

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成21年4月2日 (2009.4.2)

【公表番号】特表2008-537551(P2008-537551A)

【公表日】平成20年9月18日 (2008.9.18)

【年通号数】公開・登録公報2008-037

【出願番号】特願2008-504405(P2008-504405)

【国際特許分類】

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 9/51 (2006.01)

A 6 1 K 47/40 (2006.01)

A 6 1 K 47/06 (2006.01)

A 6 1 K 47/26 (2006.01)

A 6 1 K 47/42 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/10 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 31/7088 Z N A

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 9/51

A 6 1 K 47/40

A 6 1 K 47/06

A 6 1 K 47/26

A 6 1 K 47/42

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 31/10

A 6 1 P 31/12

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成21年2月10日 (2009.2.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

(i) 配列番号 4～6 よりなる群から選択される配列を含む 15～30ヌクレオチド長の第 1 の鎖；及び、

(ii) 15～30ヌクレオチド長の第 2 の鎖；
を含む核酸であって、

ここで該第 1 及び第 2 の鎖の少なくとも 12ヌクレオチドは相互に相補であり、そして生理学的条件下にて 2 本鎖核酸を形成し、そしてここで、該 2 本鎖核酸は RNA 干渉機序により細胞内でリボヌクレオチドレダクターゼサブユニット 2 (R2) の発現を低減できる、核酸。

【請求項 2】

前記核酸が 2 本鎖 RNA である請求項 1 記載の核酸。

【請求項 3】

前記核酸がヘアピン RNA である請求項 1 記載の核酸。

【請求項 4】

前記ヘアピン RNA のループ領域が 4～10ヌクレオチド長である請求項 3 記載の核酸。

【請求項 5】

前記 RNA の 2 本鎖部分が約 15～約 30ヌクレオチド長である請求項 1 記載の核酸。

【請求項 6】

前記第 1 の鎖が DNA ポリヌクレオチドであり、そして第 2 の鎖が RNA ポリヌクレオチドである請求項 1 記載の核酸。

【請求項 7】

前記第 1 及び／又は第 2 の鎖が更に 3' オーバーハング領域、5' オーバーハング領域又は 3' オーバーハング領域及び 5' オーバーハング領域の両方を含む請求項 1 記載の核酸。

【請求項 8】

前記オーバーハング領域が 1～10ヌクレオチド長である請求項 7 記載の核酸。

【請求項 9】

前記核酸が 1 つ以上の改変された骨格又は塩基部分を含む請求項 1 記載の核酸。

【請求項 10】

前記改変された骨格又は塩基部分が、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスフェートエステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシルメチルエステル、カーボネート及びホスフェートトリエステルの 1 つ以上である請求項 9 記載の核酸。

【請求項 11】

前記核酸が少なくとも 1 つの 2'-O-アルキル化リボヌクレオチドを含む請求項 9 記載の核酸。

【請求項 12】

前記第 1 の鎖が配列番号 7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93 及び 95 よりなる群から選択される配列を含む請求項 1 記載の核酸。

【請求項 13】

前記第 2 の鎖が配列番号 8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94 及び 96 よりなる群から選択される配列を含む請求項 1 記載の核酸。

【請求項 14】

10ナノモルの濃度において生理学的条件下にて細胞と接触した場合に、前記核酸が該細胞による R2 発現を 50% 以上阻害する請求項 1 記載の核酸。

【請求項 15】

生理学的条件下にて配列番号1のヌクレオチド422～485、616～667又は907～968に相当するR2転写物の領域にハイブリダイズし、そして、細胞内のR2の発現を低減する配列を含む、単離された核酸。

【請求項 16】

前記核酸が配列番号1のヌクレオチド432～475、626～657又は917～958に相当するR2転写物の領域にハイブリダイズする配列を含む請求項15記載の単離された核酸。

【請求項 17】

前記核酸が配列番号1のヌクレオチド437～470、631～652又は921～953に相当するR2転写物の領域にハイブリダイズする配列を含む請求項15記載の単離された核酸。

【請求項 18】

前記核酸がR2の前記領域の1つに相補的な少なくとも10連続ヌクレオチドを含む請求項15記載の核酸。

【請求項 19】

前記核酸が約14～約50ヌクレオチド長である請求項15記載の核酸。

【請求項 20】

前記核酸が1本鎖である請求項15記載の核酸。

【請求項 21】

前記核酸が2本鎖である請求項15記載の核酸。

【請求項 22】

前記核酸が改変された骨格又は塩基部分1つ以上を場合により含むDNA分子である請求項15記載の核酸。

【請求項 23】

前記核酸が改変された骨格又は塩基部分1つ以上を場合により含むRNA分子である請求項15記載の核酸。

【請求項 24】

前記核酸がDNA鎖及びRNA鎖を含み、そして改変された骨格又は塩基部分1つ以上を場合により含む請求項15記載の核酸。

【請求項 25】

前記核酸がRNA i コンストラクトである請求項15記載の核酸。

【請求項 26】

前記RNA i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分1つ以上を場合により含むdsRNAである請求項25記載の核酸。

【請求項 27】

前記RNA i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分1つ以上を場合により含むヘアピンRNAである請求項25記載の核酸。

【請求項 28】

前記RNA i コンストラクトのデュプレックス部分が約15～約30ヌクレオチド長である請求項25記載の核酸。

【請求項 29】

前記RNA i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分1つ以上を場合により含む配列番号4～6よりなる群から選択される配列を含む請求項25記載の核酸。

【請求項 30】

前記RNA i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分1つ以上を場合により含む配列番号7～96よりなる群から選択される配列を含む請求項25記載の核酸。

【請求項 31】

前記RNA i コンストラクトが改変された骨格又は塩基部分1つ以上を含む請求項25記載の核酸。

【請求項 3 2】

前記 RNA i コンストラクトがアルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスフェートエステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシルメチルエステル、カーボネート及びホスフェートトリエステルよりなる群から選択されるヌクレオチド間連結少なくとも 1 つを含む請求項 3 1 記載の核酸。

【請求項 3 3】

前記改変された RNA i コンストラクトが 2' - O - アルキル化リボヌクレオチド少なくとも 1 つを含む請求項 3 1 記載の核酸。

【請求項 3 4】

前記核酸が酵素的核酸である請求項 1 5 記載の核酸。

【請求項 3 5】

前記酵素的核酸がリボザイムである請求項 3 4 記載の核酸。

【請求項 3 6】

前記酵素的核酸が DNA 酵素である請求項 3 4 記載の核酸。

【請求項 3 7】

10 ナノモルの濃度において生理学的条件下にて細胞と接触した場合に前記核酸が該細胞による R 2 発現を 50 % 以上阻害する請求項 1 5 記載の核酸。

【請求項 3 8】

請求項 1 または請求項 1 5 記載の核酸及び製薬上許容しうる担体を含む医薬組成物。

【請求項 3 9】

前記製薬上許容しうる担体がカチオン性重合体を含有する請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 0】

前記製薬上許容しうる担体がシクロデキストリン重合体を含有する請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 1】

前記シクロデキストリン構造が図 2 7 に示す im - C D P である請求項 4 0 記載の医薬組成物。

【請求項 4 2】

シクロデキストリン重合体及び請求項 1 又は 1 5 記載の核酸を含有し、そして PEG 化されている粒子を含む請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 3】

前記粒子が更にアダマンタンを含む請求項 4 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4 4】

更に特定の組織又は細胞型をターゲティングするリガンドを含む請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 5】

前記リガンドがガラクトースを含む請求項 4 4 記載の医薬組成物。

【請求項 4 6】

ナノ粒子を含み、そして該ナノ粒子が直径 10 ~ 100 nm である請求項 3 8 記載の医薬組成物。

【請求項 4 7】

前記ナノ粒子が直径約 50 ~ 70 nm である請求項 4 6 記載の医薬組成物。

【請求項 4 8】

ナノ粒子が直径約 50 nm である請求項 4 7 記載の医薬組成物。

【請求項 4 9】

請求項 3 8 記載の医薬組成物であって、ここで前記製薬上許容しうる担体が、以下：

イミダゾール改変シクロデキストリン含有カチオン性重合体、及び、

アダマンタン - PEG - リガンドを含むターゲティング部分、

を含み、

ここで該重合体及びターゲティング部分が前記核酸をカプセル化するナノ粒子を形成する、医薬組成物。

【請求項 50】

前記ナノ粒子が約 50～120 nm の直径を有する請求項 49 記載の医薬組成物。

【請求項 51】

前記ナノ粒子が約 50～100 nm の直径を有する請求項 50 記載の医薬組成物。

【請求項 52】

ナノ粒子が約 50～70 nm の直径を有する請求項 51 記載の医薬組成物。

【請求項 53】

前記ナノ粒子が約 50 nm の直径を有する請求項 49 記載の医薬組成物。

【請求項 54】

前記ターゲティングリガンドがガラクトースを含む請求項 49 記載の医薬組成物。

【請求項 55】

前記ターゲティングリガンドがトランスフェリンを含む請求項 49 記載の医薬組成物。

【請求項 56】

細胞の望ましくない増殖に関連する疾患又は症状の治療のための医薬の製造における請求項 1 又は 15 記載の核酸の使用。

【請求項 57】

前記細胞が癌性又は腫瘍の細胞である請求項 56 記載の使用。

【請求項 58】

前記細胞が病原体細胞である請求項 56 記載の使用。

【請求項 59】

前記細胞が正常細胞であり、該細胞の前記望ましくない増殖が疾患状態をもたらす、請求項 56 記載の使用。

【請求項 60】

請求項 1 又は 15 記載の 2 本鎖核酸を含む癌を有する患者を治療するための組成物。

【請求項 61】

前記核酸が製薬上許容しうる担体とともに製剤される請求項 60 記載の組成物。

【請求項 62】

前記核酸が癌細胞をターゲティングするリガンドとともに製剤される請求項 60 記載の組成物。

【請求項 63】

前記リガンドがトランスフェリンである請求項 62 記載の組成物。

【請求項 64】

前記癌細胞が肝細胞であり、そして前記リガンドがガラクトースを含む請求項 62 記載の組成物。

【請求項 65】

前記核酸が重合体ナノ粒子の成分として製剤される請求項 60 記載の組成物。

【請求項 66】

前記ナノ粒子が直径 10～120 nm である請求項 65 記載の組成物。

【請求項 67】

前記ナノ粒子が直径 50～120 nm である請求項 65 記載の組成物。

【請求項 68】

前記ナノ粒子が直径 50～100 nm である請求項 67 記載の組成物。

【請求項 69】

前記ナノ粒子が直径 50 nm である請求項 65 記載の組成物。

【請求項 70】

全身投与により投与される請求項 60 記載の組成物。

【請求項 71】

肝動脈内投与により投与される請求項 60 記載の組成物。

【請求項 7 2】

前記癌が肝臓癌である請求項 7 1 記載の組成物。

【請求項 7 3】

前記癌細胞が比較可能な組織に由来する非癌性の細胞と比較してより高レベルの R 2 を発現する請求項 6 0 記載の組成物。

【請求項 7 4】

前記核酸と相加的又は相乗的な態様において癌細胞を阻害する追加的抗癌化学療法剤少なくとも 1 つを更に含有する請求項 6 0 記載の組成物。

【請求項 7 5】

化学療法剤がフルオロウラシル (5 F U) である請求項 7 4 記載の組成物。

【請求項 7 6】

以下：

肝臓治療薬、及び、

(i) イミダゾール改変シクロデキストリン含有カチオン性重合体、及び (i i) アダマンタン- P E G - リガンドを含むターゲティング部分を含む送達ビヒクルであって、ここで該重合体及びターゲティング部分が核酸をカプセル化するナノ粒子を形成する、送達ビヒクル、

を含む肝特異的送達医薬組成物。

【請求項 7 7】

前記ナノ粒子が直径 1 0 ~ 1 0 0 n m である請求項 7 6 記載の医薬組成物。

【請求項 7 8】

前記ナノ粒子が直径約 5 0 ~ 7 0 n m である請求項 7 7 記載の医薬組成物。

【請求項 7 9】

前記ナノ粒子が直径約 5 0 n m である請求項 7 7 記載の医薬組成物。

【請求項 8 0】

前記肝臓治療薬が小分子、ポリペプチド又は核酸である請求項 7 6 記載の医薬組成物。

【請求項 8 1】

前記肝臓治療薬が請求項 1 又は 1 5 記載の核酸である請求項 8 0 記載の医薬組成物。

【請求項 8 2】

以下：

肝臓治療薬、及び、

(i) イミダゾール改変シクロデキストリン含有カチオン性重合体、及び (i i) アダマンタン- P E G - リガンドを含むターゲティング部分を含む送達ビヒクルであって、ここで該重合体及びターゲティング部分が核酸をカプセル化するナノ粒子を形成する、送達ビヒクル、

を含む、肝臓の疾患又は障害を治療するための組成物。

【請求項 8 3】

前記肝臓の疾患又は障害が肝細胞癌である請求項 8 2 記載の組成物。

【請求項 8 4】

肝動脈内投与により投与される請求項 8 2 記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 6】

R 2 の阻害は細胞における R 2 の生物学的活性、例えばその酵素活性を阻害することにより達成してよい。或いは、R 2 の阻害は細胞における R 2 遺伝子の発現を阻害することにより達成してよい。小分子及び核酸は R 2 の活性及び／又は発現をダウンレギュレーション

ョンするために使用される。例示されるものは、ペプチド又はペプチド誘導体である2量化阻害剤（例えば米国特許第6,030,942号又は米国特許第4,845,195号に記載のペントペプチドVal Val Asn Asp Leu（配列番号117））、触媒性阻害剤（例えばフリーラジカルスカベンジャー又は鉄キレート形成剤）、アンチセンス分子（例えばGTI-2040、Lorus Therapeutics, Inc.）、Lin et al.（2003）J. Biol. Chem. 279:27030及びDuxbury et al.（2004）Oncogene 28:1539に記載のsiRNA分子を含む。しかしなお、新規で向上したR2阻害剤はR2をダウンレギュレートするための新しい手段として必要とされ続けている。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0281

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0281】

【図1】図1はヒトリボヌクレオチドレダクターゼM2に関するcDNA配列を示す（GenBank受託番号NM_001034）（配列番号1）。下線を付した太字の3つの11塩基ストレッチは配列番号4～6により示されるコア標的配列に相当する。

【図2】図2はマイコバクテリウム・ツベルクロシスH37Rvのリボヌクレオチドレダクターゼ小型サブユニット（図2A）（配列番号2）及びヒトヘルペスウィルス4のリボヌクレオチドレダクターゼ小型サブユニット（図2B）（配列番号3）に関するcDNA配列を示す。

【図3】図3は正常ヒト肝臓組織（図3A）及び肝細胞癌（HCC）組織（図3B）におけるR2の免疫組織化学的染色を示す。画像は400Xの倍率で撮影した。R2発現はHCC肝臓組織においては検出可能にアップレギュレートされていた。新しく切除されたヒトHCC組織を4%パラホルムアルデヒド中に固定し、パラフィン包埋し、そして2～5μm切片を切り出した。脱パラフィンし、等級付けされたアルコールを介して再水和した後、スライドをマイクロ波抗原回復（抗原脱マスクング溶液；Vector Laboratories, Burlingame, CA）に付し、そしてマウスIgM（1:400希釈、Vector Laboratories）を用いながらマウス抗ヒト抗RRM2抗体（1:400希釈、Covance, Philadelphia, PA）及び二次抗体で標識した。画像は冷却した電荷結合デバイスカメラ（MagnaFire；Olympus, Melville, NY）を用いてキャプチャーし、そしてTIFFファイルとしてAdobe Photoshop（Adobe Systems, Mountain View, CA）にインポートし、そしてXerox Phaser 860DPプリンター上に印刷した。ヘマトキシリン及びエオシン（H&E）染色は標準的なプロトコルを用いて実施した。

【図4】図4はR2をターゲティングするsiRNAの設計を示す。ヒトR2（hRRM2）mRNA内の標的部位の位置は本出願による新規な標的部位に関してはA、B及びCで、そして公開されている標的部位に関してはX、Y及びZで標記する。

【図5】図5はR2標的に対するsiRNAの結合を試験するゲルシフト試験を示す。レーン3、4及び5は図4に示す通り、それぞれ領域A、B及びCに対するsiRNA標的を用いたR2のゲルシフトを示す。使用したsiRNAの配列は配列番号7及び8（標的部位A）、配列番号9及び10（標的部位B）及び配列番号11及び12（標的部位C）とした。部位AにターゲティングされたsiRNAデュプレックスは強力な結合（レーン3）を示していた。

【図6】図6A及び6BはsiRNAの細胞内力価（図6A）が標的に対するそれらの結合親和性（図6B）に相関することを示している。図6CはEGFPをターゲティングしている種々のsiRNAを示す（配列番号106～116は、それぞれ、見た目の順序で

開示される)。

【図7】図7は本出願の特定のs i R N Aによる種々の細胞系統におけるR 2のダウンレギュレーションを示す。図7 Aは記載した種々のs i R N Aを投与したH e L a細胞由来のh R R M 2蛋白のレベルのウェスタンブロットを示す。図7 BはA、B及びC部位にターゲティングされたs i R N A、対照s i R N A及びh R R M 2に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドでトランスフェクトされた種々の細胞型由来の溶解物を用いたウェスタンブロット実験の結果を示す。

【図8】図8はR 2に対するs i R N AのスクリーニングのためのR 2ルシフェラーゼ融合コンストラクト(「p R 2 L u cプラスミド」)を示す。細胞はp R 2 L u cプラスミドとR 2に対するs i R N Aで同時トランスフェクトしてよい。ルシフェラーゼレベルの定量はR 2発現のダウンレギュレーションと相関していた。

【図9】図9はタイリング実験の結果を示す。図9 A、9 B及び9 Cはそれぞれ標的部位A、B及びCにおいて実施されたタイリング実験の結果を示す。各標的部位に関し、3つの元来発見されている標的部位の各々に隣接(+又は-)する8つ以上の異なる21量体の配列を合成し、そして3用量の各々(10 nM、1 nM及び0.2 nM)において比較した。図9 Dはタイリング実験の実験設計を示す。

【図10】図10はタイリング実験におけるp R 2 L u cの使用が高度に強力なs i R N Aの発見をもたらしたことを示している。s i R R M 2 A、s i R R M 2 B、s i R R M 2 Cはそれぞれ標的部位A(配列番号7及び8を有する)、標的部位B(配列番号9及び10を有する)及び標的部位C(配列番号11及び12を有する)に対して指向されたs i R N Aであり；s i R R M 2 B+3及びs i R R M 2 B+5は元の部位B s i R N A デュプレックスと比較した場合に増大した力価を有する標的部位Bからタイリングされたデュプレックスであり；G T I-2040はR 2に対してターゲティングされたアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドであり；s i (G T I-2040)はG T I-2040アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドと同様の部位にターゲティングされたs i R N Aであり；s i (J B C, 2004)はR 2に対する以前に公開されたs i R N Aである。

【図11】図11は標的部位Bの周囲(タイリングB+3~B+10)のデュプレックスを用いた追加的タイリング実験の結果を示す。B+5デュプレックスは検討対象として最も強力なデュプレックスのままであり続け、そしてB+9デュプレックスは二番目に強力なデュプレックスとして出現した。

【図12】図12は21量体及び27量体のR N AによるR 2-ルシフェラーゼ融合蛋白の用量依存的ダウンレギュレーションを示す。

【図13】図13はR 2-ルシフェラーゼ融合のs i R N A誘導ダウンレギュレーションが内因性R 2のダウンレギュレーションに相関することを示している。s i R R M 2 B+5デュプレックスはp R 2 L u cを用いた同時トランスフェクション試験において高度に強力であるものとして発見された。図に示される通り、H e p 3 B細胞におけるs i R R M 2 B+5デュプレックス単独のトランスフェクションはトランスフェクション後1日、2日及び3日において、内因性R 2の配列特異的ノックダウンをもたらした。細胞をs i R R M 2 B+5又はs i C O N 1(D h a r a m a c o nの非ターゲティング対照デュプレックス#1)20 nMでトランスフェクトした。

【図14】図14はR 2に対するs i R N Aがリポフェクションされた細胞のアポトーシスを誘導することを示している。培養されたヒトH C C細胞(H e p G 2)をR 2に対するs i R N A(s i R R M 2 B+5)又は非ターゲティング対照s i R N A(s i C O N 1)でトランスフェクトし、次にトランスフェクションの1、2又は3日後にアポトーシスについて分析した。

【図15】図15はR 2に対するs i R N AがヒトH C C細胞の薬剤誘導アポトーシスを増強することを示している。培養されたヒトH C C細胞(H e p G 2)をR 2に対するs i R N A(s i R R M 2 B+5)又は非ターゲティング対照s i R N A(s i C O N 1)でトランスフェクトし、その後、3日間アドリマイシン(100 nM)を投与した。次にアポトーシスのレベルを測定した。

【図16】図16はR2に対するs iRNAがインビボのR2発現を低減することを示している。R2-ルシフェラーゼ融合遺伝子をコードするプラスミド (pR2Luc) をBALB/cマウスにおいてR2に対するs iRNA (s iRRM2B+5) 又は非ターゲティング対照s iRNA (s iCON1) と同時注射した。融合遺伝子発現は全動物バイオミネセンス画像化により追跡した。図16Aは17日間に渡る融合遺伝子発現の総括的プロットを示す。図16Bは注射後2日において撮影された代表的画像を示す。

【図17】図17はR2に対するs iRNA (s iR2B+5) が培養ヒトHCC細胞 (Hep3B細胞) の成長能力を低減することを示している。ヒト肝細胞癌 (HCC) の細胞 (Hep3B) を希釈しながらプレーティングし、そして次に非ターゲティング対照s iRNA (s iCON1) 又はR2に対するs iRNA (s iR2B+5) (5 nM) でトランスフェクトする。トランスフェクションの5日後、細胞を固定し、染色 (メチレンブルー) し、そしてコロニー (—50以上の細胞) を計数する。記載する通り、R2に対するs iRNA (s iR2B+5) は非ターゲティング対照s iRNA (s iCON1) と比較してHep3B細胞のコロニー形成能力を有意に低減する。コラムはn=3連のウェルの平均を示し；エラーバーは標準偏差を示す。

【図18】図18はR2に対するs iRNAの力価は培養ヒトHCC細胞 (Hep3B細胞) の成長能力を低減する能力と相関していることを示している。ヒト肝細胞癌 (HCC) の細胞 (Hep3B) を希釈しながらプレーティングし、そして次にR2に対して種々の力価を有することが予めわかっている5種のs iRNA (s iR2B+3、s iR2B+5、s iR2B+6、s iR2B+7、s iR2B+9) (5 nM) の1つでトランスフェクトした (例えば図11参照)。トランスフェクションの5日後、細胞を固定し、染色 (メチレンブルー) し、そしてコロニー (—50以上の細胞) を計数する。記載する通り、コロニー形成を低減するs iRNAの能力 (本図) はR2のダウンレギュレーションに関するその力価に強力に相関しており (図11参照)、例えばs iR2B+3、s iR2B+5、s iR2B+9 >> s iR2B+6、s iR2B+7であった。コラムはn=3連のウェルの平均を示し；エラーバーは標準偏差を示す。

【図19】図19はR2に対するs iRNA (s iR2B+5) によるHep3B細胞の成育能力の低減が5-フルオロウラシル (5-FU) 曝露により増強されることを示している。ヒト肝細胞癌 (HCC) の細胞 (Hep3B) を希釈しながらプレーティングし、そして次に (1) 4時間ルシフェラーゼターゲティングs iRNA (Luc105-21) 又はR2に対するs iRNA (s iR2B+5) (5 nM) でトランスフェクト、及び／又は (2) トランスフェクション後48時間から開始して3日間5 mMの5-フルオロウラシル (5-FU) に曝露する。トランスフェクションの5日後、細胞を固定し、染色 (メチレンブルー) し、そしてコロニー (—50以上の細胞) を計数する。前に観察された通り、s iR2B+5は非R2ターゲティング対照と比較してコロニー数を低減している (今回Luc105-21)。5-FU単独 (s iRNA曝露を伴わない) は未投与細胞と比較してコロニー数を低減し、そしてs iR2B+5投与後の5-FU曝露は更にコロニー数を低減する。コラムはn=3連のウェルの平均を示し；エラーバーは標準偏差を示す。

【図20】図20はR2に対するs iRNAがマウスにおいて皮下Hep3B腫瘍内のR2蛋白レベルを低下させることを示している。皮下ヒト肝細胞癌 (Hep3B) 腫瘍を有するマウスに重合体系の送達系内において2.5 mg/kgのs iRNA (非ターゲティング対照s iRNA (s iCON1) 又はR2に対するs iRNA (s iR2B+5) の何れか) を3回連続で毎日腫瘍内 (IT) に注射する。3回目の注射の2日後、マウスを屠殺し、腫瘍を固定し、パラフィン包埋し、切片化し、そして免疫組織化学的 (IHC) に操作して腫瘍R2蛋白レベルを試験する。R2に対するs iRNAを含有する製剤を投与されたマウス3匹中2匹において、腫瘍R2蛋白レベルは、非ターゲティング対照s iRNAを投与したマウスの場合と比較して急激に低下する。このことは、s iR2B+5を含有する製剤の3回連続毎日腫瘍内注射はこれ等の腫瘍内においてR2蛋白のダウンレギュレーションを達成することを示唆している。採点は以下の尺度、即ち、+=低R2蛋

白レベル、++ = 中等度 R 2 蛋白レベル、及び+++ = 高 R 2 蛋白レベルを用いて実施した。

【図 2 1】図 2 1 は R 2 に対する s i R N A が培養ラットヘパトーマ細胞 (M c A - R H 7 7 7 7) における R 2 蛋白レベルを低下させることを示している。ラットヘパトーマ細胞 (M c A - R H 7 7 7 7) をプレーティングし、次に R 2 に対するアンチセンス分子 (G T I - 2 0 4 0 ; 1 n M 又は 2 0 n M)、ルシフェラーゼに対する s i R N A (L u c 1 0 5 - 2 1 ; 2 0 m M のみ)、R 2 に対する 2 1 量体の s i R N A (s i R 2 B + 5 ; 1 n M 又は 2 0 n M) 又は R 2 に対する 2 5 / 2 7 量体 (s i R 2 B + 5 - 2 7 ; 1 n M 又は 2 0 n M) でトランスフェクトする。トランスフェクション後 4 8 時間において、細胞を溶解し、R 2 蛋白レベルをウエスタンブロットで測定し、I m a g e Q u a n t ソフトウェアを用いて定量する。R 2 に指向された全ての分子 (G T I - 2 0 4 0 アンチセンス、s i R 2 B + 5 の 2 1 量体及び 2 5 / 2 7 量体) は陰性対照 (L u c 1 0 5 - 2 1、ルシフェラーゼに対する s i R N A) の場合よりも優れた R 2 蛋白レベルの用量依存的低下を示す。s i R 2 B + 5 の 2 1 量体及び 2 5 / 2 7 量体からの R 2 の低下は相互に同等であり、そして G T I - 2 0 4 0 アンチセンス分子で観察されたものより優れている。

【図 2 2】図 2 2 は肝細胞への送達のためのモデル粒子を製造するための方法の模式図である。ガラクトース-PEG 化合物の存在又は非存在によりガラクトース含有又は単に PEG 化されたビーズがそれぞれ形成される。

【図 2 3】図 2 3 は s i R N A の送達の為に製造された粒子の動的光散乱 (D L S) による粒径分布を示す。図 2 3 (a) はモデルビーズ G a l - 5 0 に関する粒径分布を示す。図 2 3 (b) は線状シクロデキストリン含有ポリカチオン及びガラクトース含有 PEG 系モディファイアーを用いた自己組立により形成された製剤化 s i R N A 粒子に関する粒径分布を示す。

【図 2 4】図 2 4 は注射後 2 0 分にマウス尾静脈を介して注入した G a l - 5 0、M e O - 5 0、G a l - 1 4 0 及び M e O - 1 4 0 粒子の肝取り込みを示す。

【図 2 5】図 2 5 は種々の粒径の粒子の尾静脈注射に付されたマウスに由来する肝切片を示す。左側パネルは G a l - 1 4 0 ビーズ (直径 1 4 0 n m) は大部分が肝臓切片には非存在であることを示している (図 2 5 A)。右側パネルは G a l - 5 0 ビーズ (直径 5 0 n m) は肝臓切片に存在していることを示している (図 2 5 B)。

【図 2 6】図 2 6 は G a l - 1 4 0 粒子がクプファー細胞内に位置し、肝細胞内部には到達しないことを示している T E M 画像である。

【図 2 7】図 2 7 は i m - C D P (イミダゾール含有 C D P) を生成するための C D P 末端基官能性付与の模式図である。

【図 2 8】図 2 8 は毒性に対するポリカチオンの疎水性の影響を示す。図示される A P 5 のシクロデキストリン成分が細胞毒性を低減している。

【図 2 9】図 2 9 はインビトロの細胞への s i R N A 送達のための送達ビヒクルとしての i m - C D P を示す。培養されたヒトユーイング肉腫 (T C - 7 1) 細胞を 4 時間オリゴフェクタミン (O F A) 又はシクロデキストリン含有ポリカチオン (i m - C D P) を用いて作成した s i E F B P 2 含有製剤 (E W S - F L I 1 融合蛋白をターゲティングするための配列) に曝露した。感染の 4 8 時間後、細胞を溶解し、全細胞蛋白を変性し、電気泳動に付し、そして P V D F メンブレンに転移させ、これを E W S - F L I 1 又はアクチンに対する抗体でプロービングし、そしてウエスタンブロット分析による定量を行った。平均バンド強度は密度測定により求め、そして E W S - F L I 1 のアクチンに対する強度の比を計算した。s i E F B P 2 m u t は陰性対照として使用したスクランブルド s i E F B P 2 s i R N A である。

【図 3 0】図 3 0 は C D P / p D N A (パネル a、c 及び d) 又は i m - C D P / p D N A (パネル b、e 及び f) のポリプレックスに曝露した B H K 細胞の T E M 画像である。

(a) 及び (b) において、細胞内小胞は細胞膜に接近し、低 p H ではない。(c ~ f) においては、小胞は核膜の近傍にあり、f に近似した p H 値にある。(e) 及び (f) においては、複合体脱パッケージングが観察されるのに対し、(c) 及び (d) においては

観察されない。

【図 3 1】図 3 1 はシクロデキストリン含有ポリプレックス表面改変（例えば PEG 化又はターゲティング）及びアダマンタン（AD）-PEG コンジュゲート及び β -シクロデキストリンを用いた封入複合体形成の模式図である。図 3 1 A はシクロデキストリン含有ポリプレックス表面改変の模式図を示す。図 3 1 B はアダマンタン（AD）-PEG コンジュゲート（系の第 2 の成分）及び β -シクロデキストリンを用いた封入複合体形成の模式図である。リガンド（L）は細胞表面受容体との相互作用に供する。改変された粒子は明確に識別され、インビトロのトランスフェクション並びにインビボの試験の為に使用される条件に対して安定である。

【図 3 2】図 3 2 は図 3 1 に示した成分の改変の例を示す。グルコースモディファイアーをガラクトースターゲティング試験のための対照として使用する。

【図 3 3】図 3 3 は 50 mM 塩溶液中のポリプレックス粒子の安定化を示す。完全な安定化は AD-PEG 5 K（PEG 5 K は分子量 5000 の PEG を意味する）を用いた場合に達成される。PEG 5 K の添加（対照）は如何なる安定化ももたらさない。粒径の増大は粒子の再構造化に起因するものではなく、むしろ 60 nm 原料粒子の凝集である（TEM 画像により確認）。

【図 3 4】図 3 4 はプラスミド DNA（pDNA）の添加前に CDP と AD-PEG 5000（AD-PEG 5 K）を組み合わせるにより形成される粒子の粒径を示す。粒子は PBS 中に希釈された 1 mg DNA/mL において製剤した。1000 倍超の希釈度による 150 mM 塩中の完全な安定化は AD-PEG 5 K を用いた場合に達成される。

【図 3 5】図 3 5 は記載した種々のポリプレックスを用いたルシフェラーゼ遺伝子の送達を示す。（a）表面アシアロ糖蛋白（ASGP）受容体を含む HEPG2 細胞。（b）表面受容体を含むしない HELA 細胞。細胞の取り込みは表面受容体を介して媒介される。

【図 3 6】図 3 6 は改変剤においてアニオン性のセグメントを使用することによる粒子上のチューニング可能な表面電荷の例を示す。100% AD-アニオン性 PEG は系におけるアダマンタン（AD）のシクロデキストリン（CD）に対する 1:1 モル比を示す。

【図 3 7】図 3 7 はポリプレックス粒子の自己組立の模式図である。

【図 3 8】図 3 8 は 1 時間後の種々のポリプレックス粒子の培地（A）又は 100% FBS（B）中の濁度試験を示す。未 PEG 化ポリプレックスが凝集するのに対し、PEG 化ポリプレックスは製剤時又は未結合成分除去後に凝集しない。

【図 3 9】図 3 9 は完全に製剤された粒子が補体系を活性化しないことを示す。CDP PEG Tf は 3.18 又は 5.3（+/-）の何れかの電荷比を有する完全に製剤された粒子を指す。

【図 4 0】図 4 0 は CDP が培養中の細胞に siRNA を送達することを示す。図 4 0 A は HELA 細胞におけるネイキッド及び CDP 製剤の FITC 標識 siRNA の FACS 分析を示す（100 nM の siRNA を 2 時間 HELA 細胞に曝露した）。図 4 0 B は HELA 細胞における FITC 標識 siRNA の CDP 送達の共焦点画像を示す（100 nM の siRNA を 4 時間 HELA 細胞に曝露した）。

【図 4 1】図 4 1 は高圧尾静脈注射（HPTV；2 mL 容量を注射）又は低圧尾静脈注射（LPTV；0.2 mL 容量を注射）による異なる送達製剤中の siRNA 50 μ g を注射した BALB/c マウスから得られた定量的 RT-PCR の結果を比較したものである。

【図 4 2】図 4 2 は siRNA の送達のためのトランスフェリン（Tf）-ターゲティング粒子の組立を示す。図 4 2 A は送達系の成分を示す。図 4 2 B は未ターゲティング及びターゲティングされた粒子の組立を示す。

【図 4 3】図 4 3 はトランスフェリン（Tf）-含有粒子によるルシフェラーゼに対抗した siRNA の送達を示す。

【図 4 4】図 4 4 は記載した種々の投与に付した NOD/scid マウスにおける移植された腫瘍の成長曲線を示す。各投与群 [n = 8 ~ 10] に関するメジアン積分腫瘍バイオ

ルミネセントシグナル（光子／秒）を注射後の時間に対してプロットしている（全て50 μ g siRNAにおいて）。群：（A）対照D5W、（B）ネイキッドsiEFBP2、（C）対照配列を用いて完全に製剤（CON#1）、（D）siEFBP2を用いて完全に製剤、及び（E）siEFBP2を用いてトランスフェリンリガンドは使用せずに製剤。

【図45】図45はsiRNAによるTf含有粒子（左側パネル）における腫瘍成長の阻害及びsiRNAによる標的mRNAの配列特異的阻害を示す。図45AはTf含有粒子におけるEWS-FLI1に関する50 μ g siRNAの3回毎日注射（第34日、35日、36日）を用いた樹立TC-71腫瘍を用いた腫瘍成長の阻害を示す。図45BはEWS-FLI1-mRNAの配列特異的阻害を示す2回毎日注射後の腫瘍から得られたPCRデータを示す。