

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6008845号
(P6008845)

(45) 発行日 平成28年10月19日 (2016. 10. 19)

(24) 登録日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/113 (2010. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G
A 6 1 K 31/713 (2006. 01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 P 27/02 (2006. 01)	A 6 1 P 27/02

請求項の数 11 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2013-511743 (P2013-511743)
 (86) (22) 出願日 平成23年5月27日 (2011. 5. 27)
 (65) 公表番号 特表2013-528382 (P2013-528382A)
 (43) 公表日 平成25年7月11日 (2013. 7. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/051007
 (87) 国際公開番号 W02011/148193
 (87) 国際公開日 平成23年12月1日 (2011. 12. 1)
 審査請求日 平成26年4月21日 (2014. 4. 21)
 (31) 優先権主張番号 10380074. 4
 (32) 優先日 平成22年5月27日 (2010. 5. 27)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者 507058270
 シレンティス・エセ・ア・ウ
 スペイン・2 8 7 6 0・マドリード・トレ
 ス・カントス・カリエ・サンティアゴ・グ
 リソリア・ヌーメロ・2・パルケ・テクノ
 ロジコ・デ・マドリード
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 眼の状態の治療および／または予防のための方法および組成物における s i R N A およびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

眼組織における TRPV1 の発現および／または活性の増加により特徴付けられる眼の状態の治療のための医薬の製造における、一方の鎖が配列番号2に示されるヌクレオチド配列から成り、アンチセンス鎖は相補的ヌクレオチド配列から成る19ヌクレオチドの平滑末端二本鎖RNA分子から成る、配列番号1に示される塩基配列を特異的に標的とする siRNA の使用であって、前記 siRNA が眼の角膜表面に投与されるように製剤化される、使用。

【請求項 2】

前記眼の状態が眼痛である、請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

前記眼の状態が、屈折矯正手術に続く感受性の変化、コンタクトレンズの使用、眼球乾燥症候群、およびシェーグレン症候群から選択される、請求項1または2に記載の使用。

【請求項 4】

前記 siRNA の少なくとも1つのヌクレオチドが化学的改変を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

ヌクレオチドの前記化学的改変が、2'-Oメチル化、ウラシルリボースヌクレオチドのデオキシチミジンヌクレオチドによる置換、またはそれらの組合せから選択される、請求項4に記載の使用。

【請求項 6】

10

20

前記化学的改変が、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の上にある、請求項4または5に記載の使用。

【請求項7】

前記siRNAの一方の鎖が、配列番号3～配列番号6、および配列番号8～配列番号16に示される塩基配列から選択される、請求項4から6のいずれか一項に記載の使用。

【請求項8】

眼組織におけるTRPV1の発現および/または活性の増加により特徴付けられる眼の状態の治療のための医薬組成物であって、細胞内へ導入された際にTRPV1遺伝子の発現を減少する、配列番号1に示される塩基配列を特異的に標的とするsiRNAを含み、前記siRNAが一方の鎖が配列番号2に示されるヌクレオチド配列から成り、アンチセンス鎖は相補的ヌクレオチド配列から成る、19ヌクレオチドの平滑末端二本鎖RNA分子から成り、前記siRNAが眼の角膜表面に投与されるように製剤化される、医薬組成物。

10

【請求項9】

前記siRNAの少なくとも1つのヌクレオチドが化学的改変を含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

ヌクレオチドの前記化学的改変が、2'-Oメチル化、ウラシルリボースヌクレオチドのデオキシチミジンヌクレオチドによる置換、またはそれらの組合せから選択される、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

20

前記siRNAの一方の鎖が、配列番号3～配列番号6、および配列番号8～配列番号16に示される塩基配列から選択される、請求項9または10に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、RNA干渉を使用した、一過性受容体電位パニロイド(transient receptor potential vanilloid)(TRPV1)の高いレベルの発現および/または活性に関連する眼の状態の治療および/または予防のための方法および組成物におけるsiRNA産物の提供およびそれらの使用に関する。とりわけ、眼痛、例として、屈折矯正手術に続く角膜の不快感および感受性の変化、コンタクトレンズの使用、眼球乾燥症候群、ならびにシェーグレン症候群に関連する眼の状態が緩和される。

30

【背景技術】

【0002】

RNA干渉(RNAi)は、小型の二本鎖RNA(dsRNA)分子を使用して、相同性に依存する遺伝子サイレンシングを導く、ほとんどの真核細胞の天然に存在する調節機構である。2006年には、FireおよびMelloによる虫の線虫(C. elegans)中のその発見{Fire、1998年}に対して、ノーベル賞が授与された。その最初の記載の直後にはまた、RNAiが、哺乳動物細胞中でも、長いdsRNAを通してではなく、21ヌクレオチド長の二本鎖の低分子干渉RNA(siRNA)により発生することが示された{Elbashir、2001}。

【0003】

40

RNA干渉のプロセスは、外来遺伝子の発現を阻止するために使用された、進化的に保存されている細胞の防御機構であると考えられており、多種多様な門および植物相が一般に共有し、これは、転写後遺伝子サイレンシングと呼ばれている。RNAi機構の発見以来、別の方法、すなわち、低分子またはタンパク質が関与する伝統的な薬学的アプローチを用いる方法では「新薬の開発につながらない(undruggable)」標的に取り組むことによってヒト疾患を治療する新しい方法として、遺伝子発現を選択的に変えることができる新しい化合物を解明するための研究が激増している。

【0004】

現在の知識によれば、長い二本鎖RNAが、ダイサーとして公知であるリボヌクレアーゼII様タンパク質によりプロセシングされると、RNAi機構が開始する。タンパク質ダイサー

50

は典型的には、N末端RNAヘリカーゼドメイン、RNAに結合する、いわゆるPiwi/アルゴノート/Zwille(PAZ)ドメイン、2つのリボヌクレアーゼIIIドメイン、および二本鎖RNA結合ドメイン(dsRBD)を含有し{Collins、2005年}、その活性により、長い二本鎖RNAから、2塩基の3'オーバーハング、ならびに5'リン酸および3'ヒドロキシル基を有する、21~24ヌクレオチドの二本鎖siRNAへのプロセッシングが生じる。次いで、得られたsiRNA二重鎖は、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)として公知であるエフェクター複合体中に組み込まれ、二本鎖siRNA分子が、RNAヘリカーゼ活性を通して、アデノシン-三リン酸(ATP)依存性に巻き戻される{Nykanen、2001年}と、siRNAのアンチセンス鎖またはガイド鎖が、RISCを導いて、標的mRNA配列を認識し、切断する{Elbashir、2001年}。mRNAの分解をもたらすRISCの触媒活性は、エンドヌクレアーゼであるアルゴノート2(AGO2)により媒介される{Liu、2004年; Song、2004年}。AGO2は、高度に保存されたアルゴノートファミリーのタンパク質に属する。アルゴノートタンパク質は、2つの共通ドメイン、すなわち、PIWIドメインおよびPAZドメインを含有する、約100kDaの極めて塩基性のタンパク質である{Cerutti、2000年}。PIWIドメインは、ダイサーとの相互作用によって極めて重要であり、mRNAの切断に関与するヌクレアーゼ活性を含有する{Song、2004年}。AGO2は、siRNA二重鎖の一方の鎖を、相補配列を含有するメッセンジャーRNAを見出すためのガイドとして使用し、ガイド鎖の5'末端に対する塩基10と塩基11との間のリン酸ジエステル骨格を切断する{Elbashir、2001年}。RISCの活性化の間の重要なステップは、センス鎖またはパッセージ鎖のAGO2による切断であり、複合体からこの鎖が除去される{Rand、2005年}。siRNAガイド鎖とPIWIドメインとの間の相互作用を解析する結晶学研究から、標的mRNAのRISCによる認識を導く「シード配列」を構成するのは、ヌクレオチド2~8のみであり、この配列中の単一ヌクレオチドのミスマッチが、分子のサイレンシング能力に劇的に影響を及ぼす恐れがあることが明らかになっている{Ma、2005年; Doench、2004年; Lewis、2003年}。mRNAが切断されると、断片中に未保護のRNA末端が存在することに起因して、mRNAは、細胞内ヌクレアーゼにより、さらに切断され、分解され、最早タンパク質に翻訳されず{Orban、2005年}、一方、RISCは、次回に再利用される{Hutvagner、2002年}。このことは、特定のmRNA分子および対応するタンパク質の選択的な低下をもたらす触媒プロセスを構成する。遺伝子サイレンシングのためのこの天賦の機構を、任意の最適な遺伝子を調節する目的で、siRNAエフェクターを細胞または組織内に直接送達することによって活用することが可能であり、細胞または組織では、siRNAエフェクターが、RISCを活性化させ、標的とされるmRNAの強力かつ特異的なサイレンシングをもたらす。

【0005】

siRNAが最大の有効性を達成するために有すべきである、長さ、構造、化学的組成および配列に関する理想的な特徴を記載する多くの研究が公開されている。siRNAの設計のための最初のパラメータが、Tuschlらにより、W002/44321中に記載されたが、それ以来、多くの続く研究、アルゴリズムおよび/または改善が公開されている。

【0006】

また、多くの努力が、siRNAの安定性の増強にも払われている。これは、生物学的液体中のリボヌクレアーゼの偏在性を考えると、siRNAの安定性が、siRNAに基づく療法についての主要な障害のうちの1つであると理解されているからである。安定性の増強のために追跡されている主要な戦略のうちの1つとして、改変ヌクレオチド、例として、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-アミノヌクレオチド、2'-Oまたは4'-Cのメチレン架橋を含有するヌクレオチドが使用されている。また、主としてホスホロチオエートにより改変されたヌクレオチドの導入による、隣接するヌクレオチドを接続するリボヌクレオチド骨格の改変も記載されている。安定性の増強は、有効性にしばしば反比例し(Parish、2000年)、改変ヌクレオチドの特定の数、位置および/または組合せのみから、安定なサイレンシング化合物を得ることができるようである。このことは、siRNAに基づく治療に属する重要なハードルであることから、良好な結果を示す特定の改変パターンを記載する異なる研究が公開されている。そのような例として、EP1527176、W02008/050329、W02008/104978またはW02009/044392が挙げられるが、さらに多くを文献に見出すことができる。

【0007】

一過性受容体電位パニロイド-1(TRPV1)は、パニロイド受容体1(VR-1)ともまた呼ばれ、カプサイシン応答性リガンド開口型カチオンチャネルであり、1997年に最初に発見された(Caterina、1997年)。TRPV1は、感覚神経上に主として発現し、熱、カプサイシン、プロトンおよびエンドパニロイド(endovanilloid)についての分子検出器として働く(Caterina、2001年;Montell、2002年;Baumann、2000年)。しかしまた、本出願の発明者らは、TRPV1が涙腺および毛様体に由来する組織中でも発現することを見出すに至った。

【0008】

TRPV1が、アゴニスト、例として、カプサイシン、およびその他の要因、例として、熱、アシドーシス、リポオキシゲナーゼ産物またはアナンダミドにより活性化されると、カルシウムが細胞に進入し、疼痛シグナルが開始される。チャネルの活性化が、中枢感覚神経および末梢感覚神経の末端からの神経ペプチドの放出を誘発し、結果として、疼痛の感覚、神経原性の炎症、ならびに時には、平滑筋収縮および咳が生じる。実際、最近の証拠は、TRPV1の疼痛、咳、喘息および尿失禁における役割を示唆している(Jia、2005年)。実際に、TRPV1は、疼痛刺激に応答する鎮痛による治療のための公知の標的である。さらにまた、異なる技術を使用して、TRPV1の発現レベルを低下させるように設計された治療も、W02004/042046または(Schubert、2005年)に記載されており、これらは、疼痛の治療に焦点を合わせている。

【0009】

多様式侵害受容器が、角膜中に見出される最も豊富な侵害受容器のタイプである。これらの受容器の繊維がTRPV1受容体を発現する薬理学的証拠が存在する。これは、それらの繊維が、カプサイシン、熱および酸に応答することによる。さらに、高い用量のカプサイシンは、角膜の多様式侵害受容器の、熱および酸に対する応答を不活性化させ、一方、機械的な応答性は、影響されない状態を維持する。このことは、角膜の多様式神経終末中に存在するTRPV1受容体が選択的に不活性化されたことを示唆している。したがって、角膜損傷に対する急性侵害受容応答ならびにこの組織中の炎症性および刺激性のプロセスに伴う持続性の疼痛感覚の重要な部分が、TRPV1の活性化により媒介されると思われる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】W002/44321

【特許文献2】EP1527176

【特許文献3】W02008/050329

【特許文献4】W02008/104978

【特許文献5】W02009/044392

【特許文献6】W02004/042046

【特許文献7】W02007/045930

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Maniatis, T.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1982年、387～389頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

さらに、W02007/045930が、眼痛および眼球乾燥症候群に関連する眼の病態の治療のための、TRPV1に特異的なsiRNAの使用を記載している。しかし、本発明は、TRPV1の発現および結果として生じる眼の不快感を低下させるための改善された産物を提供する。伝統的な化学阻害剤と比した、これらの状態を、siRNA産物を用いて治療する利点は、siRNAに基づく治療がより長く続く作用を示すことである。この結果は、エフェクター分子が最早存在しなくなったら、細胞が新しい受容体を一から合成しなければならないという事実

10

20

30

40

50

因する。一方、伝統的な治療では、細胞膜上の受容体のレベルは未変化のままであろう。

【0013】

現在のライフスタイルに起因して、眼の感受性の変化に関連する眼の病態により影響を受ける人々の数は極めて多く、集団の高齢化に伴い増加することが予想される。屈折矯正手術およびコンタクトレンズの使用により、角膜の感受性の変化および患者による乾燥眼の感覚がしばしば生じる。このことは、コンピュータスクリーンを見る作業時間が長いことおよび大気を通常さらに乾燥させる空調設備を使用することによりさらに悪化する。また、涙の分量および質も、年齢と共に減少する。眼球乾燥症候群に伴う症状は、眼組織の痒み、灼熱痛および過敏を含む。乾燥眼のより重度の形態が、シェーグレン症候群を有する患者に生じる。これらの感覚の1つまたは異なる組合せの存在を、本文章の意味するところにおいて眼痛と呼ぶ。現在のところ、1千万人超の米国市民が眼球乾燥症候群に罹患していると推定される。

10

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】TRPV1の時間的な発現プロファイルを示すグラフである。TRPV1を標的とする異なるsiRNA、すなわち、本発明による化合物(配列番号2)、以前に記載された、異なる領域を標的とする化合物(配列番号7)、およびTRPV1を標的とするように設計された、別の4つのsiRNA(配列番号17~20)、ならびに陰性対照として使用したスクランブル配列を、HeLa細胞にトランスフェクトした後に、Qrt-PCRを使用した。確実に明確にするために、同じ結果の2つの代替のグラフを示す。

20

【図2】TRPV1の時間的な発現プロファイルを示すグラフである。本発明の異なるsiRNA、すなわち、配列番号2~配列番号6、および配列番号8~配列番号16、ならびに陰性対照として使用したスクランブル配列を、HeLa細胞にトランスフェクトした後に、Qrt-PCRを使用した。

【図3】TRPV1依存性疼痛に特異的であることが認められている鎮痛剤であるカプサゼピンと比較した、本発明の化合物(配列番号2)を用いて治療したウサギの眼の、カプサイシンを用いた刺激後にmmで測定した眼瞼の開きに関する時系列を示すグラフである。

【図4】本発明の化合物(配列番号2)およびカプサゼピンを用いた治療から得られた、カプサイシンを用いた疼痛誘発後の眼瞼の開きの試験前の値に関する比(%)を示すグラフである。

30

【図5】10%血漿に24時間曝露した後に残存する未変化の産物の量(%)を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

第1の態様では、本発明は、siRNA分子を提供することに関し、前記分子は、配列番号1を特異的に標的とし、細胞中に導入されると、TRPV1遺伝子の発現を低下させる。

【0016】

本発明によるsiRNAが、遺伝子を「標的とする」のは、例えば、siRNA分子が遺伝子の発現を選択的に減少させるまたは阻害する場合である。句「選択的に減少させるまたは阻害する」は、本明細書で使用する場合には、1つの遺伝子、この場合には、TRPV1の発現に影響を及ぼすsiRNAを網羅する。あるいは、siRNAが、遺伝子を標的とするのは、siRNAが、厳密な条件下で、遺伝子の転写物、すなわち、そのmRNAにハイブリダイズする場合でもある。「厳密な条件下で」ハイブリダイズすることが可能であるとは、標的mRNA領域に、ハイブリダイゼーションを疎んじる傾向を示す標準的な条件、例えば、高い温度および/または低い塩含有量の下でアニーリングすることを意味する。適切なプロトコール(0.1×SSC、68°C、2時間が関与する)が、Maniatis, T.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982年、387~389頁に記載されている。

40

【0017】

本明細書に引用する核酸配列は、別段の記載がない限り、5'から3'の方向に記載する。用語「核酸」は、DNAまたはRNAまたはそれらの改変形態のいずれかを指し、これらは、DN

50

A(アデニン「A」、シトシン「C」、グアニン「G」、チミン「T」)またはRNA(アデニン「A」、シトシン「C」、グアニン「G」、ウラシル「U」)中に存在するプリン塩基またはピリミジン塩基を含む。「T」塩基は、RNA中には天然に存在しないにもかかわらず、本明細書において提供する干渉RNAは、「T」塩基を、例えば、3'末端において含むことができる。場合によっては、これらの塩基を「dT」と表記して、リボヌクレオチド鎖中に存在するデオキシリボヌクレオチドと区別することもできる。

【0018】

上記の定義に従う標的配列は、siRNAを設計する目的で使用するデータベースにおいて転写物の変異体を定義するために使用する場合には、標的DNA配列として記載され、一方、使用しようとする特異的な化合物は、そのように定義されたRNA配列である。

10

【0019】

TRPV1に対応する、異なる転写物の変異体が同定されている。代替のスプライシングにより産生される4つのTRPV1転写物に対応するGenBank受託番号は、NM_080704(NM_080704.3、GI:117306161)、NM_018727(NM_018727.5、GI:117306160)、NM_080706(NM_080706.3、GI:117306163)、およびNM_080705(NM_080705.3、GI:117306162)である。さらに、ENSEMBL(MBL-EBI/Wellcome Trust Sanger Institute)は、5つのさらなるTRPV1転写物を有し、それらは、ENST00000174621、ENST00000310522、ENST00000344161、ENST00000399752、ENST00000399756、ENST00000399759、ENST00000425167として公開されている。

【0020】

本発明は、TRPV1遺伝子の発現を阻害するsiRNAを提供し、これらのsiRNAは、現況技術においてすでに開示されているものと比較してとりわけ効率的である。とりわけ効率的とは、それらがより高い程度の阻害および/またはより長時間の作用を達成することを意味する。

20

【0021】

これら新規のsiRNAは、先行する段落に記載したTRPV1の転写物の変異体全てに共通の標的配列に対して設計され、したがって、TRPV1タンパク質をコードする細胞中に存在する可能性があるmRNA全てのRISC媒介性の分解を媒介する。本発明が同定する前記好ましい標的領域は、配列番号1(5'-AAGCGCATCTTCTACTTCA-3')として同定される。

【0022】

したがって、本発明によるsiRNAは、好ましくは、二本鎖RNA分子を含み、そのアンチセンス鎖が、配列番号1に実質的に相補的なRNA配列を含み、そのセンス鎖が、アンチセンス鎖に相補的なRNA配列を含み、両方の鎖が、ヌクレオチド間の標準的な塩基対形成によりハイブリダイズする。

30

【0023】

本発明の意味するところにおいてまた、標的mRNA配列に「実質的に相補的である」は、前記標的配列と「実質的に同一である」とも理解することができる。当業者に公知である「同一性」は、配列間でヌクレオチドの順番および同一性をマッチさせることによって決定されるヌクレオチド配列間の配列関連性の程度である。一実施形態では、標的mRNA配列に対して、80%、および80%~最高100%の間の相補性、例えば、85%、90%または95%の相補性を有するsiRNAのアンチセンス鎖を、実質的に相補的であるとみなし、本発明において使用することができる。相補性パーセントは、第2の核酸分子中の一連の近接するヌクレオチドと、ワトソン-クリック塩基対の意味で塩基対を形成することができる第1の核酸分子中の近接するヌクレオチドのパーセントを記載する。

40

【0024】

現況技術から公知であるが、RNA干渉を達成するための多くの異なる構造が提案されている。一般に、これらの二本鎖分子は、約19~約25ヌクレオチド長であり、平滑末端の構造を含んだり、オーバーハングを有する構造を含んだりする。オーバーハングは、好都合であることが記載されており、いずれかの鎖の5'末端または3'末端上に存在し得る。これは、オーバーハングは、リボヌクレアーゼによる認識を低下させ、ダイサーの天然の基質を模倣するからである。著者の中には、分子の両方の3'末端上にオーバーハングを含める

50

ことを推奨する者もいれば、一方、1つのオーバーハングで十分であると考える者もいる。その他の著者は、特定の改変パターンを有する平滑末端の構造の使用を記載している (EP1527176、W02008/104978、および多くのその他)。

【0025】

オーバーハングは、1~5つの間のヌクレオチドからなり得、典型的には、オーバーハングはジヌクレオチドで構成される。当技術分野で使用される古典的な分子は、19ヌクレオチドの二本鎖分子を含み、この分子は、Tuschlによる最初の研究に教示されているように、デオキシヌクレオチドを好ましくは含む、3'ジヌクレオチドオーバーハングをさらに含む (WO02/44321)。これらのオーバーハングは、ヌクレアーゼ (リボヌクレアーゼ) による分解に対する耐性をさらに増強するといわれている。後に、Kimら、2005年は、(ジヌクレオチドオーバーハングを含有する) 21塩基長の産物が、RISC上への取込みに必要であることを記載している。さらに、Bramsenら、2009年は、サイレンシング効率をさらに増加させるための、オーバーハングへの不安定化の可能性のある改変の導入も記載している。

10

【0026】

したがって、本発明の好ましい実施形態は、少なくとも1つのオーバーハングを含む、配列番号1を標的とするsiRNA分子を指す。

【0027】

本発明の別の代替の実施形態は、平滑末端分子を提供する。

【0028】

さらに、本発明の好ましい実施形態は、配列番号1を標的とする、19ヌクレオチドの二本鎖構造を含むまたはそれからなるsiRNAにも関する。驚くべきことに、図5に見ることができるように、前記19ヌクレオチドの二本鎖RNAは、21ヌクレオチドを有し、3'オーバーハングを有する以前に記載された産物よりも分解に対して耐性であることを証明するに至った。

20

【0029】

本発明の特定の実施形態は、配列番号1を標的とする、19ヌクレオチドの二本鎖平滑末端siRNAに関する。さらに特定の実施形態では、この化合物は、配列番号2 (5'-AAGCGCAUCUUCUACUUC A-3') として同定される。さらに好ましい実施形態では、このsiRNAのアンチセンス鎖は、配列番号1に対して、少なくとも80%、好ましくは、少なくとも90%の相補性を示す。

30

【0030】

さらに、背景技術と呼ばれるセクションに記載したように、siRNA分子に関する重要な問題は、リボヌクレアーゼの偏在性に起因する生物学的液体中のそれらの不安定性である。したがって、ヌクレオチドに対する多くの異なる化学的改変の使用が、化合物の安定性を増強する目的で記載されている。

【0031】

siRNA分子の別の内在する問題が、それらの免疫原性であり、それにより、siRNAは、特定のサイトカイン、例えば、I型および/またはII型のインターフェロンならびにIL-12、IL-6および/またはTNF-アルファの産生の上方制御を含めて、自然免疫系の非特異的な活性化を誘発することが見出されている。これらの作用の起源は、Toll様受容体、例として、TLR7、TLR8および/またはTLR3のsiRNAによる活性化であると考えられている。

40

【0032】

また、これらの作用の両方、すなわち、リボヌクレアーゼによる認識および免疫原性は、配列依存性であることも記載されている。

【0033】

また、化合物の安定性を、リボヌクレアーゼに対する感受性を減少させることによって増強する化学的改変のうちのいくつかは、続く応答の免疫認識の誘発も低下させることができる。しかし、また、これまでのセクションに記載したように、siRNA中への化学的改変ヌクレオチドの挿入により、サイレンシングの有効性の減少が生じる恐れもあり、したがって、そうした挿入には、慎重にアプローチしなければならない。

50

【0034】

したがって、本発明の好ましい実施形態では、siRNAは、化学的改変を有する少なくとも1つのヌクレオチドをさらに含む。

【0035】

安定性を増強し、免疫原性作用を低下させる好ましい化学的改変は、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-フルオロヌクレオチド、2'-アミノヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-Oまたは4'-Cのメチレン架橋を含有するヌクレオチドを含む。また、ホスホロチオエートにより改変されたヌクレオチドの導入による、隣接するヌクレオチドを接続するリボヌクレオチド骨格の改変。本発明の意味するところにおいて、さらに好ましい化学的改変は、ウラシルリボヌクレオチドの、デオキシチミジン(デオキシリボヌクレオチド)による置換に関する。本発明の別の好ましい実施形態では、少なくとも1つの化学的改変ヌクレオチドは、siRNAのセンス鎖、アンチセンス鎖または両方の鎖上にある。

10

【0036】

したがって、一実施形態では、siRNAは、配列番号3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15または16から選択される。

【0037】

上記のsiRNA分子を、当技術分野で公知の方法を使用して、細胞の内側に、それらの自然のままの構造で送達することができる。例えば、遺伝子サイレンシングを、*in vitro*において研究する場合、これらの化合物を、標準的なトランスフェクション試薬を使用して投与する。また、*in vivo*における効果を達成するためには、これらの化合物の裸での投与か、または送達増強剤、例えば、リポソーム等を使用して、もしくは特異的部分とのコンジュゲーションを使用する投与等を行うこともできるが、多くの異なる選択肢が、当技術分野では公知であり、体内の所望の標的部位に応じて、異なって使用される。

20

【0038】

あるいは、本発明のsiRNA分子を、細胞内で真核生物プロモーターから発現させることもできる。siRNA分子を発現することが可能である組換えベクターを、標的細胞内に送達し、持続させることができる。あるいは、核酸分子の一過性の発現をもたらすベクターを使用することもできる。そのようなベクターは、必要に応じて、繰り返して投与することができる。siRNA分子は、発現すると、標的mRNAと相互作用し、RNA干渉応答を発生させる。このように産生されたsiRNA分子をしばしば、shRNA(低分子ヘアピン型RNA)と呼ぶ。これは、それらのセンス鎖とアンチセンス鎖とが、ヌクレオチドの小型のループにより結ばれていることによる。siRNA分子発現ベクターの送達は、全身性、例として、静脈内もしくは筋肉内への投与であってもよく、標的細胞を、対象から外植し、続いて、対象内に再導入して投与することによる送達であってもよく、または所望の標的細胞内への導入を可能にするであろう任意のその他の手段による送達であってもよい。

30

【0039】

本発明のさらなる態様は、TRPV1の発現および/または活性の増加により特徴付けられる眼の状態を治療する方法において使用するための医薬を調製する際の、配列番号1を標的とするsiRNAの使用に関する。この方法は、患者においてTRPV1の発現を阻害するステップを含む。阻害という用語を使用して、発現または活性の減少または下方制御を示す。好ましくは、眼の状態は、眼痛である。一実施形態では、眼の状態は、屈折矯正手術に続く眼の不快感および角膜の感受性の変化、コンタクトレンズの使用、眼球乾燥症候群、シェーグレン症候群、ならびにその他の眼病態を含む群から選択される。

40

【0040】

TRPV1 mRNAに対して作られたsiRNAを用いる治療処置は、その作用が観察される時間の長さを増加させ、それによって、頻度のより少ない投与およびより高い患者の服薬遵守を可能にすることによって、低分子の外用眼用滴下剤を上回って有益であることが予想される。このことは、眼球乾燥症候群および角膜の感受性の変化等の場合にとりわけ重要である。これは、それらの状態がしばしば、慢性状態であるからである。

【0041】

50

そのような医薬を調製することを踏まえれば、本発明のsiRNAを製剤化することができる。好ましくは、前記siRNAの組成物および製剤を、目的の臓器に外用投与することができる。さらにより好ましい実施形態では、前記siRNAを、眼、好ましくは、眼の角膜表面に外用投与するために製剤化することができる。角膜表面への適用は、例えば、点眼剤、ジェル剤、ローション剤、クリーム剤または眼への挿入体の形態をとることができる。眼へのその他の投与形態は、眼内注射を含むことができる。

【0042】

本発明のさらに好ましい実施形態は、TRPV1の発現および/または活性の増加により特徴付けられる眼の状態を治療するための医薬として使用するための、先行する段落に記載した配列番号1を特異的に標的とするsiRNAに関する。上記したように、そうしたsiRNAは、配列番号1を標的とする、19ヌクレオチドの二本鎖構造を含むまたはそれからなるsiRNAであり得る。このsiRNAは、平滑末端であり得る。好ましくは、このsiRNAは、配列番号2である。本発明に従って使用するためのその他のsiRNAを、配列番号3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15または16から選択することができる。

10

【0043】

本発明の文脈においては、配列を「特異的に標的とする」ために、本発明のsiRNAは、同じシード配列を少なくとも含まなければならない。したがって、配列番号1を特異的に標的とする、本発明による配列はいずれも、アンチセンス鎖の2～8位において同一でなければならない。

【0044】

上記にもかかわらず、本発明のsiRNAを使用して、眼以外の組織においても、TRPV1の発現を停止させることができる。したがって、前記siRNAを相応に製剤化すべきである。

20

【0045】

例えば、siRNA分子は、リボソームを含めた、対象に投与するための送達ビヒクルを含むことができる。担体および希釈剤ならびにそれらの塩が、薬学的に許容できる製剤中に存在し得る。核酸分子を、これらに限定されないが、リボソーム中の被包、イオン泳動、またはその他のビヒクル、例として、生分解性ポリマー、ヒドロゲル、シクロデキストリン、ポリ(乳酸-co-グリコール)酸(PLGA)およびPLGAのマイクロスフェア、生分解性ナノカプセルならびに生体接着性物質マイクロスフェア内への組込み、またはタンパク質性ベクターを含めた、当業者に公知の多様な方法により、細胞に投与することができる。別の実施形態では、また、本発明の核酸分子は、ポリエチレンイミン、およびその誘導体、例として、ポリエチレンイミン-ポリエチレングリコール-N-アセチルガラクトサミン(PEI-PEG-GAL)誘導体またはポリエチレンイミン-ポリエチレングリコール-トリ-N-アセチルガラクトサミン(PEI-PEG-triGAL)誘導体を用いて製剤化するかまたはそれらと複合体を形成することもできる。

30

【0046】

本発明のsiRNA分子は、膜破壊剤および/またはカチオン性脂質分子もしくはヘルパー脂質分子と複合体を形成することができる。

【0047】

本発明と共に使用することができる送達システムとして、例えば、水性および非水性のジェル剤、クリーム剤、多層乳剤、マイクロエマルジョン、リボソーム、軟膏剤、水性および非水性の液剤、ローション剤、エアロゾル、炭化水素の基剤および散剤が挙げられ、それらの送達システムは、賦形剤、例として、可溶化剤、浸透増強剤(例えば、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪アルコールおよびアミノ酸)ならびに親水性ポリマー(例えば、ポリカルボフィルおよびポリビニルピロリドン)を含有することができる。一実施形態では、薬学的に許容できる担体は、リボソームまたは経皮増強剤である。

40

【0048】

本発明の医薬製剤は、細胞または例えば、ヒトを含めた、対象内への投与、例えば、全身投与または局所投与に適している形態をとる。適切な形態は、一つには、使用、または進入経路、例えば、経口、経皮もしくは注射による経路によって異なる。その他の要因は

50

、当技術分野では公知であり、考慮すべき事項、例として、毒性、および組成物または製剤がその作用を発揮するのを阻止する形態を含む。

【0049】

また、本発明は、薬学的有効量の所望の化合物を薬学的に許容できる担体または希釈剤中に含む、保存または投与のために調製した組成物も含む。治療に使用するのに許容できる担体または希釈剤は、製剤技術では周知である。例えば、保存剤、安定化剤、染料および矯味剤を提供することができる。これらは、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸およびp-ヒドロキシ安息香酸のエステルを含む。さらに、抗酸化剤および懸濁化剤も使用することができる。

【0050】

薬学的有効用量は、発症を予防する、阻害するか、または疾患状態を治療する(症状がある程度、好ましくは、症状の全てを軽減する)のに必要な用量である。薬学的有効用量は、疾患のタイプ、使用する組成物、投与経路、治療される哺乳動物のタイプ、検討中の特定の哺乳動物の身体的特徴、併用する医薬品、および医学技術における熟練者が認識するであろうその他の要因によって異なる。

【0051】

本発明のおよび本明細書に記載する製剤またはsiRNAを、従来の無毒性の薬学的に許容できる担体、アジュバントおよび/またはビヒクルを含有する単位投与製剤として投与することができる。製剤は、例えば、錠剤、トローチ剤、ドロップ剤、水性もしくは油性の懸濁剤、分散性の散剤もしくは顆粒剤、乳剤、硬質もしくは軟質のカプセル剤、またはシロップ剤もしくはエリキシル剤として、経口使用に適している形態をとることができる。経口使用を意図する組成物を、医薬組成物を製造するための当技術で公知の方法のいずれかに従って調製することができ、そのような組成物は、薬学的に洗練されたかつ風味良好な調製物を提供するために、1つまたは複数のそのような甘味剤、矯味剤、着色剤または保存剤を含有することができる。錠剤は、活性成分を、錠剤を製造するのに適している無毒性の薬学的に許容できる賦形剤との混合物として含有する。

【0052】

これらの賦形剤は、例えば、不活性な希釈剤、例として、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム;顆粒化剤および崩壊剤、例えば、コーンスターチまたはアルギン酸;結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア;ならびに滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクであり得る。錠剤は、コーティングしなくてもよく、または公知の技法によりコーティングしてもよい。場合によっては、そのようなコーティングを公知の技法により調製して、消化管における崩壊および吸収を遅延させ、それによって、より長い期間にわたり、持続性の作用をもたらすこともできる。例えば、時間を遅延させる物質、例として、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートを利用することができる。

【0053】

また、経口使用のための製剤は、活性成分を、不活性な固体の希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリンと混合する硬質ゼラチンカプセル剤として、あるいは活性成分を、水、または油性の媒体、例えば、落花生油、流動パラフィンもしくはオリーブ油と混合する、軟質ゼラチンカプセル剤として提示することもできる。

【0054】

水性懸濁剤は、活性物質を、水性懸濁剤を製造するのに適している賦形剤との混合物として含有する。そのような賦形剤は、懸濁化剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロプロピル(hydropropyl)-メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、ガムトラガントおよびガムアカシアである。分散化剤または湿潤剤は、天然に存在するホスファチド、例えば、レシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンステアレート、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導され

10

20

30

40

50

た部分エステルとの縮合生成物、例として、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレアート、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトール無水物から誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレアートであり得る。また、水性懸濁剤は、1つまたは複数の保存剤、例えば、エチルまたはn-プロピルp-ヒドロキシ安息香酸、1つまたは複数の着色剤、1つまたは複数の矯味剤、および1つまたは複数の甘味剤、例として、スクロースまたはサッカリンを含有することもできる。

【0055】

油性懸濁剤を、植物油、例えば、落花生油、オリーブ油、ゴマ油もしくはヤシ油、または鉱油、例として、流動パラフィン中に活性成分を懸濁させることによって製剤化することができる。油性懸濁剤は、増粘剤、例えば、ミツロウ、固形パラフィンまたはセチルアルコールを含有することができる。甘味剤および矯味剤を追加して、風味良好な経口調製物を提供することができる。これらの組成物を、抗酸化剤、例として、アスコルビン酸を添加することによって保存することができる。

10

【0056】

水の添加により水性懸濁剤を調製するのに適している分散性の散剤および顆粒剤は、活性成分を、分散化剤または湿潤剤、懸濁化剤、および1つまたは複数の保存剤との混合物として提供する。適切な分散化剤もしくは湿潤剤、または懸濁化剤は、例えば、上記すでに言及したものである。また、追加の賦形剤、例えば、甘味剤、矯味剤および着色剤も存在し得る。

【0057】

また、本発明の医薬組成物は、水中油型乳剤の形態をとることもできる。油相は、植物油もしくは鉱油またはこれらの混合物であり得る。

20

【0058】

適切な乳化剤は、天然に存在するガム、例えば、ガムアカシアまたはガムトラガント、天然に存在するホスファチド、例えば、大豆、レシチン、ならびに脂肪酸およびヘキシトール、無水物から誘導されたエステルまたは部分エステル、例えば、ソルビタンモノオレアート、ならびに前記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアートであり得る。また、乳剤は、甘味剤および矯味剤も含有することができる。

【0059】

シロップ剤およびエリキシル剤を、甘味剤、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、グルコースまたはスクロースと共に製剤化することができる。また、そのような製剤は、粘滑剤、保存剤、ならびに矯味剤および着色剤も含有することができる。本発明のおよび本明細書に記載する医薬組成物またはsiRNAは、無菌、注射用の水性または油質の懸濁剤の形態をとることができる。

30

【0060】

この懸濁剤を、公知の技術に従って、上記で言及したことがある適切な分散化剤または湿潤剤および懸濁化剤を使用して製剤化することができる。

【0061】

また、無菌の注射用調製物は、無毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶媒中の無菌の注射用の液剤または懸濁剤、例えば、1,3-ブタンジオール中の液剤としてもよい。利用することができる、許容できるビヒクルおよび溶媒には、水、リンゲル液および等張塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌の固定油も従来、溶媒または懸濁化媒体として利用されている。この目的では、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含めて、任意の無刺激性の固定油を利用することができる。さらに、脂肪酸、例として、オレイン酸も、注射用調製物中で有用である。

40

【0062】

また、本発明の核酸分子は、例えば、薬物の直腸投与のための坐剤の形態で投与することもできる。これらの組成物は、通常温度では固体であるが、直腸温度では液体であり、したがって、直腸中で融解して、薬物を放出する、適切な非刺激性の賦形剤と、薬物を混

50

合することによって調製することができる。そのような物質は、カカオバターおよびポリエチレングリコールを含む。

【0063】

本発明の核酸分子を、無菌の媒体中で非経口投与することができる。薬物は、使用するビヒクルおよび濃度に応じて、ビヒクル中に懸濁させてもまたは溶解させてもよい。好都合に、局所麻酔薬等のアジュバント、保存剤および緩衝化剤を、ビヒクル中に溶解させることができる。

【0064】

したがって、本発明のさらに好ましい実施形態は、医薬組成物に関し、前記組成物は、先行する段落に記載したことがあるように、配列番号1を標的とするsiRNAを少なくとも含む。

10

【0065】

任意の特定の対象についての特定の用量レベルは、利用する特定の化合物の活性、年齢、体重、全般的な健康、性別、食餌、投与時期、投与経路および排泄速度、薬物の組合せ、ならびに療法を受ける特定の疾患の重症度を含めた、多様な要因に依存することを理解されたい。

【0066】

また、本発明の核酸分子を、その他の治療用化合物と組み合わせて対象に投与して、全体的な治療効果を増加させることもできる。複数の化合物を使用して、適応症を治療することによって、有益な効果を増加させ、かつ副作用の存在を低下させることができる。

20

【0067】

本発明を、以下の非限定的な実施例にさらに記載する。

【0068】

(実施例)

in vitro解析

TRPV1の発現を停止させるsiRNA(これは、遺伝子発現の重要な阻害をもたらす)にとって特に有効な標的配列を見出すために、6つの異なるsiRNAを試験した。これらのsiRNAを、配列番号2、配列番号7、および配列番号17~20として記載する。

【0069】

配列番号2は、本発明による配列番号1を標的とするsiRNAであり、以下の配列を有する：

30

センス：5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

アンチセンス：5'-UGAAGUAGAAGAUGCUCU-3'

【0070】

配列番号7(5'-UCGCCACGACAUGCUCUUGdTdT-3')は、WO2007/045930中に、TRPV1を有効に標的とし、カプサイシンによる刺激に対する眼の応答を低下させることが以前に記載された(デオキシチミジンにより作られた3'オーバーハングを含有する21ヌクレオチド長の)古典的siRNA分子に相当する。配列番号17~19は、当技術分野で利用可能な異なるアルゴリズム、例として、Reynoldsら、2004年またはUi-Teiら、2004年が記載しているもの、およびその他に従って、TRPV1に対して設計されたsiRNAに相当する。配列番号20は、市販されているsiRNAであり、これは、Ambionにより供給され、TRPV1に対して設計されている。

40

配列番号17

センス：5'-CGCAUCUUCUACUUAACU-3'

アンチセンス：5'-AGUUGAAGUAGAAGAUGC-3'

配列番号18

センス：5'-GCGCAUCUUCUACUUAAC-3'

アンチセンス：5'-GUUGAAGUAGAAGAUGC-3'

配列番号19

センス：5'-AAAGCCAUGCUCUACCUGC-3'

アンチセンス：5'-GCAGGUUGAGCAUGGCUUU-3'

配列番号20

50

センス: 5'-UGAUCGCAGGAGUAUCUUUdTdT-3'

アンチセンス: 5'-AAAGAUACUCCUGCGAUCAdTdT-3'

【0071】

上記に記載したsiRNAの有効性を試験するためのモデルとして、HeLa(ヒト子宮頸部腺癌)細胞培養物を使用した。HeLa細胞に、100nMの異なる化合物、およびトランスフェクタント剤としてのリポフェクタミン2000を用いてトランスフェクションを行った。全てのトランスフェクションを、標準的な製造元の条件に従って行った。同じトランスフェクションにおいて、異なるスクランブルsiRNAを対照として使用した。タンパク質レベルの変動の可能性を評価するために、細胞ペレットを第24、48および72時間時に収集し、リアルタイムPCRにより処理した。リアルタイムQrt-PCRにより得られた結果を定量化するために、本発明者らは、閾値比較法(Comparative Threshold Method)を使用した。

10

【0072】

結果が示す(図1)ように、標的配列である配列番号1に対して作られたsiRNAは、同じ遺伝子の異なる領域に対して作られた、以前に記載されたsiRNA産物よりも、TRPV1遺伝子のサイレンシングの観点で、はるかに効率的である。さらに、トランスフェクション後の第72時間時にも依然として、mRNAレベルの顕著な下方制御があることから、この作用は、時間の点で持続性でもある。作用のこの持続期間は、意外なことであり、配列特異的である。

【0073】

さらに改善された産物を提供する目的で、異なる化学的改変を、上記の産物に対して、下記の記載に従って導入した。

20

配列番号3,

センス: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列番号4,

センス: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列番号8,

センス: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

30

配列番号9,

センス: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列番号10,

センス: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列番号11,

センス: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列中、下線は、2'-Oメチル基を含む塩基を示す。

40

配列番号5,

センス: 5'-AAGCGCAdTCdTdTTCdTACdTdTCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列番号6,

センス: 5'-AAGCGCAdTCdTdTTCdTACdTdTCA-3'

アンチセンス: 5'-dTGAAGdTAGAAGAdTGCGCdTdT-3'

配列番号12,

センス: 5'-AAGCGCAdTCudTdTTCdTACdTdTCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列番号13,

50

センス: 5'-AAGCGCAdTCUdTcTACUdTCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列番号14,

センス: 5'-AAGCGCAdTCUUCdTACUdTCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列番号15,

センス: 5'-AAGCGCAdTCUUCUACUdTCA-3'

アンチセンス: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

配列番号16,

センス: 5'-AAGCGCAdTCUUCUACUdTCA-3'

10

アンチセンス: 5'-UGAAGdTAGAAGAdTGCGCUU-3'

配列中、一部または全部のウラシルヌクレオチドが、デオキシチミジンヌクレオチドで置換されている。

【0074】

これらの化合物を、免疫原性アッセイにおいて、配列番号2(いずれの改変ヌクレオチドも有さない同じ化合物)と併せて試験した。結果は、これらの化合物は全て、末梢血単核球中で、免疫応答の誘発を顕著に低下させることを示した。さらに、ほとんどの化合物が、応答を誘発し、その応答は、その最も高いレベルでは、アッセイ中に対照として含めた、ヒト臨床試験に進んでいるsiRNA(bevasiranibおよびSirna-027)により発生した応答と同じように低い応答であった。

20

【0075】

種々の程度の改変が、siRNAの遺伝子サイレンシングの能力を変化させることができることから、これらの化合物を、それらのRNA干渉能力について、HeLa細胞内へのトランスフェクションによりさらに試験し、結果として生じるTRPV1 mRNAのレベルを、先行する段落に記載した方法に従って測定した。

【0076】

図2に見ることができるように、全ての化合物が、TRPV1 mRNAのレベルを効率的に減少させる能力を種々の程度で保持する。

【0077】

図5に見ることができるように、上記に記載した化合物から得られたさらなる予想外の有益な作用は、リボヌクレアーゼによる分解に対するそれらの耐性も増強されたことである。

30

【0078】

これらの実験のために、化合物を、PBS中の10%ヒト血漿中に2 μ Mの最終濃度で懸濁させ、37°Cで24時間インキュベートした。次いで、試料を、HPLC-UVを使用して解析し、残存する未変化の産物の量を決定した。図5に観察することができるように、配列番号2の19ヌクレオチドの二本鎖化合物(いずれの化学的改変も有さない)は、3'オーバーハングを含む、以前に記載された配列番号21:5'-CAAGAU CGCACAGGAGAGCdTdT-3'(W02007045930にもまた記載されている)よりもほとんど3倍分解に対して耐性である。この作用は、配列番号3の化合物について、さらに増強されている。この化合物は、先行する段落に記載したように、いくつかの化学的改変ヌクレオチドを含む。

40

【0079】

in vivo解析

乾燥眼および眼痛の動物モデルは、ウサギを活用することが多く、この場合は、New Zealand Whiteウサギを活用する。この目的のための本発明のsiRNAのさらなる利点は、標的配列、すなわち、配列番号1は、TRPV1遺伝子の、異なる動物の配列全体を通して高度に保存された領域であることである。実際に、この配列は、ヒトとウサギとの間で同一であり、この動物モデルを、前記疾患の研究にとりわけ適したものにする。

【0080】

下記に記載する実験を、当技術分野の専門家に公知の眼痛の標準的なモデル(Gonzalez

50

ら、1993年)を使用して実施した。手短に述べると、適切なマイクロピペットを使用する30 μ lの1%カプサイシン(TRPV1の公知のアゴニスト)溶液の眼への滴下注入を使用して、疼痛を誘発した。倫理的に考慮すべき事項に起因して、カプサイシンを用いて治療しようとする動物に、公知のカプサイシンアンタゴニストであるカプサゼピン5mM、または40 μ lの試験しようとする化合物を含有する溶液の投与をあらかじめ与えた。したがって、鎮痛作用は、参照治療としてのカプサゼピンと比較して測定される。

【0081】

試験品および参照品を、右眼中に、第1日から第3日までは1日1回、第4日には1日2回(60分の間隔で)滴下注入した。第4日には、最後の滴下注入の15分後に、角膜痛を、動物の右眼において、カプサイシン1%の単回滴下注入により誘発した。対側眼には、研究全体を通してPBSを滴下注入し、対側眼は、対照として利用した。

10

【0082】

疼痛に対する応答を測定するために、眼瞼の開きを測定した。疼痛に応答して眼は閉じられ、疼痛感覚が弱まるにつれて、眼瞼の開きが増加して、正常レベルに戻るとみなす。治療前(ベースライン)、疼痛誘発の直前、次いで、疼痛誘発の1、5、10、15、20、25、30分後に、眼瞼の開きを測定した。

【0083】

図3および4から見るように、本発明による化合物、具体的には、配列番号2の化合物を試験し、この化合物は、カプサゼピンよりも高い鎮痛作用(眼瞼の開きの程度により測定した場合の眼の回復)を誘発することを観察した。したがって、この化合物が眼の不快感についての有効な治療処置となることを証明するに至った。

20

【0084】

さらに、別のin vivoにおける実験も実施し、本発明の化合物(配列番号2、配列番号4および配列番号5)を、W02007045930に以前に記載された配列番号21と併せて、ウサギの眼に投与した。この場合には、ウサギ(治療群当たり、6匹の動物)に、化合物を、連続3日の間1日1回投与した。第3日には、最後の滴下注入の2時間後に、動物を屠殺した。これらのウサギから得られた眼組織を回収し、TRPV1に特異的なmRNAの存在を、RT-PCRを使用して解析した。以下の表は、参照化合物である配列番号21を用いて達成された%阻害の比として表す、所与の組織において達成されたTRPV1遺伝子のサイレンシングのレベルを示す。

【0085】

30

【表1】

	配列番号 2	配列番号 4	配列番号 5
涙腺	3.06	3.15	1.92
毛様体	6.54	2.48	3.57

【0086】

これらの結果から明確であるが、本発明の化合物は、眼組織においてTRPV1遺伝子の発現を停止させる場合、以前に記載された化合物よりもはるかに有効である。

【0087】

40

本発明の化合物のより長く続く作用と一緒にあって、そのより高い有効性は、好都合な投与レジメを提供するはずである。これは、投与間のより長い時間を可能にすることにより、患者の生活の質が顕著に改善されるためである。

[参考文献]

Baumann TK & Martenson ME. (2000). "Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels." J Neurosci 20:RC80.

Caterina et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature 389(6653):816-24.

Caterina et al. (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." Annu Rev Neurosci. 24:487-517.

10

Cerutti, L., N. Mian, et al. (2000). "Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain." Trends Biochem Sci 25(10): 481-2.

Collins, R. E. and X. Cheng (2005). "Structural domains in RNAi." FEBS Lett 579(26): 5841-9.

20

Doench, J.G. Sharp, P.A. "specificity of microRNA target selection in translational repression" Genes Dev. 18, 504-511; 2004

Elbashir, S. M., W. Lendeckel, et al. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev 15(2): 188-200.

Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature 391(6669): 806-11.

30

Gonzalez, G. G., Garcia, P. et al. (1993). "Reduction of capsaicin-induced ocular pain and neurogenic inflammation by calcium antagonists." Invest Ophthalmol Vis Sci 34(12):3329-3335.

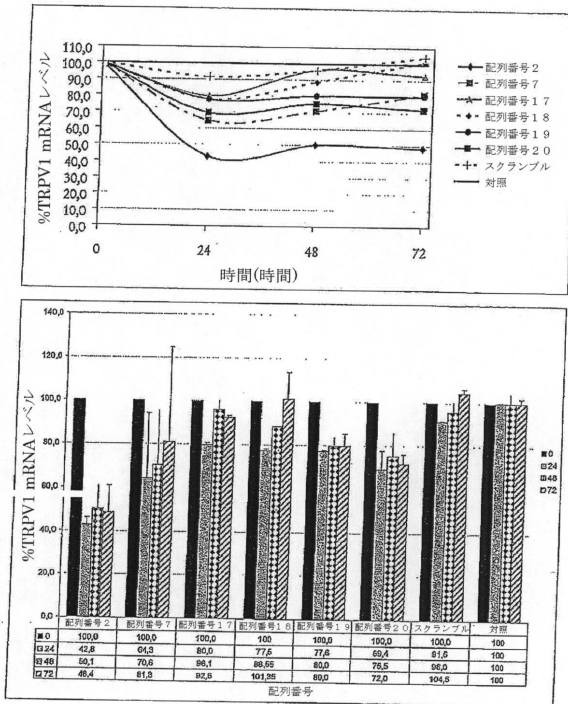
Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." Science 297(5589): 2056-60.

Jia et al. (2005). "TRPV1 receptor: a target for the treatment of pain, cough, airway disease and urinary incontinence." Drug News Perspect 18(3):165-71.

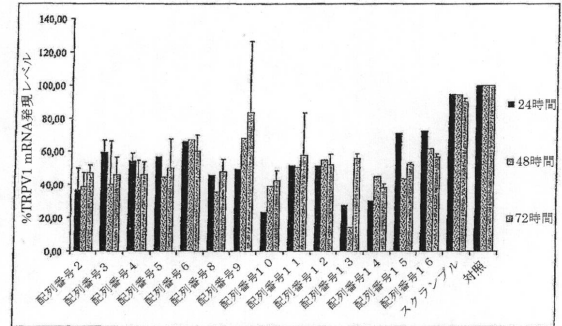
40

- Lewis, B.P., Shih I. Et al. "prediction of mammalian micro RNA targets" *Cell* 115:787-798; 2003
- Liu, J., M. A. Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* 305(5689): 1437-41.
- Ma, J. B., Y. R. Yuan, et al. (2005). "Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein." *Nature* 434(7033): 666-70. 10
- Montell et al. (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." *Genes Dev* 16(8):948-58.
- Nykanen, A., B. Haley, et al. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell* 107(3): 309-21.
- Orban, T. I. and E. Izaurralde (2005). "Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome." *Rna* 11(4): 459-69. 20
- Parrish, S., J. Fleenor, et al. (2000). "Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference." *Mol Cell* 6(5): 1077-87.
- Rand, T. A., S. Petersen, et al. (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." *Cell* 123(4): 621-9.
- Reynolds, A., Leake, D., et al. (2004). "Rational siRNA design for RNA interference " *Nat Biotechnol* 22(3):326-30. 30
- Schubert, S. et al. (2005). "Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions." *J Mol Biol* 348:883-893.
- Song, J. J., S. K. Smith, et al. (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." *Science* 305(5689): 1434-7. 40
- Ui-Tei, K., Naito, Y., et al. (2004). "Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference." *Nucleic Acids Res* 32(3): 936-48.

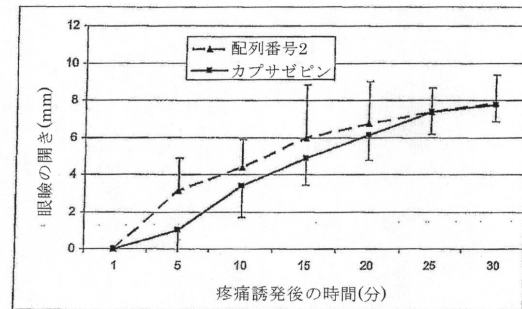
【図 1】



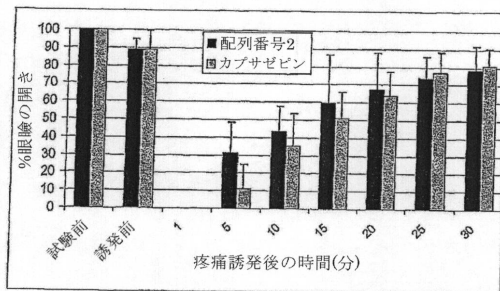
【図 2】



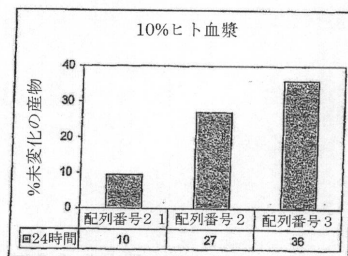
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0006008845000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 マルタ・ロペスーフラガ
スペイン・28770・マドリード・トレス・カントス・サンティアゴ・グリソリア・2
- (72)発明者 アナ・イサベル・ヒメネス
スペイン・28770・マドリード・トレス・カントス・サンティアゴ・グリソリア・2
- (72)発明者 タマラ・マルティネス・バルカレル
スペイン・28770・マドリード・トレス・カントス・サンティアゴ・グリソリア・2

審査官 厚田 一拓

- (56)参考文献 特表2009-512673 (JP, A)
米国特許出願公開第2008/0085998 (US, A1)
米国特許出願公開第2006/0122136 (US, A1)
国際公開第2009/023025 (WO, A1)
Nucleic Acids Res.,2003,31(11),p.2705-16
Adv.Genet.,2004,52,p.1-21
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)