、代替的に活性化されたマクロファージの1つの型は、創傷治癒に関与するものである。好塩基球及び肥満細胞によって生成されるIL-4などの組織損傷（例えば、外科的創傷）中に放出される先天的及び適応的シグナルに応答して、組織常駐マクロファージを活性化して創傷治癒を促進することができる。創傷治癒マクロファージは、高レベルの炎症誘発性サイトカインを生成する代わりに、大量の細胞外マトリックス成分、例えば、キチナーゼ及びキチナーゼ様タンパク質YM1/CHI3L3、YM2、AMCase、ならびにスタビリンを分泌し、これらのすべては炭水化物及びマトリックス結合活性を呈し、組織の修復に関与する。

10

【0109】

代替的に活性化されたマクロファージの別の例は、自然免疫応答及び適応免疫応答によって誘導され得る制御性マクロファージを含む。制御性マクロファージは、免疫制御機能に寄与することができる。例えば、マクロファージは、視床下部-下垂体-副腎（HPA）軸からのホルモン（例えば、糖質コルチコイド）に応答して、宿主の防御及び炎症誘発性サイトカインの転写の阻害などの炎症機能が阻害された状態をとることができる。制御性マクロファージは、制御性サイトカインTGF- β を生成して、特定の条件下、例えば適応免疫応答の後期段階で免疫応答を弱めることができる。多くの制御性マクロファージは、共刺激分子（例えば、CD80及びCD86）を高レベルで発現し、したがって、T細胞に対して抗原提示を増強することができる。

20

【0110】

多くの刺激/合図は、制御性マクロファージの分極化を誘導することができる。合図には、これらに限定されないが、TLRアゴニスト及び免疫複合体、アポトーシス細胞、IL-10、プロスタグランジン、GPCRリガンド、アデノシン、ドーパミン、ヒスタミン、スフィンゴシン1-リン酸、メラノコルチン、血管作動性腸管ペプチド、ならびにシグレック-9の組み合わせが含まれる。寄生虫、ウイルス、細菌などのいくつかの病原体は、制御性マクロファージの分化を特異的に誘導し、病原体の死滅に不完全性をもたらし、感染した微生物の生存及び拡散を促進する。

【0111】

制御性マクロファージは、いくつかの共通の特徴を共有する。例えば、制御性マクロファージは、抗炎症作用を誘導するために2つの刺激を必要とする。異なる合図/刺激によって誘導される制御性マクロファージ亜集団間の違いも観察され、それらの不均一性を反映している。

30

【0112】

制御性マクロファージはまた、代謝、発達中、恒常性の維持に見られる様々な亜集団を含む、マクロファージの不均一な集団である。一例では、代替的に活性化されたマクロファージの亜集団は、M-CSF/GM-CSF、CD16リガンド（免疫グロブリンなど）、及びIFN- γ （PCT公開第WO2017/153607号）の存在下で誘導され得る固有の免疫制御特性を備えた免疫制御性マクロファージである。

40

【0113】

組織内のマクロファージは、時間の経過と共にインビボでそれらの活性化状態を変化させることができる。この動的性は、組織へ遊走するマクロファージの一定の流入、活性化されたマクロファージの動的変化、及び休止状態に戻るマクロファージを反映する。いくつかの条件では、環境内の異なるシグナルがマクロファージを異なる活性化状態の混合に誘導することができる。例えば、慢性創傷を有する状態では、時間の経過に伴うマクロファージは、炎症誘発性活性化亜集団、創傷治癒促進性であるマクロファージ、及びいくつかの分解促進活性を示すマクロファージを含み得る。非病理学的条件下では、免疫刺激性及び免疫制御性マクロファージのバランスの取れた集団が免疫系に存在する。いくつかの疾患状態では、バランスが崩れ、不均衡が多くの臨床状態を引き起こす。

50

【0114】

マクロファージの明らかな可塑性はまた、それらが疾患状態で受ける環境の合図に対して不安定な応答をもたらす。マクロファージは、様々な疾患状態に応答して再分極することができ、明確な特徴を示す。一例は、末梢血単球から腫瘍組織に誘引され、濾過されるマクロファージであり、これはしばしば「腫瘍関連マクロファージ」（「TAM」）または「腫瘍浸潤マクロファージ」（「TIM」）と称される。腫瘍関連マクロファージは、腫瘍内の最も豊富な炎症性細胞であり、高いTAM密度及びほとんどのがんの予後不良の間に有意な相関が見られた（Zhang et al. (2012) PLoS One 7: e50946. 10.1371/journal.pone.0050946）。

【0115】

TAMは、M1様炎症誘発性及びM2様抗炎症性亜集団の両方の混合集団である。新形成の初期段階では、炎症誘発性の表現型を有する古典的に活性化されたマクロファージが正常酸素状態の腫瘍領域に存在し、形質転換された腫瘍細胞の早期根絶に寄与すると考えられている。しかしながら、腫瘍が成長して進行するにつれて、後期腫瘍のTAMの大部分は、腫瘍の低酸素領域に存在するM2様制御性マクロファージである。マクロファージのこの表現型の変化は、腫瘍細胞外マトリックス、無酸素環境、腫瘍細胞から分泌されるサイトカインなどの腫瘍微小環境刺激によって著しく影響を受ける。M2様TAMは、創傷治癒マクロファージ及び制御性マクロファージのハイブリッド活性化状態を示し、高レベルのIL-10を生成するが、IL-12をほとんどまたはまったく生成しないこと、不完全なTNF生成、抗原提示細胞の抑制、及び腫瘍血管新生への寄与を含む様々な固有の特徴を示す。

【0116】

一般に、TAMはM2表現型を特徴とし、IL-10及びIL-1 β の生成を介してM1マクロファージを媒介した炎症を抑制する。したがって、TAMは、増殖及び浸潤のための栄養素ならびに成長シグナルを提供し、新しい血管の作製（すなわち、血管新生）を促進する創傷治癒（すなわち、抗炎症）経路の活性化を通じて腫瘍の成長及び転移を促進する。さらに、TAMは、免疫系の他の要素が腫瘍を認識して攻撃するのを防ぐ抗炎症シグナルを分泌することにより、免疫抑制腫瘍の微小環境に貢献する。TAMは、多くの種類のがん（例えば、乳癌、星状細胞腫、頭頸部扁平上皮癌、乳頭状腎細胞癌II型、肺癌、膵臓癌、胆嚢癌、直腸癌、神経膠腫、古典的ホジキンリンパ腫、卵巣癌、及び結腸直腸癌）におけるがんの成長、増殖、及び転移を促進する上で重要な役割を果たしていることが報告されている。一般に、TAMの大きな集団により特徴付けされるがんは、疾患の予後不良と関連している。

【0117】

多様な機能及び活性化状態は、適切に制御されていない場合に危険な結果をもたらし得る。例えば、古典的に活性化されたマクロファージは、宿主組織に損傷を生じさせ、周囲の組織を素因とし、過剰に活性化されるとグルコース代謝に影響を与え得る。

【0118】

多くの疾患状態では、マクロファージ活性化状態のバランスの取れた動態が妨害され、不均衡が疾患を引き起こす。例えば、腫瘍にはマクロファージが豊富に存在する。マクロファージは、がんの75パーセントに見られる。攻撃型のがんは、マクロファージ及び他の免疫細胞のより高い浸潤に関連する場合が多い。ほとんどの悪性腫瘍では、TAMは、がん細胞の生存、増殖、浸潤、血管外遊出及び転移の促進、血管新生の刺激、細胞外マトリックスの再構築、ならびに抗腫瘍免疫の抑制を含む、いくつかの腫瘍促進機能を発揮する（Qian and Pollard, 2010, Cell, 141(1): 39-51）。それらはまた、オルニチン、VEGF、EGF、TGF- β などの成長促進分子を生成する可能性もある。

【0119】

TAMは、腫瘍微小環境で遭遇したCSF1及びIL4/IL13に応答して、腫瘍の成長及び生存を刺激する。TAMはまた、MMP類、カテプシン及びuPA及びマトリッ

10

20

30

40

50

クス再構築酵素（例えば、リシルオキシダーゼ及びSPARC）などのプロテアーゼの発現を介して腫瘍微小環境をリモデリングすることもできる。

【0120】

TAMは、腫瘍の悪性状態の移行に必要な腫瘍組織の血管の劇的な増加を調節する腫瘍血管新生において重要な役割を果たす。これらの血管新生TAMは、アンジオポエチン受容体TIE2を発現し、VEGFファミリーのメンバー、TNF α 、IL1 β 、IL8、PDGF、及びFGFなどの多くの血管新生分子を分泌する。

【0121】

マクロファージの亜集団の多様性は、これらの個々の腫瘍促進機能を実行する。これらのTAMは、マクロファージ浸潤の程度、及び腫瘍の種類によって表現型が異なる。例えば、ヒト肝細胞癌の詳細なプロファイリングは、解剖学的位置、及び腫瘍促進特性、及び抗腫瘍特性の観点から定義される様々なマクロファージサブタイプを示す。M2様マクロファージは、TAMの腫瘍促進機能の主要なリソースであることが示されている。M2様TAMは、抗がん治療の有効性に影響を与え、治療抵抗性に寄与し、従来のがん治療後の腫瘍再発を媒介することが示されている。

【0122】

調節不全単球及び／またはマクロファージは、自己免疫疾患、慢性炎症、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、アテローム性動脈硬化症、I型糖尿病、II型糖尿病、肥満、アレルギー、喘息、血球症性リンパ球症、サルコイドーシス、歯周病、肺胞タンパク症、マクロファージ関連肺疾患、心血管疾患、微生物感染症、移植関連合併症、代謝症候群、高血圧症、及び炎症性神経学的疾患などの様々な障害に見出されている。単球及びマクロファージは、マクロファージ媒介性疾患の潜在的な治療標的である。

【0123】

骨髄由来細胞標的としてのCCR2及びCSF1R

CCR2（C-Cケモカイン受容体2；CCR2A、CCR2B、CD192、CMKBR2、及びCKR2としても知られている）は、ヒトにおけるCCL2（MCP-1）、CCL8（MCP-2）、CCL7（MCP-3）、CCL13（MCP-4）、及びCCL16を含むマクロファージ走化性タンパク質として知られている複数のケモカインによって活性化され得る細胞表面上で発現されるGタンパク質共役受容体である（Charobetal.（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:2752-2756）。CCR2の活性化は、単球、樹状細胞、及びマクロファージなどの受容体を持つ細胞型の指向性の遊走をもたらす。CCR2は、特に循環骨髄由来の単球を炎症性部位に動員し、その後マクロファージまたは樹状細胞に形質転換する免疫細胞の輸送において重要な役割を果たす。例えば、CCR2活性化は、骨髄からがん組織への単球の遊走及び侵入を増加させることによってがん転移過程に深く関与している。腫瘍細胞は、CCR2陽性単球及びマクロファージを腫瘍領域に引き付けるCCL2を発現することができることが示されている。浸潤したマクロファージは、腫瘍微小環境の影響下で、腫瘍促進機能に適応される。CCR2シグナル伝達カスケードは、多数の炎症性疾患及び神経変性疾患、ならびにアテローム性動脈硬化症及び心筋梗塞などの心血管障害にも関与している（Francaetal.（2017）Clin. Sci. 131:1215-1224を参照されたい）。CCR2は、HIVの共受容体でもある（Conneretal.（1997）J. Exp. Med. 185:621-628）。

【0124】

CCR2とそのリガンドCCL2/MCP-1の様々な疾患における望ましくない免疫応答での関与に起因して、CCR2アンタゴニストは、がんなどのマクロファージ媒介性炎症性疾患の予防、治療、または改善に有望な治療薬であることが認識されている。例えば、CCRアンタゴニストは、ヒト肺腺癌細胞の増殖、遊走、及び浸潤を抑制することができる（Anetal.（2017）Oncotarget 8:39230-39240）。CCL2/CCR2軸を遮断すると、肝細胞癌などのがんにおいて、TAMを抑制し、抗腫瘍免疫応答を活性化することができる（Lietetal.（2017）G

ut 66:157-167)。

【0125】

C S F 1 R (コロニー刺激因子1受容体;当該技術分野でマクロファージコロニー刺激因子受容体(M-C S F R)、F M S、F I M 2、C-F M S、及びC D 1 1 5としても知られている)は、N末端細胞外ドメイン(E C D)及びチロシンキナーゼ活性を有するC末端細胞内ドメインを有する単回貫膜貫通受容体である。リガンドC S F 1 (M-C S Fとしても知られている)またはI L-3 4によるC S F 1 Rの活性化は、単球及びマクロファージの輸送、生存、増殖、及び分化を刺激することができる。C S F 1 R活性の調節異常は、マクロファージ細胞集団のレベル及び/または活性の不均衡をもたらし、いくつかの疾患を引き起こし得る。C S F 1 Rの発現及び活性は、様々な固形腫瘍型及び血液学的悪性腫瘍(例えば、慢性リンパ性白血病(C L L))においてマクロファージに浸潤する腫瘍(T A M)を維持するために重要であることが示されている。

10

【0126】

C S F 1 RおよびそのリガンドC S F 1の両方は、がん、自己免疫疾患、及び炎症を含む多くのマクロファージ媒介性疾患の潜在的な治療標的として同定されている。C S F 1 R阻害は、A M L中のC D 4⁺単球からの抑制腫瘍微小環境シグナルを枯渇させることができるという報告されている(Edwards et al. (2015) Blood 126:3824)。いくつかの研究はまた、s i R N A、アンタゴニスト抗体、及び小分子阻害剤(例えば、G W 2 5 8 0)などのC S F 1及び/またはC S F 1 R阻害剤は、膵臓癌における免疫阻害T A M (Zhu et al. (2014) Cancer Res. 74:5057-5069)、びまん型巨細胞腫(Dt-GCT) (Ries et al. (2014) Cancer Cell 25:846-859)、及び急性骨髄性白血病(A M L) (Moughon et al. (2015) Cancer Res. 75:4742-4752)を逆転することができることを示した。C S F 1 R活性化を阻害することによるT A Mの閉塞は、試験された腫瘍モデルにおけるがん治療を効果的に改善することができる。C S F 1 R及びC S F 1相互作用に対する抗体などのC S F 1 R及びC S F 1アンタゴニスト、C S F 1 RまたはC S F 1発現のR N A i媒介性サイレンシング(例えば、P C T公開第W O 2 0 0 7/0 8 1 8 7 9号)、C S F 1 R細胞外ドメイン(E C D)の可溶性形態(例えば、W O 2 0 0 7/0 8 1 8 7 9を参照されたい)、ならびにC S F 1 Rチロシンキナーゼ活性の小分子阻害剤、及びC S F 1の阻害剤がマクロ

20

30

【0127】

理論に束縛されるものではないが、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド組成物と、それを含む製剤との組み合わせの使用は、腫瘍細胞からの成長因子などの環境シグナルに応答して、単球及びマクロファージの輸送、分極化、及び活性化を同時に阻害するために、C C R 2及びC S F 1 R活性化を阻害するために特に効果的であると考えられる。

【0128】

I I I. 本発明の組成物

C C R 2及びC S F 1 Rのアンタゴニストは、疾患状態におけるマクロファージ含有量の調節に対するそれらの影響、例えば、腫瘍形成マクロファージ(例えば、T A M)及び腫瘍形成を阻害する炎症誘発性マクロファージの含有量について調査されている。本発明は、C C R 2及びC S F 1 Rシグナル伝達を遮断し、かつ同時にC C R 2及びC S F 1 Rを遮断するために相乗的に機能することができるC C R 2及び/またはC S F 1 Rの特に有効なアンタゴニストを含む組成物を提供する。

40

【0129】

本発明に従って、アンタゴニストは、小分子、ペプチド模倣薬、ポリペプチド、ペプチド、抗体、またはC C R 2及び/またはC S F 1 Rに特異的に標的化される単一または二

50

本鎖核酸のいずれかである、センスもしくはアンチセンス配向性のいずれかでの核酸分子であり得る。いくつかの実施形態では、核酸ベースの薬剤は、オリゴヌクレオチドリンカーを用いた分離などによってC C R 2及びC S F 1 Rに対する相補的配列（例えば、抗センス）を含むことでC C R 2及びC S F 1 Rの両方を標的とする単一分子であり得る。いくつかの実施形態では、核酸ベースの薬剤は、C C R 2またはC S F 1 Rのいずれかを個別に標的とする。いくつかの実施形態では、C C R 2及びC S F 1 Rの組み合わせられたアンタゴニストは、二本鎖s i R N A分子カクテルを含む。

【0130】

本発明により包含される一態様は、核酸分子の使用を伴う。核酸分子は、デオキシリボ核酸（DNA）分子（例えば、cDNA、ゲノムDNAなど）、リボ核酸（RNA）分子（例えば、mRNA、長鎖ノンコーディングRNA、低分子RNA種など）、DNA/RNAハイブリッド、及びヌクレオチド類似体を使用して生成されるDNAまたはRNAの類似体であり得る。RNA剤には、RNAi（RNA干渉）剤（例えば、低分子干渉RNA（siRNA））、一本鎖RNA（ssRNA）分子（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）、または二本鎖RNA（dsRNA）分子が含まれ得る。dsRNA分子は、第1の鎖及び第2の鎖を含み、第2の鎖は、第1の鎖と実質的に相補的であり、第1の鎖及び第2の鎖は、少なくとも1つの二本鎖二重領域を形成する。dsRNA分子は、平滑末端であるか、または少なくとも1つの末端オーバーハングを有することができる。標的核酸配列と結合する薬剤として使用される場合、本発明により包含される核酸薬剤は、ゲノム配列及び／またはmRNA配列などの標的配列の任意の領域とハイブリダイズでき、例えば、これらに限定されないが、エンハンサー領域、プロモーター領域、転写開始及び／または停止領域、スプライス部位、コード領域、3'非翻訳領域（3'-UTR）、5'非翻訳領域（5'-UTR）、5'キャップ、3'ポリアデニルルテイル、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0131】

「単離された」核酸分子は、核酸分子の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離されているものである。好ましくは、「単離された」核酸分子は、核酸が由来する生物のゲノムDNA中の核酸（すなわち、核酸の5'及び3'末端に位置する配列）に天然に隣接する配列（好ましくは、タンパク質コード配列）を含まない。例えば、様々な実施形態では、単離された核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNA中の核酸分子に天然に隣接する、約5kB、4kB、3kB、2kB、1kB、0.5kB、または0.1kBのヌクレオチド配列を含有し得る。さらに、cDNA分子などの「単離された」核酸分子は、組換え技術によって生産される場合、他の細胞性物質もしくは培地を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含み得ない。

【0132】

本発明により包含される核酸分子は、標準的な分子生物学技術及び本明細書に記載されるデータベース記録内の配列情報を使用して単離することができる。かかる核酸配列のすべてまたは一部を使用して、本発明により包含される核酸分子は、標準的なハイブリダイゼーション及びクローニング技術を使用して単離することができる（例えば、Sambrook et al., ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2012に記載される）。

【0133】

本発明により包含される核酸分子は、cDNA、mRNA、またはゲノムDNAを鋳型として使用し、標準的なPCR増幅技術に従って適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅することができる。そのように増幅された核酸分子は、適切なベクターにクローン化され、DNA配列分析によって特徴付けられ得る。さらに、本発明により包含される核酸分子のすべてまたは一部に対応する核酸分子は、例えば、自動化された核酸シン

セサイザーを使用する、標準的な合成技術によって調製することができる。代替的に、核酸分子は、核酸がサブクローン化されている発現ベクターを使用して生物学的に生成され得る。例えば、アンチセンス核酸分子は、アンチセンス配向でクローン化することができる（すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下でさらに記載されるように、目的の標的核酸に対してアンチセンス配向である）。

【0134】

また、本発明により包含される核酸分子は、核酸配列の一部のみを含むことができ、全長核酸配列は、本発明により包含されるマーカー、または本発明により包含されるマーカーに対応するポリペプチドをコードするマーカーを含む。かかる核酸分子は、例えば、プライマーまたはプローブとして使用され得る。プローブ／プライマーは通常、1つ以上の実質的に精製されたオリゴヌクレオチドとして使用される。オリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジェントな条件下で、バイオマーカー核酸配列の少なくとも約7、好ましくは約15、より好ましくは約25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、もしくは400、またはそれ以上の連続したヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。バイオマーカー核酸分子の配列に基づくプローブを使用して、本発明により包含される1つ以上のマーカーに対応する転写物またはゲノム配列を検出することができる。プローブは、それに付着した標識基、例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子を含む。

【0135】

遺伝コードの縮重のために、バイオマーカーに対応するタンパク質をコードする核酸分子のヌクレオチド配列とは異なり、したがって同じタンパク質をコードするバイオマーカー核酸分子もまた企図される。

【0136】

さらに、アミノ酸配列の変化をもたらすDNA配列多型が集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることは、当業者によって理解されるであろう。かかる遺伝的多型は、自然の対立遺伝子変動により、集団内の個体間に存在し得る。対立遺伝子は、所定の遺伝子座で交互に発生する遺伝子の群の1つである。さらに、その遺伝子の全体的な発現レベルに影響を与え得る、RNA発現レベルに影響を与えるDNA多型も存在し得ることが理解されよう（例えば、制御または分解に影響を与えることによって）。

【0137】

本明細書で「対立遺伝子バリエーション」と互換的に使用される「対立遺伝子」という用語は、遺伝子またはその一部の代替形態を指す。対立遺伝子は、相同染色体上の同じ遺伝子座または位置を占める。対象が遺伝子の2つの同一対立遺伝子を有する場合、対象は、その遺伝子または対立遺伝子についてホモ接合性であると言われる。対象が遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を有する場合、対象は、その遺伝子または対立遺伝子についてヘテロ接合であると言われる。例えば、バイオマーカー対立遺伝子は、単一のヌクレオチドまたはいくつかのヌクレオチドにおいて互いに異なり得、ヌクレオチドの置換、欠失、及び挿入を含み得る。遺伝子の対立遺伝子はまた、1つ以上の変異を含む遺伝子の形態であり得る。

【0138】

本明細書で互換的に使用される「遺伝子の多型領域の対立遺伝子バリエーション」または「対立遺伝子バリエーション」という用語は、集団内の遺伝子のその領域に見られるいくつかの可能なヌクレオチド配列のうちの1つを有する遺伝子の代替形態を指す。本明細書で使用される場合、対立遺伝子バリエーションは、機能的対立遺伝子バリエーション、非機能的対立遺伝子バリエーション、SNP、変異、及び多型を包含することを意味する。

【0139】

「一塩基多型」（SNP）という用語は、対立遺伝子配列間の変動部位である一塩基が占める多型部位を指す。この部分は、通常、その対立遺伝子の高度に保存された配列（例えば、集団の1/100または1/1000メンバー未満で異なる配列）により先行及び後続される。SNPは通常、多型部位で1つのヌクレオチドが別のものに置換されるため

に発生する。SNPは、参照対立遺伝子に対するヌクレオチドの欠失またはヌクレオチドの挿入からも発生し得る。通常、多型部位は、参照塩基以外の塩基によって占められる。例えば、参照対立遺伝子が多型部位に塩基「T」（チミジン）を含む場合、改変された対立遺伝子は、多型部位に「C」（シチジン）、「G」（グアニン）、または「A」（アデニン）を含むことができる。SNPは、タンパク質をコードする核酸配列で発生することができ、その場合、それらは欠損、あるいはバリエーションタンパク質、または遺伝的疾患を生じさせ得る。かかるSNPは遺伝子のコード配列を改変させ得、別のアミノ酸を指定するか（「ミスセンス」SNP）、またはSNPが終止コドンを導入し得る（「ナンセンス」SNP）。SNPがタンパク質のアミノ酸配列を改変しない場合、SNPは「サイレント」と称される。SNPは、ヌクレオチド配列の非コード領域でも生じ得る。これは、例えば、代替的なスプライシングの結果として、欠陥のあるタンパク質発現をもたらし得るか、またはそれはタンパク質の機能に影響を及ぼし得ない。

10

【0140】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」及び「組換え遺伝子」という用語は、本発明により包含されるマーカーに対応するポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子を指す。かかる自然対立遺伝子バリエーションは、通常、所定の遺伝子のヌクレオチド配列内に1～5%の変動をもたらし得る。代替的な対立遺伝子は、いくつかの異なる個体で目的の遺伝子を配列決定することによって特定できる。これは、ハイブリダイゼーションプローブを使用して、様々な個体において同じ遺伝子座を特定することにより、容易に実行できる。自然対立遺伝子バリエーションの結果であり、機能的活性を改変させない、かかるヌクレオチドバリエーション及び結果として生じるアミノ酸多型またはバリエーションのいずれか及びすべては、本発明により包含される範囲内にあることが意図される。

20

【0141】

別の実施形態では、バイオマーカー核酸分子は、少なくとも7、15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3500、4000、4500、またはそれ以上のヌクレオチドの長さであり得、ストリンジェントな条件下で、本発明により包含されるマーカーに対応する核酸分子、または本発明により包含されるマーカーに対応するタンパク質をコードする核酸分子にハイブリダイズする。「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーション及び洗浄のための条件を記載することを意図しており、その下で、互いに少なくとも60%（65%、70%、75%、80%、好ましくは85%）同一のヌクレオチド配列は、通常、互いにハイブリダイズしたままである。かかるストリンジェントな条件は当業者に即知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989)のセクション6.3.1-6.3.6に見出すことができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例は、約45℃での6X塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）、続いて50～65℃での0.2XSSC、0.1%SDSでの1回以上の洗浄におけるハイブリダイゼーションである。

30

40

【0142】

集団内に存在することができる、本発明により包含される核酸分子の天然に存在する対立遺伝子バリエーションに加えて、当業者は、配列の変化が変異によって導入され、それによってコードされるタンパク質の生物学的活性を改変することなく、コードされるタンパク質のアミノ酸配列の変化をもたらすことができることをさらに理解するであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換につながるヌクレオチド置換を行うことができる。「非必須」アミノ酸残基は、生物活性を改変することなく野生型配列から改変することができる残基であるが、「必須」アミノ酸残基は、生物活性に必要である。例えば、

50

様々な種の相同体間で保存されていないか、または半分だけ保存されているアミノ酸残基は、活性にとって必須ではない可能性があり、したがって、改変の標的となる可能性が高い。代替的に、様々な種（例えば、ネズミ及びヒト）の相同体間で保存されているアミノ酸残基は、活性に必須であり得、したがって、改変の標的ではない可能性が高い。

【0143】

したがって、本発明により包含される別の態様は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、本発明により包含されるポリペプチドをコードする核酸分子を包含する。かかるポリペプチドは、本発明により包含されるマーカーに対応し、依然として生物学的活性を保持する天然に存在するタンパク質とはアミノ酸配列が異なる。一実施形態では、バイオマーカータンパク質は、本明細書に記載されるバイオマーカータンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約40%同一、50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、87.5%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるアミノ酸配列を有する。

【0144】

バリエーションタンパク質をコードする単離された核酸分子は、1つ以上のアミノ酸残基の置換、追加、または欠失がコードされたタンパク質に導入されるように、本発明により包含される核酸のヌクレオチド配列に1つ以上のヌクレオチド置換、追加、または欠失を導入することによって作製することができる。変異は、部位特異的変異誘発及びPCRを媒介した変異誘発などの標準的な技術によって導入することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1つ以上の予測される非必須アミノ酸残基で行われる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。代替的に、変異は、飽和変異誘発などによって、コード配列のすべてまたは一部に沿ってランダムに導入することができ、結果として得られる変異体を生物学的活性についてスクリーニングして、活性を保持する変異体を同定することができる。変異誘発に続いて、コードされたタンパク質を組換え的に発現させることができ、タンパク質の活性を決定することができる。

【0145】

以下でさらに記載するように、本発明に従う有用ないくつかの形態の核酸は、生物学的標的の機能を阻害する薬剤を指す阻害剤として作用することができる。いくつかの実施形態では、阻害剤は、遺伝子または遺伝子産物の発現を妨げる遺伝子サイレンシング剤である。「遺伝子サイレンシング」は、しばしば「遺伝子ノックダウン」と称される。遺伝子サイレンシングは、転写レベルで、すなわち、DNAからRNAへの転写を妨げるか、または翻訳レベルで、すなわち、転写後サイレンシング、すなわち、mRNAからタンパク質への翻訳を妨げることができる。転写遺伝子サイレンシングの種類には、例えば、ゲノムインプリンティング、パラ変異、トランスポゾンサイレンシング、ヒストン修飾、導入遺伝子サイレンシング、位置効果、及びRNA指令DNAメチル化が含まれる。転写後遺伝子サイレンシングの例には、RNA干渉（RNAi）、RNAサイレンシング、ナンセンス変異依存分解機構などが含まれる。遺伝子サイレンシング剤は、特定の遺伝子をサイレンシングする（例えば、発現を阻害する）か、または複数の遺伝子を同時にサイレンシングするように設計することができる。遺伝子サイレンシング剤は、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約100%で遺伝子及び

／または遺伝子産物の発現を減少させることができる。いくつかの実施形態では、遺伝子サイレンシング剤は、少なくとも約70%で遺伝子及び／または遺伝子産物の発現を減少させる。

【0146】

いくつかの実施形態では、ゲノム中の核酸は有用であり、標的及び／または薬剤として使用することができる。例えば、ゲノム中の標的DNAは、当該技術分野で周知の方法を使用して操作することができる。ゲノム内の標的DNAは、欠失、挿入、及び／または変異、レトロウイルス挿入、人工染色体技術、遺伝子挿入、組織特異的プロモーターによるランダム挿入、遺伝子標的化、転移因子、及び／または外来DNAを導入するための他の方法、または修飾されたDNA／修飾された核DNAを生成することによって操作することができる。他の修飾技術には、ゲノムからのDNA配列の欠失、及び／または核DNA配列の改変が含まれる。核DNA配列は、例えば、部位特異的変異誘発によって改変され得る。

10

【0147】

s i R N A 分子

いくつかの実施形態では、CCR2及びCSF1Rのアンタゴニストは、CCR2またはCSF1Rにハイブリダイズする低分子干渉RNA (s i R N A) 分子である。他の実施形態では、CCR2及びCSF1Rのアンタゴニストは、s i R N A分子の二本鎖がリンカー領域 (例えば、ヌクレオチドリンカーまたは非ヌクレオチドリンカー) によって連結され得るshRNA (ショートヘアピンRNA) 分子であり得る。

20

【0148】

CCR2に特異的なs i R N A分子は、コード領域、未翻訳領域、及びUTRを含むヒトCCR2 mRNAにハイブリダイズすることができる (Gene Bank 参照配列NM_001123041. 2; 配列番号1)。CCR2に特異的なs i R N A分子は、カニクイザル及びアカゲザルなどにおいて、CCR2のすべてのタンパク質コード転写物 (例えば、CCR2アイソフォームCCR2A (NM_001123041. 2; 配列番号1) 及びCCR2B (NM_001123396. 1; 配列番号3)) 及びそのオルソログを標的とすることができる。

CSF1Rに特異的なs i R N A分子は、コード領域、未翻訳領域、及びUTRを含むヒトCSF1R mRNAにハイブリダイズすることができる (Gene Bank 参照配列NM_005211. 3; 配列番号2)。CSF1R2に特異的なs i R N A分子は、カニクイザル及びアカゲザルなどにおいて、CSF1R2のすべてのタンパク質コード転写物 (例えば、CSF1Rアイソフォーム1 (NM_005211. 3; 配列番号2) 及びCSF1Rアイソフォーム2 (NM_001288705. 2; 配列番号4) 及びCSF1Rアイソフォーム4 (NM_001349736. 1; 配列番号5)) 及びそのオルソログを標的とすることができる。

30

【表 1 - 1】

表 1 : 代表的なCCR 2 及びCSF 1 R cDNA配列

説明	配列 (5' ~ 3')	配列 番号
ヒトCCR 2 mRNA A NM_0 01123 041.2	TTTATTCTCTGGAACATGAAACATTCTG TTGTGCTCATATCATGCAAATTATCACT AGTAGGAGAGCAGAGAGTGGAAATGTTTC CAGGTATAAAGACCCACAAGATAAAGAA GCTCAGAGTCGTTAGAAACAGGAGCAGA TGTACAGGGTTTGCCTGACTCACACTCA AGGTTGCATAAGCAAGATTTCAAAATTA ATCCTATTCTGGAGACCTCAACCCAATG TACAATGTTTCCTGACTGGAAAAGAAGAA CTATATTTTTTCTGATTTTTTTTTTCAAA TCTTTACCATTAGTTGCCCTGTATCTCC GCCTTCACTTTCTGCAAGGAAACTTTATT TCCTACTTCTGCATGCCAAGTTTCTACC TCTAGATCTGTTTGGTTTCAGTTGCTGAG AAGCCTGACATACCAGGACTGCCTGAGA CAAGCCACAAGCTGAACAGAGAAAGTGG ATTGAACAAGGACGCATTTCCCCAGTAC ATCCACAACATGCTGTCCACATCTCGTT CTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAG CGGTGAAGAAGTCACCACCTTTTTTTGAT TATGATTACGGTGCTCCCTGTCATAAAT TTGACGTGAAGCAAATTGGGGGCCCAACT CCTGCCTCCGCTCTACTCGCTGGTGTTTC ATCTTTGGTTTTTGTGGGCAACATGCTGG TCGTCCTCATCTTAATAAACTGCAAAAA GCTGAAGTGCTTGACTGACATTTACCTG CTCAACCTGGCCATCTCTGATCTGCTTT TTCTTATTACTCTCCCATTTGTGGGCTCA CTCTGCTGCAAATGAGTGGGTCTTTGGG	1

10

20

30

【表 1 - 2】

	AATGCAATGTGCAAATTATTCACAGGGC TGTATCACATCGGTTATTTTGGCGGAAT CTTCTTCATCATCCTCCTGACAATCGAT AGATACCTGGCTATTGTCCATGCTGTGT TTGCTTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTT TGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACCTGG TTGGTGGCTGTGTTTGCTTCTGTCCCAG GAATCATCTTTACTAAATGCCAGAAAGA AGATTCTGTTTATGTCTGTGGCCCTTAT TTTCCACGAGGATGGAATAATTTCCACA CAATAATGAGGAACATTTTGGGGGCTGGT CCTGCCGCTGCTCATCATGGTCATCTGC TACTCGGGAATCCTGAAAACCCTGCTTC GGTGTGGAACGAGAAGAAGAGGCATAG GGCAGTGAGAGTCATCTTCACCATCATG ATTGTTTACTTTCTCTTCTGGACTCCCT ATAATATTGTCATTCTCCTGAACACCTT CCAGGAATTCTTCGGCCTGAGTAACTGT GAAAGCACCAAGTCAACTGGACCAAGCCA CGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGAC TCACTGCTGCATCAATCCCATCATCTAT GCCTTCGTTGGGGAGAAGTTCAGAAGCC TTTTTTCACATAGCTCTTGGCTGTAGGAT TGCCCCACTCCAAAACCAGTGTGTGGA GGTCCAGGAGTGAGACCAGGAAAGAATG TGAAAGTGACTACACAAGGACTCCTCGA TGGTCGTGGAAAAGGAAAGTCAATTGGC AGAGCCCCCTGAAGCCAGTCTTCAGGACA AAGAAGGAGCCTAGAGACAGAAATGACA GATCTCTGCTTTGGAAATCACACGTCTG GCTTCACAGATGTGTGATTACAGTGTG AATCTTGGTGTCTACGTTACCAGGCAGG AAGGCTGAGAGGAGAGAGACTCCAGCTG GGTTGGAAAACAGTATTTTCCAAACTAC CTTCCAGTTCCTCATTTTTTGAATACAGG CATAGAGTTCAGACTTTTTTTTAAATAGT AAAAATAAAATTAAAGCTGAAAACCTGCA ACTTGTAATGTGGTAAAGAGTTAGTTT GAGTTACTATCATGTCAAACGTGAAAAT GCTGTATTAGTCACAGAGATAATTCTAG CTTTGAGCTTAAGAATTTTGAGCAGGTG GTATGTTTGGGAGACTGCTGAGTCAACC CAATAGTTGTTGATTGGCAGGAGTTGGA	
--	---	--

10

20

30

40

【表 1 - 3】

	AGTGTGTGATCTGTGGGCACATTAGCCT ATGTGCATGCAGCATCTAAGTAATGATG TCGTTTGAATCACAGTATACGCTCCATC GCTGTCATCTCAGCTGGATCTCCATTCT CTCAGGCTTGCTGCCAAAAGCCTTTTGT GTTTTTGT TTTTGTATCATTATGAAGTCAT GCGTTTAAATCACATTTCGAGTGTTTCAGT GCTTCGCAGATGTCCTTGATGCTCATAT TGTTCCCTATTTTGGCCAGTGGGAACCTCC TAAATCAAGTTGGCTTCTAATCAAAGCT TTTAAACCCTATTGGTAAAGAATGGAAG GTGGAGAAGCTCCCTGAAGTAAGCAAAG ACTTTCCTCTTAGTCGAGCCAAGTTAAG AATGTTCTTATGTTGCCCAGTGTTGTTTC TGATCTGATGCAAGCAAGAAACACTGGG CTTCTAGAACCAGGCAACTTGGGAACATA GACTCCCAAGCTGGACTATGGCTCTACT TTCAGGCCACATGGCTAAAGAAGGTTTC AGAAAGAAGTGGGGACAGAGCAGAACTT TCACCTTCATATATTTGTATGATCCTAA TGAATGCATAAAAATGTTAAGTTGATGGT GATGAAATGTAAATACTGTTTTTTAACAA CTATGATTTGGAAAATAAATCAATGCTA TAACTATGTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA A		10
ヒトCSF 1R (NM_0 0521 1.3)	GAAGGGCAGACAGAGTGTTCCAAAAGCGT GAGAGCACGAAGTGAGGAGAAGGTGGAG AAGAGAGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAG AGAGGAAGCGGAGGGAACTGCGGCCAGG CTAAAAGGGGAAGAAGAGGATCAGCCCA AGGAGGAGGAAGAGGAAAACAAGACAAA CAGCCAGTGTCAGAGGAGAGGAACGTGTG TCCAGTGTCCTCGATCCCTGCGGAGCTAG TAGCTGAGAGCTCTGTGCCCTGGGCACC TTGCAGCCCTGCACCTGCCTGCCACTTC CCCACCGAGGCCATGGGCCCAGGAGTTC TGCTGCTCCTGCTGGTGGCCACAGCTTG GCATGGTTCAGGGAATCCCAGTGATAGAG CCCAGTGTTCCCTGAGCTGGTTCGTGAAGC CAGGAGCAACGGTGACCTTGCGATGTGT GGGCAATGGCAGCGTGGAATGGGATGGC CCCCCATCACCTCACTGGACCCTGTACT CTGATGGCTCCAGCAGCATCCTCAGCAC	2	30
			40

【表 1 - 4】

	CAACAACGCTACCTTCCAAAACACGGGG ACCTATCGCTGCACTGAGCCTGGAGACC CCCTGGGAGGCAGCGCCGCCATCCACCT CTATGTCAAAGACCCTGCCCGGCCCTGG AACGTGCTAGCACAGGAGGTGGTTCGTGT TCGAGGACCAGGACGCACTACTGCCCTG TCTGCTCACAGACCCGGTGCTGGAAGCA GGCGTCTCGCTGGTGCGTGTGCGTGGCC GGCCCCCTCATGCGCCACACCAACTACTC CTTCTCGCCCTGGCATGGCTTCACCATC CACAGGGCCAAGTTTCATTTCAGAGCCAGG ACTATCAATGCAGTGCCCTGATGGGTGG CAGGAAGGTGATGTCCATCAGCATCCGG CTGAAAGTGCAGAAAGTCATCCCAGGGC CCCCAGCCTTGACACTGGTGCCCTGCAGA GCTGGTGCGGATTTCGAGGGGAGGCTGCC CAGATCGTGTGCTCAGCCAGCAGCGTTG ATGTTAACTTTTGATGTCTTCCCTCCAACA CAACAACACCAAGCTCGCAATCCCTCAA CAATCTGACTTTTCATAATAACCGTTACC AAAAAGTCCTGACCCTCAACCTCGATCA AGTAGATTTTCCAACATGCCGGCAACTAC TCCTGCGTGGCCAGCAACGTGCAGGGCA AGCACTCCACCTCCATGTTCTTCCGGGT GGTAGAGAGTGCCCTACTTGAACCTTGAGC TCTGAGCAGAACCTCATCCAGGAGGTGA CCGTGGGGGAGGGGCTCAACCTCAAAGT CATGGTGGAGGCCTACCCAGGCCTGCAA GGTTTTAACTGGACCTACCTGGGACCCT TTTCTGACCACCAGCCTGAGCCCAAGCT TGCTAATGCTACCACCAAGGACACATAC AGGCACACCTTCACCCTCTCTCTGCCCC GCCTGAAGCCCTCTGAGGCTGGCCGCTA CTCCTTCCTGGCCAGAAACCCAGGAGGC TGGAGAGCTCTGACGTTTGAGCTCACCC TTCGATACCCCCCAGAGGTAAGCGTCAT ATGGACATTCATCAACGGCTCTGGCACCC CTTTTGTGTGCTGCCTCTGGGTACCCCC AGCCCAACGTGACATGGCTGCAGTGCAG TGGCCACACTGATAGGTGTGATGAGGCC CAAGTGCTGCAGGTCTGGGATGACCCAT ACCCTGAGGTCCTGAGCCAGGAGCCCTT CCACAAGGTGACGGTGACAGAGCCTGCTG	
		10
		20
		30
		40

【表 1 - 5】

ACTGTTGAGACCTTAGAGCACAAACCAAA	
CCTACGAGTGCAGGGCCCACAACAGCGT	
GGGGAGTGGCTCCTGGGGCCTTCATACCC	
ATCTCTGCAGGAGCCCACACGCATCCCC	
CGGATGAGTTCCTCTTCACACCAGTGGT	
GGTCGCCTGCATGTCCATCATGGCCTTG	
CTGCTGCTGCTGCTCCTGCTGCTATTGT	
ACAAGTATAAGCAGAAGCCCAAGTACCA	10
GGTCCGCTGGAAGATCATCGAGAGCTAT	
GAGGGCAACAGTTATACTTTTCATCGACC	
CCACGCAGCTGCCTTACAACGAGAAGTG	
GGAGTTCCCCCGGAACAACCTGCAGTTT	
GGTAAGACCCTCGGAGCTGGAGCCTTTG	
GGAAAGGTGGTGGAGGCCACGGCCTTTGG	
TCTGGGCAAGGAGGATGCTGTCCTGAAG	
GTGGCTGTGAAGATGCTGAAGTCCACGG	
CCCATGCTGATGAGAAGGAGGCCCTCAT	20
GTCCGAGCTGAAGATCATGAGCCACCTG	
GGCCAGCACGAGAACATCGTCAACCTTC	
TGGGAGCCTGTACCCATGGAGGCCCTGT	
ACTGGTCATCACGGAGTACTGTTGCTAT	
GGCGACCTGCTCAACTTTCTGCGAAGGA	
AGGCTGAGGCCATGCTGGGACCCAGCCT	
GAGCCCCGGCCAGGACCCCGAGGGAGGC	
GTCGACTATAAGAACATCCACCTCGAGA	
AGAAATATGTCCGCAGGGACAGTGGCTT	30
CTCCAGCCAGGGTGTGGACACCTATGTG	
GAGATGAGGCCTGTCTCCACTTCTTCAA	
ATGACTCCTTCTCTGAGCAAGACCTGGA	
CAAGGAGGATGGACGGCCCCCTGGAGCTC	
CGGGACCTGCTTCACTTCTCCAGCCAAG	
TAGCCCAGGGCATGGCCTTCCTCGCTTC	
CAAGAATTGCATCCACCGGGACGTGGCA	
GCGCGTAACGTGCTGTTGACCAATGGTC	
ATGTGGCCAAGATTGGGGACTTCGGGCT	40
GGCTAGGGACATCATGAATGACTCCAAC	
TACATTGTCAAGGGCAATGCCCGCCTGC	
CTGTGAAGTGGATGGCCCCAGAGAGCAT	
CTTTGACTGTGTCTACACGGTTTCAGAGC	
GACGTCTGGTCCTATGGCATCCTCCTCT	
GGGAGATCTTCTCACTTGGGCTGAATCC	
CTACCCTGGCATCCTGGTGAACAGCAAG	
TTCTATAAACTGGTGAAGGATGGATACC	

AAATGGCCCAGCCTGCATTTGCCCCAAA GAATATATACAGCATCATGCAGGCCTGC TGGGCCTTGGAGCCCACCCACAGACCCA CCTTCCAGCAGATCTGCTCCTTCCTTCA GGAGCAGGCCCAAGAGGACAGGAGAGAG CGGGACTATACCAATCTGCCGAGCAGCA GCAGAAGCGGTGGCAGCGGCAGCAGCAG CAGTGAGCTGGAGGAGGAGAGCTCTAGT GAGCACCTGACCTGCTGCGAGCAAGGGG ATATCGCCCAGCCCTTGCTGCAGCCCAA CAACTATCAGTTCTGCTGAGGAGTTGAC GACAGGGAGTACCACTCTCCCCTCCCAC AAACTTCAACTCCTCCATGGATGGGGGCG ACACGGGGGAGAACATACAAACTCTGCCT TCGGTCATTTCACTCAACAGCTCGGCCC AGCTCTGAAACTTGGGAAGGTGAGGGAT TCAGGGGGAGGTCAGAGGATCCCACCTCC TGAGCATGGGGCCATCACTGCCAGTCAGG GGCTGGGGGGCTGAGCCCTCACCCCCCCC TCCCCTACTGTTCTCATGGTGTTGGCCT CGTGTTTGGCTATGCCAACTAGTAGAACC TTCTTTTCTAATCCCCTTATCTTTCATGG AAATGGACTGACTTTTATGCCTATGAAGT CCCCAGGAGCTACACTGATACTGAGAAA ACCAGGCTCTTTGGGGGCTAGACAGACTG GCAGAGAGTGAGATCTCCCTCTCTGAGA GGAGCAGCAGATGCTCACAGACCACACT CAGCTCAGGCCCCCTTGGAGCAGGATGGC TCCTCTAAGAATCTCACAGGACCTCTTA GTCTCTGCCCTATACGCCGCGCTTCACTC CACAGCCTCACCCCTCCCACCCCCATAC TGGTACTGCTGTAATGAGCCAAGTGGCA GCTAAAAGTTGGGGGGTGTTCTGCCCAAGT CCCGTCAATTCTGGGGCTAGAAGGCAGGGG ACCTTGGCATGTGGCTGGCCACACCAAG CAGGAAGCACAAACTCCCCCAAGCTGAC TCATCCTAACTAACAGTCACGCCGTGGG ATGTCTCTGTCCACATTAAACTAACAGC ATTAATGCAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA

*表1に含まれるのは、RNA核酸分子（例えば、チミジンがウリジンで置き換えられている）、コードされたタンパク質のオルソログをコードする核酸分子、ならびに表1に

列挙される任意で公的に入手可能な配列の核酸配列またはその一部と、その全長にわたって少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくはそれ以上の同一性を有する核酸配列を含むDNAまたはRNA核酸配列である。かかる核酸分子は、本明細書でさらに記載されるように、全長核酸の機能を有することができる。

＊表1に含まれるのは、核酸配列によってコードされるタンパク質のオルソログ、ならびに表2に列挙される任意で公的に入手可能な配列のアミノ酸配列またはその一部と、その全長にわたって少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド分子である。かかるポリペプチドは、本明細書でさらに記載されるように、全長ポリペプチドの機能を有することができる。

＊表1に含まれるのは、列挙されるCCR2及びCSF1Rバイオマーカーについての追加の既知の核酸及びアミノ酸配列である。

【0149】

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるsiRNA分子は、約10～50ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を含み得る。本発明により包含されるsiRNA分子には、二重領域と一緒に二重領域を形成するセンス領域及びアンチセンス領域を含む（またはそれからなる）二重領域が含まれる。RNAiを媒介するための、標的mRNAに対して十分な相補性を有するアンチセンス鎖（例えば、CCR2 mRNAまたはCSF1R mRNA）。本発明による包含されるsiRNA分子は、約10～50以上のヌクレオチドの長さを有することができ、すなわち、各鎖が10～50ヌクレオチドを含む。好ましくは、siRNA分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖はそれぞれ、約15～45ヌクレオチドの長さを有する。さらに好ましくは、siRNA分子のアンチセンス鎖及びセンス鎖はそれぞれ、約18～30ヌクレオチド、例えば、約18ヌクレオチド、約19ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約21ヌクレオチド、約22ヌクレオチド、約23ヌクレオチド、約24ヌクレオチド、約25ヌクレオチド、約26ヌクレオチド、約27ヌクレオチド、約28ヌクレオチド、約29ヌクレオチド、または約30ヌクレオチドの長さを有し、アンチセンス領域は、標的mRNAに対して実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む（または代替的にはそれから本質的になる、またはそれからなる）。本明細書で使用される場合、「実質的に相補的」という用語は、siRNA分子の塩基対及び二本鎖領域における相補性を指す。相補性は完全である必要はなく、ストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件下でもハイブリダイゼーションに影響を与えない任意のいくつかの塩基対のミスマッチが存在し得る。例えば、本発明により包含されるsiRNA分子のアンチセンス領域は、標的特異的RNA干渉（RNAi）を指示するために、標的mRNA分子の核酸配列、例えば、CCR2 mRNAの核酸配列（配列番号1）またはCSF1R mRNAの核酸配列（配列番号2）に対して少なくとも約80%以上の相補性、または少なくとも約85%以上の相補性、または少なくとも約90%以上の相補性、または少なくとも約91%以上の相補性、または少なくとも約92%以上の相補性、または少なくとも約93%以上の相補性、または少なくとも約94%以上の相補性、または少なくとも約95%以上の相補性、または少なくとも約96%以上の相補性、または少なくとも約97%以上の相補性、または少なくとも約98%以上の相補性、または少なくとも約99%以上の相補性を含み得る。

【0150】

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるsiRNA分子は、少なくとも1つのオーバーハング領域をさらに含むことができ、各オーバーハング領域は、6つ以下のヌクレオチドを有する。すなわち、siRNA分子のアンチセンス及びセンス鎖が整列している場合、鎖の末端には整列しない少なくとも1、2、3、4、5、または6のヌクレオチドが存在する（すなわち、反対側の鎖に相補的な塩基がない）。いくつかの例では、セ

ンス及びアンチセンス鎖がアニーリングされる場合、二本鎖の一端または両端でオーバーハングが生じ得る。

【0151】

いくつかの例では、本発明により包含される s i R N A 分子のアンチセンス領域及びセンス領域は、長さ、配列、及びそれらに対する化学修飾の性質が異なり得る。

【0152】

C C R 2 mRNA（配列番号1）にハイブリダイズする s i R N A 分子は、配列番号6～67の核酸配列からなる群から選択されるセンス鎖核酸配列と、配列番号68～129の核酸配列からなる群から選択されるアンチセンス鎖核酸配列とを含む（表2）。

【0153】

いくつかの実施形態では、C C R 2 mRNA（配列番号1）にハイブリダイズする s i R N A 分子は、配列番号6のセンス鎖核酸配列及び配列番号68のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号7のセンス鎖核酸配列及び配列番号69のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号8のセンス鎖核酸配列及び配列番号70のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号9のセンス鎖核酸配列及び配列番号71のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号10のセンス鎖核酸配列及び配列番号72のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号11のセンス鎖核酸配列及び配列番号73のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号12のセンス鎖核酸配列及び配列番号74のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号13のセンス鎖核酸配列及び配列番号75のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号14のセンス鎖核酸配列及び配列番号76のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号15のセンス鎖核酸配列及び配列番号77のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号16のセンス鎖核酸配列及び配列番号78のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号17のセンス鎖核酸配列及び配列番号79のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号18のセンス鎖核酸配列及び配列番号80のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号19のセンス鎖核酸配列及び配列番号81のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号20のセンス鎖核酸配列及び配列番号82のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号21のセンス鎖核酸配列及び配列番号83のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号22のセンス鎖核酸配列及び配列番号84のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号23のセンス鎖核酸配列及び配列番号85のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号24のセンス鎖核酸配列及び配列番号86のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号25のセンス鎖核酸配列及び配列番号87のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号26のセンス鎖核酸配列及び配列番号88のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号27のセンス鎖核酸配列及び配列番号89のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号28のセンス鎖核酸配列及び配列番号90のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号29のセンス鎖核酸配列及び配列番号91のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号30のセンス鎖核酸配列及び配列番号92のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号31のセンス鎖核酸配列及び配列番号93のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号32のセンス鎖核酸配列及び配列番号94のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号33のセンス鎖核酸配列及び配列番号95のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号34のセンス鎖核酸配列及び配列番号96のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号35のセンス鎖核酸配列及び配列番号97のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号36のセンス鎖核酸配列及び配列番号98のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号37のセンス鎖核酸配列及び配列番号99のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号38のセンス鎖核酸配列及び配列番号100のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号39のセンス鎖核酸配列及び配列番号101のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号40のセンス鎖核酸配列及び配列番号102のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号41のセンス鎖核酸配列及び配列番号103のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号42のセンス鎖核酸配列及び配列番号104のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号43のセンス鎖核酸配列及び配列番号105のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号44のセンス鎖核酸配列及び配列番号106のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号45のセンス鎖核酸配列及び配列番号107のアンチ

10

20

30

40

50

センス鎖核酸配列、または配列番号 46 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 108 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 47 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 109 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 48 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 110 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 49 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 111 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 50 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 112 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 51 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 113 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 52 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 114 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 53 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 115 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 54 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 116 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 55 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 117 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 56 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 118 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 57 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 119 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 58 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 120 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 59 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 121 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 60 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 122 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 61 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 123 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 62 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 124 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 63 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 125 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 64 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 126 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 65 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 127 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 66 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 128 のアンチ
センス鎖核酸配列、または配列番号 67 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 129 のアンチ
センス鎖核酸配列を含み得る。

10

20

【表 2 - 1】

表 2 : C C R 2 に特異的な s i R N A 分子のセンス及びアンチセンス配列

ID (C C R 2 内の位置NM_001123041.2)	センス鎖配列 (5' ~ 3')	配列番号 :	アンチセンス鎖配列 (5' ~ 3')	配列番号
463	CAUUUCCCCAGU ACAUCCA	6	UGGAUGUACUGG GGAAAUG	68
464	AUUUCCCCAGUA CAUCCAC	7	GUGGAUGUACUG GGGAAAU	69
486	AUGCUGUCCACA UCUCGUU	8	AACGAGAUGUGG ACAGCAU	70
487	UGCUGUCCACA CUCGUUC	9	GAACGAGAUGUG GACAGCA	71
488	GCUGUCCACAUC UCGUUCU	10	AGAACGAGAUGU GGACAGC	72
489	CUGUCCACAUCU CGUUCUC	11	GAGAACGAGAUG UGGACAG	73
491	GUCCACAUCUCG UUCUCGG	12	CCGAGAACGAGA UGUGGAC	74
529	AGAGCGGUGAAG AAGUCAC	13	GUGACUUCUUCA CCGCUCU	75
533	CGGUGAAGAAGU CACCACC	14	GGUGGUGACUUC UUCACCG	76
541	AAGUCACCACCU UUUUUGA	15	UCAAAAAAGGUG GUGACUU	77
544	UCACCACCUUUU UUGAUUA	16	UAAUCAAAAAAG GUGGUGA	78
545	CACCACCUUUUU UGAUUAU	17	AUAAUCAAAAAA GGUGGUG	79
546	ACCACCUUUUUU GAUUAUG	18	CAUAAUCAAAAA AGGUGGU	80
571	GUGCUCUCCUGUC AUAAAUU	19	AAUUUAUGACAG GGAGCAC	81
572	UGCUCUCCUGUCA UAAAUUU	20	AAAUUUUAUGACA GGGAGCA	82

10

20

30

40

【表 2 - 2】

5 7 4	CUCCCUGUCAUA AAUUUGA	2 1	UCAA AUUU AUGA CAGGGAG	8 3
5 7 7	CCUGUCAUAAAU UUGACGU	2 2	ACGUCAA AUUA UGACAGG	8 4
5 7 9	UGUCAUAAAUUU GACGUGA	2 3	UCACGUCAA AUU UAUGACA	8 5
5 8 0	GUCAUAAAUUUG ACGUGAA	2 4	UUCACGUCAA AU UUAUGAC	8 6
5 8 1	UCAUAAAUUUGA CGUGAAG	2 5	CUUCACGUCAA UUUAUGA	8 7
5 8 3	AUAAAUUUGACG UGAAGCA	2 6	UGC UUCACGUCA AAUUUAU	8 8
5 8 6	AAUUUGACGUGA AGCAA AU	2 7	AUUUGCUUCACG UCAA AU	8 9
5 8 7	AUUUGACGUGAA GCAA AU	2 8	AAUUUGCUUCAC GUCAA AU	9 0
7 8 3	CACUCUGCUGCA AAUGAGU	2 9	ACUCAUUUGCAG CAGAGUG	9 1
7 9 9	AGUGGGUCUUUG GGAAUGC	3 0	GCAUUC CCAAAG ACCCACU	9 2
8 0 0	GUGGGUCUUUGG GAAUGCA	3 1	UGCAUUC CCAA GACCCAC	9 3
8 0 2	GGGUCUUUGGGA AUGCAAU	3 2	AUUGCAUUC CCA AAGACCC	9 4
8 0 8	UUGGGAAUGCAA UGUGCAA	3 3	UUGCACA UUGCA UUC CCAA	9 5
8 2 1	GUGCAA AUUAU CACAGGG	3 4	CCCUGUGAAUAA UUUGCAC	9 6
8 3 3	CACAGGGCUGUA UCACAUC	3 5	GAUGUGAUACAG CCCUGUG	9 7
8 5 1	CGGUUAUUUUGG CGGAAUC	3 6	GAUUC CGCCAAA AUAACCG	9 8
8 5 3	GUUAUUUUGGCG GAAUCUU	3 7	AAGAUUC CGCCA AAAUAA C	9 9
8 5 4	UUAUUUUGGCGG AAUCUUC	3 8	GAAGAUUC CGCC AAAAUAA	1 0 0
8 5 5	UAUUUUGGCGGA AUCUUCU	3 9	AGAAGAUUC CGC CAAAAU A	1 0 1
8 5 6	AUUUUGGCGGAA UCUUCUU	4 0	AAGAAGAUUC CG CCAAAU A	1 0 2
8 5 7	UUUUGGCGGAAU CUUCUUC	4 1	GAAGAAGAUUC C GCCAAA A	1 0 3

10

20

30

40

【表 2 - 3】

8 5 8	UUUGGCGGAAUC UUCUUCA	4 2	UGAAGAAGAUUC CGCCAAA	1 0 4
9 6 5	AAGUGUGAUCAC CUGGUUG	4 3	CAACCAGGUGAU CACACUU	1 0 5
9 6 8	UGUGAUCACCUG GUUGGUG	4 4	CACCAACCAGGU GAUCACA	1 0 6
9 6 9	GUGAUCACCUGG UUGGUGG	4 5	CCACCAACCAGG UGAUCAC	1 0 7
9 7 0	UGAUCACCUGGU UGGUGGC	4 6	GCCACCAACCAG GUGAUCA	1 0 8
9 7 4	CACCUGGUUGGU GGCUGUG	4 7	CACAGCCACCAA CCAGGUG	1 0 9
1 0 0 7	AGGAAUCAUCUU UACUAAA	4 8	UUUAGUAAAGAU GAUUCCU	1 1 0
1 0 5 5	UGGCCCUUAUUU UCCACGA	4 9	UCGUGGAAAAUA AGGGCCA	1 1 1
1 0 5 6	GGCCCUUAUUUU CCACGAG	5 0	CUCGUGGAAAAU AAGGGCC	1 1 2
1 0 5 7	GCCCUUAUUUUC CACGAGG	5 1	CCUCGUGGAAAA UAAGGGC	1 1 3
1 0 6 0	CUUAUUUCCAC GAGGAUG	5 2	CAUCCUCGUGGA AAAUAAAG	1 1 4
1 0 6 1	UUAUUUCCACG AGGAUGG	5 3	CCAUCCUCGUGG AAAAUAA	1 1 5
1 0 6 2	UAUUUCCACGA GGAUGGA	5 4	UCCAUCCUCGUG GAAAAUA	1 1 6
1 0 6 5	UUUCCACGAGGA UGGAAUA	5 5	UAUUCCAUCCUC GUGGAAA	1 1 7
1 0 6 6	UUCACGAGGAU GGAAUAA	5 6	UUAUUCCAUCCU CGUGGAA	1 1 8
1 0 6 7	UCCACGAGGAUG GAAUAAU	5 7	AUUAUUCCAUCC UCGUGGA	1 1 9
1 0 6 9	CACGAGGAUGGA AUAAUUU	5 8	AAAUUAUUCCA CCUCGUG	1 2 0
1 0 8 3	AAUUUCCACACA AUAAUGA	5 9	UCAUUUUGUGU GGAAAUU	1 2 1
1 0 8 5	UUUCCACACAAU AAUGAGG	6 0	CCUCAUUUUGU GUGGAAA	1 2 2
1 0 8 9	CACACAAUAAUG AGGAACA	6 1	UGUUCCUCAUUA UUGUGUG	1 2 3
1 1 0 4	AACAUUUUGGGG CUGGUCC	6 2	GGACCAGCCCCA AAAUGUU	1 2 4

10

20

30

40

【表 2 - 4】

1 2 9 4	AAUUCUUCGGCC UGAGUAA	6 3	UUACUCAGGCCG AAGAAUU	1 2 5
1 2 9 5	AUUCUUCGGCCU GAGUAAAC	6 4	GUUACUCAGGCC GAAGAAU	1 2 6
1 2 9 6	UUCUUCGGCCUG AGUAAACU	6 5	AGUUACUCAGGC CGAAGAA	1 2 7
1 2 9 9	UUCGGCCUGAGU AACUGUG	6 6	CACAGUUACUCA GGCCGAA	1 2 8
1 3 0 6	UGAGUAAACUGUG AAAGCAC	6 7	GUGCUUUCACAG UUACUCA	1 2 9

【0 1 5 4】

C S F 1 R mRNA（配列番号 2）にハイブリダイズする s i R N A 分子は、配列番号 1 3 0～2 4 8 の核酸配列からなる群から選択されるセンス鎖核酸配列と、配列番号 2 4 9～3 6 7 の核酸配列からなる群から選択されるアンチセンス鎖核酸配列とを含む（表 3）。

【0 1 5 5】

いくつかの実施形態では、C S F 1 R mRNA（配列番号 2）にハイブリダイズする s i R N A 分子は、配列番号 1 3 0 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 4 9 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 3 1 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 0 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 3 2 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 1 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 3 3 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 2 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 3 4 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 3 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 3 5 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 4 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 3 6 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 5 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 3 7 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 6 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 3 8 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 7 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 3 9 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 8 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 4 0 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 5 9 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 4 1 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 0 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 4 2 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 1 のアンチセンス鎖核酸配列、配列番号 1 4 3 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 2 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 4 4 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 3 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 4 5 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 4 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 4 6 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 5 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 4 7 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 6 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 4 8 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 7 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 4 9 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 8 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 5 0 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 6 9 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 5 1 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 7 0 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 5 2 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 7 1 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 5 3 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 7 2 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 5 4 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 7 3 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 5 5 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 7 4 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 5 6 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 7 5 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 5 7 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 7 6 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1 5 8 のセンス鎖核酸配列及び配列番号 2 7 7 のアンチセンス鎖核酸配列、または配列番号 1

10

20

30

40

50

0
20
40
60

[illegible]

【表 3 - 1】

表 3 : C S F 1 R に特異的な s i R N A のセンス及びアンチセンス配列

I D (C S F 1 R N M_005 211.3 における位 置)	コアセンス鎖配列 (5' ～3')	配 列 番 号	コアアンチセンス鎖配列 (5' ～3')	配列 番号
346	GGGAAUCCCAG UGAUAGAG	1 3 0	CUCUAUCACUGG GAUUCCC	24 9
410	UUGCGAUGUGU GGGCAAUG	1 3 1	CAUUGCCCACAC AUCGCAA	25 0
412	GCGAUGUGUGG GCAAUGGC	1 3 2	GCCAUUGCCCAC ACAUCGC	25 1
508	CAACGCUACCU UCCAAAAC	1 3 3	GUUUUGGAAGGU AGCGUUG	25 2
510	ACGCUACCUUC CAAAACAC	1 3 4	GUGUUUUGGAAG GUAGCGU	25 3

10

20

【表 3 - 2】

5 1 1	CGCUACCUUCC AAAACACG	1 3 5	CGUGUUUUGGAA GGUAGCG	2 5 4
6 0 4	UGCCCGGCCCU GGAACGUG	1 3 6	CACGUUCCAGGG CCGGGCA	2 5 5
6 7 5	UGCUCACAGAC CCGGUGCU	1 3 7	AGCACCGGGUCU GUGAGCA	2 5 6
7 0 0	AGGCGUCUCGC UGGUGCGU	1 3 8	ACGCACCAGCGA GACGCCU	2 5 7
8 1 7	UCAAUGCAGUG CCCUGAUG	1 3 9	CAUCAGGGCACU GCAUUGA	2 5 8
8 5 9	CAGCAUCCGGC UGAAAGUG	1 4 0	CACUUUCAGCCG GAUGCUG	2 5 9
9 2 1	CAGAGCUGGUG CGGAUUCG	1 4 1	CGAAUCCGCACC AGCUCUG	2 6 0
9 2 3	GAGCUGGUGCG GAUUCGAG	1 4 2	CUCGAAUCCGCA CCAGCUC	2 6 1
9 3 0	UGCGGAUUCGA GGGGAGGC	1 4 3	GCCUCCCCUCGA AUCCGCA	2 6 2
9 4 8	CUGCCCAGAU GUGUGCUC	1 4 4	GAGCACACGAUC UGGGCAG	2 6 3
9 5 0	GCCCAGAU GUGCUCAG	1 4 5	CUGAGCACACGA UCUGGGC	2 6 4
9 5 3	CAGAU CUCAGCCA	1 4 6	UGGCUGAGCACA CGAUCUG	2 6 5
1 0 5 3	AUAACCGUUAC CAAAAAGU	1 4 7	ACUUUUUGGUAA CGGUUAU	2 6 6
1 0 5 5	AACCGUUACCA AAAAGUCC	1 4 8	GGACUUUUUGGU AACGGUU	2 6 7

10

20

30

40

【表 3 - 3】

1 0 5 6	ACCGUUACCAA AAAGUCCU	1 4 9	AGGACUUUUUGG UAACGGU	2 6 8
1 0 6 0	UUACCAAAAAG UCCUGACC	1 5 0	GGUCAGGACUUU UUGGUAA	2 6 9
1 2 8 8	AGGUUUUAACU GGACCUAC	1 5 1	GUAGGUCCAGUU AAAACCU	2 7 0
1 2 8 9	GGUUUUUAACUG GACCUACC	1 5 2	GGUAGGUCCAGU UAAAACC	2 7 1
1 2 9 2	UUUAACUGGAC CUACCUGG	1 5 3	CCAGGUAGGUCC AGUUAAA	2 7 2
1 2 9 3	UUAACUGGACC UACCUGGG	1 5 4	CCCAGGUAGGUC CAGUUAA	2 7 3
1 3 0 0	GACCUACCUGG GACCCUUU	1 5 5	AAAGGGUCCCAG GUAGGUC	2 7 4
1 4 6 7	UGACGUUUGAG CUCACCCU	1 5 6	AGGGUGAGCUCA AACGUCA	2 7 5
1 4 6 8	GACGUUUGAGC UCACCCUU	1 5 7	AAGGGUGAGCUC AAACGUC	2 7 6
1 4 7 3	UUGAGCUCACC CUUCGAUA	1 5 8	UAUCGAAGGGUG AGCUCAA	2 7 7
1 4 7 6	AGCUCACCCUU CGAUACCC	1 5 9	GGGUAUCGAAGG GUGAGCU	2 7 8
1 4 8 5	UUCGAUACCCC CCAGAGGU	1 6 0	ACCUCUGGGGGG UAUCGAA	2 7 9
1 4 8 8	GAUACCCCCCA GAGGUAAG	1 6 1	CUUACCUCUGGG GGGUAUC	2 8 0
1 7 1 5	GAGACCUUAGA GCACAACC	1 6 2	GGUUGUGCUCUA AGGUCUC	2 8 1

10

20

30

40

【表 3 - 4】

1 7 1 7	GACCUUAGAGC ACAACCAA	1 6 3	UUGGUUGUGCUC UAAGGUC	2 8 2
1 7 5 9	CAGCGUGGGGA GUGGCUCC	1 6 4	GGAGCCACUCCC CACGCUG	2 8 3
1 8 1 5	AUCCCCCGGAU GAGUCCU	1 6 5	AGGAACUCAUCC GGGGGAU	2 8 4
1 8 1 9	CCCGGAUGAGU UCCUCUUC	1 6 6	GAAGAGGAACUC AUCCGGG	2 8 5
1 8 4 7	GUGGUCGCCUG CAUGUCCA	1 6 7	UGGACAUGCAGG CGACCAC	2 8 6
1 8 9 6	UGCUAUUGUAC AAGUAUAA	1 6 8	UUAUACUUGUAC AAUAGCA	2 8 7
1 9 3 1	CAGGUCCGCUG GAAGAUCA	1 6 9	UGAUCUUCCAGC GGACCUG	2 8 8
1 9 3 3	GGUCCGCUGGA AGAUCAUC	1 7 0	GAUGAUCUUCCA GCGGACC	2 8 9
1 9 3 5	UCCGCUGGAAG AUAUCGA	1 7 1	UCGAUGAUCUUC CAGCGGA	2 9 0
1 9 3 6	CCGCUGGAAGA UCAUCGAG	1 7 2	CUCGAUGAUCUU CCAGCGG	2 9 1
1 9 4 6	AUCAUCGAGAG CUAUGAGG	1 7 3	CCUCAUAGCUCU CGAUGAU	2 9 2
1 9 4 8	CAUCGAGAGCU AUGAGGGC	1 7 4	GCCCUCAUAGCU CUCGAUG	2 9 3
1 9 5 8	UAUGAGGGCAA CAGUUAUA	1 7 5	UAUAACUGUUGC CCUCAUA	2 9 4
1 9 6 2	AGGGCAACAGU UAUACUUU	1 7 6	AAAGUAUAACUG UUGCCCU	2 9 5

10

20

30

40

【表 3 - 5】

1 9 6 4	GGCAACAGUUA UACUUUCA	1 7 7	UGAAAGUAUAAC UGUUGCC	2 9 6
1 9 9 0	CACGCAGCUGC CUUACAAC	1 7 8	GUUGUAAGGCAG CUGCGUG	2 9 7
2 0 2 1	UCCCCCGGAA CAACCUGC	1 7 9	GCAGGUUGUUC GGGGGAA	2 9 8
2 0 2 6	CCGGAACAACC UGCAGUUU	1 8 0	AAACUGCAGGUU GUUCCGG	2 9 9
2 0 4 2	UUUGGUAAGAC CCUCGGAG	1 8 1	CUCCGAGGGUCU UACCAA	3 0 0
2 0 4 4	UGGUAAGACCC UCGGAGCU	1 8 2	AGCUCCGAGGGU CUUACCA	3 0 1
2 1 4 5	UGAAGUCCACG GCCCAUGC	1 8 3	GCAUGGGCCGUG GACUUA	3 0 2
2 1 4 6	GAAGUCCACGG CCCAUGC	1 8 4	AGCAUGGGCCGU GGACUUC	3 0 3
2 2 6 4	CCUGUACUGGU CAUCACGG	1 8 5	CCGUGAUGACCA GUACAGG	3 0 4
2 2 6 5	CUGUACUGGUC AUCACGGA	1 8 6	UCCGUGAUGACC AGUACAG	3 0 5
2 2 6 6	UGUACUGGUCA UCACGGAG	1 8 7	CUCCGUGAUGAC CAGUACA	3 0 6
2 2 6 8	UACUGGUCAUC ACGGAGUA	1 8 8	UACUCCGUGAUG ACCAGUA	3 0 7
2 2 7 2	GGUCAUCACGG AGUACUGU	1 8 9	ACAGUACUCCGU GAUGACC	3 0 8
2 2 7 6	AUCACGGAGUA CUGUUGCU	1 9 0	AGCAACAGUACU CCGUGAU	3 0 9

10

20

30

40

【表 3 - 6】

2 2 7 7	UCACGGAGUAC UGUUGCUA	1 9 1	UAGCAACAGUAC UCCGUGA	3 1 0
2 2 7 9	ACGGAGUACUG UUGCUAUG	1 9 2	CAUAGCAACAGU ACUCCGU	3 1 1
2 2 8 3	AGUACUGUUGC UAUGGCGA	1 9 3	UCGCCAUAGCAA CAGUACU	3 1 2
2 2 8 8	UGUUGCUAUGG CGACCUGC	1 9 4	GCAGGUCGCCAU AGCAACA	3 1 3
2 2 9 2	GCUAUGGCGAC CUGCUCAA	1 9 5	UUGAGCAGGUCG CCAUAGC	3 1 4
2 2 9 5	AUGGCGACCUG CUCAACUU	1 9 6	AAGUUGAGCAGG UCGCCAU	3 1 5
2 3 0 5	GCUCAACUUUC UGCGAAGG	1 9 7	CCUUCGCAGAAA GUUGAGC	3 1 6
2 3 0 8	CAACUUUCUGC GAAGGAAG	1 9 8	CUUCCUUCGCAG AAAGUUG	3 1 7
2 3 1 3	UUCUGCGAAGG AAGGCUGA	1 9 9	UCAGCCUUCCUU CGCAGAA	3 1 8
2 4 4 4	CAGGGUGUGGA CACCUAUG	2 0 0	CAUAGGUGUCCA CACCCUG	3 1 9
2 5 1 8	GGACAAGGAGG AUGGACGG	2 0 1	CCGUCCAUCCUC CUUGUCC	3 2 0
2 6 0 0	GCUUCCAAGAA UUGCAUCC	2 0 2	GGAUGCAAUUCU UGGAAGC	3 2 1
2 6 7 9	ACUUCGGGGCUG GCUAGGGA	2 0 3	UCCCUAGCCAGC CCGAAGU	3 2 2
2 6 8 7	CUGGCUAGGGA CAUCAUGA	2 0 4	UCAUGAUGUCCC UAGCCAG	3 2 3

10

20

30

40

【表 3 - 7】

2 6 8 9	GGCUAGGGACA UCAUGAAU	2 0 5	AUUCAUGAUGUC CCUAGCC	3 2 4
2 7 7 4	UUUGACUGUGU CUACACGG	2 0 6	CCGUGUAGACAC AGUCAAA	3 2 5
2 7 7 6	UGACUGUGUCU ACACGGUU	2 0 7	AACCGUGUAGAC ACAGUCA	3 2 6
2 7 7 8	ACUGUGUCUAC ACGGUUCA	2 0 8	UGAACCGUGUAG ACACAGU	3 2 7
2 7 8 1	GUGUCUACACG GUUCAGAG	2 0 9	CUCUGAACCGUG UAGACAC	3 2 8
2 7 8 5	CUACACGGUUC AGAGCGAC	2 1 0	GUCGCUCUGAAC CGUGUAG	3 2 9
2 7 8 8	CACGGUUCAGA GCGACGUC	2 1 1	GACGUCGCUCUG AACCGUG	3 3 0
2 7 9 1	GGUUCAGAGCG ACGUCUGG	2 1 2	CCAGACGUCGCU CUGAACC	3 3 1
2 7 9 3	UUCAGAGCGAC GUCUGGUC	2 1 3	GACCAGACGUCG CUCUGAA	3 3 2
2 8 4 3	CUUGGGGCUGAA UCCCUACC	2 1 4	GGUAGGGAUUCA GCCCAAG	3 3 3
2 8 7 4	UGAACAGCAAG UUCUAUAA	2 1 5	UUAUAGAACUUG CUGUUCA	3 3 4
2 8 8 0	GCAAGUUCUAU AAACUGGU	2 1 6	ACCAGUUUAUAG AACUUGC	3 3 5
2 9 4 0	AGAAUAUAUAC AGCAUCAU	2 1 7	AUGAUGCUGUAU AUAUUCU	3 3 6
3 0 4 7	AGAGAGCGGGA CUAUACCA	2 1 8	UGGUUAUAGUCCC GCUCUCU	3 3 7

10

20

30

40

【表 3 - 8】

3 0 4 8	GAGAGCGGGAC UAUACCAA	2 1 9	UUGGUAUAGUCC CGCUCUC	3 3 8
3 0 4 9	AGAGCGGGACU AUACCAAU	2 2 0	AUUGGUAUAGUC CCGCUCU	3 3 9
3 0 5 2	GCGGGACUAUA CCAAUCUG	2 2 1	CAGAUUGGUAUA GUCCCCG	3 4 0
3 0 5 5	GGACUAUACCA AUCUGCCG	2 2 2	CGGCAGAUUGGU AUAGUCC	3 4 1
3 1 4 9	UGCUGCGAGCA AGGGGAUA	2 2 3	UAUCCCCUUGCU CGCAGCA	3 4 2
3 1 5 3	GCGAGCAAGGG GAUAUCGC	2 2 4	GCGAUAUCCCCU UGCUCGC	3 4 3
3 1 5 4	CGAGCAAGGGG AUAUCGCC	2 2 5	GGCGAUAUCCCC UUGCUCG	3 4 4
3 1 6 4	GAUAUCGCCCA GCCCUUGC	2 2 6	GCAAGGGCUGGG CGAUUUC	3 4 5
3 1 8 6	AGCCCAACAAC UAUCAGUU	2 2 7	AACUGAUAGUUG UUGGGCU	3 4 6
3 1 8 7	GCCCAACAACU AUCAGUUC	2 2 8	GAACUGAUAGUU GUUGGGC	3 4 7
3 1 8 8	CCCAACAACUA UCAGUUCU	2 2 9	AGAACUGAUAGU UGUUGGG	3 4 8
3 2 9 2	ACAAACUCUGC CUUCGGUC	2 3 0	GACCGAAGGCAG AGUUUGU	3 4 9
3 2 9 8	UCUGCCUUCGG UCAUUUCA	2 3 1	UGAAAUGACCGA AGGCAGA	3 5 0
3 3 0 1	GCCUUCGGUCA UUUCACUC	2 3 2	GAGUGAAAUGAC CGAAGGC	3 5 1

10

20

30

40

【表 3 - 9】

3 3 0 5	UCGGUCAUUUC ACUCAACA	2 3 3	UGUUGAGUGAAA UGACCGA	3 5 2
3 4 5 7	CUCAUGGUGUU GGCCUCGU	2 3 4	ACGAGGCCAACA CCAUGAG	3 5 3
3 4 5 8	UCAUGGUGUUG GCCUCGUG	2 3 5	CACGAGGCCAAC ACCAUGA	3 5 4
3 4 5 9	CAUGGUGUUGG CCUCGUGU	2 3 6	ACACGAGGCCAA CACCAUG	3 5 5
3 4 6 2	GGUGUUGGCCU CGUGUUUG	2 3 7	CAAACACGAGGC CAACACC	3 5 6
3 4 7 3	CGUGUUUGCUA UGCCAACU	2 3 8	AGUUGGCAUAGC AAACACG	3 5 7
3 8 0 8	AGCUAAAAGUU GGGGGUGU	2 3 9	ACACCCCCAACU UUUAGCU	3 5 8
3 9 1 1	CCAAGCUGACU CAUCCUAA	2 4 0	UUAGGAUGAGUC AGCUUGG	3 5 9
3 9 1 4	AGCUGACUCAU CCUAACUA	2 4 1	UAGUUAGGAUGA GUCAGCU	3 6 0
3 9 1 6	CUGACUCAUCC UAACUAAC	2 4 2	GUUAGUUAGGAU GAGUCAG	3 6 1
3 9 1 7	UGACUCAUCCU AACUAACA	2 4 3	UGUUAGUUAGGA UGAGUCA	3 6 2
3 9 1 8	GACUCAUCCUA ACUAACAG	2 4 4	CUGUUAGUUAGG AUGAGUC	3 6 3
3 9 2 4	UCCUAACUAAC AGUCACGC	2 4 5	GCGUGACUGUUA GUUAGGA	3 6 4
3 9 2 5	CCUAACUAACA GUCACGCC	2 4 6	GGCGUGACUGUU AGUUAGG	3 6 5

10

20

30

40

【表 3 - 1 0】

3 9 5 8	UCCACAUAUAAA CUAACAGC	2	GCUGUUAGUUUA AUGUGGA	3 6
		4		6
		7		
3 9 5 9	CCACAUAUAAC UAACAGCA	2	UGCUGUUAGUUU AAUGUGG	3 6
		4		7
		8		

【0 1 5 6】

10

s i R N A 分子の化学修飾

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、1つ以上の化学修飾を含むことができる。修飾は、核酸分子の活性を損なうことはないであろう。当該技術分野で周知の化学修飾は、核酸分子の安定性、有用性、及び／または細胞取り込みを増加させることができる。一実施形態では、修飾を使用して、分解（ヌクレアーゼによる）に対する耐性の改善、または細胞による核酸分子の取り込みの改善を提供することができる。いくつかの実施形態では、本発明により包含される修飾核酸分子は、対応する非修飾核酸分子と比較して、増強された標的効率を有することができる。

【0 1 5 7】

20

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、発現を増加させる、標的遺伝子をサイレンシングするために使用するための遺伝子サイレンシングの有効性を改善するなど、最適化することができる。別の実施形態では、修飾を使用して、標的 m R N A 及び／または相補的 s i R N A 鎖における相補的ヌクレオチドに対する親和性を増加または低減させることができる。いくつかの実施形態では、本発明により包含される s i R N A は、細胞、組織、もしくは生物における免疫応答を防ぐまたは調節する能力を増強するように修飾することができる。

【0 1 5 8】

30

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、膜透過度及び／または標的器官、組織、及び細胞への送達を増強させるためにさらに修飾され得る。一例では、核酸分子を修飾して、骨髄細胞、単球、及びマクロファージへのその送達を増強させることができる。例えば、核酸分子は、例えば、アンチセンス核酸分子を、細胞表面受容体もしくは抗原と結合するペプチドまたは抗体に連結することによって、選択された細胞表面に発現される受容体または抗原と特異的に結合するように修飾することができる。核酸分子はまた、目的の細胞を標的とする、及び／または目的の細胞内で選択的に発現するベクターの一部として修飾することができる。

【0 1 5 9】

s i R N A 分子などの本発明により包含される二本鎖分子は、修飾されたセンス鎖、修飾されたアンチセンス鎖、または修飾されたセンス及びアンチセンス鎖を含み得る。

【0 1 6 0】

40

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、 α -アノマー核酸分子であり得る。 α -アノマー核酸分子は、相補的 R N A と特定の二本鎖ハイブリッドを形成し、通常の α -ユニットとは異なり、鎖は互いに平行に走る (G a u l t i e r e t a l . (1987) N u c l e i c A c i d s R e s . 15 : 6625 - 6641) 。アンチセンス核酸分子はまた、2'-*o*-メチルリボヌクレオチド (I n o u e e t a l . (1987) N u c l e i c A c i d s R e s . 15 : 6131 - 6148) またはキメラ R N A - D N A 類似体 (I n o u e e t a l . (1987) F E B S L e t t . 215 : 327 - 330) を含み得る。

【0 1 6 1】

本発明により包含される核酸分子は、5'末端、3'末端、5'及び3'末端、及び／または内部残基、またはそれらの任意の組み合わせで修飾することができる。本明細書に

50

記載されるように、繰り返しヌクレオチド残基を有する天然に存在する核酸は、糖及びホスホジエステル、ならびに窒素塩基（しばしば核酸塩基または単純に塩基と称される）からなる骨格を有する。したがって、化学的に修飾されたヌクレオチドは、修飾された核酸塩基、修飾された糖及び／または非ホスホジエステル結合（すなわち、骨格修飾）を含み得る。いくつかの実施形態では、修飾は、アンロックヌクレオモノマー剤（UNA）、修飾キャップ構造、修飾ヌクレオシド間連結、及びまたは核酸塩基修飾の組み合わせなど、本明細書に記載される異なる種類の修飾の組み合わせである。

【0162】

末端／キャップ修飾

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、少なくとも1つの末端修飾または「キャップ」をさらに含むことができる。

10

【0163】

例えば、キャップは、5'及び／または3'キャップ構造であり得る。「キャップ」及び「末端キャップ」という用語は、核酸分子の各鎖のいずれかの末端での化学修飾（末端リボヌクレオチドに関して）、及び／または5'末端の最後の2つのヌクレオチド及び／または3'末端の最後の2つのヌクレオチド間の連結での修飾を含む。キャップ構造は、標的mRNAまたは細胞機構との分子相互作用を損なうことなく、エキソヌクレアーゼに対する核酸分子の耐性を増強することができる。かかる修飾は、インビトロまたはインビボでのそれらの増強した効力に基づいて選択することができる。

【0164】

キャップは、5'-末端（5'-キャップ）または3'-末端（3'-キャップ）に存在し得るか、または両方の終端に存在し得る。特定の実施形態では、5'-及び／または3'-キャップは独立して、ホスホロチオエートーリン酸、脱塩基残留物（部分）、ホスホロチオエート連結、4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、ホスホロジチオエート連結、逆ヌクレオチドまたは逆脱塩基部分（2'-3'または3'-3'）（例えば、Invabasic X、Abasic II、rSpacer/RNA abasic）、及びdSpacer）、ホスホロジチオエートーリン酸、及びメチルホスホネート部分から選択される。ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート連結（複数可）は、キャップ構造の一部である場合、一般に、5'末端の2つの末端ヌクレオチドと3'末端の2つの末端ヌクレオチドとの間に配置される。

20

30

【0165】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、少なくとも1つの末端ホスホロチオエートーリン酸を有する。ホスホロチオエートーリン酸は、核酸分子の各鎖の5'及び／または3'末端にあり得る。他の実施形態では、核酸分子は、センス及び／またはアンチセンス鎖の5'及び3'末端の両方に末端ホスホロチオエートーリン酸を有する。ホスホロチオエートーリン酸は、エキソヌクレアーゼの作用を阻害することにより、より高い効力を支持することができる。

【0166】

いくつかの実施形態では、5'末端での修飾がセンス鎖において好ましく、例えば、5'-プロピルアミン基を含む。3'OH末端への修飾は、センス鎖、アンチセンス鎖、またはセンス鎖及びアンチセンス鎖においてである。3'末端修飾は、例えば、3'-ピューロマイシン、3'-ビオチンなどを含む。

40

【0167】

末端修飾はまた、分布をモニタリングするために有用であり得、このような場合、追加される好ましい基には、フルオロフォア、例えば、フルオレセインまたはAlexa色素、例えば、Alexa488が含まれる。末端修飾はまた、取り込みを増強するために有用であり得、これのための有用な修飾は、標的化リガンドを含む。末端修飾は、オリゴヌクレオチドを別の部分に架橋するためにも有用であり得、これに有用な修飾には、マイトマイシンC、ソラレン、及びそれらの誘導体が含まれる。例示的な5'-修飾には、これらに限定されないが、5'-ーリン酸（（HO）₂（O）P-O-5'）；5'-二リン

50

酸（ $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$ ）；5'-三リン酸（ $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$ ）；5'-一チオリン酸（ホスホロチオエート； $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$ ）；5'-一ジチオリン酸（ジチオリン酸； $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$ ）、5'-ホスホロチオレート（ $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$ ）；5'-アルファーチオ三リン酸；5'-ベーターチオ三リン酸；5'-ガンマーチオ三リン酸；5'-ホスホロアミド酸（ $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ 、 $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$ ）が含まれる。他の5'-修飾には、5'-アルキルホスホン酸（ $\text{R}(\text{OH})(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$ 、 $\text{R}=\text{アルキル}$ 、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど）、5'-アルキルエーテルホスホン酸（ $\text{R}(\text{OH})(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$ 、 $\text{R}=\text{アルキルエーテル}$ 、例えば、メトキシメチル（ CH_2OMe ）、エトキシメチルなど）が含まれる。

10

【0168】

いくつかの実施形態では、核酸分子の末端のキャップは、複合体、例えば、5'複合体であり得る。5'末端複合体は、5'から3'へのエキソヌクレアーゼによる切断を阻害することができる（例えば、ナプロキセン；イブプロフェン；小さなアルキル鎖；アリール基；複素環複合体；修飾糖（D-リボース、デオキシリボース、グルコースなど））。

【0169】

修飾核酸塩基（塩基）

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、天然の核酸塩基の塩基修飾及び／または置換を含み得る。

20

【0170】

「非修飾」または「天然」核酸塩基という用語には、プリン塩基アデニン（A）及びグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基チミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）が含まれる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、1つ以上の核酸塩基修飾ヌクレオチドを含み得る。それは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、またはそれ以上の核酸塩基修飾ヌクレオチドを含むことができる。いくつかの例では、核酸分子は、約1%～10%の修飾ヌクレオチド、または約10%～50%の修飾ヌクレオチドを含み得る。修飾塩基は、例えば、1つ以上の原子もしくは基の置換または追加によって修飾されている、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）、ウラシル（U）、キサンチン、イノシン、及びクエオシンなどのヌクレオチド塩基を指す。塩基部分に関して修飾されたヌクレオチドを含むことができる修飾の種類のいくつかの例には、これらに限定されないが、アルキル化、ハロゲン化、チオール化、アミノ化、アミド化、またはアセチル化された塩基を、個別にまたは組み合わせて含む。より詳細な例には、例えば、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、ウィプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、5-メチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、（acp3）w、及び2,6-ジアミノプリン、5-プロピニルウリジン、5-プロピ

30

40

50

ニルシチジン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、N、N、-ジメチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-プロピルグアニン、2-アミノアデニン、3-メチルウリジン、5-メチルシチジン、5位での修飾を有する5-メチルウリジン及び他のヌクレオチド、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ハロシチジン、5-ハロウリジン、4-アセチルシチジン、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、3-メチルシチジン、6-メチルウリジン、2-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2, 2-ジメチルグアノシン、5-メチルアミノエチルウリジン、5-メチルオキシウリジン、デアザヌクレオチド、例えば、7-デアザアデノシン、6-アゾウリジン、6-アゾシチジン、6-アゾチミジン、5-メチル-2-チオウリジン、他のチオ塩基、例えば、2-チオウリジン及び4-チオウリジン及び2-チオシチジン、ジヒドロウリジン、シュードウリジン、クエオシン、アルカエオシン、ナフチル及び置換ナフチル基、任意のO-及びN-アルキル化プリンならびにピリミジン、例えば、N6-メチルアデノシン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル及び修飾フェニル基、例えば、アミノフェノールまたは2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、Gクランプヌクレオチドとして機能する修飾シトシン、8-置換アデニン及びグアニン、5-置換ウラシル及びチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、ならびにアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドが含まれる。修飾ヌクレオチドには、糖部分に関して修飾されたヌクレオチド、及びリボシルではない糖またはその類似体を有するヌクレオチドも含まれる。例えば、糖部分は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、及び他の糖、複素環、もしくは炭素環であり得るか、またはそれらに基づく。

10

20

【0171】

例示的な修飾核酸塩基は、これらに限定されないが、他の合成及び天然の修飾核酸塩基、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニルウラシル及びシトシン、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、ならびに他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、ならびに他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンを含むことができる。いくつかの特定の実施形態では、本発明において有用な核酸塩基修飾ヌクレオチドには、これらに限定されないが、5-ブロモウリジン、5-ヨードウリジン、5-メチル-シチジン、リボチミジン、2-アミノプリン、5-フルオロ-シチジン、及び5-フルオロウリジン、2, 6-ジアミノプリン、4-チオウリジン、ならびに5-アミノアリルウリジンなどが含まれる。

30

【0172】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子はまた、塩基類似体を有するヌクレオチドを含むことができる。

40

【0173】

核酸塩基は、CpGアイランド、C、U、またはAと塩基対であり得るイノシン、チオウリジン、ジヒドロウリジン、クエオシン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン、イソグアニシン、ツベルクジン、及びウィオシンなどの天然に存在する非規準塩基であり得る。他の類似体には、フルオロフォア(例えば、ローダミン、フルオレセイン)、ならびに他の蛍光性塩基類似体、例えば、2-AP(2-アミノプリン)、3-MI、6-MI、6-MAP、ピロロ-dC、フラン修飾塩基、及び三環系シトシンファミリーの修飾及び改良誘導体(例えば、1, 3-ジアザ-2-オキソフェノチアジン、tC; tCのオ

50

キソ同族列、 tC^O ；1，3-ジアザ-2-オキソフェノキサジン）が含まれ得る。核酸塩基修飾ヌクレオチドはまた、普遍的な塩基を含むことができる。例として、普遍的な塩基には、これらに限定されないが、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、またはネブラリンが含まれる。「ヌクレオチド」という用語はまた、リボシル3'酸素のアミン基による置換から生じる、N3'からP5'へのホスホロアミド酸を含むことを意味する。本明細書で使用される場合、普遍的な核酸塩基は、融解挙動、細胞内酵素による認識、またはオリゴヌクレオチド二本鎖の活性に実質的に影響を与えることなく、4つの天然に存在する核酸塩基すべてと塩基対になり得る任意の修飾核酸塩基である。いくつかの例示的な普遍的な核酸塩基には、これらに限定されないが、2，4-ジフルオロトルエン、ニトロピロリル、ニトロインドリル、8-アザ-7-デアザアデニン、4-フルオロ-6-メチルベンズイミダズル、4-メチルベンズイミダズル、3-メチルイソカルボスチリリル、5-メチルイソカルボスチリリル、3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリリル、7-アザインドリル、6-メチル-7-アザインドリル、イミジゾピリジニル、9-メチル-イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリリル、7-プロピニルイソカルボスチリリル、プロピニル-7-アザインドリル、2，4，5-トリメチルフェニル、4-メチルノリル、4，6-ジメチルインドリル、フェニル、ナフタレニル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベンジル、テトラセニル、ペンタセニル、及びそれらの構造的誘導体が含まれる。いくつかの実施形態では、核酸分子のヌクレオチドは、米国特許第6，008，334号、第6，107，039号、第6，664，058号、第7，678，894号、第7，786，292号、及び第7，956，171号；米国特許公開第2013/122，506号、及び第2013/0296402号に記載される塩基類似体ならびに修飾塩基、PCT特許公開第WO2012/061810号）に記載されるカルボキサミド修飾塩基を組み込むことができる。

10

20

【0174】

人工核酸類似体（またはヌクレオチド類似体）

いくつかの実施形態では、本発明により包含される修飾核酸分子は、人工核酸類似体を含み得る。

【0175】

「ヌクレオシド」という用語は、リボースまたはデオキシリボース糖に共有結合したプリンまたはピリミジン塩基を有する分子を指す。例示的なヌクレオシドには、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン、及びチミジンが含まれる。

30

【0176】

「ヌクレオチド」という用語は、糖部分へのエステル連結に結合した1つ以上のリン酸基を有するヌクレオシドを指す。ヌクレオチドは、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドまたはその修飾形態、ならびにその類似体であり得る。ヌクレオチドは、例えば、アデニン、ヒポキサンチン、グアニン、ならびにそれらの誘導体及び類似体、ならびにピリミジン、例えば、シトシン、ウラシル、チミン、ならびにそれらの誘導体及び類似体を含む種を含む。

【0177】

「ヌクレオチド類似体」という用語は、本明細書において「改変ヌクレオチド」または「修飾ヌクレオチド」とも称され、非天然型リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含む非標準ヌクレオチドを指す。好ましいヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドのある特定の化学的特性を変化させるため、ヌクレオチド類似体のその意図された機能を実行する能力を依然として保持するように任意の位置で修飾される。ヌクレオチド類似体は、これらに限定されないが、5位ピリミジン修飾、8位プリン修飾、シトシン環外アミンでの修飾、及び5-プロモウラシルの置換を含む塩基、糖、及び／またはリン酸の化学構造における修飾、ならびにこれらに限定されないが、2'-OHがH、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、またはCN（Rは、アルキル部分である）などの基によって置き換えられる糖修飾リボヌクレオチドを含む2'位糖修飾を有するヌクレオチドを含む。ヌクレオチド類似体はまた、イノシン、キューオシン、キサンチンなどの

40

50

塩基、2'メチルリボースなどの糖、メチルホスホネート、ホスホロチオエートなどの非天然ホスホジエステル連結、及びペプチドを含むヌクレオチドを含むことを意味する。

【0178】

類似体は、改変されたリン酸骨格、糖、または核酸塩基（すなわち、G、C、T、U、及びA）のいずれかを有することができる。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、アンロックヌクレオモノマー剤（UNA）であり得る。UNAは、オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドなどのオリゴマーまたはポリマー組成物に含めるのに好適であり、ヌクレオシドまたはヌクレオチドに関して、アンロックまたは非環式糖部分を有する任意のモノマー単位を含む。かかるUNAがより大きなオリゴマーまたはポリマーに含まれる場合、かかるより大きなオリゴマーまたはポリマー、例えば、オリゴヌクレオチドはまた、UNAオリゴマーもしくはUNAポリマー、またはUNAオリゴヌクレオチドと称され得る。UNAが標準的なヌクレオチドに含まれる場合、かかるバリエーションヌクレオチドは、UNAヌクレオチドと称される。UNAが標準的なヌクレオシドに含まれる場合、かかるバリエーションヌクレオシドは、UNAヌクレオシドと称される。UNAは、オリゴヌクレオチドにおけるヌクレオシドまたはヌクレオチドの代替物として使用できる。この場合、UNAは、モノマーであろうと、またはモノマーを含むオリゴマーであろうと、当該技術分野では「アンロックされた核酸」と称されていることが多い。本明細書でアンロックされた核酸と称される場合、当業者は、発明者がUNAに言及していることを理解するであろう。本発明によれば、UNAは天然に存在するヌクレオモノマー剤ではない。一実施形態では、核酸分子内の1つ以上のヌクレオチドは、1つ以上のアンロックされた核酸／ヌクレオモノマー剤（UNA）部分で置き換えることができ、例えば、PCT公開WO 2015/148580に記載されるものが含まれる。UNAオリゴマーは、UNAモノマー、及び天然に存在するヌクレオシドまたは修飾ヌクレオチドに基づくことができる様々なヌクレオチドで構成される鎖であり得る。UNAオリゴマーは、修飾を欠く対応するオリゴヌクレオチドと比較して、低減したオフターゲット効果を有することが報告されている。本発明に従って利用され得る他のUNA修飾及び使用には、米国特許公開2015/0232851、2015/0232849、2015/0239926、2015/0239834、及び2015/0141678、米国特許第9,051,570号、欧州公開第2162538号及び第2370577号、ならびにPCT公開第WO 2015/074085号に開示されているもののうちのいずれかが含まれる。

【0179】

いくつかの実施形態では、骨格類似体を有する人工核酸類似体には、これらに限定されないが、ロック核酸（LNA）、架橋核酸（BNA）、グリコール核酸（GNA）、スレオース核酸（TNA）、及びモルホリノが含まれる。これらの骨格類似体を含む修飾オリゴヌクレオチドは、異なる骨格糖を有するか、またはPNAの場合、リボースリン酸の代替のアミノ酸残基は、ワトソン及びクリックのペアリングに従ってRNAまたはDNAと依然として結合するが、ヌクレアーゼ活性に免疫性である。LNAは、例えば、米国特許第6,268,490号、第6,316,198号、第6,403,566号、第6,770,748号、第6,998,484号、第6,670,461号、及び第7,034,133号、ならびにPCT公開第1999/014226号に記載されている。本発明により包含される核酸分子に組み込まれ得る他の好適なロックヌクレオチドには、米国特許第6,403,566号、第6,833,361号、及び第7,060,809号に記載されているものが含まれる。D-オキシ-LNA、 α -L-オキシ-LNA、 β -D-アミノ-LNA、 α -L-アミノ-LNA、チオ-LNA、 α -L-チオ-LNA、セレノ-LNA、メチレン-LNA、及び β -D-ENAなどの他のロック核酸誘導体は、本発明により包含される核酸分子に組み込まれ得る。米国特許第7,569,575号、第8,084,458号、及び第8,429,390号に記載されるそれらのLNA誘導体はまた、核酸分子に組み込むことができる。

【0180】

修飾糖

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、1つ以上の糖修飾ヌクレオチドを含み得る。

【0181】

それは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、またはそれ以上の糖修飾ヌクレオチドを含むことができる。本発明において有用な糖修飾ヌクレオチドには、これらに限定されないが、2'-フルオロ修飾リボヌクレオチド、2'-OMe修飾リボヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-アミノ修飾リボヌクレオチド、及び2'-チオ修飾リボヌクレオチドが含まれる。糖修飾ヌクレオチドは、例えば、2'-フルオロシチジン、2'-フルオロウリジン、2'-フルオロアデノシン、2'-フルオログアノシン、2'-アミノシチジン、2'-アミノウリジン、2'-アミノアデノシン、2'-アミノグアノシン、または2'-アミノブチルループレンウリジンが含まれ得る。骨格糖の2'修飾に加えて、糖基は他の位置で修飾することができる。糖基は、糖の同じ炭素で2つの異なる修飾を含むことができる。糖基はまた、リボース中の対応する炭素とは反対の立体化学的配置を有する1つ以上の炭素を含むことができる。したがって、核酸分子は、例えば、アラビノースを糖として含むヌクレオチドを含むことができる。ヌクレオチドは、糖上の1'位でのアルファ連結、例えば、アルファヌクレオシドを有することができる。ヌクレオチドはまた、4'位で反対の配置を有することができる、例えば、C5'及びH4'、またはそれらを置き換える置換基が互いに交換される。C5'及びH4'またはそれらを置き換える置換基が互いに交換される場合、糖は、4'位で修飾されていると言われる。

【0182】

本発明により包含される核酸分子はまた、C-1'で核酸塩基を欠くか、またはC1'で核酸塩基の代わりに他の化学基を有する脱塩基糖を含むことができる（例えば、米国特許第5,998,203号を参照されたい）。これらの脱塩基糖はまた、構成糖原子の1つ以上で修飾をさらに含むことができる。他の実施形態では、核酸分子はまた、L異性体である1つ以上の糖を含むことができる。一態様では、糖基への修飾はまた、硫黄、任意に、置換された窒素またはCH₂基による4'-Oの置換を含み得る。別の態様では、糖基への修飾はまた、非環式ヌクレオチドを含み得、リボース炭素間のC-C結合が存在しない、及び／またはリボース炭素もしくは酸素の少なくとも1つがヌクレオチドから独立してまたは組み合わせて存在しない。かかる非環式ヌクレオチドは、米国特許第5,047,533号、及び第7,737,273号、ならびに米国特許公開第2013/0130378号に開示されている。特定のヌクレオチドがその2'位を介して次のヌクレオチドと連結されている場合、本明細書に記載される糖修飾は、その特定のヌクレオチド、例えば、その2'位を介して連結されているヌクレオチドについて、糖の3'位に配置され得ることを理解されたい。3'位での修飾は、キシロース配置に存在し得る。本明細書で使用する「キシロース配置」という用語は、3'-OHがキシロース糖にあるのと同じ配置でリボースのC3'に置換基を配置することを指す。糖基のC4'及び／またはC1'と結合した水素は、2'修飾について記載したように代替物で置き換えることができる。一例では、本発明により包含される核酸分子は、2'-フルオロ修飾リボヌクレオチドを含むことができる。好ましくは、2'-フルオロリボヌクレオチドは、センス及びアンチセンス鎖である。より好ましくは、2'-フルオロリボヌクレオチドは、すべてのウリジン及びシチジンである。

【0183】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子のヌクレオシド間連結基は、修飾されている。

【0184】

ヌクレオシド間連結修飾は、センス鎖、アンチセンス鎖内、またはセンス及びアンチセンス鎖内にあり得る。「ヌクレオシド間連結基」という用語は、DNA残基間、RNA残基間、DNA及びRNA残基ならびにヌクレオチド類似体間、2つの非LNA残基間、非LNA残基及びLNA残基間、2つのLNA残基間など、2つのヌクレオ塩基を共有結合

できる基を意味することを意図する。自然な標準的な結合は、 $-O-P(O)_2-O-$ (5' から 3' 末端) からなるホスホジエステル結合 (PO 連結) であり、デオキシリボース/リボース糖は、3'-ヒドロキシル基及び 5'-ヒドロキシル基の両方で、「ホスホジエステル」結合/リンカーとしても知られるエステル連結におけるリン酸基と結合している。リンカーは、一方または両方の連結酸素 (すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素) を、窒素 (架橋ホスホロアミデート)、硫黄 (架橋ホスホロチオエート)、及び炭素 (架橋メチレンホスホネート) で置き換えることによって修飾することができる。いくつかの実施形態では、リン酸リンカー部分は、非リン含有リンカー、例えば、脱リン酸リンカーによって置き換えることができる。理論に束縛されることを望まないが、荷電ホスホジエステル基が核酸分解の反応中心であるため、中性構造模倣物でのその置換は、ヌクレアーゼ安定性の増強を与えると考えられている。リン酸リンカーを置き換えることができる部分の例には、これらに限定されないが、アミド (例えば、アミド-3 ($(3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5')$) 及びアミド-4 ($(3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5')$))、ヒドロキシルアミノ、シロキサン (ジアルキルシロキサン)、カルボキサミド、炭酸塩、カルボキシメチル、カルバメート、カルボン酸エステル、チオエーテル、エチレンオキシドリリンカー、硫化物、スルホン酸、スルホンアミド、スルホン酸エステル、チオホルムアセタール ($(3'-S-CH_2-O-5')$)、ホルムアセタール ($(3'-O-CH_2-O-5')$)、オキシム、メチレンイミノ、メチルケネカルボニルアミノ、メチレンメチルイミノ (MMI、 $(3'-CH_2-N(CH_3)-O-5')$)、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、メチレンオキシメチルイミノ、エーテル ($C3'-O-C5'$)、チオエーテル ($C3'-S-C5'$)、チオアセトアミド ($C3'-N(H)-C(=O)-CH_2-S-C5'$ 、 $C3'-O-P(O)-O-SS-C5'$ 、 $C3'-CH_2-NH-NH-C5'$ 、 $3'-NH-P(O)(OCH_3)-O-5'$ 、及び $3'-NH-P(O)(OCH_3)-O-5'$ 、ならびに N、O、S、 CH_2 構成部分を含む非イオン性連結が含まれる。

10

20

30

40

50

【0185】

いくつかの実施形態では、連結の修飾は、置換または修飾された 1 つのリン酸の酸素原子の少なくとも 1 つをさらに含む。いくつかの態様では、リン酸リンカー上の非連結リン酸酸素の一方または両方は、修飾または置換され得る。修飾リン酸塩には、これらに限定されないが、ホスホノカルボン酸 (非連結酸素原子の 1 つがカルボン酸で置換/修飾されている) (例えば、ホスホ酢酸、ホスホノギ酸、ホスホルアミデート)、ホスホロチオエート ($-O-P(O, S)-O-$ 、 $-O-P(S)_2-O-$)、メチルホスホン酸 ($-O-P(OCH_3)-O-$)、及びアルキルまたはアリールホスホン酸が含まれる。本明細書で論じられるように、本発明により包含される siRNA 分子中の 2 つの連続するモノマー間の連結の 1 つ以上の原子は、修飾されている。かかる連結の例示的な例は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CO-CH_2-$ 、 $-CH_2-CHOH-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CH=$ 、 $-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-NR^H-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NR^H-$ 、 $-CH_2-NR^H-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NR^H-$ 、 $-NR^H-CO-O-$ 、 $-NR^H-CO-NR^H-$ 、 $-NR^H-CS-NR^H-$ 、 $-NR^H-C(=NR^H)-NR^H-$ 、 $-NR^H-CO-CH_2-NR^H-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-O-CO-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CO-O-$ 、 $-CH_2-CO-NR^H-$ 、 $-O-CO-NR^H-$ 、 $-NR^H-CO-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CO-NR^H-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NR^H-$ 、 $-CH=$ 、 $-N-O-$ 、 $-CH_2-NR^H-O-$ 、 $-CH_2-O-N=$ 、 $-S-P(O)_2-O-$ 、 $-S-P(O, S)-O-$ 、 $-S-P(S)_2-O-$ 、 $-O-P(O)_2-S-$ 、 $-O-P(O, S)-S-$ 、 $-S-P(O)_2-S-$ 、 $-O-PO(R^H)-O-$ 、 $-O-PO(NR^H)-O-$ 、 $-O-PO(OCH_2CH_2S-R)-O-$ 、 $-O-PO(BH_3)-O-$ 、 $-O-PO(NHR^H)-O-$ 、 $-O-P(O)_2-NR^H-$ 、 $-NR^H-P(O)_2-O-$ 、 $-NR^H-CO-O-$ 、 $-NR^H-CO-NR^H-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-O-CO-NR^H-$ 、 $-NR^H-CO-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CO-NR^H-$ 、 $-$

$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NCH}_3-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{R})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{BH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{SO}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{NR}^{\text{H}}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{S})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{NR}^{\text{H}})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}'')-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{CH}_3)-\text{O}-$ 、及び $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{N}})-\text{O}-$ であり、 R^{H} は、水素及び C_{1-4} -アルキルから選択される。

【0186】

本発明により包含される文脈において、好ましい例には、リン酸、ホスホジエステル（PO）連結、及びホスホロチオエート（PS）連結が含まれる。ホスホロチオエートは、両方の非架橋酸素が硫黄に置き換えられている。ホスホロチオエートのリン中心はアキラルであり、オリゴヌクレオチドジASTEレオマーの形成を妨げる。したがって、理論に束縛されることを望まないが、キラル中心を排除する両方の非連結酸素への修飾、例えば、ホスホロチオエート形成は、それらがジASTEレオマー混合物を生成できないという点で所望され得る。したがって、非連結酸素は独立して、O、S、Se、B、C、H、N、またはOR（Rはアルキルまたはアリール）のいずれか1つであり得る。いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、1つ以上のホスホロチオエート連結を含むことができる。例えば、ポリヌクレオチドは、部分的にホスホロチオエート連結することができ、例えば、ホスホロチオエート連結は、ホスホジエステル連結と交代することができる。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、完全なホスホロチオエート連結である。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1～7、1～5、または1～3のホスホジエステル連結を有する。ホスホロチオエート連結は、オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼ切断に対してより抵抗性にするために使用されている。通常の5'-3'連結に加えて、修飾オリゴヌクレオチドは、5'-2'連結、及びヌクレオシド単位の隣接する対が3'-5'から5'-3'または2'-5'から5'-2'に連結している逆極性を有するものを有することができる。ヌクレオシド間連結基の修飾を教示する代表的な米国特許には、米国特許第5,519,126号、第5,536,821号、第5,541,306号、第5,550,111号、第5,563,253号、第5,571,799号、第5,587,361号、第5,625,050号、第5,378,825号、第5,697,248号、及び第7,368,439号が含まれる。ヌクレオシド間連結修飾を教示する他の参考文献には、Mesmaeker et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:343-355、Freier and Altman (1997) Nucleic Acids Res. 25:4429-4443、及びMicklefield (2001) Curr. Med. Chem. 8:1157-1179が含まれる。

【0187】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、1つ以上の骨格修飾ヌクレオチドを含むことができる。

【0188】

骨格修飾ヌクレオチドは、センス鎖、アンチセンス鎖内、またはセンス及びアンチセンス鎖内にある。本明細書で使用される通常の「骨格」は、DNAまたはRNA分子内で繰り返される交互の糖リン酸配列を指す。天然に存在するDNA及びRNA分子では、核酸分子の骨格には、3'-ヒドロキシル基及び5'-ヒドロキシル基の両方でエステル結合（すなわち、PO連結）のリン酸基と結合したデオキシリボース／リボース糖が含まれる。天然のホスホジエステル結合は、アミド結合で置き換えることができるが、2つの糖単

位間の4つの原子は保持される。かかるアミド修飾は、miRNA補体で形成された二本鎖の熱力学的安定性を高めることができる（例えば、Mesmaeker et al. (1997) Pure Appl. Chem. 3:437-440を参照されたい）。いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、2'ヒドロキシルに関する2'修飾など、配列内の非ロックヌクレオチドに関する化学修飾を含めることができる。例えば、siRNA分子に2'位の修飾ヌクレオチドを組み込むと、ヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの抵抗性、及び相補的な標的との熱安定性の両方を増強することができる。2'位での様々な修飾は、標的または細胞機構との分子相互作用を損なうことなく、増強したヌクレアーゼ抵抗性を提供するものから独立して選択することができる。かかる修飾は、インビトロまたはインビボでのそれらの増強した効力に基づいて選択することができる。いくつかの実施形態では、2'修飾は、いくつかの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基から独立して選択することができる。「オキシ」-2'ヒドロキシル基修飾の例には、アルコキシまたはアリールオキシ（例えば、Oメチル、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖；ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ （ $n=1\sim50$ ）；O-アミンまたは $O-(CH_2)_n$ アミン（ $n=1\sim10$ ）、アミン= NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノ；及び $O-CH_2CH_2(NCH_2CH_2NMe_2)_2$ ）が含まれる。「デオキシ」修飾には、水素（すなわち、一本鎖オーバーハングに特に関連するデオキシリボース糖）；ハロ（例えば、フルオロ）；アミノ（例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸； $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -アミン（アミン= NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ； $-NHC(O)R$ （R=アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖）；シアノ；メルカプト；アルキル-チオールアルキル；チオアルコキシ；チオアルキル；アルキル；シクロアルキル；アリール；アルケニル、及びアルキニルが含まれる。

【0189】

非ロックヌクレオチドの実質的にすべて、またはすべてのヌクレオチドの2'位が、特定の実施形態において修飾され得る。例えば、2'修飾はそれぞれ、O-メチル及びフルオロから独立して選択することができる。例示的な実施形態では、プリンヌクレオチドはそれぞれ、2'O-メチルを有し、ピロリジンヌクレオチドはそれぞれ、2'-Fを有する。本発明によれば、2'位の修飾はまた、小さな炭化水素置換基を含み得る。炭化水素置換基には、アルキル、アルケニル、アルキニル、及びアルコキシアルキルが含まれ、アルキル（アルコキシのアルキル部分を含む）、アルキル、及びアルキルは、置換または非置換であり得る。アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、C1からC10アルキル、アルケニル、またはアルキニル、例えば、C1、C2、またはC3であり得る。炭化水素置換基は、N、O、及び／またはSから独立して選択することができる1つまたは2つまたは3つの非炭素原子を含むことができる。2'修飾は、O-アルキル、O-アルケニル、及びO-アルキニルとしてのアルキル、アルケニル、及びアルキニルをさらに含むことができる。本発明による例示的な2'修飾には、2'-H、2'-O-アルキル（C1-3アルキル、例えば、2'O-メチルまたは2'OEt）、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）、2'-O-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMAP）、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAEOE）、2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）、またはgem 2'-OMe/2'F置換が含まれる。いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、非ロックヌクレオチドにおいて2'O-メトキシ（2'-OMe）として修飾された少なくとも1つの2'位を含む。オリゴヌクレオチドは、1から約5の2'-O-メ

トキシ（2'-OMe）修飾ヌクレオチド、または1から約3の2'-O-メトキシ（2'-OMe）修飾ヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、miR-124模倣物のすべてのヌクレオチドは、2'-O-メトキシ（2'-OMe）修飾を含む。異なる種類の2'位修飾の他の例示的な組み合わせは、2'-フルオロ、2'-クロロ、2'-ブロモ、及び2'-ヨードなどの少なくとも1つの2'-ハロ修飾（例えば、2'-ヒドロキシルの代わりに）を含むことができる。

【0190】

いくつかの実施形態では、鎖の骨格または核酸分子の鎖は、リン酸リンカー及びリボース糖がヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオシドまたはヌクレオチド代替物によって置き換えられて構築され得る。理論に拘束されることを望まないが、反復的に荷電した骨格が存在しないと、ポリアニオンを認識するタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ）との結合が減少すると考えられている。非限定的な例として、かかるヌクレオチド代替物には、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、ペプチド核酸（PNA）、アミノエチルグリシルPNA（Aegina）、及び骨格拡張ピリミジンPNA（bepPNA）ヌクレオシド代替物が含まれる（例えば、米国特許第5,359,044号、第5,519,134号、第5,142,047号、及び第5,235,033号、Bioorganic & Medicinal Chemistry（1996）, 4:5-23）が含まれる。糖リン酸骨格の置換のための代替物は、PNA代替物（ペプチド核酸）を含む。「ペプチド核酸（PNA）」という用語は、DNA及びRNAと同様の化学合成ポリマーであり、骨格は、ペプチド結合によって連結された繰り返しのN-（2-アミノエチル）-グリシン（AEG）単位で構成されている（Nielsen et al.（1991）Science 254:1497-1500）。PNAを有する合成オリゴヌクレオチドは、相補的DNAまたはRNAとの結合においてより高い結合強度及びより大きな特異性を有し、PNA/DNA塩基ミスマッチは、同様のDNA/RNA二本鎖よりも望ましい。PNAは、ヌクレアーゼまたはプロテアーゼのいずれによっても容易に認識されないため、酵素分解に対してそれを抵抗性とする。PNAはさらに、広いpH範囲にわたって安定性である。PNAは、多くの研究でアンチセンス及び抗遺伝子治療での使用が提案されている。PNAは、DNase及びプロテアーゼに抵抗性であり、細胞透過性の増加などのためにさらに修飾され得る。

【0191】

他の修飾

本発明により包含される核酸分子はまた、ミスマッチ、バルジ、または架橋などの追加の修飾を含むことができる。同様に、それらはまた、リンカー、ヘテロ機能性架橋リンカー、デンドリマー、ナノ粒子、ペプチド、有機化合物（例えば、蛍光色素）、及び／または光分解可能な化合物などの他の複合体を含み得る。いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、本明細書に記載されるような2つ以上の修飾の任意の組み合わせを含むことができる。核酸配列は独立して、1つ以上の糖部分、1つ以上のヌクレオシド間連結、及び／または1つ以上の核酸塩基に対する1つ以上の修飾を含むことができる。本明細書に開示されるように、これらの配列は、化学修飾の任意の組み合わせを用いて修飾され得る。

【0192】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、核酸配列を含むsiRNAであり、センス鎖及びアンチセンス鎖は、1つ以上のミスマッチ、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれ以上のミスマッチを含む。「ミスマッチ」という用語は、非相補的塩基からなる塩基対を指し、例えば、通常の相補的G:C、A:T、またはA:U塩基対ではない。いくつかの実施形態では、本発明により包含されるsiRNA分子のアンチセンス鎖及び標的mRNA配列は、1つ以上のミスマッチ、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれ以上のミスマッチを含み得る。いくつかの例では、ミスマッチは、アンチセンス鎖を参照する切断部位の下流にあり得る。より好ましくは、ミスマッ

チは、アンチセンス鎖の3'末端から1~6ヌクレオチド以内に存在し得る。別の実施形態では、本発明により包含されるs i R N A分子は、二本鎖s i R N A内に、バルジ、例えば、1つ以上、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれ以上の不對塩基を含む。好ましくは、バルジは、センス鎖にあり得る。

【0193】

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるs i R N A分子は、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれ以上）の架橋、例えば、センス鎖がs i R N A二本鎖のアンチセンス鎖に架橋されている架橋を含む。本発明において有用な架橋剤は、これらに限定されないが、ソラレン、マイトマイシンC、シスプラチン、クロロエチルニトロソ尿素などを含む、当該技術分野で一般的に即知のものである。好ましくは、架橋は、アンチセンス鎖を参照する切断部位の下流に存在し、より好ましくは、架橋は、センス鎖の5'末端に存在する。本発明によれば、s i R N A誘導体はまた、単一の架橋（例えば、ソラレン架橋）を有するs i R N A誘導体、光分解可能なビオチン（例えば、光分解可能なビオチン）を有するs i R N A、ペプチド（例えば、T a t ペプチド）、ナノ粒子、ペプチド模倣物、有機化合物（例えば、蛍光色素などの色素）、またはデンドリマーなどを含む。

【0194】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される核酸分子は、ペプチド（例えば、インビボで宿主細胞受容体を標的とするための）、または細胞膜（例えば、L e t s i n g e r e t a l . (1989) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 86:6553-6556、L e m a i t r e e t a l . (1987) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 84:648-652、P C T特許公開第W O 88/09810号を参照されたい）もしくは血液脳関門（例えば、P C T公開第W O 89/10134号を参照されたい）を通過する輸送を促進する薬剤などの他の付加された基を含み得る。さらに、核酸分子は、ハイブリダイゼーションによって誘発される切断剤（例えば、K r o l e t a l . (1988) B i o T e c h n i q u e s 6:958-976を参照されたい）、または挿入剤（例えば、Z o n (1988) P h a r m . R e s . 5:539-549を参照されたい）を用いて修飾され得る。

【0195】

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるs i R N A分子は、本明細書に記載されるような2つ以上の修飾の任意の組み合わせを含み得る。本明細書に示される核酸配列は、核酸に対するいかなる修飾にも依存しない。そのように、配列番号によって定義される核酸は独立して、1つ以上の糖部分、1つ以上のヌクレオシド間連結、及び／または1つ以上の核酸塩基に対する1つ以上の修飾を含み得る。本明細書に開示されるように、これらの配列は、化学修飾の任意の組み合わせを用いて修飾され得る。

【0196】

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるs i R N A分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み得、アンチセンス鎖は、特異的R N A干渉（R N A i）を指示するために、C C R 2 m R N A配列（配列番号1）またはC S F 1 R m R N A配列（配列番号2）に対して十分に相補的な配列を有し、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖は、修飾ヌクレオチドを有するヌクレオチドの置換によって修飾される。一実施形態では、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖は、少なくとも1つのヌクレオチドの置換によって修飾される。別の実施形態では、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖は、少なくとも2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチド、25ヌクレオチド、26ヌクレオチド、27ヌクレオチド、28ヌクレオチド、29ヌクレオチド

、30ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドの置換によって修飾される。別の実施形態では、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上の内部ヌクレオチドの置換によって修飾される。さらに別の実施形態では、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖は、すべてのヌクレオチドの置換によって修飾される。

【0197】

いくつかの実施形態では、CSF1RにハイブリダイズするsiRNA分子は、配列番号368～486の核酸配列からなる群から選択される修飾センス核酸配列、及び配列番号487～605の核酸配列からなる群から選択される修飾アンチセンス核酸配列を含み得る（表4）。センス及びアンチセンス二本鎖の標的位置は、表4の最初の列に示されている。他の実施形態では、マクロファージにおけるCSF1R mRNAの有意な低減をもたらす得る修飾siRNA分子は、1つ以上のバリエーションを生成するようにさらに修飾され得る。非限定的な例として、CSF1RにハイブリダイズするsiRNA分子に由来するいくつかのバリエーションは、配列番号883～921の核酸配列からなる群から選択される修飾センス核酸配列、及び配列番号922～960の核酸配列からなる群から選択される修飾アンチセンス核酸配列を含み得る。これらの修飾は、siRNA分子の効率、特異性、及び安定性を高めることができる。

【表 4 - 1】

表 4 : C S F 1 R に特異的な s i R N A の修飾センス及びアンチセンス配列

二本鎖位置	二本鎖 ID	SS ID	センス鎖配列 (5' ~ 3')	配列番号	AS ID	アンチセンス鎖配列 (5' ~ 3')	配列番号
3 4 6	XD -0 8 9 0 3	X 2 8 7 5 4	g g G A A u c c c A G u G a u A G A G d T s d T	3 6 8	X 2 8 7 5 5	C U C u A U c A C U G G G A U U C C C d T s d T	4 8 7
4 1 0	XD -0 8 9 0 4	X 2 8 7 5 6	u u G c G A u G u G u G G g c A A u G d T s d T	3 6 9	X 2 8 7 5 7	c A U U G C C c A c A c A U C G c A A d T s d T	4 8 8
4 1 2	XD -0 8 9 0 5	X 2 8 7 5 8	g c G A u G u G u G G G c a A u G G c d T s d T	3 7 0	X 2 8 7 5 9	G C c A U U G C C c A c A c A U C G C d T s d T	4 8 9
5 0 8	XD -0 8 9 0 6	X 2 8 7 6 0	c a A c G c u A c c u u c c A A A A c d T s d T	3 7 1	X 2 8 7 6 1	G U U U U G G A A G G u A G C G U U G d T s d T	4 9 0
5 1 0	XD -0 8 9 0 7	X 2 8 7 6 2	a c G c u A c c u u c c A a A A c A c d T s d T	3 7 2	X 2 8 7 6 3	G U G U U U U G G A A G G u A G C G U d T s d T	4 9 1
5 1 1	XD -0 8 9 0 8	X 2 8 7 6 4	c g c u A c c u u c c A A a A c A c G d T s d T	3 7 3	X 2 8 7 6 5	C G U G U U U U G G A A G G u A G C G d T s d T	4 9 2
6 0 4	XD -0 8 9 0 9	X 2 8 7 6 6	u g c c c G G c c c u G G a A c G u G d T s d T	3 7 4	X 2 8 7 6 7	c A C G U U C c A G G G C C G G G c A d T s d T	4 9 3
6 7 5	XD -0 8 9 1 0	X 2 8 7 6 8	u g c u c A c A G A c c c g G u G c u d T s d T	3 7 5	X 2 8 7 6 9	A G c A C C G G G U C U G U G A G c A d T s d T	4 9 4
7 0 0	XD -0 8 9 1 1	X 2 8 7 7 0	a g G c G u c u c G c u G g u G c G u d T s d T	3 7 6	X 2 8 7 7 1	A C G c A C c A G C G A G A C G C C U d T s d T	4 9 5

10

20

30

40

【表 4 - 2】

8 1 7	XD - 0 8 9 1 2	X 2 8 7 7 2	u c A A u G c A G u G c c c u G A u G d T s d T	3 7 7	X 2 8 7 7 3	c A U c A G G G c A C U G c A U U G A d T s d T	4 9 6
8 5 9	XD - 0 8 9 1 3	X 2 8 7 7 4	c a G c A u c c G G c u G a A A G u G d T s d T	3 7 8	X 2 8 7 7 5	c A C U U U c A G C C G G A U G C U G d T s d T	4 9 7
9 2 1	XD - 0 8 9 1 4	X 2 8 7 7 6	c a G A G c u G G u G c G g A u u c G d T s d T	3 7 9	X 2 8 7 7 7	C G A A U C C G c A C c A G C U C U G d T s d T	4 9 8
9 2 3	XD - 0 8 9 1 5	X 2 8 7 7 8	g a G c u G G u G c G G A u u c G A G d T s d T	3 8 0	X 2 8 7 7 9	C U C G A A U C C G c A C c A G C U C d T s d T	4 9 9
9 3 0	XD - 0 8 9 1 6	X 2 8 7 8 0	u g c G G A u u c G A G G g G A G G c d T s d T	3 8 1	X 2 8 7 8 1	G C C U C C C C U C G A A U C C G c A d T s d T	5 0 0
9 4 8	XD - 0 8 9 1 7	X 2 8 7 8 2	c u G c c c A G A u c G u g u G c u c d T s d T	3 8 2	X 2 8 7 8 3	G A G c A c A C G A U C U G G G c A G d T s d T	5 0 1
9 5 0	XD - 0 8 9 1 8	X 2 8 7 8 4	g c c c A G A u c G u G u g c u c A G d T s d T	3 8 3	X 2 8 7 8 5	C U G A G c A c A C G A U C U G G G C d T s d T	5 0 2
9 5 3	XD - 0 8 9 1 9	X 2 8 7 8 6	c a G A u c G u G u G c u c A G c c A d T s d T	3 8 4	X 2 8 7 8 7	U G G C U G A G c A c A C G A U C U G d T s d T	5 0 3
1 0 5 3	XD - 0 8 9 2 0	X 2 8 7 8 8	a u A A c c G u u A c c A a A A A G u d T s d T	3 8 5	X 2 8 7 8 9	A C U U U U U G G u A A C G G U u A U d T s d T	5 0 4
1 0 5 5	XD - 0 8 9 2 1	X 2 8 7 9 0	a a c c G u u A c c A A A a A G u c c d T s d T	3 8 6	X 2 8 7 9 1	G G A C U U U U U G G u A A C G G U U d T s d T	5 0 5
1 0 5 6	XD - 0	X 2 8 7 9 2	a c c G u u A c c A A A A a	3 8 7	X 2 8 7 9 3	A G G A C U U U U U G G u A	5 0 6

10

20

30

40

【表 4 - 3】

	8 9 2 2		G u c c u d T s d T			A C G G U d T s d T	
1 0 6 0	XD - 0 8 9 2 3	X 2 8 7 9 4	u u A c c A A A A A G u c c u G A c c d T s d T	3 8 8	X 2 8 7 9 5	G G U c A G G A C U U U U U G G u A A d T s d T	5 0 7
1 2 8 8	XD - 0 8 9 2 4	X 2 8 7 9 6	a g G u u u u A A c u G G a c c u A c d T s d T	3 8 9	X 2 8 7 9 7	G u A G G U C c A G U u A A A A C C U d T s d T	5 0 8
1 2 8 9	XD - 0 8 9 2 5	X 2 8 7 9 8	g g u u u u A A c u G G A c c u A c c d T s d T	3 9 0	X 2 8 7 9 9	G G u A G G U C c A G U u A A A A C C d T s d T	5 0 9
1 2 9 2	XD - 0 8 9 2 6	X 2 8 8 0 0	u u u A A c u G G A c c u a c c u G G d T s d T	3 9 1	X 2 8 8 0 1	C c A G G u A G G U C c A G U u A A A d T s d T	5 1 0
1 2 9 3	XD - 0 8 9 2 7	X 2 8 8 0 2	u u A A c u G G A c c u A c c u G G G d T s d T	3 9 2	X 2 8 8 0 3	C C c A G G u A G G U C c A G U u A A d T s d T	5 1 1
1 3 0 0	XD - 0 8 9 2 8	X 2 8 8 0 4	g a c c u A c c u G G G A c c c u u u d T s d T	3 9 3	X 2 8 8 0 5	A A A G G G U C C c A G G u A G G U C d T s d T	5 1 2
1 4 6 7	XD - 0 8 9 2 9	X 2 8 8 0 6	u g A c G u u u G A G c u c A c c c u d T s d T	3 9 4	X 2 8 8 0 7	A G G G U G A G C U c A A A C G U c A d T s d T	5 1 3
1 4 6 8	XD - 0 8 9 3 0	X 2 8 8 0 8	g a c G u u u G A G c u c a c c c u u d T s d T	3 9 5	X 2 8 8 0 9	A A G G G U G A G C U c A A A C G U C d T s d T	5 1 4
1 4 7 3	XD - 0 8 9 3 1	X 2 8 8 1 0	u u G A G c u c A c c c u u c G A u A d T s d T	3 9 6	X 2 8 8 1 1	u A U C G A A G G G U G A G C U c A A d T s d T	5 1 5
1 4 7 6	XD - 0 8 9 3 2	X 2 8 8 1 2	a g c u c A c c c u u c G a u A c c c d T s d T	3 9 7	X 2 8 8 1 3	G G G u A U C G A A G G G U G A G C U d T s d T	5 1 6

10

20

30

40

【表 4 - 4】

1 4 8 5	XD - 0 8 9 3 3	X 2 8 8 1 4	u u c G A u A c c c c c c a G A G G u d T s d T	3 9 8	X 2 8 8 1 5	A C C U C U G G G G G G u A U C G A A d T s d T	5 1 7
1 4 8 8	XD - 0 8 9 3 4	X 2 8 8 1 6	g a u A c c c c c c A G A g G u A A G d T s d T	3 9 9	X 2 8 8 1 7	C U u A C C U C U G G G G G G u A U C d T s d T	5 1 8
1 7 1 5	XD - 0 8 9 3 5	X 2 8 8 1 8	g a G A c c u u A G A G c a c A A c c d T s d T	4 0 0	X 2 8 8 1 9	G G U U G U G C U C u A A G G U C U C d T s d T	5 1 9
1 7 1 7	XD - 0 8 9 3 6	X 2 8 8 2 0	g a c c u u A G A G c A c a A c c A A d T s d T	4 0 1	X 2 8 8 2 1	U U G G U U G U G C U C u A A G G U C d T s d T	5 2 0
1 7 5 9	XD - 0 8 9 3 7	X 2 8 8 2 2	c a G c G u G G G G A G u g G c u c c d T s d T	4 0 2	X 2 8 8 2 3	G G A G C c A C U C C C c A C G C U G d T s d T	5 2 1
1 8 1 5	XD - 0 8 9 3 8	X 2 8 8 2 4	a u c c c c c G G A u G A g u u c c u d T s d T	4 0 3	X 2 8 8 2 5	A G G A A C U c A U C C G G G G G A U d T s d T	5 2 2
1 8 1 9	XD - 0 8 9 3 9	X 2 8 8 2 6	c c c G G A u G A G u u c c u c u u c d T s d T	4 0 4	X 2 8 8 2 7	G A A G A G G A A C U c A U C C G G G d T s d T	5 2 3
1 8 4 7	XD - 0 8 9 4 0	X 2 8 8 2 8	g u G G u c G c c u G c A u G u c c A d T s d T	4 0 5	X 2 8 8 2 9	U G G A c A U G c A G G C G A C c A C d T s d T	5 2 4
1 8 9 6	XD - 0 8 9 4 1	X 2 8 8 3 0	u g c u A u u G u A c A A g u A u A A d T s d T	4 0 6	X 2 8 8 3 1	U u A u A C U U G u A c A A u A G c A d T s d T	5 2 5
1 9 3 1	XD - 0 8 9 4 2	X 2 8 8 3 2	c a G G u c c G c u G G A a G A u c A d T s d T	4 0 7	X 2 8 8 3 3	U G A U C U U C c A G C G G A C C U G d T s d T	5 2 6
1 9 3 3	XD - 0	X 2 8 8 3 4	g g u c c G c u G G A A G a	4 0 8	X 2 8 8 3 5	G A U G A U C U U C c A G C	5 2 7

10

20

30

40

【表 4 - 5】

	8 9 4 3		u c A u c d T s d T			GG ACC d T s d T	
1 9 3 5	XD - 0 8 9 4 4	X 2 8 8 3 6	u c c G c u G G A A G A u c A u c G A d T s d T	4 0 9	X 2 8 8 3 7	U C G A U G A U C U U C c A G C G G A d T s d T	5 2 8
1 9 3 6	XD - 0 8 9 4 5	X 2 8 8 3 8	c c G c u G G A A G A u c a u c G A G d T s d T	4 1 0	X 2 8 8 3 9	C U C G A U G A U C U U C c A G C G G d T s d T	5 2 9
1 9 4 6	XD - 0 8 9 4 6	X 2 8 8 4 0	a u c A u c G A G A G c u a u G A G G d T s d T	4 1 1	X 2 8 8 4 1	C C U c A u A G C U C U C G A U G A U d T s d T	5 3 0
1 9 4 8	XD - 0 8 9 4 7	X 2 8 8 4 2	c a u c G A G A G c u A u g A G G G c d T s d T	4 1 2	X 2 8 8 4 3	G C C C U c A u A G C U C U C G A U G d T s d T	5 3 1
1 9 5 8	XD - 0 8 9 4 8	X 2 8 8 4 4	u a u G A G G G c A A c A g u u A u A d T s d T	4 1 3	X 2 8 8 4 5	u A u A A C U G U U G C C C U c A u A d T s d T	5 3 2
1 9 6 2	XD - 0 8 7 1 8	X 2 8 1 9 2	a g G G c A A c A G u u A u A c u u u d T s d T	4 1 4	X 2 8 1 9 3	A A A G u A u A A C U G U U G C C C U d T s d T	5 3 3
1 9 6 4	XD - 0 8 9 5 0	X 2 8 8 4 6	g g c A A c A G u u A u A c u u u c A d T s d T	4 1 5	X 2 8 8 4 7	U G A A A G u A u A A C U G U U G C C d T s d T	5 3 4
1 9 9 0	XD - 0 8 9 5 1	X 2 8 8 4 8	c a c G c A G c u G c c u u A c A A c d T s d T	4 1 6	X 2 8 8 4 9	G U U G u A A G G c A G C U G C G U G d T s d T	5 3 5
2 0 2 1	XD - 0 8 9 5 2	X 2 8 8 5 0	u u c c c c c G G A A c A a c c u G c d T s d T	4 1 7	X 2 8 8 5 1	G c A G G U U G U U C C G G G G G A A d T s d T	5 3 6
2 0 2 6	XD - 0 8 9 5 3	X 2 8 8 5 2	c c G G A A c A A c c u G c A G u u u d T s d T	4 1 8	X 2 8 8 5 3	A A A C U G c A G G U U G U U C C G G d T s d T	5 3 7

10

20

30

40

【表 4 - 6】

2 0 4 2	XD - 0 8 9 5 4	X 2 8 8 5 4	u u u G G u A A G A c c c u c G G A G d T s d T	4 1 9	X 2 8 8 5 5	C U C C G A G G G U C U u A C c A A A d T s d T	5 3 8
2 0 4 4	XD - 0 8 9 5 5	X 2 8 8 5 6	u g G u A A G A c c c u c g G A G c u d T s d T	4 2 0	X 2 8 8 5 7	A G C U C C G A G G G U C U u A C c A d T s d T	5 3 9
2 1 4 5	XD - 0 8 9 5 6	X 2 8 8 5 8	u g A A G u c c A c G G c c c A u G c d T s d T	4 2 1	X 2 8 8 5 9	G c A U G G G C C G U G G A C U U c A d T s d T	5 4 0
2 1 4 6	XD - 0 8 9 5 7	X 2 8 8 6 0	g a A G u c c A c G G c c c A u G c u d T s d T	4 2 2	X 2 8 8 6 1	A G c A U G G G C C G U G G A C U U C d T s d T	5 4 1
2 2 6 4	XD - 0 8 9 5 8	X 2 8 8 6 2	c c u G u A c u G G u c A u c A c G G d T s d T	4 2 3	X 2 8 8 6 3	C C G U G A U G A C c A G u A c A G G d T s d T	5 4 2
2 2 6 5	XD - 0 8 9 5 9	X 2 8 8 6 4	c u G u A c u G G u c A u c A c G G A d T s d T	4 2 4	X 2 8 8 6 5	U C C G U G A U G A C c A G u A c A G d T s d T	5 4 3
2 2 6 6	XD - 0 8 9 6 0	X 2 8 8 6 6	u g u A c u G G u c A u c a c G G A G d T s d T	4 2 5	X 2 8 8 6 7	C U C C G U G A U G A C c A G u A c A d T s d T	5 4 4
2 2 6 8	XD - 0 8 9 6 1	X 2 8 8 6 8	u a c u G G u c A u c A c g G A G u A d T s d T	4 2 6	X 2 8 8 6 9	u A C U C C G U G A U G A C c A G u A d T s d T	5 4 5
2 2 7 2	XD - 0 8 9 6 2	X 2 8 8 7 0	g g u c A u c A c G G A G u A c u G u d T s d T	4 2 7	X 2 8 8 7 1	A c A G u A C U C C G U G A U G A C C d T s d T	5 4 6
2 2 7 6	XD - 0 8 9 6 3	X 2 8 8 7 2	a u c A c G G A G u A c u g u u G c u d T s d T	4 2 8	X 2 8 8 7 3	A G c A A c A G u A C U C C G U G A U d T s d T	5 4 7
2 2 7 7	XD - 0	X 2 8 8 7 4	u c A c G G A G u A c u G u	4 2 9	X 2 8 8 7 5	u A G c A A c A G u A C U C	5 4 8

10

20

30

40

【表 4 - 7】

	8 9 6 4		u G c u A d T s d T			C G U G A d T s d T	
2 2 7 9	XD - 0 8 9 6 5	X 2 8 8 7 6	a c G G A G u A c u G u u g c u A u G d T s d T	4 3 0	X 2 8 8 7 7	c A u A G c A A c A G u A C U C C G U d T s d T	5 4 9
2 2 8 3	XD - 0 8 9 6 6	X 2 8 8 7 8	a g u A c u G u u G c u A u G G c G A d T s d T	4 3 1	X 2 8 8 7 9	U C G C c A u A G c A A c A G u A C U d T s d T	5 5 0
2 2 8 8	XD - 0 8 9 6 7	X 2 8 8 8 0	u g u u G c u A u G G c G a c c u G c d T s d T	4 3 2	X 2 8 8 8 1	G c A G G U C G C c A u A G c A A c A d T s d T	5 5 1
2 2 9 2	XD - 0 8 9 6 8	X 2 8 8 8 2	g c u A u G G c G A c c u g c u c A A d T s d T	4 3 3	X 2 8 8 8 3	U U G A G c A G G U C G C c A u A G C d T s d T	5 5 2
2 2 9 5	XD - 0 8 9 6 9	X 2 8 8 8 4	a u G G c G A c c u G c u c A A c u u d T s d T	4 3 4	X 2 8 8 8 5	A A G U U G A G c A G G U C G C c A U d T s d T	5 5 3
2 3 0 5	XD - 0 8 9 7 0	X 2 8 8 8 6	g c u c A A c u u u c u G c G A A G G d T s d T	4 3 5	X 2 8 8 8 7	C C U U C G c A G A A A G U U G A G C d T s d T	5 5 4
2 3 0 8	XD - 0 8 9 7 1	X 2 8 8 8 8	c a A c u u u c u G c G A a G G A A G d T s d T	4 3 6	X 2 8 8 8 9	C U U C C U U C G c A G A A A G U U G d T s d T	5 5 5
2 3 1 3	XD - 0 8 9 7 2	X 2 8 8 9 0	u u c u G c G A A G G A A g G c u G A d T s d T	4 3 7	X 2 8 8 9 1	U c A G C C U U C C U U C G c A G A A d T s d T	5 5 6
2 4 4 4	XD - 0 8 9 7 3	X 2 8 8 9 2	c a G G G u G u G G A c A c c u A u G d T s d T	4 3 8	X 2 8 8 9 3	c A u A G G U G U C c A c A C C C U G d T s d T	5 5 7
2 5 1 8	XD - 0 8 9 7 4	X 2 8 8 9 4	g g A c A A G G A G G A u g G A c G G d T s d T	4 3 9	X 2 8 8 9 5	C C G U C c A U C C U C C U U G U C C d T s d T	5 5 8

10

20

30

40

【表 4－8】

2 6 0 0	XD －0 8 9 7 5	X 2 8 8 9 6	g c u u c c A A G A A u u g c A u c c d T s d T	4 4 0	X 2 8 8 9 7	G G A U G c A A U U C U U G G A A G C d T s d T	5 5 9
2 6 7 9	XD －0 8 9 7 6	X 2 8 8 9 8	a c u u c G G G c u G G c u A G G G A d T s d T	4 4 1	X 2 8 8 9 9	U C C C u A G C c A G C C C G A A G U d T s d T	5 6 0
2 6 8 7	XD －0 8 9 7 7	X 2 8 9 0 0	c u G G c u A G G G A c A u c A u G A d T s d T	4 4 2	X 2 8 9 0 1	U c A U G A U G U C C C u A G C c A G d T s d T	5 6 1
2 6 8 9	XD －0 8 9 7 8	X 2 8 9 0 2	g g c u A G G G A c A u c a u G A A u d T s d T	4 4 3	X 2 8 9 0 3	A U U c A U G A U G U C C C u A G C C d T s d T	5 6 2
2 7 7 4	XD －0 8 9 7 9	X 2 8 9 0 4	u u u G A c u G u G u c u a c A c G G d T s d T	4 4 4	X 2 8 9 0 5	C C G U G u A G A c A c A G U c A A A d T s d T	5 6 3
2 7 7 6	XD －0 8 9 8 0	X 2 8 9 0 6	u g A c u G u G u c u A c a c G G u u d T s d T	4 4 5	X 2 8 9 0 7	A A C C G U G u A G A c A c A G U c A d T s d T	5 6 4
2 7 7 8	XD －0 8 9 8 1	X 2 8 9 0 8	a c u G u G u c u A c A c g G u u c A d T s d T	4 4 6	X 2 8 9 0 9	U G A A C C G U G u A G A c A c A G U d T s d T	5 6 5
2 7 8 1	XD －0 8 9 8 2	X 2 8 9 1 0	g u G u c u A c A c G G u u c A G A G d T s d T	4 4 7	X 2 8 9 1 1	C U C U G A A C C G U G u A G A c A C d T s d T	5 6 6
2 7 8 5	XD －0 8 9 8 3	X 2 8 9 1 2	c u A c A c G G u u c A G a G c G A c d T s d T	4 4 8	X 2 8 9 1 3	G U C G C U C U G A A C C G U G u A G d T s d T	5 6 7
2 7 8 8	XD －0 8 9 8 4	X 2 8 9 1 4	c a c G G u u c A G A G c g A c G u c d T s d T	4 4 9	X 2 8 9 1 5	G A C G U C G C U C U G A A C C G U G d T s d T	5 6 8
2 7 9 1	XD －0	X 2 8 9 1 6	g g u u c A G A G c G A c g	4 5 0	X 2 8 9 1 7	C c A G A C G U C G C U C U	5 6 9

10

20

30

40

【表 4 - 9】

	8 9 8 5		u c u G G d T s d T			G A A C C d T s d T	
2 7 9 3	XD - 0 8 9 8 6	X 2 8 9 1 8	u u c A G A G c G A c G u c u G G u c d T s d T	4 5 1	X 2 8 9 1 9	G A C c A G A C G U C G C U C U G A A d T s d T	5 7 0
2 8 4 3	XD - 0 8 9 8 7	X 2 8 9 2 0	c u u G G G c u G A A u c c c u A c c d T s d T	4 5 2	X 2 8 9 2 1	G G u A G G G A U U c A G C C c A A G d T s d T	5 7 1
2 8 7 4	XD - 0 8 9 8 8	X 2 8 9 2 2	u g A A c A G c A A G u u c u A u A A d T s d T	4 5 3	X 2 8 9 2 3	U u A u A G A A C U U G C U G U U c A d T s d T	5 7 2
2 8 8 0	XD - 0 8 9 8 9	X 2 8 9 2 4	g c A A G u u c u A u A A a c u G G u d T s d T	4 5 4	X 2 8 9 2 5	A C c A G U U u A u A G A A C U U G C d T s d T	5 7 3
2 9 4 0	XD - 0 8 9 9 0	X 2 8 9 2 6	a g A A u A u A u A c A G c A u c A u d T s d T	4 5 5	X 2 8 9 2 7	A U G A U G C U G u A u A u A U U C U d T s d T	5 7 4
3 0 4 7	XD - 0 8 9 9 1	X 2 8 9 2 8	a g A G A G c G G G A c u a u A c c A d T s d T	4 5 6	X 2 8 9 2 9	U G G u A u A G U C C C G C U C U C U d T s d T	5 7 5
3 0 4 8	XD - 0 8 9 9 2	X 2 8 9 3 0	g a G A G c G G G A c u A u A c c A A d T s d T	4 5 7	X 2 8 9 3 1	U U G G u A u A G U C C C G C U C U C d T s d T	5 7 6
3 0 4 9	XD - 0 8 9 9 3	X 2 8 9 3 2	a g A G c G G G A c u A u a c c A A u d T s d T	4 5 8	X 2 8 9 3 3	A U U G G u A u A G U C C C G C U C U d T s d T	5 7 7
3 0 5 2	XD - 0 8 9 9 4	X 2 8 9 3 4	g c G G G A c u A u A c c a A u c u G d T s d T	4 5 9	X 2 8 9 3 5	c A G A U U G G u A u A G U C C C G C d T s d T	5 7 8
3 0 5 5	XD - 0 8 9 9 5	X 2 8 9 3 6	g g A c u A u A c c A A u c u G c c G d T s d T	4 6 0	X 2 8 9 3 7	C G G c A G A U U G G u A u A G U C C d T s d T	5 7 9

10

20

30

40

【表 4 - 1 0】

3 1 4 9	XD - 0 8 9 9 6	X 2 8 9 3 8	u g c u G c G A G c A A G g G G A u A d T s d T	4 6 1	X 2 8 9 3 9	u A U C C C C U U G C U C G c A G c A d T s d T	5 8 0
3 1 5 3	XD - 0 8 9 9 7	X 2 8 9 4 0	g c G A G c A A G G G G A u A u c G c d T s d T	4 6 2	X 2 8 9 4 1	G C G A u A U C C C C U U G C U C G C d T s d T	5 8 1
3 1 5 4	XD - 0 8 9 9 8	X 2 8 9 4 2	c g A G c A A G G G G A u a u c G c c d T s d T	4 6 3	X 2 8 9 4 3	G G C G A u A U C C C C U U G C U C G d T s d T	5 8 2
3 1 6 4	XD - 0 8 9 9 9	X 2 8 9 4 4	g a u A u c G c c c A G c c c u u G c d T s d T	4 6 4	X 2 8 9 4 5	G c A A G G G C U G G G C G A u A U C d T s d T	5 8 3
3 1 8 6	XD - 0 9 0 0 0	X 2 8 9 4 6	a g c c c A A c A A c u A u c A G u u d T s d T	4 6 5	X 2 8 9 4 7	A A C U G A u A G U U G U U G G G C U d T s d T	5 8 4
3 1 8 7	XD - 0 9 0 0 1	X 2 8 9 4 8	g c c c A A c A A c u A u c A G u u c d T s d T	4 6 6	X 2 8 9 4 9	G A A C U G A u A G U U G U U G G G C d T s d T	5 8 5
3 1 8 8	XD - 0 9 0 0 2	X 2 8 9 5 0	c c c A A c A A c u A u c a G u u c u d T s d T	4 6 7	X 2 8 9 5 1	A G A A C U G A u A G U U G U U G G G d T s d T	5 8 6
3 2 9 2	XD - 0 9 0 0 3	X 2 8 9 5 2	a c A A A c u c u G c c u u c G G u c d T s d T	4 6 8	X 2 8 9 5 3	G A C C G A A G G c A G A G U U U G U d T s d T	5 8 7
3 2 9 8	XD - 0 9 0 0 4	X 2 8 9 5 4	u c u G c c u u c G G u c a u u u c A d T s d T	4 6 9	X 2 8 9 5 5	U G A A A U G A C C G A A G G c A G A d T s d T	5 8 8
3 3 0 1	XD - 0 9 0 0 5	X 2 8 9 5 6	g c c u u c G G u c A u u u c A c u c d T s d T	4 7 0	X 2 8 9 5 7	G A G U G A A A U G A C C G A A G G C d T s d T	5 8 9
3 3 0 5	XD - 0	X 2 8 9 5 8	u c G G u c A u u u c A c u	4 7 1	X 2 8 9 5 9	U G U U G A G U G A A A U G	5 9 0

10

20

30

40

【表 4 - 1 1】

	9 0 0 6		c A A c A d T s d T			A C C G A d T s d T	
3 4 5 7	XD - 0 9 0 0 7	X 2 8 9 6 0	c u c A u G G u G u u G G c c u c G u d T s d T	4 7 2	X 2 8 9 6 1	A C G A G G C c A A c A C c A U G A G d T s d T	5 9 1
3 4 5 8	XD - 0 9 0 0 8	X 2 8 9 6 2	u c A u G G u G u u G G c c u c G u G d T s d T	4 7 3	X 2 8 9 6 3	c A C G A G G C c A A c A C c A U G A d T s d T	5 9 2
3 4 5 9	XD - 0 9 0 0 9	X 2 8 9 6 4	c a u G G u G u u G G c c u c G u G u d T s d T	4 7 4	X 2 8 9 6 5	A c A C G A G G C c A A c A C c A U G d T s d T	5 9 3
3 4 6 2	XD - 0 9 0 1 0	X 2 8 9 6 6	g g u G u u G G c c u c G u G u u u G d T s d T	4 7 5	X 2 8 9 6 7	c A A A c A C G A G G C c A A c A C C d T s d T	5 9 4
3 4 7 3	XD - 0 9 0 1 1	X 2 8 9 6 8	c g u G u u u G c u A u G c c A A c u d T s d T	4 7 6	X 2 8 9 6 9	A G U U G G c A u A G c A A A c A C G d T s d T	5 9 5
3 8 0 8	XD - 0 9 0 1 2	X 2 8 9 7 0	a g c u A A A A G u u G G g G G u G u d T s d T	4 7 7	X 2 8 9 7 1	A c A C C C C c A A C U U U u A G C U d T s d T	5 9 6
3 9 1 1	XD - 0 9 0 1 3	X 2 8 9 7 2	c c A A G c u G A c u c A u c c u A A d T s d T	4 7 8	X 2 8 9 7 3	U u A G G A U G A G U c A G C U U G G d T s d T	5 9 7
3 9 1 4	XD - 0 9 0 1 4	X 2 8 9 7 4	a g c u G A c u c A u c c u A A c u A d T s d T	4 7 9	X 2 8 9 7 5	u A G U u A G G A U G A G U c A G C U d T s d T	5 9 8
3 9 1 6	XD - 0 9 0 1 5	X 2 8 9 7 6	c u G A c u c A u c c u A a c u A A c d T s d T	4 8 0	X 2 8 9 7 7	G U u A G U u A G G A U G A G U c A G d T s d T	5 9 9
3 9 1 7	XD - 0 9 0 1 6	X 2 8 9 7 8	u g A c u c A u c c u A A c u A A c A d T s d T	4 8 1	X 2 8 9 7 9	U G U u A G U u A G G A U G A G U c A d T s d T	6 0 0

10

20

30

40

【表 4 - 1 2】

3 9 1 8	XD - 0 9 0 1 7	X 2 8 9 8 0	g a c u c A u c c u A A c u A A c A G d T s d T	4 8 2	X 2 8 9 8 1	C U G U u A G U u A G G A U G A G U C d T s d T	6 0 1
3 9 2 4	XD - 0 9 0 1 8	X 2 8 9 8 2	u c c u A A c u A A c A G u c A c G c d T s d T	4 8 3	X 2 8 9 8 3	G C G U G A C U G U u A G U u A G G A d T s d T	6 0 2
3 9 2 5	XD - 0 9 0 1 9	X 2 8 9 8 4	c c u A A c u A A c A G u c A c G c c d T s d T	4 8 4	X 2 8 9 8 5	G G C G U G A C U G U u A G U u A G G d T s d T	6 0 3
3 9 5 8	XD - 0 9 0 2 0	X 2 8 9 8 6	u c c A c A u u A A A c u a A c A G c d T s d T	4 8 5	X 2 8 9 8 7	G C U G U u A G U U u A A U G U G G A d T s d T	6 0 4
3 9 5 9	XD - 0 9 0 2 1	X 2 8 9 8 8	c c A c A u u A A A c u A a c A G c A d T s d T	4 8 6	X 2 8 9 8 9	U G C U G U u A G U U u A A U G U G G d T s d T	6 0 5

10

20

【0 1 9 8】

いくつかの実施形態では、CCR2にハイブリダイズするsiRNA分子は、配列番号606～743の核酸配列からなる群から選択される修飾センス核酸配列、及び配列番号744～881の核酸配列からなる群から選択される修飾アンチセンス核酸配列を含み得る（表5）。センス及びアンチセンス二本鎖の識別子は、表5の最初の列に示されている。他の実施形態では、マクロファージにおけるCCR2 mRNAの有意な低減をもたらす修飾siRNA分子は、1つ以上のバリエーションを生成するようにさらに修飾され得る。非限定的な例として、CCR2にハイブリダイズするsiRNA分子に由来するいくつかのバリエーションは、配列番号961～1001の核酸配列からなる群から選択される修飾センス核酸配列、及び配列番号1002～1042の核酸配列からなる群から選択される修飾アンチセンス核酸配列を含み得る。これらの修飾は、siRNA分子の効率、特異性及び安定性を高めることができる。

30

【表 5 - 1】

表5：CCR2に特異的なsiRNAの修飾センス及びアンチセンス配列

二本鎖 ID	SS ID	センス配列 (5' ～ 3')	配 列 番 号	AS I D	アンチセンス配列 (5' ～ 3')	配 列 番 号
XD - 0 9 0 2 7	X 2 9 0 1 2	c a A G G A c G c A u u u c c c c A G d T s d T	6 0 6	X 2 9 0 1 3	C U G G G G A A A U G C G U C C U U G d T s d T	7 4 4

40

【表 5 - 2】

XD - 090 28	X2 90 14	a a G G A c G c A u u u c c c c A G u d T s d T	6 0 7	X2 90 15	ACUGGGGAA AUGCGUCCU U d T s d T	7 4 5
XD - 090 29	X2 90 16	g g A c G c A u u u c c c c A G u A c d T s d T	6 0 8	X2 90 17	G u A C U G G G G A A A U G C G U C C d T s d T	7 4 6
XD - 090 30	X2 90 18	g a c G c A u u u c c c c a G u A c A d T s d T	6 0 9	X2 90 19	U G u A C U G G G G A A A U G C G U C d T s d T	7 4 7
XD - 090 31	X2 90 20	a c G c A u u u c c c c A g u A c A u d T s d T	6 1 0	X2 90 21	A U G u A C U G G G G A A A U G C G U d T s d T	7 4 8
XD - 090 32	X2 90 22	c g c A u u u c c c c A G u A c A u c d T s d T	6 1 1	X2 90 23	G A U G u A C U G G G G A A A U G C G d T s d T	7 4 9
XD - 090 33	X2 90 24	c a u u u c c c c A G u A c A u c c A d T s d T	6 1 2	X2 90 25	U G G A U G u A C U G G G G A A A U G d T s d T	7 5 0
XD - 090 34	X2 90 26	a u u u c c c c A G u A c a u c c A c d T s d T	6 1 3	X2 90 27	G U G G A U G u A C U G G G G A A A U d T s d T	7 5 1
XD - 090 35	X2 90 28	u u u c c c c A G u A c A u c c A c A d T s d T	6 1 4	X2 90 29	U G U G G A U G u A C U G G G G A A A d T s d T	7 5 2
XD - 090 36	X2 90 30	u c c c c A G u A c A u c c A c A A c d T s d T	6 1 5	X2 90 31	G U U G U G G A U G u A C U G G G G A d T s d T	7 5 3
XD - 090 37	X2 90 32	c a G u A c A u c c A c A a c A u G c d T s d T	6 1 6	X2 90 33	G c A U G U U G U G G A U G u A C U G d T s d T	7 5 4
XD - 090 38	X2 90 34	g u A c A u c c A c A A c a u G c u G d T s d T	6 1 7	X2 90 35	c A G c A U G U U G U G G A U G u A C d T s d T	7 5 5
XD - 090 39	X2 90 36	a c A u c c A c A A c A u g c u G u c d T s d T	6 1 8	X2 90 37	G A c A G c A U G U U G U G G A U G U d T s d T	7 5 6
XD - 090 40	X2 90 38	a u G c u G u c c A c A u c u c G u u d T s d T	6 1 9	X2 90 39	A A C G A G A U G U G G A c A G c A U d T s d T	7 5 7
XD - 090 41	X2 90 40	u g c u G u c c A c A u c u c G u u c d T s d T	6 2 0	X2 90 41	G A A C G A G A U G U G G A c A G c A d T s d T	7 5 8

10

20

30

40

【表 5 - 3】

XD - 090 42	X2 90 42	g c u G u c c A c A u c u c G u u c u d T s d T	6 2 1	X2 90 43	AGAACGAGA UGUGGA c AG C d T s d T	7 5 9
XD - 090 43	X2 90 44	c u G u c c A c A u c u c g u u c u c d T s d T	6 2 2	X2 90 45	GAGAACGAG AUGUGGA c A G d T s d T	7 6 0
XD - 090 44	X2 90 46	g u c c A c A u c u c G u u c u c G G d T s d T	6 2 3	X2 90 47	CCGAGAACG AGAUGUGGA C d T s d T	7 6 1
XD - 090 45	X2 90 48	u c c A c A u c u c G u u c u c G G u d T s d T	6 2 4	X2 90 49	ACCGAGAAC GAGAUGUGG A d T s d T	7 6 2
XD - 090 46	X2 90 50	c c A c A u c u c G u u c u c G G u u d T s d T	6 2 5	X2 90 51	AACCGAGAA CGAGAUGUG G d T s d T	7 6 3
XD - 090 47	X2 90 52	c a c A u c u c G u u c u c G G u u u d T s d T	6 2 6	X2 90 53	AAACCGAGA ACGAGAUGU G d T s d T	7 6 4
XD - 090 48	X2 90 54	a c A u c u c G u u c u c g G u u u A d T s d T	6 2 7	X2 90 55	uAAACCGAG AACGAGAUG U d T s d T	7 6 5
XD - 090 49	X2 90 56	c a u c u c G u u c u c G g u u u A u d T s d T	6 2 8	X2 90 57	AuAAACCGA GAACGAGAU G d T s d T	7 6 6
XD - 090 50	X2 90 58	u c u c G u u c u c G G u u u A u c A d T s d T	6 2 9	X2 90 59	UGAuAAACC GAGAACGAG A d T s d T	7 6 7
XD - 090 51	X2 90 60	c u c G u u c u c G G u u u A u c A G d T s d T	6 3 0	X2 90 61	CUGAuAAAC CGAGAACGA G d T s d T	7 6 8
XD - 090 52	X2 90 62	u c G u u c u c G G u u u a u c A G A d T s d T	6 3 1	X2 90 63	UCUGAuAAA CCGAGAACG A d T s d T	7 6 9
XD - 090 53	X2 90 64	c g u u c u c G G u u u A u c A G A A d T s d T	6 3 2	X2 90 65	UUCUGAuAA ACCGAGAAC G d T s d T	7 7 0
XD - 090 54	X2 90 66	u u c u c G G u u u A u c a G A A A u d T s d T	6 3 3	X2 90 67	AUUUCUGAu AAACCGAGA A d T s d T	7 7 1
XD - 090 55	X2 90 68	u c u c G G u u u A u c A g A A A u A d T s d T	6 3 4	X2 90 69	uAUUUCUGA uAAACCGAG A d T s d T	7 7 2

10

20

30

40

【表 5 - 4】

XD - 090 56	X2 90 70	c u c G G u u u A u c A G a A A u A c d T s d T	6 3 5	X2 90 71	G u A U U U C U G A u A A A C C G A G d T s d T	7 7 3
XD - 090 57	X2 90 72	u c G G u u u A u c A G A a A u A c c d T s d T	6 3 6	X2 90 73	G G u A U U U C U G A u A A A C C G A d T s d T	7 7 4
XD - 090 58	X2 90 74	u u u A u c A G A A A u A c c A A c G d T s d T	6 3 7	X2 90 75	C G U U G G u A U U U C U G A u A A A d T s d T	7 7 5
XD - 090 59	X2 90 76	a g A G c G G u G A A G A a G u c A c d T s d T	6 3 8	X2 90 77	G U G A C U U C U U c A C C G C U C U d T s d T	7 7 6
XD - 090 60	X2 90 78	c g G u G A A G A A G u c a c c A c c d T s d T	6 3 9	X2 90 79	G G U G G U G A C U U C U U c A C C G d T s d T	7 7 7
XD - 090 61	X2 90 80	a a G u c A c c A c c u u u u u u G A d T s d T	6 4 0	X2 90 81	U c A A A A A A G G U G G U G A C U U d T s d T	7 7 8
XD - 090 62	X2 90 82	u c A c c A c c u u u u u u G A u u A d T s d T	6 4 1	X2 90 83	u A A U c A A A A A A G G U G G U G A d T s d T	7 7 9
XD - 090 63	X2 90 84	c a c c A c c u u u u u u g A u u A u d T s d T	6 4 2	X2 90 85	A u A A U c A A A A A A G G U G G U G d T s d T	7 8 0
XD - 090 64	X2 90 86	a c c A c c u u u u u u G a u u A u G d T s d T	6 4 3	X2 90 87	c A u A A U c A A A A A A G G U G G U d T s d T	7 8 1
XD - 090 65	X2 90 88	u u u u G A u u A u G A u u A c G G u d T s d T	6 4 4	X2 90 89	A C C G u A A U c A u A A U c A A A A d T s d T	7 8 2
XD - 090 66	X2 90 90	u g A u u A u G A u u A c g G u G c u d T s d T	6 4 5	X2 90 91	A G c A C C G u A A U c A u A A U c A d T s d T	7 8 3
XD - 090 67	X2 90 92	u u A u G A u u A c G G u g c u c c c d T s d T	6 4 6	X2 90 93	G G G A G c A C C G u A A U c A u A A d T s d T	7 8 4
XD - 090 68	X2 90 94	u a u G A u u A c G G u G c u c c c u d T s d T	6 4 7	X2 90 95	A G G G A G c A C C G u A A U c A u A d T s d T	7 8 5
XD - 090 69	X2 90 96	u g A u u A c G G u G c u c c c u G u d T s d T	6 4 8	X2 90 97	A c A G G G A G c A C C G u A A U c A d T s d T	7 8 6

10

20

30

40

【表 5 - 5】

XD - 090 70	X2 90 98	g a u u A c G G u G c u c c c u G u c d T s d T	6 4 9	X2 90 99	G A c A G G G A G c A C C G u A A U C d T s d T	7 8 7
XD - 090 71	X2 91 00	a u u A c G G u G c u c c c u G u c A d T s d T	6 5 0	X2 91 01	U G A c A G G G A G c A C C G u A A U d T s d T	7 8 8
XD - 090 72	X2 91 02	u u A c G G u G c u c c c u G u c A u d T s d T	6 5 1	X2 91 03	A U G A c A G G G A G c A C C G u A A d T s d T	7 8 9
XD - 090 73	X2 91 04	a c G G u G c u c c c u G u c A u A A d T s d T	6 5 2	X2 91 05	U u A U G A c A G G G A G c A C C G U d T s d T	7 9 0
XD - 090 74	X2 91 06	g u G c u c c c u G u c A u A A A u u d T s d T	6 5 3	X2 91 07	A A U U u A U G A c A G G G A G c A C d T s d T	7 9 1
XD - 090 75	X2 91 08	u g c u c c c u G u c A u a A A u u u d T s d T	6 5 4	X2 91 09	A A A U U u A U G A c A G G G A G c A d T s d T	7 9 2
XD - 090 76	X2 91 10	c u c c c u G u c A u A A a u u u G A d T s d T	6 5 5	X2 91 11	U c A A A U U u A U G A c A G G G A G d T s d T	7 9 3
XD - 090 77	X2 91 12	c c u G u c A u A A A u u u G A c G u d T s d T	6 5 6	X2 91 13	A C G U c A A A U U u A U G A c A G G d T s d T	7 9 4
XD - 090 78	X2 91 14	u g u c A u A A A u u u G a c G u G A d T s d T	6 5 7	X2 91 15	U c A C G U c A A A U U u A U G A c A d T s d T	7 9 5
XD - 090 79	X2 91 16	g u c A u A A A u u u G A c G u G A A d T s d T	6 5 8	X2 91 17	U U c A C G U c A A A U U u A U G A C d T s d T	7 9 6
XD - 090 80	X2 91 18	u c A u A A A u u u G A c g u G A A G d T s d T	6 5 9	X2 91 19	C U U c A C G U c A A A U U u A U G A d T s d T	7 9 7
XD - 090 81	X2 91 20	a u A A A u u u G A c G u g A A G c A d T s d T	6 6 0	X2 91 21	U G C U U c A C G U c A A A U U u A U d T s d T	7 9 8
XD - 090 82	X2 91 22	a a u u u G A c G u G A A g c A A A u d T s d T	6 6 1	X2 91 23	A U U U G C U U c A C G U c A A A U U d T s d T	7 9 9
XD - 090 83	X2 91 24	a u u u G A c G u G A A G c A A A u u d T s d T	6 6 2	X2 91 25	A A U U U G C U U c A C G U c A A A U d T s d T	8 0 0

10

20

30

40

【表 5 - 6】

XD - 090 84	X2 91 26	u u u G A c G u G A A G c a A A u u G d T s d T	6 6 3	X2 91 27	c A A U U U G C U U c A C G U c A A A d T s d T	8 0 1
XD - 090 85	X2 91 28	u u G A c G u G A A G c A a A u u G G d T s d T	6 6 4	X2 91 29	C c A A U U U G C U U c A C G U c A A d T s d T	8 0 2
XD - 090 86	X2 91 30	u g A c G u G A A G c A A a u u G G G d T s d T	6 6 5	X2 91 31	C C c A A U U U G C U U c A C G U c A d T s d T	8 0 3
XD - 090 87	X2 91 32	g a c G u G A A G c A A A u u G G G G d T s d T	6 6 6	X2 91 33	C C C c A A U U U G C U U c A C G U C d T s d T	8 0 4
XD - 090 88	X2 91 34	a c G u G A A G c A A A u u G G G G c d T s d T	6 6 7	X2 91 35	G C C C c A A U U U G C U U c A C G U d T s d T	8 0 5
XD - 090 89	X2 91 36	c g u G A A G c A A A u u g G G G c c d T s d T	6 6 8	X2 91 37	G G C C C c A A U U U G C U U c A C G d T s d T	8 0 6
XD - 090 90	X2 91 38	g a A G c A A A u u G G G g c c c A A d T s d T	6 6 9	X2 91 39	U U G G G C C C c A A U U U G C U U C d T s d T	8 0 7
XD - 090 91	X2 91 40	a a G c A A A u u G G G G c c c A A c d T s d T	6 7 0	X2 91 41	G U U G G G C C C c A A U U U G C U U d T s d T	8 0 8
XD - 090 92	X2 91 42	a g c A A A u u G G G G c c c A A c u d T s d T	6 7 1	X2 91 43	A G U U G G G C C C c A A U U U G C U d T s d T	8 0 9
XD - 090 93	X2 91 44	g c A A A u u G G G G c c c A A c u c d T s d T	6 7 2	X2 91 45	G A G U U G G G C C C c A A U U U G C d T s d T	8 1 0
XD - 090 94	X2 91 46	u g c A A A A A G c u G A a G u G c u d T s d T	6 7 3	X2 91 47	A G c A C U U c A G C U U U U G c A d T s d T	8 1 1
XD - 090 95	X2 91 48	a a A G c u G A A G u G c u u G A c u d T s d T	6 7 4	X2 91 49	A G U c A A G c A C U U c A G C U U U d T s d T	8 1 2
XD - 090 96	X2 91 50	u g c u u G A c u G A c A u u u A c c d T s d T	6 7 5	X2 91 51	G G u A A A U G U c A G U c A A G c A d T s d T	8 1 3
XD - 090 97	X2 91 52	c u u G A c u G A c A u u u A c c u G d T s d T	6 7 6	X2 91 53	c A G G u A A A U G U c A G U c A A G d T s d T	8 1 4

10

20

30

40

【表 5 - 7】

XD - 090 98	X2 91 54	u g c u u u u u c u u A u u A c u c u d T s d T	6 7 7	X2 91 55	AGAGuAAuA AGAAAAAGc AdTs dT	8 1 5
XD - 090 99	X2 91 56	u u c u u A u u A c u c u c c c A u u d T s d T	6 7 8	X2 91 57	AAUGGGAGA GuAAuAAGA AdTs dT	8 1 6
XD - 091 00	X2 91 58	c u c c c A u u G u G G G c u c A c u d T s d T	6 7 9	X2 91 59	AGUGAGCCc AcAAUGGGA GdTs dT	8 1 7
XD - 091 01	X2 91 60	c c c A u u G u G G G c u c A c u c u d T s d T	6 8 0	X2 91 61	AGAGUGAGC CcAcAAUGG GdTs dT	8 1 8
XD - 091 02	X2 91 62	c a c u c u G c u G c A A a u G A G u d T s d T	6 8 1	X2 91 63	ACUcAUUUG cAGcAGAGU GdTs dT	8 1 9
XD - 091 03	X2 91 64	a c u c u G c u G c A A A u G A G u G d T s d T	6 8 2	X2 91 65	cACUcAUUU GcAGcAGAG UdTs dT	8 2 0
XD - 091 04	X2 91 66	a g u G G G u c u u u G G g A A u G c d T s d T	6 8 3	X2 91 67	GcAUUCCcA AAGACCcAC UdTs dT	8 2 1
XD - 091 05	X2 91 68	g u G G G u c u u u G G G a A u G c A d T s d T	6 8 4	X2 91 69	UGcAUUCCc AAAGACCcA CdTs dT	8 2 2
XD - 091 06	X2 91 70	g g G u c u u u G G G A A u G c A A u d T s d T	6 8 5	X2 91 71	AUUGcAUUC CcAAAGACC CdTs dT	8 2 3
XD - 091 07	X2 91 72	u u G G G A A u G c A A u g u G c A A d T s d T	6 8 6	X2 91 73	UUGcAcAUU GcAUUCCcA AdTs dT	8 2 4
XD - 091 08	X2 91 74	g u G c A A A u u A u u c a c A G G G d T s d T	6 8 7	X2 91 75	CCCUGUGAA uAAUUUGcA CdTs dT	8 2 5
XD - 091 09	X2 91 76	c a c A G G G c u G u A u c A c A u c d T s d T	6 8 8	X2 91 77	GAUGUGAuA cAGCCCUGU GdTs dT	8 2 6
XD - 091 10	X2 91 78	a c A G G G c u G u A u c a c A u c G d T s d T	6 8 9	X2 91 79	CGAUGUGAu AcAGCCCUG UdTs dT	8 2 7
XD - 091 11	X2 91 80	c a G G G c u G u A u c A c A u c G G d T s d T	6 9 0	X2 91 81	CCGAUGUGA uAcAGCCCU GdTs dT	8 2 8

10

20

30

40

【表 5 - 8】

XD - 091 12	X2 91 82	a g G G c u G u A u c A c a u c G G u d T s d T	6 9 1	X2 91 83	A C C G A U G U G A u A c A G C C C U d T s d T	8 2 9
XD - 091 13	X2 91 84	g g c u G u A u c A c A u c G G u u A d T s d T	6 9 2	X2 91 85	u A A C C G A U G U G A u A c A G C C d T s d T	8 3 0
XD - 091 14	X2 91 86	g c u G u A u c A c A u c g G u u A u d T s d T	6 9 3	X2 91 87	A u A A C C G A U G U G A u A c A G C d T s d T	8 3 1
XD - 091 15	X2 91 88	c u G u A u c A c A u c G g u u A u u d T s d T	6 9 4	X2 91 89	A A u A A C C G A U G U G A u A c A G d T s d T	8 3 2
XD - 091 16	X2 91 90	u g u A u c A c A u c G G u u A u u u d T s d T	6 9 5	X2 91 91	A A A u A A C C G A U G U G A u A c A d T s d T	8 3 3
XD - 091 17	X2 91 92	g u A u c A c A u c G G u u A u u u u d T s d T	6 9 6	X2 91 93	A A A A u A A C C G A U G U G A u A C d T s d T	8 3 4
XD - 091 18	X2 91 94	u a u c A c A u c G G u u a u u u u G d T s d T	6 9 7	X2 91 95	c A A A A u A A C C G A U G U G A u A d T s d T	8 3 5
XD - 091 19	X2 91 96	u c A c A u c G G u u A u u u u G G c d T s d T	6 9 8	X2 91 97	G C c A A A A u A A C C G A U G U G A d T s d T	8 3 6
XD - 091 20	X2 91 98	a c A u c G G u u A u u u u G G c G G d T s d T	6 9 9	X2 91 99	C C G C c A A A A u A A C C G A U G U d T s d T	8 3 7
XD - 091 21	X2 92 00	c a u c G G u u A u u u u g G c G G A d T s d T	7 0 0	X2 92 01	U C C G C c A A A A u A A C C G A U G d T s d T	8 3 8
XD - 091 22	X2 92 02	a u c G G u u A u u u u G g c G G A A d T s d T	7 0 1	X2 92 03	U U C C G C c A A A A u A A C C G A U d T s d T	8 3 9
XD - 091 23	X2 92 04	u c G G u u A u u u u G G c G G A A u d T s d T	7 0 2	X2 92 05	A U U C C G C c A A A A u A A C C G A d T s d T	8 4 0
XD - 091 24	X2 92 06	c g G u u A u u u u G G c g G A A u c d T s d T	7 0 3	X2 92 07	G A U U C C G C c A A A A u A A C C G d T s d T	8 4 1
XD - 091 25	X2 92 08	g u u A u u u u G G c G G a A u c u u d T s d T	7 0 4	X2 92 09	A A G A U U C C G C c A A A A u A A C d T s d T	8 4 2

10

20

30

40

【表 5 - 9】

XD- 091 26	X2 92 10	uuAuuuuG GcGGAauc uucdTsdT	7 0 5	X2 92 11	GAAGAUUCC GCcAAAAuA AdTs dT	8 4 3
XD- 091 27	X2 92 12	uaauuuuGG cGGAaucu ucudTs dT	7 0 6	X2 92 13	AGAAGAUUC CGC cAAAAu AdTs dT	8 4 4
XD- 091 28	X2 92 14	auuuuuGGc GGAaucuu cuudTs dT	7 0 7	X2 92 15	AAGAAGAUU CCGC cAAAA UdTs dT	8 4 5
XD- 091 29	X2 92 16	uuuuGGcG GAAucuu c uucdTsdT	7 0 8	X2 92 17	GAAGAAGAU UCCGC cAAA AdTs dT	8 4 6
XD- 091 30	X2 92 18	uuuGGcGG AAucuu c ucAdTs dT	7 0 9	X2 92 19	UGAAGAAGA UCCGC cAA AdTs dT	8 4 7
XD- 091 31	X2 92 20	aaGuGuGA ucAccuGG uuGdTsdT	7 1 0	X2 92 21	cAACcAGGU GAUcAcACU UdTs dT	8 4 8
XD- 091 32	X2 92 22	uguGAucA ccuGGuuG GuGdTsdT	7 1 1	X2 92 23	cACcAACcA GGUGAUcAc AdTs dT	8 4 9
XD- 091 33	X2 92 24	guGAucAc cuGGuuGG uGGdTsdT	7 1 2	X2 92 25	CcACcAACc AGGUGAUcA CdTs dT	8 5 0
XD- 091 34	X2 92 26	ugAucAcc uGGuu gGu GGcdTs dT	7 1 3	X2 92 27	GCcACcAAC cAGGUGAUc AdTs dT	8 5 1
XD- 091 35	X2 92 28	ucAccuGG uuGGu gGc uGudTs dT	7 1 4	X2 92 29	AcAGCcACc AACcAGGUG AdTs dT	8 5 2
XD- 091 36	X2 92 30	caccuGGu uGGuG gcu GuGdTsdT	7 1 5	X2 92 31	cAcAGCcAC cAACcAGGU GdTsdT	8 5 3
XD- 091 37	X2 92 32	agGAAucA ucuuuacu AAAdTs dT	7 1 6	X2 92 33	UUuAGuAAA GAUGAUUCC UdTs dT	8 5 4
XD- 091 38	X2 92 34	ucAucuuu AcuAAauG ccAdTs dT	7 1 7	X2 92 35	UGGcAUUuA GuAAAGAUG AdTs dT	8 5 5
XD- 091 39	X2 92 36	gaAGAuuc uGuuuauG ucudTs dT	7 1 8	X2 92 37	AGAcAuAAA cAGAAUCUU CdTs dT	8 5 6

10

20

30

40

【表 5 - 1 0】

XD - 0 9 1 4 0	X 2 9 2 3 8	c u G u G G c c c u u A u u u u c c A d T s d T	7 1 9	X 2 9 2 3 9	U G G A A A A u A A G G G C c A c A G d T s d T	8 5 7
XD - 0 9 1 4 1	X 2 9 2 4 0	u g G c c c u u A u u u u c c A c G A d T s d T	7 2 0	X 2 9 2 4 1	U C G U G G A A A A u A A G G G C c A d T s d T	8 5 8
XD - 0 9 1 4 2	X 2 9 2 4 2	g g c c c u u A u u u u c c A c G A G d T s d T	7 2 1	X 2 9 2 4 3	C U C G U G G A A A A u A A G G G C C d T s d T	8 5 9
XD - 0 9 1 4 3	X 2 9 2 4 4	g c c c u u A u u u u c c a c G A G G d T s d T	7 2 2	X 2 9 2 4 5	C C U C G U G G A A A A u A A G G G C d T s d T	8 6 0
XD - 0 9 1 4 4	X 2 9 2 4 6	c u u A u u u u c c A c G a G G A u G d T s d T	7 2 3	X 2 9 2 4 7	c A U C C U C G U G G A A A A u A A G d T s d T	8 6 1
XD - 0 9 1 4 5	X 2 9 2 4 8	u u A u u u u c c A c G A g G A u G G d T s d T	7 2 4	X 2 9 2 4 9	C c A U C C U C G U G G A A A A u A A d T s d T	8 6 2
XD - 0 9 1 4 6	X 2 9 2 5 0	u a u u u u c c A c G A G g A u G G A d T s d T	7 2 5	X 2 9 2 5 1	U C c A U C C U C G U G G A A A A u A d T s d T	8 6 3
XD - 0 9 1 4 7	X 2 9 2 5 2	u u u c c A c G A G G A u g G A A u A d T s d T	7 2 6	X 2 9 2 5 3	u A U U C c A U C C U C G U G G A A A d T s d T	8 6 4
XD - 0 9 1 4 8	X 2 9 2 5 4	u u c c A c G A G G A u G g A A u A A d T s d T	7 2 7	X 2 9 2 5 5	U u A U U C c A U C C U C G U G G A A d T s d T	8 6 5
XD - 0 9 1 4 9	X 2 9 2 5 6	u c c A c G A G G A u G G a A u A A u d T s d T	7 2 8	X 2 9 2 5 7	A U u A U U C c A U C C U C G U G G A d T s d T	8 6 6
XD - 0 9 1 5 0	X 2 9 2 5 8	c a c G A G G A u G G A A u A A u u u d T s d T	7 2 9	X 2 9 2 5 9	A A A U u A U U C c A U C C U C G U G d T s d T	8 6 7
XD - 0 9 1 5 1	X 2 9 2 6 0	a a u u u c c A c A c A A u A A u G A d T s d T	7 3 0	X 2 9 2 6 1	U c A U u A U U G U G U G G A A A U U d T s d T	8 6 8
XD - 0 9 1 5 2	X 2 9 2 6 2	u u u c c A c A c A A u A a u G A G G d T s d T	7 3 1	X 2 9 2 6 3	C C U c A U u A U U G U G U G G A A A d T s d T	8 6 9
XD - 0 9 1 5 3	X 2 9 2 6 4	c a c A c A A u A A u G A g G A A c A d T s d T	7 3 2	X 2 9 2 6 5	U G U U C C U c A U u A U U G U G U G d T s d T	8 7 0

10

20

30

40

【表 5 - 1 1】

XD-	X2	u a A u G A G G	7	X2	C C c A A A A U G	8
0 9 1	9 2	A A c A u u u u	3	9 2	U U C C U c A U u	7
5 4	6 6	G G G d T s d T	3	6 7	A d T s d T	1
XD-	X2	a a c A u u u u	7	X2	G G A C c A G C C	8
0 9 1	9 2	G G G G c u G G	3	9 2	C c A A A A U G U	7
5 5	6 8	u c c d T s d T	4	6 9	U d T s d T	2
XD-	X2	g c c G c u G c	7	X2	G A C c A U G A U	8
0 9 1	9 2	u c A u c a u G	3	9 2	G A G c A G C G G	7
5 6	7 0	G u c d T s d T	5	7 1	C d T s d T	3
XD-	X2	a a u u c u u c	7	X2	U u A C U c A G G	8
0 9 1	9 2	G G c c u g A G	3	9 2	C C G A A G A A U	7
5 7	7 2	u A A d T s d T	6	7 3	U d T s d T	4
XD-	X2	a u u c u u c G	7	X2	G U u A C U c A G	8
0 9 1	9 2	G c c u G a G u	3	9 2	G C C G A A G A A	7
5 8	7 4	A A c d T s d T	7	7 5	U d T s d T	5
XD-	X2	u u c u u c G G	7	X2	A G U u A C U c A	8
0 9 1	9 2	c c u G A g u A	3	9 2	G G C C G A A G A	7
5 9	7 6	A c u d T s d T	8	7 7	A d T s d T	6
XD-	X2	u u c G G c c u	7	X2	c A c A G U u A C	8
0 9 1	9 2	G A G u A a c u	3	9 2	U c A G G C C G A	7
6 0	7 8	G u G d T s d T	9	7 9	A d T s d T	7
XD-	X2	u g A G u A A c	7	X2	G U G C U U U c A	8
0 9 1	9 2	u G u G A a A G	4	9 2	c A G U u A C U c	7
6 1	8 0	c A c d T s d T	0	8 1	A d T s d T	8
XD-	X2	c a c c A G u c	7	X2	U U G G U C c A G	8
0 9 1	9 2	A A c u G g A c	4	9 2	U U G A C U G G U	7
6 2	8 2	c A A d T s d T	1	8 3	G d T s d T	9
XD-	X2	c a A c u G G A	7	X2	G C G U G G C U U	8
0 9 1	9 2	c c A A G c c A	4	9 2	G G U C c A G U U	8
6 3	8 4	c G c d T s d T	2	8 5	G d T s d T	0
XD-	X2	a a c u G G A c	7	X2	U G C G U G G C U	8
0 9 1	9 2	c A A G c c A c	4	9 2	U G G U C c A G U	8
6 4	8 6	G c A d T s d T	3	8 7	U d T s d T	1

【0 1 9 9】

C C R 2 及び C S F 1 R の他のアンタゴニスト

いくつかの実施形態では、C C R 2 及び C S F 1 R のアンタゴニストは、阻害性オリゴヌクレオチド、C C R 2 及び C S F 1 R の抗体アンタゴニスト、低分子、ペプチドアンタゴニスト、ならびに C C R 2、C S F 1 R、または C C R 及び C S F 1 R の両方のそれらの組み合わせであり得る。

【0 2 0 0】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、抗原によって誘発される特異的アミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子を指し、例えば、C C R 2 または C S F 1 R であり、抗原と特異的に反応することの特徴とする。「抗体」という用語は、親抗体分子の免疫結合特性を呈する、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、C D R 移植抗体、ハイブリッド抗体、V H H 抗体、改変抗体、F (a b) 2 断片、F (a b) 分子、F a b ’

断片、Fv断片、単ドメイン抗体、ScFvs、キメラ抗体、ヒト化抗体、ナノボディ、ダイアボディ、タンデム抗体、ならびにその機能性断片を包含する。

【0201】

いくつかの実施形態では、CCR2アンタゴニスト抗体は、米国特許第6,696,550号及び第6,084,075号のヒト化CCR2抗体、米国特許第9,315,579号及び第9,238,691号のヒト抗体、米国特許公開第2009/0297502号の抗体、PCT公開第WO2016/08180号及び第WO2010/021697号の抗CCR2抗体であり得る。CCR2に結合する抗体またはその機能的断片には、例えば、米国公開第2002/0042370号、第2004/0132980号、第2004/0126851号、第2005/0048052号、第2008/0241923号、第2009/0191192号、第2011/0274696号、第2013/0344070号、及び第2015/0086546号、PCT公開第WO2005/060368号及び第WO2007/147026号に記載されるような、抗CCR2抗体及びその断片も含まれ得る。

10

【0202】

一実施形態では、CCR2のアンタゴニストは、そのリガンドの結合を遮断し、かつ受容体の活性化を阻害する遮断ペプチドなどのアンタゴニストペプチドであり、例えば、米国特許第9,434,766号に開示されているLGTFCLKC（配列番号882）からなるCCR非競合アンタゴニストペプチドである。

【0203】

他の実施形態では、CCR2アンタゴニストは、修飾ケモカインリガンド、例えば、修飾MCP-1ケモカイン及び修飾MCP-5ケモカインであり得る。

20

【0204】

CCR2のアンタゴニストはまた、CCR2の小分子アンタゴニストのある範囲を含むことができ、これらに限定されないが、化合物、例えば、米国特許第8,546,408号、第8,575,173号、及び第9,394,307号、米国特許公開第2010/0056509号及び第2011/0118248号、PCT公開第WO2004/069809号、第WO2005/118578号、第WO2006/012135号、第WO2007/130712号、第WO2007/014008号、第WO2008/008374号、第WO2008/109238号、第WO2008/008375号、第WO2010/008761号、第WO2011/156554号、第WO2011/159854号、第WO2011/042399号、第WO2012/125661号、第WO2012/125662号、第WO2012/125663号、第WO2013/111129号、第WO2013/152269号、第WO2014/014901号、及び第WO2016/187393号に記載されるものを含む。

30

【0205】

いくつかの実施形態では、CSF1Rのアンタゴニストは、抗体ならびにその機能的断片及びバリエーション、オリゴヌクレオチド及びアプタマーなどの他の阻害性核酸分子、小分子、ならびにCSF1R細胞外ドメイン（ECD）融合分子などの競合リガンドであり得る。

40

【0206】

いくつかの実施形態では、CSF1Rアンタゴニスト抗体には、これらに限定されないが、米国特許第8,747,845号及び第9,200,075号の抗CSF1R抗体、PCT公開第WO2011/140294号、第WO2016/168149号、及び第WO2016/106180号のCSF1Rと結合する抗体、米国特許公開第2017/0081415号及び第2017/0152320号の抗CSF1R抗体が含まれ得る。

【0207】

CSF1R阻害剤には、これらに限定されないが、GW2580、KI20227、HY-13075、cFMS受容体阻害剤II、cFMS受容体阻害剤III、cFMS受容体阻害剤IV、またはARRY-382などのCSF1R阻害剤が含まれ得る（例えば

50

、米国特許公開第2016/0032248号)。CSF1R阻害剤はまた、米国特許第8,648,086号及び第9,452,167号で議論されている化合物を含み得、阻害剤はPCT公開第WO2009/075344号でスクリーニングされている。

【0208】

いくつかの実施形態では、CSF1Rアンタゴニストは、米国特許第8,080,246号に記載されているようなCSF1R ECD-Fc融合タンパク質であり得る。

【0209】

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるsiRNA分子は、CCR2及びCSF1Rの他のアンタゴニストと組み合わせることができる。一実施形態では、CCR2に特異的なsiRNA分子は、CSF1Rの別のアンタゴニストと組み合わせて、結合したアンタゴニストを形成することができる。別の実施形態では、CCR2に特異的なsiRNA分子は、CCR2の別のアンタゴニスト（例えば、抗CCR2抗体）と組み合わせて、CCR2の二重阻害を達成することができる。

【0210】

細胞系組成物

いくつかの実施形態では、細胞系薬剤が使用される。例えば、本明細書に記載される薬剤と接触した骨髓由来細胞を投与することができる。

【0211】

細胞系薬剤は、対象宿主に対して免疫適合性の関係を有し、いかなるかかる関係も、本発明に従った使用のために企図される。例えば、養子単球及び／またはマクロファージ、T細胞などのような細胞は、同系であり得る。「同系」という用語は、特に抗原または免疫反応に関して、遺伝的に同一である同じ種に由来する、起源である、またはそのメンバーである状態を指し得る。これらには、一致するMHC型を有する同一の対が含まれる。したがって、「同系移植」は、ドナーから、ドナーと遺伝的に同一であるか、または望ましくない有害な免疫原性応答（例えば、本明細書に記載される免疫学的スクリーニング結果の解釈に反するものなど）を伴わずに移植を可能にするのに十分な免疫学的に適合性のあるレシピエントへの細胞の移入を指す。

【0212】

移植された細胞が同じ対象から得られ、同じ対象に移植された場合、同系移植は「自家」であり得る。「自家移植」とは、対象自身の細胞または臓器の採取及び再注入または移植を指す。自家細胞の排他的または補足的な使用は、宿主への細胞の投与、特定の移植片対宿主反応の多くの悪影響を排除または低減することができる。

【0213】

移植された細胞が同じ種の異なるメンバーから得られ、移植されたが、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)抗原と十分に一致しており、有害な免疫原性応答を回避する場合、同系移植は「同種異系」として考慮される。MHCミスマッチの程度を決定することは、当該技術分野で即知であり、使用されている標準的な試験に従って達成することができる。例えば、ヒトにおけるMHC遺伝子には少なくとも6つの主要なカテゴリがあり、移植生物学において重要であると同定されている。HLA-A、HLA-B、HLA-Cは、HLAクラスIタンパク質をコードし、一方でHLA-DR、HLA-DQ、及びHLA-DPは、HLAクラスIIタンパク質をコードする。各々のこれらのグループ内の遺伝子は、ヒト集団に見られる多数のHLA対立遺伝子またはバリエーションに反映されているように、高度に多型であり、個人間のこれらのグループの差異は、移植細胞に対する免疫応答の強さに関連している。MHC一致の程度を決定するための標準的な方法は、HLA-B及びHLA-DR、またはHLA-A、HLA-B、及びHLA-DRグループ内の対立遺伝子を調査する。したがって、試験はそれぞれ、2つまたは3つのHLAグループ内の少なくとも4つ、さらには5つ、または6つのMHC抗原で行うことができる。血清学的MHC試験において、各HLA抗原型に対する抗体は、抗体と反応する特定のMHC抗原の存在または不在を決定するために、1人の対象（例えば、ドナー）からの細胞と反応させる。これは、他の対象（例えば、レシピエント）の反応性プロファイルと比較される

。抗体とMHC抗原との反応は、典型的に、抗体を細胞とインキュベートし、次に補体を追加して細胞溶解を誘導することによって決定される（すなわち、リンパ球毒性試験）。反応は、反応において溶解された細胞の量に従って調査され、類別される（例えば、Mickelson and Petersdorf (1999) Hematopoietic Cell Transplantation, Thomas, E. D. et al. eds., pg 28-37, Blackwell Scientific, Malden, Massを参考されたい）。他の細胞系アッセイには、標識抗体を使用したフローサイトメトリまたは酵素結合免疫測定法（ELISA）が含まれる。MHC型を決定するための分子的方法が周知であり、一般に、HLAタンパク質をコードする特定の遺伝子配列を検出するために合成プローブ及び／またはプライマーを使用する。合成オリゴヌクレオチドは、特定のHLA型に関連する制限酵素断片長多型を検出するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用できる（Vaughn (2002) Method. Mol. Biol. MHC Protocol. 210:45-60）。代替的に、プライマーは、HLA配列を増幅するために使用することができ（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応またはライゲーション連鎖反応によって）、その生成物は、直接的なDNA配列決定、制限酵素断片多型分析（RFLP）、または一連の配列特異的オリゴヌクレオチドプライマー（SSOP）とのハイブリダイゼーションによってさらに調査することができる（Petersdorf et al. (1998) Blood 92:3515-3520、Morishima et al. (2002) Blood 99:4200-4206、及び Middleton and Williams (2002) Method. Mol. Biol. MHC Protocol. 210:67-112）。

10

20

【0214】

移植された細胞及び対象の細胞が、典型的には同系交配によって、単一の遺伝子座などの定義された遺伝子座において異なる場合、同系移植は「コンジェニック」であり得る。「コンジェニック」という用語は、同じ種に由来する、起源である、またはそのメンバーであることを指し、メンバーは、小さな遺伝子領域、典型的には単一の遺伝子座（すなわち、単一の遺伝子）を除いて遺伝的に同一である。「コンジェニック移植」とは、ドナーからレシピエントへの細胞または臓器の移植を指し、レシピエントは、単一の遺伝子座を除いてドナーと遺伝的に同一である。例えば、CD45は、いくつかの対立遺伝子型で存在し、CD45.1またはCD45.2対立遺伝子バージョンが発現されるかに関してマウス系統が異なるコンジェニックマウス系統が存在する。

30

【0215】

対照的に、「ミスマッチな同種異系」とは、有害な免疫原性応答を誘発するのに十分な、定義された数のMHC抗原の血清学的または分子分析など、当該技術分野で使用される標準的なアッセイによって通常決定される、同一ではない主要組織適合遺伝子複合体（MHC）抗原（すなわち、タンパク質）を有する同じ種に由来する、由起源である、またはそのメンバーであることを指す。「部分的なミスマッチ」は、メンバー間、典型的にはドナーとレシピエントとの間で試験されたMHC抗原の部分的な一致を指す。例えば、「半分のミスマッチ」は、2つのメンバー間で異なるMHC抗原型を示すものとして試験されたMHC抗原の50%を指す。「全部の」または「完全な」ミスマッチは、すべてが2つのメンバー間で異なるものとして試験されたMHC抗原を指す。

40

【0216】

同様に、対照的に、「異種」とは、異なる種、例えば、ヒト及び齧歯類、ヒト及びブタ、ヒト及びチンパンジーなどに由来する、起源である、またはそれらのメンバーであることを指す。「異種移植」は、レシピエントがドナーの種とは異なる種である場合に、ドナーからレシピエントへの細胞または臓器の移植を指す。

【0217】

さらに、細胞は、単一の源または複数の源（例えば、単一の対象または複数の対象）から得ることができる。複数の源は、少なくとも2つ（例えば、1つより多い）を指す。さらに別の実施形態では、非ヒト哺乳動物は、マウスである。目的の細胞型が得られる動物は、

50

成体、新生児（例えば、生後４８時間未満）、未成熟、または子宮内であり得る。目標の細胞型は、原発性がん細胞、がん幹細胞、確立されたがん細胞株、不死化原発性がん細胞などであり得る。特定の実施形態では、宿主対象の免疫系は、移植されたがん細胞と免疫学的に適合性があるように操作されるか、または選出され得る。例えば、一実施形態では、対象は、ヒトがん細胞と適合性であるために「ヒト化」され得る。「免疫系ヒト化」という用語は、ヒトHSC系統細胞ならびにヒト後天性及び先天性免疫細胞を含み、宿主動物から拒絶されることなく生存することにより、ヒトの造血ならびに獲得免疫及び自然免疫の両方を宿主動物で再構成することができるマウスなどの動物を指す。後天性免疫細胞には、T細胞及びB細胞が含まれる。自然免疫細胞には、マクロファージ、顆粒球（好塩基球、好酸球、好中球）、DC、NK細胞、及び肥満細胞が含まれる。代表的な非限定的な例には、SCID-hu、Hu-PBL-SCID、Hu-SRC-SCID、NSG（NOD-SCID IL2r-ガンマ（null）は、自然免疫系、B細胞、T細胞、及びサイトカインシグナル伝達を欠く）、NOG（NOD-SCID IL2r-ガンマ（切断型））、BRG（BALB/c-Rag2（null）IL2r-ガンマ（null））、及びH2dRG（Stock-H2d-Rag2（null）IL2r-ガンマ（null））マウス（例えば、Shultz et al.（2007）Nat. Rev. Immunol. 7:118、Pearson et al.（2008）Curr. Protocol. Immunol. 15:21、Brehm et al.（2010）Clin. Immunol. 135:84-98、McCune et al.（1988）Science 241:1632-1639、米国特許第7,960,175号、及び米国特許公開第2006/0161996号を参照されたい）、ならびにRag1（B及びT細胞を欠く）、Rag2（B及びT細胞を欠く）、TCRアルファ（T細胞を欠く）、パーフォリン（CD8+T細胞が細胞傷害性機能を欠く）、FoxP3（機能性CD4+T制御性細胞を欠く）、IL2rg、またはPrflなどの免疫関連遺伝子の関連null変異体、ならびにPD-1、PD-L1、Tim3、及び／または2B4の変異体もしくはノックアウト体が含まれ、マウスのような免疫不全動物のモデルにおけるヒト免疫細胞の効率的な生着を可能にし、及び／または区画特異性を提供する（例えば、PCT公開第WO2013/062134号を参照されたい）。さらに、NSG-CD34+（NOD-SCID IL2r-ガンマ（null）CD34+）ヒト化マウスは、マウスなどの動物モデルにおいてヒト遺伝子及び腫瘍活性を研究するために有用である。

【0218】

本明細書で使用される場合、生物学的物質源から「得られる」とは、ドナーから生物学的物質の源を収集または分配する任意の従来の方法を意味する。例えば、生物学的物質は、固形腫瘍、末梢血もしくは臍帯血試料などの血液試料から得られるか、または骨髓もしくは羊水などの別の体液から得ることができる。かかる試料を得るための方法は、技術者に周知である。本発明では、試料は、新鮮であり得る（すなわち、凍結することなくドナーから得られる）。さらに、試料をさらに操作して、増殖前に無関係または不要な成分を除去することができる。試料は、保存されたストックからも入手することができる。例えば、細胞株または末梢血もしくは臍帯血などの体液の場合、試料は、かかる細胞株もしくは体液の極低温または他の方法で保存されたバンクから取り除くことができる。かかる試料は、任意の好適なドナーから入手することができる。

【0219】

得られた細胞集団は、直接使用するか、または後日使用するために凍結することができる。凍結保存のための様々な媒体及びプロトコルが当該技術分野で即知である。一般に、凍結培地は、約５～１０％、１０～９０％の血清アルブミン、及び５０～９０％の培養培地からのDMSOを含む。細胞を保存するのに有用な他の添加剤には、例としてこれらに限定されないが、トレハロースなどの二糖類（Scheinkoniget al.（2004）Bone Marrow Transplant. 34:531-536）、またはヘタスターチ（すなわち、ヒドロキシエチルスターチ）などの血漿増量剤が含まれる。いくつかの実施形態では、リン酸緩衝生理食塩水などの等張緩衝液を使用することがで

きる。例示的な凍結保存組成物は、4% HSA、7.5%ジメチルスルホキシド(DMSO)、及び2%ヘタスターチを含む細胞培養培地を有する。凍結保存のための他の組成物及び方法は、当該技術分野で周知であり、説明されている(例えば、Broxmeyer et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100:645-650を参照されたい)。細胞は、約-135°C未満の最終温度で保存される。

【0220】

いくつかの実施形態では、有用な薬剤は、CAR(キメラ抗原受容体)-T療法であり得、T細胞は、目的の腫瘍細胞上の抗原と特異的な抗原結合ドメインを含むCARを発現するように操作される。「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、所望の抗原特異性及び抗原結合時に細胞内シグナルを伝達するためのシグナル伝達ドメインを有する受容体を指す。例えば、Tリンパ球は、T細胞受容体(TCR)と、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスIまたはII分子によって提示される短いペプチドとの相互作用を通じて特定の抗原を認識する。初期活性化及びクローン増殖については、ナイーブT細胞は、追加の共刺激シグナルを提供するプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)に依存する。共刺激を伴わないTCRの活性化は、無応答性及びクローン性アネルギーをもたらし得る。免疫化を回避するために、移植された認識特異性を有する細胞傷害性エフェクター細胞を誘導するための異なるアプローチが開発されている。TCRに関連するCD3複合体の細胞表面成分に特異的な天然リガンドまたは抗体に由来する結合ドメインからなるCARが構築されている。抗原が結合すると、かかるキメラ抗原受容体は、エフェクター細胞における内因性シグナル伝達経路と連携し、TCR複合体によって開始されるものと同様の活性化シグナルを生成する。キメラ抗原受容体に関する最初の報告以来、この概念は着実に洗練されており、キメラ受容体の分子設計は最適化されており、scFV、Fav、及び本明細書に記載される別のタンパク質結合断片などの任意の数の周知である結合ドメインを慣例的に使用している。

【0221】

いくつかの実施形態では、単球及びマクロファージは、例えば、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作され得る。修飾された細胞は、腫瘍微小環境に動員することができ、それが腫瘍に浸潤し、標的のがん細胞を殺傷することにより、強力な免疫エフェクターとして機能する。CARには、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインが含まれる。抗原結合ドメインは、標的細胞上の抗原と結合する。CARの抗原結合ドメインと結合する抗原として作用することができる細胞表面マーカーの例には、ウイルス、細菌、寄生虫感染、自己免疫疾患、及びがん細胞(例えば、腫瘍抗原)に関連するものが含まれる。

【0222】

一実施形態では、抗原結合ドメインは、目的の腫瘍またはがんと特異的な抗原などの腫瘍抗原と結合する。腫瘍関連抗原の非限定的な例には、BCMA、CD19、CD24、CD33、CD38、CD44v6、CD123、CD22、CD30、CD117、CD171、CEA、CS-1、CLL-1、EGFR、ERBB2、EGFRvIII、FLT3、GD2、NY-BR-1、NY-ESO-1、p53、PRSS21、PSMA、ROR1、TAG72、Tn Ag、VEGFR2が含まれる。

【0223】

一実施形態では、膜貫通ドメインは、CAR内の1つ以上のドメインと自然に関連している。膜貫通ドメインは、天然または合成源からのいずれかに由来し得る。本発明で特に使用される膜貫通領域は、T細胞受容体のアルファ、ベータ、またはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、Toll様受容体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、及びTLR9に由来(すなわち、少なくともそれらの膜貫通領域を含む)し得る。いくつかの事例では、ヒトIg(免疫グロブリン)ヒンジを

含む様々なヒトヒンジを利用することもできる。

【0224】

一実施形態では、CARの細胞内ドメインは、シグナル活性化及び／または形質導入に関与するドメインを含む。細胞内ドメインの例には、TCR、CD3ゼータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD86、一般的なFcRガンマ、FcRベータ（Fcイプシロンリブ）、CD79a、CD79b、FcガンマリIIa、DAP10、DAP12、T細胞受容体（TCR）、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（触覚）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELP（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、Toll様受容体1（TLR1）、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、本明細書に記載される他の共刺激分子、それらの任意の誘導体、バリエーション、または断片、同じ機能的能力を有する共刺激分子の任意の合成配列、及びそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない1つ以上の分子もしくは受容体からの断片またはドメインが含まれる。

【0225】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤、組成物、及び方法を使用して、単球及びマクロファージを再操作して、他の免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞に抗原を提示するそれらの能力を増強することができる。抗原提示細胞（APC）として操作された単球及びマクロファージは、腫瘍抗原を処理し、抗原エピトープをT細胞に提示して、腫瘍細胞を攻撃する適応免疫応答を刺激する。

【0226】

IV. 製剤

いくつかの実施形態では、CCR2に特異的なsiRNA分子を含む本発明により包含されるオリゴヌクレオチド組成物は、治療薬として単独で使用される。他の実施形態では、CSF1Rに特異的なsiRNA分子を含む本発明により包含されるオリゴヌクレオチド組成物は、治療薬として単独で使用され得る。

【0227】

さらに他の実施形態では、CCR2及びCSF1Rに特異的なsiRNA分子を含む本発明により包含されるオリゴヌクレオチド組成物は、組み合わせて使用される。いくつかの例では、CCR2及びCSF1Rに特異的なsiRNA分子は、siRNA分子カクテルを形成し得る。CCR2に特異的なsiRNA分子及びCSF1Rに特異的なsiRNA分子は、1:1～1:10の比でsiRNA分子カクテル組成物中に存在し得る。あるいは、CSF1Rに特異的なsiRNA分子及びCCR2に特異的なsiRNA分子は、1:1～1:10の比でsiRNA分子カクテル組成物中に存在し得る。他の実施形態では、CCR2及びCSF1Rに特異的なsiRNA分子は、高分子集合体または薬学的組成物の複合体と組み込むことができる。本発明により包含されるsiRNA分子は、様々な薬学的組成物として製剤化することができる。

【0228】

薬学的組成物は、インビトロ、エキスピボ、またはインビボ投与などの所望の使用に適した形態で調製され、本発明により包含される有効量の薬理学的活性化合物を、単独で、または1つ以上の薬学的に許容される担体と組み合わせて含む。

【0229】

本発明により包含されるCCR2に特異的なsiRNA分子及びCSF1Rに特異的なsiRNA分子を含むsiRNA分子カクテル組成物は、CCR2及びCSF1R受容体の発現を抑制し、及び／またはCCR2及びCSF1Rの活性を阻害するために使用することができる。

【0230】

10

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるsiRNA組成物は、それぞれCCL2及びCSF1などのCCR2及びCSF1Rのリガンドに対するアンタゴニストをさらに含むことができる。一例では、本発明により包含される組成物は、CCL2アンタゴニストと組み合わせてCCR2に特異的なsiRNA分子を含むことができ、CCL2アンタゴニストは、CCL2に特異的なsiRNA分子、抗CCL2抗体、及び／または小分子であり得る。別の例では、本発明により包含される組成物は、CSF1Rに特異的なsiRNA分子をCSF1アンタゴニストと組み合わせて含むことができ、CSF1アンタゴニストは、CSF1に特異的なsiRNA分子、抗CSF1抗体、及び／または小分子であり得る。

【0231】

20

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるCCR2に特異的なsiRNA分子及び／またはCSF1Rに特異的なsiRNA分子を含むsiRNAカクテル組成物は、単球及びマクロファージを標的とするもの、免疫応答を刺激するものなどの1つ以上の薬剤をさらに含むことができる。かかる単球／マクロファージ標的化薬物には、これらに限定されないが、CD11bを標的とするロベリズマブ、ニューロフィリン-1を標的とする小分子MNRP1685A、ANG2を標的とするネスブクマブ(nesvacumab)、IL-4に特異的なパスコリズマブ、IL4Raに特異的なデュピルマブ、IL-6Rに特異的なトシリズマブ及びサリルマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、タネルセプト、ゴリムマブ、ならびにTNF-αに特異的なインフリキシマブ、ならびにCD40を標的とするCP-870及びCP-893が含まれる。

30

【0232】

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるCCR2に特異的なsiRNA分子及び／またはCSF1Rに特異的なsiRNA分子を含むオリゴヌクレオチド組成物は、裸の組成物として使用することができる。他の実施形態では、本発明により包含されるオリゴヌクレオチド組成物は、結合剤として製剤化することができる。

【0233】

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるオリゴヌクレオチド組成物を含む薬学的組成物は、細胞膜を通過するオリゴマーの輸送のためなど、細胞レベルでオリゴヌクレオチドの取り込みを増強することができる1つ以上の薬剤で製剤化することができる。

【0234】

40

本発明による組成物は、単一単位用量として、及び／または複数の単一単位用量として、大量に調製、パッケージング、及び／または販売することができる。本明細書で使用される、「単位用量」は、予め決定された量の活性成分を含む薬学的組成物の個別量である。活性成分の量は一般的に、対象に投与されるであろう活性成分の用量及び／またはかかる用量の好都合な画分、例えば、かかる用量の半分もしくは3分の1などに等しい。

【0235】

脂質系製剤

いくつかの実施形態では、脂質系製剤が使用される。したがって、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載される組成物及び1つ以上の脂質を含む脂質系製剤である。いくつかの実施形態では、脂質は、脂質粒子または両親媒性化合物である。脂質は、生理学的

50

pHで中性、アニオン性、またはカチオン性であり得る。

【0236】

好適な固体脂質には、これらに限定されないが、高飽和アルコール、高脂肪酸、スフィンゴ脂質、合成エステル、ならびに高飽和脂肪酸のモノ、ジ、及びトリグリセリドが含まれる。固体脂質には、セトステアリルアルコールなど、10～40個、好ましくは12～30個の炭素原子を有する脂肪族アルコールが含まれ得る。固体脂質には、ステアリン酸、パルミチン酸、デカン酸、及びベヘン酸などの、炭素原子が10～40個、好ましくは12～30個の高級脂肪酸が含まれ得る。固体脂質は、例えば、モノステアリン酸グリセリル、ベヘン酸グリセロール、パルミトステアリン酸グリセロール、トリラウリン酸グリセロール、トリカプリン、トリラウリン、トリミリスチン、トリパルミチン、トリステアリン、及び硬化ヒマシ油など、モノグリセリド、ジグリセリド、及びトリグリセリドを含む、10～40個、好ましくは12～30個の炭素原子を有する高飽和脂肪酸のグリセリドが含まれ得る。好適な固体脂質には、パルミチン酸セチル、ミツロウ、またはシクロデキストリンが含まれ得る。

【0237】

両親媒性化合物には、これらに限定されないが、リン脂質、例えば、1,2ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジアラキドイルホスファチジルコリン(DAPC)、ジベヘノイルホスファチジルコリン(DBPC)、ジトリコサノイルホスファチジルコリン(DTPC)、及びジリグノセロイルファチジルコリン(DLPC)が含まれ、0.01～60(重量脂質/wポリマー)、例えば、0.1～30(重量脂質/wポリマー)の比率で組み込まれる。使用できるリン脂質には、これらに限定されないが、ホスファチジン酸、飽和脂質及び不飽和脂質の両方を含むホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジル誘導体、カルジオリピン、及びβ-アシル-γ-アルキルリン脂質が含まれる。リン脂質の例には、これらに限定されないが、ホスファチジルコリン、例えば、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジペンタデカノイルホスファチジルコリン、ジラウロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジアラキドイルホスファチジルコリン(DAPC)、ジベヘノイルホスファチジルコリン(DBPC)、ジトリコサノイルホスファチジルコリン(DTPC)、ジリグノセロイルファチジルコリン(DLPC)、及びホスファチジルエタノールアミン、例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンまたは1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロールホスホエタノールアミンが含まれる。非対称アシル鎖(例えば、6個の炭素の1つのアシル鎖及び12個の炭素の別のアシル鎖)を有する合成リン脂質も使用することができる。

【0238】

いくつかの実施形態では、脂質系粒子が使用される。「脂質粒子」という用語は、リポソーム、脂質ミセル、固体脂質粒子、リポプレックス、脂質ナノ粒子(LNP)、または脂質安定化高分子粒子を指し、異なる生体適合性脂質のうちの1つまたは混合物、例えば、少なくとも1つ以上のカチオン性脂質及び/または1つ以上の中性脂質及び/またはポリエチレングリコール(PEG)-脂質から構成される。

【0239】

粒子は、脂質ミセルであり得る。脂質ミセルは、例えば、脂質界面活性剤を含む油中水型エマルジョンとして形成することができる。エマルジョンは、分散した液滴を安定化するために界面活性剤が追加された2つの非混和性相のブレンドである。いくつかの実施形態では、脂質ミセルは、マイクロエマルジョンである。マイクロエマルジョンは、少なくとも水、油、及び脂質界面活性剤からなる熱力学的に安定な系であり、液滴サイズが1ミクロン未満、約10nm～約500nm、または約10nm～約250nmの透明で熱力学的に安定した系を生成する。脂質ミセルは、一般に、疎水性治療剤、疎水性予防剤、ま

たは疎水性診断剤を含む疎水性活性剤をカプセル化するのに有用である。

【0240】

粒子は、固体脂質粒子であり得る。固体脂質粒子は、コロイド状ミセル及びリポソームの代替物を提供する。固体脂質粒子は、典型的にはサブミクロンのサイズ、すなわち、約10nm～約1ミクロン、10nm～約500nm、または10nm～約250nmである。固体脂質粒子は、室温で固体である脂質で形成される。それらは、液体油を固体脂質に置き換えることにより、水中油型エマルジョンから得られる。

【0241】

粒子は、リポソームであり得る。リポソームは、球状の二重層に配置された脂質に囲まれた水性媒体からなる小さな小胞である。リポソームは、小さな単層小胞、大きな単層小胞、または多層小胞に分類することができる。多層状のリポソームには、複数の同心脂質二重層が含まれる。リポソームは、水性内部または二重層の間に親水性薬剤を捕捉することによって、または二重層内に疎水性薬剤を捕捉することによって、薬剤をカプセル化するために使用することができる。

【0242】

脂質ミセル及びリポソームは、通常、水性中心を有する。水性中心は、水または水及びアルコールの混合物を含むことができる。好適なアルコールには、これらに限定されないが、メタノール、エタノール、プロパノール（イソプロパノールなど）、ブタノール（n-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、tert-ブタノールなど）、ペンタノール（アミルアルコール、イソブチルカルビノールなど）、ヘキサノール（1-ヘキサノール、2-ヘキサノール、3-ヘキサノールなど）、ヘプタノール（1-ヘプタノール、2-ヘプタノール、3-ヘプタノール、4-ヘプタノールなど）、もしくはオクタノール（1-オクタノールなど）、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0243】

リポソームは人工的に調製された小胞であり、主に脂質二重層で構成され、栄養素及び薬学的製剤の投与のための送達媒体として使用することができる。リポソームは、直径数百ナノメートルであり得る多層小胞（MLV）などの異なるサイズであり得るが、これらに限定されない、狭い水性区画によって分離された一連の同心円状の二重層、直径50nmより小さい、小さな単細胞小胞（SUV）、及び直径50～500nmの大きな単細胞小胞（LUV）を含み得る。リポソーム設計は、これらに限定されないが、不健康な組織へのリポソームの付着を改善するため、またはエンドサイトーシスなどの事象を活性化するために、オプソニンまたはリガンドを含み得る。リポソームは、薬学的製剤の送達を改善するために、低または高pHを含むことができる。

【0244】

リポソームの形成は、これらに限定されないが、封入された薬学的製剤及びリポソーム成分、脂質小胞が分散される媒体の性質、封入された物質の有効濃度及びその潜在的な毒性、小胞の適用及び／または送達中に関与する任意の追加のプロセス、最適化サイズ、多分散度、ならびに目的の用途での小胞の有効期間、ならびにバッチ間の再現性及び安全性での効率的なリポソーム生成物の大規模生産の可能性などの物理化学的特性に依存し得る。

【0245】

一実施形態では、本明細書に記載される薬学的組成物は、限定されないが、リポソーム、例えば、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DODMA）リポソームから形成されるもの、Marina Biotech（Bothell, WA）からのDiLa2リポソーム、1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-DMA）、2,2-ジリノレイル-4-（2-ジメチルアミノエチル）-[1,3]-ジオキソラン（DLin-KC2-DMA）、及びMC3を含むことができる（例えば、米国特許公開第2010/0324120号に記載されているように）。

【0246】

一実施形態では、本発明により包含される組成物は、脂質-ポリカチオン複合体に製剤

10

20

30

40

50

化することができる。脂質－ポリカチオン複合体の形成は、当該技術分野で即知である方法によって、及び／または米国特許公開第2012/0178702号に記載される方法によって達成することができる。非限定的な例として、ポリカチオンは、カチオン性ペプチドまたはポリペプチド、例えば、ポリリジン、ポリオルニチン及び／またはポリアルギニン、ならびにPCT公開第WO2012/013326号に記載されるカチオン性ペプチドを含み得る。別の実施形態では、本発明により包含される組成物は、コレステロールまたはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)などであるがこれらに限定されない中性脂質をさらに含むことができる脂質－ポリカチオン複合体で製剤化することができる。リポソーム製剤は、これらに限定されないが、カチオン性脂質成分の選択、カチオン性脂質飽和の程度、PEG化の性質、すべての成分の比率、及びサイズなどの生物物理学的パラメータによって影響を受け得る。

10

【0247】

いくつかの実施形態では、脂質粒子は、脂質ナノ粒子(LNP)である。「脂質ナノ粒子(LNP)」という用語は、本明細書に記載されるような1つ以上の脂質成分を含むサブミクロン範囲の脂質系粒子を指す。LNPは、リポソームの構造的特徴を有し、及び／または代替的な非二重層型の構造を有し得、これは、例えば、本明細書に記載される少なくとも1つのバイオマーカー(例えば、表1及び／または表2に列挙される少なくとも1つの標的)から転写されるmRNAの核酸配列と相補的なsiRNA分子を含む、核酸系薬物を全身的に送達するために使用することができる。いくつかの実施形態では、LNP製剤は、1つ以上のカチオン性脂質を含む。カチオン性脂質は、任意の生理学的pHで正味の正電荷を帯びる脂質である。ある特定の実施形態では、LNPは、本明細書に記載されるリポドイドを含む。正電荷は、siRNA分子などの負電荷の治療剤との連結に有用である。

20

【0248】

特定の実施形態では、脂質ナノ粒子は、1つ以上の脂質及び本明細書に記載される組成物を含む。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、脂質ナノ粒子内にカプセル化される。

【0249】

いくつかの実施形態では、LNPのサイズ及び電荷比ならびに他の物理的特性(例えば、膜流動性)は、細胞のトランスフェクション及び送達の増強のために最適化される。

30

【0250】

脂質またはリポドイド粒子は、例えば、カチオン性脂質、中性脂質、アミノ酸またはペプチド系脂質、ポリエチレングリコール(PEG)－脂質、例えば、硬化大豆ホスファチジルコリン(HSPC)などのPEG鎖を有する脂質、コレステロール(ChE)、1,2-ジステアロイル-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(PEG)-2000](DSPE-PEG2000)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(PEG)-2000]鎖の遠位端がマレイミド基で修飾された1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[マレイミド(PEG)-2000]、DSPE-PEG2000-MAL、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-550](DMPE-PEG550)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、及びグリセロール骨格を有するもの、例えば、DMG-PEG、DSG-PEG(DMG-PEG2000)を含むことができる。本明細書で使用される場合、リポソームは、水性内部を取り囲む脂質含有膜を含む構造である。例えば、脂質系製剤を使用して、本発明の核酸薬剤、例えば、siRNA、miRNA、オリゴヌクレオチド、修飾されたmRNA、及び他の種類の核酸分子を送達することができる。

40

【0251】

好適な中性及びアニオン性脂質には、これらに限定されないが、ステロール及び脂質、例えば、コレステロール、リン脂質、リゾ脂質、リゾリン脂質、スフィンゴ脂質、または

50

ペグ化脂質などが含まれる。中性及びアニオン性脂質には、これらに限定されないが、1, 2-ジオシル-グリセロ-3-ホスホコリンを含むホスファチジルコリン (PC) (タマゴPC、ダイズPCなど) ; ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンイノシトール (PI) ; 糖脂質 ; スフィンゴミエリンなどのスフィンゴリン脂質、及びセラミドガラクトピラノシド、ガングリオシド、セレブロシドなどのスフィンゴ糖脂質 (1-セラミジルグルコシドとしても即知である)、例えばコレステロールなどのカルボン酸基を含む脂肪酸、ステロール ; 1, 2-ジオレイルホスファチジルコリン (DOPE)、1, 2-ジヘキサデシルホスファチジルコリン (DHPE)、1, 2-ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、1, 2-ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、及び1, 2-ジミリストイルホスファチジルコリン (DMP C) を含むが、これらに限定されない、1, 2-ジオシル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンが含まれる。脂質はまた、脂質の様々な天然 (例えば、組織由来のL- α -ホスファチジル : 卵黄、心臓、脳、肝臓、ダイズ) 及び/または合成 (例えば、飽和及び不飽和1, 2-ジオシル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン、1-アシル-2-アシル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジヘプタノイル-S N-グリセロ-3-ホスホコリン) 誘導体を含み得る。

【0252】

いくつかのカチオン性脂質、及びそれらを作製するための方法は、例えば、米国特許第5, 830, 430号、第6, 056, 938号、第7, 893, 302号、第7, 404, 969号、第8, 034, 376号、第8, 283, 333号、及び第8, 642, 076号、ならびにPCT公開第WO2010/054406号、第WO2010/054401号、第WO2010/054405号、第WO2010/054384号、第WO2012/040184号、第WO2011/153120号、第WO2011/149733号、第WO2011/090965号、第WO2011/043913号、第WO2011/022460号、第WO2012/061259号、第WO2012/054365号、第WO2012/044638号、第WO2010/080724号、第WO2010/21865号、及び第WO2008/103276号に記載される。

【0253】

「カチオン性脂質」という用語は、プロトン化されて生理学的pHでカチオン性脂質を形成することができる、1つまたは2つの脂肪酸または脂肪酸脂肪族鎖、及びアミノ頭部基を有する脂質を含むことを意味し、正に電荷した頭部及び疎水性尾部からなる。正に電荷した頭部は、負に電荷したsiRNA分子を静電的に結合する働きをし、一方で疎水性尾部は、親油性粒子への自己組織化をもたらす。カチオン性脂質の例は、これらに限定されないが、DLin-K-DMA、DLinDMA、DLinDAP、DLin-K-C2-DMA、DLin-K2-DMA、DOTAP、DMRIE、DORIE、DOTMA、DDAB、エチルPC、多価カチオン性脂質、及びDC-コレステロール、DODA、DODMA、DSDMA、DOTMA、DDAB、DODAP、DOTAP、DOTAP-Cl、DC-Chol、DMRIE、DOSPA、DOGS、DOPE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLincarbDAP、DLinCDAPを含むことができる。これらの脂質及び関連する類似体の多くは、米国特許公開第2006/0083780号、及び第2006/0240554号、ならびに米国特許第5, 208, 036号、第5, 264, 618号、第5, 279, 833号、第5, 283, 185号、第5, 753, 613号、及び第5, 785, 992号に記載されている。カチオン性脂質はまた、リポフェクタミン (登録商標)、リポフェクタミン2000 (登録商標)、リポフェクタミン3000 (登録商標)、RNAiMAX (登録商標) などのリポフェクチン (例えば、米国特許第5, 705, 188号を参照されたい) であり得る。

【0254】

ほぼ生理学的pHで正味の正電荷を帯びる他のカチオン性脂質は、本発明の脂質粒子に使用することができ、これらに限定されないが、N, N-ジオレイル-N, N-ジメチル

アンモニウムクロリド (DODAC)、ジオクタデシルジメチルアンモニウム (DODMA)、ジステアリルジメチルアンモニウム (DSDMA)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン (DODAP)、N-(1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、1,2-ジオレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DOTAP·Cl)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル) コレステロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スぺルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパナミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスぺルミン (DOGS)、1,2-ジレオイル-sn-3-ホスホエタノールアミン (DOPE、生理学的 pH であるが、酸性 pH では正電荷を帯びている)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスト-5-エン-3-ベーターオキシブタン-4-オキシ)-1-(シス,シス-9,12-オクタデカジエノキシ)プロパン (CLi nDMA)、2-[5'-(コレスト-5-エン-3β-オキシ)-3'-オキサペントキシ)-3-ジメチル-1-(シス,シス-9',1-2'-オクタデカジエノキシ)プロパン (CpLi nDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLi ncarbDAP)、1,2-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLi nCDAP)、及びそれらの混合物が含まれる。これらの脂質及び関連する類似体のいくつかは、米国特許公開第 2006/0083780 号及び第 2006/0240554 号、米国特許第 5,208,036 号、第 5,264,618 号、第 5,279,833 号、第 5,283,185 号、第 5,753,613 号、及び第 5,785,992 号に記載されている。

10

20

【0255】

好適な追加のカチオン性脂質はまた、これらに限定されないが、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩を含み得、TAP 脂質とも称され、例えば、硫酸メチル塩である。好適な TAP 脂質には、これらに限定されないが、DOTAP (ジオレオイル-)、DMTAP (ジミリストイル-)、DPTAP (ジバルミトイル-)、及び DSTAP (ジステアロイル-) が含まれる。リポソーム中の好適なカチオン性脂質には、これらに限定されないが、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB)、1,2-ジアシルオキシ-3-トリメチルアンモニウムプロパン、N-[1-(2,3-ジオロイルオキシ)プロピル]-N,N-ジメチルアミン (DODAP)、1,2-ジアシルオキシ-3-ジメチルアンモニウムプロパン、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、1,2-ジアルキルオキシ-3-ジメチルアンモニウムプロパン、ジオクタデシルアミドグリシルスぺルミン (DOGS)、3-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル] コレステロール (DC-Chol) ; 2,3-ジオレオイルオキシ-N-(2-(スぺルミンカルボキサミド)-エチル)-N,N-ジメチル-1-プロパナミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、β-アラニル コレステロール、セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB)、ジC₁₄-アミジン、N-ferf-ブチル-N'-テトラデシル-3-テトラデシルアミノ-プロピオンアミジン、N-(アルファ-トリメチルアンモニオアセチル)ジドデシル-D-グルタミン酸クロリド (TMAG)、ジテトラデカノイル-N-(トリメチルアンモニオアセチル)ジエタノールアミンクロリド、1,3-ジオレオイルオキシ-2-(6-カルボキシ-スぺルミル)-プロピルアミド (DOSPER)、及び N,N,N',N'-テトラメチル-N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2,3-ジオレオイルオキシ-1,

30

40

50

4-ブタンジアンモニウムヨウ化物が含まれる。一実施形態では、カチオン性脂質は、1-[2-(アシルオキシ)エチル]2-アルキル(アルケニル)-3-(2-ヒドロキシエチル)-イミダゾリニウムクロリド誘導体、例えば、1-[2-(9(Z)-オクタデセノイルオキシ)エチル]-2-(8(Z)-ヘプタデセニル)-3-(2-ヒドロキシエチル)イミダゾリニウムクロリド(DOTIM)、及び1-[2-(ヘキサデカノイルオキシ)エチル]-2-ペンタデシル-3-(2-ヒドロキシエチル)イミダゾリニウムクロリド(DPTIM)であり得る。一実施形態では、カチオン性脂質は、第四級アミン上にヒドロキシアルキル部分を含む2,3-ジアルキルオキシプロピル第四級アンモニウム化合物誘導体、例えば、1,2-ジオレオイル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DORI)、1,2-ジオレイルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DORIE)、1,2-ジオレイルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシプロピルアンモニウムブロミド(DORIE-HP)、1,2-ジオレイル-オキシ-プロピル-3-ジメチル-ヒドロキシブチルアンモニウムブロミド(DORIE-HB)、1,2-ジオレイルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシペンチルアンモニウムブロミド(DORIE-Hpe)、1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE)、1,2-ジパルミチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DPRIE)、及び1,2-ジステリルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DSRIE)であり得る。

10

【0256】

20

カチオン性脂質はまた、イオン化可能なカチオン性脂質であり得る。本明細書に記載される組成物の製剤化において使用するために好適なイオン化可能なカチオン性脂質には、WO2015/074805に記載されている脂質が含まれる。本発明の組成物を製剤化するための他の好適なイオン化可能なカチオン性脂質には、US2015/0239834に記載されているものが含まれ得る。

【0257】

いくつかの実施形態では、対称もしくは非対称またはイオン化可能なカチオン性脂質は、ナノ粒子または脂質製剤で使用することができる。このような脂質は、例えば、米国特許公開第2015/0239926号、第2015/0239834号、第2015/0141678号、及びPCT公開第WO2015/074805号に開示されている。

30

【0258】

さらに、LIPOFECTIN(登録商標)(GIBCO/BRLから入手可能なDOTMA及びDOPEを含む)、LIPOFECTAMINE(登録商標)(GIBCO/BRLから入手可能なDOSPA及びDOPEを含む)、TRANSFECTIN(登録商標)(Bio-Rad Laboratories, Inc. から)、siPORT NEOFX(登録商標)(Applied Biosystemsから)などのカチオン性脂質の多くの市販製剤を使用することができる。

【0259】

カチオン性脂質はまた、siRNA分子(例えば、米国特許公開第2013/0323269号に記載されるものを参照されたい)、カチオン性グリセロール誘導体、及びポリリジンなどのポリカチオン性分子(PCT公開第WO97/30731号)、1つ以上の生分解性基を含むカチオン性基(米国特許公開第2013/0195920号)などの本明細書に記載される薬剤を含む組成物の細胞送達に好適な修飾カチオン性脂質であり得る。

40

【0260】

いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、WO2015/074805またはUS2015/0239834に記載されるイオン化可能なアミノ脂質であり得る。

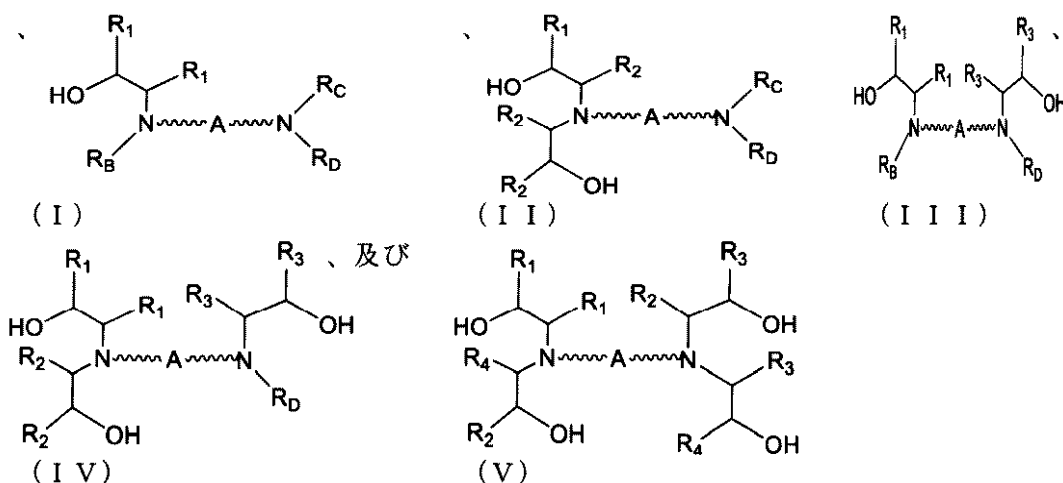
【0261】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、WO2010/053572に記載されるようなアミノアルコールリピドイドをさらに含む。ある特定の実施形態で

50

は、リポイド化合物は、式 (I) ~ (V) :

【化 1 1】



ならびにその薬学的に許容される塩から選択され、式中、

A は、置換もしくは非置換、分岐もしくは非分岐、環状もしくは非環状 C_{2-20} アルキレンであり、任意に独立して、O、S、及び N から選択される 1 つ以上のヘテロ原子によって妨害されているか、または A は、置換もしくは非置換、飽和もしくは不飽和 4 ~ 6 員環であり、

R_1 は、水素、置換、非置換、分岐、もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族、または置換、非置換、分岐、もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族であり、 R_1 の少なくとも 1 つの出現は水素であり、

R_B 、 R_C 、及び R_D は独立して、水素、置換、非置換、分岐、もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族、または置換、非置換、分岐、もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族、または $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{R}_E$ であり、

R_B 及び R_D は一緒に、任意に環状構造を形成することができ、

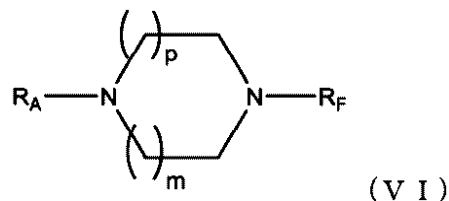
R_C 及び R_D は一緒に、任意に環状構造を形成することができ、

R_E は、置換、非置換、分岐、もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族、または置換、非置換、分岐、もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族である。

【0 2 6 2】

ある特定の実施形態では、リポイドは、式 (VI) のものであり、

【化 1 2】



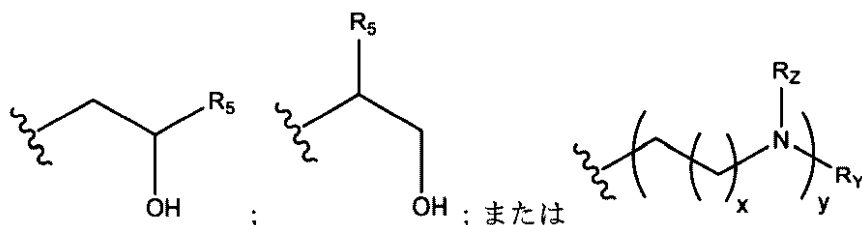
またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

p は、1 ~ 3 (境界値を含む) の整数であり、

m は、1 ~ 3 (境界値を含む) の整数であり、

R_A は、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

【化 1 3】

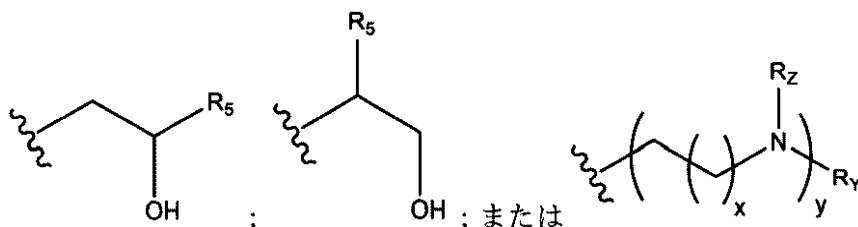


であり、

R_F は、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

10

【化 1 4】



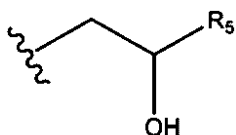
20

であり、

R_5 の各出現は独立して、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

式中、 R_A 、 R_F 、 R_Y 、及び R_Z のうちの少なくとも 1 つは、

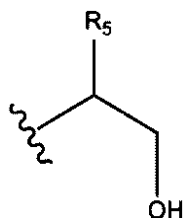
【化 1 5】



30

または

【化 1 6】



であり、

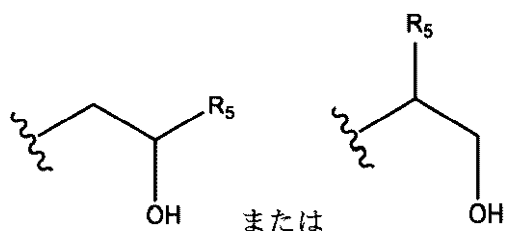
40

x の各出現は、1～10（境界値を含む）の整数であり、

y の各出現は、1～10（境界値を含む）の整数であり、

R_Y の各出現は、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

【化 1 7】

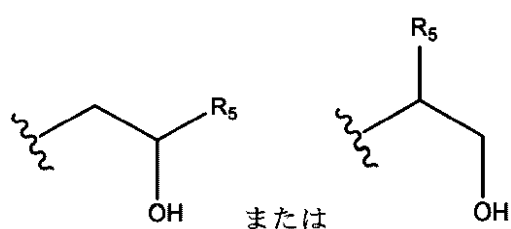


であり、

R_Z の各出現は、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；置換もしくは非置換ヘテロアリール；

10

【化 1 8】



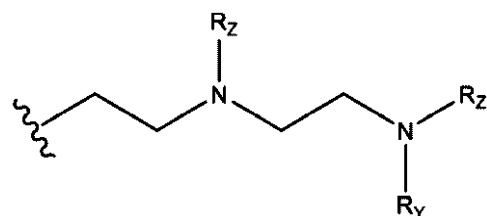
である。

20

【0 2 6 3】

式 (V I) の特定の実施形態では、 p は 1 である。特定の実施形態では、 m は 1 である。特定の実施形態では、 p 及び m は両方とも 1 である。特定の実施形態では、 R_F は、

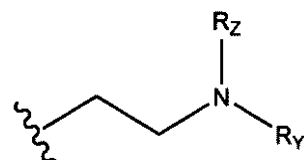
【化 1 9】



30

である。ある特定の実施形態では、 R_A は、

【化 2 0】



である。

40

【0 2 6 4】

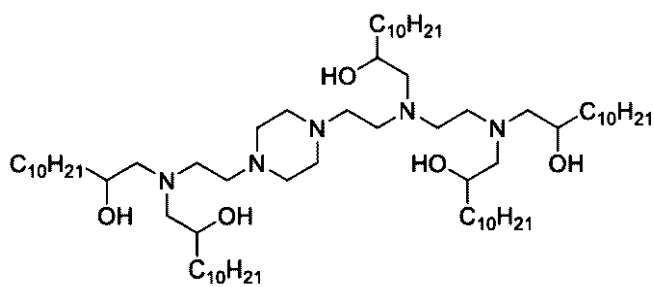
ある特定の実施形態では、組成物は、 C_{14-120} 、 C_{16-120} 、 C_{14-98} 、 C_{14-113} 、 C_{14-96} 、 C_{12-200} 、 C_{12-205} 、 C_{16-96} 、 C_{12-111} 、及び C_{12-210} から選択されるアミノアルコールリピドイドを含む（上記に参照される、米国特許第 8, 450, 298 号及び PCT 公開第 WO 2010/053572 号を参照されたい）。

【0 2 6 5】

ある特定の実施形態では、アミノアルコールリピドイドは、 C_{12-200} である。

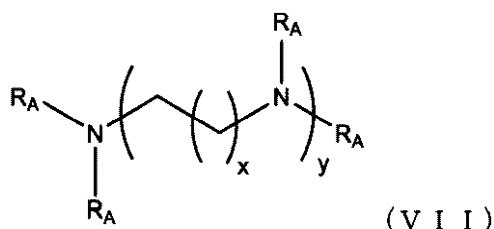
【0 2 6 6】

【化 2 1】



ある特定の実施形態では、リポイドは、式 (V I I) のもの、
【化 2 2】

10

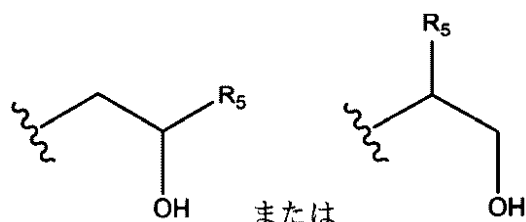


またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

R_A の各出現は独立して、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；または置換もしくは非置換ヘテロアリール；

20

【化 2 3】

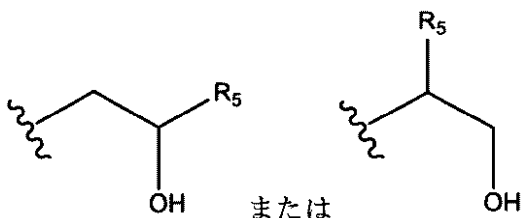


30

であり、

少なくとも 1 つの R_A は、

【化 2 4】



40

であり、

R_5 の各出現は独立して、水素；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換、環状もしくは非環状、分岐もしくは非分岐 C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換アリール；または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

x の各出現は、1～10（境界値を含む）の整数であり、

y の各出現は、1～10（境界値を含む）の整数である。

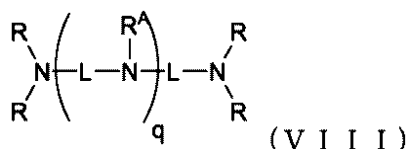
【0 2 6 7】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、WO 2 0 1 4 / 0 2 8 8 4 7 に記載されるようなアミン含有リポイドをさらに含む。

【0 2 6 8】

50

ある特定の実施形態では、アミン含有リポイドは、式 (V I I I) のもの、
【化 2 5】



またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

各 L は独立して、分岐または非分岐 C₁ - 6 アルキレンであり、式中、L は、任意に、
1 つ以上のフッ素ラジカルで置換され、

10

各 R^A は独立して、分岐もしくは非分岐 C₁ - 6 アルキル、C₃ - 7 シクロアルキル、
または分岐もしくは非分岐 C₄ - 12 シクロアルキルアルキルであり、式中、R^A は、任
意に、1 つ以上のフッ素ラジカルで置換され、

各 R は独立して、水素、または -CH₂CH₂C(=O)OR^B であり、

各 R^B は独立して、C₁₀ - 14 アルキルであり、式中、R^B は、任意に、1 つ以上の
フッ素ラジカルで置換され、

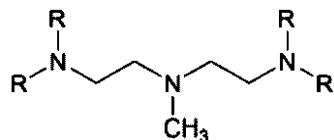
q は 1、2、または 3 であり、

但し、少なくとも 3 つの R 基は、-CH₂CH₂C(=O)OR^B であることを条件と
し、

但し、化合物は、

20

【化 2 6】



でないことを条件とする。

【0269】

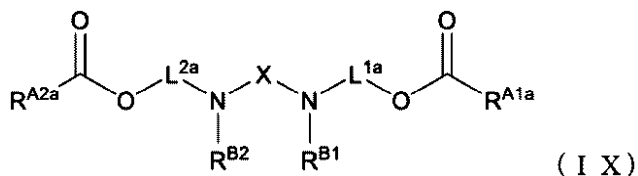
ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、WO2016/00420
2 に記載されるようなポリアミン-脂肪酸由来リポイドをさらに含む。

【0270】

30

ある特定の実施形態では、アミン含有リポイドは、式 (I X) のもの、

【化 2 7】

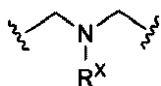


または薬学的に許容される塩であり、式中、

X は、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換アルケニレン、置換もしくは
非置換アルキニレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテ
ロアルケニレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキニレン、置換もしくは非置換カルボシ
クリレン、置換もしくは非置換ヘテロシクリレン、置換もしくは非置換アリーレン、置換
もしくは非置換ヘテロアリーレン、式：

40

【化 2 8】

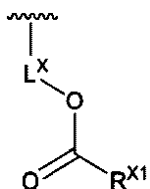


の二価部分、またはそれらの組み合わせであり、式中、R^X の各例は独立して水素、置換
もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アルケニル、置換もしくは非置換アルキ
ニル、置換もしくは非置換カルボシクリル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もし

50

くは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、窒素保護基、または式

【化 2 9】



の一部であり、あるいは R^{B1} 及び R^X の実例が連結され、置換もしくは非置換複素環または置換もしくは非置換ヘテロアリール環を形成し、あるいは R^{B2} 及び R^X の実例が連結され、置換もしくは非置換複素環または置換もしくは非置換ヘテロアリール環を形成し、式中、

L^X の各例は独立して、置換もしくは非置換アルキレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアルキレンであり、

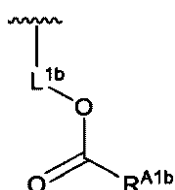
R^{X1} の各例は独立して、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキル、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルケニル、または置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキニルであり、

L^{1a} は、置換もしくは非置換アルキレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアルキレンであり、

R^{A1a} は、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキル、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルケニル、または置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキニルであり、

R^{B1} は、水素、置換もしくは非置換アシル、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アルケニル、置換もしくは非置換アルキニル、置換もしくは非置換カルボシクリル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、窒素保護基、または式：

【化 3 0】



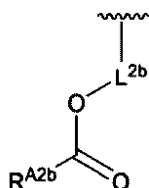
の部分であり、式中、 L^{1b} は、置換もしくは非置換アルキレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアルキレンであり、 R^{A1b} は、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキル、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルケニル、または置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキニルであり、

L^{2a} は、置換もしくは非置換アルキレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアルキレンであり、

R^{A2a} は、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキル、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルケニル、または置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキニルであり、

R^{B2} は、水素、置換もしくは非置換アシル、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アルケニル、置換もしくは非置換アルキニル、置換もしくは非置換カルボシクリル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、窒素保護基、または式：

【化 3 1】



の一部であり、式中、 L^{2b} は、置換もしくは非置換アルキレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアルキレンであり、 R^{A2b} は、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキル、置換もしくは非置換 C_{4-30} アルケニル、または置換もしくは非置換 C_{4-30} アルキニル

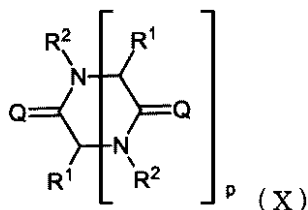
であり、あるいは

R^{B1} 及び R^{B2} が連結され、置換もしくは非置換複素環または置換もしくは非置換ヘテロアリール環を形成する。

【0271】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、WO2013/063468に記載されているようなアミノ酸脂質、ペプチド脂質、またはポリペプチド脂質をさらに含む。ある特定の実施形態では、アミン含有リポイドは、式(X)のもの、

【化32】



10

または薬学的に許容される塩であり、式中、

pは、1～9（境界値を含む）の整数であり、

Qの各例は独立して、O、S、または NR^Q であり、 R^Q は、水素、任意に置換アルキル、任意に置換アルケニル、任意に置換アルキニル、任意に置換カルボシクリル、任意に置換ヘテロシクリル、任意に置換アリール、任意に置換ヘテロアリール、窒素保護基、または式(i)、(ii)、(iii)の基であり、

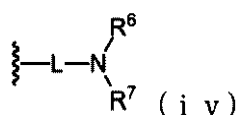
20

R^1 の各例は独立して、水素、任意に置換アルキル、任意に置換アルケニル、任意に置換アルキニル、任意に置換カルボシクリル、任意に置換ヘテロシクリル、任意に置換アリール、任意に置換ヘテロアリール、ハロゲン、 $-OR^{A1}$ 、 $-N(R^{A1})_2$ 、 $-SR^{A1}$ であり、式中、 R^{A1} の各例は独立して、水素、任意に置換アルキル、任意に置換アルケニル、任意に置換アルキニル、任意に置換カルボシクリル、任意に置換ヘテロシクリル、任意に置換アリール、任意に置換ヘテロアリール、酸素原子と結合した場合の酸素保護基、硫黄原子と結合した場合の硫黄保護基、窒素原子と結合した場合の窒素保護基、あるいは2つの R^{A1} 基が連結され、任意に置換複素環または任意に置換ヘテロアリール環を形成し、

あるいは R^1 の少なくとも1つの実例は、以下の式の基であり、

30

【化33】



式中、Lは、任意に置換アルキレン、任意に置換アルケニレン、任意に置換アルキニレン、任意に置換ヘテロアルキレン、任意に置換ヘテロアルケニレン、任意に置換ヘテロアルキニレン、任意に置換カルボシクリレン、任意に置換ヘテロシクリレン、任意に置換アリーレン、または任意に置換ヘテロアリーレンであり、

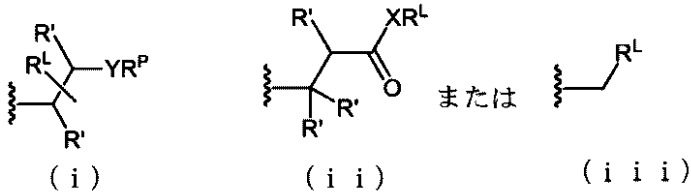
R^6 及び R^7 は各々独立して、水素、任意に置換アルキル、任意に置換アルケニル、任意に置換アルキニル、任意に置換カルボシクリル、任意に置換ヘテロシクリル、任意に置換アリール、任意に置換ヘテロアリール、及び窒素保護基からなる群から選択され、

40

R^2 の各例は独立して、水素、任意に置換アルキル、任意に置換アルケニル、任意に置換アルキニル、任意に置換カルボシクリル、任意に置換ヘテロシクリル、任意に置換アリール、任意に置換ヘテロアリール、窒素保護基、または式(i)、(ii)、もしくは(iii)の基であり、

式(i)、(ii)、及び(iii)は、以下のとおりであり、

【化 3 4】



式中、

R' の各例は独立して、水素または任意に置換アルキルであり、

X は、O、S、NR^X であり、R^X は、水素、任意に置換アルキル、任意に置換アルケニル、任意に置換アルキニル、任意に置換カルボシクリル、任意に置換ヘテロシクリル、任意に置換アリール、任意に置換ヘテロアリール、または窒素保護基であり、

Y は、O、S、NR^Y であり、R^Y は、水素、任意に置換アルキル、任意に置換アルケニル、任意に置換アルキニル、任意に置換カルボシクリル、任意に置換ヘテロシクリル、任意に置換アリール、任意に置換ヘテロアリール、または窒素保護基であり、

R^P は、水素、任意に置換アルキル、任意に置換アルケニル、任意に置換アルキニル、任意に置換カルボシクリル、任意に置換ヘテロシクリル、任意に置換アリール、任意に置換ヘテロアリール、酸素原子と結合した場合は酸素保護基、硫黄原子と結合した場合は硫黄保護基、または窒素原子と結合した場合は窒素保護基であり、

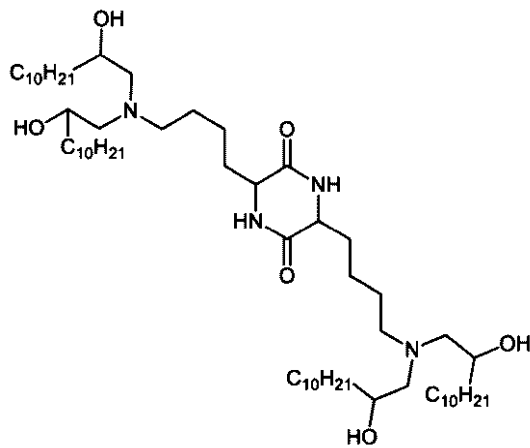
R^L は、任意に置換 C₁ - 5₀ アルキル、任意に置換 C₂ - 5₀ アルケニル、任意に置換 C₂ - 5₀ アルキニル、任意に置換ヘテロ C₁ - 5₀ アルキル、任意に置換ヘテロ C₂ - 5₀ アルケニル、任意に置換ヘテロ C₂ - 5₀ アルキニル、またはポリマーであり、

但し、R^Q、R²、R⁶、または R⁷ の少なくとも 1 つの例は、式 (i)、(ii)、または (iii) の基であることを条件とする。

【0272】

ある特定の実施形態では、アミノ酸脂質、ペプチド脂質、またはポリペプチド脂質は、以下の式を有する：

【化 3 5】



ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、脂質ナノ粒子を含む C₁₂ - 200 で製剤化することができる。いくつかの実施形態では、C₁₂ - 200 は、全組成物の約 1.0% ~ 約 60.0%、約 10.0% ~ 40.0%、または約 20.0% ~ 約 50.0% のモルパーセントで存在する。いくつかの実施形態では、組成物は、全組成物の約 5.0 モル%、約 7.5 モル%、約 10.0 モル%、約 12.5 モル%、約 15.0 モル%、約 17.5 モル%、約 20.0 モル%、約 20.5 モル%、約 21.0 モル%、約 21.5 モル%、約 22.0 モル%、約 22.5 モル%、約 23.0 モル%、約 23.5 モル%、約 24.0 モル%、約 24.5 モル%、約 25.0 モル%、約 25.5 モル%、約 26.0 モル%、約 26.5 モル%、約 27.0 モル%、約 27.5 モル%、約 28.0 モル%、約 28.5 モル%、約 29.0 モル%、約 29.5 モル%、約 30.0 モル

%、約 30.5 モル%、約 31.0 モル%、約 31.5 モル%、約 32.0 モル%、約 32.5 モル%、約 33.0 モル%、約 33.5 モル%、約 34.0 モル%、約 34.5 モル%、約 35.0 モル%、約 35.5 モル%、約 36.0 モル%、約 36.5 モル%、約 37.0 モル%、約 37.5 モル%、約 38.0 モル%、約 38.5 モル%、約 39.0 モル%、約 39.5 モル%、約 40.0 モル%、約 40.5 モル%、約 41.0 モル%、約 41.5 モル%、約 42.0 モル%、約 42.5 モル%、約 43.0 モル%、約 43.5 モル%、約 44.0 モル%、約 44.5 モル%、約 45.0 モル%、約 45.5 モル%、約 46.0 モル%、約 46.5 モル%、約 47.0 モル%、約 47.5 モル%、約 48.0 モル%、約 48.5 モル%、約 49.0 モル%、約 49.5 モル%、約 50.0 モル%、約 50.5 モル%、約 51.0 モル%、約 52.0 モル%、約 53.0 モル%、約 54.0 モル%、約 55.0 モル%、約 56.0 モル%、約 57.0 モル%、約 58.0 モル%、約 59.0 モル%、または約 60.0 モル%の濃度で C12-200 を含む。特定の実施形態では、組成物は、約 50.0 モル%の C12-200 を含む。

10

【0273】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子はまた、中性脂質、両親媒性脂質、PEG 含有脂質、陰イオン性脂質、及びステロールを含むがこれらに限定されない、1つ以上の補助脂質（本明細書では「共脂質」とも称される）を含み得る。

【0274】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、1つ以上の中性脂質をさらに含む。中性脂質は、存在する場合、生理学的 pH で非荷電または中性の双性イオン形態のいずれかで存在する任意の多くの脂質種であり得る。かかる脂質には、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、及びセレプロシドが含まれる。いくつかの実施形態では、中性脂質成分は、2つのアシル基（例えば、ジアシルホスファチジルコリン及びジアシルホスファチジルエタノールアミン）を有する脂質である。いくつかの実施形態では、中性脂質は、C₁₀ から C₂₀ の範囲（境界値を含む）の炭素鎖長を有する飽和脂肪酸を含み、いくつかの実施形態では、中性脂質は、C₁₀ から C₂₀ の範囲（境界値を含む）の炭素鎖長を有するモノ不飽和またはジ不飽和脂肪酸を含む。好適な中性脂質には、これらに限定されないが、DPPC（ジパルミトイルホスファチジルコリン）、POPC（パルミトイル-オレオイルホスファチジルコリン）、DOPE（1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン）、DSPC（ジステロイルホスファチジルコリン）、エッグL-α-ホスファチジルコリン（EPC）；1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン（DPPE）；及びSM（スフィンゴミエリン）が含まれる。いくつかの実施形態では、中性脂質は、DSPC（ジステロイルホスファチジルコリン）である。いくつかの実施形態では、組成物は、全組成物の約 1.0%～約 20.0%、または約 5.0%～約 10.0 モル%の DSPC を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、全組成物の約 1.0 モル%、1.5 モル%、約 2.0 モル%、約 2.5 モル%、約 3.0 モル%、約 3.5 モル%、約 4.0 モル%、約 4.5 モル%、約 5.0 モル%、約 5.5 モル%、約 6.0 モル%、約 6.5 モル%、約 7.0 モル%、約 7.5 モル%、約 8.0 モル%、約 8.5 モル%、約 9.0 モル%、約 9.5 モル%、約 10.0 モル%、約 10.5 モル%、約 11.0 モル%、約 11.5 モル%、約 12.0 モル%、約 12.5 モル%、約 13.0 モル%、約 13.5 モル%、約 14.0 モル%、約 14.5 モル%、約 15.0 モル%、約 15.5 モル%、約 16.0 モル%、約 16.5 モル%、約 17.0 モル%、約 17.5 モル%、約 18.0 モル%、約 18.5 モル%、約 19.0 モル%、約 19.5 モル%、または約 20.0 モル%の DSPC を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、約 10 モル%の DSPC を含む。

20

30

40

【0275】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、1つ以上のアニオン性脂質をさらに含む。アニオン性脂質は、生理的 pH で正味の負電荷を帯びる脂質である。アニオン性脂質は、カチオン性脂質と組み合わせて使用すると、脂質粒子の全体的な表面電荷を低減し、及び

50

／または脂質構造のpH依存性破壊を導入し、脂質粒子（例えば、siRNA分子）に製剤化された治療薬の放出を促進する。アニオン性脂質には、これらに限定されないが、脂肪酸（例えば、オレイン、リノール、リノレン）；ヘミコハク酸コレステリル（CHEMS）；1, 2-ジオ-0-テトラデシル-sn-グリセロ-3-ホスホ-（1'-rac-グリセロール）（ジエテルPG）；1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-（1'-rac-グリセロール）（ナトリウム塩）；1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン（ナトリウム塩）；1-ヘキサデカノイル、2-（9Z, 12Z）-オクタデカジエノイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート；1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-（1-グリセロール）]（DOPG）；ジオレオイルホスファチジン酸（DOPA）；1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン（DOPS）；及びその誘導体が含まれる。好適なアニオン性脂質の他の例には、これらに限定されないが、脂肪酸、例えば、オレイン、リノール、及びリノレン酸、ならびにコレステリルヘミコハク酸塩が含まれる。かかる脂質は、リポソーム表面にリガンドを付着させるなどの様々な目的のために、単独でまたは組み合わせて使用することができる。

【0276】

脂質ナノ粒子はまた、凝集を低減することができる1つ以上の脂質を含むことができる。製剤中の粒子の凝集を低減する脂質の例には、PEG脂質（例えば、DMG-PEG（1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール-PEG）、DMA-PEG（ポリ（エチレングリコール）-ジメタクリレート-PEG）、及びDMPE-PEG 550（1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-550]）、PEG）、モノシアロガングリオシドGm1、及びポリアミドオリゴマー（PAO）、米国特許第6, 320, 017号に記載されるものが含まれる。脂質ナノ粒子は、本明細書で教示される製剤のいずれかにおいてDMPE-PEG 2000で置換され得るDMPE-PEG 2000またはDMG-PEGを含むことができる。他の好適なPEG脂質には、これらに限定されないが、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸、PEG-セラミド複合体（例えば、PEG-CerC₁₄またはPEG-CerC₂₀）（米国特許第5, 820, 873号に記載されるものなど）、PEG修飾ジアルキルアミン及びPEG修飾1, 2-ジアシルオキシプロパン-3-アミン、PEG修飾ジアルキルグリセロール及びジアルキルグリセロール、mPEG（mw 2000）-ジアステアロイルホスファチジルエタノールアミン（PEG-DSPE）が含まれる。

【0277】

いくつかの実施形態では、凝集を低減することができる脂質は、DMPE-PEG 2000またはDMG-PEG（1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール、PEG）である。いくつかの実施形態では、組成物は、約0.1モル％～約5.0モル％のDMPE-PEG 2000もしくはDMG-PEG（すなわち、約0.1％～約5.0％のDMPE-PEG 2000または0.1％～約5.0％のDMG-PEG）、または約0.5モル％～2.0モル％のDMPE-PEG 2000もしくはDMG-PEGを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、全組成物中に約0.1モル％、約0.2モル％、約0.3モル％、約0.4モル％、約0.5モル％、約0.6モル％、約0.7モル％、約0.8モル％、約0.9モル％、約1.0モル％、約1.1モル％、約1.2モル％、約1.3モル％、約1.4モル％、約1.5モル％、約1.6モル％、約1.7モル％、約1.8モル％、約1.9モル％、約2.0モル％、約2.1モル％、約2.2モル％、約2.3モル％、約2.4モル％、約2.5モル％、約2.6モル％、約2.7モル％、約2.8モル％、約2.9モル％、約3.0モル％、約3.1モル％、約3.2モル％、約3.3モル％、約3.4モル％、約3.5モル％、約3.6モル％、約3.7モル％、約3.8モル％、約3.9モル％、約4.0モル％、約4.1モル％、約4.2モル％、約4.3モル％、約4.4モル％、約4.5モル％、約4.6モル％、約4.7モル％、約4.8モル％、約4.9モル％、または約5.0モル％のD

10

20

30

40

50

M P E - P E G 2 0 0 0 または D M G - P E G を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、約 1.5 モル % の D M P E - P E G 2 0 0 0 または D M G - P E G を含む。

【0278】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、ステロールをさらに含む。いくつかの実施形態では、ステロールは、コレステロールである。いくつかの実施形態では、組成物は、約 10.0 モル % ~ 約 50.0 モル % のコレステロール、または約 15.0 モル % ~ 約 40.0 モル % のコレステロールを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、約 10.0 モル %、約 11.0 モル %、約 11.5 モル %、約 12.0 モル %、約 12.5 モル %、約 13.0 モル %、約 13.5 モル %、約 14.0 モル %、約 14.5 モル %、約 15.0 モル %、約 15.5 モル %、約 16.0 モル %、約 16.5 モル %、約 17.0 モル %、約 17.5 モル %、約 18.0 モル %、約 18.5 モル %、約 19.0 モル %、約 19.5 モル %、約 20.0 モル %、約 20.5 モル %、約 21.0 モル %、約 21.5 モル %、約 22.0 モル %、約 22.5 モル %、約 23.0 モル %、約 23.5 モル %、約 24.0 モル %、約 24.5 モル %、約 25.0 モル %、約 25.5 モル %、約 26.0 モル %、約 26.5 モル %、約 27.0 モル %、約 27.5 モル %、約 28.0 モル %、約 28.5 モル %、約 29.0 モル %、約 29.5 モル %、約 30.0 モル %、約 30.5 モル %、約 31.0 モル %、約 31.5 モル %、約 32.0 モル %、約 32.5 モル %、約 33.0 モル %、約 33.5 モル %、約 34.0 モル %、約 34.5 モル %、約 35.0 モル %、約 35.5 モル %、約 36.0 モル %、約 36.5 モル %、約 37.0 モル %、約 37.5 モル %、約 38.0 モル %、約 38.5 モル %、約 39.0 モル %、約 39.5 モル %、または約 40.0 モル % のコレステロールを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、約 38.5 モル % のコレステロールを含む。

10

20

【0279】

L N P 製剤中の P E G の比率は、増加または低減させることができ、及び／または P E G 脂質の炭素鎖長を C 14 から C 18 に修飾して、L N P 製剤の薬物動態及び／または生体内分布を改変することができる。

【0280】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される脂質ナノ粒子は、脂質ナノ粒子及び／またはそのカプセル化された組成物（例えば、遺伝子サイレンシング剤、s i R N A 分子、ペプチドなど）の細胞取り込みまたは細胞質ゾル分布を増強することができる1つ以上の化合物をさらに含む。細胞取り込みを増強することができる化合物は、レボドパ、塩酸ナファゾリン、アセトヘキサミド、ニクロサミド、ジプロフィリン、及びイソキシカム、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。細胞質ゾル分布を増強することができる化合物は、アザグアニン-8、酢酸イソフルプレドン、クロロキン、トリメトベンズアミド、塩酸塩、イソクスプリン塩酸塩、及びジフェマニル硫酸メチル、またはそれらの組み合わせを含み得る。

30

【0281】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、本明細書に記載される少なくとも1つのバイオマーカーのm R N A 転写産物と十分に相補的なs i R N A 分子など、本発明により包含される1つ以上の薬剤をカプセル化する脂質二重層を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、細胞への取り込みを促進するように製剤化される。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、単球、樹状細胞、及び／またはマクロファージへの取り込みを促進するように製剤化される。

40

【0282】

脂質ナノ粒子は、いくつかの態様において、追加の薬剤をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、1つ以上の抗酸化剤をさらに含む。特定の理論に拘束されることを望まないが、抗酸化剤は、脂質ナノ粒子を安定化し、脂質ナノ粒子にカプセル化されたカチオン性脂質及び／または活性剤の分解を防止、減少、及び／または阻害するのを助けることができる。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、親水性抗酸化剤、親油性抗酸化剤、金属キレート剤、一次抗酸化剤、二次抗酸化剤、またはそれらの塩

50

もしくは混合物である。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、EDTAまたはその塩を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、またはそれ以上の追加の抗酸化剤（例えば、一次抗酸化剤、二次抗酸化剤、または他の金属キレート剤）と組み合わせたEDTAをさらに含む。抗酸化剤の例には、これらに限定されないが、親水性抗酸化剤、親油性抗酸化剤、及びそれらの混合物が含まれる。親水性抗酸化剤の非限定的な例には、キレート剤（例えば、金属キレート剤）例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、クエン酸、エチレングリコール四酢酸（EGTA）、1, 2-ビス（o-アミノフェノキシ）エタン-N, N, N', N'-四酢酸（BAPTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、2, 3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸（DMP S）、ジメルカプトコハク酸（DMSA）、c c-リポ酸、サリチルアルデヒドイソニコチノイルヒドラゾン（SIR）、ヘキシルチオエチルアミン塩酸塩（HTA）、デスフェリオキサミン、それらの塩、及びそれらの混合物が含まれる。追加の親水性抗酸化剤には、アスコルビン酸、システイン、グルタチオン、ジヒドロリポ酸、2-メルカプトエタンスルホン酸、2-メルカプトベンズイミダゾールスルホン酸、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸、二亜硫酸ナトリウム、それらの塩、及びそれらの混合物が含まれる。親油性抗酸化剤の非限定的な例には、ビタミンE異性体、例えば、 α -、 β -、 γ -、及び δ -トコフェロール、ならびに α -、 β -、 γ -、及び δ -トコトリエノール；ポリフェノール、例えば、2-tert-ブチル-4-メチルフェノール、2-tert-ブチル-5-メチルフェノール、及び2-tert-ブチル-6-メチルフェノール；ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）（例えば、2-テリーブチル-4-ヒドロキシアニソール及び3-tert-ブチル-4-ヒドロキシアニソール）；ブチルヒドロキシトルエン（BHT）；tert-ブチルヒドロキノン（TBHQ）；パルミチン酸アスコルビル；rc-没食子酸プロピル；それらの塩；及びそれらの混合物が含まれる。

【0283】

いくつかの実施形態では、1つ以上の薬剤（例えば、遺伝子サイレンシング剤、siRNA分子、ペプチド）の送達のために製剤化される脂質系粒子は、脂質ベクター、リポソーム、リポプレックス、脂質ナノ粒子、及びミセルから選択される。いくつかの実施形態では、脂質系粒子は、pH感受性ナノ粒子である。かかるpH感受性ナノ粒子（PNSS）は、酸に不安定なアセタールリンカーを介してマルチアームポリ（エチレングリコール）担体と化学的に架橋されたsiRNAを含む正電荷のないナノ担体であり、siRNA分子の送達に有益であり得る（Tang et al., siRNA Crosslinked Nanoparticles for the Treatment of Inflammation-induced Liver Injury, Advanced Science, 2016, 4(2), e1600228）。

【0284】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、1つ以上のC12-200アミノアルコール脂質をさらに含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約40.0モル%～約50.0モル%のC12-200を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約5.0モル%～約10.0モル%のDSPCを含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約1.0モル%～約2.0モル%のDMG-PEGを含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約20.0モル%～約40.0モル%のコレステロールを含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、50モル%のC12-200、10.0モル%のDSPC、1.5モル%のDMG-PEG、及び38.5モル%のコレステロールを含む。

【0285】

いくつかの実施形態では、製剤内の総脂質モルに対する総siRNA分子モルは、約1:5～約1:20の範囲である。いくつかの実施形態では、総脂質モルに対する総siRNA分子モルは、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、約1:10、約1:11、約1:12、約1:13、約1:14、約1:15、約1:16、約1:17

10

20

30

40

50

、約1：18、約1：18、約1：19、または約1：20である。いくつかの実施形態では、総脂質モルに対する総siRNA分子モルは、約1：9である。

【0286】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子(LNP)は、Sempleet al. (2010) Nat. Biotechnol. 28172-28176で以前に記載されるように、自発性の小胞形成製剤手順を使用して、siRNAなどの薬剤をカプセル化するように製剤化される。

【0287】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される1つ以上の薬剤、例えば、製剤中の本明細書に記載される少なくとも1つのバイオマーカーのmRNA転写産物と十分に相補的であるsiRNA分子の総濃度は、約0.001mg/ml～約100mg/ml、約0.01mg/ml～約10mg/ml、または約0.1mg/ml～約20mg/mlである。いくつかの実施形態では、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、または6つすべてのsiRNA分子の総濃度は、約0.001mg/ml～約100mg/ml、約0.01mg/ml～約10mg/ml、または約0.1mg/ml～約20mg/mlである。

【0288】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子(LNP)は、約40～約200nm、または約50nm～約100nmのサイズ範囲である。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約40nm、約45nm、約50nm、約55nm、約60nm、約65nm、約70nm、約75nm、約80nm、約85nm、約90nm、約95nm、約100nm、約110nm、約120nm、約130nm、約140nm、約150nm、約160nm、約170nm、約180nm、または約200nmのサイズである。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約80nmのサイズである。

【0289】

本発明によれば、本明細書に記載される製剤は、安定性である。本明細書で使用される「安定性」という用語は、患者への投与に好適な状況または状態に留まることを意味する。いくつかの実施形態では、製剤は、実質的に純粋である。本明細書で使用される場合、「実質的に純粋」とは、活性成分(例えば、本明細書に記載される少なくとも1つのバイオマーカーのmRNA転写産物と十分に相補的なsiRNA分子)が製剤中に存在する主要な種であることを意味する。いくつかの実施形態では、実質的に純粋な組成物は、高分子種(例えば、活性剤、遺伝子サイレンシング剤、siRNA分子、追加の薬剤(例えば、抗酸化剤))からなる80%を超える組成物を含む。いくつかの実施形態では、実質的に純粋な組成物は、高分子種からなる85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%を超える組成物を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の活性剤は、本質的に均一になるまで精製され(すなわち、従来の検出方法によって、組成物中に汚染種を検出することができない)、組成物は、単一の巨大分子種から本質的になる。

【0290】

他のナノ粒子は、本明細書に記載される薬剤及び組成物の送達ビヒクルとして使用することができる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、化学的及び/または酵素的に修飾されたりポタンパク質(例えば、米国特許公開第2011/0256224号に記載されるようなアポリポタンパク質)を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、HDL、HDL様リポタンパク質粒子、または合成HDL様粒子などの他のリポタンパク質系ナノ粒子を含む(例えば、米国特許公開第2009/0110739号及び米国特許第7,824,709号を参照されたい)。

【0291】

いくつかの実施形態では、マクロファージを標的とする送達が増強したナノ粒子は、本明細書に記載される組成物をカプセル化するために使用される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、1,3-D-グルカンを含むGPナノ粒子(Soto et al. (2012) J. Drug. Deliv. 143524)、またはマンノシル化キトサン(

10

20

30

40

50

MCS) ナノ粒子 (Peng et al. (2015) J. Nanosci. Nanotechnol. 15:2619-2627) である。

【0292】

ナノ粒子製剤は、炭水化物担体を含む炭水化物ナノ粒子であり得る。非限定的な例として、炭水化物担体には、これらに限定されないが、無水物で修飾されたフィトグリコーゲンまたはグリコーゲン型物質、コハク酸植物グリコーゲンオクテニル、フィトグリコーゲンベーターデキストリン、無水物で修飾されたフィトグリコーゲンベーターデキストリン (例えば、PCT公開第WO2012/109121号を参照されたい)。

【0293】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、脂質ナノ粒子が粘膜バリアを透過することができるように、粒子の表面特性を改変するように操作することができる。粘液は、これらに限定されないが、口腔 (例えば、頬及び食道膜及び舌組織)、眼、胃腸 (例えば、胃、小腸、大腸、結腸、直腸)、鼻、呼吸器 (例えば、鼻、咽頭、気管、気管支膜)、生殖器 (例えば、膣、頸部、尿道膜) などの粘膜組織に位置する。より高い薬物カプセル化効率及び広範囲の薬物の持続的送達を提供する能力のために好ましい10~200nmより大きいナノ粒子は、粘膜バリアを通して急速に拡散するには大きすぎると考えられてきた。粘液は継続的に分泌、排出、廃棄、消化、及びリサイクルされるため、捕捉された粒子のほとんどは数秒または数時間以内に粘膜組織から除去され得る。低分子量ポリエチレングリコール (PEG) で高密度にコーティングされている高分子ポリマーナノ粒子 (直径200nm~500nm) は、水に拡散する同じ粒子よりもわずかに4~6倍低い粘液を通して拡散した (Lai et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:1482-1487、Lai et al. (2009) Adv Drug Deliv Rev. 61:158-171)。ナノ粒子の輸送は、光退色後蛍光回復法 (FRAP) 及び高解像度の複数粒子追跡 (MPT) を含むがこれらに限定されない浸透速度及び/または蛍光顕微鏡技術を使用して決定され得る。非限定的な例として、粘膜バリアを透過することができる組成物は、米国特許第8,241,670号に記載されるように作製することができる。

【0294】

粘液を透過するように操作された脂質ナノ粒子は、ポリマー材料 (すなわち、ポリマーコア) 及び/またはポリマー-ビタミン複合体及び/またはトリブロックポリマーを含むことができる。ポリマー材料は、これらに限定されないが、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリ尿素、ポリカーボネート、ポリ (スチレン)、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、及びポリアリレートを含むことができる。ポリマー材料は、生分解性及び/または生体適合性であり得る。ポリマー材料は、さらに照射することができる。非限定的な例として、ポリマー材料は、ガンマ線照射することができる (例えば、PCT公開第WO2012/082165を参照されたい)。特定のポリマーの非限定的な例には、ポリ (カプロラクトン) (PCL)、エチレン酢酸ビニルポリマー (EVA)、ポリ (乳酸) (PLA)、ポリ (L-乳酸) (PLLA)、ポリ (グリコール酸) (PGA)、ポリ (乳酸-co-グリコール酸) (PLGA)、ポリ (L-乳酸-co-グリコール酸) (PLPGA)、ポリ (D, Lラクチド) (PDLA)、ポリ (L-ラクチド) (PLLA)、ポリ (D, Lラクチド-co-カプロラクトン)、ポリ (D, Lラクチド-co-カプロラクトン-co-グリコリド)、ポリ (D, Lラクチド-co-PEO-co-D, Lラクチド)、ポリ (D, Lラクチド-co-PPO-co-D, Lラクチド)、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリウレタン、ポリ-L-リジン (PLL)、ヒドロキシプロピルメタクリレート (HPMA)、ポリエチレングリコール、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ (ヒドロキシ酸)、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリ (エステルアミド)、ポリアミド、ポリ (エステルエーテル)、ポリカーボネート、ポリエチレンやポリプロピレンなどのポリアルキレン、ポリ (エチレングリコール) (PEG

）などのポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド（PEO）、ポリ（エチレンテレフタレート）などのポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルエーテル、ポリ（酢酸ビニル）などのポリ酢酸エステル、ポリ（塩化ビニル）（PVC）などのポリ塩化ビニル、ポリビニルピロリドン、ポリシロキサン、ポリスチレン（PS）、ポリウレタン、アルキルセルロースなどの誘導体化セルロース、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、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリ（メチル（メタ）アクリレート）（PMMA）、ポリ（エチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ブチル（メタ）アクリレート）、ポリ（イソブチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ヘキシル（メタ）アクリレート）、ポリ（イソデシル（メタ）アクリレート）、ポリ（ラウリル（メタ）アクリレート）、ポリ（フェニル（メタ）アクリレート）、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）などのアクリル酸のポリマー、ならびにそれらのコポリマー及び混合物、ポリジオキサノン及びそのコポリマー、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリプロピレンフマレート、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポリ（オルト）エステル、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド－コーカプロラクトン）、ならびに炭酸トリメチレン、ポリビニルピロリドンが含まれる。脂質ナノ粒子は、これらに限定されないが、ブロックコポリマー、及び（ポリ（エチレングリコール））－（ポリ（プロピレンオキシド））－（ポリ（エチレングリコール））トリブロックコポリマーなどのコポリマーで被覆または結合することができる（例えば、米国特許公開第2012/0121718号、及び第2010/0003337号、ならびに米国特許第8,263,665を参照されたい）。コポリマーは、一般に安全と見なされている（GRAS）ポリマーであり得、脂質ナノ粒子の形成は、新しい化学物質が作製されないような方法で行うことができる。例えば、脂質ナノ粒子は、PLGAナノ粒子をコーティングするポロキサマーを含むことができ、新しい化学物質を形成することなく、ヒトの粘液に急速に透過することができる（Yang et al. (2011) Angew. Chem. Int. Ed. 50: 2597-2600）。

【0295】

例えば、本発明により包含されるLNPは、PLGA-PEGブロックコポリマー（例えば、米国特許公開第2012/0004293号及び米国特許第8,236,330号を参照されたい）、PEG及びPLAまたはPEG及びPLGAのジブロックコポリマー（例えば、米国特許第8,246,968号を参照されたい）、マルチブロックコポリマー（例えば、米国特許第8,263,665号及び第8,287,910号）、非高分子ミセル及びブロックコポリマーを含むポリイオン複合体（例えば、米国特許公開第2012/00768号を参照されたい）、またはこれらに限定されないが、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ（アミドアミン）デンドリマー、ポリ（ペーターアミノエステル）などのアミン含有ポリマー（例えば、米国特許第8,287,849号を参照されたい）を含むことができる。

【0296】

本発明により包含されるLNPは、アクリルポリマーなどの1つ以上の他のポリマーを含むことができる。アクリルポリマーは、これらに限定されないが、アクリル酸、メタクリル酸及びメタクリル酸コポリマー、メタクリル酸メチルコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリシアノアクリレート、ならびにそれらの組み合わせを含むことができる。

【0297】

本発明により包含されるLNPは、ポリカチオン性側鎖を含み得る少なくとも1つの分解性ポリエステルを含み得る。分解性ポリエステルには、これらに限定されないが、ポリ（セリンエステル）、ポリ（L-ラクチド－c o -L-リジン）、ポリ（4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル）、及びそれらの組み合わせが含まれる。別の実施形態では、分

10

20

30

40

50

の複合体リポプレックス技術、STEMGENT（登録商標）（Cambridge, MA）からのSTEMFECT（商標）、ならびにポリエチレンイミン（PEI）またはプロタミン系の標的化及び非標的化送達の治療剤など、リポプレックスとして製剤化することができる（Aleku et al. (2008) Cancer Res. 68:9788-9798、Strumberg et al. (2012) Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. (2012) 50:76-78、Santel et al. (2006) Gene Ther. 13:1222-1234、Santel et al. (2006) Gene Ther. 13:1360-1370、Gutbier et al. (2010) Pulm. Pharmacol. Ther. 23:334-344、Kaufmann et al. (2010) Microvasc. Res. 80:286-293、Weide et al. (2009) J. Immunother. 32:498-507、Weide et al. (2008) J. Immunother. 31:180-188、Pascolo (2004) Exp. Opin. Biol. Ther. 4:1285-1294、Fotin-Mleczek et al. (2011) J. Immunother. 34:1-15、Song et al. (2005) Nature Biotechnol. 23:709-717、Peer et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 6:4095-4100、及びdeFougerolles (2008) Hum. Gene Ther. 19:125-132)。

10

【0303】

20

いくつかの実施形態では、本発明により包含される治療剤及び組成物は、合成ナノ担体にカプセル化され、連結され、及び／または関連付けられ得る。合成ナノ担体には、これらに限定されないが、国際公開第WO2010/005740号、第WO2010/030763号、第WO2012/13501号、第WO2012/149252号、第WO2012/149255号、第WO2012/149259号、第WO2012/149265号、第WO2012/149268号、第WO2012/149282号、第WO2012/149301号、第WO2012/149393号、第WO2012/149405号、第WO2012/149411号、及び第WO2012/149454号、ならびに米国特許公開第2011/0262491号、第2010/0104645号、第2010/0087337号、及び第2012/0244222号に記載されるものが含まれる。別の実施形態では、合成ナノ担体製剤は、PCT公開第WO2011/072218号、及び米国特許第8,211,473号に記載される方法などによって凍結乾燥することができる。

30

【0304】

いくつかの実施形態では、合成ナノ担体は、本明細書に記載される複合体を放出するための反応性基を含むことができる（例えば、PCT公開第WO2012/0952552号、及び米国特許公開第2012/0171229号を参照されたい）。一実施形態では、合成ナノ担体は、標的放出のために製剤化することができる。一実施形態では、合成ナノ担体は、特定のpHで及び／または所望の時間間隔後に治療剤を放出するように製剤化される。非限定的な例として、合成ナノ粒子は、24時間後及び／または4.5のpHで複合体を放出するように製剤化することができる（例えば、PCT公開第WO2010/138193号、及び第WO2010/138194号、ならびに米国特許公開第2011/0020388号、及び第2011/0027217号を参照されたい）。いくつかの実施形態では、合成ナノ担体は、本明細書に記載される複合体の制御性及び／または徐放性放出のために製剤化することができる。非限定的な例として、徐放性放出のための合成ナノ担体は、本明細書に記載される及び／またはPCT公開第WO2010/138192号、及び米国特許公開第2010/0303850号に記載される、当該技術分野で即知である方法によって製剤化することができる。

40

【0305】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、経口投与のために最適化することができる。ナ

50

ノ粒子は、キトサンまたはその誘導体などであるがこれらに限定されない、少なくとも1つのカチオン性生体高分子を含むことができる。非限定的な例として、ナノ粒子は、米国特許公開第2012/0282343号に記載される方法によって製剤化することができる。

【0306】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤はまた、天然及び／または合成ポリマーを使用して製剤化することができる。薬物送達に使用できるポリマーの非限定的な例には、これらに限定されないが、MIRUS（登録商標）Bio（Madison, WI）及びRoche Madison（Madison, WI）からのDYNAMIC POLYCONJUGATE（登録商標）（Arrowhead Research Corp., Pasadena, CA）製剤、PHASERX（商標）ポリマー製剤、限定されないが、例えば、SMARTT POLYMER TECHNOLOGY（商標）（Seattle, WA）、DMRI/DOPE、ポロキサマー、Vical（San Diego, CA）からのVAXFECTIN（登録商標）アジュバント、キトサン、Calandro Pharmaceuticals（Pasadena, CA）からのシクロデキストリン、デンドリマー及びポリ（乳酸-c o -グリコール酸）（PLGA）ポリマー、RONDEL（商標）（RNAi/オリゴヌクレオチドナノ粒子送達）ポリマー（Arrowhead Research Corporation, Pasadena, CA）、ならびにpH応答性コブロックポリマー、限定されないが、例えば、PHASERX（商標）（Seattle, WA）が含まれる。例えば、本発明により包含される薬剤及び組成物は、ポリ（アルキレンイミン）、生分解性カチオン性リポポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ポリマー、もしくは生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルポリマー、生分解性ポリエステルランダムコポリマー、線状生分解性コポリマー、PAGA、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマー、またはそれらの組み合わせを含む薬学的化合物に製剤化することができる。

【0307】

本発明で使用されるポリマーは、これに限定されないが、ポリマーの表面への細菌などの望ましくない物質の付着を低減及び／または阻害するための処理を受けてもよい。ポリマーは、当該技術分野で即知である及び／または記載されている及び／またはPCT公開第WO2011/50467号に記載されている方法によって処理することができる。

【0308】

ナノ粒子は、1つ以上のポリマーを含むことができる。ポリマーは、本明細書で「PGA」と称されるグリコール酸単位、及び乳酸単位を含むホモポリマー、例えば、ポリ-L-乳酸、ポリ-D-乳酸、ポリ-D、L-乳酸、ポリ-L-ラクチド、ポリ-D-ラクチド、及びポリ-D、L-ラクチド、本明細書では総称して「PLA」と称され、及びカプロラクトン単位、例えば、ポリ（-カプロラクトン）、本明細書で総称して「PCL」と称され、乳酸及びグリコール酸単位を含むコポリマー、例えば、乳酸：グリコール酸の比率を特徴とするポリ（乳酸-c o -グリコール酸）及びポリ（ラクチド-c o -グリコリド）の様々な形態、本明細書では総称して「PLGA」と称され、及びポリアクリレート、ならびにそれらの誘導体のポリエステルのうちの1つ以上を含むことができる。ε例示的なポリマーには、ポリエチレングリコール（PEG）及び前述のポリエステルのコポリマー、例えば、本明細書で総称して「PEG化ポリマー」と称される様々な形態のPLGA-PEGまたはPLA-PEGコポリマーも含まれる。ある特定の実施形態では、PEG領域は、ポリマーと共有結合して、切断可能なリンカーによって「PEG化ポリマー」を生成することができる。

【0309】

ナノ粒子は、1つ以上の親水性ポリマーを含むことができる。親水性ポリマーには、澱粉及び多糖類などのセルロース系ポリマー；親水性ポリペプチド；ポリ-L-グルタミン酸（PGS）、ガンマーポリグルタミン酸、ポリ-L-アスパラギン酸、ポリ-L-セリ

ン、またはポリーＬーリジンなどのポリ（アミノ酸）；ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、及びポリ（エチレンオキシド）（PEO）などのポリアルキレングリコールならびにポリアルキレンオキシド；ポリ（オキシエチル化ポリオール）；ポリ（オレフィンアルコール）；ポリビニルピロリドン）；ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）；ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）；ポリ（糖類）；ポリ（ヒドロキシ酸）；ポリビニルアルコール）；ポリオキサゾリン；及びそのコポリマーが含まれる。

【0310】

ナノ粒子は、１つ以上の疎水性ポリマーを含むことができる。好適な疎水性ポリマーの例には、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、及びポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）などのポリヒドロキシ酸；ポリ３－ヒドロキシブチレートまたはポリ４－ヒドロキシブチレートなどのポリヒドロキシアルカノエート；ポリカプロラクトン；ポリ（オルトエステル）；ポリ無水物；ポリ（フォスファゼン）；ポリ（ラクチド－ｃｏ－カプロラクトン）；チロシンポリカーボネートなどのポリカーボネート；ポリアミド（合成及び天然ポリアミドを含む）、ポリペプチド、及びポリ（アミノ酸）；ポリエステルアミド；ポリエステル；ポリ（ジオキサノン）；ポリ（アルキレンアルキレート）；疎水性ポリエーテル；ポリウレタン；ポリエーテルエステル；ポリアセタール；ポリシアノアクリレート；ポリアクリレート；ポリメチルメタクリレート；ポリシロキサン；ポリ（オキシエチレン）／ポリ（オキシプロピレン）コポリマー；ポリケタール；ポリリン酸；ポリヒドロキシ吉草酸；ポリアルキレンシュウ酸；コハク酸ポリアルキレン；ポリ（マレイン酸）、ならびにそれらのコポリマーが含まれる。

【0311】

特定の実施形態では、疎水性ポリマーは、脂肪族ポリエステルである。いくつかの実施形態では、疎水性ポリマーは、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、またはポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）である。

【0312】

ナノ粒子は、１つ以上の両親媒性ポリマーを含み得る。両親媒性ポリマーは、疎水性ポリマーブロック及び親水性ポリマーブロックを含むポリマーであり得る。疎水性ポリマーブロックは、上記の疎水性ポリマーのうちの１つ以上、またはその誘導体もしくはコポリマーを含むことができる。親水性ポリマーブロックは、上記の親水性ポリマーのうちの１つ以上、またはその誘導体もしくはコポリマーを含むことができる。いくつかの実施形態では、両親媒性ポリマーは、疎水性ポリマーから形成された疎水性末端及び親水性ポリマーから形成された親水性末端を含むジブロックポリマーである。いくつかの実施形態では、部分は、疎水性末端、親水性末端、またはその両方に付着させることができる。粒子は、２つ以上の両親媒性ポリマーを含むことができる。

【0313】

ポリマーはまた、これらに限定されないが、ポリエテン、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ（１ーリジン）（PLL）、PLLにグラフトされたPEG、カチオン性リポポリマー、生分解性カチオン性リポポリマー、ポリエチレンイミン（PEI）、架橋分岐ポリ（アルキレンイミン）、ポリアミン誘導体、修飾ポロキサマー、生分解性ポリマー、弾性生分解性ポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、マルチブロックコポリマー、線状生分解性コポリマー、ポリ〔α－（４－アミノブチル）－Ｌ－グリコール酸〕（PAGA）、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマー、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピレンフメレート、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリジン、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌーリジン

）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）、アクリルポリマー、アミン含有ポリマー、デキストランポリマー、デキストランポリマー誘導体、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【０３１４】

ポリマーは、架橋可能なポリエステルであり得る。架橋可能なポリエステルには、当該技術分野で即知であり、米国特許公開第２０１２／０２６９７６１号に記載されるものが含まれる。

【０３１５】

ナノ粒子は、１つ以上の生分解性ポリマーを含むことができる。生分解性ポリマーには、体内で化学的または酵素的に水溶性材料に変換される、水に不溶性または難溶性のポリマーが含まれ得る。生分解性ポリマーには、架橋ポリマーを水に不溶性または難溶性にするために、加水分解性架橋基によって架橋される可溶性ポリマーが含まれ得る。

【０３１６】

生分解性ポリマーは、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、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、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、及びそれらのコポリマー、アルキルセルロース、例えば、メチルセルロース及びエチルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、例えば、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、及びヒドロキシブチルメチルセルロース、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、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシルエチルセルロース、三酢酸セルロース、硫酸セルロースナトリウム塩、アクリル酸及びメタクリル酸エステルのポリマー、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（ビニルアルコール）、ポリ（酢酸ビニル、ポリ塩化ビニルポリスチレン、及びポリビニルピロリドン、それらの誘導体、それらの線状及び分岐状コポリマー及びブロックコポリマー、ならびにそれらのブレンドを含むことができる。例示的な生分解性ポリマーには、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（ヒドロキシアルカノエート）、ポリ（ヒドロキシ吉草酸）、ポリ無水物、ポリ（アクリル酸）、ポリグリコリド、ポリ（ウレタン）、ポリカーボネート、ポリホスフェートエステル、ポリホスファゼン、それらの誘導体、それらの線状及び分岐状コポリマー及びブロックコポリマー、ならびにそれらのブレンドが含まれる。いくつかの実施形態では、粒子は、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、及びポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）などの生分解性ポリエステルまたはポリ無水物を含む。

【０３１７】

分解性ポリエステルは、ポリカチオン性側鎖を含み得ない。分解性ポリエステルには、これらに限定されないが、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リジン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）、及びそれらの組み合わせが含まれる。別の実施形態では、分解性ポリエステルは、ＰＥＧ化されたポリマーを形成するためのＰＥＧ複合体を含むことができる。

【０３１８】

生分解性カチオン性リポポリマーは、米国特許第６，６９６，０３８号、ならびに米国特許公開第２００３／００７３６１９号、及び第２００４／０１４２４７４号に記載されているものなどの当該技術分野で即知である方法によって作製することができる。ポリ（アルキレンイミン）は、米国特許公開第２０１０／０００４３１５号に記載されているも

のなどの当該技術分野で即知である方法を使用して作製することができる。生分解性ポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルポリマー、または生分解性ポリエステルランダムコポリマーは、米国特許第 6, 517, 869 号、及び第 6, 267, 987 号に記載されているものなどの当該技術分野で即知である方法を使用して作製することができる。線状生分解性カチオン性ポリマーは、米国特許第 6, 652, 886 号に記載されているものなどの当該技術分野で即知である方法を使用して作製することができる。PAGA ポリマーは、米国特許第 6, 217, 912 号に記載されているものなどの当該技術分野で即知である方法を使用して作製することができる。PAGA ポリマーを共重合して、これらに限定されないが、ポリ-L-リジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、ヒストン、アビジン、プロタミン、ポリラクチド、及びポリ(ラクチド-co-グリコリド)などのポリマーとコポリマーまたはブロックコポリマーを形成することができる。生分解性架橋カチオン性マルチブロックポリマーは、米国特許第 8, 057, 821 号、及び米国特許公開第 2012/009145 号に記載されているものなどの当該技術分野で即知である方法を使用して作製することができる。例えば、マルチブロックコポリマーは、分岐ポリエチレンイミンと比較して異なるパターンを有する線状ポリエチレンイミン(LPEI)ブロックを使用して合成することができる。

【0319】

本明細書に記載されるポリマーは、脂質末端PEGに複合することができる。非限定的な例として、PLGAは、PLGA-DSPE-PEGを形成する脂質末端PEGに複合することができる。別の非限定的な例として、本発明に従って使用するためのPEG複合体は、PCT公開第WO2008/103276号に記載される。ポリマーは、米国特許第 8, 273, 363 号に記載される複合体などであるがこれに限定されないリガンド複合を使用して複合化することができる。

【0320】

ポリマーナノ粒子は、キトサンを含むこともできる。キトサン製剤は、正に電荷したキトサンのコア及び負に電荷した基質の外側部分を含む(例えば、米国特許公開第 2012/0258176号を参照されたい)。キトサンには、これらに限定されないが、N-トリメチルキトサン、モノ-N-カルボキシメチルキトサン(MCC)、N-パルミトイルキトサン(NPCS)、EDTA-キトサン、低分子量キトサン、キトサン誘導体、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0321】

ポリマーナノ粒子は、PLGAを含むこともできる。PLGA製剤は、PLGA注入可能デポー(例えば、PLGAを66%N-メチル-2-ピロリドン(NMP)に溶解することによって形成され、その残留物が水性溶媒及びリユープロリドである、ELIGARD(登録商標)を含み得るが、これらに限定されない。注入されると、PLGA及びリユープロリドペプチドが皮下腔に沈殿する。他の例では、PLGA微粒子は、調整可能な放出速度(例えば、日及び週)でPLGA微粒子を調製し、カプセル化プロセス中に薬剤の完全性を維持しながら、PLGA微粒子に活性薬剤をカプセル化することによって製剤化することができる。

【0322】

いくつかの実施形態では、前臨床徐放性インプラント用途(例えば、徐放性製品Ocuser[®]、緑内障または黄体ホルモンのためのピロカルピン点眼インサート、徐放性黄体ホルモン子宮内デバイス;経皮送達システムTestoderm、Duragesic、及びSellegiline;ならびにカテーテル)で広く使用される非生分解性、生体適合性ポリマーであるEvacが使用される。ポロキサマーF-407 NFは、5℃未満の温度で低粘度を有し、15℃を超える温度で固体ゲルを形成する、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンの親水性非イオン性界面活性剤トリブロックコポリマーである。PEG系外科用シーラントは、1分で調製でき、3分で密封し、30日以内に再吸収される送達デバイス内で混合された2つの合成PEG成分を含む。GE

L S I T E（登録商標）及び天然ポリマーは、投与部位でインサイチュゲル化することができる。それらは、安定化効果を提供するために、イオン相互作用を介してタンパク質及びペプチド治療候補と相互作用することが示されている。

【0323】

本発明に従う有用なポリマーナノ粒子の他の代表的な例には、米国特許第6, 177, 274号に記載されるようにPLLでグラフト化されたPEGのポリマー化合物、ならびにカチオン性ポリマーを含む溶液もしくは媒体中、乾燥薬学的組成物中、または米国特許公開第2009/0042829号、及び第2009/0042825号に記載されるように乾燥することができる溶液中の懸濁液が含まれる。

【0324】

ポリアミン誘導体を使用して、本発明により包含される治療剤及び組成物を送達するか、あるいは疾患を治療及び／または予防するか、または移植可能または注入可能なデバイスに含めることができる（米国特許公開第2010/0260817号）。非限定的な例として、本発明により包含される薬剤は、炭水化物ジアジドモノマーを、オリゴアミンを含むジルキン結合体と組み合わせることによって調製された、1, 3-双極子付加ポリマーを含むポリアミドポリマーを使用して送達することができる（米国特許第8, 236, 280号）。

【0325】

他のポリマーは、アクリルポリマー、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸及びメタクリル酸コポリマー、メタクリル酸メチルコポリマー、メタクリル酸エトキシエチル、メタクリル酸シアノエチル、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリシアノアクリレート、ならびにそれらの組み合わせ、またはアミン含有ポリマー、例えば、これらに限定されないが、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ（アミドアミン）デンドリマー、もしくはそれらの組み合わせ、またはPEG電荷変換ポリマー（Pitella et al. (2011) Biomat. 32:3106-3114）を含むことができる。

【0326】

ポリマーナノ粒子は、ジブロックコポリマーをさらに含むことができる一実施形態では、ジブロックコポリマーは、ポリマー、例えば、これらに限定されないが、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピレンフメレート、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリジン、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（L-ラクチド-co-L-リジン）、ポリ（4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル）、またはそれらの組み合わせと組み合わせてPEGを含むことができる。いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤は、PLGA-PEGブロックコポリマー（例えば、米国特許公開第US2012/0004293号及び米国特許第8, 236, 330号を参照されたい）またはPLGA-PEG-PLGAブロックコポリマー（例えば、米国特許第6, 004, 573号を参照されたい）で製剤化することができる。非限定的な例として、本発明により包含される薬剤は、PEG及びPLAまたはPEG及びPLGAのジブロックコポリマーで製剤化することができる（例えば、米国特許第8, 246, 968号を参照されたい）。

【0327】

いくつかの実施形態では、ポリマーナノ粒子は、親水性-疎水性ポリマー（例えば、PEG-PLGA）、疎水性ポリマー（例えば、PEG）、及び／または親水性ポリマー（例えば、PCT公開第WO2012/0225129号を参照されたい）などであるがこれらに限定されない複数のポリマーを含むことができる。

【0328】

いくつかの実施形態では、ポリマーナノ粒子は、治療用ナノ粒子として製剤化すること

10

20

30

40

50

ができる。治療用ナノ粒子は、本明細書に記載され、これらに限定されないが、PCT公開第WO2010/005740号、第WO2010/030763号、第WO2010/005721号、第WO2010/005723号、及び第WO2012/054923号、ならびに米国特許公開第2011/0262491号、第2010/0104645号、第2010/0087337号、第2010/0068285号、第2011/0274759号、第2010/0068286号、第2012/0288541号、ならびに米国特許第8,206,747号、第8,293,276号、第8,318,208号、及び第8,318,211号などの当該技術分野で即知である方法及びポリマーによって製剤化することができる。いくつかの実施形態では、治療用ポリマーナノ粒子は、米国特許公開第2012/0140790号に記載される方法によって同定することができる。

10

【0329】

ポリマー製剤はまた、これらに限定されないが、葉酸、トランスフェリン、及びN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) によって例示されるように、異なるリガンドの発現を介して選択的に標的化することができる (Benoit et al. (2011) Biomacromol. 12:2708-2714、Rozema et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:12982-12887、Davis (2009) Mol. Pharm. 6:659-668、Davis (2010) Nature 464:1067-1070)。

【0330】

いくつかの実施形態では、本発明により包含されるポリマー製剤は、カチオン性担体を含むことができるポリマー製剤を、コレステロール及びポリエチレングリコール基に共有結合することができるカチオン性リポポリマーと接触させることによって安定化することができる。ポリマー製剤は、米国特許公開第2009/0042829号に記載される方法を使用してカチオン性リポポリマーと接触させることができる。カチオン性担体は、これらに限定されないが、ポリエチレンイミン、ポリ(トリメチルエニミン)、ポリ(テトラメチレンイミン)、ポリプロピレンイミン、アミノグリコシド-ポリアミン、ジデオキシ-ジアミノ-b-シクロデキストリン、スペルミン、スペルミジン、ポリ(2-ジメチルアミノ)エチルメタクリレート、ポリ(リジン)、ポリ(ヒスチジン)、ポリ(アルギニン)、カチオン化ゼラチン、デンドリマー、キトサン、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン (DOTAP)、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、1-[2-(オレイルオキシ)エチル]-2-オレイル-3-(2-ヒドロキシエチル)イミダゾリニウムクロリド (DOTIM)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパナミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、3B-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール塩酸塩 (DC-コレステロールHCl) ジヘプタデシルアミドグリシルスペルミジン (DOGS)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロプ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、及びそれらの組み合わせを含むことができる。

20

30

40

【0331】

本発明により包含される複合体は、1つ以上のポリマーのポリプレックスを製剤化することができる (例えば、米国特許公開第2012/0237565号及び第2012/0270927号を参照されたい)。一実施形態では、ポリプレックスは、2つ以上のカチオン性ポリマーを含む。カチオン性ポリマーは、線状PEIなどのポリ(エチレンイミン) (PEI) を含むことができる。

【0332】

いくつかの実施形態では、他の形態のナノ粒子を使用することができる。

50

【0333】

例えば、本発明により包含される薬剤及び組成物は、ポリマー、脂質、及び／またはリン酸カルシウムなどであるがこれらに限定されない他の生分解性薬剤の組み合わせを使用して、ナノ粒子として製剤化することができる。成分は、コアシェル、ハイブリッド、及び／または層ごとの構造で組み合わせることができ、ナノ粒子の微調整を可能にし、本発明により包含される組成物の送達を可能にする。脂質及び／またはポリマーと組み合わせた生分解性リン酸カルシウムナノ粒子は、インビボで治療薬を送達することが示されている。一実施形態では、アニサミドなどの標的化リガンドも含むことができる脂質コーティングされたリン酸カルシウムナノ粒子を使用して、本発明により包含される組成物を送達することができる（例えば、Li et al. (2010) J. Contr. Rel. 142: 416-421、Li et al. (2012) J. Contr. Rel. 158: 108-114、Yang et al. (2012) Mol. Ther. 20: 609-615を参照されたい）。この送達システムは、薬剤の送達を改善するために、標的ナノ粒子及び成分の両方を組み合わせて、エンドソーム回避、リン酸カルシウムを増強する。

10

【0334】

いくつかの実施形態では、粒子は、上記の1つ以上の複合体及び対イオンによって形成される疎水性イオン対錯体または疎水性イオン対であり得る。

【0335】

いくつかの実施形態では、コアシェルナノ粒子は、薬学的製剤に使用することができる。コアシェルナノ粒子の使用は、カチオン性架橋ナノゲルコア及び様々なシェルを合成するためのハイスループットアプローチにさらに焦点を合わせている（Siegwart et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108: 12996-13001）。ポリマーナノ粒子の複合体形成、送達、及び内部移行は、ナノ粒子のコア及びシェル成分の両方における化学組成を改変することによって正確に制御することができる。例えば、コアシェルナノ粒子は、コレステロールをナノ粒子と共有結合させた後、マウス肝細胞に治療剤を効率的に送達できる。本発明により包含される組成物と共に使用するためのコアシェルナノ粒子が記載されており、米国特許第8,313,777号に記載される方法によって形成することができる。

20

【0336】

無機ナノ粒子は、物理的、化学的、光学的、及び電子的特性の組み合わせを示し、疾患の画像化及び診断、治療剤の選択的送達、ならびに治療レジメンへの感受性な細胞及び組織への高度に多機能なプラットフォームを提供する。いかなる理論に束縛されることも望まず、無機ナノ粒子の増強された透過性及び保持（EPR）効果は、多くの高分子量薬物の選択的蓄積の基礎を提供する。循環する無機ナノ粒子は、腫瘍部位及び炎症組織に優先的に蓄積し（Yuan et al. (1995) Cancer Res. 55: 3752-3756）、拡散性が低いために留まり続ける（Pluen et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 4628-4633）。無機ナノ粒子のサイズは、10 nm～500 nm、10 nm～100 nm、または100 nm～500 nmであり得る。無機ナノ粒子は、金属（金、鉄、銀、銅、ニッケルなど）、酸化物（ZnO、TiO₂、Al₂O₃、SiO₂、酸化鉄、酸化銅、酸化ニッケルなど）、または半導体（CdS、CdSeなど）を含むことができる。無機ナノ粒子はまた、パーフルオロカーボンまたはFeCoであり得る。

30

40

【0337】

無機ナノ粒子は、単位体積あたりの表面積が大きい。したがって、それらは、高密度で治療剤及び造影剤を負荷することができる。共有結合、静電相互作用、捕捉、及びカプセル化を含むがこれらに限定されない、様々な方法を使用して、無機ナノ粒子内に／上に治療剤をロ負荷することができる。治療剤の薬物負荷に加えて、無機ナノ粒子は、表面上の腫瘍標的化リガンドなどの標的化部分で機能化することができる。無機ナノ粒子を用いて治療剤を製剤化することは、治療剤のイメージング、検出、及びモニタリングを可能とす

50

る。

【0338】

いくつかの実施形態では、本発明に包括される薬剤及び組成物は、疎水性であり、水溶性双性イオン性リガンドで官能化された金ナノ粒子と動力学的に安定な複合体を形成することができる（例えば、Kim et al. (2009) JACS 131:1360-1361を参照されたい）。

【0339】

本発明により包含される薬剤及び組成物は、金ナノシェルで製剤化することができる。非限定的な例として、組成物は、ポリマー及び金ナノシェルを含む温度感受性システムで送達することができ、光熱的に放出することができる（例えば、Sershen et al. (2000) J. Biomed. Mater. 51:293-298を参照されたい）。1064nmでの照射はナノシェルによって吸収され、熱に変換され、これにより、水素が崩壊し、薬物が放出される。薬剤は、薬剤とナノ粒子との間の共有結合などによって、中空の金ナノシェル内にカプセル化することもできる。金ナノ粒子への共有結合は、遊離チオール、アミン、またはカルボン酸官能基などのリンカーを介して達成され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、金ナノ粒子の表面に配置される。いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤は、リンカーを含むように修飾され得る。リンカーは、生物学的環境における粒子の安定性を増強し、薬物負荷の密度を制御するために、様々な長さのPEGまたはオリゴエチレングリコール部分を含み得る。PEGまたはオリゴエチレングリコール部分は、望ましくない生体分子の非特異的吸着も最小限に抑える。PEGまたはオリゴエチレングリコール部分は、分岐または線状であり得る（例えば、Tong et al. (2009) Langmuir 25:12454-12549を参照されたい）。本発明により包含される薬剤は、アミン官能化金ナノ粒子につながることができる（例えば、Lippard et al. (2009) JACS 131:14652-14653を参照されたい）。Pt(IV)-金ナノ粒子複合体の細胞傷害性効果は、遊離Pt(IV)剤及び遊離シスプラチンよりも高い。

【0340】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤は、鉄、コバルト、ニッケル、及びそれらの酸化物から作製されたものなどの磁性ナノ粒子、または水酸化鉄ナノ粒子で製剤化することができる。局所的な磁場勾配を使用して、磁性ナノ粒子を選択した部位に誘引し、治療が完了するまでそれらを保持し、次にそれらを除去することができる（例えば、Alexiou et al. (2000) Cancer Res. 60:6641-6648を参照されたい）。いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤は、リンカーを用いて磁性ナノ粒子と結合することができる。リンカーは、分子内環化を受けて離型剤を放出することができるリンカーであり得る。開示されている任意のリンカー及びナノ粒子を使用することができる（例えば、PCT公開第WO2014/124329号を参照されたい）。環状化は、磁性ナノ粒子を加熱することによって、または磁性ナノ粒子に交流電磁界を印加することによって誘発することができる。

【0341】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤は、酸化鉄ナノ粒子に負荷される。いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤は、酸化鉄(SPIO)からなるコアに基づく超常磁性ナノ粒子で製剤化される。SPIOは、無機材料（シリカ、金など）または有機材料（リン脂質、脂肪酸、多糖類、ペプチド、または他の界面活性剤及びポリマー）で被覆されており、薬物、タンパク質、またはプラスミドでさらに機能化することができる。

【0342】

一実施形態では、水分散性オレイン酸(OA)-ポリキサマーでコーティングされた酸化鉄磁性ナノ粒子を使用して（例えば、Jain Mol. Pharm. (2005) 2:194-205を参照されたい）、薬剤を送達することができる。薬剤は、酸化鉄ナノ粒子を包囲するOAシェルに分配され得、ポリキサマーコポリマー（例えば、ブルロニッ

ク（登録商標））は、製剤に水分散性を与える。

【0343】

いくつかの実施形態では、リン酸部分を有するナノ粒子は、本発明により包含される薬剤を送達するために使用される（例えば、米国特許第8,828,975号を参照されたい）。ナノ粒子は、金、酸化鉄、二酸化チタン、酸化亜鉛、二酸化スズ、銅、アルミニウム、セレン化カドミウム、二酸化ケイ素、及び／またはダイヤモンドを含むことができる。ナノ粒子は、表面上にPEG部分を含み得る。

【0344】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤は、マクロファージ及び他の免疫細胞などの細胞の透過を増加させるために、ペプチド及び／または他の複合体で製剤化され得る。一実施形態では、これらに限定されないが、細胞透過性ペプチド、ならびに細胞内送達を可能にするタンパク質及びペプチドなどのペプチドを使用して、薬学的製剤を送達することができる。本発明により包含される薬剤と共に使用することができる細胞透過性ペプチドの非限定的な例には、細胞内空間への送達を促進するポリカチオンに付着した細胞透過性ペプチド配列、例えば、HIV由来TATペプチド、ペネトラチン、トランスポタン、またはhCT由来細胞透過性ペプチドが挙げられる（例えば、Caron et al. (2001) Mol. Ther. 3:310-318、Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL, 2002)、El-Andalousi et al. (2003) Curr. Pharm. Des. 11:3597-35611、及びDeshayes et al. (2005) Cell. Mol. Life Sci. 62:1839-1849を参照されたい）。

【0345】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤は、標的化細胞（例えば、単球、マクロファージなど）への活性薬剤（例えば、siRNA分子）の送達を増強する1つ以上の複合体をさらに含み得る。複合体は、目的の細胞を特異的に標的化するために脂質製剤に組み込むことができるリガンドであり得る。脂質粒子薬物送達のためのリガンド標的化戦略を使用することは、潜在的に標的特異性を増加させ、細胞内送達を誘発するためのカチオン性脂質の必要性を回避するという利点を有する。リガンドは、ペプチド、抗体、タンパク質、多糖類、糖脂質、糖タンパク質、及びレクチンを含むことができ、これらは、単核貪食細胞の特徴的な受容体発現お及び貪食作用の生来のプロセスを利用する。

【0346】

いくつかの実施形態では、複合化されたリガンドは、細胞特異的標的化及び細胞取り込みを改善することができる細胞標的化ペプチド（CTP）または細胞透過性ペプチド（CPP）であり得る。ペプチドのいくつかの例には、これらに限定されないが、ムラミルトリペプチド（MTP）、RGDペプチド、単球と選択的に結合するGGPペプチドが含まれる（Karathanasis et al. (2009) Ann. Biomed. Engin. 37:1984-1992）。マクロファージペプチド標的化剤はまた、フェージディスプレイ及び配列決定から同定されたものを含み得る（例えば、Liu et al. (2015) Bioconj. Chem. 26:1811-1817を参照されたい）。いくつかの実施形態では、リガンドは、抗体及びその断片であり得る。単球及びマクロファージに特異的な例示的な抗体には、抗VCAM-1抗体、抗CC52抗体、抗CC531抗体、抗CD11c/DEC-205抗体が含まれる。例えば、抗体は、リポソームの表面に結合するか、Fc領域を介してリポソームに付着したPEGと遠位に結合させることができる。

【0347】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質粒子にアルキルマンノシド、Mann-C4-Chol、Mann-His-C4-Chol、Man2DOG、4-アミノフェニル- α -D-マンノピラノシド、アミノフェニル- α -D-マンノピラノシド、及びMan3-DPPEなどのレクチンを組み込むことによってマンノシル化することができる。

肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ、単球由来樹状細胞、及びクッパー細胞を含む免疫細胞は、高レベルのマンノース受容体（MR）を構成的に発現する。したがって、マクロファージ及びDCは、マンノシル化脂質ナノ粒子を介して標的化することができる。

【0348】

他のリガンドには、マレイル化ウシ血清アルブミン（MBSA）、オーステロールアミロペクチン（O-SAP）、及びフィブロネクチンも含まれる（例えば、Ahsan et al. (2002) J. Cont. Rel. 79: 29-40、Vyas et al. (2004) Intl. J. Pharm. 269: 37-49を参照されたい）。

【0349】

製剤の他の構成成分

本発明により包含される組成物は、薬学的製剤を含む様々な製剤に組み込むことができる。「薬学的に許容される」という用語は、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症のないヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに好適な、健全な医学的判断の範囲内にあり、妥当な利益／リスク比に見合う、薬剤、物質、組成物、及び／または剤形を指す。

【0350】

本発明により包含される薬学的組成物は、無水性薬学的製剤及び剤形、液体性薬学的製剤、固体性薬学的製剤、ワクチンなどとして提示することができる。好適な液体調製物には、等張水溶液、懸濁液、乳濁液、または選択されたpHに緩衝化された粘性組成物が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0351】

以下に詳細に記載するように、本発明により包含される薬剤及び他の組成物は、様々な投与経路に適合したものを含む、固体または液体形態での投与のために特別に製剤化され得る：例えば、（１）経口投与、例えば、水薬（水性もしくは非水性溶液または懸濁液）、錠剤、ボーラス、粉末、顆粒、ペースト、（２）例えば、滅菌溶液または懸濁液としての、例えば皮下、筋肉内、または静脈内注射による非経口投与、（３）例えば、皮膚に適用されるクリーム、軟膏、またはスプレーとしての、局所的な適用、（４）例えば、ペッサリー、クリーム、もしくはフォームとしての腔内または直腸内投与、または（５）例えば、化合物を含む水性エアゾール、リポソーム製剤、または固体粒子としてのエアゾール。錠剤、カプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐剤、及び浣腸などであるがこれらに限定されない、本明細書に記載される薬剤または組成物の任意の適切なフォーム因子が企図される。

【0352】

本発明により包含される薬学的組成物は、カプセル、サシェ、もしくは錠剤、または液体もしくはエアロゾルスプレーなどの個別の剤形として提示され得、各々が粉末もしくは顆粒、溶液、または水性もしくは非水性液体中の懸濁液、水中油型エマルジョン、油中水型液体エマルジョン、再構成用粉末、経口摂取用粉末、ボトル（ボトル内の粉末または液体を含む）、経口溶解フィルム、トローチ、ペースト、チューブ、ガム、及びパックとして予め決定された量の活性成分を含有する。かかる剤形は、薬局の方法のうちのいずれかによって調製することができる。いくつかの実施形態では、本発明により包含されるオリゴヌクロエチド組成物を含む薬学的組成物は、例えば、溶液、エマルジョン（マイクロエマルジョン及びクリームを含む）、粉末、及びリポソーム含有製剤として製剤化することができる。組成物は、これらに限定されないが、錠剤、カプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐剤、及び浣腸剤などの任意の可能な形態因子に製剤化され得る。

【0353】

いくつかの実施形態では、かかる製剤はまた、これらに限定されないが、単球、マクロファージ、及び他の免疫細胞（例えば、樹状細胞、抗原提示細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、及びナチュラルキラー細胞）、がん細胞などを含む、インビボで異なる細胞型に受動的または能動的に指向するように構築または組成改変することができる。製剤はまた、葉酸、トランスフェリン、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、及び抗体標的化

10

20

30

40

50

アプローチによって例示されるが、これらに限定されない、それらの表面上の異なるリガンドの発現を通じて選択的に標的化され得る。

【0354】

本発明により包含される薬学的組成物は、1つ以上の賦形剤を使用して、(1)安定性を高め、(2)徐放または遅延放出を可能にし(例えば、デポ製剤から)、(3)生体内分布を改変し(例えば、特定の組織または細胞型に薬剤を標的化する)、(4)インビボでの薬剤の放出プロファイルを改変するように製剤化され得る。賦形剤の非限定的な例には、あらゆるすべての溶媒、分散媒体、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散剤もしくは懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤もしくは乳化剤、及び防腐剤が含まれる。本発明により包含される賦形剤には、リポドイド、リボソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポプレックス、コアシェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、ヒアルロニダーゼ、ナノ粒子模倣物、及びそれらの組み合わせも含まれるが、これらに限定されない。

10

【0355】

「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、所望の特定の剤形に適したものとして、あらゆるすべての溶媒、分散媒体、希釈剤または他の液体ビヒクル、分散剤または懸濁剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、崩壊剤、防腐剤、緩衝剤、固体結合剤、潤滑剤、油、コーティング、抗菌剤、及び抗真菌剤、吸収遅延剤などを含むことを意図する。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)は、薬学的組成物の製剤化に使用される様々な賦形剤及びそれを調製するための既知の技術を開示している。任意の従来の賦形剤媒体が、任意の望ましくない生物学的作用をもたらす、ないしは別の方法で薬学的組成物の任意の他の成分(複数可)と有害な様式で相互作用することなどにより、物質またはその誘導体と不適合である場合を除き、その使用は、本発明の範囲内であると想定される。補助的な有効成分もまた、記載される組成物中に組み込むことができる。

20

【0356】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または少なくとも99.9%、または100%純粋である。いくつかの実施形態では、賦形剤は、ヒトでの使用及び獣医学的な使用が承認されている。いくつかの実施形態では、賦形剤は、米国食品医薬品局によって承認されている。いくつかの実施形態では、賦形剤は、医薬品グレードである。いくつかの実施形態では、賦形剤は、米国薬局方(USP)、欧州薬局方(EP)、英国薬局方、及び/または国際薬局方の基準を満たす。

30

【0357】

製剤の様々な実施形態は、任意に、以下：緩衝剤、pH調整剤、等張化剤、共溶媒、または薬学的に許容される担体のうちの1つ以上を含む。

【0358】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される製剤は、緩衝剤をさらに含むことができる。緩衝剤は、溶液に添加すると、溶液の酸性またはアルカリ性を大きく変化させることなく、酸及び塩基の両方を中和することができる任意の物質である。緩衝剤の例としては、これらに限定されないが、薬学的に許容される塩、ならびに酢酸、グルタミン酸、クエン酸、酒石酸、安息香酸、乳酸、ヒスチジン、または他のアミノ酸、グルコン酸、リン酸、リンゴ酸、コハク酸、ギ酸、プロピオン酸、及び炭酸が挙げられる。

40

【0359】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される製剤は、pH調整剤をさらに含むことができる。pH調整剤は、製剤のpHを調整するために使用される。好適なpH調整剤は、典型的には、少なくとも酸もしくはその塩及び/または塩基もしくはその塩を含む。酸及び塩基は、所望のpHを達成するために必要に応じて添加することができる。例えば、pHが所望のpHよりも大きい場合、酸を使用して、pHを所望のpHに下げることが

50

できる。酸の例としては、これらに限定されないが、塩酸、リン酸、クエン酸、アスコルビン酸、酢酸、硫酸、炭酸、及び硝酸が挙げられる。別の例として、pHが所望のpHより小さい場合、所望のpHにpHを調整するために塩基を用いることができる。塩基の例としては、これらに限定されないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、及び水酸化マグネシウムが挙げられる。

【0360】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される製剤は、等張化剤をさらにことができる。等張化剤は、血液または血漿などの体液の浸透圧に近づけるために製剤の浸透圧を調整するために使用される。等張化剤の例としては、これらに限定されないが、無水または含水形態の塩化ナトリウム、デキストロース、スクロース、キシリトール、フルクトース、グリセロール、ソルビトール、マンニトール、塩化カリウム、マンノース、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、及び他の無機塩が挙げられる。

【0361】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される製剤は、共溶媒をさらに含むことができる。共溶媒は、水量よりも少ない重量の量で水性製剤に添加される溶媒であり、アプタマーの可溶化を補助する。共溶媒の例としては、これらに限定されないが、グリコール、エタノール、及び多価アルコールが挙げられる。

【0362】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される製剤は、「薬学的に許容される賦形剤」をさらに含むことができる。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」または「賦形剤」という用語は、医薬品の活性成分とともに製剤化された薬学的に許容される不活性物質（例えば、CCR2及び／またはCSF1RのsiRNA分子）である。

【0363】

賦形剤は、液体または固体であってもよく、核酸及び所与の薬学的組成物の他の構成成分と組み合わせた場合に、所望の容積、一貫性などを提供するように計画された投与方法を考慮して選択される。薬学的に許容される賦形剤は、例えば、粉末間の接着を低減する抗付着剤（例えば、予備糊化したトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）、錠剤中の成分と一緒に保持する結合剤（例えば、糖類及びその誘導体、ゼラチン、合成ポリマー：ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリエチレングリコール（PEG）、コーティング剤（例えば、錠剤用のセルロースエーテルヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）フィルムコーティング、ポリマー、シェルラック、コーンプロテインゼイン、多糖など）、崩壊剤（例えば、架橋ポリマー、架橋ポリビニルピロリドン（クロスボリドン）、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム（クロスカルメロースナトリウム）、修飾デンプン（デンプングリコール酸ナトリウム）、充填剤（例えば、ラクトース及び他の糖、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、またはン酸水素カルシウムなど）、香料（例えば、天然果実抽出物など）、着色剤（例えば、製剤の外観を改善する）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、水素化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）、滑剤（例えば、ヒュームドシリカ、タルク、及び炭酸マグネシウムなど）、吸着剤、防腐剤（例えば、抗酸化物質アミノ酸システイン、メチオニン、クエン酸、メチルパラベンなど）、甘味料（例えば、砂糖）、及び湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）として、異なる目的のために使用することができる。薬学的に許容される担体は、当該技術分野において周知である。薬学的に許容される担体の例は、例えば、Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, latest editionに見出され得る。

【0364】

本発明により包含される製剤は、薬学的組成物において従来から見られる他の付加構成成分を、それらの技術確立された使用レベルでさらに含むことができる。したがって、組成物は、例えば、鎮痒薬、収斂剤、局所麻酔薬または抗炎症剤などの追加の、適合性の薬学的に活性な物質を含むことができるか、または、染料、香料剤、防腐剤、酸化防止剤、乳白剤、増粘剤、及び安定剤などの本発明の組成物の様々な剤形を物理的に製剤化するのに有用な追加の物質を含むことができる。しかしながら、そのような物質は、添加する際に、本発明により包含される組成物の構成成分（例えば、CCR2及び／またはCSF1Rのs iRNA分子）の生物学的活性を過度に干渉するべきではない。

【0365】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される組成物は、水性、非水性、または混合培地中の懸濁液として製剤化することもできる。水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、及び／またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させ物質をさらに含み得る。懸濁液は、安定剤を含むこともできる。

【0366】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬学的組成物は、フォームとして製剤化され、使用され得る。薬学的フォームとしては、これらに限定されないが、エマルジョン、マイクロエマルジョン、クリーム、ゼリー、及びリボソームを含む製剤などの製剤が挙げられる。

【0367】

本発明により包含される薬学的組成物は、エマルジョンとして製剤化することができる。エマルジョンは、典型的には、通常直径0.1 μm を超える液滴の形態で別の液体に分散された1つの液体の不均一な系である。（例えば、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Vol. 1を参照されたい）。エマルジョンは、互いに密接に混合されかつ分散された2つの不混和性液体相からなる二相系であることが多い。一般に、エマルジョンは、油中水型（w/o）または水中油型（o/w）の種類のいずれかであり得る。エマルジョンは、分散相及び活性成分（例えば、CCR2及び／またはCSF1Rに特異的なs iRNA分子）に加えて、別の相として、水性相、油性相、またはそれ自体に溶液として存在することができる追加の構成成分を含むことができる。乳化剤、安定剤、染料、及び抗酸化剤などの薬学的賦形剤もまた、必要な場合にエマルジョンに存在することができる。薬学的エマルジョンはまた、例えば、油中の水中油型（o/w/o）及び水中の油中水型（w/o/w）エマルジョンなど、2つを超える相からなる複数のエマルジョンであり得る。このような複雑な製剤は、しばしば、単純な2成分エマルジョンが提供しないある特定の利点を提供する。o/wエマルジョンの個々の油滴が小さな水滴を封入する複数のエマルジョンは、w/o/wエマルジョンを構成する。同様に、油性連続で安定化した水の球体に封入された油滴の系は、o/w/oエマルジョンを提供する。

【0368】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬学的組成物は、マイクロエマルジョンとして製剤化される。マイクロエマルジョンは、単一の光学的等方性の熱力学的に安定した液体溶液である水、油、及び両親媒性物質の系として定義することができる（例えば、Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Vol. 1を参照されたい）。マイクロエマルジョンは、一般的に、油、水、界面活性剤、補助界面活性剤、及び電解液を含む3～5の構成成分の組み合わせを介して調製される。

【0369】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬学的組成物は、好適な希釈剤、例えば、皮下または静脈注射のための滅菌水または滅菌生理食塩水で再構成される。

【0370】

V. 投与量及び投与の経路

投与

10

20

30

40

50

本発明による薬学的組成物は、典型的には、投与を容易にし、投与量を均一にするために、投与量単位の形態で製剤化される。しかしながら、本発明により包含される組成物の1日あたりの総使用量は、健全な医学的判断の範囲内で担当医師によって決定され得ることが理解されるであろう。任意の特定の患者のための特定の治療的に有効な、予防的に有効な、または適切な予防用量レベルは、治療される障害及び障害の重症度；用いられる特定の化合物の活性；用いられる特定の組成物；患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、及び食事；用いられる特定の化合物の投与時間、投与経路、及び排泄率；治療期間；用いられる特定の化合物と組み合わせて、または同時に使用される薬物；ならびに周知である同様の要因を含む様々な要因に依存するであろう。

【0371】

総投与量は、単回用量、複数回用量、反復用量で、継続的用量、またはその組み合わせとして投与することができる。いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬学的組成物は、単一の1日の用量で投与することができるか、または1日の総投与量は、1日2回、3回、または4回の分割用量で投与することができる。

【0372】

本明細書に記載される製剤及び投与量は、副作用を同時に減少または最小化する一方で、疾患及び障害の治療における臨床的有效性を最大化するように設計される。

【0373】

いくつかの実施形態では、本発明による薬剤は、所望の治療的、診断的、予防的、またはイメージング的效果を得るために、1日あたり対象体重の約0.0001mg/kg～約1000mg/kg、約0.001mg/kg～約0.05mg/kg、約0.005mg/kg～約0.05mg/kg、約0.001mg/kg～約0.005mg/kg、約0.05mg/kg～約0.5mg/kg、約0.01mg/kg～約50mg/kg、約0.1mg/kg～約40mg/kg、約0.5mg/kg～約30mg/kg、約0.01mg/kg～約10mg/kg、約0.1mg/kg～約10mg/kg、または約1mg/kg～約25mg/kg、または約10mg/kg～約100mg/kg、または約100mg/kg～約500mg/kgを送達するのに十分な投与量レベルで、1日に1回以上投与され得る。所望の投与量は、1日3回、1日2回、1日1回、1日おき、3日おき、毎週、2週間ごと、3週間ごと、または4週間ごと、または2ヶ月ごとに送達され得る。いくつかの実施形態では、所望の投与量は、複数回の投与（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、またはそれ以上の投与）を使用して送達され得る。複数回の投与が利用される場合、本明細書に記載されるような分割投薬レジメンを使用することができる。

【0374】

いくつかの実施形態では、本発明により包含される薬剤は、抗体である。本明細書で定義されるように、治療上有効な抗体の量（すなわち、有効な投与量）は、体重の約0.001～30mg/kg、好ましくは体重の約0.01～25mg/kg、より好ましくは体重の約0.1～20mg/kg、及びさらに好ましくは体重の1～10mg/kg、2～9mg/kg、3～8mg/kg、4～7mg/kg、または5～6mg/kgの範囲である。当業者は、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の一般的な健康及び/または年齢、ならびに存在する他の疾患を含むがこれらに限定されない、特定の要因が対象を効果的に治療するために必要な投薬量に影響を及ぼし得ることを理解するであろう。さらに、治療上有効量の抗体による対象の治療は、単一の治療を含むことができ、または好ましくは、一連の治療を含むことができる。好ましい例では、対象は、体重の約0.1～20mg/kgの範囲の抗体で、週に1回、約1～10週間、好ましくは2～8週間、より好ましくは3～7週間、さらに好ましくは4、5、または6週間治療される。治療に使用される抗体の有効投与量は、特定の治療の過程で増加または減少し得ることも理解されよう。投与量の変化は、診断アッセイの結果からもたらされ得る。

【0375】

本明細書で使用される場合、「分割用量」は、単一の単位用量または総日用量を2つ以

10

20

30

40

50

上の用量、例えば、単一の単位用量を2回以上の投与に分割することである。本明細書で
使用される場合、「単一単位用量」は、1回の用量／一度に／単一の経路／単一の接触点
、すなわち、単一の投与事象で投与される任意の治療上投与の用量である。本明細書で使
用される場合、「総日用量」は、24時間の期間に与えられるかまたは処方される量であ
る。それは単一単位用量として投与することができる。

【0376】

細胞は、対象の体重1キログラムあたり、 0.1×10^6 、 0.2×10^6 、 0.3×10^6 、 0.4×10^6 、 0.5×10^6 、 0.6×10^6 、 0.7×10^6 、 0.8×10^6 、 0.9×10^6 、 1.0×10^6 、 5.0×10^6 、 1.0×10^7 、 5.0×10^7 、 1.0×10^8 、 5.0×10^8 個の細胞、またはそれ以上、またはその間の任
意の範囲、またはその間の任意の値で投与することができる。移植される細胞の数は、所
与の時間内の生着の所望のレベルに基づいて調整することができる。一般的に、体重の $1 \times 10^5 \sim 約 1 \times 10^9$ 細胞/kg、体重の $約 1 \times 10^6 \sim 約 1 \times 10^8$ 細胞/kg、も
しくは体重の $約 1 \times 10^7$ 細胞/kg、または必要に応じてそれ以上の細胞を移植するこ
とができる。いくつかの実施形態では、平均サイズのマウスと比較して、少なくとも $約 0.1 \times 10^6$ 、 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 2.0×10^6 、 3.0×10^6 、 4.0×10^6 、または 5.0×10^6 の総細胞の移植が効果的である。

10

【0377】

細胞は、注入などによって、本明細書に記載される任意の好適な経路で投与することが
できる。細胞はまた、他の抗がん剤の前、それと同時、またはその後に投与することがで
きる。

20

【0378】

投与の経路

投与は、当該技術分野で一般に即知である方法を使用して達成することができる。細胞
を含む薬剤は、直接的な注入によって、またはこれらに限定されないが、腫瘍内、血管内
、脳内、非経口、腹腔内、静脈内、硬膜外、脊髄内、胸骨内、関節内、滑膜内、髄腔内、
動脈内、心臓内、もしくは筋肉内投与を含む当該技術分野で使用される任意の他の手段に
よって、所望の部位に導入することができる。

【0379】

例えば、組成物及び製剤は、通常、対象への非経口または経口経路のいずれかを介して
投与される。非経口投与は、静脈内または筋肉内注射などによって、消化管を介する以外
の方法で体に投与される薬学的組成物に関する。非経口投与は、関節内、静脈内、腹腔内
、皮下、及び筋肉内投与を含む。

30

【0380】

いくつかの実施形態では、これらに限定されないが、頬側、舌下、内視鏡、口腔、直腸
、経皮、局所、鼻、気管内、肺、尿道、膣、及び眼を含む、経口投与を使用することがで
きる。このような経口様式によって投与される場合、本発明により包含される方法及び薬
学的組成物は、所望である場合、局所的及び全身的の両方で薬物を送達することができる
。

【0381】

細胞系薬剤は、1回の注入で、または所望の効果を生み出すのに十分な定義された期間
にわたる連続的な注入を通して投与することができる。移植、生着評価、及び移植された
細胞のマーカー表現型分析のための例示的な方法は、当該技術分野で周知である（例えば
、Pearson et al. (2008) Curr. Protoc. Immunol. 81:15.21.1-15.21.21、Ito et al. (2002) Blood 100:3175-3182、Traggiai et al. (2004) Science 304:104-107、Ishikawa et al. Blood (2005) 106:1565-1573、Shultz et al. (2005) J. Immunol. 174:6477-6489、及びHolyoake et al. (1999) Exp. Hematol. 27:1418-1427を参照されたい）。

40

50

【0382】

幹細胞の細胞系治療及び養子細胞移植、がんワクチン及び細胞系治療などのように、2つ以上の細胞型を組み合わせる投与することができる。例えば、養子細胞系免疫療法は、本発明の細胞系療法と組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、細胞系薬剤は、単独で、または養子T細胞療法（ACT）のような免疫療法などの追加の細胞系薬剤と組み合わせることができる。例えば、T細胞は、濾胞性B細胞リンパ腫の治療に使用されるCD19を認識するように遺伝子操作される。ACTの免疫細胞は、樹状細胞、T細胞、例えば、CD8⁺T細胞及びCD4⁺T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK T細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、リンホカイン活性化キラー（LAK）細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞（Treg）、ヘルパーT細胞、サイトカイン誘導キラー（CIK）細胞、及びそれらの任意の組み合わせであり得る。周知である養子細胞系免疫療法モダリティは、限定されないが、照射された自己または同種異系腫瘍細胞、腫瘍溶解物またはアポトーシス腫瘍細胞、抗原提示細胞系免疫療法、樹状細胞系免疫療法、養子T細胞移植、養子CAR T細胞療法、自家免疫強化療法（AIEt）、がんワクチン、及び／または抗原提示細胞が含まれる。かかる細胞系免疫療法は、GM-CSFなどのサイトカインを発現するような免疫応答をさらに調節するため、及び／またはMAGE-1、gp-100などの腫瘍関連抗原（TAA）抗原を発現するように、1つ以上の遺伝子産物を発現するようにさらに改変することができる。本発明により包含される薬剤と、例えば、がん細胞、本発明により包含される別の薬剤または他の組成物の比は、互いに1：1であり得る（例えば、等量の2つの薬剤、3つの薬剤、4つの薬剤など）が、所望の任意の量（例えば、1：1、1.1：1、1.2：1、1.3：1、1.4：1、1.5：1、2：1、2.5：1、3：1、3.5：1、4：1、4.5：1、5：1、5.5：1、6：1、6.5：1、7：1、7.5：1、8：1、8.5：1、9：1、9.5：1、10：1、またはそれ以上）で調節され得る。

10

20

【0383】

移植された細胞の生着は、腫瘍体積、サイトカインレベル、投与時間、移植後の1つ以上の時点で対象から得られた目的の細胞のフローサイトメトリ分析などの様々な方法のいずれかによって評価することができる。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28日間待機する時間系分析、または腫瘍採取の時期が合図される。任意のかかる測定基準は、抗がん免疫療法への応答に対する変数の影響を判断するために、周知であるパラメータに従って調整できる変数である。さらに、移植された細胞は、サイトカイン、細胞外マトリックス、細胞培養支持体などの他の薬剤と同時移植することができる。

30

【0384】

CCR2及びCSF1RのsiRNA分子を含む薬学的組成物は、必要としている対象、好ましくは、ヒト対象に、がんなどの疾患に関連する単球及び／またはマクロファージなどの骨髄由来細胞の活性を調節するのに有効な量で投与される。

【0385】

VI. 使用及び方法

本発明は、骨髄由来細胞（例えば、単球及び／またはマクロファージ）を、有効量の、本発明により包含されるCCR2を標的とするオリゴヌクレオチド組成物、CSF1Rを標的とするオリゴヌクレオチド組成物、CCR2及びCSF1Rの両方を標的とするオリゴヌクレオチド、及び／またはCSF1Rを標的とするオリゴヌクレオチド組成物と組み合わせたCCR2を標的とするオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含むCCR2及びCSF1R受容体の活性を阻害する方法を提供し、siRNA分子カクテルは、細胞におけるCCR2及び／またはCSF1Rの発現を阻害するのに十分である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド組成物は、CCl2及びCSF1の1つ以上のアンタゴニスト、免疫療法剤などの少なくとも1つの追加の治療薬をさらに含むことができる。

40

50

。

【0386】

本明細書に記載される組成物、薬剤、及び製剤は、モジュレーション法、治療方法、スクリーニング方法、診断方法、予後方法、またはそれらの組み合わせなど、本明細書に記載される様々な調節、治療、スクリーニング、診断、予後、及び治療用途に使用することができる。任意のこのような方法のすべてのステップは、単独の行為者によって、または代替的に複数の行為者によって実行することができる。例えば、診断は、治療的処置を提供する行為者によって直接的に実行することができる。代替的に、治療剤を提供する人は、診断アッセイの実施を要求することができる。診断医及び／または治療介入者は、診断アッセイの結果を解釈して、治療戦略を決定することができる。同様に、かかる代替的なプロセスは、予後アッセイなどの他のアッセイに適用することができる。

10

【0387】

さらに、本明細書に記載される本発明の任意の態様は、単独で、またはその1つ、1つより多い、もしくはすべての実施形態を含む本発明の他の任意の態様と組み合わせて実施することができる。例えば、診断及び／またはスクリーニング方法は、単独で、または適切な診断及び／またはスクリーニング結果を決定する際に適切な治療を提供するなどの治療ステップと組み合わせて行われ得る。

【0388】

本発明により包含される1つの態様は、治療目的などのために、本明細書に記載される少なくとも1つのバイオマーカー（例えば、表1、表2、実施例などに列挙される1つ以上の標的）のコピー数、量（例えば、発現）、及び／または活性（例えば、細胞内局在化を調節する）を調節する方法に関する。このような薬剤は、骨髓由来細胞を操作するために使用することができる。一実施形態では、単球及び／またはマクロファージの特定の亜集団は、生理学的状態でそれらの数及び／または活性を制御するために操作される。例えば、本発明により包含される組成物は、CCR2及び／またはCSF1Rの発現を調節して、それにより単球及びマクロファージを含む骨髓由来細胞の炎症性表現型を調節し、免疫応答をさらに調節することができる。いくつかの実施形態では、細胞活性（例えば、サイトカイン分泌、細胞集団比率など）は、免疫応答自体を調節するのではなく、調節される。本明細書に開示される組成物及び製剤を使用して骨髓由来細胞の炎症性表現型を調節するための方法が提供される。したがって、組成物及び方法は、ある特定の種類の細胞を枯渇または濃縮するCCR2及びCSF1R発現を調節することによって免疫応答を調節し、及び／または細胞型の比率を調節するために使用することができる。例えば、そのような細胞に対するCCR2及び／またはCSF1R発現を阻害すると、抗炎症性単球／マクロファージに対して炎症誘発性単球／マクロファージが増加する。いくつかの実施形態では、組成物は、がん罹患する対象におけるがんを治療するために使用される。

20

30

【0389】

本開示は、単球及びマクロファージを含む骨髓由来細胞におけるCCR2及び／またはCSF1Rの発現の下方制御が、細胞を再分極化する（例えば、炎症性表現型を変更する）ことができることを示す。いくつかの実施形態では、M2マクロファージの表現型は、1型もしくはM1表現型を有するマクロファージ、またはM1マクロファージに関してはその逆、2型もしくはM2表現型をもたらすように変更される。いくつかの実施形態では、本発明により包含される組成物は、M2表現型を有する単球及びマクロファージの輸送、分極化、及び／または活性化を阻害するために、またはその逆として1型及びM1マクロファージに関して使用される。本発明はさらに、M1マクロファージ、M2マクロファージ（例えば、腫瘍内のTAM）などの、目的の単球及び／またはマクロファージの集団を低減するための方法を提供する。

40

【0390】

いくつかの実施形態では、本発明は、単球及び／またはマクロファージの分布を変更するための方法を提供し、これには、腫瘍促進マクロファージ及び抗腫瘍マクロファージなどのそのサブタイプが含まれる。一例では、本発明は、マクロファージを抗炎症性免疫応

50

答から炎症誘発性免疫応答に向けて、及びその逆に駆動するための方法を提供する。細胞型は、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ以上、または45～55%などその間の任意の範囲で枯渇及び／または濃縮され得る。

【0391】

いくつかの実施形態では、調節は、単球、マクロファージ、または樹状細胞のような他の貪食細胞などの細胞で生じる。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載されるマクロファージサブタイプなどのマクロファージサブタイプである。例えば、マクロファージは、組織常駐マクロファージ（TAM）または血流中の循環単球に由来するマクロ

10

【0392】

いくつかの実施形態では、単球及び／またはマクロファージの炎症性表現型を調節することにより、異常な単球の遊走及び増殖、組織常駐マクロファージの非制御性の増殖、非制御性の炎症誘発性マクロファージ、非制御性の抗炎症性マクロファージ、組織における炎症誘発性及び抗炎症性マクロファージ亜集団の不均衡な分布、疾患状態における単球及びマクロファージの異常に取り入れられた活性化状態、調節された細胞傷害性T細胞活性化及び機能、治療に対するがん細胞の抵抗性の克服、ならびに免疫チェックポイント療法などの免疫療法に対するがん細胞の感受性の調節など、所望の調節された免疫応答がもたらされる。

20

【0393】

望ましくない骨髄由来細胞表現型に関連する疾患を治療及び／または予防するための方法は、インビトロ、エクスピボ、またはインビボ（例えば、対象への投与）のいずれかで、そのような細胞を本発明により包含される組成物と接触させることを含み、組成物は、細胞の遊走、動員、分化及び分極化、活性化、機能、及び／または生存を操作する。

【0394】

本発明により包含される別の態様では、単球及び／またはマクロファージの炎症誘発性活性を増加させるための方法が提供される。

【0395】

本発明により包含される別の態様では、組織内の炎症誘発性単球及びマクロファージと抗炎症性単球及びマクロファージとのバランスをとるための方法が提供される。

30

【0396】

対象

本発明は、CCR2及び／またはCSF1Rの阻害の恩恵を受けるであろう状態または障害、例えば、本発明により包含される少なくとも1つの組成物を有する目的の骨髄由来細胞と接触することを含む望ましくないCCR2及び／またはCSF1R発現または活性を特徴とする障害を有する個体を治療する方法を提供する。

【0397】

いくつかの実施形態では、対象は、動物である。動物は、どちらの性別でもよく、発育のいずれの段階であってもよい。いくつかの実施形態では、動物は、哺乳動物などの脊椎動物である。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象は、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、またはヤギなどの家畜化動物である。いくつかの実施形態では、対象は、イヌまたはネコなどのコンパニオンアニマルである。いくつかの実施形態では、対象は、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、またはヤギなどの家畜動物である。いくつかの実施形態では、対象は動物園の動物である。いくつかの実施形態では、対象は、齧歯類（例えば、マウスまたはラット）、イヌ、ブタ、または非ヒト霊長類などの研究動物である。いくつかの実施形態では、動物は、遺伝子操作された動物である。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物（例えば、トランスジェニックマウス及びトランスジェニックブタ）である。いくつかの実施形態では、対象は、サカナまたは爬虫類である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。い

40

50

くつかの実施形態では、対象は、がんの動物モデルである。例えば、動物モデルは、ヒト由来であるがんの同所性異種移植動物モデルであり得る。

【0398】

本発明により包含される方法のいくつかの実施形態では、対象は、化学療法、放射線療法、標的療法、及び／または免疫療法などの治療を受けていない。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法、放射線療法、標的療法、及び／または免疫療法などの治療を受けている。

【0399】

いくつかの実施形態では、対象は、がん性または前がん性組織を除去するための手術を受けている。いくつかの実施形態では、がん性組織は、除去されておらず、例えば、がん性組織は、生命に必須の組織など、身体の手術不能な領域、または外科的処置が患者に害を及ぼすかなりのリスクを引き起こす領域に位置し得る。

【0400】

いくつかの実施形態では、対象またはその細胞は、免疫チェックポイント阻害剤療法に抵抗性であるなど、関連性のある療法に抵抗性である。例えば、本発明により包含される1つ以上のバイオマーカーを調節することにより、免疫チェックポイント阻害剤療法に対する抵抗性を克服することができる。

【0401】

いくつかの実施形態では、対象は、本明細書に記載される1つ以上のバイオマーカーの望ましくない不在、存在、または異常な発現及び／または活性を有するとして同定されているなど、本明細書に記載される組成物及び方法による調節を必要とする。

【0402】

さらに、これらの調節剤はまた、刺激免疫応答などの所望の活性をさらに調節するために、併用療法で投与することができる。例えば、IL-4、IL-4R α 、IL-13、及びCD40を標的とする薬剤ならびに組成物を使用して、単球及び／またはマクロファージの分化及び／または分極化を調節することができる。CD11b、CSF-1R、CCL2、ニューロピリン-1、及びANG-2を標的とする薬剤ならびに組成物を使用して、組織へのマクロファージ動員を調節することができる。IL-6、IL-6R、及びTNF- α を標的とする薬剤ならびに組成物を使用して、マクロファージ機能を調節することができる。追加の薬剤には、化学療法剤、ホルモン、抗血管新生剤、放射性標識化合物、または外科手術、凍結療法、及び／または放射線療法を伴うものが含まれるが、これらに限定されない。前述の治療法は、従来の治療の前または後のいずれかで、他の形態の従来の治療（例えば、当業者に周知であるがんの標準治療）と組み合わせて投与することができる。例えば、これらの調節剤は、治療的に有効な用量の化学療法剤と共に投与することができる。別の実施形態では、これらの調節剤は、化学療法剤と組み合わせて投与されて、化学療法剤の活性及び有効性を増強する。米国医師用卓上参考書（PDR）は、様々ながんの治療に使用されてきた化学療法剤の投与量を開示している。治療的に有効なこれらの前述の化学療法薬物の投与レジメン及び投与量は、治療される特定の黒色腫、疾患の程度、及び当該技術分野の医師に周知である他の要因に依存し、医師により決定され得る。

【0403】

がん治療

いくつかの実施形態では、本発明により包含される組成物は、がんを治療するために使用される。例えば、本発明は、単球及び／またはマクロファージの腫瘍促進機能（すなわち、造腫瘍性）を低減するための方法、及び／または単球及び／またはマクロファージを含む骨髓由来細胞の抗腫瘍機能を増加させるための方法を提供する。いくつかの特定の実施形態では、本発明により包含される方法は、1) 腫瘍関連マクロファージ（TAM）の動員及び分極化、2) 腫瘍血管新生、3) 腫瘍成長、4) 腫瘍細胞分化、5) 腫瘍細胞生存、6) 腫瘍浸潤及び転移、7) 免疫阻害、ならびに8) 免疫抑制性の腫瘍微小環境を含む、マクロファージの腫瘍促進機能のうちの少なくとも1つを低減することができる。

【0404】

本発明により包含される組成物の使用を含むがん治療または治療の組み合わせは、がん細胞に接触させ、及び／またはがん治療に対する可能性が高い応答者であると示される対象などの所望の対象に投与するために使用することができる。別の実施形態では、このようながん治療は、対象ががん治療に対する可能性が高い応答者でないと示されると（例えば、骨髄由来細胞がCCR2及び／またはCSF1Rの明らかなまたは所望のレベルを発現しない対象）回避される場合があり、標的化及び／または非標的化がん治療のような代替治療レジメンが投与され得る。併用療法も企図されており、例えば、1つ以上の化学療法剤及び放射線、1つ以上の化学療法剤及び免疫療法、または1つ以上の化学療法剤、放射線、及び化学療法を含むことができ、それらの各組み合わせは、がん治療（例えば、表1及び／または表2に列挙される1つ以上の標的の少なくとも1つの修飾因子）を伴うか、もしくは伴わない場合がある。

10

【0405】

CCR2及び／またはCSF1Rを阻害するのに有用な代表的な例示的組成物は上述される。以下でさらに記載されるように、抗がん剤は、生物療法的抗がん剤（例えば、インターフェロン、サイトカイン（例えば、腫瘍壊死因子、インターフェロン α 、インターフェロン γ など）、ワクチン、造血成長因子、モノクローナル血清療法、免疫刺激剤及び／または免疫調節剤（例えば、IL-1、2、4、6、及び／または12）、免疫細胞増殖因子（例えば、GM-CSF）、及び抗体（例えば、トラスツズマブ、T-DM1、ペバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、リツキシマブ、トシツモマブなど）、ならびに化学療法剤が包含される。

20

【0406】

「標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用してそれによってがんを治療する薬剤の投与を指す。例えば、免疫チェックポイント阻害剤の阻害に関する標的療法は、本発明により包含される方法と組み合わせて有用である。

【0407】

「免疫療法」または「免疫療法（複数可）」という用語は、典型的に、有益な方法で免疫応答を調節するための任意の戦略を指し、免疫応答を誘導、増強、抑制、またはさもなければ修飾すること、ならびにがんなどの疾患と戦うために対象の免疫系の特定の部分を使用する任意の治療を含む方法により、疾患に罹患する、または罹患もしくは再発のリスクがある対象を治療することを包含する。対象自身の免疫系は、その目的のための1つ以上の薬剤の投与の有無にかかわらず、刺激（または抑制）される。免疫応答を誘発または増幅するように設計された免疫療法は、「活性化免疫療法」と称される。免疫反応を低減または抑制するように設計された免疫療法は、「抑制免疫療法」と称される。いくつかの実施形態では、免疫療法は、がん細胞などの目的の細胞と特異的である。いくつかの実施形態では、免疫療法は、免疫系細胞と選択的に相互作用しないが、免疫系機能を調節する薬剤の投与を指す「非標的」であり得る。非標的療法の代表的な例には、化学療法、遺伝子治療、及び放射線療法が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0408】

免疫療法のいくつかの形態は、例えば、がんワクチン及び／または感作された抗原提示細胞の使用を含むことができる標的療法である。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、正常細胞を無傷のまま残し、がん細胞に感染して溶解することができるウイルスであり、がん治療において潜在的に有用であり得る。腫瘍溶解性ウイルスの複製は、腫瘍細胞の破壊を促進し、腫瘍部位での用量増幅も引き起こす。それらはまた、抗がん遺伝子のベクターとして作用することができ、それらを腫瘍部位に特異的に送達することを可能にする。免疫療法は、がん抗原または疾患抗原に対して指向する予め形成された抗体の投与によって達成される、宿主の短期保護のための受動免疫を含み得る（例えば、任意に化学療法剤または毒素に連結されたモノクローナル抗体の腫瘍抗原への投与）。例えば、抗VEGF及びmTOR阻害剤は、腎細胞癌の治療に有効であることが即知である。免疫療法はまた、がん細胞株の細胞傷害性リンパ球認識エピトープを使用することに焦点を当てることができる

40

50

。代替的に、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチドなどを使用して、腫瘍もしくはがんの開始、進行、及び／または病状に関連する生体分子を選択的に調節することができる。同様に、免疫療法は、細胞系療法の形態をとることができる。例えば、養子細胞免疫療法は、T細胞などの免疫細胞を使用する免疫療法の一種であり、患者のがんに対して自然または遺伝子操作された反応性を有するものが生成され、次のがん患者に戻される。多数の活性化された腫瘍特異的T細胞の注入は、がんの完全で永続的な退行を誘導し得る。

【0409】

免疫療法は、がん抗原または疾患抗原に対して指向する予め形成された抗体の投与によって達成される、宿主の短期保護のための受動免疫を含み得る（例えば、任意に化学療法剤または毒素に連結されたモノクローナル抗体の腫瘍抗原への投与）。免疫療法はまた、がん細胞株の細胞傷害性リンパ球認識エピトープを使用することに焦点を当てることのできる。代替的に、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチドなどを使用して、腫瘍もしくはがんの開始、進行、及び／または病状に関連する生体分子を選択的に調節することができる。

【0410】

いくつかの実施形態では、免疫療法剤は、免疫刺激分子のアゴニスト、免疫阻害分子のアンタゴニスト、ケモカインのアンタゴニスト、T細胞活性化を刺激するサイトカインのアゴニスト、T細胞活性化を阻害するサイトカインに拮抗または阻害する薬剤、及び／またはB7ファミリーの膜結合タンパク質と結合する薬剤である。いくつかの実施形態では、免疫療法剤は、免疫阻害分子のアンタゴニストである。いくつかの実施形態では、免疫療法剤は、サイトカイン、ケモカイン、及び成長因子、例えば、腫瘍関連サイトカイン、ケモカイン、成長因子、ならびにIL-10、TGF- β 、及びVEGFを含む他の可溶性因子の阻害効果を中和する中和抗体の薬剤であり得る。

【0411】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、1つ以上の免疫チェックポイントの阻害剤を含む。「免疫チェックポイント」という用語は、CD4+及び／またはCD8+T細胞の細胞表面上にある分子のグループを指し、抗腫瘍免疫の下方調節または阻害など、抗がん免疫応答を調節することによって免疫応答を微調整する。免疫チェックポイントタンパク質は、当該技術分野で周知であり、これらに限定されないが、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD200R、CD160、gp49B、PIR-B、KRLG-1、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3（CD223）、IDO、GITR、4-1BB、OX40、BTLA、SIRPアルファ（CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HLA2、ブチロフィリン、及びA2aR（例えば、WO2012/177624を参照されたい）が含まれる。

【0412】

いくつかの免疫チェックポイントは、免疫系の機能（免疫応答など）を阻害、下方制御、または抑制する分子（例えば、タンパク質）を包括する「免疫阻害免疫チェックポイント」である。例えば、CD274またはB7-H1としても知られるPD-L1（プログラムされたデスリガンド1）は、T細胞の増殖を減少させ、免疫系を抑制する阻害シグナルを伝達するタンパク質である。CD152としても知られるCTLA-4（細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4）は、抗原提示細胞の表面上にあるタンパク質受容体であり、免疫応答を下方制御する免疫チェックポイント（「オフ」スイッチ）として機能する。HAVCR2としても知られるTIM-3（T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有-3）は、マクロファージ活性化を制御する免疫チェックポイントとして機能する細胞表面タンパク質である。VISTA（T細胞活性化のVドメインIgサブプレッサー）は、T細胞エフェクター機能を阻害し、末梢性免疫寛容を維持する免疫チェックポイントとして機能するI型膜貫通タンパク質である。LAG-3（リンパ球活性化遺伝子3）は、T

10

20

30

40

50

細胞の増殖、活性化、及び恒常性を負に制御する免疫チェックポイント受容体である。B T L A (B及びTリンパ球アテニューエータ)は、腫瘍壊死ファミリー受容体(T N F-R)との相互作用を介してT細胞阻害を示すタンパク質である。K I R(キラー細胞免疫グロブリン様受容体)は、NK細胞で発現するタンパク質のファミリーであり、少数のT細胞であり、NK細胞の細胞傷害性活性を抑制する。いくつかの実施形態では、免疫療法剤は、アルギナーゼ(A R G)及びインドールアミン2, 3-ジオキシゲナーゼ(I D O)、T細胞及びNK細胞を抑制する免疫チェックポイントタンパク質の活性を遮断できる阻害剤などの免疫抑制酵素と特異的な薬剤であり得、免疫抑制性腫瘍微小環境におけるアミノ酸アルギニン及びトリプトファンの異化作用を変更する。阻害剤には、これらに限定されないが、A R G及び一酸化窒素シンターゼ(N O S)を同時に遮断する、A R Gを発現するM2マクロファージを標的とするN-ヒドロキシ-L-A r g(N O H A)、ニトロアスピリン、またはシルデナフィル(V i a g r a(登録商標))、及び1-メチルトリプトファンなどのI D O阻害剤が含まれる。この用語はさらに、生物学的に活性なタンパク質断片、ならびに全長免疫チェックポイントタンパク質及びその生物学的に活性なタンパク質断片をコードする核酸を包含する。いくつかの実施形態では、用語は、本明細書で提供される相同性の記載に従う任意の断片をさらに包含する。

【0413】

対照的に、他の免疫チェックポイントは、免疫系の機能(例えば、免疫応答)を活性化、刺激、または促進する分子(例えば、タンパク質)を含む「免疫刺激性」である。いくつかの実施形態では、免疫刺激性分子は、C D 2 8、C D 8 0(B 7. 1)、C D 8 6(B 7. 2)、4-1 B B(C D 1 3 7)、4-1 B B L(C D 1 3 7 L)、C D 2 7、C D 7 0、C D 4 0、C D 4 0 L、C D 1 2 2、C D 2 2 6、C D 3 0、C D 3 0 L、O X 4 0、O X 4 0 L、H V E M、B T L A、G I T R及びそのリガンドG I T R L、L I G H T、L T β R、L T α β、I C O S(C D 2 7 8)、I C O S L(B 7-H 2)、ならびにN K G 2 Dである。C D 4 0(表面抗原分類40)は、抗原提示細胞上に見られる共刺激タンパク質であり、それらの活性化に必要である。腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー4(T N F R S F 4)またはC D 1 3 4としても知られるO X 4 0は、T細胞死を防ぎ、その後サイトカイン生成を増加させることにより、活性化後の免疫応答の維持に参与する。C D 1 3 7は、腫瘍壊死因子受容体(T N F-R)ファミリーのメンバーであり、活性化T細胞を共刺激して増殖及びT細胞の生存を増強する。C D 1 2 2は、インターロイキン2受容体(I L-2)タンパク質のサブユニットであり、未成熟T細胞の制御性、エフェクター、またはメモリーT細胞への分化を促進する。C D 2 7は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーであり、共刺激免疫チェックポイント分子として機能する。C D 2 8(表面抗原分類28)は、T細胞上に発現するタンパク質であり、T細胞活性化及び生存に必要な共刺激シグナルを提供する。T N F R S F 1 8及びA I T Rとしても知られるG I T R(糖質コルチコイド誘導性T N F R関連タンパク質)は、制御性T細胞によって維持される優性免疫自己寛容において重要な役割を果たすタンパク質である。C D 2 7 8としても知られるI C O S(誘導性T細胞共刺激因子)は、活性化T細胞上で発現し、T細胞シグナル伝達及び免疫応答で役割を果たすC D 2 8スーパーファミリー共刺激分子である。

【0414】

免疫チェックポイント及びそれらの配列は、当該技術分野で周知であり、代表的な実施形態を以下でさらに記載する。免疫チェックポイントは、典型的に、阻害性受容体及び天然結合パートナー(例えば、リガンド)の対に関連する。例えば、P D-1ポリペプチドは、免疫細胞に阻害性シグナルを伝達することにより免疫細胞エフェクター機能を阻害することが可能な阻害性受容体であるか、または例えば、可溶性の単量体形態で存在する場合、免疫細胞の共刺激(例えば、競合阻害による)を促進することが可能である。好ましいP D-1ファミリーメンバーは、P D-1と配列同一性を共有し、1つ以上のB 7ファミリーメンバー、例えば、B 7-1、B 7-2、P D-1リガンド、及び/または抗原提示細胞上の他のポリペプチドと結合する。「P D-1活性」という用語は、例えば、抗原

10

20

30

40

50

提示細胞上の天然のPD-1リガンドと結合することによって、活性化された免疫細胞における阻害シグナルを調節するPD-1ポリペプチドの能力を含む。免疫細胞における阻害性シグナルの調節は、免疫細胞の増殖及び／または免疫細胞によるサイトカイン分泌の調節をもたらす。したがって、「PD-1活性」という用語には、PD-1ポリペプチドとその天然のリガンド（複数可）とが結合する能力、免疫細胞阻害シグナルを調節する能力、及び免疫応答を調節する能力が含まれる。「PD-1リガンド」という用語は、PD-1受容体の結合パートナーを指し、PD-L1（Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027-1034）及びPD-L2（Lachman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261）の両方が含まれる。「PD-1リガンド活性」という用語には、PD-1リガンドポリペプチドとその天然の受容体（複数可）（例えば、PD-1またはB7-1）とが結合する能力、免疫細胞阻害シグナルを調節する能力、及び免疫応答を調節する能力が含まれる。

10

【0415】

本明細書で使用される場合、「免疫チェックポイント療法」という用語は、それらの核酸及び／またはタンパク質を阻害するなど、免疫阻害性免疫チェックポイントを阻害する薬剤の使用を指す。1つ以上のかかる免疫チェックポイントの阻害は、阻害シグナル伝達を遮断または中和して、それにより、がんをより効果的に治療するために免疫応答を上方制御することができる。免疫チェックポイントを阻害するのに有用な例示的な薬剤には、免疫チェックポイントタンパク質もしくはその断片と結合及び／または不活性化または阻害することのいずれかができる抗体、低分子、ペプチド、ペプチド模倣体、天然リガンド、及び天然リガンドの誘導体、ならびに免疫チェックポイント核酸もしくはその断片の発現及び／または活性を下方制御することができるRNA干渉、アンチセンス、核酸アプタマーなどが含まれる。免疫応答を上方制御するための例示的な薬剤には、タンパク質とその天然の受容体（複数可）との間の相互作用を遮断する1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質に指向する抗体、1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質の非活性化形態（例えば、ドミナントネガティブポリペプチド）、1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質とその天然の受容体（複数可）との間の相互作用を遮断する低分子またはペプチド、その天然の受容体（複数可）と結合する融合タンパク質（例えば、抗体または免疫グロブリンのFc部分と融合した免疫チェックポイント阻害タンパク質の細胞外部分）、免疫チェックポイント核酸の転写または翻訳を遮断する核酸分子などが含まれる。かかる薬剤は、1つ以上の免疫チェックポイントとその天然の受容体（複数可）（例えば、抗体）との間の相互作用を直接的に遮断して、阻害性シグナル伝達を防ぎ、免疫応答を上方制御することができる。代替的に、薬剤は、1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質とその天然の受容体（複数可）との間の相互作用を間接的に遮断して、阻害性シグナル伝達を防ぎ、免疫応答を上方制御することができる。例えば、安定化された細胞外ドメインなどの免疫チェックポイントタンパク質リガンドの可溶性バージョンは、その受容体と結合して、受容体の有効濃度を間接的に低減させて適当なリガンドと結合することができる。一実施形態では、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、及び／または抗PD-L2抗体は、単独または組み合わせのいずれかで、免疫チェックポイントを阻害するために使用される。PD-1経路を遮断するために使用される治療薬には、アンタゴニスト性抗体及び可溶性PD-L1リガンドが含まれる。PD-1及びPD-L1/2阻害経路に指向するアンタゴニスト剤は、これらに限定されないが、PD-1またはPD-L1/2に指向するアンタゴニスト性抗体（例えば、米国特許第8,008,449号に開示される17D8、2D3、4H1、5C4（ニボルマブまたはBMS-936558としても即知である）、4A11、7D3及び5F4と、AMP-224、ピジリズマブ（CT-011）、ペンブロリズマブならびに米国特許第8,779,105号、第8,552,154号、第8,217,149号、第8,168,757号、第8,008,449号、第7,488,802号、第7,943,743号、第7,635,757号、及び第6,808,710号に開示される抗体を含むことができる。同様に、追加の代表的なチェックポイント阻害剤は、これらに限定されないが、阻害性調節因子CTLA-4（抗細胞傷害性Tリン

20

30

40

50

パ球抗原4、抗細胞傷害性Tリンパ球抗原4)に指向する抗体、例えば、イピリムマブ、トレメリムマブ(完全ヒト化)、抗CD28抗体、抗CTLA-4アドネクチン、抗CTLA-4ドメイン抗体、一本鎖抗CTLA-4抗体断片、重鎖抗CTLA-4断片、軽鎖抗CTLA-4断片、ならびに米国特許第8,748,815号、第8,529,902号、第8,318,916号、第8,017,114号、第7,744,875号、第7,605,238号、第7,465,446号、第7,109,003号、第7,132,281号、第6,984,720号、第6,682,736号、第6,207,156号、及び第5,977,318号、ならびにEP特許第1212422号、米国特許公開第2002/0039581号、及び第2002/086014号、ならびにHurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:10067-10071に開示されるものなどの他の抗体であり得る。

10

【0416】

PD-1、PD-L1、PD-L2、及びCTLA-4について例示された免疫チェックポイント活性、リガンド、遮断などの代表的な定義は、一般に他の免疫チェックポイントに適用される。

【0417】

「非標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用しないが、がんを治療する薬剤の投与を指す。非標的療法の代表的な例には、化学療法、遺伝子治療、及び放射線療法が含まれるが、これらに限定されない。

【0418】

20

一実施形態では、化学療法が使用される。化学療法には、化学療法剤の投与が含まれる。かかる化学療法剤は、これらに限定されないが、白金化合物、細胞傷害性抗生物質、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、ヒ素化合物、DNAトポイソメラーゼ阻害剤、タキサン、ヌクレオシド類似体、植物アルカロイド、及び毒素、ならびにその合成誘導体の化合物群の中から選択されるものであり得る。例示的な薬剤には、これらに限定されないが、アルキル化剤：ナイトロジェンマスタード(例えば、シクロホスファミド、イホスファミド、トロホスファミド、クロラムブシル、エストラムスチン、及びメルファラン)、ニトロソウレア(例えば、カルムスチン(BCNU)及びロムスチン(CCNU))、アルキルスルホン酸(例えば、ブスルファン及びトレオスルファン)、トリアゼン(例えば、ダカルバジン、テモゾロミド)、シスプラチン、トレオスルファン、及びトロホスファミド；植物アルカロイド：ビンブラスチン、パクリタキセル、ドセタキソール；DNAトポイソメラーゼ阻害剤：テニポシド、クリスナトール、及びマイトマイシン；葉酸拮抗剤：メトトレキサート、ミコフェノール酸、及びヒドロキシ尿素；ピリミジン類似体：5-フルオロウラシル、ドキシフルリジン、及びシトシンアラビノシド；プリン類似体：メルカプトプリン及びチオグアニン；DNA代謝拮抗剤：2'-デオキシ-5-フルオロウリジン、グリシン酸アフィジコリン、及びピラゾロイミダゾール；ならびに有糸分裂阻害剤：ハリコンドリル、コルヒチン、及びリゾキシシンが含まれる。同様に、追加の例示的な薬剤には、白金含有化合物(例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン)、ピンカアルカロイド(例えば、ピンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、及びビノレルビン)、タキソイド(例えば、パクリタキセルまたは同等のパクリタキセル、例えば、ナノ粒子アルブミン結合パクリタキセル(ABRAXANE)、ドコサヘキサエン酸結合パクリタキセル(DHA-パクリタキセル、タキソプレキシシン)、ポリグルタミン酸結合パクリタキセル(PG-パクリタキセル、パクリタキセルポリグルメックス、CT-2103、XYOTAX)、腫瘍活性化プロドラッグ(TAP)ANG1005(AnGIOpep-2が3分子のパクリタキセルと結合)、パクリタキセル-EC-1(パクリタキセルがerbB2認識ペプチドEC-1と結合)、及びグルコース結合パクリタキセル、例えば、2'-パクリタキセルメチル2-グルコピラノシルコハク酸；ドセタキセル、タキソール)、エポドフィリン(例えば、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド、トポテカン、9-アミノカンプトテシン、カンプトイリノテカン、イリノテカン、クリスナトール、マイトマイシンC)、代謝拮抗剤、DHFR阻害剤(例えば、メトト

30

40

50

レキサート、ジクロロメトトレキサート、トリメトレキサート、エダトレキサート）、I
 MPデヒドロゲナーゼ阻害剤（例えば、ミコフェノール酸、チアゾプリン、リバビリン、
 及びEICAR）、リボヌクロチドレダクターゼ阻害剤（例えば、ヒドロキシ尿素及びデ
 フェロキサミン）、ウラシル類似体（例えば、5-フルオロウラシル（5-FU）、フロ
 クスウリジン、ドキシフルリジン、ラチトレキセド、テガフルーウラシル、カペシタビン
 ）、シタラビン類似体（例えば、シタラビン（ara C）、シトシンアラビノシド、及
 びフルダラビン）、プリン類似体（例えば、メルカプトプリン及びチオグアニン）、ビタ
 ミンD3類似体（例えば、EB 1089、CB 1093、及びKH 1060）、イ
 ソプレニル化阻害剤（例えば、ロバスタチン）、ドーパミン作動性神経毒（例えば、1-
 メチル-4-フェニルピリジニウムイオン）、細胞周期阻害剤（例えば、スタウロスポリ
 ン）、アクチノマイシン（例えば、アクチノマイシンD、ダクチノマイシン）、ブレオマ
 イシン（例えば、ブレオマイシンA2、ブレオマイシンB2、ペプロマイシン）、アント
 ラサイクリン（例えば、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、ペグ化リボソームドキシソルビ
 シン、イダルビシン、エピルビシン、ピラルビシン、ゾルビシン、ミトキサントロン）、
 MDR阻害剤（例えば、ベラパミル）、 Ca^{2+} ATPase阻害剤（例えば、タプシガ
 ルジン）、イマチニブ、サリドマイド、レナリドマイド、チロシンキナーゼ阻害剤（例え
 ば、アキシチニブ（AG013736）、ボスチニブ（SKI-606）、セディラニブ
 （RECENTIN（商標）、AZD2171）、ダサチニブ（SPRYCEL（登録商
 標）、BMS-354825）、エルロチニブ（TARCEVA（登録商標））、ゲフィ
 チニブ（IRESSA（登録商標））、イマチニブ（Gleevec（登録商標）、CG
 P57148B、STI-571）、ラパチニブ（TYKERB（登録商標）、TYVE
 RB（登録商標））、レスタウルチニブ（CEP-701）、ネラチニブ（HKI-27
 2）、ニロチニブ（TASIGNA（登録商標））、セマキシニブ（セマキシニブ、SU
 5416）、スニチニブ（SUTENT（登録商標）、SU11248）、トセラニブ（
 PALLADIA（登録商標））、バンデタニブ（ZACTIMA（登録商標）、ZD6
 474）、パタラニブ（PTK787、PTK/ZK）、トラスツズマブ（HERCEP
 TIN（登録商標））、ベバシズマブ（AVASTIN（登録商標））、リツキシマブ（
 RITUXAN（登録商標））、セツキシマブ（ERBITUX（登録商標））、パニツ
 ムマブ（VECTIBIX（登録商標））、ラニビズマブ（Lucentis（登録商標
 ））、ニロチニブ（TASIGNA（登録商標））、ソラフェニブ（NEXAVAR（登
 録商標））、エベロリムス（AFINITOR（登録商標））、アレムツズマブ（CAM
 PATH（登録商標））、ゲムツズマブオゾガマイシン（MYLOTARG（登録商標）
 ）、テムシロリムス（TORISEL（登録商標））、ENMD-2076、PCI-3
 2765、AC220、乳酸ドビチニブ（TKI258、CHIR-258）、BIBW
 2992（TOVOK（商標））、SGX523、PF-04217903、PF-0
 2341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP4
 70、BIBF 1120（VARGATEF（登録商標））、AP24534、JNJ
 -26483327、MGC265、DCC-2036、BMS-690154、CE
 P-11981、チボザニブ（AV-951）、OSI-930、MM-121、XL-
 184、XL-647、及び／またはXL228）、プロテアソーム阻害剤（例えば、ボ
 ルテゾミブ（ベルケイド））、mTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン、テムシロリムス
 （CCI-779）、エベロリムス（RAD-001）、リダフォロリムス、AP235
 73（Ariad）、AZD8055（AstraZeneca）、BEZ235（No
 vartis）、BGT226（Novartis）、XL765（Sanofi A
 ventis）、PF-4691502（Pfizer）、GDC0980（Genen
 tech）、SF1126（Semafoe）、OSI-027（OSI））、オブリメ
 ルセン、ゲムシタビン、カルミノマイシン、ロイコボリン、ペメトレキセド、シクロホス
 ファミド、ダカルバジン、プロカルビジン、プレドニゾロン、デキサメタゾン、カンパテ
 シン、プリカマイシン、アスパラギナーゼ、アミノプテリン、メトプテリン、ポルフィロ
 マイシン、メルファラン、ロイロシジン、ロイロシン、クロラムブシル、トラベクテジン

10

20

30

40

50

、プロカルバジン、ディスコデルモライド、カルミノマイシン、アミノプテリン、ならびにヘキサメチルメラミンが含まれる。1つ以上の化学療法剤（例えば、FLAG、CHOP）を含む組成物も使用することができる。FLAGには、フルダラビン、シトシンアラビノシド（Ara-C）、及びG-CSFが含まれる。CHOPには、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、及びプレドニゾンが含まれる。別の実施形態では、PARP（例えば、PARP-1及び／またはPARP-2）阻害剤が使用され、かかる阻害剤は当該技術分野で周知である（例えば、オラパリブ、ABT-888、BSI-201、BGP-15（N-Gene Research Laboratories, Inc.）；INO-1001（Inotek Pharmaceuticals Inc.）；PJ34（Soriano et al., 2001；Pacher et al., 2002b）；3-アミノベンズアミド（Trevigen）；4-アミノ-1, 8-ナフタルイミド；（Trevigen）；6（5H）-フェナントリジノン（Trevigen）；ベンズアミド（米国特許再第36, 397号）；及びNU1025（Bowman et al.）。作用機序は一般に、PARP阻害剤がPARPと結合してその活性を減少させる能力に関連する。PARPは、ベータニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）からニコチンアミド及びポリADPリボース（PAR）への変換を触媒する。ポリ（ADP-リボース）及びPARPの両方が、転写、細胞増殖、ゲノム安定性、及び発がんの制御に関連している（Bouchard et al. (2003) Exp. Hematol. 31:446-454）、Herczeg (2001) Mut. Res. 477:97-110）。ポリ（ADPリボース）ポリメラーゼ1（PARP1）は、DNA一本鎖切断（SSB）の修復における重要な分子である（de Murcia J. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:7303-7307、Schreiber et al. (2006) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7:517-528、Wang et al. (1997) Genes Dev. 11:2347-2358）。PARP1機能の阻害によるSSB修復のノックアウトは、DNA二本鎖切断（DSB）を誘導し、相同性指向のDSB修復に欠陥があるがん細胞で合成致死性を引き起こし得る（Bryant et al. (2005) Nature 434:913-917、Farmer et al. (2005) Nature 434:917-921）。化学療法剤の前述の例は例示的なものであり、限定することを意図するものではない。

10

20

30

【0419】

別の実施形態では、放射線療法が使用される。放射線療法で使用される放射線は、電離放射線であり得る。放射線療法はまた、ガンマ線、X線、または陽子線でもあり得る。放射線療法の例には、これらに限定されないが、外部ビーム放射線療法、放射性同位元素（I-125、パラジウム、イリジウム）の間質移植、ストロンチウム89などの放射性同位元素、胸部放射線療法、腹腔内P-32放射線療法、及び／または腹部及び骨盤全体の放射線療法が含まれる。放射線療法の一般的な概要については、Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001、DeVita et al., eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphiaを参照されたい。放射線療法は、外部ビーム放射線または遠隔療法として施すことができ、放射線は遠隔源から向けられる。放射線治療は、放射線源が、がん細胞または腫瘍塊の近くの体内に配置される内部療法または近接照射療法として施すこともできる。ヘマトポルフィリン及びその誘導体、ベルトポルフィン（BPD-MA）、フタロシアニン、光増感剤Pc4、デメトキシヒポクレリンA、ならびに2BA-2-DMHAなどの光増感剤の投与を含む光線力学療法の使用も含まれる。

40

【0420】

別の実施形態では、ホルモン療法が使用される。ホルモン治療的処置は、例えば、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト（例えば、フルタミド、ピカルタミド、タモキシフェン、ラロキシフェン、酢酸リュープロリド（LUPRON）、LH-RHアンタゴ

50

ニスト）、ホルモン生合成及びプロセシングの阻害剤、ならびにステロイド（例えば、デキサメタゾン、レチノイド、デルトイド、ベタメタゾン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲステン）、ビタミンA誘導体（例えば、オールトランスレチノイン酸（ATRA））、ビタミンD3類似体、抗ゲスタゲン剤（例えば、ミフェプリストン、オナプリストン）、または抗アンドロゲン剤（例えば、酢酸シプロテロン）を含むことができる。

【0421】

別の実施形態では、身体組織が高温（最大106°F）に曝露される手順である温熱療法が使用される。熱は、細胞に損傷を与えるか、またはそれらの生存のために必要な物質をそれらから欠乏させることで、腫瘍を縮小させるのを助ける。温熱療法は、外部及び内部の加熱デバイスを使用する、局所、領域、及び全身の温熱療法であり得る。温熱療法は、ほとんどの場合、その有効性を増強しようと試みるために療法の他の形態（例えば、放射線療法、化学療法、及び生物学的療法）と一緒に使用される。局所温熱療法は、腫瘍などの非常に小さな領域に加えられる熱を指す。領域は、身体の外側のデバイスから腫瘍に向けられた高周波で外部から加熱することができる。内部加熱を達成するために、細い加熱されたワイヤーまたは温水で満たされた中空のチューブ、埋め込まれたマイクロ波アンテナ、及び高周波電極など、いくつかの種類の滅菌プローブの1つを使用できる。局所温熱療法では、器官または四肢が加熱される。高エネルギーを生成する磁石及びデバイスは、加熱される領域を覆って配置される。灌流と称される別のアプローチでは、患者の血液の一部を除去し、加熱し、次に内部で加熱された領域にポンピングされる（灌流される）。全身加熱は、身体に至る所に拡散している転移性がんの治療に使用される。これは、温水ブランケット、ホットワックス、誘導コイル（電気ブランケットのようなもの）、または温熱性チャンバ（大型インキュベータと同様）を使用して実現され得る。温熱療法は、放射線の副作用または合併症の顕著な増加を引き起こさない。しかし、皮膚に直接的に熱を加えると、治療を受けた患者の約半数において不快感または局所的な痛みが生じ得る。また、一般的に急速に治癒する水疱を引き起こし得る。

【0422】

さらに別の実施形態では、光線力学療法（PDT、光放射線療法、光線療法、または光化学療法とも称される）が、いくつかの種類のがんの治療に使用される。これは、光増感剤として知られる特定の化学物質が、特定の種類の光に曝露された場合に単細胞生物を殺傷することができるという発見に基づく。PDTは、固定周波数のレーザー光を光増感剤と組み合わせて使用することにより、がん細胞を破壊する。PDTでは、光増感剤が血流中に注入され、全身の細胞にわたって吸収される。この薬剤は、正常細胞よりも長い期間でがん細胞に留まる。処置されたがん細胞がレーザー光に曝露されると、光増感剤が光を吸収し、処置されたがん細胞を破壊する活性型の酸素を生成する。光増感剤の大部分が健康な細胞を離れているが、がん細胞に依然として存在している場合に生じるように、露光のタイミングを慎重に設定する必要がある。PDTで使用されるレーザー光は、光ファイバー（非常に細いガラスストランド）を通して向けることができる。光ファイバーは、適切な量の光を照射するために、がんの近くに配置される。光ファイバーは、肺癌の治療のために気管支鏡を通して肺に向けることができ、または食道癌の治療のために内視鏡を通して食道に向けることができる。PDTの利点は、健康な組織への損傷を最小限に抑えることである。しかしながら、現在使用されているレーザー光は、約3センチメートル（1/8インチ強）を超える組織を通過できないため、PDTは主に、皮膚上またはそのすぐ下、または内臓の内層の腫瘍を治療するために使用される。光線力学療法は、治療後6週間以上、皮膚及び目を光に敏感にする。患者は、直射日光及び明るい室内光を少なくとも6週間は避けるように助言される。患者が屋外に出なければならない場合は、サングラスを含む保護衣類を着用する必要がある。PDTの他の一時的な副作用は、特定の領域の治療に関連しており、咳、嚥下障害、腹痛、呼吸困難、または息切れなどがある。1995年12月、米国食品医薬品局（FDA）は、閉塞を引き起こしている食道癌の症状を緩和

10

20

30

40

50

し、レーザーだけでは十分に治療できない食道癌に対して、ポルフィマーナトリウムまたはPhotofrin（登録商標）と称される光増感剤を承認した。1998年1月、FDAは、肺癌の通常の治療が適切でない患者の初期の非小細胞肺癌の治療にポルフィマーナトリウムを承認した。国立がん研究所及び他の機関は、膀胱、脳、喉頭、及び口腔のがんを含むいくつかの種類のがんに対する光線力学療法の使用を評価するための臨床治験（調査研究）を支援している。

【0423】

さらに別の実施形態では、レーザー治療を使用して、高強度の光を利用して癌細胞を破壊する。この技術は、特に他の治療法ではがんを治癒できない場合に、出血または閉塞などのがんの症状を緩和するためによく使用される。また、腫瘍を縮小または破壊することによってがんを治療するために使用することもできる。「レーザー」という用語は、放射線の誘導放出による光増幅を表す。電球からの光などの通常の光は、多くの波長を有し、すべての方向に広がる。一方、レーザー光は特定の波長を有し、狭いビームに集束する。このタイプの高輝度光には多くのエネルギーが含まれる。レーザーは非常に強力で、鋼を切断したり、ダイヤモンドを成形したりするために使用できる。レーザーは、目の損傷した網膜の修復または組織の切断（メスの代わりに）など、非常に正確な外科手術にも使用することができる。レーザーにはいくつかの異なる種類があるが、医学で広く使用されているのは3種類のみである：二酸化炭素（CO₂）レーザーは、深い層に透過することなく、皮膚の表面から薄い層を取り除くことができる。この技術は、皮膚の深層まで広がっていない腫瘍及びある特定の前がん状態の治療に特に有用である。従来のメス手術に代わるものとして、CO₂レーザーはまた、皮膚をカットすることもできる。レーザーは、皮膚癌を除去するための方法で使用される。ネオジム：イットリウム－アルミニウム－ガーネット（Nd：YAG）レーザーこのレーザーからの光は、他の種類のレーザーからの光よりも組織の深層まで透過することができ、血液の急速な凝固をもたらす得る。それは光ファイバーを通して身体のアksesしにくい部分に運ぶことができる。この種類のレーザーは、咽頭癌の治療に使用されることがある。アルゴンレーザーこのレーザーは組織の表層のみを通過できるため、皮膚科及び眼科手術に有用である。また、光線力学療法（PDT）として知られる手順で腫瘍を治療するために、感光性染料と共に使用される。レーザーには、レーザーがメスよりも正確であるような標準的な手術器具に比べていくつかの利点を有する。周囲の皮膚及び他の組織の接触がほとんどないため、切開部付近の組織が保護される。レーザーによって生成された熱は、手術部位を滅菌し、感染のリスクを低減する。レーザーの精度により切開が小さくなるため、必要な操作時間が短縮される。多くの場合、治療時間が短縮され、レーザー熱が血管を密閉するため、出血、腫れ、瘢痕が少なくなる。レーザー手術はそれほど複雑ではない。例えば、光ファイバーを使用すると、大きな切開を行うことなく、レーザー光を身体の一部に向けることができる。より多くの手順を外来で行うことができる。レーザーは、熱で腫瘍を縮小もしくは破壊することによるか、またはがん細胞を破壊する化学物質（光増感剤と称される）を活性化することによる、がんを治療するための2つの方法で使用できる。PDTでは、光増感剤はがん細胞に保持され、光によって刺激されてがん細胞を殺傷する反応を引き起こすことができる。CO₂及びNd：YAGレーザーは、腫瘍を縮小または破壊するために使用される。それらは、内視鏡、膀胱などの身体の特定の領域を医師が見ることができるチューブと共に使用できる。一部のレーザーからの光は、光ファイバーを備えた柔軟な内視鏡を透過することができる。これにより、医師は、手術以外では到達できない身体の部分を確認して作業できるため、レーザービームを非常に正確に照準することができる。レーザーは低倍率の顕微鏡でも使用できるため、医師は治療部位をはっきりと見ることができる。他の機器と一緒に使用すると、レーザーシステムは直径200ミクロンという非常に細いねじの幅よりも小さい切断領域を生成できる。レーザーは、多くの種類のがんを治療するために使用される。レーザー手術は、声門（声帯）、子宮頸部、皮膚、肺、膣、外陰部、及び陰茎のがんの特定の段階の標準的な治療法である。レーザー手術は、がんを破壊するための使用に加えて、がんによって引き起こされる症状を緩和するためにも使用される（緩和ケア）

10

20

30

40

50

。例えば、レーザーを使用して、患者の気管（気道）を塞いでいる腫瘍を縮小または破壊して、呼吸を容易にすることができる。また、結腸直腸癌及び肛門癌の緩和にも使用されることがある。レーザー誘発間質温熱療法（L I T T）は、レーザー療法の最新の開発の1つである。L I T Tは、温熱療法と称されるがん治療と同じアイデアを使用しており、その熱は、細胞に損傷を与えるか、またはそれらが生存するために必要な物質を欠乏させることで、腫瘍を縮小させるのを助ける。この治療では、レーザーは体内の間質領域（臓器間の領域）に向けられる。次に、レーザー光が腫瘍の温度を上昇させ、がん細胞を損傷または破壊する。

【0424】

V I I . キット

本発明はまた、本発明により包含される組成物及び製剤を含むキットを包含する。「キット」は、少なくとも1つの試薬、例えば、C C R 2 及び／またはC S F 1 R の発現を特異的に検出及び／または影響を与えるためのオリゴヌクレオチド組成物を含む任意の製造物（例えば、パッケージまたは容器）である。キットは、本発明の方法を実行するためのユニットとして、奨励、流通、または販売され得る。キットは、検出、阻害、スクリーニングなどに必要な、本発明の方法において有用な1つ以上の薬剤を含むことができる。

【0425】

キット内の試薬は、個別の容器で、または単一の容器内の2つ以上の試薬の混合物として提供され得る。さらに、キット内の組成物の使用を説明する指導書を含めることができる。本発明により包含されるキットはまた、本明細書で提供される本発明により包含される方法のためのキットの使用を開示または説明する指導書を含むことができる。キットには、キットが設計される特定の用途を容易にするための追加の構成要素を含めることもできる。例えば、キットは、対照（例えば、対照の生物学的試料または標準）をさらに含むことができる。キットは、開示された本発明の方法における使用が認識された緩衝液及び他の試薬をさらに含むことができる。

【0426】

本発明により包含される他の実施形態は、以下の実施例に記載される。本発明は、以下の実施例によってさらに説明されるが、これはさらなる限定と解釈されるべきではない。

【実施例】

【0427】

実施例1：ヒトC C R 2 mRNAを標的とする候補s i R N A の同定
バイオインフォマティクスアルゴリズムを用いたs i R N A の設計

ヒトC C R 2 mRNA配列（Gene Bank 番号NM_001123041.2；配列番号1）を、標的テンプレートとして使用した。すべての可能な19-mer s i R N A 分子を、この参照配列から作成した。同時に、すべての可能なs i R N A のオフターゲット遺伝子は、ヒト、アカゲザル及びカニクイザルなどの非ヒト霊長類（NHP）、ならびにマウス及びラットについても予測された。特異性スコアを、分析及び比較した各s i R N A 鎖に割り当てた。ヒトC C R 2 転写物に対して向けられた900超のs i R N A 候補を作成し、さらに評価した。

【0428】

s i R N A 候補の評価

すべてのs i R N A 候補について、標的特異性、種間及び種内の交差活性、活性、ならびに他の主要な特徴を評価した。

【0429】

標的特異性

シード領域（2～7位前後）が既知のマイクロRNA分子のシード領域（位置2～7）と同一でない任意の非標的転写物及びs i R N A 候補に対する最も低い配列相補性を有するs i R N A 候補が同定される。

【0430】

予測された各s i R N A 候補について、ヒト、アカゲザル、及びカニクイザルに対して

10

20

30

40

50

オフ遺伝子ターゲットが予測された。各 s i R N A 鎖（すなわち、センス鎖及びアンチセンス鎖）に特異性スコアを割り当てた。特異性スコアを有する各 s i R N A 鎖を分類し、分析した。特異性スコアは、s i R N A 鎖の完全または部分的な相補性（19-mer の 2 ～ 18 位内で最大 4 つのミスマッチ）によって任意の他の転写物の意図しない下方制御の可能性を考慮し、スコアは、トランスクリプトーム規模のオフターゲット分析によって各 s i R N A 分子のアンチセンス及びセンス鎖に対する予測された最も可能性の高いオフターゲット（複数可）を説明する。オフターゲットの頻度は、ミスマッチの数で分類した（例えば、0 のミスマッチ～4 のミスマッチ）。その後、別の基準をターゲット特異性について分析した。s i R N A は、m R N A 分子の 3' - U T R 内の相補配列との塩基対を介して m i R N A のような様式で機能することができる。その相補性は、典型的には、m i R N A（シード領域）の 5' 末端 2 ～ 7 を包含する。機能的 m i R N A 結合部位を介して作用する s i R N A を回避するために、天然の m i R N A シード領域を含む s i R N A 鎖を評価し、回避した。さらに、ヒト、マウス、ラット、アカゲザル、イヌ、及びブタ由来の m i R N A 中の保存されたシード領域も調べた（m i R B a s e データベースから受信したデータ）。

10

【表 6 - 1】

表 6：標的特異性の分類基準

分類	特異性スコア	m i R N A シードを含む	保存された m i R N A シードを含む
1 非常に特異的	≥ 3	いいえ	いいえ
2 特異的	≥ 2	はい／いいえ	いいえ

20

【表 6 - 2】

3	最小特異性	≥ 1	はい／いいえ	いいえ
4	(A) 特異性は考慮されない	—	はい／いいえ	はい／いいえ
	(B) 非特異的	0	はい／いいえ	はい／いいえ
	(C) 非特異的	—	はい／いいえ	はい

30

【0 4 3 1】

これらの基準（表 6 に示されるように）に基づいて、非常に特異的な s i R N A 分子をさらなる評価のために選択した。

【0 4 3 2】

種交差反応性

標的遺伝子 C C R 2 の少なくとも全タンパク質コード転写物及び各種に対して標的となる s i R N A 候補を選択した。異なる種由来の転写物バリエーションを含む配列を、交差反応性について分析した（表 7）。分析は、主要な種の標的配列に完全に一致するすべての 19-mer 及び 17-mer（19-mer の 2 ～ 18 の位置）に対して、ならびに副次的な種の標的配列に完全に一致するかまたは単一のミスマッチを有する、19-mer または 17-mer とそれらのそれぞれの標的部位と一致する s i R N A に対して、別々に行った。約 553 ～ 847 の s i R N A は特異性を考慮せずに予測された。約 108 ～ 221 の s i R N A は、ヒトにおいて特異的であると予測され、約 84 ～ 173 の s i R N A は、ヒト及び N H P（アカゲザル及びカニクイザル）の両方において特異的であると予測された。

40

【表 7 - 1】

表 7 : 交差反応性分析のための C C R 2 転写物

種	転写物 (受託 / I D)	NM_001 12304 1. 2 と交差 反応性の 19 -mer の数	共通の 19 - mer	種類
ヒト	NM_00112 3041. 2	2650	962	mRNA
	NM_00112 3396. 1	1402		mRNA
	XM_01153 4069. 1	2235		mRNA
	ENST0000 0445132	1402		既知のタンパク質コード
	ENST0000 0400888	2204		既知のタンパク質コード
	ENST0000 0292301	2643		既知のタンパク質コード
	ENST0000 0421659	433		既知のタンパク質コード

10

20

【表 7 - 2】

	ENST00000465202	625		既知の処理された転写物
アカゲザル	予測による	1181	1181	予測による
	NM_001032806.1	537		mRNA
	ENSMMUT0000020033	616		プロジェクション__タンパク質コードによって既知である
カニクイザル	XM_005546901.2	1196	1196	mRNA
マウス	NM_009915.2	36	36	mRNA
	XM_006512428.2	36		mRNA
	XM_011243063.1	56		mRNA
	XM_011243064.2	36		mRNA
	ENSMUST00000171719	53		既知のタンパク質コード
	ENSMUST00000168841	36		既知のタンパク質コード
	ENSMUST00000055918	36		既知のタンパク質コード
	ENSMUST00000165984	36		既知のタンパク質コード
ラット	NM_021866.1	35	35	mRNA
	ENSRNOT00000078529	0		既知のタンパク質コード
イヌ	XM_005632629.1	47	36	mRNA
	XM_005632630.2	46		mRNA
	XM_005632631.2	46		mRNA

10

20

30

40

【表 7 - 3】

	ENSCAFT0 00000218 91	36		プロジェクション_タンパク質コードによって既知である
ブタ	NM_00100 1619.1	75	75	mRNA
	ENSSSCT0 00000282 61	75		既知のタンパク質コード
ウサギ	XM_00271 3280.3	53	53	mRNA

10

【0433】

また、各種に対する s i R N A 候補の別の特異性解析も行った。この分析を通じて、ヒト C C R 2 に対して向けられた 962 の s i R N A 候補を分析した。274 のアンチセンス鎖はヒトにおいて特異的であり、896 のセンス鎖はヒトにおいて最小の特異性しか有さない。すべての s i R N A 候補のうち、262 の s i R N A 候補はヒトにおいて特異的であり、553 中 108 のアカゲザル及びカニクイザル（すなわち、非ヒト霊長類）交差反応性 s i R N A（ヒト X N H P）はヒトにおいて特異的であった。

20

【0434】

553 の s i R N A を、N H P における予測された特異性について分析した。146 のアンチセンス鎖が N H P において特異的であり、512 のセンス鎖は N H P において最小の特異性しか有さないことが見出された。すべての s i R N A 候補のうち、138 の s i R N A 候補がヒトにおいて特異的であり、ヒト及び N H P の交差反応性を示した。

【0435】

ヒト及び N H P の間の別の特異性分析も行った。19-mer の分析では、合計 553 の s i R N A のうち 84 の s i R N A がヒト及び N H P において特異的であった。4 の s i R N A は、ヒトにおいて非常に特異的であった。17-mer（19-mer の 2～18 位）を用いた分析では、合計 581 の s i R N A のうち 90 の s i R N A がヒト及び N H P において特異的であった。6 の s i R N A は、ヒトにおいて非常に特異的であった。

30

【0436】

これらの s i R N A は、特異性基準（例えば、ヒト m i R N A シードの不在、アカゲザル m i R N A シードの不在、ヒト、マウス、及びラット間の保存された m i R N A シードの不在、オフターゲット頻度、ならびに 2 つ以上のミスマッチ）及び予測された s i R N A 活性に従ってさらにフィルタリングすることができる。

【0437】

s i R N A 活性予測

選択した s i R N A 候補を、予測された s i R N A 活性についてさらに評価した。特定の活性を得るために、S N P を豊富に有する標的部位を有する s i R N A（一塩基多型）を除外した。ヒト S N P を C C R 2 転写物中の s i R N A 標的部位にマッピングし、分析した。標的部位が S N P から解放された s i R N A 候補を選択した。

40

【0438】

s i R N A 活性は、選択した s i R N A 化学及び他のアルゴリズムに基づいても予測された。不活性 s i R N A である可能性が最も高いと予測される s i R N A 候補は、評価リストから除外される。

【0439】

s i R N A の選択

評価後の選択した s i R N A 候補を表 2 に列挙した。ヒト C C R 2 mRNA 上の各 s i R N A 分子の標的部位の位置（配列番号 1）も表 2 に示す。選択した s i R N A は、ヒ

50

ト C C R 2 mRNA のコード領域を標的とする。

【0440】

実施例 2 : C S F 1 R を標的とする候補 s i R N A の同定

C C R 2 を標的とする s i R N A 候補の同定と同様のアプローチを用いて、ヒト C S F 1 R を標的とする s i R N A 候補を同定した。

【0441】

ヒト C S F 1 R mRNA 配列 (Gene Bank 番号 NM__005211.3 ; 配列番号 2) を、標的テンプレートとして使用した。すべての可能な 19-mer s i R N A 分子を、この参照配列から作成した。すべての s i R N A 候補について、標的特異性、種間及び種内の交差活性、活性、ならびに他の主要な特徴を評価した。

【0442】

各 s i R N A 鎖のオフターゲット遺伝子は、ヒト、アカゲザル、カニクイザルについて予測された。オフターゲット頻度による特定のスコアを各 s i R N A 鎖に割り当てた。すべての s i R N A 鎖を、ヒト、アカゲザル、イヌ、ブタ、ラット、及びマウス m i R N A シード領域の存在について分析した。次いで、各 s i R N A 候補を、特異性スコア及び m i R N A シード分析の両方を考慮して特異性分類に割り当てた (表 6 に示されるように)。

【0443】

s i R N A 候補の種内及び種間交差反応性は、転写物バリエーション及び異なる種、19-mer 及び 17-mer (19-mer のヌクレオチド 2 ~ 18)、ならびに単一のミスマッチを有する 19-mer 及び 17-mer について計算された。約 1770 ~ 2957 の s i R N A は特異性を考慮せずに予測された。約 623 ~ 1051 の s i R N A は、ヒトにおいて特異的であると予測され、約 444 ~ 771 の s i R N A は、ヒト及び N H P (アカゲザル及びカニクイザル) の両方において特異的であると予測された。交差反応性について分析された異なる種からの転写物バリエーションを含む配列を表 8 に示した。

【表 8-1】

表 8 : 交差反応性分析のための C S F 1 R 転写物

種	転写物 (受託 / I D)	NM__005211.3 と交差反応性の 19-mer の数	共通の 19-mer	種類
ヒト	NM__005211.3	3977	3860	mRNA

10

20

30

【表 8 - 2】

	NM_001288 705.2	3866		mRNA	10
	NM_001349 736.1	3866		mRNA	
	ENST00000 286301	3971		既知のタンパク質コード	
	NR_10996 9.1	3688		非コードRNA	
	ENST00000 504875	3664		既知のナンセンス媒介崩壊	
	ENST00000 509861	478		既知の保持イントロン	
	ENST00000 515068	499		既知のナンセンス媒介崩壊	
	ENST00000 515239	411		既知の処理された転写物	
	ENST00000 513609	396		既知のタンパク質コード	
	ENST00000 502660	998		既知のタンパク質コード	
	ENST00000 511344	620		既知のタンパク質コード	
	ENST00000 543093	887		既知のタンパク質コード	
	XM_001107 711.3	1878	1878	mRNA	
	ENSMMUT00 000016183	1598		プロジェクション__タンパク 質コードによって既知である	
アカゲ ザル	ENSMMUT00 000040845	1430		プロジェクション__タンパク 質コードによって既知である	30
	ENSMMUT00 000064465	333		プロジェクション__タンパク 質コードによって既知である	
	XM_005558 240.2	1933	184	mRNA	
カニク イザル	XM_015452 130.1	1849	9	mRNA	40
	NM_001037 859.2	115	115	mRNA	
マウス	XM_006525 584.1	115		mRNA	

【表 8 - 3】

	XM_006525 585.3	115		mRNA	
	XM_006525 586.3	115		mRNA	
	XM_017317 810.1	115		mRNA	
	ENSMUST00 000025523	115		既知のタンパク質コード	
	ENSMUST00 000115268	115		既知のタンパク質コード	
	XR_001782 332.1	109		misc__RNA	
ラット	NM_001029 901.1	105	102	mRNA	
	XM_006254 813.3	108		mRNA	
	XM_008772 147.2	108		mRNA	
	XM_008772 148.2	108		mRNA	
	ENSRNOT00 000079360	105		既知のタンパク質コード	
	ENSRNOT00 000049357	105		既知のタンパク質コード	
	ENSRNOT00 000088988	22		既知のタンパク質コード	
イヌ	XM_54630 6.5	304	274	mRNA	
	ENSCAFT00 000028942	309		プロジェクション__タンパク 質コードによって既知である	
ブタ	XM_003124 100.5	222	214	mRNA	
	XM_013995 332.1	222		mRNA	
	ENSSSCT00 000015787	214		新規__タンパク質コード	
ウサギ	XM_017341 189.1	220	218	mRNA	
	ENSOCUT00 000021641	224		プロジェクション__タンパク 質コードによって既知である	

10

20

30

40

【0444】

また、各種についてCSF1Rに対するsiRNA候補の別の特異性分析も行った。分析を通じて、ヒトCSF1Rに対して向けられた3860のsiRNA候補を分析した。

50

1493のアンチセンス鎖はヒトにおいて特異的であり、3504のセンス鎖はヒトにおいて最小の特異性しか有さない。すべてのs i R N A候補のうち、1418のs i R N A候補はヒトにおいて特異的であり、1770中623のアカゲザル及びカニクイザル交差反応性s i R N A（ヒト及びN H P）はヒトにおいて特異的であった。

【0445】

s i R N Aを、N H Pにおいて予測された特異性について分析した。691のアンチセンス鎖がN H Pにおいて特異的であり、1636のセンス鎖がN H Pにおいて最小の特異性しか有さないことが見出された。すべてのs i R N A候補のうち、655のs i R N A候補がヒトにおいて特異的であり、ヒト及びN H Pの交差反応性を示した。

【0446】

ヒト及びN H Pの間の別の特異性分析も行った。19-merの分析では、合計1770のs i R N Aのうち444のs i R N Aがヒト及びN H Pにおいて特異的であった。21のs i R N Aは、ヒトにおいて非常に特異的であった。17-mer（19-merの2～18位）を用いた分析では、合計1901のs i R N Aのうち481のs i R N Aがヒト及びN H Pにおいて特異的であった。23のs i R N Aは、ヒトにおいて非常に特異的であった。

【0447】

これらのs i R N Aは、特異性基準（例えば、ヒトm i R N Aシードの不在、アカゲザルm i R N Aシードの不在、ヒト、マウス、及びラット間の保存されたm i R N Aシードの不在、オフターゲット頻度、ならびに2つ以上のミスマッチ）及び予測されたs i R N A活性に従ってさらにフィルタリングすることができる。

【0448】

選択したs i R N A候補を、予測されたs i R N A活性についてさらに評価した。特定の活性を得るために、S N Pを豊富に有する標的部位を有するs i R N Aを除外する。ヒトS N PをC S F 1 R転写物中のs i R N A標的部位にマッピングし、分析した。標的部位がS N Pから解放されたs i R N A候補を選択した。s i R N A活性は、選択したs i R N A化学及び他のアルゴリズムに基づいても予測された。不活性s i R N Aである可能性が最も高いと予測されるs i R N A候補は、評価リストから除外される。

【0449】

評価後のC S F 1 Rに特異的な選択したs i R N A候補を表3に列举し、修飾s i R N A鎖を表4に示す。ヒトC S F 1 R mRNA上の各s i R N A分子の標的部位の位置（配列番号2）も表に示す。選択したs i R N Aは、ヒトC S F 1 R mRNAのコード領域及び3' U T R領域の両方を標的とする。

【0450】

実施例3：C S F 1 R s i R N Aスクリーニング

C S F 1 R s i R N A二本鎖の二重用量スクリーニング

ヒト単球T H P - 1細胞を培養し、ウェルあたり25,000個の細胞の密度で、96ウェルプレートで維持した。T H P - 1単球は、L i p o f e c t o m i n e（登録商標）2000（0.5 μ l /ウェル）を用いてC S F 1 R s i R N A二本鎖（表9を参照されたい）でトランスフェクトした。C S F 1 R s i R N Aを、それぞれ0.2 n M及び20 n Mの最終濃度でトランスフェクトした。抗A h a 1 s i R N A（X D - 0 0 0 3 3）を陽性対照としてトランスフェクトした。2つのスクランブルs i R N A配列（X D - 0 0 3 7 9及びX D - 0 0 3 8 5）を陰性対照として使用した。24時間インキュベートした後、処理した細胞を採取し、残りのC S F 1 R mRNAレベルを測定した（表10）。

10

20

30

40

【表 9 - 1】

表 9 : CSF1R siRNA二本鎖及び配列

二本鎖 ID	センス配列	配 列 番 号	アンチセンス配列	配 列 番 号
XD- 089 03	g g G A A u c c c A G u G a u A G A G d T s d T	3 6 8	C U C u A U c A C U G G G A U U C C C d T s d T	4 8 7
XD- 089 04	u u G c G A u G u G u G G g c A A u G d T s d T	3 6 9	c A U U G C C c A c A c A U C G c A A d T s d T	4 8 8
XD- 089 05	g c G A u G u G u G G G c a A u G G c d T s d T	3 7 0	G C c A U U G C C c A c A c A U C G C d T s d T	4 8 9
XD- 089 06	c a A c G c u A c c u u c c A A A A c d T s d T	3 7 1	G U U U U G G A A G G u A G C G U U G d T s d T	4 9 0
XD- 089 07	a c G c u A c c u u c c A a A A c A c d T s d T	3 7 2	G U G U U U U G G A A G G u A G C G U d T s d T	4 9 1
XD- 089 08	c g c u A c c u u c c A A a A c A c G d T s d T	3 7 3	C G U G U U U U G G A A G G u A G C G d T s d T	4 9 2
XD- 089 09	u g c c c G G c c c u G G a A c G u G d T s d T	3 7 4	c A C G U U C c A G G G C C G G G c A d T s d T	4 9 3
XD- 089 10	u g c u c A c A G A c c c g G u G c u d T s d T	3 7 5	A G c A C C G G G U C U G U G A G c A d T s d T	4 9 4
XD- 089 11	a g G c G u c u c G c u G g u G c G u d T s d T	3 7 6	A C G c A C c A G C G A G A C G C C U d T s d T	4 9 5
XD- 089 12	u c A A u G c A G u G c c c u G A u G d T s d T	3 7 7	c A U c A G G G c A C U G c A U U G A d T s d T	4 9 6

10

20

30

40

【表 9 - 2】

XD- 089 13	c a G c A u c c G G c u G a A A G u G d T s d T	3 7 8	c A C U U U c A G C C G G A U G C U G d T s d T	4 9 7
XD- 089 14	c a G A G c u G G u G c G g A u u c G d T s d T	3 7 9	C G A A U C C G c A C c A G C U C U G d T s d T	4 9 8
XD- 089 15	g a G c u G G u G c G G A u u c G A G d T s d T	3 8 0	C U C G A A U C C G c A C c A G C U C d T s d T	4 9 9
XD- 089 16	u g c G G A u u c G A G G g G A G G c d T s d T	3 8 1	G C C U C C C C G A A U G c A d T s d T	5 0 0
XD- 089 17	c u G c c c A G A u c G u g u G c u c d T s d T	3 8 2	G A G c A c A C G A U C U G G G c A G d T s d T	5 0 1
XD- 089 18	g c c c A G A u c G u G u g c u c A G d T s d T	3 8 3	C U G A G c A c A C G A U C U G G G C d T s d T	5 0 2
XD- 089 19	c a G A u c G u G u G c u c A G c c A d T s d T	3 8 4	U G G C U G A G c A c A C G A U C U G d T s d T	5 0 3
XD- 089 20	a u A A c c G u u A c c A a A A G u d T s d T	3 8 5	A C U U U U U G G u A A C G G U u A U d T s d T	5 0 4
XD- 089 21	a a c c G u u A c c A A A a A G u c c d T s d T	3 8 6	G G A C U U U U U G G u A A C G G U U d T s d T	5 0 5
XD- 089 22	a c c G u u A c c A A A A a G u c c u d T s d T	3 8 7	A G G A C U U U U U G G u A A C G G U d T s d T	5 0 6
XD- 089 23	u u A c c A A A A A G u c c u G A c c d T s d T	3 8 8	G G U c A G G A C U U U U U G G u A A d T s d T	5 0 7
XD- 089 24	a g G u u u u A A c u G G a c c u A c d T s d T	3 8 9	G u A G G U C c A G U u A A A A C C U d T s d T	5 0 8
XD- 089 25	g g u u u u A A c u G G A c c u A c c d T s d T	3 9 0	G G u A G G U C c A G U u A A A A C C d T s d T	5 0 9
XD- 089 26	u u u A A c u G G A c c u a c c u G G d T s d T	3 9 1	C c A G G u A G G U C c A G U u A A A d T s d T	5 1 0

10

20

30

40

【表 9 - 3】

XD- 089 27	u u A A c u G G A c c u A c c u G G G d T s d T	3 9 2	C C c A G G u A G G U C c A G U u A A d T s d T	5 1 1
XD- 089 28	g a c c u A c c u G G G A c c c u u u d T s d T	3 9 3	A A A G G G U C C c A G G u A G G U C d T s d T	5 1 2
XD- 089 29	u g A c G u u u G A G c u c A c c c u d T s d T	3 9 4	A G G G U G A G C U c A A A C G U c A d T s d T	5 1 3
XD- 089 30	g a c G u u u G A G c u c a c c c u u d T s d T	3 9 5	A A G G G U G A G C U c A A A C G U C d T s d T	5 1 4
XD- 089 31	u u G A G c u c A c c c u u c G A u A d T s d T	3 9 6	u A U C G A A G G G U G A G C U c A A d T s d T	5 1 5
XD- 089 32	a g c u c A c c c u u c G a u A c c c d T s d T	3 9 7	G G G u A U C G A A G G G U G A G C U d T s d T	5 1 6
XD- 089 33	u u c G A u A c c c c c c a G A G G u d T s d T	3 9 8	A C C U C U G G G G G G u A U C G A A d T s d T	5 1 7
XD- 089 34	g a u A c c c c c c A G A g G u A A G d T s d T	3 9 9	C U u A C C U C U G G G G G G u A U C d T s d T	5 1 8
XD- 089 35	g a G A c c u u A G A G c a c A A c c d T s d T	4 0 0	G G U U G U G C U C u A A G G U C U C d T s d T	5 1 9
XD- 089 36	g a c c u u A G A G c A c a A c c A A d T s d T	4 0 1	U U G G U U G U G C U C u A A G G U C d T s d T	5 2 0
XD- 089 37	c a G c G u G G G G A G u g G c u c c d T s d T	4 0 2	G G A G C c A C U C C C c A C G C U G d T s d T	5 2 1
XD- 089 38	a u c c c c c G G A u G A g u u c c u d T s d T	4 0 3	A G G A A C U c A U C C G G G G G A U d T s d T	5 2 2
XD- 089 39	c c c G G A u G A G u u c c u c u u c d T s d T	4 0 4	G A A G A G G A A C U c A U C C G G G d T s d T	5 2 3
XD- 089 40	g u G G u c G c c u G c A u G u c c A d T s d T	4 0 5	U G G A c A U G c A G G C G A C c A C d T s d T	5 2 4

10

20

30

40

【表 9 - 4】

XD- 089 41	u g c u A u u G u A c A A g u A u A A d T s d T	4 0 6	U u A u A C U U G u A c A A u A G c A d T s d T	5 2 5
XD- 089 42	c a G G u c c G c u G G A a G A u c A d T s d T	4 0 7	U G A U C U U C c A G C G G A C C U G d T s d T	5 2 6
XD- 089 43	g g u c c G c u G G A A G a u c A u c d T s d T	4 0 8	G A U G A U C U U C c A G C G G A C C d T s d T	5 2 7
XD- 089 44	u c c G c u G G A A G A u c A u c G A d T s d T	4 0 9	U C G A U G A U C U U C c A G C G G A d T s d T	5 2 8
XD- 089 45	c c G c u G G A A G A u c a u c G A G d T s d T	4 1 0	C U C G A U G A U C U U C c A G C G G d T s d T	5 2 9
XD- 089 46	a u c A u c G A G A G c u a u G A G G d T s d T	4 1 1	C C U c A u A G C U C U C G A U G A U d T s d T	5 3 0
XD- 089 47	c a u c G A G A G c u A u g A G G G c d T s d T	4 1 2	G C C C U c A u A G C U C U C G A U G d T s d T	5 3 1
XD- 089 48	u a u G A G G G c A A c A g u u A u A d T s d T	4 1 3	u A u A A C U G U U G C C C U c A u A d T s d T	5 3 2
XD- 087 18	a g G G c A A c A G u u A u A c u u u d T s d T	4 1 4	A A A G u A u A A C U G U U G C C C U d T s d T	5 3 3
XD- 089 50	g g c A A c A G u u A u A c u u u c A d T s d T	4 1 5	U G A A A G u A u A A C U G U U G C C d T s d T	5 3 4
XD- 087 51	c a c G c A G c u G c c u u A c A A c d T s d T	4 1 6	G U U G u A A G G c A G C U G C G U G d T s d T	5 3 5
XD- 089 52	u u c c c c c G G A A c A a c c u G c d T s d T	4 1 7	G c A G G U U G U U C C G G G G G A A d T s d T	5 3 6
XD- 089 53	c c G G A A c A A c c u G c A G u u u d T s d T	4 1 8	A A A C U G c A G G U U G U U C C G G d T s d T	5 3 7
XD- 089 54	u u u G G u A A G A c c c u c G G A G d T s d T	4 1 9	C U C C G A G G G U C U u A C c A A A d T s d T	5 3 8

10

20

30

40

【表 9 - 5】

XD- 089 55	u g G u A A G A c c c u c g G A G c u d T s d T	4 2 0	AGCUCCGAGGGUC UuACcAdTs dT	5 3 9
XD- 089 56	u g A A G u c c A c G G c c c A u G c d T s d T	4 2 1	G c A U G G G C C G U G G ACUUCAdTs dT	5 4 0
XD- 089 57	g a A G u c c A c G G c c c A u G c u d T s d T	4 2 2	A G c A U G G G C C G U G GACUUCdTs dT	5 4 1
XD- 089 58	c c u G u A c u G G u c A u c A c G G d T s d T	4 2 3	CCGUGAUGACcAG uAcAGGdTs dT	5 4 2
XD- 089 59	c u G u A c u G G u c A u c A c G G A d T s d T	4 2 4	UCCGUGAUGACcA GuAcAGdTs dT	5 4 3
XD- 089 60	u g u A c u G G u c A u c a c G G A G d T s d T	4 2 5	CUCCGUGAUGACc AGuAcAdTs dT	5 4 4
XD- 089 61	u a c u G G u c A u c A c g G A G u A d T s d T	4 2 6	uACUCCGUGAUGA CcAGuAdTs dT	5 4 5
XD- 089 62	g g u c A u c A c G G A G u A c u G u d T s d T	4 2 7	A c A G u A C U C C G U G AUGACCdTs dT	5 4 6
XD- 089 63	a u c A c G G A G u A c u g u u G c u d T s d T	4 2 8	A G c A A c A G u A C U C CGUGAUdTs dT	5 4 7
XD- 089 64	u c A c G G A G u A c u G u u G c u A d T s d T	4 2 9	uAGcAAcAGuACU CCGUGAdTs dT	5 4 8
XD- 089 65	a c G G A G u A c u G u u g c u A u G d T s d T	4 3 0	c A u A G c A A c A G u A CUCCGUdTs dT	5 4 9
XD- 089 66	a g u A c u G u u G c u A u G G c G A d T s d T	4 3 1	U C G C c A u A G c A A c AGuACUdTs dT	5 5 0
XD- 089 67	u g u u G c u A u G G c G a c c u G c d T s d T	4 3 2	G c A G G U C G C c A u A GcAAcAdTs dT	5 5 1
XD- 089 68	g c u A u G G c G A c c u g c u c A A d T s d T	4 3 3	UUGAGcAGGUCGC cAuAGCdTs dT	5 5 2

10

20

30

40

【表 9 - 6】

XD- 089 69	a u G G c G A c c u G c u c A A c u u d T s d T	4 3 4	A A G U U G A G c A G G U C G C c A U d T s d T	5 5 3
XD- 089 70	g c u c A A c u u u c u G c G A A G G d T s d T	4 3 5	C C U U C G c A G A A A G U U G A G C d T s d T	5 5 4
XD- 089 71	c a A c u u u c u G c G A a G G A A G d T s d T	4 3 6	C U U C C U U C G c A G A A A G U U G d T s d T	5 5 5
XD- 089 72	u u c u G c G A A G G A A g G c u G A d T s d T	4 3 7	U c A G C C U U C C U U C G c A G A A d T s d T	5 5 6
XD- 089 73	c a G G G u G u G G A c A c c u A u G d T s d T	4 3 8	c A u A G G U G U C c A c A C C C U G d T s d T	5 5 7
XD- 089 74	g g A c A A G G A G G A u g G A c G G d T s d T	4 3 9	C C G U C c A U C C U C C U U G U C C d T s d T	5 5 8
XD- 089 75	g c u u c c A A G A A u u g c A u c c d T s d T	4 4 0	G G A U G c A A U U C U U G G A A G C d T s d T	5 5 9
XD- 089 76	a c u u c G G G c u G G c u A G G G A d T s d T	4 4 1	U C C C u A G C c A G C C C G A A G U d T s d T	5 6 0
XD- 089 77	c u G G c u A G G G A c A u c A u G A d T s d T	4 4 2	U c A U G A U G U C C C u A G C c A G d T s d T	5 6 1
XD- 089 78	g g c u A G G G A c A u c a u G A A u d T s d T	4 4 3	A U U c A U G A U G U C C C u A G C C d T s d T	5 6 2
XD- 089 79	u u u G A c u G u G u c u a c A c G G d T s d T	4 4 4	C C G U G u A G A c A c A G U c A A A d T s d T	5 6 3
XD- 089 80	u g A c u G u G u c u A c a c G G u u d T s d T	4 4 5	A A C C G U G u A G A c A c A G U c A d T s d T	5 6 4
XD- 089 81	a c u G u G u c u A c A c g G u u c A d T s d T	4 4 6	U G A A C C G U G u A G A c A c A G U d T s d T	5 6 5
XD- 089 82	g u G u c u A c A c G G u u c A G A G d T s d T	4 4 7	C U C U G A A C C G U G u A G A c A C d T s d T	5 6 6

10

20

30

40

【表 9 - 7】

XD- 089 83	c u A c A c G G u u c A G a G c G A c d T s d T	4 4 8	G U C G C U C U G A A C C G U G u A G d T s d T	5 6 7
XD- 089 84	c a c G G u u c A G A G c g A c G u c d T s d T	4 4 9	G A C G U C G C U C U G A A C C G U G d T s d T	5 6 8
XD- 089 85	g g u u c A G A G c G A c g u c u G G d T s d T	4 5 0	C c A G A C G U C G C U C U G A A C C d T s d T	5 6 9
XD- 089 86	u u c A G A G c G A c G u c u G G u c d T s d T	4 5 1	G A C c A G A C G U C G C U C U G A A d T s d T	5 7 0
XD- 089 87	c u u G G G c u G A A u c c c u A c c d T s d T	4 5 2	G G u A G G G A U U c A G C C c A A G d T s d T	5 7 1
XD- 089 88	u g A A c A G c A A G u u c u A u A A d T s d T	4 5 3	U u A u A G A A C U U G C U G U U c A d T s d T	5 7 2
XD- 089 89	g c A A G u u c u A u A A a c u G G u d T s d T	4 5 4	A C c A G U U u A u A G A A C U U G C d T s d T	5 7 3
XD- 089 90	a g A A u A u A u A c A G c A u c A u d T s d T	4 5 5	A U G A U G C U G u A u A u A U U C U d T s d T	5 7 4
XD- 089 91	a g A G A G c G G G A c u a u A c c A d T s d T	4 5 6	U G G u A u A G U C C C G C U C U C U d T s d T	5 7 5
XD- 089 92	g a G A G c G G G A c u A u A c c A A d T s d T	4 5 7	U U G G u A u A G U C C C G C U C U C d T s d T	5 7 6
XD- 089 93	a g A G c G G G A c u A u a c c A A u d T s d T	4 5 8	A U U G G u A u A G U C C C G C U C U d T s d T	5 7 7
XD- 089 94	g c G G G A c u A u A c c a A u c u G d T s d T	4 5 9	c A G A U U G G u A u A G U C C C G C d T s d T	5 7 8
XD- 089 95	g g A c u A u A c c A A u c u G c c G d T s d T	4 6 0	C G G c A G A U U G G u A u A G U C C d T s d T	5 7 9
XD- 089 96	u g c u G c G A G c A A G g G G A u A d T s d T	4 6 1	u A U C C C C U U G C U C G c A G c A d T s d T	5 8 0

10

20

30

40

【表 9 - 8】

XD- 089 97	g c G A G c A A G G G G A u A u c G c d T s d T	4 6 2	G C G A u A U C C C C U U G C U C G C d T s d T	5 8 1
XD- 089 98	c g A G c A A G G G G A u a u c G c c d T s d T	4 6 3	G G C G A u A U C C C C U U G C U C G d T s d T	5 8 2
XD- 089 99	g a u A u c G c c c A G c c c u u G c d T s d T	4 6 4	G c A A G G G C U G G G C G A u A U C d T s d T	5 8 3
XD- 090 00	a g c c c A A c A A c u A u c A G u u d T s d T	4 6 5	A A C U G A u A G U U G U U G G G C U d T s d T	5 8 4
XD- 090 01	g c c c A A c A A c u A u c A G u u c d T s d T	4 6 6	G A A C U G A u A G U U G U U G G G C d T s d T	5 8 5
XD- 090 02	c c c A A c A A c u A u c a G u u c u d T s d T	4 6 7	A G A A C U G A u A G U U G U U G G G d T s d T	5 8 6
XD- 090 03	a c A A A c u c u G c c u u c G G u c d T s d T	4 6 8	G A C C G A A G G c A G A G U U U G U d T s d T	5 8 7
XD- 090 04	u c u G c c u u c G G u c a u u u c A d T s d T	4 6 9	U G A A A U G A C C G A A G G c A G A d T s d T	5 8 8
XD- 090 05	g c c u u c G G u c A u u u c A c u c d T s d T	4 7 0	G A G U G A A A U G A C C G A A G G C d T s d T	5 8 9
XD- 090 06	u c G G u c A u u u c A c u c A A c A d T s d T	4 7 1	U G U U G A G U G A A A U G A C C G A d T s d T	5 9 0
XD- 090 07	c u c A u G G u G u u G G c c u c G u d T s d T	4 7 2	A C G A G G C c A A c A C c A U G A G d T s d T	5 9 1
XD- 090 08	u c A u G G u G u u G G c c u c G u G d T s d T	4 7 3	c A C G A G G C c A A c A C c A U G A d T s d T	5 9 2
XD- 090 09	c a u G G u G u u G G c c u c G u G u d T s d T	4 7 4	A c A C G A G G C c A A c A C c A U G d T s d T	5 9 3
XD- 090 10	g g u G u u G G c c u c G u G u u u G d T s d T	4 7 5	c A A A c A C G A G G C c A A c A C C d T s d T	5 9 4

10

20

30

40

【表 9 - 9】

XD- 090 11	c g u G u u u G c u A u G c c A A c u d T s d T	4 7 6	AGUUGG c A u A G c A A A c A C G d T s d T	5 9 5
XD- 090 12	a g c u A A A A G u u G G g G G u G u d T s d T	4 7 7	A c A C C C C c A A C U U U u A G C U d T s d T	5 9 6
XD- 090 13	c c A A G c u G A c u c A u c c u A A d T s d T	4 7 8	U u A G G A U G A G U c A G C U U G G d T s d T	5 9 7
XD- 090 14	a g c u G A c u c A u c c u A A c u A d T s d T	4 7 9	u A G U u A G G A U G A G U c A G C U d T s d T	5 9 8
XD- 090 15	c u G A c u c A u c c u A a c u A A c d T s d T	4 8 0	G U u A G U u A G G A U G A G U c A G d T s d T	5 9 9
XD- 090 16	u g A c u c A u c c u A A c u A A c A d T s d T	4 8 1	U G U u A G U u A G G A U G A G U c A d T s d T	6 0 0
XD- 090 17	g a c u c A u c c u A A c u A A c A G d T s d T	4 8 2	C U G U u A G U u A G G A U G A G U C d T s d T	6 0 1
XD- 090 18	u c c u A A c u A A c A G u c A c G c d T s d T	4 8 3	G C G U G A C U G U u A G U u A G G A d T s d T	6 0 2
XD- 090 19	c c u A A c u A A c A G u c A c G c c d T s d T	4 8 4	G G C G U G A C U G U u A G U u A G G d T s d T	6 0 3
XD- 090 20	u c c A c A u u A A A c u a A c A G c d T s d T	4 8 5	G C U G U u A G U U u A A U G U G G A d T s d T	6 0 4
XD- 090 21	c c A c A u u A A A c u A a c A G c A d T s d T	4 8 6	U G C U G U u A G U U u A A U G U G G d T s d T	6 0 5

【表 10 - 1】

表 10 : s i R N A 二本鎖処理後の C S F 1 R mRNA 発現レベル

S i R N A 二本鎖 I D	残りの C S F 1 R m R N A (20 n M)	S D	残りの C S F 1 R m R N A (0. 2 n M)	S D
XD-09016	0. 185 37	0. 02 284	0. 507 02	0. 0644 5

10

20

30

40

【表 10 - 2】

XD-08982	0. 186 92	0. 00 529	0. 780 50	0. 0288 8
XD-08947	0. 193 55	0. 01 912	0. 559 00	0. 0674 8
XD-08993	0. 193 94	0. 04 830	0. 587 60	0. 0293 5
XD-08988	0. 215 06	0. 01 206	0. 574 05	0. 0675 7
XD-08944	0. 217 50	0. 01 495	0. 620 30	0. 0705 1
XD-08969	0. 218 05	0. 01 873	0. 729 11	0. 0476 8
XD-09003	0. 224 26	0. 02 053	0. 737 82	0. 0119 9
XD-09002	0. 230 38	0. 00 631	0. 903 98	0. 0734 0
XD-08917	0. 235 03	0. 05 984	0. 807 99	0. 0827 5
XD-08936	0. 241 59	0. 01 493	0. 606 41	0. 0556 3
XD-08923	0. 243 49	0. 03 950	0. 694 06	0. 0614 5
XD-09021	0. 244 89	0. 02 555	0. 804 75	0. 0745 9
XD-08989	0. 253 38	0. 01 847	0. 829 19	0. 0698 9
XD-08963	0. 254 51	0. 01 114	0. 777 94	0. 0495 0
XD-08986	0. 257 69	0. 01 899	0. 710 13	0. 1082 0
XD-08922	0. 269 56	0. 05 050	0. 672 10	0. 0503 6
XD-08985	0. 274 18	0. 01 579	0. 811 07	0. 0592 9
XD-08911	0. 276 98	0. 02 007	0. 973 47	0. 0562 0
XD-08975	0. 277 64	0. 02 523	0. 807 13	0. 0668 5
XD-08998	0. 279 53	0. 02 538	0. 922 03	0. 0582 4
XD-08920	0. 281 26	0. 01 955	0. 888 99	0. 0419 1

10

20

30

40

【表 10 - 3】

XD-08910	0. 283 92	0. 04 528	0. 971 03	0. 0529 8
XD-08919	0. 289 78	0. 00 295	0. 823 17	0. 0747 7
XD-09000	0. 292 23	0. 02 449	1. 017 98	0. 0708 5
XD-09005	0. 292 34	0. 01 560	0. 800 71	0. 1250 1
XD-09006	0. 293 09	0. 01 102	0. 662 57	0. 0607 5
XD-09015	0. 298 64	0. 02 154	0. 779 11	0. 0474 8
XD-08959	0. 303 78	0. 01 653	0. 886 76	0. 0555 6
XD-09020	0. 306 55	0. 03 732	0. 916 08	0. 0619 2
XD-08965	0. 306 76	0. 01 428	0. 942 95	0. 0873 8
XD-08983	0. 308 87	0. 04 038	0. 959 85	0. 1131 3
XD-09017	0. 310 64	0. 01 470	0. 867 26	0. 0757 3
XD-08718	0. 311 91	0. 02 699	0. 894 23	0. 0745 6
XD-08921	0. 313 15	0. 03 781	0. 958 73	0. 1026 8
XD-08964	0. 317 94	0. 00 603	0. 871 72	0. 0296 4
XD-08937	0. 334 54	0. 04 225	0. 671 01	0. 0621 5
XD-09014	0. 335 45	0. 02 391	0. 822 05	0. 0637 7
XD-08946	0. 342 65	0. 01 887	0. 861 98	0. 0715 3
XD-08970	0. 345 29	0. 02 865	1. 034 88	0. 0656 0
XD-08961	0. 350 79	0. 02 145	1. 003 60	0. 0736 7
XD-08929	0. 357 56	0. 04 288	0. 951 56	0. 1803 5
XD-08974	0. 358 93	0. 01 063	0. 897 74	0. 0810 0

10

20

30

40

【表 10 - 4】

XD-08906	0. 359 86	0. 01 554	0. 970 84	0. 0545 2
XD-09004	0. 367 50	0. 02 836	0. 629 93	0. 0452 7
XD-08954	0. 375 19	0. 03 992	0. 848 90	0. 0262 5
XD-09011	0. 376 44	0. 03 108	0. 960 06	0. 0945 3
XD-08908	0. 378 94	0. 03 524	1. 003 67	0. 0617 3
XD-08925	0. 379 05	0. 09 014	0. 830 44	0. 0886 0
XD-09001	0. 379 16	0. 01 949	1. 111 65	0. 0994 9
XD-08996	0. 410 14	0. 02 609	0. 946 61	0. 0264 9
XD-08945	0. 411 98	0. 02 662	0. 956 33	0. 0507 0
XD-08907	0. 438 09	0. 03 115	0. 962 89	0. 0690 0
XD-08930	0. 443 01	0. 02 980	0. 987 19	0. 0322 9
XD-08973	0. 444 96	0. 05 228	0. 900 93	0. 1073 4
XD-08976	0. 445 26	0. 01 723	0. 828 31	0. 0396 1
XD-08939	0. 446 55	0. 02 934	0. 930 25	0. 0486 3
XD-09018	0. 463 74	0. 03 399	0. 881 68	0. 0330 9
XD-08955	0. 464 74	0. 04 281	0. 831 19	0. 0826 6
XD-09013	0. 483 10	0. 03 093	0. 968 55	0. 0164 8
XD-08992	0. 484 11	0. 03 658	0. 984 62	0. 0905 2
XD-08977	0. 486 02	0. 04 398	0. 951 41	0. 0832 7
XD-08971	0. 516 21	0. 02 496	0. 977 47	0. 0948 7
XD-08914	0. 521 02	0. 00 757	0. 973 45	0. 0749 4

10

20

30

40

【表 10 - 5】

XD-08995	0. 541 38	0. 01 044	1. 020 92	0. 0823 1
XD-08991	0. 550 09	0. 02 018	1. 041 90	0. 0750 6
XD-08987	0. 554 65	0. 01 375	0. 930 50	0. 1062 1
XD-09008	0. 556 37	0. 02 834	1. 034 10	0. 0526 9
XD-09007	0. 564 57	0. 05 419	0. 953 11	0. 0448 5
XD-08950	0. 570 08	0. 03 851	0. 946 92	0. 0639 6
XD-08984	0. 579 05	0. 03 816	0. 929 53	0. 0474 0
XD-08980	0. 583 98	0. 05 652	1. 022 00	0. 0749 6
XD-08927	0. 590 37	0. 04 877	0. 920 02	0. 1792 5
XD-08994	0. 597 08	0. 06 231	0. 972 99	0. 1148 7
XD-08948	0. 603 45	0. 01 408	0. 975 58	0. 0494 9
XD-08943	0. 617 42	0. 03 261	0. 883 35	0. 0572 3
XD-09010	0. 639 71	0. 06 697	1. 092 04	0. 1385 6
XD-08979	0. 658 38	0. 09 571	1. 014 48	0. 0905 7
XD-08913	0. 665 00	0. 04 354	0. 956 28	0. 0645 9
XD-08960	0. 671 38	0. 03 943	1. 086 70	0. 0731 7
XD-08978	0. 679 92	0. 06 028	0. 969 62	0. 0659 6
XD-08718	0. 684 33	0. 02 467	0. 940 05	0. 0355 0
XD-09019	0. 688 10	0. 05 982	0. 984 29	0. 0404 4
XD-08931	0. 714 72	0. 01 747	1. 024 15	0. 0908 8
XD-08942	0. 716 82	0. 06 685	0. 920 23	0. 0477 2

10

20

30

40

【表 10 - 6】

XD-08967	0.717 78	0.05 235	1.113 23	0.0662 8
XD-08997	0.728 82	0.01 181	1.060 92	0.0543 3
XD-08968	0.737 91	0.02 149	1.036 93	0.1457 2
XD-08941	0.754 32	0.04 593	0.983 08	0.0452 3
XD-08972	0.761 28	0.10 513	0.955 68	0.0617 6
XD-08966	0.794 11	0.03 587	0.813 51	0.1307 7
XD-08953	0.808 59	0.06 608	0.905 81	0.0775 2
XD-08903	0.812 77	0.05 747	1.006 63	0.0418 9
XD-08904	0.819 16	0.05 336	1.009 53	0.0482 3
XD-08990	0.833 19	0.06 048	0.917 11	0.0738 3
XD-08909	0.836 63	0.07 080	0.969 07	0.1082 6
XD-08981	0.842 19	0.15 995	1.097 66	0.1196 7
XD-08918	0.847 87	0.01 734	0.950 26	0.0580 7
XD-08916	0.852 13	0.04 898	0.974 63	0.0663 6
XD-09009	0.854 04	0.03 917	1.150 60	0.0435 9
XD-08915	0.863 21	0.12 021	1.017 80	0.1856 6
XD-08956	0.866 90	0.08 694	0.854 77	0.0740 8
XD-08962	0.873 73	0.05 496	1.100 57	0.0247 9
XD-08957	0.901 37	0.03 356	0.882 67	0.0838 5
XD-08928	0.906 59	0.10 278	0.952 60	0.2073 6
XD-08933	0.921 09	0.09 930	0.911 02	0.0675 3

10

20

30

40

【表 10-7】

XD-08958	0.927 51	0.02 078	1.006 19	0.0699 2
XD-08926	0.927 76	0.12 489	0.916 75	0.1207 7
XD-08932	0.930 11	0.10 329	1.023 11	0.0997 6
XD-08912	0.938 04	0.02 806	1.020 81	0.0899 5
XD-08935	0.971 56	0.06 127	0.835 23	0.0643 0
XD-08924	0.981 58	0.06 688	0.894 00	0.0771 1
XD-08940	0.991 13	0.01 645	0.946 43	0.0195 9
XD-08934	0.992 25	0.08 202	0.896 70	0.0814 8
XD-08905	0.998 64	0.05 744	0.914 16	0.1410 5
XD-08938	1.024 80	0.06 030	0.824 52	0.1033 0
XD-08952	1.031 08	0.06 577	0.893 69	0.0378 2
XD-08999	1.110 78	0.06 150	1.086 61	0.1099 7
XD-00379 (陰性対照)	0.869 33	0.02 880	1.122 39	0.0208 6
XD-00385 (陰性対照)	0.907 07	0.03 773	1.033 51	0.0398 6
XD-00033 (Aha-1;陽 性対照)	0.189 75	0.01 787	0.668 40	0.0475 4

10

20

30

【0451】

選択したCSF1R siRNA二本鎖の用量応答

二重用量スクリーニングにおいてCSF1R mRNAレベルの有意な低減を引き起こしたCSF1R siRNA二本鎖を選択し、用量応答についてさらに試験した。ヒト単球THP-1細胞を培養し、ウェルあたり25,000個の細胞の密度で、96ウェルプレートで維持した。THP-1単球を、Lipofectamine（登録商標）2000（0.5 μ l/ウェル）を用いた様々な濃度での前の二重用量スクリーニングから選択されたCSF1R siRNA二本鎖でトランスフェクトした。各CSF1R siRNA二本鎖の用量には、50 nM、6.25 nM、0.78 nM、 1.2×10^{-2} nM、 1.5×10^{-3} nM、 1.9×10^{-4} nM、 3.0×10^{-6} nM、及び 3.7×10^{-7} nMが含まれていた。24時間のインキュベーションの後、処理した細胞を採取し、残りのCSF1R mRNAレベルを各条件で測定した。各CSF1R二本鎖のIC₅₀値を表11に示されるように決定し、各用量応答曲線を図1Aに示す。

40

【表 11】

表 11 : C S F 1 R s i R N A 二本鎖の I C₅₀

S i R N A 二本鎖 I D	I C ₅₀ (nM)
XD-08917	1.292
XD-08922	0.494
XD-08923	1.283
XD-08936	1.251
XD-08944	0.349
XD-08947	0.495
XD-08969	1.452
XD-08982	0.906
XD-08988	0.348
XD-08993	0.267
XD-09003	0.981
XD-09016	0.167

10

【0452】

実施例 4 : C C R 2 s i R N A スクリーニング

20

C C R 2 s i R N A 二本鎖の二重用量スクリーニング

ヒト単球 T H P - 1 細胞を、ウェルあたり 25,000 個の細胞の密度で、96 ウェルプレートで培養して維持した。T H P - 1 単球を、L i p o f e c t o m i n e (登録商標) 2000 (0.5 μ l / ウェル) を用いた C C R 2 s i R N A 二本鎖 (表 12) でトランスフェクトした。C C R 2 s i R N A を、それぞれ 0.2 nM 及び 20 nM の最終濃度でトランスフェクトした。抗 A h a 1 s i R N A (X D - 00033) を陽性対照としてトランスフェクトした。2 つのスクランブル s i R N A 配列 (X D - 00379 及び X D - 00385) を陰性対照として使用した。24 時間のインキュベーションの後、処理した細胞を採取し、残りの C C R 2 m R N A レベルを測定した (表 13)。

【表 12-1】

30

表 12 : C C R 2 s i R N A 二本鎖及び配列

二本鎖 I D	センス配列	配 列 番 号	アンチセンス配列	配 列 番 号
XD- 090 27	c a A G G A c G c A u u u c c c c A G d T s d T	6 0 6	C U G G G G A A A U G C G U C C U U G d T s d T	7 4 4

【表 1 2 - 2】

XD- 090 28	a a G G A c G c A u u u c c c c A G u d T s d T	6 0 7	ACUGGGGGAAAUGC GUCCUUdTsdT	7 4 5
XD- 090 29	g g A c G c A u u u c c c c A G u A c d T s d T	6 0 8	G u A C U G G G G A A A U G C G U C C d T s d T	7 4 6
XD- 090 30	g a c G c A u u u c c c c a G u A c A d T s d T	6 0 9	U G u A C U G G G G A A A U G C G U C d T s d T	7 4 7
XD- 090 31	a c G c A u u u c c c c A g u A c A u d T s d T	6 1 0	A U G u A C U G G G G A A A U G C G U d T s d T	7 4 8
XD- 090 32	c g c A u u u c c c c A G u A c A u c d T s d T	6 1 1	G A U G u A C U G G G G A A A U G C G d T s d T	7 4 9
XD- 090 33	c a u u u c c c c A G u A c A u c c A d T s d T	6 1 2	U G G A U G u A C U G G G G A A A U G d T s d T	7 5 0
XD- 090 34	a u u u c c c c A G u A c a u c c A c d T s d T	6 1 3	G U G G A U G u A C U G G G G A A A U d T s d T	7 5 1
XD- 090 35	u u u c c c c A G u A c A u c c A c A d T s d T	6 1 4	U G U G G A U G u A C U G G G G A A A d T s d T	7 5 2
XD- 090 36	u c c c c A G u A c A u c c A c A A c d T s d T	6 1 5	G U U G U G G A U G u A C U G G G G A d T s d T	7 5 3
XD- 090 37	c a G u A c A u c c A c A a c A u G c d T s d T	6 1 6	G c A U G U U G U G G A U G u A C U G d T s d T	7 5 4
XD- 090 38	g u A c A u c c A c A A c a u G c u G d T s d T	6 1 7	c A G c A U G U U G U G G A U G u A C d T s d T	7 5 5
XD- 090 39	a c A u c c A c A A c A u g c u G u c d T s d T	6 1 8	G A c A G c A U G U U G U G G A U G U d T s d T	7 5 6
XD- 090 40	a u G c u G u c c A c A u c u c G u u d T s d T	6 1 9	A A C G A G A U G U G G A c A G c A U d T s d T	7 5 7
XD- 090 41	u g c u G u c c A c A u c u c G u u c d T s d T	6 2 0	G A A C G A G A U G U G G A c A G c A d T s d T	7 5 8

10

20

30

40

【表 1 2 - 3】

XD- 090 42	g c u G u c c A c A u c u c G u u c u d T s d T	6 2 1	AGAACGAGAUGUG GA c AGC d T s d T	7 5 9
XD- 090 43	c u G u c c A c A u c u c g u u c u c d T s d T	6 2 2	GAGAACGAGAUGU GGA c AG d T s d T	7 6 0
XD- 090 44	g u c c A c A u c u c G u u c u c G G d T s d T	6 2 3	CCGAGAACGAGAU GUGGAC d T s d T	7 6 1
XD- 090 45	u c c A c A u c u c G u u c u c G G u d T s d T	6 2 4	ACCGAGAACGAGA UGUGGA d T s d T	7 6 2
XD- 090 46	c c A c A u c u c G u u c u c G G u u d T s d T	6 2 5	AACCGAGAACGAG AUGUGG d T s d T	7 6 3
XD- 090 47	c a c A u c u c G u u c u c G G u u u d T s d T	6 2 6	AAACCGAGAACGA GAUGUG d T s d T	7 6 4
XD- 090 48	a c A u c u c G u u c u c g G u u u A d T s d T	6 2 7	uAAACCGAGAACG AGAUGU d T s d T	7 6 5
XD- 090 49	c a u c u c G u u c u c G g u u u A u d T s d T	6 2 8	AuAAACCGAGAAC GAGAUG d T s d T	7 6 6
XD- 090 50	u c u c G u u c u c G G u u u A u c A d T s d T	6 2 9	UGAuAAACCGAGA ACGAGAd T s d T	7 6 7
XD- 090 51	c u c G u u c u c G G u u u A u c A G d T s d T	6 3 0	CUGAuAAACCGAG AACGAG d T s d T	7 6 8
XD- 090 52	u c G u u c u c G G u u u a u c A G A d T s d T	6 3 1	UCUGAuAAACCGA GAACGAd T s d T	7 6 9
XD- 090 53	c g u u c u c G G u u u A u c A G A A d T s d T	6 3 2	UUCUGAuAAACCG AGAACG d T s d T	7 7 0
XD- 090 54	u u c u c G G u u u A u c a G A A A u d T s d T	6 3 3	AUUUCUGAuAAAC CGAGAA d T s d T	7 7 1
XD- 090 55	u c u c G G u u u A u c A g A A A u A d T s d T	6 3 4	uAUUUCUGAuAAA CCGAGAd T s d T	7 7 2

10

20

30

40

【表 1 2 - 4】

XD- 090 56	c u c G G u u u A u c A G a A A u A c d T s d T	6 3 5	G u A U U U C U G A u A A A C C G A G d T s d T	7 7 3
XD- 090 57	u c G G u u u A u c A G A a A u A c c d T s d T	6 3 6	G G u A U U U C U G A u A A A C C G A d T s d T	7 7 4
XD- 090 58	u u u A u c A G A A A u A c c A A c G d T s d T	6 3 7	C G U U G G u A U U U C U G A u A A A d T s d T	7 7 5
XD- 090 59	a g A G c G G u G A A G A a G u c A c d T s d T	6 3 8	G U G A C U U C U U c A C C G C U C U d T s d T	7 7 6
XD- 090 60	c g G u G A A G A A G u c a c c A c c d T s d T	6 3 9	G G U G G U G A C U U C U U c A C C G d T s d T	7 7 7
XD- 090 61	a a G u c A c c A c c u u u u u u G A d T s d T	6 4 0	U c A A A A A A G G U G G U G A C U U d T s d T	7 7 8
XD- 090 62	u c A c c A c c u u u u u u G A u u A d T s d T	6 4 1	u A A U c A A A A A A G G U G G U G A d T s d T	7 7 9
XD- 090 63	c a c c A c c u u u u u u g A u u A u d T s d T	6 4 2	A u A A U c A A A A A A G G U G G U G d T s d T	7 8 0
XD- 090 64	a c c A c c u u u u u u G a u u A u G d T s d T	6 4 3	c A u A A U c A A A A A A G G U G G U d T s d T	7 8 1
XD- 090 65	u u u u G A u u A u G A u u A c G G u d T s d T	6 4 4	A C C G u A A U c A u A A U c A A A A d T s d T	7 8 2
XD- 090 66	u g A u u A u G A u u A c g G u G c u d T s d T	6 4 5	A G c A C C G u A A U c A u A A U c A d T s d T	7 8 3
XD- 090 67	u u A u G A u u A c G G u g c u c c c d T s d T	6 4 6	G G G A G c A C C G u A A U c A u A A d T s d T	7 8 4
XD- 090 68	u a u G A u u A c G G u G c u c c c u d T s d T	6 4 7	A G G G A G c A C C G u A A U c A u A d T s d T	7 8 5
XD- 090 69	u g A u u A c G G u G c u c c c u G u d T s d T	6 4 8	A c A G G G A G c A C C G u A A U c A d T s d T	7 8 6

10

20

30

40

【表 1 2 - 5】

XD- 090 70	g a u u A c G G u G c u c c c u G u c d T s d T	6 4 9	G A c A G G G A G c A C C G u A A U C d T s d T	7 8 7
XD- 090 71	a u u A c G G u G c u c c c u G u c A d T s d T	6 5 0	U G A c A G G G A G c A C C G u A A U d T s d T	7 8 8
XD- 090 72	u u A c G G u G c u c c c u G u c A u d T s d T	6 5 1	A U G A c A G G G A G c A C C G u A A d T s d T	7 8 9
XD- 090 73	a c G G u G c u c c c u G u c A u A A d T s d T	6 5 2	U u A U G A c A G G G A G c A C C G U d T s d T	7 9 0
XD- 090 74	g u G c u c c c c u G u c A u A A A u u d T s d T	6 5 3	A A U U u A U G A c A G G G A G c A C d T s d T	7 9 1
XD- 090 75	u g c u c c c c u G u c A u a A A u u u d T s d T	6 5 4	A A A U U u A U G A c A G G G A G c A d T s d T	7 9 2
XD- 090 76	c u c c c c u G u c A u A A a u u u G A d T s d T	6 5 5	U c A A A U U u A U G A c A G G G A G d T s d T	7 9 3
XD- 090 77	c c u G u c A u A A A u u u G A c G u d T s d T	6 5 6	A C G U c A A A U U u A U G A c A G G d T s d T	7 9 4
XD- 090 78	u g u c A u A A A u u u G a c G u G A d T s d T	6 5 7	U c A C G U c A A A U U u A U G A c A d T s d T	7 9 5
XD- 090 79	g u c A u A A A u u u G A c G u G A A d T s d T	6 5 8	U U c A C G U c A A A U U u A U G A C d T s d T	7 9 6
XD- 090 80	u c A u A A A u u u G A c g u G A A G d T s d T	6 5 9	C U U c A C G U c A A A U U u A U G A d T s d T	7 9 7
XD- 090 81	a u A A A u u u G A c G u g A A G c A d T s d T	6 6 0	U G C U U c A C G U c A A A U U u A U d T s d T	7 9 8
XD- 090 82	a a u u u G A c G u G A A g c A A A u d T s d T	6 6 1	A U U U G C U U c A C G U c A A A U U d T s d T	7 9 9
XD- 090 83	a u u u G A c G u G A A G c A A A u u d T s d T	6 6 2	A A U U U G C U U c A C G U c A A A U d T s d T	8 0 0

10

20

30

40

【表 1 2 - 6】

XD- 090 84	u u u G A c G u G A A G c a A A u u G d T s d T	6 6 3	c A A U U U G C U U c A C G U c A A A d T s d T	8 0 1
XD- 090 85	u u G A c G u G A A G c A a A u u G G d T s d T	6 6 4	C c A A U U U G C U U c A C G U c A A d T s d T	8 0 2
XD- 090 86	u g A c G u G A A G c A A a u u G G G d T s d T	6 6 5	C C c A A U U U G C U U c A C G U c A d T s d T	8 0 3
XD- 090 87	g a c G u G A A G c A A A u u G G G G d T s d T	6 6 6	C C C c A A U U U G C U U c A C G U C d T s d T	8 0 4
XD- 090 88	a c G u G A A G c A A A u u G G G G c d T s d T	6 6 7	G C C C c A A U U U G C U U c A C G U d T s d T	8 0 5
XD- 090 89	c g u G A A G c A A A u u g G G G c c d T s d T	6 6 8	G G C C C c A A U U U G C U U c A C G d T s d T	8 0 6
XD- 090 90	g a A G c A A A u u G G G g c c c A A d T s d T	6 6 9	U U G G G C C C c A A U U U G C U U C d T s d T	8 0 7
XD- 090 91	a a G c A A A u u G G G G c c c A A c d T s d T	6 7 0	G U U G G G C C C c A A U U U G C U U d T s d T	8 0 8
XD- 090 92	a g c A A A u u G G G G c c c A A c u d T s d T	6 7 1	A G U U G G G C C C c A A U U U G C U d T s d T	8 0 9
XD- 090 93	g c A A A u u G G G G c c c A A c u c d T s d T	6 7 2	G A G U U G G G C C C c A A U U U G C d T s d T	8 1 0
XD- 090 94	u g c A A A A A G c u G A a G u G c u d T s d T	6 7 3	A G c A C U U c A G C U U U U U G c A d T s d T	8 1 1
XD- 090 95	a a A G c u G A A G u G c u u G A c u d T s d T	6 7 4	A G U c A A G c A C U U c A G C U U U d T s d T	8 1 2
XD- 090 96	u g c u u G A c u G A c A u u u A c c d T s d T	6 7 5	G G u A A A U G U c A G U c A A G c A d T s d T	8 1 3
XD- 090 97	c u u G A c u G A c A u u u A c c u G d T s d T	6 7 6	c A G G u A A A U G U c A G U c A A G d T s d T	8 1 4

10

20

30

40

【表 1 2 - 7】

XD- 090 98	u g c u u u u u c u u A u u A c u c u d T s d T	6 7 7	AGAG u AA u AAGAA AAAG c Ad T s d T	8 1 5
XD- 090 99	u u c u u A u u A c u c u c c c A u u d T s d T	6 7 8	AAUGGGAGAG u AA u AAGAA d T s d T	8 1 6
XD- 091 00	c u c c c A u u G u G G G c u c A c u d T s d T	6 7 9	AGUGAGCC c A c AA UGGGAG d T s d T	8 1 7
XD- 091 01	c c c A u u G u G G G c u c A c u c u d T s d T	6 8 0	AGAGUGAGCC c A c AAUGGG d T s d T	8 1 8
XD- 091 02	c a c u c u G c u G c A A a u G A G u d T s d T	6 8 1	ACU c AUUUG c AG c AGAGUG d T s d T	8 1 9
XD- 091 03	a c u c u G c u G c AA A u G A G u G d T s d T	6 8 2	c ACU c AUUUG c AG c AGAGU d T s d T	8 2 0
XD- 091 04	a g u G G G u c u u u G G g A A u G c d T s d T	6 8 3	G c AUUCC c AAAGA CC c ACU d T s d T	8 2 1
XD- 091 05	g u G G G u c u u u G G G a A u G c A d T s d T	6 8 4	UG c AUUCC c AAAG ACC c AC d T s d T	8 2 2
XD- 091 06	g g G u c u u u G G G A A u G c A A u d T s d T	6 8 5	AUUG c AUUCC c AA AGACCC d T s d T	8 2 3
XD- 091 07	u u G G G A A u G c AA u g u G c A A d T s d T	6 8 6	UUG c A c AUUG c AU UCC c A A d T s d T	8 2 4
XD- 091 08	g u G c A A A u u A u u c a c A G G G d T s d T	6 8 7	CCCUGUGAA u AAU UUG c AC d T s d T	8 2 5
XD- 091 09	c a c A G G G c u G u A u c A c A u c d T s d T	6 8 8	GAUGUGA u A c AGC CCUGUG d T s d T	8 2 6
XD- 091 10	a c A G G G c u G u A u c a c A u c G d T s d T	6 8 9	CGAUGUGA u A c AG CCCUGU d T s d T	8 2 7
XD- 091 11	c a G G G c u G u A u c A c A u c G G d T s d T	6 9 0	CCGAUGUGA u A c A GCCCUG d T s d T	8 2 8

10

20

30

40

【表 1 2 - 8】

XD- 091 12	a g G G c u G u A u c A c a u c G G u d T s d T	6 9 1	ACCGAUGUGA u A c AGCCCU d T s d T	8 2 9
XD- 091 13	g g c u G u A u c A c A u c G G u u A d T s d T	6 9 2	u AACCGAUGUGA u A c AGCC d T s d T	8 3 0
XD- 091 14	g c u G u A u c A c A u c g G u u A u d T s d T	6 9 3	A u AACCGAUGUGA u A c AGC d T s d T	8 3 1
XD- 091 15	c u G u A u c A c A u c G g u u A u u d T s d T	6 9 4	AA u AACCGAUGUG A u A c AG d T s d T	8 3 2
XD- 091 16	u g u A u c A c A u c G G u u A u u u d T s d T	6 9 5	AAA u AACCGAUGU G A u A c A d T s d T	8 3 3
XD- 091 17	g u A u c A c A u c G G u u A u u u u d T s d T	6 9 6	AAAA u AACCGAUG U G A u A C d T s d T	8 3 4
XD- 091 18	u a u c A c A u c G G u u a u u u u G d T s d T	6 9 7	c AAAA u AACCGAU G U G A u A d T s d T	8 3 5
XD- 091 19	u c A c A u c G G u u A u u u u G G c d T s d T	6 9 8	G C c AAAA u AACCG A U G U G A d T s d T	8 3 6
XD- 091 20	a c A u c G G u u A u u u u G G c G G d T s d T	6 9 9	CCGC c AAAA u AAC C G A U G U d T s d T	8 3 7
XD- 091 21	c a u c G G u u A u u u u g G c G G A d T s d T	7 0 0	UCCGC c AAAA u AA C C G A U G d T s d T	8 3 8
XD- 091 22	a u c G G u u A u u u u G g c G G A A d T s d T	7 0 1	U U C C G C c AAAA u A A C C G A U d T s d T	8 3 9
XD- 091 23	u c G G u u A u u u u G G c G G A A u d T s d T	7 0 2	A U U C C G C c AAAA u A A C C G A d T s d T	8 4 0
XD- 091 24	c g G u u A u u u u G G c g G A A u c d T s d T	7 0 3	G A U U C C G C c AAAA u A A C C G d T s d T	8 4 1
XD- 091 25	g u u A u u u u G G c G G a A u c u u d T s d T	7 0 4	A A G A U U C C G C c AA A A u A A C d T s d T	8 4 2

10

20

30

40

【表 1 2 - 9】

XD- 091 26	u u A u u u u G G c G G A a u c u u c d T s d T	7 0 5	GAAGA U U C C G C c A A A A u A A d T s d T	8 4 3
XD- 091 27	u a u u u u G G c G G A A u c u u c u d T s d T	7 0 6	AG A A G A U U C C G C c A A A A u A d T s d T	8 4 4
XD- 091 28	a u u u u G G c G G A A u c u u c u u d T s d T	7 0 7	A A G A A G A U U C C G C c A A A A U d T s d T	8 4 5
XD- 091 29	u u u u G G c G G A A u c u u c u u c d T s d T	7 0 8	GAAGA A G A U U C C G C c A A A A d T s d T	8 4 6
XD- 091 30	u u u G G c G G A A u c u u c u u c A d T s d T	7 0 9	U G A A G A A G A U U C C G C c A A A d T s d T	8 4 7
XD- 091 31	a a G u G u G A u c A c c u G G u u G d T s d T	7 1 0	c A A C c A G G U G A U c A c A C U U d T s d T	8 4 8
XD- 091 32	u g u G A u c A c c u G G u u G G u G d T s d T	7 1 1	c A C c A A C c A G G U G A U c A c A d T s d T	8 4 9
XD- 091 33	g u G A u c A c c u G G u u G G u G G d T s d T	7 1 2	C c A C c A A C c A G G U G A U c A C d T s d T	8 5 0
XD- 091 34	u g A u c A c c u G G u u g G u G G c d T s d T	7 1 3	G C c A C c A A C c A G G U G A U c A d T s d T	8 5 1
XD- 091 35	u c A c c u G G u u G G u g G c u G u d T s d T	7 1 4	A c A G C c A C c A A C c A G G U G A d T s d T	8 5 2
XD- 091 36	c a c c u G G u u G G u G g c u G u G d T s d T	7 1 5	c A c A G C c A C c A A C c A G G U G d T s d T	8 5 3
XD- 091 37	a g G A A u c A u c u u u a c u A A A d T s d T	7 1 6	U U u A G u A A A G A U G A U U C C U d T s d T	8 5 4
XD- 091 38	u c A u c u u u A c u A A a u G c c A d T s d T	7 1 7	U G G c A U U u A G u A A A G A U G A d T s d T	8 5 5
XD- 091 39	g a A G A u u c u G u u u a u G u c u d T s d T	7 1 8	A G A c A u A A A c A G A A U C U U C d T s d T	8 5 6

10

20

30

40

【表 1 2 - 1 0】

XD- 091 40	c u G u G G c c c u u A u u u u c c A d T s d T	7 1 9	U G G A A A A u A A G G G C c A c A G d T s d T	8 5 7
XD- 091 41	u g G c c c u u A u u u u c c A c G A d T s d T	7 2 0	U C G U G G A A A A u A A G G G C c A d T s d T	8 5 8
XD- 091 42	g g c c c u u A u u u u c c A c G A G d T s d T	7 2 1	C U C G U G G A A A A u A A G G G C C d T s d T	8 5 9
XD- 091 43	g c c c u u A u u u u c c a c G A G G d T s d T	7 2 2	C C U C G U G G A A A A u A A G G G C d T s d T	8 6 0
XD- 091 44	c u u A u u u u c c A c G a G G A u G d T s d T	7 2 3	c A U C C U C G U G G A A A A u A A G d T s d T	8 6 1
XD- 091 45	u u A u u u u c c A c G A g G A u G G d T s d T	7 2 4	C c A U C C U C G U G G A A A A u A A d T s d T	8 6 2
XD- 091 46	u a u u u u c c A c G A G g A u G G A d T s d T	7 2 5	U C c A U C C U C G U G G A A A A u A d T s d T	8 6 3
XD- 091 47	u u u c c A c G A G G A u g G A A u A d T s d T	7 2 6	u A U U C c A U C C U C G U G G A A A d T s d T	8 6 4
XD- 091 48	u u c c A c G A G G A u G g A A u A A d T s d T	7 2 7	U u A U U C c A U C C U C G U G G A A d T s d T	8 6 5
XD- 091 49	u c c A c G A G G A u G G a A u A A u d T s d T	7 2 8	A U u A U U C c A U C C U C G U G G A d T s d T	8 6 6
XD- 091 50	c a c G A G G A u G G A A u A A u u u d T s d T	7 2 9	A A A U u A U U C c A U C C U C G U G d T s d T	8 6 7
XD- 091 51	a a u u u c c A c A c A A u A A u G A d T s d T	7 3 0	U c A U u A U U G U G U G G A A A U U d T s d T	8 6 8
XD- 091 52	u u u c c A c A c A A u A a u G A G G d T s d T	7 3 1	C C U c A U u A U U G U G U G G A A A d T s d T	8 6 9
XD- 091 53	c a c A c A A u A A u G A g G A A c A d T s d T	7 3 2	U G U U C C U c A U u A U U G U G U G d T s d T	8 7 0

10

20

30

40

【表 1 2 - 1 1】

XD-		7		8
091	u a A u G A G G A A c A	3	C C c A A A A U G U U C C	7
54	u u u u G G G d T s d T	3	U c A U u A d T s d T	1
XD-		7		8
091	a a c A u u u u G G G G	3	G G A C c A G C C C c A A	7
55	c u G G u c c d T s d T	4	A A U G U U d T s d T	2
XD-		7		8
091	g c c G c u G c u c A u	3	G A C c A U G A U G A G c	7
56	c a u G G u c d T s d T	5	A G C G G C d T s d T	3
XD-		7		8
091	a a u u c u u c G G c c	3	U u A C U c A G G C C G A	7
57	u g A G u A A d T s d T	6	A G A A U U d T s d T	4
XD-		7		8
091	a u u c u u c G G c c u	3	G U u A C U c A G G C C G	7
58	G a G u A A c d T s d T	7	A A G A A U d T s d T	5
XD-		7		8
091	u u c u u c G G c c u G	3	A G U u A C U c A G G C C	7
59	A g u A A c u d T s d T	8	G A A G A A d T s d T	6
XD-		7		8
091	u u c G G c c u G A G u	3	c A c A G U u A C U c A G	7
60	A a c u G u G d T s d T	9	G C C G A A d T s d T	7
XD-		7		8
091	u g A G u A A c u G u G	4	G U G C U U U c A c A G U	7
61	A a A G c A c d T s d T	0	u A C U c A d T s d T	8
XD-		7		8
091	c a c c A G u c A A c u	4	U U G G U C c A G U U G A	7
62	G g A c c A A d T s d T	1	C U G G U G d T s d T	9
XD-		7		8
091	c a A c u G G A c c A A	4	G C G U G G C U U G G U C	8
63	G c c A c G c d T s d T	2	c A G U U G d T s d T	0
XD-		7		8
091	a a c u G G A c c A A G	4	U G C G U G G C U U G G U	8
64	c c A c G c A d T s d T	3	C c A G U U d T s d T	1

【表 1 3 - 1】

表 1 3 : s i R N A 処理後の C C R 2 m R N A 発現レベル

S i R N A 二本鎖 I D	残りの C C R 2 m R N A (20 n M)	S D	残りの C C R 2 m R N A (0.2 n M)	S D
XD-09127	0.133	0.012	0.988	0.067

10

20

30

40

【表 1 3 - 2】

XD-0911 7	0. 150	0. 05 7	0. 990	0. 13 6
XD-0909 8	0. 151	0. 03 1	0. 715	0. 11 4
XD-0913 8	0. 152	0. 02 2	1. 039	0. 04 6
XD-0912 1	0. 156	0. 05 2	1. 087	0. 27 2
XD-0906 2	0. 160	0. 01 9	1. 487	0. 13 2
XD-0911 3	0. 178	0. 02 4	0. 929	0. 10 4
XD-0905 0	0. 198	0. 01 1	1. 271	0. 08 1
XD-0904 8	0. 202	0. 00 9	1. 230	0. 06 9
XD-0904 3	0. 202	0. 01 1	1. 200	0. 28 6
XD-0909 4	0. 203	0. 02 7	0. 902	0. 16 2
XD-0908 6	0. 204	0. 00 6	0. 952	0. 05 6
XD-0906 0	0. 245	0. 04 6	1. 295	0. 17 6
XD-0914 3	0. 257	0. 02 8	1. 047	0. 07 4
XD-0909 5	0. 258	0. 03 4	0. 843	0. 15 8
XD-0910 7	0. 267	0. 02 4	0. 951	0. 07 6
XD-0904 5	0. 278	0. 03 9	1. 042	0. 11 5
XD-0914 9	0. 281	0. 03 1	1. 055	0. 03 1
XD-0911 5	0. 283	0. 01 2	1. 028	0. 07 6
XD-0911 2	0. 289	0. 06 7	0. 964	0. 13 8
XD-0914 7	0. 289	0. 04 5	1. 001	0. 07 3
XD-0915 4	0. 291	0. 04 9	0. 472	0. 06 0

10

20

30

40

【表 1 3 - 3】

X D - 0 9 0 6 5	0 . 3 0 6	0 . 0 1 5	1 . 0 8 4	0 . 1 6 8
X D - 0 9 1 4 6	0 . 3 1 1	0 . 0 2 8	0 . 9 7 9	0 . 0 6 5
X D - 0 9 1 2 3	0 . 3 1 5	0 . 1 2 1	1 . 2 0 1	0 . 3 1 2
X D - 0 9 0 4 7	0 . 3 2 0	0 . 0 3 5	1 . 0 9 1	0 . 1 4 7
X D - 0 9 1 2 5	0 . 3 3 2	0 . 1 1 7	0 . 7 5 0	0 . 0 3 4
X D - 0 9 1 0 9	0 . 3 6 7	0 . 0 3 7	0 . 9 9 9	0 . 1 0 6
X D - 0 9 0 4 6	0 . 3 7 0	0 . 0 7 2	1 . 0 1 1	0 . 1 0 3
X D - 0 9 0 4 4	0 . 3 7 1	0 . 0 1 8	1 . 1 8 7	0 . 1 8 5
X D - 0 9 0 5 3	0 . 3 7 5	0 . 0 7 1	1 . 3 8 4	0 . 1 5 2
X D - 0 9 0 8 8	0 . 3 7 9	0 . 0 3 0	0 . 9 2 3	0 . 0 7 6
X D - 0 9 1 3 9	0 . 4 0 4	0 . 0 4 4	0 . 9 8 0	0 . 0 7 3
X D - 0 9 1 3 7	0 . 4 2 5	0 . 0 5 1	1 . 0 3 1	0 . 0 5 2
X D - 0 9 0 4 1	0 . 4 4 3	0 . 0 3 6	1 . 1 5 9	0 . 2 3 3
X D - 0 9 0 5 5	0 . 4 5 9	0 . 1 2 3	1 . 1 5 9	0 . 1 4 5
X D - 0 9 0 5 1	0 . 4 7 6	0 . 0 4 9	1 . 3 8 0	0 . 1 0 8
X D - 0 9 1 5 8	0 . 4 8 3	0 . 0 2 9	0 . 9 3 0	0 . 1 1 6
X D - 0 9 0 2 7	0 . 4 8 6	0 . 0 4 8	0 . 9 8 0	0 . 1 0 2
X D - 0 9 0 9 0	0 . 4 9 0	0 . 0 1 2	0 . 9 5 3	0 . 1 7 1
X D - 0 9 0 5 9	0 . 4 9 4	0 . 0 6 3	1 . 2 0 0	0 . 1 8 6
X D - 0 9 0 5 2	0 . 4 9 7	0 . 0 4 6	1 . 3 9 2	0 . 0 2 0
X D - 0 9 0 5 4	0 . 5 0 3	0 . 0 7 1	1 . 0 7 8	0 . 1 1 6

10

20

30

40

【表 1 3 - 4】

XD-0903 9	0. 5 1 2	0. 0 4 5	1. 2 0 0	0. 1 8 0
XD-0916 1	0. 5 1 4	0. 0 4 5	0. 8 1 6	0. 2 1 4
XD-0915 9	0. 5 2 2	0. 0 4 9	0. 7 6 2	0. 1 3 4
XD-0915 3	0. 5 4 1	0. 0 7 8	0. 7 4 5	0. 0 8 5
XD-0913 0	0. 5 4 8	0. 0 2 4	0. 7 7 0	0. 0 5 2
XD-0914 1	0. 5 5 0	0. 0 6 4	0. 9 6 4	0. 0 9 7
XD-0913 5	0. 5 5 1	0. 0 8 7	0. 9 8 0	0. 1 0 4
XD-0904 9	0. 5 5 2	0. 0 5 5	1. 3 2 0	0. 1 6 0
XD-0909 6	0. 5 5 4	0. 0 5 5	0. 7 7 6	0. 0 8 4
XD-0915 7	0. 5 5 6	0. 0 6 3	0. 8 0 7	0. 1 9 7
XD-0903 6	0. 5 5 7	0. 0 2 4	1. 0 6 7	0. 1 5 5
XD-0911 4	0. 5 5 8	0. 0 7 6	0. 9 3 9	0. 1 2 9
XD-0903 0	0. 5 5 9	0. 0 3 4	1. 1 1 3	0. 1 7 2
XD-0903 5	0. 5 6 7	0. 0 3 8	1. 1 2 7	0. 1 7 7
XD-0910 8	0. 5 6 9	0. 0 9 3	1. 0 9 0	0. 1 4 7
XD-0915 2	0. 5 7 6	0. 0 7 7	1. 0 2 0	0. 0 7 2
XD-0910 1	0. 6 0 9	0. 0 5 0	0. 9 4 5	0. 0 2 9
XD-0911 8	0. 6 1 5	0. 2 6 2	1. 0 8 1	0. 2 8 5
XD-0906 1	0. 6 2 0	0. 0 6 0	1. 4 3 2	0. 1 3 2
XD-0914 0	0. 6 2 6	0. 0 7 7	0. 9 5 1	0. 0 8 5
XD-0912 6	0. 6 2 8	0. 0 8 2	0. 9 6 5	0. 1 0 4

10

20

30

40

【表 1 3 - 5】

X D - 0 9 1 2 4	0 . 6 3 1	0 . 2 2 9	0 . 9 1 4	0 . 1 7 7
X D - 0 9 0 2 8	0 . 6 3 1	0 . 0 4 1	1 . 1 0 0	0 . 1 2 3
X D - 0 9 1 5 6	0 . 6 3 8	0 . 0 8 6	0 . 8 1 4	0 . 1 2 9
X D - 0 9 1 2 9	0 . 6 5 7	0 . 0 3 9	0 . 9 3 0	0 . 1 3 7
X D - 0 9 1 5 0	0 . 6 5 8	0 . 1 1 8	1 . 0 2 0	0 . 0 7 2
X D - 0 9 0 8 0	0 . 6 7 2	0 . 0 2 5	0 . 7 9 5	0 . 0 8 2
X D - 0 9 0 8 2	0 . 6 7 2	0 . 0 7 6	0 . 8 9 3	0 . 0 7 3
X D - 0 9 1 2 2	0 . 6 7 3	0 . 2 2 1	1 . 0 6 2	0 . 2 8 8
X D - 0 9 0 4 2	0 . 6 9 7	0 . 0 6 0	1 . 2 2 8	0 . 2 7 9
X D - 0 9 0 7 5	0 . 7 0 5	0 . 0 4 2	1 . 0 2 2	0 . 0 4 0
X D - 0 9 1 6 4	0 . 7 1 3	0 . 1 1 0	0 . 6 5 9	0 . 1 1 6
X D - 0 9 1 2 8	0 . 7 1 4	0 . 0 8 1	0 . 9 2 4	0 . 0 3 5
X D - 0 9 1 2 0	0 . 7 1 6	0 . 2 3 9	1 . 0 0 0	0 . 2 1 0
X D - 0 9 1 6 3	0 . 7 2 1	0 . 0 2 3	0 . 7 5 6	0 . 1 1 2
X D - 0 9 0 5 8	0 . 7 2 5	0 . 0 9 6	1 . 1 9 0	0 . 2 5 1
X D - 0 9 1 6 2	0 . 7 3 7	0 . 0 3 8	0 . 8 0 2	0 . 1 1 1
X D - 0 9 1 1 6	0 . 7 3 8	0 . 0 2 1	0 . 9 6 9	0 . 1 3 4
X D - 0 9 1 5 1	0 . 7 3 9	0 . 0 5 6	1 . 0 0 6	0 . 1 0 5
X D - 0 9 0 9 9	0 . 7 4 2	0 . 0 7 0	1 . 0 2 1	0 . 0 4 6
X D - 0 9 1 0 5	0 . 7 5 1	0 . 0 7 9	0 . 8 9 5	0 . 0 4 3
X D - 0 9 0 5 6	0 . 7 5 6	【 0 . 2 3 2 】	1 . 2 0 3	0 . 0 9 1

10

20

30

40

【表 1 3 - 6】

XD-0908 9	0. 7 6 5	0. 0 5 7	0. 8 1 0	0. 0 7 8
XD-0911 0	0. 7 6 8	0. 0 3 9	1. 0 7 1	0. 0 3 4
XD-0911 1	0. 7 7 1	0. 0 9 6	1. 0 0 7	0. 0 6 7
XD-0915 5	0. 7 7 2	0. 1 5 1	1. 0 7 7	0. 2 6 7
XD-0916 0	0. 7 8 1	0. 0 5 9	0. 9 8 3	0. 1 3 1
XD-0905 7	0. 7 8 5	0. 1 5 8	1. 1 6 1	0. 1 4 4
XD-0914 2	0. 7 8 7	0. 0 6 7	0. 9 6 8	0. 0 3 9
XD-0914 5	0. 7 9 2	0. 1 2 3	0. 8 7 8	0. 1 3 5
XD-0909 1	0. 7 9 3	0. 1 5 6	0. 8 9 4	0. 1 1 0
XD-0914 4	0. 7 9 7	0. 1 1 5	0. 9 5 8	0. 0 7 8
XD-0911 9	0. 8 0 1	0. 2 6 9	1. 0 9 5	0. 2 9 2
XD-0906 6	0. 8 0 1	0. 0 5 3	0. 9 4 1	0. 1 4 6
XD-0914 8	0. 8 0 4	0. 1 1 2	1. 0 6 1	0. 1 0 2
XD-0908 1	0. 8 3 0	0. 0 7 6	0. 8 9 3	0. 0 6 0
XD-0906 3	0. 8 3 1	0. 1 0 5	1. 1 7 2	0. 4 1 3
XD-0907 2	0. 8 4 1	0. 0 5 0	0. 9 8 2	0. 1 2 3
XD-0903 3	0. 8 4 3	0. 0 4 5	1. 0 7 2	0. 1 9 4
XD-0910 6	0. 8 5 0	0. 1 0 0	0. 9 4 0	0. 1 0 1
XD-0913 6	0. 8 5 5	0. 0 7 9	0. 9 3 7	0. 1 1 3
XD-0908 7	0. 8 5 8	0. 1 0 3	0. 8 7 8	0. 1 0 9
XD-0903 8	0. 8 6 0	0. 0 2 0	1. 1 1 8	0. 2 1 3

10

20

30

40

【表 1 3 - 7】

X D - 0 9 1 3 1	0 . 8 6 2	0 . 0 8 6	0 . 7 9 1	0 . 1 7 2
X D - 0 9 0 3 7	0 . 8 6 5	0 . 0 7 1	1 . 0 6 2	0 . 2 1 8
X D - 0 9 1 3 4	0 . 8 6 9	0 . 1 1 8	0 . 7 6 2	0 . 1 4 0
X D - 0 9 0 4 0	0 . 8 8 3	0 . 0 4 3	1 . 2 7 5	0 . 2 7 3
X D - 0 9 1 0 0	0 . 8 8 8	0 . 1 1 7	0 . 9 3 0	0 . 0 6 8
X D - 0 9 0 7 9	0 . 8 9 0	0 . 0 4 0	0 . 7 6 5	0 . 1 3 6
X D - 0 9 1 0 2	0 . 9 0 1	0 . 1 4 4	0 . 9 3 7	0 . 1 2 3
X D - 0 9 0 3 2	0 . 9 0 4	0 . 0 5 7	1 . 0 3 6	0 . 0 9 8
X D - 0 9 0 3 1	0 . 9 0 5	0 . 0 4 8	1 . 1 5 2	0 . 1 6 7
X D - 0 9 1 3 2	0 . 9 1 1	0 . 0 6 4	0 . 8 1 8	0 . 0 5 6
X D - 0 9 0 7 6	0 . 9 1 7	0 . 0 2 8	1 . 0 4 0	0 . 1 9 8
X D - 0 9 0 9 2	0 . 9 2 5	0 . 0 9 3	0 . 9 6 8	0 . 1 6 6
X D - 0 9 0 7 4	0 . 9 3 7	0 . 0 4 6	0 . 9 4 1	0 . 1 7 2
X D - 0 9 0 8 5	0 . 9 3 9	0 . 0 1 7	0 . 9 2 5	0 . 0 4 7
X D - 0 9 0 8 3	0 . 9 5 4	0 . 0 9 8	0 . 9 3 8	0 . 0 4 3
X D - 0 9 0 7 8	0 . 9 6 2	0 . 0 4 3	0 . 9 1 9	0 . 1 4 4
X D - 0 9 0 7 3	0 . 9 6 3	0 . 0 4 5	0 . 9 0 5	0 . 1 0 1
X D - 0 9 0 7 1	0 . 9 6 9	0 . 0 8 5	0 . 8 9 6	0 . 1 9 5
X D - 0 9 0 2 9	0 . 9 7 2	0 . 0 7 0	1 . 0 5 1	0 . 1 0 1
X D - 0 9 0 8 4	0 . 9 7 3	0 . 0 6 9	0 . 8 6 9	0 . 0 5 9
X D - 0 9 0 6 4	0 . 9 8 4	0 . 0 5 4	1 . 0 6 0	0 . 1 2 0

10

20

30

40

【表 13-8】

XD-0913 3	0.987	0.03 0	0.951	0.17 0
XD-0910 3	1.003	0.09 2	0.946	0.10 5
XD-0909 7	1.010	0.14 0	0.727	0.12 8
XD-0910 4	1.014	0.10 9	0.877	0.07 2
XD-0903 4	1.031	0.11 7	1.186	0.11 6
XD-0909 3	1.046	0.13 0	0.810	0.13 4
XD-0906 7	1.058	0.14 7	1.016	0.12 7
XD-0906 9	1.081	0.01 8	0.886	0.14 9
XD-0907 0	1.089	0.06 4	0.860	0.16 0
XD-0906 8	1.102	0.05 4	0.918	0.13 8
XD-0907 7	1.153	0.12 1	0.943	0.11 2
XD-0037 9 (陰性対照)	0.851	0.03 4	1.020	0.20 7
XD-0038 5 (陰性対照)	0.891	0.09 5	0.863	0.06 8
XD-0003 3 (Aha- 1 ; 陽性対照)	0.186	0.04 4	0.678	0.06 7

10

20

30

【0453】

選択したCCR2 siRNA二本鎖の用量応答

二重用量スクリーニングにおいてCCR2 mRNAレベルの有意な低減を引き起こしたCCR2 siRNA二本鎖を選択し、用量応答についてさらに試験した。ヒト単球THP-1細胞を培養し、ウェルあたり25,000個の細胞の密度で、96ウェルプレートで維持した。THP-1単球を、Lipofectamine（登録商標）2000（0.5 μ l/ウェル）を用いた様々な濃度での前の二重用量スクリーニングから選択されたCCR2 siRNA二本鎖でトランスフェクトした。各CCR2 siRNA二本鎖の用量には、50.0 nM、10.0 nM、2.0 nM、0.4 nM、0.8 $\times 10^{-1}$ nM、1.6 $\times 10^{-2}$ nM、3.2 $\times 10^{-3}$ nM、6.4 $\times 10^{-4}$ nM、1.28 $\times 10^{-4}$ nM、及び2.6 $\times 10^{-5}$ nMが含まれていた。24時間のインキュベーションの後、処理した細胞を採取し、残りのCCR2 mRNAレベルを各条件で測定した。各CCR2 siRNA二本鎖に対するIC₅₀値を表14に示されるように決定し、各用量応答を図1Bに示す。

40

【表 14】

表 14 : CCR2 siRNA二本鎖の IC₅₀

SiRNA二本鎖ID	IC ₅₀ (nM)
XD-09048	0.17046435
XD-09050	0.11069267
XD-09062	0.38493077
XD-09086	0.2956292
XD-09094	0.27921953
XD-09098	0.01619127
XD-09113	0.70462092
XD-09117	0.13414519
XD-09121	0.20361795
XD-09127	0.15636242
XD-09138	0.23593031
XD-09154	3.37845447

10

20

30

【0454】

実施例 5 : CSF1R siRNA二本鎖及びバリエントの二重用量スクリーニング

CSF1R mRNAノックダウンに対して高効率かつ特異性を有する siRNA二本鎖に由来する siRNA修飾バリエントを、配列及び化学修飾によって設計し、得られた二本鎖バリエントを、Hepa 1-6細胞でさらに試験した。マウス肝腫由来の Hepa 1-6細胞を標準的な培養条件で培養し、1ウェルあたり15,000個の細胞の密度で96ウェルプレートに維持した。Hepa 1-6細胞を、Lipofectamine（登録商標）2000（0.5 μl/ウェル）を用いてCSF1R siRNA二本鎖及びバリエントでトランスフェクトした。元の修飾 siRNA二本鎖からのバリエントを含む合計59のCSF1R siRNA二本鎖をHepa 1-6細胞に導入し、さらに検証した（表15）。CSF1R siRNAは、それぞれ0.2 nM及び20 nMの最終濃度でトランスフェクションされた。抗R-Luc siRNA二本鎖（XD-00379）及びスクランブルRNA二本鎖（XD-00194）を、それぞれ陽性及び陰性対照として使用した。これらの siRNA二本鎖の情報及び配列を表15に示す。

40

【表 15-1】

表 15. CSF1R siRNA二本鎖及びバリエーション

位置	二本鎖 ID	SS ID	センス配列	配列番号	AS ID	アンチセンス配列	配列番号
948	XD-08917	X28782	c u G c c c A G A u c G u g u G c u c d T s d T	382	X28783	G A G c A c A C G A U C U G G G c A G d T s d T	501
1056	XD-08922	X28792	a c c G u u A c c A A A A a G u c c u d T s d T	387	X28793	A G G A C U U U U U G G u A A C G G U d T s d T	506
1060	XD-08923	X28794	u u A c c A A A A A G u c c u G A c c d T s d T	388	X28795	G G U c A G G A C U U U U G G u A A d T s d T	507
1717	XD-08936	X28820	g a c c u u A G A G c A c a A c c A A d T s d T	401	X28821	U U G G U U G U G C U C u A A G G U C d T s d T	520
3049	XD-08944	X28836	u c c G c u G G A A G A u c A u c G A d T s d T	409	X28837	U C G A U G A U C U U C c A G C G G A d T s d T	528
1935	XD-08947	X28842	c a u c G A G A G c u A u g A G G G c d T s d T	431	X28843	G C C C U c A u A G C U C U C G A U G d T s d T	531
2276	XD-08963	X28872	a u c A c G G A G u A c u g u u G c u d T s d T	428	X28873	A G c A A c A G u A C U C C G U G A U d T s d T	547
2295	XD-08969	X28884	a u G G c G A c c u G c u c A A c u u d T s d T	434	X28885	A A G U U G A G c A G G U C G C c A U d T s d T	553
2600	XD-08975	X28896	g c u u c c A A G A A u u g c A u c c d T s d T	440	X28897	G G A U G c A A U U C U U G G A A G C d T s d T	559

10

20

30

40

【表 15-2】

27 81	XD -0 89 82	X2 89 10	g u G u c u A c A c G G u u c A G A G d T s d T	4 4 7	X2 89 11	CUCUGAAC CGUGuAGA cACdTsdT	5 6 6
27 91	XD -0 89 85	X2 89 16	g g u u c A G A G c G A c g u c u G G d T s d T	4 5 0	X2 89 17	C c A G A C G U C G C U C U G A A C C d T s d T	5 6 9
27 93	XD -0 89 86	X2 89 18	u u c A G A G c G A c G u c u G G u c d T s d T	4 5 1	X2 89 19	G A C c A G A C G U C G C U C U G A A d T s d T	5 7 0
28 74	XD -0 89 88	X2 89 22	u g A A c A G c A A G u u c u A u A A d T s d T	4 5 3	X2 89 23	U u A u A G A A C U U G C U G U U c A d T s d T	5 7 2
28 80	XD -0 89 89	X2 89 24	g c A A G u u c u A u A A a c u G G u d T s d T	4 5 4	X2 89 25	A C c A G U U u A u A G A A C U U G C d T s d T	5 7 3
19 48	XD -0 89 93	X2 89 32	a g A G c G G G A c u A u a c c A A u d T s d T	4 5 8	X2 89 33	A U U G G u A u A G U C C C G C U C U d T s d T	5 7 7
32 92	XD -0 90 03	X2 89 52	a c A A A c u c u G c c u u c G G u c d T s d T	4 6 8	X2 89 53	G A C C G A A G G c A G A G U U U G U d T s d T	5 8 7
33 05	XD -0 90 06	X2 89 58	u c G G u c A u u u c A c u c A A c A d T s d T	4 7 1	X2 89 59	U G U U G A G U G A A A U G A C C G A d T s d T	5 9 0
39 16	XD -0 90 15	X2 89 76	c u G A c u c A u c c u A a c u A A c d T s d T	4 8 0	X2 89 77	G U u A G U u A G G A U G A G U c A G d T s d T	5 9 9
39 17	XD -0 90 16	X2 89 78	u g A c u c A u c c u A A c u A A c A d T s d T	4 8 1	X2 89 79	U G U u A G U u A G G A U G A G U c A d T s d T	6 0 0
39 59	XD -0	X2 89 88	c c A c A u u A A A c u A a	4 8 6	X2 89 89	U G C U G U u A G U U u A A U G U G G d T s d T	6 0 5

10

20

30

40

【表 1 5 - 3】

	9 0 2 1		c A G c A d T s d T				
1 9 3 5 — v a r 1	XD — 1 0 3 4 3	X 3 2 2 9 8	u c C G c u G G A a G A u c A u C g s a	8 8 3	X 3 2 3 7 2	d T C G A U G A U C U U C c A G C G G A u s u	9 2 2
1 9 4 8 — v a r 1	XD — 1 0 3 4 4	X 3 2 2 9 9	c a U c G A G A G c u A u g A G G g s a	8 8 4	X 3 2 3 7 3	d T C C C U c A u A G C U c U C G A U G u s u	9 2 3
2 8 7 4 — v a r 1	XD — 1 0 3 4 5	X 3 2 3 0 0	u g A A c A G C A a G U u c u A U a s a	8 8 5	X 3 2 3 7 4	d T U A u A G A A C U U G c U G U U c A u s u	9 2 4
3 0 4 9 — v a r 1	XD — 1 0 3 4 6	X 3 2 3 0 1	a g A G c G G G A c u A u a c c A a s a	8 8 6	X 3 2 3 7 5	d T U U G G u A u A G U C c C G C U C U u s u	9 2 5
3 9 1 7 — v a r 1	XD — 1 0 3 4 7	X 3 2 3 0 2	u g A c u c A U C c u A A c u A A c s a	8 8 7	X 3 2 3 7 6	d T G U u A G U u A G G A u G A G U c A u s u	9 2 6
1 9 3 5 — v a r 2	XD — 1 0 3 4 8	X 3 2 3 0 3	u c c G c u G G A a G A u c A u c g s a	8 8 8	X 3 2 3 7 2	d T C G A U G A U C U U C c A G C G G A u s u	9 2 7
1 9 4 8 — v a r 2	XD — 1 0 3 4 9	X 3 2 3 0 4	c a u c G A G A G c u A u g A G G g s a	8 8 9	X 3 2 3 7 3	d T C C C U c A u A G C U c U C G A U G u s u	9 2 8
2 8 7 4 — v a r 2	XD — 1 0 3 5 0	X 3 2 3 0 5	u g A A c A G c A a G u u c u A u a s a	8 9 0	X 3 2 3 7 4	d T U A u A G A A C U U G c U G U U c A u s u	9 2 9

10

20

30

40

【表 1 5 - 4】

3 0 4 9 — v a r 2	XD — 1 0 3 5 1	X 3 2 3 0 1	a g A G c G G G A c u A u a c c A a s a	8 9 1	X 3 2 3 7 7	d T U U G G u A u A G U C c C g C U C U u s u	9 3 0
3 9 1 7 — v a r 2	XD — 1 0 3 5 2	X 3 2 3 0 6	u g A c u c A u c c u A A c u A A c s a	8 9 2	X 3 2 3 7 6	d T G U u A G U u A G G A u G A G U c A u s u	9 3 1
1 9 3 5 — v a r 3	XD — 1 0 3 5 3	X 3 2 3 0 7	u c C G c u G G A a G A u c A u C g a (C 6)	8 9 3	X 3 2 3 7 8	U C G A U G A U C U U C c A G C G G A u s u	9 3 2
1 9 4 8 — v a r 3	XD — 1 0 3 5 4	X 3 2 3 0 8	c a U c G A G A G c u A u g A G G g a (C 6)	8 9 4	X 3 2 3 7 9	U C C C U c A u A G C U c U C G A U G u s u	9 3 3
2 8 7 4 — v a r 3	XD — 1 0 3 5 5	X 3 2 3 0 9	u g A A c A G C A a G U u c u A U a a (C 6)	8 9 5	X 3 2 3 8 0	U U A u A G A A C U U G c U G U U c A u s u	9 3 4
3 0 4 9 — v a r 3	XD — 1 0 3 5 6	X 3 2 3 1 0	a g A G c G G G A c u A u a c c A a a (C 6)	8 9 6	X 3 2 3 8 1	U U U G G u A u A G U C c C G C U C U u s u	9 3 5
3 9 1 7 — v a r 3	XD — 1 0 3 5 7	X 3 2 3 1 1	u g A c u c A U C c u A A c u A A c a (C 6)	8 9 7	X 3 2 3 8 2	U G U u A G U u A G G A u G A G U c A u s u	9 3 6
9 4 8 — v a r 1	XD — 1 0 3 5 8	X 3 2 3 1 2	c u G c c c A G A u c G u g u G C u s a	8 9 8	X 3 2 3 8 3	d T A G c A c A C G A U C u G G G c A G u s u	9 3 7
1 0 5 6 — v	XD — 1 0 3 5 9	X 3 2 3 1 3	a c C G u u A C C a A A A a G u C c s a	8 9 9	X 3 2 3 8 4	d T G G A C U U U U U G G u A A C G G U u s u	9 3 8

10

20

30

40

【表 15-5】

a r 1							
10 60 —v a r 1	XD —1 03 60	X3 23 14	u u A c c A A A A a G U c c u G A c s a	9 0 0	X3 23 85	d T G U c A G G A C U U U u U G G u A A u s u	9 3 9
17 17 —v a r 1	XD —1 03 61	X3 23 15	g a C c u u A G A g c A c a A c C a s a	9 0 1	X3 23 86	d T U G G U U G U G C U C u A A G G U C u s u	9 4 0
22 76 —v a r 1	XD —1 03 62	X3 23 16	a u C A c G G A G u A C u g u u G c s a	9 0 2	X3 23 87	d T G c A A c A G u A C U c C G U G A U u s u	9 4 1
22 95 —v a r 1	XD —1 03 63	X3 23 17	a u G G c G A C C u G C u c A A C u s a	9 0 3	X3 23 88	d T A G U U G A G c A G G u C G C c A U u s u	9 4 2
26 00 —v a r 1	XD —1 03 64	X3 23 18	g c U u c c A A G a A U u g c A U c s a	9 0 4	X3 23 89	d T G A U G c A A U U C U u G G A A G C u s u	9 4 3
27 81 —v a r 1	XD —1 03 65	X3 23 19	g u G u c u A C A c G G u u c A G a s a	9 0 5	X3 23 90	d T U C U G A A C C G U G u A G A c A C u s u	9 4 4
27 91 —v a r 1	XD —1 03 66	X3 23 20	g g U u c A G A G c G A c g u c U g s a	9 0 6	X3 23 91	d T C A G A C G U C G C U c U G A A C C u s u	9 4 5
27 93 —v a r 1	XD —1 03 67	X3 23 21	u u C A G A G C G a c G u c u G G u s a	9 0 7	X3 23 92	d T A C c A G A C G U C G c U C U G A A u s u	9 4 6

10

20

30

40

【表 15-6】

28 80 —v ar 1	XD —1 03 68	X3 23 22	g c A A G u U C U a u A A a c u G g s a	9 0 8	X3 23 93	d T C c A G U U u A u A G a A C U U G C u s u	9 4 7
32 92 —v ar 1	XD —1 03 69	X3 23 23	a c A A A c U C U g c C u u c G G u s a	9 0 9	X3 23 94	d T A C C G A A G G c A G a G U U U G U u s u	9 4 8
33 05 —v ar 1	XD —1 03 70	X3 23 24	u c G G u c A U U u c A c u c A A c s a	9 1 0	X3 23 95	d T G U U G A G U G A A A u G A C C G A u s u	9 4 9
39 16 —v ar 1	XD —1 03 71	X3 23 25	c u G A c u C A U c c U A a c u A a s a	9 1 1	X3 23 96	d T U u A G U u A G G A U g A G U c A G u s u	9 5 0
39 59 —v ar 1	XD —1 03 72	X3 23 26	c c A c A u U A A a c U A a c A G c s a	9 1 2	X3 23 97	d T G C U G U u A G U U u a A U G U G G u s u	9 5 1
97 3— va r1	XD —1 03 73	X3 23 27	c a G c G u U G A u G U u a A c U u s a	9 1 3	X3 23 98	d T A A G U u A A c A U c a A C G C U G u s u	9 5 2
10 87 —v ar 1	XD —1 03 74	X3 23 28	c g A u c A A G U a G A u u u c C a s a	9 1 4	X3 23 99	d T U G G A A A U C u A C u U G A U C G u s u	9 5 3
19 41 —v ar 1	XD —1 03 75	X3 23 29	g g A A G A U C A u c G A g A G C u s a	9 1 5	X3 24 00	d T A G C U C U C G A U G a U C U U C C u s u	9 5 4
19 64 —v	XD —1 03 76	X3 23 30	g g C A A c A G U u A U A c u u U c s a	9 1 6	X3 24 01	d T G A A A G u A u A A C u G U U G C C u s u	9 5 5

10

20

30

40

【表 15-7】

a r 1							
26 89 —v a r 1	XD —1 03 77	X3 23 31	g g C u A G G G A c A U c a u G A a s a	9 1 7	X3 24 02	d T U U c A U G A U G U C c C u A G C C u s u	9 5 6
28 96 —v a r 1	XD —1 03 78	X3 23 32	g g U G A A G G A u G G A u A c C a s a	9 1 8	X3 24 03	d T U G G u A U C c A U C c U U c A C C u s u	9 5 7
35 27 —v a r 1	XD —1 03 79	X3 23 33	g g A A A u G G A c u G A c u u U a s a	9 1 9	X3 24 04	d T U A A A G U c A G U C c A U U U C C u s u	9 5 8
39 11 —v a r 1	XD —1 03 80	X3 23 34	c c A A G c U G A c u C A u c c U a s a	9 2 0	X3 24 05	d T U A G G A U G A G U c a G C U U G G u s u	9 5 9
39 62 —v a r 1	XD —1 03 81	X3 23 35	c a U u A A A C U a A C A g c A U u s a	9 2 1	X3 24 06	d T A A U G C U G U u A G u U u A A U G u s u	9 6 0

【0455】

24時間インキュベートした後、処理した細胞を採取し、残りのCSF1R mRNAレベルを各条件で測定し、ランク付けした。各siRNA二本鎖での24時間の処理後の残りのCSF1R mRNAレベルを、表16に列挙する。二本鎖XD-08944及びそのバリエント、XD-10343、XD-10348、及びXD-10353；二本鎖XD-08947及びそのバリエント、XD-10344、XD-10349、及びXD-10354；二本鎖XD-08988及びそのバリエント、XD-10345、XD-10350、及びXD-10355；二本鎖XD-08993及びそのバリエント、XD-10346、XD-10351、及びXD-10356；ならびに二本鎖XD-09016及びそのバリエント、XD-10347、XD-10352、及びXD-10357を含めて、試験した59の二本鎖の中で、最も低減されたCSF1R mRNAレベルを有する5のsiRNA及びそのバリエントを選択した。XD-08927及びそのバリエントXD-10358；XD-08922及びそのバリエントXD-10359、XD-08923及びそのバリエントXD-10360；XD-08936及びそのバリエントXD-10361；XD-08963及びそのバリエントXD-10362；XD-08969及びそのバリエントXD-10363；XD-08975及びそのバリエントXD-10364；XD-08982及びそのバリエントXD-10365；XD-08985及びそのバリエントXD-10366；XD-08986及びそのバリエントXD-10367；XD-08989及びそのバリエントXD-10368；XD-09003及

びそのバリエーションXD-10369; XD-09006及びそのバリエーションXD-10370; XD-09015及びそのバリエーションXD-10371; ならびにXD-09021及びそのバリエーションXD-10372を含む、上位20のsiRNA及びその修飾バリエーションもランク付けした(表16)。このデータはまた、XD-10373、XD-10374、XD-10375、XD-10376、XD-10377、XD-10378、XD-10379、XD-10380、及びXD-10381などの発現の有意な低減をもたらすいくつかの他のsiRNA修飾を示す。

【表16-1】

表16. siRNA処理後のCSF1R mRNA発現

二本鎖ID	残りのmRNA A (20nM siRNA)	SD	残りのmRNA (0.2nM siRNA)	SD
XD-08944	0.136	0.009	0.244	0.028
XD-10343	0.128	0.007	0.207	0.011
XD-10348	0.145	0.015	0.210	0.007
XD-10353	0.130	0.006	0.269	0.017
XD-08947	0.256	0.012	0.655	0.042
XD-10344	0.231	0.006	0.387	0.028
XD-10349	0.233	0.013	0.380	0.028
XD-10354	0.259	0.019	0.413	0.036
XD-08988	0.162	0.009	0.275	0.009
XD-10345	0.122	0.009	0.161	0.010
XD-10350	0.109	0.007	0.181	0.014
XD-10355	0.112	0.009	0.196	0.013

10

20

30

40

【表 16-2】

XD-08 993	0.218	0.0 09	0.403	0.03 9
XD-10 346	0.193	0.0 11	0.359	0.01 6
XD-10 351	0.233	0.0 09	0.327	0.01 6
XD-10 356	0.198	0.0 06	0.369	0.02 3
XD-09 016	0.118	0.0 07	0.180	0.00 9
XD-10 347	0.110	0.0 08	0.172	0.00 7
XD-10 352	0.117	0.0 05	0.181	0.01 4
XD-10 357	0.103	0.0 10	0.174	0.01 3
XD-08 917	0.120	0.0 08	0.392	0.00 3
XD-10 358	0.132	0.0 07	0.194	0.01 0
XD-08 922	0.100	0.0 05	0.202	0.01 7
XD-10 359	0.078	0.0 05	0.154	0.02 3
XD-08 923	0.072	0.0 10	0.236	0.02 1
XD-10 360	0.068	0.0 02	0.149	0.01 9
XD-08 936	0.131	0.0 02	0.332	0.03 0
XD-10 361	0.119	0.0 06	0.290	0.03 3
XD-08 963	0.186	0.0 06	0.465	0.04 1
XD-10 362	0.207	0.0 09	0.432	0.04 4
XD-08 969	0.279	0.0 22	0.465	0.05 5
XD-10 363	0.166	0.0 06	0.378	0.03 8
XD-08 975	0.167	0.0 13	0.582	0.03 6

10

20

30

40

【表 16-3】

XD-10 364	0. 140	0. 0 11	0. 352	0. 04 5
XD-08 982	0. 221	0. 0 26	0. 494	0. 03 5
XD-10 365	0. 166	0. 0 13	0. 400	0. 02 4
XD-08 985	0. 286	0. 0 08	0. 784	0. 04 1
XD-10 366	0. 196	0. 0 17	0. 543	0. 06 3
XD-08 986	0. 195	0. 0 21	0. 376	0. 01 9
XD-10 367	0. 192	0. 0 14	0. 284	0. 03 0
XD-08 989	0. 250	0. 0 25	0. 751	0. 03 2
XD-10 368	0. 206	0. 0 19	0. 545	0. 04 5
XD-09 003	0. 197	0. 0 18	0. 591	0. 01 4
XD-10 369	0. 131	0. 0 14	0. 238	0. 01 5
XD-09 006	0. 146	0. 0 06	0. 321	0. 03 0
XD-10 370	0. 074	0. 0 03	0. 214	0. 01 5
XD-09 015	0. 251	0. 0 12	0. 459	0. 06 9
XD-10 371	0. 159	0. 0 15	0. 194	0. 00 9
XD-09 021	0. 117	0. 0 08	0. 224	0. 03 5
XD-10 372	0. 117	0. 0 06	0. 147	0. 02 0
XD-10 373	0. 042	0. 0 05	0. 095	0. 02 0
XD-10 374	0. 061	0. 0 02	0. 111	0. 01 2
XD-10 375	0. 073	0. 0 07	0. 284	0. 03 6
XD-10 376	0. 202	0. 0 10	0. 362	0. 03 6

10

20

30

40

【表 16-4】

XD-10 377	0.644	0.0 37	0.571	0.04 6
XD-10 378	0.212	0.0 08	0.378	0.04 8
XD-10 379	0.077	0.0 04	0.175	0.01 3
XD-10 380	0.126	0.0 14	0.191	0.02 0
XD-10 381	0.094	0.0 05	0.166	0.02 1
XD-00 194 (陰性対 照)	0.965	0.1 17	0.980	0.04 8
XD-00 379 (ウミシイ タケルシフ エラーゼ対 照)	0.009	0.0 03	0.069	0.00 9

10

20

【0456】

選択したCSF1R siRNA二本鎖及びバリエーションの用量応答

二重用量スクリーニングにおいてCSF1R mRNAレベルの有意な低減を引き起こしたCSF1R siRNA二本鎖及びバリエーションを選択し、用量応答についてさらに試験した。Hepa 1-6細胞を培養し、1ウェルあたり15,000個の細胞の密度で96ウェルプレートで維持した。Hepa 1-6細胞を、Lipofectamine (登録商標) 2000 (0.5 µl/ウェル) を用いた様々な濃度での前の二重用量スクリーニングから選択されたCSF1R siRNA二本鎖及びバリエーションでトランスフェクトした。各CSF1R siRNA二本鎖の用量には、50 nM、10 nM、2.0 nM、0.40 nM、0.08 nM、 1.6×10^{-2} nM、 3.2×10^{-3} nM、 6.4×10^{-4} nM、 1.28×10^{-4} nM、及び 2.6×10^{-5} nMが含まれていた。24時間のインキュベーションの後、処理した細胞を採取し、残りのCSF1R mRNAレベルを各条件で測定した。各CSF1R二本鎖のIC₅₀及びIC₈₀値を決定し(表17に示す)、各用量応答曲線を図1Cに示す。

30

【表 17-1】

表 17. CSF1R siRNA二本鎖のIC₅₀及びIC₈₀

40

SiRNA二本 鎖ID	IC ₅₀ (nM)	IC ₈₀ (n M)	最大KD
XD-1037 3	0.01 5664 77	0.1011 4948	95%

【表 17-2】

XD-1038 1	0.02 1517 24	0.2650 4219	88%
XD-0901 6	0.04 7745 74	0.5206 7604	87%
XD-1034 7	0.02 3666 98	0.2533 9097	87%
XD-1035 7	0.03 2703 23	0.3040 1297	96%
XD-1034 5	0.03 1424 79	0.4264 0625	87%
XD-1035 0	0.02 8937 49	0.2906 3486	86%
XD-1035 9	0.03 6767 81	0.2126 2353	91%
XD-1036 0	0.03 2271 82	0.2567 045	92%
XD-1037 1	0.03 2992 14	0.4377 136	84%
XD-0902 1	0.04 2415 52	0.3461 2646	87%
XD-1037 2	0.01 8091 42	0.2194 2896	87%

10

20

30

【0457】

実施例 6 : CCR2 siRNA二本鎖及びバリエーションの二重応答スクリーニング

40

CCR2 mRNAノックダウンに対して高効率かつ特異性を有する siRNA二本鎖に由来する siRNA修飾バリエーションを、配列及び化学修飾に従って設計し、得られた二本鎖バリエーションを、Hepa 1-6細胞でさらに試験した。Hepa 1-6細胞を標準的な培養条件を用いて培養し、1ウェルあたり15,000個の細胞の密度で、96ウェルプレートで維持した。Hepa 1-6細胞を、Lipofectamine（登録商標）2000（0.5 μl/ウェル）を用いてCCR2 siRNA二本鎖でトランスフェクトした。元の修飾 siRNA二本鎖からのバリエーションを含む合計61の siRNA二本鎖をHepa 1-6細胞にトランスフェクトし、さらに検証した（表18）。CCR2 siRNAを、それぞれ0.2 nM及び20 nMの最終濃度でトランスフェクトした。抗R-Luc siRNA二本鎖（XD-00379）及びスクランブルRNA二

50

本鎖（XD-00194）を、それぞれ陽性及び陰性対照として使用した。24時間インキュベートした後、処理した細胞を採取し、残りのCCR2 mRNAレベルを測定し、ランク付けした。これらのsiRNA二本鎖の情報及び配列を表18に含む。

【表18-1】

表18. CCR2 siRNA二本鎖及びバリエーション

位置	二本鎖ID	SSID	センス配列	配列番号	ASID	アンチセンス配列	配列番号
489	XD-09043	X29044	c u G u c c A c A u c u c g u u c u c d T s d T	622	X29045	G A G A A C G A G A U G U G G A c A G d T s d T	760
492	XD-09045	X29048	u c c A c A u c u c G u u c u c G G u d T s d T	624	X29049	A C C G A G A A C G A G A U G U G G A d T s d T	762
495	XD-09048	X29054	a c A u c u c G u u c u c g G u u u A d T s d T	627	X29055	u A A A C C G A G A A C G A G A U G U d T s d T	765
498	XD-09050	X29058	u c u c G u u c u c G G u u u A u c A d T s d T	629	X29059	U G A u A A A C C G A G A A C G A G A d T s d T	767
533	XD-09060	X29078	c g G u G A A G A A G u c a c c A c c d T s d T	639	X29079	G G U G G U G A C U U C U U c A C C G d T s d T	777
544	XD-09062	X29082	u c A c c A c c u u u u u u G A u u A d T s d T	641	X29083	u A A U c A A A A A A G G U G G U G A d T s d T	779
590	XD-09086	X29130	u g A c G u G A A G c A A a u u G G G d T s d T	665	X29131	C C c A A U U U G C U U c A C G U c A d T s d T	803

10

20

30

40

【表 18-2】

693	XD -0 90 94	X2 91 46	u g c A A A A A G c u G A a G u G c u d T s d T	6 7 3	X2 91 47	A G c A C U U c A G C U U U U U G c A d T s d T	8 1 1
698	XD -0 90 95	X2 91 48	a a A G c u G A A G u G c u u G A c u d T s d T	6 7 4	X2 91 49	A G U c A A G c A C U U c A G C U U U d T s d T	8 1 2
751	XD -0 90 98	X2 91 54	u g c u u u u u c u u A u u A c u c u d T s d T	6 7 7	X2 91 55	A G A G u A A u A A G A A A A A G c A d T s d T	8 1 5
808	XD -0 91 07	X2 91 72	u u G G G A A u G c A A u g u G c A A d T s d T	6 8 6	X2 91 73	U U G c A c A U U G c A U U C C c A A d T s d T	8 2 4
838	XD -0 91 13	X2 91 84	g g c u G u A u c A c A u c G G u u A d T s d T	6 9 2	X2 91 85	u A A C C G A U G U G A u A c A G C C d T s d T	8 3 0
840	XD -0 91 15	X2 91 88	c u G u A u c A c A u c G g u u A u u d T s d T	6 9 4	X2 91 89	A A u A A C C G A U G U G A u A c A G d T s d T	8 3 2
842	XD -0 91 17	X2 91 92	g u A u c A c A u c G G u u A u u u u d T s d T	6 9 6	X2 91 93	A A A A u A A C C G A U G U G A u A C d T s d T	8 3 4
848	XD -0 91 21	X2 92 00	c a u c G G u u A u u u u g G c G G A d T s d T	7 0 0	X2 92 01	U C C G C c A A A A u A A C C G A U G d T s d T	8 3 8
855	XD -0 91 27	X2 92 12	u a u u u u G G c G G A A u c u u c u d T s d T	7 0 6	X2 92 13	A G A A G A U U C C G C c A A A A u A d T s d T	8 4 4
1012	XD -0 91 38	X2 92 34	u c A u c u u u A c u A A a u G c c A d T s d T	7 1 7	X2 92 35	U G G c A U U u A G u A A A G A U G A d T s d T	8 5 5
1057	XD -0	X2 92 44	g c c c u u A u u u u c c a	7 2 2	X2 92 45	C C U C G U G G A A A A u A	8 6 0

10

20

30

40

【表 18-3】

	9 1 4 3		c G A G G d T s d T			A G G G C d T s d T	
1 0 6 7	XD - 0 9 1 4 9	X 2 9 2 5 6	u c c A c G A G G A u G G a A u A A u d T s d T	7 2 8	X 2 9 2 5 7	A U u A U U C c A U C C U C G U G G A d T s d T	8 6 6
1 0 9 6	XD - 0 9 1 5 4	X 2 9 2 6 6	u a A u G A G G A A c A u u u u G G G d T s d T	7 3 3	X 2 9 2 6 7	C C c A A A A U G U U C C U c A U u A d T s d T	8 7 1
4 9 5 v a r 1	XD - 1 0 3 0 2	X 3 2 2 5 7	a c A u c u C G U u c U c g G u U u s a	9 6 1	X 3 2 3 3 6	d T A A A C C G A G A A C g A G A U G U u s u	1 0 0 2
4 9 8 v a r 1	XD - 1 0 3 0 3	X 3 2 2 5 8	u c U c G u U C U c G G u u u A U c s a	9 6 2	X 3 2 3 3 7	d T G A u A A A C C G A G a A C G A G A u s u	1 0 0 3
7 5 1 v a r 1	XD - 1 0 3 0 4	X 3 2 2 5 9	u g C u u u U U C u u A u u A c U c s a	9 6 3	X 3 2 3 3 8	d T G A G u A A u A A G A a A A A G c A u s u	1 0 0 4
8 4 2 v a r 1	XD - 1 0 3 0 5	X 3 2 2 6 0	g u A u c A C A U c G G u u A u U u s a	9 6 4	X 3 2 3 3 9	d T A A A u A A C C G A U g U G A u A C u s u	1 0 0 5
8 5 5 v a r 1	XD - 1 0 3 0 6	X 3 2 2 6 1	u a U u u u G G C g G A A u c u U c s a	9 6 5	X 3 2 3 4 0	d T G A A G A U U C C G C c A A A A u A u s u	1 0 0 6
4 9 5 v a r 2	XD - 1 0 3 0 7	X 3 2 2 6 2	a c A u c u c G u u c u c g G u u u s a	9 6 6	X 3 2 3 3 6	d T A A A C C G A G A A C g A G A U G U u s u	1 0 0 7
4 9 8 v a r 2	XD - 1 0 3 0 8	X 3 2 2 6 3	u c u c G u u c u c G G u u u A u c s a	9 6 7	X 3 2 3 3 7	d T G A u A A A C C G A G a A C G A G A u s u	1 0 0 8
7 5 1 v a r 2	XD - 1 0 3 0 9	X 3 2 2 6 4	u g c u u u u u c u u A u u A c u c s a	9 6 8	X 3 2 3 3 8	d T G A G u A A u A A G A a A A A G c A u s u	1 0 0 9

10

20

30

40

【表 18-4】

84 2v ar 2	XD -1 03 10	X3 22 65	g u A u c A c A u c G G u u A u u u s a	9 6 9	X3 23 39	d T A A A u A A C C G A U g U G A u A C u s u	1 0 1 0
85 5v ar 2	XD -1 03 11	X3 22 66	u a u u u u G G c g G A A u c u u c s a	9 7 0	X3 23 40	d T G A A G A U U C C G C c A A A A u A u s u	1 0 1 1
49 5v ar 3	XD -1 03 12	X3 22 67	a c A u c u C G U u c U c g G u U u a (C 6)	9 7 1	X3 23 41	U A A A C C G A G A A C g A G A U G U u s u	1 0 1 2
49 8v ar 3	XD -1 03 13	X3 22 68	u c U c G u U C U c G G u u u A U c a (C 6)	9 7 2	X3 23 42	U G A u A A A C C G A G a A C G A G A u s u	1 0 1 3
75 1v ar 3	XD -1 03 14	X3 22 69	u g C u u u U U C u u A u u A c U c a (C 6)	9 7 3	X3 23 43	U G A G u A A u A A G A a A A A G c A u s u	1 0 1 4
84 2v ar 3	XD -1 03 15	X3 22 70	g u A u c A C A U c G G u u A u U u a (C 6)	9 7 4	X3 23 44	U A A A u A A C C G A U g U G A u A C u s u	1 0 1 5
85 5v ar 3	XD -1 03 16	X3 22 71	u a U u u u G G C g G A A u c u U c a (C 6)	9 7 5	X3 23 45	U G A A G A U U C C G C c A A A A u A u s u	1 0 1 6
48 9v ar 1	XD -1 03 17	X3 22 72	c u G u c c A C A u c U c g u u C u s a	9 7 6	X3 23 46	d T A G A A C G A G A U G u G G A c A G u s u	1 0 1 7
49 2v ar 1	XD -1 03 18	X3 22 73	u c C A c A U C U c G U u c u c G g s a	9 7 7	X3 23 47	d T C C G A G A A C G A G a U G U G G A u s u	1 0 1 8
53 3v ar 1	XD -1 03 19	X3 22 74	c g G u G A A G A a G U c a c c A c s a	9 7 8	X3 23 48	d T G U G G U G A C U U C u U c A C C G u s u	1 0 1 9
54 4v	XD -1	X3 22 75	u c A c c A C C U u u U u u G A U u s a	9 7 9	X3 23 49	d T A A U c A A A A A A G g	1 0

10

20

30

40

【表 18-5】

a r 1	0 3 2 0					U G G U G A u s u	2 0
5 9 0 v a r 1	XD - 1 0 3 2 1	X 3 2 2 7 6	u g A c G u G A A g c A A a u u G g s a	9 8 0	X 3 2 3 5 0	d T C c A A U U U G C U U c A C G U c A u s u	1 0 2 1
6 9 3 v a r 1	XD - 1 0 3 2 2	X 3 2 2 7 7	u g C A A A A A G c u G A a G u G c s a	9 8 1	X 3 2 3 5 1	d T G c A C U U c A G C U u U U U G c A u s u	1 0 2 2
6 9 8 v a r 1	XD - 1 0 3 2 3	X 3 2 2 7 8	a a A G c u G A A g u G c u u G A c s a	9 8 2	X 3 2 3 5 2	d T G U c A A G c A C U U c A G C U U U u s u	1 0 2 3
8 0 8 v a r 1	XD - 1 0 3 2 4	X 3 2 2 7 9	u u G G G A A U G c A A u g u G C a s a	9 8 3	X 3 2 3 5 3	d T U G c A c A U U G c A u U C C c A A u s u	1 0 2 4
8 3 6 v a r 1	XD - 1 0 3 2 5	X 3 2 2 8 0	a g G G c u G U A u c A c a u c G g s a	9 8 4	X 3 2 3 5 4	d T C C G A U G U G A u A c A G C C C U u s u	1 0 2 5
8 3 8 v a r 1	XD - 1 0 3 2 6	X 3 2 2 8 1	g g C u G u A U C a c A u c G G U u s a	9 8 5	X 3 2 3 5 5	d T A A C C G A U G U G A u A c A G C C u s u	1 0 2 6
8 4 0 v a r 1	XD - 1 0 3 2 7	X 3 2 2 8 2	c u G u A u C A C a u C G g u u A u s a	9 8 6	X 3 2 3 5 6	d T A u A A C C G A U G U g A u A c A G u s u	1 0 2 7
8 4 8 v a r 1	XD - 1 0 3 2 8	X 3 2 2 8 3	c a U c G G U U A u u U u g G c G g s a	9 8 7	X 3 2 3 5 7	d T C C G C c A A A A u A a C C G A U G u s u	1 0 2 8
1 0 1 2 v a r 1	XD - 1 0 3 2 9	X 3 2 2 8 4	u c A u c u U U A c u A A a u G C c s a	9 8 8	X 3 2 3 5 8	d T G G c A U U u A G u A a A G A U G A u s u	1 0 2 9
1 0 5 7 v a r 1	XD - 1 0 3 3 0	X 3 2 2 8 5	g c C c u u A U U u u C c a c G A g s a	9 8 9	X 3 2 3 5 9	d T C U C G U G G A A A A u A A G G G C u s u	1 0 3 0

10

20

30

40

【表 18-6】

10 67 v a r 1	XD - 1 03 31	X3 22 86	u c C A c G A G G a u G G a A u A a s a	9 9 0	X3 23 60	d T U u A U U C c A U C C u C G U G G A u s u	1 0 3 1
50 8 v a r 1	XD - 1 03 32	X3 22 87	g g U u u A U C A g A A A u A c C a s a	9 9 1	X3 23 61	d T U G G u A U U U C U G a U A A A C C u s u	1 0 3 2
54 5 v a r 1	XD - 1 03 33	X3 22 88	c a C c A c C U U u u U u g A u U a s a	9 9 2	X3 23 62	d T U A A U c A A A A A A g G U G G U G u s u	1 0 3 3
54 7 v a r 1	XD - 1 03 34	X3 22 89	c c A c c u U U U u u G A u u A U g s a	9 9 3	X3 23 63	d T C A u A A U c A A A A a A G G U G G u s u	1 0 3 4
56 9 v a r 1	XD - 1 03 35	X3 22 90	c g G u G c U C C c u G u c A u A a s a	9 9 4	X3 23 64	d T U u A U G A c A G G G a G c A C C G u s u	1 0 3 5
57 4 v a r 1	XD - 1 03 36	X3 22 91	c u C c c u G U C a u A A a u u U g s a	9 9 5	X3 23 65	d T C A A A U U u A U G A c A G G G A G u s u	1 0 3 6
58 0 v a r 1	XD - 1 03 37	X3 22 92	g u C A u A A A U u u G A c G u G a s a	9 9 6	X3 23 66	d T U c A C G U c A A A U u U A U G A C u s u	1 0 3 7
10 06 v a r 1	XD - 1 03 38	X3 22 93	c a G G A A U C A u c U u u A c U a s a	9 9 7	X3 23 67	d T U A G u A A A G A U G a U U C C U G u s u	1 0 3 8
10 07 v a r 1	XD - 1 03 39	X3 22 94	a g G A A u C A U c u U u a c u A a s a	9 9 8	X3 23 68	d T U u A G u A A A G A U g A U U C C U u s u	1 0 3 9
10 69 v a r 1	XD - 1 03 40	X3 22 95	c a C G A G G A U g G A A u A A U u s a	9 9 9	X3 23 69	d T A A U u A U U C c A U c C U C G U G u s u	1 0 4 0
10 79	XD - 1	X3 22 96	g a A u A A U U U c c A c a c A A u s a	1 0	X3 23 70	d T A U U G U G U G G A A a	1 0

10

20

30

40

【表 18-7】

v a r l	0 3 4 1			0 0		U u A U U C u s u	4 1
1 0 8 9 v a r l	X D - 1 0 3 4 2	X 3 2 2 9 7	c a C A c A A U A a u G A g G A A c s a	1 0 0 1	X 3 2 3 7 1	d T G U U C C U c A U u A u U G U G U G u s u	1 0 4 2

【0458】

24時間インキュベートした後、処理した細胞を採取し、残りのCCR2 mRNAレベルを各条件で測定し、ランク付けした。各siRNA二本鎖での24時間の処理後の残りのCCR2 mRNAレベルを、表19に列挙した。二本鎖XD-09048及びそのバリエーション、XD-10302、XD-10307、及びCD-10321；二本鎖XD-09050及びそのバリエーション、XD-10303、XD-10308、及びXD-10313；二本鎖XD-09098及びそのバリエーション、XD-10304、XD-10309、及びXD-10314；二本鎖XD-09117及びそのバリエーション、XD-10305、XD-10310、及びXD-10315；ならびに二本鎖XD-09127及びそのバリエーション、XD-10306、XD-10311、及びXD-10316を含めて、試験した61の二本鎖の中で、最も低減されたCCR2 mRNAレベルを有する5のsiRNA及びそのバリエーションを選択した。XD-09043及びそのバリエーションXD-10317；XD-09045及びそのバリエーションXD-10318；XD-09060及びそのバリエーションXD-10319；XD-09062及びそのバリエーションXD-10320；XD-09086及びそのバリエーションXD-10321；XD-09094及びそのバリエーションXD-10322；XD-09095及びそのバリエーションXD-10323；XD-09107及びそのバリエーションXD-10324；XD-09112及びそのバリエーションXD-10325；XD-09113及びXD-10326；XD-09115及びそのXD-10327；XD-09121及びそのバリエーションXD-10328；XD-09138及びそのバリエーションXD-10329；XD-09143及びそのバリエーションXD-10330；ならびにXD-09149及びそのバリエーションXD-10331を含む、上位20のsiRNA二本鎖、その修飾バリエーションもランク付けした（表18）。このデータはまた、XD-10332、XD-10333、XD-10334、XD-10335、XD-10335、XD-10336、XD-10337、XD-10338、XD-10339、XD-10340、XD-10341、及びXD-10342などの発現の有意な低減をもたらすいくつかの他のsiRNA修飾を示す。

【表 19-1】

表 19. siRNA処理後のCCR2 mRNA発現

二本鎖ID	残りのmRNA A (20 nM siRNA)	SD	残りのmRNA A (0.2 nM siRNA)	SD
XD-090 48	0.0828 811	0.01 621	0.2620 2	0.02 301

10

20

30

40

【表 19-2】

XD-103 02	0.0458 746	0.00 603	0.0977 0	0.01 263
XD-103 07	0.0572 924	0.00 596	0.0982 1	0.00 772
XD-103 12	0.05	0.00 919	0.0783 5	0.00 144
XD-090 50	0.0861 9	0.00 859	0.1513 6	0.02 523
XD-103 03	0.0522 5	0.00 315	0.0910 7	0.01 053
XD-103 08	0.0985 1	0.01 143	0.0957 5	0.00 460
XD-103 13	0.0517 7	0.00 743	0.1076 2	0.01 369
XD-090 98	0.1199 6	0.01 069	0.2280 5	0.01 252
XD-103 04	0.1057 2	0.02 569	0.1591 0	0.02 864
XD-103 09	0.1079 98	0.02 183	0.1656 2	0.02 625
XD-103 14	0.0771 379	0.00 892	0.1478 8	0.01 315
XD-091 17	0.1027 451	0.02 382	0.2145 4	0.03 092
XD-103 05	0.08	0.01 474	0.1380 2	0.00 828
XD-103 10	0.1016 0	0.00 876	0.1900 2	0.01 845
XD-103 15	0.0632 4	0.01 587	0.1292 2	0.01 160
XD-091 27	0.0465 0	0.00 482	0.1954 3	0.05 751
XD-103 06	0.0422 2	0.00 768	0.1442 6	0.02 314
XD-103 11	0.0462 2	0.00 548	0.1412 2	0.02 280
XD-103 16	0.0453 4	0.00 900	0.1227 0	0.01 968
XD-090 43	0.1212 235	0.01 143	0.5050 4	0.04 412
XD-103 17	0.0625 109	0.01 082	0.9783 2	0.05 761

10

20

30

40

【表 19-3】

XD-090 45	0.0968 615	0.00 805	0.5448 8	0.02 852
XD-103 18	0.07	0.01 043	0.2175 5	0.01 514
XD-090 60	0.0568 0	0.00 704	0.3886 1	0.01 861
XD-103 19	0.0543 7	0.00 452	0.3343 5	0.04 273
XD-090 62	0.0861 1	0.00 674	0.3209 0	0.02 100
XD-103 20	0.0599 9	0.00 241	0.1229 4	0.01 148
XD-090 86	0.0702 3	0.00 615	0.3975 7	0.03 588
XD-103 21	0.0755 2	0.00 698	0.2354 3	0.03 086
XD-090 94	0.0856 153	0.00 829	0.2078 9	0.01 513
XD-103 22	0.0760 854	0.00 779	0.1705 4	0.02 017
XD-090 95	0.0900 298	0.01 120	0.2124 9	0.01 983
XD-103 23	0.08	0.01 189	0.1703 5	0.01 813
XD-091 07	0.0763 0	0.00 240	0.1530 2	0.01 313
XD-103 24	0.0881 4	0.01 035	0.1402 8	0.03 762
XD-091 12	0.0962 3	0.00 753	0.1543 3	0.02 567
XD-103 25	0.1080 6	0.01 872	0.1403 1	0.01 675
XD-091 13	0.0862 7	0.01 356	0.3378 9	0.07 231
XD-103 26	0.0755 9	0.01 524	0.1200 1	0.01 492
XD-091 15	0.1418 658	0.02 075	0.1882 6	0.02 735
XD-103 27	0.0584 942	0.00 428	0.1313 5	0.01 794
XD-091 21	0.0745 102	0.00 592	0.1184 9	0.00 961

10

20

30

40

【表 19-4】

XD-103 28	0.06	0.00 448	0.0976 7	0.00 895
XD-091 38	0.0633 1	0.01 094	0.1649 3	0.02 036
XD-103 29	0.0585 1	0.00 823	0.1159 8	0.02 222
XD-091 43	0.1355 2	0.01 133	0.3885 6	0.04 295
XD-103 30	0.0898 5	0.01 329	0.1652 1	0.03 149
XD-091 49	0.1175 0	0.02 240	0.2406 8	0.02 158
XD-103 31	0.1051 8	0.02 421	0.2426 8	0.01 657
XD-103 32	0.0479 462	0.00 567	0.2839 0	0.03 031
XD-103 33	0.1228 451	0.00 433	0.1991 7	0.01 957
XD-103 34	0.0515 203	0.00 568	0.0918 4	0.00 562
XD-103 35	0.07	0.00 693	0.2635 8	0.02 275
XD-103 36	0.1357 0	0.01 136	0.2366 7	0.01 347
XD-103 37	0.0605 8	0.01 142	0.1952 2	0.02 186
XD-103 38	0.0546 8	0.00 741	0.1215 7	0.01 297
XD-103 39	0.0764 5	0.00 934	0.1382 9	0.02 922
XD-103 40	0.1290 8	0.01 606	0.2177 8	0.02 301
XD-103 41	0.0780 6	0.01 851	0.1442 0	0.01 470
XD-103 42	0.1353 099	0.01 4961 5	0.3257 299	0.04 2132 5
XD-001 94 (陰性对照)	0.983	0.12 6	0.9992 1	0.13 987

10

20

30

40

【表 19-5】

XD-00379 (Luc;陽性対照)	0.006	0.002	0.0438	0.01031
------------------------	-------	-------	--------	---------

【0459】

選択したCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーションの用量応答

二重用量スクリーニングにおいてCSF1R mRNAレベルの有意な低減をもたらしたCSF1R siRNA二本鎖及びバリエーションを選択し、用量応答についてさらに試験した。Hepa 1-6細胞を培養し、1ウェルあたり15,000個の細胞の密度で96ウェルプレートで維持した。Hepa 1-6細胞を、Lipofectamine（登録商標）2000（0.5 μl/ウェル）を用いた様々な濃度での前の二重用量スクリーニングから選択されたCCR2 siRNA二本鎖及びバリエーションでトランスフェクトした。各CCR2 siRNA二本鎖の用量には、50 nM、10 nM、2.0 nM、0.40 nM、0.08 nM、 1.6×10^{-2} nM、 3.2×10^{-3} nM、 6.4×10^{-4} nM、 1.28×10^{-4} nM、及び 2.6×10^{-5} nMが含まれていた。24時間のインキュベーションの後、処理した細胞を採取し、残りのCCR2 mRNAレベルを各条件で測定した。各CCR2二本鎖のIC₅₀値を表20に示されるように決定し、各用量応答曲線を図1Dに示す。

【表 20-1】

表 20. CCR2 siRNA二本鎖のIC₅₀及びIC₈₀

SiRNA二本鎖 ID	IC ₅₀ (nM)	IC ₈₀ (nM)	最大KD
XD-10311	0.007	0.056	93%
XD-10305	0.007	0.045	91%
XD-09098	0.028	0.246	87%
XD-10309	0.014	0.111	90%
XD-10303	0.004	0.030	94%
XD-10308	0.005	0.021	90%
XD-10302	0.006	0.030	94%
XD-10307	0.007	0.032	93%
XD-10312	0.005	0.035	95%
XD-10329	0.006	0.041	92%

【表 20-2】

XD-09121	0.009	0.062	93%
XD-10328	0.006	0.038	94%
XD-10320	0.012	0.097	93%
XD-10326	0.010	0.087	91%

10

【0460】

実施例7：組み合わせたCSF1R及びCCR2 siRNAの用量応答

ヒト単球THP-1細胞を培養し、ウェルあたり25,000個の細胞の密度で、96ウェルプレートで維持した。THP-1単球を、CSF1R二本鎖(XD-09016)及びCCR2二本鎖(XD-09098)の組み合わせで、CSF1R二本鎖(XD-09016)単独で、CCR2二重(XD-09098)単独で、またはLipofectamine(登録商標)2000(0.5μl/ウェル)を用いたホタルルシフェラーゼsiRNA(FLuc、XD-00194)でトランスフェクトした。24時間インキュベートした後、細胞を採取し、残りのCSF1R、CCR2、及びGAPDH mRNAレベルを、製造業者の指示に従って分岐DNA(bDNA)アッセイを使用して測定した(Quantigene(登録商標)SinglePlex遺伝子発現アッセイ、ThermoFisher;CSF1Rプローブ:SA-14861;CCR2プローブ:SA-3020026;GAPDHプローブ:SA-10001)。データを、個々のsiRNA濃度(nM)対残りのmRNA(標的遺伝子対GAPDHの比率、模擬トランスフェクト細胞に正規化)としてプロットされた図2に示し、2つ組の平均、+/-標準偏差を表す。結果は、siRNAをトランスフェクトのみとは対照的に互いに組み合わせてトランスフェクトした場合、CSF1RまたはCCR2のサイレンシングに有意な差が観察されなかったため、siRNAの組み合わせを使用したCSF1RまたはCCR2のサイレンシングは、個々のsiRNAを使用したCSF1RまたはCCR2のサイレンシングと同じくらい効果的であったことを示した。

20

30

【0461】

実施例8：マウスにおいて腹腔内投与されたLNP製剤化されたCSF1R及びCCR2 siRNA

C57BL/6マウス(7~8週齢、雌、群あたりn=5)に、-4、-1、及び1日目にLNPの腹腔内投与(全siRNAにより2mg/kg)を行った。LNPを、50:10:38.5:1.5のモル比のC12-200:1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC):コレステロール:1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](C14-PEG-2000)の組成物で、9:1の総脂質:総siRNA重量比で合成した。LNPを、a)mCSF1R+Luc siRNA、b)mCCR2+Luc siRNA、c)mCSF1R+mCCR2 siRNA、またはd)Luc siRNAのいずれかの等モル比で製剤化した。マウスsiRNA配列を表21に列挙する。

40

【表 2 1】

表 2 1. マウス s i R N A 配列

標的	センス配列	アンチセンス配列
m C S F 1 R	c u A c u c A A c u u u c u c c G A A d T s d T	U U C G G A G A A A G U U G A G u A G d T s d T
m C C R 2	u G c u A A A c G u c u c u G c A A A d T s d T	U U U G c A G A G A C G U U u A G c A d T s d T
L u c	c u u A c G c u G A G u A c u u c G A d T s d T	U C G A A G u A C U c A G C G u A A G d T s d T

10

【 0 4 6 2】

0 日目に、マウスに、2 m L の 3 % チオグリコレートブロス（D i f c o 液状チオグリコレート培地、B D 2 2 5 6 5 0）を腹腔内注射し、腹腔へのマクロファージ遊走を誘導した。3 日目に、マウスを屠殺し、それらの腹腔マクロファージを回収した。単一の細胞懸濁液を生成し、フローサイトメトリを介して分析した（表 2 2）。

【表 2 2】

表 2 2. アッセイに使用されるフローサイトメトリ抗体

色	標的	クローン	製造業者
B V 4 2 1	m C C R 2	S A 2 0 3 G 1 1	B i o l e g e n d
B V 5 1 0	生存性	該当なし	T h e r m o F i s h e r
B V 6 0 5	m T C R - B、m C D 1 9、m N K 1. 1	H 5 7 - 5 9 7、 6 D 5、P K 1 3 6	B i o l e g e n d（すべてク ローン用）
B V 7 1 1	m C D 4 5	3 0 - F 1 1	B i o l e g e n d
P e r C P / C y 5. 5	m L y - 6 C	H K 1. 4	B i o l e g e n d
P E	m C S F 1 R	A F S 9 8	B i o l e g e n d
P E / D a z z l e 5 9 4	m L y - 6 G	1 A 8	B i o l e g e n d
A F 7 0 0	m F 4 / 8 0	C I : A 3 - 1	B i o R a d
A P C / F i r e 7 5 0	m C D 1 1 b	M 1 / 7 0	B i o l e g e n d

20

30

40

【 0 4 6 3】

腹腔マクロファージを、シングレット、ライブ、m C D 4 5 +、m T C R - B -、m C D 1 9 -、m N K 1. 1 -、m L y - 6 G -、m C D 1 1 b +、及び m F 4 / 8 0 + 基準でゲーティングした。次いで、m C S F 1 R / m C C R 2 の発現をグラフ化し、定量化した（図 3）。結果は、m C S F 1 R 及び m C C R 2 のサイレンシングが、s i R N A - L n p s の腹腔内投与後のマウスにおける腹腔マクロファージで同時に達成されたことを示した。さらに、図 3 C は、s i R N A の組み合わせを使用することは、少なくとも個々の s i R N A を使用して m C S F 1 R または m C C R 2 をサイレンシングするのと同じくらい効果的であり、それより効果的であると考えられていることを示す。

【 0 4 6 4】

50

実施例 9：マウスにおいて静脈内投与された L N P 製剤化された C S F 1 R 及び C C R 2 s i R N A

C 5 7 B L / 7 マウス (7 ~ 8 週齢、雌、群あたり n = 3) に、- 4、- 1、及び 1 日目に L N P の静脈内投与 (全 s i R N A により 1. 5 m g / k g) を行った。L N P を、5 0 : 1 0 : 3 8. 5 : 1. 5 のモル比の C 1 2 - 2 0 0 : 1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C) : コレステロール : 1, 2 - ジミリスチル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール) - 2 0 0 0] (C 1 4 P E G - 2 0 0 0) の組成物で、9 : 1 の総脂質 : 総 s i R N A 重量比で合成した。L N P を、a) m C S F 1 R + m C C R 2 s i R N A または b) L u c s i R N A のいずれかの等モル比で製剤化した。マウス s i R N A 配列を、上に記載される表 2 1 に列挙する。

【0 4 6 5】

0 日目に、マウスに 2 m L の 3 % チオグリコレートブロス (D i f c o 液状チオグリコレート培地、B D 2 2 5 6 5 0) を腹腔内注射し、腹膜へのマクロファージ遊走を誘導した (例えば、チオグリコレート腹膜炎モデルは、標準リポ多糖 (L P S) が、C C R 2 が急速に下方制御されるにつれて C C R 2 及び C S F 1 R の両方を発現するマクロファージを生成しなかったと判定されたため)。3 日目に、マウスを屠殺し、それらの血液を採取した。単一の細胞懸濁液を生成し、フローサイトメトリを介して分析した (表 2 2 ; 上述)。血液単球を、シングレット、ライブ、m C D 4 5 +、m T C R - B -, m C D 1 9 -, m N K 1. 1 -, m C D - 1 1 b +、m L y - 6 G - 基準によってゲーティングし、次いで、m C C R 2 発現は炎症誘発性 L y - 6 C ^{h i} 単球と関連しているが、L y - 6 C ^{l o} 単球には関連していないため、L y - 6 C ^{h i} 及び L y - 6 C ^{l o} 単球として別々にゲーティングした (周知のゲーティング基準として、例えば、Leuschner et al. (2012) Nat. Biotechnol. 29 : 1005 - 1010 及び Rose et al. (2012) Cytometry A 81 : 343 - 350 に記載されている)。次いで、m C S F 1 R / m C C R 2 の発現をグラフ化し、定量化した (図 4)。結果は、血液単球上の m C S F 1 R 及び L y - 6 C ^{h i} 血液単球上の m C C R 2 のサイレンシングが、S i R N A - L n P s の静脈内投与後のマウスにおいて s i R N A の組み合わせを使用して同時に達成されたことを示した。

【0 4 6 6】

実施例 10：モデルのインビトロレポーターシステムにおける C S F 1 R 及び C C R 2 の相乗的なサイレンシング

C S F 1 R の領域 (N M _ 0 0 5 2 1 1. 3、ヌクレオチド領域 : 1 0 3 0 - 1 1 0 8、2 8 4 4 - 2 9 2 2、3 0 1 9 - 3 0 9 7、3 8 8 7 - 3 9 6 5) 及び C C R 2 (N M _ 0 0 1 1 2 3 3 9 6. 2、ヌクレオチド領域 : 4 6 5 - 5 4 6、7 2 1 - 7 9 9、8 1 8 - 8 9 6、9 8 2 - 1 0 6 0) を、ウミシイタケルシフェラーゼ (R L u c) レポーター遺伝子の下流にある p s i C H E C K (商標) - 2 (P r o m e g a) ベクターにクローン化した。このベクターには、内部対照として二次ホタルルシフェラーゼ (F L u c) レポーターカセットも含まれる。このプラスミドを発現する細胞における C S F 1 R または C C R 2 のいずれかのサイレンシングは、R L u c の比例的サイレンシングをもたらし、F L u c によって細胞数に対して正規化することができる。したがって、このレポーターシステムを使用すると、C S F 1 R 及び C C R 2 の両方のサイレンシングを単一の読み出しと一緒に測定し、C S F 1 R 及び C C R 2 s i R N A の組み合わせの潜在的な相乗的なサイレンシングを定量化することができる。

【0 4 6 7】

C H O 細胞を、9 6 ウェルプレートに 3 0, 0 0 0 個の細胞 / ウェルで播種し、2 0 0 n g の p s i C H E C K (商標) - 2 プラスミド及び 0. 5 u L の L i p o f e c t a m i n e (登録商標) 2 0 0 0 でトランスフェクトした。3 7 °C で 2 4 時間のインキュベーションを行った後、培地を交換した。L N P を、5 0 : 1 0 : 3 8. 5 : 1. 5 のモル比の C 1 2 - 2 0 0 : 1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S

PC) : コレステロール : 1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (C14 PEG-2000) の組成物で、9:1の総脂質:総siRNA重量比で合成し、次いで、図5に示されるように、LNPを個々のsiRNA濃度を変化させて各ウェルに添加した。LNPには、CSF1R siRNA (XD-09016)、CCR2 siRNA (XD-09098)、CSF1R+CCR2 siRNA、またはAHA-1 siRNAのいずれかが含まれていた。ハウスキーピング遺伝子AHA-1を標的とするAHA-1 siRNA (表23)を陰性対照として使用した。

【表23】

表23. AHA-1 siRNA配列

標的	センス配列	アンチセンス配列
AHA-1	g g A u G A A G u G G A G a u u A G u d T s d T	A C u A A U C U C c A C U U c A U C C d T s d T

【0468】

24時間後、Dual-Glo (登録商標) ルシフェラーゼアッセイ (Promega) を、製造業者の指示に従って行った。ウミシイタケ発光はホタル発光によって正規化され、次いで、この比率は、y軸上にプラスミドでトランスフェクトされた未処理の細胞に正規化され、各LNPの個々の(合計ではない)CSF1RまたはCCR2 siRNA濃度は、x軸にプロットした(図5)。

【0469】

結果は、CSF1R及びCCR2の用量依存性サイレンシングが単一及び組み合わせsiRNA-LNPsで達成されたことを示した。IC50を決定するために4点シグモイド曲線(GraphPad Prism)をデータに適合させた。CSF1R siRNA-LNP及びCCR2 siRNA-LNPsは、それぞれ約45nM及び35nMのIC50を有していた。CSF1R+CCR2 siRNA-LNPの組み合わせは、約20nMのIC50を有していた。siRNAの組み合わせのIC50は、単一のsiRNAの約半分であり、それにより単一のエンドポイントを有するこのモデルのインビトロレポーターシステムにおけるCSF1R及びCCR2の相乗的なサイレンシングを示す。

【0470】

参照による組み込み

本明細書で述べられるすべての刊行物、特許、及び特許出願は、各々の個々の刊行物、特許、または特許出願が参照によって組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのよう、参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合には、本出願が、本明細書における任意の定義を含めて優先する。

【0471】

ワールドワイドウェブ上でThe Institute for Genomic Research (TIGR) 及び/またはワールドワイドウェブ上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI) によって維持されているものなどの公開データベースにおけるエントリーと関連する受託番号を参照する任意のポリヌクレオチド及びポリペプチド配列も参照によってそれらの全体が組み込まれる。

【0472】

等価物及び範囲

本発明により包含される1つ以上の実施形態の詳細は、上記の記載に示される。好ましい材料及び方法は上記に記載されているが、本明細書に記載されているものと類似または同等の任意の材料及び方法を、本発明により包含される実施形態の実施または試験に使用することができる。本発明に関連する他の特徴、目的、及び利点が、記載から明らかである。別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解する意味と同一の意味を有する。矛盾した場合は、上記

10

20

30

40

50

の現在の記載が優先される。

【0473】

当業者は、ほんの日常的な実験を使用して、本明細書に記載される本発明により包含される特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または確認することができるであろう。本発明の範囲は、本明細書で提供される記載に限定されることを意図するものではなく、かかる同等物は、添付の特許請求の範囲に包含されることを意図する。

【0474】

冠詞「a」及び「an」は、反対に示されない限り、または文脈から明らかでない限り、冠詞の文法上の目的語のうちの1つを超えるもの（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で使用される。例として、「(an)要素」は、1つの要素または1つを超える要素を意味する。群の1つ以上の要素の間に「または」を含む請求項または記載は、その反対が示されるか、または別途文脈から明白でない限り、1つ、2つ以上、またはすべての群要素が、所与の製品または過程において存在するか、用いられるか、または別途関連している場合に、満たされると考えられる。本発明は、群の正確に1つの要素が、所与の製品または過程において存在するか、用いられるか、または別途関連している実施形態を含む。本発明はまた、2つ以上、またはすべての群要素が、所与の製品または過程を提示するか、それらにおいて用いられるか、または別途それらに関連している実施形態を含む。

10

【0475】

「含む」という用語は、制約がないことが意図され、追加の要素またはステップの包含する必要がないことに留意されたい。したがって、本明細書で「含む」という用語が使用される場合、「からなる」という用語も包含され、開示される。

20

【0476】

範囲が与えられている場合、終点を含む。さらに、別途示されるか、または別途文脈及び当業者の理解から明白でない限り、範囲として表される値は、文脈が別途明確に指示しない限り、範囲の下限の単位の10分の1まで、本発明により包含される異なる実施形態の状態範囲内の任意の特定の値または部分範囲をとることができることが理解されるべきである。

【0477】

その上、先行技術範囲内の本発明の任意の特定の実施形態が、請求項のうちのいずれか1つ以上から明らかに除外され得ることが理解されるべきである。かかる実施形態は、当業者に既知であると見なされるので、除外が明らかに本明細書に記載されていない場合でも除外され得る。本発明により包含される組成物（例えば、任意の抗生物質、治療または有効成分、任意の製造方法、任意の使用方法など）のいずれの特定の実施形態も、先行技術の存在に関連するかどうかに関わらず、あらゆる理由により、任意の1つ以上の請求項から除外することができる。

30

【0478】

使用されている単語は、限定ではなく説明の単語であり、その変更は、本発明のより広い態様に含まれる真の範囲及び精神から逸脱することなく、添付の特許請求の範囲内で行うことができることが理解される。

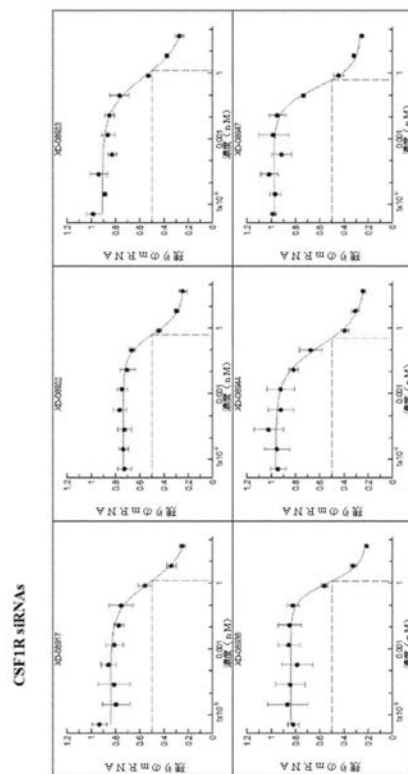
40

【0479】

本発明は、いくつかの記載された実施形態に関して、ある程度の長さで、ある程度の特殊性をもって記載されてきたが、それが任意のかかる詳細または実施形態または特定の実施形態に限定されるべきであることは意図されず、しかし先行技術を考慮してかかる特許請求の範囲の可能な限り広い解釈を提供し、したがって、本発明の意図された範囲を効果的に包含するように、添付の特許請求の範囲を参照して解釈されるべきである。

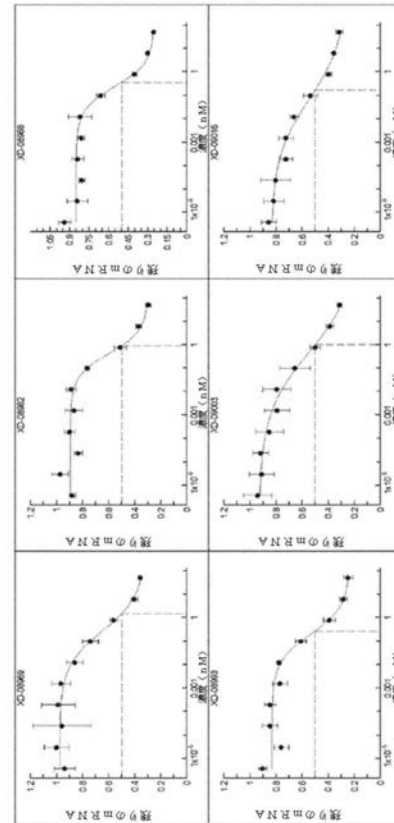
【図 1 A - 1】

【図 1 A】



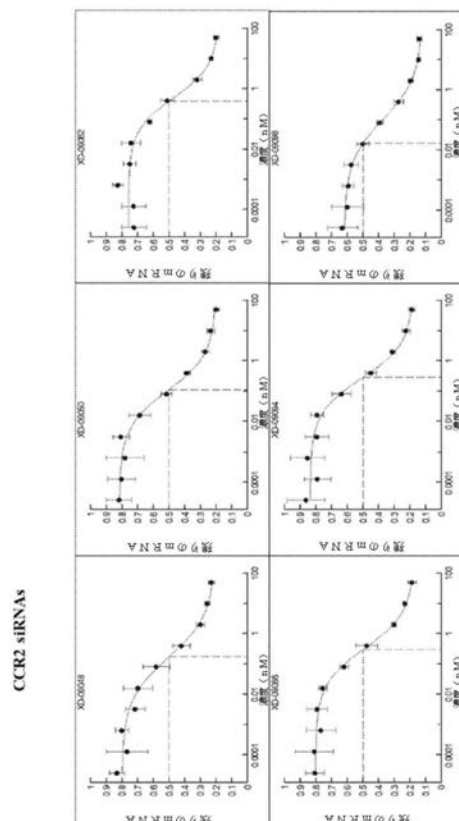
【図 1 A - 2】

【図 1 A】 (続き)



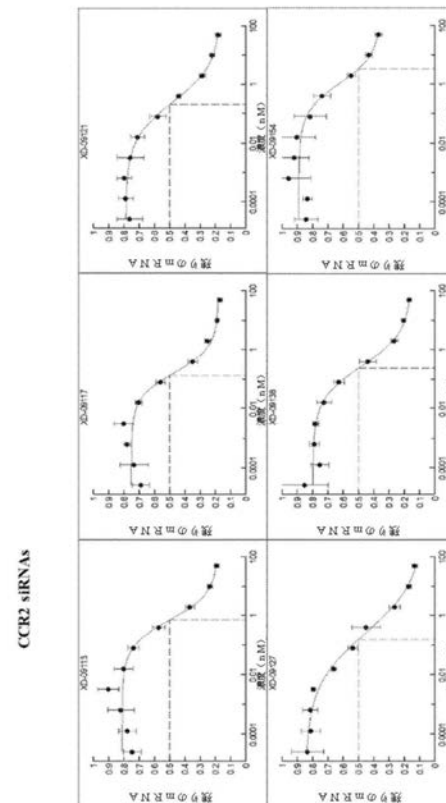
【図 1 B - 1】

【図 1 B】



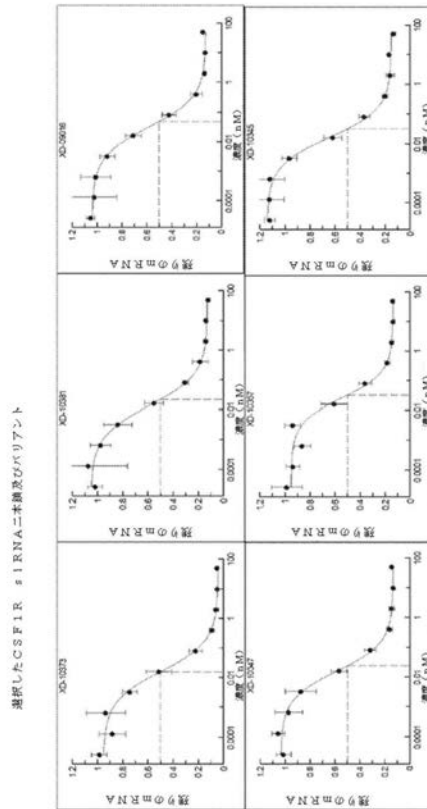
【図 1 B - 2】

【図 1 B】 (続き)



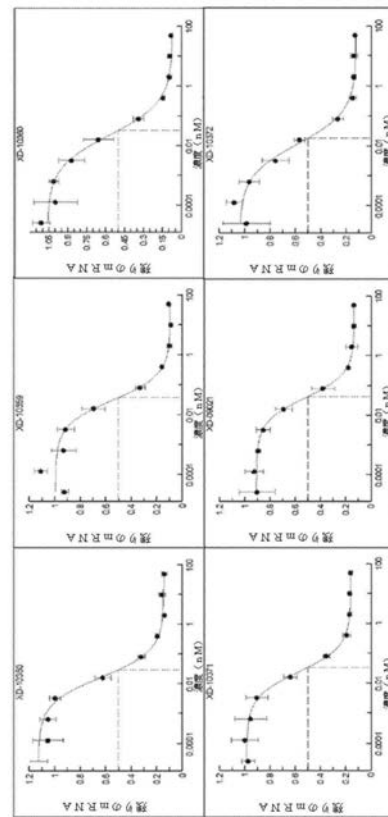
【図 1 C - 1】

【図 1 C】



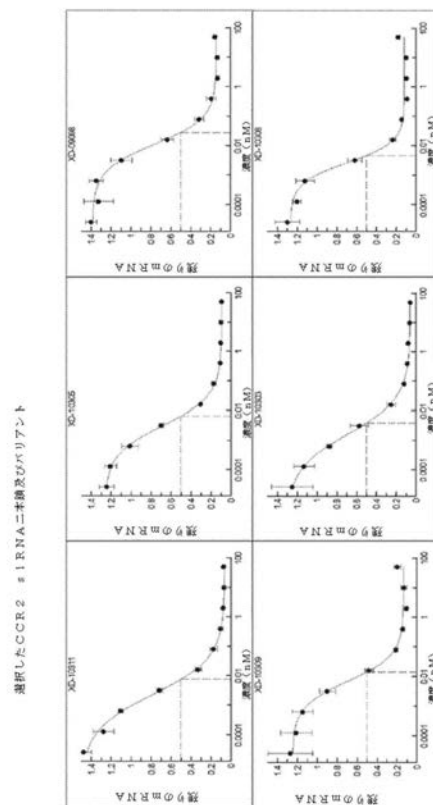
【図 1 C - 2】

【図 1 C】 (続き)



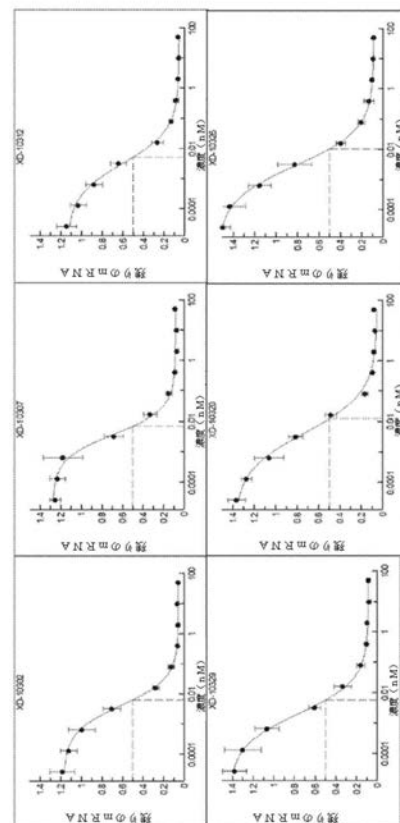
【図 1 D - 1】

【図 1 D】



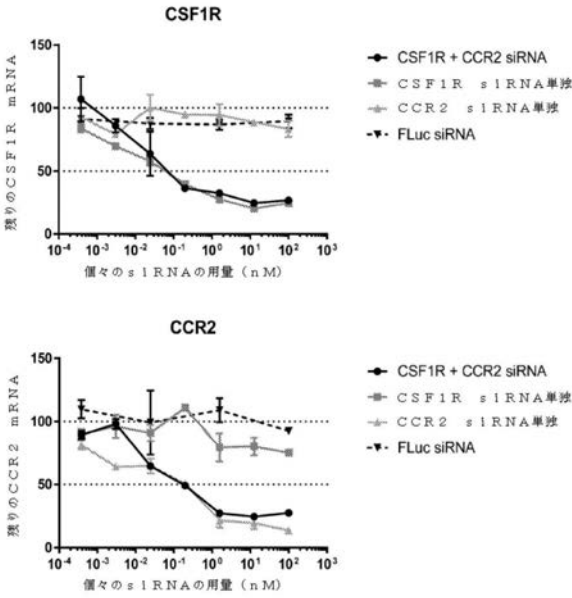
【図 1 D - 2】

【図 1 D】 (続き)



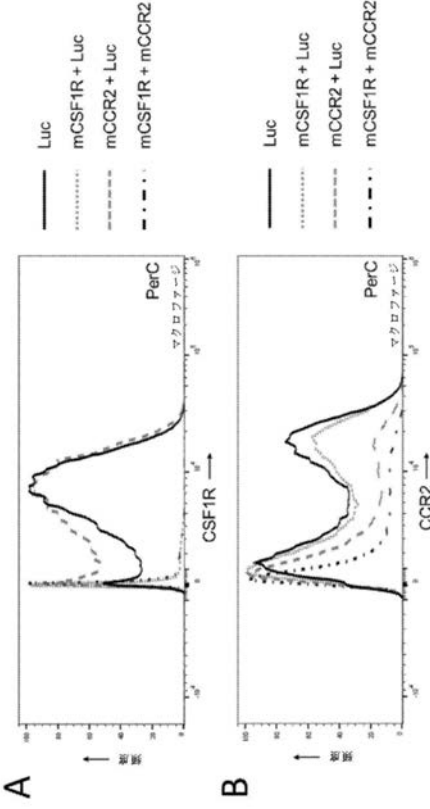
【図2】

【図2】



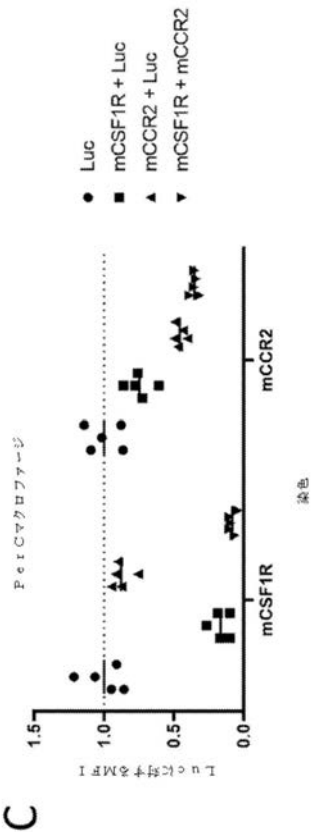
【図3-1】

【図3】



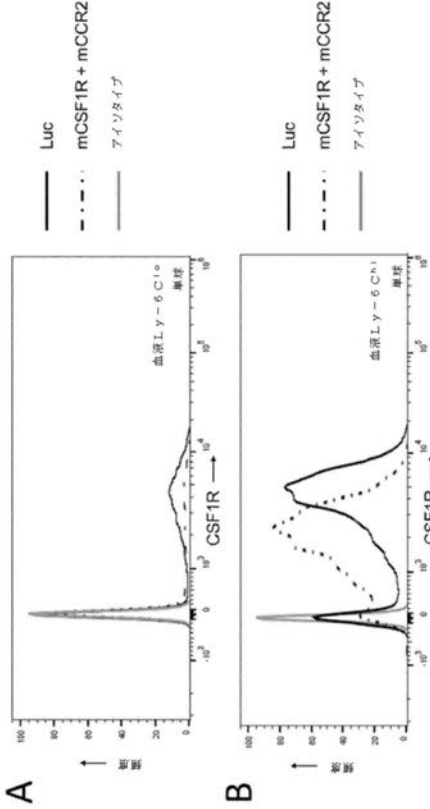
【図3-2】

【図3】(続き)



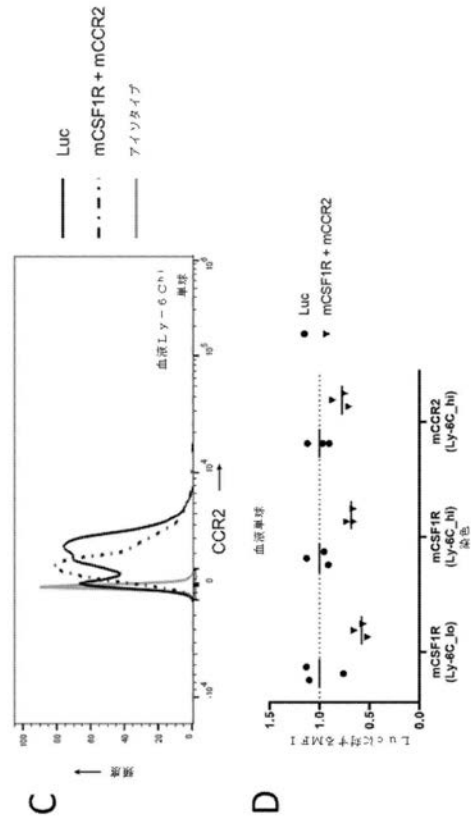
【図4-1】

【図4】



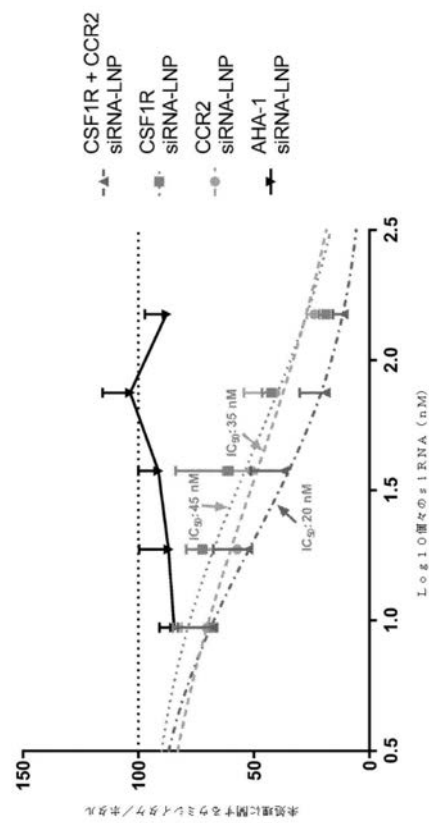
【 図 4 - 2 】

【 図 4 】 (続 き)



【 図 5 】

【 図 5 】



【 配 列 表 】

2021534101000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/45841

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 15/113, A61K 48/00, C07H 21/04 (2019.01)

CPC - C12N 15/1138, C12N 15/113

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History documentElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2011/0038871 A1 (VISWANTH et al.) 17 February 2011 (17.02.2011) abstract; claims 4 and 7	1 2, 11
Y	WO 2005/101002 A1 (BAYER HEALTHCARE AG) 27 October 2005 (27.10.2005) p. 1, para 1; Fig. 4; SEQ ID NO: 4	2, 11

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 December 2019

Date of mailing of the international search report

10 JAN 2020

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/45841

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-10, 16-78
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

--continued on next extra sheet--

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2, 11 limited to CCR2 siRNA SEQ ID Nos: 6 and 68 (duplex XD-09033)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 19/45841

--continued from Box III: Observations where unity of invention is lacking--

Group I+, claims 1-3 and 11-15, directed to a composition comprising a) at least one siRNA molecule that hybridizes to a nucleic acid molecule encoding CCR2, and/or b) at least one siRNA molecule that hybridizes to a nucleic acid molecule encoding CSF1R. The composition will be searched to the extent that the siRNA molecule encompasses a siRNA molecule that hybridizes to CCR2, comprising sense strand SEQ ID NO: 6, anti-sense strand SEQ ID NO: 68, and duplex XD-09033 (note, applicant specification p. 68, Table 2 and p. 195, Table 12, duplex XD-09033 corresponds to SEQ ID Nos: 6 and 68). It is believed that claims 1, 2 and 11 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the siRNA molecule encompasses CCR2 siRNA SEQ ID Nos: 6 and 68 (duplex XD-09033). Additional siRNA molecule(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected siRNA molecule(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be siRNA molecule comprising sense strand SEQ ID NO: 7, anti-sense strand SEQ ID NO: 69, and duplex XD-09034, (claims 1, 2, 11).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique nucleic acid sequence, and is considered a distinct technical feature.

No technical features are shared between the CCR2 or CSF1R siRNA nucleic acid sequences of Group I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Group I+ were considered to share the technical features of including: a composition comprising a) at least one siRNA molecule that hybridizes to a nucleic acid molecule encoding CCR2, and/or b) at least one siRNA molecule that hybridizes to a nucleic acid molecule encoding CSF1R, wherein the at least one siRNA duplex that hybridizes to the nucleic acid molecule encoding CCR2 or CSF1R comprises a sense strand and an anti-sense strand, these shared technical features are previously taught by US 2011/0038871 A1 to Viswanth et al., (hereinafter Viswanth).

Viswanth teaches a composition comprising an siRNA molecule that hybridizes to a nucleic acid molecule encoding CCR2, wherein the siRNA duplex that hybridizes to the nucleic acid molecule encoding CCR2 comprises a sense strand and an anti-sense strand (abstract "compositions and methods for treating conditions of the eye using CCR2"; claim 4 "A double stranded short interfering nucleic acid (siNA) molecule that directs cleavage of CCR2 RNA...wherein one strand of the siNA molecule comprises a nucleotide sequence having sufficient complementarity to the CCR2 RNA for the siNA molecule to direct cleavage of the CCR2 RNA via RNA interference."; claim 7).

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of item 4 above: claims 4-10, 16-78 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ノボブラントセバ, タティアナ アイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02482, ウェルズリー, ハイ レッジ アベニュー 15

(72)発明者 カウフマン, ケビン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02144, サマービル, ピアソン ロード 5, ユニット 2

Fターム(参考) 4C076 AA29 BB11 CC27 DD60A DD63 DD70 EE23 EE52

4C084 AA13 MA02 MA05 MA43 NA14 ZB26

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MA43 NA14
ZB26

4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA03 NA14 ZB26