(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2011-516065
(P2011-516065A)
(43)公表日　平成23年5月26日(2011.5.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	G	4B063
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4C076
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00		4C084
A61K 31/7105	(2006.01)	A61K	31/7105		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 68 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-502994 (P2011-502994)
(86)(22)出願日　平成21年4月3日(2009.4.3)
(85)翻訳文提出日　平成22年12月1日(2010.12.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/002125
(87)国際公開番号　WO2009/123764
(87)国際公開日　平成21年10月8日(2009.10.8)
(31)優先権主張番号　61/123,069
(32)優先日　平成20年4月4日(2008.4.4)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　509166766
カランド　ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９１１０６，　パサディナ，ノース　ヒル　アベニュー　１２９
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＥＰＡＳ１阻害剤の組成物および使用

(57)【要約】
本発明は、内皮ＰＡＳドメインタンパク質１（ＥＰＡＳ１）阻害剤、ならびに該ＥＰＡＳ１阻害剤に関連する方法および組成物に関する。特定の実施形態において、該ＥＰＡＳ１阻害剤には、例えば、ｓｉＲＮＡなどの核酸が含まれる。本開示は、ＥＰＡＳ１発現を調節するための組成物および方法を提供する。特に、ＥＰＡＳ１発現を調節するためのＲＮＡｉ組成物は、ＥＰＡＳ１と関連する異常な増殖状態を治療するのに有用であると考えられる。本発明はまた、ＥＰＡＳ１阻害剤、ならびに標的細胞内におけるＥＰＡＳ１の阻害を達成しうる、これらと関連する方法および組成物を提供する。

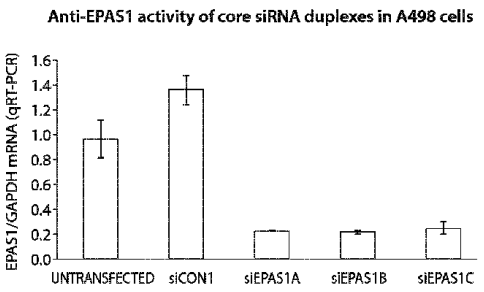


Fig. 2

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ｉ）配列番号２～４から選択される配列を含む、約１５～約３０ヌクレオチドの長さの第１鎖と、
（ｉｉ）約１５～約３０ヌクレオチドの長さの第２鎖と
を含み、
前記第１鎖および第２鎖のうちの少なくとも１２ヌクレオチドが互いに相補的であり、生理学的条件下で二本鎖核酸を形成し、前記二本鎖核酸が、ＲＮＡ干渉機構を介して細胞内における内皮ＰＡＳドメインタンパク質１（ＥＰＡＳ１）の発現を低下させうる核酸。
【請求項２】
二本鎖ＲＮＡである、請求項１に記載の核酸。
【請求項３】
前記二本鎖部分が、場合によって、約１５～約３０ヌクレオチドの長さである、請求項２に記載の核酸。
【請求項４】
ヘアピンＲＮＡである、請求項１に記載の核酸。
【請求項５】
前記ヘアピンＲＮＡが、約４～約１０ヌクレオチドの長さのループ領域を含む、請求項４に記載の核酸。
【請求項６】
前記第１鎖がＤＮＡポリヌクレオチドであり、前記第２鎖がＲＮＡポリヌクレオチドである、請求項１から５のいずれかに記載の核酸。
【請求項７】
前記第１鎖および／または第２鎖が、３’突出領域、５’突出領域、または３’突出領域および５’突出領域の両方をさらに含む、請求項６に記載の核酸。
【請求項８】
前記突出領域が、約１～約１０ヌクレオチドの長さである、請求項７に記載の核酸。
【請求項９】
前記第１鎖が、配列番号５、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、および８１から選択される配列を含む、請求項１から８のいずれかに記載の核酸。
【請求項１０】
前記第２鎖が、配列番号６、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、および８２から選択される配列を含む、請求項１から９のいずれかに記載の核酸。
【請求項１１】
生理学的条件下で、配列番号１のヌクレオチド６５５～７１８、２８７８～２９２９、または４９７８～５０３９に対応するＥＰＡＳ１転写物の領域とハイブリダイズし、細胞内におけるＥＰＡＳ１の発現を低下させる配列を含む単離核酸。
【請求項１２】
配列番号１のヌクレオチド６６５～７０８、２８８８～２９１９、または４９８８～５０２９に対応するＥＰＡＳ１転写物の領域とハイブリダイズする配列を含む、請求項１１に記載の単離核酸。
【請求項１３】
配列番号１のヌクレオチド６７０～７０３、２８９３～２９１４、または４９９２～５０２４に対応するＥＰＡＳ１転写物の領域とハイブリダイズする配列を含む、請求項１１に記載の核酸。

【請求項１４】
一本鎖である、請求項１１から１３のいずれかに記載の核酸。
【請求項１５】
二本鎖である、請求項１１から１３のいずれかに記載の核酸。
【請求項１６】
前記ＥＰＡＳ１の領域のうちの１つに相補的な少なくとも１０の連続ヌクレオチドを含む、請求項１１から１５のいずれかに記載の核酸。
【請求項１７】
約１４～約５０ヌクレオチドの長さである、請求項１１から１６のいずれかに記載の核酸。
【請求項１８】
ＲＮＡ分子である、請求項１１から１７のいずれかに記載の核酸。
【請求項１９】
ＤＮＡ分子である、請求項１１から１７のいずれかに記載の核酸。
【請求項２０】
ＤＮＡ鎖およびＲＮＡ鎖を含む、請求項１１から１７のいずれかに記載の核酸。
【請求項２１】
配列番号２～４から選択される配列を含むＲＮＡｉ構築物である、請求項１１から２０のいずれかに記載の核酸。
【請求項２２】
配列番号５～８２から選択される配列を含むＲＮＡｉ構築物である、請求項１１から２０のいずれかに記載の核酸。
【請求項２３】
酵素性核酸である、請求項１１から２２のいずれかに記載の核酸。
【請求項２４】
前記酵素性核酸がリボザイムである、請求項２３に記載の核酸。
【請求項２５】
前記酵素性核酸がＤＮＡ酵素である、請求項２３に記載の核酸。
【請求項２６】
ＲＮＡｉ構築物である、請求項１から２５のいずれかに記載の核酸。
【請求項２７】
前記ＲＮＡｉ構築物がｄｓＲＮＡである、請求項２６に記載の核酸。
【請求項２８】
前記ＲＮＡｉ構築物がヘアピンＲＮＡである、請求項２７に記載の核酸。
【請求項２９】
前記ＲＮＡｉ構築物の二重鎖部分が、約１５～約３０ヌクレオチドの長さである、請求項２７に記載の核酸。
【請求項３０】
場合によって、１つまたは複数の修飾骨格部分または修飾塩基部分を含む、請求項１から２９のいずれかに記載の核酸。
【請求項３１】
前記修飾骨格部分または修飾塩基部分が、以下：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、アルキルホスホノチオエート、ホスホルアミデート、リン酸エステル、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、およびリン酸トリエステルのうちの１つまたは複数を含む、請求項３０に記載の核酸。
【請求項３２】
前記修飾骨格部分または修飾塩基部分が、場合によって、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３０に記載の核酸。
【請求項３３】

生理学的条件下、１０ナノモルの濃度で細胞と接触させると、細胞におけるＥＰＡＳ１発現を５０％以上阻害する、請求項１から３２のいずれかに記載の核酸。
【請求項３４】
請求項１から３３のいずれかに記載の核酸と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項３５】
前記薬学的に許容される担体に、陽イオンポリマーが含まれる、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３６】
前記薬学的に許容される担体に、シクロデキストリンポリマーが含まれる、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３７】
前記シクロデキストリン構造がｉｍ－ＣＤＰである、請求項３６に記載の医薬組成物。
【請求項３８】
シクロデキストリンポリマー、および請求項１から３３のいずれかに記載の核酸を包含する粒子を含み、ＰＥＧ化される、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３９】
前記粒子が、アダマンタンをさらに含む、請求項３８に記載の医薬組成物。
【請求項４０】
特定の組織または細胞型を標的とするリガンドをさらに含む、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項４１】
前記リガンドがトランスフェリンを含む、請求項４０に記載の医薬組成物。
【請求項４２】
約１０～約１００ｎｍの直径のナノ粒子を含む、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項４３】
前記ナノ粒子が、約５０～約７０ｎｍの直径である、請求項４２に記載の医薬組成物。
【請求項４４】
前記ナノ粒子が、場合によって、約５０ｎｍの直径である、請求項４３に記載の医薬組成物。
【請求項４５】
薬学的に許容される担体が、
イミダゾール修飾された、シクロデキストリンを含有する陽イオンポリマーと、
アダマンタン－ＰＥＧ－リガンドを含む標的化部分と
を含み、
前記ポリマーおよび標的化部分が、前記核酸を封入するナノ粒子を形成する、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項４６】
前記ナノ粒子が、約５０～約１２０ｎｍの直径である、請求項４５に記載の医薬組成物。
【請求項４７】
前記ナノ粒子が、約５０～約１００ｎｍの直径である、請求項４６に記載の医薬組成物。
【請求項４８】
前記ナノ粒子が、約５０～約７０ｎｍの直径である、請求項４７に記載の医薬組成物。
【請求項４９】
前記ナノ粒子が、約５０の直径である、請求項４５に記載の医薬組成物。
【請求項５０】
前記標的化リガンドが、ガラクトースを含む、請求項４５に記載の医薬組成物。
【請求項５１】

前記標的化リガンドが、トランスフェリンを含む、請求項４５に記載の医薬組成物。
【請求項５２】
細胞の望ましくない増殖と関連する疾患または状態を治療するための医薬の製造における、請求項１から３３のいずれかに記載の核酸の使用。
【請求項５３】
前記細胞が癌性細胞または腫瘍細胞である、請求項５２に記載の使用。
【請求項５４】
前記細胞が病原性細胞である、請求項５２に記載の使用。
【請求項５５】
前記細胞が、その望ましくない増殖により疾患または状態がもたらされる正常細胞である、請求項５２に記載の使用。
【請求項５６】
癌を有する患者を治療する方法であって、治療有効量の、請求項１から３３のいずれかに記載の核酸を前記患者に投与するステップを含む方法。
【請求項５７】
前記核酸と共に相加的または相乗作用的な形で癌細胞の増殖を阻害する、少なくとも１つのさらなる抗癌化学療法剤をさらに含む、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記化学療法剤が、場合によって、フルオロウラシル（５ＦＵ）である、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
癌細胞が、同等の組織に由来する非癌性細胞と比較してより高レベルのＥＰＡＳ１を発現する、請求項５６に記載の方法。
【請求項６０】
癌を有する患者を治療する方法であって、ＲＮＡｉ機構を介してＥＰＡＳ１の発現を低下させる治療有効量の二本鎖核酸と、ＥＰＡＳ１発現を誘導する１つまたは複数の抗癌剤とを前記患者に投与するステップを含む方法。
【請求項６１】
前記核酸が、薬学的に許容される担体と共に製剤化される、請求項５６から６０のいずれかに記載の方法。
【請求項６２】
前記核酸が、癌細胞を標的とするリガンドと共に製剤化される、請求項５６から６０のいずれかに記載の方法。
【請求項６３】
前記癌細胞が腎明細胞癌であり、前記リガンドがトランスフェリンを含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記リガンドがガラクトースである、請求項６２に記載の方法。
【請求項６５】
前記核酸が、ポリマーナノ粒子による成分として製剤化される、請求項５６から６０のいずれかに記載の方法。
【請求項６６】
前記ナノ粒子が、約１０～約１２０ｎｍの直径である、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記ナノ粒子が、約５０～約１２０ｎｍの直径である、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記ナノ粒子が、約５０～約１００ｎｍの直径である、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記ナノ粒子が、約５０ｎｍの直径である、請求項６５に記載の方法。
【請求項７０】

前記治療有効量の核酸が全身投与される、請求項５６から６９のいずれかに記載の方法。
【請求項７１】
前記核酸を投与するステップの前に、患者におけるフォンヒッペルーリンダウ（ＶＨＬ）タンパク質活性のレベルを決定するステップをさらに含む、請求項５６から７０のいずれかに記載の方法。
【請求項７２】
前記活性が、健康な対象におけるＶＨＬのＲＮＡレベルまたはタンパク質レベルと比較した、前記患者における前記レベルの低下を測定することにより決定される、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
前記活性が、ＶＨＬ遺伝子における１つまたは複数の突然変異を同定する遺伝子スクリーニングにより決定される、請求項７１に記載の方法。
【請求項７４】
前記１つまたは複数の突然変異が、切断を引き起こす突然変異または対立遺伝子喪失を引き起こす突然変異を含む、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
前記１つまたは複数の突然変異が、ノンセンス突然変異、フレームシフトの突然変異、プロモーターの突然変異、エンハンサーの突然変異、スプライス部位の突然変異、ヌル突然変異、またはポリＡテールの突然変異を含む、請求項７３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願への相互参照）
本願は、２００８年４月４日に出願された米国仮特許出願第６１／１２３，０６９号の利益を主張する。この出願の全ての教示は、本明細書中に参考として援用される。
【背景技術】
【０００２】
背景
転写複合体である低酸素誘導因子（ＨＩＦ）は、酸素ホメオスタシスの重要な調節因子である。低酸素状態は、酸素の輸送および鉄の代謝、赤血球生成、血管新生、解糖およびグルコースの取込み、転写、代謝、ｐＨの調節、成長因子によるシグナル伝達、ストレスおよび細胞接着に対する応答を含めた多くの細胞過程および生理学的過程に関与する遺伝子の発現を誘導する。これらの遺伝子生成物は、低酸素組織に対する酸素送達の増大、または酸素を必要としない代替的な代謝経路（解糖）の活性化に関与する。低酸素誘導経路は、正常な細胞過程に必要とされるのに加え、血管新生、不死化、遺伝子の不安定性、組織浸潤、および転移を可能とするかまたは補助することにより、腫瘍の増殖もまた補助しうる（非特許文献１；非特許文献２）。
【０００３】
ＨＩＦとは、その両方が塩基性ヘリックスーループーヘリックス転写因子である、ベータサブユニットと複合したアルファサブユニットからなるヘテロ二量体である。ＨＩＦのベータサブユニットは、構成的な核タンパク質である。アルファサブユニットは、酸素反応経路に特異的な調節サブユニットであり、ＨＩＦ１アルファ、ＨＩＦ２アルファ、またはＨＩＦ３アルファ（それぞれ、ＨＩＦ１α、ＨＩＦ２α、およびＨＩＦ３α）という３つのサブユニットの１つでありうる（非特許文献２；非特許文献３）。
【０００４】
腫瘍が血液供給を確立するまでは、低酸素状態が腫瘍の増殖を制限する。これに続いてＨＩＦ１α活性が上昇する結果、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）などの標的遺伝子の発現が上昇する。ＶＥＧＦの発現は、大半の充実性腫瘍における血管形成および血管新生の確立に不可欠である（非特許文献４）。ＨＩＦ１α、ＶＥＧＦの過剰発現、および腫瘍の悪

性度の著明な関連はまた、悪性度が最も高い（患者の平均生存期間が１年未満である）神経膠腫であるヒト多形性神経膠芽腫においても見られる。急速に増殖する腫瘍がその血液供給を上回る結果、広範な壊死が生じ、これらの領域が高レベルのＨＩＦ１αタンパク質およびＶＥＧＦ　ｍＲＮＡを発現することから、低酸素状態に対する腫瘍の反応が示唆される（Ｚａｇｚａｇら、Ｃａｎｃｅｒ、８８巻、２６０６～２６１８頁、２０００年）。

【０００５】

ＨＩＦ２α（また、内皮ＰＡＳドメインタンパク質１（ＥＰＡＳ１）、ＭＯＰ２、低酸素誘導因子２、ＨＩＦ関連因子（ＨＲＦ）、ＨＩＦ１アルファ様因子（ＨＬＦ）とも称する）をコードする遺伝子は当初、内皮細胞内において発現する転写因子として同定された（非特許文献５；非特許文献６；非特許文献７；非特許文献８）。ＨＩＦ活性がどのようにしてＶＥＧＦの発現を調節するのかを示す実験により、ＥＰＡＳ１活性の上昇と血管新生との連関が裏付けられている。正常なヒト腎細胞のＥＰＡＳ１は低レベルであることが典型的であるが、ＥＰＡＳ１をコードするベクターをこれらの細胞内に導入すると、ＶＥＧＦのｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルが著明に上昇する（非特許文献９）。ＥＰＡＳ１を阻害したところ、ＶＥＧＦの発現は著明に低下し、これにより、ＥＰＡＳ１の活性とＶＥＧＦの発現との直接の連関が裏付けられた（非特許文献９）。ＨＩＦの活性とＶＥＧＦの発現との相関はまた、悪性細胞および悪性組織においても観察される。ＥＰＡＳ１は、ＥＰＡＳ１をコードするベクターの不在下にある腎細胞癌（ＲＣＣ）細胞株内において容易に検出することができる（非特許文献９）。正常組織と比較した、腎細胞癌の組織試料中におけるＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡおよびＶＥＧＦ　ｍＲＮＡの著明な増大は、ＥＰＡＳ１の異常な活性化が、ＲＣＣによる血管新生に関与しうることを示唆する（非特許文献９）。

【０００６】

ＲＣＣに加え、他の悪性腫瘍におけるＥＰＡＳ１の発現もまた報告されている。ＥＰＡＳ１は、ヒト膀胱癌、とりわけ、浸潤性の表現型を有するヒト膀胱癌において、ｍＲＮＡおよびタンパク質のレベルで発現する（非特許文献１０）。ＥＰＡＳ１の過剰発現の別の例は、頭頚部扁平上皮細胞癌（ＳＣＨＮＣ）においても見られる。ＥＰＡＳ１レベルの上昇は、ＳＣＨＮＣの局所的な侵襲性挙動のほか、血管新生の強化とも関連する（非特許文献１１）。これらの知見はまた、ＥＰＡＳ１の過剰発現と、化学療法に対する耐性との連関も裏付けた。ＥＰＡＳ１の過剰発現と癌とのさらに別の相関は、良性の褐色細胞腫と比べるとＥＰＡＳ１レベルの上昇およびＶＥＧＦ経路の誘導を示す、悪性の褐色細胞腫においても見られる（非特許文献１２）。ＥＰＡＳ１の過剰発現はまた、肺非小細胞癌（ＮＳＣＬＣ）においても一般的なイベントであり、癌細胞による多数の血管新生に関わる因子の上方調節および血管新生に関わる受容体の過剰発現にも関連する。ＮＳＣＬＣにおけるＥＰＡＳ１の過剰発現は、予後不良の指標である（非特許文献１３）。ＥＰＡＳ１のｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルの上昇は、ヒト肺腺癌細胞においても見られ、低酸素状態に対するこれらの細胞の曝露により、ＥＰＡＳ１の発現がさらに上昇する（非特許文献１４）。まとめると、これらの研究は、ＥＰＡＳ１の上昇により侵襲性の腫瘍挙動がもたらされ、ＨＩＦ経路の標的化が、異なる複数種の癌の治療を補助しうることを裏付ける。

【０００７】

さらに、低酸素状態の反応エレメントは、正常酸素状態下の癌細胞株内におけるＶＥＧＦアイソフォームの構成的な上方調節においても役割を果たす。神経膠芽腫細胞内の細胞型特異的なエンハンサーエレメント内にあるＨＲＥは、ＨＲＥに対するＥＰＡＳ１結合の増強を介して、ＶＥＧＦ発現の上方調節に関与する（非特許文献１５）。低酸素誘導因子１ベータには結合しうるがＨＲＥには結合しえない、ＥＰＡＳ１の切断型には、ＶＥＧＦプロモーターの転写活性化が不可能であった（非特許文献１６）。これは、血管形成および血管新生に必要とされる因子の発現を増強することにより低酸素状態に対抗する、癌細胞の能力をさらに裏付ける。

【先行技術文献】

【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】Ｈａｒｒｉｓ、Ｎａｔ．　Ｒｅｖ．　Ｃａｎｃｅｒ、２巻、３８～４７頁、２００２年
【非特許文献２】Ｍａｘｗｅｌｌら、Ｃｕｒｒ．　Ｏｐｉｎ．　Ｇｅｎｅｔ．　Ｄｅｖ．、１１巻、２９３～２９９頁、２００１年
【非特許文献３】ＳａｆｒａｎおよびＫａｅｌｉｎ、Ｊ．　Ｃｌｉｎ．　Ｉｎｖｅｓｔ．、１１１巻、７７９～７８３頁、２００３年
【非特許文献４】Ｉｙｅｒら、Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．、１２巻、１４９～１６２頁、１９９８年
【非特許文献５】Ｅｍａら、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　Ｕ．Ｓ．Ａ．、９４巻、４２７３～４２７８頁、１９９７年
【非特許文献６】Ｆｌａｍｍｅら、Ｍｅｃｈ．　Ｄｅｖ．、６３巻、５１～６０頁、１９９７年
【非特許文献７】Ｈｏｇｅｎｅｓｃｈら、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２７２巻、８５８１～８５９３頁、１９９７年
【非特許文献８】Ｔｉａｎら、Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．、１１巻、７２～８２頁、１９９７年
【非特許文献９】Ｘｉａら、Ｃａｎｃｅｒ、９１巻、１４２９～１４３６頁、２００１年
【非特許文献１０】Ｘｉａら、Ｕｒｏｌｏｇｙ、５９巻、７７４～７７８頁、２００２年
【非特許文献１１】Ｋｏｕｋｏｕｒａｋｉｓら、Ｉｎｔ．　Ｊ．　Ｒａｄｉａｔ．　Ｏｎｃｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　Ｐｈｙｓ．、５３巻、１１９２～１２０２頁、２００２年
【非特許文献１２】Ｆａｖｉｅｒら、Ａｍ．　Ｊ．　Ｐａｔｈｏｌ．、１６１巻、１２３５～１２４６頁、２００２年
【非特許文献１３】Ｇｉａｔｒｏｍａｎｏｌａｋｉら、Ｂｒ．　Ｊ．　Ｃａｎｃｅｒ、８５巻、８８１～８９０頁、２００１年
【非特許文献１４】Ｓａｔｏら、Ａｍ．　Ｊ．　Ｒｅｓｐｉｒ．　Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．、２６巻、１２７～１３４頁、２００２年
【非特許文献１５】Ｌｉａｎｇら、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２７７巻、２００８７～２００９４頁、２００２年

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
多くの疾患においてＥＰＡＳ１が関与する結果として、ＥＰＡＳ１の機能を有効に調節することが可能なさらなる薬剤が必要であると長らく考えられてきたが、その必要性は依然として存在する。ＥＰＡＳ１発現の上方調節が多くの異なる種類の癌と関連することを踏まえるなら、このような阻害は、癌の治療においてとりわけ重要である。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本開示は、ＥＰＡＳ１発現を調節するための組成物および方法を提供する。特に、ＥＰＡＳ１発現を調節するためのＲＮＡｉ組成物は、ＥＰＡＳ１と関連する異常な増殖状態を治療するのに有用であると考えられる。異常な増殖状態の例は、癌、腫瘍、過形成、肺線維症、血管新生、乾癬、アテローム性動脈硬化、および血管内における平滑筋細胞の増殖などの過剰増殖障害である。ＥＰＡＳ１の阻害は、このような障害の治療に特に有用な手法でありうる。
【００１１】
したがって、本発明は、ＥＰＡＳ１阻害剤、ならびに標的細胞内におけるＥＰＡＳ１の阻害を達成しうる、これらと関連する方法および組成物を提供する。特に、標的細胞には、癌性細胞または腫瘍細胞など、望ましくない増殖を経る細胞、特定の疾患または状態と関連する過剰な増殖（ｇｒｏｗｔｈおよび／またはｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）を経る

細胞（例えば、自己免疫疾患または移植の拒絶におけるＴ細胞）、および病原体（例えば、細菌細胞および真菌細胞）が含まれる。本発明のＥＰＡＳ１阻害は、ＥＰＡＳ１の発現またはＥＰＡＳ１の生物学的機能（例えば、ＥＰＡＳ１の酵素活性）を低下させることにより、ＥＰＡＳ１を阻害しうる。

【００１２】

ＥＰＡＳ１阻害剤は、核酸、低分子、抗体を包含するペプチド、ペプチド誘導体、またはペプチド模倣体でありうる。

【００１３】

特定の実施形態は、核酸であるＥＰＡＳ１阻害剤に関する。本発明は、特定の条件（例えば、生理学的条件または細胞内条件）下でＥＰＡＳ１の転写物とハイブリダイズし、細胞内における標的遺伝子の発現を低下させる、少なくとも１つの部分を含む単離核酸を提供する。標的遺伝子の転写物は、任意のスプライシング前転写物（すなわち、イントロンを包含する）、スプライシング後転写物のほか、任意のスプライス変異体でありうる。特定の実施形態において、標的遺伝子の転写物は、配列番号１に記載の配列を有する。核酸類型の例には、例えば、ＲＮＡｉ構築物および触媒性の核酸構築物が含まれる。核酸は一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もある。二本鎖核酸はまた、該鎖の一方または他方が一本鎖である突出領域または非相補性領域も包含しうる。一本鎖核酸は、自己相補性領域を包含しうるが、これは、該化合物が、二本鎖螺旋構造の領域を有する、いわゆる「ヘアピン」構造または「ステムループ」構造を形成することを意味する。核酸は、配列番号１（図１）によって指定される核酸配列など、標的遺伝子の核酸配列、またはその任意の相同体（例えば、オルトログおよびパラログ）もしくは変異体（例えば、対立遺伝子変異体）のうちの１０００以下、５００以下、２５０以下、１００以下、または５０以下のヌクレオチドからなる領域に相補的なヌクレオチド配列を含みうる。相補性領域は、好ましくは、少なくとも８ヌクレオチドであり、場合によっては、少なくとも１０、１５、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０ヌクレオチドである。相補性領域は、標的遺伝子転写物のイントロンの範囲内に入る場合もあり、コード配列の範囲内に入る場合もあり、非コード配列の範囲内に入る場合もある。一般に、核酸は、約８～約５００ヌクレオチドまたは同塩基対の長さであり、場合によって、該長さは約１４～約５０ヌクレオチドである。核酸は、ＤＮＡの場合もあり、ＲＮＡの場合もあり、ＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッドの場合もある。任意の一本鎖には、ＤＮＡおよびＲＮＡの混合物のほか、ＤＮＡまたはＲＮＡとして容易に分類できない修飾形態も含まれうる。同様に、二本鎖核酸は、ＤＮＡ：ＤＮＡの場合もあり、ＤＮＡ：ＲＮＡの場合もあり、ＲＮＡ：ＲＮＡの場合もあり、また、任意の一本鎖にも、ＤＮＡおよびＲＮＡの混合物のほか、ＤＮＡまたはＲＮＡとして容易に分類できない改変形態が含まれうる。核酸は、骨格（ヌクレオチド間の結合を含めた、天然の核酸における糖－リン酸部分）または塩基部分（天然核酸のプリン部分またはピリミジン部分）に対する１つまたは複数の修飾を含めた、各種の修飾のいずれかを包含しうる。核酸は、約１５～約３０ヌクレオチドの長さであることが好ましく、血清中、細胞内、または経口送達される核酸の場合における胃、および吸入される核酸の場合の肺など、該核酸が送達される可能性が高い場所における安定性などの特徴を改善する１つまたは複数の修飾を含有することが多い。ＲＮＡｉ構築物の場合、標的転写物に相補的な鎖は一般に、ＲＮＡまたはその修飾体である。他の鎖は、ＲＮＡの場合もあり、ＤＮＡの場合もあり、他の任意の変異体の場合もある。二本鎖ＲＮＡｉ構築物または一本鎖「ヘアピン」ＲＮＡｉ構築物の二重鎖部分は、好ましくは、１８～３０ヌクレオチドの長さであり、場合によっては、約２１～２７ヌクレオチドの長さである。触媒性または酵素性の核酸は、リボザイムの場合もあり、ＤＮＡ酵素の場合もあり、また、修飾形態も含有しうる。本明細書における核酸は、生理学的条件下、ノンセンス対照またはセンス対照がほとんどまたはまったく影響を及ぼさない濃度で細胞と接触させた場合、標的のＥＰＡＳ１遺伝子の発現を約５０％、７５％、９０％以上阻害しうる。核酸の作用を調べるのに好ましい濃度は、１、５、１０、２０、５０、１００、または１０００ナノモルである。本明細書における核酸はまた、細胞の表現型に対する効果についても調べるこ

とができる。特定の癌細胞株の場合、標的核酸の投与時において、細胞死または増殖速度の低下を測定することができる。好ましくは、実験的に有意味な核酸濃度では、細胞増殖が５０％を超えて阻害される。

【００１４】

特定の態様において、本発明は、各種のＥＰＡＳ１阻害剤、例えば、ＥＰＡＳ１遺伝子（または標的とされる核酸）を標的とする核酸のいずれかを含む医薬組成物を提供する。医薬組成物は一般に、薬学的に許容される担体を包含する。医薬組成物は、生理学的条件下で標的の遺伝子転写物とハイブリダイズし、細胞内における標的遺伝子の発現を低下させる核酸を含みうる。

【００１５】

特定の態様において、本発明は、細胞内におけるＥＰＡＳ１遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。該方法は、該細胞を、生理学的条件下で標的のＥＰＡＳ１転写物とハイブリダイズし、細胞内における標的遺伝子の発現を低下させる有効量の核酸と接触させるステップを含みうる。ＥＰＡＳ１を標的とする、開示される核酸のいずれかを、このような方法において用いることができる。細胞は、腫瘍細胞または癌性細胞の場合もあり、病原体細胞の場合もあり、正常細胞の場合もある。特定の実施形態において、正常細胞は、患者における特定の疾患または状態をもたらす、望ましくない増殖を経る。

【００１６】

特定の態様において、本発明は、対象における腫瘍の増殖速度を低下させる方法であって、該腫瘍の増殖速度を低下させるのに十分な量の、本明細書におけるＥＰＡＳ１阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。特定の態様において、本発明は、癌に罹患する患者を治療する方法であって、本明細書におけるＥＰＡＳ１阻害剤を該患者に投与するステップを含む方法を提供する。ＥＰＡＳ１阻害剤は、核酸、例えば、ＲＮＡｉ核酸または触媒性核酸であり得、薬学的に許容される担体と共に製剤化することができる。場合によって、腫瘍は、核酸が標的とする遺伝子を発現する１つまたは複数の癌細胞を含む。標的のＥＰＡＳ１遺伝子は、同等の組織に由来する非癌性細胞と比べて過剰発現しうる。腫瘍はまた、転移性腫瘍でもありうる。このような治療は、核酸と共に相加的または相乗作用的な形で癌細胞を阻害する、少なくとも１つのさらなる抗癌化学療法剤と組み合わせることができる。核酸および（１つまたは複数の）さらなる抗癌剤は、組合せ製剤として併せて製剤化することもでき、個別に製剤化し、組合せ効果を達成するような形（例えば、タイミング、用量）で投与することもできる。

【００１７】

特定の態様において、本発明は、例えば、癌または病原体による感染を治療するための医薬の製造における核酸の使用を提供する。

【００１８】

特定の態様において、本発明は、病原体が感染した患者または病原体により汚染された対象から病原体を除去または低減するための方法および組成物を提供する。

【００１９】

本発明の別の態様は、パッケージ化された医薬品を提供する。このようなパッケージ化された医薬品は、（ｉ）ＥＰＡＳ１遺伝子を標的とする、本明細書で開示される治療有効量の阻害剤と、（ｉｉ）ＥＰＡＳ１遺伝子を発現する腫瘍を有する患者を治療するためのＥＰＡＳ１阻害剤の投与のための指示書および／またはラベルとを含む。

【００２０】

本発明の別の態様は、パッケージ化された消毒剤を提供する。パッケージ化された消毒剤は、病原体などの１つまたは複数の感染作用物質に対して特的なものであってもよい。このようなパッケージ化された消毒剤は、（ｉ）感染作用物質中におけるＥＰＡＳ１遺伝子を標的とする有効量のＥＰＡＳ１阻害剤と、（ｉｉ）感染作用物質の量を除去または低減するためのＥＰＡＳ１阻害剤の投与のための指示書および／またはラベルとを含む。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図１－１】図１は、ヒトＥＰＡＳ１のｃＤＮＡ配列（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号第ＮＭ＿００１４３０号）（配列番号１）を示す図である。下線を付して太字とした１１塩基ずつの３つの連続塩基は、配列番号２～４により表されるコア標的配列に対応する。
【図１－２】図１は、ヒトＥＰＡＳ１のｃＤＮＡ配列（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号第ＮＭ＿００１４３０号）（配列番号１）を示す図である。下線を付して太字とした１１塩基ずつの３つの連続塩基は、配列番号２～４により表されるコア標的配列に対応する。
【図２】図２は、Ａ４９８（ヒト腎癌）細胞内における３つの初期ｓｉＲＮＡ二重鎖：ｓｉＥＰＡＳ１Ａ（配列番号５および６）、ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ（配列番号７および８）、およびｓｉＥＰＡＳ１Ｃ（配列番号９および１０）の抗ＥＰＡＳ１活性の評価を示す図である。ｓｉＣＯＮ１がＥＰＡＳ１の下方調節（トランスフェクトされない細胞と比べて）を示さなかったのに対し、ＥＰＡＳ１に対する３つのｓｉＲＮＡすべてが、ＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡに対する著明な下方調節を示した。
【図３】図３Ａは、Ａ４９８細胞の３つの初期部位の近傍にある、さらなるｓｉＲＮＡ二重鎖の抗ＥＰＡＳ１活性を示す。検討された二重鎖のうちで、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－１、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ＋３、ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ－４、およびｓｉＥＰＡＳ１Ｃ－４が、最も強力な抗ＥＰＡＳ１活性を示した。図３Ｂは、タイリング実験の設計についての例示である。
【図４】図４は、Ａ４９８細胞の増殖に対する、複数の抗ＥＰＡＳ１　ｓｉＲＮＡ二重鎖（最も強力な抗ＥＰＡＳ１活性を示した二重鎖；図３Ａを参照されたい）の効果をさらに検討する図である。被験のｓｉＲＮＡ二重鎖のうち、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２およびｓｉＥＰＡＳ１Ａが、リアルタイム細胞電子センシング（ＲＴ－ＣＥＳ）により測定されたＡ４９８細胞の増殖に対する最も著明な阻害剤である。
【図５】図５は、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２（配列番号２９および３０）が、培養されたヒト腎細胞癌細胞株（Ａ４９８、７８６－Ｏ、およびＣａｋｉ－１）における細胞内ＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡレベルを有効に低下させることを示す図である。
【図６Ａ】図６は、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２による治療時における細胞増殖速度の低下を示す図である。ＶＨＬ状態に基づき予測される通り、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２が、Ａ４９８細胞および７８６－Ｏ細胞においては著明な抗増殖効果を達成したが、Ｃａｋｉ－１細胞においては同効果を達成しなかったことにより、ＶＨＬを欠損する癌細胞が、細胞内ＨＩＦレベルを低下させる治療に適する候補細胞であることが示される。
【図６Ｂ】図６は、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２による治療時における細胞増殖速度の低下を示す図である。ＶＨＬ状態に基づき予測される通り、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２が、Ａ４９８細胞および７８６－Ｏ細胞においては著明な抗増殖効果を達成したが、Ｃａｋｉ－１細胞においては同効果を達成しなかったことにより、ＶＨＬを欠損する癌細胞が、細胞内ＨＩＦレベルを低下させる治療に適する候補細胞であることが示される。
【図６Ｃ】図６は、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２による治療時における細胞増殖速度の低下を示す図である。ＶＨＬ状態に基づき予測される通り、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２が、Ａ４９８細胞および７８６－Ｏ細胞においては著明な抗増殖効果を達成したが、Ｃａｋｉ－１細胞においては同効果を達成しなかったことにより、ＶＨＬを欠損する癌細胞が、細胞内ＨＩＦレベルを低下させる治療に適する候補細胞であることが示される。
【発明を実施するための形態】
【００２２】
発明の概要
本発明の一態様は、配列番号２～４から選択される配列を含む、約１５～約３０ヌクレオチドの長さの第１鎖と、約１５～約３０ヌクレオチドの長さの第２鎖とを含み、第１鎖および第２鎖のうちの少なくとも１２ヌクレオチドが互いに相補的であり、生理学的条件下で二本鎖核酸を形成し、該二本鎖核酸が、ＲＮＡ干渉機構を介して細胞内における内皮ＰＡＳドメインタンパク質１（ＥＰＡＳ１）の発現を低下させうる核酸に関する。
【００２３】
特定の実施形態において、核酸は、場合によって、約１５～約３０ヌクレオチドの長さ

の二本鎖ＲＮＡである。他の実施形態において、核酸は、約４～約１０ヌクレオチドの長さのループ領域を含むヘアピンＲＮＡである。本明細書で開示される実施形態のいずれかにおいて、核酸は、その第１鎖としてのＤＮＡポリヌクレオチドと、その第２鎖としてのＲＮＡポリヌクレオチドとを含みうる。一部の実施形態において、前出の核酸の第１鎖および／または第２鎖は、３’突出領域を含む場合もあり、５’突出領域を含む場合もあり、３’突出領域および５’突出領域の両方を含む場合もあり、該突出領域は、場合によって、約１～約１０ヌクレオチドの長さを含有する。

【００２４】

開示される実施形態のいずれかにおいて、核酸の第１鎖は、配列番号５、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、および８１から選択される配列を含みうる。同様に、第２鎖は、配列番号６、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、および８２から選択される配列を含みうる。

【００２５】

本発明の別の態様は、生理学的条件下で、配列番号１のヌクレオチド６５５～７１８、２８７８～２９２９、または４９７８～５０３９に対応するＥＰＡＳ１転写物の領域とハイブリダイズし、細胞内におけるＥＰＡＳ１の発現を低下させる配列を含む単離核酸に関する。さらなる実施形態において、該核酸は、配列番号１のヌクレオチド６６５～７０８、２８８８～２９１９、または４９８８～５０２９に対応するＥＰＡＳ１転写物の領域とハイブリダイズする配列を含む。特定の実施形態において、該核酸は、配列番号１のヌクレオチド６７０～７０３、２８９３～２９１４、または４９９２～５０２４に対応するＥＰＡＳ１転写物の領域とハイブリダイズする配列を含む。特定の実施形態において、該核酸は、一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もある。

【００２６】

開示される実施形態のうちのいずれかにおいて、核酸は、前記ＥＰＡＳ１の領域のうちの１つに相補的な少なくとも１０の連続ヌクレオチドを含みうる。該核酸は、約１４～約５０ヌクレオチドの長さでありうる。本明細書に記載の核酸は、ＲＮＡ分子の場合もあり、ＤＮＡ分子の場合もあり、ＤＮＡ鎖およびＲＮＡ鎖を含む場合もある。

【００２７】

一部の実施形態において、開示される核酸のうちのいずれかは、配列番号２～４から選択される配列を含むＲＮＡｉ構築物でありうる。特定の実施形態において、該核酸は、配列番号５～８２から選択される配列を含むＲＮＡｉ構築物である。他の実施形態において、該核酸は、酵素性核酸、例えば、リボザイムまたはＤＮＡ酵素でありうる。

【００２８】

本発明の特定の実施形態において、開示される核酸のうちのいずれかは、ＲＮＡｉ構築物、例えば、ｄｓＲＮＡまたはヘアピンＲＮＡでありうる。ＲＮＡｉ構築物の二重鎖部分は、約１５～約３０ヌクレオチドの長さでありうる。

【００２９】

開示される実施形態のうちのいずれかにおいて、核酸は、場合によって、以下：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、アルキルホスホノチオエート、ホスホルアミデート、リン酸エステル、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、リン酸トリエステルのうちの１つまたは複数を含みうる、１つまたは複数の修飾骨格部分または修飾塩基部分を含む。該修飾骨格部分または修飾塩基部分は、場合によって、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。

【００３０】

特定の実施形態において、上記の核酸、および／または上記の適用可能な組合せのうち

のいずれかによる核酸は、生理学的条件下で、例えば、約１０または約２０ナノモルの濃度で細胞と接触させると、該細胞におけるＥＰＡＳ１発現を５０％以上阻害する。

【００３１】

本発明の別の態様は、開示される実施形態のうちのいずれかによる核酸と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物に関する。

【００３２】

特定の実施形態において、薬学的に許容される担体には、陽イオンポリマーが含まれる。薬学的に許容される担体には、シクロデキストリンポリマー、例えば、ｉｍ－ＣＤＰが含まれる。特定の実施形態において、医薬組成物は、シクロデキストリンポリマー、および開示される核酸のうちのいずれかを包含する粒子を含む場合もあり、かつ／またはＰＥＧ化される場合もある。

【００３３】

他の実施形態において、医薬組成物の粒子は、アダマンタンをさらに含みうる。一部の実施形態において、医薬組成物は、特定の組織型または細胞型を標的とするリガンドを含み、場合によって、該リガンドは、トランスフェリンを含む。特定の実施形態において、医薬組成物は、約５０～約７０ｎｍの直径、例えば、約５０ｎｍの直径など、約１０～約１００ｎｍの直径のナノ粒子を含む。

【００３４】

さらなる実施形態において、薬学的に許容される担体は、イミダゾール修飾された、シクロデキストリンを含有する陽イオンポリマーと、アダマンタン－ＰＥＧ－リガンドを含む標的化部分とを含み、該ポリマーおよび標的化部分は、該核酸を封入するナノ粒子を形成する。該ナノ粒子は、約５０～約１００ｎｍ、例えば、約５０～約７０ｎｍ、さらにまたは約５０ｎｍなど、約５０～約１２０ｎｍの直径である。例えば、医薬組成物の標的化リガンドは、ガラクトースおよび／またはトランスフェリンを含みうる。

【００３５】

さらなる態様において、本発明は、細胞の望ましくない増殖と関連する疾患または状態を治療するための医薬の製造における、開示される核酸のうちのいずれかの使用に関する。細胞は、癌性細胞の場合もあり、腫瘍細胞の場合もあり、病原性細胞の場合もある。特定の実施形態において、細胞は、その望ましくない増殖により疾患または状態がもたらされる正常細胞でありうる。

【００３６】

本発明の他の態様は、癌を有する患者を治療する方法であって、治療有効量の、上述の核酸のうちのいずれかを該患者に投与するステップを含む方法に関する。特定の実施形態において、該方法は、例えば、核酸と共に相加的または相乗作用的な形で癌細胞の増殖を阻害する、少なくとも１つのさらなる抗癌化学療法剤、例えば、フルオロウラシル（５ＦＵ）を投与するステップをさらに含みうる。一部の実施形態において、癌細胞は、同等の組織に由来する非癌性細胞と比較してより高レベルのＥＰＡＳ１を発現する。

【００３７】

特定の実施形態において、本発明は、癌を有する患者を治療する方法であって、ＲＮＡｉ機構を介してＥＰＡＳ１の発現を低下させる治療有効量の二本鎖核酸と、ＥＰＡＳ１発現を誘導する１つまたは複数の抗癌剤とを該患者に投与するステップを含む方法に関する。

【００３８】

上記または他の箇所に記載の方法のうちのいずれかにおいて、核酸は、薬学的に許容される担体と共に製剤化することができる。特定の実施形態において、該核酸は、腎明細胞癌などの癌細胞を標的とするリガンドと共に製剤化することができ、例えば、該リガンドは、場合によってトランスフェリンおよび／またはガラクトースを含む。該核酸は、ポリマーナノ粒子による成分として製剤化することができ、該ナノ粒子は、約５０～約１２０ｎｍの直径、例えば、約５０～約１００ｎｍの直径、さらにまたは約５０ｎｍの直径など、約１０～約１２０ｎｍの直径である。

【００３９】
本明細書で開示される方法のうちのいずれかにおいて、治療有効量の核酸は、全身投与することができる。
【００４０】
本明細書に記載の方法は、核酸を投与するステップの前に、患者におけるフォンヒッペルーリンダウ（ＶＨＬ）タンパク質活性のレベルを決定するステップをさらに含みうる。例えば、前記活性は、健康な対象におけるＶＨＬのＲＮＡレベルまたはタンパク質レベルと比較した、該患者における前記レベルの低下を測定することにより決定することができる。他の実施形態において、前記活性は、切断を引き起こす突然変異または対立遺伝子の喪失を引き起こす突然変異を含む、ＶＨＬ遺伝子における１つまたは複数の突然変異を同定するための遺伝子スクリーニングにより決定することができる。さらに、該１つまたは複数の突然変異は、ノンセンス突然変異、フレームシフトの突然変異、プロモーターの突然変異、エンハンサーの突然変異、スプライス部位の突然変異、ヌル突然変異、またはポリＡテールの突然変異を含みうる。
【００４１】
発明の詳細な説明
概観
ＥＰＡＳ１の活性化は、ＨＩＦの標的遺伝子、中でもとりわけ、ＶＥＧＦ、ＴＧＦ－アルファ、Ｍｅｔ、間質細胞由来因子（ＳＤＦ）１、およびケモカイン受容体であるＣＸＣＲ４をコードする遺伝子の上方調節を結果としてもたらす（Ｓｏｃｃｉｏら、Ｊｏｕｒ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２８０巻、１９４１０～１９４１８頁、２００５年；ＫｉｍおよびＫａｅｌｉｎ、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｏｃｏｌｏｇｙ、２２巻、４９９１～５００４頁、２００４年）。ＥＰＡＳ１は、それ自体として、癌治療の望ましい標的である。特に、ＥＰＡＳ１の上方調節は、腎細胞癌と密接に関連しており、部分的に、そのフォンヒッペルーリンダウ腫瘍抑制遺伝子（ＶＨＬ）との関連に起因する。ＶＨＬの不活化は、多様なＶＨＬ関連異常、特に、腎明細胞癌（ＲＣＣ）の発生と連関する。ＶＨＬ遺伝子の産物であるｐＶＨＬは、ＨＩＦのαサブユニットを認識し、それをポリユビキチン化およびプロテアソームによる分解の標的とする複合体の一部である。したがって、ＶＨＬが欠損する癌細胞は、ＨＩＦレベルが高く、細胞内ＨＩＦレベルを低下させる治療の良好な候補細胞となっている。
【００４２】
ＥＰＡＳ１の阻害は、その酵素活性など、細胞内におけるＥＰＡＳ１の生物学的活性を阻害することにより達成することができる。代替的に、ＥＰＡＳ１の阻害は、細胞内におけるＥＰＡＳ１遺伝子の発現を阻害することによっても達成することができる。ＥＰＡＳ１の活性および／または発現を下方調節する低分子および核酸が利用可能である。少数の例には、アンチセンス分子（例えば、米国特許第７，２１７，５７２号）および短鎖ヘアピンＲＮＡ（Ｋｏｎｄｏら、１巻、３号、４３９～４４４頁、２００３年；およびＺｉｍｍｅｒら、２巻、８９～９５頁、２００４年で説明される）が含まれる。にもかかわらず、ＥＰＡＳ１を下方調節する新規のツールとして、新規であり、また改善されたＥＰＡＳ１阻害剤が依然として所望される。
【００４３】
核酸によるＥＰＡＳ１阻害剤
特定の態様において、対象の発明は、ＥＰＡＳ１遺伝子の核酸阻害剤、また、例えばＥＰＡＳ１遺伝子の発現を低下させるかまたは下方調節することによりＥＰＡＳ１遺伝子またはＥＰＡＳ１タンパク質の活性を阻害するかまたは低下させる方法を提供する。「阻害する」または「低下させる」とは、１つまたは複数のタンパク質またはタンパク質サブユニットをコードする遺伝子の発現、または核酸もしくは同等核酸のレベルが、対象の発明による核酸薬剤の不在下において観察される発現またはレベル未満に低下することを意味する。
【００４４】

本明細書で用いられる「核酸」または「核酸薬剤」という用語は、ヌクレオチドを含有し、ＥＰＡＳ１遺伝子に対して所望の効果を及ぼす、任意の核酸ベースの化合物を指す。該核酸は、一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もあり、多数本鎖の場合もあり、また、修飾ヌクレオチドを含む場合もあり、非修飾ヌクレオチドを含む場合もあり、ヌクレオチド以外の分子を含む場合もあり、これら各種の混合物および組合せを含む場合もある。対象の発明による核酸薬剤の例には、ｄｓＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、および酵素核酸が含まれるがこれらに限定されない。

【００４５】

特定の実施形態において、対象の発明は、真核生物または原核生物を含めた１つまたは複数の種に由来するＥＰＡＳ１遺伝子またはＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡを標的とする核酸阻害剤を提供する。特定の実施形態では、該核酸阻害剤を、それらが、特定の種に由来するＥＰＡＳ１遺伝子またはＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの配列の発現は特異的に阻害するが、他の種に由来するＥＰＡＳ１遺伝子またはＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの発現は阻害しないように設計することができる。例えば、病原体感染の治療に有用な核酸阻害剤を、それらが、病原体におけるＥＰＡＳ１遺伝子またはＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの発現は特異的に阻害するが、宿主のＥＰＡＳ１遺伝子またはＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの発現は阻害しないように設計することができる。

【００４６】

特定の実施形態において、対象の発明は、ＥＰＡＳ１遺伝子内における１つまたは複数の特定の領域を標的とする、ＥＰＡＳ１遺伝子の核酸阻害剤を提供する。ヒトＥＰＡＳ１遺伝子内における例示的な領域には、下記の表１（また、図１も参照されたい）に示されるコア標的領域が含まれる。コア標的配列とは一般に、例えば、ｄｓＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、および酵素核酸などの阻害核酸が配列特異的に結合するとＥＰＡＳ１の発現を有効に阻害する、標的ＥＰＡＳ１遺伝子または対応するｍＲＮＡの部分を指す。一般に、核酸阻害剤は、コア標的配列を含むＥＰＡＳ１タンパク質の領域、またはＥＰＡＳ１遺伝子もしくはＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの配列内にあるコア標的領域の一端または両端に隣接する５、１０、または２０ヌクレオチド、例えば、コア標的部位±５、±１０、または±２０ヌクレオチド（一端または両端における）を含む、ＥＰＡＳ１遺伝子またはＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの部分と、厳密な条件下でハイブリダイズしうる。表１に示されるコア標的配列は、ヒトＥＰＡＳ１配列から得たが、本明細書では、他の哺乳動物など他の真核生物を含めた他の種に由来するＥＰＡＳ１配列内にある同等の領域もまた意図される。

【００４７】

【表１】

表1: EPAS1(HIF2α)のコア標的配列の例

名称	センス配列	配列番号
EPAS1-0677コア	5’ acacacaagcu 3’	配列番号2
EPAS1-2894コア	5’ gccacccagua 3’	配列番号3
EPAS1-4999コア	5’ ugucaacguaa 3’	配列番号4

ｄｓＲＮＡ構築物およびＲＮＡｉ構築物

特定の実施形態において、対象の発明は、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）構築物およびＲＮＡｉ構築物に関する。本明細書で用いられる「ｄｓＲＮＡ」という用語は、ｓｉＲＮＡを含めた、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）が可能な二本鎖ＲＮＡ分子を指す（例えば、Ｂａｓｓ、Ｎａｔｕｒｅ、４１１巻、４２８～４２９頁、２００１年；Ｅｌｂａｓｈｉｒら、Ｎａｔｕｒｅ、４１１巻、４９４～４９８頁、２００１年；Ｋｒｅｕｔｚｅｒら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ００／４４８９５号；Ｚｅｒｎｉｃｋａ－Ｇｏｅｔｚら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ０１／３６６４６号；Ｆｉｒｅ、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ９９／３２６１９号；Ｐｌａｅ

ｔｉｎｃｋら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ００／０１８４６号；ＭｅｌｌｏおよびＦｉｒｅ、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ０１／２９０５８号； Ｄｅｓｃｈａｍｐｓ－Ｄｅｐａｉｌｌｅｔｔｅ、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ９９／０７４０９号；ならびにＬｉら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ００／４４９１４号を参照されたい）。加えて、ＲＮＡｉとは当初、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）が、転写後において特異的に遺伝子発現を遮断する、植物および線虫において観察された現象に適用された用語である。ＲＮＡｉは、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏにおける遺伝子発現を阻害するかまたは低下させる有用な方法を提供する。

【００４８】

本明細書で用いられる「短鎖干渉ＲＮＡ」、「ｓｉＲＮＡ」、または「短鎖干渉核酸」という用語は、細胞により適切にプロセシングされるとＲＮＡｉまたは遺伝子サイレンシングを媒介することが可能な任意の核酸を指す。例えば、ｓｉＲＮＡは、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であり得、該アンチセンス領域は、標的遺伝子に対する相補性を含む。ｓｉＲＮＡは、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む一本鎖ヘアピンポリヌクレオチドであり得、該アンチセンス領域は、標的遺伝子に対する相補性を含む。ｓｉＲＮＡは、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む、２つ以上のループ構造およびステムを有する環状一本鎖ポリヌクレオチドであり得、該アンチセンス領域は、標的遺伝子に対する相補性を含み、該環状ポリヌクレオチドは、ｉｎ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｔｒｏにおいてプロセシングされて、ＲＮＡｉの媒介が可能な活性ｓｉＲＮＡを生成する。ｓｉＲＮＡはまた、標的遺伝子に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドも含み、該一本鎖ポリヌクレオチドは、５’－リン酸（例えば、Ｍａｒｔｉｎｅｚら、Ｃｅｌｌ、１１０巻、５６３～５７４頁、２００２年を参照されたい）、または５’，３’－二リン酸などの末端リン酸基をさらに含みうる。特定の実施形態において、ｓｉＲＮＡは、標的核酸に結合し、標的核酸の活性を変化させる、非酵素性核酸である。ｓｉＲＮＡの結合および／または活性は、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（またはＲＩＳＣ）など、１つまたは複数のタンパク質またはタンパク質複合体との相互作用により促進されうる。特定の実施形態において、ｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡ分子の１本の鎖の単一の連続配列に沿って、標的配列に相補的な配列を含む。

【００４９】

場合によって、対象の発明によるｓｉＲＮＡは、阻害される遺伝子（「標的」遺伝子）のｍＲＮＡ転写物の少なくとも一部のヌクレオチド配列と、生理学的条件下で（例えば、細胞内環境において）ハイブリダイズするヌクレオチド配列を含有する。二本鎖ＲＮＡは、それがＲＮＡｉを媒介する能力を有するのに十分な程度に天然ＲＮＡに類似することだけが必要である。したがって、対象の発明は、遺伝子の突然変異、細胞株の多型、または進化的多様性に起因して予測されうる配列変異体を許容しうることの利点を有する。標的配列と、ｓｉＲＮＡ配列との間で許容されるヌクレオチドのミスマッチ数は、５塩基対中の１カ所、１０塩基対中の１カ所、２０塩基対中の１カ所、５０塩基対中の１カ所である。ｓｉＲＮＡ二重鎖の中央部におけるミスマッチは極めて重大であり、標的ＲＮＡの切断を本質的に消失させうる。これに対し、標的ＲＮＡに相補的なｓｉＲＮＡ鎖の３’端にあるヌクレオチドは、標的認識の特異性にさほど寄与しない。配列の同一性は、当技術分野で公知の配列比較およびアライメントアルゴリズム（ＧｒｉｂｓｋｏｖおよびＤｅｖｅｒｅｕｘ、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ」、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ社、１９９１年、および同書に引用される参考文献を参照されたい）により、また、例えば、デフォルトのパラメータを用いるＢＥＳＴＦＩＴソフトウェアプログラムにおいて実装されるスミス－ウォーターマンアルゴリズム（例えば、ウィスコンシン大学遺伝子計算グループ）を介して、ヌクレオチド配列間の百分率による差違を計算することにより最適化することができる。ｓｉＲＮＡと標的遺伝子の部分との９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超える配列同一性、さらにまたは１００％の配列同一性が好ましい。代替的に、ＲＮＡの二重鎖領域は、厳密な条件（例えば、４００ｍＭ ＮａＣｌ、４０ｍＭ ＰＩＰＥＳ ｐＨ６．４、１ｍＭ ＥＤＴＡ、５０℃または７０

℃で１２～１６時間にわたるハイブリダイゼーション；その後、洗浄する）下で標的遺伝子転写物の部分とハイブリダイズすることが可能なヌクレオチド配列として機能的に定義することもできる。

【００５０】

ｄｓＲＮＡの二本鎖構造は、１本の自己相補性ＲＮＡ鎖、２本の相補性ＲＮＡ鎖、またはＤＮＡ鎖および相補的なＲＮＡ鎖により形成することができる。場合によって、ＲＮＡ二重鎖の形成は、細胞の内側で誘発することもでき、細胞の外側で誘発することもできる。ＲＮＡは、細胞当たり少なくとも１コピーの送達を可能とする量で導入することができる。より高用量（例えば、細胞当たり少なくとも５、１０、１００、５００、または１０００コピー）の二本鎖材料は、より有効な阻害をもたらしうるが、具体的な適用ではより低用量もまた有用である。ＲＮＡの二重鎖領域に対応するヌクレオチド配列が阻害の標的とされるという点において、阻害は配列特異的である。

【００５１】

本明細書に記載の通り、対象のｓｉＲＮＡは、約１９～３０ヌクレオチドの長さ、約２１～２７ヌクレオチドの長さ、約２１～２５ヌクレオチドの長さ、または約２１～２３ヌクレオチドの長さの二重鎖領域を含む。ｓｉＲＮＡは、特定の配列に対合することにより、ヌクレアーゼ複合体を動員し、標的の遺伝子転写物へと該複合体を誘導することが理解される。結果として、該タンパク質複合体内におけるヌクレアーゼにより標的遺伝子の転写物が分解される。特定の実施形態において、ｓｉＲＮＡ分子は、３’ヒドロキシル基を含む。特定の実施形態では、例えば、酵素であるダイサーの存在下においてより長い二本鎖ＲＮＡをプロセシングすることにより、例えば、ｉｎ　ｓｉｔｕでｓｉＲＮＡ構築物を作製することができる。一実施形態では、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａのｉｎ　ｖｉｔｒｏ系を用いる。この実施形態では、ｄｓＲＮＡを、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａの胚に由来する可溶性抽出物と混合し、これにより混合物を作製する。該混合物を、ｄｓＲＮＡが、約２１～約２７ヌクレオチドのＲＮＡ分子へとプロセシングされる条件下で維持する。ｓｉＲＮＡ分子は、当業者に公知の多数の技法を用いて精製することができる。例えば、ゲル電気泳動を用いてｓｉＲＮＡを精製することができる。代替的に、非変性型のカラムクロマトグラフィーなど、非変性法を用いてｓｉＲＮＡを精製することもできる。加えて、クロマトグラフィー（例えば、サイズ除外クロマトグラフィー）、グリセロール勾配遠心分離、抗体によるアフィニティー精製を用いてｓｉＲＮＡを精製することもできる。

【００５２】

対象のｄｓＲＮＡ（例えば、ｓｉＲＮＡ）の作製は、化学合成法により実施することもでき、組換え核酸法により実施することもできる。処理された細胞の内因性ＲＮＡポリメラーゼによりｉｎ　ｖｉｖｏにおける転写を媒介させる場合もあり、クローニングされたＲＮＡポリメラーゼを用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける転写を行う場合もある。本明細書で用いられる対象の発明によるｄｓＲＮＡ分子またはｓｉＲＮＡ分子は、ＲＮＡだけを含有する分子に限定される必要はなく、化学修飾されたヌクレオチドおよびヌクレオチド以外の分子をさらに包含する。例えば、ｄｓＲＮＡは、例えば、細胞内ヌクレアーゼに対する感受性を低下させ、バイオアベイラビリティーを改善し、製剤特徴を改善し、かつ／または他の薬物動態特性を変化させる、リン酸－糖骨格またはヌクレオチドに対する修飾を包含しうる。例示を目的として述べると、天然ＲＮＡのホスホジエステル結合は、少なくとも１つの窒素または硫黄のヘテロ原子を包含するように修飾することができる。ＲＮＡ構造における修飾は、ｄｓＲＮＡに対する一般的な反応を回避する一方で、特異的な遺伝子阻害を可能とするように調整することができる。同様に、塩基も、アデノシン脱アミノ酵素の活性を遮断するように修飾することができる。ｄｓＲＮＡは、酵素的に作製することもでき、部分的／全体的な有機合成により作製することもでき、修飾された任意のリボヌクレオチドは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける酵素的合成または有機合成により導入することができる。ＲＮＡ分子を化学修飾する方法を、ｄｓＲＮＡの修飾に適合させることができる（例えば、Ｈｅｉｄｅｎｒｅｉｃｈら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２５巻、７７６～７８０頁、１９９７年；Ｗｉｌｓｏｎら、Ｊ　Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇ．、７

巻、８９～９８頁、１９９４年；Ｃｈｅｎら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２３巻、２６６１～２６６８頁、１９９５年；Ｈｉｒｓｃｈｂｅｉｎら、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｖ．、７巻、５５～６１頁、１９９７年を参照されたい）。例示だけを目的として述べると、ｄｓＲＮＡまたはｓｉＲＮＡの骨格は、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、ホスホロジチオエート（ｐｈｏｓｐｈｏｄｉｔｈｉｏａｔｅｓ）、メチルホスホネート－ホスホジエステルのキメラ、ペプチド核酸、５－プロピニル－ピリミジン含有オリゴマー、または糖修飾（例えば、２’置換リボヌクレオシド、ａ－立体構造）により修飾することができる。特定の場合において、対象の発明のｄｓＲＮＡは、２’－ヒドロキシ（２’－ＯＨ）含有ヌクレオチドを欠く。特定の実施形態において、ｓｉＲＮＡ分子は、ホスホロチオエートによるセンス鎖を含む。特定の実施形態において、ｓｉＲＮＡ分子は、ホスホジエステルによるアンチセンス鎖を含む。

【００５３】

具体的な実施形態において、ｓｉＲＮＡ分子の少なくとも１本の鎖は、約１～約１０ヌクレオチドの長さ、約１～５ヌクレオチドの長さ、約１～３ヌクレオチドの長さ、または約２～４ヌクレオチドの長さの３’突出を有する。特定の実施形態において、ｓｉＲＮＡは、３’突出を有する一方の鎖を含む場合があり、他方の鎖は３’端が平滑末端である（例えば、３’突出を有さない）。別の実施形態において、ｓｉＲＮＡは、両方の鎖において３’突出を含みうる。該突出の長さは、同じの場合もあり、鎖ごとに異なる場合もある。ｓｉＲＮＡの安定性をさらに増強するため、３’突出を分解に対して安定化させることができる。一実施形態では、アデノシンヌクレオチドまたはグアノシンヌクレオチドなどのプリンヌクレオチドを包含することにより、ＲＮＡを安定化させる。代替的に、修飾された類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば、２’－デオキシチミジン（２’－ｄｅｏｘｙｔｈｙｉｎｉｄｉｎｅ）による、３’突出におけるウリジンヌクレオチドの置換は許容され、ＲＮＡｉの効能に影響を及ぼさない。２’ヒドロキシルの不在は、組織培地中における突出のヌクレアーゼ耐性を著明に増強し、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて有益でありうる。

【００５４】

別の具体的な実施形態において、対象のｄｓＲＮＡはまた、長い二本鎖ＲＮＡの形態でもありうる。例えば、ｄｓＲＮＡは、少なくとも２５、５０、１００、２００、３００、または４００塩基である。一部の場合において、ｄｓＲＮＡは、４００～８００塩基の長さである。場合によって、例えば、細胞内においてｓｉＲＮＡ配列を作製するには、ｄｓＲＮＡを細胞内で消化する。しかし、おそらくは、配列に依存しないｄｓＲＮＡ反応により引き起こされうる有害作用のために、ｉｎ ｖｉｖｏにおける長い二本鎖ＲＮＡの使用が常に実用的であるわけではない。このような実施形態において、インターフェロンまたはＰＫＲの作用を低減する局所送達系または局所送達作用物質の使用が好ましい。

【００５５】

さらに具体的な実施形態において、ｄｓＲＮＡまたはｓｉＲＮＡは、ヘアピン構造（またはヘアピンＲＮＡ）の形態である。ヘアピンＲＮＡは、外因的に合成することもでき、ｉｎ ｖｉｖｏにおけるＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターから転写することにより形成することもできる。哺乳動物細胞における遺伝子サイレンシングのために、このようなヘアピンＲＮＡを作製および使用する例は、例えば、Ｐａｄｄｉｓｏｎら、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、１６巻、９４８～５８頁、２００２年；ＭｃＣａｆｆｒｅｙら、Ｎａｔｕｒｅ、４１８巻、３８～９頁、２００２年；ＭｃＭａｎｕｓら、ＲＮＡ、８巻、８４２～５０頁、２００２年；Ｙｕら、Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． Ｕ．Ｓ． Ａ．、９９巻、６０４７～６０５２頁、２００２年において説明されている。このようなヘアピンＲＮＡを細胞内または動物内において操作し、標的遺伝子の連続的で安定した抑制を確保することが好ましい。細胞内におけるヘアピンＲＮＡのプロセシングによりｓｉＲＮＡを作製しうることは、当技術分野において公知である。

【００５６】

ＰＣＴ特許出願第ＷＯ０１／７７３５０号は、真核細胞内における同じトランス遺伝子のセンスおよびアンチセンス両方のＲＮＡ転写物をもたらす、トランス遺伝子の２方向的な転写のための例示的なベクターについて説明している。したがって、特定の実施形態において、本発明は、以下の固有の特徴を有する組換えベクターを提供する：それは、反対方向に配置された２つの重複する転写単位を有し、対象のｄｓＲＮＡのためのトランス遺伝子に隣接するウイルスレプリコンを含み、該２つの重複する転写単位により、宿主細胞内における同じトランス遺伝子フラグメントからセンスおよびアンチセンス両方のＲＮＡ転写物がもたらされる。

【００５７】

例示的な実施形態において、対象の発明は、上記の表１に示したコア標的配列、またはコア標的配列の片側または両側に隣接する±５、±１０、または±２０ヌクレオチドを有する、コア標的配列に対応するＥＰＡＳ１遺伝子またはＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの領域に対応する領域を対象とするｓｉＲＮＡを提供する。各種の例示的なｓｉＲＮＡ二重鎖の配列を、以下の表２～６に示す。

【００５８】

【表２】

表2: 標的部位A、B、およびCを対象とするsiRNA二重鎖の例;下線を付した残基は3'突出を表す

名称	配列	鎖	配列番号
siEPAS1A (またはEPAS1-0677)	5' ugcgaacacacaagcuccucu 3'	センス	配列番号5
	3' ggacgcuuguguguucgagga 5'	アンチセンス	配列番号6
siEPAS1B (またはEPAS1-2894)	5' gcuacgccacccaguaccagg 3'	センス	配列番号7
	3' cacgaugcggugggucauggu 5'	アンチセンス	配列番号8
siEPAS1C (またはEPAS1-4999)	5' cuaccugucaacguaacgauu 3'	センス	配列番号9
	3' gggauggacaguugcauugcu 5'	アンチセンス	配列番号10

上記３つの２１マーに対応する２７マーのｓｉＲＮＡもまた提供される。より具体的に述べると、「２７Ｒ」および「２７Ｌ」の変異体は、ＥＰＡＳ１の発現を下方調節するのにより強力でありうる。Ｋｉｍら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２３巻、２２２～２２６頁、２００５年；Ｒｏｓｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、３３巻、１３号、４１４０～５６頁、２００５年７月２６日を参照されたい。「Ｒ」の２７マーでは、初期の標的配列の右側（標的に対して３’側）へと伸長するように塩基が付加されているのに対し、「Ｌ」の２７マーでは、初期の標的配列の左側（標的に対して５’側）へと伸長するように塩基が付加されている。２７マーのｓｉＲＮＡの例を、以下の表３に示す。

【００５９】

【表３】

表3: 前出の表2に示した21マーのsiRNAに対応する27マーのsiRNA; 大文字はDNAの残基を示し、小文字はRNAの残基を示し、[5' phos]は、5'リン酸を示す

名称	配列	鎖	配列番号
siEPAS1A1 (またはEPAS1-0677-27R)	5' [5'phos]ugcgaacacacaagcuccucuccTC 3'	センス	配列番号 11
	3' ggacgcuuguguguucgaggagaggag 5'	アンチセンス	配列番号 12
siEPAS1A2 (またはEPAS1-0677-27L)	5' gcuuccugcgaacacacaagcuccucu 3'	センス	配列番号 13
	3' CGaaggacgcuuguguguucgagga[5'phos'] 5'	アンチセンス	配列番号 14
siEPAS1B1 (またはEPAS1-2894-27R)	5' [5'phos]gcuacgccacccaguaccaggacTA 3'	センス	配列番号 15
	3' cacgaugcggugggucaugguccugau 5'	アンチセンス	配列番号 16
siEPAS1B2 (またはEPAS1-2894-27L)	5' cacagugcuacgccacccaguaccagg 3'	センス	配列番号 17
	3' GTgucacgaugcggugggucauggu[5'phos] 5'	アンチセンス	配列番号 18
siEPAS1C1 (またはEPAS1-4999-27R)	5' [5'phos]cuaccugucaacguaacgauuucAT 3'	センス	配列番号 19
	3' gggauggacaguugcauugcuaaagua 5'	アンチセンス	配列番号 20
siEPAS1C2 (またはEPAS1-4999-27L)	5' uuaacccuaccugucaacguaacgauu 3'	センス	配列番号 21
	3' aauugggauggacaguugcauugcu[5'phos] 5'	アンチセンス	配列番号 22

対象の発明はまた、コア標的配列の－２０～＋２０塩基内、または対象の発明によるｓｉＲＮＡの－１０～＋１０塩基内を標的とするｓｉＲＮＡも提供する。例えば、３つの２１マーのｓｉＲＮＡの各々の－５～＋５塩基内、または３つのコア標的配列の各々の－１０～＋１０塩基内に標的部位を有する２１マーの二重鎖を以下の表４～６に示す。

【００６０】

【表４】

表4: 標的部位Aを対象とし、siEPAS1A siRNA二重鎖の−5～+5塩基をタイリングしたsiRNA二重鎖;下線を付した残基は3’突出を表す

名称	配列	鎖	配列番号
siEPAS1A-5 (またはEPAS1-0672)	5' cuuccugcgaacacacaagcu 3'	センス	配列番号23
	3' ucgaaggacgcuugugugguuc 5'	アンチセンス	配列番号24
siEPAS1A-4 (またはEPAS1-0673)	5' uuccugcgaacacacaagcuc 3'	センス	配列番号25
	3' cgaaggacgcuugugugguucg 5'	アンチセンス	配列番号26
siEPAS1A-3 (またはEPAS1-0674)	5' uccugcgaacacacaagcucc 3'	センス	配列番号27
	3' gaaggacgcuugugugguucga 5'	アンチセンス	配列番号28
siEPAS1A-2 (またはEPAS1-0675)	5' ccugcgaacacacaagcuccu 3'	センス	配列番号29
	3' aaggacgcuugugugguucgag 5'	アンチセンス	配列番号30
siEPAS1A-1 (またはEPAS1-0676)	5' cugcgaacacacaagcuccuc 3'	センス	配列番号31
	3' aggacgcuugugugguucgagg 5'	アンチセンス	配列番号32
siEPAS1A+1 (またはEPAS1-0678)	5' gcgaacacacaagcuccucuc 3'	センス	配列番号33
	3' gacgcuugugugguucgaggag 5'	アンチセンス	配列番号34
siEPAS1A+2 (またはEPAS1-0679)	5' cgaacacacaagcuccucucc 3'	センス	配列番号35
	3' acgcuugugugguucgaggaga 5'	アンチセンス	配列番号36
siEPAS1A+3 (またはEPAS1-0680)	5' gaacacacaagcuccucuccu 3'	センス	配列番号37
	3' cgcuugugugguucgaggagag 5'	アンチセンス	配列番号38
siEPAS1A+4 (またはEPAS1-0681)	5' aacacacaagcuccucuccuc 3'	センス	配列番号39
	3' gcuugugugguucgaggagagg 5'	アンチセンス	配列番号40
siEPAS1A+5 (またはEPAS1-0682)	5' acacacaagcuccucuccuca 3'	センス	配列番号41
	3' cuugugugguucgaggagagga 5'	アンチセンス	配列番号42

【００６１】

【表５】

表5: 標的部位Bを対象とし、siEPAS1B siRNA二重鎖の−5～+5塩基をタイリングしたsiRNA二重鎖;下線を付した残基は3’突出を表す

名称	配列	鎖	配列番号
siEPAS1B-5 (またはEPAS1-2889)	5' acagugcuacgccacccagua 3'	センス	配列番号43
	3' ggugucacgaugcggugggguc 5'	アンチセンス	配列番号44
siEPAS1B-4 (またはEPAS1-2890)	5' cagugcuacgccacccaguac 3'	センス	配列番号45
	3' gugucacgaugcggugggguca 5'	アンチセンス	配列番号46
siEPAS1B-3 またはEPAS1-2891)	5' agugcuacgccacccaguacc 3'	センス	配列番号47
	3' ugucacgaugcggugggucau 5'	アンチセンス	配列番号48
siEPAS1B-2 (またはEPAS1-2892)	5' gugcuacgccacccaguacca 3'	センス	配列番号49
	3' gucacgaugcggugggucaug 5'	アンチセンス	配列番号50
siEPAS1B-1 (またはEPAS1-2893)	5' ugcuacgccacccaguaccag 3'	センス	配列番号51
	3' ucacgaugcggugggucaugg 5'	アンチセンス	配列番号52
siEPAS1B+1 (またはEPAS1-2895)	5' cuacgccacccaguaccagga 3'	センス	配列番号53
	3' acgaugcggugggucaugguc 5'	アンチセンス	配列番号54
siEPAS1B+2 (またはEPAS1-2896)	5' uacgccacccaguaccaggac 3'	センス	配列番号55
	3' cgaugcggugggucauggucc 5'	アンチセンス	配列番号56
siEPAS1B+3 (またはEPAS1-2897)	5' acgccacccaguaccaggacu 3'	センス	配列番号57
	3' gaugcggugggucaugguccu 5'	アンチセンス	配列番号58
siEPAS1B+4 (またはEPAS1-2898)	5' cgccacccaguaccaggacua 3'	センス	配列番号59
	3' augcggugggucaugguccug 5'	アンチセンス	配列番号60
siEPAS1B+5 (またはEPAS1-2899)	5' gccacccaguaccaggacuac 3'	センス	配列番号61
	3' ugcggugggucaugguccuga 5'	アンチセンス	配列番号62

【００６２】

【表６】

表6: 標的部位Cを対象とし、siEPAS1C siRNA二重鎖の−5～+5塩基をタイリングしたsiRNA二重鎖;下線を付した残基は3’突出を表す

名称	配列	鎖	配列番号
siEPAS1C-5 (またはEPAS1-4994)	5' uaacccuaccugucaacguaa 3'	センス	配列番号63
	3' uaauugggauggacaguugca 5'	アンチセンス	配列番号64
siEPAS1C-4 (またはEPAS1-4995)	5' aacccuaccugucaacguaac 3'	センス	配列番号65
	3' aauugggauggacaguugcau 5'	アンチセンス	配列番号66
siEPAS1C-3 (またはEPAS1-4996)	5' acccuaccugucaacguaacg 3'	センス	配列番号67
	3' auugggauggacaguugcauu 5'	アンチセンス	配列番号68
siEPAS1C-2 (またはEPAS1-4997)	5' cccuaccugucaacguaacga 3'	センス	配列番号69
	3' uugggauggacaguugcauug 5'	アンチセンス	配列番号70
siEPAS1C-1 (またはEPAS1-4998)	5' ccuaccugucaacguaacgau 3'	センス	配列番号71
	3' ugggauggacaguugcauugc 5'	アンチセンス	配列番号72
siEPAS1C+1 (またはEPAS1-5000)	5' uaccugucaacguaacgauuu 3'	センス	配列番号73
	3' ggauggacaguugcauugcua 5'	アンチセンス	配列番号74
siEPAS1C+2 (またはEPAS1-5001)	5' accugucaacguaacgauuuc 3'	センス	配列番号75
	3' gauggacaguugcauugcuaa 5'	アンチセンス	配列番号76
siEPAS1C+3 (またはEPAS1-5002)	5' ccugucaacguaacgauuuca 3'	センス	配列番号77
	3' auggacaguugcauugcuaaa 5'	アンチセンス	配列番号78
siEPAS1C+4 (またはEPAS1-5003)	5' cugucaacguaacgauuucau 3'	センス	配列番号79
	3' uggacaguugcauugcuaaag 5'	アンチセンス	配列番号80
siEPAS1C+5 (またはEPAS1-5004)	5' ugucaacguaacgauuucaug 3'	センス	配列番号81
	3' ggacaguugcauugcuaaagu 5'	アンチセンス	配列番号82

酵素性核酸

特定の実施形態において、対象の発明は、ＥＰＡＳ１遺伝子またはＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの発現を阻害する酵素性核酸に関する。例示的な酵素性核酸には、上記の表１に示したコア標的配列のうちの１つ、または該コア標的領域の片側または両側に隣接する５、１０、または２０ヌクレオチドを有する、コア標的配列を含む領域を標的とする酵素性核酸が含まれる。「酵素性核酸」とは、基質結合領域において、特定の標的遺伝子に対する相補性を有し、また、標的核酸を特異的に切断するように作用する酵素活性も有する核酸を意味する。酵素性核酸は、分子間相互作用により核酸を切断し、これにより、標的核酸を不

活化することが可能であると理解される。これらの相補性領域は、標的核酸に対する酵素性核酸の十分なハイブリダイゼーションを可能とし、これにより、切断を可能とする。１００パーセントの相補性（同一性）が好ましいが、この適用では、５０～７５％の低い相補性でもまた有用である（例えば、ＷｅｒｎｅｒおよびＵｈｌｅｎｂｅｃｋ、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２３巻、２０９２～２０９６頁、１９９５年；Ｈａｍｍａｎｎら、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ａｎｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｖ．、９巻、２５～３１頁、１９９９年を参照されたい）。酵素性核酸は、塩基、糖、および／またはリン酸基において修飾することができる。本明細書に記載の通り、「酵素性核酸」という用語は、リボザイム、触媒性ＲＮＡ、酵素性ＲＮＡ、触媒性ＤＮＡ、アプタザイムもしくはアプタマー結合リボザイム、調節性リボザイム、触媒性オリゴヌクレオチド、ヌクレオザイム、ＤＮＡザイム、ＲＮＡ酵素、エンドリボヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、ミニザイム、リードザイム、オリゴザイム、またはＤＮＡ酵素などの語句と互換的に用いられる。これらのすべての用語は、酵素活性を有する核酸について述べる。本明細書に記載の具体的な酵素性核酸に適用は限定されず、本発明の酵素性核酸において重要なすべてのことは、それが、標的核酸領域のうちの１つまたは複数に相補的である、特異的な基質結合部位を有し、それが、その基質結合部位の内部または周囲において、該分子に対して核酸切断活性および／またはライゲーション活性を付与するヌクレオチド配列を有することである（Ｃｅｃｈら、米国特許第４，９８７，０７１号；Ｃｅｃｈら、ＪＡＭＡ、２６０巻、３０３０頁、１９８８年）ことを当業者は認識するであろう。

【００６３】

現在のところ、複数種の天然の酵素性核酸が公知である。各酵素性核酸は、生理学的条件下で、トランス位にある核酸のホスホジエステル結合の加水分解を触媒しうる（したがってまた、他の核酸を切断しうる）。一般に、酵素性核酸は、まず、標的核酸に結合することにより作用する。このような結合は、標的核酸を切断するように作用する、酵素性核酸の酵素性部分に対してごく近傍に保持される該分子の標的結合部分を介して生じる。したがって、酵素性核酸は、相補性塩基対合を介して標的核酸をまず認識し、次いでこれに結合し、適正な部位に結合すると、酵素的に作用して標的核酸を切断する。このような標的核酸の戦略的切断により、コードされるタンパク質の合成を誘導するその能力が破壊される。酵素性核酸は、その核酸標的に結合し、これを切断した後で、その核酸から放出されて別の標的を探索し、新たな標的に繰り返し結合してこれらを切断しうる。

【００６４】

具体的な実施形態において、対象の酵素性核酸は、ＥＰＡＳ１ ｍＲＮＡを触媒作用によって切断してその翻訳を阻害するように設計されたリボザイムである（例えば、１９９０年１０月４日に公開された、ＰＣＴ 国際特許公開第ＷＯ９０／１１３６４号；Ｓａｒｖｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４７巻、１２２２～１２２５頁、１９９０年；および米国特許第５，０９３，２４６号を参照されたい）。部位特異的な認識配列においてｍＲＮＡを切断するリボザイムを用いて特定のｍＲＮＡを破壊することができるが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的ｍＲＮＡと相補的な塩基対を形成する隣接領域により規定される位置にあるｍＲＮＡを切断する。唯一の要件は、標的ｍＲＮＡが、２塩基による以下の配列：５’－ＵＧ－３’を有することである。ハンマーヘッド型リボザイムの構築および作製は当技術分野において周知であり、ＨａｓｅｌｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ、１９８８年、Ｎａｔｕｒｅ、３３４巻、５８５～５９１頁においてより完全な形で説明されている。本発明のリボザイムにはまた、Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌａにおいて天然であり、広範にわたって説明されている（例えば、Ｚａｕｇら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２４巻、５７４～５７８頁、１９８４年；ＺａｕｇおよびＣｅｃｈ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３１巻、４７０～４７５頁、１９８６年；Ｚａｕｇら、Ｎａｔｕｒｅ、３２４巻、４２９～４３３頁、１９８６年；Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐａｔｅｎｔｓ社による国際特許出願第ＷＯ８８／０４３００号； ＢｅｎおよびＣｅｃｈ、Ｃｅｌｌ、４７巻、２０７～２１６頁、１９８６年を参照されたい）ＲＮＡエンドリボヌクレアーゼ（ＩＶＳ ＲＮＡまたはＬ－１９ ＩＶＳ ＲＮＡとし

て公知）などのＲＮＡエンドリボヌクレアーゼ（以後、「Ｃｅｃｈ型リボザイム」と称する）も含まれる。

【００６５】

別の具体的な実施形態において、対象の酵素性核酸は、ＤＮＡ酵素である。ＤＮＡ酵素は、アンチセンス法およびリボザイム法両方の力学的特徴の一部を組み込む。ＤＮＡ酵素は、アンチセンスオリゴヌクレオチドとまったく同様に、特定の標的核酸配列を認識するが、リボザイムともまったく同様に、それらは触媒性であり、標的核酸を特異的に切断するように設計される。略述すると、標的核酸を特異的に認識してこれを切断する理想的なＤＮＡ酵素を設計するために、当業者はまず、固有の標的配列を同定しなければならない。好ましくは、固有であるかまたは実質的に固有の配列は、約１８～２２ヌクレオチドのＧ／Ｃに富む配列である。高Ｇ／Ｃ含量は、ＤＮＡ酵素と標的遺伝子配列とのより強力な相互作用を確保する一助となる。ＤＮＡ酵素を合成する場合、メッセージを該酵素の標的とする特異的なアンチセンスの認識配列は、それが、該ＤＮＡ酵素の２本のアームを含み、該ＤＮＡ酵素のループが該２本の特異的なアームの間に配置されるように分割される。ＤＮＡ酵素を作製して投与する方法は、例えば、米国特許第６，１１０，４６２号において見出すことができる。

【００６６】

特定の実施形態において、対象の発明による核酸薬剤は、１２～２００ヌクレオチドの長さでありうる。一実施形態において、対象の発明による例示的な酵素性核酸は、例えば、２５～４０ヌクレオチドの長さを含めた、１５～５０ヌクレオチドの長さである（例えば、Ｊａｒｖｉｓら、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２７１巻、２９１０７～２９１１２頁、１９９６年を参照されたい）。別の実施形態において、対象の発明による例示的なアンチセンス分子は、例えば、２０～３５ヌクレオチドの長さを含めた、１５～７５ヌクレオチドの長さである（例えば、Ｗｏｏｌｆら、ＰＮＡＳ、８９巻、７３０５～７３０９頁、１９９２年；Ｍｉｌｎｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１５巻、５３７～５４１頁、１９９７年を参照されたい）。別の実施形態において、対象の発明による例示的なｓｉＲＮＡは、例えば、２１～２７ヌクレオチドの長さを含めた、２０～３０ヌクレオチドの長さである。必要とされるすべてのことは、対象の核酸薬剤が、本明細書で意図されるその活性に十分であり適切な長さおよび立体構造であることを当業者は認識するであろう。本発明の核酸薬剤の長さは、言及された一般的な限界内に制限されない。

【００６７】

核酸薬剤の合成

自動化された方法を用いて１００ヌクレオチドを超える長さの核酸を合成することは難しく、このような分子による治療費用は法外なものとなる。本発明の場合、外因性送達には、小型の核酸モチーフ（小型とは、約１００ヌクレオチド未満の長さ、好ましくは約８０ヌクレオチド未満の長さ、またより好ましくは約５０ヌクレオチド未満の長さの核酸モチーフを指す）（例えば、酵素性核酸の構築物およびＲＮＡｉ構築物）を用いることが好ましい。これらの分子の構造が単純であると、標的とされるＲＮＡ構造の領域内に侵入する核酸の能力が増大する。

【００６８】

本発明による、ＲＮＡ分子およびＤＮＡ分子を含めた例示的な核酸阻害剤分子は、化学合成することができる。例示を目的として述べると、オリゴヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ）は、Ｃａｒｕｔｈｅｒｓら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、２１１巻、３～１９頁、１９９２年；Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、ＰＣＴ国際特許公開第ＷＯ９９／５４４５９；Ｗｉｎｃｏｔｔら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２３巻、２６７７～２６８４頁、１９９５年；Ｗｉｎｃｏｔｔら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏ．、７４巻、５９頁、１９９７年；Ｂｒｅｎｎａｎら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｂｉｏｅｎｇ．、６１巻、３３～４５頁、１９９８年；およびＢｒｅｎｎａｎ、米国特許第６，００１，３１１号において説明される通り、当技術分野で公知のプロトコールを用いて合成さ

れる。オリゴヌクレオチドの合成では、５’端におけるジメトキシトリチル基および３’端におけるホスホルアミダイト基など、一般的な核酸保護基および核酸結合基を用いる。非限定的な例において、小規模の合成は、２．５分間にわたる２’－Ｏ－メチル化ヌクレオチドの結合ステップおよび４５秒間にわたる２’－デオキシヌクレオチドの結合ステップにより、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製の３９４型合成器上で実施することができる。代替的に、合成は、Ｐｒｏｔｏｇｅｎｅ社（カリフォルニア州、パロアルト）製の器具など、９６ウェルプレートによる合成器上で、サイクルに最小限の改変を加えて実施することもできる。

【００６９】

場合によって、本核酸の部分を個別に合成し、合成後において、例えば、ライゲーション（Ｍｏｏｒｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５６巻、９９２３頁、１９９２年；Ｄｒａｐｅｒら、ＰＣＴ 国際特許公開第ＷＯ９３／２３５６９号；Ｓｈａｂａｒｏｖａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、１９巻、４２４７頁、１９９１年；Ｂｅｌｌｏｎら、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ＆ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ、１６巻、９５１頁、１９９７年；Ｂｅｌｌｏｎら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．、８巻、２０４頁、１９９７年）により接合することができる。

【００７０】

本明細書における核酸は、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、２’－アミノ基、２’－Ｃ－アリル基、２’－フルオロ基、２’－Ｏ－メチル基、２’－Ｈ基を伴う修飾により、安定性を大幅に増強するように修飾することが好ましい（総説については、ＵｓｍａｎおよびＣｅｄｅｒｇｒｅｎ、ＴＩＢＳ、１７巻、３４頁、１９９２年；Ｕｓｍａｎら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｓｙｍｐ． Ｓｅｒ．、３１巻、１６３頁、１９９４年を参照されたい）。リボザイムは、一般的な方法を用いるゲル電気泳動により精製するか、または高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ；Ｗｉｎｃｏｔｔら、前出を参照されたい）により精製し、水中で再懸濁させる。

【００７１】

核酸の活性および設計の最適化

修飾（例えば、塩基修飾、糖修飾、および／またはリン酸修飾）を伴う核酸は、血清リボヌクレアーゼによるそれらの分解を防止することが可能であり、これにより、それらの効力を増大させうる。当技術分野では、核酸内に導入して、それらのヌクレアーゼの安定性および有効性を著明に増強しうる、糖修飾、塩基修飾、およびリン酸修飾が複数の例で説明されている。例えば、オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、２’－アミノ基、２’－Ｃ－アリル基、２’－フルオロ基、２’－Ｏ－メチル基、２’－Ｈ基を伴う修飾である、ヌクレオチド塩基の修飾により安定性を増強し、かつ／または生物学的活性を増強するように修飾される（総説については、ＵｓｍａｎおよびＣｅｄｅｒｇｒｅｎ、ＴＩＢＳ、１７巻、３４頁、１９９２年；Ｕｓｍａｎら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｓｙｍｐ． Ｓｅｒ．、３１巻、１６３頁、１９９４年；Ｂｕｒｇｉｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、３５巻、１４０９０頁、１９９６年を参照されたい）。核酸の糖修飾は、当技術分野で広範にわたり説明されている（例えば、Ｅｃｋｓｔｅｉｎら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ９２／０７０６５号；Ｐｅｒｒａｕｌｔら、Ｎａｔｕｒｅ、３４４巻、５６５～５６８頁、１９９０年；Ｐｉｅｋｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５３巻、３１４～３１７頁、１９９１年；ＵｓｍａｎおよびＣｅｄｅｒｇｒｅｎ、Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍ． Ｓｃｉ．、１７巻、３３４～３３９頁、１９９２年；Ｕｓｍａｎら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ９３／１５１８７号；Ｓｐｒｏａｔ、米国特許第５，３３４，７１１号；およびＢｅｉｇｅｌｍａｎら、Ｊ． Ｂｉｏｌ． Ｃｈｅｍ．、２７０巻、２５７０２頁、１９９５年；Ｂｅｉｇｅｌｍａｎら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ９７／２６２７０号；Ｂｅｉｇｅｌｍａｎら、米国特許第５，７１６，８２４号；Ｕｓｍａｎら、米国特許第５，６２７，０５３号；Ｗｏｏｌｆら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ９８／１３５２６号；１９９８年４月２０日に出願された、Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、Ｕ．Ｓ．Ｓ．６０／０８２，４０４；Ｋａｒｐｅｉｓｋｙら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．、３９巻、１１３１頁、１

９９８年；ＥａｒｎｓｈａｗおよびＧａｉｔ、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ（Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、４８巻、３９～５５頁、１９９８年；ＶｅｒｍａおよびＥｃｋｓｔｅｉｎ、Ａｎｎｕ． Ｒｅｖ． Ｂｉｏｃｈｅｍ．、６７巻、９９～１３４頁、１９９８年；ならびにＢｕｒｌｉｎａら、Ｂｉｏｏｒｇ． Ｍｅｄ． Ｃｈｅｍ．、５巻、１９９９～２０１０頁、１９９７年を参照されたい）。同様の修飾を用いて、本発明の核酸を修飾することができる。

【００７２】

ホスホロチオエート結合、ホスホロチオエート結合、および／または５’－メチルホスホネート結合を伴うヌクレオチド間の結合によるオリゴヌクレオチドの化学的な修飾は安定性を改善するが、これらの修飾が過剰になると、毒性が引き起こされうる。したがって、該核酸を設計する場合は、これらのヌクレオチド間結合の量を評価し、適切に最小化するべきである。これらの結合の濃度を低下させることで毒性が低下し、その結果、これらの分子の有効性が増大し、特異性が上昇する。

【００７３】

一実施形態において、本発明の核酸は、１つまたは複数のＧ－クランプヌクレオチドを包含する。Ｇ－クランプヌクレオチドとは修飾されたシトシン類似体であり、該修飾により、二重鎖内の相補的なグアニンのワトソン－クリック面およびフーグスティーン面の両方に水素結合を形成する能力が付与される（例えば、ＬｉｎおよびＭａｔｔｅｕｃｃｉ、Ｊ． Ａｍ． Ｃｈｅｍ． Ｓｏｃ．、１２０巻、８５３１～８５３２頁、１９９８年を参照されたい）。相補的なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる場合、オリゴヌクレオチド内において単一のＧ－クランプ類似体による置換を行うと、螺旋の熱安定性およびミスマッチの識別力が、結果として実質的に増強されうる。本発明の核酸内でこのようなヌクレオチドを組み入れると、核酸標的に対する親和性および特異性の両方が結果として増強される。別の実施形態において、本発明の核酸には、２’，４’－Ｃ－メチレン（ｍｙｔｈｙｌｅｎｅ）ビシクロヌクレオチドなど、１つまたは複数のＬＮＡ（ロックト核酸）ヌクレオチドが含まれる（例えば、Ｗｅｎｇｅｌら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ００／６６０４号および同第ＷＯ９９／１４２２６号を参照されたい）。

【００７４】

別の実施形態において、本発明は、ＥＰＡＳ１遺伝子を標的とする核酸のコンジュゲートおよび／または複合体を特徴とする。このようなコンジュゲートおよび／または複合体を用いて、細胞などの生体系内への核酸の送達を促進することができる。本発明により提供されるコンジュゲートおよび複合体は、細胞膜を超えて標的の組織または細胞型へと治療剤を輸送するかまたは移動させ、薬物動態を変化させ、かつ／または本発明の核酸の局在化を調節することにより、治療活性を付与しうる。このようなコンジュゲートおよび／または複合体はまた、以下でも説明される。

【００７５】

本発明は、低分子、脂質、リン脂質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、抗体、毒素、負に帯電したポリマー、および他のポリマー、例えば、タンパク質、ペプチド、ホルモン、炭水化物、ポリエチレングリコール、またはポリアミンが含まれるがこれらに限定されない分子を、細胞膜を超えて送達するための新規のコンジュゲートおよび複合体の設計および合成を包含する。一般に、記載の輸送体は、分解性のリンカーを伴う場合であれ伴わない場合であれ、個別に、または多成分系の一部として用いられるように設計される。これらの化合物は、血清の存在下であれ不在下であれ、異なる組織に由来する多数の細胞型内への本発明の核酸の送達および／または局在化を改善することが期待される（ＳｕｌｌｅｎｇｅｒおよびＣｅｃｈ、米国特許第５，８５４，０３８号を参照されたい）。本明細書に記載の分子によるコンジュゲートは、生体分解性の核酸リンカー分子など、生体分解性のリンカーを介して生物学的な活性分子に結合しうる。

【００７６】

本明細書で用いられる「生体分解性核酸リンカー分子」という用語は、１つの分子を別の分子、例えば、生物学的な活性分子へと接合する生体分解性リンカーとして設計される

核酸分子を指す。生体分解性核酸リンカー分子の安定性は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、および化学修飾されたヌクレオチド、例えば、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、２’－アミノ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－アミノ修飾ヌクレオチド、２’－Ｃ－アリル修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－アリル修飾ヌクレオチド、および他の２’修飾ヌクレオチド、または塩基修飾ヌクレオチドの多様な組合せを用いることにより調節することができる。生体分解性核酸リンカー分子は、二量体、三量体、四量体、またはより長い核酸、例えば、約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドの場合もあり、リンベースの結合、例えば、ホスホルアミデート結合またはホスホジエステル結合を伴う単一のヌクレオチドを含む場合もある。生体分解性核酸リンカー分子はまた、核酸骨格修飾、核酸糖修飾、または核酸塩基修飾も含みうる。本明細書で用いられる「生体分解性」という用語は、生体系における分解、例えば、酵素性分解または化学分解を指す。

【００７７】

外因的に送達される、本明細書に記載の分子などの治療用核酸薬剤は、望ましくないタンパク質のレベルを低下させるのに十分な長時間にわたり標的ＲＮＡの翻訳が阻害されるまで、細胞内で安定であることが最適である。この時間は、疾患状態に応じて、数時間～数日間で変化する。これらの核酸薬剤は、有効な細胞内治療剤として機能するために、ヌクレアーゼに対して耐性であるべきである。本明細書および当技術分野における核酸の化学合成の改善は、上記で説明した通り、それらのヌクレアーゼに対する安定性を増強するヌクレオチド修飾を導入することにより核酸を修飾する能力を拡張している。

【００７８】

別の態様において、核酸は、５’キャップ構造および３’キャップ構造を含む。「キャップ構造」とは、オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれた化学修飾を意味する（例えば、Ｗｉｎｃｏｔｔら、ＷＯ９７／２６２７０を参照されたい）。これらの末端修飾は、エキソヌクレアーゼによる分解から核酸を保護し、細胞内への送達および／または局在化の一助となる。キャップは、５’末端（５’キャップ）または３’末端（３’キャップ）において存在する場合もあり、両方の末端において存在する場合もある。非限定的な例において、５’キャップには、逆位脱塩基残基（部分）、４’，５’－メチレンヌクレオチド；１－（ベータ－Ｄ－エリトロフラノシル）ヌクレオチド、４’－チオヌクレオチド、炭素環状ヌクレオチド；１，５－アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；Ｌ－ヌクレオチド；アルファ－ヌクレオチド；修飾塩基によるヌクレオチド；ホスホロジチオエート結合；トレオ－ペントフラノシルヌクレオチド；非環状３’，４’－セコヌクレオチド；非環状３，４－ジヒドロキシブチルヌクレオチド；非環状３，５－ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、３’－３’－逆位ヌクレオチド部分；３’－３’－逆位脱塩基部分；３’－２’－逆位ヌクレオチド部分；３’－２’－逆位脱塩基部分；１，４－ブタンジオールホスフェート；３’－ホスホルアミデート；リン酸ヘキシル；リン酸アミノヘキシル；３’－リン酸；３’－ホスホロチオエート；ホスホロジチオエート；または架橋もしくは非架橋のメチルホスホネート部分が含まれる（より詳細については、Ｗｉｎｃｏｔｔら、ＷＯ９７／２６２７０を参照されたい）。他の非限定的な例において、３’キャップには、例えば、４’，５’－メチレンヌクレオチド；１－（ベータ－Ｄ－エリトロフラノシル）ヌクレオチド；４’－チオヌクレオチド、炭素環状ヌクレオチド；５’－アミノ－アルキルホスフェート；１，３－ジアミノ－２－プロピルホスフェート、３－アミノプロピルホスフェート；６－アミノヘキシルホスフェート；１，２－アミノドデシルホスフェート；リン酸ヒドロキシプロピル；１，５－アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；Ｌ－ヌクレオチド；アルファ－ヌクレオチド；修飾塩基によるヌクレオチド；ホスホロジチオエート；トレオ－ペントフラノシル（ｔｈｒｅｏｐｅｎｔｏｆｕｒａｎｏｓｙ）ヌクレオチド；非環状３’，４’－セコヌクレオチド；３，４－ジヒドロキシブチルヌクレオチド；３，５－ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、５’－５’－逆位ヌクレオチド部分；５’－５’－逆位脱塩基部分；５’－ホスホルアミデート；５’－ホスホロチオエート；１，

４－ブタンジオールホスフェート；５’－アミノ；架橋および／または非架橋の５’－ホスホルアミデート、ホスホロチオエートおよび／またはホスホロジチオエート、架橋または非架橋のメチルホスホネート、および５’－メルカプト部分が含まれる（より詳細については、ＢｅａｕｃａｇｅおよびＩｙｅｒ、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ、４９巻、１９２５頁、１９９３年を参照されたい）。

【００７９】

ｓｉＲＮＡの設計

ＲＮＡ干渉またはＲＮＡｉとは、もとは植物（この場合、ＲＮＡ干渉は、転写後遺伝子サイレンシング、またはＰＴＧＳとして知られた）、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ、およびＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎら、２００１年；Ｃａｒｍｅｌｌら、２００２年において総説されている）において説明された遺伝子サイレンシング機構である。最新のモデルにおいて、ＲＮＡｉ経路は、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）の「引き金」により活性化され、次いで、これが、細胞内酵素であるＤｉｃｅｒにより、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）と呼ばれる、２１～２３ヌクレオチドの短いｄｓＲＮＡへとプロセシングされる。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）内へと組み込まれ、そこではｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖がガイド鎖として用いられ、相同的なｍＲＮＡが、該ｓｉＲＮＡガイド鎖の５’端から約１０塩基に位置する、ｓｉＲＮＡ／標的二重鎖内におけるエンドヌクレアーゼによる切断の標的とされる。哺乳動物細胞の場合、３０ヌクレオチドより長いｄｓＲＮＡは、ＲＮＡｉではなく、非特異的なインターフェロン経路を誘発する。しかし、Ｔｕｓｃｈｌらは、哺乳動物細胞内に外因的に導入されたより短いｓｉＲＮＡは、Ｄｉｃｅｒ工程を迂回し、インターフェロン反応を誘発せずに、相同的なｍＲＮＡの分解を直接に活性化することを示した（Ｅｌｂａｓｈｉｒら、２００１年ａ；Ｈａｒｂｏｒｔｈら、２００１年；Ｃａｐｌｅｎら、２００２年）。その後、多くの研究者が、ｉｎｖｉｖｏにおけるヒトのウイルス標的および細胞標的に対して、ｓｉＲＮＡおよび類縁の短鎖ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）の発現の実行可能性を示した。ＲＮＡｉにおける進歩は急速に拡大しつつあり、治療適用に対してかなりの進展が既になされている（Ｚａｍｏｒｅ、２００１年；ＫｉｔａｂｗａｌｌａおよびＲｕｐｒｅｃｈｔ、２００２年；Ｍａｒｔｉｎｅｚら、２００２年；Ｃｏｕｚｉｎ、２００３年；Ｓｃｈｅｒｒら、２００３年；Ｗｉｌｓｏｎら、２００３年；ＨａｎｎｏｎおよびＲｏｓｓｉ、２００４年）。

【００８０】

合成ｓｉＲＮＡは、外因性の短時間にわたる適用に最適の方法である。現在のところ、非修飾のｓｉＲＮＡが、典型的にはトランスフェクションの２～３日後にピークとなるＲＮＡｉ効果を媒介している。合成ｓｉＲＮＡで最も一般的な設計は、ＤｉｃｅｒによるトリガーｄｓＲＮＡの切断を介して作製される内因性ｓｉＲＮＡを模倣し（Ｅｌｂａｓｈｉｒら、２００１年ａ）、この場合、センス鎖およびアンチセンス鎖は、２１～２３ヌクレオチドの長さである。アニーリングされた二重鎖部分は、両方の３’端における２ヌクレオチドずつの突出を除き、完全に相補的である。合成ｓｉＲＮＡの場合、ジヌクレオチドの３’突出は、それらの天然の対応物と同様に、標的配列に由来しうる。大半の目的には、２１～２３マーから構築されたｓｉＲＮＡで十分であるが、２９ヌクレオチドまでのオリゴマーは、インターフェロン反応を誘発することなく用いることができる。本発明者らは、Ｄｉｃｅｒの作用により細胞内においてより長い二本鎖ＲＮＡから生成されるｓｉＲＮＡは、外因的に供給される２１マーより最大で１００倍強力でありうることを観察した（Ｋｉｍら、２００５年）。Ｓｉｏｌａｓら（２００５年）による手引書の草稿も同様の結論を示したが、これらの研究者は、合成のヘアピンをＤｉｃｅｒ基質として用いた。本明細書で提起される試験は、動物試験で用いられる強力なｓｉＲＮＡを生成させるのに重要なこれらの知見を活用する。次に、Ｄｉｃｅｒ基質である二重鎖ＲＮＡから生成されるｓｉＲＮＡの正確な予測を可能とする、新規の設計ルールについて論じる。

【００８１】

ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖と標的とのミスマッチは、それらの数および位置に応じて、様々な程度で活性を低下させる傾向がある。ｓｉＲＮＡ／標的ミスマッチとＲＮＡｉ活

性との関係を制御する法則が完全に明らかにされたわけではないが、ｓｉＲＮＡおよび単純なｓｈＲＮＡの両方におそらく当てはまる、ある程度の一般化を行うことはできる。エンドヌクレアーゼによる切断部位近傍の突然変異は、常にではないが、ＲＮＡｉ効果を低下させることが多い。また、アンチセンス鎖の最初の半分（５’端）における突然変異も、極めて有害である（ＲａｎｄａｌｌおよびＲｉｃｅ、２００１年；Ｈｏｌｅｎら、２００２年；Ａｍａｒｚｇｕｉｏｕｉら、２００３年）。エンドヌクレアーゼによる切断は、ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の５’端から「その位置を計測される」ので、ガイド鎖の５’端における突然変異は、活性化されたＲＩＳＣ複合体内におけるアンチセンス／ｍＲＮＡ標的の二重鎖を不安定化させ、切断を阻害する可能性がある。まとめると、これらの結果は、特定のアイソフォームを標的とするようにＲＮＡｉ構築物を設計する場合、その対応するｓｉＲＮＡと非標的アイソフォームとのミスマッチが、該二重鎖の５’端で生じるように、標的アイソフォーム内の標的部位を選択することが望ましい場合がある。標的が切断可能でない場合（ＳｃｈｅｒｅｒおよびＲｏｓｓｉ、２００３年ｂにおいて総説されている）など、これが不可能な場合は、交差反応性について調べることが重要である。

【００８２】

大半の目的には、２１～２３マーから構築されたｓｉＲＮＡで十分であるが、２９ヌクレオチドまでのオリゴマーは、インターフェロン反応を誘発することなく用いることができる。本発明者らは、Ｄｉｃｅｒの作用により細胞内においてより長い二本鎖ＲＮＡから生成されるｓｉＲＮＡは、外因的に供給される２１マーより最大で１００倍強力でありうることを観察した（Ｋｉｍら、２００５年）。Ｓｉｏｌａｓら（２００５年）による手引書の草稿も同様の結論を示したが、これらの研究者は、合成のヘアピンをＤｉｃｅｒ基質として用いた。本明細書で提起される試験は、動物試験で用いられる強力なｓｉＲＮＡを生成させるのに重要なこれらの知見を活用する。Ｄｉｃｅｒ基質である二重鎖ＲＮＡから生成されるｓｉＲＮＡの正確な予測を可能とする、新規の設計ルールについて論じる。

【００８３】

Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａの胚溶解物における実験は、合成ｓｉＲＮＡ鎖上における遊離５’－ＯＨまたは５’－リン酸の必要を示した（Ｅｌｂａｓｈｉｒら、２００１年ｂ；Ｎｙｋａｎｅｎら、２００１年）。同様の結果は、ＨｅＬａ抽出物（Ｓｃｈｗａｒｚら、２００２年）または完全細胞（ＣｈｉｕおよびＲａｎａ、２００２年）においても観察された。ｓｉＲＮＡ鎖の一方または他方に対する非対称的な５’－アミノ修飾は、アンチセンス鎖の５’アミノ修飾がＲＮＡｉを消失させるのに対し、センス鎖だけの同じ修飾はＲＮＡｉ効果を阻害しないことを示した。また、リン酸化されない合成ｓｉＲＮＡは、ホスファターゼにより前処理したのでない限り、細胞内にトランスフェクトし、後に再単離しても、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて、キナーゼによりリン酸化することができない（ＣｈｉｕおよびＲａｎａ、２００２年）。まとめると、これは、ｉｎ ｖｉｖｏにおける、アンチセンス鎖上の５’リン酸に対する必要性を強く示唆する。これは、このヌクレオチドの修飾が、活性化されたＲＩＳＣ複合体内においてエンドヌクレアーゼによる切断のガイド鎖として用いられる、アンチセンス鎖の能力に干渉するという仮説と符合する。一方、３’端を遮断する修飾は、二重鎖ｓｉＲＮＡに対してほとんど影響を及ぼさず、大半の場合、いずれの鎖に対してもほとんど影響を及ぼさない（Ａｍａｒｚｇｕｉｏｕｉら、２００３年）。

【００８４】

ｓｉＲＮＡ二重鎖に対する骨格修飾の研究により、５’末端と３’末端の間に分布する、ｓｉＲＮＡ鎖当たり最大で６カ所の２’－Ｏ－メチル修飾、または３’末端における２カ所の２’－Ｏ－アリル修飾は、ＲＮＡｉに有害な影響を及ぼさないことが示されている（Ａｍａｒｚｇｕｉｏｕｉら、２００３年）。この程度を超えて修飾の数を増加させるか、または５’末端のアリル修飾を行うと、ＲＮＡｉは低下する（Ａｍａｒｚｇｕｉｏｕｉら、２００３年；Ｈｏｌｅｎら、２００３年）。２カ所を超えるホスホロチオエート修飾は、著明な効力の増大を促進せず、逆に、毒性である（Ａｍａｒｚｇｕｉｏｕｉら、２００３年）。ｓｉＲＮＡを動物内に直接注射する場合に限り、該ｓｉＲＮＡに対する骨格修

飾によりこれらの分子の半減期が延長されるので、該骨格修飾の利点を実現することができる（Ｌａｙｚｅｒら、２００４年；Ｓｏｕｔｓｃｈｅｋら、２００４年）。本明細書において、本発明者らは、シクロデキストリンナノ粒子担体によりもたらされる、血清ヌクレアーゼからの保護を利用し、したがって、本発明者らのＲＮＡは、骨格修飾されず、このため、それらは、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて有効にＤｉｃｅｒ処理されうる。

【００８５】

配列の定義

ＲＮＡｉは、陽イオン性脂質または他の担体を用いて細胞に送達される合成ｓｉＲＮＡを介して、または２１マーのセンス鎖およびアンチセンス鎖の遺伝子発現もしくはｓｉＲＮＡへとプロセシングされる短鎖ヘアピンＲＮＡ（ＳｃｈｅｒｅｒおよびＲｏｓｓｉ、２００３年ａにおいて総説されている）を介して誘発することができる。ｓｉＲＮＡを介するノックダウンの成功についての重要な決定因子は、標的部位への到達可能性と、ｓｉＲＮＡによる適切な鎖の選択との組合せである。本発明者らおよび他の発明者らは、標的部位とｓｉＲＮＡ二重鎖との適切な組合せを同定するアルゴリズムを開発している（Ｈｅａｌｅら、２００５年）。本発明者らのアルゴリズムは、標的部位の二次構造予測、およびｓｉＲＮＡの二重鎖端における安定性を考慮に入れる。後者は、ＲＩＳＣ内へのアンチセンス鎖の選択において重要である（Ｋｈｖｏｒｏｖａら、２００３年；Ｓｃｈｗａｒｚら、２００３年；Ｔｏｍａｒｉら、２００４年）。また、ＲＮアーゼＩＩＩファミリーのメンバーであるＤｉｃｅｒにより切断されるのに十分な長さのｄｓＲＮＡは、２１マーのｓｉＲＮＡより最大で１００倍強力でありうることも発見されている（Ｋｉｍら、２００５年；Ｓｉｏｌａｓら、２００５年）。したがって、標的部位およびｓｉＲＮＡの同定に好ましい本発明者らの方法は、本発明者らのアルゴリズム（Ｈｅａｌｅら、２００５年）により配列モチーフを精選し、潜在的な標的配列および２１マーのｓｉＲＮＡを同定し、複数の２１マーを相対的な有効性について調べることである。

【００８６】

最適の標的部位を決定するための、コンピュータによる新規のアルゴリズムを用いて、ヒト内皮ＰＡＳドメインタンパク質１（ＥＰＡＳ１）遺伝子内における３つの潜在的な標的部位を同定した。参照によりその全体性において本明細書に組み込まれる、ＵＳ２００６／０２６３４３５Ａ１におけるＤａｖｉｓらにより説明される通り、これらの３つの標的配列を対象とするｓｉＲＮＡを合成し、これを細胞抽出物に対するプレスクリーンアッセイにおいて調べた。

【００８７】

細胞抽出物による結合アッセイは、細胞内における有効性を高度に予測することが既に示されている（例えば、参照によりその全体性において本明細書に組み込まれる、米国特許第７，４２７，６０５号を参照されたい）。略述すると、合成の２１マーをその５’端において^{32}Ｐで標識し、ＨＥＫ　２９３の細胞質抽出物中において室温でインキュベートする。ＲＩＳＣの構成要素であるａｒｇｏｎａｕｔｅ　２（Ａｇｏ２）を含有する複合体内において、ｓｉＲＮＡを結合させることができる。米国特許第７，４２７，６０５号の図６に示される通り、結合の有効性は、細胞内における効力と強く相関する。最も強力な２１マーを同定したら、その配列を、Ｄｉｃｅｒの基質である２７塩基の二重鎖内に組み込む。２７マーから最適の２１マーだけが生成されるように、Ｄｉｃｅｒ処理のためのフォーマットを確立した（以下を参照されたい）。したがって、選択された２７マーの使用に対する唯一の制約条件は送達である。ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＤｉｃｅｒ処理に好ましい基質は、以下：

【００８８】

【化１】

5’NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNdNdN3’

3’ NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN N N5’

の一般的な特徴を有する。

【００８９】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるＤｉｃｅｒ処理、およびＤｉｃｅｒ処理された産物に対する質量分析を用いて、Ｄｉｃｅｒが、２塩基の３’突出を認識し、センス鎖の５’端からの２１塩基、および該２塩基突出からの２１塩基を切断し、唯一の２１マーを生成することが決定されている。センス鎖の３’端における２つのデオキシリボヌクレオチド（ｄＮ）を包含することにより、Ｄｉｃｅｒは、この二重鎖の右側からは進行せず、これにより、対象の２１マーだけの生成を確保する。米国特許第７，４２７，６０５号の図６および実施例１は、単一の塩基だけ異なる一連の２１マーを抽出物とインキュベートする、抽出物結合アッセイの代表的な結果を示す。ｓｉＲＮＡの結合親和性は、標的のノックダウンと正確に相関する。このアッセイは、２０を超える異なるｓｉＲＮＡについて繰り返されたが、この相関は依然として存続した。

【００９０】
ヒトＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの配列は、Ｈｅａｌｅら、２００５年に記載のアルゴリズムにより決定した。上位で予測された複数のｓｉＲＮＡおよび標的を、他のヒト配列との潜在的な相補性について解析し、アンチセンス鎖の５’端におけるマッチの拡張に注意した。他の標的に対する５’側相同性の拡張を共有しなかった配列を、１０ｎＭの濃度で調べた。Ａ４９８細胞において最も著明なＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡレベルの低減および／または抗増殖効果を示すｄｓＲＮＡを、後続のｉｎ　ｖｉｖｏ実験において用いることができる。

【００９１】
ＥＰＡＳ１阻害剤の使用
特定の実施形態において、本発明は、１つまたは複数の細胞、例えば、腫瘍細胞もしくは癌性細胞、または病原体細胞の望ましくない増殖を阻害する方法を提供する。特定の実施形態において、本発明は、癌の増殖を阻害するかまたは低下させる方法、および癌に罹患する個体を治療する方法を提供する。これらの方法は、上記で説明した、１つまたは複数の有効量のＥＰＡＳ１阻害剤（例えば、ｓｉＲＮＡ）を個々の患者に投与するステップを伴う。特定の実施形態において、本発明は、転移性癌を治療する方法および／または転移を防止する方法を提供する。特定の実施形態において、本発明は、例えば、化学療法剤など、従来の療法に対して耐性である癌を治療する方法を提供する。特定の方法は、特に、動物、またより具体的には、ヒトの治療的処置および予防的処置を目的とし、このような方法では、（１つまたは複数の）治療有効量のＥＰＡＳ１阻害剤が、動物またはヒト患者に投与される。

【００９２】
「治療（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」という用語は、予防的および／または治療的処置（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ　ａｎｄ／ｏｒ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｔｒｅａｔｍｅｎｔｓ）を包含する。「予防的または治療的」処置という用語は当技術分野で認知されており、宿主に対する、対象組成物のうちの１つまたは複数の投与を包含する。それが、望ましくない状態（例えば、宿主動物の疾患または他の望ましくない状態）の臨床症状以前に投与される場合、該処置は予防的であり（すなわち、それは、望ましくない状態の発生に対して宿主を保護する）、それが、望ましくない状態の発現後に投与される場合、該処置は治療的である（すなわち、それは、既存の望ましくない状態またはその副作用を軽減するか、改善するか、または安定化させることを意図する）。

【００９３】
本明細書で用いられる通り、障害または状態を「防止する」治療薬とは、統計学的試料のうち、非治療の対照試料と比べて、治療された試料における障害もしくは状態の発生を低下させるか、または非治療の対照試料と比べて、障害もしくは状態の、１つもしくは複数の症状の発生を遅延させるか、またはその重症度を軽減する化合物を指す。

【００９４】
本明細書に記載の腫瘍または癌には、個体内部における腫瘍、異種移植による腫瘍、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養される腫瘍が含まれる。特に、本発明の核酸薬剤は、癌の治

療または防止に有用である。対象の方法により治療しうる癌の例示的な形態には、前立腺癌、膀胱癌、肺癌（小細胞肺癌または非小細胞肺癌を含めた）、結腸癌、腎癌、肝癌、乳癌、子宮頚癌、子宮内膜癌または他の子宮癌、卵巣癌、精巣癌、陰茎癌、膣癌、尿道癌、胆癌、食道癌、または膵臓癌が含まれるがこれらに限定されない。対象の方法により治療しうる癌のさらなる例示的な形態には、骨格筋腫または平滑筋腫、胃癌、小腸癌、唾液腺癌、肛門癌、直腸癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、脳下垂体癌、および鼻咽頭癌が含まれるがこれらに限定されない。本発明のＥＰＡＳ１阻害剤により治療しうる癌のさらなる例示的な形態には、ヘッジホッグ発現細胞を含む癌が含まれる。本発明のＥＰＡＳ１阻害剤により治療しうる癌のまたさらなる例示的な形態には、ＥＰＡＳ１発現細胞を含む癌が含まれる。特定のこのような実施形態において、癌細胞と同じ組織型の正常細胞または非癌性細胞は、当技術分野における技法により検出可能なレベルではＥＰＡＳ１を発現しえない；例えば、腎癌細胞内におけるＥＰＡＳ１の発現と対照的に、正常な腎組織または腎細胞は、検出可能なレベルのＥＰＡＳ１を発現しない。本発明は、本明細書におけるＥＰＡＳ１阻害剤を単独で用いることもでき、他の治療薬および／または、従来からのものであれそうでない場合であれ、他の療法を含めた全体的な治療レジメンの一部として投与することもできることを意図する。

【００９５】

本明細書に記載のＥＰＡＳ１阻害核酸を用いて治療しうる癌のさらなる例には、以下：急性白血病、急性リンパ球性白血病、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、および赤白血病、ならびに骨髄異形成症候群などの急性骨髄性白血病；慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ球性白血病、毛様細胞白血病などであるがこれらに限定されない慢性白血病；真性赤血球増加症；ホジキン病、非ホジキン病などであるがこれらに限定されないリンパ腫；くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫、および骨髄外形質細胞腫などであるがこれらに限定されない多発性骨髄腫；ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症；良性単クローン性免疫グロブリン血症；重鎖病；骨肉腫（ｂｏｎｅ　ｓａｒｃｏｍａ）、骨肉腫（ｏｓｔｅｏｓａｒｃｏｍａ）、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟組織肉腫、血管肉腫（ａｎｇｉｏｓａｒｃｏｍａ（ｈｅｍａｎｇｉｏｓａｒｃｏｍａ））、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫が含まれるがこれらに限定されない骨および結合組織の肉腫；神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起膠腫、非神経膠性腫瘍、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽細胞腫、原発性脳リンパ腫などが含まれるがこれらに限定されない脳腫瘍；乳腺癌、小葉（小細胞）癌、乳管内癌、乳腺髄様癌、粘液性乳癌、乳腺管状癌、乳腺乳頭癌、乳腺パジェット病、および炎症性乳癌が含まれるがこれらに限定されない乳癌；褐色細胞腫および副腎皮質癌などであるがこれらに限定されない副腎癌；甲状腺乳頭癌または甲状腺濾胞癌、甲状腺髄様癌、および甲状腺未分化癌などであるがこれらに限定されない甲状腺癌；インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、ＶＩＰオーマ、ソマトスタチン分泌腫瘍、および膵カルチノイド腫瘍または膵内分泌腫瘍などであるがこれらに限定されない膵臓癌；クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、末端肥大症、および尿崩症（ｄｉａｂｅｔｅｓ　ｉｎｓｉｐｉｕｓ）などであるがこれらに限定されない下垂体癌；虹彩黒色腫、脈絡叢黒色腫、および毛様体黒色腫などの眼内黒色腫、ならびに網膜芽腫などであるがこれらに限定されない眼腫瘍；膣扁平上皮癌、膣腺癌、および膣黒色腫などの膣癌；外陰扁平上皮癌、外陰黒色腫、外陰腺癌、外陰基底細胞癌、外陰肉腫、および外陰パジェット病などの外陰癌；子宮扁平上皮癌および子宮腺癌などであるがこれらに限定されない子宮頚癌；子宮内膜癌および子宮肉腫などであるがこれらに限定されない子宮癌；卵巣上皮癌、卵巣境界腫瘍、卵巣胚細胞腫瘍、および卵巣間質性腫瘍などであるがこれらに限定されない卵巣癌；食道扁平上皮癌、食道腺癌、食道腺様嚢胞癌、食道粘液性類表皮癌、食道腺扁平上皮癌、食道肉腫、食道黒色腫、食道形質細胞腫、食道疣状癌、および食道燕麦細胞（小細胞）癌などであるがこれらに限定されない食道癌；胃

腺癌、決潰型（ポリープ状）胃癌、潰瘍型胃癌、表在拡大型胃癌、びまん拡大型胃癌、胃悪性リンパ腫、胃脂肪肉腫、胃線維肉腫、および胃癌肉腫などであるがこれらに限定されない胃癌；結腸癌；直腸癌；肝細胞癌および肝芽腫などであるがこれらに限定されない肝癌；胆嚢腺癌などの胆嚢癌；乳頭型胆管癌、結節型胆管癌、およびびまん型胆管癌などの胆管癌；肺非小細胞癌、肺扁平上皮細胞癌（肺類表皮癌）、肺腺癌、肺大細胞癌、および肺小細胞癌などの肺癌；精巣胚細胞腫瘍、精巣セミノーマ、退形成性セミノーマ、定型（典型）セミノーマ、精母細胞性セミノーマ、精巣非セミノーマ、精巣胎児性癌、精巣奇形腫、精巣絨毛癌（卵黄嚢腫瘍）などであるがこれらに限定されない精巣癌；前立腺腺癌、前立腺平滑筋肉腫、および前立腺横紋筋肉腫などであるがこれらに限定されない前立腺癌；陰茎癌；口腔扁平上皮癌などであるがこれらに限定されない口腔癌；基底細胞癌；唾液腺腺癌、唾液腺粘膜表皮癌、および唾液腺腺様嚢胞癌などであるがこれらに限定されない唾液腺癌；咽頭扁平上皮癌および咽頭疣状癌などであるがこれらに限定されない咽頭癌；皮膚基底細胞癌、皮膚扁平上皮細胞癌、および皮膚黒色腫、表在拡大型皮膚黒色腫、結節型皮膚黒色腫、悪性黒子型黒色腫、末端黒子型黒色腫などであるがこれらに限定されない皮膚癌；腎明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、嫌色素性腎細胞癌、好酸性顆粒細胞腫、腎腺癌、副腎腫、腎線維肉腫、移行上皮癌（腎芋および／または尿管（ｕｔｅｒｅｒ））などであるがこれらに限定されない腎癌；ウィルムス腫瘍；膀胱移行上皮癌、膀胱扁平上皮癌、膀胱腺癌、膀胱癌肉腫などであるがこれらに限定されない膀胱癌が含まれる。加えて、癌には、粘液肉腫、骨肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、および乳頭腺癌が含まれる（このような障害の総説については、Ｆｉｓｈｍａｎら、１９８５年、「Ｍｅｄｉｃｉｎｅ」、第２版、Ｊ．Ｂ．　Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ社、フィラデルフィア；およびＭｕｒｐｈｙら、１９９７年、「Ｉｎｆｏｒｍｅｄ　Ｄｅｃｉｓｉｏｎｓ：　Ｔｈｅ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ，　Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ，　ａｎｄ　Ｒｅｃｏｖｅｒｙ」、Ｖｉｋｉｎｇ　Ｐｅｎｇｕｉｎ社、Ｐｅｎｇｕｉｎ　Ｂｏｏｋｓ　Ｕ．Ｓ．Ａ．社、米国を参照されたい）。

【００９６】

特定の実施形態において、本発明は、正常細胞（例えば、非癌性細胞および／または非病原性細胞）の望ましくない増殖を阻害する方法を提供する。例えば、正常細胞は、毛髪の成長に必要とされる細胞であり得、本明細書に記載の方法により毛髪の望ましくない成長を治療することができる；細胞の望ましくない増殖は、毛髪の正常な成長、異所発毛症、多毛症（ｈｙｐｅｒｔｒｉｃｈｏｓｉｓ）、多毛症（ｈｉｒｓｕｔｉｓｍ）、または脱毛性毛包炎、網状瘢痕性紅斑性毛包炎、頭部乳頭状皮膚炎、および偽毛包炎を含めた毛包炎において生じうる。さらなる例において、正常細胞は、自己免疫反応、移植拒絶など、望ましくない免疫反応に関与する免疫細胞でありうる。例示的な実施形態において、正常細胞は正常なＴ細胞であり、Ｔ細胞の過剰な活性または増殖は、糖尿病、関節炎（関節リウマチ、若年性関節リウマチ、骨関節炎、および乾癬性関節炎を含めた）、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎を含めた）、乾癬、シェーグレン症候群、クローン病、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、Ｉ型糖尿病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、喘息、アレルギー性喘息、皮膚エリテマトーデス、強皮症、膣炎、直腸炎、薬疹、ハンセン病反転反応、癩性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳脊髄炎、特発性両側性進行性感音難聴、再生不良性貧血、真性赤血球性貧血、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ウェゲナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スティーブンスージョンソン症候群、特発性スプルー、扁平苔癬、グレーブス病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、間質性肺線維症、移植片対宿主病、骨髄移植、肝移植、または任意の臓器または組織の移植などの移植症例（同種組織または異種組織を用いる移植を含めた）、アトピー性アレルギーなどのアレルギー、および白血病および／またはリンパ腫などのＴ細胞新生物を含めた、多数の疾患または状態の一因である。

【００９７】

本明細書に記載の方法の特定の実施形態において、１つまたは複数の核酸によるＥＰＡＳ１阻害剤は、併せて（同時に）投与することもでき、異なる時点において（逐次的に）投与することもできる。例えば、２つ以上のｄｓＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、もしくは酵素性核酸、またはこれらの組合せは、本明細書に記載の方法に従って用いることができる。

【００９８】

特定の実施形態において、本発明の対象の阻害核酸は、単独で用いることができる。代替的に、対象の阻害核酸は、他の従来の抗癌剤、抗病原体剤、または望ましくない細胞増殖の治療または予防を対象とする他の治療法と組み合わせて投与することもできる。例えば、このような方法は、癌の予防的な防止、手術後における癌の再発および転移の防止において、また従来の他の癌療法に対するアジュバントとして用いることができる。本発明は、対象の核酸薬剤の使用を介して、従来の癌療法（例えば、化学療法、放射線療法、光線療法、免疫療法、および手術）の有効性を増強しうることを認識する。ＥＰＡＳ１阻害核酸および別の治療剤を含む組合せ療法を用いる場合、このような治療剤は、個別に投与することもでき、併せて投与することもできる。特定の実施形態において、組合せ療法は、併せて製剤化される場合であれ、個別の製剤として投与される場合であれ、ＥＰＡＳ１阻害核酸および別の治療剤を伴いうる。

【００９９】

従来の多種多様な化合物が、抗新生物活性を有することが示されている。これらの化合物は、充実性腫瘍を退縮させるか、白血病もしくは骨髄腫の転移およびさらなる増殖を防止するか、またはその悪性細胞数を低減するために、化学療法における薬剤として用いられている。化学療法は、各種の悪性腫瘍を治療するのに有効であるが、望ましくない副作用を誘発する抗新生物化合物が多い。２つ以上の異なる治療を組み合わせる場合、治療は相乗作用的に働き、各治療の用量の低減を可能とし、これにより、高用量の各化合物によりもたらされる有害な副作用が軽減されることが示されている。他の場合には、治療に対して不応な悪性腫瘍が、２つ以上の異なる治療による組合せ療法には応答する場合がある。

【０１００】

特定の化学療法剤はＥＰＡＳ１の望ましくない上方調節を引き起こし、これにより、サイクリンＧ２、ｃ－Ｍｅｔ、ＣＸＣＲ４、ＩＧＦ２、ＩＧＦ－ＢＰ１、ＩＧＦ－ＢＰ２、ＩＧＦ－ＢＰ３、ＥＧＦ、ＷＡＦ－１、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β３、ＡＤＭ、ＥＰＯ、ＩＧＦ２、ＥＧ－ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦ、ＮＯＳ２、ＬＥＰ、ＬＲＰ１、ＨＫ１、ＨＫ２、ＡＭＦ／ＧＰ１、ＥＮＯ１、ＧＬＵＴ１、ＧＡＰＤＨ、ＬＤＨＡ、血小板由来成長因子Ｂ、ＰＦＫＢＦ３、ＰＫＦＬ、ＭＩＣ１、ＮＩＰ３、ＮＩＸ、ＲＴＰ８０１、および／または特定のマトリックスメタロプロテアーゼのうちの１つまたは複数の発現が誘導される。その血管新生の誘導およびその嫌気性代謝の活性化を介して細胞の生存を促進することにより、ＥＰＡＳ１の活性化は、これらの薬剤による他の抗癌活性に対して反作用的であると考えられている。したがって、（１つまたは複数の）ＥＰＡＳ１阻害剤を特定の化学療法剤と組み合わせて用いて、それらの有効性を高めることができる。

【０１０１】

例示だけを目的として述べると、（１つまたは複数の）ＥＰＡＳ１阻害剤との対象の組合せ療法において用いうる薬剤には、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、ｂｃｇ、ビカルタミド、ブレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンプトテシン（ｃａｍｐｏｔｈｅｃｉｎ）、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クロランブシル、シスプラチン、クラドリビン、クロドロネート、コルヒチン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタビン、ゲニステイン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロン、イリ

ノテカン、イロノテカン、レトロゾール、レウコボリン、レウプロリド、レバミゾール、ロムスチン、メクロレタミン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、スラミン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストステロン、チオグアニン、チオテパ、二塩化チタノセン、トポテカン、トラスツズマブ、トレチノイン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、およびビノレルビンが含まれる。

【０１０２】

これらの抗癌剤は、それらの作用機構により、例えば、以下の群：ピリミジン類似体（５－フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタビン、ゲムシタビン、およびシタラビン）およびプリン類似体、葉酸アンタゴニストおよび類縁阻害剤（メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、および２－クロロデオキシアデノシン（クラドリビン））などの代謝拮抗剤／抗癌剤；ビンカアルカロイド（ビンブラスチン、ビンクリスチン、およびビノレルビン）などの天然生成物、タキサン（パクリタキセル、ドセタキセル）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロンおよびナベルビン、エピジポドフィロトキシン（テニポシド）などの微小管破壊剤、ＤＮＡ損傷剤（アクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メルクロレタミン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソウレア、パクリタキセル、プリカマイシン、プロカルバジン、テニポシド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびエトポシド（ＶＰ１６））を含めた抗増殖／抗有糸分裂剤；ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ）、ダウノルビシン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、イダルビシン、アントラサイクリン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、およびマイトマイシンなどの抗生剤；酵素（全身においてＬ－アスパラギンを代謝し、それら自身のアスパラギンを合成する能力を有さない細胞を除去するＬ－アスパラギナーゼ）；抗血小板剤；窒素マスタード（メクロレタミン、シクロホスファミドおよび類似体、メルファラン、クロラムブシル）、エチレンイミンおよびメチルメラミン（ヘキサメチルメラミンおよびチオテパ）、アルキルスルホネート－ブスルファン、ニトロソウレア（カルムスチン（ＢＣＮＵ）および類似体、ストレプトゾシン）、トラゼン－ダカルバジン（ＤＴＩＣ）などの抗増殖／抗有糸分裂アルキル化剤；葉酸類似体（メトトレキサート）などの抗増殖／抗有糸分裂代謝拮抗剤；白金配位錯体（シスプラチン、カルボプラチン）、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、ミトタン、アミノグルテチミド；ホルモン、ホルモン類似体（エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ビカルタミド、ニルタミド）、およびアロマターゼ阻害剤（レトロゾール、アナストロゾール）；抗凝血剤（ヘパリン、合成ヘパリン塩、および他のトロンビン阻害剤）；線溶剤（組織プラスミノーゲン活性化剤、ストレプトキナーゼ、およびウロキナーゼなど）、アスピリン、ＣＯＸ－２阻害剤、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；抗遊走剤；抗分泌剤（ブレベルジン）；免疫抑制剤（シクロスポリン、タクロリムス（ＦＫ－５０６）、シロリムス（ラパマイシン）、アザチオプリン、マイコフェノール酸モフェチル）；抗血管新生化合物（ＴＮＰ－４７０、ゲニステイン）および成長因子阻害剤（血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）阻害剤、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）阻害剤、上皮成長因子（ＥＧＦ）阻害剤）；アンジオテンシン受容体遮断剤；一酸化窒素供与剤；アンチセンスオリゴヌクレオチド；抗体（トラスツズマブ）；細胞周期阻害剤および分化誘導剤（トレチノイン）；ｍＴＯＲ阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤（ドキソルビシン（アドリアマイシン）、アムサクリン、カンプトテシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エニポシド、エピルビシン、エトポシド、イダルビシン、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）およびミトキサントロ

ン、トポテカン、イリノテカン）、コルチコステロイド（コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン（ｍｅｔｈｙｌｐｅｄｎｉｓｏｌｏｎｅ）、プレドニゾン、およびプレドニゾロン（ｐｒｅｎｉｓｏｌｏｎｅ））；成長因子シグナル伝達キナーゼ阻害剤；ミトコンドリア機能不全誘発剤およびカスパーゼ活性化剤；クロマチン破壊剤に分類することができる。

【０１０３】

これらの抗癌剤は、ＥＰＡＳ１阻害剤と共に個別で用いることもでき、さらなる抗癌剤と共に組合せで用いることもできる。当技術分野では、上記で列挙した組合せ療法が含まれるがこれらに限定されない多くの組合せ療法が開発されている。従来の抗癌剤に加えて、対象の方法による薬剤はまた、従来の化学療法の標的である望ましくない細胞増殖に寄与する細胞成分の発現を阻害する化合物、およびアンチセンスＲＮＡ、ＲＮＡｉポリヌクレオチド、または他のポリヌクレオチドでもありうる。例示だけを目的として述べると、このような標的は、成長因子、成長因子受容体、細胞周期調節タンパク質、転写因子、またはシグナル伝達キナーゼである。

【０１０４】

本発明の方法は、従来の抗癌剤がより低用量でより大きな効果を及ぼすことを可能とすることにより、既存の組合せ療法を超えて有利でありうる。本発明の好ましい実施形態において、ＥＰＡＳ１阻害剤（例えば、核酸構築物）と組み合わせて用いられた場合における、抗癌剤または抗癌剤の組合せについての有効用量（ED_{50}）は、抗癌剤単独（すなわち、ＥＰＡＳ１阻害剤を伴わない、同じ１つの薬剤または複数の薬剤）についてのED_{50}の５分の１以下である。逆に、ＥＰＡＳ１阻害剤（例えば、核酸構築物）と組み合わせて用いられた場合における、このような抗癌剤または抗癌剤の組合せについての治療指数（ＴＩ）は、抗癌剤レジメン単独（すなわち、ＥＰＡＳ１阻害剤を伴わない、同じ１つの薬剤または複数の薬剤）についてのＴＩの少なくとも５倍である。

【０１０５】

特定の実施形態において、本明細書に記載のＥＰＡＳ１阻害核酸は、例えば、抗炎症剤、免疫抑制剤、および／または抗感染症剤（例えば、抗生化合物、抗ウイルス化合物、および／または抗真菌化合物など）を含めた他の治療剤と組み合わせて投与することができる。例示的な抗炎症薬には、例えば、ステロイド性抗炎症薬（例えば、コルチゾール、アルドステロン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、トリアムシノロン、デキサメタゾン、デオキシコルチコステロン、およびフルオロコルチゾールなど）および非ステロイド抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、およびピロキシカムなど）が含まれる。例示的な免疫抑制薬には、例えば、プレドニゾン、アザチオプリン（Ｉｍｕｒａｎ）、シクロスポリン（Ｓａｎｄｉｍｍｕｎｅ、Ｎｅｏｒａｌ）、ラパマイシン、抗胸腺細胞グロブリン、ダクリズマブ、ＯＫＴ３およびＡＬＧ、マイコフェノール酸モフェチル（Ｃｅｌｌｃｅｐｔ）およびタクロリムス（Ｐｒｏｇｒａｆ、ＦＫ５０６）が含まれる。例示的な抗生剤には、例えば、サルファ薬（例えば、スルファニルアミド）、葉酸類似体（例えば、トリメトプリム）、ベーターラクタム（例えば、ペニシリン（ｐｅｎａｃｉｌｌｉｎ）、セファロスポリン）、アミノグリコシド（例えば、ストレプトマイシン（ｓｔｒｅｔｏｍｙｃｉｎ）、カナマイシン、ネオマイシン、ゲンタマイシン）、テトラサイクリン（例えば、クロロテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、およびドキシサイクリン）、マクロリド（例えば、エリトロマイシン、アジトロマイシン、およびクラリトロマイシン）、リンコサミド（例えば、クリンダマイシン）、ストレプトグラミン（例えば、キヌプリスチンおよびダルホプリスチン）、フルオロキノロン（例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、およびモキシフロキサシン）、ポリペプチド（例えば、ポリミキシン）、リファンピン、ムピロシン、シクロセリン、アミノシクリトール（例えば、スペクチノマイシン）、グリコペプチド（例えば、バンコマイシン）、およびオキサゾリジノン（例えば、リネゾリド）が含まれる。例示的な抗ウイルス剤には、例えば、ビダラビン、アシクロビル、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤（例えば、ＺＡＴ、ｄｄｌ、ｄｄＣ、Ｄ４Ｔ、３ＴＣ）、ヌクレオシド類似体以外の

逆転写酵素阻害剤（例えば、ネビラピン、デラビルジン）、プロテアーゼ阻害剤（例えば、サクイナビル、リトナビル、インジナビル、ネルフィナビル）、リバビリン、アマンタジン、リマンタジン、レレンザ、タミフル、プレコナリル、およびインターフェロンが含まれる。例示的な抗真菌剤には、例えば、ポリエン系抗真菌剤（例えば、アムホテリシンおよびニスタチン）、イミダゾール系抗真菌剤（例えば、ケトコナゾールおよびミコナゾール）、トリアゾール系抗真菌剤（例えば、フルコナゾールおよびイトラコナゾール）、フルシトシン、グリセオフルビン、およびテルビナフィンが含まれる。

【０１０６】

他の態様において、本明細書に記載のＥＰＡＳ１阻害核酸はまた、例えば、ＫｈｏｄａｄｏｕｓｔおよびＳｈａｒｍａ（ＵＳ２００６／０１３５４４３Ａ１）により説明される化合物など、ＨＩＦ１αを阻害する他の薬剤と組み合わせて投与することもできる。このような化合物はまた、本明細書に記載のＥＰＡＳ１阻害剤と共に用いることもでき、本明細書に記載の抗癌剤とさらに組み合わせて用いることもできる。

【０１０７】

他の実施形態において、本開示は、血管新生を阻害する方法および血管新生関連疾患を治療する方法を提供する。本明細書に記載の血管新生関連疾患には、例えば、充実性腫瘍、白血病などの血行性腫瘍、および腫瘍転移；良性腫瘍、例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫；免疫性炎症および非免疫性炎症などの炎症性障害；慢性関節リウマチおよび乾癬；眼内血管新生性疾患、例えば、糖尿病性網膜炎、若年性網膜炎、黄斑変性、角膜移植拒絶、新生血管緑内障、後水晶体線維増殖症、ルベオーシス；オスラー－ウェーバー－ランデュ症候群（Ｏｓｌｅｒ－Ｗｅｂｂｅｒ　Ｓｙｎｄｒｏｍｅ）；心筋血管新生；プラーク内新血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節症；血管線維腫ならびに創傷顆粒形成および創傷治癒；毛細血管拡張症、乾癬、強皮症、化膿性肉芽腫、冠動脈側枝、虚血性四肢血管新生、角膜疾患、ルベオーシス、関節炎、糖尿病性新血管形成、骨折、血管形成、血球新生を含めた血管新生依存性癌が含まれるがこれらに限定されない。

【０１０８】

本開示の方法および組成物はまた、任意の血管新生非依存性癌（腫瘍）を治療するのにも有用であることが理解される。本明細書で用いられる「血管新生非依存性癌」という用語は、腫瘍組織内において、新血管形成がほとんどまたはまったく見られない癌（腫瘍）を指す。

【０１０９】

このような方法の特定の実施形態では、１つまたは複数の核酸治療剤を、併せて（同時に）投与することもでき、異なる時点において（逐次的に）投与することもできる。加えて、核酸治療剤は、癌を治療するか、または血管新生を阻害するための別の種類の化合物と共に投与することができる。

【０１１０】

組合せ療法の性質に応じて、本発明の核酸治療剤は、他の療法が投与される間、および／またはその後において継続することができる。核酸治療剤の投与は、単回投与で実施することもでき、複数回投与で実施することもできる。一部の場合には、核酸治療剤の投与が従来の療法に少なくとも数日間先だって開始されるのに対し、他の場合には、従来の療法の投与直前または投与時において投与が開始される。

【０１１１】

投与方法および組成物

特定の実施形態において、本発明は、本明細書で記載される、１つまたは複数のＥＰＡＳ１阻害剤を含む組成物を提供する。特定の実施形態において、組成物は、患者における治療的使用に適する医薬品である。特定の実施形態において、組成物は、動物またはヒトにおける美容的使用に適する化粧品である。代替的な実施形態において、組成物は、医薬部外品および非化粧品である。一般に、化粧品と医薬品との違いは、後者をヒトまたは動物において使用するには、規制機関による承認（例えば、米国食品医薬品局による）が必

要となることである。

【０１１２】

ＥＰＡＳ１阻害剤、特に、該核酸を送達する方法は、当技術分野で公知の方法に基づく（例えば、Ａｋｈｔａｒら、Ｔｒｅｎｄｓ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏ．、２巻、１３９頁、１９９２年；および「Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ」、Ａｋｈｔａｒ編、１９９５年； Ｓｕｌｌｉｖａｎら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ９４／０２５９５号を参照されたい）。事実上任意の核酸を送達するのに、これらのプロトコールを用いるか、改変するか、または改良しうる。リポソーム内における封入、イオントフォレーシスによる投与、ハイドロゲル、シクロデキストリン、生体分解性のナノカプセル、および生体付着性のマイクロスフェアなど、他の媒体内への組込みによる投与が含まれるがこれらに限定されない、当業者に公知の各種の方法により、核酸を細胞へと投与することができる。代替的に、核酸／媒体の組合せは、直接の注射により、または注入ポンプを用いることにより局所的に送達される。他の送達経路には、経口（錠剤形態または丸薬形態）送達および／またはくも膜下腔内送達（Ｇｏｌｄ、Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ、７６巻、１１５３～１１５８頁、１９９７年）が含まれるがこれらに限定されない。他の手法には、各種の輸送系および担体系の使用、例えば、コンジュゲートおよび生体分解性ポリマーの使用を介する手法が含まれる。特定の実施形態において、対象のＥＰＡＳ１阻害剤および媒体は、投与前の最終的な剤形において混合され、製剤化される。代替的な実施形態において、対象のＥＰＡＳ１阻害剤および媒体は、投与時において混合されるように、個別に製剤化される。例えば、対象のＥＰＡＳ１阻害剤および媒体は、送達用のキットまたはパッケージの個別の区画内において保存され、対象のＥＰＡＳ１阻害剤および媒体が送達用に混合されるのは、所望の部位への投与時、または所望の経路を介する投与時においてである。個別の区画は、キット中における個別のバイアルの場合もあり、医薬送達ペン中における個別のカートリッジ（米国特許第５，５４２，７６０号を参照されたい）の場合もあり、個別のカニューレまたはシリンジ内の区画などの場合もある。

【０１１３】

特定の実施形態において、対象のＥＰＡＳ１阻害剤は、送達媒体としてポリマーによるマイクロ粒子またはナノ粒子を包含する超分子複合体として提供される。本明細書で用いられる「マイクロ粒子」または「ナノ粒子」という用語には、マイクロスフェアまたはナノスフェア（均一の球体）、マイクロカプセルまたはナノカプセル（コアおよびポリマーの外層を有する）、および不規則な形状の粒子が含まれる。

【０１１４】

本発明は、その間にわたってＥＰＡＳ１阻害剤の放出が所望される時間内、またはその後の比較的早期、一般には１年間の範囲、より典型的には数カ月間、さらにより典型的には数日間～数週間にわたり生体分解性であることが好ましいポリマーの使用を意図する。生体分解とは、マイクロ粒子の分解、すなわち、マイクロ粒子／ナノ粒子を形成するポリマーの解離を指す場合もあり、かつ／またはポリマー自体の分解を指す場合もある。これは、ジケトピペラジンの場合のように、その中にある粒子が投与される担体から、放出部位におけるｐＨへのｐＨ変化の結果として生じることもあり、ポリ（ヒドロキシ酸）の場合のように、加水分解の結果として生じることもあり、アルギン酸などのポリマーのイオン結合により形成されるマイクロ粒子またはナノ粒子の場合のように、マイクロ粒子からカルシウムなどのイオンが拡散することにより生じることもあり、多くの多糖およびタンパク質の場合のように、酵素作用により生じることもある。一部の場合には、直線的放出が最も有用であるが、他の場合には、パルス放出または「バルク放出」が、より有効な結果をもたらすこともある。

【０１１５】

代表的な合成材料は、ジケトピペラジン；ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、およびこれらのコポリマーなどのポリ（ヒドロキシ酸）；ポリ酸無水物；ポリオルトエステルなどのポリエステル；ポリアミド；ポリカーボネート；ポリエチレン、ポリプロピレン、

ポリ（エチレングリコール）、ポリ（酸化エチレン）、ポリ（テレフタル酸エチレン）などのポリアルキレン；ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリハロゲン化ビニル、ポリビニルピロリドン、ポリ酢酸ビニル、およびポリ塩化ビニルなどのポリビニル化合物；ポリスチレン；ポリシロキサン；ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリ（メタクリル酸エチル）、ポリ（メタクリル酸ブチル）、ポリ（メタクリル酸イソブチル）、ポリ（メタクリル酸ヘキシル）、ポリ（メタクリル酸イソデシル）、ポリ（メタクリル酸ラウリル）、ポリ（メタクリル酸フェニル）、ポリ（アクリル酸メチル）、ポリ（アクリル酸イソプロピル）、ポリ（アクリル酸イソブチル）、ポリ（アクリル酸オクタデシル）を含めたアクリル酸ポリマーおよびメタクリル酸ポリマー；ポリウレタンおよびこれらのコポリマー；アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酪酸酢酸セルロース、フタル酸酢酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース、およびセルロース硫酸ナトリウム塩を含めたセルロース；ポリ（酪酸）（ｐｏｌｙ（ｂｕｔｉｃ　ａｃｉｄ））；ポリ（吉草酸）；ならびにポリ（ラクチド－ｃｏ－カプロラクトン）である。

【０１１６】

天然のポリマーには、アルギン酸ならびにデキストランおよびセルロースを含めた他の多糖、コラーゲン、アルブミン、および他の親水性タンパク質、ゼインおよび他のプロラミン、ならびに疎水性タンパク質、これらのコポリマーおよび混合物が含まれる。本明細書で用いられるこれらの化学的誘導体とは、化学基、例えば、アルキル基、アルキレン基の置換、付加、水酸化、酸化、および当業者によって日常的に行われる他の修飾を指す。

【０１１７】

生体付着性ポリマーには、Ｈ．Ｓ．Ｓａｗｈｎｅｙ、Ｃ．Ｐ．ＰａｔｈａｋおよびＪ．Ａ．Ｈｕｂｅｌｌ、Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ、２６巻、５８１～５８７頁、１９９３年により説明される生体浸蝕性ハイドロゲル、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギン酸、キトサン、およびポリアクリレートが含まれる。

【０１１８】

薬物送達戦略に対する包括的な総説については、Ｈｏら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．、１巻、３３６～３４３頁、１９９９年；およびＪａｉｎ、「Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ：Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　ａｎｄ　Ｃｏｍｍｅｒｃｉａｌ　Ｏｐｐｏｒｔｕｎｉｔｉｅｓ，Ｄｅｃｉｓｉｏｎ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ」、１９９８年；およびＧｒｏｏｔｈｕｉｓら、Ｊ．ＮｅｕｒｏＶｉｒｏｌ．、３巻、３８７～４００頁、１９９７年を参照されたい。核酸の送達および投与についてのより詳細な説明は、Ｓｕｌｌｉｖａｎら、前出；Ｄｒａｐｅｒら、ＰＣＴ　ＷＯ９３／２３５６９；Ｂｅｉｇｅｌｍａｎら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ９９／０５０９４号；Ｋｌｉｍｕｋら、ＰＣＴ特許公開第ＷＯ９９／０４８１９号において提供されている。

【０１１９】

本明細書で用いられる「非経口投与」および「非経口投与された」という語句は、経口投与および局所投与以外の投与方式を意味し、通常は注射により、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、関節包内、眼窩内、心内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、胸骨内の注射および注入、ならびに肝内動脈内投与（肝内注射および肝内注入を含めた）が含まれるがこれらに限定されない。

【０１２０】

本明細書で用いられる「全身投与」、「全身投与された」、「末梢投与」、および「末梢投与された」という語句は、化合物、薬物、または他の物質が患者の全身に投入され、したがって、代謝および他の同様の過程にかけられるように、中枢神経系内への直接的な投与以外の化合物、薬物、または他の物質の投与、例えば、皮下投与を意味する。

【０１２１】
特定の実施形態において、本発明の対象の核酸（例えば、ＲＮＡｉ構築物および酵素性核酸）は、薬学的に許容される担体と共に製剤化される。このような治療剤は、単独で、または医薬製剤（組成物）の成分として投与することができる。該薬剤は、ヒトまたは脊椎動物に対する医療において用いられる任意の好都合な方法での投与に応じて製剤化することができる。保湿剤、乳化剤、およびラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤のほか、着色剤、放出剤、被覆剤、甘味剤、香味剤および芳香剤、防腐剤、および抗酸化剤もまた、組成物中に存在しうる。

【０１２２】
対象の核酸による製剤は、全身投与、局所（ｌｏｃａｌ）投与、経口投与、鼻腔内投与、局所（ｔｏｐｉｃａｌ）投与、非経口投与、直腸内投与、および／または膣内投与に適するものを包含する。該製剤は、単位剤形で提示すると好都合な場合があり、製薬技術分野で周知の任意の方法により調製することができる。担体物質と組み合わせて単一の剤形をもたらしうる有効成分の量は、治療される宿主、特定の投与方式に応じて変化する。担体物質と組み合わせて単一の剤形をもたらしうる有効成分の量は一般に、治療効果をもたらす化合物の量である。

【０１２３】
特定の実施形態において、これらの製剤または組成物を調製する方法は、別の種類の治療薬または抗感染症剤、ならびに担体、および、場合によって、１つまたは複数の付属成分を混合するステップを包含する。一般に、該製剤は、液体の担体、または微粒子化された固体の担体、またはこれらの両方により調製することができ、次いで、必要な場合は生成物を成形する。

【０１２４】
経口投与用の製剤は、カプセル、カシェ、丸薬、錠剤、ドロップ（通常、スクロースおよびアカシアガムまたはトラガカントガムである香味ベースを用いる）、粉末、顆粒の形態の場合もあり、水溶性または非水溶性の液体中における溶液または懸濁液の場合もあり、水中油または油中水による液体エマルジョンの場合もあり、エリキシル剤またはシロップの場合もあり、トローチ（ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアガムなどの不活性ベースを用いる）の場合もあり、かつ／または口腔洗浄剤などの場合もあるが、各々が、所定量の対象の核酸治療剤を有効成分として含有する。

【０１２５】
経口投与用の固体剤形（カプセル、錠剤、丸薬、糖衣錠、粉末、顆粒など）の場合、本発明の１つまたは複数の核酸治療剤は、クエン酸ナトリウム、リン酸ジカルシウム、および／または以下：（１）デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および／またはケイ酸などの充填剤および増量剤；（２）例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、および／またはアカシアガムなどの結合剤；（３）グリセロールなどの保湿剤；（４）寒天、炭酸カルシウム、バレイショまたはタピオカのデンプン、アルギン酸、特定のシリケート、および炭酸ナトリウムなどの崩壊剤；（５）パラフィンなどの溶解遅延剤；（６）第四アンモニウム化合物などの吸収促進剤；（７）例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールなどの湿潤剤；（８）カオリンおよびベントナイト粘土などの吸収剤；（９）滑石、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体のポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびこれらの混合物などの潤滑剤；（１０）着色剤のうちのいずれかなど、１つまたは複数の薬学的に許容される担体と混合することができる。カプセル、錠剤、および丸薬の場合、医薬組成物はまた、緩衝剤も含みうる。類似の種類の固体組成物はまた、ラクトースまたは乳糖などの賦形剤のほか、高分子量のポリエチレングリコールなどを用いる軟性および硬性の充填型ゼラチンカプセル内における充填剤としても用いることができる。

【０１２６】
経口投与用の液体剤形には、薬学的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン

、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル剤が含まれる。有効成分に加えて、該液体剤形は、水、またはエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、油（特に、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、麦芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにこれらの混合物など他の溶媒、可溶化剤、および乳化剤など、当技術分野で一般的に用いられる不活性希釈剤を含有しうる。不活性希釈剤のほか、経口組成物はまた、保湿剤、乳化剤および懸濁剤、甘味剤、香味剤、着色剤、芳香剤、および防腐剤などのアジュバントも包含しうる。

【０１２７】

活性化合物に加えて、懸濁液は、エトキシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、およびソルビタンエステル、微晶質セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天、およびトラガカントガム、ならびにこれらの混合物などの懸濁剤を含有しうる。

【０１２８】

本発明の方法および組成物は、子宮頸部および膣の皮膚または粘膜へと局所投与することができる。これにより、副作用を誘発する可能性を最小限としながら、皮膚または粘膜に局在化する、望ましくない細胞増殖に対して直接的な送達を行う最大の機会がもたらされる。局所製剤は、皮膚または角質層の透過増強剤として有効であることが公知の、多種多様な薬剤のうちの１つまたは複数をさらに含みうる。これらの例は、２－ピロリドン、Ｎ－メチル－２－ピロリドン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、プロピレングリコール、メチルアルコールまたはイソプロピルアルコール、ジメチルスルホキシド、およびアゾンである。製剤を化粧品として許容されるものとするために、追加の薬剤をさらに組み入れることができる。これらの例は、脂肪、蝋、油、色素、香料、防腐剤、安定化剤、および界面活性剤である。当技術分野において公知の角質溶解剤などの角質溶解剤もまた組み入れることができる。例は、サリチル酸および硫黄である。

【０１２９】

局所投与用または経皮投与用の剤形には、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、貼付剤、および吸入剤が含まれる。対象の核酸は、無菌条件下で、薬学的に許容される担体、および必要とされうる任意の防腐剤、緩衝剤、または推進剤と混合することができる。軟膏、ペースト、クリーム、およびゲルは、対象の核酸分子に加えて、動物性脂肪および植物性脂肪、油、蝋、パラフィン、デンプン、トラガカントガム、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、滑石、および酸化亜鉛、またはこれらの混合物などの賦形剤を含有しうる。

【０１３０】

粉末およびスプレーは、対象の核酸治療剤に加え、ラクトース、滑石、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などの賦形剤を含有しうる。スプレーは、クロロフルオロハイドロカーボンなど通常の推進剤、ならびにブタンおよびプロパンなど、揮発性の非置換炭化水素をさらに含有しうる。

【０１３１】

吸入に適する製剤もまた提供され、このような製剤は、肺系に局在化される肺内送達または全身送達に用いることができる。医薬の肺内送達用デバイスの例には、用量計量型吸入器（ＭＤＩ）および乾燥粉末吸入器（ＤＰＩ）が含まれる。対象のＥＰＡＳ１阻害剤および／または活性薬剤の送達に適合させうる、吸入による例示的な送達系は、例えば、米国特許第５，７５６，３５３号；同第５，８５８，７８４号；およびＰＣＴ特許出願第ＷＯ９８／３１３４６号；同第ＷＯ９８／１０７９６号；同第ＷＯ００／２７３５９号；同第ＷＯ０１／５４６６４号；同第ＷＯ０２／０６０４１２号において説明されている。対象のＥＰＡＳ１阻害剤および／または活性薬剤を送達するのに用いうる他のエアゾール製剤は、米国特許第６，２９４，１５３号；同第６，３４４，１９４号；同第６，０７１，

４９７号；米国特許出願公開第２００４／００６３６５４号、およびＰＣＴ特許出願第ＷＯ００２／０６６０７８号；同第ＷＯ００２／０５３１９０号；同第ＷＯ００１／６０４２０号；同第ＷＯ０００／６６２０６号において説明されている。

【０１３２】

加圧式用量計量型吸入器（ｐＭＤＩ）は、世界中で最も一般的に用いられる吸入器である。バルブを開く（通常、推進剤キャニスター上における押し下げ操作により）とエアゾールが創出され、これにより、液体推進剤がキャニスターから噴霧される。通常、薬物または治療薬は、液体推進剤中に懸濁させた微粒子（通常、直径数ミクロン）内に含有されるが、一部の製剤では、薬物または治療薬を推進剤中に溶解させることができる。エアゾールがデバイスから放出されるに従い、推進剤は急速に蒸発し、その結果、薬物または治療薬の微粒子が吸入される。このようなｐＭＤＩにおいて典型的に用いられる推進剤には、ハイドロフルオロアルカン（ＨＦＡ）が含まれるが、これらに限定されない。例えば、薬物または治療薬を製剤化するのに、界面活性剤もまたｐＭＤＩと共に用いることができる。エタノール、アスコルビン酸、メタ二硫酸ナトリウム、グリセリン、クロロブタノール、および塩化セチルピリジニウム（ｃｅｔｙｌｐｙｒｉｄｉｕｍ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ）など、他の溶媒または賦形剤もまた、ｐＭＤＩと共に用いることができる。このようなｐＭＤＩは、例えば、スペーサー、保持チャンバーなどの付加デバイス、および他の改変をさらに包含しうる。

【０１３３】

吸入器の第三の種類は、乾燥粉末吸入器（ＤＰＩ）である。ＤＰＩにおいて、エアゾールは通常、それが吸入されるまでデバイス内に含有される粉末である。治療薬または薬物は、微粒子粉末（通常、数マイクロメートル（百万分の１メートル）の直径）としての粉末形態で製造される。多くのＤＰＩにおいて、薬物または治療薬は、直径５０～１００マイクロメートルが典型的である、はるかに大型の糖粒子（例えば、ラクトース一水和物）と混合される。ラクトース／薬物の凝集物に対する空気動力学的な力が増大すると、個別の小粉末用量の充填が容易となりうることに加え、吸入時における薬物粒子の引き込みが改善される。吸入時において、粉末は、乱流および／またはそれに対して粒子凝集物が衝突するスクリーンもしくは回転表面などの力学的デバイスの補助によりその構成粒子へと分解され、薬物の個々の粉末微粒子が、肺内に吸入される空気中へと放出される。糖粒子は通常、デバイス内および／または口腔－咽喉内に残留することが意図される。

【０１３４】

本発明の一態様は、ＥＰＡＳ１阻害剤を含むエアゾール組成物を提供する。エアゾール組成物は、エアゾール化されたＥＰＡＳ１阻害剤を含む組成物の場合もあり、エアゾール化に適する製剤中にＥＰＡＳ１阻害剤を含む組成物の場合もある。ＥＰＡＳ１阻害剤は、さらなる活性薬剤と組み合わせて製剤化することができ、該組合せ製剤は、エアゾール化に適する。代替的に、ＥＰＡＳ１阻害剤およびさらなる活性薬剤は、エアゾール化が生じた後であるか、または対象への投与後においてそれらが混合されるように、個別に製剤化することもできる。

【０１３５】

非経口投与に適する医薬組成物は、使用の直前に無菌の注射溶液または分散液中へと再構成することができ、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、製剤を意図される受容者の血液と等張にする溶質、または懸濁剤もしくは増粘剤を含有しうる、１つまたは複数の薬学的に許容される、水溶性または非水溶性の無菌等張溶液、分散液、懸濁液もしくはエマルジョン、または無菌粉末と組み合わせた、１つまたは複数の核酸薬剤を含みうる。本発明の医薬組成物において用いうる、適切な水溶性および非水溶性の担体の例には、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが含まれる。例えば、レシチンなどの被覆材料を用いることにより、分散液の場合、必要とされる粒子サイズを維持することにより、また、界面活性剤を用いることにより、適正な流体性を維持することができる。

【０１３６】
これらの組成物はまた、防腐剤、保湿剤、乳化剤、および分散化剤などのアジュバントも含有しうる。例えば、パラベン、クロロブタノール、ソルビン酸フェノールなど、各種の抗菌剤および抗真菌剤を組み入れることにより、微生物作用の防止を確保することができる。糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に組み入れることもまた望ましい場合がある。加えて、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなど、吸収を遅延させる薬剤を組み入れることにより、注射用医薬形態の遅延吸収をもたらすことができる。
【０１３７】
注射用デポ剤の形態は、ポリラクチド－ポリグリコリドなど、生体分解性ポリマー中において、１つまたは複数の核酸薬剤のマイクロ封入マトリックスを形成することにより作製される。ポリマーに対する薬物の比率、および用いられる特定のポリマーの性質に応じて、薬物放出の速度が制御される。他の生体分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）およびポリ（酸無水物）が含まれる。注射用デポ製剤はまた、身体組織と適合性のリポソームまたはマイクロエマルジョン中において薬物を捕捉することによっても調製することができる。
【０１３８】
膣内投与用または直腸内投与用の製剤は、本発明の１つまたは複数の化合物を、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤用の蝋、またはサリチル酸を含み、室温では固体であるが、体温では液体となり、したがって、直腸内腔または膣内腔では溶融し、活性化合物を放出する、１つまたは複数の適切な非刺激性の賦形剤または担体と混合することにより調製しうる坐剤として提示することができる。
【０１３９】
特定の実施形態において、本発明の核酸は、それらの所望の活性に最も適する身体内の場所における該核酸の有効な分布を可能とする、薬学的に許容される薬剤により製剤化される。このような薬学的に許容される薬剤の非限定的な例には、ＰＥＧ、リン脂質、ホスホロチオエート、各種の組織内への薬物の侵入を増強しうるＰ－糖タンパク質阻害剤（Ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｐ８５など）、植え込み後における徐放送達のためのポリ（ＤＬ－ラクチド－コグリコリド）マイクロスフェアなどの生体分解性ポリマー（Ｅｍｅｒｉｃｈ，ＤＦら、Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ、８巻、４７～５８頁、１９９９年）、および血液脳関門を越えて薬物を送達し、ニューロン内への取込み機構を変化させうるシアノアクリル酸ポリブチルからなるナノ粒子など、負荷ナノ粒子（Ｐｒｏｇ　Ｎｅｕｒｏｐｓｙｃｈｏｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｂｉｏｌ　Ｐｓｙｃｈｉａｔｒｙ、２３巻、９４１～９４９頁、１９９９年）が含まれる。
【０１４０】
他の実施形態において、本発明の核酸の一部は、真核生物のプロモーターによる細胞内で発現させることができる（例えば、ＩｚａｎｔおよびＷｅｉｎｔｒａｕｂ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２９巻、３４５頁、１９８５年；ＭｃＧａｒｒｙおよびＬｉｎｄｑｕｉｓｔ、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８３巻、３９９頁、１９８６年；Ｓｃａｎｌｏｎら、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８８巻、１０５９１～５頁、１９９１年；Ｋａｓｈａｎｉ－Ｓａｂｅｔら、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｒｅｓ．　Ｄｅｖ．、２巻、３～１５頁、１９９２年；Ｄｒｏｐｕｌｉｃら、Ｊ．　Ｖｉｒｏｌ．、６６巻、１４３２～４１頁、１９９２年；Ｗｅｅｒａｓｉｎｇｈｅら、Ｊ．　Ｖｉｒｏｌ．、６５巻、５５３１～４頁、１９９１年；Ｏｊｗａｎｇら、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８９巻、１０８０２～６頁、１９９２年；Ｃｈｅｎら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２０巻、４５８１～９頁、１９９２年；Ｓａｒｖｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４７巻、１２２２～１２２５頁、１９９０年；Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２３巻、２２５９頁、１９９５年；Ｇｏｏｄら、Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ、４巻、４５頁、１９９７年）。当業者は、適切なＤＮＡ／ＲＮＡベクターにより、任意の核酸を真核細胞内で発現させうることを認識する。酵素性核酸による一次転写物からのそれらの放出により、このような核

酸の活性を増強することができる（Ｄｒａｐｅｒら、ＰＣＴ　ＷＯ９３／２３５６９；およびＳｕｌｌｉｖａｎら、ＰＣＴ　ＷＯ９４／０２５９５；Ｏｈｋａｗａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｓｙｍｐ．　Ｓｅｒ．、２７巻、１５～６頁、１９９２年；Ｔａｉｒａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１９巻、５１２５～３０頁、１９９１年；Ｖｅｎｔｕｒａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２１巻、３２４９～５５頁、１９９３年；Ｃｈｏｗｒｉｒａら、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２６９巻、２５８５６頁、１９９４年；これらの参考文献のすべては、参照によりその全体性において本明細書に組み込まれる）。ＣＮＳに特異的な遺伝子治療法は、Ｂｌｅｓｃｈら、Ｄｒｕｇ　Ｎｅｗｓ　Ｐｅｒｓｐｅｃｔ．、１３巻、２６９～２８０頁、２０００年；Ｐｅｔｅｒｓｏｎら、Ｃｅｎｔ．　Ｎｅｒｖ．　Ｓｙｓｔ．　Ｄｉｓ．、４８５～５０８頁、２０００年；ＰｅｅｌおよびＫｌｅｉｎ、Ｊ．　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．　Ｍｅｔｈｏｄｓ、９８巻、９５～１０４頁、２０００年；Ｈａｇｉｈａｒａら、Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．、７巻、７５９～７６３、２０００年；ならびにＨｅｒｒｌｉｎｇｅｒら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．　Ｍｅｄ．、３５巻、２８７～３１２頁、２０００年により説明されている。Ｋａｐｌｉｔｔら、米国特許第６，１８０，６１３号により、神経系細胞へのＡＡＶを介する核酸の送達がさらに説明されている。

【０１４１】

本発明の別の態様において、本発明のＲＮＡ分子は、ＤＮＡベクターまたはＲＮＡベクター内へと挿入された転写単位（例えば、Ｃｏｕｔｕｒｅら、ＴＩＧ、１２巻、５１０頁、１９９６年を参照されたい）から発現されることが好ましい。組換えベクターは、ＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクターであることが好ましい。リボザイムを発現するウイルスベクターは、アデノ関連ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはアルファウイルスに基づいて構築することができるが、これらに限定されない。核酸を発現することが可能な組換えベクターは、上記で説明した通りに送達され、標的細胞内に存続することが好ましい。代替的に、核酸の一過性発現をもたらすウイルスベクターも用いることができる。このようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。発現すると、核酸は、標的のｍＲＮＡに結合する。核酸発現ベクターの送達は、静脈内投与もしくは筋肉内投与によるか、患者から摘出された標的細胞への投与後に、患者内へと再導入することによるか、または所望の標的細胞内への導入を可能とする他の任意の手段によるなど、全身性でありうる（総説については、Ｃｏｕｔｕｒｅら、ＴＩＧ、１２巻、５１０頁、１９９６年を参照されたい）。

【０１４２】

一態様において、本発明は、本発明の核酸のうちの少なくとも１つをコードする核酸配列を含む発現ベクターを意図する。該核酸配列は、本発明の核酸の発現を可能とする形で作動的に連結される。例えば、本発明は、ａ）転写開始領域（例えば、真核生物のｐｏｌ　Ｉ、ＩＩ、またはＩＩＩ開始領域）；ｂ）転写終結領域（例えば、真核生物のｐｏｌ　Ｉ、ＩＩ、またはＩＩＩ終結領域）；ｃ）本発明の核酸触媒のうちの少なくとも１つをコードする核酸配列であって、前記核酸の発現および／または送達を可能とする形で、前記開始領域および前記終結領域へと作動的に連結される核酸配列を含む発現ベクターを特徴とする。該ベクターは、場合によって、本発明の核酸触媒をコードする配列の５’側または３’側に作動的に連結された、タンパク質のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）；および／またはイントロン（介在配列）を包含しうる。

【０１４３】

二本鎖核酸を包含する特定の実施形態において、該二本鎖は、細胞内において個別に発現し、次いで、ハイブリダイズしうる。このような個別の発現は、個別の発現構築物を介する場合もあり、単一の発現構築物を介する場合もある。代替的に、該二本鎖は共に発現しうる、例えば、ヘアピンＲＮＡの二本鎖は、共に発現しうる。

【０１４４】

選択される投与経路に関わらず、適切な水和形態で用いうる本発明のＥＰＡＳ１阻害剤、および／または本発明の医薬組成物は、以下で説明されるか、または従来の他の方法に

よる、薬学的に許容される剤形へと製剤化される。

【０１４５】

特定の患者に所望される治療応答を達成するのに有効な有効成分の量、組成物、および投与方式を、該患者に対して毒性とならずに得るように、本発明の医薬組成物中における有効成分の実際の用量レベルを変化させることができる。

【０１４６】

選択される用量レベルは、用いられる本発明の特定のＥＰＡＳ１阻害剤の活性、投与経路、投与回数、用いられる特定の化合物の排出速度、治療期間、用いられる特定のＥＰＡＳ１阻害剤と組み合わせて用いられる他の薬物、化合物、および／または物質、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全般的な健康、および既往の治療履歴など、医療技術分野で周知の因子を含めた各種の因子に依存する。

【０１４７】

医師または獣医師は、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医師は、医薬組成物中で用いられる本発明のＥＰＡＳ１阻害剤の用量を、所望の治療効果を達成するために必要とされるレベル未満のレベルで開始し、所望の効果が達成されるまで用量を漸増することができる。

【０１４８】

一般に、本発明のＥＰＡＳ１阻害剤の適切な毎日の用量は、治療効果をもたらすのに有効な最低用量である化合物量である。このような有効用量は一般に、上記の因子に依存する。一般に、患者の静脈内用量、脳室内用量、および皮下用量は、１日当たり体重キログラム当たり約０．０００１～約１００ｍｇの範囲である。

【０１４９】

所望の場合、活性化合物の毎日の有効用量は、場合によっては単位剤形において、１日のうちの適切な間隔で個別に、２回、３回、４回、５回、６回以上の部分用量として投与することができる。

【０１５０】

本発明の医薬製剤にはまた、獣医科用組成物、例えば、獣医科使用に適する、例えば、家畜（ｌｉｖｅｓｔｏｃｋまたはｄｏｍｅｓｔｉｃ　ａｎｉｍａｌｓ）、例えば、イヌの治療に適するＥＰＡＳ１阻害剤の医薬調製物も含まれる。この治療を受ける患者は、霊長動物、特に、ヒト、およびウマ、ウシ、ブタ、およびヒツジ；ならびに家禽およびペット一般など、他の非ヒト哺乳動物を含めた、それを必要とする任意の動物である。

【０１５１】

ＥＰＡＳ１阻害剤はまた、医薬部外品としての使用、例えば、病原体汚染された任意の対象から病原体を除去する消毒剤としての使用、または望ましくない毛髪成長を消失させるための化粧品としての使用のためにも製剤化することができる。化粧品組成物は、特定の医薬組成物（例えば、ローション、軟膏、フィルム、貼付剤など）と同様に製剤化することができる。

【０１５２】

本発明の、ＲＮＡｉ構築物などのＥＰＡＳ１阻害剤はまた、取込み、分配、および／または吸収に寄与する、例えば、リポソーム、ポリマー、受容体標的化分子、経口製剤、直腸内製剤、局所製剤、または他の製剤として、他の分子、分子構造、または化合物の混合物と共に混合するか、封入するか、コンジュゲートさせるか、または他の形で会合させることもできる。対象のＲＮＡｉ構築物は、透過性増強剤、担体化合物、および／またはトランスフェクション剤も含めた製剤において提供することができる。

【０１５３】

ＲＮＡｉ構築物、特に、ｓｉＲＮＡ分子の送達に適合させうる、このような取込み補助製剤、分布補助製剤、および／または吸収補助製剤の調製について教示する代表的な米国特許には、Ｕ．Ｓ．５，１０８，９２１；同５，３５４，８４４；同５，４１６，０１６；同５，４５９，１２７；同５，５２１，２９１；同５１５４３，１５８；同５，５４７，９３２；同５，５８３，０２０；同５，５９１，７２１；同４，４２６，３３０；同４

，５３４，８９９；同５，０１３，５５６；同５，１０８，９２１；同５，２１３，８０４；同５，２２７，１７０；同５，２６４，２２１；同５，３５６，６３３；同５，３９５，６１９；同５，４１６，０１６；同５，４１７，９７８；同５，４６２，８５４；同５，４６９，８５４；同５，５１２，２９５；同５，５２７，５２８；同５，５３４，２５９；同５，５４３，１５２；同５，５５６，９４８；同５，５８０，５７５；および同５，５９５，７５６が含まれるが、これらに限定されない。

【０１５４】

本発明のＲＮＡｉ構築物はまた、ヒトを含めた動物に投与されると、その生物学的に活性な代謝物またはその残留物を（直接的または間接的に）もたらすことが可能な、薬学的に許容される塩、エステルもしくはこのようなエステルの塩、または他の任意の化合物も包含する。したがって、本開示はまた、例えば、ＲＮＡｉ構築物およびｓｉＲＮＡの薬学的に許容される塩、このようなＲＮＡｉ構築物の薬学的に許容される塩、ならびに他の生体等価物にも引き寄せられる。

【０１５５】

薬学的に許容される塩基付加塩は、アルカリ金属およびアルカリ土類金属または有機アミンなどの金属またはアミンにより形成される。陽イオンとして用いられる金属の例は、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどである。適切なアミンの例は、Ｎ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、Ｎ－メチルグルカミン、およびプロカインである（例えば、Ｂｅｒｇｅら、「Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓａｌｔｓ」、Ｊ．　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａ　Ｓｃｉ．、６６巻、１～１９頁、１９７７年を参照されたい）。前記の酸性化合物の塩基付加塩は、遊離酸形態を、従来の方法で該塩を生成するのに十分な量の所望の塩基と接触させることにより調製する。遊離酸形態は、該塩形態を酸と接触させ、従来の方法で遊離酸を単離することにより再生成することができる。遊離酸形態は、極性溶媒中における溶解度など、特定の物理的特性において、それぞれの塩形態とある程度異なるが、それ以外の本発明の目的にとって、該塩は、それらの各々の遊離酸と同等である。本明細書で用いられる「薬学的付加塩」には、本発明の組成物の成分のうちの１つの酸形態の薬学的に許容される塩が含まれる。これらには、該アミンの有機酸塩および無機酸塩が含まれる。好ましい酸塩は、塩酸塩、酢酸塩、サリチル酸塩、硝酸塩、およびリン酸塩である。他の適切な薬学的に許容される塩は当業者に周知であり、各種の無機酸および有機酸の塩基塩が含まれる。

【０１５６】

ｓｉＲＮＡの場合、薬学的に許容される塩の例には、（ａ）ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウムなどの陽イオン、スペルミンおよびスペルミジンなどのポリアミンにより形成される塩；（ｂ）無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などにより形成される酸付加塩；（ｃ）酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギニン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクツロン酸などの有機酸により形成される塩；（ｄ）塩素、臭素、およびヨウ素などの元素陰イオンにより形成される塩が含まれるが、これらに限定されない。

【０１５７】

例示的な組成物は、リポソーム系などの送達系と混合され、また場合によって、許容される賦形剤を含めた、ＲＮＡｉ構築物を含む。特定の実施形態において、該組成物は、局所投与用に製剤化される。

【０１５８】

特定の実施形態において、対象の核酸は、ポリマー媒体を用いて送達される。ポリマー媒体は、１つまたは複数の対象の核酸と共にマイクロ粒子を形成しうる。特定の実施形態において、特に、全身投与が望ましい場合、ナノ粒子のサイズは、直径約１０ｎｍ、２０ｎｍ、３０ｎｍ、４０ｎｍ、５０ｎｍ、６０ｎｍ、７０ｎｍ、８０ｎｍ、９０ｎｍ、１０

０ｎｍ、１２０ｎｍ、１５０ｎｍ、２００ｎｍ以上でありうる。特定の実施形態において、ナノ粒子のサイズは、直径約１０～１２０ｎｍ、１０～１００ｎｍ、５０～１２０ｎｍ、５０～１００ｎｍ、１０～７０ｎｍ、５０～７０ｎｍ、または約５０ｎｍでありうる。特定の実施形態において、ナノ粒子は、シクロデキストリンを含む。具体的な実施形態において、ナノ粒子は、シクロデキストリンコポリマー、例えば、米国特許第６，５０９，３２３号および米国特許出願公開第２００２／０１５１５２３号に記載の直鎖状のシクロデキストリンコポリマー、および米国特許出願公開第２００４／００７７５９５号、同第２００４／０１０９８８８号、および同第２００４／００８７０２４に記載のシクロデキストリンベースのポリマーを含む。具体的な実施形態において、シクロデキストリンは修飾され、例えば、イミダゾールを含有するＣＤＰなどの官能化された末端基を有する。特定の実施形態において、核酸は、米国特許第７，０１８，６０９号、および同第７，１６６，３０２号、および米国特許出願公開第２００４／００６３６５４号に記載の複合体などの組入れ複合体を用いて送達することができる。特定の実施形態において、送達系または媒体は、１つまたは複数の修飾剤または修飾成分、例えば、マイクロ粒子の表面化学反応を変化させうる修飾剤をさらに含みうる。修飾剤は、陰イオン成分でありうる。修飾剤は、以下に記載の通り、（１つまたは複数の）特定の組織、または（１つまたは複数の）細胞型を標的とするリガンドでありうる。修飾剤は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）分子、例えば、ＰＥＧ５０００分子でありうる。

【０１５９】

特定の実施形態において、ＥＰＡＳ１阻害剤またはその医薬組成物は、標的細胞上における特定の細胞表面タンパク質またはマトリックスに結合し、これにより標的細胞への該複合体の封入を促進し、場合によっては、細胞によるＲＮＡｉ構築物の取込みを増強するのに有効な１つまたは複数のリガンドと会合しうる。例示だけを目的として、特定の細胞型を本発明の超分子複合体およびリポソームの標的とする場合の使用に適するリガンドの例を、以下の表に列挙する。

【０１６０】

【表７】

表7:各細胞型に対する標的化された送達に適するリガンド

リガンド	受容体	細胞型
葉酸	葉酸受容体	上皮癌、骨髄幹細胞
水溶性ビタミン	ビタミン受容体	各種の細胞
リン酸ピリドキシル	CD4	CD4+リンパ球
アポリポタンパク質	LDL	肝臓の肝細胞、血管内皮細胞
インスリン	インスリン受容体	
トランスフェリン	トランスフェリン受容体	内皮細胞
トランスフェリン	メガリン	腎近位尿細管細胞
ガラクトース	アシアロ糖タンパク質受容体	肝臓の肝細胞
シアリル-ルイス$_x$	Eセレクチン、Pセレクチン	活性化内皮細胞
Mac-1	Lセレクチン	好中球、白血球
VEGF	Flk-1、Flk-2	腫瘍上皮細胞
塩基性FGF	FGF受容体	腫瘍上皮細胞
EGF	EGF受容体	上皮細胞
VCAM-1	a_4b_1インテグリン	血管内皮細胞
ICAM-1	a_Lb_2インテグリン	血管内皮細胞
PECAM-1/CD31	a_vb_3インテグリン	血管内皮細胞、活性化血小板
オステオポンチン	a_vb_1インテグリン a_vb_5インテグリン	アテローム斑内における内皮細胞および平滑筋細胞
RGD配列	a_vb_3インテグリン	腫瘍内皮細胞、血管平滑筋細胞
HIV GP 120/41またはGP120	CD4	CD4+リンパ球

特定の実施形態において、ＥＰＡＳ１阻害剤またはその医薬組成物は、ガラクトースまたはトランスフェリンを含む１つまたは複数の標的化リガンドと会合しうる。腎明細胞癌（ＲＣＣ）では、トランスフェリンに結合可能な表面受容体であるメガリンが過剰発現する（Ｓｃｈｕｅｔｚら、Ｊ Ｍｏｌ Ｄｉａｇｎ.、７巻、２０６～１８頁、２００５年）。また低酸素状態時には、トランスフェリン受容体が過剰発現することも示されている（Ｔａｃｃｈｉｎｉら、Ｊ. Ｂｉｏｌ. Ｃｈｅｍ.、２７４巻、２４１４２～６頁、１９９９年；ＬｏｋおよびＰｏｎｋａ、Ｊ Ｂｉｏｌ. Ｃｈｅｍ.、２７４巻、２４１４７～５２頁、１９９９年）。明細胞ＲＣＣはまた、トランスフェリン受容体を高度に上方調節し、トランスフェリンを、腎臓の障害、特に腎癌を治療するのに望ましい標的化リガンドとしている。ガラクトースを含む例示的なリガンドには、例えば、ラクトースおよび類似の分子が含まれる。肝臓のアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）は、肝細胞表面上で発現するＣ型レクチンである。ＡＳＧＰＲは、末端のβ－Ｄ－ガラクトース（Ｇａｌ）またはＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）を有する糖タンパク質に結合する。ＡＳＧＰＲに対するリガンドの親和性は、種類（Ｇａｌ対ＧａｌＮＡｃ）、数（四分岐＞三分岐＞＞二分岐＞＞一分岐）、および多分岐残基の配置に依存する。ＡＳＧＰＲ

（ヒトは四量体）の各ポリペプチドサブユニットは、単一の末端ＧａｌまたはＧａｌＮＡｃに結合しうる。

【０１６１】

他の実施形態

腎癌

腎癌の最も一般的な形態である腎細胞癌（ＲＣＣ）には、１０，０００人中約３人が罹患する。この発生率は上昇しつつあり、その結果、米国では毎年約３８，０００人の新規症例が発生している。近年ＲＣＣについて３つの新薬が承認されたが、効果は大半が部分的であり、期間も限られている（ＣｏｓｔａおよびＤｒａｂｋｉｎ、Ｏｎｃｏｌｏｇｉｓｔ　Ｄｅｃ、１２巻、１２巻、１４０４～１５頁、２００７年）。本明細書において、本発明者らは、腎癌を治療するための新規の治療剤を提起する。非ウイルス的に送達された短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）によるＥＰＡＳ１の阻害は、腎癌に対する有効な療法を提供する。単独の、および／または低用量の化学療法剤と組み合わせたＥＰＡＳ１阻害の結果、安全性プロファイルが現在の療法より優れていると予測される、腎癌に対する治療機構がもたらされる。

【０１６２】

ＲＣＣ症例の７５パーセントは明細胞癌であり、大半が、フォンヒッペル－リンダウ（ＶＨＬ）遺伝子の機能不全により駆動されている。ＶＨＬの機能喪失およびＲＣＣをもたらすＶＨＬ以外の他の経路は、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）の上方調節および結果として生じる新血管形成など、低酸素反応の異常な活性化を共有する。ＶＨＬ遺伝子の産物であるｐＶＨＬは、転写因子である低酸素誘導因子（ＨＩＦ）のαサブユニットを認識し、それをポリユビキチン化およびプロテアソームによる分解の標的とする複合体の一部である。したがって、ＶＨＬ欠損癌細胞は、ＨＩＦレベルが高く、細胞内ＨＩＦレベルを低下させる治療の良好な候補細胞となっている。実際、動物におけるｐＶＨＬ欠損腫瘍の増殖を抑制するには、レトロウイルスを介する、ＥＰＡＳ１を標的とするｓｈＲＮＡの送達によるＥＰＡＳ１（３つのヒトＨＩＦαタンパク質の１つ）の阻害で十分であることが示されている（Ｋｏｎｄｏら、ＰＬＯＳ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、１巻、３号、４３９～４４４頁、２００３年）。

【０１６３】

フォンヒッペル－リンダウ（ＶＨＬ）腫瘍抑制遺伝子の産物の作用は、正常細胞および疾患細胞の両方における低酸素状態遺伝子の調節に関与する。ＶＨＬ病を有する個体は、腎嚢胞、腎明細胞癌、褐色細胞腫、中枢神経系の血管芽細胞腫、網膜血管腫、膵臓の島細胞腫、および内リンパ嚢腫瘍に対する素因を示す（ＰｕｇｈおよびＲａｔｃｌｉｆｆｅ、Ｓｅｍｉｎ．　Ｃａｎｃｅｒ．　Ｂｉｏｌ．、１３巻、８３～８９頁、２００３年）。ＶＨＬ遺伝子の産物は、低酸素誘導因子アルファサブユニットの分解に関与する、Ｅ３－ユビキチンリガーゼ複合体の認識成分として作用することにより、ユビキチンを介するタンパク質分解に関与する（Ｃｏｃｋｍａｎら、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２７５巻、２５７３３～２５７４１頁、２０００年；Ｏｈｈら、Ｎａｔ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．、２巻、４２３～４２７頁、２０００年）。正常細胞において、ＶＨＬ／ＨＩＦ複合体は、ＨＩＦアルファサブユニットを形成し、これを破壊の標的とする（Ｍａｘｗｅｌｌら、Ｎａｔｕｒｅ、３９９巻、２７１～２７５頁、１９９９年）。相同的な酸素依存ドメインの認識は、それを介してＶＨＬタンパク質がＨＩＦ１αを認識する機構であるため、この破壊は、ＥＰＡＳ１の酸素依存ドメインの水酸化、およびＶＨＬ遺伝子の産物によるその後の認識を介して生じるものと提示されている（Ｍａｘｗｅｌｌら、Ｎａｔｕｒｅ、３９９巻、２７１～２７５頁、１９９９年）。実際、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、ＥＰＡＳ１は、酵素であるプロリル４－ヒドロキシラーゼにより水酸化される（Ｈｉｒｓｉｌａら、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２００３年）。

【０１６４】

腎癌に対するＥＰＡＳ１の阻害

ＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡは、肺、心臓、および肝臓など、高度に血管形成された成体マウ

スの組織内、ならびに胚マウスおよび成体マウスの胎盤細胞および内皮細胞内において主に発現する（Ｈｏｇｅｎｅｓｃｈら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７２巻、８５８１～８５９３頁、１９９７年）。ヒトの正常組織と癌との比較により、ＥＰＡＳ１タンパク質は、正常組織では検出可能でないが、悪性組織内では容易に可視化されることが示される（Ｔａｌｋｓら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．、１５７巻、４１１～４２１頁、２０００年）。発生におけるＥＰＡＳ１の発現に対する必要性は、カテコールアミンホメオスタシスの破壊、および観察される心不全に対する保護の欠如が含まれる、ＥＰＡＳ１遺伝子欠損マウス胚において観察される異常により裏付けられる（Ｔｉａｎら、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、１２巻、３３２０～３３２４頁、１９９８年）。

【０１６５】

ＥＰＡＳ１の発現およびＨＩＦの転写活性は、細胞内の酸素濃度により正確に調節されている。酸素レベルの変化が、ＨＩＦ１－ベータタンパク質のレベルには影響を及ぼさないのに対し、細胞を低酸素状態に曝露すると、主に、該アルファサブユニットタンパク質の安定化に起因して、該アルファサブユニットの量が顕著に増大する（ＳａｆｒａｎおよびＫａｅｌｉｎ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、１１１巻、７７９～７８３頁、２００３年）。組織培養細胞内では、ＥＰＡＳ１のｍＲＮＡおよびタンパク質が低レベルで発現するが、低酸素状態である１％酸素へと曝露することにより、ＥＰＡＳ１タンパク質の発現は顕著に誘導される（Ｗｉｅｓｅｎｅｒら、Ｂｌｏｏｄ、９２巻、２２６０～２２６８頁、１９９８年）。低酸素誘導因子２アルファ／低酸素誘導因子１ベータのヘテロ二量体タンパク質は、コア認識配列である５’－ＴＡＣＧＴＧ－３’を含有し、低酸素状態調節型遺伝子のシス調節領域内に見出される低酸素反応エレメントに結合する（Ｅｍａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．、９４巻、４２７３～４２７８頁、１９９７年；Ｈｏｇｅｎｅｓｃｈら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７２巻、８５８１～８５９３頁、１９９７年）。ＨＲＥに対する該ヘテロ二量体の結合は、遺伝子発現を誘導する。正常酸素状態へと復帰すると、ＥＰＡＳ１は、急速に分解される（Ｗｉｅｓｅｎｅｒら、Ｂｌｏｏｄ、９２巻、２２６０～２２６８頁、１９９８年）。

【０１６６】

ＥＰＡＳ１の活性化には、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（ＭＡＰＫ）経路が極めて重要である。ＭＡＰＫを直接にリン酸化する二重特異性タンパク質キナーゼの阻害は、低酸素状態におけるＥＰＡＳ１のトランス活性化を防止する（Ｃｏｎｒａｄ、１９９９年；Ｃｏｎｒａｄ、２００１年）。しかし、該阻害剤は、ＥＰＡＳ１のリン酸化を防止せず、したがって、ＭＡＰＫ経路は、ＥＰＡＳ１の活性を調節するが、該タンパク質を直接にはリン酸化しない（Ｃｏｎｒａｄら、Ｃｏｍｐ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｂ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１２８巻、１８７～２０４頁、２００１年；Ｃｏｎｒａｄら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７４巻、３３７０９～３３７１３頁、１９９９年）。ＥＰＡＳ１の調節には、Ｓｒｃファミリーのキナーゼ経路もまた関与する。Ｓｒｃファミリーのキナーゼに対する特異的な阻害は、ヒト肺腺癌細胞におけるＥＰＡＳ１ ｍＲＮＡの低酸素状態誘導発現を消失させる（Ｓａｔｏら、Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２６巻、１２７～１３４頁、２００２年）。

【０１６７】

酸素ホメオスタシスの維持は、生理学的発生において必要とされるのに加えて、腫瘍の増殖においても必要とされる。腫瘍が確立する異常な血管を介する血液の循環は低度であるため、腫瘍細胞は低酸素状態を経過する。低酸素状態は癌細胞にとっても毒性であるが、それらは、低酸素環境においてそれらが増殖することを可能とする遺伝子的変化および適合的変化の結果として存続する。このような適合の１つは、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）と称する血管新生性成長因子の発現上昇である。ＶＥＧＦは、低酸素状態に応答して、正常細胞のほか、癌細胞によっても分泌される、血管新生に関わる重要な因子である（Ｈａｒｒｉｓ、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ、２巻、３８～４７頁、２００２年；Ｍａｘｗｅｌｌら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．、１１巻、２９３

～２９９頁、２００１年）。
【０１６８】
最もよく見られるＶＨＬ遺伝子変異の症状である血管芽細胞腫は、それらに関連する間質細胞内におけるＶＥＧＦ　ｍＲＮＡの過剰発現を示す。該ＶＥＧＦ　ｍＲＮＡの過剰発現は、ＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの発現上昇と高度に相関している。この知見は、ＶＨＬ遺伝子の機能喪失と、おそらく、ＶＥＧＦ依存性血管成長におけるＥＰＡＳ１活性を介する、ＶＥＧＦ遺伝子の転写活性化との関係を示唆する（Ｆｌａｍｍｅら、Ａｍ．　Ｊ．　Ｐａｔｈｏｌ．、１５３巻、２５～２９頁、１９９８年）。
【０１６９】
ＶＨＬ遺伝子の産物による腫瘍抑制活性は、ｉｎ　ｖｉｖｏのヒト腎癌細胞におけるＨＩＦ標的遺伝子の活性化により無効化されうる。ＶＨＬ遺伝子の産物の突然変異体が、ＨＩＦを、ユビキチンを介する破壊の標的とする能力を喪失することは、ＨＩＦの下方調節と、ＶＨＬの腫瘍抑制機能とが密接に連関していることを示唆する（Ｋｏｎｄｏら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ、１巻、２３７～２４６頁、２００２年）。げっ歯動物腎細胞癌では、ヒト腎細胞癌と対照的に、ＶＨＬ遺伝子ではなく、結節硬化症複合体２（Ｔｓｃ－２）遺伝子の産物が主要な標的である（Ｌｉｕら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、６３巻、２６７５～２６８０頁、２００３年）。Ｔｓｃ－２機能を欠くラットＲＣＣ細胞は、ＥＰＡＳ１タンパク質の安定化およびＶＥＧＦの上方調節を示し、血管形成が高度であった（Ｌｉｕら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、６３巻、２６７５～２６８０頁、２００３年）。
【０１７０】
ＨＩＦの活性がどのようにしてＶＥＧＦの発現を調節するのかを示す実験により、ＥＰＡＳ１活性の上昇と血管新生との連関もまた裏付けられている。正常なヒト腎細胞のＥＰＡＳ１は低レベルであることが典型的であるが、ＥＰＡＳ１をコードするベクターをこれらの細胞内に導入すると、ＶＥＧＦのｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルが著明に上昇する（Ｘｉａら、Ｃａｎｃｅｒ、９１巻、１４２９～１４３６頁、２００１年）。ＥＰＡＳ１を阻害したところ、ＶＥＧＦの発現は著明に低下し、これにより、ＥＰＡＳ１の活性とＶＥＧＦの発現との直接の連関が裏付けられた（Ｘｉａら、Ｃａｎｃｅｒ、９１巻、１４２９～１４３６頁、２００１年）。同様に、ＥＰＡＳ１をコードするウイルスによりヒト臍帯静脈細胞に形質導入すると、ＶＥＧＦ　ｍＲＮＡの用量依存的な増大が観察される（Ｍａｅｍｕｒａら、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２７４巻、３１５６５～３１５７０頁、１９９９年）。突然変異してトランス活性化ドメインを欠くＥＰＡＳ１の発現は、低酸素状態時におけるＶＥＧＦ　ｍＲＮＡの誘導を阻害するが、この知見により、ＥＰＡＳ１が、ＶＥＧＦ発現の重要な調節物質であることがさらに示唆される（Ｍａｅｍｕｒａら、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２７４巻、３１５６５～３１５７０頁、１９９９年）。
【０１７１】
ＨＩＦの活性とＶＥＧＦの発現との相関はまた、悪性細胞および悪性組織においても観察される。ＥＰＡＳ１は、ＥＰＡＳ１をコードするベクターの不在下にある腎細胞癌（ＲＣＣ）細胞株内において容易に検出することができる（Ｘｉａら、Ｃａｎｃｅｒ、９１巻、１４２９～１４３６頁、２００１年）。正常組織と比較した、腎細胞癌の組織試料中におけるＥＰＡＳ１およびＶＥＧＦ　ｍＲＮＡの著明な増大は、ＥＰＡＳ１の異常な活性が、ＲＣＣによる血管新生に関与しうることを示唆する（Ｘｉａら、Ｃａｎｃｅｒ、９１巻、１４２９～１４３６頁、２００１年）。
【０１７２】
まとめると、これらの研究は、ＥＰＡＳ１の上昇により侵襲性の腫瘍挙動がもたらされ、ＨＩＦ経路の標的化が、異なる複数種類の癌の治療を補助しうることを裏付ける。特に、これらの研究および本明細書で報告されない他の研究は、ＥＰＡＳ１が、腎癌に対する優れた標的であることを示す。ＥＰＡＳ１の発現を阻害して腎細胞癌を治療するには、ＥＰＡＳ１に対するｓｉＲＮＡを罹患した腎組織へと送達する腎細胞標的化粒子を用いて、本明細書に記載の組成物を送達することができる。特定の実施形態では、本明細書に記載

の阻害核酸の腎特異的な送達に適する媒体として、ＲＯＮＤＥＬ（商標）による送達法を用いることができる。ＲＯＮＤＥＬ（商標）法は、その２つの部分からなるｓｉＲＮＡ送達系の基盤をなす、シクロデキストリン含有ポリマーの使用を伴う。第１の成分は、低分子干渉ＲＮＡと混合するとｓｉＲＮＡの陰イオン「骨格」に結合する、直鎖状のシクロデキストリン含有ポリ陽イオンである。該ポリマーおよびｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡを、血清中におけるヌクレアーゼによる分解から完全に保護する、直径１００ｎｍ未満のナノ粒子へと自己組織化する。ｓｉＲＮＡ送達系は、静脈内注射を含めた、各種の送達経路を可能とするように設計されている。標的細胞へと送達されると、標的化リガンドは、細胞表面上における膜受容体へと結合し、エンドサイトーシスによりＲＮＡ含有ナノ粒子は細胞内へと取り込まれ、送達媒体から放出される。

【０１７３】

本発明の腎臓治療剤は、低分子、ペプチド、または、例えば、ペプチド模倣剤などのペプチド類似体、および核酸でありうる。本発明の核酸による腎臓治療剤は、アンチセンスＲＮＡ、ＲＮＡｉ構築物（例えば、ｓｉＲＮＡ）、またはリボザイムでありうる。核酸による腎臓治療剤はまた、例えば、腎細胞内において発現される遺伝子を送達する発現構築物などの遺伝子治療構築物でありうる。

【０１７４】

本発明の腎臓治療剤は、例えば、望ましくない細胞増殖により引き起こされる腎疾患または腎状態に対して有効である。本発明の方法および組成物は、腎癌（例えば、腎明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、嫌色素性腎細胞癌、および好酸性顆粒細胞腫）、急性腎不全、慢性腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症などを含むがこれらに限定されない、任意の腎疾患または腎状態に対して有用または有効でありうる。したがって、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載の腎疾患または腎状態など、１つまたは複数の腎疾患または腎状態に対して有効でありうる。

【０１７５】

特定の実施形態において、腎臓治療剤は、腎疾患または腎状態を有する患者の腎細胞内において調節異常である遺伝子を標的とする。該遺伝子は、腎細胞に特異的でありうる。代替的に、該遺伝子は、例えば、腎細胞における発現レベルが、他の細胞および組織と比較して同等であるかまたはより低い遺伝子など、腎臓特異的な遺伝子ではなく、その遺伝子の発現および／または活性が、腎疾患または腎状態を有する患者の腎細胞においては正常な腎臓に由来する腎細胞と比較して変化している。例えば、腎細胞癌においては、ＥＰＡＳ１が調節異常である。すなわち、ＥＰＡＳ１は、フォンヒッペル－リンダウ（ＶＨＬ）タンパク質の異常活性により、腎細胞癌の細胞では過剰発現するが、正常な腎細胞における発現は検出不可能なレベルでありうる。ＥＰＡＳ１を標的とする腎臓治療剤は、ＥＰＡＳ１の発現を特異的に低下させるかまたは阻害する核酸薬剤であり得、このような核酸薬剤は、アンチセンス分子の場合もあり、ＲＮＡｉ構築物（例えば、ｓｉＲＮＡ構築物）の場合もあり、リボザイムの場合もある。

【０１７６】

本発明の別の態様は、腎疾患または腎状態を有する患者を治療する方法を提供する。該方法は一般に、治療有効量の、本発明の医薬組成物を該患者に全身投与するステップを含む。全身投与は、例えば、静脈内注射または腹腔内注射、経皮送達、肺内送達、または経口摂取など、各種の送達経路を介して達成することができる。

【０１７７】

特定の態様において、本発明は、癌に罹患する患者を治療する方法であって、（ａ）該患者において、ＥＰＡＳ１を発現する（または、所定の閾値を上回るレベルでＥＰＡＳ１を発現する）複数の癌細胞を有する腫瘍を同定するステップと、（ｂ）ＥＰＡＳ１を標的とする対象の核酸を、適切な形で該患者に投与するステップとを含む方法を提供する。該方法は、ＥＰＡＳ１遺伝子が増幅された複数の癌細胞を有する腫瘍を該患者において同定するステップを、診断部分として包含しうる。遺伝子増幅は、例えば、ｉｎ　ｓｉｔｕ蛍光ハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）またはレプレゼンテーショナルオリゴヌクレオチ

ドマイクロアレイ解析（ＲＯＭＡ）を含めた、各種の方法により検出することができる。
【０１７８】
特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の送達媒体の一部として、（１つまたは複数の）ＥＰＡＳ１阻害剤を投与することにより、明細胞ＲＣＣなどの腎疾患に罹患する患者を治療する方法を提供する。他の実施形態において、該治療方法は、彼らのＶＨＬ状態を決定するために、治療前に患者をプロファイリングするステップを包含する。すなわち、適切なＶＨＬ状態を有する患者は、本方法に望ましい候補患者として選択することができる。適切なＶＨＬ状態は、当技術分野で認知される各種の方法を介して決定することができる。例えば、Ｈｕｉら（Ｕ．Ｓ．６，０１３，４３６）は、挿入または欠失による突然変異でありうる、ＶＨＬにおける突然変異を診断するためのキットおよび方法を開示する。加えて、Ｂｏｍａｎ（ＵＳ２００７／０３１８８１Ａ１）は、細胞内におけるＶＨＬレベルを検出して、野生型の対立遺伝子についてホモ接合性の細胞とヘテロ接合性の細胞とを区別するイムノアッセイについて教示する。さらに、Ｈｅｎｄｅｒｓｏｎ（ＵＳ２００４／１６６４９１Ａ１）は、ＶＨＬ遺伝子における一塩基多型（ＳＮＰ）を診断する方法について教示する。コード領域に位置する場合、ＳＮＰの存在は、非機能性であるか、または機能が低下するタンパク質の生成を結果としてもたらしうる。ＳＮＰは、非コード領域において生じることがより頻繁である。ＳＮＰが調節領域において生じると、それは、ＶＨＬタンパク質の発現に影響を及ぼしうる。例えば、プロモーター領域におけるＳＮＰの存在は、タンパク質の発現を低下させうる。本方法は、それ自体、ＶＨＬの欠損性変異体を有する腫瘍を患者において同定するステップを診断部分として包含しうる。
【０１７９】
本発明は、低分子薬剤、ペプチドまたはペプチド類似体（ペプチド模倣剤を含めた）、核酸薬剤（例えば、ｓｉＲＮＡ構築物を含めたＲＮＡｉ構築物、アンチセンス分子、酵素性核酸、または他の遺伝子治療構築物など）、ワクチン、または現在入手可能であるかもしくは開発中（例えば、臨床試験における）の医薬が含まれるがこれらに限定されない、各種の腎臓治療剤を意図する。このような腎臓治療剤は、Ｄａｖｉｓら（ＵＳ２００６／０２６３４３５Ａ１）により説明される方法に従い送達することができる。
【実施例】
【０１８０】
ここまで一般的な形で説明されている本開示は、本開示の特定の態様および実施形態の例示だけを目的として包含されるものであり、本開示を限定することを意図するものではない以下の実施例を参照することにより、より容易に理解されるであろう。
【０１８１】
（実施例１）
ｓｉＲＮＡを用いるＥＰＡＳ１発現の下方調節
本発明者らは今や、ＥＰＡＳ１の配列に特異的な多数のｓｉＲＮＡを設計し、これらを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏの両方において、それらがＥＰＡＳ１の発現を下方調節する能力について調べた。本明細書では、配列番号５～８２（上記の表２～６で示す）として、特異的なｓｉＲＮＡの配列を示す。
【０１８２】
図２で示す通り、ＥＰＡＳ１を対象とするｓｉＲＮＡは、Ａ４９８（ヒト腎癌）細胞におけるＥＰＡＳ１の発現を下方調節することが可能であった。ＥＰＡＳ１に対する３つのｓｉＲＮＡ二重鎖（表２において配列番号５～１０として示される、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ、ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ、およびｓｉＥＰＡＳ１Ｃ）の各々は、Ａ４９８細胞におけるＥＰＡＳ１のタンパク質レベルを低下させる。これに対し、表８において配列番号８３および８４として示されるｓｉＣＯＮ１（対照の非標的化ｓｉＲＮＡ）は、明らかな下方調節を示さない。
【０１８３】
図２で示される実験を実施するため、Ａ４９８細胞を、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ

Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ社から入手した。トランスフェクションの２４時間前に、６ウェル組織培養プレートに細胞を播種した（ウェル当たりの細胞２５０，０００個）。トランスフェクションには、製造元の推奨に従い、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）および以下の核酸：

「ｓｉＣＯＮＴＲＯＬ」または「ｓｉＣＯＮ１」：陰性対照の非標的化ｓｉＲＮＡ；

「ｓｉＥＰＡＳ１Ａ」：上記の表２における配列番号５および６として示されるｈＥＰＡＳ１の標的部位「Ａ」にわたるｓｉＲＮＡ；

「ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ」：上記の表２における配列番号７および８として示されるｈＥＰＡＳ１の標的部位「Ｂ」にわたるｓｉＲＮＡ；

「ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ」：上記の表２における配列番号９および１０として示されるｈＥＰＡＳ１の標的部位「Ｃ」にわたるｓｉＲＮＡ

の各々を用いて、無血清培地（ＯｐｔｉＭＥＭ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）内で複合体を調製した。

【０１８４】

１０ｎＭの最終核濃度で４時間にわたり該核酸複合体を細胞に曝露し、その後、吸引により該複合体を除去し、完全培地で置換した。トランスフェクションの２日（４８時間）後、Ｔｒｉｚｏｌによりすべての細胞から全ＲＮＡを単離し、ｃＤＮＡへと逆転写させた。ｑＲＴ－ＰＣＲによりＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの相対レベル（トランスフェクトされていないＡ４９８細胞と比べた）を決定し、ハウスキーピング遺伝子（ＧＡＰＤＨ）に対してデータを標準化した。

【０１８５】

【表８】

表8: 本明細書に記載の実施例で用いられる対照核酸の配列;下線を付した残基は3'突出を表す

名称	配列	鎖	配列番号
siCONTROL (またはsiCON1)	5' uagcgacuaaacacaucaauu 3'	センス	配列番号83
	3' uuaucgcugauuuguguaguu 5'	アンチセンス	配列番号84

（実施例２）

各標的部位におけるＥＰＡＳ１　ｓｉＲＮＡを同定するためのタイリング実験

図３Ａで示す通り、タイリング実験を用いて、効力を増大させた、ＥＰＡＳ１を対象とするｓｉＲＮＡを同定した。図３で示される実験を実施するため、Ａ４９８（ヒト腎癌）細胞を、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ社から入手した。トランスフェクションの２４時間前に、６ウェル組織培養プレートに細胞を播種した（ウェル当たりの細胞２５０，０００個）。トランスフェクションには、製造元の推奨に従い、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）および以下の核酸：

「ｓｉＥＰＡＳ１Ａ」：上記の表２および４における配列番号５、６、および２３～４２として示されるｈＥＰＡＳ１の部位「Ａ」にわたるｓｉＲＮＡ二重鎖；

ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－５：上記の表４における配列番号２３および２４として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの５つのヌクレオチド；

ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－４：上記の表４における配列番号２５および２６として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの４つのヌクレオチド；

ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－３：上記の表４における配列番号２７および２８として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの３つのヌクレオチド；

ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２：上記の表４における配列番号２９および３０として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの２つのヌクレオチド；

ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－１：上記の表４における配列番号３１および３２として示されるｈ

ＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの１つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ａ：上記の表２における配列番号５および６として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」を中心とするｓｉＲＮＡ；
ｓｉＥＰＡＳ１Ａ＋１：上記の表４における配列番号３３および３４として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの１つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ａ＋２：上記の表４における配列番号３５および３６として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの２つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ａ＋３：上記の表４における配列番号３７および３８として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの３つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ａ＋４：上記の表４における配列番号３９および４０として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの４つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ａ＋５：上記の表４における配列番号４１および４２として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ａ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの５つのヌクレオチド；
「ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ」：上記の表２および５における配列番号７、８、および４３～６２として示されるｈＥＰＡＳ１の部位「Ｂ」にわたるｓｉＲＮＡ二重鎖；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ－５：上記の表５における配列番号４３および４４として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの５つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ－４：上記の表５における配列番号４５および４６として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの４つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ－３：上記の表５における配列番号４７および４８として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの３つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ－２：上記の表５における配列番号４９および５０として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの２つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ－１：上記の表５における配列番号５１および５２として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの１つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ：上記の表２における配列番号７および８として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」を中心とするｓｉＲＮＡ；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ＋１：上記の表５における配列番号５３および５４として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの１つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ＋２：上記の表５における配列番号５５および５６として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの２つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ＋３：上記の表５における配列番号５７および５８として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの３つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ＋４：上記の表５における配列番号５９および６０として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの４つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ＋５：上記の表５における配列番号６１および６２として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｂ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの５つのヌクレオチド；
「ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ」：上記の表２および６における配列番号９、１０、および６３～８２として示されるｈＥＰＡＳ１の部位「Ｃ」にわたるｓｉＲＮＡ二重鎖；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ－５：上記の表６における配列番号６３および６４として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの５つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ－４：上記の表６における配列番号６５および６６として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの４つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ－３：上記の表６における配列番号６７および６８として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの３つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ－２：上記の表６における配列番号６９および７０として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの２つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ－１：上記の表６における配列番号７１および７２として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の上流にある、ｓｉＲＮＡの１つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ：上記の表２における配列番号９および１０として示されるｈＥＰＡ

Ｓ１の元の部位「Ｃ」を中心とするｓｉＲＮＡ；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ＋１：上記の表６における配列番号７３および７４として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの１つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ＋２：上記の表６における配列番号７５および７６として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの２つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ＋３：上記の表６における配列番号７７および７８として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの３つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ＋４：上記の表６における配列番号７９および８０として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの４つのヌクレオチド；
ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ＋５：上記の表６における配列番号８１および８２として示されるｈＥＰＡＳ１の元の部位「Ｃ」の下流にある、ｓｉＲＮＡの５つのヌクレオチド
の各々を用いて、無血清培地（ＯｐｔｉＭＥＭ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）内で複合体を調製した。

【０１８６】
タイリング実験の実験設計の説明については、図３Ｂを参照されたい。

【０１８７】
１０ｎＭの最終核濃度で４時間にわたりこれらの複合体を細胞に曝露し、その後、吸引により該複合体を除去し、完全培地で置換した。トランスフェクションの２日（４８時間）後、Ｔｒｉｚｏｌによりすべての細胞から全ＲＮＡを単離し、ｃＤＮＡへと逆転写させた。ｑＲＴ－ＰＣＲによりＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡの相対レベル（トランスフェクトされていないＡ４９８細胞と比べた）を決定し、ＧＡＰＤＨに対してデータを標準化した。

【０１８８】
この実験で検討した二重鎖のうち、以下の６つの二重鎖：ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－１、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ＋３、ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ－４、ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ－４が最も強力な抗ＥＰＡＳ１活性を示した。これらの二重鎖については、以下でさらに検討した。

【０１８９】
（実施例３）
ＥＰＡＳ１に対するｓｉＲＮＡは培養されたＡ４９８細胞の増増殖能を低下させる
図４で示す通り、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－１、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ＋３、ｓｉＥＰＡＳ１Ｂ－４、ｓｉＥＰＡＳ１Ｃ－４のｓｉＲＮＡ二重鎖を、それらが、培養されたヒトＡ４９８細胞の増殖能を低下させる能力について検討した。ｓｉＣＯＮ１は、非標的化対照として用いた。ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２およびｓｉＥＰＡＳ１Ａが、Ａ４９８細胞の増殖において最も著明な阻害を誘発した（ＲＴ－ＣＥＳ）。

【０１９０】
図４で示される実験を実施するため、Ａ４９８（ヒト腎癌）細胞を、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ社から入手した。トランスフェクションの２４時間前に、６ウェル組織培養プレートに細胞を播種した（ウェル当たりの細胞２５０，０００個）。トランスフェクションには、製造元の推奨に従い、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）および以下の核酸の各々を用いて、無血清培地（ＯｐｔｉＭＥＭ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）内で複合体を調製した。

【０１９１】
（実施例４）
ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２は細胞内におけるＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡレベルを低下させる
培養されたヒト腎細胞癌（Ａ４９８、７８６－Ｏ、およびＣａｋｉ－１）細胞にｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２（配列番号２９および３０による配列対）をトランスフェクションした後で、ｑＲＴ－ＰＣＲにより該細胞内におけるＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡレベルを検討した。３つの細胞株すべてにおいて、ＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡレベルの極めて強力な配列特異的低下が見られた（図５を参照されたい；誤差バーは、３連による測定の標準偏差を表す）。

【０１９２】
市販されるトランスフェクション試薬（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＲＮＡｉＭＡＸ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を用い、２０ｎＭのｓｉＲＮＡ濃度、４時間の曝露時間で、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２または対照の非標的化ｓｉＲＮＡ二重鎖（ｓｉＣＯＮＴＲＯＬ）を各細胞株にトランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後、細胞内ＲＮＡを単離して逆転写させ、トランスフェクトされないか、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２をトランスフェクトされたか、または対照の非標的化ｓｉＲＮＡ（ｓｉＣＯＮＴＲＯＬ）をトランスフェクトされたＡ４９８細胞、Ｃａｋｉ－１細胞、および７８６－Ｏ細胞において、ＥＰＡＳ１　ｍＲＮＡレベル（ＧＡＰＤＨに対して標準化された）を測定した。
【０１９３】
（実施例５）
ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２は細胞増殖速度を低下させる
有効な抗癌剤であるために、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２は、細胞内ＥＰＡＳ１レベルを低下させるだけでなく、細胞増殖も阻害すべきである。フォンヒッペル－リンダウヌル（ＶＨＬ$^{-}$／$^{-}$）の細胞では、ＥＰＡＳ１のノックダウンに基づく抗増殖効果が期待される。７８６－ＯおよびＡ４９８のヒトＲＣＣ細胞が野生型のｐＶＨＬを欠くのに対し、Ｃａｋｉ－１細胞はＶＨＬ$^{+}$／$^{+}$である。
【０１９４】
細胞増殖速度に対するｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２の効果を検討するため、これら３つのヒトＲＣＣ細胞株の各々に、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２または対照の非標的化ｓｉＲＮＡ（ｓｉＣＯＮＴＲＯＬ）を、各々１０ｎＭ（Ａ４９８およびＣａｋｉ－１）または２０ｎＭ（７８６－Ｏ）でトランスフェクトして４時間置き、リアルタイム細胞電子センシング（ＲＴ－ＣＥＳ）アッセイシステムを用いて、それらのその後の増殖速度を測定した。トランスフェクション後の数日間にわたり定期的に（６０分間ごとに）細胞密度をモニタリングし、「細胞指数」として定量化した。３つの異なる細胞株についての、トランスフェクション後の時間の関数としての細胞指数のプロットを図６Ａ～６Ｃ（誤差バーは、４連ウェルの標準偏差を表す）において示す。ＶＨＬ状態に基づき予測される通り、ｓｉＥＰＡＳ１Ａ－２により、Ａ４９８細胞および７８６－Ｏ細胞においては著明な抗増殖効果が達成されたが、Ｃａｋｉ－１細胞においてはこれが達成されなかったことは、ＶＨＬを欠損する癌細胞が、細胞内におけるＨＩＦレベルを低下させる治療の良好な候補細胞であることを示す。
【０１９５】
当業者は、日常的な実験だけを用いながら、本明細書に記載の本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識するか、またはこれらを確認することができるであろう。このような均等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるものとする。
【０１９６】
引用された参考文献および刊行物のすべては、参照により、その全体において本明細書に組み込まれる。

【図１－１】

hEPAS1 mRNA[GenBankによる配列番号:NM001430](配列番号1)

起点

```
  1 gccacacggg tccggtgccc gctgcgcttc cgccccagcg ctcctgaggc ggccgtacaa
 61 tcctcggcag tgtcctgaga ctgtatggtc agctcagccc ggcctccgac tccttccgac
121 tcccagcatt cgagccactt ttttttttct ttgaaaactc agaaaagtga ctccttttcc
181 agggaaaaag gaacttgggt tcccttctct ccgtcctctt ttcgggtctg acagcctcca
241 cccactcctt ccccggaccc cgcctccgcg cgcaggttcc tcccagtcac ctttctccac
301 ccccgccccc gcacctagcc cgccgcgcgc caccttccac ctgactgcgc ggggcgctcg
361 ggacctgcgc gcacctcgga ccttcaccac ccgcccgggc cgcggggagc ggacgagggc
421 cacagccccc cacccgccag ggagcccagg tgctcggcgt ctgaacgtct caaagggcca
481 cagcgacaat gacagctgac aaggagaaga aaaggagtag ctcggagagg aggaaggaga
541 agtcccggga tgctgcgcgg tgccggcgga gcaaggagac ggaggtgttc tatgagctgg
601 cccatgagct gcctctgccc cacagtgtga gctcccatct ggacaaggcc tccatcatgc
661 gactggcaat cagcttcctg cgaacacaca agctcctctc ctcagtttgc tctgaaaacg
721 agtccgaagc cgaagctgac cagcagatgg acaacttgta cctgaaagcc ttggagggtt
781 tcattgccgt ggtgacccaa gatggcgaca tgatctttct gtcagaaaac atcagcaagt
841 tcatgggact tacacaggtg gagctaacag gacatagtat ctttgacttc actcatccct
901 gcgaccatga ggagattcgt gagaacctga gtctcaaaaa tggctctggt tttgggaaaa
961 aaagcaaaga catgtccaca gagcgggact tcttcatgag gatgaagtgc acggtcacca
1021 acagaggccg tactgtcaac ctcaagtcag ccacctggaa ggtcttgcac tgcacgggcc
1081 aggtgaaagt ctacaacaac tgccctcctc acaatagtct gtgtggctac aaggagcccc
1141 tgctgtcctg cctcatcatc atgtgtgaac caatccagca cccatcccac atggacatcc
1201 ccctggatag caagaccttc ctgagccgcc acagcatgga catgaagttc acctactgtg
1261 atgacagaat cacagaactg attggttacc accctgagga gctgcttggc cgctcagcct
1321 atgaattcta ccatgcgcta gactccgaga acatgaccaa gagtcaccag aacttgtgca
1381 ccaagggtca ggtagtaagt ggccagtacc ggatgctcgc aaagcatggg ggctacgtgt
1441 ggctggagac ccaggggacg gtcatctaca accctcgcaa cctgcagccc cagtgcatca
1501 tgtgtgtcaa ctacgtcctg agtgagattg agaagaatga cgtggtgttc tccatggacc
1561 agactgaatc cctgttcaag ccccacctga tggccatgaa cagcatcttt gatagcagtg
1621 gcaagggggc tgtgtctgag aagagtaact tcctattcac caagctaaag gaggagcccg
1681 aggagctggc ccagctggct cccaccccag gagacgccat catctctctg gatttcggga
1741 atcagaactt cgaggagtcc tcagcctatg gcaaggccat cctgccccag agccagccat
1801 gggccacgga gttgaggagc cacagcaccc agagcgaggc tgggagcctg cctgccttca
1861 ccgtgcccca ggcagctgcc ccgggcagca ccaccccaag tgccaccagc agcagcagca
1921 gctgctccac gcccaatagc cctgaagact attacacatc tttggataac gacctgaaga
1981 ttgaagtgat tgagaagctc ttcgccatgg acacagaggc caaggaccaa tgcagtaccc
2041 agacggattt caatgagctg gacttggaga cactggcacc ctatatcccc atggacgggg
2101 aagacttcca gctaagcccc atctgccccg aggagcggct cttggcggag aacccacagt
2161 ccacccccca gcactgcttc agtgccatga caaacatctt ccagccactg gcccctgtag
2221 ccccgcacag tcccttcctc ctggacaagt ttcagcagca gctggagagc aagaagacag
2281 agcccgagca ccggcccatg tcctccatct tctttgatgc cggaagcaaa gcatccctgc
2341 caccgtgctg tggccaggcc agcaccctc tctcttccat gggggcaga tccaatacc
2401 agtggccccc agatccacca ttacattttg ggcccacaaa gtgggccgtc ggggatcagc
2461 gcacagagtt cttgggagca gcgccgttgg ggccccctgt ctctccaccc catgtctcca
2521 ccttcaagac aaggtctgca aagggttttg gggctcgagg cccagacgtg ctgagtccgg
```

Fig. 1

【図１－２】

```
2581 ccatggtagc cctctccaac aagctgaagc tgaagcgaca gctggagtat gaagagcaag
2641 ccttccagga cctgagcggg ggggacccac ctggtggcag cacctcacat ttgatgtgga
2701 aacggatgaa gaacctcagg ggtgggagct gcccttgat gccggacaag ccactgagcg
2761 caaatgtacc caatgataag ttcacccaaa acccatgag gggcctgggc catcccctga
2821 gacatctgcc gctgccacag cctccatctg ccatcagtcc cggggagaac agcaagagca
2881 ggttcccccc acagtgctac gccacccagt accaggacta cagcctgtcg tcagcccaca
2941 aggtgtcagg catggcaagc cggctgctcg ggccctcatt tgagtcctac ctgctgcccg
3001 aactgaccag atatgactgt gaggtgaacg tgcccgtgct gggaagctcc acgctcctgc
3061 aaggagggga cctcctcaga gccctggacc aggccacctg agccaggcct tctacctggg
3121 cagcacctct gccgacgccg tcccaccagc ttcactctct ccgtctgttt ttgcaactag
3181 gtatttctaa cgccagcaca ctatttacaa gatggactta cctggcagac ttgcccaggt
3241 caccaagcag tggccttttt ctgagatgct cacttttatta tccctatttt taaagtacac
3301 aattgttttta cctgttctga aatgttctta aattttgtag gatttttttc ctccccacct
3361 tcaatgactt ctaatttata ttatccatag gtttctctcc ctccttctcc ttctcacaca
3421 caactgtcca tactaacaag tttggtgcat gtctgtttct ctgtagggag aagctttagc
3481 ttcattttac taaaaagatt cctcgttatt gttgttgcca aagagaaaca aaaatgattt
3541 tgctttccaa gcttggtttg tggcgtctcc ctcgcagagc ccttctcgtt tcttttttaa
3601 actaatcacc atattgtaaa tttcagggtt ttttttttt tgtttaagct gactctttgc
3661 tctaattttg gaaaaaaaga aatgtgaagg gtcaactcca acgtatgtgg ttatctgtga
3721 aagttgcaca gcgtggcttt tcctaaactg gtgtttttcc cccgcatttg gtggattttt
3781 tattattatt caaaaacata actgagtttt ttaaaagagg agaaaattta tatctgggtt
3841 aagtgtttat catatatatg ggtactttgt aatatctaaa aacttagaaa cggaaatgga
3901 atcctgctca caaaatcact ttaagatctt ttcgaagctg ttaatttttc ttagtgttgt
3961 ggacactgca gacttgtcca gtgctcccac ggcctgtacg gacactgtgg aaggcctccc
4021 tctgtcggct ttttgccatc tgtgatatgc catagggtgtg acaatccgag cagtggagtc
4081 attcagcggg agcactgcgc gctatcccct cacattctct atgtactatg tatgtatgta
4141 ttattattat tgctgccaag agggtctgat ggcacgttgt ggggtcgggg ggtggggcgg
4201 ggaagtgctc taacttttct taaggttttg ttgctagccc ttcaagtgca ctgagctatg
4261 tgactcggat ggtctttcac acggcacatt tggacatttc cagaactacc atgagatggt
4321 ttagacggga attcatgcaa atgaggggtc aaaaatggta tagtgacccc gtccacgtcc
4381 tccaagctca cgaccttgga gccccgtgga gctggactga ggaggaggct gcacagcggg
4441 agagcagctg gtccagacca gccctgcagc ccccactcag ccggcagcca gatggccccg
4501 caaggcctcc agggatggcc cctagccaca ggccctggct gaggtctctg ggtcggtcag
4561 tgacatgtag gtaggaagca ctgaaaatag tgttcccaga gcactttgca actccctggg
4621 taagagggac gacacctctg gtttttcaat accaattaca tggaactttt ctgtaatggg
4681 tacaatgaag aagtttctaa aaacacacac aaagcacatt gggccaacta tttagtaagc
4741 ccggatagac ttattgccaa aaacaaaaaa tagctttcaa aagaaattta agttctatga
4801 gaaattcctt agtcatggtg ttgcgtaaat catattttag ctgcacggca ttaccccaca
4861 cagggtggca gaacttgaag ggttactgac gtgtaaatgc tggtatttga tttcctgtgt
4921 gtgttgccct ggcattaagg gcattttacc cttgcagttt tactaaaaca ctgaaaaata
4981 ttccaagctt catattaacc ctacctgtca acgtaacgat ttcatgaacg ttattatatt
5041 gtcgaattcc tactgacaac attataactg tatgggagct taactttata aggaaatgta
5101 ttttgacact ggtatcttat taaagtattc tgatcctaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
5161 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa
```

Fig. 1 続き

【図２】

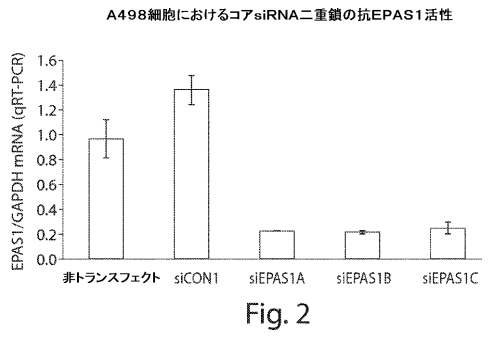


Fig. 2

【図３】

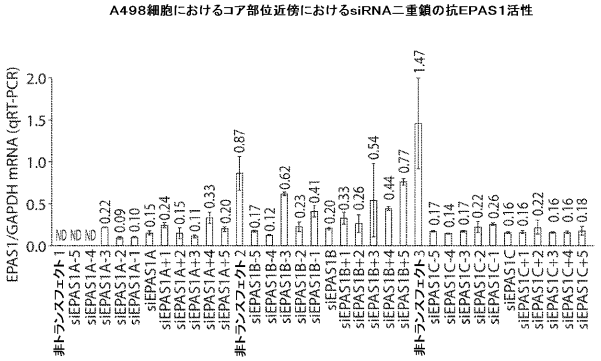


Fig. 3A

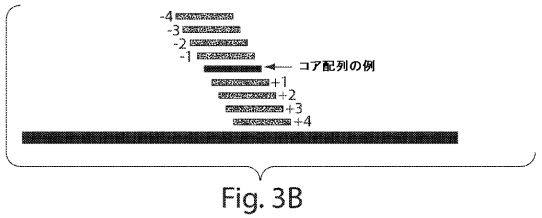


Fig. 3B

【図４】

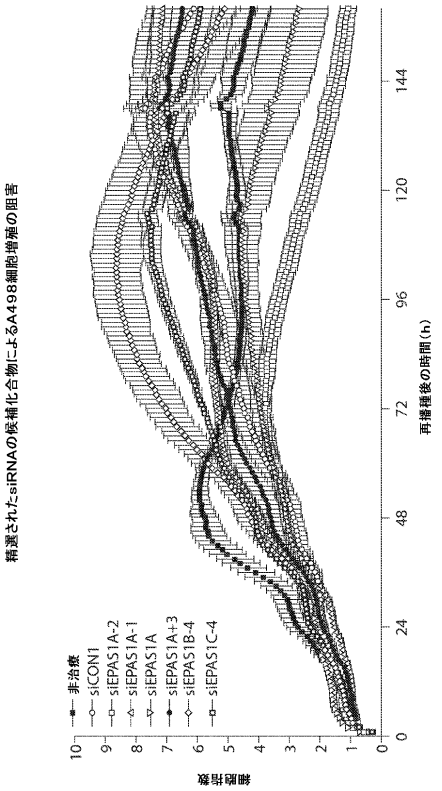


Fig. 4

【図５】

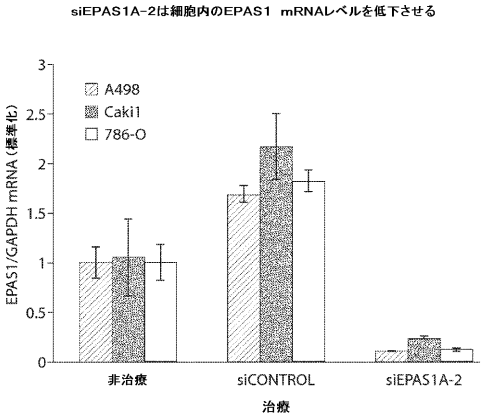


Fig. 5

【図６Ａ】

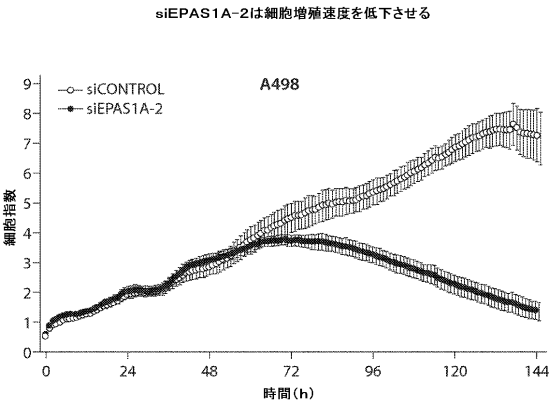


Fig. 6A

【図６Ｂ】

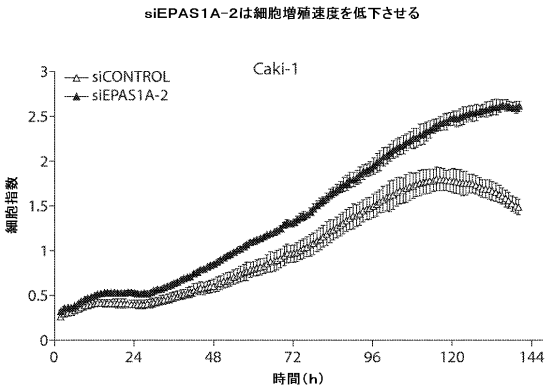


Fig. 6B

【図６Ｃ】

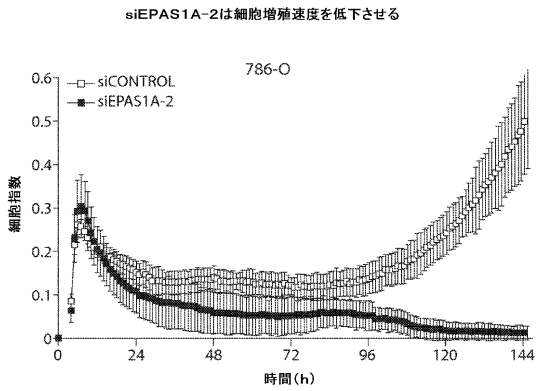


Fig. 6C

【配列表】

2011516065000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/002125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/11 A61K31/7088 A61P35/00

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 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 13 June 2006 (2006-06-13), "Homo sapiens piRNA piR-47460, complete sequence." XP002549880 retrieved from EBI accession no. EMBL:DQ579348 Database accession no. DQ579348 the whole document -/--	11-14, 16-18, 21,26, 30-32,34

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 document 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
12 October 2009	22/12/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Vreugde, Sarah

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/002125

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/076639 A (WYETH CORP [US]; O'TOOLE MARY MARGOT [US]; WEI LIU [US]) 10 September 2004 (2004-09-10) page 30; table 3 page 26, paragraph 97 page 28, paragraph 107 page 29, paragraph 108 page 53, paragraph 198	1-8, 11-21, 23,24, 26-32, 34,40, 41, 52-56, 61,62, 64,70
Y	WO 2007/055547 A (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]; IM DONG-SOO [KR]; JUNG CHO-ROK [KR]) 18 May 2007 (2007-05-18) page 69, paragraph 2 page 70, paragraph 3 page 71, paragraph 2	25,33, 35-39, 42-51, 57-60, 63, 65-69, 71-75
A	SOWTER HEIDI M ET AL: "Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia." CANCER RESEARCH 1 OCT 2003, vol. 63, no. 19, 1 October 2003 (2003-10-01), pages 6130-6134, XP002549878 ISSN: 0008-5472 page 6130, right-hand column, paragraph 3 page 6131 - page 6132; figures 1,2	1-75
A	TAKEDA NORIHIKO ET AL: "Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1." CIRCULATION RESEARCH 23 JUL 2004, vol. 95, no. 2, 23 July 2004 (2004-07-23), pages 146-153, XP002549879 ISSN: 1524-4571 page 148, left-hand column, paragraph 3 page 150; figure 4	1-75

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/002125

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/220393 A1 (WARD DONNA T [US] ET AL) 4 November 2004 (2004-11-04) page 4, paragraphs 29,30; claims 47,84 page 34; table 5	25,33, 35-39, 42-51, 57-60, 63, 65-69, 71-75

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/002125

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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 additional 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 an 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. ☒ 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.:

see annex

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 Application No. PCT/US2009/002125

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-75 partially

nucleic acids comprising a sequence that hybridizes to a region of an EPAS1 transcript corresponding to nucleotides 655-718 of SEQ ID NO: 1 and which can reduce the expression of EPAS1; related compositions, methods and uses.

---

2. claims: 1-75 partially

nucleic acids comprising a sequence that hybridizes to a region of an EPAS1 transcript corresponding to nucleotides 2878-2929 of SEQ ID NO: 1 and which can reduce the expression of EPAS1; related compositions, methods and uses.

---

3. claims: 1-75 partially

nucleic acids comprising a sequence that hybridizes to a region of an EPAS1 transcript corresponding to nucleotides 4978-5039 of SEQ ID NO: 1 and which can reduce the expression of EPAS1; related compositions, methods and uses.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/002125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004076639 A	10-09-2004	NONE	
WO 2007055547 A	18-05-2007	AU 2006312445 A1	18-05-2007
		CA 2625854 A1	18-05-2007
		CN 101309928 A	19-11-2008
		EP 1954709 A1	13-08-2008
		JP 2009515874 T	16-04-2009
		KR 20070050611 A	16-05-2007
		US 2008269158 A1	30-10-2008
US 2004220393 A1	04-11-2004	AU 2003295801 A1	18-06-2004
		EP 1581656 A2	05-10-2005
		WO 2004048526 A2	10-06-2004
		US 2004101858 A1	27-05-2004
		US 2007020679 A1	25-01-2007

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　9/51	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51	
Ａ６１Ｋ　47/40	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/40	
Ａ６１Ｋ　47/48	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/48	
Ａ６１Ｋ　47/30	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/30	
Ｃ１２Ｑ　1/68	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/68	Ａ

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　デイビス,　マーク　イー.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９１１０５,　パサディナ,　ラグーナ　ロード　５７５
(72)発明者　ヘイデル,　ジェレミー　ディー.
アメリカ合衆国　ウィスコンシン　５３７０４,　マディソン,　ケンジントン　ドライブ　２６０
(72)発明者　リュー,　ジョアンナ　イーーチン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９１００７,　アルカディア,　ノース　ゴールデン　ウエスト　アベニュー　６７２８

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11 HA17
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR59 QR62 QS25 QX01
4C076 AA65 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 CC27 EE39 EE59 FF34 FF63
4C084 AA13 MA02 MA24 MA66 NA13 NA14 ZB261 ZB262
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA24 MA66 NA13 NA14 ZB26