

(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2005-506087

(P2005-506087A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 9/127
A61K 9/50
A61K 9/51
A61K 31/7105

F 1

C12N 15/00
A61K 9/127
A61K 9/50
A61K 9/51
A61K 31/7105

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁) 最終頁に続く

テーマコード (参考)

4B024
4C076
4C086

(21) 出願番号	特願2003-538376 (P2003-538376)	(71) 出願人	504164930 リボファーマ アーゲー ドイツ連邦共和国 95326 クルムバ ッハ、フリッツ・ホルンシューフーシュト ラーセ 9
(86) (22) 出願日	平成14年10月25日 (2002.10.25)	(74) 代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月26日 (2004.4.26)	(72) 発明者	クレブス, アンヤ ドイツ連邦共和国 90425 ニュール ンベルク、プレッツフェルダー シュトラ ーセ 10
(86) 國際出願番号	PCT/EP2002/011973	(72) 発明者	ジョン, マティアス ドイツ連邦共和国 96103 ハールシ ュタット、カペツレンシュトラーゼ 12
(87) 國際公開番号	W02003/035876		
(87) 國際公開日	平成15年5月1日 (2003.5.1)		
(31) 優先権主張番号	101 55 280.7		
(32) 優先日	平成13年10月26日 (2001.10.26)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
(31) 優先権主張番号	101 58 411.3		
(32) 優先日	平成13年11月29日 (2001.11.29)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
(31) 優先権主張番号	101 60 151.4		
(32) 優先日	平成13年12月7日 (2001.12.7)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】プラス鎖RNAウイルスによる感染症を処置するための2本鎖リボ核酸の使用

(57) 【要約】

本発明は、プラス鎖のRNAウイルスによる感染症を処置するための、2本鎖リボ核酸(d s RNA)の使用に関し、ここで、d s RNAの鎖S1は、ウイルスゲノムの翻訳可能なドメインのセグメントに少なくとも部分的に相補的なドメインを含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(+)鎖RNAウイルス感染症を処置するための、2本鎖リボ核酸(dsRNA)の使用であって、dsRNAの1本の鎖S1が、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示す、前記使用。

【請求項 2】

(+)鎖RNAウイルス感染症を処置するための医薬を製造するための、2本鎖リボ核酸(dsRNA)の使用であって、dsRNAの1本の鎖S1が、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示す、前記使用。

【請求項 3】

(+)鎖RNAウイルスが、C型肝炎ウイルス(HCV)である、請求項1または2に記載の使用。

【請求項 4】

dsRNAが、ウイルスゲノムからコードされたポリタンパク質の発現を阻害することができる、請求項1～3のいずれかに記載の使用。

【請求項 5】

dsRNAが、ウイルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼ、特にHCV-NS3ヘリカーゼの発現を阻害することができる、請求項1～4のいずれかに記載の使用。

【請求項 6】

ウイルスRNAの読みとり方向におけるセグメントが、ヘリカーゼ、特にHCV-NS3ヘリカーゼをコードするウイルスゲノムの前に、またはこの領域中に配置されている、請求項1～5のいずれかに記載の使用。

【請求項 7】

相補的な領域が、好ましさの低い順に、25個より少ない、19～24個の、20～24個の、21～23個の、および特に22または23個のヌクレオチドを有する、請求項1～6のいずれかに記載の使用。

【請求項 8】

鎖S1が、好ましさの低い順に、30個より少ない、25個より少ない、21～24個の、および特に23個のヌクレオチドを有する、請求項1～7のいずれかに記載の使用。

【請求項 9】

dsRNAが、1～4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる1本鎖のオーバーハングを、該dsRNAの少なくとも1つの末端において有する、請求項1～8のいずれかに記載の使用。

【請求項 10】

dsRNAが、1つの末端のみに、特に鎖S1の3'末端であるこの末端において、オーバーハングを有する、請求項9に記載の使用。

【請求項 11】

dsRNAが、鎖S1に加えて鎖S2を有し、鎖S1が23ヌクレオチド長であり、鎖S2が21ヌクレオチド長であり、かつ、鎖S1の3'末端が2個のヌクレオチドで構成された1本鎖のオーバーハングを有するが、鎖S1の5'末端に位置するdsRNAの末端は平滑である、請求項1～10のいずれかに記載の使用。

【請求項 12】

dsRNAが、経口的に、吸入、注入または注射により、特に静脈内または腹腔内注入もしくは注射により投与するのに適する製剤中に存在する、請求項1～11のいずれかに記載の使用。

【請求項 13】

製剤が、dsRNAと、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水溶液または生理学的に許容される緩衝液、特にリン酸緩衝生理食塩水溶液とから、特に専らなる、請求項1～12のいずれかに記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

d s R N A が、生理学的に許容される溶液中に、特に生理学的に許容される緩衝液もしくは生理食塩水溶液中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、ウイルスカプシド、カプソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の使用。

【請求項 15】

d s R N A を、好ましさの低い順に、1日体重 1 k gあたり最大 5 m g、2 . 5 m g、2 0 0 μ g、1 0 0 μ g、5 0 μ g および最適には最大 2 5 μ g の投与量で用いる、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の使用。

【請求項 16】

(+)鎖 R N A ウィルス感染症を処置するための医薬であって、該医薬が、2本鎖リボ核酸 (d s R N A) を含み、ここで、d s R N A の1本の鎖 S 1 が、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示す、前記医薬。

【請求項 17】

(+)鎖 R N A ウィルスが、C型肝炎ウィルス (H C V) である、請求項 16 に記載の医薬。

【請求項 18】

d s R N A が、ウイルスゲノムからコードされたポリタンパク質の発現を阻害することができる、請求項 16 または 17 に記載の医薬。

【請求項 19】

d s R N A が、ウイルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼ、特に H C V - N S 3 ヘリカーゼの発現を阻害することができる、請求項 16 ~ 18 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 20】

ウィルス R N A の読みとり方向におけるセグメントが、ヘリカーゼ、特に H C V - N S 3 ヘリカーゼをコードするウイルスゲノムの前に、またはこの領域中に配置されている、請求項 16 ~ 19 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 21】

相補的な領域が、好ましさの低い順に、2 5 個より少ない、1 9 ~ 2 4 個の、2 0 ~ 2 4 個の、2 1 ~ 2 3 個の、および特に 2 2 または 2 3 個のヌクレオチドを有する、請求項 16 ~ 2 0 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 22】

鎖 S 1 が、好ましさの低い順に、3 0 個より少ない、2 5 個より少ない、2 1 ~ 2 4 個の、および特に 2 3 個のヌクレオチドを有する、請求項 16 ~ 2 1 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 23】

d s R N A が、1 ~ 4 個、特に 2 または 3 個のヌクレオチドからなる 1 本鎖のオーバーハングを、該 d s R N A の少なくとも 1 つの末端において有する、請求項 16 ~ 2 2 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 24】

d s R N A が、1 つの末端のみに、特に鎖 S 1 の 3' 末端であるこの末端において、オーバーハングを有する、請求項 2 3 に記載の医薬。

【請求項 25】

d s R N A が、鎖 S 1 に加えて鎖 S 2 を有し、鎖 S 1 が 2 3 ヌクレオチド長であり、鎖 S 2 が 2 1 ヌクレオチド長であり、かつ、鎖 S 1 の 3' 末端が 2 個のヌクレオチドで構成された 1 本鎖のオーバーハングを有するが、鎖 S 1 の 5' 末端に位置する d s R N A の末端は平滑である、請求項 16 ~ 2 4 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 26】

医薬が、経口的に、吸入、注入または注射により、特に静脈内または腹腔内注入もしくは注射により投与するのに適する製剤である、請求項 16 ~ 2 5 のいずれかに記載の医薬。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

製剤が、d s R N Aと、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水溶液または生理学的に許容される緩衝液、特にリン酸緩衝生理食塩水溶液とから、特に専らなる、請求項26に記載の医薬。

【請求項 28】

d s R N Aが、溶液中の、特に生理学的に許容される緩衝液もしくは生理食塩水溶液中の医薬中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、ウイルスカプシド、カプソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項16～27のいずれかに記載の医薬。

【請求項 29】

医薬が、d s R N Aを、好ましさの低い順に、1日体重1kgあたり5mg、2.5mg、200μg、100μg、50μgおよび最適には25μgの最大投与量を可能にする量で含む、少なくとも1つの投薬単位において利用可能である、請求項16～28のいずれかに記載の医薬。

【請求項 30】

(+)鎖R N Aウイルスの細胞中での複製を阻害する方法であって、少なくとも1つの2本鎖リボ核酸(d s R N A)を、細胞中に導入し、d s R N Aの1本の鎖S1が、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示す、前記方法。

【請求項 31】

(+)鎖R N Aウイルスが、C型肝炎ウイルスである、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

ウイルスゲノムからコードされたポリタンパク質の発現を阻害する、請求項30または31に記載の方法。

【請求項 33】

ウイルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼ、特にH C V - N S 3ヘリカーゼの発現を阻害する、請求項30～32のいずれかに記載の方法。

【請求項 34】

ウイルスR N Aの読みとり方向におけるセグメントが、ヘリカーゼ、特にH C V - N S 3ヘリカーゼをコードするウイルスゲノムの前に、またはこの領域中に配置されている、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

相補的な領域が、好ましさの低い順に、25個より少ない、19～24個の、20～24個の、21～23個の、および特に22または23個のヌクレオチドを有する、請求項30～34のいずれかに記載の方法。

【請求項 36】

鎖S1が、好ましさの低い順に、30個より少ない、25個より少ない、21～24個の、および特に23個のヌクレオチドを有する、請求項30～35のいずれかに記載の方法。

【請求項 37】

d s R N Aが、1～4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる1本鎖のオーバーハングを、該d s R N Aの少なくとも1つの末端において有する、請求項30～36のいずれかに記載の方法。

【請求項 38】

d s R N Aが、1つの末端のみに、特に鎖S1の3'末端であるこの末端において、オーバーハングを有する、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

d s R N Aが、鎖S1に加えて鎖S2を有し、鎖S1が23ヌクレオチド長であり、鎖S2が21ヌクレオチド長であり、かつ、鎖S1の3'末端が2個のヌクレオチドで構成された1本鎖のオーバーハングを有するが、鎖S1の5'末端に位置するd s R N Aの末端

10

20

30

40

50

は平滑である、請求項 30～38 のいずれかに記載の方法。

【請求項 40】

d s R N A が、溶液中に、特に生理学的に許容される緩衝液もしくは生理食塩水溶液中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、ウイルスカプシド、カプソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項 30～39 のいずれかに記載の方法。

【請求項 41】

2本鎖リボ核酸 (d s R N A) であって、該 d s R N A の鎖 S 1 が、(+)鎖 R N A ウィルスのゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示す、前記 2 本鎖リボ核酸。

10

【請求項 42】

(+)鎖 R N A ウィルスが、C型肝炎ウィルスである、請求項 41 に記載の d s R N A。

【請求項 43】

d s R N A が、ウィルスゲノムからコードされたポリタンパク質の発現を阻害することができる、請求項 41 または 42 に記載の d s R N A。

【請求項 44】

d s R N A が、ウィルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼ、特に H C V - N S 3 ヘリカーゼの発現を阻害することができる、請求項 41～43 のいずれかに記載の d s R N A。

【請求項 45】

ウィルス R N A の読みとり方向におけるセグメントが、ヘリカーゼ、特に H C V - N S 3 ヘリカーゼをコードするウィルスゲノムの前に、またはこの領域中に配置されている、請求項 41～44 のいずれかに記載の d s R N A。

20

【請求項 46】

相補的な領域が、好ましさの低い順に、25 個より少ない、19～24 個の、20～24 個の、21～23 個の、および特に 22 または 23 個のヌクレオチドを有する、請求項 41～45 のいずれかに記載の d s R N A。

【請求項 47】

鎖 S 1 が、好ましさの低い順に、30 個より少ない、25 個より少ない、21～24 個の、および特に 23 個のヌクレオチドを有する、請求項 41～46 のいずれかに記載の d s R N A。

30

【請求項 48】

d s R N A が、1～4 個、特に 2 または 3 個のヌクレオチドからなる 1 本鎖のオーバーハンギングを、該 d s R N A の少なくとも 1 つの末端において有する、請求項 41～47 のいずれかに記載の d s R N A。

【請求項 49】

d s R N A が、1 つの末端のみに、特に鎖 S 1 の 3' 末端であるこの末端において、オーバーハンギングを有する、請求項 48 に記載の d s R N A。

【請求項 50】

d s R N A が、鎖 S 1 に加えて鎖 S 2 を有し、鎖 S 1 が 23 ヌクレオチド長であり、鎖 S 2 が 21 ヌクレオチド長であり、かつ、鎖 S 1 の 3' 末端が 2 個のヌクレオチドで構成された 1 本鎖のオーバーハンギングを有するが、鎖 S 1 の 5' 末端に位置する d s R N A の末端は平滑である、請求項 41～49 のいずれかに記載の d s R N A。

40

【請求項 51】

d s R N A が、経口的に、吸入、注入または注射により、特に静脈内または腹腔内注入もしくは注射により投与するのに適する製剤中に存在する、請求項 41～50 のいずれかに記載の d s R N A。

【請求項 52】

製剤が、d s R N A と、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水溶液または生理学的に許容される緩衝液、特にリン酸緩衝生理食塩水溶液とから、特に専らなる、請求

50

項 5 1 に記載の d s R N A 。

【請求項 5 3】

d s R N A が、溶液中に、特に生理学的に許容される緩衝液もしくは生理食塩水溶液中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、ウイルスカプシド、カプソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項 4 1 ~ 5 2 のいずれかに記載の d s R N A 。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

本発明は、(+)鎖 R N A ウィルス感染症を処置するための、2本鎖リボ核酸の使用、並びに医薬を製造するためのこのようなリボ核酸の使用、(+)鎖 R N A ウィルスの複製を阻害するための医薬および方法に関する。 10

【 0 0 0 2 】

細胞中の標的遺伝子の発現を阻害するための方法は、DE 101 00 586 C1から知られており、ここで、2本鎖構造を有するオリゴリボヌクレオチドが、細胞中に導入される。2本鎖構造の1本の鎖は、ここでは、標的遺伝子に相補的である。

【 0 0 0 3 】

遺伝情報のキャリアとして、(+)鎖 R N A ウィルスは、細胞内部において、タンパク質合成がそこで直接起こり得る R N A を示す。これにより、転写が不要になる。翻訳されない 3' および 5' 領域を除いて、ウイルスゲノムの全長は、ポリタンパク質に翻訳される。個別の、機能的に活性な構造タンパク質および非構造タンパク質は、切断の結果、ポリタンパク質から出現する。非構造タンパク質配列は、ウイルスゲノム中の構造タンパク質配列に続く。非構造的な N S 3 タンパク質は、セリンプロテアーゼドメインを有する多機能性酵素であり、N T P アーゼおよびヘリカーゼ活性を示す。(+)鎖 R N A ウィルス感染症の処置のための以前の方法は、わずかな成功しか経験せず、ほとんどの感染した患者において、疾患の状態の継続的な改善をもたらさなかった。 20

【 0 0 0 4 】

本発明の課題は、従来技術によるこれらの欠点を克服することにある。特に、(+)鎖 R N A ウィルス感染症を処置するための有効な使用を利用可能とする。さらに、(+)鎖 R N A ウィルス感染症を処置するための医薬およびこの医薬を製造するための使用を、利用可能とする。さらに、(+)鎖 R N A ウィルスの複製を阻害するための方法を、利用可能とする。 30

【 0 0 0 5 】

この課題は、請求項 1、2、16、30 および 41 における特徴により解決される。有利な態様は、請求項 3 ~ 15、17 ~ 29、31 ~ 40 および 42 ~ 53 における特徴から得られる。

【 0 0 0 6 】

本発明において、(+)鎖 R N A ウィルス感染症を処置するための、2本鎖リボ核酸(d s R N A)の使用が意図され、ここで、d s R N A の1本の鎖 S 1 は、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に(segmentally)相補的である領域を示す。さらに、本発明は、(+)鎖 R N A ウィルス感染症を処置するための医薬を製造するための、このような d s R N A の使用に関する。 40

【 0 0 0 7 】

いずれが、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域の部分であるかは、問題ではない。驚異的ことに、ウイルスゲノムは、多くのタンパク質をコードするが、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域の任意のセグメントに相補的である鎖 S 1 を有する d s R N A が用いられる際に、これは、(+)鎖 R N A ウィルスの複製の阻害に十分である。このような d s R N A は、ウイルス R N A ゲノムの完全性を、R N A 干渉により恒常的に破壊し得る。この理由のために、それは、このようなウイルス感染症を処置するのに、理想的に適している。処置により、疾患の状態の継続的な改善がもたらされる。

【 0 0 0 8 】

10

20

30

40

50

(+)鎖RNAウイルスは、C型肝炎ウイルス(HCV)であることができる。この分野における有効な処置は、今まで、C型肝炎ウイルスに対する有効なワクチンを製造することが可能ではなかったため、特に重要である。ヒトにおいて、HCV感染症により、重大な疾患に至り得、特に慢性肝炎から、肝硬変および肝臓癌に至り得る。

【0009】

感染した細胞において、dsRNAは、(+)鎖RNAウイルスの(+)鎖RNAを、前述のセグメントの領域において酵素的に切断されるようにする。切断部位の前のウイルスRNAの読みとり方向における領域は、尚翻訳することができ、少なくとも部分的に機能的なタンパク質をもたらすことができる。これらのタンパク質の発現は、必ずしも阻害されない。この方法の有利な態様において、dsRNAは、ウイルスゲノムからコードされたポリタンパク質の発現を阻害することができる。また、部分的な阻害が結果として起こり得、即ち、従って、完全なポリタンパク質の一部のみが発現されるか、または、発現されたポリタンパク質の合計量が、減少する。

【0010】

dsRNAは、好ましくは、ウイルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼ、特にHCV-NS3ヘリカーゼの発現を阻害することができる。このためには、dsRNAの鎖S1が相補的であるセグメントを、ウイルスRNAの読みとり方向において、ヘリカーゼをコードするウイルスゲノム領域の前、またはこの領域中に配置することができる。驚異的なことに、ウイルスヘリカーゼの発現の阻害は、特に有利である。本発明者らは、ウイルスヘリカーゼの存在により、dsRNAの複製阻害作用が減少することを見出した。ヘリカーゼの発現の阻害のために、dsRNAの作用は、他のウイルスタンパク質の発現の阻害における場合よりも、強力である。

【0011】

dsRNAの相補的な領域は、好ましさの低い順に、25個より少ない、19~24個の、20~24個の、21~23個の、および特に22または23個のヌクレオチドを有することができる。この構造を有するdsRNAは、特に、ウイルス感染症の処置において、および特にウイルス複製の阻害において、効率的である。dsRNAの鎖S1は、好ましさの低い順に、30個より少ない、25個より少ない、21~24個の、および特に23個のヌクレオチドを有することができる。これらのヌクレオチドの数はまた、dsRNAにおける可能な塩基対の最大の数である。このようなdsRNAは、特に細胞内で安定である。

【0012】

dsRNAは、好ましくは、1~4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる1本鎖のオーバーハングを、該dsRNAの少なくとも1つの末端において有する。1本鎖オーバーハングにより、dsRNAの、血液、血清および細胞中での安定性は、低下する一方、同時に、dsRNAの複製阻害作用は増大する。dsRNAが、1つの末端のみにおいて、特に鎖S1の3'末端を示すこの末端において、オーバーハングを有する場合、特に有利である。2つの末端を有するdsRNAにおいて、他方の末端は、したがって平滑であり、即ち、オーバーハングを有しない。驚異的なことに、dsRNAの複製阻害作用を増大させるために、dsRNAの一方の末端における1つのオーバーハングで十分であり、2つのオーバーハングで生じる程度に、安定性を低下させないことが、示された。1つのみのオーバーハングを有するdsRNAは、それ自体で、種々の細胞培養培地の中で、並びに血液、血清および細胞中で、十分に安定であり、特に有効であることが示された。ウイルスの複製の阻害は、オーバーハングが、鎖S1の3'末端に位置する際に、特に有効である。

【0013】

好ましくは、dsRNAは、鎖S1に加えて鎖S2を有し、即ちこれは、2つの個別の鎖から構成される。dsRNAは、鎖S1(アンチセンス鎖)が23ヌクレオチド長であり、鎖S2が21ヌクレオチド長であり、かつ、鎖S1の3'末端が2個のヌクレオチドで構成された1本鎖のオーバーハングを有する際に、特に有効である。ここで、鎖S1の5

10

20

30

40

50

’末端に位置するd s R N A末端は、平滑である。

【0014】

d s R N Aは、経口的に、吸入、注入または注射により、特に静脈内または腹腔内注入もしくは注射により投与するのに適する製剤中に存在することができる。この製剤は、d s R N Aと、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水溶液または生理学的に許容される緩衝液とから、特に専らなることができる。生理学的に許容される緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水溶液であることができる。驚異的なことに、このような溶媒またはこのような緩衝液に単に溶解され、投与されたd s R N Aは、d s R N Aが特別のビヒクル中に包まれる(be packaged)ことを要することなく、細胞により取り込まれ、標的遺伝子の発現またはウイルスの複製を阻害することが、示された。

10

【0015】

好ましくは、d s R N Aは、生理学的に許容される溶液中に、特に生理学的に許容される緩衝液もしくは生理食塩水溶液中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、ウイルスカプシド、カブソイド(capsoid)または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する。生理学的に許容される緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水溶液であることができる。ミセル構造、ウイルスカプシド、カブソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルは、d s R N Aの感染細胞中への取り込みを促進することができる。高分子ナノもしくはマイクロカプセルは、ポリピチルシアノアクリレートなどの少なくとも1種の生分解性ポリマーからなる。高分子ナノもしくはマイクロカプセルは、これに含まれたか、または結合したd s R N Aを、体内で輸送し、放出することができる。d s R N Aは、経口的に、吸入、注入または注射により、特に静脈内または腹腔内注入もしくは注射により、投与するか、または摂取することができる。

20

【0016】

好ましくは、d s R N Aを、好ましさの低い順に、1日体重1 k gあたり最大5 m g、2.5 m g、200 μ g、100 μ g、50 μ gおよび最適には最大25 μ gの投与量で用いる。d s R N Aは、この投与量においても、(+)鎖R N Aウイルス感染症の処置において、顕著な有効性を示すことが示された。

30

【0017】

さらに、本発明は、(+)鎖R N Aウイルス感染症を処置するための医薬であって、該医薬が、2本鎖リボ核酸(d s R N A)を含み、ここで、1本の鎖S 1が、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示す、前記医薬に関する。好ましくは、該医薬は、d s R N Aを、好ましさの低い順に、1日体重1 k gあたり5 m g、2.5 m g、200 μ g、100 μ g、50 μ gおよび最適には25 μ gの最大投与量を可能にする量で含む、少なくとも1つの投薬単位において利用可能である。この投薬単位を、单一の1日用量投与または摂取のために調合することができる。この場合、1日用量の全体が、单一の投薬単位に含まれている。投薬単位が、1日数回投与または摂取されるように調合されている場合、各用量中に含まれるd s R N Aの量は、合計の1日の投与量を達成するために、相応して一層少ない。投薬単位はまた、数日間にわたる単一の投与または摂取のために、例えば、d s R N Aが数日にわたって放出されるように、調合することができる。この場合、投薬単位は、相応して複数の1日用量を含む。

40

【0018】

さらに、本発明において、(+)鎖R N Aウイルスの細胞中での複製を阻害する方法が意図され、ここで、少なくとも1つの2本鎖リボ核酸(d s R N A)を、細胞中に導入し、d s R N Aの1本の鎖S 1は、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示す。本発明は、さらに、d s R N Aに関し、ここで、該d s R N Aの鎖S 1は、(+)鎖R N Aウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示す。

【0019】

本発明の医薬、方法およびd s R N Aのさらなる有利な態様に関して、上述の記載を参照

50

されたい。続いて、本発明を、図面を用いて例示的に説明する。

【0020】

HCVは、約9600個のヌクレオチドを有するゲノムを有する。これは、構造タンパク質C、E1およびE2、並びに非構造タンパク質NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5aおよびNS5bをコードする。細胞培養液中のHCVについての分子生物学的分析が、極めて困難であるため、ウイルス遺伝子配列に対するdsRNAの作用を、非病原性代替系(non-pathogenic substitute system)により試験する。このために、ネオマイシン耐性媒介ネオマイシンカセットで、構造タンパク質C、E1およびE2をコードするウイルスゲノムの部分を置換する。改変されたウイルスゲノムは、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)、National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USAに遺伝子受託番号AJ242654の下に登録されている。

【0021】

これは、HuH-7肝臓細胞(JCRB0403、JCRB細胞バンク、国立医薬品食品衛生研究所、郵便番号158、東京都世田谷区上用賀1-18-1、日本国)にトランスフェクトされた。これは、これらの細胞中で、ネオマイシン類似体G418の存在下で、感染性粒子を生成せずに複製される。改変されたHCVゲノム(Lohmann et al. Science 285, [1999], 110頁)の安定な複製を可能にする系はまた、C型肝炎ウイルスについて、「レプリコンモデル」に指定されている。

【0022】

用いるRNAは、配列表中の配列番号1～配列番号4として表される以下の配列を示す：20
NS3をコードする領域からの配列に対応するdsRNA1

S2: 5' - AGA CAG UCG ACU UCA GCC UGG - 3' (配列番号1)

S1: 3' - GG UCU GUC AGC UGA AGU CGG A - 5' (配列番号2)

NS3配列に何の関係も有しない陰性対照として、pEGFP-C1ベクター、受託番号U55763、NCBIのヌクレオチド886～909の配列に相当するdsRNA2:

S2: 5' - CUA CGU CCA GGA GCG CAC CA UC - 3' (配列番号3)

S1: 3' - CC GAU GCA GGU CCC CGC GUG GU AG - 5' (配列番号4)

【0023】

各々の場合において、S2は、センス鎖を表し、S1は、アンチセンス鎖を表す。即ち、鎖S2の配列は、HCVからの対応する配列と同一である。

【0024】

HuH7細胞を、20%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地中に、1mg/mlの抗生物質G418の存在下で培養する。トランスフェクションのために、6ウェルプレートのウェル(直径3.5cm)あたり80,000個の細胞を、2mlの培地中に蒔く。「フュージーン(Fugene)6」(カタログ番号1814443)、Roche Diagnostic s GmbH, Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim, Germanyを用いて、添付されている指示に従ってトランスフェクションを補助した。このために、100μlの無血清培地(SFM)を、5μlのフュージーン6試薬と反応容器中で混合し、室温で5分間インキュベートした。

【0025】

3μgのdsRNA2(約0.1μmol/lの最終的なdsRNA2濃度に対応する)、3μgのdsRNA1(約0.1μmol/lの最終的なdsRNA1濃度に対応する)、1.5μgのdsRNA1および1.5μgのdsRNA2(約0.05μmol/lの最終的なdsRNA1濃度に対応する)、または300ngのdsRNA1および2.7μgのdsRNA2(約0.01μmol/lの最終的なdsRNA1濃度に対応する)を、各々他の反応容器中に調製した。各々の場合において、dsRNA1およびds

R N A 2 のストック濃度は、20 μM（約300 ng / μlに対応する）に等しかった。フュージーン6およびS FMで構成されている混合物を、核酸に1滴ずつ加え、ピペットのチップで注意深く混合し、室温で15分間インキュベートした。トランスフェクションのために、反応調製物を、細胞に1滴ずつ加えた。各々のトランスフェクションを、少なくとも2回実施し、少なくとも2つの独立した実験において立証した。

【0026】

改変されたH C Vゲノムの複製に対するd s R N Aの作用を、定量P C Rにより決定した。トランスフェクションの約36時間後に、細胞を崩壊させ、これらが含んでいたR N Aを、ペクゴールドR N Aピュアキット(PeqGold RNAPure kit)(PEQLAB Biotechnology GmbH, Carl-Thiersch Str. 2b, 91052 Erlangen, Germany, 製造番号30-1010)で、製造者の指示に従って単離した。10

【0027】

その後、同一の量のR N A(100~1000 ng)を、スーパースクリプト(Superscript)II(Invitrogen GmbH, Karlsruhe Technology Park, Emmy-Noether-Str. 10, 76131 Karlsruhe, Germany, カタログ番号18064-014)を用いた、逆転写のために用いた。100 pmolのオリゴ-d Tプライマーまたは50 pmolのランダムプライマーを、プライマーとして用いた。10 μlのR N A(100~1000 ng)、0.5 μlのオリゴ-d Tプライマー(100 pmol)、および1 μlのランダムプライマー(50 pmol)を、10分間70℃でインキュベートし、次に氷上に短時間保管した。次に、7 μlの逆転写酵素混合物(4 μlの5×緩衝液；2 μlの0.1 mol/lのD T T；各1 μlの10 mmol/lのd N T P)、1 μlのスーパースクリプトII、および1 μlのリボヌクレアーゼ阻害剤RNAsin(登録商標)[Promega GmbH, Schildkroetstr. 15, 68199 Mannheim, Germany]を、加えた。混合物を、10分間25℃で、次に1時間42℃で、および最後に15分間70℃で保持した。20

【0028】

特定のc D N Aの量を、「ライトサイクラー(Light-Cycler)」(Roche Diagnostics GmbH)において生成したc D N Aの同一の容積から、「タックマン(TaqMan)」法(PerkinElmer, Ferdinand-Porsche-Ring 17, 63110 Rodgau-Juegesheim, Germany)により、製造者の指示に従って、ライトサイクラー ファスト スタート D N A マスター ハイブリダイゼーション プローブ キット(LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probe s Kit)(Roche Diagnostics GmbH)を用いて、定量した。検出を、5'末端においてフルオロフォア6'-F A M(カルボキシフルオレセイン)および3'末端において消光分子T A M R A(カルボキシ-テトラ-メチル-ローダミン)でマークしたプローブにより、実施した。30

【0029】

フルオロフォアを、光により刺激し、刺激エネルギーを、これにすぐ近接している3'側の消光分子に伝える。P C R反応の各々の伸長相の間、T a q D N Aポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性により、プローブの加水分解がもたらされ、これと共に、消光分子からのフルオロフォアの空間的分離がもたらされる。6'-F A Mの蛍光は、次第に小さく消光される。このために、これは増大し、定量的に決定される。40

【0030】

以下のものを、H C V N S 3 - c D N Aの定量のために用いた：

N S 3 プローブ：5' - C A T T G T C G T A G C A A C G G A C G C T C T A A T G A C - 3' (配列番号5)

N S 3 プライマー：5' - C C T T G A T G T A T C C G T C A T A C C A A C T A G - 3' (配列番号6)

N S 3 リバースプライマー：5' - T G A G T C G A A A T C G C C G G T A A - 3' (配列番号7)

【0031】

さらに、2-ミクログロブリンc D N Aを、標準物質として定量した。2-ミクログロブリンc D N Aを、標準物質として定量した。50

ロブリン(2 - MG)は、安定した量で構成的に発現するタンパク質である。以下のものを、定量のために用いた：

2 - ミクログロブリンプローブ： 5' - A A C C G T C A C C T G G G A C
C G A G A C A T G T A - 3' (配列番号 8)

2 - ミクログロブリンプライマー： 5' - C C G A T G T A T A T G C T T
G C A G A G T T A A - 3' (配列番号 9)

2 - ミクログロブリンリバースプライマー： 5' - C A G A T G A T T C A G
A G C T C C A T A G A - 3' (配列番号 10)

【 0 0 3 2 】

NS3 プローブおよび 2 - ミクログロブリンプローブは、各々、 5' 末端において F A M マーキングおよび 3' 末端において T A M R A マーキングを示した。

【 0 0 3 3 】

HCV NS3 cDNA の量を、 2 - MG cDNA の量に対する比率の形で決定し、図 1 にグラフで表す。「 p E G F P 」は、 dsRNA2 のみでのトランスフェクションにより決定された値を表し(対照)、「 HCV 0 . 1 μmol / l 」、「 HCV 0 . 05 μmol / l 」および「 HCV 0 . 01 μmol / l 」は、それぞれ 0 . 1 μmol / l 、 0 . 05 μmol / l および 0 . 01 μmol / l の NS3 特異的 dsRNA1 でのトランスフェクションにより決定された値を表す。

【 0 0 3 4 】

培地中の 0 . 1 μmol / l 、 0 . 05 μmol / l および 0 . 01 μmol / l の最終濃度において、 dsRNA1 でのトランスフェクションにより、非特異的な対照である dsRNA2 でのトランスフェクションと比較して、約 60 倍大きい阻害がもたらされる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 5 】

【図 1】 HCV レプリコンモデルにおける、 NS3 特異的 dsRNA のトランスフェクションによる HCV - RNA の減少を表したグラフである。

【図1】

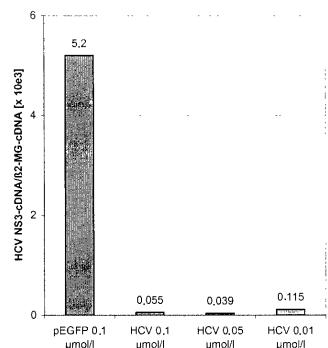


図1

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/035876 A1

(51) Internationale Patentklassifikation*: C12N 15/40,
15/51, 15/88, C07K 14/18, 14/82, A61K 31/713, A61P
31/14

KREUTZER, Roland [DE/DE]; Glotzdorf 26, 95466
Weidenberg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11973

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstr. 49 A,
91052 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. Oktober 2002 (25.10.2002)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AI., AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EI, ES, FI, GB, GD, GL,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, L, I, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EL, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SI, SK, TR), OAPI-Patent (BJ, BJ, CH, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(85) Veröffentlicht:

mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstufen mit Ausnahme von
US): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Fritz-Homschuch-
Strasse 9, 95326 Kulmbach (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KREBS, Anja
[DE/DE]; Prezfelder Str. 10, 90425 Nürnberg
(DE). JOHN, Matthias [DE/DE]; Kapellenstr. 12,
96103 Hallstadt (DE). SCHUPPAN, Detlef [DU/DU];
Baumzeit 2, 91088 Bubenreuth (DE). LIMMER, Stefan
[DE/DE]; Gutenbergerstr. 9, 95512 Neudrossenfeld (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

A1

(54) Title: USE OF A DOUBLE STRAND RIBONUCLEIC ACID FOR TREATING AN INFECTION WITH A POSITIVE-
STRAND RNA-VIRUS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER DOPPELSTRÄNGIGEN RIBONUKLEINSÄURE ZUR BEHANDLUNG EINER
INFektION MIT IUNUM (+)-STRANG-RNA-VIRUS

(57) Abstract: The invention relates to the use of a double strand ribonucleic acid (dsRNA) for treating an infection with a positive-strand RNA-virus, wherein a strand S1 of the dsRNA comprises a domain at least partially complementary of a segment of the translatable domain of the viral genome.

WO

03/035876

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.

Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus

Die Erfinung betrifft die Verwendung einer doppelsträngigen
5 Ribonukleinsäure zur Behandlung einer Infektion mit einem
(+)-Strang-RNA-Virus und die Verwendung einer solchen Ribonu-
kleinsäure zur Herstellung eines Medikaments, ein Medikament
und ein Verfahren zur Hemmung der Replikation eines (+)-
Strang-RNA-Virus.

10 Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der
Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein
Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle
eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist
15 dabei komplementär zum Zielgen.

(+)-Strang-RNA-Viren weisen als Träger der genetischen Infor-
mation eine RNA auf, an welcher im Zellinneren direkt eine
Proteinsynthese stattfinden kann. Es ist somit keine Tran-
20 skription erforderlich. Das Virusgenom wird abgesehen von ei-
nem 3'- und einem 5'-untranslatierten Bereich in seiner gan-
zen Länge in ein Polyprotein translatiert. Aus dem Polypro-
tein gehen durch Spaltungen die einzelnen, funktionell akti-
ven Struktur- und Nichtstrukturproteine hervor. Im viralen
25 Genom schließen sich an die Sequenzen der Strukturproteine
die Sequenzen der Nichtstrukturproteine an. Das Nichtstruk-
turprotein NS3 ist ein multifunktionelles Enzym mit einer Ser-
inprotease-Domäne sowie NTPase- und Helikaseaktivität. Bis-
herige Therapieansätze zur Behandlung einer Infektion mit ei-
30 nem (+)-Strang-RNA-Virus sind wenig erfolgreich und führen
bei einem großen Teil der Infizierten zu keiner anhaltenden
Besserung des Krankheitszustands.

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu vermeiden. Insbesondere soll eine wirksame Verwendung zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus bereitgestellt werden. Weiterhin soll ein Medikament zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus sowie eine Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments bereitgestellt werden. Weiterhin soll ein Verfahren zur Hemmung der Replikation eines (+)-Strang-RNA-Virus bereitgestellt werden.

10

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 16, 30 und 41 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 3 bis 15, 17 bis 29, 31 bis 40 und 42 bis 53.

15

Erfindungsgemäß ist eine Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus vorgesehen, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer solchen dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus.

25

Der Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms ist beliebig. Obwohl das Virusgenom für zahlreiche Proteine kodiert, ist es für eine Hemmung der Replikation des (+)-Strang-RNA-Virus überraschenderweise ausreichend, wenn eine dsRNA mit einem zu einem beliebigen Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms komplementären Strang S1 verwendet wird. Eine solche dsRNA kann durch RNA-Interferenz die Integrität des viralen RNA-Genoms dauerhaft zerstören.

Sie ist damit ideal zu einer Behandlung einer Infektion mit einem solchen Virus geeignet. Die Behandlung führt zu einer anhaltenden Besserung des Krankheitszustands.

- 5 Das (+)-Strang-RNA-Virus kann ein Hepatitis C-Virus (HCV) sein. Hier ist die Möglichkeit einer wirksamen Behandlung besonders bedeutend, da ein Impfschutz gegen Hepatitis C-Viren bisher nicht möglich ist. Eine HCV-Infektion kann beim Menschen zu schwerwiegenden Erkrankungen führen, insbesondere
10 über eine chronische Hepatitis zu Leberzirrhose und Leberkrebs.

In einer infizierten Zelle bewirkt die dsRNA, dass die (+)-Strang-RNA des (+)-Strang-RNA-Virus im Bereich des genannten
15 Abschnitts enzymatisch geschnitten wird. Die in Ableserichtung der viralen RNA vor der Schnittstelle gelegenen Bereiche können dennoch translatiert werden und dabei zumindest teilweise zu funktionellen Proteinen führen. Die Expression dieser Proteine ist nicht zwangsläufig gehemmt. Bei einer vor-
20 teilhaften Ausgestaltung des Verfahrens ist die dsRNA zur Hemmung der Expression eines vom Virusgenom kodierten Polyproteins geeignet. Die Hemmung kann dabei auch nur teilweise erfolgen, d.h. so, dass nur ein Teil des vollständigen Polyproteins exprimiert wird oder so, dass die Gesamtmenge des
25 exprimierten Polyproteins reduziert wird.

Vorzugsweise ist die dsRNA zur Hemmung der Expression einer funktionsfähigen vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbesondere der HCV-NS3-Helikase, geeignet. Dazu kann
30 der Abschnitt, zu welchem der Strang S1 der dsRNA komplementär ist, in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für die Helikase kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet sein. Die Hemmung der Expression der viralen Helikase ist

Überraschenderweise besonders vorteilhaft. Die Erfinder haben nämlich festgestellt, dass das Vorhandensein der viralen Helikase die replikationshemmende Wirkung der dsRNA reduziert. Durch die Hemmung der Expression der Helikase ist die Wirkung 5 der dsRNA stärker als bei der Hemmung der Expression anderer viraler Proteine.

Der komplementäre Bereich der dsRNA kann weniger als 25, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 10 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Behandlung der Virus-Infektion und insbesondere in der Hemmung der Replikation des Virus. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare. Eine solche dsRNA ist intrazellulär besonders beständig.

20 Vorzugsweise weist die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf. Einzelsträngige Überhänge verringern die Stabilität der dsRNA in Blut, Serum und Zellen und verstärken gleichzeitig die replikationshemmende Wirkung der dsRNA. Besonders vorteilhaft ist es, wenn 25 die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist. Das andere Ende ist dann bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der replikationshemmenden Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen

zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend beständig und besonders Wirksam erwiesen. Die Hemmung der Replikation der Viren ist besonders effektiv, wenn sich der Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

- 5 Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d.h. sie ist aus zwei Einzelsträngen gebildet. Besonders wirksam ist die dsRNA, wenn der Strang S1 (Antisinn-Strang) eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen
10 aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA ist dabei glatt ausgebildet.

Die dsRNA kann in einer Zubereitung vorliegen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion und Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Die Zubereitung kann dabei, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, und der dsRNA bestehen. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Lösungsmittel oder einem solchen Puffer gelöste
20 und verabreichte dsRNA von Zellen aufgenommen wird und die Expression eines Zielgens bzw. Replikation eines Virus hemmt, ohne das die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

- 25 30 Vorzugsweise liegt die dsRNA in einer physiologisch verträglichen Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem

Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vor. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein. Eine micellare Struktur, ein Virus-Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel kann die Aufnahme der dsRNA in infizierte Zellen erleichtern. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel besteht aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymer, z.B. Polybutylcyanoacrylat. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel kann darin enthaltene oder daran gebundene dsRNA im Körper transportieren und freisetzen. Die dsRNA kann oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser oder intraperitonealer Infusion oder Injektion, verabreicht bzw. eingenommen werden.

- 15 Vorzugsweise wird die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag verwendet. Es hat es sich nämlich gezeigt, dass die dsRNA bereits in dieser Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus aufweist.
- 20 25 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Medikament zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus, wobei das Medikament eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält, deren einer Strang S1 einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist. Vorzugsweise liegt das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vor, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg,

bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht. Die Verabreichungseinheit kann für eine einmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert sein. Dann ist die gesamte Tagesdosis in einer Verabreichungseinheit enthalten. Ist die Verabreichungseinheit für eine mehrmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert, so ist die dsRNA darin in einer entsprechend geringeren das Erreichen der Tagesdosis ermöglichen Menge enthalten. Die Verabreichungseinheit kann auch für eine einzige Verabreichung bzw. Einnahme für mehrere Tage konzipiert sein, z. B. indem die dsRNA über mehrere Tage freigesetzt wird. Die Verabreichungseinheit enthält dann ein entsprechend Mehrfaches der Tagesdosis.

15 Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren zur Hemmung der Replikation eines (+)-Strang-RNA-Virus in einer Zelle vorgesehen, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird und wobei ein Strang S1 20 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist. Die Erfindung betrifft außerdem eine dsRNA, deren einer Strang S1 einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Genoms eines (+)-Strang-RNA- 25 Virus zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Medikaments, des erfindungsgemäßen Verfahrens 30 und der erfindungsgemäßen dsRNA wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen. Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnung beispielhaft erläutert.

Fig. 1 zeigt eine grafische Darstellung der Reduktion der HCV-RNA im HCV-Replikon-Modell durch Transfektion von NS3-spezifischer dsRNA.

5 HCV weist ein Genom von ca. 9600 Nukleotiden auf. Es kodiert für die Strukturproteine C, E1 und E2 und für die Nicht-Strukturproteine NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a und NS5b. Da molekularbiologische Analysen mit HCV in Zellkultur sehr schwierig sind, wird die Wirkung der dsRNA auf virale Gensequenzen anhand eines nicht pathogenen Ersatzsystems untersucht. Hierzu ist der für die Strukturproteine C, E1 und E2 kodierende Teil des viralen Genoms durch eine Neomycin-Resistenz vermittelnde Neomycinkassette ersetzt worden. Das modifizierte virale Genom ist mit der Gene Accession Number 10 AJ242654 beim National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USA registriert. Es ist in HuH-7-Leberzellen (JCRB0403, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, 15 Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan) transfiziert worden. Es repliziert in diesen Zellen in Gegenwart des Neomycin-Analogen G418 ohne infektiöse Partikel entstehen zu lassen. Das die stabile Replikation des modifizierten HCV-Genoms ermöglichen-de System (Lohmann et al. Science 285, (1999), Seite 110) 20 wird auch als "Replikon-Modell" für Hepatitis C-Viren bezeichnet.

25

Die eingesetzten dsRNAs weisen folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:4 bezeichneten Sequenzen auf:

30 dsRNA1, welche einer Sequenz aus dem für NS3 kodierenden Bereich entspricht:

S2: 5'- AGA CAG UCG ACU UCA GCC UGG-3' (SEQ ID NO: 1)
S1: 3'-GG UCU GUC AGC UGA AGU CGG A -5' (SEQ ID NO: 2)

dsRNA2, welche als Negativkontrolle ohne Beziehung zur Sequenz von NS3 der Sequenz der Nukleotide 886-909 des Vektors pEGFP-C1, Accession Number U55763, NCBI entspricht:

S2: 5'- CUA CGU CCA GGA GCG CAC CA UC -3' (SEQ ID NO: 3)
S1: 3'- CC GAU GCA GGU CCU CGC GUG GU AG -5' (SEQ ID NO: 4)

S2 stellt dabei jeweils den Sinn-Strang und S1 den Antisinn-Strang dar, d.h. die Sequenz des Strangs S2 ist identisch mit der entsprechenden Sequenz aus dem HCV.

Die HuH-7-Zellen werden in Gegenwart von 1 mg/ml des Antibiotikums G418 in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium mit 20 % fötalem Kälberserum kultiviert. Zur Transfektion wurden 80000 Zellen pro Vertiefung (3,5 cm Durchmesser) einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät. Als Transfektionshilfe wurde "Fugene 6" (Katalog-Nummer 1814443) der Firma Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim entsprechend der zugehörigen Arbeitsvorschrift eingesetzt. Dazu wurden in einem Reaktionsgefäß 100 µl serumfreies Medium (SFM) mit 5 µl Fugene 6-Reagenz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. In einem weiteren Gefäß wurden jeweils 3 µg dsRNA2 (entspricht ca. 0,1 µmol/l finale Konzentration dsRNA2), 3 µg dsRNA1 (entspricht ca. 0,1 µmol/l finale Konzentration dsRNA1), 1,5 µg dsRNA1 plus 1,5 µg dsRNA2 (entspricht ca. 0,05 µmol/l finale Konzentration dsRNA1) oder 300 ng dsRNA1 plus 2,7 µg dsRNA2 (entspricht ca. 0,01 µmol/l finale Konzentration dsRNA1) vorgelegt. Die Stammkonzentrationen der dsRNA1 und dsRNA2 betrug jeweils 20 µM (entspricht ca. 300 ng/µl). Das Gemisch aus Fugene 6 und SFM wurde tropfenweise zu den Nukleinsäuren gegeben, mit einer Pipettenspitze vor-

sichtig gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transfektion wurde der Reaktionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Jede Transfektion wurde mindestens im Doppelansatz durchgeführt und in mindestens 2 unabhängigen Experimenten verifiziert.

Die Wirkung der dsRNA auf die Replikation des modifizierten HCV Genoms wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Etwa 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen dazu aufge-
schlossen und die enthaltene RNA mit dem Kit PeqGold RNAPure
der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2 b,
D-91052 Erlangen, Bestell Nummer 30-1010, gemäß Hersteller-
vorschrift isoliert.

Anschließend wurden gleiche RNA-Mengen (100-1000 ng) zur Re-
versen Transkription mittels Superscript II der Firma Invitro-
gen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse
10, D-76131 Karlsruhe, Katalog-Nummer 18064-014 eingesetzt.
Als Primer wurden 100 pmol Oligo-dT-Primer bzw. 50 pmol ran-
dom Primer verwendet. 10 µl RNA (100-1000 ng), 0,5 µl Oligo
dT-Primer (100 pmol) und 1 µl random Primer (50 pmol) wurden
10 min bei 70°C inkubiert und dann kurz auf Eis gelagert. An-
schließend sind 7 µl Reverse Transkriptase-Mix (4 µl 5 x Puf-
fer; 2 µl 0,1 mol/l DTT; 1 µl je 10mmol/l dNTP), 1 µl Super-
script II und 1 µl des Ribonuklease Inhibitors RNAsin® der
Firma Promega GmbH, Schildkrötstr. 15, D-68199 Mannheim zuge-
setzt worden. Das Gemisch ist für 10 min bei 25°C, dann für 1
Stunde bei 42°C und abschließend für 15 min bei 70°C gehalten
worden.

Von gleichen Volumina der gebildeten cDNA wurden im "Light-
Cycler" der Firma Roche Diagnostics GmbH gemäß dem "TaqMan"-
Verfahren der Firma PerkinElmer, Ferdinand-Porsche-Ring 17,

D-63110 Rodgau-Jügesheim, nach Herstellerangaben mittels des LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes -Kits der Firma Roche Diagnostics GmbH spezifische cDNA-Mengen quantifiziert. Die Detektion erfolgt über eine mit dem 5 Fluorophor 6'-FAM (Carboxyfluorescein) am 5'-Ende und dem Löschenmolekül TAMRA (Carboxy-tetra-methyl-Rhodamin) am 3'-Ende markierte Sonde. Dabei wird das Fluorophor mit Licht angeregt und überträgt die Anregungsentnergie auf das in unmittelbarer Nähe befindliche 3'-seitige Löschenmolekül. Während der jeweiligen Extensionsphasen der PCR Reaktion führt die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase zur Hydrolyse der Sonde und damit zur räumlichen Trennung des Fluorophors vom Löschenmolekül. Die Fluoreszenz von 6'-FAM wird immer weniger gelöscht. Sie nimmt daher zu und wird quantitativ erfasst.

15 Zur Quantifizierung von HCV NS3-cDNA kamen zum Einsatz:

NS3-Sonde: 5'-CAT TGT CGT AGC AAC GGA CGC TCT AAT GAC-3' (SEQ ID NO 5)

20 NS3 Primer: 5'-CCT TGA TGT ATC CGT CAT ACC AAC TAG-3' (SEQ ID NO 6)

NS3 Reverse Primer: 5'-TGA GTC GAA ATC GCC GGT AA-3' (SEQ ID 25 NO 7)

Weiterhin wurde β 2-Mikroglobulin-cDNA als Standard quantifiziert. β 2-Mikroglobulin (β 2-MG) ist ein konstitutiv in konstanter Menge exprimiertes Protein. Zur Quantifizierung kamen 30 zum Einsatz:

β 2-Microglobulin-Sonde: 5'-AAC CGT CAC CTG GGA CCG AGA CAT GTA-3' (SEQ ID NO 8)

β2-Microglobulin Primer: 5'-CCG ATG TAT ATG CTT GCA GAG TTA
A-3' (SEQ ID NO 9)

β2-Microglobulin Reverse Primer: 5'-CAG ATG ATT CAG AGC TCC
5 ATA GA-3' (SEQ ID NO 10)

Die NS3-Sonde und die β2-Microglobulin-Sonde wiesen jeweils am 5'-Ende eine FAM-Markierung und am 3'-Ende eine TAMRA-Markierung auf.

10 Die Menge an HCV NS3-cDNA wurde als Verhältnis zur Menge von β2-MG-cDNA bestimmt und graphisch in Fig. 1 dargestellt.
"pEGFP" stellt den durch ausschließliche Transfektion mit dsRNA2 (Kontrolle) ermittelten Wert und "HCV 0,1 μmol/l",
15 "HCV 0,05 μmol/l" und "HCV 0,01 μmol/l" die durch Transfektion mit jeweils 0,1 μmol/l, 0,05 μmol/l und bei 0,01 μmol/l NS3-spezifischer dsRNA1 ermittelten Werte dar.

20 Die Transfektion mit dsRNA1 führte bei 0,1 μmol/l, 0,05 μmol/l und bei 0,01 μmol/l finaler Konzentration im Medium zu einer etwa 60-fachen Hemmung im Vergleich zur Transfektion mit der unspezifischen Kontrolle dsRNA2.

Patentansprüche

1. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.
2. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis C-Virus (HCV) ist.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression eines vom Virusgenom kodierten Polyproteins geeignet ist.
- 20 5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression einer funktionsfähigen vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbesondere der HCV-NS3-Helikase, geeignet ist.
- 25 6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Abschnitt in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für eine Helikase, insbesondere die HCV-NS3-Helikase, kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet ist.
- 30 7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich weniger als 25, insbesondere 19

bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
5
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten ein-
10 zelsträngigen Überhang aufweist.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten ein-
15 zelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
20
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
25
13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiolo-
30

gisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

14. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer physiologisch verträglichen Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
5
15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag verwendet wird.
15
16. Medikament zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus, wobei das Medikament eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält, deren einer Strang S1 einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.
20
17. Medikament nach Anspruch 16, wobei das (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis C-Virus (HCV) ist.
25
18. Medikament nach Anspruch 16 oder 17, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression eines vom Virusgenom kodierten Polypeptides geeignet ist.
30
19. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression einer funktionsfähigen vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbesondere der HCV-NS3-Helikase, geeignet ist.

20. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei der Abschnitt in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für eine Helikase, insbesondere die HCV-NS3-Helikase, kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet ist.
- 5 21. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei der komplementäre Bereich weniger als 25, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
- 10 22. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
- 15 23. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 22, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 20 24. Medikament nach Anspruch 23, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
- 25 25. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 24, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
- 30 26. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 25, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

27. Medikament nach Anspruch 26, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
28. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 27, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
- 15 29. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 28, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vorliegt, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.
- 25 30. Verfahren zur Hemmung der Replikation eines (+)-Strang-RNA-Virus in einer Zelle, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle einge-führt wird und wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusge-noms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.
31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis C-Virus ist.
- 30 32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, wobei die Expression eines vom Virusgenom kodierten Polyproteins gehemmt wird.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 32, wobei die Expression einer funktionsfähigen vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbesondere der HCV-NS3-Helikase, gehemmt wird.
- 5 34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der Abschnitt in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für eine Helikase, insbesondere die HCV-NS3-Helikase, kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet ist.
- 10 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei der komplementäre Bereich weniger als 25, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
- 15 36. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 35, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
- 20 37. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 36, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
- 25 39. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 38, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
- 30

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 39, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
- 5 41. Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), deren einer Strang S1 einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Genoms eines (+)-Strang-RNA-Virus zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.
- 10 42. DsRNA nach Anspruch 41, wobei das (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis C-Virus (HCV) ist.
- 15 43. DsRNA nach Anspruch 41 oder 42, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression eines vom Virusgenom kodierten Polyproteins geeignet ist.
- 20 44. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 43, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression einer funktionsfähigen vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbesondere der HCV-NS3-Helikase, geeignet ist.
- 25 45. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 44, wobei der Abschnitt in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für eine Helikase, insbesondere die HCV-NS3-Helikase, kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet ist.
- 30 46. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 45, wobei der komplementäre Bereich weniger als 25, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
47. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 46, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25,

besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.

48. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
49. DsRNA nach Anspruch 48, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
- 10 50. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 49, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
- 15 51. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 50, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
- 20 52. DsRNA nach Anspruch 51, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
- 25 53. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 52, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise
- 30

einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.

1/1

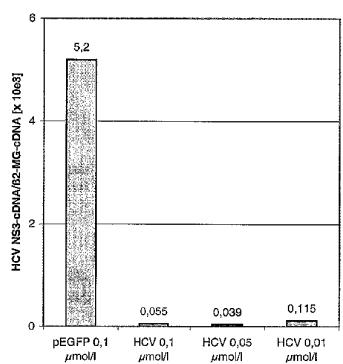


Fig. 1

1

SEQUENZPROTOKOLL
<110> Ribopharma AG
5 <120> Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus
10 <130> 422328EH
<140>
<141>
15 <160> 10
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 21
20 <212> RNA
<213> Hepatitis C virus
<400> 1
25 agacagucgca cuucagccug g 21
<210> 2
<211> 21
<212> RNA
30 <213> Hepatitis C virus
<400> 2
29 aggcugaaagu cgacugucug g 21
35 <210> 3
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz
40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vektor
<400> 3
45 cuacguccag gagcgccacca uc 22
<210> 4
<211> 24
50 <212> RNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vektor
55 <400> 4
gauggugcgc uccuggacgu agcc 24
60 <210> 5
<211> 30

2

<212> DNA
<213> Hepatitis C virus
5 cattgtcgta gcaacggacg ctctaatgac 30

<210> 6
<211> 27
10 <212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 6
ccttgcgtat tccgtcatac caactag 27
15

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
20 <213> Hepatitis C virus

<400> 7
tgagtcgaaa tcgccccgtaa 20
25

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens
30

<400> 8
aacccgtcacc tgcccggcgg acatgtta 27

35 <210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens
40 <400> 9
ccgatgtata tgcttgccaga gttaa 25

45 <210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
50 cagatgattc agagctccat aga 23

【手続補正書】

【提出日】平成15年8月27日(2003.8.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(+)鎖RNAウイルス感染症を処置するための、2本鎖リボ核酸(dsRNA)の使用であって、dsRNAの1本の鎖S1が、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示し、dsRNAが、ウイルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼの発現を阻害することができる、前記使用。

【請求項2】

(+)鎖RNAウイルス感染症を処置するための医薬を製造するための、2本鎖リボ核酸(dsRNA)の使用であって、dsRNAの1本の鎖S1が、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示し、dsRNAが、ウイルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼの発現を阻害することができる、前記使用。

【請求項3】

(+)鎖RNAウイルスが、C型肝炎ウイルス(HCV)である、請求項1または2に記載の使用。

【請求項4】

dsRNAが、ウイルスゲノムからコードされたポリタンパク質の発現を阻害することができる、請求項1~3のいずれかに記載の使用。

【請求項5】

ヘリカーゼが、HCV-NS3ヘリカーゼである、請求項1~4のいずれかに記載の使用。

【請求項6】

ウイルスRNAの読みとり方向におけるセグメントが、ヘリカーゼ、特にHCV-NS3ヘリカーゼをコードするウイルスゲノムの前に、またはこの領域中に配置されている、請求項1~5のいずれかに記載の使用。

【請求項7】

相補的な領域が、好ましさの低い順に、25個より少ない、19~24個の、20~24個の、21~23個の、および特に22または23個のヌクレオチドを有する、請求項1~6のいずれかに記載の使用。

【請求項8】

鎖S1が、好ましさの低い順に、30個より少ない、25個より少ない、21~24個の、および特に23個のヌクレオチドを有する、請求項1~7のいずれかに記載の使用。

【請求項9】

dsRNAが、1~4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる1本鎖のオーバーハングを、該dsRNAの少なくとも1つの末端において有する、請求項1~8のいずれかに記載の使用。

【請求項10】

dsRNAが、1つの末端のみに、特に鎖S1の3'末端であるこの末端において、オーバーハングを有する、請求項9に記載の使用。

【請求項11】

dsRNAが、鎖S1に加えて鎖S2を有し、鎖S1が23ヌクレオチド長であり、鎖S2が21ヌクレオチド長であり、かつ、鎖S1の3'末端が2個のヌクレオチドで構成さ

れた1本鎖のオーバーハングを有するが、鎖S1の5'末端に位置するdsRNAの末端は平滑である、請求項1～10のいずれかに記載の使用。

【請求項12】

dsRNAが、経口的に、吸入、注入または注射により、特に静脈内または腹腔内注入もしくは注射により投与するのに適する製剤中に存在する、請求項1～11のいずれかに記載の使用。

【請求項13】

製剤が、dsRNAと、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水溶液または生理学的に許容される緩衝液、特にリン酸緩衝生理食塩水溶液とから、特に専らなる、請求項1～12のいずれかに記載の使用。

【請求項14】

dsRNAが、生理学的に許容される溶液中に、特に生理学的に許容される緩衝液もしくは生理食塩水溶液中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、ウイルスカプシド、カプソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項1～13のいずれかに記載の使用。

【請求項15】

dsRNAを、好ましさの低い順に、1日体重1kgあたり最大5mg、2.5mg、200μg、100μg、50μgおよび最適には最大25μgの投与量で用いる、請求項1～14のいずれかに記載の使用。

【請求項16】

(+)鎖RNAウイルス感染症を処置するための医薬であって、該医薬が、2本鎖リボ核酸(dsRNA)を含み、ここで、dsRNAの1本の鎖S1が、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示し、dsRNAが、ウイルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼの発現を阻害することができる、前記医薬。

【請求項17】

(+)鎖RNAウイルスが、C型肝炎ウイルス(HCV)である、請求項16に記載の医薬。

【請求項18】

dsRNAが、ウイルスゲノムからコードされたポリタンパク質の発現を阻害することができる、請求項16または17に記載の医薬。

【請求項19】

ヘリカーゼが、HCV-NS3ヘリカーゼである、請求項16～18のいずれかに記載の医薬。

【請求項20】

ウイルスRNAの読みとり方向におけるセグメントが、ヘリカーゼ、特にHCV-NS3ヘリカーゼをコードするウイルスゲノムの前に、またはこの領域中に配置されている、請求項16～19のいずれかに記載の医薬。

【請求項21】

相補的な領域が、好ましさの低い順に、25個より少ない、19～24個の、20～24個の、21～23個の、および特に22または23個のヌクレオチドを有する、請求項16～20のいずれかに記載の医薬。

【請求項22】

鎖S1が、好ましさの低い順に、30個より少ない、25個より少ない、21～24個の、および特に23個のヌクレオチドを有する、請求項16～21のいずれかに記載の医薬。

【請求項23】

dsRNAが、1～4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる1本鎖のオーバーハングを、該dsRNAの少なくとも1つの末端において有する、請求項16～22のいずれかに記載の医薬。

【請求項 2 4】

d s R N A が、1つの末端のみに、特に鎖 S 1 の 3' 末端であるこの末端において、オーバーハングを有する、請求項 2 3 に記載の医薬。

【請求項 2 5】

d s R N A が、鎖 S 1 に加えて鎖 S 2 を有し、鎖 S 1 が 2 3 ヌクレオチド長であり、鎖 S 2 が 2 1 ヌクレオチド長であり、かつ、鎖 S 1 の 3' 末端が 2 個のヌクレオチドで構成された 1 本鎖のオーバーハングを有するが、鎖 S 1 の 5' 末端に位置する d s R N A の末端は平滑である、請求項 1 6 ~ 2 4 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 2 6】

医薬が、経口的に、吸入、注入または注射により、特に静脈内または腹腔内注入もしくは注射により投与するのに適する製剤である、請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 2 7】

製剤が、d s R N A と、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水溶液または生理学的に許容される緩衝液、特にリン酸緩衝生理食塩水溶液とから、特に専らなる、請求項 2 6 に記載の医薬。

【請求項 2 8】

d s R N A が、溶液中の、特に生理学的に許容される緩衝液もしくは生理食塩水溶液中の医薬中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、ウイルスカプシド、カプソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項 1 6 ~ 2 7 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 2 9】

医薬が、d s R N A を、好ましさの低い順に、1日体重 1 k g あたり 5 m g 、 2 . 5 m g 、 2 0 0 μ g 、 1 0 0 μ g 、 5 0 μ g および最適には 2 5 μ g の最大投与量を可能にする量で含む、少なくとも 1 つの投薬単位において利用可能である、請求項 1 6 ~ 2 8 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 3 0】

(+)鎖 R N A ウィルスの細胞中での複製を阻害する方法であって、少なくとも 1 つの 2 本鎖リボ核酸 (d s R N A) を、細胞中に導入し、d s R N A の 1 本の鎖 S 1 が、ウイルスゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示し、ウイルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼの発現を阻害する、前記方法。

【請求項 3 1】

(+)鎖 R N A ウィルスが、C型肝炎ウィルスである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

ウイルスゲノムからコードされたポリタンパク質の発現を阻害する、請求項 3 0 または 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

ヘリカーゼが、H C V - N S 3 ヘリカーゼである、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 4】

ウイルス R N A の読みとり方向におけるセグメントが、ヘリカーゼ、特に H C V - N S 3 ヘリカーゼをコードするウイルスゲノムの前に、またはこの領域中に配置されている、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

相補的な領域が、好ましさの低い順に、2 5 個より少ない、1 9 ~ 2 4 個の、2 0 ~ 2 4 個の、2 1 ~ 2 3 個の、および特に 2 2 または 2 3 個のヌクレオチドを有する、請求項 3 0 ~ 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6】

鎖 S 1 が、好ましさの低い順に、3 0 個より少ない、2 5 個より少ない、2 1 ~ 2 4 個の、および特に 2 3 個のヌクレオチドを有する、請求項 3 0 ~ 3 5 のいずれかに記載の方法

。

【請求項 3 7】

d s R N A が、1～4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる1本鎖のオーバーハングを、該d s R N Aの少なくとも1つの末端において有する、請求項30～36のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 8】

d s R N A が、1つの末端のみに、特に鎖S1の3'末端であるこの末端において、オーバーハングを有する、請求項37に記載の方法。

【請求項 3 9】

d s R N A が、鎖S1に加えて鎖S2を有し、鎖S1が23ヌクレオチド長であり、鎖S2が21ヌクレオチド長であり、かつ、鎖S1の3'末端が2個のヌクレオチドで構成された1本鎖のオーバーハングを有するが、鎖S1の5'末端に位置するd s R N Aの末端は平滑である、請求項30～38のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 0】

d s R N A が、溶液中に、特に生理学的に許容される緩衝液もしくは生理食塩水溶液中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、ウイルスカプシド、カブソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項30～39のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 1】

2本鎖リボ核酸(d s R N A)であって、該d s R N Aの鎖S1が、(+)鎖R N Aウイルスのゲノムの翻訳可能な領域のセグメントに、少なくとも断片的に相補的である領域を示し、d s R N Aが、ウイルスゲノムからコードされた機能的なプロテアーゼまたはヘリカーゼの発現を阻害することができる、前記2本鎖リボ核酸。

【請求項 4 2】

(+)鎖R N Aウイルスが、C型肝炎ウイルスである、請求項41に記載のd s R N A。

【請求項 4 3】

d s R N A が、ウイルスゲノムからコードされたポリタンパク質の発現を阻害することができる、請求項41または42に記載のd s R N A。

【請求項 4 4】

ヘリカーゼが、H C V - N S 3ヘリカーゼである、請求項41～43のいずれかに記載のd s R N A。

【請求項 4 5】

ウイルスR N Aの読みとり方向におけるセグメントが、ヘリカーゼ、特にH C V - N S 3ヘリカーゼをコードするウイルスゲノムの前に、またはこの領域中に配置されている、請求項41～44のいずれかに記載のd s R N A。

【請求項 4 6】

相補的な領域が、好ましさの低い順に、25個より少ない、19～24個の、20～24個の、21～23個の、および特に22または23個のヌクレオチドを有する、請求項41～45のいずれかに記載のd s R N A。

【請求項 4 7】

鎖S1が、好ましさの低い順に、30個より少ない、25個より少ない、21～24個の、および特に23個のヌクレオチドを有する、請求項41～46のいずれかに記載のd s R N A。

【請求項 4 8】

d s R N A が、1～4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる1本鎖のオーバーハングを、該d s R N Aの少なくとも1つの末端において有する、請求項41～47のいずれかに記載のd s R N A。

【請求項 4 9】

d s R N A が、1つの末端のみに、特に鎖S1の3'末端であるこの末端において、オーバーハングを有する、請求項48に記載のd s R N A。

【請求項 5 0】

d s R N A が、鎖 S 1 に加えて鎖 S 2 を有し、鎖 S 1 が 2 3 ヌクレオチド長であり、鎖 S 2 が 2 1 ヌクレオチド長であり、かつ、鎖 S 1 の 3' 末端が 2 個のヌクレオチドで構成された 1 本鎖のオーバーハングを有するが、鎖 S 1 の 5' 末端に位置する d s R N A の末端は平滑である、請求項 4 1 ~ 4 9 のいずれかに記載の d s R N A。

【請求項 5 1】

d s R N A が、経口的に、吸入、注入または注射により、特に静脈内または腹腔内注入もしくは注射により投与するのに適する製剤中に存在する、請求項 4 1 ~ 5 0 のいずれかに記載の d s R N A。

【請求項 5 2】

製剤が、d s R N A と、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水溶液または生理学的に許容される緩衝液、特にリン酸緩衝生理食塩水溶液とから、特に専らなる、請求項 5 1 に記載の d s R N A。

【請求項 5 3】

d s R N A が、溶液中に、特に生理学的に許容される緩衝液もしくは生理食塩水溶液中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、ウイルスカプシド、カブソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項 4 1 ~ 5 2 のいずれかに記載の d s R N A。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No. PCT/EP 02/11973
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C12N15/40 C12N15/51 C12N15/88 C07K14/18 C07K14/82 A61K31/713 A61P31/14		
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) IPC 7 C12N C07K		
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) WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	MCCAFFREY ANTON P ET AL: "RNA interference in adult mice." NATURE, ENGLAND 4 JUL 2002, vol. 418, no. 6893, 4 July 2002 (2002-07-04), pages 38-39, XP002234152 ISSN: 0028-0836	1-4, 7, 8, 12-18, 21, 22, 26-32, 35, 36, 40-43, 46, 47, 51-53
Y	the whole document	9-11, 23-25, 37-39, 48-50 --/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 doubt on validity, claim(s) or non-inventiveness of the application. It is not later than the priority date of another claimed or other special reason can be associated		
'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 novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 March 2003	Date of mailing of the international search report 27/03/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlan 2 NL-2233 AH Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Armandola, E	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In nternational Application No PCT/EP 02/11973
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03)	1,2,4,7, 8,12-16, 18,21, 22, 26-30, 32,35, 36,40, 41,43, 46,47, 51-53 the whole document
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW () 1 July 1999 (1999-07-01)	1,2,4, 12,16, 18, 26-30, 32,40, 41,51-53 the whole document
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11 October 2001 (2001-10-11)	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53 the whole document
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6 June 2002 (2002-06-06)	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53 the whole document
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 101, no. 1, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 the whole document	1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53
P,Y	JACQUE JEAN-MARC ET AL: "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." NATURE, ENGLAND 25 JUL 2002, vol. 418, no. 6896, 25 July 2002 (2002-07-25), pages 435-438, XP002232889 ISSN: 0028-0836 the whole document	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53 --/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/11973
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 the whole document ---	1-4, 7, 8, 12-18, 21, 22, 26-32, 35, 36, 40-43, 46, 47, 51-53
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, vol. 15, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 188-200, XP02204651 ISSN: 0890-9369 the whole document ---	1-4, 7, 8, 12-18, 21, 22, 26-32, 35, 36, 40-43, 46, 47, 51-53
Y	CAPLEN N J ET AL: "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 14 AUG 2001, vol. 98, no. 17, 14 August 2001 (2001-08-14), pages 9742-9747, XP02232936 ISSN: 0027-8424 the whole document ---	1-4, 7, 8, 12-18, 21, 22, 26-32, 35, 36, 40-43, 46, 47, 51-53
P, Y	BITKO V ET AL: "Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses." BMC MICROBIOLOGY 'ELECTRONIC RESOURCE', ENGLAND 2001, vol. 1, no. 1, 2001, page 34 XP002232991 ISSN: 1471-2180 the whole document ---	1-4, 7-18, 21-32, 35-43, 46-53
A	PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 6, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765 the whole document ---	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. EP02/11973	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although Claims 1-15 and 30-40 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:.</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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.:.</p>	
Remark on Protest <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
International Application No PCT/EP 02/1973			
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0044895	A 03-08-2000	DE 19956568 A1 AT 222953 T AU 3271300 A CA 2359180 A1 WO 0044895 A1 DE 10080167 D2 DE 50000414 D1 EP 1144623 A1 EP 1214945 A2 JP 2003502012 T	17-08-2000 15-09-2002 18-08-2000 03-08-2000 03-08-2000 28-02-2002 02-10-2002 17-10-2001 19-06-2002 21-01-2003
WO 9932619	A 01-07-1999	US 6506559 B1 AU 743798 B2 AU 1938099 A CA 2311999 A1 EP 1042462 A1 JP 2002516062 T WO 9932619 A1	14-01-2003 07-02-2002 12-07-1999 01-07-1999 11-10-2000 04-06-2002 01-07-1999
WO 0175164	A 11-10-2001	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002
WO 0244321	A 06-06-2002	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1995)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int	Internationale Aktenzeichen
PCT/EP 02/11973	

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7 C12N15/40 C12N15/51 C12N15/88 C07K14/18 C07K14/82 A61K31/713 A61P31/14		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfung (Klassifikationsystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGEGEHENDE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Satz. Anspruch Nr.
P, X	MCCAFFREY ANTON P ET AL: "RNA interference in adult mice." NATURE, ENGLAND 4 JUL 2002, Bd. 419, Nr. 6893, 4. Juli 2002 (2002-07-04), Seiten 38-39, XP002234152 ISSN: 0028-0836	1-4, 7, 8, 12-18, 21, 22, 26-32, 35, 36, 40-43, 46, 47, 51-53
Y	das ganze Dokument	9-11, 23-25, 37-39, 48-50
	---	-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den angewandten Stand der Technik definiert, aber nicht als Besonders bedeutsam anzusehen ist.</p> <p>"B" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht wurde.</p> <p>"C" Veröffentlichung, die gezeigt hat, dass ein Vertragsanspruch zweifelhaft erfüllt ist, obwohl sie nicht als besondere Veröffentlichung (durch eine andere im Recherchenbericht genannte Veröffentlichung) belegt wurde, soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (vgl. unten).</p> <p>"D" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Erörterung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezog.</p> <p>"E" Veröffentlichung, die als besondere Veröffentlichung angesehen wird, aber nach dem befragten Prüfungsdatum veröffentlicht worden ist.</p>		
** Spätere Veröffentlichungen, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prüfungsdatum veröffentlicht werden, ist und mit der Anmeldung nicht identisch, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie.		** Spätere Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf offensichtlicher Weise überarbeitet bezeichnet werden.
*** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf offensichtlicher Tägigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen verbunden ist, die eine Verbindung wie und diese Verbindung für einen Fachmann nachweisend ist.		*** Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist.
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11. März 2003		Absendetermin des internationalen Recherchenberichts 27/03/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchebehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5016 Patentamt 2 NL-2200 MV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Tx. 51 651 epo nl Fax. (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beisitzer Armandola, E

Formblatt PCT/ISA210 (Blatt 2) (Auli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHEBERICHT

In nationales Alterszeichen
PCT/EP 02/11973

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 00 44295 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument ---	1,2,4,7, 8,12-16, 18,21, 22, 26-30, 32,35, 36,40, 41,43, 46,47, 51-53
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW () 1. Juli 1999 (1999-07-01) das ganze Dokument ---	1,2,4, 12,16, 18, 26-30, 32,40, 41,51-53
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11. Oktober 2001 (2001-10-11) das ganze Dokument ---	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASIR SAYDA (DE);) 6. Juni 2002 (2002-06-06) das ganze Dokument ---	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 101, Nr. 1, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ---	1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53
P,Y	JACQUE JEAN-MARC ET AL: "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." NATURE, ENGLAND 25 JUL 2002, Bd. 418, Nr. 6896, 25. Juli 2002 (2002-07-25), Seiten 435-438, XP002232889 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument ---	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53
		-/-

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationalem Aktenzeichen
PCT/EP 02/11973

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEBEHNE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BASSE BRENDAL: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ----	1-4, 7, 8, 12-18, 21-22, 26-32, 35, 36, 40-43, 46, 47, 51-53
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, Bd. 15, Nr. 2, 15. Januar 2001 (2001-01-15), Seiten 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 das ganze Dokument ----	1-4, 7, 8, 12-18, 21, 22, 26-32, 35, 36, 40-43, 46, 47, 51-53
Y	CAPLEN N J ET AL: "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 14 AUG 2001, Bd. 98, Nr. 17, 14. August 2001 (2001-08-14), Seiten 9742-9747, XP002232936 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument ----	1-4, 7, 8, 12-18, 21, 22, 26-32, 35, 36, 40-43, 46, 47, 51-53
P, Y	BITKO V ET AL: "Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses." BMC MICROBIOLOGY 'ELECTRONIC RESOURCE!'. ENGLAND 2001, Bd. 1, Nr. 1, 2001, Seite 34 XP002232991 ISSN: 1471-2180 das ganze Dokument ----	1-4, 7-18, 21-32, 35-43, 46-53
A	PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 6, Nr. 5, November 2000 (2000-11), Seiten 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765 ----	

Formblatt PCT/SAZ10 (Fortsetzung von Blatt 2) (Jul 1992)

<p align="center">INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT</p>	Internationales Aktenzeichen: PCT/EP 02/11973
Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)	
Gemäß Artikel 17(2)(a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Ansprüche Nr. _____, weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Obwohl die Ansprüche 1-15 und 30-40 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.	
2. <input type="checkbox"/> Ansprüche Nr. _____, weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich	
3. <input type="checkbox"/> Ansprüche Nr. _____, weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.	
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)	
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:	
1. <input type="checkbox"/> Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.	
2. <input type="checkbox"/> Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.	
3. <input type="checkbox"/> Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____.	
4. <input type="checkbox"/> Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:	
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs <input type="checkbox"/> Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. <input type="checkbox"/> Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.	

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 1 (1))(Juli 1998)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In: Internationale Anmeldenummer
PCT/EP 02/11973

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0044895	A	03-08-2000	DE 19956568 A1 AT 222953 T AU 3271300 A CA 2359180 A1 WO 0044895 A1 DE 10080167 D2 DE 50000414 D1 EP 1144623 A1 EP 1214945 A2 JP 2003502012 T	17-08-2000 15-09-2002 18-08-2000 03-08-2000 03-08-2000 28-02-2002 02-10-2002 17-10-2001 19-06-2002 21-01-2003

WO 9932619	A	01-07-1999	US 6506559 B1 AU 743798 B2 AU 1938099 A CA 2311999 A1 EP 1042462 A1 JP 2002516062 T WO 9932619 A1	14-01-2003 07-02-2002 12-07-1999 01-07-1999 11-10-2000 04-06-2002 01-07-1999

WO 0175164	A	11-10-2001	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002

WO 0244321	A	06-06-2002	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷ A 6 1 P 31/14	F I A 6 1 P 31/14	テーマコード(参考)
--	----------------------	------------

(31) 優先権主張番号 PCT/EP02/00151
 (32) 優先日 平成14年1月9日(2002.1.9)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP02/00152
 (32) 優先日 平成14年1月9日(2002.1.9)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31) 優先権主張番号 102 35 621.1
 (32) 優先日 平成14年8月2日(2002.8.2)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW)

(72) 発明者 シュッパン, デトレフ
 ドイツ連邦共和国 9 1 0 8 8 ブーベンロイト、バウムツァイル 2

(72) 発明者 リンマー, シュテファン
 ドイツ連邦共和国 9 5 5 1 2 ノイドロッセンフェルト、グーテンベルクシュトラーセ 9

(72) 発明者 クロイツァー, ローラント
 ドイツ連邦共和国 9 5 4 6 6 ヴァイデンベルク、グロッツドルフ 2 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA03 GA11 HA17
 4C076 AA19 AA61 AA65 BB01 BB11 BB13 BB21 CC35
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA24 MA38 MA52 MA56 MA66
 NA14 ZB33