(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2011 年 6 月 23 日(23.06.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/074652 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/072716

(22) 国際出願日: 2010 年 12 月 16 日(16.12.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-285215 2009 年 12 月 16 日(16.12.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和発酵キリン株式会社(**Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.**) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藪内　隼人 (**YABUUCHI, Hayato**) [JP/JP]; 〒4118731 静岡県駿東郡長泉町下土狩１１８８　協和発酵キリン株式会社　探索研究所内 Shizuoka (JP). 篠原　史一 (**SHINOHARA, Fumikazu**) [JP/JP]; 〒4118731 静岡県駿東郡長泉町下土狩１１８８　協和発酵キリン株式会社　探索研究所内 Shizuoka (JP). 吉田　哲郎 (**YOSHIDA, Tetsuo**) [JP/JP]; 〒1948533 東京都町田市旭町３丁目６番６号　協和発酵キリン株式会社　次世代創薬研究所内 Tokyo (JP). 曽我　史朗 (**SOGA, Shiro**) [JP/JP]; 〒4118731 静岡県駿東郡長泉町下土狩１１８８　協和発酵キリン株式会社　探索研究所内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 高島　一 (**TAKASHIMA, Hajime**); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号　明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2011/074652 A1

(54) **Title**: NUCLEIC ACID CAPABLE OF INHIBITING EXPRESSION OF HIF-2A

(54) 発明の名称 : HIF-2α の発現を抑制する核酸

(57) **Abstract**: A nucleic acid having an inhibitory activity on the expression of HIF-2α; a pharmaceutical composition containing the nucleic acid; and an anti-angiogenic agent, particularly a prophylactic or therapeutic agent for cancer, diabetic retina, rheumatism or the like, comprising the nucleic acid.

(57) 要約: 本発明は、HIF-2α の発現抑制活性を有する核酸、該核酸を含む医薬組成物ならびに該核酸を含む血管新生抑制剤、特に癌、糖尿病性網膜症、リウマチなどの予防または治療薬を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： HIF-2αの発現を抑制する核酸

技術分野

[0001] 本発明は、血管新生因子として働くHIF-2αの発現抑制に用いるための核酸またはその誘導体、該核酸またはその誘導体を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 既存の血管から新しい血管が形成されることを血管新生という。血管新生は、通常創傷治癒や炎症の修復の際に起こる生体内現象であるが、固形癌、糖尿病性網膜症、リウマチ、アテローム性動脈硬化症、乾せんなど多くの疾患の成立・悪性化に関与することが知られている（非特許文献１参照）。特に、癌の発生・腫瘍増殖には血管新生が大きな役割を果たしている。

[0003] HIF(低酸素誘導性因子(hypoxia-inducible factor))は低酸素環境において機能する転写因子であり、血管新生や糖代謝、細胞増殖を促進する。通常低酸素環境においてのみ機能するが、多くの腫瘍で恒常的に発現しており、腫瘍増殖の原因の一つと考えられている（非特許文献２参照）。HIFはヘテロ二量体の転写因子であり、恒常的に発現しているHIF-1βサブユニットと、制御因子HIF-αサブユニットからなる。HIF-αサブユニットにはHIF-1α、 HIF-2α、HIF-3αの３種類が知られており、それぞれが重複的、あるいは組織特異的に機能している。

[0004] 腫瘍抑制因子遺伝子VHL(von Hippel-Lindau tumor suppressor)はHIF-αサブユニットの分解を担っており、これによりHIFの恒常発現が抑えられる。VHLはほとんどの散発性明細胞腎臓癌およびVHL疾患で突然変異しており、このことが腫瘍におけるHIFの恒常発現に寄与している。腫瘍において恒常的に発現しているHIFを抑制することは腫瘍の血管新生を制御するので、HIFの抑制は作用機序に基づいた抗血管新生方法として有効である（非特許文献３参照）。

[0005] これまで、HIF-αサブユニットの中でもHIF-1αが抗腫瘍作用の標的となる

ことが知られている（非特許文献４参照）。一方HIF-2αも多数の癌種において恒常的に発現しており、また特定の癌種においてHIF-１αより特異的に腫瘍進行に関わること（非特許文献５～６参照）、またVHLが変異した腫瘍においてはHIF-2αの阻害が十分に有効であることが知られている（非特許文献７～９参照）。

[0006] 癌などの疾患の原因となる蛋白質をコードする核酸に結合することにより、その発現を阻害するように構成した抑制性オリゴヌクレオチド化合物は、それらの疾患の治療に有用である可能性がある。そのような例として例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどが考えられる。

標的遺伝子の発現を抑制する方法として、ＲＮＡ干渉（RNA interference、以下、ＲＮＡｉともいう）を利用した方法等が知られている。例えば、２１～２３塩基の長さの二本鎖ＲＮＡを細胞に導入することにより、標的遺伝子の発現が抑制されることが知られている。このようなＲＮＡは、small interfering RNA(siRNA)と名づけられている。

[0007] hif-2αのｍＲＮＡに対するアンチセンスヌクレオチド、ｓｉＲＮＡは、知られているが（特許文献１、２、非特許文献５、８、１０～１２参照）、いずれも本発明の二本鎖RNAとは異なる配列を有しているか、または具体的な配列が示されていない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第０４／０４８５２６号

特許文献2：国際公開第００／０９６５７号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Journal of Molecular Medicine, 73(7), 333-46 (1995)

非特許文献2：Nature, 441(25), 437-443 (2006)

非特許文献3：Nature Reviews Cancer, 3, 721-732 (2003)

非特許文献4：Nature Reviews Drug Discovery, 2, 4-9 (2003)

非特許文献5：Cancer Research, 63, 6130-6134 (2003)

非特許文献6：Cell Cycle, 6(8), 919-926 (2007)

非特許文献7：Molecular Cancer Research, 2, 89-95 (2004)

非特許文献8：PLoS Biology, 1(3), 439-444 (2003)

非特許文献9：Oncogene, 27(40), 5354-5358 (2008)

非特許文献10：Journal of Cellular Biochemistry, 92, 491-501 (2004)

非特許文献11：Cancer Biology & Therapy, 5(10), 1320-1326 (2006)

非特許文献12：Cancer Research, 66, 6264-6270 (2006)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、血管新生因子として働くHIF-2αの発現を抑制することが可能な核酸を提供することを目的とする。また本発明は、その治癒において血管新生抑制が有効となる癌、糖尿病性網膜症、リウマチなどの疾患を治療または予防するための医薬組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明は、以下の（１）～（２７）に関する。

（１）配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸または該核酸の少なくとも一方の末端が１～４塩基削除された核酸と、
該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とを含有し、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸；または
配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸または該核酸の少なくとも一方の末端が１～４塩基削除された核酸と、
該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸の少なくとも一方の核酸において、１～３塩基が置換、欠失もしくは付加された核酸とを含有し、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸。

（２）２７塩基対以下の二重鎖形成部を有する、（１）に記載の核酸。

（３）１５～１９塩基対からなる二重鎖形成部を有する、（２）に記載の核酸。

（４）HIF-2αの発現抑制活性を有する核酸が二本鎖核酸である、（１）～（

３）のいずれか１項に記載の核酸。

（５）（４）に記載の二本鎖核酸の少なくとも一方の鎖の３’末端または５’末端に１～４塩基付加した核酸。

（６）配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸。

（７）（６）に記載の核酸において、１～３塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸。

（８）（６）または（７）に記載の核酸を含む、３０塩基以下の核酸。

（９）（１）～（８）のいずれか１項に記載の核酸を構成するヌクレオチドの一部または全部がリボヌクレオチドであり、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸。

（１０）（１）～（９）のいずれか１項に記載の核酸を構成するヌクレオチドの一部または全部が、デオキシリボヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドであり、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸。

（１１）修飾ヌクレオチドの少なくとも１つが、リボヌクレオチドの２’－修飾ヌクレオチドである、（１０）に記載の核酸。

（１２）３’末端または５’末端に付加した１～４塩基の少なくとも１塩基がデオキシリボヌクレオチドである、（１０）に記載の核酸。

（１３）（１）～（１２）のいずれか１項に記載の核酸をコードするベクター。

（１４）（１）～（１３）のいずれか１項に記載の核酸またはベクターを有効成分とする、医薬組成物。

（１５）核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体をさらに含む、（１４）に記載の医薬組成物。

（１６）核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体がカチオン性担体である、（１５）に記載の医薬組成物。

（１７）核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体がリポソームである、（１６）に記載の医薬組成物。

（１８）リポソームがHIF-2αをコードする遺伝子の発現部位を含む組織または臓器に到達するリポソームである、（１７）に記載の医薬組成物。

（１９）核酸またはベクターとリード粒子とを構成成分とする複合粒子および該複合粒子を被覆する脂質膜から構成され、該脂質膜の構成成分が可溶な極性有機溶媒を含む液の中に、該脂質膜の構成成分が分散可能で、該複合粒子も分散可能な濃度で該極性有機溶媒を含む液が存在するリポソームである、（１４）に記載の医薬組成物。

（２０）HIF-2αの発現を抑制することを特徴とする、（１４）～（１９）のいずれか１項に記載の医薬組成物。

（２１）血管新生抑制剤である、（２０）に記載の医薬組成物。

（２２）癌、糖尿病性網膜症またはリウマチの治療剤または予防剤である、（１４）～（２１）のいずれか１項に記載の医薬組成物。

（２３）（１）～（２２）のいずれか１項に記載の核酸、ベクターまたは医薬組成物を対象に投与することを特徴とする、HIF-2αの発現を抑制する方法。

（２４）（１）～（２２）のいずれか１項に記載の核酸、ベクターまたは医薬組成物を対象に投与することを特徴とする、血管新生を抑制する方法。

（２５）（１）～（２２）のいずれか１項に記載の核酸、ベクターまたは医薬組成物を対象に投与することを特徴とする、癌、糖尿病性網膜症もしくはリウマチを治療または予防する方法。

（２６）医薬組成物の製造のための、（１）～（１３）のいずれか１項に記載の核酸またはベクターの使用。

（２７）癌、糖尿病性網膜症もしくはリウマチの治療または予防における使用のための、（１）～（１３）のいずれか１項に記載の核酸またはベクター。

発明の効果

[0012] 本発明のHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸、該核酸をコードするベクター、該核酸または該ベクターを含む医薬組成物を提供することによって、血

管新生を抑制することが可能となる。特に、血管新生が関与する疾患である、癌、糖尿病性網膜症、リウマチなどの疾患の治療・予防に有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１は、本発明の二本鎖核酸（配列番号Ｎ、Ｎ＋２１：Ｎは４３～６１の整数）であるHIF-2 siRNA #1～#19を終濃度200pMでA-498細胞にトランスフェクションして４８時間培養した後の、hif-2αのｍＲＮＡの発現をＲＴ－ＰＣＲにより定量、評価した結果を示す。hif-2αのｍＲＮＡ量は、対応するサンプルのgapdh（D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）のｍＲＮＡ量を内部対照として用いて、準定量値を算出した。

[図2]図２は、本発明の二本鎖核酸（配列番号Ｎ、Ｎ＋２１：Ｎは４３～６１の整数）であるHIF-2 siRNA #1～#19を終濃度200pMでA-498細胞にトランスフェクションして４８時間培養した後の、vegfaのｍＲＮＡの発現をＲＴ－ＰＣＲにより定量、評価した結果を示す。vegfaのｍＲＮＡ量は、対応するサンプルのgapdhのｍＲＮＡ量を内部対照として用いて、準定量値を算出した。

[図3]図３は、本発明の二本鎖核酸（配列番号Ｎ、Ｎ＋２１：Ｎは４３～６１の整数）であるHIF-2 siRNA #1～#19の細胞増殖に対する抑制効果を、細胞数の計測により評価した結果を示す。A-498細胞に二本鎖核酸を、1、0.3、0.1、0.03、0.01、0.003、0.001ｎＭで、それぞれトランスフェクションした後、７日間培養した後の生細胞数を測定した。二本鎖核酸をトランスフェクションしていないA-498細胞の生細胞数を１００％としたときの、それぞれの二本鎖核酸をトランスフェクションした場合の生細胞数の割合を縦軸に示す。

[図4]図４は、本発明の二本鎖核酸（配列番号Ｎ、Ｎ＋２１：Ｎは４３～６１の整数）であるHIF-2 siRNA #1～#19の細胞増殖に対する抑制効果を、細胞数の計測により評価した結果を示す。A-498細胞に二本鎖核酸を、1、0.3、0.1、0.03、0.01、0.003、0.001ｎＭで、それぞれトランスフェクションした後、７日間培養した後の生細胞数を測定した。二本鎖核酸をトランスフェクションしていないA-498細胞の生細胞数を１００％としたときの、それぞれの二本鎖核酸をトランスフェクションした場合の生細胞数の割合を縦軸に示す。

[図5]図５は、本発明の修飾二本鎖核酸（配列番号Ｎ’、Ｎ’＋６：Ｎ’は８５～９０の整数）であるHIF-2 siRNA #1, #4, #6, #9, #11, #15のリボースの一部の２’－ＯＨ基を２’－メトキシ基で置換したものを、終濃度200pMでA-498細胞にトランスフェクションして４８時間培養した後の、hif-2αのｍＲＮＡの発現をＲＴ－ＰＣＲにより定量、評価した結果を示す。また、グラフの右側には対応する無修飾の二本鎖核酸（配列番号Ｎ”、Ｎ”＋２１：Ｎ”は４３、４６、４８、５１、５３または５７）の結果を示す。hif-2αのｍＲＮＡ量は、対応するサンプルのgapdhのｍＲＮＡ量を内部対照として用いて、準定量値を算出した。

[図6]図６は、本発明の修飾二本鎖核酸（配列番号Ｎ’、Ｎ’＋６：Ｎ’は８５～９０の整数）であるHIF-2 siRNA #1, #4, #6, #9, #11, #15のリボースの一部の２’－ＯＨ基を２’－メトキシ基で置換したものを、終濃度200pMでA-498細胞にトランスフェクションして４８時間培養した後の、vegfaのｍＲＮＡの発現をＲＴ－ＰＣＲにより定量、評価した結果を示す。また、グラフの右側には対応する無修飾の二本鎖核酸（配列番号Ｎ”、Ｎ”＋２１：Ｎ”は４３、４６、４８、５１、５３または５７）の結果を示す。vegfaのｍＲＮＡ量は、対応するサンプルのgapdhのｍＲＮＡ量を内部対照として用いて、準定量値を算出した。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の核酸が標的とするHIF-2αをコードする遺伝子（以下、hif-2α遺伝子ともいう）は、Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．NM_001430.3として登録されている、hif-2αの完全長ｍＲＮＡに対応するＤＮＡ塩基配列（配列番号９７）を含む遺伝子があげられる。本発明においては、配列番号９７で表される塩基配列からなるヌクレオチドを標的遺伝子とも称する。

１．本発明の核酸

本発明において、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸に対して相補的な塩基配列を含む核酸をアンチセンス鎖核酸と称し、アンチセンス鎖核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸をセンス鎖核酸とも称す

る。センス鎖核酸は、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸そのものであってもよい。

[0015] 本発明の核酸としては、配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸または該核酸の少なくとも一方の末端が１～４塩基削除された核酸と該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とを含有し、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸、または配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸または該核酸の少なくとも一方の末端が１～４塩基削除された核酸と該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸との少なくとも一方の核酸において、１～３塩基が置換、欠失もしくは付加された核酸を含有し、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸があげられる。

[0016] 本発明の核酸としては、ヌクレオチドまたは該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子であればいかなる分子であってもよく、例えばリボヌクレオチドの重合体であるＲＮＡ、デオキシリボヌクレオチドの重合体であるＤＮＡ、ＲＮＡとＤＮＡとからなるキメラ核酸、およびこれらの核酸の少なくとも一つのヌクレオチドが該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子で置換されたヌクレオチド重合体があげられる。ｓｉＲＮＡ、ｓｈ（short hairpin）ＲＮＡ、およびこれらの核酸内にヌクレオチドと同等の機能を有する分子を少なくとも一つ含む誘導体も、本発明の核酸に含まれる。またＲＮＡ中のウリジンＵは、ＤＮＡにおいてはチミンＴに一義的に読み替えることができる。

[0017] ヌクレオチドと同等の機能を有する分子としては、例えばヌクレオチド誘導体等があげられる。

ヌクレオチド誘導体としては、ヌクレオチドに修飾を施した分子であればいかなる分子あってもよいが、例えばＲＮＡまたはＤＮＡと比較して、ヌクレアーゼ耐性の向上もしくは安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーをあげるため、細胞透過性をあげるため、または可視化させるために、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドに修飾を施した分子等が

好適に用いられる。

[0018] ヌクレオチド誘導体としては、例えば糖部修飾ヌクレオチド、リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド、塩基修飾ヌクレオチド、ならびに糖部、リン酸ジエステル結合および塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド等があげられる。

糖部修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよいが、２’－修飾ヌクレオチドが好ましく用いられる。

[0019] ２’－修飾ヌクレオチドとしては、例えばリボースの２’－ＯＨ基がＨ、ＯＲ、Ｒ、Ｒ’ＯＲ、ＳＨ、ＳＲ、NH_2、ＮＨＲ、NR_2、N_3、ＣＮ、Ｆ、Ｃｌ、ＢｒおよびＩからなる群（Ｒはアルキルまたはアリール、好ましくは炭素数１～６のアルキルであり、Ｒ’はアルキレン、好ましくは炭素数１～６のアルキレンである）から選択される置換基で置換された２’－修飾ヌクレオチド、好ましくは２’－ＯＨ基がＦまたはメトキシ基があげられる。また、2-(methoxy)ethoxy基、3-aminopropoxy基、2-[(N,N-dimethylamino)oxy]ethoxy基、3-(N,N-dimethylamino)propoxy基、2-[2-(N,N-Dimethylamino)ethoxy]ethoxy基、2-(methylamino)-2-oxoethoxy基2- (N-methylcarbamoyl) etoxy 基および2-cyanoetoxy 基からなる群から選択される置換基で置換された２’－修飾ヌクレオチド等もあげられる。

[0020] 糖部修飾ヌクレオチドとしては、糖部に架橋構造を導入することにより２つの環状構造を有する架橋構造型人工核酸 (Bridged Nucleic Acid) (BNA)があげられ、具体的には、2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックト人工核酸 (Locked Nucleic Acid) (LNA)、エチレン架橋構造型人工核酸 (Ethylene bridged nucleic acid) (ENA) [Nucleic Acid Research, 32, e175(2004)] 等があげられ、さらにペプチド核酸 (PNA) [Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)]、オキシペプチド核酸 (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)]、ペプチドリボ核酸 (PRNA) [J. Am. Chem. So

c., 122, 6900 (2000)]等もあげられる。

[0021] リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロジチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がアルキルホスホネート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロアミデート結合に置換されたヌクレオチド等があげられる。

[0022] 塩基修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの塩基の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、塩基内の酸素原子が硫黄原子で置換されたもの、水素原子が炭素数１～６のアルキル基で置換されたもの、メチル基が水素もしくは炭素数２～６のアルキル基で置換されたもの、アミノ基が炭素数１～６のアルキル基、炭素数１～６のアルカノイル基等の保護基で保護されたものがあげられる。

[0023] ヌクレオチド誘導体としては、ヌクレオチドまたは糖部、リン酸ジエステル結合もしくは塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド誘導体に、ペプチド、蛋白質、糖、脂質、リン脂質、フェナジン、フォレート、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、色素など、別の化学物質を、直接またはリンカーを介して付加したものもあげられ、具体的には、５’－ポリアミン付加ヌクレオチド誘導体、コレステロール付加ヌクレオチド誘導体、ステロイド付加ヌクレオチド誘導体、胆汁酸付加ヌクレオチド誘導体、ビタミン付加ヌクレオチド誘導体、Cy5付加ヌクレオチド誘導体、Cy3付加ヌクレオチド誘導体、6－FAM付加ヌクレオチド誘導体、およびビオチン付加ヌクレオチド誘導体等があげられる。

[0024] ヌクレオチド誘導体は、核酸内の他のヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体とアルキレン構造、ペプチド構造、ヌクレオチド構造、エーテル構造、

エステル構造、およびこれらの少なくとも一つを組み合わせた構造等の架橋構造を形成してもよい。

本発明の核酸は、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸または該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸と同等な機能を有する核酸であれば、いずれのヌクレオチドまたはその誘導体から構成されていてもよい。すなわち、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸または該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸は、その塩基配列を構成するヌクレオチドが、該ヌクレオチドと同等の機能を有するリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはその誘導体に置換されたものであってもよい。

[0025] 本発明の核酸は、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸と該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とが二重鎖を形成することができればいずれの長さでもよいが、二重鎖を形成できる配列の長さは、通常１５～２７塩基であり、１５～２５塩基が好ましく、１５～２３塩基がより好ましく、１５～２１塩基がさらに好ましく、１５～１９塩基が特に好ましい。

[0026] 本発明の核酸としては、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸が用いられるが、該核酸のうち１～３塩基、好ましくは１～２塩基、より好ましくは１塩基が欠失、置換または付加したものを用いてもよい。

HIF-2αの発現を抑制する核酸としては、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とを含み、かつHIF-2αの発現を抑制する核酸であれば、一本鎖核酸、二本鎖核酸等、いずれの核酸も用いられるが、二本鎖核酸が好適に用いられる。

[0027] 本発明において二本鎖核酸とは、二本の鎖が対合し二重鎖形成部を有する核酸をいう。二重鎖形成部とは、二本鎖核酸を構成するヌクレオチドまたはその誘導体が塩基対を構成して二重鎖を形成している部分をいう。二重鎖形成部は、通常１５～２７塩基対であり、１５～２５塩基対が好ましく、１５～２３塩基対がより好ましく、１５～２１塩基対がさらに好ましく、１５～

１９塩基対が特に好ましい。

[0028] 二本鎖核酸を構成する一本鎖の核酸は、通常１５～３０塩基からなるが、１５～２９塩基からなることが好ましく、１５～２７塩基からなることがより好ましく、１５～２５塩基からなることがさらに好ましく、１７～２３塩基からなることが特に好ましく、１９～21塩基からなることが最も好ましい。

本発明の二本鎖核酸において、二重鎖形成部に続く３’側または５’側に二重鎖を形成しない追加のヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を有する場合には、これを突出部（オーバーハング）と呼ぶ。突出部を有する場合には、突出部を構成するヌクレオチドはリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはこれらの誘導体であってもよい。

[0029] 突出部を有する二本鎖核酸としては、少なくとも一方の鎖の３’末端または５’末端に１～４塩基、通常は１～３塩基からなる突出部を有するものが用いられるが、２塩基からなる突出部を有するものが好ましく用いられ、ｄＴｄＴまたはＵＵからなる突出部を有するものがより好ましく用いられる。突出部は、アンチセンス鎖のみ、センス鎖のみ、およびアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に有することができるが、アンチセンス鎖とセンス鎖の両方に突出部を有する二本鎖核酸が好ましく用いられる。また、二重鎖形成部に続いて標的配列と一部または全てが一致する配列、または、二重鎖形成部に続いて標的配列の相補鎖の塩基配列と一致する配列を用いることもできる。さらに、本発明の二本鎖核酸としては、例えばＤｉｃｅｒ等のリボヌクレアーゼの作用により上記の二本鎖核酸を生成する核酸分子（WO2005/089287）や、３’末端や５’末端の突出部を有していない二本鎖核酸などを用いることもできる。

[0030] 本発明の二本鎖核酸としては、標的遺伝子の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列と同一の配列からなる核酸を用いてもよいが、該核酸の少なくとも一方の鎖の５’末端または３’末端が１～４塩基削除された核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とからなる二本鎖核酸を

用いてもよい。

[0031] また、本発明の核酸としては、一本鎖の核酸を用いることもできる。そのような核酸の例として、配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸や、これらの核酸において１～３塩基、好ましくは１～２塩基、より好ましくは１塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸もあげることができる。またこれらの核酸を含む、３０塩基以下、好ましくは２９塩基以下、より好ましくは２７塩基以下、さらに好ましくは２５塩基以下、特に好ましくは２３塩基以下の核酸をあげることができる。

[0032] 本発明の核酸としては、上記した二本鎖核酸のセンス鎖およびアンチセンス鎖を、スペーサー配列を介して連結して一本鎖核酸としたものであってもよい。該一本鎖核酸としては、ステムループ構造によって二重鎖形成部を有するｓｈＲＮＡ等の一本鎖核酸であることが好ましい。ステムループ構造を有する一本鎖核酸は、通常５０～７０塩基長である。

本発明の核酸としては、リボヌクレアーゼ等の作用により上記の一本鎖核酸または二本鎖核酸を生成するように設計した、７０塩基長以下、好ましくは５０塩基長以下、さらに好ましくは３０塩基長以下の核酸であってもよい。

[0033] 本発明の核酸を製造する方法としては、特に限定されず、公知の化学合成を用いる方法、あるいは、酵素的転写法等があげられる。公知の化学合成を用いる方法として、ホスホロアミダイト法、ホスホロチオエート法、ホスホトリエステル法、CEM法 [Nucleic Acid Research, 35, 3287 (2007)] 等をあげることができ、例えば、ABI3900ハイスループット核酸合成機（アプライドバイオシステムズ社製）により合成することができる。合成が終了した後は、固相からの脱離、保護基の脱保護および目的物の精製等を行う。精製により、純度９０%以上、好ましくは９５%以上の核酸を得るのが望ましい。二本鎖核酸の場合には、合成および精製したセンス鎖、アンチセンス鎖を適当な比率、例えば、アンチセンス鎖１当量に対して、センス鎖０．１～１０当

量、好ましくは０．５～２当量、より好ましくは０．９～１．１当量、さらに好ましくは等モル量で混合した後、アニーリングを行って用いてもよいし、または、混合したものをアニーリングする工程を省いて直接用いてもよい。アニーリングは、二本鎖核酸を形成できる条件であればいかなる条件で行ってもよいが、通常、センス鎖、アンチセンス鎖をほぼ等モル量で混合した後、９４℃程度で５分程度加熱したのち、室温まで徐冷することにより行われる。本発明の核酸を製造する酵素的転写法としては、目的の塩基配列を有したプラスミドまたはＤＮＡを鋳型としてファージＲＮＡポリメラーゼ、例えば、T7、T3、またはSP6RNAポリメラーゼを用いた転写による方法があげられる。

[0034] 本発明の核酸は、トランスフェクション用の担体、好ましくはカチオン性リポソーム等のカチオン性担体を用いて細胞内に導入することができる。また、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法またはマイクロインジェクション法などにより、直接細胞内に導入することもできる。

本発明の核酸の代わりに、細胞内に導入してこれらが発現されるようなベクターを用いてもよい。具体的には、本発明の核酸をコードする配列を発現ベクター内のプロモーター下流に挿入して発現ベクターを構築し、細胞に導入することにより該核酸等を発現させることができる。

[0035] 発現ベクターとしては、pCDNA6.2-GW/miR（Invitrogen社製）、pSilencer 4.1-CMV（Ambion社製）、pSINsi-hH1 DNA（タカラバイオ社製）、pSINsi-hU6 DNA（タカラバイオ社製）、pENTR/U6（Invitrogen社製）等をあげることができる。

また、本発明の核酸をコードする配列をウイルスベクター内のプロモーター下流に挿入し、該ベクターをパッケージング細胞に導入して生産した組換えウイルスベクターを用いることもできる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどがあげられる。

２．HIF-2αの発現抑制活性を有する核酸

HIF-2αの発現抑制活性を有する二本鎖核酸の第１の選択基準としては、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とからなる二本鎖核酸であることである。該一部の塩基配列からなる核酸は、(a)ＧまたはＣが４塩基以上続く配列がない、(b)ＧＣ含量が２０～８０%であることを第２の選択基準として選択することが好ましい。

[0036] hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸は、Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．NM_001430.3として登録されているhif-2αの完全長ｍＲＮＡのｃＤＮＡ塩基配列（配列番号９７）に基づいて設計することができる。

hif-2α遺伝子の一部の塩基配列のうち、HIF-2αの発現抑制活性を有する核酸を設計するために用いられる塩基配列としては、例えば配列番号１～１９のいずれか１つで表される塩基配列が好ましく、配列番号１、６および１５のいずれか１つで表される塩基配列がさらに好ましく、配列番号１で表される塩基配列が特に好ましい。

[0037] このようにして選択される核酸としては、例えばhif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とを含有し、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸とからなる二本鎖核酸があげられる。該二本鎖核酸を構成する一本鎖の核酸は、通常１５～３０塩基からなるが、１５～２９からなることが好ましく、１５～２７からなることがより好ましく、１５～２５からなることがさらに好ましく、１７～２３からなることが特に好ましく、１９～21からなることが最も好ましい。該二本鎖核酸は通常１５～２７塩基対、好ましくは１５～２５塩基対、より好ましくは１５～２３塩基対、さらに好ましくは１５～２１塩基対、特に好ましくは１５～１９塩基対からなる二重鎖形成部を有している。

[0038] 該二本鎖核酸の具体例として、下記（ａ）～（ｆ）があげられる。

（ａ）hif-2のｍＲＮＡの相補配列に該当する、配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列を含むアンチセンス鎖核酸と、該核酸の塩基配列

に対して相補的なセンス鎖塩基配列を含む核酸とからなる二本鎖核酸。

（ｂ）配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなるアンチセンス鎖核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなるセンス鎖核酸とからなる二本鎖核酸。

（ｃ）配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸の５’末端または３’末端のうち、少なくとも一方の末端が１～４塩基削除されたアンチセンス鎖核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなるセンス鎖核酸とからなる二本鎖核酸。

（ｄ）配列番号１～１９のいずれか１つで表される塩基配列からなるセンス鎖核酸と、配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなるアンチセンス鎖核酸（ここで、センス鎖の配列番号ｎ（ｎは１～１９である）に対してアンチセンス鎖の配列番号はｎ＋２１である）とからなる二本鎖核酸の少なくとも一方の鎖において、１～３塩基、好ましくは１～２塩基、より好ましくは１塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する二本鎖核酸。

（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれか１つに記載の二本鎖核酸において、二重鎖形成部が２７塩基対以下、好ましくは２５塩基対以下、より好ましくは２３塩基対以下、さらに好ましくは２１塩基対以下、特に好ましくは１９塩基対以下である二本鎖核酸。

（ｆ）（ａ）～（ｅ）のいずれか１つに記載の二本鎖核酸において、アンチセンス鎖核酸またはセンス鎖核酸の少なくとも一方の核酸の３’末端または５’末端に、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を１～４塩基、好ましくは１～３塩基、より好ましくは１～２塩基、さらに好ましくは２塩基付加した二本鎖核酸。

[0039] 上記（ｆ）の二本鎖核酸の具体的な例として、配列番号Ｎで表される塩基配列からなる核酸と、その相補鎖として配列番号Ｎ＋２１で表される塩基配列からなる核酸とからなる二本鎖核酸があげられる。ここで、Ｎは４３～６１のいずれか１つの整数を示す。

[0040] HIF-2αの発現抑制活性を有する一本鎖核酸としては、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸のアンチセンス鎖核酸を用いることもできる。そのような核酸の例として、配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸や、これらの核酸において、１～３塩基、好ましくは１～２塩基、より好ましくは１塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸もあげることができる。またこれらの核酸を含む、３０塩基以下、好ましくは２９塩基以下、より好ましくは２７塩基以下、さらに好ましくは２５塩基以下、特に好ましくは２３塩基以下の核酸をあげることができる。

[0041] HIF-2αの発現抑制活性を有する一本核酸としては、hif-2α遺伝子の一部の塩基配列からなる核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる、下記（Ａ）～（Ｇ）の一本鎖核酸もあげられる。

（Ａ）hif-2αのｍＲＮＡの相補配列に該当する、配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列を含むアンチセンス鎖核酸と、該塩基配列に対して相補的なセンス鎖核酸とをスペーサー配列を介して連結してなる一本鎖核酸。

（Ｂ）配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなるアンチセンス鎖核酸と、該塩基配列に対して相補的な塩基配列からなるセンス鎖核酸とをスペーサー配列を介して連結してなる一本鎖核酸。

（Ｃ）配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸の５’末端または３’末端のうち、少なくとも一方の末端が１～４塩基削除されたアンチセンス鎖核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなるセンス鎖核酸とをスペーサー配列を介して連結してなる一本鎖核酸。

（Ｄ）配列番号１～１９のいずれか１つで表される塩基配列からなるセンス鎖核酸と、配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなるアンチセンス鎖核酸とをスペーサー配列を介して連結してなる一本鎖核酸に含まれる、センス鎖またはアンチセンス鎖の少なくとも一方の鎖において、

１～３塩基、好ましくは１～２塩基、より好ましくは１塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する二本鎖核酸。

（Ｅ）（Ａ）～（Ｄ）のいずれか１つに記載の一本鎖核酸に含まれるセンス鎖とアンチセンス鎖とが２７塩基対以下、好ましくは２５塩基対以下、より好ましくは２３塩基対以下、さらに好ましくは２１塩基対以下、特に好ましくは１９塩基対以下の二重鎖を形成する一本鎖核酸。

（Ｆ）ステムループ構造によって二重鎖形成部を形成する（Ａ）～（Ｅ）のいずれか１つに記載の一本鎖核酸。

（Ｇ）５０～７０塩基長からなる（Ａ）～（Ｆ）のいずれか１つに記載の一本鎖核酸。

[0042] これらの一本鎖核酸または二本鎖核酸を細胞に導入することにより、HIF-2αの発現を抑制することができる。アンチセンスＤＮＡを用いたhif-2αのｍＲＮＡの発現抑制においては、一般的にアンチセンスＤＮＡを数十ｎＭから数百ｎＭの濃度で必要とするのと比較して、例えば本発明の二本鎖核酸は、数百ｐＭ～数ｎＭの濃度でも、細胞に導入した後、２４時間以上、例えば４８時間培養した段階でもhif-2αのｍＲＮＡの発現を抑制することができる。

[0043] また、本発明の一本鎖核酸または二本鎖核酸のhif-2αのｍＲＮＡの発現抑制活性の評価は、該核酸等を培養系癌細胞などにカチオン性リポソームなどを用いてトランスフェクションし、一定時間培養した後、当該癌細胞におけるhif-2αのｍＲＮＡの発現量をＲＴ－ＰＣＲで定量することにより行うことができる。またその効果として血管新生因子の発現を抑制する効果については、本発明の一本鎖核酸または二本鎖核酸を導入した細胞が産生する血管新生因子VEGFの蛋白質量を定量することで、評価することができる。さらに細胞増殖を抑制する効果については、本発明の一本鎖核酸または二本鎖核酸を導入した細胞の生細胞数を算出することにより、評価することができる。

３．本発明の医薬組成物

本発明は、一本鎖核酸、二本鎖核酸等の核酸またはベクターを有効成分として含有する医薬組成物に関する。当該医薬組成物は、核酸を細胞内に移行

させるのに有効な担体をさらに含むことができる。本発明の医薬組成物は、血管新生抑制剤として用いることができ、血管新生抑制が有効な癌、糖尿病性網膜症、リウマチなどの疾患、HIF-2αの過剰発現が原因となっている疾患、VHLが変異していることが原因となっている疾患の治療剤または予防剤としても用いることができる。癌としては、例えば腎癌、肝臓癌、皮膚癌、乳癌、肺癌、消化器癌、頭頸部癌、前立腺癌、子宮癌、膀胱癌などの固形癌をあげることができる。

[0044] 核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体としては、例えばカチオン性担体があげられる。カチオン性担体としては、カチオン性リポソームおよびカチオン性ポリマーなどがあげられる。また、核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体として、ウイルスエンベロープを利用した担体を用いてもよい。カチオン性リポソームとしては、２－Ｏ－（２－ジエチルアミノエチル）カルバモイル－１，３－Ｏ－ジオレオイルグリセロールを含有するリポソーム（以下リポソームＡともいう）、オリゴフェクトアミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、リポフェクチン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、リポフェクトアミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、リポフェクトアミン２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、ＤＭＲＩＥ－Ｃ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、ＧｅｎｅＳｉｌｅｎｃｅｒ（Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、ＴｒａｎｓＭｅｓｓｅｎｇｅｒ（ＱＩＡＧＥＮ社）、ＴｒａｎｓＩＴ ＴＫＯ（Ｍｉｒｕｓ社）、などが好ましく用いられる。カチオン性ポリマーとしては、ＪｅｔＳＩ（Ｑｂｉｏｇｅｎｅ社）、Ｊｅｔ－ＰＥＩ（ポリエチレンイミン；Ｑｂｉｏｇｅｎｅ社）などが好ましく用いられる。ウイルスエンベロープを利用した担体としては、ＧｅｎｏｍｅＯｎｅ（ＨＶＪ－Ｅリポソーム；石原産業社）などが好ましく用いられる。

[0045] 本発明の医薬組成物に含まれる一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターに上記担体を含む組成物は、当業者に既知の方法により調製することができる。例えば、適当な濃度の担体分散液と一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクター溶液とを混合して調製することができる。カチオン性担体を用いる場合、

一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターは水溶液中で負電荷を帯びているため、常法により水溶液中で混合することによって容易に調製することができる。該組成物を調製するために用いる水性溶媒としては、注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水などの電解質液、ブドウ糖液、マルトース液などの糖液などがあげられる。また、該組成物を調製する際のｐＨおよび温度などの条件は当業者が適宜選択できる。例えば、リポソームＡの場合、１０％マルトース水溶液中の１６ｍｇ／ｍｌのリポソーム分散液に、１０％マルトース水溶液中のオリゴ二本鎖ＲＮＡ溶液を、ｐＨ７．４、２５℃で撹拌しながら徐々に添加して調製することができる。

[0046] 該組成物は、必要ならば超音波分散装置や高圧乳化装置などを用いて分散処理を行うことにより、均一な組成物とすることもできる。当業者であれば、担体と一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターとを含む組成物の調製に最適な方法および条件は、用いる担体に依存するので、上記の方法にとらわれることなく、用いる担体に最適な方法を選択できる。

本発明の医薬組成物としては、一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターとリード粒子とを構成成分とする複合粒子および該複合粒子を被覆する脂質膜から構成され、該脂質膜の構成成分が可溶な極性有機溶媒を含む液の中に、該脂質膜の構成成分が分散可能で、該複合粒子も分散可能な濃度で該極性有機溶媒を含む液が存在するリポソームも好適に用いられる。リード粒子としては、例えば、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等を構成成分とする微粒子のことであり、好ましくはリポソームを構成成分とする微粒子があげられる。本発明におけるリード粒子は、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等を2つ以上組み合わせた複合体を構成成分としていてもよく、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等と他の化合物(例えば糖、脂質、無機化合物等)とを組み合わせた複合体を構成成分としていてもよい。

[0047] 該複合粒子を被覆する脂質膜としては、例えば中性脂質およびポリエチレ

ングリコールーホスファチジルエタノールアミン等を構成成分とするものがあげられる。

該リポソームは、例えばWO2006/080118等に記載の方法に従って調製することができる。

本発明の医薬組成物に含まれる一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターと担体との配合比は、一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターの１重量部に対して担体１～２００重量部が適当である。好ましくは、一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターの１重量部に対して担体２．５～１００重量部、さらに好ましくは担体１０～２０重量部である。

[0048] 本発明の医薬組成物には、上記担体の他に、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤などを含んでいてもよい。医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤などは、本質的に化学的に不活性および無害な組成物であり、本発明の医薬組成物の生物学的活性に全く影響を与えないものである。そのようなキャリアーまたは希釈剤の例は、塩溶液、糖溶液、グリセロール溶液、エタノールなどがあるが、これらに限定されない。

[0049] 本発明の医薬組成物は、疾患の治療または予防に有効な量の該複合体を含み、かつ、患者に適切に投与できるような形態で提供される。本発明の医薬組成物の製剤形態は、例えば注射剤、点眼剤、吸入用などの液剤、例えば軟膏、ローション剤などの外用剤等であってもよい。

液剤の場合、本発明の医薬組成物の濃度範囲は通常、０．００１～２５％（ｗ／ｖ）であり、好ましくは０．０１～５％（ｗ／ｖ）であり、より好ましくは０．１～２％（ｗ／ｖ）である。本発明の医薬組成物は医薬的に許容される任意の添加剤、例えば、乳化補助剤、安定化剤、等張化剤、ｐＨ調整剤等を適当量含有していてもよい。医薬的に許容される任意の添加剤は、該複合体の分散前でも分散後でも適当な工程で添加することができる。

[0050] 凍結乾燥製剤は、一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターと担体とを分散処理した後、凍結乾燥処理することにより調製することができる。凍結乾燥処理は、常法により行うことができる。例えば、上記の分散処理後の複合体

溶液を無菌状態にて所定量をバイアル瓶に分注し、約－４０～－２０℃の条件で予備乾燥を約２時間程度行い、約０～１０℃で減圧下に一次乾燥を行い、次いで、約１５～２５℃で減圧下に二次乾燥して凍結乾燥することができる。そして、例えばバイアル内部を窒素ガスで置換し、打栓することにより、本発明の医薬組成物の凍結乾燥製剤を得ることができる。

[0051] 本発明の医薬組成物は、任意の適当な溶液の添加によって再溶解し、使用することができる。このような溶液としては、注射用水、生理食塩水などの電解質液、ブドウ糖液、その他一般輸液などをあげることができる。この溶液の液量は、用途などによって異なり、特に制限されないが、凍結乾燥前の液量の０．５～２倍量、または５００ｍｌ以下が好ましい。

[0052] 本発明の医薬組成物は、ヒトを含む動物に対し、例えば静脈内投与、動脈内投与、経口投与、組織内投与、経皮投与、経粘膜投与または経直腸投与することができるが、患者の症状に合わせた適切な方法により投与することが好ましい。特に静脈投与、経皮投与、経粘膜投与が好ましく用いられる。また、癌内局所投与など、局所投与をすることもできる。これらの投与方法に適した剤型としては、例えば各種の注射剤、経口剤、点滴剤、吸収剤、点眼剤、軟膏剤、ローション剤、坐剤等があげられる。

[0053] 本発明の医薬組成物の用量は、薬物、剤型、年齢や体重などの患者の状態、投与経路、疾患の性質と程度などを考慮した上で決定することが望ましいが、通常は一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターの質量として、成人に対して１日当たり、０．１ｍｇ～１０ｇ／日、好ましくは１ｍｇ～５００ｍｇ／日である。場合によっては、これ以下でも十分であるし、また逆にこれ以上の用量を必要とすることもある。また１日１回～数回投与することもでき、１日～数日の間隔をおいて投与することもできる。

[0054] 以下に、本発明を実施例により説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[0055] hif-2α遺伝子の発現を抑制する核酸の設計とその評価

（１）二本鎖核酸の調製

hif-2α遺伝子の発現を抑制できる核酸の配列として、hif-2αのｍＲＮＡ配列(GenBank登録番号:NM_001430.3、配列番号９７)から、(a)ＧまたはＣが４塩基以上続く配列がない、(b)ＧＣ含量が20～80%である、(c)より好ましくは５’側もしくは３’側非翻訳領域に位置する、の３つの条件に当てはまる配列１９組を選択した。配列は配列番号Ｎ、およびその相補配列として配列番号ｎ＋２１の塩基配列で示す。ここでｎは１から１９までの整数である。配列番号１～１９で表される配列からなるＲＮＡのそれぞれの３’端に、適宜２塩基からなるＤＮＡ配列を付加し、配列番号Ｎで表される塩基配列からなる核酸と、その相補鎖として配列番号Ｎ＋２１で表される塩基配列からなる核酸とからなる二本鎖核酸である、ｓｉＲＮＡを設計した。ここでＮは４３から６１までの整数を示す。

[0056] 二本鎖核酸を構成する核酸の合成は、株式会社ジーンデザインに依頼した。

（２）スクリーニングにおける評価方法

スクリーニングにおける評価は、二本鎖核酸を担体と共に各種癌細胞に導入し、hif-2αのｍＲＮＡ量をＲＴ－ＰＣＲ（Reverse transcription-polymerase chain reaction）を用いて定量することにより行った。

（３）二本鎖核酸と担体の複合体の調製

担体として、市販のカチオニックリポソームであるハイパーフェクト（QIAGEN社製）を用い、添付の使用説明書に記載された方法に従って二本鎖核酸－ハイパーフェクトの複合体を調製した。

（４）二本鎖核酸によるhif-2αのｍＲＮＡの発現抑制

二本鎖核酸のトランスフェクションによりhif-2αのｍＲＮＡの発現が抑制されるかどうかを調べるため、hif-2αのｍＲＮＡの発現量をＲＴ－ＰＣＲによる準定量により評価した。

[0057] 二本鎖核酸としては、配列番号Ｎで表される塩基配列からなる核酸と配列番号Ｎ＋２１で表される塩基配列からなる核酸を用いた。ここでＮは４３～

６１までの整数を示す。

[0058] [表1]

	sense (5'-3')	配列番号	antisense (5'-3')	配列番号
HIF-2 siRNA#1	CUUAGAAACGGAAAUGGAAtt	43	UUCCAUUUCCGUUUCUAAGtt	64
HIF-2 siRNA#2	GGGUUACUGACGUGUAAAUtt	44	AUUUACACGUCAGUAACCCtt	65
HIF-2 siRNA#3	GCCACAGCACCCAGAGCGAtt	45	UCGCUCUGGGUGCUGUGGCtc	66
HIF-2 siRNA#4	GCUGGAGUAUGAAGAGCAAtt	46	UUGCUCUUCAUACUCCAGCtg	67
HIF-2 siRNA#5	GGAGUAGCUCGGAGAGGAGtt	47	CUCCUCUCCGAGCUACUCCtt	68
HIF-2 siRNA#6	CCUGAAGAUUGAAGUGAUUtt	48	AAUCACUUCAAUCUUCAGGtc	69
HIF-2 siRNA#7	CCAAGAGUCACCAGAAACUUtt	49	AAGUUCUGGUGACUCUUGGtc	70
HIF-2 siRNA#8	CCACAGCCUCCAUCUGCCAtt	50	UGGCAGAUGGAGGCUGUGGca	71
HIF-2 siRNA#9	GCCUCAUCAUCAUGUGUGAtt	51	UCACACAUGAUGAUGAGGCag	72
HIF-2 siRNA#10	CCAUGACAAACAUCUUCCAtt	52	UGGAAGAUGUUUGUCAUGGca	73
HIF-2 siRNA#11	GAACUGACCAGAUAUGACUtt	53	AGUCAUAUCUGGUCAGUUCgg	74
HIF-2 siRNA#12	ACAGCAUGGACAUCAAGUUtt	54	AACUUCAUGUCCAUGCUGUgg	75
HIF-2 siRNA#13	GAUAUGACUGUGAGGUGAAtt	55	UUCACCUCACAGUCAUAUCtg	76
HIF-2 siRNA#14	UCAGCAAGUUCAUGGGACUtt	56	AGUCCCAUGAACUUGCUGAtg	77
HIF-2 siRNA#15	AGUGCACUGAGCUAUGUGAtt	57	UCACAUAGCUCAGUGCACUtg	78
HIF-2 siRNA#16	CCUUCAAUGACUUCUAAUUtt	58	AAUUAGAAGUCAUUGAAGGtg	79
HIF-2 siRNA#17	ACACAACUGUCCAUACUAAtt	59	UUAGUAUGGACAGUUGUGUgt	80
HIF-2 siRNA#18	CGGUCAGUGACAUGUAGGUtt	60	ACCUACAUGUCACUGACCGac	81
HIF-2 siRNA#19	CCAGAACUACCAUGAGAUGtt	61	CAUCUCAUGGUAGUUCUGGaa	82
HIF-2 siRNA control#1	GCGACAGCUGGAGUAUGAAtt	62	UUCAUACUCCAGCUGUCGCtt	83
HIF-2 siRNA control#2	GACAAGGUCUGCAAAGGGUtt	63	ACCCUUUGCAGACCUUGUCtt	84

[0059] 表１に示されるとおり、配列番号Ｎ（４３～６１）で表される塩基配列からなる核酸と配列番号Ｎ＋２１（６４～８２）で表される塩基配列からなる核酸で形成される二本鎖核酸は、それぞれHIF-2 siRNA #1～#19ともいう。表１中で大文字はリボヌクレオチド、小文字はデオキシリボヌクレオチドをそれぞれ示す。

[0060] ヒトのいずれの遺伝子とも交差しないｓｉＲＮＡであるNontargeting siRNA #1（以下、Nontargeting#1ともいう）（Dharmacon社製）を陰性対照として用いた。また、配列番号６２で表される塩基配列からなる核酸と配列番号８３で表される塩基配列からなる核酸（以下、Control#1ともいう。Journal of Cellular Biochemistry, 92, 491-501 (2004)）、および配列番号６３で表される塩基配列からなる核酸と配列番号８４で表される塩基配列からなる核酸（以下、Control# 2ともいう。PLoS Biology, 1(3), 439-444 (2003)）を、陽性対照として用いた。

[0061] これらの二本鎖核酸を、以下の方法により、それぞれヒト腎臓細胞であるA-498細胞（1260933853765_1.htmlHTB 44）に導入した。

96ウェルの培養プレートに、MEM（GIBCO社製、11095）で希釈した二本鎖核酸を10μLずつ分注した後、添付の使用説明書に記載された量となるようにMEMで希釈したハイパーフェクトを10μLずつ添加して、二本鎖核酸－ハイパーフェクト複合体を調製した。次に、1.11%ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、Non-Essential Amino-acids（NEAA）、Pyruvateを含むMEMに懸濁させたA-498細胞を、5000細胞数/180μL/ウェルとなるように播種し、３７℃、５％CO_2条件下で培養することで、二本鎖核酸をA-498細胞に導入した。二本鎖核酸の最終濃度は200pMとなるように調製した。

[0062] 二本鎖核酸を導入した細胞を３７℃の５％CO_2インキュベーター内で４８時間培養し、氷冷したＰＢＳで洗浄し、Cells-to-Ct Kit（ABI社製）を用いて全ＲＮＡを回収し、製品に添付された説明書に記載された方法に従い逆転写反応を行い、ｃＤＮＡを作製した。

得られたｃＤＮＡを鋳型とし、Universal Probe Library（Roche Applied Science社製）をプローブとして、ABI7900HT Fast（ABI社製）を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってＰＣＲ反応させることにより、hif-2α遺伝子および構成的発現遺伝子であるgapdh（D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）遺伝子をＰＣＲ反応させて得られた増幅量から、それぞれhif-2αのｍＲＮＡ量およびgapdhのｍＲＮＡ量の準定量値を算出した。hif-2αのｍＲＮＡ量を準定量するに際しては、対応するサンプルのgapdhのｍＲＮＡ量を内部対照とした上で算出した。

[0063] hif-2αのｍＲＮＡ量についての結果を図１に示す。なお、検体のｍＲＮＡ量は、担体のみを処理した群（mock群）における、hif- 2αのｍＲＮＡ量およびgapdhのｍＲＮＡ量を、それぞれ１としたときの相対的な割合として表した。

図１に示されるとおり、hif-2α遺伝子を標的とする本発明の二本鎖核酸を導入したA-498細胞は、陰性対照と比較してhif-2αのｍＲＮＡ量が低下した。

実施例 2

[0064] 二本鎖核酸によるvegfaのｍＲＮＡの発現抑制

HIF-2によりその転写が促進される血管新生因子であるVEGFの発現が、hif-2αのｍＲＮＡの発現抑制に伴って抑制されるかどうかを、実施例１（４）に記載されたＲＴ－ＰＣＲによるｍＲＮＡ量の準定量と同様の方法で評価した。VEGFをコードする遺伝子であるvegfaのｍＲＮＡ量についての結果を図２に示す。

[0065] 図２に示されるとおり、hif-2α遺伝子を標的とする本発明の二本鎖核酸を導入したA-498細胞は、陰性対照と比較してvegfaのｍＲＮＡ量が低下した。

実施例 3

[0066] 二本鎖核酸のin vitroにおける抗細胞増殖活性

384ウェルの培養プレートに、MEM（GIBCO社製、11095）で希釈した二本鎖核酸を6μLずつ分注した後、添付の使用説明書に記載された量となるようにM

EMで希釈したハイパーフェクトを10μLずつ添加して、二本鎖核酸－ハイパーフェクト複合体を調製した。次に、1.47%ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、Non-Essential Amino-acids (NEAA)、Pyruvateを含むMEMに懸濁させたA-498細胞を、2000細胞数/34μL/ウェルとなるように播種し、３７℃、５％CO_2条件下で培養することで、二本鎖核酸をA-498細胞に導入した。二本鎖核酸の最終濃度は、それぞれ1、0.3、0.1、0.03、0.01、0.003、0.001ｎＭとなるように調製した。

なお、二本鎖核酸の濃度は、それぞれの鎖が完全に二本鎖を形成していると仮定したときのモル濃度で示している。

[0067] 二本鎖核酸を導入した細胞を３７℃の５％CO_2インキュベーター内で７日間培養し、CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay（Promega社製）を用いて生細胞率を測定した。測定方法は製品に添付された説明書に記載された方法に従った。担体のみ処理した場合のA-498細胞の生細胞率を１００％として、それぞれの相対生細胞率を計算した。その結果を図３および図４に示す。

[0068] 図３および図４に示されるとおり、hif-2α遺伝子を標的とする二本鎖核酸の導入による生細胞率の減少は認められず、本発明の二本鎖核酸は細胞増殖を阻害しないことが示された。

実施例 4

[0069] 修飾二本鎖核酸によるhif-2α、vegfaのｍＲＮＡの発現抑制

二本鎖核酸を修飾することにより、核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）耐性の向上や免疫原性の低下などの効果が見込まれる一方、RNAi効果が低下する場合もある。修飾により活性が変化するかを調べるため、hif-2αおよびvegfaのｍＲＮＡの発現量をＲＴ－ＰＣＲによる準定量により評価した。

[0070] 修飾二本鎖核酸の修飾ヌクレオチドとしては、Oligonucleotides, 18(2), 187-200 (2008)を参考にして、リボヌクレオチドのリボースの２’－ＯＨ基を２’－メトキシ基で置換したものを用いた。修飾二本鎖核酸としては、配列番号Ｎ’で表される塩基配列からなる核酸と配列番号Ｎ’＋６で表される

塩基配列からなる核酸を用い、それぞれ対応する無修飾の二本鎖核酸による結果と比較した。ここでN'は８５～９０までの整数を示す。

[0071] [表2]

	sense (5'-3')	配列番号	antisense (5'-3')	配列番号
HIF-2 siRNA#1-OMe	CUUAGAAACGGAAAUGGAAUCCUgc	85	GCAGGAUUCCAUUUCCGUUUCUAAGUU	91
HIF-2 siRNA#4-OMe	GCUGGAGUAUGAAGAGCAAGCCUtc	86	GAAGGCUUGCUCUUCAUACUCCAGCUG	92
HIF-2 siRNA#6-OMe	CCUGAAGAUUGAAGUGAUUGAGAag	87	CUUCUCAAUCACUUCAAUCUUCAGGUC	93
HIF-2 siRNA#9-OMe	GCCUCAUCAUCAUGUGUGAACCAat	88	AUUGGUUCACACAUGAUGAGGCAG	94
HIF-2 siRNA#11-OMe	GAACUGACCAGAUAUGACUGUGAgg	89	CCUCACAGUCAUAUCUGGUCAGUUCGG	95
HIF-2 siRNA#15-OMe	AGUGCACUGAGCUAUGUGACUCGga	90	UCCGAGUCACAUAGCUCAGUGCACUUG	96

[0072] 表２に示されるとおり、配列番号Ｎ’（８５～９０）で表される塩基配列からなる核酸と配列番号Ｎ’＋６（９１～９６）で表される塩基配列からなる核酸で形成される二本鎖核酸は、それぞれHIF-2 siRNA #1-OMe, #4-OMe, #6-OMe, #9-OMe, #11-OMe, #15-OMeともいう。これらに対応する無修飾の二本鎖核酸がそれぞれ表１に示されるHIF-2 siRNA #1, #4, #6, #9, #11, #15である。なお、表２中で大文字はリボヌクレオチド、小文字はデオキシリボヌクレオチド、斜体文字はリボースの２’-ＯＨ基が２’-メトキシ基に置換されたヌクレオチドを、それぞれ示す。

[0073] hif-2αおよびvegfaのｍＲＮＡ量について、実施例１（４）に記載されたＲＴ－ＰＣＲによるｍＲＮＡ量の準定量と同様の方法で評価した結果を、それぞれ図５および図６に示す。

図５および図６に示されるとおり、hif-2α遺伝子を標的とする本発明の修飾二本鎖核酸を導入したA-498細胞は、陰性対照と比較してhif-2α、vegfaのｍＲＮＡ量が低下した。中でも、HIF-2 siRNA #1-OMe, #6-OMe, #15-OMeは高い抑制活性を保持した。

産業上の利用可能性

[0074] 本発明により、HIF-2αの発現抑制活性を有する核酸、該核酸を有効成分とする医薬組成物などが提供される。本発明の核酸および、医薬組成物は、血管新生を抑制し、癌、糖尿病性網膜症、リウマチなどの疾患の治療に有用である。

[0075] 本出願は、日本で出願された特願２００９－２８５２１５（出願日：２００９年１２月１６日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸または該核酸の少なくとも一方の末端が１～４塩基削除された核酸と、

該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とを含有し、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸；または

配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸または該核酸の少なくとも一方の末端が１～４塩基削除された核酸と、

該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸の少なくとも一方の核酸において、１～３塩基が置換、欠失もしくは付加された核酸とを含有し、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸。

[請求項2] ２７塩基対以下の二重鎖形成部を有する、請求項１に記載の核酸。

[請求項3] １５～１９塩基対からなる二重鎖形成部を有する、請求項２に記載の核酸。

[請求項4] HIF-2αの発現抑制活性を有する核酸が二本鎖核酸である、請求項１～３のいずれか１項に記載の核酸。

[請求項5] 請求項４に記載の二本鎖核酸の少なくとも一方の鎖の３’末端または５’末端に１～４塩基付加した核酸。

[請求項6] 配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸。

[請求項7] 請求項６に記載の核酸において、１～３塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸。

[請求項8] 請求項６または７に記載の核酸を含む、３０塩基以下の核酸。

[請求項9] 請求項１～８のいずれか１項に記載の核酸を構成するヌクレオチドの一部または全部がリボヌクレオチドであり、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸。

[請求項10] 請求項１～９のいずれか１項に記載の核酸を構成するヌクレオチドの

一部または全部が、デオキシリボヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドであり、かつHIF-2αの発現抑制活性を有する核酸。

[請求項11] 修飾ヌクレオチドの少なくとも１つが、リボヌクレオチドの２’ー修飾ヌクレオチドである、請求項１０に記載の核酸。

[請求項12] ３’末端または５’末端に付加した１～４塩基の少なくとも１塩基がデオキシリボヌクレオチドである、請求項１０に記載の核酸。

[請求項13] 請求項１～１２のいずれか１項に記載の核酸をコードするベクター。

[請求項14] 請求項１～１３のいずれか１項に記載の核酸またはベクターを有効成分とする、医薬組成物。

[請求項15] 核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体をさらに含む、請求項１４に記載の医薬組成物。

[請求項16] 核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体がカチオン性担体である、請求項１５に記載の医薬組成物。

[請求項17] 核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体がリポソームである、請求項１６に記載の医薬組成物。

[請求項18] リポソームがHIF-2αをコードする遺伝子の発現部位を含む組織または臓器に到達するリポソームである、請求項１７に記載の医薬組成物。

[請求項19] 核酸またはベクターとリード粒子とを構成成分とする複合粒子および該複合粒子を被覆する脂質膜から構成され、該脂質膜の構成成分が可溶な極性有機溶媒を含む液の中に、該脂質膜の構成成分が分散可能で、該複合粒子も分散可能な濃度で該極性有機溶媒を含む液が存在するリポソームである、請求項１４に記載の医薬組成物。

[請求項20] HIF-2αの発現を抑制することを特徴とする、請求項１４～１９のいずれか１項に記載の医薬組成物。

[請求項21] 血管新生抑制剤である、請求項２０に記載の医薬組成物。

[請求項22] 癌、糖尿病性網膜症またはリウマチの治療剤または予防剤である、請求項１４～２１のいずれか１項に記載の医薬組成物。

[請求項23] 請求項１～２２のいずれか１項に記載の核酸、ベクターまたは医薬組成物を対象に投与することを特徴とする、HIF-2αの発現を抑制する方法。

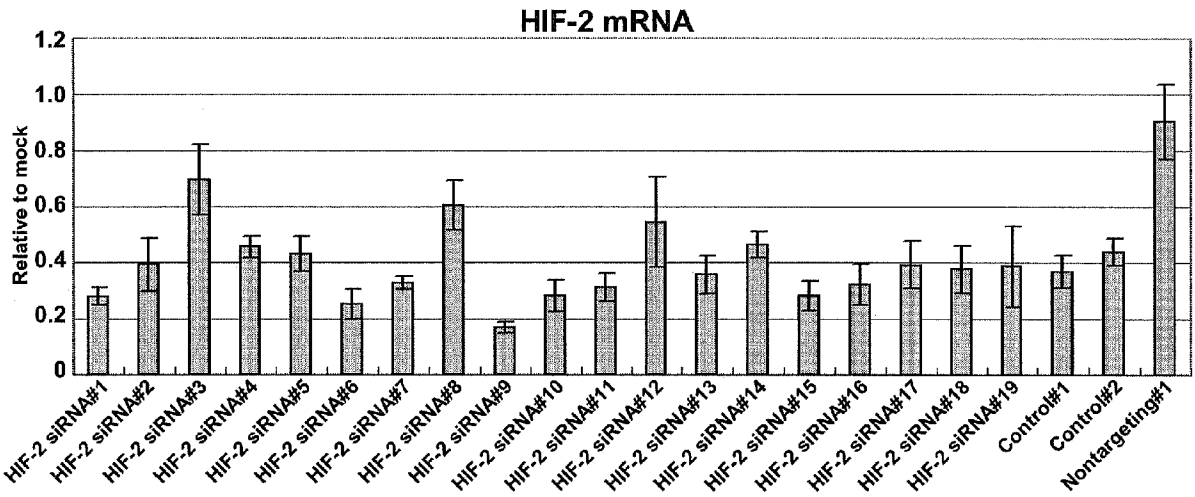
[請求項24] 請求項１～２２のいずれか１項に記載の核酸、ベクターまたは医薬組成物を対象に投与することを特徴とする、血管新生を抑制する方法。

[請求項25] 請求項１～２２のいずれか１項に記載の核酸、ベクターまたは医薬組成物を対象に投与することを特徴とする、癌、糖尿病性網膜症もしくはリウマチを治療または予防する方法。

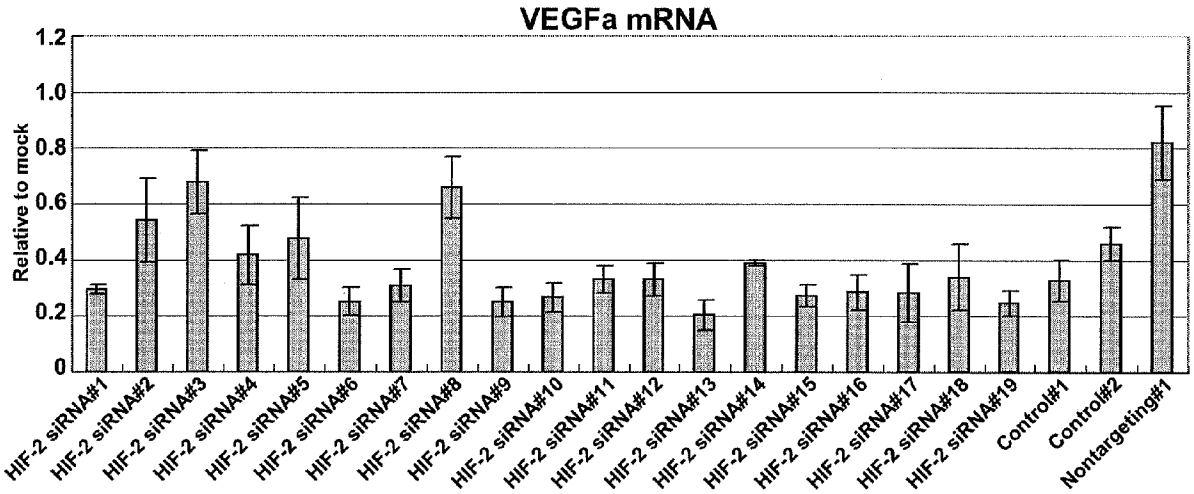
[請求項26] 医薬組成物の製造のための、請求項１～１３のいずれか１項に記載の核酸またはベクターの使用。

[請求項27] 癌、糖尿病性網膜症もしくはリウマチの治療または予防における使用のための、請求項１～１３のいずれか１項に記載の核酸またはベクター。

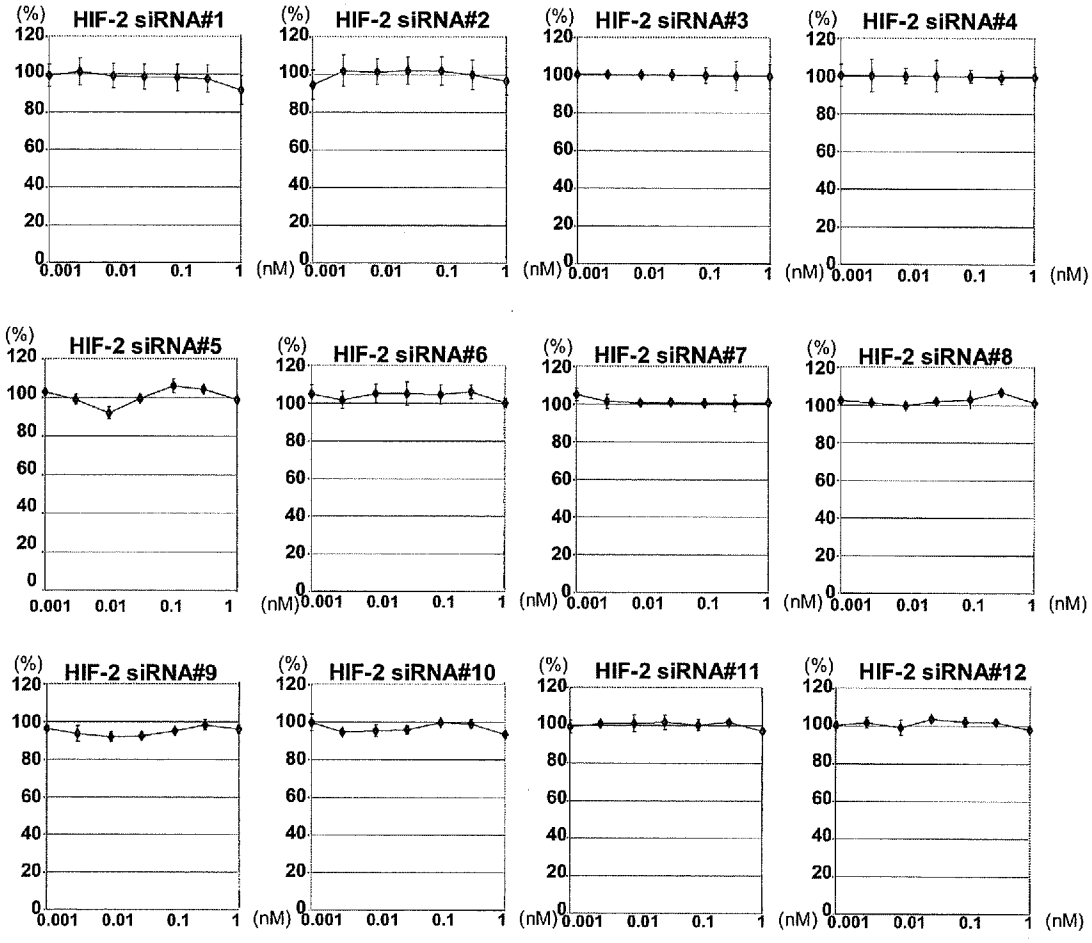
[図1]


HIF-2 mRNA
Relative to mock
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
HIF-2 siRNA#1
HIF-2 siRNA#2
HIF-2 siRNA#3
HIF-2 siRNA#4
HIF-2 siRNA#5
HIF-2 siRNA#6
HIF-2 siRNA#7
HIF-2 siRNA#8
HIF-2 siRNA#9
HIF-2 siRNA#10
HIF-2 siRNA#11
HIF-2 siRNA#12
HIF-2 siRNA#13
HIF-2 siRNA#14
HIF-2 siRNA#15
HIF-2 siRNA#16
HIF-2 siRNA#17
HIF-2 siRNA#18
HIF-2 siRNA#19
Control#1
Control#2
Nontargeting#1

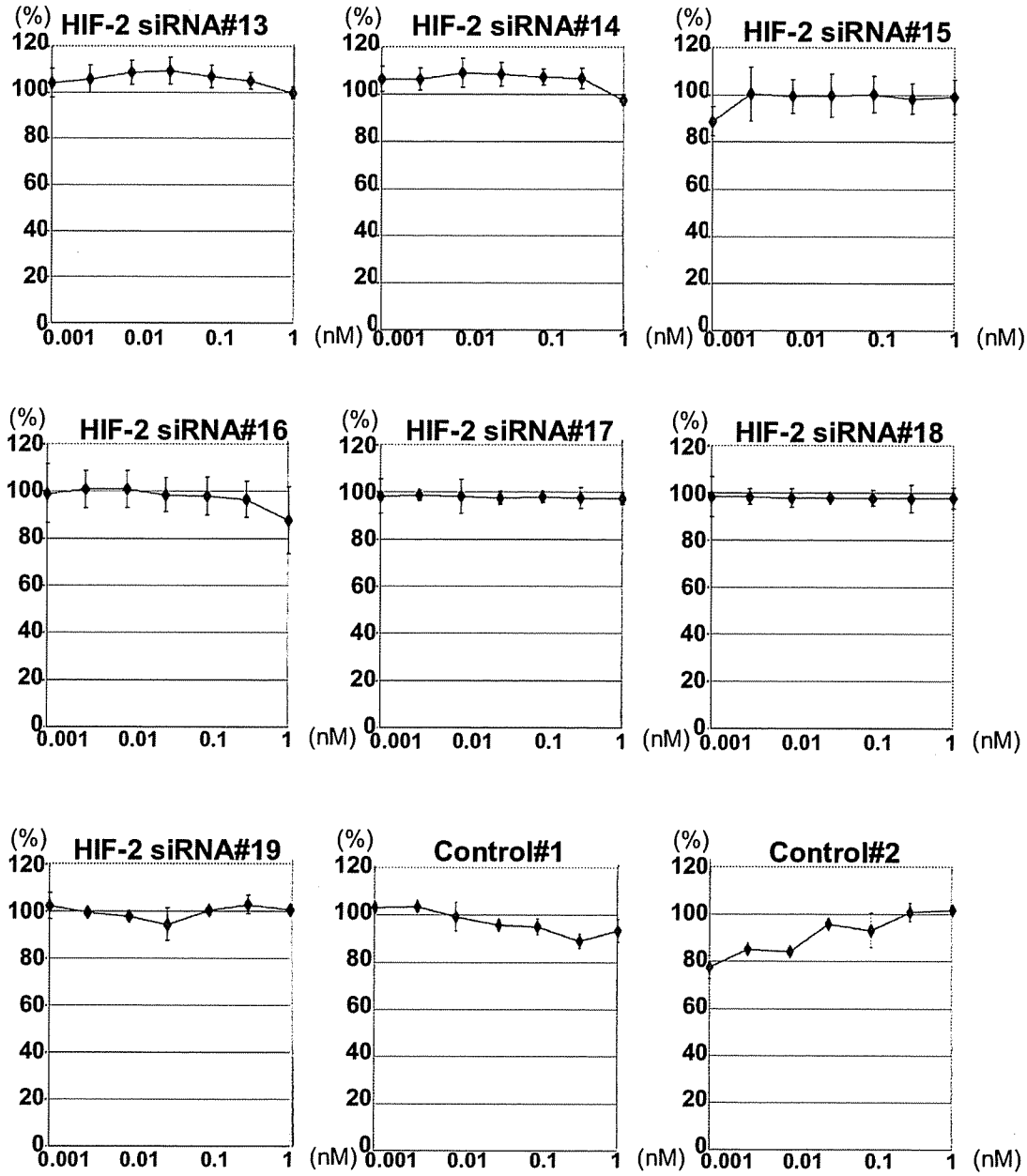
[図2]


VEGFa mRNA
Relative to mock
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
HIF-2 siRNA#1
HIF-2 siRNA#2
HIF-2 siRNA#3
HIF-2 siRNA#4
HIF-2 siRNA#5
HIF-2 siRNA#6
HIF-2 siRNA#7
HIF-2 siRNA#8
HIF-2 siRNA#9
HIF-2 siRNA#10
HIF-2 siRNA#11
HIF-2 siRNA#12
HIF-2 siRNA#13
HIF-2 siRNA#14
HIF-2 siRNA#15
HIF-2 siRNA#16
HIF-2 siRNA#17
HIF-2 siRNA#18
HIF-2 siRNA#19
Control#1
Control#2
Nontargeting#1

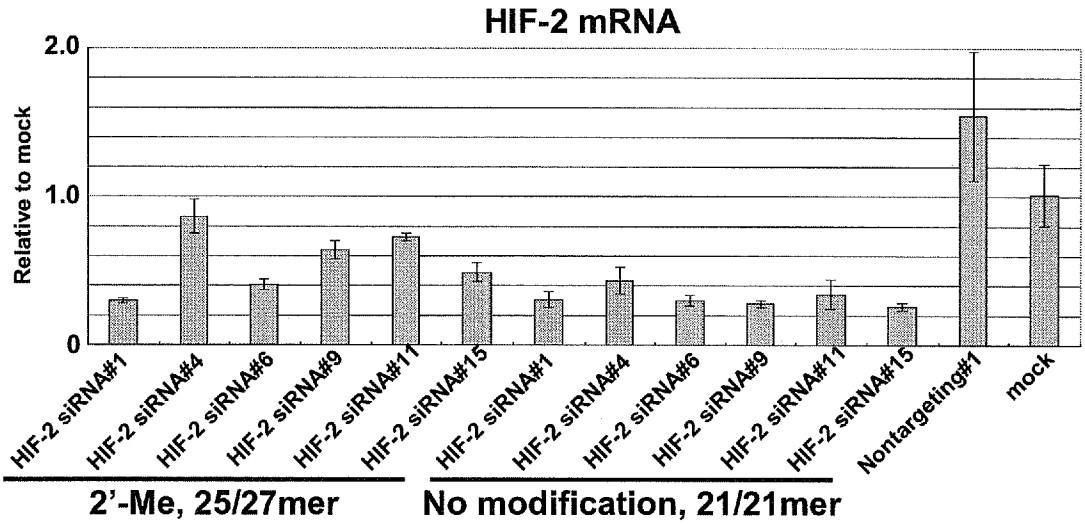
[図3]


(%)
HIF-2 siRNA#1
HIF-2 siRNA#2
HIF-2 siRNA#3
HIF-2 siRNA#4
HIF-2 siRNA#5
HIF-2 siRNA#6
HIF-2 siRNA#7
HIF-2 siRNA#8
HIF-2 siRNA#9
HIF-2 siRNA#10
HIF-2 siRNA#11
HIF-2 siRNA#12
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
(nM)

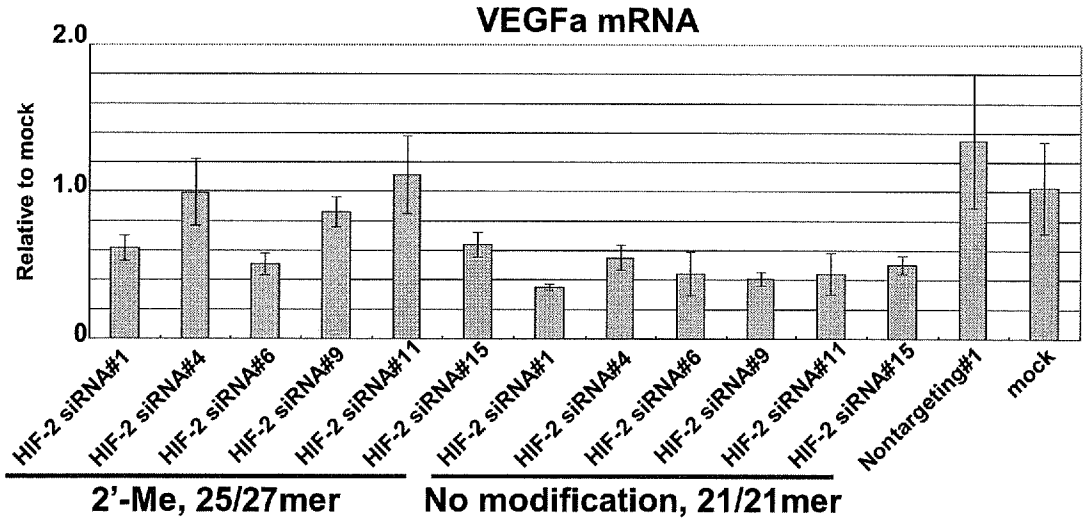
[図4]


(%)
HIF-2 siRNA#13
HIF-2 siRNA#14
HIF-2 siRNA#15
HIF-2 siRNA#16
HIF-2 siRNA#17
HIF-2 siRNA#18
HIF-2 siRNA#19
Control#1
Control#2
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
(nM)

[図5]


HIF-2 mRNA
Relative to mock
2.0
1.0
0
HIF-2 siRNA#1
HIF-2 siRNA#4
HIF-2 siRNA#6
HIF-2 siRNA#9
HIF-2 siRNA#11
HIF-2 siRNA#15
HIF-2 siRNA#1
HIF-2 siRNA#4
HIF-2 siRNA#6
HIF-2 siRNA#9
HIF-2 siRNA#11
HIF-2 siRNA#15
Nontargeting#1
mock
2'-Me, 25/27mer
No modification, 21/21mer

[図6]


VEGFa mRNA
Relative to mock
2.0
1.0
0
HIF-2 siRNA#1
HIF-2 siRNA#4
HIF-2 siRNA#6
HIF-2 siRNA#9
HIF-2 siRNA#11
HIF-2 siRNA#15
HIF-2 siRNA#1
HIF-2 siRNA#4
HIF-2 siRNA#6
HIF-2 siRNA#9
HIF-2 siRNA#11
HIF-2 siRNA#15
Nontargeting#1
mock
2'-Me, 25/27mer
No modification, 21/21mer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/072716

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/113(2010.01)i, *A61K9/127*(2006.01)i, *A61K31/713*(2006.01)i, *A61K48/00*(2006.01)i, *A61P9/00*(2006.01)i, *A61P27/02*(2006.01)i, *A61P29/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(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)
C12N15/113, A61K9/127, A61K31/713, A61K48/00, A61P9/00, A61P27/02, A61P29/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/REGISTRY(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOWTER, H. I. et al., Predominant Role of Hypoxia-Inducible Transcription Factor (Hif)-1α versus Hif-2α in Regulation of the Transcriptional Response to Hypoxia., Cancer Res., 2003, Vol.63, P.6130-6134, Abstract, Introduction, Materials and Methods	1-22,26,27
X	WARNECKE, C. et al., Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1α and HIF-2α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2α target gene in Hep3B and Kelly cells., FASEB J., 2004, Vol.18, P.1462-1464, Full text, pages 1, 2, Materials and Methods	1-22,26,27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
02 March, 2011 (02.03.11)	15 March, 2011 (15.03.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/072716

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HOLMQUIST-MENGELBIER, L. et al., Recruitment of HIF-1a and HIF-2a to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2a promotes an aggressive phenotype., Cancer Cell, 2006, Vol.10, P.413-423, Summary, Experimental procedures, Table S1	1-22,26,27
X	CARROLL, V. A. et al., Role of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1A versus HIF-2A in the Regulation of HIF Target Genes in Response to Hypoxia, Insulin-Like Growth Factor-I, or Loss of von Hippel-Lindau Function: Implications for Targeting the HIF Pathway., Cancer Res., Vol.66, 2006, P.6264-6270, Abstract, Materials and Methods	1-22,26,27
X	LAUZIER, M.-C. et al., (2R)-[(4-Biphenylylsulfonyl)amino]-N-hydroxy-3-phenylpropion amide (BiPS), a Matrix Metalloprotease Inhibitor, Is a Novel and Potent Activator of Hypoxia-Inducible Factors., Mol. Pharmacol., 2008, Vol.74, No.1, P.282-288, page 282, left column, Materials and Methods	1-22,26,27
X	GORDAN, J. D. et al., HIF-2alfa Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity., Cancer Cell, 2007, Vol.11, P.335-347, Summary, Introduction, Experimental Procedures	1-22,26,27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/072716

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. [X] Claims Nos.: 23-25
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The claims involve methods for surgery or treatment of human being and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. [ ] Claims Nos.:
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:

3. [ ] Claims Nos.:
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:
See extra sheet.

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 additional fees, this Authority did not invite payment of 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. [X] 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.:
Parts of 1-22, 26 and 27 which relate to a nucleic acid comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:22.

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.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The "nucleic acids respectively comprising nucleotide sequences represented by SEQ ID NO:22 to SEQ ID NO:40" recited in claims 1 and 6 share no common chemical structure to one another, and share only a common technical feature "a nucleic acid constituting siRNA for HIF-2α mRNA".

However, documents 1 to 5 shown below disclose siRNA for HIF-2α mRNA.

Therefore, the above-stated technical feature cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence. Further, there is not any other common matter that can be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence, among the nucleic acids.

Consequently, the group of inventions cannot be regarded as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and are considered as a group of inventions composed of 19 inventions respectively relating to different 19 nucleic acids.

Document 1: Cancer Res., 2003, Vol.63, P.6130-6134
Document 2: FASEB J., 2004, Vol.18, P.1462-1464
Document 3: Cancer Cell, 2006, Vol.10, P.413-423
Document 4: Cancer Res., Vol.66, 2006, P.6264-6270
Document 5: Mol. Pharmacol., 2008, Vol.74, No.1, P.282-288

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０７２７１６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/113(2010.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/113, A61K9/127, A61K31/713, A61K48/00, A61P9/00, A61P27/02, A61P29/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/REGISTRY(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)、PubMed

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	SOWTER, H. I. et al., Predominant Role of Hypoxia-Inducible Transcription Factor (Hif)-1α versus Hif-2α in Regulation of the Transcriptional Response to Hypoxia., Cancer Res., 2003, Vol.63, P.6130-6134, Abstract、Introduction、Materials and Methods	1-22, 26, 27

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０２．０３．２０１１	１５．０３．２０１１

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４１５２
鈴木　崇之
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WARNECKE, C. et al., Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1α and HIF-2α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2α target gene in Hep3B and Kelly cells., FASEB J., 2004, Vol.18, P.1462-1464, Full textの第１及び２頁、Materials and Methods	1-22, 26, 27
X	HOLMQUIST-MENGELBIER, L. et al., Recruitment of HIF-1a and HIF-2a to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2a promotes an aggressive phenotype., Cancer Cell, 2006, Vol.10, P.413-423, Summary、Experimental procedures、Table S1	1-22, 26, 27
X	CARROLL, V. A. et al., Role of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1A versus HIF-2A in the Regulation of HIF Target Genes in Response to Hypoxia, Insulin-Like Growth Factor-I,or Loss of von Hippel-Lindau Function: Implications for Targeting the HIF Pathway., Cancer Res., Vol.66, 2006, P.6264-6270, Abstract、Materials and Methods	1-22, 26, 27
X	LAUZIER, M.-C. et al., (2R)-[(4-Biphenylylsulfonyl)amino]-N-hydroxy-3-phenylpropionamide (BiPS), a Matrix Metalloprotease Inhibitor, Is a Novel and Potent Activator of Hypoxia-Inducible Factors., Mol. Pharmacol., 2008, Vol.74, No.1, P.282-288, 第２８２頁左欄、Materials and Methods	1-22, 26, 27
X	GORDAN, J. D. et al., HIF-2alfa Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity., Cancer Cell, 2007, Vol.11, P.335-347, Summary、Introduction、Experimental Procedures	1-22, 26, 27

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０７２７１６

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　23-25　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
人間を手術又は治療する方法を含むものであって、ＰＣＴ第１７条（２）（ａ）（ｉ）及びＰＣＴ規則３９．１（ｉｖ）の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☑ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項 1-22, 26, 27 の配列番号 22 で表される塩基配列からなる核酸

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項１及び６に記載された「配列番号２２～４０のいずれか１つで表される塩基配列からなる核酸」は、互いに共通の化学構造を有するものではなく、ＨＩＦ－２αのｍＲＮＡに対するｓｉＲＮＡを構成する核酸であることにおいてのみ技術的特徴を共有する。

しかしながら、下記に示す文献１～５には、ＨＩＦ－２αのｍＲＮＡに対するｓｉＲＮＡが記載されている。

よって、上記の技術的特徴は、ＰＣＴ規則１３．２の第２文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、上述の核酸の間には、ＰＣＴ規則１３．２の第２文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

したがって、これら一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとはいえず、異なった１９個の核酸に関する１９個の発明からなる発明群であるといえる。

文献１：Cancer Res., 2003, Vol.63, P.6130-6134
文献２：FASEB J., 2004, Vol.18, P.1462-1464
文献３：Cancer Cell, 2006, Vol.10, P.413-423
文献４：Cancer Res., Vol.66, 2006, P.6264-6270
文献５：Mol. Pharmacol., 2008, Vol.74, No.1, P.282-288