

【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 (E g 5 / K S P) 遺伝子の発現を阻害するための、第 1 の二本鎖リボ核酸 (d s R N A) と、細胞内のヒト V E G F の発現を阻害するための第 2 の d s R N A とを含む、組成物であって、
前記第 1 の d s R N A および前記第 2 の d s R N A の両方が、安定な核酸脂質粒子 (S N A L P) に製剤化され、
前記第 1 の d s R N A 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 1 3 1 1 (5'-UCGAGAAUCUAAACUAACU-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 d s R N A は、15 ~ 30 塩基対長であり、前記第 2 の d s R N A 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 1 5 3 8 (5'-GCACAUAGGAGAGAGAGCUU-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 1 3 1 1 (5'-UCGAGAAUCUAAACUAAACU-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 1 5 3 8 (5'-GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU-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 d s R N A は、配列番号 1 5 3 4 (5'-UCGAGAAUCUAAACUAAACUTT-3') からなるセンス鎖と、配列番号 1 5 3 5 (5'-AGUUAGUUUAGAUUCUCGATT-3') からなるアンチセンス鎖とからなり、前記第 2 の d s R N A は、配列番号 1 5 3 6 (5'-GCACAUAGGAGAGAUAGAGCUU-3') からなるセンス鎖と、配列番号 1 5 3 7 (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 d s R N A は、

配列番号 1 2 4 0 (5'-ucGAGAAucuuAAAcuAAcuTsT-3')

からなるセンス鎖と、

配列番号 1 2 4 1 (5'-AGUuAGUUuAGAUUCUCGATsT)

からなるアンチセンス鎖とからなり、

前記第 2 の d s R N A は、

配列番号 1 2 4 2 (5'-GcAcAuAGGAGAGAuGAGCUsU-3')

からなるセンス鎖と、

配列番号 1 2 4 3 (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 d s R N A および前記第 2 の d s R N A 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末端ヌクレオチド、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 d s R N A および前記第 2 の d s R N A 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 d s R N A 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 d s R N A のそれぞれの鎖が 21 塩基長であり、前記第 2 の d s R N A の前記センス鎖が 21 塩基長であり、前記第 2 の d s R N A 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 d s R N A および前記第 2 の d s R N A 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 S N A L P は、D L i n D M A、コレステロール、D P P C、および P E G 2 0 0

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、薬品粒子の粒経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、2 mg / kg の SNALP - VSP（A）または 2 mg / 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モデルの処置プロトコルを示す。

【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。