

(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2016-531563

(P2016-531563A)

(43) 公表日 平成28年10月13日(2016.10.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 6
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-525279 (P2016-525279)
 (86) (22) 出願日 平成26年7月9日 (2014.7.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年3月14日 (2016.3.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2014/006145
 (87) 国際公開番号 W02015/005669
 (87) 国際公開日 平成27年1月15日 (2015.1.15)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0080579
 (32) 優先日 平成25年7月9日 (2013.7.9)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

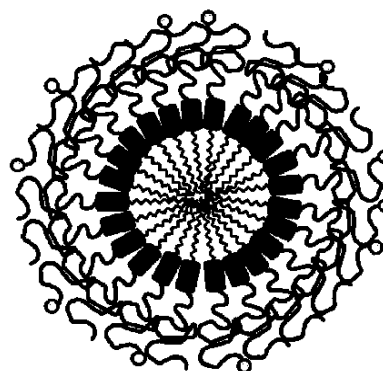
(71) 出願人 514171197
 バイオニア コーポレーション
 BIONEER CORPORATION
 大韓民国, 306-220, テジョン, テ
 ドクーク, ムンピョンソーロ, 8-11
 (71) 出願人 516011822
 サノフィーアベンティス コリア カンパ
 ニー リミテッド
 SANOFI-AVENTIS KORE
 A CO., LTD.
 大韓民国, 137-804, ソウル, ソチ
 ヨーグ, パンボーデロ, 235
 (74) 代理人 100090251
 弁理士 森田 憲一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓癌関連遺伝子特異的 s i R N A、そのような s i R N A を含む二重らせんオリゴRNA構造体及びこれを含む癌予防または治療用組成物

(57) 【要約】

本発明は、肝臓癌関連遺伝子特異的 s i R N A 及びこれを含む高効率二重らせんオリゴRNA構造体に関し、前記二重らせんオリゴRNA構造体は、細胞内に効率的に伝達されるようにするために、二重らせんRNA (s i R N A) の両末端に親水性物質及び疎水性物質を単純共有結合またはリンカー媒介 (l i n k e r - m e d i a t e d) 共有結合を利用して接合された形態の構造を持ち、水溶液で前記二重らせんオリゴRNA構造体の疎水性相互作用によってナノ粒子形態に転換されることができる。前記二重らせんオリゴRNA構造体に含まれた s i R N A は、肝臓癌関連遺伝子、特に G a n k y r i n または B M I - 1 特異的 s i R N A であることが好ましい。また、本発明は、前記二重らせんオリゴRNA構造体の製造方法及び前記二重らせんオリゴRNA構造体を含む癌、特に肝臓癌を予防または治療するための薬学的組成物に関する。



Double stranded oligo RNA molecules
 Hydrophobic compound
 siRNA
 Hydrophilic compound
 Target specific ligand

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 ~ 200 番から選択されたいずれか一つの配列を有するセンス鎖 (sense strand) とそれに相補的な配列を持つアンチセンス鎖からなる Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA。

【請求項 2】

siRNA のセンス鎖またはアンチセンス鎖は、19 ~ 31 個のヌクレオチドからなることを特徴とする請求項 1 に記載の Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA。

【請求項 3】

配列番号 1、10、13、56、99、102、180、197、199 または 200 番で構成された群から選択されたいずれか一つの配列を持つセンス鎖とそれに相補的な配列を持つアンチセンス鎖を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA。

【請求項 4】

siRNA のセンス鎖またはアンチセンス鎖は、一つ以上の化学的変形 (chemical modification) を含むことを特徴とする請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載の Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA。

【請求項 5】

前記化学的変形は、ヌクレオチド内糖構造の 2' 炭素位置で -OH 基が -CH₃ (メチル)、-OCH₃ (methoxy)、-NH₂、-F (フッ素)、-O-2-メトキシエチル-O-プロピル (propyl)、-O-2-メチルチオエチル (methylthioethyl)、-O-3-アミノプロピル、-O-3-ジメチルアミノプロピル、-O-N-メチルアセトアミドまたは -O-ジメチルアミドオキシエチルへの置換による変形；ヌクレオチド内糖 (sugar) 構造内の酸素が硫黄に置き換えられた変形；ヌクレオチド結合のホスホロチオエート (phosphorothioate) またはボラノホスフェート (boranophosphate)、メチルホスホネート (methylphosphonate) 結合への変形；及び PNA (peptide nucleic acid)、LNA (locked acid) または UNA (unlocked nucleic acid) 形態への変形から選択された一つ以上の変形であることを特徴とする請求項 4 に記載の Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA。

【請求項 6】

siRNA のアンチセンス鎖の 5' 末端に一つ以上のリン酸基 (phosphate group) が結合されていることを特徴とする請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA。

【請求項 7】

下記の構造式 1 の構造を持つ二重らせんオリゴ RNA 構造体：

[構造式 1]

A-X-R-Y-B

前記構造式 1 で、A は親水性物質、B は疎水性物質、X および Y はそれぞれ独立して単純共有結合またはリンカーが媒介された共有結合を意味して、R は Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA を意味する。

【請求項 8】

下記の構造式 2 の構造を持つことを特徴とする請求項 7 に記載の二重らせんオリゴ RNA 構造体：

[構造式 2]

A-X-S-Y-B

AS

10

20

30

40

50

前記構造式 2 で、S は、請求項 7 に記載の s i R N A のセンス鎖、A S は、s i R N A のアンチセンス鎖を意味して、A、B、X および Y は、請求項 7 に記載の構造式 1 での定義と同様である。

【請求項 9】

下記の構造式 3 の構造を持つことを特徴とする請求項 8 に記載の二重らせんオリゴRNA 構造体：

[構造式 3]

A - X - 5' S 3' - Y - B

AS

10

前記構造式 3 で、A、B、X、Y、S および A S は、請求項 8 に記載の構造式 2 での定義と同様であり、5' および 3' は、s i R N A センス鎖の 5' 末端および 3' 末端を意味する。

【請求項 10】

G a n k y r i n または B M I - 1 特異的 s i R N A は、請求項 1 から請求項 6 のいずれかに記載の s i R N A であることを特徴とする請求項 7 から請求項 9 のいずれかに記載の二重らせんオリゴRNA 構造体。

【請求項 11】

前記親水性物質の分子量は、200 ~ 10,000 であることを特徴とする請求項 7 から請求項 10 のいずれかに記載の二重らせんオリゴRNA 構造体。

20

【請求項 12】

前記親水性物質は、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルピロリドン及びポリオキサゾリンで構成された群から選択されるいずれか一つあることを特徴とする請求項 11 に記載の二重らせんオリゴRNA 構造体。

【請求項 13】

前記疎水性物質の分子量は、250 ~ 1,000 であることを特徴とする請求項 7 から請求項 10 のいずれかに記載の二重らせんオリゴRNA 構造体。

【請求項 14】

前記疎水性物質は、ステロイド(steroid)誘導体、グリセリド(glyceride)誘導体、グリセロールエーテル(glycerol ether)、ポリプロピレングリコール(polypropylene glycol)、C₁₂ ~ C₅₀ の不飽和または飽和炭化水素(hydrocarbon)、ジアシルホスファチジルコリン(diacylphosphatidylcholine)、脂肪酸(fatty acid)、リン脂質(phospholipid)、及びリポポリアミン(lipopolyamine)で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 13 に記載の二重らせんオリゴRNA 構造体。

30

【請求項 15】

前記ステロイド(steroid)誘導体は、コレステロール、コレスタノール、コール酸、コレステリルホルマート、コテストニルモルメートおよびコリスタニルアミンで構成された群から選択されることを特徴とする請求項 14 に記載の二重らせんオリゴRNA 構造体。

40

【請求項 16】

前記グリセリド誘導体は、モノ -、ジ - およびトリ - グリセリドから選択されることを特徴とする請求項 14 に記載の二重らせんオリゴRNA 構造体。

【請求項 17】

前記 X、Y および Z 表される共有結合は、非分解性結合または分解性結合であることを特徴とする請求項 7 から請求項 16 のいずれかに記載の二重らせんオリゴRNA 構造体。

【請求項 18】

前記非分解性結合は、アミド結合またはリン酸化結合であることを特徴とする請求項 7 に記載の二重らせんオリゴRNA 構造体。

50

【請求項 19】

前記分解性結合は、ジスルフィド結合、酸分解性結合、エステル結合、アンハイドライド結合、生分解性結合または酵素分解性結合であることを特徴とする請求項 17 に記載の二重らせんオリゴRNA構造体。

【請求項 20】

前記親水性物質に受容体媒介内包作用 (receptor-mediated endocytosis, RME) を介してターゲット細胞内在化 (internalization) を増進させる受容体と特異的に結合する特性を持つリガンド (ligand) が追加的に結合されたことを特徴とする請求項 7 から請求項 16 のいずれかに記載の二重らせんオリゴRNA構造体。

10

【請求項 21】

前記リガンドは、ターゲット受容体特異的抗体やアプタマー、ペプチド、葉酸 (Folate)、N-アセチルガラクトサミン (N-acetyl Galactosamine, NAG)、ブドウ糖 (glucose) 及びマンノース (mannose) で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 20 に記載の二重らせんオリゴRNA構造体。

【請求項 22】

請求項 7 から請求項 21 のいずれかに記載の二重らせんオリゴRNA構造体を含むナノ粒子。

【請求項 23】

互いに異なる配列を持つ siRNA を含む二重らせんオリゴRNA構造体が混合されて構成されることを特徴とする請求項 22 に記載のナノ粒子。

20

【請求項 24】

請求項 1 から請求項 6 のいずれかに記載の siRNA、請求項 7 から請求項 21 のいずれかに記載の二重らせんオリゴRNA構造体、または請求項 22 または請求項 23 に記載のナノ粒子を有効成分として含む薬学的組成物。

【請求項 25】

前記薬学的組成物は、癌を防または治療するための薬学的組成物であることを特徴とする請求項 24 に記載の薬学的組成物。

【請求項 26】

前記癌は、癌は、肝臓癌、胃癌、大腸癌、すい臓癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、腎臓癌及び肺癌で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 25 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 27】

前記肝臓癌は、HCC (hepatocellular carcinoma) であることを特徴とする請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 28】

請求項 24 から請求項 27 のいずれかに記載の組成物を含む凍結乾燥された形態の剤形。

【請求項 29】

請求項 1 から請求項 6 のいずれかに記載の siRNA、請求項 7 から請求項 21 のいずれかに記載の二重らせんオリゴRNA構造体、請求項 22 または請求項 23 に記載のナノ粒子、または請求項 24 から請求項 28 のいずれかに記載の組成物または剤形を予防または治療を要する個体に投与することを特徴とする癌の予防または治療方法。

40

【請求項 30】

前記癌は、癌は、肝臓癌、胃癌、大腸癌、すい臓癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、腎臓癌及び肺癌で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 29 に記載の癌の防または治療方法。

【請求項 31】

前記肝臓癌は、HCC (hepatocellular carcinoma) であ

50

ることを特徴とする請求項 30 に記載の癌の防または治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝臓癌関連遺伝子特異的 siRNA およびこれを含む高効率二重らせんオリゴRNA 構造体に関し、前記二重らせんオリゴRNA 構造体は、細胞内に効率的に伝達されるようにするために、二重らせんRNA (siRNA) の両末端に親水性物質および疏水性物質を単純共有結合またはリンカー媒介 (linker-mediated) 共有結合を利用して接合された形態の構造を持ち、水溶液で前記二重らせんオリゴRNA 構造体の疏水性相互作用によってナノ粒子形態に転換されることができる。前記二重らせんオリゴRNA 構造体に含まれた siRNA は、肝臓癌関連遺伝子、特に Gankyrin または BMI-1 特異的な siRNA であることが好ましい。

10

【0002】

また、本発明は、前記二重らせんオリゴRNA 構造体の製造方法および前記二重らせんオリゴRNA 構造体を含む癌、特に肝臓癌を予防または治療するための薬剤学的組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

遺伝子の発現を抑制する技術は、疾病治療のための治療剤開発および標的検証において重要なツールである。この技術で、干渉RNA (RNA interference、以下「RNAi」という) は、その役割が発見された以後、多様な種類の哺乳動物細胞 (mammalian cell) で配列特異的に mRNA に作用することが明らかになった (Silence of the transcripts: RNA interference in medicine. J Mol Med, 2005, 83: 764-773)。長い鎖の RNA 二本鎖が細胞に伝達されると、伝達された RNA 二本鎖は Dicer というエンドヌクレアーゼ (endonuclease) によって 21~23 塩基対 (base pair, bp) でプロセッシングされた短い干渉RNA (small interfering RNA、以下「siRNA」という) に変換されて、siRNA は、RISC (RNA-induced silencing complex) に結合してガイド (アンチセンス) 鎖が、ターゲット mRNA を認識して分解する過程を介してターゲット遺伝子の発現を配列特異的に阻害する (NUCLEIC ACID THERAPEUTICS: BASIC PRINCIPLES AND RECENT APPLICATIONS. Nature Reviews Drug Discovery. 2002. 1, 503-514)。

20

30

【0004】

ベルTRAN (Bertrand) 研究グループの研究によると、同じターゲット遺伝子に対する siRNA がアンチセンスオリゴヌクレオチド (Antisense oligonucleotide, ASO) に比べて siRNA が生体内/外 (in vitro および in vivo) で mRNA 発現の阻害効果が優れて、該当効果が長く持続される効果を持つと明らかになった (Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. 296: 1000-1004)。また、siRNA の作用機序は、ターゲット mRNA と相補的に結合して配列特異的に標的遺伝子の発現を調節するので、既存の抗体ベース医薬品や化学物質 (small molecule drug) に比べて適用できる対象が画期的に拡大する可能性がある長所を持つ (Progress Towards in Vivo Use of siRNAs. MOLECULAR THERAPY. 2006 13 (4): 664-670)。

40

【0005】

50

s i R N A などの優れた効果および多様な使用範囲にもかかわらず、s i R N A が治療剤として開発されるためには、s i R N A の安定性改善と細胞伝達効率改善によって、s i R N A がターゲット細胞に効果的に伝達されなければならない (Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. Drug Discov Today. 2006 Jan; 11 (1 - 2) : 67 - 73)。

【 0 0 0 6 】

前記問題を解決するために、体内安定性改善のために s i R N A の一部ヌクレオチドまたは骨格 (b o a c k b o n e) を核酸分解酵素抵抗性を持つように変形 (m o d i f i c a t i o n) するかウイルス性ベクター (v i r a l v e c t o r)、リボソームまたはナノ粒子 (n a n o p a r t i c l e) 等の伝達体の利用などに対する研究が活発に試みられている。

10

【 0 0 0 7 】

アデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルス性ベクターを利用した伝達システムは、形質注入効率 (t r a n s f e c t i o n e f f i c a c y) が高いが、免疫原性 (i m m u n o g e n i c i t y) および発ガン性 (o n c o g e n i c i t y) が高い。一方、ナノ粒子を含む非ウイルス性 (n o n - v i r a l) 伝達システムは、ウイルス性伝達システムに比べて細胞伝達効率は低い方であるが、生体内 (i n v i v o) での安定性 (s t a b i l i t y) が高く、ターゲット特異的に伝達が可能で、内包されている R N A i オリゴヌクレオチドを細胞または組織に吸収 (u p t a k e) および内在化 (i n t e r n a l i z a t i o n) 等の改善された伝達効果が高いだけでなく、細胞毒性および免疫誘発 (i m m u n e s t i m u l a t i o n) が殆どない長所を有していて、現在はウイルス性伝達システムに比べて有力な伝達方法と評価されている (N o n v i r a l d e l i v e r y o f s y n t h e t i c s i R N A s i n v i v o . J C l i n I n v e s t . 2007 D e c e m b e r 3 ; 117 (12) : 3623 - 3632)。

20

【 0 0 0 8 】

前記非ウイルス性伝達システムのうちナノ伝達体 (n a n o c a r r i e r) を利用する方法は、リボソーム、陽イオン高分子複合体などの様々な高分子を使用することによってナノ粒子を形成して、s i R N A をこのようなナノ粒子 (n a n o p a r t i c l e)、すなわちナノ伝達体 (n a n o c a r r i e r) に担持して細胞に伝達する形態を持つ。ナノ伝達体を利用する方法のうち主に活用される方法は、高分子ナノ粒子 (p o l y m e r i c n a n o p a r t i c l e)、高分子ミセル (p o l y m e r m i c e l l e)、リポプレックス (l i p o p l e x) 等があるが、この中でリポプレックスを利用した方法は、カチオン性脂質で構成されて細胞のエンドソーム (e n d o s o m e) のアニオン性脂質と相互作用してエンドソームの脱安定化効果を誘発して、細胞内で (に) 伝達する役割をする (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 15 ; 93 (21) : 11493 - 8 , 1996)。

30

【 0 0 0 9 】

また、s i R N A パッセンジャー (p a s s e n g e r ; センス (s e n s e)) 鎖の末端部位に化学物質などを連結して増進された薬物動態 (p h a r m a c o k i n e t i c s) 的特徴を持つようにして、生体内 (i n v i v o) で高い効率を誘導できることが知られている (N a t u r e 11 ; 432 (7014) : 173 - 8 , 2004)。この時 s i R N A センス (s e n s e ; パッセンジャー (p a s s e n g e r)) またはアンチセンス (a n t i s e n c e ; ガイド (g u i d e)) 鎖の末端に結合された化学物質の性質により s i R N A の安定性が変わる。例えば、ポリエチレングリコール (p o l y e t h y l e n e g l y c o l , P E G) のような高分子化合物が接合された形態の s i R N A はカチオン性物質が存在する条件で s i R N A のアニオン性リン酸基と相互作用して複合体を形成することによって、改善された s i R N A 安定性を持つ伝達体となる (J C o n t r o l R e l e a s e 129 (2) : 107 - 16 , 2008)。

40

50

特に高分子複合体で構成されたミセル (micelle) は薬品伝達運搬体として使われる他のシステムである、小球体 (microsphere) またはナノ粒子 (nanoparticle) 等に比べてその大きさが小さく分布が非常に一定で、自発的に形成される構造であるため、製剤の品質管理および再現性確保が容易である長所がある。

【0010】

また、siRNAの細胞内伝達効率性を向上させるために、siRNAに生体適合性高分子である親水性物質 (例えば、ポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG)) を単純共有結合またはリンカー媒介 (linker-mediated) 共有結合で接合させたsiRNA接合体を介して、siRNAの安定性確保および効率的な細胞膜透過性のための技術が開発された (大韓民国登録特許公報第883471号参照)。しかし、siRNAの化学的変形およびポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) を接合させること (PEGylation) だけでは生体内での低い安定性とターゲット組織への伝達がスムーズでない短所は依然として残る。このような短所を解決するために、オリゴヌクレオチド、特にsiRNAのような二重らせんオリゴRNAに親水性および疎水性物質が結合された二重らせんオリゴRNA構造体が開発されたが、前記構造体は、疎水性物質の疎水性相互作用によってSAMiRNATM (self assembled micelle inhibitory RNA) と命名された自己組み立てナノ粒子を形成することになるが (大韓民国登録特許公報第1224828号参照)、SAMiRNATM技術は、既存の伝達技術に比べて非常にサイズが小さいながらも均一な (homogenous) ナノ粒子を収得できる長所を持つ。

10

20

【0011】

一方、韓国では、人口4人中1人が癌 (死亡原因1位) で死亡して、毎年診断方法と資料収集方法の発展と人口の高齢化と環境変化などによってその数が顕著に増加する傾向にある。また、世界的な癌発生及び癌による死亡も増加する傾向にあって癌征服のための予防、診断及び治療技術は人類共通の緊急な課題である (BT技術動向報告書、主要疾患別新薬開発動向、生命工学政策研究センター、2007、叢書第72冊)。

【0012】

癌は、世界的に最も多い死亡者を出す疾病の一つで、革新的な癌治療剤の開発はこれに対する治療時発生する医療費を節減できると同時に高付加価値を創り出すことができる。癌の治療は、手術、放射線治療、化学療法、生物学的治療に区分されるが、この中で化学療法は、化学物質で癌細胞の増殖を抑制したり殺す治療法であり、抗癌剤によって現れる毒性は、相当部分正常細胞でも現れるため、一定程度の毒性を示し、抗癌剤が効果を示すが一定期間使用後には効果が喪失される耐性が発生するので、癌細胞に選択的に作用して耐性が生じない抗癌剤の開発が切に望まれる (癌征服の現住所 Biowave 2004. 6 (19))。近年、癌に対する分子遺伝情報の確保を通じて癌の分子的特性を標的にした新しい抗癌剤の開発が進行されており、癌細胞だけが持っている特徴的な分子的標的 (molecular target) をねらう抗癌剤は、薬剤耐性が生じないとの報告もある。したがって、癌細胞だけ持っている特徴的な分子的標的を狙った遺伝子治療剤の開発を通じて既存抗癌剤に比べて効果が優れて副作用が少ない治療剤の開発が可能である。

30

40

【0013】

RNA干渉現象を利用して高い特異性と効率で遺伝子発現を阻害できることが知られた以後癌に対する治療剤として多様な遺伝子をターゲットにするsiRNAが研究されている。これらの遺伝子は、腫瘍遺伝子 (oncogene) を始め、抗-アポトーシス物質 (anti-apoptotic molecule)、テロメラーゼ (telomerase)、成長因子受容体遺伝子 (growth factor receptor gene)、信号伝達物質 (signaling molecule) 等で癌細胞の生存に必要な遺伝子の発現を阻害させたりアポトーシスを誘導することが主な方向である (RNA interference in cancer. Biomolecular En

50

gineering. 2006; 23: 17 - 34)。

【0014】

Gankyrinは、26Sプロテアソーム(proteasome)の調節複合体であるp28遺伝子産物で、p28^{GANK}とも呼ばれ、腫瘍抑制遺伝子であるpRb(retinoblastoma protein)とp53の活性を調節する細胞周期調節因子で腫瘍タンパク質(oncoprotein)である。Gankyrinが過発現されると、pRbのリン酸化(phosphorylation)が増加して、p16^{INK4a}の活性が阻害されて細胞分裂進行が加速される(Gene therapy strategies for hepatocellular carcinoma. Journal of biomedical science. 2006; 13(4): 453 - 68)。Gankyrinが減ると、pRbのリン酸化が減少して、caspase-8、9媒介アポトーシスが増加して肝臓癌(hepatocellular carcinoma, HCC)動物モデルで腫瘍成長抑制が観察された(Use of adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28GANK in hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2005; 128(7): 2029 - 41)。

10

【0015】

また、BMI-1(B cell specific Molonet murine leukemia virus Insertion site 1)は、転写抑制因子で、造血幹細胞と神経幹細胞を調節する役割をする。BMI-1は知らされた酵素活性はないが、染色質(chromatin)の構造と腫瘍抑制タンパク質であるp16(ink4a)とp14(Arf)の転写活性(transcription activity)を調節するPRC1複合体(polycomb repressive complex-1)の核心調節因子である(BMI1 as a novel target for drug discovery in cancer. J Cell Biochem. 2011; 112(10): 2729 - 41)。正常細胞でBMI-1シグナルがなければ、細胞周期が進行してアポトーシスが抑制されて分裂が進行される。種々の癌でBMI-1が過発現することが確認され、BMI-1の発現が抑制されると、in vitro及びin vivo上で細胞増殖(proliferation)、コロニー形成(colony formation)、移動(migration)が明らかに阻害されることが観察された(Effect of siRNA-mediated silencing of BMI-1 gene expression on HeLa cells. Cancer Science. 2010; 101(2): 379 - 386)。

20

30

【0016】

前記考察した通り、GankyrinとBMI-1の癌治療剤ターゲットとしての可能性は提示されている状況であるが、まだGankyrinとBMI-1に対するsiRNA治療剤及びこれの伝達技術に対する技術開発は僅かな状況で、特異的かつ高効率でGankyrinとBMI-1の発現を阻害できるsiRNA治療剤及びこれの伝達技術に対する市場の需要は非常に高い状況である。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の目的は、前記のような問題点を解決しようと、GankyrinまたはBMI-1に特異的でありかつ非常に高い効率でその発現を阻害できる新規siRNAおよびこれを含む二重らせんオリゴRNA構造体、およびそのような二重らせんオリゴRNA構造体の製造方法を提供するところにある。

【0018】

また、本発明の他の目的は、前記GankyrinまたはBMI-1特異的なsiRNAまたはそのようなsiRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体を有効性分として

50

含む癌、特に肝臓癌予防または治療用薬剤学的組成物を提供することである。

【0019】

本発明のさらに他の目的は、前記 *Gankyrin* または *BMI-1* 特異的な *siRNA* または、そのような *siRNA* を含む二重らせんオリゴRNA構造体を利用して癌を予防または治療する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明では配列番号1~200番で構から選択されたいずれか一つの配列を含むセンス鎖 (sense strand) である第1のオリゴヌクレオチドとそれに相補的な配列を含むアンチセンス鎖である第2のオリゴヌクレオチドからなる肝臓癌関連遺伝子である *Gankyrin* または *BMI-1* 特異的 *siRNA* を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本発明に係る二重らせんオリゴRNA構造体で構成されたナノ粒子の模式図。

【図2】本発明に係る配列番号1、102または201番の配列をセンス鎖として含む *siRNA* を含む二重らせんオリゴRNA構造体からなるナノ粒子の大きさ (size) 及び *PDI* (polydispersity index) の測定グラフで、*SAMiRNA-Gank* は配列番号1番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* を含む二重らせんオリゴRNA構造体からなるナノ粒子；*SAMiRNA-BMI* は、配列番号102番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* を含む二重らせんオリゴRNA構造体からなるナノ粒子；*SAMiRNA-Gank+BMI* は、配列番号1及び配列番号102番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* を含む二重らせんオリゴRNA構造体からなるナノ粒子を示す。

【図3】本発明の配列番号1~100番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* の1nM濃度で形質転換させた後、確認されたターゲット遺伝子 (target gene) 発現阻害量グラフ。

【図4】本発明の配列番号1~100番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* の0.2nM濃度で形質転換させた後、確認されたターゲット遺伝子発現阻害量グラフ。

【図5】本発明の配列番号101~200番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* の1nM濃度で形質転換させた後、確認されたターゲット遺伝子発現阻害量グラフ。

【図6】本発明の配列番号101~200番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* の0.2nM濃度で形質転換させた後、確認されたターゲット遺伝子発現阻害量グラフ。

【図7】本発明の配列番号1、10、12、35、56、61、81、88、99番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* を2種の肝臓癌細胞に低濃度で処理してターゲット遺伝子の発現阻害量を確認したグラフ、A: *Hep3B* 細胞株 B: *Huh-7* 細胞株。

【図8】本発明の配列番号102、124、125、180、183、193、197、198、199、200番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* を2種の肝臓癌細胞に低濃度で処理してターゲット遺伝子の発現阻害量を確認したグラフ、A: *Hep3B* 細胞株 B: *Huh-7* 細胞株。

【図9】本発明の配列番号1、102番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* の IC_{50} (inhibition concentration 50%) を確認したグラフ、A: 配列番号1番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* の IC_{50} B: 配列番号102番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* の IC_{50} 。

【図10】本発明の配列番号1、102、201番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* を2種の癌細胞に形質転換させて該当 *siRNA* によるコロニー形成分析 (colony forming assay, CFA) を介してコロニー形成抑制を確認した写真、A: 配列番号1番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* のコロニー形成分析 B: 配列番号102番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* のコロニー形成分析。

【図11】本発明の配列番号1、102、201番の配列をセンス鎖として持つ *siRNA* を同時形質転換 (co-transfection) 時ターゲット遺伝子の発現阻害を

確認したグラフ。

【図12】本発明の配列番号1、102、201番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを同時形質転換 (co-transfection) 時示される細胞生存率 (cell viability) 減少を確認したグラフ。

【図13】本発明の配列番号102及び201番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを含む二重らせんRNA構造体を含むナノ粒子の肝臓癌モデル尾静脈投与によるターゲット遺伝子発現阻害を確認したグラフで、最後の投与後48時間が経過した時点の腫瘍組織で配列番号201番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを含む二重らせんRNA構造体を含むナノ粒子が投与された対照群対比配列番号102番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを含む二重らせんRNA構造体を含むナノ粒子が投与された実験群で発現するターゲット遺伝子のmRNA量を確認したグラフで、x軸の各数字は個体を示す。

【図14】本発明の配列番号1、102、201番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを含む二重らせんRNA構造体を含むナノ粒子の肝臓癌モデル尾静脈投与による肝臓癌成長抑制効果を確認したグラフで、ナノ粒子投与による肝臓癌成長抑制程度を血清内AFP数値を確認する。DPBSは、溶媒であるDPBSだけを投与した対照群；201は配列番号201番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを含むナノ粒子を5mg/kg body weightで投与した対照群；1は配列番号1番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを含むナノ粒子を5mg/kg body weightで投与した実験群；102は配列番号102番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを含むナノ粒子を5mg/kg body weightで投与した実験群；1+102は同量の配列番号1番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体と配列番号102番の配列をセンス鎖として含むsiRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体からなるナノ粒子を5mg/kg body weight (各配列当たり処理された二重らせんオリゴRNA構造体の量は2.5mg/kg body weightずつである) で投与した実験群；sorafenibは陽性対照群を意味する。

【0022】

発明を実施するための形態

本発明では配列番号1～200番から選択されたいずれか一つの配列を含むセンス鎖 (sense strand) である第1のオリゴヌクレオチドとそれに相補的な配列を含むアンチセンス鎖である第2のオリゴヌクレオチドからなる肝臓癌関連遺伝子である G

ankyrinまたはBMI-1特異的siRNAを提供する。
本発明における「GankyrinまたはBMI-1特異的siRNA(s)」とは、GankyrinまたはBMI-1タンパク質をエンコードする遺伝子に特異的なsiRNA(s)を意味する。

【0023】

また、GankyrinまたはBMI-1に対する特異性が維持される限り、前記配列番号1～配列番号200に係る配列を含むセンス鎖またはそれに相補的なアンチセンス鎖で、一つまたは2以上の塩基が置換、欠失、または挿入された配列を含むセンス鎖及びアンチセンス鎖を含むGankyrinまたはBMI-1特異的siRNAも本発明の権利範囲に含まれることは、本発明が属する技術分野で通常の知識を有する者にとっては自明である。

【0024】

前記配列番号1～100番は、Gankyrinに特異的なsiRNAのセンス鎖配列で、配列番号101～200番は、BMI-1に特異的なsiRNAのセンス鎖配列である。

本発明に係るsiRNAは、好ましくは配列番号1、10、13、56または99番に係るGankyrin特異的siRNAのセンス鎖、または配列番号102、180、197、199または200番に係るBMI-1特異的siRNAのセンス鎖を含み、さらに好ましくは、配列番号1、10または99番に係るGankyrin特異的siRNAのセンス鎖、または配列番号102、199または200番に係るBMI-1特異

的 *siRNA* のセンス鎖を含み、

最も好ましくは、配列番号 1 番に係る *Gankyrin* 特異的 *siRNA* のセンス鎖、または配列番号 102 番に係る *BMI-1* 特異的 *siRNA* のセンス鎖を含む。

【0025】

本発明に係る *siRNA* のセンス鎖またはアンチセンス鎖は、19～31 個のヌクレオチドからなることが好ましく、前記配列番号 1～配列番号 200 番から選択されたいずれか一つの配列を含むセンス鎖およびこれに相補的なアンチセンス鎖を含む。

【0026】

本発明で提供される *Gankyrin* または *BMI-1* 特異的 *siRNA* は、該当遺伝子を暗号化する mRNA と相補的に結合することができるように設計された塩基配列を持つので、該当遺伝子の発現を効果的に抑制できることを特徴とする。また、前記 *siRNA* の 3' 末端に一つまたは二つ以上の非結合 (*unpaired*) されたヌクレオチドを持つ構造であるオーバーハング (*overhang*) を含んでもよく、

10

【0027】

また、前記 *siRNA* の生体内安定性向上のために、核酸分解酵素抵抗性付与および特異的免疫反応減少のための様々な変形 (*modification*) を含んでもよい。前記 *siRNA* を構成する第 1 または第 2 オリゴヌクレオチドの変形は一つ以上のヌクレオチド内糖構造の 2' 炭素位置で -OH 基が -CH₃ (メチル)、-OCH₃ (*methoxy*)、-NH₂、-F (フッ素)、-O-2-メトキシエチル-O-プロピル (*propyl*)、-O-2-メチルチオエチル (*methylthioethyl*)、-O-3-アミノプロピル、-O-3-ジメチルアミノプロピル、-O-N-メチルアセトアミドまたは -O-ジメチルアミドオキシエチルへの置換による変形；ヌクレオチド内糖 (*sugar*) 構造内の酸素が硫黄に置き換えられた変形；及びヌクレオチド結合のホスホロチオエート (*phosphorothioate*) またはボラノホスフェート (*boranophosphate*)、メチルホスホネート (*methyl phosphonate*) 結合への変形から選択された一つ以上の変形が組み合わせて使用でき、PNA (*peptide nucleic acid*)、LNA (*locked acid*) または UNA (*unlocked nucleic acid*) 形態への変形も使用可能である (*Ann. Rev. Med. Vol. 55: pp 61-65 2004, US 5,660,985, US 5,958,691, US 6,531,584, US 5,808,023, US 6,326,358, US 6,175,001; Bioorg. Med. Chem. Lett. 14: 1139-1143, 2003; RNA, 9: 1034-1048, 2003; Nucleic Acid Res. 31: 589-595, 2003; Nucleic Acids Research, 38(17) 5761-5773, 2010; Nucleic Acids Research, 39(5) 1823-1832, 2011*)。

20

30

【0028】

本発明で提供される *Gankyrin* または *BMI-1* 特異的 *siRNA* は、該当遺伝子の発現を低下させるだけでなく、該当タンパク質の発現を顕著に阻害させる。また、癌の治療において使用される癌特異的 RNAi と典型的な組み合わせられる (*combination*) 治療方法である放射線や化学療法の感受性を向上させると知られているので (*The Potential RNAi-based Combination Therapeutics. Arch Pharm Res 34(1):1-2, 2011*)、本発明の *Gankyrin* 特異的 *siRNA* または *BMI-1* 特異的 *siRNA* を既存の放射線または化学療法と並行使用できる。

40

【0029】

また、本発明の *Gankyrin* 特異的 *siRNA* 及び *BMI-1* 特異的 *siRNA* を同時に使用する場合、該当遺伝子の発現が同時に阻害されて癌細胞の成長を明確に阻害できる特徴を持つ。

【0030】

50

本発明の他の様態として、肝臓癌関連遺伝子、特に、GankyrinまたはBMI-1特異的 siRNA の生体内への効率的な伝達および安定性向上のために、siRNA の両末端に親水性物質および疎水性物質が接合された形態の接合体を提供する。

【0031】

前記のとおり siRNA に親水性物質および疎水性物質が結合された siRNA 接合体の場合、疎水性物質の疎水性相互作用によって自己組み立てナノ粒子を形成するようになるが（大韓民国特許登録番号第1224828号参照）、このような接合体は、体内への伝達効率および体内での安定性がきわめて優秀なだけでなく、粒子の大きさが非常に均一してQC（Quality control）が容易であるため、薬物としての製造工程が簡単である長所がある。

10

【0032】

一つの好ましい具体例として、本発明に係るGankyrinまたはBMI-1特異的 siRNA を含む二重らせんオリゴRNA構造体は、下記の構造式(1)のような構造を持つことが好ましい：

[構造式 1]

A-X-R-Y-B

前記構造式(1)で、Aは親水性物質、Bは疎水性物質、XおよびYはそれぞれ独立して単純共有結合またはリンカーが媒介された共有結合を意味して、RはGankyrinまたはBMI-1特異的 siRNA を意味する。

20

【0033】

前記GankyrinまたはBMI-1特異的 siRNA は、GankyrinまたはBMI-1特異性が維持される限り、siRNA のアンチセンス鎖がGankyrinまたはBMI-1遺伝子の結合部位と100%塩基配列が相補的な場合、すなわち完全一致（perfect match）することだけでなく、一部塩基配列が一致しない場合、すなわち不完全一致（mismatch）があるものも含まれる。このような siRNA は、GankyrinまたはBMI-1遺伝子のmRNA配列の一部に対して少なくとも70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、より一層好ましくは95%以上、最も好ましくは100%の相同性を持つ配列で構成されてもよい。

【0034】

このような siRNA は、二本鎖デュプレックスまたは、一本鎖ポリヌクレオチドであってもよく、一本鎖ポリヌクレオチドとしては、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはmicroRNA（miRNAs）等が挙げられるがこれに限定されない。

30

【0035】

より好ましくは、本発明に係るGankyrinまたはBMI-1特異的 siRNA を含む二重らせんオリゴRNA構造体は、下記の構造式(2)の構造を持つ：

[構造式 2]

A-X-S-Y-B

AS

40

前記構造式(2)で、A、B、XおよびYは、前記構造式(1)での定義と同様であり、Sは、GankyrinまたはBMI-1特異的 siRNA のセンス鎖、ASは、GankyrinまたはBMI-1特異的 siRNA のアンチセンス鎖を意味する。

【0036】

より好ましくは、GankyrinまたはBMI-1特異的 siRNA を含む二重らせんオリゴRNA構造体は、下記の構造式3の構造を持つ：

[構造式 3]

A-X-5' S 3'-Y-B

AS

50

前記構造式 3 で、A、B、S、AS、X および Y は、前記構造式 1 での定義と同様であり、5' および 3' は、Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA センス鎖の 5' 末端および 3' 末端を意味する。

【0037】

前記構造式 1 ~ 構造式 3 での Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA を含む二重らせんオリゴRNA 構造体のアンチセンス鎖の 5' 末端にリン酸基 (phosphate group) が一つ ~ 三つ結合されてもよく、siRNA の代わりに shRNA が使用されてもよいことは本発明の属する技術分野で通常の知識を有する者には自明である。

【0038】

前記構造式 1 ~ 構造式 3 での親水性物質は分子量が 200 ~ 10,000 であるカチオン性または非イオン性高分子物質であることが好ましく、さらに好ましくは 1,000 ~ 2,000 である非イオン性高分子物質である。例えば、親水性高分子化合物としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリオキサゾリンなどの非イオン性親水性高分子化合物を使用することが好ましいが、必ずしもこれに限定されるのではない。

【0039】

前記構造式 1 ~ 構造式 3 での疎水性物質 (B) は、疎水性相互作用を介して構造式 1 ~ 構造式 3 に係るオリゴヌクレオチド構造体で構成されたナノ粒子を形成する役割をする。前記疎水性物質は、分子量が 250 ~ 1,000 であることが好ましく、ステロイド (steroid) 誘導体、グリセリド (glyceride) 誘導体、グリセロールエーテル (glycerol ether)、ポリプロピレングリコール (polypropylene glycol)、C₁₂ ~ C₅₀ の不飽和または飽和炭化水素 (hydrocarbon)、ジアシルホスファチジルコリン (diacylphosphatidylcholine)、脂肪酸 (fatty acid)、リン脂質 (phospholipid)、リポポリアミン (lipopolyamine) 等が使用されるが、これに制限されず、本発明の目的に合致するものであればいかなる疎水性物質も使用可能である点は、本発明が属する技術分野で通常の知識を有する者には自明である。

【0040】

前記ステロイド (steroid) 誘導体は、コレステロール、コレスタノール、コール酸、コレステリルホルマート、コテストニルモルメートおよびコリスタニルアミンからなる群で選択されてもよく、前記グリセリド誘導体は、モノ -、ジ - およびトリ - グリセリドなどから選択されるが、この時、グリセリドの脂肪酸としては、C₁₂ ~ C₅₀ の不飽和または飽和脂肪酸が好ましい。

【0041】

特に、前記疎水性物質の中でも飽和または不飽和炭化水素やコレステロールが、本発明に係るオリゴヌクレオチド構造体の合成段階で容易に結合させることができる長所を有している点から好ましい。

【0042】

前記疎水性物質は、親水性物質の反対側末端 (distal end) に結合され、siRNA のセンス鎖またはアンチセンス鎖のどの位置に結合されても構わない。

【0043】

本発明に係る構造式 1 ~ 構造式 3 での親水性物質ブロックまたは疎水性物質と Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA は単純共有結合またはリンカーが媒介された共有結合 (X または Y) によって結合される。前記共有結合を媒介するリンカーは、親水性物質、または疎水性物質と Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA の末端で共有結合して、必要に応じて特定環境で分解が可能な結合を提供する限り特に限定されるのではない。したがって、前記リンカーは、本発明に係る二重らせんオリゴRNA 構造体の製造過程中 Gankyrin または BMI-1 特異的 siRNA および / または親水性物質 (または、疎水性物質) を活性化するために結合させるいかなる化合物も使用することができる。前記共有結合は、非分解性結合または分解性結合のうちいずれでもよい

10

20

30

40

50

。この時、非分解性結合としては、アミド結合またはリン酸化結合があり、分解性結合としては、ジスルフィド結合、酸分解性結合、エステル結合、アンハイドライド結合、生分解性結合または酵素分解性結合などがあるが、これに限定されない。

【0044】

また、前記構造式1～構造式3でのR（または、SおよびAS）で表されるGankyrinまたはBMI-1特異的siRNAは、GankyrinまたはBMI-1に特異的に結合できる特性を持つsiRNAならばいずれも制限なしに使用可能で、好ましくは本発明では配列番号1～200から選択されたいずれか一つの配列を含むセンス鎖とそれに相補的な配列を持つアンチセンス鎖で構成される。

【0045】

本発明に係るsiRNAは、好ましくは配列番号1、10、13、56または99番に係るGankyrin特異的siRNAのセンス鎖、または配列番号102、180、197、199または200番に係るBMI-1特異的siRNAのセンス鎖を含み、さらに好ましくは、配列番号1、10または99番に係るGankyrin特異的siRNAのセンス鎖、または配列番号102、199または200番に係るBMI-1特異的siRNAのセンス鎖を含み、最も好ましくは、配列番号1番に係るGankyrin特異的siRNAのセンス鎖、または配列番号102番に係るBMI-1特異的siRNAのセンス鎖を含む。

【0046】

一方、腫瘍(tumor)の組織は非常に堅固で正常組織に比べて拡散制限(diffusion-limitation)を持つが、このような拡散制限は、腫瘍成長に必要な栄養分、酸素及び二酸化炭素のような老廃物の移動に悪影響を与えるので、血管新生(angiogenesis)を介して周辺に血管を形成することによって拡散制限を克服する。血管新生を介して形成された腫瘍組織内血管は、腫瘍の種類によって100nm～2umほどの隙間を持つ緩い血管構造(leaky and defective blood vessel)を持つ。したがって、ナノ粒子は、正常組織の組織化された毛細血管に比べて緩い血管構造を含む癌組織の毛細血管内皮(capillary endothelium)を通過しやすくなって血液内循環過程中腫瘍間質(tumor interstitium)に接近が容易になり、また腫瘍組織の中にはリンパ管(lymphatic drainage)がなく薬物が蓄積される結果を示すが、これをEPR(enhanced permeation and retention)効果という。ナノ粒子が、このような効果によって腫瘍組織特異的に伝達しやすいことを受動的ターゲッティング(passive targeting)という(Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. Urol. Oncol. 2008 Jan-Feb; 26(1):57-64)。能動的ターゲッティング(active targeting)は、標的物質(targeting moiety)がナノ粒子に結合した場合で、ナノ粒子をターゲット組織での蓄積を増進(preferential accumulation)させたり、ターゲット細胞中にナノ粒子が伝達される内在化(internalization)を改善することが報告された(Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake Trends Biotechnol. 2008 Oct; 26(10):552-8. Epub 2008 Aug 21)。能動的ターゲッティングは、ターゲット細胞表面特異的または過発現している炭水化物(carbohydrate)、受容体(receptor)、抗原(antigen)と結合できる能力を持つ物質(ターゲッティングモイエティ、targeting moiety)を利用する(Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. Mol Cancer Ther 2006; 5(8):1909-1917)。

【0047】

したがって、本発明に係る G a n k y r i n または B M I - 1 特異的 s i R N A を含む二重らせんオリゴRNA構造体およびこれから形成されたナノ粒子にターゲッティングモイアティが備わると、効率的にターゲット細胞への伝達を促進して、比較的低い濃度の投与量でもターゲット細胞に伝達されて高いターゲット遺伝子発現調節機能を示し、他臓器および細胞への非特異的な G a n k y r i n または B M I - 1 特異的 s i R N A の伝達を防止することができる。

【0048】

これにより、本発明は、前記構造式1～構造式3に係る構造体にリガンド(L)、特に受容体媒介内包作用(receptor-mediated endocytosis, RME)を介してターゲット細胞内在化(internalization)を増進させる受容体と特異的に結合する特性を持つリガンド(ligand)が追加的に結合された二重らせんオリゴRNA構造体を提供して、例えば構造式1に係る二重らせんオリゴRNA構造体にリガンドが結合された形態は、下記の構造式4のような構造を持つ：

10

[構造式 4]

(L_i-Z)-A-X-R-Y-B

前記構造式4で、A、B、XおよびYは、前記構造式1～構造式3での定義と同様であり、Lは受容体媒介内包作用(receptor-mediated endocytosis, RME)を介してターゲット細胞内在化(internalization)を増進させる受容体と特異的に結合する特性を持つリガンド、Zは、単純共有結合または親水性物質ブロック内の親水性物質単量体とリガンドの結合を媒介するリンカーを意味して、iは、1～5の整数、好ましくは1～3の整数である。

20

【0049】

前記構造式4でのリガンドは、好ましくはターゲット細胞特異的に細胞内在化(internalization)を増進させるRME特性を持つターゲット受容体特異的抗体やアプタマー、ペプチド；または、葉酸(Folate、一般にfolateとfolic acidは互いに交差使用されており、本発明での葉酸は、自然状態または人体で活性化状態であるfolateを意味する)、N-アセチルガラクトサミン(N-acetyl Galactosamine, NAG)等のヘキサミン(hexoamine)、ブドウ糖(glucose)、マンノース(mannose)をはじめとする糖や炭水化物(carbohydrate)等の化学物質などで選択されるが、これに限定されるのではない。

30

【0050】

本発明のさらに他の形態として、本発明は、前記GankyrinまたはBMI-1特異的siRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体を製造する方法を提供する。

【0051】

本発明に係るGankyrinまたはBMI-1特異的siRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体を製造する過程は、例えば、

(1) 固形支持体(solid support)をベースに親水性物質を結合させる段階；

40

(2) 前記親水性物質が結合された固形支持体をベースにRNA一本鎖を合成する段階；

(3) 前記RNA一本鎖5'末端に疎水性物質を共有結合させる段階；

(4) 前記RNA一本鎖の配列と相補的な配列のRNA一本鎖を合成する段階；

(5) 合成が完了すれば固形支持体からRNA-高分子構造体およびRNA一本鎖を分離精製する段階；及び

(6) 製造されたRNA-高分子構造体と相補的な配列のRNA一本鎖のアニーリングにより二重らせんオリゴRNA構造体を製造する段階；

を含んでなる。

【0052】

本発明での固形支持体(solid support)は、Controlled P

50

ore Glass (CPG) が好ましいが、CPGである場合、径は40～180 μmであることが好ましく、500～3000 の孔隙の大きさを持つことが好ましい。

【0053】

前記段階(5)以後、製造が完了されると、精製されたRNA-高分子構造体およびRNA一本鎖は、MALDI-TOF質量分析器で分子量を測定して、目的するRNA-高分子構造体およびRNA一本鎖が製造されたか否かを確認することができる。前記製造方法において(2)段階で合成されたRNA一本鎖の配列と相補的な配列のRNA一本鎖を合成する段階(4)は、(1)段階以前または(1)段階～(5)段階のうちいずれか一つの過程に実行されても構わない。

【0054】

また、(2)段階で合成されたRNA一本鎖と相補的な配列を含むRNA一本鎖は、5'末端にリン酸基が結合された形態で利用されたことを特徴とする製造方法であってもよい。

【0055】

一方、本発明は、GankyrinまたはBMI-1特異的siRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体に追加的にリガンドが結合された二重らせんオリゴRNA構造体の製造方法を提供する。

【0056】

リガンドが結合されたGankyrinまたはBMI-1特異的siRNAを含むオリゴRNA構造体を製造する方法は、例えば、

- (1) 機能基が結合されている固形支持体に親水性物質を結合させる段階；
 - (2) 機能基-親水性物質が結合されている固形支持体をベースにRNA一本鎖を合成する段階；
 - (3) 前記RNA一本鎖の5'末端に疎水性物質を共有結合させる過程で合成する段階；
 - (4) 前記RNA一本鎖の配列と相補的な配列のRNA一本鎖を合成する段階；
 - (5) 合成が完了すると、固形支持体から機能基-RNA-高分子構造体および相補的な配列のRNA一本鎖を分離する段階；
 - (6) 前記機能基を利用して親水性物質末端にリガンドを結合してリガンド-RNA-高分子構造体一本鎖を製造する段階；及び
 - (7) 製造されたリガンド-RNA-高分子構造体と相補的な配列のRNA一本鎖のアニールリングによりリガンド-二重らせんオリゴRNA構造体を製造する段階；
- を含んでなる。

【0057】

前記(6)段階以後、製造が完了すると、リガンド-RNA-高分子構造体および相補的な配列のRNA一本鎖を分離精製した後、MALDI-TOF質量分析器で分子量を測定して目的するリガンド-RNA-高分子構造体および相補的なRNAが製造されたかを確認することができる。製造されたリガンド-RNA-高分子構造体と相補的な配列のRNA一本鎖のアニールリングによりリガンド-二重らせんオリゴRNA構造体を製造することができる。前記製造方法において(3)段階で合成されたRNA一本鎖の配列と相補的な配列のRNA一本鎖を合成する段階(4)は、独立的な合成過程として(1)段階以前または(1)段階～(6)段階のうちいずれか一つの過程に実行されても構わない。

【0058】

本発明のさらに他の様態として、GankyrinまたはBMI-1特異的siRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体を含むナノ粒子を提供する。

【0059】

すでに先に説明したとおり、GankyrinまたはBMI-1遺伝子特異的siRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体は、疎水性および親水性物質を共に含んでいる両親媒性であり、親水性の部分は、体内に存在する水分子と水素結合などの相互作用を介して親和力を有して外側へ向かうようになり、疎水性物質は、それらの間の疎水性相互作用(hydrophobic interaction)を介して内側へ向かうように

10

20

30

40

50

なり、熱力学的に安定したナノ粒子を形成するようになる。すなわち、ナノ粒子の中心に疎水性物質が位置するようになり、GankyrinまたはBMI-1特異的siRNAの外側方向に親水性物質が位置して、GankyrinまたはBMI-1特異的siRNAを保護する形態のナノ粒子を形成する。このように形成されたナノ粒子は、GankyrinまたはBMI-1特異的siRNAの細胞内伝達向上およびsiRNA効能を向上させる。

【0060】

本発明に係るナノ粒子は、同じ配列を持つsiRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体だけで形成されてもよく、互いに異なる配列を持つsiRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体で構成されることを特徴とするが、本発明での互いにことなる配列を持つsiRNAは、他のターゲット遺伝子、例えばGankyrinまたはBMI-1特異的なsiRNAであってもよく、同じターゲット遺伝子特異性を持ちながらその配列が異なる場合も含まれて解釈される。

10

【0061】

また、GankyrinまたはBMI-1特異的なsiRNA以外に他の癌特異的ターゲット遺伝子に特異的なsiRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体が発明に係るナノ粒子に含まれてもよい。

【0062】

また、本発明は他の様態として、Gankyrinおよび/またはBMI-1特異的siRNA、これを含む二重らせんオリゴRNA構造体および/または前記二重らせんオリゴRNA構造体からなるナノ粒子を含む癌予防または治療用組成物を提供する。

20

【0063】

本発明に係るGankyrinおよび/またはBMI-1特異的siRNA、これを含む二重らせんオリゴRNA構造体および/または前記二重らせんオリゴRNA構造体からなるナノ粒子を有効成分として含む組成物は、癌細胞の増殖及び癌細胞の死滅を誘導して癌の予防または治療効果を現す。したがって、本発明に係るGankyrin及び/またはBMI-1特異的siRNA及びこれを含む組成物は、該当遺伝子が過発現すると報告された肝臓癌をはじめとして胃癌、肺癌、すい臓癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌及び腎臓癌をはじめとする様々な癌の予防または治療に効果がある。

【0064】

30

特に、本発明に係る二重らせんオリゴRNA構造体を含む癌予防または治療用組成物には、

配列番号1～100番から選択されたいずれか一つの配列、好ましくは配列番号1、10、13、56または99番に係る配列から選択されたいずれか一つの配列、らに好ましくは配列番号1、10または99番に係る配列、最も好ましくは配列番号1番に係る配列を含むセンス鎖およびこれと相補的な配列を含むアンチセンス鎖を含むGankyrin特異的なsiRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体、または

配列番号101～200番から選択されたいずれか一つの配列、好ましくは配列番号102、180、197、199および200番から選択されたいずれか一つの配列、らに好ましくは配列番号102、199または200番に係る配列、最も好ましくは、配列番号102番の配列を含むセンス鎖およびこれと相補的な配列を含むアンチセンス鎖を含むBMI-1特異的siRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体が含まれてもよく、前記Gankyrin特異的なsiRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体およびBMI-1特異的siRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体が混合された形態で含まれてもよい。

40

【0065】

また、GankyrinまたはBMI-1以外の他の癌特異的ターゲット遺伝子に特異的なsiRNA、またはこれを含む二重らせんオリゴRNA構造体が発明に係る組成物に追加的に含まれてもよい。

【0066】

50

前記のとおり、G a n k y r i n特異的s i R N Aを含む二重らせんオリゴR N A構造体およびB M I - 1特異的s i R N A、または前記G a n k y r i n特異的s i R N Aを含む二重らせんオリゴR N A構造体およびB M I - 1特異的s i R N Aと共に、追加的に他の癌特異的ターゲット遺伝子に特異的なs i R N Aを含む二重らせんオリゴR N A構造体を全て含む癌予防または治療用組成物を利用する場合、よく癌治療に利用される併用療法(c o m b i n a t i o n t h e r a p y)のように相乗的な効果を奏することができる。

【0067】

本発明に係る組成物が予防または治療できる癌は、肝臓癌、胃癌、大腸癌、すい臓癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、腎臓癌及び肺癌などが例示されるが、これに限定されるのではない。

10

【0068】

また、本発明に係る二重らせんオリゴR N A構造体からなるナノ粒子を含む癌予防または治療用組成物に含まれるナノ粒子もG a n k y r i nまたはB M I - 1特異的s i R N Aを含む二重らせんオリゴR N A構造体で選択されたいずれか一つの構造体だけで純粋に構成されてもよく、G a n k y r i n特異的s i R N Aを含む二重らせんオリゴR N A構造体およびB M I - 1特異的s i R N Aを含む二重らせんオリゴR N A構造体が混合された形態で構成されてもよい。

【0069】

本発明の組成物は、投与のために前記記載した有効成分以外に追加で薬剤学的に許容可能な担体を1種以上含んで製造してもよい。薬剤学的に許容可能な担体は、本発明の有効性分と両立可能であるべきで、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、デキストロス溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノールおよびこれらの成分のうち一つの成分または二つ以上の成分を混合して使用でき、必要に応じて抗酸化剤、緩衝液、静菌剤など他の通常の添加剤を添加してもよい。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤および潤滑剤を付加的に添加して水溶液、懸濁液、乳濁液などのような注射用剤形で製剤化することができる。特に、凍結乾燥(l y o p h i l i z e d)された形態の剤形で製剤化して提供することが好ましい。凍結乾剤形燥製造のために本発明が属する技術分野で通常知られている方法が使用でき、凍結乾燥のための安定化剤が追加されてもよい。さらには、当分野の適正な方法でまたはレミントン薬学(R e m i n g t o n ' s p h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e , M a c k P u b l i s h i n g c o m p a n y , E a s t o n P A)に開示されている方法を利用して、各疾病に応じてまたは成分に応じて好ましく製剤化することができる。

20

30

【0070】

本発明の薬剤学的組成物に含まれる有効性分などの含有量および投与方は、通常の患者の症候と疾病の深刻度に基づいて本技術分野の通常の専門家が決めることができる。また、散剤、精製、カプセル剤、液剤、注射剤、軟こう剤、シロップ剤などの様々な形態で製剤化することができて、単位投与量または多投与量容器、例えば密封されたアンプルおよびビンなどで提供されてもよい。

【0071】

40

本発明の薬剤学的組成物は、経口または、非経口投与が可能である。本発明に係る薬剤学的組成物の投与経路は、これらに限定されず、例えば、口腔、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、硬膜内、心臓内、経皮、皮下、腹腔内、腸管、舌下または局所投与が可能である。本発明に係る組成物の投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食事、投与時間、方法、排泄率および疾病の重症度等によりその範囲が多様であり、本技術分野の通常の専門家が容易に決めることができる。また、臨床投与のために、公知の技術を利用して本発明の薬剤学的組成物を適した剤形で製剤化することができる。

【0072】

本発明では、本発明に係るG a n k y r i nまたはB M I - 1特異的s i R N A、前記s i R N Aを含む二重らせんオリゴR N A構造体、またはこれを含む組成物またはナノ

50

粒子を癌の予防および治療のための薬剤の製造に利用する用途を提供する。

【0073】

また、本発明は、本発明に係る二重らせんオリゴRNA構造体、これを含む組成物またはナノ粒子を予防または治療を要する患者に投与することを含む癌の予防および治療方法を提供する。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0074】

以下、添付された実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。しかし、このような実施例は本発明の技術的思想の内容と範囲を簡単に説明するための例示するものであって、これによって本発明の技術的範囲が限定されたり変更されるのではない。また、このような例示に基づいて本発明の技術的思想の範囲の中で様々な変形と変更が可能であることは当業者には当然である。

10

【0075】

実施例1．Gankyrin及びBMI-1の目標塩基配列デザイン及びsiRNAの製造

Gankyrin遺伝子のmRNA配列(NM_002814)またはBMI-1遺伝子のmRNA配列(NM_005180)に結合できる目標塩基配列(センス鎖)を遺伝子別に100種ずつデザインして、前記目標塩基配列の相補的配列であるアンチセンス鎖のsiRNAを製造した。

20

【0076】

まず、パイオニア(株)で開発された遺伝子デザインプログラム(Turbo si-Designer)を使用して、該当遺伝子のmRNA配列でsiRNAが結合できる目標塩基配列をデザインした。本発明に係る肝臓癌連遺伝子に対するsiRNAは、19個のヌクレオチドで構成されたセンス鎖とこれに相補的なアンチセンス鎖で構成された二本鎖構造である。また、ある遺伝子の発現を阻害しない配列のsiRNAであるsiCONT(配列番号201)を製造した。前記siRNAは、-シアノエチルホスホロアミダイト(-cyanoethyl phosphoramidite)を利用してRNA骨格構造をなすホスホジエステル結合を連結して製造した(Nucleic Acids Research, 12:4539-4557, 1984)。具体的に、RNA合成機(384 Synthesizer, BIONEER, KOREA)を使用して、ヌクレオチドが付着された固形支持体上で、遮断除去(deblocking)、結合(coupling)、酸化(oxidation)およびキャッピング(capping)からなる一連の過程を繰り返して望む長さのRNAを含む反応物を収得した。前記反応物をDaisogel C18(Daiso, Japan)カラムが取り付けられたHPLC LC918(Japan Analytical Industry, Japan)でRNAを分離および精製して、これをMALDI-TOF質量分析器(Shimadzu, Japan)を利用して目標塩基配列と合致するか否かを確認した。以後、センスとアンチセンスRNA鎖を結合させて、目的する二本鎖siRNA(配列番号1~201)を製造した(表1参照)。

30

40

【0077】

【表 1】

本発明に係る s i R N A のセンス鎖配列

配列番号	ターゲット遺伝子	配列
1	Gankyrin	CUGUUGAGAUUGUUCUACU
2	Gankyrin	CUGUACUCCCUUACAUAU
3	Gankyrin	CGGCUGUUUUGACUGGCGU
4	Gankyrin	GGCCGGGAUGAGAUUGUAA
5	Gankyrin	GUGUCUAACCUAAUGGUCU
6	Gankyrin	GUGGCCUGGGUUUAUACU
7	Gankyrin	CGCUGUCAUGUACUGGAA
8	Gankyrin	CGCGCGACAAGUAGUUGCU
9	Gankyrin	GCUGGGACAGCGAAUGGA
10	Gankyrin	GUUACUUGUUCGAAGCUUA
11	Gankyrin	GAAACAGAACAGCUCCAAU
12	Gankyrin	CCUUCUGGGAAAAGGUGCU
13	Gankyrin	CCAGAUGUUUCUAUGUGGA
14	Gankyrin	CCGGGAUGAGAUUGUAAAA
15	Gankyrin	GAGAGUGGAAGAAGCAAAA
16	Gankyrin	AGCCCUUCUGGGAAAAGGU
17	Gankyrin	AGGUGCUC AAGUGAUGCU
18	Gankyrin	AGUUGGAUGGUGUGCUCUA
19	Gankyrin	GUUAAACAGCUUGGAUUUA
20	Gankyrin	GAGAGUAUUCUGGCCGAUA
21	Gankyrin	GUGGAAGGUUAAACAGCUU
22	Gankyrin	CUAAUUCUGUGGCUGUUGU
23	Gankyrin	GAGUAUUCUGGCCGAUAAA
24	Gankyrin	CCCAAGGAGCAAGUAUUUA
25	Gankyrin	CCCUCCAUGUACCUUAUA
26	Gankyrin	GGAUGGUGUGCUCUAAAAU
27	Gankyrin	UUCUGCCAGAUUUUCUAU
28	Gankyrin	GCUCGCGGACAAGUAGUU
29	Gankyrin	GGUGUGUGUCUAACCUAAU
30	Gankyrin	UGGAUUCUGUAAUGUCCU
31	Gankyrin	GAAUGAUAAAGACGAUGCA
32	Gankyrin	GCUCAAGUGAAUGCUGUCA
33	Gankyrin	CGAAAAACAGGCAUGAGAU
34	Gankyrin	GAGAUUGUUCUACUGUUGU
35	Gankyrin	GCAACAAGCUAGUUGUUCU
36	Gankyrin	CUGUCAUGUACUGGAAGG
37	Gankyrin	AGAUGC UAAGGACCAUUAU
38	Gankyrin	CAGGUUGGUCUCCUCUUA
39	Gankyrin	GCUACAGCUUGUUUCCA
40	Gankyrin	CUGAGUACUUGUUCGAAG

10

20

30

40

41	Gankyrin	ACUUGGAGUGCCAGUGAAU
42	Gankyrin	AGCCCAUAUACCUAUGUAU
43	Gankyrin	CCAUUAUGAGGCUACAGCA
44	Gankyrin	GGUGGAAGGUUAAACAGCU
45	Gankyrin	CAUCUAUGAAUGAUGAAGU
46	Gankyrin	GUGUCCUACAAACUAAUGU
47	Gankyrin	GUGCACAAGACAUCAUCUA
48	Gankyrin	GUUCUACUGUUGUCGUUAU
49	Gankyrin	GUUGGAUGGUGUGCUCUAA
50	Gankyrin	CAGGACAGCAGAACUGCAU
51	Gankyrin	AACAAUAGCCCAUAUACCU
52	Gankyrin	CAGGCCUACGCCAAACGUU
53	Gankyrin	CUGGGUUUAAUACUCAAGA
54	Gankyrin	CGAAGCUUACAGCUUGUUU
55	Gankyrin	GUGUCAUCCUGUAUUGAAA
56	Gankyrin	AGACGAUGCAGGUUGGUCU
57	Gankyrin	UUCUAUGUGGAUUCUGUAA
58	Gankyrin	CUCCAAUAGCAACAAGCUA
59	Gankyrin	GCUACUAGAACUGACCAGG
60	Gankyrin	CCUCCCAUGUACCUUAUAU
61	Gankyrin	GUUCCUCCAUACAGUUAUU
62	Gankyrin	GUGUGUGUCUAAACUAAUG
63	Gankyrin	UGUAAUGUUCCUCCAUACA
64	Gankyrin	GUCCUACAAACUAAUGUAU
65	Gankyrin	GAAUAAACUGUUGAGAUUGU
66	Gankyrin	GUUUUUGAUGGGUUGUUUA
67	Gankyrin	CAGUGAAUGAUAAAGACGA
68	Gankyrin	GUAUUCUGGCCGAUAAAUC
69	Gankyrin	GCUCUACGGCUGUUUUGA
70	Gankyrin	GUUGCUGGGACAGCGAAAU
71	Gankyrin	GAUAAAUCCUGGCUACUA
72	Gankyrin	GCCGGGAUGAGAUUGUAAA
73	Gankyrin	GGCUGUACUCCCUUACAUI
74	Gankyrin	GUCCCAAGGAGCAAGUAUU
75	Gankyrin	GAGAAUGGUGGAAGGUAA
76	Gankyrin	GGUUAACAGCUUGGAUUU
77	Gankyrin	CCCAGUGUCCUACAAACUA
78	Gankyrin	CCAGUGUCCUACAAACUAA
79	Gankyrin	CCUCCAUACAGUUAUAAACA
80	Gankyrin	CGCCAAACGUUCUGUUUU
81	Gankyrin	ACCUAUUGGUCUGCAACCU
82	Gankyrin	UCAAGAGAAUGGUGGAAGG
83	Gankyrin	AUCCAGAUGCUAAGGACCA

10

20

30

40

84	Gankyrin	CACUCAGGCCUACGCCAAA
85	Gankyrin	UCACUCAGGCCUACGCCAA
86	Gankyrin	CUGUUGUCGUAAUUCUUC
87	Gankyrin	GGGUGUGUGUCUAACCUAA
88	Gankyrin	CGAUAAAUCCUGGCCUACU
89	Gankyrin	GUCAAUCAAAAUGGCUGUA
90	Gankyrin	GGCAUGAGAUCCGUGUCAU
91	Gankyrin	GGGCUAAUCCAGAUGCUGAA
92	Gankyrin	CCAGAUGCUGAAGGACCAUU
93	Gankyrin	GCCUGGGUUUAAUACUCAA
94	Gankyrin	GGGUUUAAUACUCAAGAGA
95	Gankyrin	CCCUCUCUGAAACAGAACA
96	Gankyrin	CCAAUAGCAACAAGCUAGU
97	Gankyrin	GUAUGUUGUGUUGUUGUCC
98	Gankyrin	CGAUGCAGGUUGGUCUCCU
99	Gankyrin	AGGAAGUUUUAAAGUACCU
100	Gankyrin	GGCUGUUUUGACUGGCGUA
101	BMI1	GUGUGUUCACACCCAUCA
102	BMI1	GAAAGUUUCUCAGAAGUAA
103	BMI1	UGUCUACAUUCCUUCUGUA
104	BMI1	GAAUUCUUUGACCAGAACA
105	BMI1	CAUUGAUGCCACAACCAUA
106	BMI1	GAAAUUCAACCAACGGAAA
107	BMI1	CACAAGACCAGACCACUAC
108	BMI1	CAGAGAGAUGGACUGACAA
109	BMI1	GGGUACUUCAUUGAUGCCA
110	BMI1	CCAGACCACUACUGAAUUAU
111	BMI1	GAGCUUCUACAGGUUUUUU
112	BMI1	GUCUACAUUCCUUCUGUAA
113	BMI1	CCUGGAGACCAGCAAGUAU
114	BMI1	CUUUUUCUCUGUGUUAGGA
115	BMI1	GUCACUGUGAAUAACGAUU
116	BMI1	GUCGAACUUGGUGUGUGUU
117	BMI1	CAGAGUUCGACCUACUUGU
118	BMI1	GACUGACAAAUGCUGGAGA
119	BMI1	CCAGAUUGAUGUCAUGUAU
120	BMI1	CUCCAAGAUUUGUAUACA
121	BMI1	CAGGGCUUUUCAAAAUGA
122	BMI1	GUUAUUUGUGAGGGUGUUU
123	BMI1	CUGGUUGAUACCUGAGACU
124	BMI1	CGAGAAUCAAGAUCACUGA
125	BMI1	CCACUACUGAAUUAAGGU
126	BMI1	GUCAGAUAAAACUCUCCAA

10

20

30

40

127	BMI1	CCAACGGAAAGAAUAUGCA
128	BMI1	CAACCAACGGAAAGAAUAU
129	BMI1	GGUCAGAUAAAACUCUCCA
130	BMI1	GACAUAAAGCAUUGGGCCAU
131	BMI1	GUACUCUGCAGUGGACAU
132	BMI1	GAGCAAGCAUGUUGAAUUU
133	BMI1	GCUUGGCUCGCAUUCAUUU
134	BMI1	GACUGUGAUGCACUUAAGA
135	BMI1	GGUCCACUCCAUAUGAAAU
136	BMI1	CGACCUACUUGUAAAAGAA
137	BMI1	CUCACAUUCCAGUACUAU
138	BMI1	CCAGCAGGUUGC UAAAAGA
139	BMI1	ACAAGACCAGACCACUACU
140	BMI1	ACAUGUGACUAUCGUCCAA
141	BMI1	AGUACUCUGCAGUGGACAU
142	BMI1	GUGGUAAUAGCAGUAAUUU
143	BMI1	GAGAAGGAAUGGUCCACUU
144	BMI1	CUGUAGAAAAACAAGUGCUU
145	BMI1	GUAAGAAUCAGAUGGCAUU
146	BMI1	GCCAAUAGACCUCGAAAAU
147	BMI1	CGGGUACUACCGUUUUAUU
148	BMI1	GGUGGUAAUAGCAGUAAUUU
149	BMI1	UAGAGCAAGCAUGUUGAAU
150	BMI1	CAUUAUGCUUGUUGUACAA
151	BMI1	CACCAAUUCUUCUUUGCCA
152	BMI1	GUGUGUGUUAUCACCCA
153	BMI1	GCCACAACCAUAAUAGAAU
154	BMI1	CAGCAAGUAUUGUCCUAUU
155	BMI1	GUAUGAGGAGGAACCUUUA
156	BMI1	CCUCGAAAAUCAUCAGUAA
157	BMI1	GGUUCGACCUUUGCAGAU
158	BMI1	GCAAUUGGCACAUCUUUCU
159	BMI1	CCCAUUGUAAGUGUUGUUU
160	BMI1	UCUAUGUAGCCAUGUCACU
161	BMI1	UGC UUUGGUCGAACUUGGU
162	BMI1	CACAACCAUAAUAGAAUGU
163	BMI1	CUGUGAAUAACGAUUUCUU
164	BMI1	GUAUUGUCCUAUUUGUGAU
165	BMI1	CUGCAGCUCGCUUCAAGAU
166	BMI1	CAGAUUGGAUCGGAAGUA
167	BMI1	CAGCGUAACCAACCAUCU
168	BMI1	CUGACAAAUGCUGGAGAAC
169	BMI1	CGAACAACGAGAAUCAAGA

10

20

30

40

170	BMI1	CAUGUAUGAGGAGGAACCU
171	BMI1	CUAAUGGAUAUUGCCUACA
172	BMI1	GGUUGAUACCUGAGACUGU
173	BMI1	GACAUACAGGAAACAGUA
174	BMI1	GAGCCUUGCUUACCAGCAA
175	BMI1	CCUUCUCUGCUAUGUCUGA
176	BMI1	GGUCGAACUUGGUGUGUGU
177	BMI1	CGAACUUGGUGUGUGUUA
178	BMI1	GUCUGCAAAAGAAGCACAA
179	BMI1	CAGUACUAUGAAUGGAACC
180	BMI1	CAGAUGGCAUUAUGCUUGU
181	BMI1	GCUCGCAUUCAUUUUCUGC
182	BMI1	CCCGCAGAAUAAAACCGAU
183	BMI1	AGAUGGACUACAUGUGAUA
184	BMI1	UCUGCAAAAGAAGCACAAU
185	BMI1	CUGUAAAACGUGUAUUGUU
186	BMI1	GGUAUAUGACAUAACAGGA
187	BMI1	GGAAUAUGCCUUCUCUGCU
188	BMI1	CUGCCAAUGGCUCUAAUGA
189	BMI1	CAGCAGGUUGCUAAAAGAA
190	BMI1	GAUGGACUACAUGUGAUAC
191	BMI1	UAGUAUGAGAGGCAGAGAU
192	BMI1	UUCAUUGAUGCCACAACCA
193	BMI1	ACCAGCAAGUAUUGUCCUA
194	BMI1	AGAACUGGAAAGUGACUCU
195	BMI1	ACUAUCGUCCAAUUUGCUU
196	BMI1	UCUGUCCAUAUAGAAGCAA
197	BMI1	GUAAAAUGGACAUACCUAA
198	BMI1	GCUGCUCUUUCCGGGAUUU
199	BMI1	GAACAGAUUGGAUCGGAAG
200	BMI1	CAUGUGACUAUCGUCCAAU
201	siCONT (negative control siRNA)	CUUACGCUGAGUACUUCGA

10

20

30

【 0 0 7 8 】

実施例 2 . 二重らせんオリゴRNA構造体 (S A M i R N A L P) の製造

40

本発明で製造した二重らせんオリゴRNA構造体 (S A M i R N A L P) は、下記の構造式 5 のような構造を持つ:

[構造式 5]

C₂₄-5'-S-3'-PEG

AS

。

【 0 0 7 9 】

前記構造式 5 で、S は s i R N A のセンス鎖 ; A S は s i R N A のアンチセンス鎖 ; P

50

EGは親水性物質でポリエチレングリコール (polyethylene glycol) ; C₂₄は疎水性物質でジスルフィド結合 (disulfide) が含まれたテトラドコサン (tetracosane) ; 5' および 3' は二重らせんオリゴRNAセンス鎖末端の方向性を意味する。

【0080】

前記構造式5でのsiRNAのセンス鎖は、既存特許(大韓民国公開特許公報第2012-0119212号)の実施例1に記載された方法により製造された3' ポリエチレングリコール (polyethylene glycol、PEG、Mn=2,000) - CPGを支持体として先述した方式のとおり - シアノエチルホスホロアミダイトを利用してRNA骨格構造をなすホスホジエステル結合を連結していく方法により3' 末端部位にポリエチレングリコールが結合されたセンス鎖の二重らせんオリゴRNA-親水性物質構造体を合成した後、ジスルフィド結合が含まれているテトラドコサンを5' 末端に結合して望むRNA-高分子構造体のセンス鎖を製造した。前記鎖とアニーリングを行うアンチセンス鎖の場合、先述した反応を介してセンス鎖と相補的な配列のアンチセンス鎖を製造した。

10

【0081】

合成が完了すると、60 の温湯器 (water bath) で28% (v/v) アンモニア (ammonia) を処理して合成されたRNA一本鎖とRNA高分子構造体をCPGから引き離した後、脱保護 (deprotection) 反応を介して保護残基を除去した。保護残基が除去されたRNA一本鎖およびRNA-高分子構造体は、70 のオープンでN-メチルピロリドン (N-methylpyrrolidone)、トリエチルアミン (triethylamine) およびトリエチルアミントリハイドロフルオリド (triethylaminetrihydrofluoride) を体積比10:3:4の割合で処理して2' TBDMS (tert-butyl dimethylsilyl) を除去した。

20

【0082】

前記反応物をDaisogel C18 (Daiso, Japan) カラムが取り付けられたHPLC LC918 (Japan Analytical Industry, Japan) でRNAを分離および精製して、これをMALDI-TOF質量分析器 (Shimadzu, Japan) を利用して目標塩基配列と合致するか否かを確認した。以後、それぞれの二重らせんオリゴRNA高分子構造体を製造するために、センス鎖とアンチセンス鎖を同量混合して1Xアニーリングバッファー (30mM HEPES、100mMカリウムアセテート (Potassium acetate)、2mMマグネシウムアセテート (Magnesium acetate)、pH7.0~7.5) に入れて、90 恒温水槽で3分反応させた後、再び37 で反応させて、配列番号1、102および201番の配列をsiRNAのセンス鎖として含siRNAを含む二重らせんオリゴRNA構造体(以下、それぞSAMiRNA LP-Gank、SAMiRNA LP-BMI、SAMiRNA LP-CONT という。)をそれぞれ製造した。製造された二重らせんオリゴRNA構造体は、電気泳動を介してアニーリングされたことを確認した。

30

【0083】

実施例3. 二重らせんオリゴRNA構造体 (SAMiRNA LP) からなるナノ粒子 (SAMiRNA) の製造および大きさ測定

40

前記実施例2で製造された二重らせんオリゴRNA構造体 (SAMiRNA LP) は、二重らせんオリゴRNAの末端に結合された疎水性物質の間の疎水性相互作用によってナノ粒子、すなわちミセル (micelle) を形成するようになる (図1参照)。

【0084】

SAMiRNA LP-Gank、SAMiRNA LP-BMI、SAMiRNA LP-CONT からなるナノ粒子の大きさPDI (polydispersity index) 分析を介して該当SAMiRNA LPで構成されたナノ粒子 (SAMiRNA) の形成を確認した。

50

【0085】

実施例3-1. ナノ粒子の製造

前記SAMiRNALP-Gankを1.5ml DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)に50 μ g/mlの濃度で溶解した後、-75、5mTorr条件で48時間凍結乾燥を介してナノ粒子パウダーを製造した後、溶媒であるDPBSに溶解して均質化されたナノ粒子を製造した。SAMiRNALP-Gank+BMIの場合、前記SAMiRNALP-GankとSAMiRNALP-BMIを各々0.75ml DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)に50 μ g/mlの濃度で溶解した後、-75、5mTorr条件で48時間凍結乾燥を介してナノ粒子パウダーを製造した後、溶媒であるDPBSに溶解して均質化されたナノ粒子を製造して、二種類の物質を混合して配列番号1番と配列番号102番をセンス鎖として持つsiRNAを含むナノ粒子を製造した。

10

【0086】

実施例3-2. ナノ粒子の大きさ及び多分散指数(polydispersity index、以下「PDI」という)測定

ゼータ電位測定機(zeta-potential measurement)を介して前記ナノ粒子の大きさを測定した。実施例3-1で製造された均質化されたナノ粒子は、ゼータ電位測定機(Nano-ZS、MALVERN、英国)で大きさを測定したが、物質に対する屈折率(Refractive index)は1.459、吸収率(Absorption index)は0.001にして、溶媒であるDPBSの温度25およびそれに応じた粘度(viscosity)は1.0200および屈折率は1.335の値を入力して測定した。1回の測定は15回繰り返して構成された大きさ測定からなり、これを6回繰り返した。前記SAMiRNALP-BMI、SAMiRNALP-Gank+BMIも同じ方法で測定した。

20

【0087】

SAMiRNALP-Gankで構成されたナノ粒子(SAMiRNA-Gank)の場合、約83nmの大きさ(size)と0.24のPDI値を持って、SAMiRNALP-BMIで構成されたナノ粒子(SAMiRNA-BMI)の場合、80nmの大きさと0.22のPDIを含むことが確認された。SAMiRNALP-Gank+BMIで構成されたナノ粒子(SAMiRNA-Gank+BMI)の場合、約85nmの大きさ(size)と0.26のPDI値を含むことが確認された(図2参照)。PDI値が低いほど該当粒子が均等に分布していることを示す数値で、本発明のナノ粒子は非常に均一な大きさで形成されることが分かった。

30

【0088】

実施例4. ヒト肝臓癌細胞(Hep3B)細胞株でsiRNAを利用したターゲット遺伝子の発現抑制確認

前記実施例1で製造された配列番号1番~201番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを利用してヒト肝臓癌細胞(Hep3B)を形質転換させて、前記形質転換された肝臓癌細胞(Hep3B)細胞株でターゲット遺伝子の発現様子を分析した。)

40

【0089】

実施例4-1. ヒト肝臓癌細胞の細胞株の培養

韓国細胞株銀行(KCLB、Korean Cell line bank, Korea)から入手したヒト肝臓癌細胞(Hep3B)の細胞株EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium)培養培地(GIBCO/Invitrogen、USA、10%(v/v)牛胎児血清、ペニシリン100units/mlおよびストレプトマイシン100 μ g/ml)で37、5%(v/v)CO₂の条件下で培養した。

【0090】

実施例4-2. ヒト肝臓癌細胞の細胞株への目標siRNAの形質注入(transfection)

前記実施例4-1で培養された1 \times 10⁵肝臓癌細胞(Hep3B)の細胞株を37

50

で5% (v/v) CO₂ の条件下で12 - wellプレートで18時間EMEMで培養した後、培地を除去した後、各well当たり500 µlのOpti-MEM培地 (GIBCO, USA) を分株した。

【0091】

一方、リポフェクタミンRNAiマックス (LipofectamineTM RNAi Max, Invitrogen, USA) 1.5 µlとOpti-MEM培地248.5 µlを混合して混合液を製造して、室温で5分間反応させた後、前記実施例1で製造したそれぞれの配列番号1~200番の配列をセンス鎖として持つsiRNA (1 pmole/µl) の0.2または1 µlをOpti-MEM培地230 µlに添加して最終濃度が0.2または1 nMであるsiRNA溶液を製造した。前記リポフェクタミンRNAiマックス (LipofectamineTM RNAi Max) 混合液とsiRNA溶液を混合して室温で20分間反応させて、形質注入用溶液を製造した。

10

【0092】

その後、Opti-MEMが分株された腫瘍細胞株の各wellに形質注入用溶液をそれぞれ500 µlずつ分株して6時間培養した後、Opti-MEM培地を除去した。そこにEMEM培養培地1 mlずつ分株した後24時間37 °Cで5% (v/v) CO₂ の条件下で培養した。

【0093】

実施例4-3. ターゲット遺伝子mRNAの定量分析

前記実施例4-2で形質注入された細胞株から全RNAを抽出してcDNAを製造した後、リアルタイムPCR (real-time PCR) を利用してターゲット遺伝子のmRNA発現量を相対定量した。

20

【0094】

実施例4-3-1. 形質注入された細胞からRNA分離およびcDNA製造

RNA抽出キット (AccuPrep Cell total RNA extraction kit, BIONEER, Korea) を利用して、前記実施例4-2で形質注入された細胞株から全RNAを抽出して、抽出されたRNAはRNA逆転写酵素 (AccuPower CycleScript RT Premix/dT20, Bioneer, Korea) を利用して、下記の方法でcDNAを製造した。具体的に、0.25 ml エッペンドルフチューブに入っているAccuPower CycleScript RT Premix/dT20 (Bioneer, Korea) でチューブ当たり抽出された1 µg ずつのRNAを入れて総体積が20 µlになるようにDEPC (diethyl pyrocarbonate) 処理された蒸留水を添加した。これを遺伝子増幅器 (MyGeneTM 96 Gradient Thermal Block, BIONEER, Korea) で30 °Cで1分間RNAとプライマーを混成化して、52 °Cで4分間cDNAを製造する二つの過程を6回繰り返した後、95 °Cで5分間酵素を不活性化させて増幅反応を終了した。

30

【0095】

実施例4-3-2. ターゲット遺伝子mRNAの相対定量分析

前記実施例4-3-1で製造されたcDNAを鋳型にしてリアルタイムPCRを介して肝臓癌疾患関連遺伝子mRNAの相対量を下記の方法で定量した。96 - wellプレートの各wellに前記実施例4-3-1で製造されたcDNAを蒸留水で5倍希釈して、ターゲット遺伝子mRNA発現量分析のために希釈されたcDNA 3 µlと2 × GreenStarTM PCR master mix (BIONEER, Korea) を10 µl、蒸留水6 µl、Gankyrin qPCRプライマー (F、Rそれぞれ10 pmole/µl; BIONEER, Korea、表2参照) を1 µl入れて混合液を作った。一方、ターゲット遺伝子mRNAの発現量を正規化するためにハウスキーピング遺伝子 (housekeeping gene、以下HK遺伝子) のGAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) を標準遺伝子とした。前記混合液が入った96 - wellプレートをExicyclerTM 96 Real-Time Quantitative The

40

50

rmal Block (BIONEER, Korea) を利用して下記のような反応を行った：95 で15分間反応して酵素の活性化およびcDNAの二次構造をなくした後、94 で30秒変性 (denaturing)、58 で30秒アニーリング (annealing)、72 で30秒延長 (extension)、SYBRグリーンスキャン (SYBR green scan) の四つの過程を42回繰り返し行って、72 で3分間最終延長を行った後、55 で1分間温度を維持して、55 から95 まで融解曲線 (melting curve) を分析した。PCRが終了した後、それぞれ取得したターゲット遺伝子のCt (threshold cycle) 値は、GAPDH遺伝子を介して補正されたターゲット遺伝子のCt値を求めた後、遺伝子発現阻害を起こさないコントロール配列のsiRNA (siCONT) が処理された実験群を対照群として Ct 値の差を求めた。前記 Ct 値と計算式 $2^{-Ct} \times 100$ を利用してGankyrin特異的siRNA (配列番号1～配列番号100をセンス鎖として持つ) が処理された細胞のターゲット遺伝子の発現量を相対定量した (図3、4)。またBMI-1特異的siRNA (配列番号101～200番をセンス鎖として持つ) が処理された実験群は前記方法と同じ方法でBMI-1 qPCRプライマーとGAPDH qPCRプライマーを利用してターゲット遺伝子のmRNAを相対的定量した (図5、6)。高効率のsiRNAを選別するために、0.2 nMと1 nM濃度で各遺伝子に対するmRNA発現量が共通して高く減少したsiRNAを選択した (配列番号1、10、13、56、99、102、180、197、199、200番の配列をセンス鎖として持つ)。

10

20

【0096】

【表2】

qPCR primer配列情報

(F: Forward primer、R: Reverse primer)

name	配列	配列番号
GAPDH-F	GGTGAAGGTCGGAGTCAACG	202
GAPDH-R	ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG	203
Gankyrin-F	AGCAGCCAAGGGTAACTTGA	204
Gankyrin-R	CACTGCGAGGGGTGTCTTTT	205
BMI1-F	TCATCCTTCTGCTGATGCTG	206
BMI1-R	CCGATCCAATCTGTTCTGGT	207

30

【0097】

実施例5．ヒト肝臓癌細胞 (Hep3B、Huh-7) 細胞株で高効率のsiRNA選定及びIC₅₀ (inhibition concentration 50%) 測定

前記実施例4-3-2で選定された配列番号1、10、13、56、99、102、180、197、199、200及び201番の配列をセンス鎖として持つsiRNAを利用してヒト肝臓癌細胞 (Hep3B、Huh-7) を形質転換させて、前記形質転換された肝臓癌細胞 (Hep3B、huh-7) の細胞株でターゲット遺伝子の発現様子を分析して高効率のsiRNAを選定して、最も効率が低いsiRNAのIC₅₀を測定してsiRNA性能を確認した。

40

【0098】

実施例5-1．ヒト肝臓癌細胞株の培養

米国種菌協会 (American Type Culture Collection, ATCC) から入手したヒト肝臓癌細胞 (Hep3B) 細胞株は、実施例4-1と同じ条件で培養した。

韓国細胞株銀行 (Korean cell line bank, KCLB) から入手したヒト肝臓癌細胞 (Huh-7) 細胞株をRPMI-1640培養培地 (GIBCO/Invitrogen、USA、10% (v/v) 牛胎児血清、ペニシリン100 units/ml及びストレプトマイシン100 µg/ml) で37、5% (v/v) CO

50

2 の条件下で培養した。

【0099】

実施例 5 - 2 . ヒト肝臓癌細胞株で目標 s i R N A の形質注入 (t r a n s f e c t i o n)

前記実施例 5 - 1 で培養された H e p 3 B 細胞株は、4 - 2 と同じ条件で培養した後、リポフェクタミン RNA i マックス (L i p o f e c t a m i n e ^{T M} RNA i M a x、Invitrogen、米国) 1.5 μ l と Opti - MEM 培地 248.5 μ l を混合して混合液を製造して、室温で 5 分間反応させた後、前記実施例 1 で製造したそれぞれの配列番号 1、10、13、56、99、201 番をセンス鎖として持つ s i R N A 及び先行文献の s i R N A (G a n k _ R e f、G G G C A G C A G C C A A G G G U A A、S E Q I D N O . 208、U S 2008/0071075 A1, D h a r m a c o n) (1 p m o l e / μ l) 0.04、0.2 または 1 μ l を Opti - MEM 培地 230 μ l に添加して最終濃度が 0.04、0.2 または、1 nM である s i R N A 溶液を製造した。前記実施例 1 で製造したそれぞれの配列番号 102、180、197、199、200、201 番の配列をセンス鎖として持つ s i R N A 及び先行文献の s i R N A (B M I _ R e f、C G T G T A T T G T T C G T T A C C T、S E Q I D N O . 209、C a n c e r S c i . 2010 Feb; 101 (2) : 379 - 86) (1 p m o l e / μ l) 0.008、0.04 または 0.2 μ l を Opti - MEM 培地 230 μ l に添加して最終濃度が 0.008、0.04 nM または 0.2 nM である s i R N A 溶液を製造した。前記リポフェクタミン RNA i マックス (L i p o f e c t a m i n e ^{T M} RNA i M a x) 混合液と s i R N A 溶液を混合して室温で 20 分間反応させて形質注入用溶液を製造した。

【0100】

また、前記実施例 5 - 1 で培養された 1×10^5 H u h - 7 細胞株を 37 $^{\circ}$ C で 5 % (v / v) C O ₂ の条件下に 12 - ウェルプレートで 18 時間 R P M I - 1640 培養培地で培養した後、培地を除去した後、各ウェル当たり 500 μ l の Opti - MEM 培地 (G I B C O、米国) に分株した。一方、リポフェクタミン RNA i マックス (L i p o f e c t a m i n e ^{T M} RNA i M a x、Invitrogen、米国) 1.5 μ l と Opti - MEM 培地 248.5 μ l を混合して混合液を製造して、室温で 5 分間反応させた後、前記実施例 1 で製造したそれぞれの配列番号 1、10、13、56、99、201 番をセンス鎖として持つ s i R N A 及び先行文献 (G a n k _ R e f) の s i R N A (1 p m o l e / μ l) 0.04、0.2 または 1 μ l を Opti - MEM 培地 230 μ l に添加して最終濃度が 0.04、0.2 または 1 nM である s i R N A 溶液を製造した。前記リポフェクタミン RNA i マックス混合液と s i R N A 溶液を混合して室温で 20 分間反応させて、形質注入用溶液を製造した。

【0101】

その後、Opti - MEM が分株された腫瘍細胞株の各 w e l l に形質注入用溶液をそれぞれ 500 μ l ずつ分株して 6 時間培養した後、Opti - MEM 培地を除去した。そこに R P M I 1640 培養培地 1 m l ずつ分株した後 24 時間 37 $^{\circ}$ C で 5 % (v / v) C O ₂ の条件下で培養した。

【0102】

前記実施例 1 で製造したそれぞれの配列番号 102、180、197、199、200、201 番の配列をセンス鎖として持つ s i R N A 及び先行文献の s i R N A (B M I _ r e f、C a n c e r S c i . 2010 Feb; 101 (2) : 379 - 86) (1 p m o l e / μ l) 0.008、0.04 または 0.2 μ l を Opti - MEM 培地 230 μ l に添加して最終濃度が 0.008、0.04 nM または 0.2 nM である s i R N A 溶液を製造した。

【0103】

実施例 5 - 3 . ターゲット遺伝子 m R N A の定量分析

前記実施例 5 - 2 で形質注入された細胞株から全体 R N A を抽出して c D N A を製造し

た後、リアルタイムPCR (real-time PCR) を利用して実施例 4 - 3 と同じ方法でターゲット遺伝子の mRNA 発現量を相対定量した (図 7、8)。2 種の肝臓癌細胞でターゲット遺伝子発現阻害量観察を通じて各 siRNA の効率が明確に確認できて、配列番号 1、10、13、102、197 及び 199 番の配列をセンス鎖として持つ siRNA は非常に低い濃度でも比較的高いターゲット遺伝子発現阻害を示すことを確認した。

【0104】

実施例 5 - 4 . IC₅₀ 測定

前記実施例 5 - 3 で確認された高効率の siRNA 中各遺伝子に対して一種ずつ選定して IC₅₀ の確認を通じて、該当 siRNA の性能を確認した。前記実施例 5 - 1 で培養された Hep3B 細胞株は、4 - 2 と同じ条件で培養した後、リポフェクタミン RNAi マックス (LipofectamineTM RNAi Max、Invitrogen、米国) 1.5 µl と Opti-MEM 培地 248.5 µl を混合して混合液を製造して、室温で 5 分間反応させた後、前記実施例 1 で製造したそれぞれの配列番号 1、102 及び 201 番の配列をセンス鎖として持つ siRNA (0.01 pmole / µl) 0.8、4 µl または 1、102 及び 201 番の配列をセンス鎖として持つ siRNA (1 pmole / µl) 0.2、1 または 5 µl を Opti-MEM 培地 230 µl に添加して最終濃度が 8 pM、40 pM、0.2 nM、1 nM または 5 nM である siRNA 溶液を製造した。前記リポフェクタミン RNAi マックス (LipofectamineTM RNAi Max) 混合液と siRNA 溶液を混合して室温で 20 分間反応させて形質注入用溶液を製造した。

【0105】

また、前記実施例 5 - 1 で培養された 1 × 10⁵ Huh - 7 細胞株を 37 °C で 5 % (v/v) CO₂ の条件下に 12 - ウェルプレートで 18 時間 RPMI - 1640 培養培地で培養した後、培地を除去した後、各ウェル当たり 500 µl の Opti-MEM 培地 (GIBCO、米国) を分株した。一方、リポフェクタミン RNAi マックス (LipofectamineTM RNAi Max、Invitrogen、米国) 1.5 µl と Opti-MEM 培地 248.5 µl を混合して混合液を製造して、室温で 5 分間反応させた後、前記実施例 1 で製造したそれぞれの配列番号 1、102 及び 201 番 siRNA (0.01 pmole / µl) 0.8、4 µl または、1、102 及び 201 番をセンス鎖として持つ siRNA (1 pmole / µl) 0.2、1 または 5 µl を Opti-MEM 培地 230 µl に添加して最終濃度が 8 pM、40 pM、0.2 nM、1 nM または 5 nM である siRNA 溶液を製造した。前記リポフェクタミン RNAi マックス (LipofectamineTM RNAi Max) 混合液と siRNA 溶液を混合して室温で 20 分間反応させて形質注入用溶液を製造した。

【0106】

その後、Opti-MEM が分株された腫瘍細胞株の各 well に形質注入用溶液をそれぞれ 500 µl ずつ分株して 6 時間培養した後、Opti-MEM 培地を除去した。そこに RPMI 1640 培養培地 1 ml ずつ分株した後 24 時間 37 °C で 5 % (v/v) CO₂ の条件下で培養した。

【0107】

形質注入された細胞株から全体 RNA を抽出して cDNA を製造した後、リアルタイム PCR (real-time PCR) を利用して実施例 4 - 3 と同じ方法でターゲット遺伝子の mRNA 発現量を相対定量した (図 9)。配列番号 1 番をセンス鎖として持つ siRNA の IC₅₀ は、Hep3B 細胞株で 40 ~ 200 pM の間で観察されて、Huh - 7 細胞株で 8 ~ 40 pM の間で観察されて、配列番号 102 番をセンス鎖として持つ siRNA の IC₅₀ は Hep3B と Huh - 7 細胞株でいずれも 8 ~ 40 pM で観察されて、本発明で選定された siRNA の高効率を再確認した。

【0108】

実施例 6 . コロニー形成分析 (colony forming assay) を通した G

10

20

30

40

50

ankyrin特異的siRNAまたはBMI-1特異的siRNAの抑制能力確認

in vitro上で単一細胞(single cell)がコロニー形成分析(colony forming assay)を通じて細胞の癌化(transformation)を測定する方法は、半定量的(semi-quantitative)であり、癌細胞が保有している細胞の接触による細胞成長抑制の喪失(loss of contact inhibition)及び固定-非依存的(anchorage independent)である表現型的特性に起因する。前記分析方法は、癌細胞に特定抗癌物質を処理した場合、in vitro上で該当物質による癌細胞の生存を確認する用途と使用される(Clonogenic assay of cells in vitro, Nat Protoc. 2006; 1(5):2315-9)。

10

【0109】

前記実施例5-4で選定された高効率のGankyrinまたはBMI-1特異的siRNAによって癌細胞のコロニー形成(colony forming)阻害程度を確認するために、コロニー形成分析(colony forming assay、CFA)を行った。前記実施例5-1で培養されたHep3BとHuh7 cellを径35mmのシャーレ(petri-dish)にそれぞれ 1×10^4 で接種した後、20時間が経過した時実施例5-4と同じ方法で5nMまたは20nMの濃度で形質転換した。形質転換された細胞は、3日ごとに培養培地を交換して、形質転換後10日または14日が経過した日にDiff Quik(Sysmex, Japan)を通じて染色してコロニー形成程度を比較した(図10)。配列番号1番及び102番は、配列番号201番をセンス鎖として持つsiRNAで処理された場合、対照群に比べて濃度依存的に非常に低い程度のcolonyが形成されることを確認することができた。

20

【0110】

実施例7. Gankyrin特異的siRNAとBMI-1特異的siRNAの組み合わせによるターゲット遺伝子の発現阻害及び細胞成長阻害確認

前記実施例5-4で確認された高効率のsiRNAである配列番号1番と102番の配列をセンス鎖として持つsiRNAの組み合わせをIC₅₀以上の濃度である5、20nMで形質転換させて二つの遺伝子の発現が同時に阻害される場合のターゲット遺伝子の発現阻害程度と細胞成長阻害効果のシナジーを確認した。

30

【0111】

実施例7-1. ヒト肝臓癌細胞の細胞株への目標siRNAの形質注入(transfection)

前記実施例5-1で培養された 1×10^5 Huh-7細胞株を37℃で5%(v/v) CO₂の条件下に12-ウェルプレートで18時間RPMI-1640培養培地で培養した後、培地を除去した後、各ウェル当たり500μlのOpti-MEM培地(GIBCO、米国)を分株した。一方、リポフェクタミンRNAiマックス(LipofectamineTM RNAi Max、Invitrogen、米国)1.5μlとOpti-MEM培地248.5μlを混合して混合液を製造して、室温で5分間反応させた後、前記実施例1で製造したそれぞれの配列番号1、102及び201番をセンス鎖として持つsiRNA(1pmole/μl)5μlをOpti-MEM培地230μlに添加して最終濃度がそれぞれ5nMであるsiRNA溶液を製造した。前記リポフェクタミンRNAiマックス混合液とsiRNA溶液を混合して室温で20分間反応させて、形質注入用溶液を製造した。

40

【0112】

その後、Opti-MEMが分株された腫瘍細胞株の各wellに形質注入用溶液をそれぞれ500μlずつ分株して6時間培養した後、Opti-MEM培地を除去した。そこにRPMI 1640培養培地1mlずつ分株した後24時間37℃で5%(v/v) CO₂の条件下で培養した。

【0113】

実施例7-2. Gankyrin特異的siRNAとBMI-1特異的siRNAの組み

50

合わせによるターゲット遺伝子 mRNA の定量分析

前記実施例 7 - 1 で形質注入された細胞株から全体 RNA を抽出して cDNA を製造した後、リアルタイム PCR (real-time PCR) を利用して実施例 4 - 3 と同じ方法でターゲット遺伝子の mRNA 発現量を相対定量した (図 11)。ヒト肝臓癌細胞 Huh - 7 細胞株でターゲット遺伝子発現阻害量観察を通じて同時に処理された siRNA によるターゲット遺伝子の発現阻害が確認できて、特に、配列番号 1 番と 102 番をセンス鎖として持つ siRNA で共に処理された場合でもターゲット遺伝子の発現阻害が同時に行われることを観察することができた。

【0114】

実施例 7 - 3 . Gankyrin 特異的 siRNA と BMI - 1 特異的 siRNA の組み合わせによる細胞成長阻害確認

Gankyrin 特異的 siRNA と BMI - 1 特異的 siRNA の組み合わせによるターゲット遺伝子の発現阻害を通じて細胞成長阻害確認を行った。

前記実施例 4 - 1 で培養された Hep3B 細胞株は、4 - 2 と同じ条件で培養した後、培地を除去した後、各ウェル当たり 500 μ l の Opti-MEM 培地 (GIBCO、米国) を分株した。一方、リポフェクタミン RNAi マックス (LipofectamineTM RNAi Max、Invitrogen、米国) 1.5 μ l と Opti-MEM 培地 248.5 μ l を混合して混合液を製造して、室温で 5 分間反応させた後、前記実施例 1 で製造したそれぞれの配列番号 1、102 及び 201 番をセンス鎖として持つ siRNA (1 pmole / μ l) 5 または 20 μ l を Opti-MEM 培地 230 μ l に添加して最終濃度がそれぞれ 5 または 20 nM である siRNA 溶液を製造した。前記リポフェクタミン RNAi マックス混合液と siRNA 溶液を混合して室温で 20 分間反応させて、形質注入用溶液を製造した。

【0115】

その後、Opti-MEM が分株された腫瘍細胞株の各 well に形質注入用溶液をそれぞれ 500 μ l ずつ分株して 6 時間培養した後、Opti-MEM 培地を除去した。そこに RPMI 1640 培養培地 1 ml ずつ分株した後 72 時間 37 ° で 5 % (v/v) CO₂ の条件下で培養した。

【0116】

細胞数確認を通じて、配列番号 201 番をセンス鎖として持つ siRNA が処理された実験群と対比して細胞生存力 (cell viability) を確認した (図 12)。配列番号 1 番と 102 番をセンス鎖として持つ siRNA で共に処理した場合、濃度依存的に細胞生存力が減少することが確認できて、これは一つの遺伝子の発現を抑制した時現れる成長抑制効果よりさらに優れるものと確認された。

【0117】

実施例 8 . 動物モデルで Gankyrin 及び / または BMI - 1 特異的 siRNA を含むナノ粒子のターゲット遺伝子発現阻害及び肝臓癌成長阻害確認

in vivo 上で選定された Gankyrin または BMI - 1 特異的 siRNA の効果を確認するために、二重らせんオリゴ RNA 構造体からなるナノ粒子を製造した後、マウス肝臓癌モデルに投与してターゲット遺伝子発現阻害及び肝臓癌成長抑制を確認した。

【0118】

実施例 8 - 1 . マウス肝臓癌モデル (orthotropic liver cancer model) の製造

前記実施例 4 - 1 で培養されたヒト肝臓癌細胞 Hep3B 細胞株 2 X 10⁶ cell をヌードマウス (Balb/c nude mice) に肝臓器 (左肝葉) に移植して肝臓癌モデルを確立後、肝臓癌発生血清内マーカー (marker) である α -Fetoprotein (AFP) 量を測定して腫瘍細胞が形成されることを確認した。血清内 AFP 数値が 1,000 ng/ml 程度になった時、AFP 量により実験群を群当たり 5 匹ずつ振り分けた。

10

20

30

40

50

【0119】

実施例 8 - 2 . 二重らせんオリゴ高分子構造体からなるナノ粒子 (S A M i R N A) によるターゲット遺伝子の発現阻害

前記実施例 2 で合成された配列番号 102 及び 201 番をセンス鎖として持つ s i R N A 配列を含む二重らせんオリゴ高分子構造体 (S A M i R N A L P) を前記実施例 3 - 1 の方法で均質なナノ粒子を製造した。対照群は、配列番号 201 番をセンス鎖として持つ s i R N A 配列を含むナノ粒子 (S A M i R N A - C O N T)、実験群は、配列番号 102 番をセンス鎖として持つ s i R N A 配列を含むナノ粒子 (S A M i R N A - B M I) に設定した。前記ナノ粒子は、5 m g / k g b o d y w e i g h t で投与されて、投与量は 100 μ l i n D P B S、1 m l 注射器 (0 . 25 m m x 8 m m , 31 G a u g e , B D 328820 , U S A) を利用して 2 回繰り返して前記実施例 8 - 1 で製造されたマウス肝臓癌モデルに尾静脈投与 (i n t r a v e n o u s i n j e c t i o n) して、信頼度を高めるためにブラインドテスト (B l i n d t e s t) で進行した。最後の投与後 48 時間が経過した時点で、マウスの肝臓癌組織を分離した。前記分離した癌組織から全体 R N A を抽出して c D N A を製造した後、リアルタイム P C R (r e a l - t i m e P C R) を利用して実施例 4 - 3 と同じ方法でターゲット遺伝子の m R N A 発現量を相対定量した (図 13)。1 個体で発現阻害が低く現れたが、その個体を除いて平均 70 % ほどターゲット遺伝子である B M I - 1 の発現が阻害されることを確認して、最大 80 % ほどターゲット遺伝子の発現が阻害された個体も確認 (個体 # 2、4、5) されて、本発明に係る二重らせんオリゴ高分子構造体からなるナノ粒子の i n v i v o 上優れたターゲット遺伝子発現阻害効果を確認した。

10

20

【0120】

実施例 8 - 3 . 二重らせんオリゴ高分子構造体からなるナノ粒子 (S A M i R N A) による肝臓癌成長阻害確認

前記実施例 2 で合成された配列番号 1、102 及び 201 番をセンス鎖として持つ s i R N A 配列を含む二重らせんオリゴ高分子構造体 (S A M i R N A L P) を前記実施例 3 - 1 の方法で均質なナノ粒子を製造した。陰性対照群は溶媒である D P B S、配列番号 201 番をセンス鎖として持つ s i R N A 配列を含むナノ粒子 (S A M i R N A - C O N T)、実験群は、配列番号 1 番をセンス鎖として持つ s i R N A 配列を含むナノ粒子 (S A M i R N A - G a n k)、配列番号 102 番をセンス鎖として持つ s i R N A 配列を含むナノ粒子 (S A M i R N A - B M I) 及び配列番号 1 番と 102 番をセンス鎖として持つ s i R N A 配列を含む二重らせんオリゴ高分子構造体を同量混ぜて製造されたナノ粒子 (S A M i R N A - G a n k + B M I)、陽性対照群としてリン酸化酵素抑制剤である s o r a p e n i b に設定した。前記ナノ粒子は、5 m g / k g b o d y w e i g h t で投与されて、投与量は 100 μ l i n D P B S、1 m l 注射器 (0 . 25 m m x 8 m m , 31 G a u g e , B D 328820 , U S A) を利用して 2 週間 14 回繰り返して前記実施例 8 - 1 で製造されたマウス肝臓癌モデルに尾静脈投与 (i n t r a v e n o u s i n j e c t i o n) して、信頼度を高めるためにブラインドテスト (B l i n d t e s t) で進行した。陽性対照群である s o r a p e n i b は、30 m g / k g b o d y w e i g h t の量で 2 週間 14 回繰り返して前記実施例 8 - 1 で製造されたマウス肝臓癌モデルに経口投与 (p e r o r a l a d m i n i s t r a t i o n) した。初投与後 2、6、10、14 日が経過した時点で血液内 A F P 数値を測定して、癌の成長程度を確認した (図 14)。G a n k y r i n 遺伝子特異的 s i R N A または B M I - 1 特異的 s i R N A を含むナノ粒子が投与された実験群は対照群に比べて血液内 A F P 数値が 20 % ~ 30 % ほど減少する結果を示して、G a n k y r i n と B M I - 1 特異的 s i R N A が共に含まれているナノ粒子が投与された実験群は、初投与後 10 日が経過した時点で、陽性対照群よりも A F P 数値が若干低く観察されて、14 日が経過した時点で A F P 数値が陰性対照群に比べて 40 % ほど減少する結果を示して前記 G a n k y r i n 及び / または B M I - 1 特異的 s i R N A を含む二重らせんオリゴ高分子構造体からなるナノ粒子の優れた抗癌効能を確認することができた。

30

40

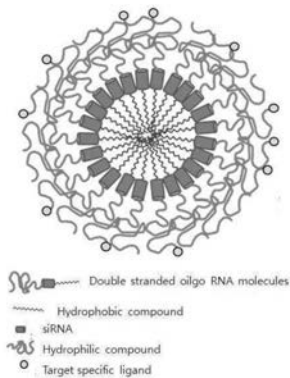
50

【産業上の利用可能性】

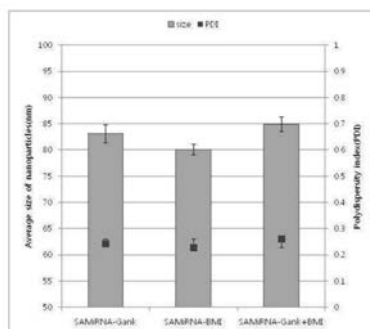
【0121】

本発明に係る *Gankyrin* 及び / または *BMI-1* 特異的 *siRNA*、これを含む二重らせんオリゴRNA構造体を含む癌治療用組成物は副作用なしに高い効率で *Gankyrin* 及び / または *BMI-1* の発現を抑制して、癌、特に肝臓癌治療効果を上げることができるので、現在適切な治療剤がない肝臓癌の治療に非常に有用に使用できる。

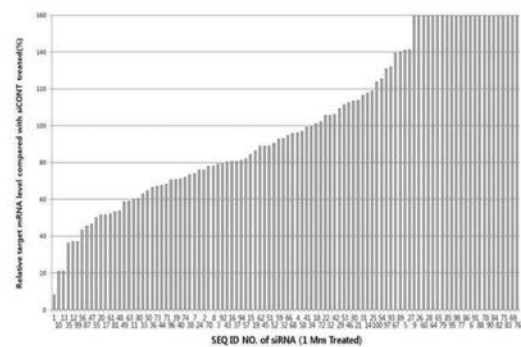
【図1】



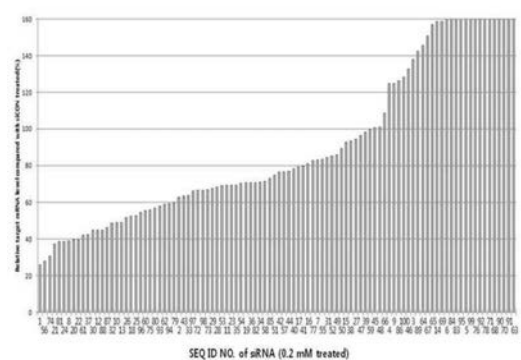
【図2】



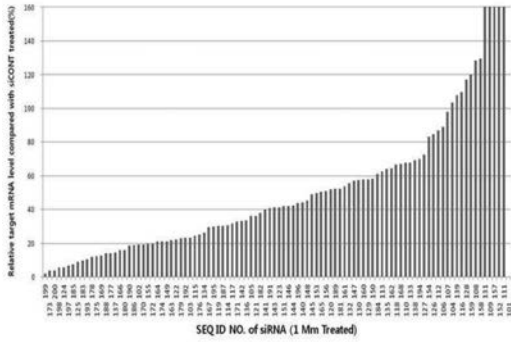
【図3】



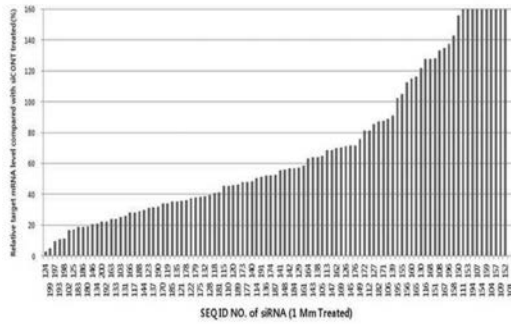
【図4】



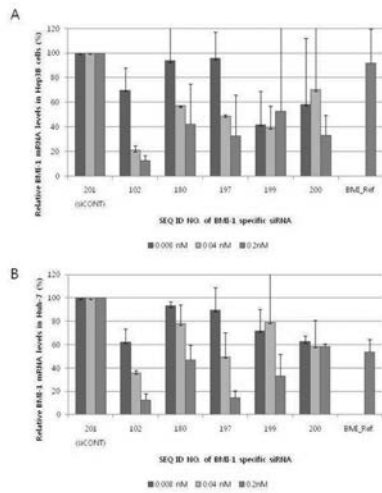
【図 5】



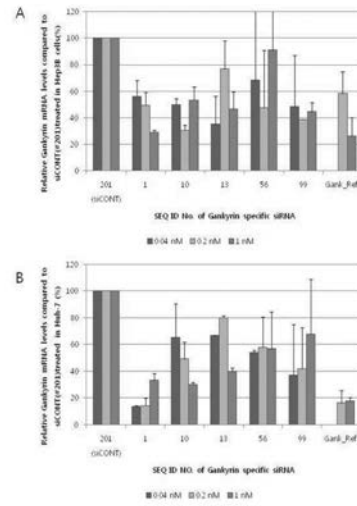
【図 6】



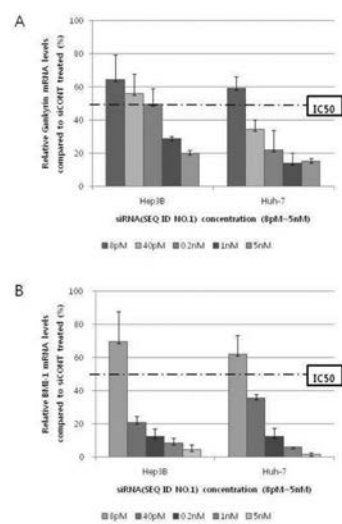
【図 8】



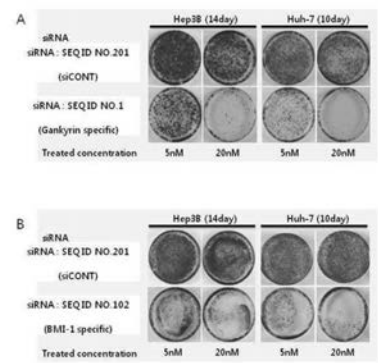
【図 7】



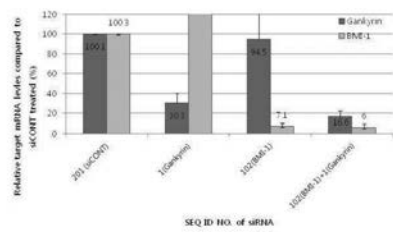
【図 9】



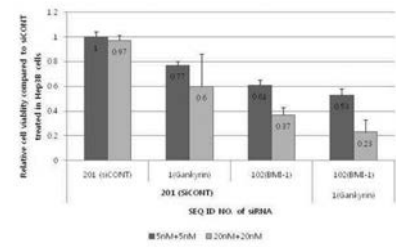
【 図 1 0 】



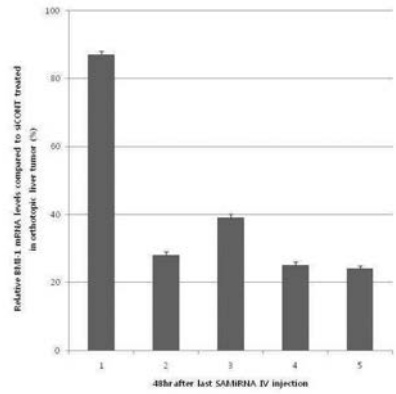
【 図 1 1 】



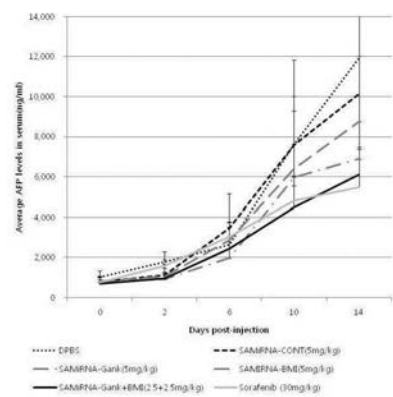
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】





【 図 1 4 】



【配列表】

2016531563000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2014/006145
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/113(2010.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/113; C07H 21/04; A01N 43/04; A61P 21/00; C07H 21/02; C07F 7/10; A61K 31/713; A61K 48/00; A61K 33/24; A61K 31/7088; A61P 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Gankyrin, BMI-1, siRNA, siRNA conjugate, liver cancer		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7645870 B2 (KHVOROVA, ANASTASIA et al.) 12 January 2010 See column 67, lines 6	1-5
Y		7-9
Y	US 2012-0108803 A1 (HAN, BO RAM et al.) 03 May 2012 See claim 22.	7-9
A		1-5
A	JIANG, YUE et al., "Effect of siRNA-mediated silencing of Bmi-1 gene expression on HeLa cells", Cancer Sci., 23 November 2009, Vol. 101, No. 2, pp. 379-386 See abstract.	1-5, 7-9
A	EP 2213738 B1 (DHARMACON, INC.) 10 October 2012 See claim 1.	1-5, 7-9
A	KR 10-1230913 B1 (UNIV. CHUNG ANG IND.) 07 February 2013 See claims 1 and 8.	1-5, 7-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 October 2014 (28.10.2014)		Date of mailing of the international search report 28 October 2014 (28.10.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung  Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/006145

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29-31
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 29-31 pertain to a method for treatment of the human by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☒ Claims Nos.: 12, 14-16, 18-19, 21, 23, 25-27, 30-31
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 12, 14-16, 18-19, 21, 23, 25-27 and 30-31 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: 6, 10-11, 13, 17, 20, 22, 24, 28-29
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This ISA found multiple inventions in this application as follows:

- Invention 1 (claims 1-6, 24-28, partially) directed to a siRNA of SEQ ID NO: 11.
- Inventions 2-200 (claims 1-6, 24-28, partially) directed to siRNAs (SEQ ID Nos: 1-10, 12-200).
- Invention 201 (claims 7-23, 24-28 partially) directed to a double-stranded oligo RNA molecule.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 7645870 B2	12/01/2010	US 2007-0128640 A1	07/06/2007
		US 2007-0128641 A1	07/06/2007
		US 2007-0134697 A1	14/06/2007
		US 2007-0134698 A1	14/06/2007
		US 2007-0141602 A1	21/06/2007
		US 2007-0179286 A1	02/08/2007
		US 2007-0185317 A1	09/08/2007
		US 2007-0185318 A1	09/08/2007
		US 2007-0185319 A1	09/08/2007
		US 2007-0185320 A1	09/08/2007
		US 2007-0213520 A1	13/09/2007
		US 2007-0213521 A1	13/09/2007
		US 2007-0219362 A1	20/09/2007
		US 2007-0225486 A1	27/09/2007
		US 2007-0232797 A1	04/10/2007
		US 2007-0238868 A1	11/10/2007
		US 2007-0244312 A1	18/10/2007
		US 2007-0249819 A1	25/10/2007
		US 2007-0255046 A1	01/11/2007
		US 2007-0255047 A1	01/11/2007
		US 2007-0255048 A1	01/11/2007
		US 2007-0255049 A1	01/11/2007
		US 2007-0255050 A1	01/11/2007
		US 2007-0255051 A1	01/11/2007
		US 2007-0255052 A1	01/11/2007
		US 2007-0260047 A1	08/11/2007
		US 2007-0260048 A1	08/11/2007
		US 2007-0260049 A1	08/11/2007
		US 2007-0260050 A1	08/11/2007
		US 2007-0260051 A1	08/11/2007
		US 2007-0260052 A1	08/11/2007
		US 2007-0265437 A1	15/11/2007
		US 2007-0265438 A1	15/11/2007
		US 2007-0276135 A1	29/11/2007
		US 2007-0276136 A1	29/11/2007
		US 2007-0287833 A1	13/12/2007
		US 2007-0293664 A1	20/12/2007
		US 2007-0299253 A1	27/12/2007
		US 2008-0015114 A1	17/01/2008
		US 2008-0027215 A1	31/01/2008
		US 2008-0027216 A1	31/01/2008
		US 2008-0039617 A1	14/02/2008
		US 2008-0045703 A1	21/02/2008
		US 2008-0064865 A1	13/03/2008
		US 2008-0071073 A1	20/03/2008
		US 2008-0071075 A1	20/03/2008
		US 2008-0076908 A1	27/03/2008
		US 2008-0081904 A1	03/04/2008
		US 2008-0085997 A1	10/04/2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2008-0085998 A1	10/04/2008
		US 2008-0086001 A1	10/04/2008
		US 2008-0086002 A1	10/04/2008
		US 2008-0090997 A1	17/04/2008
		US 2008-0097089 A1	24/04/2008
		US 2008-0097091 A1	24/04/2008
		US 2008-0097092 A1	24/04/2008
		US 2008-0113369 A1	15/05/2008
		US 2008-0113370 A1	15/05/2008
		US 2008-0113371 A1	15/05/2008
		US 2008-0113372 A1	15/05/2008
		US 2008-0113373 A1	15/05/2008
		US 2008-0113374 A1	15/05/2008
		US 2008-0113375 A1	15/05/2008
		US 2008-0113376 A1	15/05/2008
		US 2008-0113377 A1	15/05/2008
		US 2008-0113378 A1	15/05/2008
		US 2008-0132691 A1	05/06/2008
		US 2008-0139799 A1	12/06/2008
		US 2009-0156797 A1	18/06/2009
		US 2009-0191625 A1	30/07/2009
		US 2009-0253776 A1	08/10/2009
		US 2009-0325818 A1	31/12/2009
		US 2010-0004141 A1	07/01/2010
		US 2010-0010206 A1	14/01/2010
		US 2010-0016176 A1	21/01/2010
		US 2010-0022413 A1	28/01/2010
		US 2010-0022763 A1	28/01/2010
		US 2010-0062951 A1	11/03/2010
		US 2010-0069261 A1	18/03/2010
		US 2010-0069622 A1	18/03/2010
		US 2010-0087334 A1	08/04/2010
		US 2010-0099578 A1	22/04/2010
		US 2010-0113306 A1	06/05/2010
		US 2010-0113760 A1	06/05/2010
		US 2010-0113761 A1	06/05/2010
		US 2010-0144552 A1	10/06/2010
		US 2010-0190971 A1	29/07/2010
		US 2010-0234582 A1	16/09/2010
		US 2010-0234583 A1	16/09/2010
		US 2010-0240554 A1	23/09/2010
		US 2010-0267587 A1	21/10/2010
		US 2010-0279896 A1	04/11/2010
		US 2011-0003713 A1	06/01/2011
		US 2011-0003714 A1	06/01/2011
		US 2011-0021382 A1	27/01/2011
		US 2011-0034349 A1	10/02/2011
		US 2011-0039734 A1	17/02/2011
		US 2011-0077173 A1	31/03/2011
		US 2011-0281769 A1	17/11/2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2011-0319296 A1	29/12/2011
		US 2011-0319297 A1	29/12/2011
		US 2012-0010106 A1	12/01/2012
		US 2012-0015850 A1	19/01/2012
		US 2012-0065250 A1	15/03/2012
		US 2012-0184463 A1	19/07/2012
		US 2012-0252873 A1	04/10/2012
		US 2012-0258888 A1	11/10/2012
		US 2012-0258889 A1	11/10/2012
		US 2012-0270751 A1	25/10/2012
		US 2012-0270926 A1	25/10/2012
		US 2012-0283142 A1	08/11/2012
		US 2012-0283311 A1	08/11/2012
		US 7521191 B2	21/04/2009
		US 7541453 B2	02/06/2009
		US 7550572 B2	23/06/2009
		US 7569684 B2	04/08/2009
		US 7579458 B2	25/08/2009
		US 7582746 B2	01/09/2009
		US 7589191 B2	15/09/2009
		US 7592443 B2	22/09/2009
		US 7595388 B2	29/09/2009
		US 7598369 B2	06/10/2009
		US 7598370 B2	06/10/2009
		US 7605252 B2	20/10/2009
		US 7608706 B2	27/10/2009
		US 7615541 B2	10/11/2009
		US 7632938 B2	15/12/2009
		US 7632939 B2	15/12/2009
		US 7635771 B2	22/12/2009
		US 7638621 B2	29/12/2009
		US 7638622 B2	29/12/2009
		US 7655789 B2	02/02/2010
		US 7662950 B2	16/02/2010
		US 7666853 B2	23/02/2010
		US 7678896 B2	16/03/2010
		US 7709629 B2	04/05/2010
		US 7737267 B2	15/06/2010
		US 7741470 B2	22/06/2010
		US 7745610 B2	29/06/2010
		US 7745612 B2	29/06/2010
		US 7795421 B2	14/09/2010
		US 7807820 B2	05/10/2010
		US 7816512 B2	19/10/2010
		US 7833989 B2	16/11/2010
		US 7855186 B2	21/12/2010
		US 7897754 B2	01/03/2011
		US 7935813 B2	03/05/2011
		US 7999097 B2	16/08/2011
		US 8022198 B2	20/09/2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012-0108803 A1	03/05/2012	US 8022199 B2	20/09/2011
		US 8030476 B2	04/10/2011
		US 8039610 B2	18/10/2011
		US 8067576 B2	29/11/2011
		US 8071754 B2	06/12/2011
		US 8138329 B2	20/03/2012
		US 8217162 B2	10/07/2012
		US 8222395 B2	17/07/2012
		US 8222396 B2	17/07/2012
		US 8232386 B2	31/07/2012
		US 8236942 B2	07/08/2012
		US 8247169 B2	21/08/2012
		US 8268985 B2	18/09/2012
		US 8293887 B2	23/10/2012
		US 8304528 B2	06/11/2012
		WO 2006-006948 A2	19/01/2006
		WO 2006-006948 A3	15/11/2007
		AU 2011-248239 A1	08/12/2011
		CA 2761749 A1	18/11/2010
		CN 102439148 A	02/05/2012
EP 2213738 B1	10/10/2012	EP 2463371 A2	13/06/2012
		KR 10-2010-0123214 A	24/11/2010
		WO 2010-131916 A2	18/11/2010
		WO 2010-131916 A3	07/04/2011
		AT 517992 T	15/08/2011
		AU 2004-295600 A1	15/06/2004
		EP 1560931 A2	10/08/2005
		EP 1560931 A4	02/08/2006
		EP 1560931 B1	27/07/2011
		EP 2213738 A2	04/08/2010
		EP 2213738 A3	17/11/2010
		EP 2278005 A2	26/01/2011
		EP 2278005 A3	23/05/2012
		EP 2284266 A2	16/02/2011
		EP 2284266 A3	25/01/2012
		EP 2305812 A2	06/04/2011
		EP 2305812 A3	06/06/2012
		EP 2305813 A2	06/04/2011
		EP 2305813 A3	28/03/2012
		EP 2314691 A2	27/04/2011
		EP 2314691 A3	18/01/2012
		JP 2006-507841 A	09/03/2006
		JP 2010-187668 A	02/09/2010
		US 2005-0246794 A1	03/11/2005
		US 2005-0255487 A1	17/11/2005
		US 2005-0256525 A1	17/11/2005
		US 2007-0031844 A1	08/02/2007
		US 2007-0039072 A1	15/02/2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2007-0072823 A1	29/03/2007
		US 2007-0088152 A1	19/04/2007
		US 2007-0088153 A1	19/04/2007
		US 2007-0088154 A1	19/04/2007
		US 2007-0088155 A1	19/04/2007
		US 2007-0093653 A1	26/04/2007
		US 2007-0099862 A1	03/05/2007
		US 2007-0141611 A1	21/06/2007
		US 2007-0207974 A1	06/09/2007
		US 2008-0091001 A1	17/04/2008
		US 2008-0091002 A1	17/04/2008
		US 2008-0091003 A1	17/04/2008
		US 2008-0091004 A1	17/04/2008
		US 2008-0097090 A1	24/04/2008
		US 2008-0108802 A1	08/05/2008
		US 2008-0108803 A1	08/05/2008
		US 2008-0114162 A1	15/05/2008
		US 2008-0139798 A1	12/06/2008
		US 2008-0188647 A1	07/08/2008
		US 2008-0188648 A1	07/08/2008
		US 2008-0221317 A1	11/09/2008
		US 2008-0293593 A1	27/11/2008
		US 2008-0293595 A1	27/11/2008
		US 2008-0300395 A1	04/12/2008
		US 2008-0306015 A1	11/12/2008
		US 2009-0082556 A1	26/03/2009
		US 2009-0088563 A1	02/04/2009
		US 2009-0149644 A1	11/06/2009
		US 2009-0163701 A1	25/06/2009
		US 2009-0163702 A1	25/06/2009
		US 2009-0203895 A1	13/08/2009
		US 2009-0291497 A1	26/11/2009
		US 2009-0298176 A1	03/12/2009
		US 2010-0004142 A1	07/01/2010
		US 2010-0029510 A1	04/02/2010
		US 2010-0075869 A1	25/03/2010
		US 2010-0087335 A1	08/04/2010
		US 2010-0152064 A1	17/06/2010
		US 2010-0267586 A1	21/10/2010
		US 2010-0291681 A1	18/11/2010
		US 2010-0323922 A1	23/12/2010
		US 2010-0331214 A1	30/12/2010
		US 2011-0111983 A1	12/05/2011
		US 2011-0319474 A1	29/12/2011
		US 2012-0052487 A9	01/03/2012
		US 2012-0135892 A1	31/05/2012
		US 7507811 B2	24/03/2009
		US 7511132 B2	31/03/2009
		US 7514550 B2	07/04/2009
		US 7576196 B2	18/08/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 7576197 B2	18/08/2009
		US 7579457 B2	25/08/2009
		US 7592444 B2	22/09/2009
		US 7595389 B2	29/09/2009
		US 7608707 B2	27/10/2009
		US 7642349 B2	05/01/2010
		US 7645869 B2	12/01/2010
		US 7655788 B2	02/02/2010
		US 7674896 B2	09/03/2010
		US 7691997 B2	06/04/2010
		US 7696344 B2	13/04/2010
		US 7745611 B2	29/06/2010
		US 7795420 B2	14/09/2010
		US 7803933 B2	28/09/2010
		US 7807819 B2	05/10/2010
		US 7834170 B2	16/11/2010
		US 7893247 B2	22/02/2011
		US 7985854 B2	26/07/2011
		US 8000902 B2	16/08/2011
		US 8008474 B2	30/08/2011
		US 8030474 B2	04/10/2011
		US 8090542 B2	03/01/2012
		US 8093370 B2	10/01/2012
		WO 2004-045543 A2	03/06/2004
		WO 2004-045543 A3	21/04/2005
KR 10-1230913 B1	07/02/2013	EP 2496268 A1	12/09/2012
		JP 2012-503494 A	09/02/2012
		KR 10-2011-0050338 A	13/05/2011
		US 2011-0229966 A1	22/09/2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00		
B 8 2 Y 5/00	(2011.01)	B 8 2 Y 5/00		

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

(74)代理人 100139594

弁理士 山口 健次郎

(74)代理人 100185915

弁理士 長山 弘典

(74)代理人 100194973

弁理士 尾崎 祐朗

(72)発明者 チェ ジェウク

大韓民国, 3 0 5 - 7 6 1 , テジョン, ユソン - グ, エクスポ - ロ, 4 4 8 , エクスポ アパートメント, 1 0 4 - 2 0 1

(72)発明者 バク ハンオ

大韓民国, 3 0 5 - 7 6 1 , テジョン, ユソン - グ, エクスポ - ロ, 4 4 8 , エクスポ アパートメント, 2 0 8 - 6 0 1

(72)発明者 ユン ピョンオ

大韓民国, 3 0 5 - 7 5 1 , テジョン, ユソン - グ, クジユク - ロ, 2 5 , ソンガン グリーンアパートメント, 3 0 6 - 1 2 0 5

(72)発明者 ハン ボラム

大韓民国, 3 0 5 - 7 5 1 , テジョン, ユソン - グ, クジユク - ロ, 2 5 , プチョンボムバク ヒルステイト 3 - ダンジ アパートメント, 3 1 0 - 1 2 0 4

(72)発明者 キム ハンナ

大韓民国, 5 6 0 - 8 5 7 , チョルラブク - ト, チョンジュ - シ, ワンサン - グ, コマピョン - ロ, 1 0 9 , ヒョジャ ジェイル アパートメント, 1 0 3 - 1 3 0 2

(72)発明者 ユン ソンイル

大韓民国, 3 0 5 - 7 5 2 , テジョン, ユソン - グ, ソンガン - ロ 4 2 ボン - ギル, 6 1 , ソンガン チョンソル アパートメント, 1 0 1 - 1 0 0 6

(72)発明者 バク ジュノン

大韓民国, 3 0 6 - 8 1 7 , テジョン, テドク - ク, ハンバト - テロ 1 0 0 3 ボン - ギル, 2 5 , ピョンファロウン アパートメント, 1 0 1 - 1 2 0 5

(72)発明者 コ ヨンホ

大韓民国, 1 5 7 - 7 4 2 , ソウル, カンソ - グ, ホジュン - ロ, 4 7 , ソンジ アパートメント, 2 0 6 - 6 0 6

(72)発明者 チョイ ギウン

大韓民国, 4 4 9 - 9 3 5 , キョンギ - ド, ヨンイン - シ, チョイン - グ, ペゴク - テロ 1 4 0 2 ボン - ギル, 1 5 - 1 1 , イルボン ピラ, 1 0 5 - 5 0 3

(72)発明者 ジュン ジュンス

大韓民国, 1 3 0 - 8 2 6 , ソウル, トンデムン - グ, イムン - ロ 3 2 - ギル, 6 - 5

(72)発明者 キム ジェウン

大韓民国, 1 3 6 - 7 9 3, ソウル, ソンブク - ク, プガクサン - ロ, 8 4 4, ブラウン スト
ン ドナム アパートメント, 1 0 2 - 5 0 3

F ターム(参考) 4C084 AA13 MA01 NA14 ZA752 ZB262

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA05 NA14 ZA75 ZB26

4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 NA14 ZA75 ZB26