(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2010-536380
(P2010-536380A)
(43)公表日　平成22年12月2日(2010.12.2)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | A | 4B024 |
| C12N 15/113 | (2010.01) | C12N | 15/00 | ZNAG | 4B065 |
| C12N 1/15 | (2006.01) | C12N | 1/15 | | 4C076 |
| C12N 1/19 | (2006.01) | C12N | 1/19 | | 4C084 |
| C12N 1/21 | (2006.01) | C12N | 1/21 | | 4C086 |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 24 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-522029 (P2010-522029)
(86)(22)出願日　平成20年8月21日 (2008.8.21)
(85)翻訳文提出日　平成22年4月12日 (2010.4.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/073872
(87)国際公開番号　WO2009/026445
(87)国際公開日　平成21年2月26日 (2009.2.26)
(31)優先権主張番号　60/957,097
(32)優先日　平成19年8月21日 (2007.8.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

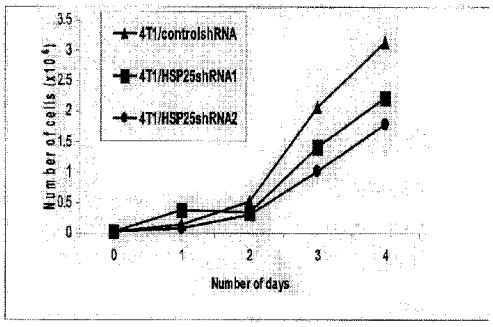
(71)出願人　510046413
スコット　アンド　ホワイト　メモリアル　ホスピタル　アンド　スコット，シェルウッド　アンド　ブリンドリー　ファンデーション
アメリカ合衆国　７６５０８　テキサス、テンプル、サウス　サーティファースト　ストリート　２４０１
(74)代理人　110000855
特許業務法人浅村特許事務所
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇

最終頁に続く

(54)【発明の名称】転写後遺伝子サイレンシングのための方法及び組成物

(57)【要約】
標的遺伝子の発現を阻害する、単離した二本鎖リボ核酸（ｄｓＲＮＡ）分子であって、前記ｄｓＲＮＡが２本のヌクレオチド鎖と、第１鎖の３’末端を第２鎖の５’末端に結合させる結合部分とを含み、第１鎖が１９～２８個の連続ヌクレオチドの長さを示し、標的遺伝子中の配列と実質的と同一であり、第２鎖が第１鎖に対して実質的に相補的である、単離したｄｓＲＮＡ。配列番号３と実質的に同一であるヌクレオチドの第１鎖と、第１鎖に対して実質的に相補的である第２鎖とを含む、単離した二本鎖リボ核酸分子。

*FIG. 3*



【特許請求の範囲】
【請求項１】
標的遺伝子の発現を阻害する、単離した二本鎖リボ核酸（ｄｓＲＮＡ）分子であって、前記ｄｓＲＮＡが２本のヌクレオチド鎖と、第１鎖の３’末端を第２鎖の５’末端に結合させる結合部分とを含み、第１鎖が１９～２８個の連続ヌクレオチドの長さを示し、標的遺伝子中の配列と実質的に同一であり、第２鎖が第１鎖に対して実質的に相補的である、上記単離したｄｓＲＮＡ。
【請求項２】
結合部分がポリヌクレオチドリンカーを含む、請求項１に記載のｄｓＲＮＡ。
【請求項３】
ポリヌクレオチドリンカーが５～１２塩基対の長さである、請求項２に記載のｄｓＲＮＡ。
【請求項４】
標的遺伝子が熱ショックタンパク質をコードする、請求項１に記載のｄｓＲＮＡ。
【請求項５】
標的遺伝子が配列番号３を含む、請求項１に記載のｄｓＲＮＡ。
【請求項６】
第１鎖が配列番号４、５又は６を含む、請求項１に記載のｄｓＲＮＡ。
【請求項７】
第１鎖、第２鎖又は両方がさらにマーカータンパク質を含む、請求項１に記載のｄｓＲＮＡ。
【請求項８】
マーカータンパク質が蛍光タンパク質である、請求項７に記載のｄｓＲＮＡ。
【請求項９】
請求項１に記載のｄｓＲＮＡを含む細胞の形質導入のためのベクターファミリー。
【請求項１０】
ベクターがレトロウイルスベクターである、請求項９に記載のベクターファミリー。
【請求項１１】
ベクターがレンチウイルスベクターである、請求項１０に記載のベクターファミリー。
【請求項１２】
プロモーター、リボソーム結合部位、エンハンサー配列、応答エレメント、誘導性エレメント、選択可能マーカー、調節エレメント、又はそれらの組合せをさらに含む、請求項９に記載のベクターファミリー。
【請求項１３】
プロモーターが、マウスＵＧ　ＲＮＡプロモーター、合成ヒトＨ１ＲＮＡプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＲＳＶプロモーター、ＲＮＡポリメラーゼＩＩプロモーター、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーター、それらの誘導体、又はそれらの組合せを含む、請求項１２に記載のベクターファミリー。
【請求項１４】
請求項１に記載のｄｓＲＮＡを含む細胞系。
【請求項１５】
細胞系がパッケージング細胞系である、請求項１４に記載の細胞系。
【請求項１６】
請求項１に記載のｄｓＲＮＡを含む、ヒト以外の動物。
【請求項１７】
請求項１に記載のｄｓＲＮＡを含む、治療量の組成物の投与を含む、増殖性障害に罹っている生物を処置する方法。
【請求項１８】
増殖性障害が腫瘍増殖により証明される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】

腫瘍増殖が約１０％～約９５％まで阻害される、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
腫瘍の転移能が約１０％～約９５％まで低下する、請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
請求項１に記載のｄｓＲＮＡと賦形剤とを含む、医薬品組成物。
【請求項２２】
デリバリーシステムと腫瘍標的指向性部分とをさらに含む、請求項２１に記載の医薬品組成物。
【請求項２３】
デリバリーシステムがリポソームを含む、請求項２２に記載の医薬品組成物。
【請求項２４】
腫瘍標的指向性部分が、抗体、トランスフェリン又はそれらの組合せを含む、請求項２２に記載の医薬品組成物。
【請求項２５】
配列番号３と実質的に同一であるヌクレオチドの第１鎖と、第１鎖に対して実質的に相補的である第２鎖とを含む、単離した二本鎖リボ核酸分子。
【請求項２６】
配列番号３中に提示される配列を含む核酸分子によりコードされているタンパク質の発現を阻害する単離した二本鎖リボ核酸であって、ｄｓＲＮＡの第１鎖が配列番号３と実質的に同一であり、第２鎖が第１鎖に対して実質的に相補的である、上記単離した二本鎖リボ核酸。
【請求項２７】
請求項２６に記載のｄｓＲＮＡを含む細胞の形質導入のための、ベクターファミリー。
【請求項２８】
請求項２６に記載のｄｓＲＮＡと賦形剤とを含む、腫瘍増殖及び／又は転移能を低下させるための医薬品組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
連邦政府による資金提供を受けた研究又は開発に関する言明
適用外。
【０００２】
本開示は、転写後遺伝子サイレンシングのための方法及び組成物に関する。より詳細には、本開示は、細胞中の熱ショックタンパク質の発現を低下させるための方法及び組成物に関する。
【背景技術】
【０００３】
熱ショックタンパク質（Ｈｓｐ）はすべての原核生物及び真核生物において見出されている高度に保存されたタンパク質である。例えば、環境的（紫外線放射、熱ショック、重金属及びアミノ酸）、病理的（細菌、寄生生物による感染症又は発熱、炎症、悪性腫瘍又は自己免疫）、又は物理的ストレス（増殖因子、細胞分化、ホルモン刺激又は組織発達）等の多岐にわたる様々なストレス刺激は、ストレス応答として知られる細胞内Ｈｓｐ合成の著しい増加を引き起こす。これは、細胞質内の熱ショック因子１（ＨＳＦ－１）の三量体形成及び核移行の活性化により、核内の熱ショックエレメント（ＨＳＥ）とし、その結果、Ｈｓｐを転写することにより達成される。折り畳まれていない、誤って折り畳まれている、若しくは変異しているペプチド又はタンパク質を結合し、それらを小胞体（ＥＲ）に輸送することにより、Ｈｓｐは潜在的な凝集及び／又は死を防ぐ。最近、細胞がストレス下にあるときに生成され、放出される危険シグナル、及び免疫系の活性化因子としてのさらなる役割もＨｓｐのものと見なされた。ストレス応答は、非折り畳み又は変性タンパク質の濃度の上昇に対処する細胞の能力を強化するように設計されている。

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
見かけの分子量に基づき、Ｈｓｐは小型Ｈｓｐと大型Ｈｓｐの主な２群に細分される。ヒトＨｓｐ２７のマウスホモログであるＨｓｐ２５は、様々な生物学的機能に関与している小型Ｈｓｐファミリーの偏在的発現性メンバーである。大型Ｈｓｐとは違い、Ｈｓｐ２５／２７はＡＴＰ非依存性機構を通じて働き、折り畳み中間体のリザーバーをつくることによって、それらはインビボで他のシャペロンと協調して働く。Ｈｓｐ２５／Ｈｓｐ２７は、エストロゲン応答性悪性腫瘍に関連しており、生検試料中に高濃度に発現し、しかも乳癌患者の血清中に循環している。腫瘍宿主の相互作用は、腫瘍進行の測定、特に転移を伴う場合に、重要な役割を果たす。Ｈｓｐなどの生物学的応答変更因子は、これらの現象のいくつかを組織化しているように見える。したがって、Ｈｓｐ発現を調節するための組成物及び方法の開発は望ましいことであろう。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本明細書で開示されるのは、標的遺伝子の発現を阻害する、単離した二本鎖リボ核酸（ｄｓＲＮＡ）分子であって、前記ｄｓＲＮＡが２本のヌクレオチド鎖と、第１鎖の３’末端を第２鎖の５’末端に結合させる結合部分とを含み、第１鎖が１９～２８個の連続ヌクレオチドの長さを示し、標的遺伝子中の配列と実質的に同一であり、第２鎖が第１鎖に対して実質的に相補的である、単離したｄｓＲＮＡである。
【０００６】
さらに本明細書で開示されるのは、配列番号３と実質的に同一であるヌクレオチドの第１鎖と、第１鎖に対して実質的に相補的である第２鎖とを含む、単離した二本鎖リボ核酸分子である。
【０００７】
また、本明細書で開示されるのは、配列番号３中に提示される配列を含む核酸分子によりコードされているタンパク質の発現を阻害し、ｄｓＲＮＡの第１鎖が配列番号３と実質的に同一であり、第２鎖が第１鎖に対して実質的に相補的である、単離した二本鎖リボ核酸である。
【図面の簡単な説明】
【０００８】
【図１】ベクターの実施形態を示す図である。
【図２】例２のウェスタンブロットのサンプルを示す図である。
【図３】例２のサンプルに関して、経過時間に対する機能としての細胞数のプロットである。
【図４】例２のサンプルに関して、時間経過に対する機能としての腫瘍体積のプロットである。
【図５】例２に記載されているように腫瘍細胞を注射して処置したマウスの写真である。
【図６】例２に記載されているように腫瘍細胞を注射して処置したマウスの写真である。
【図７】ｓｈＲＮＡタイプの機能としての浸潤細胞数のプロットである。
【図８】インビボにおいて本開示のｓｈＲＮＡで処理した腫瘍性腫瘤の画像である。
【図９】インビボにおいて本開示のｓｈＲＮＡで処理した腫瘍性腫瘤の画像である。
【発明を実施するための形態】
【０００９】
以下は本開示全体にわたって使用され得る用語の定義として役立つものである。「ベクター」は、別のＤＮＡセグメントが結合し得る、プラスミド、ファージ、ウイルスコンストラクト又はコスミドなどのレプリコンである。ベクターは形質導入及び細胞中のＤＮＡセグメントの発現に用いられる。本明細書で使用する場合、「ベクター」、「コンストラクト」、「ＲＮＡｉ発現ベクター」又は「ＲＮＡｉ発現コンストラクト」の用語は、１つ又は複数のＲＮＡｉ発現カセットが連結し得る又は連結している、プラスミド、ファージ

、ウイルスコンストラクト、コスミド、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、ヒト人工染色体（ＨＡＣ）などのレプリコンが挙げられる。

【００１０】

「プロモーター」又は「プロモーター配列」は、細胞中でＲＮＡポリメラーゼを結合することができ、メッセンジャーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、核内低分子ＲＮＡ若しくは核小体ＲＮＡ、又は任意のクラスの任意のＲＮＡポリメラーゼによって転写される任意の種類のＲＮＡなどのポリヌクレオチド又はポリペプチドコード配列の転写を開始することができる、ＤＮＡ調節領域である。

【００１１】

例えば形質移入試薬との複合体として、又はウイルス粒子中へパッケージングされてかかる核酸が細胞内に導入されているとき、細胞は外来性又は異種性核酸又はベクターによって「形質転換」、「形質導入」又は「形質移入」されている。形質転換ＤＮＡは細胞のゲノムに組み込まれる（共有結合的に連結される）か、又は組み込まれない場合がある。真核生物細胞に関しては、安定な形質転換細胞は、形質転換ＤＮＡが、宿主細胞染色体に組み込まれてしまうか、又は染色体外で維持されることにより、形質転換ＤＮＡが、細胞複製の間に娘細胞によって受け継がれるか、又は形質転換ＤＮＡが、持続的なエピソームが存在する分化した複製しない分化細胞中に存在する。

【００１２】

本明細書で開示されるのは、細胞又は組織中で、所望の標的遺伝子からの遺伝子産物の発現を選択的に低下させるための組成物及び方法である。ある実施形態では、細胞は真核生物細胞である。また、本明細書で開示されるのは、経過又は進行が所望の標的遺伝子の発現により影響を受ける疾患を処置する方法である。より具体的には、本明細書で開示されるのは、熱ショックタンパク質（Ｈｓｐ）の発現を調節するための組成物及び方法である。さらに本明細書で開示されるのは、熱ショックタンパク質の発現を調節する組成物を細胞及び組織に送達するための方法である。

【００１３】

いくつかの実施形態では、これらの組成物は、機能不全、望ましくない病状、障害又は疾患状態に罹っている生物の処置に用いることができる治療量の物質を含む医薬品製剤を含む。機能不全、望ましくない病状、障害又は疾患状態は、「望ましくない状態」と以下ではまとめて呼称する。本明細書において望ましくない状態は、真核生物Ｈｓｐの発現レベルが望ましくない状態の発生又は進行の一因となり得るものであり、したがって望ましくない状態は、ｓｉＲＮＡ治療の影響を受けやすいものである。したがって、望ましくない状態は、１つ又は複数の遺伝子欠陥に起因する状態を指す「遺伝子疾患」、先天的欠陥に起因しない病理学的状態を指す「後天的病態」、癌、疾患などの状態が挙げられる。本明細書において「処置」は、望ましくない状態の病態の進展又は変化を防ぐことを意図して行われる介入を指す。したがって、「処置する」は治療的処置及び予防的手段の両方を指す。ある実施形態では、本明細書に記載されているタイプの組成物の治療量を生物に投与することは、望ましくない状態の回復の観点から、レシピエントに有益な効果をもたらす。本明細書において「治療量」は有益な効果を引き出すのに必要な組成物の量を指す。また、本明細書に記載されている組成物は、Ｈｓｐ発現レベルが望ましくない状態の発生及び再発の一因となる前記望ましくない状態をこれまで経験していないレシピエントにおいて、望ましくない状態の潜在的な発生及び再発を低下させるために予防的に使用することができる。

【００１４】

ある実施形態では、組成物は１つ又は複数の単離した又は精製した核酸分子（ＮＡＭ）を含み、細胞中の１つ又は複数のＨｓｐ発現を低下させるのにこれらのＮＡＭを利用する方法である。本明細書で使用する場合、「核酸分子」（ＮＡＭ）の用語は、ＤＮＡ分子、ＲＮＡ分子、ヌクレオチド類似体を用いて作り出すＤＮＡ又はＲＮＡ分子の類似体、それらの誘導体又はそれらの組合せを包含ことができる。本開示のＮＡＭは、一本鎖又は二本鎖が可能であり、鎖の本数は目的とするその使用によって左右されよう。開示されたＮＡ

Ｍの断片又は部分もまた本開示に含まれる。「断片」又は「部分」に関しては、ヌクレオチド配列の全長より短いことを意味する。本明細書で使用する場合、「単離した」又は「精製した」核酸分子は、単離した核酸分子に普通は伴う他の核酸分子から分離された核酸分子である。したがって、単離した核酸分子は、単離した核酸が由来する生物のゲノムにおける核酸の片方又は両方の末端に、天然では隣接している配列を含まない核酸分子を包含するが、これに限定されるものではない（例えば、ＰＣＲ又は制限エンドヌクレアーゼ分解によって産生されるｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ断片）。或いは、「単離した」又は「精製した」ＮＡＭは、他の細胞性物質又は組換え技術により産生したときの培地を実質的に含まないこともあり、又は、化学的に合成したときの化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まないこともある。本明細書において実質的に含まないとは、Ｈｓｐ発現低下組成物及び／又は該組成物が導入される生物の性質に悪影響を与えない量で存在する他の成分の量を指す。例えば、ＮＡＭが、純度約７０％より多く、或いは純度が約７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％より多い場合が可能である。かかる単離した核酸分子は、以降でより詳しく記載されるように、操作を便利にするために、又は融合核酸分子を作り出すために、一般的にベクター（例えば、クローニングベクター、又は発現ベクター、又は発現コンストラクト）に導入する。さらに、単離した核酸分子は、組換え又は合成核酸分子などの操作された核酸分子を包含し得る。

【００１５】

ＮＡＭは、１つ又は複数の細胞性タンパク質の発現を調節するために使用することができる。例えば、本開示のＮＡＭは１つ又は複数のＨｓｐの発現を低下させるために機能することができる。ある実施形態では、ＮＡＭは、ＲＮＡ、及び結果として少なくとも１つのＲＮＡ転写物の転写後サイレンシングを起こす、細胞へのＲＮＡ導入を含む。本開示は、かかるＲＮＡ分子、かかるＲＮＡ分子をコードするＤＮＡ分子、かかるＮＡＭによりコードされるポリペプチド、前記ポリペプチドを生じさせる抗体、又はそれらの組合せを提供する。本開示のＲＮＡ分子は様々な形態で使用することができ、アンチセンスＲＮＡｉ及びｓｈＲＮＡを包含する例に制限されない。

【００１６】

開示された方法では、１つ又は複数のＲＮＡ転写物の発現を低下させるＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）機構を利用する。「ＲＮＡ干渉又はサイレンシング」の用語は、参照により本明細書にその全体を組み込む、Ｐ．Ｄ．Ｚａｍｏｒｅ、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９６、１２６５（２００２）に記載されているものなどの、ＲＮＡを介した遺伝子発現の阻害の、すべての転写後及び転写機構を包含するものとして広範に定義されている。現在知られている低分子干渉性ＲＮＡによって媒介されるＲＮＡ干渉の提案された機構に焦点を当てる以下の考察は、制限するという意味ではなく、先行技術を承認するものではない。

【００１７】

ＲＮＡｉは、真核生物のほとんどとは言わないまでも多くに存在する保存された生物学的応答である。ＲＮＡｉは全身性及び遺伝性の両方の転写物サイレンシングを引き起こし、動物の発生及び一生を通して調べられる遺伝子発現の変化を導くことを可能にする。

【００１８】

ＲＮＡｉの過程では、長い二本鎖ＲＮＡ分子（ｄｓＲＮＡ）は、原始的及び多細胞性生物において遺伝子発現の配列特異的サイレンシングを誘導することができる。これらの長いｄｓＲＮＡは、ダイサーと呼ばれるリボ核酸により、小分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）と名付けられた、２１～２３ヌクレオチド（ｎｔ）のガイドＲＮＡ二本鎖へと変化する。そのｓｉＲＮＡは、続いてＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）、つまり類似のヌクレオチド配列でＲＮＡ標的を認識して切断するためのテンプレートとしてｓｉＲＮＡを使うタンパク質－ＲＮＡエフェクターヌクレアーゼ複合体により使われる。ＲＩＳＣの組成物は完全には明確にされていないが、アルゴノートファミリータンパク質を包含する。ＲＩＳＣはｓｉＲＮＡをほどき、標的ｍＲＮＡに対して相補的な（アンチセンス）鎖と安定的に結合する。ｓｉＲＮＡとその標的ｍＲＮＡとの間の相同性の程度に依存して、ｓｉＲＮＡ－ＲＩＳＣ複合体は、２つの異なる経路によって遺伝子機能を阻害する。ほとん

どのｓｉＲＮＡは不完全にそれらの標的と対を成し、翻訳抑制によって遺伝子発現を抑制する。このＲＮＡｉ機構は、多様なｓｉＲＮＡ結合部位が標的ｍＲＮＡの３’非翻訳領域に存在するとき、最も効果的に作動するようである。いくつかの他のケースでは、ｓｉＲＮＡは標的ｍＲＮＡと完全な配列同一性を示し、ｍＲＮＡ分解の引き金となることによって遺伝子機能を阻害する。転写レベルの低下は標的タンパク質のレベルの低下を引き起こし、結果として表現型が変化する。

【００１９】

ｓｉＲＮＡは、ある特定の形質転換された哺乳類動物の細胞系において短期間の遺伝子阻害に効果的であることが示されているが、それらの抑制効果は、定義からして持続期間が限定されているので、初代細胞培養でのその使用又は安定したノックダウン転写物のためのその使用に関連した欠点がある場合がある。低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）は、短い二本鎖構造からなり、ｓｉＲＮＡとは異なり、植物、線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）及びショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）において、安定した遺伝子サイレンシングの効果的な引き金となることがわかっている。これらの合成されたＲＮＡ形態はｐｏｌＩＩ又はｐｏｌＩＩＩプロモーターから発現する場合があり、ヘアピン構造はダイサーにより認識されて切断され、標的遺伝子のサイレンシングのためにＲＩＳＣによって続いて始まるｓｉＲＮＡを形成する。

【００２０】

ある実施形態では、本開示の組成物はＨｓｐ、二者択一的に真核生物のＨｓｐ、又は哺乳類動物のＨｓｐの発現レベルを低下させることができる。例えば、本開示のｓｈＲＮＡは、マウスのＨｓｐ（例えばＨｓｐ２５）、ヒトのＨｓｐ（例えばＨｓｐ２７）又は両方の発現を低下させることができる。ある実施形態では、本開示のＮＡＭは、配列番号１又は配列番号２中に提示される配列を有するｍＲＮＡ転写物から産生されるポリペプチドの発現を低下させることができる。

【００２１】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は多様なＨｓｐの発現を低下させることができる１種のＮＡＭを含むことができる。また、本明細書に記載されている１種のＮＡＭのタイプは、異なる種に由来するＨｓｐの発現を低下させることができるような交差反応性を示し得る。どちらかの実施形態において、一本鎖ＮＡＭは同程度又は異なる程度の、異なるＨｓｐの発現を阻害することができる。本開示の組成物が、非哺乳類動物系において１種又は複数のＨｓｐの発現レベルを低下させ得ることもまた考えられる。

【００２２】

本開示の組成物は１種又は複数のＮＡＭを含む。ある実施形態では、ＮＡＭは標的遺伝子の発現を阻害する二本鎖リボ核酸（ｄｓＲＮＡ）分子を含み、前記ｄｓＲＮＡ分子は２本のヌクレオチド鎖を含み、第１鎖はヌクレオチド配列ＮＮＡＧＣＣＣＧＡＧＣＵＧＧＧＡＡＣＣＡＡＵＵ（配列番号３）と実質的に同一であり、第２鎖は第１鎖に対して実質的に相補的である。本明細書において実質的に同一とは約５０％より高い相同性を指し、一方、実質的に相補的とは、真核生物細胞の細胞質内などの生物学的条件下で第１鎖への第２鎖のアニーリングを可能にするのに十分な相同性を指す。

【００２３】

ある実施形態では、第１鎖は配列番号３に対して約５５％より高い相同性であり、又は約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、９０％、９５％より高い相同性である。第１鎖はダイサーによりｓｉＲＮＡの産生が進行されるくらいの十分な長さであってよい。どちらかの鎖はダイサーにとって基質としての役割を果たし得る。

【００２４】

各鎖の長さは一般的に約１９～約２５ｎｔの長さ（例えば、１９、２０、２１、２２、２３、２４又は２５ヌクレオチド）である。いくつかの実施形態では、各鎖の長さは約１９～約２８ヌクレオチドの長さである。ある実施形態では、第１鎖における配列の長さは第２鎖における配列の長さと同一であり、形成されたｄｓＲＮＡは平滑末端である。別の実施形態では、形成されたｄｓＲＮＡの末端はオーバーハングを有する。

【００２５】
ある実施形態では、哺乳類動物のＨｓｐの発現レベルを低下させるのに使うｄｓＲＮＡは配列５’－ＡＧＣＣＣＧＡＧＣＴＧＧＧＡＡＣＣＡＴＴ－３’（配列番号４）及び／又は５’－ＣＣＧＣＡＧＡＧＣＧＴＴＴＧＡＧＴＡＴ－３’（配列番号５）を含む第１鎖を包含する。ある実施形態では、Ｈｓｐ発現を低下させるのに使う組成物は、配列５’－ＧＣＴＣＡＡＴＣＣＧＡＧＡＧＡＧＡＡＴＡ－３’（配列番号６）を包含する第１鎖、及び第１鎖に対して相補的な配列を有する第２鎖を有するｄｓＲＮＡを含む。ある実施形態では、ｄｓＲＮＡ分子の相補的な第１及び第２鎖はヘアピン構造の「ステム」である。
【００２６】
２本のｄｓＲＮＡ鎖は結合部分により連結でき、ｓｈＲＮＡのヘアピン構造において「ループ」を形成することができる。ある実施形態では、結合部分は長さが可変なポリヌクレオチドのリンカーを含む。いくつかの実施形態では、結合部分は５、６、７、８、９、１０、１１、１２又は１３ヌクレオチドの長さであってよく、また、結合部分は９ヌクレオチドの長さである。代表的な結合部分は５’－ＴＴＣ　ＡＡＧ　ＡＧＡ－３’であるが、本明細書で開示されたタイプのｄｓＲＮＡの形態と適合した任意の適切な結合部分が考えられる。本明細書に記載されている２本の鎖及び結合部分は、１種又は複数のＨｓｐの発現を低下させることができるｓｈＲＮＡを形成することができる。
【００２７】
本明細書に記載されているようなＮＡＭ（例えば、ｄｓＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ）は、例えば、組換え核酸技術、単一核酸分子又は一連のオリゴヌクレオチドのどちらかとしての化学的合成、通常の分子クローニング技術を用いる変異誘発（例えば、部位特異的変異誘発）、及びポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの当業者に知られている技術を用いて得ることができる。一般的なＰＣＲ技術は、例えば、参照により本明細書にその全体を組み込む、ＰＣＲ　Ｐｒｉｍｅｒ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｄｉｅｆｆｅｎｂａｃｈ　＆　Ｄｖｅｋｓｌｅｒ編、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、１９９５に記載されている。可能な変異には、欠失、挿入、置換及びこれらの組合せが挙げられるが、これに限定されない。さらに、適切な分子生物学の技術は、例えば、これに限定されないが、制限酵素による消化及びライゲーションなどをこれらの分子の単離のために採用することができる。
【００２８】
本明細書に記載されているＮＡＭは、例えばナノ粒子又はリポソームへのカプセル封入、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿及び同等のものなどの技術を使用して直接細胞に導入することができる。ある実施形態では、本開示のＮＡＭはベクターのエレメントとして細胞に導入することができ、したがってＤＮＡベクターに基づくｓｈＲＮＡを含む。簡単にするために、本明細書より前に記載されたタイプの他の組成物もまた考えられるが、以下の考察ではｓｈＲＮＡを含む組成物に焦点を当てる。
【００２９】
発現ベクターを含み、本開示の使用に適したベクターは商業的に入手でき、及び／又は、当技術分野における組換えＤＮＡ技術法の決まったやり方によって産生される。本開示のｓｈＲＮＡを含むベクターは、かかる分子に作動的に結合して発現するのに必要なエレメントを有することができ、さらに選択可能なマーカー（例えば、抗生物質耐性をコードする配列）をコードする配列、及び／又はポリペプチドの精製に使用され得る配列（例えば、Ｈｉｓ標識）などの配列を包含することができる。本開示の使用に適したベクターは、細胞内ゲノムに組み込まれるか、染色体外へと出る場合がある（例えば、複製の発生を伴う自律的複製プラスミド）。
【００３０】
ある実施形態では、ベクターは発現ベクターであり、本開示の核酸分子の発現に有用な追加のエレメントを含む。発現に有用なエレメントとして、核酸コード配列の発現を指示し調節する核酸配列が挙げられる。発現に有用なエレメントの１つの例はプロモーター配列である。使用に適したプロモーターの例として、マウスＵ６　ＲＮＡプロモーター、合

成ヒトＨ１ＲＮＡプロモーター、ＳＶ４０、ＣＭＶ、ＲＳＶ、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーター、これらの誘導体、又はこれらの組合せが挙げられる。発現に有用なエレメントとしてまた、リボソーム結合部位、イントロン、エンハンサー配列、応答エレメント、又は核酸の発現を調節する誘導性エレメントを挙げることができる。発現に必要なエレメントは、細菌、酵母、昆虫、哺乳類動物又はウイルスの開始点であってよく、ベクターは異なる開始点からのエレメントの組合せを含むことができる。発現に必要なエレメントは当業者に知られており、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ、１９９０、Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．に記載されており、参照により関連部分を本明細書に組み込む。本明細書で使用する場合、作動的に結合するというのは、プロモーター及び／又は他の調節エレメント（複数可）が、ベクター中でｓｈＲＮＡに対して、その分子の発現を指示又は調節するように位置していることを意味する。ｓｈＲＮＡはセンス又はアンチセンスの方向で、調節配列に作動的に結合することができる。さらに、発現とは、センスｍＲＮＡの転写物を指すことができ、また、タンパク質産生を指すことができる。

【００３１】

ある実施形態では、本開示のｓｈＲＮＡはレトロウイルスベクターのエレメントである。レトロウイルスベクターとは、配列を生物の染色体に挿入するのに用いることができるレトロウイルスに由来する人工ＤＮＡコンストラクトを指す。アデノウイルス並びにレンチウイルス及びマウス幹細胞ウイルス（ＭＳＣＶ）などの多くのレトロウイルスは、いくつかの一般的に使用されるレトロウイルスのデリバリーシステムである。アデノウイルスは受容体介在性感染を利用し、安定したサイレンシング実験のためにゲノムに組み込まず、一方、ＭＳＣＶはニューロンなどの非分裂細胞系に組み込むことができない。レンチウイルスベクターは、非分裂及び分裂細胞のゲノムに組み込む能力を有するレトロウイルスベクターのサブクラスである。レンチウイルスベクターは当技術分野で知られており、例えば以下の出版物に開示されており、参照により本明細書に組み込む：Ｅｖａｎｓ Ｊ．Ｔ．ら、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１９９９；１０：１４７９－１４８９；Ｃａｓｅ Ｓ．Ｓ．、Ｐｒｉｃｅ，Ｍ．Ａ．、Ｊｏｒｄａｎ Ｃ．Ｔ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９９；９６：２９８８－２９９３；Ｕｃｈｉｄａ Ｎ．、Ｓｕｔｔｏｎ Ｒ．Ｅ．、Ｆｒｉｅｒａ，Ａ．Ｍ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９８；９５：１１９３９－１１９４４；Ｍｉｙｏｓｈｉ Ｈ、Ｓｍｉｔｈ Ｋ Ａ、Ｍｏｓｉｅｒ Ｄ．Ｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９９；２８３：６８２－６８６；Ｓｕｔｔｏｎ Ｒ．Ｅ．、Ｗｕ Ｈ．Ｔ．、Ｒｉｇｇ Ｒ．ら、Ｊ Ｖｉｒｏｌ．１９９８；７２：５７８１－５７８８。レンチウイルスベクター系は、幅広い親和性及び非受容体介在性デリバリーを示す。その上、レンチウイルスベクター系は、ゲノムへの組込みのために有糸分裂イベントを必要とせず、安定した遺伝子サイレンシングのためにゲノムに組み込む能力を示し、したがって、その使用は分裂と非分裂の両細胞系に拡張される。レンチウイルスベクター系はまた、免疫応答を引き起こさず、オフターゲット効果の懸念を最小化し、インビトロの適用に用いられることが知られている。

【００３２】

ある実施形態では、本開示のｓｈＲＮＡはレンチウイルスベクターのエレメントである。本開示に使用するのに適したベクターの実施形態を表すベクターの図は図１に示されている。図１を参照すると、本開示で使用するための典型的なベクターの特徴としては、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）などの少なくとも１つのポジティブ選択マーカーの上流に処理された伸長因子アルファ１プロモーター（ＥＦ－１ａ）などのプロモーター；例えばこれに限定されないが、マーモット肝炎の転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）などの１種又は複数の調節エレメント；及び発現が上流のポリメラーゼＩＩＩプロモーター、つまりヒト１（Ｈ１）により引き起こされ得るＨｓｐ発現を低下させるための少なくとも１つのＮＡＭ配列（例えば、配列番号４を含む第１鎖、相補的な第２鎖及び結合部分を有するｓｈＲＮＡ）が挙げられる。調節エレメントとは、関心遺伝子の発現を強めるよう設計された

遺伝子エレメントを指す。ある実施形態では、レンチウイルスベクターは、本明細書より前に開示された少なくとも１つの配列を含むＮＡＭをコードする核酸配列に作動的に結合するＨ１－ＲＮＡプロモーターを含む。したがって、Ｈ１プロモーターはＮＡＭの転写を開始させ、ＮＡＭの構成的発現を可能にさせる。別の実施形態では、ＮＡＭは、ＮＡＭの誘導性発現を可能にする調節可能プロモーターに作動的に結合する。かかる誘導性プロモーター及び同等物を使用する方法は、当業者に知られている。ある実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターであり、ベクターのマーカー、遺伝子、及び他のエレメントは、無傷のレトロウイルス５’末端反復配列（ＬＴＲ）及び３’末端の自己不活性化（ＳＩＮ）によって隣接することができる。かかる隣接配列は当業者に知られている。

【００３３】

コンストラクトに包含され得るエレメントのタイプは任意の方法で制限されるものではなく、熟練した技術者によって選ばれて特定の結果を獲得する。例えば、標的細胞へのウイルスゲノムの核移行を促進するシグナルは、コンストラクトに包含され得る。本明細書で開示されているように、ベクターの小さな変更は、ベクターの有用性を著しく変化させることなしになされ得ることを理解されたい。そのようなものとして、ベクターの図は制限することを意図せず、ベクターのファミリーの一実施形態を例示する。簡単にするために、以下では、本明細書で開示されているように少なくとも１つのｓｈＲＮＡを含むベクターのファミリーは、熱ショックタンパク質低下ベクター（ＨＲＶ）と呼ぶことにする。ある実施形態では、ＨＲＶは例えば、ボルティモア、ＭＤのＬｅｎｔｉｇｅｎ Ｃｏｒｐ．から商業的に入手できるレンチＧＦＰベクター、カールスバッド、ＣＡのＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから商業的に入手できるＢｌｏｃｋ－ｉＴレンチウイルスベクター、及びマウンテンビュー、ＣＡのＳｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから商業的に入手できるｐＳＩＦ１－Ｈ１ ｓｈＲＮＡベクターなどのレンチウイルスベクター、並びに本開示のｓｈＲＮＡを含む。

【００３４】

ある実施形態では、ＨＲＶは１種又は複数の発現カセットを含み、前記発現カセットは、第１セグメント、第１セグメントのすぐ３’側に位置する第２セグメント、及び第２セグメントのすぐ３’側に位置する第３セグメントをコードする単離した核酸配列に作動的に結合するプロモーターを含み、前記第１及び第３セグメントは約１９～約２８ヌクレオチドの長さであり、前記第１セグメントは配列番号３と実質的に同一であり、前記第３セグメントの配列が第１セグメントの相補体である。ある実施形態では、ＨＲＶから発現する単離した核酸配列は、１種又は複数のＨｓｐの発現を阻害するｓｈＲＮＡとして機能する。

【００３５】

ウイルスが細胞に感染するのを可能にする任意の方法で、ＨＲＶは細胞に送達することができる。ある実施形態では、ＨＲＶはパッケージング細胞系に導入される。パッケージング細胞系は、ウイルスゲノムＲＮＡをウイルス粒子にパッケージングするためのトランスで必要とされるウイルスタンパク質を提供する。パッケージング細胞系は、レトロウイルスタンパク質を発現できる任意の細胞系であってよい。ＨＲＶは次いで、パッケージング細胞から精製し、力価測定して所望の濃度に希釈することができる。ある実施形態では、感染した細胞は、さらなる工程を伴うか、伴うことなしに用いることができる。別の実施形態では、感染した細胞は生物を感染させるのに用いることができる。

【００３６】

ある実施形態では、ＨＲＶは細胞又は細胞系に導入する。別の実施形態では、ＨＲＶは一般的には改変された細胞としてヒト以外の動物に導入することができ、しばらくの間、インビボでヒト以外の動物によって維持することができる。例えば、細胞はヒト以外の動物から単離でき、本明細書で前に記載したようなインビトロ技法（例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿など）をいく種でも用いてＨＲＶを細胞に導入することができる。ＨＲＶを今や保持している単離細胞は、ヒト以外の動物に再導入することができ、結果としてしばらくの間、１種又は複数のＨｓｐの発現を低下が引き起こされる。他の実施形態で

は、望ましくない状態を有するヒトを処置するために類似の方法を採用することができる。

【００３７】

ある実施形態では、本明細書に開示されているように、ＨＲＶに感染している細胞、組織又は生物は、ＨＲＶを欠く他の類似の細胞又は生物と比較したとき、Ｈｓｐ発現レベルの低下を経験することができる。例えば、配列番号４、５又は６を含むＨＲＶに感染したとき、Ｈｓｐを発現する細胞はＨｓｐ発現レベルの低下を経験することができる。

【００３８】

ＨＲＶを含む細胞又は生物におけるＨｓｐ発現レベルは、ＨＲＶの非存在下で他の同一の細胞又は生物と比較したとき、約６０％と同等か、それより多い量、或いは、約７０、７５又は８０％より多い量によって低下させることができる。Ｈｓｐ発現レベルの低下を明確にするための方法として、ｍＲＮＡ転写物に関するアッセイ、翻訳産物に関するアッセイ又はこれらの組合せを挙げることができる。ＮＡＭ（例えば、ｍＲＮＡ転写物）及びポリペプチド（例えば、Ｈｓｐ）は、当業者によく知られている多くの異なる方法を用いて検出することができる。ＮＡＭを検出するための方法としては、例えばＰＣＲ及び核酸ハイブリダイゼーション（例えば、サザンブロット、ノーザンブロット又はインサイツハイブリダイゼーション）が挙げられる。

【００３９】

本開示のｓｈＲＮＡは、多くの細胞型又は組織型においてＨｓｐ発現を低下させるために使用することができる。このようなものとして、Ｈｓｐ発現の低下により望ましくない状態が回復し得るため、ｓｈＲＮＡを前記状態を経験する任意の細胞型又は組織に導入する場合がある。例えば、本開示のｓｈＲＮＡは癌細胞中のＨｓｐ発現を低下させるために使用することができる。本明細書で使用する場合、「癌細胞」は、制御できず及び／又は異常に増殖し、例えば上皮性悪性腫瘍になり得る細胞を指す。上皮性悪性腫瘍としては、例えば、頭部及び頸部癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、及び結腸癌細胞が挙げられる。本開示のｓｈＲＮＡは、結果として癌細胞の増殖の阻害を引き起こすために投与することができる。本明細書で使用する場合、癌細胞の増殖は一定期間（例えば、時間、日、又は月）にわたる癌細胞（インビトロ又はインビボ）の数の増加を指す。注意すべきは、癌細胞数は静止しておらず、細胞分裂を受ける細胞の数と死ぬ細胞（例えば、アポトーシスによる）の数の両方を反映するということである。癌細胞の増殖の阻害は、癌細胞数の増加率の減少、癌細胞の完全な消失、又はこれらの間の任意の変化として明確にすることができる。腫瘍に関しては、腫瘍サイズの縮小は増殖の阻害を示している場合がある。本明細書に記載されているタイプのｓｈＲＮＡを含む１種又は複数の組成物を、腫瘍増殖により明白にされる細胞増殖障害を有する生物に投与することにより、ＨＲＶの非存在下で観察した腫瘍細胞増殖と比較したときに、約１０～約９０％、或いは約３０～約９０％、或いは約７５％より高い腫瘍増殖の阻害を結果として引き起こし得る。本明細書における腫瘍細胞増殖とは細胞増殖又は腫瘍量の増加を指し、例えば、磁気共鳴画像法、電子キャリパー、マンモグラムなどの当業者に知られている技術により測定することができる。

【００４０】

さらに、本開示のｓｈＲＮＡは、結果として転移能が低下した癌をもたらし得る。転移とは悪性腫瘍細胞が身体においてその最初の部位から他の部位に広がることを指す。したがって、本開示のｓｈＲＮＡは、転移能を有する癌細胞に導入して発現したとき、本開示のｓｈＲＮＡが発現しない細胞の転移能と比較すると、最初の位置から広がる悪性腫瘍細胞の能力は低下する可能性がある。本明細書に記載されているタイプのｓｈＲＮＡを含む１種又は複数の組成物を、転移する能力とともに腫瘍増殖によって明白になる細胞増殖障害を有する生物に投与することにより、ＨＲＶの非存在下で観察した腫瘍細胞増殖と比較したときに、約１０％～約９５％、或いは約３０％～約７０％、或いは約７５％と同等かそれより高い転移能の低下を結果として引き起こす。本明細書における転移能とは、１つ又は複数の遠位部位で増殖する腫瘍の能力を指し、例えば細胞移動アッセイなどの当業者に知られている技術によって測定することができる。

【００４１】
ある実施形態では、本明細書に記載されているタイプのｓｈＲＮＡを含む組成物は、望ましくない状態に処置効果を与える他の治療方法と併せて使用することができる。例えば、本開示のｓｈＲＮＡは、他の遺伝子サイレンシング治療、化学療法レジメン、放射線治療、低体温療法などと併せて使用することができる。
【００４２】
ある実施形態では、本開示のｓｈＲＮＡは医薬品組成物の成分であってよく、前記組成物は望ましくない状態に罹っている生物に投与するべきであり、治療剤として働く。医薬品組成物（ＰＣ）はその目的とする投与の経路に適合するように処方することができる。例えば、生物は１種又は複数の腫瘍量を有する場合があり、ＰＣは直接注射を経て導入することができる。さらに、投与経路の例として、非経口（例えば、静脈内、皮内、皮下）、経口（例えば、摂取又は吸入）、経皮（例えば、局所）、経粘膜、及び直腸内投与が挙げられる。ある実施形態では、本開示のｓｈＲＮＡは、単独で又はベクター（即ちＨＲＶ）の成分として、投与に適した医薬品組成物に組み込むことができる。かかる組成物は通常はｓｈＲＮＡ及び薬学的に許容できる担体又は賦形剤を含む。本明細書に使用されているように、「薬学的に許容できる担体」として、医薬品投与に適合した、任意の及びすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌及び抗かび剤、等張及び吸収遅延剤などを包含することを意図している。薬学的な活性物質のためのかかる媒体及び作用剤の使用は、当技術分野においてよく知られている。
【００４３】
ある実施形態では、望ましくない状態の処置に用いるための組成物には、腫瘍標的Ｈｓｐ発現低下システム（ＴＴＨＲＳ）の投与が含まれる。ＴＴＨＲＳには、本明細書より前に記載された１種又は複数のＨｓｐ組成物、１種又は複数のデリバリーナノ粒子、及び１種又は複数の標的指向性部分が含まれる。ある実施形態では、身体のどこで腫瘍細胞が生じようとも、ＴＴＨＲＳは本開示のＨｓｐ発現低下組成物を腫瘍細胞に送達することができる。例えば、ＴＴＨＲＳは本開示の組成物を初期と転移性疾患の両方に送達することができ得る。
【００４４】
ある実施形態では、ＴＴＨＲＳには１種又は複数のｓｈＲＮＡを輸送するためのデリバリーシステム、及び任意選択の生物中の成分が含まれる。デリバリーシステムには、本開示の組成物に適合し、生物への使用に適した、任意の物質の使用が包含される。ある実施形態では、デリバリーシステムには、ナノ粒子、又はリポソームが含まれ得る。本明細書におけるナノ粒子とは、少なくとも１つの直径が１００ｎｍより小さい大きさの物質を指し、一方、リポソームは脂質二重層を指す。リポソームは静脈内（ｉ．ｖ．）注射に従って血液循環の存続時間の拡張を示すため、一般的に系統的な適用を示し、かかる領域で血管浸透圧が高まることにより、様々な組織及び器官又は腫瘍で選択的に蓄積される可能性があり、エンドソーム膜の破壊によるエンドサイトーシスのリソソーム経路を逃れるように設計することができる。リポソームは一般的に、化合物を含むコア、通常は水性コアを有する封入された脂肪滴を含む。リポソーム又はリポソーム前駆体は当業者に知られている任意の手法を用いて調製することができる。本開示の使用に適したリポソームの例には、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓから商業的に入手できる置換Ｎ－（１－（２、３－ジオレオイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウム塩化物化合物であるカチオン性脂質のＤＯＴＡＰ系列がある。ある実施形態では、本開示のＨｓｐ発現低下組成物はリポソームの脂質成分に化学的に共役する。他の実施形態では、本開示のＨｓｐ発現低下組成物はリポソームの内側の水性区画内に含まれる。
【００４５】
ある実施形態では、ＴＴＨＲＳは標的指向性部分を含む。かかる標的指向性部分は細胞表面上の受容体を認識して結合することができる。ある実施形態では、標的指向性部分は、機能障害性又は疾患性細胞によって主に発現する受容体に優先的に結合するように選ぶことができる。或いは、標的指向性部分は正常及び疾患性細胞の両方に結合することがで

きるが、疾患性細胞は正常細胞に比べてより多くの部分が標的になるため、疾患性細胞は１つ又は複数の受容体を高いレベルで発現することができる。ある実施形態では、標的指向性部分は、ＴＴＨＲＳの他の成分に適合し、１種又は複数の関連細胞（例えば、腫瘍細胞）に効果的に結合できる任意の物質を含むことができる。かかる部分は当技術分野で既知であり、抗体、トランスフェリンなどが挙げられる。ある実施形態では、標的指向性部分はトランスフェリンを含む。ある実施形態では、ＴＴＨＲＳは、ＴＴＨＲＳのリポソームの表面に結合しているトランスフェリンを含む。

【００４６】

さらに本明細書には、１種又は複数のｓｈＲＮＡ、本開示のｓｈＲＮＡをコードする１種又は複数のベクター（例えば、ＨＲＶ）、或いは１種又は複数のＴＴＨＲＳを含む製造品（例えば、キット）を開示されている。かかる組成物は投与のために処方でき、本明細書より前に記載されているように、投与の目的の経路に対して適切にパッケージングすることができる。例えば、ｓｈＲＮＡ又は本開示のｓｈＲＮＡを含むベクターは、薬学的に許容できる担体又は賦形剤内に包含され得る。

【００４７】

ある実施形態では、本開示のｓｈＲＮＡ又はＨＲＶを含むキットはまた、追加の試薬（例えば、バッファー、補因子又は酵素）を包含することができる。本明細書に記載されているように、医薬品組成物は、さらに組成物を個体に投与するために使用説明書を包含することができる。キットはまた、アッセイすることができて生物のサンプルと比較できる対照サンプル又は対照サンプル系列も含むことができる。キットの各成分は、通常、個々の容器内に封入され、すべての様々な容器は単一のパッケージ内にある。

【実施例】

【００４８】

大まかに本発明を記載してきたが、本発明の具体的な実施形態として以下に実施例を記載し、それらの実践及び利点を実際に示す。実施例は例示の方法として提供するものであり、任意の方法によって導かれる本明細書の特許請求の範囲を制限する意図はないことを理解されたい。

【００４９】

（例１）

配列番号６及び配列番号７に与えられるｓｈＲＮＡ配列を含む核酸分子がＨｓｐ２５発現を低下させる能力を調べた。マウスの乳癌４Ｔ１細胞は、変異原処理することなく４１０．４腫瘍から選択した６－チオグアニン耐性細胞系である。２ｍＭのＬ－グルタミンを含むＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ ｍｅｄｉｕｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、Ｃａｌｉｆ．、ＵＳＡ）中に細胞を維持し、５％$CO_2$雰囲気の加湿したインキュベーターにおいて３７℃で、１．５ｇ／ｌの炭酸水素ナトリウム、４．５ｇ／ｌのグルコース、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１．０ｍＭのピルビン酸ナトリウム、及び１０％のウシ胎仔血清を含むように調製した。細胞を指数関数的増殖率で増殖させ、培養物がおよそ８０％集密のとき、０．１％のトリプシン－ＥＤＴＡを用いて収穫した。新鮮な細胞を使用する前に、細胞を５～８回だけ継代培養した。

【００５０】

製品説明書に従って脂質形質移入試薬Ｅｆｆｅｃｔｅｎｅ（Ｑｉａｇｅｎ、Ｖａｌｅｎｃｉａ、Ｃａｌｉｆ、ＵＳＡ）を使用して、４Ｔ１細胞を含む２つのサンプルに、配列番号８又は配列番号９のいずれかを有するｓｈＲＮＡをそれぞれが含む、ベクターｐＬＶＴＨＭ、ｐｓＰＡＸ２又はｐＭＤ２Ｇのいずれか、及びＧＦＰ$^{plasmid}$を形質移入した。以下の考察では、配列番号６をＡＳ１又は Ｈｓｐ２５ｓｈＲＮＡ１として呼び、配列番号７をＤＳ１又はＨｓｐ２５ｓｈＲＮＡ２として呼ぶ。３つ目のサンプルに、対照配列の配列番号１０を形質移入した。ＣＧＡＴＣＣＣＣＧＣＴＣＡＡＴＣＣＧＡＧＡＧＧＡＡＴＡＴＴＣＡＡＧＡＧＡＴＡＴＴＣＣＴＣＴＣＧＧＡＴＴＧＡＧＣＴＴＴＴＴＴＧＧＡＡＡＴ。簡潔に述べると、$3\times10^5$個の対数増殖期細胞を６０ｍｍ組織培養プレート中に蒔き、Ｅｆｆｅｃｔｅｎｅ中のＧＦＰ$^{plasmid}$ＤＮＡ１μｇ、及びＡＳ１、ＤＳ

１又は対照を含むプラスミド１μｇの混合物を細胞に加え、３７℃で１８時間インキュベートした。４８時間後、細胞を回収し、すぐにＭｏＦｌｏｗサイトメーター（Ｄａｋｏｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、ＣＡ、ＵＳＡ）を使用してＧＦＰ陽性及び陰性亜集団に選別した。個々の細胞を、前方散乱（ＦＳＣ）及び直角散乱（ＳＳＣ）に基づいてゲート選別した。ＧＦＰ（ＦＬ１－ｈｅｉｇｈｔ）のための光電子倍増管（ＰＭＴ）を対数スケールにセットした。細胞の残骸はＦＳＣ－ｈｅｉｇｈｔ　ＰＭＴの域値を上げることによって除去した。流率を×２００ｃｅｌｌｓ／ｓに調製し、少なくとも$10^5$個の細胞を各サンプルグループに分類した。

【００５１】

適切なプロテアーゼ阻害剤を含むＲＩＰＡバッファーを用いて１００万個の細胞を溶解し、ＤＵ－６５０分光光度計（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）とともにＢｒａｄｆｏｒｄ法（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、Ｃａｌｉｆ．、ＵＳＡ）を用いてタンパク質濃度を決定した。サンプルを１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル中に流し、ニトロセルロース膜上に移した。５％ミルクを含むＴｗｅｅｎ２０－Ｔｒｉｓ緩衝塩水（Ｔ－ＴＢＳ）を用いて４℃で１時間、膜を固定した。リンス後、１：２，０００の希釈率でＨｓｐ２７（ＳｔｒｅｓｓＧｅｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）又は１：１，０００の希釈率でＨｓｐ２５（ＳｔｒｅｓｓＧｅｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に対する一次抗体で膜をプローブした。５％ミルクを含むＴ－ＴＢＳ中で抗体を希釈した。室温で１時間インキュベートした後、膜をＴ－ＴＢＳ中で３回洗浄した。対応するＨＲＰ結合型ＩｇＧ二次抗体（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、Ｍｏ．、ＵＳＡ）を加え、膜を室温で３０分間インキュベートした。さらなる洗浄の後、バンドを高感度化学発光（Ａｍｅｒｓｈａｍ、Ｌｉｔｔｌｅ　Ｃｈａｌｆｏｎｔ、ＵＫ）を用いて可視化し、結果を図２に示す。

【００５２】

図２はＡＳ１、ＤＳ１又は対照ｓｈＲＮＡを形質移入した細胞に関するブロットを示し、βアクチンを負荷対照として使用した。矢印１０を参照すると、４Ｔ１細胞は両実験においてＨｓｐ２５を発現すると考えられる。矢印２０を参照すると、対照ｓｈＲＮＡ（配列番号６）の細胞への形質移入は、Ｈｓｐ発現の低下を結果として引き起こすが、矢印３０及び４０のそれぞれを参照すると、ＡＳ１又はＤＳ１を形質移入した細胞において検出可能なＨｓｐ２５の発現はない。

【００５３】

（例２）

例１に記載のベクターを形質移入した腫瘍細胞の増殖を調べた。４Ｔ１の細胞増殖を合計４日間、血球計測器を用いて測定し、増殖結果を図３に示し、グラフを次のようにラベルする。対照ｓｈＲＮＡは４Ｔ１／対照ｓｈＲＮＡ１に対応し、ＡＳ１は４Ｔ１／ＨＳＰ２５ｓｈＲＮＡ１に対応、ＤＳ１は４Ｔ１／ＨＳＰ２５ｓｈＲＮＡ２に対応する。結果は、対照ｓｈＲＮＡ、ＡＳ１又はＤＳ１を発現する細胞が類似の増殖曲線を表すことを実際に示す。

【００５４】

例１に記載のベクターを形質移入した腫瘍細胞を動物に感染させるために用い、これらの動物における初期腫瘍細胞の進行を調べた。具体的には、腹部乳腺パッドへの４Ｔ１細胞の注射により、Ｊａｃｋｓｏｎ研究室（Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｍｅ．、ＵＳＡ）から購入したＢＡＬＢ／ｃマウスで試み、腫瘍サイズが１，０００$mm^3$に到達するまで、電子キャリパーを用いて一定間隔で腫瘍体積を測定した。楕円の体積に関する式（長さ×幅×高さ×０．５２３６）を用いて腫瘍体積を見積もった。すべての動物を人道的に処理し、米国学術研究会議及びボストン大学医学部の、動物資源協会の研究用動物の管理と使用に関する委員会（ｔｈｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ　ｏｎ　ｔｈｅ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　ｏｆ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ａｎｉｍａｌ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｕｎｃｉｌ　ａｎｄ　Ｂｏｓｔｏｎ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｓｃｈｏｏｌ　ｏｆ　Ｍ

ｅｄｉｃｉｎｅ）の指針に従った。対照ｓｈＲＮＡ、ＡＳ１又はＤＳ１を発現する細胞を感染させた動物に関する初期腫瘍増殖曲線を図４に示し、グラフは次のようにラベルする。対照ｓｈＲＮＡは４Ｔ１／対照ｓｈＲＮＡ１に対応し、ＡＳ１は４Ｔ１／ＨＳＰ２５ｓｈＲＮＡ１に対応し、ＤＳ１は４Ｔ１／ＨＳＰ２５ｓｈＲＮＡ２に対応する。結果は、ＡＳ１又はＤＳ１を形質移入した腫瘍細胞を注射した動物が実験の間中、腫瘍体積の小さな変化を表すことを実際に示し、一方、対照ｓｈＲＮＡを形質移入した腫瘍細胞を注射した動物は、実験の間中、腫瘍体積の十分な増殖を示した。このことはさらに図５及び６で図示し、図５はＡＳ１を形質移入した腫瘍細胞を注射してあるマウスの写真を示し、また、図６は対照ｓｈＲＮＡを形質移入した腫瘍細胞を注射してあるマウスの写真を示す。ＡＳ１を形質移入した腫瘍細胞を注射した図４のマウスは、実験の間中、固形腫瘍の進行が皆無か少ししか見られず、一方、対照ｓｈＲＮＡを形質移入した腫瘍細胞を注射したマウスは実験の間中、腫瘍の進行を示した。

【００５５】

（例３）

腫瘍細胞の転移能を低下させる例１に記載のＡＳ１及びＤＳ１分子の能力を、細胞遊走アッセイを用いて調べた。製品の説明書に従って、Ｍａｔｒｉｇｅｌ ｉｎｖａｓｉｏｎ ｃｈａｍｂｅｒ（ＢＤ Ｂｉｏｃｏａｔ Ｃｅｌｌｗａｒｅ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、Ｃａｌｉｆ．、ＵＳＡ）及び例１に記載の４Ｔ１腫瘍細胞を使用して細胞遊走を測定した。簡潔に述べると、条件培地を化学遊走物質として下部の容器に置いた。単一細胞の懸濁液を上部の容器に置いた。２２時間後、フィルターを通過しない細胞を洗い落とし、膜を０．５％クリスタルバイオレットで染色し、顕微鏡のスライド上に乗せ、視覚化して写真を撮った。１５カ所の異なる部分を１０×の倍率で光学顕微鏡を用いて視覚化した。図７は各コンストラクトに関する浸潤細胞数のプロットであり、浸潤は化学遊走物質の方へ遊走する腫瘍細胞の数を指し、グラフは次のようにラベルする。対照ｓｈＲＮＡは４Ｔ１／対照ｓｈＲＮＡ１に対応し、ＡＳ１は４Ｔ１／ＨＳＰ２５ｓｈＲＮＡ１に対応し、ＤＳ１は４Ｔ１／ＨＳＰ２５ｓｈＲＮＡ２に対応する。結果は、ＡＳ１又はＤＳ１コンストラクトのいずれかを形質移入した腫瘍細胞が、対照ｓｈＲＮＡを形質移入した腫瘍細胞より狭い範囲を遊走したことを実際に示す。

【００５６】

（例４）

簡潔に述べると、ＤＯＴＡＰ及びコレステロール（モル比１：１）からなるリポソームを、薄膜水和の後、膜押出しにより、Ｎ４ ＰＬＵＳ Ｃｏｕｌｔｅｒ粒径散乱測定器を用いて測定したとき、８０～１００ｎｍの粒子サイズを得ることにより調製した。リポソームナノ粒子には、ＤＯＴＡＰ／コレステロール、プロタミンスルホン酸、並びに配列番号４～６及び対照配列中に提示されているタイプのＨｓｐ標的指向化ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドを含ませた。体重１ｋｇ当たり１ｍｇのｓｉＲＮＡ製剤を調製するために、２００μｌのリポソームナノ粒子は、１３．５μｌのｓｉＲＮＡ、１０μｌ（２０μｇ）のプロタミンスルホン酸、４０μｌのＤＯＴＡＰ及びコレステロール（モル比１：１）、１５μｌのトランスフェリン（３００μｇ）、リボヌクレアーゼを含まない１２１．５μｌの水を含む。ＤＯＴＡＰ、コレステロールは、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．から商業的に入手でき、ヒトトランスフェリンは、鉄飽和の熱失活した形態でＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから商業的に入手でき、サケから単離したプロタミンスルホン酸ＧｒａｄｅＸは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから商業的に入手することができる。ナノ粒子複合体を、プロタミンスルホン酸と、リボヌクレアーゼを含まない水と、ｓｉＲＮＡとを混合し、１０分間室温で放置した後、ＤＯＴＡＰ／コレステロールリポソーム、トランスフェリン複合体を加えることにより調製されよう。リポソームナノ粒子を、動物に注射する前に１０分間室温でインキュベートした。

【００５７】

赤色蛍光タンパク質で標識した$10^4$個の４Ｔ１腫瘍細胞をＢＡＬＢ／ｃ雌マウスの乳腺に皮下注射し、これが０日目となり図８ａに示す。腫瘍が適切な量に到達した７日目に

、配列番号４、相補的な第２鎖、結合部分及び緑色蛍光標識を含むｓｈＲＮＡをマウスの乳腺に注射した。図８及び９では、腫瘍部位は点線で大体の輪郭を描き、ｓｈＲＮＡは実線で大体の輪郭を表している。２４時間後のインビボの画像である図８ｂは、赤色蛍光標識によって明らかになったときの腫瘍、及び緑色蛍光標識によって明らかになったときの、腫瘍部位の近位に局在するｓｈＲＮＡを示す。１４日目の画像である図８ｃでは、処置していない腫瘍と比較すると、腫瘍量の低下が見られる。腫瘍量が低下した４日目に、ｓｈＲＮＡを注射するという変化を加えた実験を繰り返し、２４時間後に画像化したのが図９ｂである。１４日目に、処置していない腫瘍と比較したときに腫瘍量の低下を観察したのが図９ｃである。

【００５８】

（予想例５）

以下は、本明細書に開示されている組成物を利用するｓｉＲＮＡ遺伝子治療に関する机上のプロトコールである。簡潔に述べると、ＤＯＴＡＰ及びコレステロール（モル比１：１）からなるリポソームは、薄膜水和の後、膜押出しにより、８０～１００ｎｍの粒子サイズを得ることによって調製されよう。粒子サイズは、Ｎ４　ＰＬＵＳ　Ｃｏｕｌｔｅｒ散乱測定器を用いて測定されよう。リポソームナノ粒子には、ＤＯＴＡＰ／コレステロール、プロタミンスルホン酸、及び配列番号４～６中に提示されているタイプのＨｓｐ標的指向化ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドを含むことになろう。体重１ｋｇ当たり１ｍｇのｓｉＲＮＡ製剤を調製するために、２００μｌのリポソームナノ粒子は、１３．５μｌのｓｉＲＮＡ、１０μｌ（２０μｇ）のプロタミンスルホン酸、４０μｌのＤＯＴＡＰ及びコレステロール（モル比１：１）、１５μｌのトランスフェリン（３００μｇ）、リボヌクレアーゼを含まない１２１．５μｌの水を含む。ＤＯＴＡＰ、コレステロールは、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．から商業的に入手でき、ヒトトランスフェリンは、鉄飽和の熱失活した形態でＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから商業的に入手でき、サケから単離したプロタミンスルホン酸ＧｒａｄｅＸは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから商業的に入手することができる。ナノ粒子複合体を、プロタミンスルホン酸と、リボヌクレアーゼを含まない水と、ｓｉＲＮＡとを混合することにより調製すると、ＤＯＴＡＰ／コレステロールリポソーム、トランスフェリン複合体を加える前に、１０分間室温で維持することができよう。リポソームナノ粒子は、動物に注射する前に１０分間室温でインキュベートされよう。

【００５９】

赤色蛍光タンパク質で標識した$10^4$個の４Ｔ１細胞は、ＢＡＬＥ／ｃ雌マウスの乳腺に皮下注射されよう。腫瘍が（２０～３０$mm^2$）のサイズに到達するときに、ｓｉＲＮＡ処置が開始されよう。ｓｉＲＮＡ製剤は、体重１ｋｇ当たり１～２ｍｇの投与量（１日に１回の注射を１週間に３日間、２～４週間）で、マウスの皮下、静脈内又は腫瘍内に注射されよう。腫瘍の退縮は、インビボの画像化及び電子キャリパーの使用による腫瘍の測定によってモニターされよう。処置の経過の間、ｓｉＲＮＡ分布の調査のために組織を採取し、サイトカイン測定（インビボでの毒性）調査のために血液が採取されよう。これらの調査結果は、哺乳類動物の腫瘍を減少させる、腫瘍の転移能を低下させる、及び異なる哺乳類動物の配列における交差反応性を調べるというＨｓｐ組成物の能力を評価するために、部分的に使用されよう。

【００６０】

様々な実施形態を示し、説明してきたが、これらの改変は、本発明の精神及び教示から逸脱することなしに、当業者によって成すことができる。本明細書に記載の実施形態は単なる例示にすぎず、限定する意図はない。本明細書に開示されている本発明の多くの変形形態及び改変形態が可能であり、本発明の範囲内である。数値の範囲又は制限が明記されている場合、かかる明白な範囲又は制限は、明記された範囲又は制限内に入る大きさ類似の反復的範囲又は制限を包含するものと理解すべきである（例えば、約１～約１０は２、３、４などを包含し、０．１０より大きい場合は０．１１、０．１２、０．１３などを包含する）。特許請求の範囲の任意の要素に関して、「場合により（ｏｐｔｉｏｎａｌｌｙ

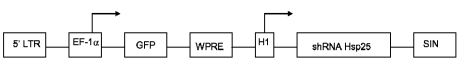
）」という用語の使用は、対象の要素を必要とする、或いは必要としないことを意味することを意図している。両選択肢とも、本特許請求の範囲内に入ることを意図している。含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）、包含する（ｉｎｃｌｕｄｅ）、有する（ｈａｖｉｎｇ）などのより広範な用語の使用は、からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）、から基本的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）、を実質的に含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ　ｓｕｂｓｔａｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）などのより狭い用語を補助するものとして理解すべきである。

【００６１】

したがって、保護範囲は、上述の説明により制限されないが、以下に続く特許請求の範囲によってのみ制限され、その範囲は特許請求の範囲の対象となるすべての同等物を包含している。それぞれの及びすべての請求項は、本発明の実施形態として本明細書に組み込まれる。したがって、請求項はさらなる記載であり、本開示の実施形態に追加するものである。本開示における参照文献の考察は、本開示より前の技術として承認したわけではなく、特に、任意の参照文献は、本出願の優先日後の出版日を有する場合がある。本明細書に示した詳細内容の補足となる例、手順、又は他のことに関する詳細を提供する限りは、本明細書に引用されているすべての特許、特許出願、及び出版物は、参照により本明細書に組み込まれる。

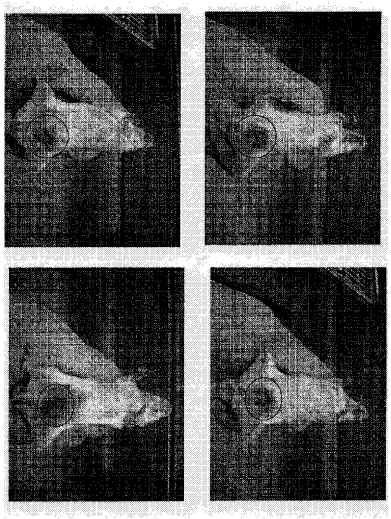
【図１】

*FIG. 1*



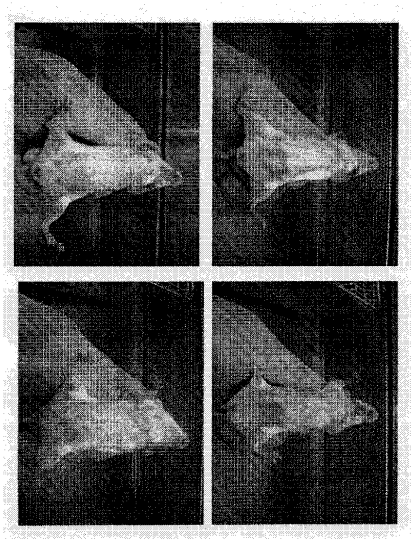

【図５】

*FIG. 5*

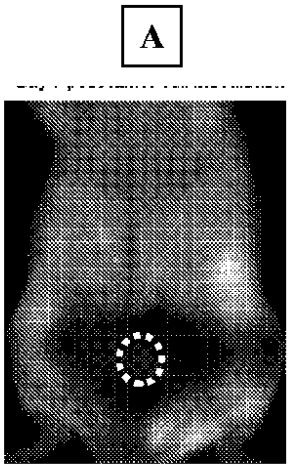


【図６】

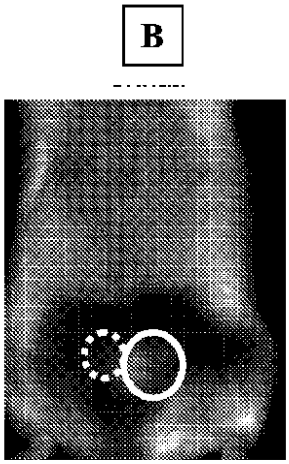
*FIG. 6*



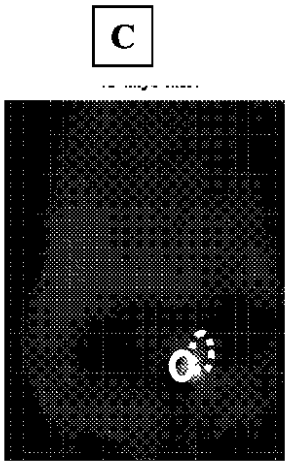
【図８Ａ】



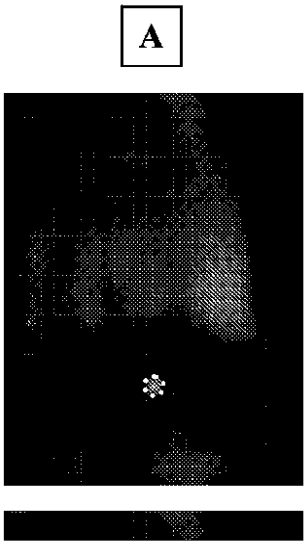

【図８Ｂ】



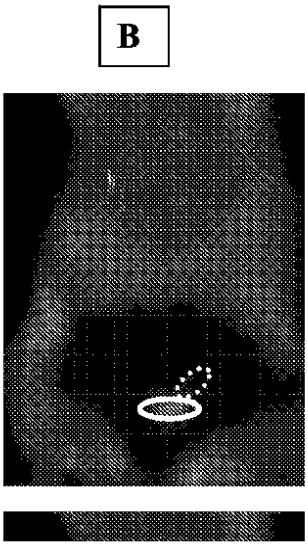

【図８Ｃ】



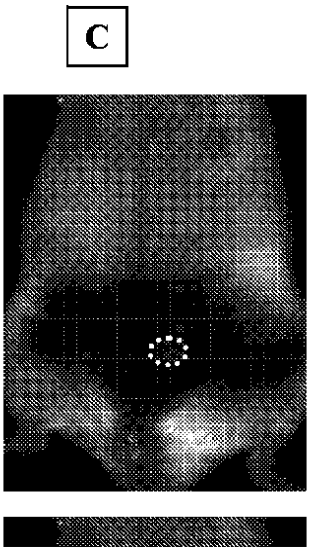

【図９Ａ】



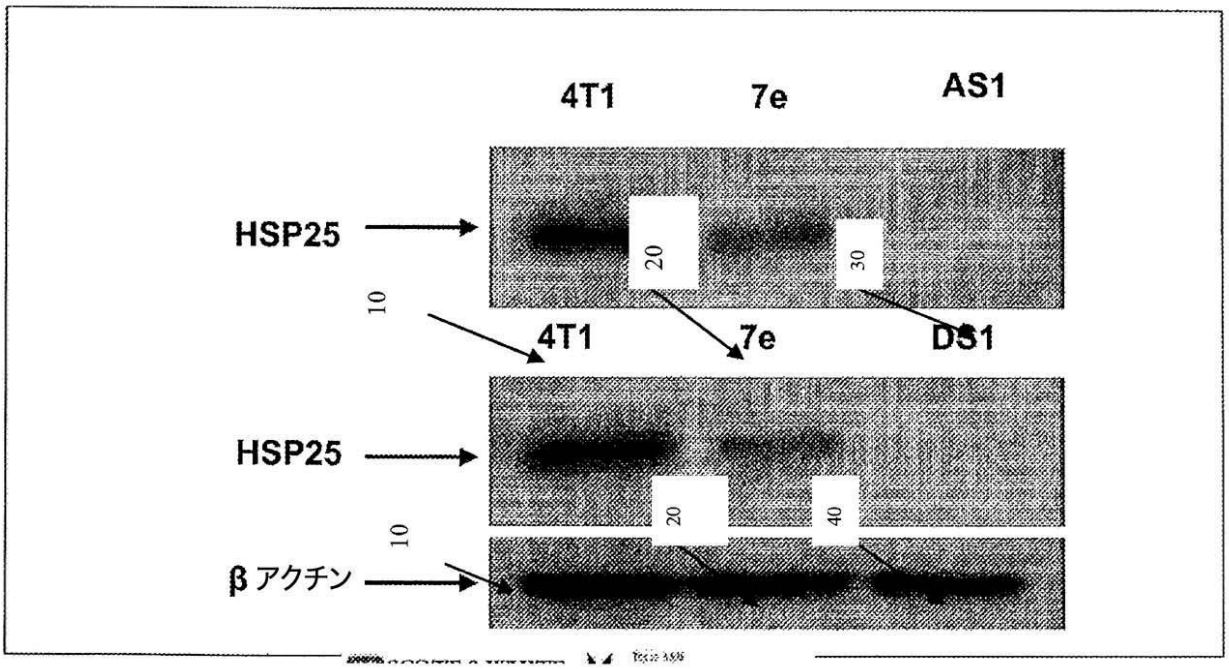
【図９Ｂ】



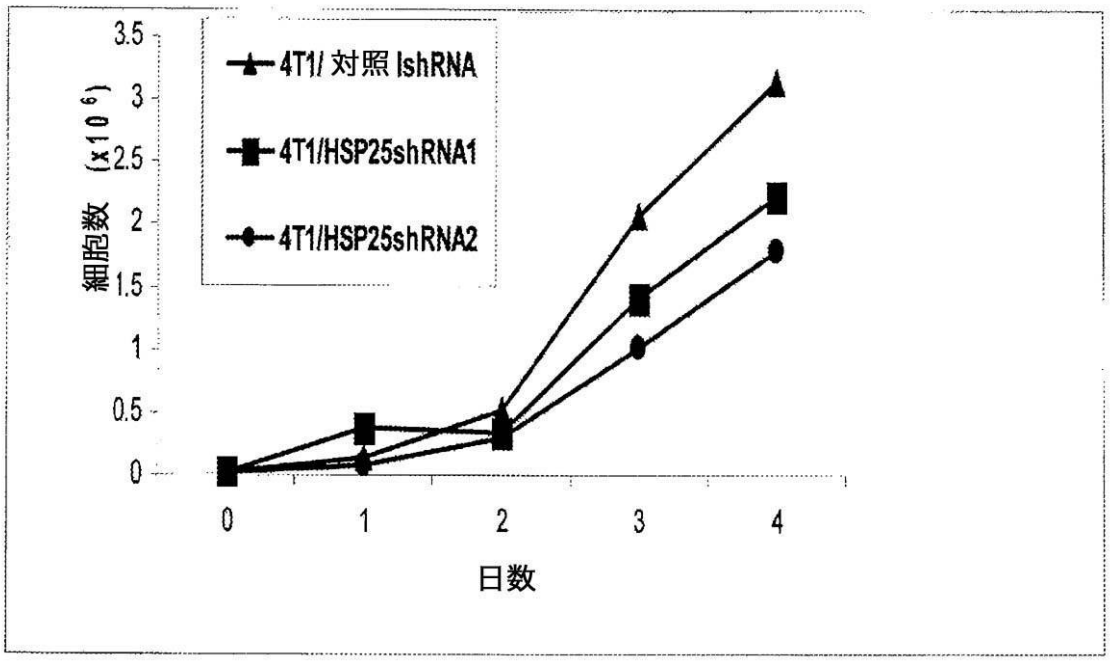

【図９Ｃ】



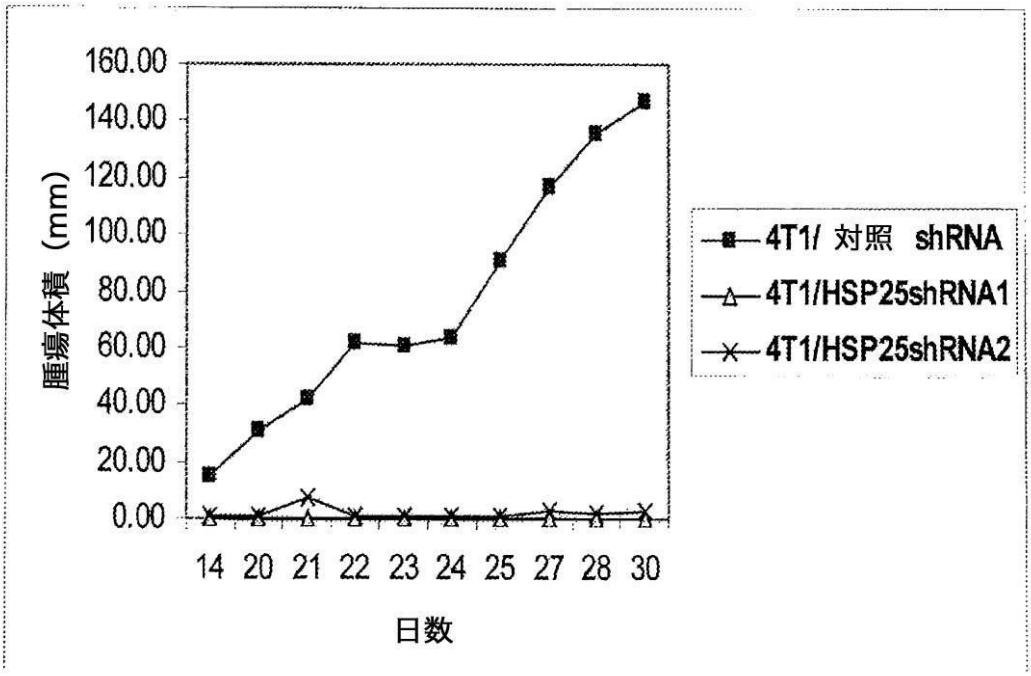

【図２】



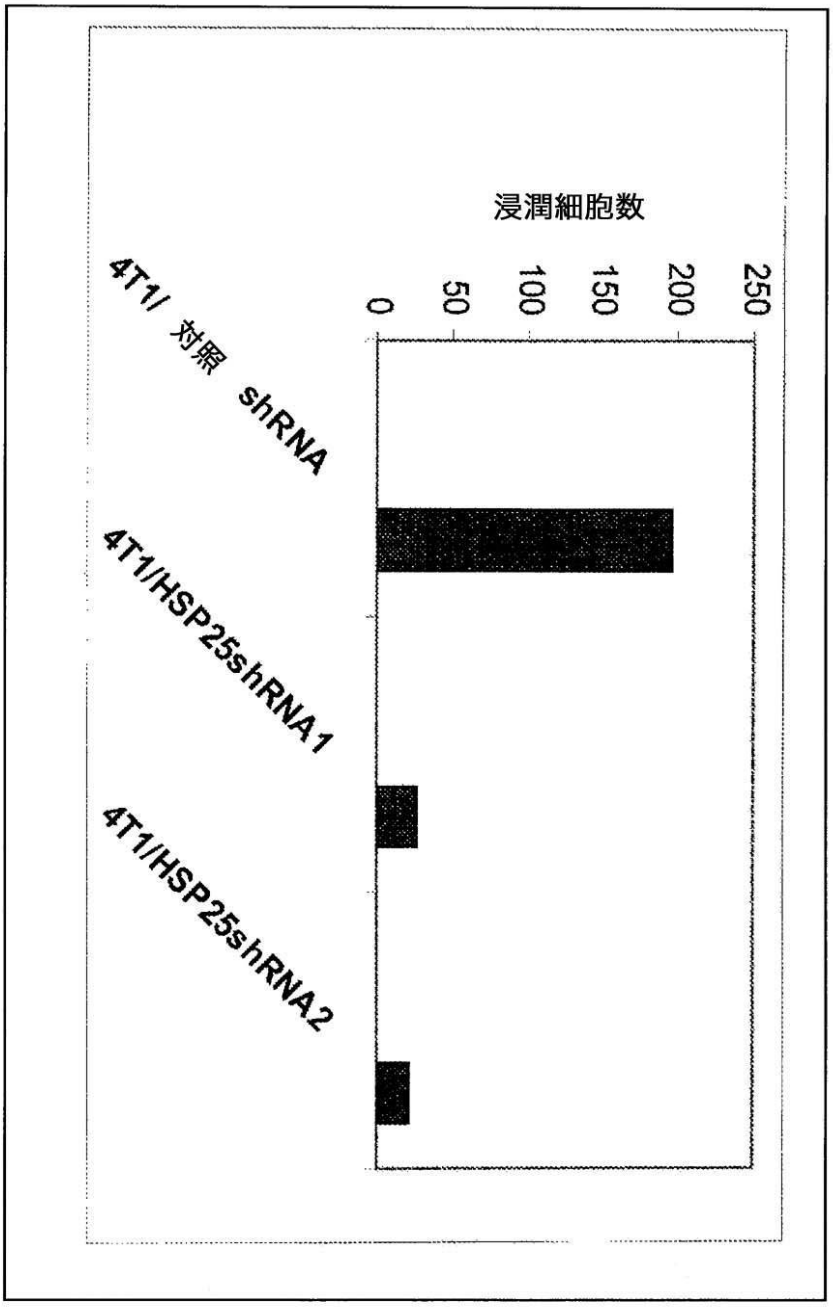
【図３】


4T1/ 対照 IshRNA
4T1/HSP25shRNA1
4T1/HSP25shRNA2
細胞数 (x10^6)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
1
2
3
4
日数

【図４】


腫瘍体積 (mm)
160.00
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
14 20 21 22 23 24 25 27 28 30
日数
4T1/ 対照 shRNA
4T1/HSP25shRNA1
4T1/HSP25shRNA2

【図７】




【配列表】
2010536380000001.app

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/US2008/073872**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

*C12N 15/09(2006.01)i, C07H 21/02(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC C12N 15/09 C07H 21/02

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 practicable, search terms used)

eKIPASS(KIPO internal), PubMed(NCBI), JPO, USPTO, Google

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X<br>A | Tuschl T. and Borkhardt A. 'Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy.' Mol Interv. Vol. 2(3), pp. 158-67, Jun. 2002.<br>See Abstract, Fig. 2 | 1-4, 7-24<br>5, 6, 25-28 |
| X<br>A | KR10-2002-0093009 A (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH and MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) DECEMBER 12, 2002.<br>See Abstract, Fig. 11, Page 11-12 | 1-4, 7-24<br>5, 6, 25-28 |
| X<br>A | Herborth J. at al. 'Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing.' Antisense Nucleic Acid Drug Dev. Vol. 13(2), pp. 83-105, April 2003.<br>See Abstract, Pages 83-86 | 1-4, 7-24<br>5, 6, 25-28 |
| X<br>A | Catalog # VEC-pRT-0002, Laboratory Protocol for pSUPER.retro.puro by DNAengine Co.(Seattle, USA) 'pSUPER RNAi System; A Vector System for Expression of Short Interfering RNA', May 1, 2003. | 1-4, 7-24<br>5, 6, 25-28 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 |
|---|---|
| 06 MARCH 2009 (06.03.2009) | **06 MARCH 2009 (06.03.2009)** |

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer
PARK, Yeong-Gwan
Telephone No. 82-42-481-8407

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
**PCT/US2008/073872**

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| KR 10-2002-0093009 A | 12.12.2002 | AT 373724 T | 15.10.2007 |
| | | AU 2001-249622 B2 | 07.06.2007 |
| | | AU 2001-49622 A1 | 15.10.2001 |
| | | AU 4962201 A | 15.10.2001 |
| | | BR 0107536 A | 02.03.2004 |
| | | BR 0115814 A | 23.03.2004 |
| | | CA 2404890 A1 | 11.10.2001 |
| | | CA 2429814 A1 | 06.06.2002 |
| | | CN 1568373 A | 19.01.2005 |
| | | CZ 20031839 A3 | 15.10.2003 |
| | | DE 60130583 D1 | 31.10.2007 |
| | | EP 1309726 A2 | 14.05.2003 |
| | | EP 1407044 A2 | 14.04.2004 |
| | | EP 1407044 B1 | 19.09.2007 |
| | | EP 1873259 A1 | 02.01.2008 |
| | | EP 1309726 A2 | 14.05.2003 |
| | | EP 1407044 B1 | 19.09.2007 |
| | | ES 2215494 T1 | 16.10.2004 |
| | | HU 0302557 A2 | 28.10.2003 |
| | | IL 151928 D0 | 10.04.2003 |
| | | IL 155991 D0 | 23.12.2003 |
| | | JP 2003-529374 T | 07.10.2003 |
| | | JP 2004-526422 T | 02.09.2004 |
| | | JP 2007-111053 A | 10.05.2007 |
| | | KR 10-2004-0012686 A | 11.02.2004 |
| | | PA 03004836 A | 08.09.2005 |
| | | NO 20032464 A | 21.07.2003 |
| | | NZ 522045 A | 31.05.2007 |
| | | NZ 525888 A | 28.04.2006 |
| | | PL 365784 A1 | 10.01.2005 |
| | | TR 200401292 T3 | 21.07.2004 |
| | | US 2002-0086356 A1 | 04.07.2002 |
| | | US 2002-086356 A1 | 04.07.2002 |
| | | US 2003-0108923 A1 | 12.06.2003 |
| | | US 2003-108923 A1 | 12.06.2003 |
| | | US 2004-0229266 A1 | 18.11.2004 |
| | | US 2004-0259247 A1 | 23.12.2004 |
| | | US 2004-0259248 A1 | 23.12.2004 |
| | | US 2004-229266 A1 | 18.11.2004 |
| | | US 2004-259247 A1 | 23.12.2004 |
| | | US 2004-259248 A1 | 23.12.2004 |
| | | US 2005-0026278 A1 | 03.02.2005 |
| | | US 2008-0132461 A1 | 05.06.2008 |
| | | US 2008-0269147 A1 | 30.10.2008 |
| | | US 7056704 B2 | 06.06.2006 |
| | | US 7078196 B2 | 18.07.2006 |
| | | WO 01-75164 A2 | 11.10.2001 |
| | | WO 01-75164 A3 | 27.02.2003 |
| | | WO 02-44321 A2 | 06.06.2002 |
| | | WO 02-44321 A3 | 23.10.2003 |
| | | ZA 200303929 A | 19.07.2004 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ　5/10* | *(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/00　１０１ | |
| *Ａ６１Ｋ　31/7105* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/7105 | |
| *Ａ６１Ｋ　9/127* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 9/127 | |
| *Ａ６１Ｐ　35/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 35/00 | |
| *Ａ６１Ｐ　35/04* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 35/04 | |
| *Ａ６１Ｋ　48/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 48/00 | |

(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,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

(74)代理人　100102897
弁理士　池田　幸弘
(74)代理人　100088926
弁理士　長沼　暉夫
(74)代理人　100097870
弁理士　梶原　斎子
(74)代理人　100140556
弁理士　新村　守男
(74)代理人　100114719
弁理士　金森　久司
(74)代理人　100143258
弁理士　長瀬　裕子
(74)代理人　100124969
弁理士　井上　洋一
(74)代理人　100132492
弁理士　弓削　麻理
(74)代理人　100163485
弁理士　渡邉　義敬
(72)発明者　アセア、アレクサンダー
アメリカ合衆国、テキサス、ベルトン、ペコス　トレイル　５０２

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 CA02 DA02 EA04 FA02 GA11 HA17
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA23 CA24 CA44
4C076 AA19 CC27
4C084 AA13 MA24 NA14 ZB262
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA24 NA14 ZB26