

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-514647

(P2008-514647A)

(43) 公表日 平成20年5月8日(2008.5.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C O 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 6
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 O 1	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-533789 (P2007-533789)	(71) 出願人	506049851
(86) (22) 出願日	平成17年9月27日 (2005. 9. 27)		ナステック ファーマスーティカル カン
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月14日 (2007. 5. 14)		パニー インク.
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/035259		アメリカ合衆国 ワシントン州 9802
(87) 国際公開番号	W02006/037126		1-7266, ボセル, モンテピラパーク
(87) 国際公開日	平成18年4月6日 (2006. 4. 6)		ウェイ 3830
(31) 優先権主張番号	60/613, 416	(74) 代理人	100096024
(32) 優先日	平成16年9月27日 (2004. 9. 27)		弁理士 柏原 三枝子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	キューイ, クンユアン
(31) 優先権主張番号	60/656, 572		アメリカ合衆国 ワシントン州 9801
(32) 優先日	平成17年2月25日 (2005. 2. 25)		2, ボセル, 189番ストリートエスイー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		- 3224
(31) 優先権主張番号	60/667, 833		
(32) 優先日	平成17年4月1日 (2005. 4. 1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 二本鎖リボ核酸によって炎症性疾患を治療する方法

(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】

開示の内容は、哺乳動物の炎症性疾患を治療し、哺乳動物における腫瘍壊死因子 - (T N F -) の産生を阻害する薬剤の製造において、二本鎖リボ核酸 (d s R N A) を含む製剤を使用することである。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の腫瘍壊死因子 - (T N F -) の産生を阻害することによって、哺乳動物における炎症性疾患を治療する薬剤の製造において、二本鎖リボ核酸 (d s R N A) を具えることを特徴とする薬剤の使用。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の薬剤の使用において、前記炎症性疾患が、全身性疾患であることを特徴とする薬剤の使用。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の薬剤の使用において、前記炎症性疾患が、関節リウマチであることを特徴とする薬剤の使用。 10

【請求項 4】

請求項 1 に記載の薬剤の使用において、前記薬剤が、哺乳動物の血液循環に投与されることを特徴とする薬剤の使用。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の薬剤の使用において、前記薬剤が、静脈内投与されることを特徴とする薬剤の使用。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の薬剤の使用において、s i R N A が、血液の白血球に送達されることを特徴とする薬剤の使用。 20

【請求項 7】

請求項 6 に記載の薬剤の使用において、前記白血球が、単核白血球であることを特徴とする薬剤の使用。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の薬剤の使用において、前記薬剤の投与が、前記哺乳動物の前記血液循環における T N F - のレベルを低下させることを特徴とする薬剤の使用。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の薬剤の使用において、前記哺乳動物が、ヒトであることを特徴とする薬剤の使用。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の薬剤の使用において、前記薬剤が、送達促進ペプチドを更に含むことを特徴とする薬剤の使用。 30

【請求項 11】

請求項 10 に記載の薬剤の使用において、前記ペプチドが、
 K G S K K A V T K A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q
 Q I D N O : 5 9) ;
 K K A V T K A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I
 D N O : 1 6 5) ;
 V T K A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N
 O : 1 6 6) ;
 A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1
 6 7) ;
 K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 6 8)
 ;
 K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 6 9) ;
 K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 0) ;
 R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 1) ;
 S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 2) ;
 V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 3) ; 及び
 Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 4) ; 40

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする製剤の使用。

【請求項 1 2】

請求項 1 に記載の製剤の使用において、前記 dsRNA が、

G C G U G G A G C U G A G A G A U A A (S E Q I D N O : 1 0 9) ;
 G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 1 0) ;
 G G U A U G A G C C C A U C U A U C U (S E Q I D N O : 1 1 1) ;
 C C A G G G A C C U C U C U C U A A U (S E Q I D N O : 1 1 2) ;
 G C C C G A C U A U C U C G A C U U U (S E Q I D N O : 1 1 3) ;
 U G A C A A G C C U G U A G C C C A U (S E Q I D N O : 1 1 4) ;
 G G U C U A C U U U G G G A U C A U U (S E Q I D N O : 1 1 5) ;
 C C C A G G G A C C U C U C U C U A A (S E Q I D N O : 1 1 6) ;
 A A U C G G C C C G A C U A U C U C G A C U U (S E Q I D N O : 1 1 7) ;

10

A A U G G C G U G G A G C U G A G A G A U (S E Q I D N O : 1 1 8) ;
 A A C C U C C U C U C U G C C A U C A A G (S E Q I D N O : 1 1 9) ;
 A A C U G A A A G C A U G A U C C G G G A (S E Q I D N O : 1 2 0) ;
 A A U C U C G A C U U U G C C G A G U C U (S E Q I D N O : 1 2 1) ;
 A A G G G U G A C C G A C U C A G C G C U (S E Q I D N O : 1 2 2) ;
 A A U C A G C C G C A U C G C C G U C U C (S E Q I D N O : 1 2 3) ;
 A A C C C A U G U G C U C C U C A C C C A (S E Q I D N O : 1 2 4) ;
 A A G C U C C A G U G G C U G A A C C G C (S E Q I D N O : 1 2 5) ;
 A A G U C A G A U C A U C U U C U C G A A (S E Q I D N O : 1 2 6) ;
 A A G G G A C C U C U C U C U A A U C A G (S E Q I D N O : 1 2 7) ;
 C C U C A G C C U C U U C U C C U U C C U G A (S E Q I D N O : 1 2 8) ;

20

A A U C C U C A G C C U C U U C U C C U U (S E Q I D N O : 1 2 9) ;
 A A C C A A U G C C C U C C U G G C C A A (S E Q I D N O : 1 3 0) ;
 C U G A U U A A G U U G U C U A A A C A A (S E Q I D N O : 1 3 1) ;
 C C G A C U C A G C G C U G A G A U C A A (S E Q I D N O : 1 3 2) ;
 C U U G U G A U U A U U U A U U A U U U A (S E Q I D N O : 1 3 3) ;
 A A G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 3 4) ;
 U A G G G U C G G A A C C C A A G C U U A (S E Q I D N O : 1 3 5) ;

30

C U G A A A G C A U G A U C C G G G A (S E Q I D N O : 1 3 6) ;
 A G G C G G U G C U U G U U C C U C A (S E Q I D N O : 1 3 7) ;
 C C A C C A C G C U C U U C U G C C U (S E Q I D N O : 1 3 8) ;
 A G G G A C C U C U C U C U A A U C A (S E Q I D N O : 1 3 9) ;
 U G A C A A G C C U G U A G C C C A U (S E Q I D N O : 1 4 0) ;
 G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 4 1) ;
 U A G C C C A U G U U G U A G C A A A (S E Q I D N O : 1 4 2) ;
 C C A A U G C C C U C C U G G C C A A (S E Q I D N O : 1 4 3) ;

40

C C A A U G G C G U G G A G C U G A G (S E Q I D N O : 1 4 4) ;
 G G C G U G G A G C U G A G A G A U A A (S E Q I D N O : 1 4 5) ;
 G C G U G G A G C U G A G A G A U A A (S E Q I D N O : 1 4 6) ;
 G C C U G U A C C U C A U C U A C U C (S E Q I D N O : 1 4 7) ;
 C C U C C U C U C U G C C A U C A A G (S E Q I D N O : 1 4 8) ;
 G G U A U G A G C C C A U C U A U C U (S E Q I D N O : 1 4 9) ;
 G C U G G A G A A G G G U G A C C G A (S E Q I D N O : 1 5 0) ;
 G A G A A G G G U G A C C G A C U C A (S E Q I D N O : 1 5 1) ;
 G C C C G A C U A U C U C G A C U U U (S E Q I D N O : 1 5 2) ;
 G C A G G U C U A C U U U G G G A U C (S E Q I D N O : 1 5 3) ;

50

G G U C U A C U U U G G G A U C A U U (S E Q I D N O : 1 5 4) ;

U G G G A U C A U U G C C C U G U G A (S E Q I D N O : 1 5 5) ;
 G G U C G G A A C C C A A G C U U A G (S E Q I D N O : 1 5 6) ;
 C C A G A A U G C U G C A G G A C U U (S E Q I D N O : 1 5 7) ;
 G A G A A G A C C U C A C C U A G A A A (S E Q I D N O : 1 5 8) ;
 G A A G A C C U C A C C U A G A A A U (S E Q I D N O : 1 5 9) ;
 C C A G A U G U U U C C A G A C U U C (S E Q I D N O : 1 6 0) ;
 C U A U U U A U G U U U G C A C U U G (S E Q I D N O : 1 6 1) ;
 U C U A A A C A A U G C U G A U U U G (S E Q I D N O : 1 6 2) ; 及び
 G A C C A A C U G U C A C U C A U U (S E Q I D N O : 1 6 3) ;

からなる群より選択されるリボ核酸配列を含むことを特徴とする製剤の使用。

10

【請求項 13】

請求項 7 に記載の製剤の使用において、前記 dsRNA が、

A A U C G G C C C G A C U A U C U C G A C U U (S E Q I D N O : 1 1 7) ;

A A U G G C G U G G A G C U G A G A G A U (S E Q I D N O : 1 1 8) ;
 A A C C U C C U C U C U G C C A U C A A G (S E Q I D N O : 1 1 9) ;
 A A C U G A A A G C A U G A U C C G G G A (S E Q I D N O : 1 2 0) ;
 A A U C U C G A C U U U G C C G A G U C U (S E Q I D N O : 1 2 1) ;
 A A G G G U G A C C G A C U C A G C G C U (S E Q I D N O : 1 2 2) ;
 A A U C A G C C G C A U C G C C G U C U C (S E Q I D N O : 1 2 3) ;
 A A C C C A U G U G C U C C U C A C C C A (S E Q I D N O : 1 2 4) ;
 A A G C U C C A G U G G C U G A A C C G C (S E Q I D N O : 1 2 5) ;
 A A G U C A G A U C A U C U U C U C G A A (S E Q I D N O : 1 2 6) ;
 A A G G G A C C U C U C U C U A A U C A G (S E Q I D N O : 1 2 7) ;
 C C U C A G C C U C U U C U C C U U C C U G A (S E Q I D N O : 1 2 8) ;
 A A U C C U C A G C C U C U U C U C C U U (S E Q I D N O : 1 2 9) ;
 A A C C A A U G C C C U C C U G G C C A A (S E Q I D N O : 1 3 0) ;
 C U G A U U A A G U U G U C U A A A C A A (S E Q I D N O : 1 3 1) ;
 C C G A C U C A G C G C U G A G A U C A A (S E Q I D N O : 1 3 2) ;
 C U U G U G A U U A U U U A U U A U U U A (S E Q I D N O : 1 3 3) ;
 A A G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 3 4) ; 及び
 U A G G G U C G G A A C C C A A G C U U A (S E Q I D N O : 1 3 5) ;

20

30

からなる群より選択されるリボ核酸配列を含むことを特徴とする製剤の使用。

【請求項 14】

二本鎖リボ核酸 (dsRNA) を具え、前記 dsRNA が、前記哺乳動物の細胞における腫瘍壊死因子 - (TNF -) の発現を阻害することができることを特徴とする医薬製剤。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の製剤において、前記製剤が、送達促進ペプチドを更に具えることを特徴とする製剤。

40

【請求項 16】

請求項 15 に記載の製剤において、前記ペプチドが、

K G S K K A V T K A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E
 Q I D N O : 5 9) ;
 K K A V T K A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I
 D N O : 1 6 5) ;
 V T K A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N
 O : 1 6 6) ;
 A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1
 6 7) ;

50

K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 6 8)

;

K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 6 9) ;

K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 0) ;

R K E S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 1) ;

S Y S V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 2) ;

V Y V Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 3) 及び

Y K V L K Q (S E Q I D N O : 1 7 4)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を具えることを特徴とする製剤。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の製剤において、前記 d s R N A が、

G C G U G G A G C U G A G A G A U A A (S E Q I D N O : 1 0 9) ;

G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 1 0) ;

G G U A U G A G C C C A U C U A U C U (S E Q I D N O : 1 1 1) ;

C C A G G G A C C U C U C U C U A A U (S E Q I D N O : 1 1 2) ;

G C C C G A C U A U C U C G A C U U U (S E Q I D N O : 1 1 3) ;

U G A C A A G C C U G U A G C C C A U (S E Q I D N O : 1 1 4) ;

G G U C U A C U U U G G G A U C A U U (S E Q I D N O : 1 1 5) ;

C C C A G G G A C C U C U C U C U A A (S E Q I D N O : 1 1 6) ;

A A U C G G C C C G A C U A U C U C G A C U U (S E Q I D N O : 1 1 7) ;

A A U G G C G U G G A G C U G A G A G A U (S E Q I D N O : 1 1 8) ;

A A C C U C C U C U C U G C C A U C A A G (S E Q I D N O : 1 1 9) ;

A A C U G A A A G C A U G A U C C G G G A (S E Q I D N O : 1 2 0) ;

A A U C U C G A C U U U G C C G A G U C U (S E Q I D N O : 1 2 1) ;

A A G G G U G A C C G A C U C A G C G C U (S E Q I D N O : 1 2 2) ;

A A U C A G C C G C A U C G C C G U C U C (S E Q I D N O : 1 2 3) ;

A A C C C A U G U G C U C C U C A C C C A (S E Q I D N O : 1 2 4) ;

A A G C U C C A G U G G C U G A A C C G C (S E Q I D N O : 1 2 5) ;

A A G U C A G A U C A U C U U C U C G A A (S E Q I D N O : 1 2 6) ;

A A G G G A C C U C U C U C U A A U C A G (S E Q I D N O : 1 2 7) ;

C C U C A G C C U C U U C U C C U U C C U G A (S E Q I D N O : 1 2 8) ;

A A U C C U C A G C C U C U U C U C C U U (S E Q I D N O : 1 2 9) ;

A A C C A A U G C C C U C C U G G C C A A (S E Q I D N O : 1 3 0) ;

C U G A U U A A G U U G U C U A A A C A A (S E Q I D N O : 1 3 1) ;

C C G A C U C A G C G C U G A G A U C A A (S E Q I D N O : 1 3 2) ;

C U U G U G A U U A U U U A U U A U U U A (S E Q I D N O : 1 3 3) ;

A A G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 3 4) ;

U A G G G U C G G A A C C C A A G C U U A (S E Q I D N O : 1 3 5) ;

C U G A A A G C A U G A U C C G G G A (S E Q I D N O : 1 3 6) ;

A G G C G G U G C U U G U U C C U C A (S E Q I D N O : 1 3 7) ;

C C A C C A C G C U C U U C U G C C U (S E Q I D N O : 1 3 8) ;

A G G G A C C U C U C U C U A A U C A (S E Q I D N O : 1 3 9) ;

U G A C A A G C C U G U A G C C C A U (S E Q I D N O : 1 4 0) ;

G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 4 1) ;

U A G C C C A U G U U G U A G C A A A (S E Q I D N O : 1 4 2) ;

C C A A U G C C C U C C U G G C C A A (S E Q I D N O : 1 4 3) ;

C C A A U G G C G U G G A G C U G A G (S E Q I D N O : 1 4 4) ;

G G C G U G G A G C U G A G A G A U A (S E Q I D N O : 1 4 5) ;

G C G U G G A G C U G A G A G A U A A (S E Q I D N O : 1 4 6) ;

G C C U G U A C C U C A U C U A C U C (S E Q I D N O : 1 4 7) ;

10

20

30

40

50

CCUCCUCUCUGCCAUCAAG (SEQ ID NO: 148);
 GGUAUGAGCCCAUCUAUCU (SEQ ID NO: 149);
 G C U G G A G A A G G G U G A C C G A (SEQ ID NO: 150);
 G A G A A G G G U G A C C G A C U C A (SEQ ID NO: 151);
 G C C C G A C U A U C U C G A C U U U (SEQ ID NO: 152);
 G C A G G U C U A C U U U G G G A U C (SEQ ID NO: 153);
 G G U C U A C U U U G G G A U C A U U (SEQ ID NO: 154);
 U G G G A U C A U U G C C C U G U G A (SEQ ID NO: 155);
 G G U C G G A A C C C A A G C U U A G (SEQ ID NO: 156);
 C C A G A A U G C U G C A G G A C U U (SEQ ID NO: 157);
 G A G A A G A C C U C A C C U A G A A (SEQ ID NO: 158);
 G A A G A C C U C A C C U A G A A A U (SEQ ID NO: 159);
 C C A G A U G U U U C C A G A C U U C (SEQ ID NO: 160);
 C U A U U U A U G U U U G C A C U U G (SEQ ID NO: 161);
 U C U A A A C A A U G C U G A U U U G (SEQ ID NO: 162); 及び
 G A C C A A C U G U C A C U C A U U (SEQ ID NO: 163);

10

からなる群より選択されるリボ核酸配列を具えることを特徴とする製剤。

【請求項18】

請求項17に記載の製剤において、前記 dsRNA が、

A A U C G G C C C G A C U A U C U C G A C U U (SEQ ID NO: 117);
 A A U G G C G U G G A G C U G A G A G A U (SEQ ID NO: 118);
 A A C C U C C U C U C U G C C A U C A A G (SEQ ID NO: 119);
 A A C U G A A A G C A U G A U C C G G G A (SEQ ID NO: 120);
 A A U C U C G A C U U U G C C G A G U C U (SEQ ID NO: 121);
 A A G G G U G A C C G A C U C A G C G C U (SEQ ID NO: 122);
 A A U C A G C C G C A U C G C C G U C U C (SEQ ID NO: 123);
 A A C C C A U G U G C U C C U C A C C C A (SEQ ID NO: 124);
 A A G C U C C A G U G G C U G A A C C G C (SEQ ID NO: 125);
 A A G U C A G A U C A U C U U C U C G A A (SEQ ID NO: 126);
 A A G G G A C C U C U C U C U A A U C A G (SEQ ID NO: 127);
 C C U C A G C C U C U U C U C C U U C C U G A (SEQ ID NO: 128);

20

30

A A U C C U C A G C C U C U U C U C C U U (SEQ ID NO: 129);
 A A C C A A U G C C C U C C U G G C C A A (SEQ ID NO: 130);
 C U G A U U A A G U U G U C U A A A C A A (SEQ ID NO: 131);
 C C G A C U C A G C G C U G A G A U C A A (SEQ ID NO: 132);
 C U U G U G A U U A U U U A U U A U U U A (SEQ ID NO: 133);
 A A G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (SEQ ID NO: 134); 及び
 U A G G G U C G G A A C C C A A G C U U A (SEQ ID NO: 135);

からなる群より選択されるリボ核酸配列を具えることを特徴とする製剤。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸を細胞に送達する方法及び組成物に関する。より具体的には、本発明は、標的遺伝子の発現を変更して、細胞の疾患状態又は疾患可能性等の表現型を改変するために、二本鎖ポリヌクレオチドを細胞に送達する手順及び調製物に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍壊死因子 (TNF -) の主な役割は、様々な疾患につながる炎症過程の開始及び / 又は持続の際に特定され、又は、その開始及び / 又は持続に関わっている。これらの疾

50

患には、関節リウマチ (R A)、クローン病 (C D)、乾癬、強直性脊椎炎、ステイル病、多発性筋炎、皮膚筋炎 (d e m a t o m y o s i t i s)、及び、(ベーチェット病及びヴェグナー肉芽腫症を含む) 血管炎が挙げられる (L o r e n z a n d K a l d e n (2 0 0 2) A r t h r i t i s R e s e a r c h 4 (s u p p l 3) : S 1 7 - 2 4)。脂肪組織による T N F - の産生は、糖尿病及び肥満にも関わっている (R u a n a n d L o d i s h (2 0 0 3) C y t o k i n e G r o w t h F a c t o r R e v . 1 4 : 4 4 7 - 5 5)。

【 0 0 0 3 】

(メトトレキサートを含む) 確立された療法の限界によって、代替療法の治療標的として一部の炎症性メディエーターが特定されることとなった。この関連から、モノクローナル抗体、サイトカイン受容体 - ヒト I g 構築物 (c y t o k i n e r e c e p t o r - h u m a n I g c o n s t r u c t s) 及び組み換えヒトタンパク質を含む、新規の治療剤が開発され、現在テスト中である。この分野の疾患を治療するための有効な治療方法に対する需要にはまだ応じられていないままである。

10

【 0 0 0 4 】

エンドトキシン、腫瘍細胞、(H I V を含む) 数種のウイルス、他のサイトカイン、様々なストレス関連の反応を含む、T N F - の産生を誘導する様々な刺激が知られている。クローン病患者治療用のレミケード (R e m i c a d e) (登録商標) のラベリングに支援を提供するとして、米国食品医薬品局 (F D A) が承認した非臨床試験のための動物モデルが開発されている。マウスモデル (T g 1 9 7、T g 2 1 1、及び T g 5 4 5 3 マウス) は、ヒト T N F - を構造的に発現するトランスジェニックマウスの開発に由来する (G e o r g o p o u l o s 等 (1 9 9 6) J . I n f l a m m a t i o n 4 6 : 8 6 - 9 7)。幾つかの他の抗 T N F - 抗体療法が、成功裡にこの動物モデルに適用され、効力を評価し、有効性を証明した。(H U M I R A ^{T M}, I n f l i x i m a b, A d a l i m u n a b, E t a n e r c e p t, A b g e n i x A B X 1 0 1 3 1)。

20

【 0 0 0 5 】

動物細胞及び植物細胞に核酸を送達することは、長い間、分子生物学の研究開発の重要な目的であった。遺伝子療法、アンチセンス療法及び R N A 干渉 (R N A i) 療法の分野における最近の開発によって、核酸を細胞に導入するより効率的な手段を開発する需要が生まれた。

30

【 0 0 0 6 】

多様な配列のプラスミドや他の核酸「ベクター」が、大きいポリヌクレオチド分子を細胞に送達するために開発されてきた。通常、これらのベクターは、標的細胞を変化させて科学的利益、又は治療的利益のある遺伝子を発現させる目的で、インタクトな遺伝子を含む大きい D N A 分子を組み込む。

【 0 0 0 7 】

外因性核酸が人工的に細胞に送達される過程は、一般的に、トランスフェクションと呼ばれる。様々な技術と物質を用いて、外因性の機能的核酸を取り込むよう細胞をトランスフェクトすることができる。最も多用されるトランスフェクション方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションと、エレクトロポレーションとである。外因性 D N A 又は R N A 分子を送達するために、ウイルス媒介の形質導入、カチオン脂質又はリポソーム送達、及び、(例えば、界面活性剤、マイクロインジェクション、又はパーティクルガンを用いて) 機械的又は生物化学的な膜破壊 / 貫通を標的とする多数の方法を含む、細胞に形質導入する様々な他の方法が開発されてきた。

40

【 0 0 0 8 】

R N A 干渉は、標的メッセンジャー R N A (m R N A) の一部の配列において同族である二本鎖ポリヌクレオチド、通常は d s R N A によって開始される、細胞における配列特異的な転写後レベルでの遺伝子サイレンシングの過程である。適切な d s R N A を細胞に導入すると、内因性、同族の m R N A (すなわち、導入された d s R N A と実質的な配列 I D を共有する m R N A) を破壊する。d s R N A 分子は、ダイサーと呼ばれる R N a s

50

e III 族ヌクレアーゼ (RNase III family nuclease) によって、長さ19から23ヌクレオチド (nt) の短干渉RNA (siRNAs) に切断される。その後、siRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体又は「RISC」として知られる多成分ヌクレアーゼ複合体に組み込まれる。RISCは、siRNAへの同族性を通してmRNA基質を特定し、標的mRNAに結合して破壊することによって、遺伝子発現のサイレンシングを達成する。

【0009】

RNA干渉は、植物細胞及び動物細胞において特異的に遺伝子発現を変更する有望な技術として浮上しており、内因性遺伝子発現の変更による治療に反応しやすい広範な疾患及び不調を治療する有益な手段を提供すると期待されている。

10

【0010】

当技術分野においては、特に、核酸を細胞に送達する既存の技術が、非効率及び/又は送達試薬の毒性の高さによる限界があるという事実を受けて、siRNA及び他の小さい阻害核酸 (siNA) を細胞に送達するためのより良い手段及び方法に対する長年にわたる需要がある。標的細胞の表現型又は疾患状態を改変するように遺伝子発現の調節を媒介するために、有効量、活性・持続的な状態で、且つ、毒性のない送達ビヒクルを用いて、siNAを選択した細胞、組織又はコンパートメントに送達する方法及び製剤の向上に対する関連需要がある。

【0011】

本発明の概要

20

本発明の一態様は、哺乳動物の炎症性疾患を治療し、哺乳動物の腫瘍壊死因子 - (TNF -) の産生を阻害する薬剤の製造に二本鎖リボ核酸 (dsRNA) を含む製剤を使用することである。好ましくは、炎症性疾患は、全身性疾患である。より好ましくは、炎症性疾患は、関節リウマチである。本発明の実施形態においては、製剤は、哺乳動物の血液循環に、好ましくは静脈投与によって投与される。別の実施形態においては、siRNAは、白血球、好ましくは単核白血球に送達される。別の実施形態においては、製剤の投与により、哺乳動物の血液循環におけるTNF - が低下する。好ましい実施形態においては、哺乳動物はヒトである。

【0012】

本発明の別の態様は、二本鎖リボ核酸 (dsRNA) を含む、哺乳動物の炎症性疾患を治療する医薬製剤である。この態様では、dsRNAは、哺乳動物の細胞における腫瘍壊死因子 - (TNF -) の発現を変更することができる。好ましい実施形態においては、ペプチドは：

30

KGSKKAVTKAQQKKGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 59) ;

KKAVTKAQQKKGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 165) ;

VTKAQQKKGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 166) ;

AQKKGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 167) ;

40

KDGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 168) ;

KRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 169) ;

KRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 170) ;

RKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 171) ;

SYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 172) ;

VYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 173) ;及び

YKVLKQ (SEQ ID NO: 174) ;

からなる群より選択されたアミノ酸配列を含む。関連する好ましい実施形態においては、dsRNAは：

50

G C G U G G A G C U G A G A G A U A A (S E Q I D N O : 1 0 9) ;
G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 1 0) ;
G G U A U G A G C C C A U C U A U C U (S E Q I D N O : 1 1 1) ;
C C A G G G A C C U C U C U C U A A U (S E Q I D N O : 1 1 2) ;
G C C C G A C U A U C U C G A C U U U (S E Q I D N O : 1 1 3) ;
U G A C A A G C C U G U A G C C C A U (S E Q I D N O : 1 1 4) ;
G G U C U A C U U U G G G A U C A U U (S E Q I D N O : 1 1 5) ;
C C C A G G G A C C U C U C U C U A A (S E Q I D N O : 1 1 6) ;
A A U C G G C C C G A C U A U C U C G A C U U (S E Q I D N O : 1 1 7) ;
A A U G G C G U G G A G C U G A G A G A U (S E Q I D N O : 1 1 8) ; 10
A A C C U C C U C U C U G C C A U C A A G (S E Q I D N O : 1 1 9) ;
A A C U G A A A G C A U G A U C C G G G A (S E Q I D N O : 1 2 0) ;
A A U C U C G A C U U U G C C G A G U C U (S E Q I D N O : 1 2 1) ;
A A G G G U G A C C G A C U C A G C G C U (S E Q I D N O : 1 2 2) ;
A A U C A G C C G C A U C G C C G U C U C (S E Q I D N O : 1 2 3) ;
A A C C C A U G U G C U C C U C A C C C A (S E Q I D N O : 1 2 4) ;
A A G C U C C A G U G G C U G A A C C G C (S E Q I D N O : 1 2 5) ;
A A G U C A G A U C A U C U U C U C G A A (S E Q I D N O : 1 2 6) ;
A A G G G A C C U C U C U C U A A U C A G (S E Q I D N O : 1 2 7) ;
C C U C A G C C U C U U C U C C U U C C U G A (S E Q I D N O : 1 2 8) ; 20
A A U C C U C A G C C U C U U C U C C U U (S E Q I D N O : 1 2 9) ;
A A C C A A U G C C C U C C U G G C C A A (S E Q I D N O : 1 3 0) ;
C U G A U U A A G U U G U C U A A A C A A (S E Q I D N O : 1 3 1) ;
C C G A C U C A G C G C U G A G A U C A A (S E Q I D N O : 1 3 2) ;
C U U G U G A U U A U U U A U U A U U U A (S E Q I D N O : 1 3 3) ;
A A G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 3 4) ;
U A G G G U C G G A A C C C A A G C U U A (S E Q I D N O : 1 3 5) ;
C U G A A A G C A U G A U C C G G G A (S E Q I D N O : 1 3 6) ;
A G G C G G U G C U U G U U C C U C A (S E Q I D N O : 1 3 7) ;
C C A C C A C G C U C U U C U G C C U (S E Q I D N O : 1 3 8) ; 30
A G G G A C C U C U C U C U A A U C A (S E Q I D N O : 1 3 9) ;
U G A C A A G C C U G U A G C C C A U (S E Q I D N O : 1 4 0) ;
G C C U G U A G C C C A U G U U G U A (S E Q I D N O : 1 4 1) ;
U A G C C C A U G U U G U A G C A A A (S E Q I D N O : 1 4 2) ;
C C A A U G C C C U C C U G G C C A A (S E Q I D N O : 1 4 3) ;
C C A A U G G C G U G G A G C U G A G (S E Q I D N O : 1 4 4) ;
G G C G U G G A G C U G A G A G A U A A (S E Q I D N O : 1 4 5) ;
G C G U G G A G C U G A G A G A U A A (S E Q I D N O : 1 4 6) ;
G C C U G U A C C U C A U C U A C U C (S E Q I D N O : 1 4 7) ;
C C U C C U C U C U G C C A U C A A G (S E Q I D N O : 1 4 8) ; 40
G G U A U G A G C C C A U C U A U C U (S E Q I D N O : 1 4 9) ;
G C U G G A G A A G G G U G A C C G A (S E Q I D N O : 1 5 0) ;
G A G A A G G G U G A C C G A C U C A (S E Q I D N O : 1 5 1) ;
G C C C G A C U A U C U C G A C U U U (S E Q I D N O : 1 5 2) ;
G C A G G U C U A C U U U G G G A U C (S E Q I D N O : 1 5 3) ;
G G U C U A C U U U G G G A U C A U U (S E Q I D N O : 1 5 4) ;
U G G G A U C A U U G C C C U G U G A (S E Q I D N O : 1 5 5) ;
G G U C G G A A C C C A A G C U U A G (S E Q I D N O : 1 5 6) ;
C C A G A A U G C U G C A G G A C U U (S E Q I D N O : 1 5 7) ;
G A G A A G A C C U C A C C U A G A A (S E Q I D N O : 1 5 8) ; 50

GAAGACCUCACCUAGAAAU (SEQ ID NO: 159);
 CCAGAUGUUUCAGACUUC (SEQ ID NO: 160);
 CUAUUUAUGUUUGCACUUG (SEQ ID NO: 161);
 UCUAAACA AUGCUGAUUUG (SEQ ID NO: 162); 及び
 GACCAACUGUCACUCAUU (SEQ ID NO: 163);
 からなる群より選択されるリボ核酸配列を含む。最も好ましくは、dsRNAは:
 AAUCGGCCCGACUAUCUCGACUU (SEQ ID NO: 117);
 AAUGGCGUGGAGCUGAGAGAU (SEQ ID NO: 118);
 AACCUCCUCUCUGCCAUCAAG (SEQ ID NO: 119);
 AACUGAAAGCAUGAUC CGGA (SEQ ID NO: 120); 10
 AAUCUCGACUUUGCCGAGUCU (SEQ ID NO: 121);
 AAGGGUGACCGACUCAGCGCU (SEQ ID NO: 122);
 AAUCAGCCGCAUCGCCGUCUC (SEQ ID NO: 123);
 AACCCAUGUGCUC CUCACCCA (SEQ ID NO: 124);
 AAGCUC CAGUGGCUGAACCGC (SEQ ID NO: 125);
 AAGUCAGAUCAUCUUCUCGAA (SEQ ID NO: 126);
 AAGGGACCUCUCUCUAAUCAG (SEQ ID NO: 127);
 CCUCAGCCUCUUCUCCUUCUGA (SEQ ID NO: 128);
 AAUC CUCAGCCUCUUCUCCUU (SEQ ID NO: 129);
 AACCA AUGCCUC CUGGCCAA (SEQ ID NO: 130); 20
 CUGAUUAAGUUGUCUAAACAA (SEQ ID NO: 131);
 CCGACUCAGCGCUGAGAUCAA (SEQ ID NO: 132);
 CUUGUGAUUAUUUAUUUA (SEQ ID NO: 133);
 AAGCCUGUAGCCCAUGUUGUA (SEQ ID NO: 134); 及び
 UAGGGUCGGAACCCAAGCUUA (SEQ ID NO: 135);
 からなる群より選択されるリボ核酸配列を含む。

【0013】

本発明の例示的態様の記載

本発明は、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと組み合わせて、短干渉核酸 (siNA: short interfering nucleic acid) 又はその前駆体を用いる新規の組成物及び方法を提供することによって、これらの需要を満足し、更なる目的及び利点を実現させる。ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドは、siNA及びその前駆体を含むポリヌクレオチドの、細胞内送達又は取り込みを促進する能力のために選択した天然又は人工のポリペプチドである。 30

【0014】

本発明の新規組成物の範囲内で、siNAを、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドに、混合、複合、又は共役して、標的細胞を裸のsiNA (すなわち、送達促進ポリペプチドが存在しないsiNA) に接触させる結果として生じる送達と比較して、siNAの細胞内送達を促進する組成物を形成してもよい。 40

【0015】

エンハンサー・ペプチド

本明細書では、「細胞」という用語は、通常の生物学的意味で使用され、完全な多細胞生物、例えば、詳細にはヒトを指すものではない。細胞は、生物体、例えば、鳥類、植物、並びに、ヒト、ウシ、ヒツジ、類人猿、サル、ブタ、犬及びネコなどの哺乳動物に存在することができる。細胞は、原核細胞 (例えば、細菌細胞) であってもよく、真核細胞 (例えば、哺乳動物細胞又は植物細胞) であってもよい。細胞は、体細胞系又は生殖細胞系、全脳細胞又は多能性細胞、分裂性又は非分裂性であってもよい。細胞は、配偶子若しくは胚、幹細胞、又は完全に分化した細胞に由来してもよく、それらを含んでもよい。 40

【0016】

「ベクター」は、所望の核酸を送達するのに用いられる、任意の核酸系及び/又はウイ 50

ルス系手法を意味する。

【0017】

「含む」は、「含む」という語に続くものは全て含めることを意味するが、それらに限定されない。従って、「含む」という用語を使用することによって、リストした要素は必要又は不可欠であるが、他の要素は任意であり、存在してもしなくてもよいことを表す。

「から成る」は、「から成る」という句に続くものは全て含めることを意味し、それらに限定される。従って、「から成る」という句は、リストした要素は必要又は不可欠であり、且つ、その他の要素は存在しないことを表す。「基本的に～から成る」は、その句の後にリストされたいずれの要素も含むことを意味し、且つ、リストされた要素の開示で明記された活性若しくは働きに干渉しない、又は活性若しくは働きに貢献する他の要素に限定される。従って、句「基本的に～から成る」は、リストした要素は必要で不可欠であるが、他の要素は任意であり、それらの要素がリストした要素の活性又は働きに影響を与えるか否かに応じて、存在してもしなくてもよいことを表す。

10

【0018】

本明細書で用いられる「生物分解性」という用語は、例えば、酵素分解や化学分解等の、生物系における分解を指す。

【0019】

本明細書で用いられる「生物学的に活性な分子」という用語は、系の生物学的反応を引き出す又は修飾することができる化合物又は分子を指す。単独で、又は本発明によって検討されている他の分子との組み合わせで、生物学的に活性な s i N A 分子の例には、抗体、コレステロール、ホルモン、抗ウイルス薬、ペプチド、タンパク質、化学療法薬、小分子、ビタミン、補助因子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素核酸、アンチセンス核酸、三重鎖 (t r i p l e x) 形成オリゴヌクレオチド、2, 5 - A キメラ、s i N A、d s R N A、アロザイム、アプタマー、デコイ (d e c o y) 及びそれらの類縁体等の、治療的に活性な分子が含まれるが、これらに限定されない。本発明による生物学的に活性な分子には、他の生物学的に活性な分子、例えば、脂質、並びに、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール及び他のポリエーテル等のポリマーなどの薬物動態及び / 又は薬力学的効果を調節できる分子も含まれる。

20

【0020】

本明細書で用いられる「リン脂質」という用語は、リン基を少なくとも1つ含む疎水性分子を指す。例えば、リン脂質は、リンを含む基と、飽和又は不飽和アルキル基を含むことができ、アルキル基は任意で O H、C O O H、オキソ、アミン、置換アリール基、又は非置換アリール基で置換することができる。

30

【0021】

「配位子」という用語は、受容体等の他の化合物と直接的又は間接的に相互作用できる、薬物、ペプチド、ホルモン又は神経伝達物質等の化合物又は分子を指す。配位子と相互作用する受容体は、細胞の表面に存在してもよいし、細胞内受容体であってもよい。配位子と受容体の相互作用は、結果として生化学反応を生じる場合もあり、単に物理的相互作用若しくは物理的関係である場合もある。

【0022】

「非ヌクレオチド」という用語は、糖及び / 又はリン酸置換を含む、1つ又はそれ以上のヌクレオチド単位に代わって核酸鎖に組み込むことができ、残留塩基が酵素活性を呈することを可能にする、任意の基又は化合物を意味する。その基又は化合物は、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシル又はチミン等の、広く知られているヌクレオチド塩基を含まず、従って、1' 位に塩基を持たないという点で、脱塩基である。

40

【0023】

本明細書で使用される「ヌクレオチド」は、天然の塩基 (標準) と、当技術分野で公知の修飾塩基とを含むとして当技術分野においては認識されている。このような塩基は、一般的にヌクレオチド糖部分の 1' 位にある。ヌクレオチドは、一般的に塩基、糖、及びリン酸基を含む。ヌクレオチドは、糖、リン酸及び / 又は塩基部分で、修飾されていないくて

50

もよく、修飾されていてもよい。(ヌクレオチド類縁体、修飾ヌクレオチド、非天然産ヌクレオチド、非標準ヌクレオチドなどとも呼ばれる。例えば、本明細書に参照により組み込む、Usman and McSwiggen, supra; Eckstein等, PCT国際公開番号WO92/07065; Usman等, PCT国際公開番号WO93/15187; Uhlman & Peyman, supraを参照)。Limbach等, 1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183によってまとめられた、当技術分野で公知の修飾核酸塩基の例が幾つかある。核酸分子に導入することができる塩基修飾の例には、イノシン、プリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、擬似ウラシル、2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン(例、5-メチルシチジン)、5-アルキルウリジン(例、リボチミジン)、5-ハロウリジン(例、5-プロモウリジン)又は6-アザピリミジン若しくは6-アルキルピリミジン(例、6-メチルウリジン)、プロピン、及びその他が含まれるが、これらに限定されない(Burgin等, 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, supra)。本態様における「修飾塩基」は、アデニン、グアシン及びウラシル以外の1'位のヌクレオチド塩基、又はそれらの等価物を意味する。

10

【0024】

「標的部位」は、アンチセンス領域内に標的配列に相補的な配列を含む siNA 構築物が媒介する切断の「標的となる」標的 RNA 内の配列を意味する。

20

【0025】

「検知可能なレベルの切断」は、標的 RNA の無作為な分解によって生産される RNA のバックグラウンドを超えた、切断産物を見分けるのに十分な程度までの標的 RNA の切断(及び切断産物 RNA の形成)を意味する。標的 RNA の1%から5%の切断産物を生産すると、大抵の検知方法に対するバックグラウンド以上の検知を行うのに十分である。

【0026】

「生物系」は、ヒト、動物、植物、昆虫、細菌、ウイルス、又はその他の生物源を含むが、これらに限定されない生物源由来の純粋又は純粋でない形態の物質を意味する。生物系は、RNAi 活性に必要な構成要素を含む。「生物系」という用語は、例えば、細胞、組織若しくは生物、又は、それらの抽出物を含む。生物系という用語は、in vitro 設定で用いることができる再構成された RNAi 系も含む。

30

【0027】

本明細書で使用される「生物分解性リンカー」という用語は、ある分子を別の分子に結び付ける、例えば、生物学的に活性な分子を本発明の siNA 分子又は本発明の siNA 分子のセンス鎖又はアンチセンス鎖に結び付ける生物分解性リンカーとして設計された核酸又は非核酸系のリンカー分子を指す。生物分解性リンカーは、その安定性を、特定の組織又は細胞型への送達等の特定の目的に合わせて調節できるように設計される。核酸系生物分解性リンカー分子の安定性は、例えば、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドと、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-アミノ、2'-O-アミノ、2'-C-アリル、2'-O-アリル、及び他の2'-修飾、又は塩基修飾のヌクレオチド等、の化学修飾されたヌクレオチドとの組み合わせなどの様々な化学的性質を用いて調節することができる。生物分解性核酸リンカー分子は、二量体、三量体、四量体、又は、例えば、長さが、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、等のより長い核酸分子であってもよく、例えば、ホスホロアミデート又はホスホジエステル結合等のリン系結合を伴う単一のヌクレオチドを含んでもよい。生物分解性核酸リンカー分子は、核酸のバックボーン、核酸糖、又は核酸塩基修飾を含んでもよい。

40

【0028】

本発明の一実施形態においては、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドは、ヒストンタンパク質であってもよく、ポリペプチド又はペプチドのフラグメント、誘導體、類縁体若しくはそれらの共役体であってもよい。これらの実施形態の範囲においては、siNA

50

は、1つ又はそれ以上の全長ヒストンタンパク質、又は、ヒストンH1、ヒストンH2A、ヒストンH2B、ヒストンH3若しくはヒストンH4の1つ又はそれ以上等のヒストンタンパク質の一部の配列に少なくとも部分的に対応しているポリペプチド、又は、ヒストンタンパク質の少なくとも一部の配列、通常は天然ヒストンタンパク質の少なくとも5から10若しくは10から20の隣接する残基を含む1つ又はそれ以上のポリペプチドフラグメント若しくはその誘導體と、混合、複合又は共役している。より詳細な実施形態においては、siRNA/ヒストンの混合物、複合体又は共役体は、両親媒性化合物を実質的に含まない。他の詳細な実施形態においては、ヒストンタンパク質又はポリペプチドと混合、複合又は共役しているsiRNAは、二本鎖RNA、例えば、30未満のヌクレオチドを有する二本鎖RNAを含む。これは、短干渉RNA (siRNA)である。例示の実施形態においては、ヒストンポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドは、後述のPN73と表すポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドによって例示されているように、ヒストンH2Bのフラグメントを含む。更に追加の詳細な実施形態においては、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドは、ペグ化して、特にin vivoにおける投与のコンテキストにおいて、安定性及び/又は有効性を向上させてもよい。

10

20

30

40

50

【0029】

本発明の更なる実施形態の範囲において、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを、両親媒性アミノ酸配列を含むように選択してもよく、合理的に設計してもよい。例えば、疎水性配列ドメイン又はモチーフを形成する複数の非極性又は疎水性のアミノ酸残基を含む、有用なポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを選択して、荷電配列ドメイン又はモチーフを形成する複数の荷電アミノ酸残基に結合させて、両親媒性ペプチドを生み出してもよい。

【0030】

他の実施形態においては、タンパク質導入ドメイン又はモチーフと、融合ペプチドドメイン又はモチーフとを含むポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを選択する。タンパク質導入ドメインは、細胞膜に入り、好ましくは細胞膜を通過することができるペプチド配列である。融合ペプチドは、例えば、原形質膜や、エンドソームを取り囲む膜などの脂質膜を不安定にするペプチドであり、低いpHで促進される。例示の融合ドメイン又はモチーフは、多様なウイルス融合タンパク質、及び、例えば、線維芽細胞増殖因子4 (FGF4)などの他のタンパク質において見出される。

【0031】

本発明のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを合理的に設計するために、核酸が原形質膜を通過して細胞に入ることを容易にするモチーフとしてタンパク質導入ドメインを用いる。一実施形態においては、輸送された核酸は、エンドソームの中に包まれる。エンドソームの内部はpHが低いので、融合ペプチドモチーフがエンドソームの膜を不安定にする。エンドソーム膜の不安定化及び崩壊によって、siRNAの細胞質への放出が可能になり、細胞質でsiRNAは、RISC複合体と結びついて、その標的mRNAに向けられることができる。

【0032】

本発明の範囲の例示のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドは、次のペプチドから選択することができる：

WWETWKPFQCMCMRNFSTRQARRNHRRRHR (SEQ ID NO : 27) ; GKINLKAALAKKIL (SEQ ID NO : 28) , RVIRVWFQNKRCCKDKK (SEQ ID NO : 29) , GRKKRRQRPPQGRKKRRQRPPQ (SEQ ID NO : 30) , GEQIAQLIAGYIDIILKKKSK (SEQ ID NO : 31) , Poly Lys - Trp , 4 : 1 , MW20 , 000 - 50 , 000 ; 及び Poly Orn - Trp , 4 : 1 , MW20 , 000 - 50 , 000 。

本明細書の組成物及び方法の範囲で有用な追加のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドは、メリチンタンパク質配列の全て又は一部を含む。

【0033】

更に、他の例示のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを、以下の例で明らかにする。これらのペプチドの任意の1つ又は任意の組み合わせを選択又は組み合わせて、本発明の方法及び組成物の範囲内で siRNA の細胞内送達を誘導又は容易にする有効なポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド試薬を生み出してもよい。

【0034】

本発明のより詳細な態様においては、siRNA と、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドとを含む混合物、複合体又は共役体は、任意で、LIPOFECTIN (登録商標) 等のカチオン脂質と組み合わせてもよい (例えば、混合してもよく、複合してもよい)。このコンテキストにおいて、本明細書で予想外の開示となるのは、siRNA 単独と複合又は共役されたポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドが、RNAi による遺伝子サイレンシングを媒介するのに十分な siRNA の送達を達成することである。しかしながら、本明細書の更なる予想外の開示は、siRNA / ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド複合体又は共役体は、リポフェクチン等のカチオン脂質と混合又は複合すると、siRNA 送達及び遺伝子サイレンシングを媒介する活性がより大きくなることである。ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド、siRNA 及びカチオン脂質から構成されるこれらの組成物を作るためには、siRNA 及びペプチドを、細胞培養培地等の適切な培地で最初に混合し、その後、カチオン脂質をその混合物に加えて、siRNA / 送達ペプチド / カチオン脂質組成物を形成する。任意で、ペプチド及びカチオン脂質を、細胞培養培地等の適切な培地で最初に混合し、そこに、後で、siRNA を加えて、siRNA / 送達ペプチド / カチオン脂質組成物を形成してもよい。

【0035】

本発明のこれらの態様の範囲の有用なカチオン脂質の例には、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、1 , 2 - ビス (オレオイルオキシ) - 3 - 3 (トリメチルアンモニウム) プロパン、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、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、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 - プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (2 , 3 - dioleyloxy - N - [2 (spermincarboxamido) ethyl] - N , N - dimethyl - 1 - propanaminium trifluoroacetate)、1 , 3 - ジオレオイルオキシ - 2 - (6 - カルボキシスペルミル) - プロピルアミド (1 , 3 - dioleoyloxy - 2 - (6 - carboxyspermyl) - propylamid)、5 - カルボキシスペルミルグリシンジオクタデシルアミド、テトラメチルテトラパルミトイルスペルミン、テトラメチルテトラオレイルスペルミン、テトラメチルテトララウリルスペルミン、テトラメチルテトラミリスチルスペルミン、テトラメチルジオレイルスペルミン、DOTMA (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 - ビス (オレオイルオキシ) - 3 , 3 - (トリメチルアンモニウム) プロパン)、DMRIE (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)、又はDDAB (ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド) が挙げられる。多価カチオン脂質は、リボスペルミン、具体的には、限定はされないが、DOSPA (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) 及びDOSPER (1 , 3 - ジオレオイルオキシ - 2 - (6 カルボキシスペルミル) - プロピル - アミド (1 , 3 - dioleoyloxy - 2 - (6 carboxyspermyl) - propyl - amid)、及び、TMTPS (テトラメチルテトラパルミトイルスペルミン)、TMTOS (テトラメチルテトラオレイルスペルミン)、TMTLS (テトラメチルテトララウリルスペルミン)、TMTMS (テトラメチルテトラミリスチルスペルミン)、並びにTMDOS (テトラメチルジオレイルスペルミン)、DOG S (ジオクタデシル - アミドグリシルスペルミン (TRANSFECTAM (登

10

20

30

40

50

録商標))を含むジ - 及びテトラ - アルキル - テトラ - メチルスペルミンである。他の有用なカチオン脂質については、例えば、米国特許第 6, 733, 777号、米国特許第 6, 376, 248号、米国特許第 5, 736, 392号、米国特許第 5, 686, 958号、米国特許第 5, 334, 761号、及び米国特許第 5, 459, 127等に記載されている。

【0036】

カチオン脂質は、任意で、非カチオン脂質、特に、中性脂質、例えば、DOPE (ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン)、DPHPE (ジフィタノイルホスファチジルエタノールアミン) 又はコレステロール等の脂質と組み合わせてもよい。DOSPAとDOPEを3:1 (w/w)の割合で混合した物で構成したカチオン脂質、又は、DOTMAとDOPEを1:1 (w/w)の割合で混合した物で構成したカチオン脂質 (LIPOFECTIN (登録商標), Invitrogen社製) が、一般的に、本発明の組成物をトランスフェクトするのに有用である。好ましいトランスフェクション用組成物は、より高度な真核細胞株の実質的なトランスフェクションを誘導する組成物である。

10

【0037】

二本鎖 siRNA 分子

本明細書で使用される「非対称ヘアピン」という用語は、アンチセンス領域と、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを含むことができるループ部と、センス領域とを含む線形の siRNA 分子を意味する。ここで、センス領域は、アンチセンス領域より少ないがアンチセンス領域との塩基対に十分な相補的ヌクレオチドを有して、ループ部と二重鎖 (duplex) を形成する程度のヌクレオチドを含む。例えば、本発明の非対称ヘアピン siRNA 分子は、T細胞内の RNAi を媒介するのに十分な長さ (例えば、約 19 から約 22 (例えば、約 19, 20, 21 又は 22) のヌクレオチド) を有するアンチセンス領域と、約 4 から約 8 (例えば、約 4, 5, 6, 7 又は 8) のヌクレオチドを含むループ領域と、アンチセンス領域を相補する約 3 から約 18 (例えば、約 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 又は 18) のヌクレオチドを有するセンス領域とを含むことができる。非対称ヘアピン siRNA 分子は、化学修飾することができる 5' 末端リン酸基を含むこともできる。非対称ヘアピン siRNA 分子のループ部は、本明細書に記載のヌクレオチド、非ヌクレオチド、リンカー分子、又は共役分子を含むことができる。

20

30

【0038】

本明細書で用いられている「非対称二重鎖 (duplex)」は、センス領域と、アンチセンス領域とを含む2つの分かれた鎖を有する siRNA 分子を意味し、そこでは、センス領域は、アンチセンス領域より少ないがアンチセンス領域と塩基対になり、二重鎖 (duplex) を形成するのに十分な相補的ヌクレオチドを有する。例えば、本発明の非対称二重鎖 (duplex) siRNA 分子は、T細胞内の RNAi を媒介するのに十分な長さ (例えば、約 19 から約 22 (例えば、約 19, 20, 21 又は 22) のヌクレオチド) を有するアンチセンス領域と、アンチセンス領域を相補する約 3 から約 18 (例えば、約 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 又は 18) のヌクレオチドを有するセンス領域とを含むことができる。

40

【0039】

「遺伝子発現を調節する」とは、標的遺伝子の発現をアップレギュレート又はダウンレギュレートすることを意味し、標的遺伝子がコードする、細胞に存在する mRNA レベル、mRNA 翻訳、又は、タンパク質若しくはタンパク質サブユニットの合成、のアップレギュレーション又はダウンレギュレーションを含むことができる。標的遺伝子がコードする1つ又はそれ以上のタンパク質又はタンパク質サブユニットの、存在、数量又は活性についても、遺伝子発現をアップレギュレートするか又はダウンレギュレートするかのモジュレーションを決定することができる。その結果、対象タンパク質又はサブユニットの発現、レベル又は活性は、モジュレーター (例えば siRNA) が存在しない場合に観察されるより、多く又は少なくなる。例えば、「調節する」という用語は、「阻害する」を

50

意味することもできるが、単語「*modulate*」の使用は、その定義に限定されない。

【0040】

発現を「阻害する」、「ダウンレギュレートする」又は「低減する」は、遺伝子、1つ又はそれ以上のタンパク質、又はタンパク質サブユニットをコードするRNA分子若しくはRNA分子の同等物のレベル、又は、標的遺伝子がコードする1つ又はそれ以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットの活性のレベルの発現を、本発明の核酸分子（例えば*siNA*）が存在しない場合に観察されるより下に低減することを意味する。一実施形態においては、*siNA*分子を用いての阻害、ダウンレギュレーション又は低減は、非活性又は弱められた分子が存在する場合に観察されるレベル以下である。別の実施形態においては、*siNA*分子を用いての阻害、ダウンレギュレーション又は低減は、例えば、スクランブル配列又はミスマッチを有する*siNA*分子が存在する場合に観察されるレベル以下である。別の実施形態においては、本発明の核酸分子を用いての阻害、ダウンレギュレーション又は低減は、その核酸分子が存在しない場合よりも存在する場合のほうが大きい。

10

【0041】

遺伝子「サイレンシング」は、細胞の遺伝子発現の標的阻害を通して部分的又は完全な機能の喪失を指し、「ノックダウン」とも呼ばれる。状況と、取り組むべき生物学的問題に応じて、遺伝子発現を一部低減することが好ましい場合がある。或いは、遺伝子発現をできる限り低減するのが望ましい場合もある。サイレンシングの程度は、当技術分野で公知の方法で決定することができ、その方法の一部は、国際公開番号W099/32619にまとめられている。アッセイに応じて、遺伝子発現の定量化によって、予防的方法及び治療的方法を含む、本発明の一実施形態で所望される様々な量の阻害の検知が可能になる。それによって、mRNAレベル又はタンパク質レベル若しくは活性という点で、治療の標的となる特定の疾患状態又は他の状態に関連するように、発現レベルを上げることを含めて、例えば、ベースライン（すなわち通常）又は他の対照群レベルの10%、30%、50%、75%、90%、95%又は99%以上に標的遺伝子発現をノックダウンすることが可能になる。

20

【0042】

「標的遺伝子の発現を阻害する」という句は、本発明の*siNA*の標的遺伝子の遺伝子サイレンシングを開始する能力を指す。遺伝子サイレンシングの程度を調べるために、特定の構築物を発現する目的の生物又は培養中の細胞を、その構築物を発現しない対照試料と比較する。（構築物を発現しない）対照試料に100%の相対値を割り当てる。対照群との相対的なテスト値が、約90%、しばしば50%、一の実施形態においては25%~0%のとき、標的遺伝子の発現の阻害が達成される。適切なアッセイには、当業者に公知の表現型アッセイだけでなく、例えば、ドットプロット法、ノーザンプロット法、*in situ*ハイブリッド形成法、ELISA、免疫沈降、酵素機能等の当業者に公知の技術を用いるタンパク質レベル又はmRNAレベルの試験が含まれる。

30

【0043】

「対象」は、生物、組織又は細胞を意味し、移植細胞の対象、又はドナー若しくはレシピエントとしての生物と、又は、それ自体が*siNA*送達の対象である細胞とを含んでもよい。従って、「対象」は、*in vitro*又は*ex vivo*の器官、組織又は細胞対象を含む、生物、器官、組織又は細胞を指してもよく、それらに、本発明の核酸分子を投与することができ、本明細書に記載のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドによって促進することができる。例示の対象は、哺乳動物の個体又は細胞、例えば、ヒト患者又は細胞を含む。

40

【0044】

「RNA」は、少なくとも1つのリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。

【0045】

「リボヌクレオチド」は、ベータ-D-リボ-フラノース部分の2'位にヒドロキシ基

50

を有するヌクレオチドを意味する。その用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、部分的に精製したRNA等の単離RNA、基本的に純粋なRNA、合成RNA、組み換えによって生産されたRNAを含み、1つ又はそれ以上のヌクレオチドの追加、欠失、置換及び/又は改変による、天然産RNAとは異なる改変RNAを含む。このような改変は、例えば、RNAの1つ又はそれ以上のヌクレオチドで、siNAの端(単数又は複数)に、又は、内部に、非ヌクレオチド物質の追加を含んでもよい。本発明のRNA分子のヌクレオチドは、非天然産ヌクレオチド又は化学的に合成されたヌクレオチド又はデオキシヌクレオチド等の、非標準ヌクレオチドを含んでもよい。これらの改変RNAは、類縁体、又は天然産RNAの類縁体と呼ぶことができる。

【0046】

「高度に保存された配列領域」は、標的遺伝子の1つ又はそれ以上の領域のヌクレオチド配列が、ある世代から次の世代で、又は、ある生物系から次の生物系で、有意に変化しないことを意味する。

【0047】

「センス領域」は、siNA分子のアンチセンス領域に対する相補性を有するsiNA分子のヌクレオチド配列を意味する。更に、siNA分子のセンス領域は、標的核酸配列と相補性を有する核酸配列を含むことができる。

【0048】

「アンチセンス領域」は、標的核酸配列への相補性を有するsiNA分子のヌクレオチド配列を意味する。更に、siNA分子のアンチセンス領域は、任意で、siNA分子のセンス領域に対する相補性を有する核酸配列を含むことができる。

【0049】

「標的核酸」は、その発現又は活性を調節する任意の核酸配列を意味する。標的核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。

【0050】

「相補性」は、核酸が、従来のワトソクリック型又は他の従来型ではない型によって、別の核酸配列と水素結合を形成することができることを意味する。本発明の核酸分子を参照すると、相補的配列を有する核酸分子の結合自由エネルギーは、核酸の関連機能が、RNAi活性等の進行を可能にするのに十分である。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は、当技術分野では公知である(Turner等, 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LI pp. 123-133; Frier等, 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83: 9373-9377; Turner等, 1987, J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-3785等を参照)。相補性パーセントは、核酸分子内の、第2核酸配列との水素結合(例えば、ワトソクリック塩基対)を形成できる隣接する残基のパーセンテージを表す。(例えば、第1オリゴヌクレオチドの総数10個のヌクレオチドのうち5, 6, 7, 8, 9, 又は10個のヌクレオチドが、10個のヌクレオチドを有する第2核酸配列と塩基対になる場合は、それぞれ、50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%の相補性を表す。)「完全に相補的」とは、核酸配列の隣接する残基が全て、第2核酸配列の同数の隣接する残基と水素結合することを意味する。

【0051】

本明細書で使用されている用語「ユニバーサル塩基」は、天然のDNA/RNA塩基の各々と、それらの間での差異はほとんどなく、塩基対を形成するヌクレオチド塩基の類縁体を指す。ユニバーサル塩基の例には、当技術分野で公知のC-フェニル、C-ナフチル及び他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、及び、3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、6-ニトロインドール等のニトロアゾール誘導体が含まれるが、それらに限定されない(例えば、Loakes, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437-2447を参照)。

【0052】

本明細書で使用されている「非環状ヌクレオチド」という用語は、例えば、リボース炭

10

20

30

40

50

素 (C 1 , C 2 , C 3 , C 4 又は C 5) のいずれかが、独立して、又はヌクレオチドに入っていない組み合わせである、非環状リボース糖を有する任意のヌクレオチドを指す。

【 0 0 5 3 】

「脱塩基」は、1'位の塩基の代わりに、塩基を欠く、又は他の化学基を有する糖部分を意味する (例えば、Adamic等, 米国特許第5,998,203号を参照)。

【 0 0 5 4 】

「非修飾ヌクレオチド」は、ベータ-D-リボフラノースの1'位の炭素に結合したアデニン、シトシン、グアニン、チミン又はウラシル塩基の1つを意味する。

【 0 0 5 5 】

「修飾ヌクレオチド」は、非修飾ヌクレオチドの塩基、糖及び/又はリン酸の化学構造の修飾を含む任意のヌクレオチド塩基を意味する。修飾ヌクレオチドの例を、一般式IからVII、及び/又は本明細書に記載の他の修飾によって示すが、それらに限定されない。

10

【 0 0 5 6 】

「キャップ構造」は、オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれた化学修飾を意味する (例えば、本明細書に参照により組み込まれたAdamic等, 米国特許第5,998,203号を参照)。これらの末端の修飾により、核酸分子がエクソヌクラーゼによって分解されることを防ぎ、細胞内の送達及び/又は局在化を支援する。キャップは、5'末端に存在してもよく (5'キャップ)、3'末端に存在してもよく (3'キャップ)、又はその両方の末端に存在してもよい。5'キャップの例には、グリセリル、インバーテッドデオキシ脱塩基残基 (inverted deoxy abasic residue) (部分); 4', 5'-メチレンヌクレオチド; 1-(ベータ-D-エリトロフラノシル)ヌクレオチド, 4'-チオヌクレオチド; 炭素環式ヌクレオチド; 1, 5-アンヒドロヘキソールヌクレオチド; L-ヌクレオチド; アルファ-ヌクレオチド; 修飾塩基ヌクレオチド; ホスホロジチオエート結合; トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド; 非環状3', 4'-セコヌクレオチド (acyclic 3', 4'-seco-nucleotide); 非環状3, 4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド; 非環状3, 5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド, 3'-3'-インバーテッドヌクレオチド部分 (3'-3'-inverted nucleotide moiety); 3'-3'-インバーテッド脱塩基部分 (3'-3'-inverted abasic moiety); 3'-2'-インバーテッドヌクレオチド部分 (3'-2'-inverted nucleotide moiety); 3'-2'-インバーテッド脱塩基部分 (3'-2'-inverted abasic moiety); 1, 4-ブタンジオールホスフェート; 3'-ホスホラミデート; ヘキシルホスフェート; アミノヘキシルホスフェート; 3'ホスフェート; 3'-ホスホロチオエート; ホスホロジチオエート; 又は、架橋若しくは非架橋のメチルホスホネート部分が含まれるが、それらに限定されない。

20

30

【 0 0 5 7 】

3'キャップの例には、グリセリル、インバーテッドデオキシ脱塩基残基 (inverted deoxy abasic residue) (部分)、4', 5'-メチレンヌクレオチド; 1-(ベータ-D-エリトロフラノシル)ヌクレオチド; 4'-チオヌクレオチド, 炭素環式ヌクレオチド; 5'-アミノ-アルキルホスフェート; 1, 3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート; 3-アミノプロピルホスフェート; 6-アミノヘキシルホスフェート; 1, 2-アミノドデシルホスフェート; ヒドロキシプロピルホスフェート; 1, 5-アンヒドロヘキソールヌクレオチド; L-ヌクレオチド; アルファ-ヌクレオチド; 修飾塩基ヌクレオチド; ホスホロジチオエート; トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド; 非環状3', 4'-セコヌクレオチド (acyclic 3', 4'-seco-nucleotide); 3, 4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド; 3, 5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド, 5'-5'-インバーテッドヌクレオチド部分 (5'-5'-inverted nucleotide moiety); 5'-5'-インバーテッド脱塩基部分 (5'-5'-inverted abasic moiety);

40

50

5' - ホスホラミデート ; 5' - ホスホロチオエート ; 1, 4 - ブタンジオールホスフェート ; 5' - アミノ ; 架橋及び / 又は非架橋の 5' - ホスホラミデート , ホスホロチオエート及び / 又はホスロジチオエート、架橋又は非架橋のメチルホスホネート及び 5' - メルカプト部分が含まれるが、それらに限定されない (より詳細については、本明細書に参照により組み込んだ *Beaucage and Lyster 1993, Tetrahedron 49, 1925* を参照)。

【0058】

本発明のために記載した 2' - 修飾ヌクレオチドに関連して、「アミノ」は、2' - NH₂ 又は 2' - O - NH₂ を意味し、修飾されていても、修飾されていなくてもよい。このような修飾基については、例えば、*Eckstein* 等による米国特許第 5, 672, 695 号及び *Matulic - Adamic* 等による米国特許第 6, 248, 878 号に記載されている。

10

【0059】

siNA 分子は、カチオン脂質と複合する、リボソーム内に包み込む、又は、標的細胞若しくは組織に送達することができる。核酸又は核酸複合体は、バイオポリマー内に組み込んで、又は組み込まずに、注射、輸液ポンプ、又はステントを通して局所投与することができる。別の実施形態においては、ポリエチレングリコール (PEG) は、共有結合によって、本発明の *siNA* 化合物、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド、又は、その両方に結合することができる。結合した PEG は、任意の分子量を取ることができるが、約 2000 から約 5000 ダルトン (Da) の間であることが好ましい。

20

【0060】

センス領域は、ポリヌクレオチドリinker 又は非ヌクレオチドリinker 等のリinker 分子によって、アンチセンス領域に結び付くことができる。

【0061】

「インバーテッドリピート」は、センス要素及びアンセンス要素を含み、反復を転写すると、それらが二本鎖 *siRNA* を形成することができるよう位置されている核酸配列を指す。逆位反復は、反復の 2 つの要素間に、リinker 又は自己切断リボザイム等の非相同配列を任意で含んでもよい。逆位反復の要素は、二本鎖 RNA を形成するのに十分な長さを有する。通常、逆位反復の各要素は、長さ約 15 から約 100 ヌクレオチドであるが、長さ約 20 から 30 塩基ヌクレオチド、約 20 から 25 ヌクレオチド、例えば、長さ 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 ヌクレオチドであることが好ましい。

30

【0062】

「核酸」は、デオキシリボ核酸又はリボ核酸、及び、一本鎖又は二本鎖の形態のそれらのポリマーを指す。「核酸」という用語は、公知のヌクレオチド類縁体、又は修飾されたバックボーンの残基若しくは結合を含む、合成、天然産、及び非天然産の基準核酸と類似の結合特性を有する、基準ヌクレオチドと類似の方法で代謝される核酸を包含する。このような類縁体の例には、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホネート、キラル - メチルホスホネート、2 - O - メチルリボヌクレオチド、ペプチド - 核酸 (PNA) が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0063】

「大きい二本鎖 RNA」は、約 40 塩基対 (bp) より大きいサイズ、例えば、100 bp、特に、300 bp より大きいサイズを有する任意の二本鎖 RNA を指す。大きい dsRNA の配列は、mRNA のセグメント又は mRNA 全体を表してもよい。大きい dsRNA の最大サイズは、本明細書では制限していない。二本鎖 RNA は、リン酸糖バックボーン又はヌクレオチドを修飾している修飾塩基を含む。このような修飾には、窒素若しくは硫黄のヘテロ原子、又は当技術分野で公知の任意の他の修飾を含む。

【0064】

二本鎖構造は、ヘアピン又はマイクロ RNA に対して生じるような自己相補的 RNA 鎖によって形成してもよく、2 つの別個の相補的 RNA 鎖のアニーリングによって形成して

50

もよい。

【0065】

「重複」は、2つのRNAフラグメントが、1本の鎖上で、複数のヌクレオチドが重複する配列を有するときを指す。この場合、重複する複数のヌクレオチド（nt）の数は、少なくとも2から5ヌクレオチド、又は5から10ヌクレオチド又はそれ以上である。

【0066】

「1つ又はそれ以上のdsRNA」は、配列を基に、互いに異なるdsRNAを指す。

【0067】

「標的遺伝子又はmRNA」は、目的の任意の遺伝子又はmRNAを指す。実際に、遺伝学又は配列決定によって特定された任意の遺伝子を標的としてよい。標的遺伝子又はmRNAは、発生遺伝子及び調節遺伝子を含み、代謝若しくは構造遺伝子、又は遺伝子がコードする酵素を含む。標的遺伝子は、表現型を調査中の細胞において発現させてもよいし、直接的又は間接的に表現型の特性に影響を与える方法で生物体において発現させてもよい。標的遺伝子は、内因性であっても外因性であってもよい。このような細胞には、配偶子、又は、不死化細胞株若しくは初代細胞培養で発生する任意の単利離細胞を含む、動物の成体、植物の成体、動物胚又は植物胚の体の、任意の細胞が含まれる。

10

【0068】

例示の実施形態においては、本発明は、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと混合、複合、又は共役された、短干渉核酸（siNA）、短干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（mRNA）又は短ヘアピンRNA（shRNA）等の小核酸分子を含む組成物を特徴とする。

20

【0069】

本明細書で用いられる「短干渉核酸」、「siNA」、「短干渉RNA」、「siRNA」、「短干渉核酸分子」、「短干渉オリゴヌクレオチド分子」、又は「化学修飾された短干渉核酸分子」という用語は、例えば、RNA干渉「RNAi」を媒介することによって、又は配列特異的方法で遺伝子サイレンシングを行うことによって、遺伝子発現又はウイルスの複製を、阻害又はダウンレギュレートすることができる任意の核酸分子を指す。例示の実施形態の範囲では、siNAは、自己相補的なセンス領域及びアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であり、アンチセンス領域は、発現をダウンレギュレートする標的核酸分子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、又は、その一部を含み、センス領域は、標的核酸配列又はその一部に対応する（すなわち、実質的に同じ配列である）ヌクレオチド配列を含む。

30

【0070】

「siNA」は、短い長さの二本鎖核酸（又は任意で、その長い前駆体）である、例えばsiRNA等の小さい干渉核酸を意味し、標的細胞において容認できないほどの毒性はない。本発明の範囲内で有用なsiNAの長さは、一実施形態においては、約21から23bpで最適となる。しかしながら、siRNAを含めて、有用なsiNAの長さに特別な制限はない。例えば、siNAは、最初、前駆体の形態で細胞に与えることができる。前駆体の形態は、siNAの最終又は処理後の形態とは実質的に異なる。siNAの最終又は処理後の形態とは、送達時又は送達後に存在し、標的細胞に対して遺伝子サイレンシング活性を発揮するものである。例えば、siNAの前駆体の形態は前駆体配列要素を含み、前駆体配列要素は、送達時又は送達後に、処理、分解、改変、又は切断されて、細胞内で活性なsiNAを産し、遺伝子サイレンシングを媒介する。従って、一実施形態においては、本発明の範囲内で有用なsiNAは、例えば、約100から200の塩基対、50から100の塩基対、又は約50未満の塩基対等の、前駆体の長さを有することになり、標的細胞内で活性を呈する処理されたsiNAを産することになる。他の実施形態においては、有用なsiNA又はsiNA前駆体は、長さ約10から49bp、15から35bp、又は約21から30bpである。

40

【0071】

上述のように、本発明の一実施形態においては、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチ

50

ドを使用して、*siNA*の大きい核酸前駆体を含む、従来の*siNA*より大きい核酸分子の送達を容易にしている。例えば、本明細書の方法及び組成物を、所望の*siNA*の「前駆体」である大きい核酸分子の送達を促進するために用いてもよく、その場合、前駆体アミノ酸は、標的細胞に送達前、送達中、又は送達後に、切断又は処理されて、標的細胞内で遺伝子発現を調節する活性な*siNA*を形成する。例えば、*siNA*前駆体ポリヌクレオチドを、3つ以上のループ構造と、自己相補的センス領域及びアンチセンス領域を含むステム(*stem*)とを有する環状の一本鎖ポリヌクレオチドとして選択してもよく、その場合、アンチセンス領域は、標的核酸分子のヌクレオチド配列、又はその一部に相補的な核酸配列を含み、センス領域は、標的核酸配列又はその一部に対応する核酸配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、*in vivo*又は*in vitro*で処理されて、RNA *i*を媒介することができる活性*siNA*分子を生成することができる。

10

【0072】

哺乳動物細胞において、30塩基より長い*dsRNA*は、通常、インターフェロンによって誘導された、*dsRNA*依存キナーゼPKR及び2'-5'-オリゴアデニレートシターゼ(2'-5'-*oligoadenylate synthetase*)を活性化することができる。活性化されたPKRは、翻訳因子真核細胞開始因子2 (*eIF2*)のリン酸化反応によって通常の翻訳を阻害し、2'-5'-オリゴアデニレートシターゼ(2'-5'-*oligoadenylate synthetase*)は、RNA *ase L*の活性によって非特異的*mRNA*分解を引き起こす。本発明の*siNA*は、通常、30塩基対未満、最もよく見られるのは、約17から19、19から21、又は21から23塩基対というように、サイズが小さい(特に前駆体でない形態)ことによって、インターフェロン応答の活性化を回避する。

20

【0073】

長い*dsRNA*の非特異的効果とは対照的に、*siRNA*は、哺乳動物系における選択的遺伝子サイレンシングを媒介する。ステム(*stem*)に短いループと19から27の塩基対とを有するヘアピンRNAも、二本鎖ステム(*stem*)における配列と相同の遺伝子の発現を選択的にサイレンシング(抑制)する。哺乳動物細胞は、短ヘアピンRNAを*siRNA*に転換して、選択的遺伝子サイレンシングを媒介する。

【0074】

RISCは、*siRNA*二重鎖(*duplex*)のアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAの切断は、*siRNA*二重鎖(*duplex*)のアンチセンス鎖に相補的な領域の真ん中で起こる。21ヌクレオチド*siRNA*二重鎖(*duplex*)は、2つのヌクレオチドの3'オーバーハングを含むとき、最も活性であることが研究によって明らかになった。更に、*siRNA*鎖の一方又は両方を、2'-デオキシ(2'-H)又は2'-O-メチルヌクレオチドで完全に置換すると、RNA *i*活性を取り除くが、3'末端*siRNA*オーバーハングヌクレオチドのデオキシヌクレオチド(2'-H)での置換は、許容されると報告されている。

30

【0075】

2つのヌクレオチド3'オーバーハングを有する21-*mersiRNA*二重鎖(*duplex*)の3'オーバーハングセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置き換えることは、RNA *i*活性に有害影響を与えないことが、研究によって明らかになった。*siRNA*の各端で最大4ヌクレオチドまでデオキシリボヌクレオチドと交換することは、十分に許容されると報告されているが、デオキシリボヌクレオチドとの完全な置換は、RNA *i*を不活性にする。

40

【0076】

或いは、単一又は複数の*siNA*をコードし、且つ標的細胞内での発現を指示するポリヌクレオチドベクターによって発現される単一又は複数の転写産物として、*siNA*を送達することができる。これらの実施形態において、標的細胞内で発現される*siRNA*の最終転写産物の二本鎖部分は、例えば、15から49bp、15から35bp、又は、約21から30bpの長さである。例示の実施形態の範囲内で、2本の鎖が対になった、*s*

50

i N Aの二本鎖部分は、完全に対になったヌクレオチドセグメントに限定されず、ミスマッチ（対応するヌクレオチドが相補的でない）、バルジ（一方の鎖に対応する相補的ヌクレオチドがない）、オーバーハング等により対になっていない部分を含んでもよい。s i N A形成に干渉しない程度まで、対にならない部分を含んでもよい。より詳細な実施形態においては、「バルジ」は、1から2の対になっていないヌクレオチドを含んでもよく、2つの鎖が対になっているs i N Aの二本鎖領域は、約1から7、又は約1から5のバルジを含んでもよい。更に、s i N Aの二本鎖領域に含まれる「ミスマッチ」は、約1から7、又は約1から5の数で存在してもよい。ミスマッチの場合に最も多いのは、ヌクレオチドの1つがグアニンで、他方がウラシルの場合である。このようなミスマッチは、例えば、センスRNAをコードする対応するDNAにおける、CからTへの変異、GからAへの変異、又はそれらの混合に起因する場合があるが、他の原因も考えられる。更に、本発明においては、2本の鎖が対になっているs i N Aの二本鎖領域は、およその規定する数の範囲内で、バルジ及びミスマッチ部分を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0077】

本発明のs i N Aの末端構造は、s i N Aが標的遺伝子の発現をサイレンシングする活性を保持する限り、平滑でもよく、突出して（オーバーハングして）いてもよい。突出（オーバーハング）端の構造は、他によって報告されているように、3'オーバーハングに限定されない。5'オーバーハング構造がRNAi等によって遺伝子サイレンシング効果を誘導することができる限り、5'オーバーハング構造を含んでもよい。更に、オーバーハングヌクレオチドの数は、報告された2つ又は3つのヌクレオチドの制限に限定されず、オーバーハングがs i N Aの遺伝子サイレンシング活性を損なわない限り、任意の数でよい。例えば、オーバーハングは、約1から8のヌクレオチドを含んでもよく、約2から4のヌクレオチドを含むことが多い。突出した端構造を有するs i N Aの全長は、対になった二本鎖部分の長さ、両端でオーバーハングしている一本鎖を含む対の長さを合計したもので表される。例えば、4つのヌクレオチドオーバーハングを両端に有する19bpの二本鎖RNAという例示の場合においては、全長は、23bpで表される。更に、オーバーハング配列は、標的遺伝子に対する特異性が低いので、標的遺伝子配列に対して、必ずしも、相補的（アンチセンス）又は同一（センス）ではない。更に、s i N Aが標的遺伝子に対する遺伝子サイレンシング効果を維持することができる限り、例えば、一方の端のオーバーハング部分に、低分子量構造（例えば、tRNA、rRNA若しくはウイルスRNA等の天然のRNA分子、又は人工のRNA分子）を含んでもよい。

【0078】

更に、s i N Aの末端構造は、二本鎖核酸の片側の端同士を、例えばリンカーRNA等のリンカー核酸によって結び付けるステム（stem）-ループ構造を有してもよい。二本鎖の領域（ステム（stem）-ループ部分）の長さは、例えば、15から49bp、しばしば15から35bp、より多く見られるのは約21から30bpである。或いは、標的細胞で発現されs i N Aの最終転写産物である二本鎖領域の長さは、例えば、約15から49bp、15から35bp、又は約21から30bpであってよい。リンカーセグメントを用いると、リンカーの長さが、ステム（stem）部分に対になるのを妨げない限り、リンカーの長さに特別な制限はない。例えば、ステム（stem）部分を安定して対にするために、及び、この部分をコードするDNA間の組み換えを抑制するために、リンカー部分は、クローバーの葉型のtRNA構造を有してもよい。リンカーが、ステム（stem）部分に対になるのを妨げる長さを有としても、例えば、イントロンを含むようにリンカー部分を構築し、前駆体RNAを成熟RNAに処理中にイントロンを除去することによって、ステム（stem）部分を対にすることを可能にすることができる。ステム（stem）-ループs i RNAの場合には、ループ構造を持たないRNAのどちらかの端（頭又は尾）は、低分子量のRNAを有してもよい。上述のように、この低分子量のRNAは、tRNA、rRNA若しくはウイルスRNA等の天然のRNA分子を含んでもよく、人工のRNA分子を含んでもよい。

【0079】

*s i N A*は、標的核酸分子又はその一部のヌクレオチド配列に補完的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドも含むことができ、(例えば、このような*s i N A*分子は、標的核酸配列又はその一部に対応する核酸配列の*s i N A*分子内にその存在を必要としない)、この場合、一本鎖ポリヌクレオチドは、更に5'リン酸塩(例えば、Martinez等, Cell, 110:563-574(2002) and Schwarz等, Molecular Cell, 10:537-568(2002)を参照)又は5',3'-2リン酸塩等の末端リン酸基を含むことができる。

【0080】

本明細書で使用されている*s i N A*分子という用語は、天然産RNA又はDNAのみを含む分子に限定されず、化学修飾されたヌクレオチド及び非ヌクレオチドをも包含する。一実施形態においては、本発明の短干渉核酸分子は、ヌクレオチドを含む2'-ヒドロキシ(2'-OH)を欠いている。一実施形態においては、短干渉核酸は、RNAiを媒介するために、2'ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要とせず、従って、本発明の短干渉核酸分子は、任意で、全くリボヌクレオチド(例えば2'-OH基を有するヌクレオチド)を含まなくてもよい。*s i N A*分子内にRNAiを支援するリボヌクレオチドの存在を必要としない、このような*s i N A*分子は、しかしながら、2'-OH基を有する1つ又はそれ以上のヌクレオチド基を含む、結合されたリンカー(単数又は複数)、又は他の結合された若しくは関連付けられた基、部分若しくは鎖を有することができる。任意で、*s i N A*分子は、ヌクレオチド位置の約5, 10, 20, 30, 40又は50%にリボヌクレオチドを含むことができる。

10

20

【0081】

本明細書で使用されている*s i N A*という用語は、配列特異的RNAiを媒介することができる核酸分子を表すのに使用される他の用語、例えば、短干渉RNA(*s i R N A*)、二本鎖RNA(*d s R N A*)、マイクロ-RNA(*m R N A*)、短ヘアピンRNA(*s h R N A*)、短干渉オリゴヌクレオチド、短干渉核酸、短干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学修飾*s i R N A*、転写後ジーンサイレンシングRNA(*p t g s R N A*)等と等価物であることを意味する。

【0082】

他の実施形態においては、本明細書の範囲内で使用される*s i N A*分子は、個別のセンス及びアンチセンス配列又は領域を含んでもよく、センス及びアンチセンス領域は、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドリナー分子によって共有結合で結合しているか、或いは、イオンの相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水的相互作用、及び/又はスタッキング相互作用を介して、非共有結合で結合している。

30

【0083】

「アンチセンスRNA」は、標的遺伝子mRNAに相補的な配列を有するRNA鎖であり、標的遺伝子mRNAに結合することによって、RNAiを誘導すると考えられている。「センスRNA」は、アンチセンスRNAに相補的な配列を有し、その相補的アンチセンスRNAにアニーリングされて*s i R N A*を形成する。これらのアンチセンス及びセンスRNAは、従来、RNA合成酵素を用いて合成されてきた。

【0084】

本明細書で使用されている「RNAi構築物」という用語は、本明細書を通じて使用される総称的な用語で、小さい干渉のRNA(*s i R N A*)、ヘアピンRNA、及び、*i n v i v o*で切断されて*s i R N A*を形成することができる他のRNA種を含む。本明細書のRNAi構築物は、細胞内の*d s R N A*又はヘアピンRNAを形成する転写、及び/又は*i n v i v o*で*s i R N A*を産生することができる転写を引き起こすことができる発現ベクター(RNAi発現ベクターとも呼ばれる)も含む。任意で、*s i R N A*は、一本鎖又は二本鎖の*s i R N A*を含む。

40

【0085】

*s i*ハイブリッド分子は、*s i R N A*と類似の機能を有する二本鎖核酸である。二本鎖のRNA分子の代わりに、*s i*ハイブリッドは、1本のRNA鎖と1本のDNA鎖で構成

50

されている。RNA鎖は、標的mRNAに結合する鎖であるアンチセンス鎖であることが好ましい。DNA鎖とRNA鎖とのハイブリダイゼーションによって作られたsiハイブリッドは、ハイブリダイゼーションされた相補部分と、好ましくは少なくとも1つの3'オーバーハング端とを有する。

【0086】

本発明の範囲内で使用されるsiNAは、2つの別個のオリゴヌクレオチドから組立てることができ、1本の鎖はセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖であり、アンチセンス鎖及びセンス鎖は、自己相補的である（すなわち、各鎖は、他方の鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。例えば、アンチセンス鎖とセンス鎖が二重鎖（duplex）又は二本鎖構造を形成し、二本鎖領域は、約19塩基対である）。アンチセンス鎖は、標的核酸分子又はその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含んでもよく、センス鎖は、標的核酸又はその一部に対応するヌクレオチド配列を含んでもよい。或いは、siNAは、単一のオリゴヌクレオチドから組立てることができる。その場合は、siNAの自己相補的なセンス領域及びアンチセンス領域は、核酸系の又は非核酸系のリンカー（単数又は複数）によって結合する。

10

【0087】

更なる実施形態の範囲で、本発明の方法及び組成物による細胞内送達のためのsiNAは、二重鎖（duplex）、非対称二重鎖（duplex）、ヘアピン又は非対称ヘアピン2次構造を有し、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域とを有するポリヌクレオチドであってよい。その場合は、アンチセンス領域は、個別の標的核酸分子又はその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列又はその一部に対応するヌクレオチド配列を含む。

20

【0088】

siNAで行うことができる化学修飾の例は、ホスホロチオエート・ヌクレオチド間結合、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、「ユニバーサル塩基」ヌクレオチド、「非環状」ヌクレオチド、5'-C-メチルヌクレオチド、及び、末端のグリセリル及び/又はインパーテッドデオキシ脱塩基残基（inverted deoxy abasic residue）の組み込みを含むが、これらに限定されない。これらの化学修飾は、様々なsiNA構築物で使用されると、細胞のRNAi活性を維持すると同時に、これらの化合物の血清安定性を劇的に向上させる。

30

【0089】

非限定的な例において、化学修飾ヌクレオチドの核酸分子へ導入は、外因的に送達される天然のRNA分子に生来備わっているin vivoでの安定性及びバイオアベイラビリティの潜在的な限界に克服する強力な手段を提供する。例えば、核酸分子を化学修飾すると、血清内での半減期が長くなる傾向があるので、化学修飾核酸分子を使用することによって、所与の治療効果を得るために特定の核酸分子の用量を減らすことを可能にすることができる。更に、ある化学修飾は、特定の細胞又は組織を標的にし、及び/又は核酸分子の細胞への取り込みを向上させることによって、核酸分子のバイオアベイラビリティを向上させることができる。従って、例えば、全てRNAの核酸分子と比較すると、化学修飾核酸分子の活性が、天然の核酸分子と比較して低減されていても、修飾核酸分子全体としての活性は、分子の安定性及び/又は送達の向上により天然の分子の活性よりも大きくなり得る。天然の非修飾siNAと異なり、化学修飾siNAは、ヒトのインターフェロン活性を活性化する可能性を最小化することもできる。

40

【0090】

本明細書に記載のsiNA分子において、本発明のsiNA分子のアンチセンス領域は、アンチセンス領域の3'端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。本明細書に記載のsiNA分子の実施形態のいずれにおいても、アンチセンス領域は、アンチセンス領域の5'端に約1個から約5個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。本明細書に記載のsiNA分子の実施形態のいずれにおいても、

50

本発明の *s i N A* 分子の 3' 末端のヌクレオチドオーバーハングは、核酸の糖、塩基又はバックボーンに、化学修飾されたりボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを含むことができる。本明細書に記載の *s i N A* 分子の実施形態のいずれにおいても、3' 末端のヌクレオチドオーバーハングは、1つ又はそれ以上のユニバーサル塩基リボヌクレオチドを含むことができる。本明細書に記載の *s i N A* 分子の実施形態のいずれにおいても、3' 末端のヌクレオチドオーバーハングは、1つ又はそれ以上の非環状ヌクレオチドを含むことができる。

【0091】

例えば、非限定的な例において、本発明は、1本の *s i N A* 鎖に、約1、2、3、4、5、6、7、8又はそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学修飾短干渉核酸 (*s i N A*) を特徴とする。また、別の実施形態においては、本発明は、両方の *s i N A* 鎖に、各々、約1、2、3、4、5、6、7、8又はそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学修飾短干渉核酸 (*s i N A*) を特徴とする。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、*s i N A* 二重鎖 (*duplex*) のオリゴヌクレオチド鎖の1本又は両方に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、又はその両方の鎖に存在することができる。本発明の *s i N A* 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖又はその両方の鎖の、3' 端、5' 端又はその両方に、1つ又はそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示の *s i N A* 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、又はその両方の鎖の5' 端に、約1から約5又はそれ以上 (例えば、約1、2、3、4、5又はそれ以上) の連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的な例において、本発明の例示の *s i N A* 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、又はその両方の鎖に、1つ又はそれ以上の (例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上) のピリミジンホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。更に別の非限定的な例においては、本発明の例示の *s i N A* 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、又はその両方の鎖に、1つ又はそれ以上の (例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上) のプリンホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0092】

s i N A 分子は、環状核酸分子で構成されていてもよく、その場合、*s i N A* は、約18から約23の (例えば、約18、19、20、21、22、又は23) の塩基対を有する、長さ約38から約70 (例えば、約38、40、45、50、55、60、65、又は70) ヌクレオチドであり、環状オリゴヌクレオチドが、約19の塩基対と2つのループとを有するダンベル形構造を形成する。

【0093】

環状 *s i N A* 分子は、2つのループモチーフを含み、*s i N A* 分子の1つ又は両方のループ部分は、生物分解性である。例えば、本発明の環状 *s i N A* 分子は、*s i N A* 分子のループ部分の *in vivo* における分解によって約2ヌクレオチドを含む3' 末端ヌクレオチドオーバーハング等の3' 末端オーバーハングを有する二本鎖 *s i N A* 分子を生成できるように、設計される。

【0094】

s i N A 分子に存在する、好ましくは *s i N A* 分子のアンチセンス鎖に存在する、しかしまた任意でセンス鎖、及び/又はアンチセンス鎖及びセンス鎖の両方に存在する、修飾ヌクレオチドは、天然産リボヌクレオチドと類似の属性又は特性を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、本発明は、ノーザン立体配置 (例えば、ノーザン擬回転サイクル、例えば *Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984* を参照) を有する修飾ヌクレオチドを含む *s i N A* 分子を特徴とする。従って、本発明の *s i N A* 分子に存在し、好ましくは本発明の *s i N A* 分子のアンチセンス鎖に存在するが、また選択的にセンス鎖、及び/又はアンチセンス鎖及びセンス鎖の両方に存在し、化学修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド分解に耐性があると同時に、RNAi を媒介する能力を維持する。ノーザ

ン立体配置を有するヌクレオチドの例には、ロックされた核酸 (LNA: locked nucleic acid) ヌクレオチド (例えば 2' - O, 4' - C - メチレン - (D - リボフラノシル) ヌクレオチド); 2' - メトキシエトキシ (MOE) ヌクレオチド; 2' - メチル - チオ - エチル, 2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - クロロヌクレオチド、2' - アジドヌクレオチド及び 2' - O - メチルヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0095】

二本鎖 siNA 分子のセンス鎖は、センス鎖の 3' 端、5' 端、又は、3' 端及び 5' 端の両方に、インバーテッドデオキシ塩基部分 (inverted deoxybasic moiety) 等の末端キャップ部分を有してもよい。

10

【0096】

共役体の例には、図面を含めて、その全体を本明細書に参照により組み込んだ、2003年4月30日出願の Vargeese 等の米国特許出願第 10 / 427, 160 号に記載の共役体及び配位子が含まれるが、これに限定されない。別の実施形態においては、共役体は、化学修飾 siNA 分子に生物分解性リンカーを介して共有結合されている。一実施形態においては、共役分子は、化学修飾 siNA 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖の 3' 端で結合している。別の実施形態においては、共役分子は、化学修飾 siNA 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖の 5' 端で結合している。更に別の実施形態においては、共役分子は、化学修飾 siNA 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、若しくは両方の鎖の 3' 端及び 5' 端、又はその組み合わせで結合している。一実施形態においては、本発明の共役分子は、化学修飾 siNA 分子の、細胞等の生物系への送達を容易にする分子を含む。別の実施形態においては、化学修飾 siNA 分子に結合した共役分子は、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、又は、細胞への取り込みを媒介することができる細胞受容体の配位子である。本発明で検討されている、化学修飾 siNA 分子に結合することができる特異的共役分子の例は、2003年7月10日に公開された Vargeese 等の米国特許出願第 20030130186 号及び 2004年6月10日に公開された米国特許出願第 20040110296 号に記載されている。本発明で用いられている共役体の型及び siNA 分子の共役の程度を、薬物動態プロフィール、バイオアベイラビリティ及び / 又は siNA 構築物の安定性の向上と、同時に RNAi 活性を媒介する siNA の能力を維持するために評価することができる。従って、当業者は、様々な共役体で修飾された siNA 構築物をスクリーニングして、その siNA 共役複合体が、例えば当技術分野で一般に知られている動物モデルにおいて、RNAi を媒介する能力を維持しつつ、向上した属性を保有するかどうかを決定することができる。

20

30

【0097】

siNA は、また、siNA のセンス領域を siNA のアンチセンス領域に結合する、ヌクレオチドリinker、非ヌクレオチドリinker、又は、ヌクレオチド / 非ヌクレオチド混合リンカーで構成してもよい。一実施形態においては、ヌクレオチドリinkerは、2ヌクレオチドより長い、例えば、長さ約 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 又は 10 ヌクレオチドであってよい。別の実施形態においては、ヌクレオチドリinkerは、核酸アプタマーであってよい。本明細書で使用される「アプタマー」又は「核酸アプタマー」は、標的分子に特異的に結合する核酸分子を意味する。その場合、核酸分子は、天然の設定において標的分子が認識する配列を含む配列を有する。或いは、アプタマーは、天然では核酸に結合しない標的分子に結合する核酸分子であってよい。標的分子は、目的の任意の分子であってよい。例えば、アプタマーを使用して、タンパク質の配位子結合ドメインに結合することができ、それによって、天然産配位子とタンパク質との相互作用を防ぐ。これは非限定的な例で、当業者は、当技術分野で一般に知られている技術を用いて他の実施形態を容易に作成できることを認識するであろう。(例えば、Gold 等, Annu. Rev. Biochem., 64: 763 (1995); Brody and Gold, J. Biotechnol., 74: 5 (2000); Sun, Curr. Opin. Mol. Ther., 2: 100 (2000); Kusser, J. Biotechnol., 74:

40

50

27 (2000); Hermann and Patel, Science 287: 820 (2000); and Jayasena, Clinical Chemistry, 45: 1628. (1999)を参照)

【0098】

非ヌクレオチドリンカーは、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素、又は他の高分子化合物(例えば、2から100の間のエチレングリコールユニットを有するポリエチレングリコール等のポリエチレングリコール)で構成されてもよい。具体的な例には、Seela and Kaiser, Nucleic Acids Res., 18: 6353 (1990) and Nucleic Acids Res., 15: 3113 (1987); Cload and Schepartz, J. Am. Chem. Soc., 113: 6324 (1991); Richardson and Schepartz, J. Am. Chem. Soc., 113: 5109 (1991); Ma等, Nucleic Acids Res., 21: 2585 (1993) and Biochemistry 32: 1751 (1993); Durand等, Nucleic Acids Res., 18: 6353 (1990); McCurdy等, Nucleosides & Nucleotides, 10: 287 (1991); Jschke等, Tetrahedron Lett., 34: 301 (1993); Ono等, Biochemistry, 30: 9914 (1991); Arnold等, 国際公開番号WO89/02439; Usman等, 国際公開番号WO95/06731; Dudycz等, 国際公開番号WO95/11910、及び Ferentz and Verdine, J. Am. Chem. Soc., 113: 4000 (1991)に記載されているものが含まれる。「非ヌクレオチド」は、更に、糖及び/又はリン酸置換基のいずれかを含む、1つ又はそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに核酸鎖に組み込むことができ、且つ残留塩基が酵素活性を呈することを可能にする、任意の基又は化合物を意味する。基又は化合物は、例えば、糖のC1位に、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシル又はチミジン等の広く知られているヌクレオチド塩基を含まないという点で、脱塩基であることができる。

【0099】

本発明の siNA 分子の合成は、化学修飾することができ：(a) siNA 分子の2本の相補的鎖の合成と；(b) 二本鎖 siNA 分子を得るのに適切な条件のもとで、2本の相補的鎖を一緒にアニーリングすることと；を含む。別の実施形態においては、siNA 分子の2本の相補的鎖の合成は、固相オリゴヌクレオチド合成による。更に別の実施形態においては、siNA 分子の2本の相補的鎖の合成は、固相タンデムオリゴヌクレオチド合成による。

【0100】

オリゴヌクレオチド(例えば、特定の修飾オリゴヌクレオチド又はリボ核酸を欠くオリゴヌクレオチドの部分)を、例えば、Caruthers等, 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19, Thompson等, PCT国際公開番号WO99/54459、Wincott等, 1995, Nucleic Acid Res. 23, 2677-2684, Wincott等, 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59, Brennan等, 1998, Biotechnol Bioeng., 61, 33-45、及び Brennan, 米国特許第6,001,311号に記載の当技術分野において公知のプロトコルを用いて合成する。本発明の特定の siNA 分子を含む RNA の合成は、例えば、Usman等, 1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845; Scaringe等, 1990, Nucleic Acids Res., 18, 5433; 及び Wincott等, 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684 Wincott等, 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59に記載の一般的な手順に従う。

【0101】

本発明の範囲における使用のための核酸分子の送達に対する補助的な又は相補的な方法

は、例えば、Akhtar等, Trends Cell Bio., 2, 139 (1992); Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer等, Mol. Membr. Biol., 16: 129-140 (1999); Hofland and Huang, Handb. Exp. Pharmacol., 137: 165-192 (1999); 及びLee等, ACS Symp. Ser., 752: 184-192 (2000)に記載されている。Sullivan等, PCT国際公開番号WO94/02595号には、更に、酵素核酸分子の送達に関する一般的な方法が記載されている。これらのプロトコルを利用して、本発明の範囲で検討される任意の核酸分子のほとんどの送達を補助又は相補することができる。

10

【0102】

医薬組成物

核酸分子及びポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドは、当業者に公知の様々な方法で細胞に投与することができる。それらの方法には、siNA及びポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドのみを含む製剤、又は、薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、アジュバント、乳化剤、緩衝剤、安定剤、保存剤等の、1つ又はそれ以上の追加の成分を更に含む製剤での投与が含まれるが、それらに限定されない。一部の実施形態においては、siNA及び/又はポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドは、リポソームに包む、イオントフォレーゼにより投与する、又は、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生物分解性ナノカプセル、生体接着性マイクロスフェア若しくはタンパク性ベクター等の他のビヒクルに組み込むことができる(例えばO'Hare and Normand, PCT国際公開番号WO00/53722号を参照)。或いは、核酸/ペプチド/ビヒクルの組み合わせを、直接注射することによって、又は輸液ポンプを用いることによって局所的に送達することができる。本発明の核酸分子の直接注射は、皮下注射、筋肉注射、皮内注射のいずれにおいても、標準的な針とシリンジの方法によって、又は、Cornly等, Clin. Cancer Res., 5: 2330-2337 (1999) and Barry等, PCT国際公開番号WO99/31262に記載の技術等の針を使わない技術によって、行うことができる。

20

【0103】

本発明の組成物は、薬剤として有効に用いることができる。薬剤は、患者の疾患状態又は他の好ましくない状態を予防、その状態の発生若しくは重篤度を調節、又は、その状態を治療する(検出又は測定可能な程度にまで1つ又はそれ以上の症状を緩和する)。

30

【0104】

従って、更なる実施形態の範囲で、本発明は、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドとの組み合わせ、複合、又は共役され、選択的に、希釈剤、安定剤、緩衝剤等の薬剂的に許容可能な担体と調剤された、1つ又はそれ以上のポリ核酸、通常は、1つ又はそれ以上のsiNA、の存在又は投与を特徴とする医薬組成物及び方法を提供する。

【0105】

本発明は、対象の特定の疾患状態又は他の好ましくない状態に関連する遺伝子の発現を調節する短干渉核酸(siNA)分子を提供することによって、更なる目的及び利点を満たす。通常、siNAは、対象の疾患状態又は好ましくない状態に関連する一時的又は原因となる因子として、発現レベルが上昇する遺伝子を標的とする。このコンテキストにおいて、siNAは、1つ又はそれ以上の関連する疾患症状の重篤度又は再発を予防、緩和、低減するレベルまで、有効に遺伝子の発現をダウンレギュレートする。或いは、疾患又は他の好ましくない状態の結果又は帰結として、標的遺伝子の発現が必ずしも上昇しない様々な明確な疾患モデルに関しては、標的遺伝子のダウンレギュレーションは、それでもなお、遺伝子発現を低下させることによって治療結果(すわなち、選択したmRNA及び/又は標的遺伝子のタンパク質産物のレベルを低減する)をもたらす。或いは、本発明のsiNAを標的として、1つの遺伝子の発現を低下させることもでき、そうすると、結果として、標的遺伝子の産物又は活性によって発現をマイナスに調節される「下流」遺伝子

40

50

をアップレギュレートすることができる。

【0106】

例示の実施形態の範囲で、本発明の組成物及び方法は、腫瘍壊死因子 - (TNF -)の発現を調節して、関節リウマチ(RA)の症状を治療又は予防する治療手段として有用である。このコンテキストにおいて、本発明は、小核酸分子を用いたRNA干渉(RNAi)によってTNF - の発現及び活性を調節するのに有用な化合物、組成物及び方法を更に提供する。より詳細な実施形態において、本発明は、TNF - 及び/又はTNF - 遺伝子の発現を調節して、哺乳動物類対象のRAの症状を予防又は緩和するのに有効な、短干渉核酸(s i N A)分子、短干渉RNA(s i R N A)分子、二本鎖RNA(d s R N A)分子、マイクロ-RNA(mRNA)分子、及び短ヘアピンRNA(s h R N A)分子等の小核酸分子と、関連方法とを提供する。これらの及び関連する治療組成物及び方法の範囲で、化学修飾s i N Aの使用は、例えば、i n v i v oにおけるヌクレアーゼによる分解への耐性を向上させることによって、及び/又は、細胞への取り込みを向上させることによって、天然のs i N A分子の属性と比較して、修飾s i N Aの属性を向上させることが多い。本明細書の開示に従って容易に判断できるように、複数の化学修飾を有する有用なs i N Aは、RNAi活性を保持している。従って、本発明のs i N A分子は、治療、診断、標的評価、ゲノム発見、遺伝子工学、及び薬理ゲノム学用途に、有用な試薬及び方法を提供する。

10

【0107】

本発明のこのs i N Aは、例えば、経皮的に、又は局所注射(例えば、乾癬を治療するために乾癬斑の部位に局所注射、又は、乾癬性関節炎若しくはRAの患者の関節に局所注射)によって等、任意の形態で投与してよい。より詳細な実施形態においては、本発明は、TNF - のmRNAに対して向けられる治療的に有効量のs i N Aを投与するための製剤及び方法を提供して、TNF - RNAを有効にダウンレギュレートし、それによって、1つ又はそれ以上のTNF - 関連の炎症状態を低減又は防止する。動物対象における選択した疾患状態に関連する、その疾患状態に関連して一時的又は原因となる因子として発現が異常に増加することが知られている多数の遺伝子のいずれかを含む、1つ又はそれ以上の異なる遺伝子の発現を標的にする比較例の方法及び組成物を提供する。

20

【0108】

本発明のs i N A / ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド混合物は、標的疾患状態に対する他の標準的な治療と併せて、例えば、RA又は乾癬等の炎症性疾患に有効な治療薬と併せて投与することができる。このコンテキストにおいて、組み合わせる有用且つ有効な薬剤の例には、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、メトトレキサート、金化合物、D - ペニシラミン、抗マラリア薬、スルファサラジン、グルココルチコイド、並びに、インフリキシマブ及びエントラセプト(e n t r a c e p t)等の他のTNF - 中和剤が挙げられる。

30

【0109】

本発明の負に帯電したポリヌクレオチド(例えばRNA又はDNA)は、安定剤、緩衝剤等を用いて、又は用いずに医薬組成物を形成する任意の標準的手段によって、患者に投与することができる。リポソーム送達機構の使用を望む場合、リポソーム形成のための標準的プロトコルに従うことができる。本発明の組成物は、経口投与用の錠剤、カプセル又はエリキシル剤、直腸投与用の坐薬、滅菌溶液、注射投与用懸濁剤、及び、当技術分野で公知の他の組成物として、調剤及び使用してもよい。

40

【0110】

本発明は、本明細書に記載の組成物の薬剤的に許容可能な製剤も含む。これらの製剤には、前述の化合物の塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、酢酸塩及びベンゼンスルホン酸塩等の酸付加塩も含まれる。

【0111】

薬理組成物又は製剤は、例えば、ヒトを含む細胞又は患者への、全身投与などの、投与に適切な形態の組成物又は製剤を指す。適切な形態は、ある程度は、例えば、経口、経皮

50

、又は注射によって等、使用又は製剤が入る経路に応じて決まる。このような形態は、組成物又は製剤が標的細胞（すなわち、負に帯電した核酸の送達に望ましい細胞）に到達するのを妨げてはならない。例えば、血流に注射された薬理組成物は、可溶性でなければならない。他の因子は当技術分野では公知であり、他の因子には、毒性等の考慮が含まれる。

【0112】

「全身投与」は、*in vivo*における血流への薬物の全身吸収、又は蓄積とその後続く全身への分布を意味する。全身吸収につながる投与経路には、静脈内、皮下、腹腔内、吸入、経口、肺内及び筋肉内が含まれるが、これらに限定されない。これらの投与経路は各々、例えば、核酸等の望ましい負に帯電したポリマーを接近可能な疾患組織に曝露する。薬物が血液循環に入る率は、分子量又は分子サイズの関数で表されてきた。リポソーム又は本発明の化合物を含む他の薬物担体を使用することによって、薬物を、例えば、網膜内皮系（RES）の組織等、特定の組織型に局在化できる可能性がある。薬物がリンパ球やマクロファージ等の細胞の表面に会合するのを容易にすることができるリポソーム製剤も有用である。この方法を用いて、癌細胞等の異常細胞のマクロファージ及びリンパ球の免疫認識の特異性を利用することによって、薬物の標的細胞への送達を促進してもよい。

10

【0113】

「薬学的に許容可能な製剤」は、所望の活性を得るのに最適な身体箇所、本発明の核酸分子を有効に分布することを可能にする組成物又は製剤を意味する。本発明の核酸分子を有する製剤に適切な薬剤の例には：CNSに薬物が入るのを促進することができる（Pluronic P85等の）P-糖タンパク阻害剤 [Jolliet-Riant and Tillement, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13:16-26 (1999)]；脳内移植後の徐放性送達のためのポリ（DL-ラクチド-グリコリコリド）マイクロスフェア等の生物分解性ポリマー（Emerich, D F等, *Cell Transplant*, 8:47-58 (1999)]（Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.）；及び、薬物を血液脳関門を越えて送達することができ、且つ、ニューロンへの取り込みメカニズムを変えることができるポリブチルシアノアクリレートでできたもの等のロードしたナノ粒子（Prog *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 23:941-949, (1999)]が含まれるが、それらに限定されない。本発明の核酸分子の他の送達戦略の例には、Boado等, *J. Pharm. Sci.*, 87:1308-1315 (1998)；Tyler等, *FEBS Lett.*, 421:280-284 (1999)；Pardridge等, *PNAS USA*, 92:5592-5596 (1995)；Boado, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 15:73-107 (1995)；Aldrian-Herrada等, *Nucleic Acids Res.*, 26:4910-4916 (1998)；及びTyler等, *PNAS USA*, 96:7053-7058 (1999)に記載されている物質が含まれるが、それらに限定されない。

20

30

【0114】

本発明には、保管又は投与の目的で調製された組成物も含まれる。その組成物は、薬学的に許容可能な担体又は希釈剤に所望の化合物の薬剤として有効な量を含む。治療のための使用に許容可能な担体又は希釈剤は、薬剤分野では公知であり、例えば、Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)に記載されている。例えば、保存剤、安定剤、色素及び香料を含んでもよい。これらには、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、及びp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが含まれる。更に、酸化防止剤及び懸濁化剤を使用してもよい。

40

【0115】

薬学的有効量は、疾患状態の予防、疾患状態の発生の障害、又は疾患状態の治療（症状

50

のある程度までの緩和、好ましくは症状の全ての緩和)に必要な用量である。薬学的有効量は、疾患の種類、使用される組成物、投与経路、治療される哺乳動物の種類、治療を検討している具体的な哺乳動物の身体的特性、併用薬剤、及び、医療分野の当業者が認識する他の要因によって決まる。一般的に、活性成分の0.1mg/kgと100mg/kg体重/日との間の量を、負に帯電したポリマーの効力に依存して投与する。

【0116】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適切な賦形剤との混合物の形で活性物質を含む。このような賦形剤は、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-メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリジン、トラガカントゴム及びアカシアゴム等の懸濁化剤である。分散剤及び湿潤剤は、例えばレシチン等の天然産リン脂質、又は、例えばポリオキシエチレンステアレート等のアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、又は、例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール等の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、又は、例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート等のエチレンオキシドと、脂肪酸及びヘキシトール由来の部分エステルとの縮合物、又は例えばポリエチレンソルビタンモノオレエート等のエチレンオキシドと、脂肪酸及びヘキシトール無水物由来の部分エステルとの縮合物であってよい。水性懸濁剤は更に、例えばエチル又はn-プロピルp-ヒドロキシベンゾアート等の1つ又はそれ以上の保存剤と、1つ又はそれ以上の着色剤と、1つ又はそれ以上の矯味剤と、例えばスクロース又はサッカリン等の1つ又はそれ以上の甘味剤とを含んでもよい。

10

20

【0117】

油性懸濁剤は、例えば落花生油、オリーブ油、ゴマ油若しくはココナツ油等の植物油、又は、液状パラフィン等の鉱油に、活性成分を懸濁することによって調剤することができる。油性懸濁剤は、例えば、蜜蝋、硬質パラフィン又はセチルアルコール等の増粘剤を含むことができる。甘味剤及び矯味剤を加えて、味の良い経口製剤を提供することができる。これらの組成物は、アスコルビン酸等の酸化防止剤を添加して保存することができる。

【0118】

水を加えて水性懸濁剤を調製するのに適した分散性分散剤及び顆粒剤は、分散剤若しくは湿潤剤、懸濁化剤、及び、1つ又はそれ以上の保存剤と混合した形で活性成分を提供する。適切な分散剤若しくは湿潤剤、又は懸濁化剤の例は前述のものである。更に、例えば、甘味剤、矯味剤及び着色剤等の賦形剤が存在してもよい。

30

【0119】

本発明の医薬組成物は水中油型乳剤の形態であってもよい。油性相は、植物油、鉱油、又は、それらの混合物であってよい。適切な乳化剤は、例えばアカシアゴム又はトラガカントゴム等の天然産ゴム、例えば大豆、レシチン等の天然産リン脂質、例えばソルビタンモノオレエート等の脂肪酸及びヘキシトール無水物由来のエステル又は部分エステル、並びに、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート等の前記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物であってよい。乳剤は、甘味剤及び矯味剤を更に含んでもよい。

40

【0120】

医薬組成物は、滅菌注射可能な水性又は油性懸濁剤の形態であってよい。この懸濁剤は、上述の適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を用いて公知の技術に従って調剤することができる。滅菌注射可能製剤は、例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液等の、非経口投与可能な無毒性の希釈剤又は溶媒中の滅菌注射可能な溶液又は懸濁剤であってもよい。使用できる許容可能なビヒクル及び溶媒は、水、リンガー溶液及び生理食塩水である。更に、滅菌不揮発性油が、溶媒又は懸濁化媒体として、従来用いられている。このためには、合成モノ-又はジグリセリドを含む任意の無刺激性不揮発性油を用いることができる。また、オレイン酸等の脂肪酸も注射剤の調製に用いられている。

【0121】

s i N A は、例えば薬物を直腸投与するために、坐薬の形態で投与することもできる。

50

これらの組成物は、薬物を、常温では固体であるが直腸温では液体であり、従って直腸内で融解して薬物を放出する適切な無刺激性賦形剤と混合することによって調製することができる。そのような物質には、ココアバター及びポリエチレングリコールが含まれる。

【0122】

s i N A は、例えば、2' - アミノ、2' - C - アリル、2' - フルオロ、2' - O - メチル、2' - H 等のヌクレアーゼ耐性基を用いて修飾することによって安定性を大きく促進することができる (Usman and Cedergren, TIBS 17: 34 (1992); Usman 等, Nucleic Acids Symp. Ser. 31: 163 (1994) を参照)。S i N A 構築物は、ゲル電気泳動によって一般的な方法を用いて精製してもよく、高圧液体クロマトグラフィーを用いて精製してもよく、水に再懸濁する。

10

【0123】

修飾 (塩基、糖、及び / 又はリン酸) を有する核酸分子を化学的に合成することによって、その核酸分子が血清リボヌクレアーゼによって分解されるのを防ぐことができ、核酸分子の効力を高めることができる。例えば、Eckstein 等, 国際公開番号 WO 92 / 07065; Perrault 等, Nature 344: 565 (1990); Pieken 等, Science 253, 314 (1991); Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17: 334 (1992); Usman 等, 国際公開番号 WO 93 / 15187; Rossi 等, 国際公開番号 WO 91 / 03162; Sproat, 米国特許第 5, 334, 711 号; Gold 等, 米国特許第 6, 300, 074 号を参照。上述の参照文献は全て、本明細書に記載の塩基、リン酸及び / 又は糖の部分に行うことのできる様々な化学修飾について記載している。

20

【0124】

核酸分子のヌクレアーゼに対する安定性と、有効性とを有意に促進しながら、核酸分子に導入することのできる糖、塩基及びリン酸修飾を記載する、当技術分野における幾つの例がある。例えば、オリゴヌクレオチドを、2' - アミノ、2' - C - アリル、2' - フルオロ、2' - O - メチル、2' - O - アリル、2' - H、ヌクレオチド塩基修飾等のヌクレアーゼ耐性基を用いた修飾によって、修飾して安定性及び / 又は生物活性を促進する。Usman and Cedergren, TIBS. 17: 34 (1992); Usman 等, Nucleic Acids Symp. Ser. 31: 163 (1994); Burgin 等, Biochemistry, 35: 14090 (1996) を参照。核酸分子の糖の修飾は、当技術分野では幅広く記載されている。Eckstein 等, PCT 国際公開番号 WO 92 / 07065; Perrault 等, Nature, 344, 565 - 568 (1990); Pieken 等, Science, 253: 314 - 317 (1991); Usmati and Cedergren, Trends in Biochem. Sci, 17: 334 - 339 (1992); Usman 等, PCT 国際公開番号 WO 93 / 15187; Sproat, 米国特許第 5, 334, 711 号; Beigelman 等, 1995, J. Biol. Chem., 270, 25702; Beigelman 等, PCT 国際公開番号 WO 97 / 26270; Beigelman 等, 米国特許第 5, 716, 824 号; Usman 等, 米国特許第 5, 627, 053 号; Woolf 等, PCT 国際公開番号 WO 98 / 13526; Thompson 等, Karpinsky 等, Tetrahedron Lett., 39: 1131 (1998); Earnshaw and Gait, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences), 48: 39 - 55 (1998); Verma and Eckstein, Annu. Rev. Biochem., 67: 99 - 134 (1998); 及び Burlina 等, Bioorg. Med. Chem., 5: 1999 - 2010 (1997) を参照。このような出版物は、触媒作用を調節することなしに、糖、塩基及び / 又はリン酸修飾等を核酸分子に組み込む位置を決定する一般的な方法及び戦略を記載している。これらの教示を考慮して、s i N A の細胞の RNA i を促す能力が有意に阻害されない限り、本明細書に記載する同様の修飾を用いて、本発明の s i N A 核酸分子を修飾

30

40

50

することができる。

【0125】

ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートを有するオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合、及び/又は5'-メチルホスホネート結合の化学修飾は、安定性を向上させる一方、過剰な修飾によって、毒性を引き起こしたり、活性を減じることがある。従って、核酸分子を設計するときは、ヌクレオチド間結合の量を最小化しなければならない。これらの結合の濃度を低減することで、毒性を低下させ、これら分子の有効性を向上させ、特異性を高めることができる。

【0126】

一実施形態において、本発明は、1つ又はそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、リン酸トリエステル、モルホリノ、アミデートカルバメート、カルボキシメチル、アセトアミデート (acetamidate)、ポリアミド、スルホン酸塩、スルホンアミド、スルファミン酸、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、及び/又はアルキルシリル、の置換基を含むリン酸バックボーン修飾した、修飾 siNA 分子を特徴とする。オリゴヌクレオチドバックボーン修飾に関しては、Hunziker and Leumann, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, in Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417 (1995) 及び Mesmaeker 等, *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS 24-39 (1994) を参照。

10

20

【0127】

核酸分子の送達方法については、Akhtar 等, *Trends Cell Biol.*, 2:139 (1992); *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, (1995), Maurer 等, *Mol. Membr. Biol.*, 16:129-140 (1999); Hofland and Huang, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 137:165-192 (1999); 及び Lee 等, *ACS Symp. Ser.*, 752:184-192 (2000) に記載されている。Beigelman 等, 米国特許第 6,395,713 号及び Sullivan 等, PCT 番号 WO94/02595 には、更に核酸分子の一般的な送達方法が記載されている。任意の核酸分子のほとんどの送達に、これらのプロトコルを利用することができる。核酸分子は、当業者に公知の様々な方法で細胞に投与することができる。それらの方法には、リポソームカプセル化、イオントフォレーゼ、又は生物分解性ポリマー、ヒドロゲル、シクロデキストリン等の他のビヒクルへの組み込み (例えば、Gonzalez 等, *Bioconjugate Chem.*, 10:1068-1074 (1999); Wang 等, PCT 国際公開番号 WO03/47518 及び WO03/46185 を参照)、ポリ(ラクティック-co-グリコリック)酸 (PLGA) 及び PLCA マイクロスフェア (例えば、米国特許第 6,447,796 号及び米国特許出願第 US2002130430 号を参照)、生物分解性ナノカプセル及び生体接着性マイクロスフェア、又はタンパク質性ベクター (O'are and Normand, PCT 国際公開番号 WO00/53722) が含まれるが、これらに限定されない。或いは、核酸/ビヒクルの組み合わせを、直接注射することにより、又は輸液ポンプを用いることにより、局所的に送達する。本発明の核酸分子の直接注射は、皮下注射、筋肉内注射又は皮内注射のいずれであっても、標準的な針とシリンジの方法を用いてもよく、Conry 等, *Clin. Cancer Res.*, 5:2330-2337 (1999) and Barry 等, PCT 国際公開番号 WO99/31262 に記載されている技術等の針を使わない技術で行ってもよい。本発明の分子は、薬剤として使用することができる。薬剤は、対象の疾患状態の予防、疾患状態の発生の調節、又は疾患状態の治療 (症状をある程度まで、好ましくは症状の

30

40

50

全てを緩和)を行う。

【0128】

本明細書及び請求項において、「a」、「an」、「the」の単数形は複数形を含む。但し、コンテキストにより明らかに複数形を含まない場合は、この限りではない。

【0129】

実施例

実施例 1

ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと複合した siRNA を含む組成物の生産及び特徴

本発明の候補 siRNA とポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドとの複合体を形成するためには、十分な量の siRNA を、例えば、Opti-MEM (登録商標) 細胞培地 (Invitrogen 社) において、規定の割合で、所定の量のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと混ぜ合わせ、室温で約 10 分から 30 分培養する。次に、この混合物を、選択した体積、例えば 50 μ l を標的細胞に接触させ、その細胞を、所定の培養時間、本実施例においては約 2 時間培養した。siRNA / ペプチド混合物は、任意で、細胞培養培地、又は、ウシ胎仔血清等の他の添加剤を含んでもよい。H3, H4 及び H2b に関しては、これらのポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを siRNA と異なった割合で複合する一連の実験を行った。一般的に、これは、siRNA / ヒストン割合が、1 : 0.01 から 1 : 50 で開始した。96 ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに、40 pm の siRNA を加えた。各ウエルは、50% の密集度で beta-gal 細胞を含んでいた。トランスフェクション効率の例示の最適化割合を次の表 2 に示す。

【0130】

トランスフェクションは、通常の siRNA 又は上に特定したヒストンタンパク質の 1 つと複合した siRNA を用いて、9L / beta-gal 細胞で行った。siRNA は、ベータガラクトシダーゼ mRNA を特異的にノックダウンするように設計した。活性は、対照群の beta-gal 活性のパーセンテージとして表した。(対照細胞は、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを用いずに、リポフェクタミンを用いて、トランスフェクトした。)

【0131】

siRNA 送達の効率を検出及び / 又は定量化するアッセイは、例えば、ベータガラクトシダーゼアッセイ又はフローサイトメトリー法等、従来の方法を用いて行う。

【0132】

ベータガラクトシダーゼアッセイに関しては、9L / LacZ 細胞、ベータガラクトシダーゼを構成的に発現する細胞株を用いた。9L / LacZ 細胞は、LacZ を構成的に発現するラット神経膠肉腫線維芽細胞で、ATCC (# CRL - 2200) から得た。9L / LacZ 細胞は、DMEM 培地 (Dulbecco's Modified Essential Medium) において、1 mM ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、及び 20% ウシ胎仔血清を添加して成長させた。細胞は、100 ユニット / ml ペニシリン、100 μ g / ml ストレプトマイシン及び 0.25 mg / ml ファンギゾン (Fungizone) (Invitrogen 社) を含む抗生物質の混合物を添加し、37、5% CO₂ 環境下で培養した。beta-gal mRNA に対抗して設計された siRNA 二重鎖 (duplex) を化学的に合成し、ノックダウン効率を評価するために送達試薬と共に用いる。

【0133】

siRNA 合成及び調製

オリゴヌクレオチドの合成を、標準的な 2 - シアノエチルフォスフォアミダイト法を用いて、最適な 5' - O - ジメチルトリチル - 2' - O - t - ブチルジメチルシリル - 3' - O - スクシニルリボヌクレオチド又は、適用できる場合には 5' - O - ジメチルトリチル - 2' - デオキシ - 3' - O - スクシニルチミジン支持体で誘導体化された長鎖アルキルアミン細孔性ガラス上で行った。全てのオリゴヌクレオチドを、0.2 又は 1 μ mol

スケールでABI 3400 DNA/RNA シンセサイザを用いて合成し、濃縮NH₄OHを用いて固体支持体から切断し、55 で、NH₄OH : EtOH 3 : 1の混合物を用いて、脱保護した。2' - TBDMS 保護基の脱保護は、塩基脱保護RNAをN - メチルピロリドン/トリエチルアミン/トリエチルアミントリス(フッ化水素塩)(体積比6 : 3 : 4)の溶液(600 μL / μmol)を用いて65 で2.5時間、培養することによって達成した。対応するビルディングブロックである、A、U、C及びGの5' - ジメトキシトリチル - N - (tac) - 2' - O - (t - ブチルジメチルシリル) - 3' - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - フォスフォアミダイト(Proligo, Boulder社)、及び修飾フォスフォアミダイトである、5' DMTr - 5 - メチル - U - TOM - CE - フォスフォアミダイト、5' - DMTr - 2' - OMe - Ac - C - CEフォスフォアミダイト、5' - DMTr - 2' - OMe - G - CEフォスフォアミダイト、5' - DMTr - 2' - OMe - U - CEフォスフォアミダイト、5' - DMTr - 2' - OMe - A - CEフォスフォアミダイト(Glen Research社)は、供給業者から直接購入した。トリエチルアミン - 三フッ化水素塩、N - メチルピロリジン及び濃縮水酸化アンモニウムは、Aldrich社から購入した。全てのHPLC分析及び精製は、Xterra(登録商標)カラムを用いて、Waters 2690で行った。他の試薬は全て、Glen Research社から購入した。オリゴヌクレオチドは、RP - HPLC判定で97%以上の純度に精製した。マウス注射用siRNAは、Qiagen社から購入し、in vivo注射に許容可能なエンドトキシンのレベルでアニーリングした後、HPLC精製した。

10

20

【0134】

トランスフェクション手順

トランスフェクション手順の第1日目に、飽和9L/LacZ培養液をT75フラスコから取り出し、細胞を分離し、10mlの完全培地(DMEM、1xPS、1xピルビン酸Na、1xNEAA)に希釈する。細胞を、更に1 : 15まで希釈し、この調製物100 μlを96ウエルプレートのウエルに等分すると、翌日までにトランスフェクション用に一般的に約50%コンフルエントな細胞密度を産出する。ウエルの端を空にして、250 μlの水で満たし、プレートを培養器(5%CO₂培養器)中に、37 で一晩、積み重ねずに置く。

30

【0135】

第2日目に、各ウエル50 μlのOpti - MEMでトランスフェクション複合体を調製する。培地をプレートから取り除き、ウエルを200 μlのPBS又はOpti - MEMで一度洗う。プレートを逆さにしてティッシュでふき取り、完全に乾かす。次に、トランスフェクション混合物を、各ウエルに加え(50 μl/ウエル)、それらのウエルの乾燥を防ぐために、250 μlの水をウエルの端に加える。次に、細胞を37 (5%CO₂培養器)で少なくとも3時間培養する。トランスフェクション混合物を取り除き、100 μlの完全培地(DMEM、1xPS、1xピルビン酸Na、1xNEAA)で置き換える。細胞を、所定の時間培養し、次に酵素アッセイのために収穫する。

40

【0136】

ベータガラクトシダーゼmRNAをサイレンシングするために用いたsiRNA配列は、次の配列であった。

C . U . A . C . A . C . A . A . A . U . C . A . G . C . G . A . U . U . U . d T
 . d T (センス) (SEQ ID NO : 32)

A . A . A . U . C . G . C . U . G . A . U . U . U . G . U . G . U . A . G . d T
 . d T (アンチセンス) (SEQ ID NO : 33)

40

【0137】

本実施例に関するデータを表2に示す。トランスフェクション効率は、細胞溶解物から測定したベータガラクトシダーゼ活性の量と逆相関する。トランスフェクション時に、測定されたベータガラクトシダーゼ活性の減少は、トランスフェクションの成功を示す。従って、トランスフェクションが起こっていない場合は、測定されたベータガラクトシダー

50

ゼ活性は100%であり、トランスフェクション効率0%である。ベータガラクトシダーゼ活性が減少すると、トランスフェクション効率が増加する。例えば、表2において、ヒストンH2BプラスsiRNAは、62.03%のトランスフェクション効率となり、測定されたベータガラクトシダーゼ活性は37.97%に減少したことを示す。表3に示したデータに関しても、トランスフェクション効率の決定に同じ方法を用いた。

【0138】

表2：

9L/LacZ 細胞における ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドが媒介する siRNA 送達の効率

トランスフェクション混合物	トランスフェクション効率 (細胞全体の%)	モル比： (siRNA: ペプチド)
siRNA (40 pmol/ ウェル) 単独	0.09	
カチオン脂質 (Invitrogen 社)	84.32	unknown
ヒストン H2B	62.03	1:10-15
ヒストン H3	85.08	1:10-20
ヒストン H4	72.07	1:4-8
GEQIAQLIAGYIDILK K K K K S K (SEQ ID NO: 31)	50.86	1:5-20
WWETWKPFQCRICMRNFSTRQARRNHRRRHR (SEQ ID NO: 27)	98.29	1:0.5-4
Poly Lys-Trp, 4:1, MW 20,000-50,000	71.92	1:2-8
Poly Orn-Trp, 4:1, MW 20,000-50,000	74.16	1:2-8

10

20

【0139】

siRNA / ペプチド / 脂質

カチオン脂質を、siRNA / ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド混合物、複合体又は共役体に加える効果を評価するために、リポフェクタミン (Invitrogen 社) を、製造元の指示 (0.2 μl / 100 μl Opti-MEM) に従って、一定の濃度で siRNA / ポリヌクレオチド送達製剤に加えた以外は、上記手順に従った。

【0140】

GKINLKALAA LAKKIL (SEQ ID NO: 28)、siRNA 及び LIPOFECTIN (登録商標) (Invitrogen 社) から構成される組成物を生産するために、最初に、siRNA とペプチドを、室温で、Opti-MEM 細胞培養培地において混ぜ、その後、LIPOFECTIN (登録商標) を室温で、その混合物に加えて、siRNA / ペプチド / カチオン脂質組成物を形成した。

30

【0141】

RVIRVWFQNK RCKDKK (SEQ ID NO: 29)、siRNA 及び LIPOFECTIN (登録商標) から構成される組成物を生産するために、最初に、ペプチドと LIPOFECTIN (登録商標) を Opti-MEM 細胞培養培地において混ぜ、その混合物に siRNA を加えて、siRNA / ペプチド / LIPOFECTIN (登録商標) 組成物を形成した。

【0142】

GRKKRRQR RRPPQGRKKRRQR RRPPQGRKKRRQR RRPPQ (SEQ ID NO: 30) 又は GEQIAQLIAGYID IILK K K K S K (SEQ ID NO: 31) を用いて、siRNA / ペプチド / カチオン脂質組成物を生産するためには、成分を加える順番は問題ではない。

40

【0143】

siRNA / メリチン / LIPOFECTIN (登録商標) を生産するために、最初に siRNA とメリチンを Opti-MEM 細胞培養培地において混ぜ、その後、その混合物に LIPOFECTIN (登録商標) を加えた。

【0144】

siRNA / ヒストン H1 / LIPOFECTIN (登録商標) の組成物を生産するためには、最初にヒストン H1 及び LIPOFECTIN (登録商標) を Opti-MEM

50

細胞培養培地と一緒に加えて、完全に混ぜ、その後、*siRNA*を加えて、ヒストンと *L IPO F E C T I N*（登録商標）の混合物と完全に混ぜ、*siRNA* / ヒストン *H 1* / *L IPO F E C T I N*（登録商標）組成物を形成した。

【 0 1 4 5 】

表 3 :

9L/LacZ 細胞における、カチオン脂質が存在するときと存在しないときのポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドが媒介する *siRNA* 送達の効率

トランスフェクション混合物	脂質が存在するときのトランスフェクション効率 (細胞全体の%)	脂質が存在しないときのトランスフェクション効率 (細胞全体の%)	トランスフェクション混合物に加えられた <i>siRNA</i> : ペプチド
<i>siRNA</i> 単独	01.72	00.11	
リポフェクタミン (ペプチドなし)	83.48		
GKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 28)	89.67	00.26	1:5-20
RVIRVWFQNKRCCKDKK (SEQ ID NO: 29)	89.00	00.59	1:1-5
GRKKRRQRRRPPQGRKKRRQ RRRPPQGRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 30)	89.99	54.58	1:5
GEQIAQLLAGYIDILKKKSK (SEQ ID NO: 31)	90.01	50.86	1:5-10
メリチン	93.10	05.15	1:20
ヒストン <i>H1</i>	93.39	00.14	1:10-20

10

20

【 0 1 4 6 】

前述の結果に基づいて、本発明の例示のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドが、*siRNA*の細胞への取り込みを実質的に促進することができること、また、本発明の一部の *siRNA* / ポリペプチド混合物に任意でカチオン脂質を加えると、*siRNA*の送達効率を実質的に向上させることがあるのは明らかである。

【 0 1 4 7 】

実施例 2

T A T - H A ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと共役した *siRNA* を含む組成物の生産と特徴

本実施例は、*siRNA*二重鎖 (*duplex*) の1本の鎖に共有結合により共役した特異的ペプチドの合成と取り込み活性を記載する。これらの共役体は効率的に *siRNA* を細胞質に送達する。

30

【 0 1 4 8 】

ペプチド及びRNAを、標準的な固体相合成方法を用いて調製する。

【 0 1 4 9 】

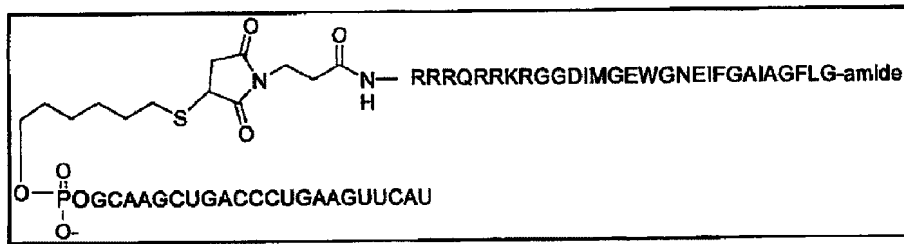
共役体を形成するためには、ペプチドとRNA分子を、互いの共役結合を可能にするために特異的部分で官能化しなければならない。ペプチドに関しては、N末端を3-マレイミドプロピオン酸で官能化する。RNA分子に関しては、センス鎖の5'端及びアンチセンス鎖の3'端を、標準的な手順を用いて、1-O-ジメトキシトリチル-ヘキシル-ジスルフィドリンカーで官能化する。

40

【 0 1 5 0 】

図 :

ペプチド-siRNA 共役体の構造 (SEQ ID NOS 34 and 35)



【0151】

トランスフェクション時に、細胞が50から80%コンフルエントな密度になるように、細胞を1日前にプレートに置いた。複合体に関しては、*siRNA*及びペプチドをOpti-MEM(登録商標)培地(Invitrogen社)に希釈し、その後、混合して、5分から10分複合し、PBSで洗った細胞に加えた。*siRNA*の最終濃度は、各ペプチド濃度(2-50 μ M)で500nMであった。共役体も、Opti-MEM(登録商標)培地で希釈し、62.5nMから500nMの最終濃度で細胞に加えた。500nMの最終濃度で、共役体を20%FBSと混ぜてすぐに、洗った細胞に加えた。細胞を、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で3時間トランスフェクトした。細胞をPBSで洗い、トリプシン処理した後、フローサイトメトリーによって分析した。*siRNA*の取り込みをCy5蛍光強度によって測定し、細胞生存性を、プロピジウムイオダイドを添加して評価した。

10

20

【0152】

図1に示すように、ペプチド/*siRNA*共役体は、ペプチド/*siRNA*複合体より大きいマウス尾繊維芽細胞へのより大きいパーセントの取り込みを達成する。更に、ペプチド/*siRNA*共役体は、ペプチド/*siRNA*複合体より高い平均蛍光強度(MFI、図2)を達成した。従って、一実施形態においては、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを*siRNA*分子と共役させるのが望ましいことが、これらのデータによって示される。

【0153】

実施例3

9L/LacZ細胞における*siRNA*の取り込みのための*siRNA*/送達ペプチド複合体のスクリーニング

30

本発明の合理的に設計したポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドの幅広い多様なアセンブリは、*siRNA*と複合すると、*siRNA*取り込みを促進するという、追加の証拠を本実施例は提供する。

【0154】

取り込みは、実施例2で記載したようにトランスフェクトした9L/LacZ細胞を用いて、測定した。細胞をPBSで洗い、トリプシン処理した後、フローサイトメトリーによって分析した。*siRNA*取り込みをFAM蛍光強度により測定し、細胞生存性を、プロピジウムイオダイドを加えて評価した。下記の表4は、各種の合理的に設計されたポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドに関する9L/LacZ細胞における細胞への取り込みをパーセントで表したデータをまとめたものである。この表に含まれるのは、用いられたペプチド及び*siRNA*の濃度である。

40

【0155】

表4：

9L/LacZ 細胞における合理的に設計したポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドが媒介する siRNA 取り込み効率

PN #	配列	ペプチド 濃度	siRNA 濃度	取り込み% (%PI- /FAM+)
PN173	GRKKRRQRRRPPQC (SEQ ID NO: 36)	10uM	400nM	84.8
PN227	Maleimide-AAVALLPAVLLALLAPRKKRRQRRRPPQ-amide (SEQ ID NO: 37)	1uM	400nM	31.0
PN27	AAVALLPAVLLALLAPRKKRRQRRRPPQC (SEQ ID NO: 38)	1uM	400nM	82.6
PN275	Maleimide-AAVALLPAVLLALLAPRKKRRQRRRPPQ-amide (SEQ ID NO: 37)	4uM	400nM	95.3
PN28	NH2-RKKRRQRRRPPQCAAVALLPAVLLALLAP-amide (SEQ ID NO: 39)	2uM	400nM	79.3
PN69	BrAc-GRKKRRQRRRPPQ-amide (SEQ ID NO: 40)	80uM	400nM	0.0
PN81	BrAc-RRRQRRKRGGDIMGEWGNIFGAIAGFLGamide (SEQ ID NO: 41)	8uM	800nM	97.9
PN250	NH2-RRRQRRKRGGDIMGEWGNIFGAIAGFLG-amide (SEQ ID NO: 35)	15uM	800nM	99.5
PN204	C(YGRKKRRQRRR)2 (SEQ ID NO: 42)	1.4uM	800nM	82.5
PN280	Maleimide-GRKKRRQRRRPPQ-amide (SEQ ID NO: 43)	80uM	400nM	7.9
PN350	NH2-KLWKA WPKLWKKLWKP-amide (SEQ ID NO: 44)	10uM	400nM	0.0
PN365	AAVALLPAVLLALLAPRRRRR-amide (SEQ ID NO: 45)	10uM	400nM	81.4
PN366	RLWRALPRVLRLLRP-amide (SEQ ID NO: 46)	10uM	400nM	0.0
PN29	NH2-AAVALLPAVLLALLAPSGASGLDKRDYV-amide (SEQ ID NO: 47)	80uM	400nM	86.5
PN235	Maleimide-AAVALLPAVLLALLAPSGASGLDKRDYV-amide (SEQ ID NO: 48)	80uM	400nM	0.0
PN30	NH2-SGASGLDKRDYVAAVAALLPAVLLALLAP-amide (SEQ ID NO: 49)	80uM	400nM	0.0
PN202	NH2-LLETLLKPFQCRICMRNFSTRQARRNHRHRHRR-amide (SEQ ID NO: 50)	2uM	400nM	70.8
PN225	NH2-AAVACRICMRNFSTRQARRNHRHRHRR-amide (SEQ ID NO: 51)	2uM	400nM	30.9
PN236	Maleimide-RQIKIWFQRRMKWKK-amide (SEQ ID NO: 52)	10uM	400nM	37.7
PN58	RQIKIWFQRRMKWKK amide (SEQ ID NO: 53)	40uM	400nM	75.8
PN251	NH2-RQIKIWFQRRMKWKKDIMGEWGNIFGAIAGFLG-amide (SEQ ID NO: 54)	4uM	400nM	44.5
PN279	Maleimide-SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK-amide (SEQ ID NO: 55)	40uM	400nM	24.7
PN61	SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGC-amide (SEQ ID NO: 56)	80uM	800nM	86.8
PN360	KGSKKAVTKAQKKGKRRSRK-amide (SEQ ID NO: 57)	80uM	400nM	0.0
PN361	NH2-KKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-amide (SEQ ID NO: 58)	10uM	400nM	42.0

10

20

30

PN73	KGSKKAVTKAQKKDGGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 59)	10uM	400nM	99.5
PN64	BrAc-GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKILamide (SEQ ID NO: 60)	10uM	400nM	14.5
PN159	KLAIKLALKALKAALKLAamide (SEQ ID NO: 13)	08nM	80nM	16.4
PN68	BrAc-KLALKLALKALKAALKLAamide (SEQ ID NO: 61)	10uM	400nM	0.0
PN182	Ac-KETWWETWWTEWSQPKKRRKV-amide (SEQ ID NO: 62)	1uM	400nM	84.9
PN183	NH2-KETWWETWWTEWSQPGRKKRRRPPQ-amide (SEQ ID NO: 63)	20uM	400nM	78.1
PN71	BrAc-RRRRRRR (SEQ ID NO: 64)	80uM	400nM	0.0
PN87	QqQqQqQqQq (SEQ ID NO: 65)	10uM	400nM	0.0
PN249	NH2-RRRQRRRGqQqQqQqQqQq-amide (SEQ ID NO: 66)	80uM	400nM	0.0
PN158	RVRWFQNKRCCKDKK-amide (SEQ ID NO: 67)	1uM	400nM	94.0
PN86	Ac-LGLLLRHLRHHSNLLANI-amide (SEQ ID NO: 68)	80uM	400nM	62.2
PN162	GQMSEIEAKVRTVKLARS-amide (SEQ ID NO: 69)	80nM	400nM	0.0
PN228	NH2-KLWSAWPSLWSSLWKP-amide (SEQ ID NO: 70)	80uM	400nM	6.8
PN357	NH2-KKKKKKKKKK-amide (SEQ ID NO: 71)	10uM	400nM	0.0
PN358	NH2-AARLHRFKNKGKSTEMRRRR-amide (SEQ ID NO: 72)	40uM	400nM	0.0
PN283	Maleimide-GLGSLKKAGKKLQPKSKRKV-amide (SEQ ID NO: 73)	40uM	400nM	36.3
PN284	Maleimide-Dmt-r-FK-amide (SEQ ID NO: 74)	100uM	400nM	0.0
PN285	Maleimide-Dmt-r-FKQqQqQqQqQqQq-amide (SEQ ID NO: 74)	8uM	800nM	90.7
PN286	Maleimide-WRFK-amide (SEQ ID NO: 75)	80uM	400nM	0.0
PN289	Maleimide-WRFKQqQqQqQqQqQq-amide (SEQ ID NO: 76)	8uM	400nM	91.7
PN267	Maleimide-YRFK-amide (SEQ ID NO: 77)	80uM	400nM	0.3
PN282	Maleimide-YRFKYRFKYRFK-amide (SEQ ID NO: 78)	40uM	800nM	22.8
PN286	Maleimide-WRFK-amide (SEQ ID NO: 75)	80uM	400nM	0.0
PN290	Maleimide-WRFKSKRKV-amide (SEQ ID NO: 79)	80uM	400nM	5.3
PN291	Maleimide-WRFKAAVALLPAVLLALLAP-amide (SEQ ID NO: 80)	4uM	800nM	12.5
PN243	NH2-DiMeYrFKamide (SEQ ID NO: 81)	40uM	400nM	0.0
PN244	NH2-YrFKamide (SEQ ID NO: 82)	80uM	400nM	0.0
PN245	NH2-DiMeYrFKamide (SEQ ID NO: 83)	80uM	400nM	0.0
PN246	NH2-WrFKamide (SEQ ID NO: 84)	80uM	400nM	0.0
PN247	NH2-DiMeYrWKamide (SEQ ID NO: 85)	80uM	400nM	0.0
PN248	NH2-KFrDiMeY-amide (SEQ ID NO: 86)	80uM	400nM	0.0
PN287	Maleimide-WRFKWRFK-amide (SEQ ID NO: 87)	10uM	400nM	8.8
PN288	Maleimide-WRFKWRFKWRFK-amide (SEQ ID NO: 88)	4uM	400nM	9.0

10

20

30

40

【0156】

実施例4

s i R N A / 送 達 は、 I n V i t r o に お い て ポ リ ヌ ク レ オ チ ド 送 達 促 進 ポ リ ペ プ チ ド によつて促進される。

本実施例は、L a c Z 細胞、マウス初代繊維芽細胞及びヒト単核白血球における、本発明のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドによる s i R N A 取り込みの促進を示す。9 L / L a c Z 細胞及びマウス初代繊維芽細胞において行われる実験に用いる物質及び方法は、一般的に上述のものと同じであるが、マウスの実験には、9 L / L a c Z 細胞をマウス尾繊維芽細胞に代えて使用する。マウス尾繊維芽 (M T F) 細胞で行ったトランスフェクションの結果を表5にまとめている。表5は、使用したペプチド及び s i R N A の濃度を、s i R N A 分子と共役した標識と共に示している。M T F 細胞及び9 L / L a c Z 細胞で行ったトランスフェクションの結果を表6にまとめている。表6のデータは、異なった細胞型におけるペプチド / s i R N A 複合体のトランスフェクション効率を比較したものである。

【0157】

表5：

マウス尾絨維芽 (MTF) 細胞における合理的に設計したポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドが媒介する siRNA 取り込み効率

名前	配列	状態	取り込み%	siRNA
PN250	NH2-RRRQRRKRGGDIMGEWGNEIFGAIAGFLG-amide (SEQ ID NO: 35)	0.5uM siRNA/40uM peptide	85.9	Cy5-eGFP
PN73	NH2-KGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-amide (SEQ ID NO: 59)	0.5uM siRNA/5uM peptide	94.5	Cy5-eGFP
PEG-PN509	Peg-KGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-amide (SEQ ID NO: 90)	0.5uM siRNA/25uM peptide	91	Cy5-eGFP
PN404	NH2-RGSRRRAVTRAQRDGRRRRRSRRESYSVYVYRVLRLQ-amide (SEQ ID NO: 91)	0.5uM siRNA/25uM peptide	50.4	Cy5-eGFP
PN361	NH2-KKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-amide (SEQ ID NO: 58)	0.5uM siRNA/50uM peptide	65	Cy5-eGFP
PN27	AAVALLPAVLLALLAPRKRQRPPQC (SEQ ID NO: 38)	0.5uM siRNA/5uM peptide	60.7	Cy5-eGFP
PN58	NH2-RQIKIWFQNRMRKWKK-amide (SEQ ID NO: 53)	1uM siRNA/20uM peptide	3.7	Cy5-eGFP
PN158	NH2-RVIRWFQNKRCCKDKK amide (SEQ ID NO: 67)	0.5uM siRNA/50nM peptide	86.2	Cy5-eGFP
PN316	Maleimido-RVIRWFQNKRSKDKK-amide (SEQ ID NO: 92)	0.5uM siRNA/100uM peptide	84.8	Cy5-eGFP
PN289	Maleimido-WRFKQqQqQqQqQq-amide (SEQ ID NO: 76)	0.5uM siRNA/10uM peptide	7	Cy5-eGFP
PN28	NH2-RKKRRQRPPQCAAVALLPAVLLALLAP-amide (SEQ ID NO: 39)	1uM siRNA/8uM peptide	80.5	Cy5-eGFP
PN173	GRKKRRQRPPQC (SEQ ID NO: 36)	0.5uM siRNA/ 130nM peptide	94.8	Cy5-eGFP
PN159	KLALKLALKALKALKLA-amide (SEQ ID NO: 13)	0.5uM siRNA/5uM peptide	0	Cy5-eGFP
PN161	NH2-GWTLNSAGYLLGKINLKALALAKKIL-amide (SEQ ID NO: 93)	0.5uM siRNA/10nM peptide	0	Cy5-eGFP

10

20

【 0 1 5 8 】

表 6 :

LacZ 細胞およびマウス尾絨維芽細胞における合理的に設計したポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドが媒介する siRNA 取り込み効率

ペプチド	配列	取り込み%	
		LacZ 細胞	初代 MTF 細胞
PN27	NH2-AAVALLPAVLLALLAPRKRQRPPQ-amide (SEQ ID NO: 94)	86	61
PN28	NH2-RKKRRQRPPQAAVALLPAVLLALLAP-amide (SEQ ID NO: 89)	79	81
PN29	NH2-AAVALLPAVLLALLAPSGASGLDKRDYV-amide (SEQ ID NO: 47)	87	not tested
PN58	NH2-RQIKIWFQNRMRKWKK-amide (SEQ ID NO: 53)	76	6
PN61	NH2-SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHLLRKGK-amide (SEQ ID NO: 56)	87	not tested
PN73	NH2-KGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-amide (SEQ ID NO: 59)	91	95
PN158	NH2-RVIRWFQNKRCCKDKK-amide (SEQ ID NO: 67)	94	86
PN173	NH2-GRKKRRQRPPQC-amide (SEQ ID NO: 36)	85	95
PN182	NH2-KETVWBTWTEWSQPKKKRV-amide (SEQ ID NO: 95)	85	not tested
PN202	NH2-LLETLLKPFQCRICMRNFSRQARRNHRHR-amide (SEQ ID NO: 50)	71	not tested
PN204	NH2-C(YGRKKRRQRRR)2-amide (SEQ ID NO: 42)	83	not tested
PN250	NH2-RRRQRRKRGGDIMGEWGNEIFGAIAGFLG-amide (SEQ ID NO: 35)	99	86
PN361	NH2-KKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-amide (SEQ ID NO: 58)	42	65
PN365	NH2-AAVALLPAVLLALLAPRRRRR-amide (SEQ ID NO: 45)	81	not tested
PN404	NH2-RGSRRRAVTRAQRDGRRRRRSRRESYSVYVYRVLRLQ-amide (SEQ ID NO: 91)	not tested	50
PN453	NH2-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKVC-amide (SEQ ID NO: 96)	not tested	79
PN509	Peg-KGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-amide (SEQ ID NO: 90)	not tested	91

30

40

【 0 1 5 9 】

ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドの、培養中の細胞をトランスフェクトする能力を更に特徴付けるために、各種の濃度の PN 7 3、PN 2 5 0、PN 1 8 2、PN 5 8 及

50

びPN158と複合したFITC標識されたsiRNAを用いて、ヒト単核白血球を培養した。ヒト単核白血球は、関節リウマチの治療の標的細胞型なので、LacZ細胞及びマウス繊維芽細胞に加えて用いた。

【0160】

単核白血球は、健康なドナーのヒト新鮮血試料から、FACS分析で95%を超える純粋度まで単離した。

【0161】

単核白血球を、Cy5-又はFAMと共役したsiRNA、及びペプチドを用いて、実施例2の手順でトランスフェクトし、siRNA取り込みを、細胞内Cy5又はFAM蛍光強度によって測定した。細胞生存性は、プロピジウムイオダイド(取り込み)又はAnnexinV-PE(染色)を用いて決定した。

【0162】

図3は、幾つかの異なるポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドの、培養中のヒト単核白血球におけるsiRNA取り込みを促進する能力を示す。リポフェクタミンによるトランスフェクションを比較として用いた。細胞生存性も、各ペプチドに関して評価した。ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド、PN73は、関節リウマチの治療候補として理想的であることが、その結果より明らかになった。PN73ペプチドは、ヒト単核白血球によるsiRNA取り込みを高い効率及び低い毒性で促進するという驚くべき予想外の発見がそのデータより明らかとなり、PN73ペプチドが*in vivo*における関節リウマチの治療に使用できることを示唆している。

【0163】

実施例5

siRNA/送達は、ペプチド-siRNA共役体により促進される。

本実施例は、siRNA/ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド共役体の、9L/LacZ培養細胞株と、マウス尾からの初代繊維芽細胞とにおけるsiRNAの取り込みを誘導又は促進する活性を評価するためのスクリーニングの結果を提供する。9L/LacZ細胞で行ったトランスフェクションの結果を、表7にまとめる。MTFで行ったトランスフェクションの結果を、表8にまとめる。

【0164】

表7:

LacZ細胞における、siRNAsと共役した合理的に設計したポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドが媒介するsiRNA取り込み効率

共役体	ペプチド	siRNA	ペプチド/siRNA濃度	取り込み%
CoP267nfR137-1	YRFK (SEQ ID NO: 97)	FAM-β-gal	2.0uM までテスト	0
CoP286nfR138-1	WRFK] (SEQ ID NO: 98)	FAM-β-gal	0.8uM	0
CoP287nfR138-1	(WRFK)2 (SEQ ID NO: 99)	FAM-β-gal	0.8uM	0
CoP284nfR164-1	Dmt-r-FK	FAM-β-gal	tested up to 1.0uM	0
CoP282nfR165-1	(YRFK)3 (SEQ ID NO: 100)	FAM-β-gal	tested up to 1.0uM	0
CoP290nfR165-1	WRFKKSkrKV (SEQ ID NO: 101)	FAM-β-gal	tested up to 1.0uM	0
CoP277nfR167-1	PN73	FAM-β-gal	1.0uM	42.9
CoP277nfR167-2	PN73	FAM-β-gal	2.0uM	55.4

【0165】

表8:

10

20

30

40

マウス尾繊維芽細胞における、**siRNAs** と共役した合理的に設計したポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドが媒介する **siRNA** 取り込み効率

名前	配列	siRNA	濃度	取り込み%
Cy5-dsCoP278nfr270	Maleimide-RRRQRRKRGGDIMGEWGNFAGIAGFLG-amide (SEQ ID NO: 102)	Cy5-eGFP	0.5μM	96.3
dsCoP277nfr317	Maleimide-KGSKKAVTKAQKKDGGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-amide (SEQ ID NO: 103)	Cy5-eGFP	4μM	83.5
dsCoP275nfr321	Maleimide-AAVALLPAVLLALLAPRKKRRQRRRPPQ-amide (SEQ ID NO: 37)	Cy5-eGFP	4μM	52.1
dsCoP285nfr322-1	Maleimide-Dmt-r-FKQqQqQqQqQq-amide (SEQ ID NO: 74)	Cy5-eGFP	4μM	41.3
dsCoP236nfr332	Maleimide-RQIKIWFQNRMRKWKK-amide (SEQ ID NO: 52)	Cy5-eGFP	4μM	36.3
dsCoP317nfr320	Maleimido-KETWWETWWTEWSQPKKRKRK-amide (SEQ ID NO: 104)	Cy5-eGFP	2μM	29.6
dsCoP316nfr347	Maleimido-RVIRWFQNKRSKDKK-amide (SEQ ID NO: 92)	Cy5-eGFP	2μM	17.1
dsCoP289nfr268	Maleimide-WRFKQqQqQqQqQq-amide (SEQ ID NO: 76)	Cy5-eGFP	4μM	3.2
dsCoP276nfr319	Maleimide-RKKRRQRRRPPQCAAVALPAVLLALLAP-amide (SEQ ID NO: 105)	Cy5-eGFP	2μM	3.6
dsCoP298nfr248	NH2-WRFKC-amide (SEQ ID NO: 106)	Cy5-eGFP	4μM	4.1
dsCoP280nfr362-1	Maleimide-GRKKRRQRRRPPQ-amide (SEQ ID NO: 43)	Cy5-eGFP	4μM	1.8
dsCoP458nfr363-1	Maleimido-KLALKLALKALKAAALKLA-amide (SEQ ID NO: 107)	Cy5-eGFP	4μM	10.8

【0166】

本発明の **siRNA** / ペプチド共役体の多様なアセンブリは、異なる細胞型への **siRNA** の送達を、高効率で媒介することが、前述のデータよりはっきりと証明される。

【0167】

実施例 6

siRNA の遺伝子発現ノックダウンは、**siRNA** に複合したポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドによって促進される。

本実施例は、本発明の **siRNA** / ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド複合体による標的遺伝子発現の効果的なノックダウンを示す。この研究において、ヒト及び他の哺乳動物の対象において過剰発現するとき、**RA** の発生又は進行を媒介するとされているヒト腫瘍壊死因子 - (**hTNF** -) 遺伝子の発現を調節するペプチド / **siRNA** 複合体の能力をテストした。

【0168】

ヒト単核白血球を、実施例 4 に記載のように単離し、トランスフェクトした。mRNA 測定に関しては、Genospectra 社 (カリフォルニア州) のブランチ DNA 技術を製造業者の仕様書に従って用いた。LPS 処理したヒト単核白血球 (CD14+) は、約 2 時間以内に、**TNF** - 特異的 mRNA を誘導し、2 時間後に、**TNF** - タンパク質は最高レベルとなる。Lipofectamine 2000 を用いて **siRNA** 候補配列によって単核白血球をトランスフェクトし、LPS で感染細胞を処理し、**TNF** - mRNA レベルを約 16 時間後に測定することによって、**siRNA** のノックダウン活性をスクリーニングした。活性化したヒト初代単核白血球における **TNF** - mRNA 及びタンパク質レベルをノックダウンする能力に関して、様々な **siRNA** 配列をスクリーニングした (表 9)。

【0169】

細胞の mRNA レベルの量を計るために、ハウスキーピング遺伝子 (**cypB**) と標的遺伝子 (**TNF** -) mRNA の両方を測定し、**TNF** - の読み取りを **cypB** で標準化して、相対発光単位を得た。タンパク質レベルを定量化するために、BD Bioscience 社の **TNF** - ELISA を、製造業者の仕様書に従って使用した。

【0170】

表 9 :

10

20

30

40

TNF- α を標的とする siRNA の学名、標的配列およびオリゴ配列

名前	代替名	標的配列	オリゴ配列	SEQ ID NO:	
N125	TNF- α -1	516-534	GCGUGGAGCUGAGAGAUAA	109	
N115	TNF- α -2	430-448	GCCUGUAGCCCAUGUUGUA	110	
N132	TNF- α -3	738-756	GGUAUGAGCCCAUCUAUCU	111	
N108	TNF- α -4	360-378	CCAGGGACCUCUCUCUAAU	112	
N138	TNF- α -5	811-829	GCCCCACUAUCUCGACUUU	113	
N113	TNF- α -6	424-442	UGACAAGCCUGUAGCCCAU	114	
N143	TNF- α -7	844-862	GGUCUACUUUGGGAUCAUU	115	
N107	TNF- α -8	359-377	CCCAGGGACCUCUCUCUAA	116	
N137	LC1	806-828	AAUCGGCCCGACUAUCUCGACUU	117	10
N122	LC2	514-532	AAUGGGGUGGAGCUGAGAGAU	118	
N130	LC3	673-691	AACCUCCUCUCUGCCAUCAAG	119	
N101	LC4	177-195	AACUGAAAGCAUGAUCCGGGA	120	
N140	LC5	820-838	AAUCUCGACUUUGCCGAGUCU	121	
N135	LC6	781-799	AAGGGUGACCGACUCAGCGCU	122	
N128	LC7	636-654	AAUCAGCCGCAUCGCCGUCUC	123	
N127	LC8	612-630	AACCCAUGUGCUCUCCUACCCA	124	
N118	LC9	472-490	AAGCUCCAGUGGCUGAACCGC	125	
N111	LC10	398-416	AAGUCAGAUAUCUUCUCGAA	126	
N110	LC11	363-381	AAGGGACCUCUCUCUAAUCAG	127	
N105	LC12	265-287	CCUCAGCCUCUUCUCCUUCUGA	128	20
N104	LC13	264-282	AAUCCUCAGCCUCUUCUCCUU	129	
N120	LC14	495-513	AACCA AUGCCUCCUGGCCAA	130	
N153	LC16	1535-1555	CUGAUUAAGUUGUCUAAACAA	131	
N136	LC17	787-807	CCGACUCAGCGCUGAGAUCAA	132	
N152	LC18	1327-1347	CUUGUGAUUAUUUAUUUUUA	133	
N114	LC19	428-448	AAGCCUGUAGCCCAUGUUGUA	134	
N145	LC20	982-1002	UAGGGUCGGAACCCAAGCUUA	135	
N101	YC-1	177-195	CUGAAAGCAUGAUCCGGGA	136	
N103	YC-2	251-269	AGGCGGUGCUUGUUCUCA	137	
N106	YC-3	300-318	CCACCACGCUCUCUGCCU	138	
N109	YC-4	362-380	AGGGACCUCUCUCUAAUCA	139	30
N113	YC-5	424-442	UGACAAGCCUGUAGCCCAU	140	
N115	YC-6	430-448	GCCUGUAGCCCAUGUUGUA	141	
N117	YC-7	435-453	UAGCCCAUGUUGUAGCAAA	142	
N120	YC-8	495-513	CCAAUGCCUCCUGGCCAA	143	
N121	YC-9	510-528	CCAAUGGCGUGGAGCUGAG	144	
N123	YC-10	515-533	GGCGUGGAGCUGAGAGAUAA	145	
N125	YC-11	516-534	GCGUGGAGCUGAGAGAUAA	146	
N126	YC-12	558-576	GCCUGUACCUCAUCUACUC	147	
N130	YC-13	673-691	CCUCCUCUCUGCCAUCAAG	148	
N132	YC-14	738-756	GGUAUGAGCCCAUCUAUCU	149	
N133	YC-15	772-790	GCUGGAGAAGGGUGACCGA	150	40
N134	YC-16	776-794	GAGAAGGGUGACCGACUCA	151	
N136	YC-17	787-807	GCCCGACUAUCUCGACUUU	152	
N141	YC-18	841-859	GCAGGUCUACUUUGGGAUC	153	

N143	YC-19	844-862	GGUCUACUUUGGGAUCAUU	154
N144	YC-20	853-871	UGGGAUCAUUGCCCUGUGA	155
N146	YC-21	985-1003	GGUCGGAACCCAAGCUUAG	156
N147	YC-22	1179-1197	CCAGAAUGCUGCAGGACUU	157
N148	YC-23	1198-1216	GAGAAGACCUCACCUAGAA	158
N149	YC-24	1200-1218	GAAGACCUCACCUAGAAAU	159
N150	YC-25	1250-1268	CCAGAUGUUUCCAGACUUC	160
N151	YC-26	1312-1330	CUAUUUUUGUUUGCACUUG	161
N154	YC-27	1547-1565	UCUAAACAAUGCUGAUUUG	162
N155	YC-28	1568-1585	GACCAACUGUCACUCAUU	163

10

【 0 1 7 1 】

表 1 0、1 1、1 2 は、本発明のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドに複合した特異的オリゴが、ヒト単核白血球の TNF- α 遺伝子の発現レベルを標的にしてノックダウンする効果を示す。

【 0 1 7 2 】

表 1 0 :

PN73/siRNA 複合体が媒介する TNF- α ノックダウンのパーセント

ペプチド/siRNA 複合体		
Peptide 1.6 μ M PN73	siRNA 4nM	KD (%)
	LC1	20.08
	LC2	19.06
	LC3	23.17
	LC4	26.67
	LC5	46.78
	LC6	44.10
	LC7	42.76
	LC8	41.24
	LC9	40.32
	LC10	13.52
	LC11	7.89
	LC12	40.61
	LC13	48.29
	LC14	50.76
	LC16	55.91
	LC17	50.78
	LC18	63.44
	LC19	61.83
	LC20	42.68
	YC12	43.60

20

30

40

【 0 1 7 3 】

表 1 1 :

PN509/siRNA 複合体が媒介するTNF- α ノックダウンのパーセント

	複合体		
	siRNA 4nM	KD (%)	
標的遺伝子 TNF- α	ペプチド PN509 1.6uM	LC1	31.13
		LC2	37.04
		LC3	30.14
		LC4	22.71
		LC5	34.93
		LC6	50.19
		LC7	56.11
		LC8	47.35
		LC9	58.20
		LC10	25.62
		LC11	25.65
		LC12	17.03
		LC13	25.04
		LC14	42.78
		LC16	40.06
		LC17	48.94
		LC18	58.13
		LC19	56.38
		LC20	71.12
		YC12	64.37

10

20

【 0 1 7 4 】

表 1 2 :

PN250/siRNA 複合体が媒介する TNF- α ノックダウンのパーセント

	複合体		KD (%)
	ペプチド PN250	siRNA 20nM	
標的遺伝子 TNF- α	0.5uM	YC11	13.70
		YC12	17.06
		YC17	17.30
		YC18	20.72
		LC13	20.65
		LC20	-3.80
		TNF-4	0.90
	0.75uM	YC11	21.09
		YC12	21.66
		YC17	29.82
		YC18	17.82
		LC13	18.04
		LC20	10.72
		TNF-4	14.39
	1uM	YC11	33.10
		YC12	15.91
		YC17	24.68
		YC18	24.66
		LC13	31.35
		LC20	26.53
		TNF-4	26.47

10

20

30

40

【0175】

siRNA 配列を代表するセットの活性は、80% mRNA ノックダウン活性から、検知できない活性の程度の範囲であった。一般的に、TNF-タンパク質レベルは、mRNA レベルより低減された。例えば、TNF-mRNA (TNF-1) において50%のノックダウンでは、TNF-タンパク質レベルは75%低減した。30%から60%のノックダウンレベルを呈する、選択したsiRNAの用量反応曲線を得た。計算したIC₅₀値は、10pMolから200pMolの範囲であった。評価したsiRNA配列をTNF-転写を通して分布したが、識別された最も効力のあるsiRNAは、コード領域の中央と、3'-UTRとの2つの領域に位置していた。

【0176】

TNF-遺伝子発現のノックダウンに有効なレベルは、本発明の新規siRNA/ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド組成物を用いて哺乳動物の細胞で達成できることが、上述の結果(表10、11、12)より証明される。

【0177】

実施例7

siRNA 遺伝子発現ノックダウンは、siRNA と共役したポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドによって促進される。

本実施例は、本発明のペプチド-siRNA 共役体による標的遺伝子発現のノックダウンを示している。これらの研究に使用された物質及び方法は、上述のものと同じである。この実施例の結果を表13に示す。

【0178】

表13:

ペプチド/siRNAが媒介する、リポフェクタミンが存在する場合と存在しない場合の、TNF- α 遺伝子発現のノックダウン

ペプチド	siRNA	アッセイされた細胞	リポフェクタミンが存在する場合		リポフェクタミンが存在しない場合		
			濃度 (μ M)	KD (%)	濃度 (μ M)	KD (%)	
CoP456	cIBR	LC20	CD14	0.4	no KD	0.4	no KD
				1.3	no KD	1.3	no KD
				4	no KD	4	no KD
CoP457	Peptide T	LC20	0.4	no KD	0.4	no KD	
			1.3	no KD	1.3	no KD	
			4	no KD	4	no KD	
CoP278	TAT+HA	YC12	0.4	no KD	0.4	no KD	
			1.3	no KD	1.3	no KD	
			4	no KD	4	no KD	
CoP277	PN73	LC13	MTF	0.19	31.95	0.19	61.61
				0.38	32.83	0.38	76.31
				0.75	39.29	0.75	73.94
				1.50	41.42	1.50	73.14
				3.00	39.88	3.00	58.14
				6.00	20.23	6.00	50.71
CoP277	PN73	LC13	CD14	0.000	93.06	0.000	93.06
				0.002	83.63	0.002	83.63
				0.011	72.58	0.011	72.58
				0.053	73.52	0.053	73.52
				0.266	85.01	0.266	85.01
CoP277	PN73	LC20	CD14	0.000	75.15	0.000	75.15
				0.002	60.72	0.002	60.72
				0.011	57.09	0.011	57.09
				0.053	58.70	0.053	58.70
				0.266	62.79	0.266	62.79

10

20

【0179】

siRNAと共役した本発明のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドの多様なアセンブリは、哺乳動物対象において、siRNAが媒介するTNF-遺伝子発現のノックダウンを促進するように機能することは結果より明らかである。

【0180】

実施例 8

siRNA遺伝子発現ノックダウンの時間的経過

本実施例は、siRNAが媒介する遺伝子発現ノックダウンの時間的経過に関する研究を示す。siRNA効果の持続期間をテストするために、eGFP発現マウス由来の繊維芽細胞を使用する以外は、上述のsiRNAトランスフェクション手順を採用した。ここで用いたトランスフェクション試薬はリポフェクタミンであった。細胞は、異常増殖のため、18日目にプレートを変えた。第2トランスフェクションは、第1トランスフェクション後19日目に行った。19日目に、トランスフェクション後、eGFPレベルを測定した。スクランブル又はナンセンスsiRNA (Qiagen社)を対照群として、GFPI siRNA (GFPI)及びヘアピンsiRNA (D#21)と共に使用した。ノックダウン活性は、スクランブルsiRNA (Qiagen社対照群)で校正した。

30

【0181】

表14:

40

siRNA のリポフェクタミン媒介トランスフェクションによる EGFP 遺伝子発現のノックダウンの時間的経過

第1トランスフェクション後の日数	1	3	5	7	9	11	13	15	17
Qiagen	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GFPI	27.61	60.87	64.75	58.40	56.72	40.46	35.56	16.59	15.50
D#21	28.22	61.11	66.91	62.86	57.36	54.71	42.96	24.66	9.88

	19	20	21	25	27
Qiagen	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GFPI	59.60	37.10	57.38	66.94	59.63
D#21	46.36	35.89	65.25	74.15	58.39

10

【0182】

siRNA ノックダウン活性は、第3日目頃に明らかになり、第9日目まで維持され、その後、第17日目頃に、標的遺伝子発現は、ベースラインレベルに戻る事が、前述の研究(表14)により実証される。第18日目の第2トランスフェクション後、eGFP 発現の再度の減少が生じ、試薬を細胞に繰り返し投与して、繰り返し又は持続的遺伝子発現ノックダウンをもたらすことが可能であることを示している。

【0183】

実施例9

哺乳動物細胞の siRNA ノックダウン効果を延長する複数回投与プロトコル

複数回投与スケジュールによって、本発明の siRNA / ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド組成物が媒介する、哺乳動物細胞における遺伝子発現ノックダウン効果は有効に延長されることを、本実施例は実証する。この研究に用いられる物質及び方法は、表示の時にトランスフェクションを繰り返した以外は、上述の物質及び方法と同じである。スクランブル siRNA (Qiagen 社) を、比較対照群に使用した。表15に、ペプチド/siRNA 複合体を用いる複数回のトランスフェクションのデータをまとめてある。TNF- α 遺伝子のノックダウン活性パーセントは、遺伝子発現全体に対するパーセントを表す。

【0184】

表15:

ペプチド/siRNA 複合体を用いた複数回のトランスフェクション後の、TNF- α 遺伝子発現ノックダウン活性

第1トランスフェクション後の日数	4	5	6	7	8	9	10	11	12
単回	74.69	61.87	62.57	55.47	41.41	39.42	27.21		
5日目に2回目			66.69	69.78	68.27	64.18	63.86	64.37	56.52
6日目に2回目				64.21	65.78	67.74	64.12	58.64	53.96
7日目に2回目					63.03	62.50	69.94	62.63	58.07

40

【0185】

複数回のトランスフェクションを、ちょうどよい時に(この場合は、第1トランスフェクション後、約5日目から約7日目の間)行くと、哺乳動物細胞における TNF- α 遺伝子発現ノックダウン効果は維持又は再誘導することができることを、前述の結果は実証している。

【0186】

実施例10

ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを最適化する合理的設計

本実施例は、本発明のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを最適化する例示の設計

50

及びデータを提供する。対象の合理的設計操作は、ヒストンH2B由来のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドに関して行った。

【0187】

この、及び他のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドの機能と構造活性との関係をより良く理解するために、C-及びN-末端の機能と、PN73及び他の化学的部分間の共役体の活性とを特徴付けることによって、一次構造研究を行った。

【0188】

ヒトヒストン2B(H2B)タンパク質のアミノ酸配列を下記に示す。

【0189】

PN73、PN360及びPN361は、H2Bのペプチドフラグメントであり、そのフラグメントに相当するH2Bタンパク質の部分は、下記では、ペプチド名に続く括弧内に示されている。下記にリストしたPN360及びPN361のアミノ酸配列は、PN73の対応するアミノ酸配列と同じように並んでいる。PN73ペプチドフラグメントは、H2Bアミノ酸配列でアンダーラインされており、H2Bアミノ酸配列の13から48までを表す。PN73は、また、H2Bアミノ酸の12から48までによっても表される。PN360は、PN73とN末端を共有するが、PN73のC末端を持たず、PN361は、PN73とC末端を共有するが、PN73のN末端を持たない。PN73共役体は、1本のsiRNA鎖(例えば、センス鎖)に共有結合で結合している。PN404は、PN73の全てのリジンがアルギニンに置き換えられたPN73の変形で、PN509は、N末端でペグ化された、ペグ化PN73(PEG分子量1Kダルトン)誘導体である。

10

20

【0190】

H2B(ヒストン2B)アミノ酸配列

MPEPAKSA P A P K K G S K K A V T K A Q K - K D S K K R K R S R K E S Y S
V Y V Y K V L K V H P D T G I S S K A M G I M N S F V N D I F E R I A G E A S R
 LAHYNK R S T I T S R E I Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T
 KYTSSK (SEQ ID NO: 164)

PN73(13から48)

NH2 - K G S K K A V T K A Q K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q
 - a m i d e (S E Q I D N O : 5 9)

30

PN360(13から35; PN73のN末端)

NH2 - K G S K K A V T K A Q K K D G K K R K R S R K - a m i d e (S E Q I D
 N O : 5 7)

PN361(24から48; PN73のC末端)

NH2 - K K D G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V L K Q - a m i d e (S E Q
 I D N O : 5 8)

PN73(13から48) - siRNA(センス鎖)共役体

siRNA - K G S K X A V T K A Q K K T J G K K R K R S R K E S Y S V Y V Y K V
 L K Q - a m i d e (S E Q I D N O 5 9)

40

PN404(PN73の全てのリジンをアルギニンに交換)

NH2 - R G S R R A V T R A Q R R D G R R R R R S R R E S Y S V Y V Y R V L R Q
 - a m i d e (S E Q I D N O : 9 1)

PN509(ペグ化したPN73)

PEG - R G S R E A V T R A Q R R D G R R R R R S R R E S Y S V Y V Y R V L R
 Q - a m i d e (S E Q I D N O : 5 9) .

50

【0191】

前述の合理的設計誘導体ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドPN73に関する、マウス尾繊維芽細胞における取り込み効果及び生存性試験の結果を図5に示す。マウス尾繊維芽細胞における修飾PN73の活性の変化を示す。PN404とは異なり、PN509は、毒性を増加させることなしに、取り込みを増加させる。PN73のN末端の欠失部分が活性を低減させ、C末端残基を取り除くと、活性を失くす。PN73及びPN509は両方とも、初代細胞において、リポフェクタミン（Invitrogen社、カリフォルニア州）よりも高い活性を示す。

【0192】

実施例11

アセチル化したポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドは、siRNAの安定性を向上させる。

本実施例の目的は、例示のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドPN73を修飾すると、ポリペプチドPN73の安定性が向上し、結果としてトランスフェクション活性が促進される否かを決定することであった。PN73の非修飾形態、N末端をペグ化した形態、及びN末端をアセチル化した形態の安定性を血漿中で比較した。PN73のC末端はアミド化した。血漿中で培養前と後に、紫外吸光検出器と共にサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、PN73の非修飾形態及び修飾形態の安定性を特徴付けた。

【0193】

血漿がない場合は、PN73の非修飾形態、ペグ化した形態、及びアセチル化した形態とは、約9分で、独特であるが、重なるUVトレース（traces）を示した。しかしながら、血漿に4時間曝露すると、非修飾PN73及びペグ化したPN73に特異的なUVトレースは、もはや存在せず、実質的な分解を示した。対照的に、アセチル化したPN73に独特のUVトレースは残存し、この修飾が、非修飾及びペグ化したPN73形態に比べて、実質的にプラスミド中のPN73の安定性を向上させることを示した。

【0194】

血漿中のPN73の安定性を、PN73ペプチドのN末端のアセチル化によって促進することができるという驚くべき予想外の発見を、これらのデータは示す。アセチル化したペプチドの一次構造は次のようになる。

Ac - KGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ -
amide (SEQ ID NO: 59)

【0195】

実施例14

ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドはインターフェロン反応を引き出さない。

本実施例の目的は、リポフェクタミン・プラス・siRNA、又は、例示のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドであるPN73ペプチド・プラス・siRNAを用いてトランスフェクトした細胞のインターフェロン反応を比較することであった。インターフェロン反応性を、ELISA（タンパク質）及びbDNA（mRNAレベル）によって、アッセイを行った。

【0196】

従来、siRNA分子は、リポソームが媒介するトランスフェクションによって細胞に送達される。しかしながら、これは、通常、送達効率が悪く、in vivoにおいて炎症性反応を起こし、且つ、インターフェロン遺伝子発現をアップレギュレートして細胞増殖を阻害する。結果として、標的遺伝子発現レベルの低減に限界があり、従って、siRNAは、効果のない治療法となり、遺伝子発現を研究する手段としても効果のないものとなる。PN73によるsiRNAの送達は、この問題を克服する。

【0197】

幾つかの異なるsiRNAのトランスフェクションにおいて、リポフェクタミンのインターフェロン反応性を、PN73ペプチドに対して比較した。siRNAを、1nM、1

10

20

30

40

50

0 nM、100 nM又は200 nMの濃度で、リポフェクタミン又はPN73と複合した。インターフェロン反応性を決定する分子マーカとしての役目をするインターロイキン1 (IL-1) 及びQneGを、陰性対照として用いた。100 nM又は200 nM TNF-9 siRNAと複合したリポフェクタミンは、IL-1 mRNAレベルの有意な増加を引き起こした。更に、テストした他のsiRNAは全て、IL-1 mRNAレベルの軽度の増加を引き起こした。対照的に、PN73ペプチドと複合した同じsiRNAは、IL-1 mRNAレベルを増加させなかった。

【0198】

リポフェクタミンを用いてトランスフェクトした細胞と、PN73を用いてトランスフェクトした細胞において、観察されるインターフェロン反応性の相違を更に特徴付けるために、ELISAアッセイを行って、分子マーカであるインターロイキン1 (IL-1)、インターフェロン- (INF-)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-12 (IL-12)、MIP-I、インターフェロン- (IFN-) 及び腫瘍壊死因子 (TNF-) のタンパク質発現レベルを決定した。siRNAと複合したリポフェクタミンを用いてトランスフェクトした細胞と、siRNAと複合したPN73を用いてトランスフェクトした細胞との相対的タンパク質発現レベルを、表16にまとめる。

【0199】

表16

インターフェロン反応性の分子マーカとなる相対的タンパク質発現レベル

インターフェロン 反応マーカ	リポフェクタミントランスフェクション				PN73 トランスフェクション
	IFN-1 siRNA	LC17 siRNA	LC20 siRNA	TNF-α9 siRNA	テストした全ての siRNA
IL-1β	++	-	-	+	-
INF-α	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド
IL-6	++	-	-	+	-
IL-8	-	-	-	-	-
IL-12	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド
MIP-1α	+++	-	-	++	-
IFN-γ	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド	バックグラウンド
TNF-α	+	-	-	-	-

【0200】

siRNA LC20及びLC17は、両方とも、どのトランスフェクション試薬を用いたかに関わらず、インターフェロンに反応しなかったことを、その結果は示している。しかしながら、リポフェクタミンを用いたIFN-I又はTNF-9のトランスフェクションは、IL-1、IL-6及びMIP-1タンパク質発現レベルの増加を引き起こした。対照的に、PN73を用いてテストしたsiRNAの全てのトランスフェクションは、テストしたインターフェロン反応マーカのいずれにおいても、タンパク質発現における誘導が観察できなかった。

【0201】

PN73が媒介するsiRNAのトランスフェクションは、インターフェロン反応を引き出さないという驚くべき予想外の発見をELISAアッセイのこれらのデータは示している。

【0202】

10

20

30

40

50

実施例 1 5

ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと共役した s i R N A は、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと複合した s i R N A より大きいノックダウン活性を提供する。

本実施例の目的は、例示のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド P N 7 3 と共役した s i R N A L C 1 3 及び L C 2 0 と、該 P N 7 3 と複合した s i R N A L C 1 3 及び L C 2 0 とのヒト単核白血球におけるノックダウン活性を比較することであった。ヒト単核白血球の単離及びトランスフェクションと、ノックダウン活性を測定するのに用いた方法に関しては前述した。Q n e g は、無作為な s i R N A 配列を表し、これらの実験の陰性対照として機能する。観察された Q n e g ノックダウン活性は、100% (100% 遺伝子発現レベル) に標準化し、L C 2 0 及び L C 1 3 の活性は、陰性対照に対する相対的なパーセンテージとして表す。L C 2 0 及び L C 1 3 は、ヒト T N F - 遺伝子を標的とする s i R N A である。P N 7 3 が存在しないとき、P N 7 3 と複合したとき、又は P N 7 3 と共役したときの、s i R N A L C 2 0 及び L C 1 3 のノックダウン活性を、0 n M から 2 . 5 n M の濃度範囲でテストした。P N 7 3 は、複合体及び共役体の実験において、1 : 1 の割合とした。

【 0 2 0 3 】

P N 7 3 が存在しないとき、L C 1 3 及び L C 2 0 は、ノックダウン活性をほとんど示さなかった (図 6 - C)。L C 1 3 及び L C 2 0 は両方とも、P N 7 3 と複合したとき、T N F - 遺伝子発現において、Q n e g 対照と相対的に約 15% 及び 30% の減少を引き起こした (図 6 - B)。しかしながら、T N F - のノックダウン活性は、s i R N A を P N 7 3 と共役させると、60% 未満に低減された (図 6 - A)。これは、P N 7 3 / s i R N A 複合体と比較して、s i R N A ノックダウン活性の有意な増加である。従って、s i R N A を例示のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド P N 7 3 と共役すると、s i R N A ノックダウン活性は有意に促進されるという驚くべき予想外の結果を、これらのデータは示している。

【 0 2 0 4 】

実施例 1 6

例示のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドの欠失分析

本実施例の目的は、小分子及び高分子の細胞への送達を促進する P N 7 3 ペプチドの能力に必須の最小長を決定することであった。表 1 7 に示すように、ペプチドの N 末端から一度に 3 残基ずつを順次、欠失することによって、P N 7 3 の先端を切り取った 1 0 の形態を作成した。下記は、P N 7 3 の 1 次構造と先端を切り取った形態を表しており、それらのトランスフェクション活性を調べる。本実施例でテストしたペプチドは全て、C 末端 F I T C (フルオレセイン - 5 - イソチオシアン酸塩) 標識をつけた (すなわち、- G K [E P S I L O N] G - a m i d e) 。

【 0 2 0 5 】

表 1 7

10

20

30

PN643 or PN73 (13-48) KGSKKAVTKAQKKDGGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 59)

PN661 (16-48) KKA VTKAQKKDGGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 165)

PN685 (19-48) VTKAQKKDGGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 166)

PN660 (22-48) AQKKDGGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 167)

PN735 (25-48) KDGKKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 168)

PN655 (28-48) KKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 169)

PN654 (31-48) KRSRKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 170)

PN708 (34-48) RKESYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 171)

PN653 (37-48) SYSVYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 172)

PN652 (40-48) VYVYKVLKQ (SEQ ID NO: 173)

PN651 (43-48) YKVLKQ (SEQ ID NO: 174)

10

20

30

40

50

【 0 2 0 6 】

実施例 1 7In Vivoにおける siRNA 媒介遺伝子発現ノックダウン活性A . e G F P マウス

20g から 25g の体重の e G F P トランスジェニックマウスをジャクソン研究所 (Jackson Laboratory) より購入した。siRNA 注射に関しては、siRNA を、siRNA / PN73 を 1 : 5 の割合で、5mg / kg の用量で用いた。処置は全て、三日間、日に一度、尾静脈注射によって行った。組織を、第 4 日に採取した。実験プロトコルは、R & R R a b b i t a r y (ワシントン州 Standwood) で行い、その研究機関の動物管理使用委員会 (I A C U C : I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e) が承認した。

【 0 2 0 7 】

動物からの組織を、すぐに P B S に置き、氷の上に保管した。組織からの単離細胞に関しては、試料組織を、2 枚の顕微鏡用すりガラススライドの間に、すりガラス面が組織に面するように、はさんだ。組織をすりつぶすために数回こすり合わせる。その後、すりつぶされた組織をスライドから、P B S を用いて 1 2 - ウエルプレートのウエルに洗い流す。すりつぶした組織 1 m l は、2 X コラゲナーゼ (筋肉用タイプ I 及び肝臓組織用タイプ I I) 1 m l を含む 1 2 ウエルプレートに移した。最終濃度は、100 ユニット / m l である。コラゲナーゼ溶液中で、37 °C で 3 時間、組織を培養する。小片及び結合組織を取り除くために、分解された組織混合物を細胞濾過器を通して 6 ウエルプレートに濾過する。500 μ l 細胞をラベルを貼った F A C S 管に移す。単離細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーによって決定した。

【0208】

eGFPに特異的な二本鎖siRNAの二重鎖(duplex)を化学的に合成した。siRNAを、PBS緩衝液又は、生理食塩水若しくはグルコース緩衝液に溶かした。

【0209】

3つの群の動物に(特異的eGFP siRNA単独、ペプチド/eGFP siRNA複合体、及び対照のsiRNA/ペプチド複合体)を、表1に示す様々な用量及び期間で静脈注射した。処置したマウスの末梢血を眼窩採血により採取し、抗凝血剤を加えて氷上で保管した。PBMCをフィコール(Ficoll)ベースの遠心分離法によって単離した。ノックダウン活性は、フローサイトメトリーを用いて細胞のeGFP蛍光強度を決定することによって、評価した。

10

【0210】

E G F Pトランスジェニック動物の筋細胞中のeGFPタンパク質の低減

トランスジェニックマウスは、ペプチドPN73と複合したeGFPトランスジェニックマウスのsiRNA(siRNAとペプチドの割合1:5)で処置した(5mg/kg 3日間)。ノックダウン活性の決定に関しては、方法の項で述べたコラゲナーゼ処理後、細胞を筋細胞から単離した。単離細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで分析した。

【0211】

対照のsiRNA及びGFP siRNA単独と比較すると、GFP siRNA/PN509(ペグ化したPN73)複合体は、連続3日間の注射後、in vivoにおいてE G F Pの有効なノックダウンを示した。

20

【0212】

E G F Pトランスジェニック動物の肝細胞中のeGFPタンパク質及びmRNAの低減

トランスジェニックマウスは、ペプチドPN73と複合したeGFPトランスジェニックマウスのsiRNA(siRNAとペプチドの割合1:5)で処置した(5mg/kg 3日間)。ノックダウン活性の決定に関しては、方法の項で述べたコラゲナーゼ処理後、細胞を肝臓組織から単離した。単離細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで分析した。

【0213】

対照のsiRNA/PN602及びGFP siRNA単独と比較すると、GFP siRNA/PN509(ペグ化したPN73)複合体は、連続3日間の注射後、in vivoにおいてE G F Pの有効なノックダウンを示した。eGFP mRNAのノックダウンに関しては、表18にまとめてある。タンパク質発現のノックダウンは、同等である。

30

【0214】

表18:

siRNA 用量	ペプチド		注射された化合物 / eGFP タンパク質残存		
			GFPI siRNA	PN73/GFPI siRNA	PN73/陰性対照 siRNA
2 mg/kg 1:10	PN73	平均	60%	50%	100%
		STDEV	11%	12%	74%
0.5 mg/kg 1:80	PN73	Average	89%	73%	100%
		STDEV	31%	3%	52%
5 mg/kg 1:15	PN509	Average	83%	70%	100%
		STDEV	30%	9%	44%

40

【0215】

送達ペプチドは、in vivoにおいて、効率的にsiRNAを送達し、PBMC内のeGFPをノックダウンすることができる(最高50%まで)。陰性対照と比較して、裸のsiRNAも、eGFPのノックダウンにおいて幾分、活性を示したが、送達ペプチ

50

トほど効率的ではない。

【0216】

B. タコニック社 (Taconic) 製マウス

ヒトTNF - 動物疾患モデルに関しては、2つのトランスジェニックモデルを使用した。tg197マウスは、ヘレニック・パスツール研究所 (Pasteur Hellenic Institute) (ギリシャ、アテネ) から取得し、B6.SJL-Tg (TNF) N21マウスは、タコニック社 (ニューヨーク州ジャーマンタウン) から購入した。両方のヒトTNF - トランスジェニックマウスモデルの遺伝子型は、供給者によって特定された。tg197マウスに関しては、6週令のマウスを、インフリキシマブ、siRNA/PN73複合体、及び生理食塩水の3つの処置群に分けた。TNF - 中和抗体系薬物であるインフリキシマブ (Remicade等) は、一般の薬局で購入し、1週間に一度、10mg/kgの用量で使用した。siRNAは、siRNA/PN73を1:5の割合で、2mg/kgの用量で用いた。全ての処置は、1週間に2度、尾静脈注射によって行った。実験プロトコルは、SkelleTech社 (ワシントン州ボセル) で行い、その研究機関の動物管理使用委員会 (IACUC) が承認した。類似の用法を、B6.SJL-Tg (TNF) N21マウスに使用した。臨床スコアは、前述のスコアシステム (stem) (2, 3) に基づいた。すなわち、0 (正常)、1 (足関節又は後足首関節の浮腫又は変形)、2 (足関節及び後足首関節の変形) 又は3 (前足首関節又は後足首関節の硬直) である。1週間に2度、4肢全てを合計し、マウス一匹あたり、12を最高スコアとする。

10

20

【0217】

TNF - レベルの決定、トランスジェニックマウスを使用する実験の分析に関しては、血漿試料を、眼窩採血により採取した全血から分離した。hTNF - の血漿レベルは、製造業者 (R&D systems社、ミネソタ州ミネアポリス) の指示に従って1:2希釈で、ELISAにより決定した。

【0218】

bDNAアッセイ (カリフォルニア州フレモント、Genospectra社のQuantigeneアッセイ) を、製造業者の指示に従って行った。

【0219】

siRNA/PN73複合体又はインフリキシマブを用いての処置後のトランスジェニックマウスにおけるヒトTNF - 血漿タンパク質レベル及びRAスコアの低減。

30

【0220】

ヒトTNF - トランスジェニックマウスは、5週令で、インフリキシマブ (10µg/kg、腹腔注射) と、ペプチドPN73と複合した抗TNF - siRNA (LC20) (siRNAとペプチドの割合は1:5) (2mg/kg、静脈注射、1週間に2度) と、を用いて、処置を開始した。ヘレニック製トランスジェニックマウスに関しては、次の基準を用いてRAスコアを決定した (盲検処置)。すなわち、0は正常、1は足関節又は後足首関節の浮腫又は変形、2は足関節及び後足首関節の変形、3は前足首関節又は後足首関節の硬直である。

【0221】

LC20/PN73処置群は、3週間の処置期間中、関節の関節炎の臨床的な進行が劇的に抑制される。

40

【0222】

siRNA/PN73複合体又はインフリキシマブを用いての処置後のヒトTNF - 血漿タンパク質レベルの低減。

【0223】

タコニック社製マウスに関しては、血漿中のTNF - レベルは、ELISA (R&D systems社、ミネソタ州ミネアポリス) によって決定し、処置スケジュールは、ヘレニック製トランスジェニックhTNF - トランスジェニックマウスと同じであった。

50

【0224】

C. ヘレニック製マウス

本実施例は、標的遺伝子発現を調節し、治療的方法で細胞の表現型を変更するのに有効な、*siRNA*による全身への送達及び治療的遺伝子ノックダウンを媒介する本発明の*siRNA*/ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド組成物の有効性を示す *in vivo* におけるデータを提供する。

【0225】

ヒトNF- κ 発現マウスは、5週令のものを、ヘレニック・パスツール研究所（ギリシャ）から購入した。4匹のマウスのうち、2匹に、1週間に2度、300 μ lの生理食塩水と、1週間に一度、RA薬物レミケード（Ramicade）（5mg/kg）とを静脈内（IV）投与した。あとの2匹には、1週間に2度、300 μ lの生理食塩水と、1週間に2度、PN73と混合したLC20*siRNA*（2mg/kg）（LC20*siRNA*とPN73のモル比は1：5）と、を静脈内（IV）投与した。注射期間中、ELISAテスト（R&D Systems社、Cat#SSTA00C）のための血漿試料を採取し、RA疾患の進行と治療的有効性の認められた指標として、週に2度、足スコアを取った（表19）。

【0226】

表19

ELISAによってアッセイを行った血漿中のTNF- α タンパク質の量

週令	7	8	9
Ramicade	102.24	39.27	25.80
LC20/PN73	25.96	21.89	14.21
生理食塩水	33.78	34.29	24.48

* このデータは、実験を行ったマウスの平均を *pg/ml* で表したものである。

【0227】

レミケード（Ramicade）又は生理食塩水（対照）処置したマウスにおけるレベルと比較して、循環血液中でのペプチド/*siRNA*処置したマウスのTNF- κ タンパク質レベルの有効な低減を、前述の結果は示している。

【0228】

本発明の*siRNA*/ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド組成物と方法の *in vivo* における有効性の追加の証拠を、RA疾患状態と治療有効性の認められた表現型指標である足スコアを用いて上記のマウス対象から得た。開始点における相違（一部の動物は、より早い時点でスコアを示す）のために、実験では、スコアを全ての動物に対して0に調整した。次のスコア指標に従って、各足に0から3のスコアを与え、最高のスコアを12とする。

- 0： 正常
- 1： 足関節又は後足首関節の浮腫又は変形
- 2： 足関節及び後足首関節の変形
- 3： 前足首関節又は後足首関節の硬直

【0229】

これらの足スコア評価の結果は、図4にグラフとして表している。ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドPN73は、動物に注射すると、第8週のRA進行の遅延によって分かるように、治療量の*siRNA*（例えば、LC20、TNF- κ 2及びTNF- κ 9（UAGCCCAUGUUGUAGCAAA（SEQ ID NO. 175））を送達することができることを、そのデータは実証している。PN73/*siRNA*処置したマウスは、レミケード（Ramicade）処置したマウスと比べて、第8週で足スコア指標が良くなった。処置後11週まで足スコア評価を行うと、PN73/LC20複合体は、レミケード（Ramicade）処置マウスに匹敵する足スコア評価を達成した。PN73ペプチド/LC20*siRNA*を1：5の割合では、2mg/kg LC20は、テス

トした LC20 より少ない用量と比較して、RA 進行において最大の相対的遅延が観察された。PN73 及び siRNA 処置後に評価した、5 つの異なる群に関する幾つかの siRNA の相対的有効性を下記の表 20 にまとめる。

【0230】

表 20

グループラベル	処置 *	siRNA の相対的効果	
TNF #1	LC20, Ramicade, PBS	LC20 は、Ramicade と同じくらい有効である	10
TNF #4	LC20 and LC13	全体として低い足スコア	
TNF #5	PN73 と共役した LC20	全体として低い足スコア、共役体は複合体よりも活性が低い。	
TNF #6	LC20, YC12 and LC17	全体として低い足スコア、YC12 および LC17 は、LC20 ほど有効ではない。	
TNF #7	LC20, TNF- α 2 and TNF- α 9	LC20 および TNF- α 9 は、第8週まで Ramicade より有効である。 LC20 は、第11週まで Ramicade と同じくらい有効である。	20

*siRNAs は、PN73 の存在下でテストした。Ramicade は、陽性の処置対照であり、PBS は陰性の処置対照である。

【0231】

本発明の siRNA 及びポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド組成物は、遺伝子発現を調節し、疾患を治療し管理する有望な新しい治療手段を提供することを、前述の結果は実証している。本発明の siRNA、例えば、ヒト TNF - 特異的 mRNA の分解を標的とする siRNA は、現在の小分子、可溶性受容体又は RA 抗体療法よりも、特異性が高く、免疫原性が低く、疾患をより緩和する。hTNF - を標的とし、単回投与により 30% から 85% のノックダウンを生じた 50 を超える候補 siRNA 配列を、スクリーニングした。in silico において設計された 20 を超えるペプチド複合体及び / 又は共有結合分子を、単核白血球による蛍光 RNA 取り込みに関して比較し、リポフェクタミン又はコレステロールと共役した siRNA よりも有意に取り込みが良いことを表す数字を得、且つ、 $< 10 \text{ pM}$ の IC_{50} 値を有することが分かった。ペプチド - siRNA 製剤は、in vitro において活性化されたヒト単核白血球内で効率的に TNF - mRNA 及びタンパク質レベルをノックダウンする。

【0232】

1 つの例示的な候補の送達ペプチド / siRNA 製剤を、ヒト TNF - を構成的に発現する関節リウマチ (RA) の 2 つのトランスジェニックマウスモデルにおいて評価した。6 週令で、週に 2 度 IV 注射による $2 \text{ mg} / \text{kg}$ の siRNA 又はインフリキシマブによって処置した動物は、疾患状態が第 10 週まで持続した対照群と比較して、7 週令で RA スコア (足及び関節の炎症) が安定化し始めた。9 週令で siRNA 処置した動物は、RA スコアにおいて匹敵する低下を示したが、インフリキシマブ処置した動物に比べて、血漿中の TNF - タンパク質レベルが有意に低かった。

【0233】

本明細書での開示に基づいて、標的遺伝子、例えば、炎症等の病理学的状態において重要な役割を果たす TNF - 等のサイトカイン、の発現を阻害する siRNA の使用は、哺乳動物対象における、RA によって例示されるような疾患の症状を緩和又は予防する有効な治療を提供する。本発明の方法及び組成物の範囲で用いた例示のペプチド / siRNA 組成物は、例えば、TNF - 等の標的遺伝子の産物に、抗体又は可溶性受容体の場合

のように複合することによってではなく、標的遺伝子発現、例えばTNF- α 発現を低減又は排除する能力に関して利点を提供する。

【0234】

本発明の教示に従った、核酸の全身への送達を向上させることは、薬物としてのsiRNAの開発に更なる利点を提供する。本コンテキストにおける具体的な課題には、siRNAの安定性を維持しながら、組織閉門を通して標的細胞又は組織への送達、及び、細胞膜を通して細胞に有効量のsiRNAを届ける細胞間送達が含まれる。本開示は、ヒトTNF- α の発現等の特異的遺伝子発現を標的とする新規のペプチド/siRNA組成物を含むin vivoにおける有効な送達システム(system)を初めて実証し、そのシステム(system)は、RNのマウスモデルを用いた研究によって例示したように、標的疾患が予測できるトランスジェニック動物モデルにおいて疾患活性を緩和する。関連研究においては、本発明の組成物及び方法は、RA患者由来の活性単核白血球においてTNF- α の発現を有効に阻害する。RNAi経路は、TNF- α 経路への細胞内効果を通じて、細胞の表現型と、疾患の進行の改変とを有効に媒介し、且つ、循環する抗体/TNF- α 複合体による毒性効果をRAの現行の抗体療法を特徴付ける残留する免疫反応性と共に回避することを、これらの結果は示している。特に、これらの実施例で示したsiRNA及びポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドの用量は、常に少なくとも80%から90%、又はそれ以上の細胞生存レベルと相関するように、本明細書に記載したテストは全て、関連する毒性効果を最小限にして実施した。

【0235】

D. マウスLPS反応

正常な(マウスタイプ)マウスを、様々なLPS濃度で腹腔内注射又は静脈注射によって処置した。LPS反応性は、LPS注射後、様々な時間に採取した血液中のTNF- α のレベルを測定することによって決定した。TNF- α 誘導の線形の範囲は、IP投与におけるLPS注射に関しては10ngと100ngとの間、IV注射による場合は最高25ngであった。最高TNF- α 誘導の平均時間は、LPS注射後70分である。これらの結果に基づいて、更なる実験のために、IP投与に関しては25ng、IV投与に関しては10ngのLPS用量を選択した。

【0236】

TNF- α のLPS誘導に対するsiRNAの効果は、治療スケジュールごとに6匹のマウスを用いて、2mg/kg siRNA用量の、(1)LC13/PN73、(2)LC13単独、(3)Qneg/PN73、(4)PN73、(5)緩衝剤単独、を注射によってテストした。LPS誘導は、最後のsiRNA注射後24時間で行い、0.2 μ g LPSと血液をLPS注射後90分で採取した。LC13(試料1, 2)は、陰性対照群(試料3から5)と比較して、LPS誘導の結果、循環TNF- α の量を低下させたことを、結果(下記)は示している。

【0237】

第2の実験的アプローチは、2mg/kg siRNA用量の組成物(1)LC13/PN73、(2)Inm-2/PN73、(3)Inm-4/PN73、(4)Qneg/PN73、(5)PBS(緩衝剤対照)を用いて、行った。30匹の動物を用いて3つの研究を行った。各投薬スケジュールは、連続4日、連続8日、及び連続11日であった。siRNA注射後24時間でLPS誘導が行われた(25ng LPS(IP))。LPS注射後、70分で採血した。Inm-4は、連続4日の実験(n=1テスト)において、LC13、Inm-2、及びQnegに比べて、最大のKD活性を示したことを、その結果は示している。第8日及び第11日の測定結果は、尾注射の繰り返しに一部、起因する技術的問題のために、変動的な結果となった。

【0238】

前述の発明を、理解を明瞭にするために、実施例を用いて詳細に記載してきたが、限定的目的ではなく例証のために提供する請求項の範囲内で、一部の変更及び修正を行ってもよいことは当業者には明らかであろう。このコンテキストにおいて、記載を簡略にするた

10

20

30

40

50

めに、前述の開示において、様々な出版物及び他の参考文献を引用した。これら参考文献の各々は、あらゆる目的で、その全体を参照することによりここに組み込んだ。しかしながら、ここで論じた様々な出版物は、本出願の出願日以前の開示のためのみここに組み込むのであり、その発明者は、先行発明によって、この開示に先行する権利を有することに留意されたい。

【図面の簡単な説明】

【0239】

【図1】図1は、本発明のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド (SEQ ID NO : 35) に複合した siRNA 又は共役した siRNA のペプチド媒介取り込み及び細胞生存性への影響を示す図である。細胞への取り込み及び細胞生存性は、パーセントで表す。

10

【図2】図2は、本発明のポリヌクレオチド送達促進ポリペプチド (SEQ ID NO : 35) に複合した siRNA 又は共役した siRNA のペプチド媒介取り込みを更に示す図である。細胞への取り込みは、平均蛍光強度 (MFI) で表す。

【図3】図3は、幾つかの異なるポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを用いた、ヒト単核白血球における siRNA のペプチド媒介取り込みを示す図である。

【図4】図4は、siRNA / ペプチドを注射されたマウスは、レミケード治療 (Ram icade - treated) をした被検体に相当するほど RA の進行が遅延することを示す図である。RA の進行は、足スコア指標 (paw scoring index) によって測定した。

20

【図5】図5は、本発明の誘導體ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドを合理的に設計した PN73 の、マウス尾繊維芽細胞における、取り込み効果及び細胞生存性検査試験の結果を示す図である。

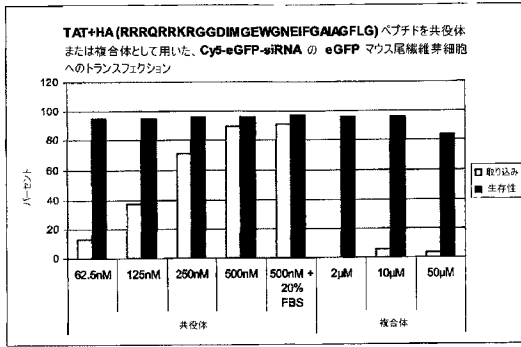
【図6A】図6Aは、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと共役した siRNA は、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドに複合した siRNA よりも in vitro において高いノックダウン活性を有することを示す。

【図6B】図6Bは、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと共役した siRNA は、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドに複合した siRNA よりも in vitro において高いノックダウン活性を有することを示す。

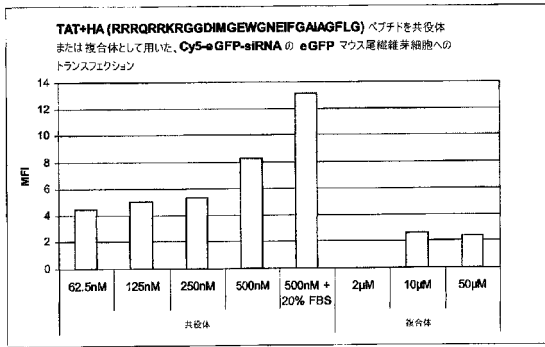
【図6C】図6Cは、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドと共役した siRNA は、ポリヌクレオチド送達促進ポリペプチドに複合した siRNA よりも in vitro において高いノックダウン活性を有することを示す。

30

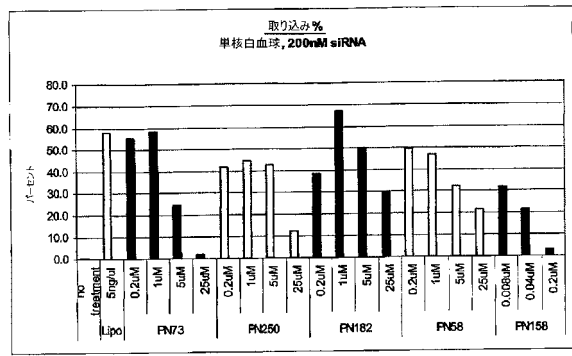
【 図 1 】



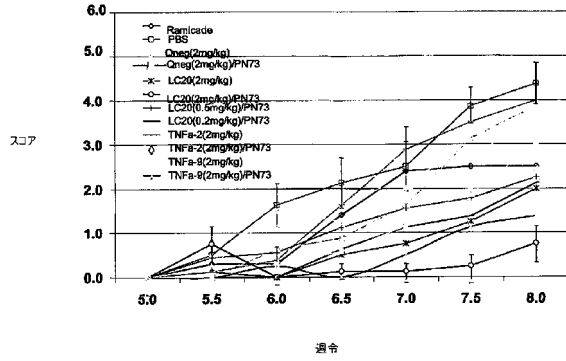
【 図 2 】



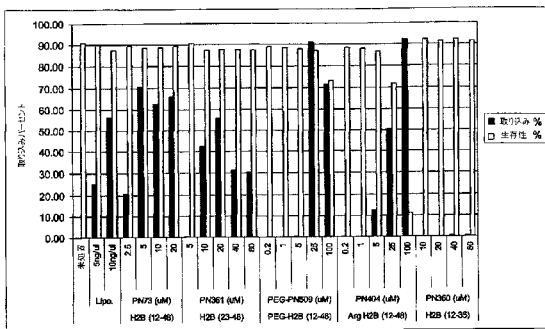
【 図 3 】



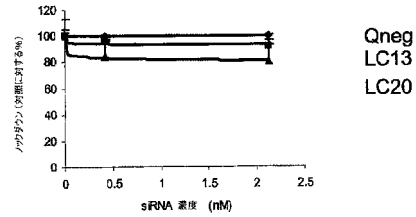
【 図 4 】



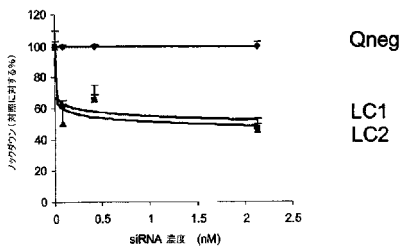
【 図 5 】



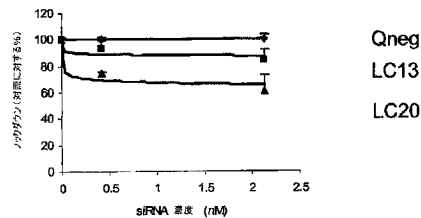
【 図 6 C 】



【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【配列表】

2008514647000001.xml

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 1 2 N	15/00		A
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/06		
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	C 0 7 K	7/08		
			C 0 7 K	14/00		

(31)優先権主張番号 11/121,566

(32)優先日 平成17年5月4日(2005.5.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 チェン, リーシャン

アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 0 0 6 , ベルビュー , エス . イー . 4 3 番プレイス 1 3 6
2 0

(72)発明者 チェン, ユチン

アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 0 0 6 , ベルビュー , エス . イー . 4 3 番プレイス 1 3 6
2 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11 DA02 DA06 GA11 GA13 HA17
4C076 BB13 CC04 EE41N FF34
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA16 MA66 NA14
ZB11 ZB15 ZB21 ZC02
4H045 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 EA20