

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成24年4月19日(2012.4.19)

【公表番号】特表2011-518117(P2011-518117A)

【公表日】平成23年6月23日(2011.6.23)

【年通号数】公開・登録公報2011-025

【出願番号】特願2010-549893(P2010-549893)

【国際特許分類】

A 6 1 K	31/713	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 K	47/24	(2006.01)
A 6 1 K	47/28	(2006.01)
A 6 1 K	47/18	(2006.01)
A 6 1 K	9/127	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/113	(2010.01)

【F I】

A 6 1 K	31/713	Z N A
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/28	
A 6 1 K	47/18	
A 6 1 K	9/127	
A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	15/00	G

【手続補正書】

【提出日】平成24年3月1日(2012.3.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞内のヒトキネシンファミリーメンバー11(Eg5/KSP)遺伝子の発現を阻害するための、第1の二本鎖リボ核酸(dsRNA)と、細胞内のヒトVEGFの発現を阻害するための第2のdsRNAとを含む、組成物であって、

前記第1のdsRNAおよび前記第2のdsRNAの両方が、安定な核酸脂質粒子(SNALP)に製剤化され、

前記第1のdsRNAは、第1のセンス鎖と第1のアンチセンス鎖とからなり、前記第1のセンス鎖は、第1の配列を含み、前記第1のアンチセンス鎖は、配列番号1311(5'-UCGAGAAUCUAACUACU-3')の少なくとも15個の連続するヌクレオチドに相補的な第2の配列を含み、前記第1の配列は、前記第2の配列に相補的であり、前記第1のdsRNAは、15~30塩基対長であり、前記第2のdsRNAは、第2のセンス鎖と第2のアンチセンス鎖とからなり、前記第2のセンス鎖は、第3の配列を含み、前記第2のアンチセンス鎖は、配列番号1538(5'-GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU-3')の少なくとも15個の連続するヌクレオチドに相補的な第4の配列を含み、前記第3の配列は、前記第4の配列に相補的であり、それぞれの鎖は、15~30塩基対長である、組成物。

## 【請求項 2】

前記第1のアンチセンス鎖は、配列番号1311(5'-UCGAGAAUCUAAACUAACU-3')に相補的な第2の配列を含み、第2のアンチセンス鎖は、配列番号1538(5'-GCACAUAGGAGA GAUGAGCUU-3')に相補的な第4の配列を含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記第1のdsRNAは、配列番号1534(5'-UCGAGAAUCUAAACUAACUTT-3')からなるセンス鎖と、配列番号1535(5'-AGUUAGUUAGAUUCUCGATT-3')からなるアンチセンス鎖とからなり、前記第2のdsRNAは、配列番号1536(5'-GCACAUAGGAGAGAUGAGC UU-3')からなるセンス鎖と、配列番号1537(5'-AAGCUCAUCUCUCCUAUGUGCUG-3')からなるアンチセンス鎖とからなる、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 4】

それぞれの鎖が、小文字「c」もしくは「u」で示される2'-O-メチルリボヌクレオチドと、小文字「s」で示されるホスホロチオエートとを含むように、

前記第1のdsRNAは、

配列番号1240(5'-ucGAGAAucuAAACuAAcuTsT-3')

からなるセンス鎖と、

配列番号1241(5'-AGUuAGUuAGAUUCUCGATsT)

からなるアンチセンス鎖とからなり、

前記第2のdsRNAは、

配列番号1242(5'-GcAcAuAGGAGAGAuGAGCUsU-3')

からなるセンス鎖と、

配列番号1243(5'-AAGCUcAUCUCUCCuAuGuGCusG-3')

からなるアンチセンス鎖とからなるように修飾される、請求項3に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記第1のdsRNAおよび前記第2のdsRNAは、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む、請求項1、2、および3のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、コレステリル誘導体もしくはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される終端ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ-修飾ヌクレオチド、ロックされたヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ-修飾ヌクレオチド、2'-アルキル-修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホルアミデート、およびヌクレオチドを含む非天然塩基からなる群から選択される、請求項5に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記第1のdsRNAおよび前記第2のdsRNAは、それぞれ少なくとも1個の2'-O-メチル修飾リボヌクレオチドと、5'-ホスホロチオエート基を含む少なくとも1個のヌクレオチドとを含む、請求項1、2、および3のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 8】

それぞれのdsRNAのそれぞれの鎖が、19~23または21~23塩基長である、請求項1、2および5~7のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記第1のdsRNAのそれぞれの鎖が21塩基長であり、前記第2のdsRNAの前記センス鎖が21塩基長であり、前記第2のdsRNAの前記アンチセンス鎖が23塩基長である、請求項1、2および5~7のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記第1のdsRNAおよび前記第2のdsRNAは、等モル比で存在する、請求項1~9のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 11】

前記SNALPは、DLinDMA、コレステロール、DPPC、およびPEG200

0 - C - D M A を含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 2】

以下の表に列記される割合の構成成分を含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の組成物：

【表 1】

構成成分、等級	割合 (mg/mL)
ALN-VSPDS01、cGMP	2.0*
DLinDMA (1,2-ジリノレイルオキシ- N,N-ジメチル-3-アミノプロパン)、 cGMP	7.3
DPPC (R-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3- ホスホコリン)、cGMP	1.1
コレステロール、合成、cGMP	2.8
PEG2000-C-DMA (3-N-[(ω-メトキシポリ(エチレングリコー- ル)2000)カルバモイル]-1,2-ジミリストイル- プロピルアミン)、 cGMP	0.8
リン酸緩衝食塩水、cGMP	適量

\* 薬品中の 2 つの s i R N A の 1 : 1 のモル比を、薬品粒子の粒径分布全体に維持する。

【請求項 1 3】

前記組成物は、n M 濃度で投与される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 4】

ソラフェニブをさらに含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記第 1 の d s R N A は、2 つのオーバーハングを含有し、前記第 2 の d s R N A は前記アンチセンスの 3' にオーバーハングと、前記アンチセンス鎖の 5' 末端に平滑末端とを含有する、請求項 1 ~ 1 4 のうちのいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

細胞内の E g 5 / K S P および V E G F の発現を阻害するためのインビトロでの方法であって、前記細胞に、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 1 7】

非ヒト細胞内の E g 5 / K S P および V E G F の発現を阻害するための方法であって、前記非ヒト細胞に、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の組成物を含む、細胞内の E g 5 / K S P および V E G F の発現を阻害するための医薬組成物。

【請求項 1 9】

癌の治療を必要とする哺乳動物における、腫瘍成長の阻止、腫瘍成長の低下、または生存の延長のための請求項1～15のいずれかに記載の組成物を含む医薬組成物。

【請求項20】

前記哺乳動物は、肝臓癌を有する、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項21】

ソラフェニブがさらに投与される、請求項16または17に記載の方法。

【請求項22】

ソラフェニブをさらに含む、請求項18～20のいずれかに記載の医薬組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

【図1】Hep3BマウスモデルにおけるSNALP-siRNAの投与後の、体重の割合としての肝重量を示すグラフである。

【図2】図2A～2Dは、Hep3Bマウスモデルにおける、体重に対するSNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図3】Hep3Bマウスモデルにおける、体重に対するSNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図4】未処置対照動物の体重を示すグラフである。

【図5】Hep3Bマウスモデルにおける、体重に対する対照ルシフェラーゼSNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図6】Hep3Bマウスモデルにおける、体重に対するVSP-SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図7A】Hep3Bマウスモデルにおける、マウスGAPDHレベルに基準化したヒトGAPDHレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図7B】Hep3Bマウスモデルにおける、血清ELISAによって測定される血清AFPレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図8】Hep3Bマウスモデルにおける、マウスGAPDHレベルに基準化したヒトGAPDHレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図9】Hep3Bマウスモデルにおける、ヒトGAPDHレベルに基準化したヒトKSPレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図10】Hep3Bマウスモデルにおける、ヒトGAPDHレベルに基準化したヒトVEGFレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図11A】Hep3Bマウスモデルにおける、ヒトGAPDHレベルに基準化したマウスVEGFレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図11B】Hep3Bマウスモデルにおける、ヒトGAPDHレベルおよび血清AFPレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示す一連のグラフである。

【図12】図12A～12Cは、Hep3Bマウスモデルにおける、腫瘍KSP、VEGF、およびGAPDHレベルに対する、SNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図13】図13Aおよび図13Bは、肝臓腫瘍を有するモデルにおける、生存に対するSNALP-siRNAの効果を示すグラフである。腫瘍細胞の播種後18日(図13A)および26日(図13B)に処置が開始された。

【図14】血清アルファフェトプロテイン(AFP)レベルに対するSNALP-siRNAの効果を示すグラフである。

【図15】図15Aおよび15Bは、2mg/kgのSNALP-VSP(A)または2mg/kgのSNALP-Luc(B)を投与した担腫瘍動物(Hep3B細胞の埋め込み後3週間)の、HE染色した切片の画像である。24時間後、担腫瘍肝葉を組織学的分

析のために処理した。矢印は単星を示す。

【図16】ALN-VSPDS01の製造過程を図示する流れ図である。

【図17】ALN-VSP02のクライオ透過型電子顕微鏡（クライオ-TEM）画像である。

【図18】ALN-VSP02の製造過程を図示する流れ図である。

【図19】KSPに標的化されたsiRNAを用いるMYC-癌遺伝子により起こされるデノボ肝臓癌のトランスジェニックマウスマルクスモデルの処置プロトコールを示す。

【図20】SNALPに製剤化されたsiRNAおよびソラフェニブの投与の、生存に対する効果を図示するグラフである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0339

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0339】

生存率のデータを図20に示す。ソラフェニブまたはVSP siRNA-SNALPのみの投与と比較して、VSP siRNA-SNALPとソラフェニブとの同時投与によって、生存割合が増加した。ソラフェニブと比較して、VSP siRNA-SNALPによって生存割合が増加した。