

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7237009号

(P7237009)

(45)発行日 令和5年3月10日(2023.3.10)

(24)登録日 令和5年3月2日(2023.3.2)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/7125(2006.01)

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 K 9/127(2006.01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/19 (2006.01)

A 6 1 K 9/19

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K 47/54

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

請求項の数 24 (全48頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-556836(P2019-556836)

(86)(22)出願日 平成30年4月19日(2018.4.19)

(65)公表番号 特表2020-517632(P2020-517632
A)

(43)公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/028259

(87)国際公開番号 WO2018/195249

(87)国際公開日 平成30年10月25日(2018.10.25)

審査請求日 令和3年4月9日(2021.4.9)

(31)優先権主張番号 62/487,292

(32)優先日 平成29年4月19日(2017.4.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 518130059

バイオ - パス ホールディングス, イン
コーポレイテッドアメリカ合衆国 テキサス 77401,
ベルエアー, ベルエアー プールバード
4710, スイート 210

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 S T A T 3 阻害のための P - エトキシ核酸

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オリゴヌクレオチドの集団、リン脂質および界面活性剤を含む組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、S T A T 3 ポリヌクレオチド遺伝子産物にハイブリダイズし、前記集団のオリゴヌクレオチドが、リン酸骨格結合を介して一緒に連結されたヌクレオチド分子からなり、各オリゴヌクレオチドの前記リン酸骨格結合の60%~75%が、P - エトキシ骨格結合であり、各オリゴヌクレオチドの前記リン酸骨格結合の25%~40%が、ホスホジエステル骨格結合であり、前記集団の前記オリゴヌクレオチドが、S T A T 3 タンパク質の発現を阻害し、前記集団の前記オリゴヌクレオチドが、1.8~3.0ヌクレオチドの範囲のサイズを有する、組成物。

【請求項 2】

前記集団のオリゴヌクレオチドが、配列番号1~4のいずれか1つに従う配列を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記ホスホジエステル骨格結合が、各オリゴヌクレオチド全体に分散している、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記ホスホジエステル骨格結合が、各オリゴヌクレオチドの一部内にクラスタ化されていない、請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

オリゴヌクレオチドの前記集団が、前記集団の前記オリゴヌクレオチドに存在する P - エトキシ骨格結合およびホスホジエステル骨格結合の数に関して不均一である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

オリゴヌクレオチドの前記集団が、単一の種のオリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

オリゴヌクレオチドの前記集団が、少なくとも 2 つの種のオリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

オリゴヌクレオチドの前記集団が、前記集団の前記オリゴヌクレオチド間のホスホジエステル骨格結合の分散に関して不均一である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記集団の前記オリゴヌクレオチドが、デオキシリボースヌクレオチド分子からなる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記界面活性剤がポリソルベート 20 である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチドおよびリン脂質が、オリゴヌクレオチド - 脂質複合体を形成する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記リン脂質が、帯電していないか、または生理学的 pH で中性の電荷を有する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記リン脂質が、中性リン脂質である、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記中性リン脂質が、ホスファチジルコリンである、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記中性リン脂質が、ジオレオイルホスファチジルコリンである、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記リン脂質およびオリゴヌクレオチドが、5 : 1 ~ 100 : 1 のモル比で存在する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記オリゴヌクレオチド - 脂質複合体が、リボソームの集団としてさらに定義される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記リボソームの少なくとも 90 % が、直径 5 ミクロン未満である、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物が、凍結乾燥される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 20】

細胞中の STAT3 タンパク質の発現レベルを低減させるための、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物であって、前記細胞が前記組成物と接触させられることを特徴とする、組成物。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 22】

がんまたは自己免疫疾患を有する対象を治療するための、請求項 21 に記載の薬学的組

10

20

30

40

50

成物。

【請求項 2 3】

前記がんが、非小細胞肺癌、膵臓腺がん、乳がん、前立腺がん、黒色腫、結腸がん、白血病、リンパ腫、膠芽腫、骨肉腫、口腔がん、卵巣がん、子宮がん、骨がん、脳がん、前立腺がん、腎臓がん、胃がん、食道がん、直腸がん、膀胱がん、精巣がん、または肝臓がんである、請求項 2 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 4】

前記自己免疫疾患が、紅斑性狼瘡、脊椎関節症、シェーグレン病、クローン病、真性糖尿病、多発性硬化症、または関節リウマチである、請求項 2 2 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2017年4月19日に出願された米国仮特許出願第62/487,292号の優先権利益を主張し、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

本発明は、概して、医学の分野に関する。より具体的には、STAT3ポリヌクレオチド遺伝子産物にハイブリダイズするP-エトキシオリゴヌクレオチドのリポソーム製剤に関し、さらにより具体的には、STAT3遺伝子の高い発現または活性の増加を有する固形がんおよび血液がんの治療における医薬におけるそのような製剤の作製および使用方法

20

【0 0 0 3】

関連技術の説明

多くの遺伝子は、前悪性および進行した難治性腫瘍におけるがん細胞の持続的な増殖および生存に関与する。シグナル伝達兼転写活性化因子(STAT)シグナル伝達経路のメンバーは、この能力において重要な役割を果たすことが知られている。STAT3は、すべての固形腫瘍および血液がんの約70%で過剰に活性化される転写因子である。活性化されると、STAT3は、サイトゾルから核に移行して、細胞の生存、成長、移動、浸潤、転移、および血管新生などの広範な細胞プロセスを調節するために、サバイビン、Bcl-X_L、Mcl-1、c-Myc、サイクリンD1、p21、サイクリンE、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9および-2、ならびにVEGFを含む多数の遺伝子の発現を駆動する(Wu et al., 2011, Hardee et al., 2013)。さらに、STAT3は、IL-3、IL-6、およびNF- κ Bカスケードを含むがんの進行に関与するいくつかの重要なシグナル伝達経路を調節しつつ、それ自体の活性化を強化するフィードバック経路も活性化する(Hardee et al., 2013)。

30

【0 0 0 4】

STAT3は、通常、健康な細胞のサイトゾルでは低レベルで発現するが、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)を含むがんでは、頻繁に過剰発現および活性化(リン酸化および核に局在化)する。DLBCLでは、それは、疾患のABCサブタイプで最も頻繁に活性化され、GCサブタイプDLBCLではあまり頻繁に活性化されない(Wu et al., 2011, Hardee et al., 2013, Scuto et al., 2011)。重要なことに、STAT3の過剰発現、過剰リン酸化、および核局在化は、STAT3の発現レベルがより低い腫瘍と比較して、これらの腫瘍の全体的な予後不良と相関している。さらに、過剰に活性化されたSTAT3を持つ腫瘍は、ABCサブタイプDLBCLでNF- κ Bシグナル伝達の増加も示し、STAT3シグナル伝達がDLBCLの進行における役割を果たすことを示唆している。

40

【0 0 0 5】

STAT3タンパク質の性質により、それをアンチセンスおよび他の遺伝子ノックダウンアプローチの理想的な標的にする、そのシグナル伝達活性を直接標的とする小分子の設計は、困難である。しかしながら、STAT3が非常に多くの形態のがんおよび他の疾患

50

で果たす中心的な役割を考えると、STAT3の活性化、二量体化、DNA結合をブロックするための、または酵素の不活性化を加速させるためのペプチド、デコイオリゴヌクレオチド、および小分子ベースの化合物を設計する試みが数多く行われている(Miklosy et al., 2013)。代替のアプローチとして、複数のグループが、様々な成功を伴って、LCIおよび他の疾患におけるSTAT3のリン酸化および活性化をブロックするためのヤヌスキナーゼ(JAK)阻害剤の開発に取り組んでいる(Amin et al., 2003、Fagard et al., 2013)。

【0006】

STAT3を特異的に標的とするアプローチでは、STAT3 mRNAのタンパク質への翻訳をブロックするために、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)およびsiRNAベースの技術を介してRNase H機構によりRNA分解を誘発するために、オリゴヌクレオチドの使用を伴う。これらの戦略は、毒性を低減するための方法を提供し、耐性変異への適応性がより低い。STAT3に対するこのアプローチでのいくつかの試みは成功していない。したがって、疾患の治療に使用するためのSTAT3を標的とする改善されたアンチセンス組成物が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

STAT3によって制御される広範囲のがん細胞において成長阻害および/またはアポトーシスを誘導する組成物および方法が、本明細書で提供される。STAT3タンパク質の発現は、中性リポソームと組み合わせてSTAT3をコードするポリヌクレオチドを標的とする非毒性のヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチドによって防止され、このため、利用可能なSTAT3タンパク質のプールを排除する。

【0008】

一実施形態では、STAT3ポリヌクレオチド遺伝子産物にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの集団を含む組成物が、提供される。いくつかの態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、リン酸骨格結合を介して一緒に連結されたヌクレオシド分子からなり、各オリゴヌクレオチド中のリン酸骨格結合のうちの少なくとも1つは、P-エトキシ骨格結合であり、各オリゴヌクレオチド中のリン酸骨格結合の80%以下は、P-エトキシ骨格結合である。いくつかの態様では、各オリゴヌクレオチド中のリン酸骨格結合のうちの少なくとも1つは、ホスホジエステル骨格結合である。いくつかの態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、配列番号1~4のいずれか1つに従う配列を含む。いくつかの態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、配列番号1に従う配列を含む。いくつかの態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、配列番号2に従う配列を含む。いくつかの態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、配列番号3に従う配列を含む。いくつかの態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、配列番号4に従う配列を含む。様々な態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、STAT3の発現を阻害する。いくつかの態様では、組成物は、凍結乾燥される。

【0009】

いくつかの態様では、リン酸骨格結合の10%~80%は、P-エトキシ骨格結合であり、リン酸骨格結合の20%~80%は、P-エトキシ骨格結合であり、リン酸骨格結合の30%~80%は、P-エトキシ骨格結合であり、リン酸骨格結合の40%~80%は、P-エトキシ骨格結合であり、リン酸骨格結合の50%~80%は、P-エトキシ骨格結合であるか、またはリン酸骨格結合の60%~70%は、P-エトキシ骨格結合であるか、またはその中で誘導可能な任意の範囲である。いくつかの態様では、リン酸骨格結合の20%~90%は、ホスホジエステル骨格結合であり、リン酸骨格結合の20%~80%は、リン酸ジエステル骨格結合であり、リン酸骨格結合の20%~70%は、リン酸ジエステル骨格結合であり、リン酸骨格結合の20%~60%は、ホスホジエステル骨格結合であり、リン酸骨格結合の20%~50%は、ホスホジエステル骨格結合であるか、またはリン酸骨格結合の30%~40%は、ホスホジエステル骨格結合であるか、またはそ

の中で誘導可能な任意の範囲である。様々な態様では、リン酸骨格結合のうちの少なくとも 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、または 95 %、またはその中の任意の値は、P - エトキシ骨格結合である。様々な態様では、リン酸骨格結合の最大 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、または 95 %、またはその中の任意の値は、ホスホジエステル骨格結合である。ある特定の態様では、ホスホジエステル骨格結合は、オリゴヌクレオチド全体に分散している。したがって、オリゴヌクレオチドは、キメラ分子ではない。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格結合を含まない。

10

【0010】

いくつかの態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、7 ~ 30 ヌクレオチドの範囲のサイズを有する。ある特定の態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、12 ~ 25 ヌクレオチドの範囲のサイズを有する。様々な態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 ヌクレオチドのサイズを有する。サイズ範囲は、集団内のオリゴヌクレオチドの平均サイズであってもよい。

【0011】

いくつかの態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 ヌクレオチドの平均サイズを有し、これらは、それぞれ、各オリゴヌクレオチド中のリン酸骨格結合の 5、6、7、8、8、9、10、11、11、12、13、14、15、15、16、17、18、19、20、20、21、22、23、または 24 以下は、P - エトキシ骨格結合である。いくつかの態様では、集団のオリゴヌクレオチドは、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 ヌクレオチドの平均サイズを有し、これらは、それぞれ、各オリゴヌクレオチド中のリン酸骨格結合の少なくとも 2、2、2、2、3、3、3、3、4、4、4、4、4、5、5、5、5、5、5、6、6、6、6、または 6 は、ホスホジエステル骨格結合である。例として、集団のオリゴヌクレオチドは、18 ヌクレオチドの平均サイズを有してもよく、各オリゴヌクレオチド中のリン酸骨格結合のうちの 14 個以下は、P - エトキシ骨格結合であり、集団のオリゴヌクレオチドは、20 ヌクレオチドの平均サイズを有してもよく、各オリゴヌクレオチド中のリン酸骨格結合のうちの 16 個以下は、P - エトキシ骨格結合であり、集団のオリゴヌクレオチドは、25 ヌクレオチドの平均サイズを有してもよく、各オリゴヌクレオチド中のリン酸骨格結合のうちの 20 個以下は、P - エトキシ骨格結合であるか、または、集団のオリゴヌクレオチドは、30 ヌクレオチドの平均サイズを有してもよく、各オリゴヌクレオチド中のリン酸骨格結合のうちの 24 個以下は、P - エトキシ骨格結合である。

20

30

【0012】

いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドの集団は、単一の種のオリゴヌクレオチドを含む。他の態様では、オリゴヌクレオチドの集団は、少なくとも 2 つの種のオリゴヌクレオチドを含む。単一の種のオリゴヌクレオチドは、同じヌクレオチド配列を有してもよいが、分子内の異なる位置に P - エトキシ結合を有するか、またはそれを欠いている。したがって、集団は、ヌクレオチド配列に関して均一であり得、集団のオリゴヌクレオチド間のホスホジエステル骨格結合の分布に関して不均一であり得る。さらに、集団は、集団のオリゴヌクレオチド間の P - エトキシ骨格結合およびホスホジエステル骨格結合の数に関して不均一であり得る。非限定的な例として、集団のオリゴヌクレオチドの第 1 の部分は、70 % の P - エトキシ結合と 30 % のホスホジエステル結合を有し得るが、集団のオリゴヌクレオチドの第 2 の部分は、60 % の P - エトキシ結合と 40 % のホスホジエステル

40

50

結合を有し得る。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドの集団は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA (miRNA)、または piwiRNA (piRNA) を含む。

【 0 0 1 3 】

様々な態様では、組成物は、リン脂質をさらに含む。いくつかの態様では、リン脂質およびオリゴヌクレオチドは、約 5 : 1 ~ 約 100 : 1 のモル比で存在する。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドおよびリン脂質は、例えば、リポソーム複合体などのオリゴヌクレオチド - 脂質複合体を形成する。いくつかの態様では、リポソームのうちの少なくとも 75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % は、直径 5 ミクロン未満である。いくつかの態様では、リポソームのうちの少なくとも 75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % のリポソームは、直径 4 ミクロン未満である。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドの集団は、リポソームの集団に組み込まれる。

10

【 0 0 1 4 】

いくつかの態様では、リン脂質は、帯電していないか、または生理学的 pH で中性の電荷を有する。いくつかの態様では、リン脂質は、中性リン脂質である。特定の態様では、中性リン脂質は、ホスファチジルコリンである。特定の態様では、中性リン脂質は、ジオレオイルホスファチジルコリンである。いくつかの態様では、リン脂質は、本質的にコレステロールを含まない。

20

【 0 0 1 5 】

一実施形態では、本実施形態のオリゴヌクレオチドおよびリン脂質の組成物と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物が提供される。いくつかの態様では、組成物は、化学療法剤をさらに含む。

【 0 0 1 6 】

一実施形態では、細胞を本実施形態の薬学的組成物と接触させることを含む、治療上有効量のオリゴヌクレオチドを細胞に送達するための方法が提供される。いくつかの態様では、本方法は、過形成、がん、自己免疫疾患、または感染症を治療する方法である。

30

【 0 0 1 7 】

一実施形態では、がん、自己免疫疾患、または感染症を有する対象を治療するための方法であって、対象に、治療上有効量の本実施形態の薬学的組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの態様では、対象は、ヒトである。いくつかの態様では、がんは、膀胱、血液、リンパ腫、脾臓、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、胃、頭頸部、腎臓、肝臓、肺、前立腺、皮膚、精巣、舌、卵巣、または子宮がんである。様々な態様では、がんは、肺腺がん、白血病、例えばびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫などのリンパ腫、または膵管腺がんである。いくつかの態様では、自己免疫疾患は、全身性紅斑性狼瘡、脊椎関節症、シェーグレン病、クローン病、真性糖尿病、多発性硬化症、または関節リウマチである。いくつかの態様では、感染症は、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス感染症、または寄生虫感染症である。いくつかの態様では、組成物は、皮下、静脈内、または腹腔内に投与される。いくつかの態様では、方法は、対象に、少なくとも第 2 の抗がん療法を施すことをさらに含む。いくつかの態様では、第 2 の抗がん療法は、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、免疫療法、またはサイトカイン療法である。いくつかの態様では、免疫療法は、チェックポイント遮断療法である。いくつかの態様では、組成物の投与は、患者における STAT3 タンパク質の発現を低減させる。

40

【 0 0 1 8 】

オリゴヌクレオチドは、標的タンパク質をコードする核酸分子または標的タンパク質の発現を調節する核酸分子に特異的にハイブリダイズするアンチセンス核酸分子を含む。「特異的ハイブリダイゼーション」とは、アンチセンス核酸分子が標的核酸分子にハイブリ

50

ダイズし、その発現を調節することを意味する。好ましくは、「特異的ハイブリダイゼーション」は、他の遺伝子または転写物が影響を受けないことも意味する。オリゴヌクレオチドは、一本鎖核酸であり得、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個以上の核酸塩基を含み得る。特定の態様では、オリゴヌクレオチドは、15～30、19～25、20～23、または21個の連続した核酸塩基を含むことができる。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、がん性または前がん性または過形成の哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）の成長を促進する遺伝子の翻訳を阻害する。オリゴヌクレオチドは、細胞のアポトーシスを誘導し、および/またはがん遺伝子または他の標的遺伝子の翻訳を阻害し得る。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド成分は、単一の種のオリゴヌクレオチドを含む。他の態様では、オリゴヌクレオチド成分は、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドの2つ、3つ、4つまたはそれ以上の種を含む。組成物は、本発明の脂質成分またはリポソームに組み込まれていてもいなくてもよい化学療法剤または他の抗がん剤をさらに含んでもよい。さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチド成分は、リポソームまたは脂質成分内に組み込まれる。

10

【0019】

「捕獲する」、「カプセル化する」、および「組み込む」とは、対象となる薬剤との関連またはその周囲での溶液への自由拡散の障害を形成する脂質またはリポソームを指し、例えば、リポソームは、脂質層内に、または脂質層の内部または間の水性区画内に薬剤をカプセル化し得る。ある特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体に含まれる。薬学的に許容される担体は、ヒト対象または患者への投与用に製剤化され得る。

20

【0020】

ある特定の実施形態では、脂質成分は、中性リン脂質または正味中性電荷を含むため、本質的に中性電荷を有する。ある特定の態様では、中性リン脂質は、DOPC、卵ホスファチジルコリン（「EPC」）、ジラウロイルホスファチジルコリン（「DLPC」）、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（「DPPC」）、ジステアロイルホスファチジルコリン（「DSPC」）、ジリノレオイルホスファチジルコリン、1,2-ジアラチドイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（「DAPC」）、1,2-ジエイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（「DEPC」）、1-ミリスチル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（「MPPC」）、1-パルミトイル-2-ミリスチルホスファチジルコリン（「PMP C」）、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン（「SPPC」）、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（「SPPC」）、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン（「POPC」）、1-オレオイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（「OPPC」）、またはリゾホスファチジルコリンなどのホスファチジルコリンであり得る。他の態様では、中性リン脂質は、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（「DOPE」）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（「DSPE」）、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン（「DMPE」）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（「DPPE」）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（「POPE」）、またはリゾホスファチジルエタノールアミンなどのホスファチジルエタノールアミンであり得る。ある特定の実施形態では、リン脂質成分は、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれ以上の種類またはタイプの中性リン脂質を含むことができる。他の実施形態では、リン脂質成分は、2、3、4、5、6、またはそれ以上の種類またはタイプの中性リン脂質を含むことができる。

30

40

【0021】

ある特定の実施形態では、脂質成分は、正に帯電した脂質および負に帯電した脂質を含むため、本質的に中性の電荷を有し得る。脂質成分は、中性に帯電した脂質（複数可）またはリン脂質（複数可）をさらに含んでもよい。正に帯電した脂質は、正に帯電したリン

50

脂質であり得る。負に帯電した脂質は、負に帯電したリン脂質であり得る。負に帯電したリン脂質は、ジミリスチルホスファチジルセリン（「DMPS」）、ジパルミチルホスファチジルセリン（「DPPS」）、または脳ホスファチジルセリン（「BPS」）などのホスファチジルセリンであり得る。負に帯電したリン脂質は、ジラウロイルホスファチジルグリセロール（「DLPG」）、ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）、ジパルミチルホスファチジルグリセロール（「DPPG」）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（「DSPG」）、またはジオレオイルホスファチジルグリセロール（「DOPG」）などのホスファチジルグリセロールであり得る。ある特定の実施形態では、組成物は、コレステロールまたはポリエチレングリコール（PEG）をさらに含む。他の実施形態では、組成物は、本質的にコレステロールを含まない。特定の
10 実施形態では、リン脂質は、天然に存在するリン脂質である。他の実施形態では、リン脂質は、合成リン脂質である。

【0022】

脂質材料が実質的に帯電していない限り、リボソームは、1つ以上のリン脂質で作製され得る。本組成物が、アニオン性およびカチオン性のリン脂質およびコレステロールを実質的に含まないことが重要である。適切なリン脂質には、ホスファチジルコリンおよびこの分野の当業者によく知られている他のものが含まれる。

【0023】

本発明の別の態様は、細胞を本発明の中性脂質組成物と接触させることを含む、オリゴヌクレオチドを細胞に送達するための方法を含む。この方法は、有効量の本発明の組成物を提供するであろう。有効量は、対象において細胞、状態、または疾患状態を減衰し、遅延させ、低減させ、または排除する治療成分の量である。細胞は、ヒトなどの対象または患者に含まれていてもよい。この方法は、がんまたは他の過形成状態を治療する方法をさらに含み得る。がんは、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、胃腸、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、リンパ節、肺、鼻咽頭、首、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、卵巣、または子宮に由来するものであってもよい。ある特定の実施形態では、この方法は、非がん性疾患または過形成状態を治療する方法をさらに含む。細胞は、前がん性またはがん性細胞であってよい。ある特定の実施形態では、組成物および方法は、細胞の成長を阻害し、細胞のアポトーシスを誘導し、および/またはがん遺伝子の翻訳を阻害する。オリゴヌクレオチドは、がん性細胞で過剰発現される遺伝子の翻訳を阻害することができる。
20 30

【0024】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、さらなる療法を対象に施すことをさらに含む。さらなる療法は、化学療法剤（例えば、パクリタキセルまたはドセタキセル）、外科的処置、放射線療法、および/または遺伝子療法を施すことを含んでもよい。ある特定の態様では、化学療法剤は、ドセタキセル、パクリタキセル、シスプラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソ尿素、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリコマイシン、マイトマイシン、エトポシド（VP16）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタビエン、ナベルピン、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチナ、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキサート、またはこれらの組み合わせである。ある特定の
40 実施形態では、化学療法剤は、ドセタキセルまたはパクリタキセルなどのタキサンである。化学療法剤は、本発明の中性脂質組成物に対して、その前に、間に、後に、またはこれらの組み合わせで送達することができる。化学療法剤は、中性脂質組成物の0、1、5、10、12、20、24、30、48、または72時間以上以内に送達することができる。中性脂質組成物、第2の抗がん療法、または中性脂質組成物と抗がん療法の両方は、腫瘍内、静脈内、腹腔内、皮下、経口、またはそれらの様々な組み合わせによって施すことができる。

【0025】

10

20

30

40

50

本明細書で議論される任意の実施形態は、本発明の任意の方法または組成物に関して実施することができ、逆もまた同様であると企図される。さらに、本発明の組成物は、本発明の方法を達成するために使用することができる。

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用する場合、特定の成分に関して「本質的に含まない」は、特定の成分が意図的に組成物に配合されておらず、かつ／または汚染物質としてまたは微量でのみ存在することを意味するために本明細書で使われる。したがって、組成物のいかなる意図しない汚染物質から生じる特定の成分の総量は、0 . 0 5 % を大きく下回り、好ましくは0 . 0 1 % を下回る。特定の成分のいかなる量も標準的分析方法では検出することができない組成物であることが、最も好ましい。

10

【 0 0 2 7 】

本明細書で使われる場合、「a」または「an」は、1つ以上を意味してもよい。特許請求の範囲（複数可）内で本明細書で使われる場合、「含む」という単語と併せて使われる場合、「a」または「an」という単語は、1つ以上を意味してもよい。

【 0 0 2 8 】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替のみを指すこと、または代替が相互に排他的であることが明示的に示されない限り、「および／または」を意味するために使用されるが、本開示は代替のみおよび「および／または」を指すという定義を支持する。本明細書で使われる場合、「別の」は、少なくとも第2の、またはそれ以上を意味し得る。

20

【 0 0 2 9 】

本出願を通して、「約」という用語は、値がデバイスの誤差の固有の変動、値を決定するために用いられる方法の固有の変動、または試験対象間に存在する変動を含むことを示すために使用される。

【 0 0 3 0 】

本発明の他の目的、特性、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の趣旨および範囲内の様々な変更および修正が、この詳細な説明から当業者に明らかになるため、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の好適な実施形態を示すが、例示説明のみの目的でのみ与えられることが理解されるべきである。本発明は、例えば以下の項目を提供する。

30

（項目1）

オリゴヌクレオチドの集団を含む組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、S T A T 3 ポリヌクレオチド遺伝子産物にハイブリダイズし、前記集団のオリゴヌクレオチドが、リン酸骨格結合を介して一緒に連結されたヌクレオシド分子からなり、各オリゴヌクレオチドの前記リン酸骨格結合のうちの少なくとも1つが、P - エトキシ骨格結合であり、各オリゴヌクレオチドの前記リン酸骨格結合の80%以下が、P - エトキシ骨格結合である組成物。

（項目2）

前記集団のオリゴヌクレオチドが、配列番号1～4のいずれか1つに従う配列を含む、項目1に記載の組成物。

40

（項目3）

前記集団のオリゴヌクレオチドが、配列番号1に従う配列を含む、項目2に記載の組成物。

（項目4）

前記集団のオリゴヌクレオチドが、配列番号2に従う配列を含む、項目2に記載の組成物。

（項目5）

前記集団のオリゴヌクレオチドが、配列番号3に従う配列を含む、項目2に記載の組成物。

（項目6）

前記集団のオリゴヌクレオチドが、配列番号4に従う配列を含む、項目2に記載の組成物。

（項目7）

前記リン酸骨格結合の50%～80%が、P - エトキシ骨格結合である、項目1に記載の

50

組成物。

(項目 8)

前記リン酸骨格結合の 60% ~ 75% が、P - エトキシ骨格結合である、項目 7 に記載の組成物。

(項目 9)

前記リン酸骨格結合の 20% ~ 50% が、ホスホジエステル骨格結合である、項目 1 に記載の組成物。

(項目 10)

前記リン酸骨格結合の 25% ~ 40% が、ホスホジエステル骨格結合である、項目 9 に記載の組成物。

(項目 11)

前記ホスホジエステル骨格結合が、各オリゴヌクレオチド全体に分散している、項目 1 に記載の組成物。

(項目 12)

前記ホスホジエステル骨格結合が、各オリゴヌクレオチドの一部内にクラスタ化されていない、項目 1 に記載の組成物。

(項目 13)

オリゴヌクレオチドの前記集団が、前記集団の前記オリゴヌクレオチドに存在する P - エトキシ骨格結合およびホスホジエステル骨格結合の数に関して不均一である、項目 1 に記載の組成物。

(項目 14)

前記集団の前記オリゴヌクレオチドが、18 ~ 30 ヌクレオチドの範囲のサイズを有する、項目 1 に記載の組成物。

(項目 15)

前記集団の前記オリゴヌクレオチドが、18 ヌクレオチドの平均サイズを有し、各オリゴヌクレオチド中の前記リン酸骨格結合のうちの 14 個以下が、P - エトキシ骨格結合である、項目 14 に記載の組成物。

(項目 16)

前記集団の前記オリゴヌクレオチドが、20 ヌクレオチドの平均サイズを有し、各オリゴヌクレオチド中の前記リン酸骨格結合のうちの 16 個以下が、P - エトキシ骨格結合である、項目 14 に記載の組成物。

(項目 17)

前記集団の前記オリゴヌクレオチドが、25 ヌクレオチドの平均サイズを有し、各オリゴヌクレオチド中の前記リン酸骨格結合のうちの 20 個以下が、P - エトキシ骨格結合である、項目 14 に記載の組成物。

(項目 18)

前記集団の前記オリゴヌクレオチドが、30 ヌクレオチドの平均サイズを有し、各オリゴヌクレオチド中の前記リン酸骨格結合のうちの 24 個以下が、P - エトキシ骨格結合である、項目 14 に記載の組成物。

(項目 19)

オリゴヌクレオチドの前記集団が、単一の種のオリゴヌクレオチドを含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 20)

オリゴヌクレオチドの前記集団が、少なくとも 2 つの種のオリゴヌクレオチドを含む、項目 1 に記載の組成物。

(項目 21)

オリゴヌクレオチドの前記集団が、前記集団の前記オリゴヌクレオチド間のホスホジエステル骨格結合の分散に関して不均一である、項目 1 に記載の組成物。

(項目 22)

前記集団の前記オリゴヌクレオチドが、STAT3 タンパク質の発現を阻害する、項目 1

10

20

30

40

50

に記載の組成物。

(項目23)

リン脂質をさらに含み、前記オリゴヌクレオチドおよびリン脂質が、オリゴヌクレオチド-脂質複合体を形成する、項目1に記載の組成物。

(項目24)

前記リン脂質が、帯電していないか、または生理学的pHで中性の電荷を有する、項目23に記載の組成物。

(項目25)

前記リン脂質が、中性リン脂質である、項目24に記載の組成物。

(項目26)

前記中性リン脂質が、ホスファチジルコリンである、項目25に記載の組成物。

(項目27)

前記中性リン脂質が、ジオレオイルホスファチジルコリンである、項目25に記載の組成物。

(項目28)

前記リン脂質が、本質的にコレステロールを含まない、項目23に記載の組成物。

(項目29)

前記リン脂質およびオリゴヌクレオチドが、約5:1~約100:1のモル比で存在する、項目23に記載の組成物。

(項目30)

前記オリゴヌクレオチド-脂質複合体が、リボソームの集団としてさらに定義される、項目23に記載の組成物。

(項目31)

前記リボソームの少なくとも90%が、直径5ミクロン未満である、項目30に記載の組成物。

(項目32)

オリゴヌクレオチドの前記集団が、リボソームの前記集団に組み込まれている、項目30に記載の組成物。

(項目33)

前記組成物が、凍結乾燥される、項目1に記載の組成物。

(項目34)

細胞中のSTAT3タンパク質の発現レベルを低減させる方法であって、前記細胞を項目1に記載の組成物と接触させることを含む、方法。

(項目35)

項目23に記載の組成物と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

(項目36)

化学療法剤をさらに含む、項目35に記載の組成物。

(項目37)

がんまたは自己免疫疾患を有する対象を治療する方法であって、前記対象に、治療上有効量の項目35に記載の薬学的組成物を投与することを含む、方法。

(項目38)

前記対象が、ヒトである、項目37に記載の方法。

(項目39)

前記がんが、非小細胞肺癌、膵臓腺がん、乳がん、前立腺がん、黒色腫、結腸がん、白血病、リンパ腫、膠芽腫、骨肉腫、口腔がん、卵巣がん、子宮がん、骨がん、脳がん、前立腺がん、腎臓がん、胃がん、食道がん、直腸がん、膀胱がん、精巣がん、または肝臓がんである、項目37に記載の方法。

(項目40)

前記自己免疫疾患が、紅斑性狼瘡、脊椎関節症、シェーグレン病、クローン病、真性糖尿病、多発性硬化症、または関節リウマチである、項目37に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 4 1)

前記組成物が、皮下、静脈内、または腹腔内に投与される、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記対象に、少なくとも第 2 の抗がん療法を施すことをさらに含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記第 2 の抗がん療法が、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、免疫療法、抗ウイルス療法、免疫抑制療法、抗菌療法、抗寄生虫療法、抗真菌療法、またはサイトカイン療法である、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記組成物の投与が、前記患者の S T A T 3 タンパク質の発現を低減させる、項目 3 7 に記載の方法。

【 0 0 3 1 】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含まれている。本発明は、本明細書に提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の 1 つ以上を参照することにより、よりよく理解され得る。

【図面の簡単な説明】**【 0 0 3 2 】**

【図 1】リボソーム S T A T 3 アンチセンスによる S T A T 3 の発現の阻害。リボソーム S T A T 3 アンチセンスが S T A T 3 の発現を阻害する能力は、2 つの肺腺がん細胞株、H 1 9 7 5 および H C C 8 2 7 で試験した。配列番号 4 に対応するリボソーム S T A T 3 アンチセンス (1 8 0 μ g / m L) または同等量の空のリボソームを、各細胞株とともに 4 日間インキュベートした。

【図 2 A】リボソーム S T A T 3 アンチセンスによる非小細胞肺がん細胞の生存の阻害。リボソーム S T A T 3 アンチセンスが非小細胞肺がん細胞の生存を阻害する能力は、3 つの肺腺がん細胞株：H 1 9 7 5 (図 2 A)、H C C 8 2 7 (図 2 B)、および H 3 5 8 (図 2 C) で試験した。配列番号 1 ~ 4 のうちの 1 つに対応するリボソーム S T A T 3 アンチセンスを、各細胞株とともに 4 日間インキュベートした。

【図 2 B】同上

【図 2 C】同上

【図 3 A】リボソーム S T A T 3 アンチセンスによる白血病およびリンパ腫細胞の生存の阻害。リボソーム S T A T 3 アンチセンスが白血病細胞の増殖を阻害する能力は、3 つのヒト白血病細胞株 (K - 5 6 2、M V 4 - 1 1、および K a s u m i - 1) (図 3 A) および 5 つのヒトリンパ腫細胞株 (D O H H - 2、S U - D H L - 4、S U - D H L - 6、S U - D H L - 1 0、および R L) (図 3 B) で試験した。配列番号 4 に対応するリボソーム S T A T 3 アンチセンスを、各細胞株とともに 4 日間インキュベートした。

【図 3 B】同上

【発明を実施するための形態】**【 0 0 3 3 】**

本発明は、脂質組成物、ある特定の態様では、約ゼロの正味電荷を有する脂質組成物、すなわち中性脂質組成物を介して細胞に抗 S T A T 3 オリゴヌクレオチド (例えば、遺伝子発現の阻害剤) を送達するための組成物および方法を提供する。ある特定の実施形態では、脂質組成物は、非荷電リボソームである。これらの方法は、がんまたは自己免疫疾患を治療するのに効果的に使用することができる。

【 0 0 3 4 】**I . 脂質およびリボソーム**

「リボソーム」は、本明細書において、脂質二重層を有する脂質含有小胞、ならびにアンチセンスオリゴヌクレオチドを捕捉または組み込むことができる他の脂質担体粒子を意味するために使用される。したがって、リボソームは、封入された脂質二重層または凝集体の発生によって形成される、様々な単層、多層、および多小胞の脂質ビヒクルを含む一

10

20

30

40

50

般的用語である。さらに、リボソームは、未定義のラメラ構造を有し得る。リボソームは、リン脂質二重層膜と内部水性媒体を持つ小胞構造を有するものとして特徴付けることができる。多層リボソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。リン脂質が過剰な水溶液に懸濁すると、自然に形成される。脂質成分は、閉じた構造、および捕獲水、および脂質二重層の間の溶解した溶質の形成前に自己再編成を受ける (G h o s h a n d B a c h h a w a t , 1 9 9 1) 。しかしながら、本発明は、正常な小胞構造よりも溶液中に異なる構造を有する組成物も含む。例えば、脂質はミセル構造をとることができるか、単純に、脂質分子の不均一な凝集体として存在することができる。

【 0 0 3 5 】

リボソームは、様々な薬物を病変組織に送達するための担体であるナノ粒子の形態である。最適ナリボソームサイズは、標的組織に依存する。腫瘍組織において、血管系は不連続であって、ポアサイズは100～780nmで変化する (S i w a k e t a l . , 2 0 0 2) 。比較により、正常な血管内皮におけるポアサイズは、ほとんどの組織において2nm未満であり、毛細血管後細静脈においては6nmである。負に帯電したリボソームは、中性または正に帯電したリボソームよりも循環からより急速に除去されと考えられていた。しかしながら、最近の研究は、負に帯電した脂質のタイプが網状 - 内皮系 (R E S) によるリボソームの取り込み速度に影響することを示している。例えば、立体的に遮蔽されていない負に荷電した脂質 (ホスファチジルセリン、ホスファチジル酸、およびホスファチジルグリセロール) を含有するリボソームは、中性リボソームよりもさらに急速に除去される。興味深いことに、カチオン性リボソーム (1 , 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン [D O T A P]) およびカチオン性 - リボソーム - D N A 複合体は、アニオン性、中性、または立体的に安定化された中性リボソームよりもエンドサイトーシスを介して脈管形成血管の内皮細胞によってより貪欲に結合され、内部化される (T h u r s t o n e t a l . , 1 9 9 8 、 K r a s n i c i e t a l . , 2 0 0 3) 。カチオン性リボソームは、腫瘍細胞との表面相互作用が静電的に導かれた結合部位バリア効果を生じ、送達系と腫瘍スフェロイドとのさらなる会合を阻害するため、腫瘍細胞にとって理想的な送達ビヒクルではない場合がある (K o s t a r e l o s e t a l . , 2 0 0 4) 。しかしながら、中性リボソームは、良好な腫瘍内貫入を有するように見える。特定のリボソーム製剤に伴う毒性も懸念されている。カチオン性リボソームは、反応性酸素中間体の放出を促進することによって用量依存性毒性および肺炎を誘導し、この効果は、D O T A P などの一価カチオン性リボソームよりも多価カチオン性リボソームでより顕著である (D o k k a e t a l . , 2 0 0 0) 。中性および負のリボソームは、肺毒性を呈するようには見えない (G u i t t i e r r e z - P u e n t e e t a l . , 1 9 9 9) 。カチオン性リボソームは、核酸を効果的に取り込みつつ、場合により、それらの安定な細胞内性質、および結果として核酸内容物を放出できないことのため、インビボ遺伝子の下方調節について制限された成功を有した。中性特性、およびインビボにおけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの送達での成功のため、中性の電荷を有する脂質または中和された電荷を有する脂質組成物、例えば、1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D O P C) が、本明細書で使用される。

【 0 0 3 6 】

本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドを脂質および/またはリボソームと会合させるための方法および組成物を提供する。オリゴヌクレオチドは、リボソームの水性内部に組み込まれ、リボソームの脂質二重層内に散在させ、リボソームとオリゴヌクレオチドの両方と会合する連結分子を介してリボソームに付着させ、リボソームに捕獲し、リボソームと複合化し、脂質を含有する溶液に分散させ、脂質と混合し、脂質と組み合わせ、脂質中の懸濁液として含有し、ミセルとともに含有させ、またはそれと複合体化させるか、あるいはさもなければ脂質と会合させることができる。本明細書で提供されるリボソームまたはリボソーム / オリゴヌクレオチド会合組成物は、溶液中のいずれの特定の構造にも限定されない。例えば、それらは、二重層構造中に、ミセルとして、または「崩壊した」構造にて存在し得る。それらはまた、単純に溶液中に散在し、

場合により、サイズまたは形状が均一ではない凝集体を形成する。

【0037】

A. 脂質

脂質は、天然に存在するか、または合成であり得る脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質中で天然に存在する脂肪液滴、ならびに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、およびアルデヒドのような長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体を含む当業者に周知の化合物のクラスを含む。その例は、脂質 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC) である。

【0038】

本発明の脂質組成物は、リン脂質を含み得る。ある特定の実施形態では、単一の種類またはタイプのリン脂質を、リボソームなどの脂質組成物の構築に使用することができる。他の実施形態では、1を超える種類またはタイプのリン脂質を使用することができる。

【0039】

リン脂質は、グリセロリン脂質およびある特定のスフィンゴ脂質を含む。リン脂質としては、ジオレオイルホスファチジルコリン (「DOPC」)、卵ホスファチジルコリン (「EPC」)、ジラウリロイルホスファチジルコリン (「DLP C」)、ジミリスチルホスファチジルコリン (「DMP C」)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (「DSPC」)、ジリノレオイルホスファチジルコリン、1, 2 - ジアラチドイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (「DAPC」)、1, 2 - ジエイコセノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (「DEPC」)、1 - ミリスチル - 2 - パルミトイルホスファチジルコリン (「MPPC」)、1 - パルミトイル - 2 - ミリスチルホスファチジルコリン (「PMP C」)、1 - ステアロイル - 2 - パルミトイルホスファチジルコリン (「SPPC」)、パルミトイルエオイルホスファチジルコリン (「POPC」)、1 - オレオイル - 2 - パルミトイルホスファチジルコリン (「OPPC」)、ジラウリロイルホスファチジルグリセロール (「DLPG」)、ジミリスチルホスファチジルグリセロール (「DMPG」)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (「DPPG」)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (「DSPG」)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (「DOPG」)、ジミリスチルホスファチジン酸 (「DMPA」)、ジパルミトイルホスファチジン酸 (「DPPA」)、ジステアロイルホスファチジン酸 (「DSPA」)、ジオレオイルホスファチジン酸 (「DOPA」)、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン (「DMPE」)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (「DPPE」)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (「DSPE」)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (「DOPE」)、パルミトイルオエオイルホスファチジレトリアナノールアミン (「POPE」)、ジミリスチルホスファチジルセリン (「DMP S」)、ジパルミトイルホスファチジルセリン (「DPP S」)、脳ホスファチジルセリン (「BPS」)、ジステアロイルスフィンゴミエリン (「DSSP」)、脳スフィンゴミエリン (「BSP」)、ジパルミトイルスフィンゴミエリン (「DPS P」)、リゾホスファチジルコリン、およびリゾホスファチジルエタノールアミンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0040】

リン脂質は、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、およびホスファチジルエタノールアミンを含む。ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルコリンは生理学的条件下 (すなわち、約 pH 7) で非荷電であるため、これらの化合物は中性リボソームを生じさせるのに特に有用であり得る。ある特定の実施形態では、リン脂質 DOPC は、非荷電リボソームまたは脂質組成物を生成するために使用される。ある特定の実施形態では、リン脂質ではない脂質 (例えば、コレステロール) を使用することもできる。

【0041】

リン脂質は、天然または合成源からのものであってもよい。しかしながら、卵または大

10

20

30

40

50

豆ホスファチジルコリン、脳ホスファチジン酸、脳または植物ホスファチジルイノシトール、心臓カルジオリピン、および植物または細菌ホスファチジルエタノールアミンのような天然源からのリン脂質は、得られたリポソームの不安定性および漏出をもたらし得るため、一次ホスファチドとして（すなわち、全ホスファチド組成物の50%以上を構成する）ある特定の実施形態で用いられない。

【0042】

B. 中性リポソーム

本明細書で使用する、「中性リポソームまたは脂質組成物」あるいは「非荷電リポソームまたは脂質組成物」は、本質的に中性の正味電荷（実質的に非荷電）を生じる1つ以上の脂質を有するリポソームまたは脂質組成物として定義される。ある特定の実施形態では、中性リポソームまたは脂質組成物は、それ自体が中性であるほとんどの脂質および/またはリン脂質を含み得る。ある特定の実施形態では、両親媒性脂質を組み込むか、またはそれを用いて、中性リポソームまたは脂質組成物を生成することができる。例えば、中性リポソームは、それらの電荷が互いに実質的に相殺するように、正および負に帯電した脂質を組み合わせることにより生成することができ、それにより本質的に中性の正味の電荷が生じる。「本質的に中性」または「本質的に非荷電」とは、所与の集団（例えば、リポソームの集団）内の、もしあれば、少数の脂質が、別の成分の反対の電荷によって相殺されない電荷を含むことを意味する（例えば、成分の10%未満、より好ましくは5%未満、最も好ましくは1%未満の非相殺電荷を含む）。本発明のある特定の実施形態では、組成物の脂質成分が本質的に中性であるが、リポソームの形態ではない、組成物を調製することができる。

【0043】

リポソームのサイズは、合成方法によって異なる。水溶液に懸濁されたリポソームは、一般に、球形の小胞の形状であり、脂質二重層分子の1つ以上の同心円状の層を有することができる。各層は、式XYによって表される分子の平行アレイからなり、Xは親水性部分であり、Yは疎水性部分である。水性懸濁液において、同心層は、親水性部分が水相と接触したままにある傾向があり、疎水性領域が自己会合する傾向があるように配置される。例えば、水相がリポソーム内に存在する場合、脂質分子は、配置XY-YXのラメラとして既知の二重層を形成することができる。脂質の凝集体は、1より多い脂質分子の親水性および疎水性部分が相互に会合するときに形成され得る。これらの凝集体のサイズと形状は、溶媒の性質、および溶液中の他の化合物の存在などの多くの異なる変数に依存する。

【0044】

本発明の範囲内のリポソームは、既知の実験室技術、例えば、Bangham et al. (1965)の方法（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）、Gregoriadis (1979)の方法（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）、Deamer and Uster (1983)の方法（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）、およびSzoka and Papahadjopoulos (1978)によって記載される逆相蒸発方法に従って調製することもできる。前述の方法は、水性材料を捕獲するそれらの各能力、およびそれらの各水性空間対脂質比率が異なる。

【0045】

ある特定の実施形態では、中性リポソームを用いて、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドを送達することができる。中性リポソームは、単一遺伝子の翻訳の抑制に向けられた単一の種のオリゴヌクレオチドを含有することができるか、あるいは中性リポソームは、複数の遺伝子の翻訳の抑制に向けられた複数の種のオリゴヌクレオチドを含有することができる。さらに、中性リポソームは、オリゴヌクレオチドに加えて化学療法剤を含有することもできる。したがって、ある特定の実施形態では、化学療法剤およびオリゴヌクレオチドは、同じまたは別個の組成物で細胞（例えば、ヒト対象におけるがん性細胞）に送達することができる。

【0046】

乾燥した脂質または凍結乾燥したリポソームは脱水し、適切な溶媒（例えば、DPBS

10

20

30

40

50

またはH e p e s 緩衝液)を用いて適切な濃度で再構成することができる。次いで、混合物をボルテックスミキサー中で激しく振盪してもよい。リポソームは、適切な総リン脂質濃度(例えば、約10~200mM)で再懸濁させることができる。カプセル化されていないオリゴヌクレオチドは、29,000gでの遠心分離によって除去し、リポソームペレットを洗浄することができる。あるいは、カプセル化されていないオリゴヌクレオチドは、過剰の溶媒に対して透析することによって除去することができる。カプセル化されたオリゴヌクレオチドの量は、標準的な方法に従って決定することができる。

【0047】

II. 遺伝子発現の阻害

阻害性オリゴヌクレオチドは、細胞中での遺伝子の転写または翻訳を阻害することができる。オリゴヌクレオチドは、5~50以上のヌクレオチド長であり得、ある特定の実施形態では、7~30ヌクレオチド長であり得る。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチド長であり得る。オリゴヌクレオチドは、核酸および/または核酸類似体を含んでもよい。典型的には、阻害性オリゴヌクレオチドは、細胞内での単一遺伝子の翻訳を阻害する。しかしながら、ある特定の実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、細胞内の1より多い遺伝子の翻訳を阻害し得る。

【0048】

オリゴヌクレオチド内では、オリゴヌクレオチドの成分は、全体にわたって同じタイプまたは均質である必要はない(例えば、オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドおよび核酸またはヌクレオチド類似体を含んでもよい)。本発明の特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、単一の核酸または核酸類似体のみを含んでもよい。阻害性オリゴヌクレオチドは、相補的核酸とハイブリダイズして、二本鎖構造を形成する、その間のすべての範囲を含む、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30個以上の連続した核酸塩基を含み得る。

【0049】

III. 核酸

本発明は、中性リポソームを介したオリゴヌクレオチドの送達のための方法および組成物を提供する。オリゴヌクレオチドは核酸から構成されるため、核酸に関連する方法(例えば、核酸の生成、核酸の修飾など)もまた、オリゴヌクレオチドに関して使用してもよい。

【0050】

「核酸」という用語は、当該技術分野で周知である。本明細書で使用される、「核酸」は、一般に、核酸塩基を含む、DNA、RNA、またはその誘導体もしくは類似体の分子(すなわち、鎖)を指す。これらの定義は、一本鎖または二本鎖核酸を指す。二本鎖核酸は、十分に相補的な結合によって形成され得るが、いくつかの実施形態では、二本鎖核酸は、部分的または実質的相補的結合によって形成され得る。本明細書で使用される場合、一本鎖核酸は、接頭辞「s s」によって示され得、二本鎖核酸は、接頭辞「d s」によって示され得る。

【0051】

A. 核酸塩基

本明細書で使用される、「核酸塩基」は、例えば、少なくとも1つの天然に存在する核酸(すなわちDNAおよびRNA)に見られる天然に存在する核酸塩基(すなわち、A、T、G、C、またはU)、ならびにそのような核酸塩基の天然のまたは非天然の誘導体(複数可)および類似体などの複素環塩基を指す。核酸塩基は、一般に、天然に存在する核酸塩基の対合のために置き換えることができる様式で、少なくとも1つの天然に存在する核酸塩基で1つ以上の水素結合を形成することができる(例えば、AとT、GとC、およびAとUの水素結合)。核酸塩基は、本明細書に記載されているか、または当業者に知られている任意の化学的または天然の合成方法を使用して、ヌクレオシドまたはヌクレ

10

20

30

40

50

オチドに含まれてもよい。

【 0 0 5 2 】

「プリン」および/または「ピリミジン」核酸塩基（複数可）は、天然に存在するプリンおよび/またはピリミジン核酸塩基、ならびにその誘導体（複数可）および類似体（複数可）も包含し、アルキル、カルボキシアルキル、アミノ、ヒドロキシル、ハロゲン（すなわち、フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード）、チオール、またはアルキルチオール部分のうちの1つ以上によって置換されたプリンまたはピリミジンを含むが、これらに限定されない。好ましいアルキル（例えば、アルキル、カルボキシアルキルなど）部分は、約1個、約2個、約3個、約4個、約5個から約6個の炭素原子を含む。プリンまたはピリミジンの他の非限定的な例には、デアザプリン、2, 6 - ジアミノプリン、5 - フルオロウラシル、キサンチン、ヒポキサンチン、8 - ブロモグアニン、8 - クロログアニン、ブロモチリン、8 - アミノグアニン、8 - ヒドロキシグアニン、8 - メチルグアニン、8 - チオグアニン、アザグアニン、2 - アミノプリン、5 - エチルシトシン、5 - メチルシトシン、5 - ブロモウラシル、5 - エチルウラシル、5 - ヨードウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ブロピルウラシル、チオウラシル、2 - メチルアデニン、メチルチオアデニン、N, N - ジメチルメチルアデニン、アザアデニン、8 - ブロモアデニン、8 - ヒドロキシアデニン、6 - ヒドロキシアミノプリン、6 - チオプリン、4 - (6 - アミノヘキシル/シトシン) などが含まれる。プリンおよびピリミジン誘導体または類似体には、（略語/修飾された塩基の説明）：a c 4 c / 4 - アセチルシチジン、M a m 5 s 2 U / 5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウリジン、C h m 5 u / 5 - (カルボキシヒドロキシルメチル) ウリジン、M a n q / ベータ, D - マンノシルケオシン、C m / 2' - O - メチルシチジン、M c m 5 s 2 u / 5 - メトキシカルボニルメチル - 2 - チオウリジン、C m n m 5 s 2 u / 5 - カルボキシメチルアミノ - メチル - 2 - チオウリジン、M c m 5 u / 5 - メトキシカルボニルメチルウリジン、C m n m 5 u / 5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン、M o 5 u / 5 - メトキシウリジン、D / ジヒドロウリジン、M s 2 i 6 a、2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデノシン、F m / 2' - O - メチルプソイドウリジン、M s 2 t 6 a / N - ((9 - ベータ - D - リボフラノシル - 2 - メチルチオプリン - 6 - イル) カルバモイル) スレオニン、G a l q / ベータ, D - ガラクトシルケオシン、M t 6 a / N - ((9 - ベータ - D - リボフラノシルプリン - 6 - イル) N - メチル - カルバモイル) スレオニン、G m / 2' - O - メチルグアノシン、M v / ウリジン - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、I / イノシン、o 5 u / ウリジン - 5 - オキシ酢酸 (v)、I 6 a / N 6 - イソペンテニルアデノシン、O s y w / ワイブトキソシン、m 1 a / 1 - メチルアデノシン、P / プソイドウリジン、m 1 f / 1 - メチルプソイドウリジン、Q / ケオシン、m 1 g / 1 - メチルグアノシン、s 2 c / 2 - チオシチジン、m 1 I / 1 - メチルイノシン、s 2 t / 5 - メチル - 2 - チオウリジン、m 2 2 g / 2, 2 - ジメチルグアノシン、s 2 u / 2 - チオウリジン、m 2 a / 2 - メチルアデノシン、s 4 u / 4 - チオウリジン、m 2 g / 2 - メチルグアノシン、T / 5 - メチルウリジン、m 3 c / 3 - メチルシチジン、t 6 a / N - ((9 - ベータ - D - リボフラノシルプリン - 6 - イル) カルバモイル) スレオニン、m 5 c / 5 - メチルシチジン、T m / 2' - O - メチル - 5 - メチルウリジン、m 6 a / N 6 - メチルアデノシン、U m / 2' - O - メチルウリジン、m 7 g / 7 - メチルグアノシン、Y w / ワイブトシン、M a m 5 u / 5 - メチルアミノメチルウリジン、またはX / 3 - (3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル) ウリジン、(a c p 3) u が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 3 】

B . ヌクレオシド

本明細書で使用する、「ヌクレオシド」とは、核酸塩基リンカー部分に共有結合した核酸塩基を含む個々の化学単位を指す。「核酸塩基リンカー部分」の非限定的な例は、デオキシリボース、リボース、アラビノース、または5 - 炭素糖の誘導体もしくは類似体を含むが、これらに限定されない、5 - 炭素原子を含む糖（すなわち「5 - 炭素糖」）である。5 - 炭素糖の誘導体または類似体の非限定的な例には、2' - フルオロ - 2' - デオキシ

リボースまたは炭素環式糖が含まれ、炭素は糖環において酸素原子と置き換えられる。本明細書で使用される、「部分」とは、一般に、より大きな化学的構造または分子構造のより小さな化学的成分または分子成分を指す。

【0054】

核酸塩基リンカー部分への核酸塩基の異なるタイプの共有結合（複数可）は、当該技術分野で知られている。非限定的な例として、プリン（すなわち、AまたはG）を含むヌクレオシドまたは7-デアザプリン核酸塩基は、典型的には、5-炭素糖の1'位へのプリンまたは7-デアザプリンの9位の共有結合を含む。別の非限定的な例では、ピリミジン核酸塩基（すなわち、C、T、またはU）を含むヌクレオシドは、典型的には、5-炭素糖の1'位へのピリミジンの1位の共有結合を含む（Kornberg and Baker, 1992）。

10

【0055】

C. ヌクレオチド

本明細書で使用する、「ヌクレオチド」とは、「骨格結合」をさらに含むヌクレオシドを指す。骨格結合は、一般に、ヌクレオチドを含む別の分子または別のヌクレオチドにヌクレオチドを共有結合させて、核酸を形成する。天然に存在するヌクレオチドの「骨格結合」は、典型的には、5-炭素糖に共有結合しているリン酸部分（例えば、ホスホジエステル骨格結合）を含む。骨格部分の結合は、典型的には、5-炭素糖の3'位または5'位のいずれかで起こる。しかしながら、特にヌクレオチドが天然に存在する5-炭素糖またはリン酸部分の誘導体または類似体を含む場合に、他のタイプの結合が当該技術分野で知られている。

20

【0056】

D. 核酸類似体

核酸は、天然に存在する核酸に存在し得る核酸塩基、核酸塩基リンカー部分、および/または骨格結合の誘導体もしくは類似体を含むか、またはそれらから完全に構成され得る。本明細書で使用する、「誘導体」とは、天然に存在する分子の化学的に修飾または変更された形態を指し、一方、「模倣体」または「類似体」という用語は、天然に存在する分子または部分に構造的に似ていても似ていなくてもよいが、同様な機能を保有する分子を指す。核酸塩基、ヌクレオシド、およびヌクレオチド類似体または誘導体は、当該技術分野で周知である。

30

【0057】

ヌクレオシド、ヌクレオチド、または5-炭素糖および/もしくは骨格結合誘導体または類似体を含む核酸の非限定的な例には、dsDNAとで三重らせんを形成し、および/またはdsDNAの発現を防止するプリン誘導体を含むオリゴヌクレオチドを記載する米国特許第5,681,947号；特に、蛍光核酸プローブとして用いるためのDNAまたはRNAに見られるヌクレオシドの蛍光類似体を取り込む核酸を記載する米国特許第5,652,099号および同第5,763,167号；増強されたヌクレアーゼ安定性を保有するピリミジン環上の置換を持つオリゴヌクレオチド類似体を記載する米国特許第5,614,617号；核酸検出で用いる修飾された5-炭素糖（すなわち、修飾された2'-デオキシフラノシル部分）を持つオリゴヌクレオチド類似体を記載する米国特許第5,670,663号、同第5,872,232号および同第5,859,221号；ハイブリダイゼーションアッセイで用いることができる水素以外の置換基で4'位が置換された少なくとも1つの5-炭素糖部分を含むオリゴヌクレオチドを記載する米国特許第5,446,137号；3'-5'骨格結合を持つデオキシリボヌクレオチド、および2'-5'骨格結合を持つリボヌクレオチドの両方を持つオリゴヌクレオチドを記載する米国特許第5,886,165号；骨格結合の3'位の酸素が炭素によって置き換えられて、核酸のヌクレアーゼ耐性を増強させる修飾された骨格結合を記載する米国特許第5,714,606号；ヌクレアーゼ耐性を増強する1つ以上の5'メチレンホスホネート骨格結合を含有するオリゴヌクレオチドを記載する米国特許第5,672,697号；ヌクレアーゼ安定性を高め、薬物または検出部分を送達する能力を提供するためのオリゴヌクレオチドの2'炭素への薬

40

50

物または標識を含み得る置換基部分の結合を記載する米国特許第 5, 466, 786 号および同第 5, 792, 847 号；細胞への取り込み、ヌクレアーゼ耐性、および標的 RNA へのハイブリダイゼーションを強化するための隣接する 5 - 炭素糖部分の 4' 位と 3' 位を結合した 2 または 3 炭素骨格結合を有するオリゴヌクレオチド類似体を記載する米国特許第 5, 223, 618 号；核酸ハイブリダイゼーションプローブとして有用な少なくとも 1 つのスルファメートまたはスルファミド骨格結合を含むオリゴヌクレオチドを記載する米国特許第 5, 470, 967 号；改良されたヌクレアーゼ耐性、細胞取り込みおよび RNA 発現の調節で用いられるホスホジエステル骨格結合を置き換える 3 または 4 原子骨格結合部分を持つオリゴヌクレオチドを記載する米国特許第 5, 378, 825 号、同第 5, 777, 092 号、同第 5, 623, 070 号、同第 5, 610, 289 号、および同第 5, 602, 240 号；それらの膜浸透性および安定性を増強するためのオリゴヌクレオチドの 2' - O 位置に結合された疎水性担体薬物を記載する米国特許第 5, 858, 988 号；DNA または RNA への強化されたハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼに対する増強された安定性を保有する 5' 末端でアントラキノンにコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドを記載する米国特許第 5, 214, 136 号；DNA が、増強されたヌクレアーゼ耐性、結合親和性および RNAase H を活性化する能力のための 2' - デオキシ - エリスロ - ペントフラノシルヌクレオチドを含む PNA - DNA - PNA キメラを記載する米国特許第 5, 700, 922 号；DNA に連結されて DNA - RNA ハイブリッドを形成する RNA を記載する米国特許第 5, 708, 154 号；1 つ以上の核酸塩基がポリエーテル骨格のキラル炭素原子に結合しているポリエーテル核酸を記載する米国特許第 5, 908, 845 号；核酸塩基部分、5 - 炭素糖ではない核酸塩基リンカー部分（例えば、アザ窒素原子、アミドおよび / またはウレイドテザー）、および / またはリン酸骨格結合ではない骨格結合を含む 1 つ以上のヌクレオチドまたはヌクレオシド（例えば、アミノエチルグリシン、ポリアミド、ポリエチル、ポリチオアミド、ポリスルフィンアミド、またはポリスルホンアミド骨格結合）を含むペプチド核酸（PNA またはペプチド系核酸類似体；または PENAM）を記載する米国特許第 5, 786, 461 号、同第 5, 891, 625 号、同第 5, 786, 461 号、同第 5, 773, 571 号、同第 5, 766, 855 号、同第 5, 736, 336 号、同第 5, 719, 262 号、同第 5, 714, 331 号、同第 5, 539, 082 号、および WO 92 / 20702；ならびに疎水性のヌクレアーゼ耐性 P - エトキシ骨格結合が記載する米国特許第 5, 855, 911 号、に記載されるものが含まれる。

【0058】

核酸類似体の他の改変および使用は、当該技術分野で知られており、これらの技術およびタイプの核酸類似体を本発明で 사용할 ことが予想される。

【0059】

E. 核酸の調製

核酸は、化学合成、酵素生産、または生物学的生産など、当業者に知られている任意の技術によって作成することができる。合成核酸（例えば、合成オリゴヌクレオチド）の非限定的な例には、ホスホトリエステル、ホスファイトまたはホスホルアミダイト化学を用いるインピトロ化学的合成、および EP 266, 032（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される、固相技術によって、あるいは Froehler et al.（1986）および米国特許第 5, 705, 629 号（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）によって記載される、デオキシヌクレオシド H - ホスホネート中間体を介して作成される核酸を含む。本発明の方法において、1 種以上のオリゴヌクレオチドを使用することができる。オリゴヌクレオチド合成の様々なメカニズムは、例えば、米国特許第 4, 659, 774 号、同第 4, 816, 571 号、同第 5, 141, 813 号、同第 5, 264, 566 号、同第 4, 959, 463 号、同第 5, 428, 148 号、同第 5, 554, 744 号、同第 5, 574, 146 号、同第 5, 602, 244（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【0060】

F . 核酸の精製

核酸は、ポリアクリルアミドゲル、塩化セシウム遠心分離勾配で、または当業者に既知のいずれかの他の手段によって精製することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる S a m b r o o k ら（ 2 0 0 1 ）を参照のこと）。

【 0 0 6 1 】

ある特定の実施形態では、本発明は、単離された核酸である核酸に関する。本明細書で使用される、「単離された核酸」という用語は、1 つ以上の細胞の全ゲノムおよび転写された核酸の大部分を含まずに単離されている、またはそうでなければそれを含まない核酸分子（例えば、RNA または DNA 分子）を指す。ある特定の実施形態では、「単離された核酸」とは、例えば、脂質またはタンパク質、小さな生体分子などの高分子などの細胞成分またはインビトロ反応成分の大部分を含まずに単離されている、またはそうでなければそれを含まない核酸を指す。

10

【 0 0 6 2 】

G . ハイブリダイゼーション

本明細書で使用される、「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイズする」、または「ハイブリダイズすることができる」とは、二本鎖もしくは三本鎖分子または部分的な二本鎖もしくは三本鎖の性質を有する分子を形成することを意味すると理解される。本明細書で使用される、「アニールする」という用語は、「ハイブリダイズする」と同義語である。

【 0 0 6 3 】

20

本明細書で使用される、「ストリンジェントな条件（複数可）」または「高ストリンジェンシー」は、相補配列（複数可）を含有する 1 つ以上の核酸鎖の間またはその内でのハイブリダイゼーションを可能にする条件であるが、ランダム配列のハイブリダイゼーションを排除する。ストリンジェントな条件は、核酸と標的鎖の間の、もしあれば、ほとんどミスマッチを許容しない。そのような条件は、当業者に周知であり、高い選択性を必要とする適用で好ましい。

【 0 0 6 4 】

ストリンジェントな条件は、約 5 0 ~ 約 7 0 の温度における約 0 . 0 2 M ~ 約 0 . 1 5 M の NaCl によって提供されるような低塩および / または高温条件を含み得る。所望のストリンジェンシーの温度およびイオン強度は、部分的には、特定の核酸（複数可）の長さ、標的配列（複数可）の長さおよび核酸塩基含有量、核酸（複数可）の電荷組成、およびハイブリダイゼーション混合物におけるホルムアミド、塩化テトラメチルアンモニウム、または他の溶媒（複数可）の存在または濃度によって決定されることが理解される。

30

【 0 0 6 5 】

これらの範囲、組成、およびハイブリダイゼーションについての条件は、非限定的な例としてのみ言及されており、特定のハイブリダイゼーション反応についての所望のストリンジェンシーは、1 つ以上の陽性または陰性対照との比較によってしばしば経験的に決定されることも理解される。考えられる適用に応じて、ハイブリダイゼーションの種々の条件を使用して、標的配列に向けての核酸の種々の程度の選択性を達成することが好ましい。非限定的な例において、ストリンジェントな条件下で核酸にハイブリダイズしない関連標的核酸の同定または単離は、低温および / または高イオン強度におけるハイブリダイゼーションによって達成され得る。そのような条件は、「低ストリンジェンシー」または「低ストリンジェンシー条件」と呼ばれ、低ストリンジェンシーの非限定的な例には、約 2 0 ~ 約 5 0 の温度範囲にて約 0 . 1 5 M ~ 約 0 . 9 M NaCl で行われるハイブリダイゼーションが含まれる。もちろん、特定の適用に適合させるために低または高ストリンジェンシー条件をさらに修飾するのは当業者の範囲内のことである。

40

【 0 0 6 6 】

I V . リポソーム P - エトキシアンチセンス製剤の製造方法

標的 mRNA の特定の領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド（オリゴ）は、内在性遺伝子の発現を阻害するために使用されてきた。アンチセンスオリゴヌクレオチド

50

が標的 mRNA に結合するとき、DNA-RNA ハイブリッドが形成される。このハイブリッド形成は、mRNA の翻訳を阻害し、そのため、コードされたタンパク質の発現を阻害する。タンパク質が細胞の生存に不可欠である場合、その発現の阻害は細胞死を引き起こし得る。したがって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、抗がんおよび抗ウイルス療法の有用なツールであり得る。

【 0 0 6 7 】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して遺伝子発現を阻害する際の主な障害は、細胞の不安定性、低い細胞取り込み、および不十分な細胞間送達である。天然のホスホジエステルは、ヌクレアーゼ加水分解に耐性がなく、したがって、任意の阻害効果が観察される前に、高濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドが必要である。このヌクレアーゼ加水分解の問題を克服するために P - エトキシなどの修飾ホスホジエステル類似体が作製されてきたが、問題に対する満足のいく解決策を提供していない。

【 0 0 6 8 】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞取り込みは少ない。この問題を解決するために、リン酸カルシウム沈殿、DEAE - デキストラン媒介、またはエレクトロポレーションなどの物理学的技術は、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増大させるために使用されている。これらの技術は、再現が難しく、インビボでは適用できない。リポフェクチンなどのカチオン性脂質もまた、オリゴヌクレオチドを送達するために使用されている。静電相互作用はカチオン性脂質と負に帯電したオリゴヌクレオチドとの間に形成され、その結果、複合体が標的細胞によって取り込まれる。これらのカチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼ消化から保護せず、細胞膜に有害であるため、これらは、ヌクレアーゼ耐性ホスホロチオエートの送達にのみ有用であるが、ヌクレアーゼ切断可能なホスホジエステルでは有用でない。

【 0 0 6 9 】

調製された別の修飾ホスホジエステル類似体は、P - エトキシである。P - エトキシアンチセンス骨格は、他のアンチセンス類似体について報告されている毒性の一部である出血および補体活性化に悪影響を及ぼさない。P - エトキシオリゴヌクレオチドの修飾は、標的 mRNA へのこれらのオリゴヌクレオチドの結合を妨げないように、リン酸骨格で行われる。P - エトキシオリゴヌクレオチドは、リン酸骨格の非架橋酸素原子にエチル基を付加することにより作製され、このため、これらのオリゴヌクレオチドの非荷電化合物を得る。ヌクレアーゼに対する耐性にもかかわらず、内在化すると、これらのオリゴヌクレオチドがエンドソーム / リソソーム液胞内に隔離されたままになり、標的 mRNA へのアクセスを妨げるため、P - エトキシオリゴヌクレオチドの細胞取り込みおよび細胞内送達は不十分である。

【 0 0 7 0 】

A . P - エトキシアンチセンス製剤

リボソーム P - エトキシアンチセンス製剤は、2 つの c G M P 製品で構成されており、どちらも FDA 承認された放出基準を有する FDA 必須分析証明書を持っている。原料、溶媒、および最終製剤は、本明細書で説明する。製造するとき、製剤は、オリゴヌクレオチド（例えば、P - エトキシアンチセンス原薬）、中性脂質（例えば、D O P C）、および界面活性剤（例えば、ポリソルベート 2 0）の材料を含む、凍結乾燥結晶または琥珀色または白色の粉末である。患者への投与に備えて、生理食塩水をバイアルに加え、その時点で、内部に組み込まれた P - エトキシアンチセンスを用いて、リボソームを形成する。

【 0 0 7 1 】

B . P - エトキシアンチセンス原薬

最終製品の特定の物理学的特性（例えば、生理食塩水中の製剤の溶解性、リボソームへのオリゴの取り込み、およびリボソーム粒子サイズに影響する溶解性と疎水性）は、P - エトキシアンチセンス原薬の製造期間中に所定の P - エトキシおよびホスホジエステルアミダイト原料の混合物を使用して定義することができる。これらの結合でホスホジエステル結合が生じるオリゴヌクレオチドの製造期間中に P - エトキシ骨格群の損失がランダム

10

20

30

40

50

に発生するが、その損失は、オリゴヌクレオチド内で P - エトキシ：ホスホジエステル骨格結合の好ましい比率を生じ得ない。この場合は、P - エトキシとホスホジエステルアミダイト原料の混合物は、P - エトキシ骨格の欠失の期待値を補い、このため、所望の比率のオリゴヌクレオチドを生成する。オリゴヌクレオチドの骨格における P - エトキシ分子の数の増加は、分子の疎水性がより高まり（より大きなリポソーム粒子をもたらす；表 1）、極性がより低くなり、溶解性を低減させる（表 2）。電荷中性の疎水性 P - エトキシ原薬を試験する方法には、オリゴヌクレオチドの長さの分布を決定するための質量分析法および原薬の溶解性を判定するためのアッセイが含まれ、溶解性の実際的な目的は、生理食塩水中に再構成された製品の目視検査である。多数の P - エトキシ骨格結合によりオリゴヌクレオチドの溶解性がより低くなるため、疎水性が高くなりすぎて粒子が形成されるまで、再構成溶液はより白色になる。

10

【 0 0 7 2 】

製剤は、粒子サイズを使用する必要がある、90%の値は、5000nm未満のサイズであり、可溶性であり、これは、ヌクレオチド組成の関数である。例として、オリゴヌクレオチドが18~20ヌクレオチド長である場合、リン酸骨格結合のうちの少なくとも5つは、ホスホジエステル骨格結合でなければならない。このことは、18量体オリゴヌクレオチドからのデータを提供する、以下の表1の実験7~10によって支持されている。オリゴヌクレオチドが25ヌクレオチド長である場合、リン酸骨格結合のうちの少なくとも6つは、ホスホジエステル骨格結合でなければならない。

【 表 1 】

20

表 1. アンチセンス骨格組成によるリポソーム粒子サイズの変動

実験	操作された アンチセン ス骨格	製造後の骨格エチルの欠失		粒径の特徴付け： 累積分布関数		
		主要ピーク ^d	複合欠失 ^e	90%値 (nm) **	50%値 (nm)	300nm 値 (%)
1	3 アミダイト置換	—6	—5. 67	2130	911	15. 30
2	3 アミダイト置換	—6	—5. 67	2420	1004	15. 50
3	3 アミダイト置換	—6	—6. 12	3682	943	15. 50
4	3 アミダイト置換	—7	—6. 66	3805	978	14. 60
5	100%P-エトキシ	—5	—5. 66	3924	976	16. 00
6	2 アミダイト置換	—5	—5. 32	4387	1888	11. 60
7 ^a	100%P-エトキシ	—4	—4. 22	5057	1131	17. 70
8	100%P-エトキシ	—4	—4. 52	5659	1359	10. 00
9 ^b	100%P-エトキシ	—4	—4. 38	7571	1909	2. 60
10 ^c	100%P-エトキシ	—4	—4. 38	7994	1653	14. 40

30

40

** 製剤の放出基準は、リポソーム粒子の90%が5000nm以下である。

a. このロットは、難溶性であるために、具体的には、再構成された溶液中のアンチセンス粒子のために廃棄された。

b. このロットは、DMSOとtBAの量がより少なく、20mLのバイアル中に2mgのアンチセンスが含まれており、これに、リポソームの拡大のため、追加の成分が追加された。

50

- c . このロットは、粒子サイズの放出スペックが衰えたため、放出されなかった。
- d . 主要ピークは、集団のオリゴヌクレオチドにおける最も一般的な p - エトキシ欠失の数を表す。
- e . 複合欠失は、オリゴヌクレオチドの集団における p - エトキシの欠失の平均数を表す。

【表 2】

表 2. アンチセンス骨格組成によるリポソーム粒子の溶解度

実験	操作されたアンチセンス骨格	製造後の骨格エチルの欠失		薬物の溶解度	
		主要ピーク	複合欠失	目視観察**	溶解性評価
1	3 アミダイト置換	—6	—5. 67	脱脂乳溶液	良い
2	3 アミダイト置換	—6	—5. 67	脱脂乳溶液	良い
3	3 アミダイト置換	—6	—6. 12	脱脂乳溶液	良い
4	3 アミダイト置換	—7	—6. 66	脱脂乳溶液	良い
5	100%P-エトキシ	—5	—5. 66	脱脂乳溶液	良い
6	2 アミダイト置換	—5	—5. 32	脱脂乳溶液	良い
7	100%P-エトキシ	—4	—4. 52	白色溶液	合格
8 ^b	100%P-エトキシ	—4	—4. 38	白色溶液	合格
9 ^c	100%P-エトキシ	—4	—4. 38	白色溶液	合格
10 ^a	100%P-エトキシ	—4	—4. 22	白色溶液粒子	不合格

* * 製剤試料に粒子がある場合、このロットは拒否される

- a . このロットは、難溶性であるために、具体的には、再構成された溶液中のアンチセンス粒子のために廃棄された。
- b . このロットは、DMSO と t B A の量がより少なく、20 mL のバイアル中に 2 mg のアンチセンスが含まれており、これに、リポソームの拡大のため、追加の成分が追加された。
- c . このロットは、粒子サイズの放出スペックが衰えたため、放出されなかった。

【0073】

C . リポソーム P - エトキシアンチセンス製剤の製剤、濾過、および凍結乾燥

1 グラム (1 g) の p E オリゴを、1 mL の DMSO 当たり 10 mg のオリゴヌクレオチドの比率で DMSO に溶解する。次に、DOPC を、1719 mL の t e r t - ブチルアルコール当たり 1 g の DOPC の比率で t e r t - ブチルアルコールに添加する。オリゴおよび DOPC を、2.67 g の DOPC 当たり 1 g のオリゴヌクレオチドの比率で組み合わせ、混合する。次いで、20 mL のポリソルベート 20 の 0.835 % (v / v) 溶液を、混合物に添加し、0.039 mg / mL の最終濃度を得る。この溶液は、凍結乾燥のためにガラスバイアルに分注する前に滅菌フィルターを通過させる。

【0074】

リポソームの粒子サイズにおける界面活性剤の効果は、界面活性剤の量を滴定することによって決定された (表 3)。ポリソルベート 20 が存在しない場合、粒子のわずか 2.8 % が 300 nm 以下の直径を有した。1 倍のポリソルベート 20 が存在する場合、粒子の 12.5 % が 300 nm 以下の直径を有した。3 倍 ~ 10 倍のポリソルベート 20 を添加すると、粒子の約 20 % が 300 nm 以下の直径を有した。したがって、界面活性剤が

1 倍～3 倍に増加すると、粒子サイズが減少する。

【表 3】

表 3. 界面活性剤によるリポソーム粒子サイズの変動

実験	界面活性剤の量	粒径の特徴付け： 累積分布関数		
		50%値	90%値**	300nm 値
1	0 倍	5301nm	10719nm	2. 8%
2	1 倍	1053nm	4054nm	12. 5%
3	3 倍	785nm	2926nm	19. 1%
4	5 倍	721nm	2691nm	21. 9%
5	10 倍	734nm	2937nm	21. 4%

10

* * 製剤の放出基準は、リポソーム粒子の 90% が 5000nm 以下である。

【0075】

D. 投与のためのリポソーム P - エトキシアンチセンス製剤の調製

凍結乾燥調製物を、10～5000μMの最終オリゴ濃度で、生理食塩水（0.9% / 10mMのNaCl）で水和した。リポソーム - P - エトキシオリゴは、手動攪拌によって混合した。

【0076】

E. リポソーム P - エトキシアンチセンス製剤の試験方法

20

製造された製剤の目視検査：製造後、製剤を含む試料バイアルを選択し、目視検査する。液体が存在しないことは必須であり、バイアルの底部にある琥珀色の結晶が、許容され、白色の凝集した粉末または外観への許容範囲が増加し、最良の結果が得られる。白色の外観は、表面積と質量の比が高い、より良好な乾燥プロセスを示し、これは、使用のための再構成に非常に役立つ。

【0077】

患者IVへの準備ができている再構成された薬物の目視検査：生理食塩水を、製造されたリポソーム P - エトキシアンチセンス製剤を含むバイアルに加え、振盪して、薬物結晶または粉末が完全に溶解した溶液に再構成する。以下の3つの主な観察が行われる：1) 結晶または粉末が完全に溶解している、2) 未溶解物質の白い塊がない、3) 外観が乳白色または脱脂乳の外観である。再構成された液体の外観が青色であればあるほど、青色スペクトルの光を反射するより小さなリポソーム粒子サイズを示すため、より良好である。

30

【0078】

質量分析：質量分析（質量分析）を使用して、試料中の様々な質量のプロファイルを表示する。P - エトキシアンチセンス材料が生成されるとき、質量分析が試料で実行される。これらの結果は、右側に「x」軸の質量が増加し、「y」軸の相対質量が上方に増加しているグリッド上に存在する材料のピークを示す。試料からのプロファイル进行分析して、P - エトキシ試料中の P - エトキシ骨格の相対量を決定し、プロファイルのピークが（最右側から開始する）、P - エトキシ結合からなるすべての骨格を持つ完全な長さの材料を表し、次のピークが、P - エトキシが欠失した1つの骨格を持つ完全な長さを左に動き（したがって、エチルがロックオフされ、結果は通常のホスホジエステル骨格結合となる）を表すことを認識し、継続する。右に移動した質量分析パターンは、より多くの P - エトキシ骨格を有し、したがって、疎水性が高く、溶解性が低いという特性を有する P - エトキシ試料を表し、同様に、反対の効果を持つ左に移動した。また、試料の質量分析チャートの検査を使用して、製造期間中の濾過が濾過された製品中に存在するオリゴヌクレオチド組成に悪影響を与えるかどうかを判定することもできる。

40

【0079】

UV試験：紫外線試験は、試料中に存在するオリゴヌクレオチドの質量を決定するために使用される。オリゴヌクレオチドは、260ナノメートルの範囲内の光を吸収する。結果として、完成した再構成された製剤のUV試験は、製剤のバイアル中のオリゴヌクレオ

50

チド原薬の量を決定する方法として使用されるようになる。製造の開発および革新の観点から、UV試験は、製造におけるまたは難溶性のP-エトキシアンチセンス原薬における、濾過期間中に問題が発生したかどうかを判定するために使用し、その結果、溶液中のオリゴヌクレオチドがより少なく、したがって、より低いUV測定値を得た。方法は検証され、最終製品の出荷試験の一部になる可能性がある。

【0080】

リポソーム粒子サイズ：完成した製剤のバイアルを再構成し、リポソーム粒子サイズを試験する。その結果、多くの場合、中心点、尾部および平均値を有するほぼ正規分布、または粒子の大部分のほぼ正規分布および二次粒子形成効果から生じるより小さなリポソーム粒子のより小さな二次ピークが得られる。リポソーム粒子は、患者に悪影響を与える（例えば、肺のより小さな血管で血流の問題を引き起こす）可能性があるため、大きすぎないことが重要である。結果として、製剤の放出基準は、粒子サイズ試験が、リポソームの90%が5ミクロン以下のサイズであることを示すことを含む。さらに、細胞への取り込みがより良好であるため、より小さなリポソームが好ましく、第2に、より小さなリポソームが血管の細孔に浸透し、それにより、リポソームが腫瘍内部に浸透できるようにし、リポソームP-エトキシアンチセンス製剤の治療効果を増大させる。

【0081】

V. 治療方法

本発明のある特定の態様は、がん、自己免疫疾患、または感染症などの疾患を治療するためのオリゴヌクレオチド-脂質複合体（例えば、非荷電リポソームに組み込まれたオリゴヌクレオチド）を提供する。特に、オリゴヌクレオチドは、ヒトヌクレオチド配列との塩基対合を可能にする配列を有し得、したがって、ヒトヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の発現を阻害し得る。

【0082】

「治療」および「治療すること」とは、疾患または健康に関連する状態の治療的利益を得るために、治療剤を対象に投与もしくは適用すること、または手順もしくはモダリティを対象に対して実施することを指す。例えば、治療は、薬学的に有効な量のオリゴヌクレオチド-脂質複合体の投与を含み得る。

【0083】

「対象」および「患者」とは、霊長類、哺乳動物、および脊椎動物などのヒトまたは非ヒトのいずれかを指す。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0084】

「治療的利益」または「治療的に有効」という用語は、本出願を通して使用される場合、この状態の医学的治療に関して、対象の健康（well-being）を促進または増強する任意のものを指す。これには、疾患の徴候または症状の頻度または重症度の低下が含まれるが、これらに限定されない。例えば、がんの治療は、例えば、腫瘍のサイズの低下、腫瘍の侵襲性の低下、がんの成長速度の低下、または転移の予防を伴い得る。がんの治療はまた、がんを有する対象の生存の延長を指し得る。自己免疫疾患の治療は、例えば、望ましくない免疫応答がある自己抗原の発現を低減させること、望ましくない免疫応答がある自己抗原の耐性を誘導すること、または自己抗原に対する免疫応答を阻害することを含み得る。感染症の治療は、例えば、感染性因子を除去し、感染性因子のレベルを低減させるか、または感染性因子のレベルの一定レベルを維持することを含み得る。

【0085】

本発明の治療方法が有用である腫瘍は、固形腫瘍、血液学的腫瘍、転移性がん、または非転移性がんに見られるものなどのあらゆる悪性細胞型を含む。例示的な固形腫瘍としては、膀胱、結腸、盲腸、食道、胃腸、歯肉、肝臓、皮膚、胃、精巣、舌、子宮、胃、脳、頭部、頸部、卵巣、腎臓、喉頭、肉腫、骨、肺、膀胱、黒色腫、前立腺、および乳房からなる群から選択される臓器の腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。例示的な血液学的腫瘍には、骨髄、TまたはB細胞悪性腫瘍、白血病、例えばびまん性大細胞型B細胞リンパ腫などのリンパ腫、芽細胞腫、骨髄腫などの腫瘍が含まれる。本明細書で提供され

る方法を使用して治療され得るがんのさらなる例としては、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、扁平上皮がん、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がんおよび肺の扁平上皮がんを含む）、腹膜がん、肝細胞がん、胃がんまたは胃がん（胃腸がんおよび消化管間質がんを含む）、膵臓がん（膵管腺がんを含む）、膠芽細胞腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がんまたは子宮がん、唾液腺がん、腎臓がんまたは腎がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、様々なタイプの頭頸部がん、黒色腫、表在拡大型黒色腫、黒子悪性黒色腫、末端性黒子性黒色腫、結節型黒色腫、ならびにB細胞リンパ腫（軽度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中程度／濾胞性NHL；中程度びまん性NHL；高度免疫芽細胞性NHL；高度リンパ芽球性NHL；高度切れ込みの無い小細胞型NHL；巨大病変NHL；びまん性大細胞型B細胞リンパ腫；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；およびWaldenströmマクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、有毛細胞白血病、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病（AML）および慢性骨髄芽球性白血病が挙げられるが、これらに限定されない。

【0086】

がんは、具体的には以下の組織型のものであり得るが、これらに限定されない：新生物、悪性；がん腫；がん腫、未分化；巨細胞および紡錘体細胞がん；小細胞がん；乳頭状がん；扁平上皮がん；リンパ上皮がん；基底細胞がん；石灰化上皮腫（pilomatric carcinoma）；移行上皮がん；乳頭状移行上皮がん；腺がん；ガストリノーマ、悪性；胆管がん；肝細胞がん；混合型肝細胞がんおよび胆管がん；柱状腺がん（trabecular adenocarcinoma）；腺様嚢胞がん；腺腫様ポリープ内腺がん；腺がん、家族性大腸ポリポーシス；固形がん；カルチノイド腫瘍、悪性；細気管支肺胞腺がん（branchiolo-alveolar adenocarcinoma）；乳頭状腺がん；嫌色素性がん；好酸性がん；好酸性腺がん；好塩基性がん；明細胞腺がん；顆粒細胞がん；濾胞性腺がん；乳頭状濾胞性腺がん；非被包性硬化性がん；副腎皮質がん；類内膜がん（endometrioid carcinoma）；皮膚付属器がん；アポクリン腺がん；皮脂腺がん；耳道腺がん（ceruminous adenocarcinoma）；粘液性類表皮がん；嚢胞腺がん；乳頭状嚢胞腺がん；乳頭状漿液性嚢胞腺がん；粘液性嚢胞腺がん；粘液性腺がん；印環細胞がん；浸潤性腺管がん；髄様がん；小葉がん；炎症性がん；パジェット病、乳房；腺房細胞がん；腺扁平上皮がん；扁平上皮化生を伴う腺がん；胸腺腫、悪性；卵巣間質腫瘍、悪性；莢膜細胞腫、悪性；顆粒膜細胞腫、悪性；アンドロblastoma、悪性；セルトリ細胞がん；ライディッヒ細胞腫、悪性；脂質細胞腫、悪性；傍神経節腫、悪性；乳房外傍神経節腫、悪性；褐色細胞腫；グロムス血管肉腫（glomangiosarcoma）；悪性黒色腫；メラニン欠乏性黒色腫；表在拡大型黒色腫；巨大色素性母斑における悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；青色母斑、悪性；肉腫；線維肉腫；線維性組織球腫、悪性；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；胞巣状横紋筋肉腫；間質肉腫；混合腫瘍、悪性；ミューラー管混合腫瘍；腎芽細胞腫；肝芽腫；がん肉腫；間葉腫、悪性；ブレンナー腫瘍、悪性；葉状腫瘍、悪性；滑膜肉腫；中皮腫、悪性；未分化胚細胞腫；胎生期がん；奇形腫、悪性；卵巣甲状腺腫、悪性；絨毛がん；中腎腫、悪性；血管肉腫；血管内皮腫、悪性；カボジ肉腫；血管外皮細胞腫、悪性；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；軟骨芽細胞腫、悪性；間葉性軟骨肉腫；骨の巨細胞腫；ユーイング肉腫；歯源性腫瘍、悪性；エナメル芽細胞歯牙肉腫（ameloblastic odontosarcoma）；エナメル上皮腫、悪性；エナメル上皮線維肉腫；松果体腫、悪性；脊索腫；神経膠腫、悪性；上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起神経膠腫；乏突起膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽細胞腫；網膜芽細胞腫；嗅神経原性腫瘍；髄膜腫、悪性；神経線維肉腫；神経鞘腫、悪性；顆粒細胞腫、悪性；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン；側肉芽腫（paragranuloma）；悪性リンパ腫、小リンパ球性；悪性リンパ腫、大細胞、び

10

20

30

40

50

まん性；悪性リンパ腫、濾胞性；菌状息肉腫；特定された他の非ホジキンリンパ腫；悪性組織球増殖症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞性白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞性白血病（*lymphosarcoma cell leukemia*）；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞性白血病；巨核芽球性白血病（*megakaryoblastic leukemia*）；骨髄性肉腫；および有毛細胞白血病。

【0087】

本発明の治療方法が有用である自己免疫疾患には、全身性紅斑性狼瘡、脊椎関節症、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、腸疾患性関節炎、真性糖尿病、セリアック病、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫性肝疾患、アジソン病、移植片拒絶反応、移植片対宿主病、宿主対移植片疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、過敏性腸疾患、炎症性腸疾患、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、家族性地中海熱、筋萎縮性側索硬化症、シェーグレン症候群、早期関節炎、ウイルス性関節炎、多発性硬化症、または乾癬が含まれるが、これらに限定されない。これらの疾患の診断および治療は、文献で十分に立証されている。

【0088】

本発明の治療方法が有用である感染症には、細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、および寄生虫感染症が含まれるが、これらに限定されない。例示的なウイルス感染症には、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1、ヒト免疫不全ウイルス2、ヒト乳頭腫ウイルス、単純ヘルペスウイルス1、単純ヘルペスウイルス2、带状疱疹疹、水痘带状疱疹疹、コクサッキーウイルスA16、サイトメガロウイルス、エボラウイルス、エンテロウイルス、エプスタインバーウイルス、ハンタウイルス、ヘンドラウイルス、ウイルス性髄膜炎、呼吸器合胞体ウイルス、ロタウイルス、ウエストナイルウイルス、アデノウイルス、およびインフルエンザウイルス感染症が含まれる。例示的な細菌感染症には、*Chlamydia trachomatis*、*Listeria monocytogenes*、*Helicobacter pylori*、*Escherichia coli*、*Borrelia burgdorferi*、*Legionella pneumophila*、*Mycobacteria* spp（例えば、*M. tuberculosis*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. kansasii*、*M. goodii*）、*Staphylococcus aureus*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus pyogenes*（A群*Streptococcus*）、*Streptococcus agalactiae*（B群*Streptococcus*）、*Streptococcus (viridans*群）、*Streptococcus faecalis*、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus (anaerobic* spp.）、*Streptococcus pneumoniae*、*pathogenic Campylobacter* sp.、*Enterococcus* sp.、*Haemophilus influenzae*、*Bacillus anthracis*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Corynebacterium* sp.、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Enterobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pasteurella multocida*、*Bacteroides* sp.、*Fusobacterium nucleatum*、*Streptobacillus moniliformis*、*Treponema pallidum*、*Treponema pertenue*、*Leptospira*、*Rickettsia*、*Actinomyces israelii*、*Shigella* spp（例えば、*S. flexneri*、*S. sonnei*、*S. dysenteriae*）、および*Salmonella* spp感染症が含まれる。例示的な真菌感染症には、*Candida albicans*、*Candida glabrata*、*Aspergillus fumigatus*、*Aspergillus terreus*、*Cryptococcus neoformans*

10

20

30

40

50

ans、Histoplasma capsulatum、Coccidioides immitis、Blastomyces dermatitidis、およびChlamydia irachomatis感染症が含まれる。

【0089】

オリゴヌクレオチド - 脂質複合体は、本明細書において、様々な様式の抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌剤、抗寄生虫剤、または抗自己免疫剤として使用され得る。特定の実施形態では、本発明は、疾患を抑制または逆転させるのに十分な期間、疾患細胞の集団を治療上有効量のオリゴヌクレオチド - 脂質複合体と接触させることを含む、オリゴヌクレオチド - 脂質複合体を使用する方法を企図する。

【0090】

一実施形態では、インピボでの接触は、静脈内、腹腔内、皮下、または腫瘍内注射により、本発明のオリゴヌクレオチド - 脂質複合体を含む治療上有効量の生理学的に許容される組成物を患者に投与することによって達成される。オリゴヌクレオチド - 脂質複合体は、注射によってまたは経時的に徐々に注入することによって非経口的に投与することができる。

【0091】

オリゴヌクレオチド - 脂質複合体を含む治療用組成物は、例えば、単位用量の注射などによって、静脈内または皮下に通常投与される。「単位用量」という用語は、治療用組成物に関して使用される場合、対象のための投薬量単位として適切な物理的に個別の単位を指し、各単位は、必要とされる希釈剤、すなわち、担体、またはビヒクルとともに、所望の治療効果をもたらすように計算された所定の量の活性な材料を含有する。

【0092】

本組成物は、投与製剤に適合する様式で、治療上有効量で投与される。投与される量は、治療される対象、対象のシステムが活性成分を利用する能力、および望ましい治療効果の程度に依存する。投与することが必要とされる活性成分の正確な量は、医師の判断に依存し、各個人に対して特有である。しかしながら、全身投与のための適したレジメンは、本明細書に開示されており、投与経路に依存する。初回投与および追加投与に適したレジメンも企図され、初回投与の後に、1時間以上の間隔において、その後の注射または他の投与による反復投与を行うことが典型的である。例示的な複数回投与が、本明細書に記載されており、ポリペプチドの高い血清および組織レベルを継続的に維持するのに特に好ましい。あるいは、インピボ治療のために指定された範囲内の血中濃度を維持するのに十分な連続静脈内注入が企図される。

【0093】

本発明のオリゴヌクレオチドを全身的または局所的に投与して、疾患を治療し、例えば、腫瘍細胞の成長を阻害するか、または局所進行性または転移性がん罹患しているがん患者のがん細胞を殺すことができると企図される。それらは、静脈内、くも膜下腔内、皮下、および/または腹腔内に投与することができる。それらは、単独でまたは抗増殖薬と組み合わせて投与することができる。一実施形態では、それらは、手術または他の処置の前に患者のがん負荷を軽減するために投与される。あるいは、それらは、いかなる残ったがん（例えば、手術で除去できなかったがん）も生き残らないように、手術後に投与することができる。

【0094】

オリゴヌクレオチドの治療上有効量は、所望の効果を達成するために、すなわち、標的タンパク質の発現を阻害するために計算された所定の量である。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドの投与のための投与量範囲は、所望の効果を生み出すのに十分に大きい範囲である。投与量は、有害な副作用、例えば、過粘稠度症候群、肺水腫、うっ血性心不全、神経学的効果などを引き起こすほど多量であってはならない。一般的に、投与量は、患者の年齢、状態、性別、および疾患の程度によって変化し、当業者によって決定することができる。いずれかの合併症の場合には、個々の医師が投与量を調節することができる。

【0095】

10

20

30

40

50

本発明の組成物は、好ましくは、例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、リンパ内、腹腔内、皮下、胸膜内、または髄腔内注射によって非経口的に患者に投与されるか、またはエクスピボで使用する事ができる。好ましい投与量は、 $5 \sim 25 \text{ mg/kg}$ である。投与は、好ましくは、がんが消失または退縮するまでタイムスケジュールで繰り返され、他の形態の治療と併用してもよい。

【0096】

VI. 薬学的調製物

リポソームを含む薬学的組成物は、通常、デキストロースまたは生理食塩水などの滅菌の薬学的に許容される担体または希釈剤を含む。

【0097】

オリゴヌクレオチドを含む非荷電脂質成分（例えば、リポソームの形態）の臨床応用が行われる場合、意図する用途に適切な薬学的組成物として脂質複合体を調製することが一般に有益であろう。これは、典型的には、発熱物質、ならびにヒトまたは動物にとって有害であり得る任意の他の不純物を本質的に含まない薬学的組成物を調製することを伴う。適切な緩衝液を使用して、複合体を安定させ、標的細胞による取り込みを可能にすることもできる。

【0098】

「薬学的または薬理学的に許容される」という語句は、必要に応じて、ヒトなどの動物に投与した場合に、有害反応、アレルギー反応、または他の有害反応を引き起こさない分子実体および組成物を指す。オリゴヌクレオチドまたは追加の活性成分を含む少なくとも1つの非荷電脂質成分を含む薬学的組成物の調製は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st, 2005（参照により本明細書に組み込まれる）に例示されるとおり、本開示を考慮すれば当業者には既知である。さらに、動物（例えば、ヒト）投与のために、製剤は、FDA Office of Biological Standardsによって必要とされる滅菌性、発熱性、一般的安全性、および純度標準を満たすべきであることが理解されよう。

【0099】

本明細書で使用される、「薬学的に許容される担体」には、当業者に既知のように、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物、薬物安定化剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、着香剤、色素、それに類似の物質およびその組み合わせを含む。薬学的に許容される担体は、好ましくは、ヒトへの投与のために製剤化されるが、ある特定の実施形態では、非ヒト動物への投与のために製剤化されるが、ヒトへの投与では（例えば、政府の規制のため）許容できない薬学的に許容される担体を使用するのが望ましくあり得る。いずれかの従来の担体が活性成分に適合しない場合を除いて、治療または薬学的組成物におけるその使用が企図される。

【0100】

患者または対象に投与される本発明の組成物の実際の投与量は、体重、状態の重症度、治療されている疾患の種類、以前または同時の治療的介入、患者の突発性疾患、および投与経路などの物理的および生理的因子によって決定することができる。投与に責任のある医師が、いずれにしても、組成物中の活性成分（複数可）の濃度および個々の対象に対する適切な用量（複数可）を決定する。

【0101】

ある特定の実施形態では、薬学的組成物は、例えば、少なくとも約0.1%の活性化化合物を含み得る。他の実施形態では、活性化化合物は、単位重量の約2%～約75%、または例えば約25%～約60%、およびそこから派生する任意の範囲を含み得る。他の非限定的な例では、用量はまた、1投与当たり約1マイクログラム/kg/体重、約5マイクログラム/kg/体重、約10マイクログラム/kg/体重、約50マイクログラム/kg/体重、約100マイクログラム/kg/体重、約200マイクログラム/kg/体重、約350マイクログラム/kg/体重、約500マイクログラム/kg/体重、約1ミリ

10

20

30

40

50

グラム / k g / 体重、約 5 ミリグラム / k g / 体重、約 10 ミリグラム / k g / 体重、約 50 ミリグラム / k g / 体重、約 100 ミリグラム / k g / 体重、約 200 ミリグラム / k g / 体重、約 350 ミリグラム / k g / 体重、約 500 ミリグラム / k g / 体重から約 1000 m g / k g / 体重またはそれ以上、およびそこから派生する任意の範囲を含み得る。本明細書に列挙される数からの派生可能な範囲の非限定的な例では、約 5 μ g / k g / 体重 ~ 約 1000 m g / k g / 体重、約 5 マイクログラム / k g / 体重 ~ 約 500 ミリグラム / k g / 体重などの範囲を投与することができる。

【0102】

本実施形態のオリゴヌクレオチドは、1 用量当たり 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100 μ g、またはそれ以上の核酸の用量で投与することができる。各用量は、1、10、50、100、200、500、1000 μ l または m l、またはそれ以上の容量であり得る。

10

【0103】

治療用組成物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水中で調製することができる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、これらの混合物、および油で調製することもできる。保管および使用の通常の条件下で、これらの製剤は、微生物の成長を妨げるための保存剤を含有する。

【0104】

本発明の治療用組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして注射可能な組成物の形態で有利に投与される。注射前の液体の溶液または懸濁液に適した固体形態を調製することもできる。これらの製剤は、乳化することもできる。そのような目的での典型的な組成物は、薬学的に許容される担体を含む。例えば、組成物は、リン酸緩衝生理食塩水の 1 ミリリットル当たり 10 m g、25 m g、50 m g、または最大約 100 m g のヒト血清アルブミンを含有することができる。他の薬学的に許容される担体には、水溶液、塩を含む非毒性の賦形剤、保存剤、緩衝液などが含まれる。

20

【0105】

非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、およびオレイン酸エチル (e t h y l o l e a t e) などの注射可能な有機エステルである。水性担体には、水、アルコール / 水溶液、食塩水、塩化ナトリウムなどの非経口ビヒクル、リンゲルデキストロースなどが含まれる。静脈内ビヒクルには、液体および栄養補給剤が含まれる。保存剤には、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスが含まれる。薬学的組成物の様々な成分の p H および正確な濃度は、周知のパラメータに従って調整される。

30

【0106】

本発明の治療用組成物は、古典的な薬学的製剤を含み得る。本発明による治療用組成物の投与は、標的組織がその経路を介して利用可能である限り、任意の一般的な経路を介するであろう。これには、経口、鼻腔、頬、直腸、経膈、または局所が含まれる。局所投与は、化学療法誘発性脱毛症または他の皮膚過剰増殖性障害を予防するために、皮膚がんの治療に特に有利であり得る。あるいは、投与は、同所、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、または静脈内注射によるものであり得る。このような組成物は、通常、生理学的に許容される担体、緩衝液、または他の賦形剤を含む薬学的に許容される組成物として投与され得る。肺の病態の治療のため、エアロゾル送達を使用することができる。エアロゾルの容量は、約 0 . 01 m L ~ 0 . 5 m L である。

40

【0107】

治療用組成物の有効量は、意図された目標に基づいて決定される。「単位用量」または「用量」という用語は、対象における使用に適している物理的に別個の単位を指し、それぞれの単位は、その投与、すなわち、適切な経路および治療レジメンに伴って上記の所望の応答を起こすために計算された所定量の治療用組成物を含有する。治療の回数および単位用量の両方によって投与すべき量は、所望される保護または効果に依存する。

【0108】

治療用組成物の正確な量は、担当医の判断にも依存し、それぞれの個体に特有である。

50

用量に影響する因子としては、患者の身体的および臨床的状态、投与経路、および意図される治療目的（例えば、治療に対する症状の緩和）ならびに特定の治療物質の効能、安定性および毒性が挙げられる。

【 0 1 0 9 】

V I I . 併用治療

ある特定の実施形態では、本発明の組成物および方法は、第 2 のまたは追加の治療法と組み合わせて、阻害性オリゴヌクレオチド、または遺伝子発現の阻害剤を発現することができるオリゴヌクレオチドを含む。併用療法を含む方法および組成物は、治療または保護効果を向上させ、および / または別の抗がん療法もしくは抗過剰増殖療法の治療効果を増加させる。治療法および予防法ならびに組成物は、がん細胞の殺傷および / または細胞過剰増殖の阻害などの所望の効果を達成するのに有効な組み合わせられた量で提供することができる。このプロセスには、細胞を遺伝子発現の阻害剤および第 2 の治療法の両方と接触させることを含み得る。組織、腫瘍、または細胞は、薬剤（すなわち、遺伝子発現の阻害剤または抗がん剤）のうちの 1 つ以上を含む 1 つ以上の組成物もしくは薬理学的製剤（複数可）と接触させることができるか、あるいは組織、腫瘍、および / または細胞を 2 つ以上の異なる組成物もしくは製剤と接触させることができ、1 つの組成物は、1）阻害性オリゴヌクレオチド、2）抗がん剤、または 3）阻害性オリゴヌクレオチドおよび抗がん剤の両方を提供する。また、このような併用療法は、化学療法、放射線療法、手術療法、または免疫療法とともに使用することができることも企図される。

【 0 1 1 0 】

阻害性オリゴヌクレオチドは、抗がん治療前、抗がん治療中、抗がん治療後、または抗がん治療に関連して様々な組み合わせで投与することができる。投与は、同時から数分、数日、数週間の範囲に及ぶ間隔であり得る。阻害性オリゴヌクレオチドが抗がん剤とは別に患者に提供される実施形態では、一般に、それぞれの送達の時間の間にかなりの時間が満了しないことを確保し、そのため、2 つの化合物は、依然として、有利に併用効果を患者に及ぼし得る。このような場合、阻害性オリゴヌクレオチド療法および抗がん療法を、互いに約 12 ~ 24 または 72 時間以内、より好ましくは互いに約 6 ~ 12 時間以内に、患者に提供することができることが企図される。一部の状況において、それぞれの投与の間に数日間（2、3、4、5、6、または 7 日間）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、または 8 週間）が経過する場合、治療のための期間をかなり延長させることが望ましくあり得る。

【 0 1 1 1 】

ある特定の実施形態では、治療過程は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90 日以上継続する。ある薬剤を、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、および / もしくは 90 日目、これらの任意の組み合わせで投与することができ、別の薬剤を、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、4

6、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、および/もしくは90日目、またはこれらの任意の組み合わせで投与することができることが企図される。1日(24時間)以内に、患者に、薬剤(複数可)の1回または複数回の投与を行うことができる。さらに、治療過程後、抗がん治療が施されない期間が存在することが企図される。この期間は、患者の状態、例えば、患者の予後、体力、健康状態などに応じて、1、2、3、4、5、6、7日間、および/または1、2、3、4、5週間、および/または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月以上継続し得る。

10

【0112】

様々な組み合わせを使用することができる。以下の例について、阻害性オリゴヌクレオチド療法は、「A」であり、抗がん療法または自己免疫療法は、「B」である。

A / B / A B / A / B B / B / A A / A / B A / B / B B / A / A A / B / B / B
B / A / B / B B / B / B / A B / B / A / B A / A / B / B A / B / A / B
A / B / B / A
B / B / A / A B / A / B / A B / A / A / B A / A / A / B B / A / A / A
A / B / A / A
A / A / B / A

【0113】

本発明の任意の化合物または治療法の患者への投与は、薬剤の毒性を考慮して、毒性である場合、このような化合物の投与のための一般的プロトコルに従う。したがって、いくつかの実施形態では、併用療法に起因する毒性をモニタリングするステップが存在する。必要に応じて、治療サイクルが繰り返されることが予想される。また、様々な標準治療法、および外科的介入が、記載された治療法と組み合わせで適用され得ることも企図される。

20

【0114】

特定の態様では、標準療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、外科療法、または遺伝子療法を含み、本明細書に記載の、遺伝子発現療法の阻害剤、抗がん療法、または遺伝子発現療法の阻害剤および抗がん療法の両方と組み合わせで使用され得ることが企図される。

30

【0115】

A. 化学療法

本実施形態に従って、多種多様な化学療法剤を使用することができる。「化学療法」という用語は、がんを治療するための薬物の使用を指す。「化学療法剤」は、がんの治療に投与される化合物または組成物を示すために使用される。これらの薬剤または薬物は、細胞内でのそれらの活性の様式、例えば、それらが細胞周期に影響を及ぼすかどうか、およびどの段階に影響を及ぼすかにより分類される。あるいは、薬剤は、DNAを直接架橋するその能力、DNAの中に挿入される能力、または核酸合成に影響を及ぼすことによって染色体異常および有糸分裂異常を誘導する能力に基づいて特徴付けすることができる。

【0116】

化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロスホスファミド；アルキルスルホナート、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドパ(meturedopa)、およびウレドパ(uredopa)；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含む、エチレンイミンおよびメチルアメラミン(methylamelamine)；アセトゲニン(特に、プラタシンおよびプラタシノン(bullatacinone))；カンプトテシン(合成類似体トポテカンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン(carzeles

40

50

in)、およびピセレシン合成類似体を含む); クリプトフィシン(特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8); ドラスタチン; デュオカルマイシン(合成類似体KW-2189およびCB1-TM1を含む); エリユテロピン; パンクラチスタチン(pancratistatin); サルコジクチン(sarcodictyin); スポンギスタチン(spongistatin); ナイトロジェンマスタード、例えば、クロランブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムピシン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、およびウラシルマスタード; ニトロソ尿素、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン; 抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質(例えば、カリチアマイシン、特に、カリチアマイシガンマ1IおよびカリチアマイシンオメガI1; ディネミシン(dynemicin)Aを含むディネミシン; クロドロネートなどのビスホスホネート; エスペラミシン; ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジイン抗菌性発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オーラルナイシン(authrarnycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス(chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、およびデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン(esorubicin)、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラルナイシン(nogalarncin)、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、およびゾルピシン; 代謝拮抗物質、例えば、メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル(5-FU); 葉酸類似体、例えば、デノプテリン、プテロプテリン、およびトリメトトレキセート; プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン(thiamiprine)、およびチオグアニン; ピリミジン類似体、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、およびフロクスウリジン; アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、およびテストラクトン; 抗副腎剤、例えば、ミトタンおよびトリロスタン; 葉酸補充剤、例えば、フォリン酸; アセグラトン; アルドホスファミドグリコシド; アミノレブリン酸; エニルウラシル; アムサクリン; ベストラブシル; ピサントレン; エダトラキサート(edatraxate); デフォファミン(defofamine); デメコルチン; ジアジクオン; エルフォルミチン(elformithine); 酢酸エリブチニウム; エボチロン; エトグルシド; 硝酸ガリウム; ヒドロキシウレア; レンチナン; ロニダイニン; メイタンシノイド、例えば、メイタンシンおよびアンサミトシン(ansamitocin); ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダンモール(mopidanmol); ニトラエリン(nitraerine); ペントスタチン; フェナメット; ピラルピシン; ロソキサントロン(losoxantrone); ポドフィリニック酸; 2-エチルヒドラジド; プロカルバジン; PSK多糖複合体; ラゾキサン; リゾキシン(rhizoxin); シゾフィラン(sizofiran); スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジクオン; 2,2,2'-トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン(特に、T-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン(roridin)A、およびアングイジン(anguidine)); ウレタン; ピンデシン; ダカルバジン; マンノムスチン; ミトブロニトール; ミトラクトール; ピボプロマン; ガシトシン(gacytosine); アラビノシド('Ara-C'); シクロホスファ

10

20

30

40

50

ミド；タキソイド、例えば、バクリタキセルおよびドセタキセルゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；白金配位錯体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン；ビンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン（例えば、CPT-11）；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（difluoromethylornithine）（DMFO）；レチノイン酸などのレチノイド；カペシタピン；カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン（plicomycin）、ゲムシタビエン（gemcitabine）、ナベルピン、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランス白金（transplatinum）、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。

10

【0117】

B．放射線療法

DNA損傷を引き起こし、広く使用されている他の因子としては、 γ 線、X線、および/または腫瘍細胞への放射性同位体の指向性送達として一般に知られているものが挙げられる。他の形態のDNA損傷因子、例えば、マイクロ波、陽子ビーム照射（米国特許第5,760,395号および同第4,870,287号）ならびにUV照射も企図される。これらの因子はすべて、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の集合および維持に対する広範囲の損傷に影響を及ぼす可能性が最も高い。X線につ

20

【0118】

「接触させる」および「曝露させる」という用語は、細胞に適用される場合、治療用構築物および化学療法剤または放射線療法剤を標的細胞に送達し、または標的細胞と直接並置して配置するプロセスを説明するために本明細書において使用される。細胞殺傷を達成するために、例えば、両方の薬剤を、細胞を殺傷するか、または細胞の分裂を防止するために有効な組み合わせた量で細胞に送達する。

30

【0119】

C．免疫療法

がん治療の文脈では、免疫療法薬は、一般に、がん細胞を標的化および破壊するための免疫エフェクター細胞および分子の使用に依存する。トラスツズマブ（Herceptin（商標））がそのような例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上の一部のマーカーに特異的な抗体であり得る。抗体は、単独で、治療法のエフェクターとして機能し得るか、または他の細胞を動員して実際に細胞殺傷に影響を及ぼし得る。抗体はまた、薬物または毒素（化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）とコンジュゲートさせることもでき、単に標的化薬剤として機能する。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接的に相互作用する表面分子を担持するリンパ球であり得る。種々のエフェクター細胞としては、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が挙げられる。治療法の組み合わせ、すなわち、直接的な細胞傷害活性およびErbb2の阻害または減少は、Erbb2過剰発現がんの治療に治療的利益をもたらし得る。

40

【0120】

別の免疫療法も、上記の遺伝子抑制療法との併用療法の一部として使用され得る。免疫療法の一態様では、腫瘍細胞は、標的化に適する、すなわち、大多数の他の細胞には存在しない一部のマーカーを担持しなければならない。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらはいずれも、本発明の文脈における標的化に好適であり得る。一般的な腫瘍マーカーとしては、がん胎児性抗原、前立腺特異抗原、尿腫瘍関連抗原、胎児抗原、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB

50

、PLAP、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、erb B、およびp155が挙げられる。免疫療法の別の態様は、抗がん効果を免疫刺激効果と組み合わせることである。IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、ガンマ-IFNなどのサイトカイン、MIP-1、MCP-1、IL-8などのケモカイン、およびFLT3リガンドなどの成長因子を含む、免疫刺激分子も存在する。タンパク質として、または腫瘍抑制因子と組み合わせる遺伝子送達を使用して、免疫刺激分子を組み合わせることにより、抗腫瘍効果を増大させることが示されている。さらに、これらの化合物のいずれかに対する抗体を使用して、本明細書で議論される抗がん剤を標的化することができる。

【0121】

現在調査中のまたは使用中の免疫療法の例は、免疫アジュバント、例えば、ウシ結核菌 (*Mycobacterium bovis*)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物 (米国特許第5,801,005号および同第5,739,169号、Hui and Hashimoto, 1998、Christodoulides et al., 1998)、サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、およびIL-1、GM-CSF、およびTNF (Bukowski et al., 1998、Davidson et al., 1998、Hellstrand et al., 1998) 遺伝子治療、例えば、TNF、IL-1、IL-2、p53 (Qin et al., 1998、Austin-Ward and Villaseca, 1998、米国特許第5,830,880号および同第5,846,945号)、ならびにモノクローナル抗体、例えば、抗ガングリオシドGM2、抗HER-2、抗p185 (Pietras et al., 1998、Hanibuchi et al., 1998、米国特許第5,824,311号) である。1つ以上の抗癌療法を本明細書に記載の遺伝子サイレンシング療法とともに用いることができることが企図される。

【0122】

能動免疫療法では、抗原性ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質、または自己もしくは同種腫瘍細胞組成物または「ワクチン」が、一般に、異なる細菌アジュバントとともに投与される (Ravindranath and Morton, 1991、Morton et al., 1992、Mitchell et al., 1990、Mitchell et al., 1993)。

【0123】

養子免疫療法では、患者の循環リンパ球、または腫瘍浸潤リンパ球をインビトロで単離し、IL-2などのリンホカインで活性化するか、または腫瘍壊死のための遺伝子を形質導入し、再投与する (Rosenberg et al., 1988、1989)。

【0124】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤であり得る。免疫チェックポイントは、シグナル (共刺激分子など) を大きくするか、シグナルを小さくする。免疫チェックポイント遮断により標的化され得る阻害性免疫チェックポイントとしては、アデノシンA2A受容体 (A2AR)、B7-H3 (CD276としても既知)、BおよびTリンパ球アテニューエータ (BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4)、CD152としても既知)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、キラー細胞免疫グロブリン (KIR)、リンパ球活性化遺伝子-3 (LAG3)、プログラム死1 (PD-1)、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3 (TIM-3)、ならびにT細胞活性化のVドメインIgサブレッサー (VISTA) が挙げられる。特に、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1軸および/またはCTLA-4を標的とする。

【0125】

免疫チェックポイント阻害剤は、小分子などの薬物、組換え型のリガンドもしくは受容体であってもよく、または特に、ヒト抗体などの抗体である (例えば、国際特許公開WO 2015016718、Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4): 2

10

20

30

40

50

52-64, 2012、これらはいずれも参照により本明細書に組み込まれる)。免疫チェックポイントタンパク質またはその類似体の既知の阻害剤を使用してもよく、特に、キメラ化型、ヒト化型、またはヒト型の抗体を使用してもよい。当業者が既知であるように、本開示で言及されるある特定の抗体に対して、代替的および/または同等の名称が、使用され得る。そのような代替的および/または同等の名称は、本開示の文脈において交換可能である。例えば、ランブロリズマブは、代替的および/または同等の名称MK-3475およびペンブロリズマブとしても知られていることが既知である。

【0126】

いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1のそのリガンド結合パートナーへの結合を阻害する分子である。特定の態様では、PD-1リガンド結合パートナーは、PDL1および/またはPDL2である。別の実施形態では、PDL1結合アンタゴニストは、PDL1のその結合パートナーへの結合を阻害する分子である。特定の態様では、PDL1結合パートナーは、PD-1および/またはB7-1である。別の実施形態では、PDL2結合アンタゴニストは、PDL2のその結合パートナーへの結合を阻害する分子である。特定の態様では、PDL2結合パートナーは、PD-1である。アンタゴニストは、抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、またはオリゴペプチドであり得る。例示的な抗体は、米国特許第8,735,553号、同第8,354,509号、および同第8,008,449号に記載されており、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で提供される方法において使用される他のPD-1軸アンタゴニストは、米国特許公開第2014/0294898号、同第2014/022021号、および同第2011/0008369号に記載されているように、当該技術分野で既知である。

【0127】

いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、抗PD-1抗体(例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体)である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、およびCT-011からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、イムノアドヘシン(例えば、定常領域(例えば、免疫グロブリン配列のFc領域)に融合したPDL1またはPDL2の細胞外またはPD-1結合部分を含むイムノアドヘシン)である。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、AMP-224である。MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558、およびOPDIVO(登録商標)としても既知である、ニボルマブは、WO2006/121168に記載されている抗PD-1抗体である。MK-3475、Merck 3475、ランブロリズマブ、KEYTRUDA(登録商標)、およびSCH-900475としても既知である、ペンブロリズマブは、WO2009/114335に記載される抗PD-1抗体である。hBATまたはhBAT-1としても既知である、CT-011は、WO2009/101611に記載される抗PD-1抗体である。B7-DCIgとしても既知である、AMP-224は、WO2010/027827およびWO2011/066342に記載されるPDL2-Fc融合可溶性受容体である。

【0128】

本明細書において提供される方法で標的化することができる別の免疫チェックポイントは、CD152としても既知の細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4)である。ヒトCTLA-4の完全なcDNA配列は、Genbank受託番号U15006を有する。CTLA-4は、T細胞の表面上に見出され、抗原提示細胞の表面上でCD80またはCD86に結合するとき、「オフ」スイッチとして作用する。CTLA4は、ヘルパーT細胞の表面上で発現し、T細胞に阻害シグナルを伝達する免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。CTLA4は、T細胞共刺激タンパク質のCD28と類似しており、両分子が、抗原提示細胞において、それぞれ、B7-1およびB7-2とも呼ばれるCD80およびCD86に結合する。CTLA4は、阻害シグナルをT細胞に伝達するが、CD28は、刺激シグナルを伝達する。細胞内CTLA4は、制御性T細胞

10

20

30

40

50

においても見出され、その機能のために重要であり得る。T細胞受容体およびCD28を介したT細胞の活性化は、B7分子の阻害性受容体であるCTLA-4の発現増大につながる。

【0129】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体）、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、またはオリゴペプチドである。

【0130】

本方法で使用するのに適した抗ヒト-CTLA-4抗体（またはそれに由来するVHおよび/またはVLドメイン）は、当該技術分野で周知の方法を使用して生成することができる。あるいは、当該技術分野で認識されている抗CTLA-4抗体を使用することができる。例えば、米国特許第8,119,129号、WO01/14424、WO98/42752；WO00/37504（CP675,206、トレメリムマブとしても既知；旧称チシリムマブ）、米国特許第6,207,156号、Hurwitz et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(17):10067-10071、Camacho et al. (2004) J Clin Oncology 22(145): Abstract No. 2505（抗体CP-675206）、およびMokyr et al. (1998) Cancer Res 58:5301-5304に開示されている抗CTLA-4抗体は、本明細書に開示される方法で使用することができる。前述の公開文献のそれぞれの教示は、参照により本明細書に組み込まれる。CTLA-4への結合について、これらの当該技術分野で認識されている抗体のいずれかと競合する抗体も使用することができる。例えば、ヒト化CTLA-4抗体は、国際特許出願第WO2001/014424号、同第WO2000/037504号、および米国特許第8,017,114号に記載されており、すべて参照により本明細書に組み込まれる。

【0131】

例示的な抗CTLA-4抗体は、イピリムマブ（10D1、MDX-010、MDX-101、およびYervoy（登録商標）としても既知）またはその抗原結合断片およびバリエーションである（例えば、WO01/14424を参照のこと）。他の実施形態では、抗体は、イピリムマブの重鎖および軽鎖CDRまたはVRを含む。したがって、一実施形態では、抗体は、イピリムマブのVH領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインと、イピリムマブのVL領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインと、を含む。別の実施形態では、抗体は、上記の抗体と同じCTLA-4のエピトープとの結合に関して競合し、および/またはそれに結合する。別の実施形態では、抗体は、上述の抗体と少なくとも約90%の変換領域アミノ酸配列同一性（例えば、イピリムマブと少なくとも約90%、95%、または99%の変換領域同一性）を有する。

【0132】

CTLA-4を調節するための他の分子には、米国特許第5844905号、同第5885796号、ならびに国際特許出願第WO1995/001994号および同第WO1998/042752号（すべて参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているCTLA-4リガンドおよび受容体、ならびに米国特許第8329867号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているイムノアドヘシンが含まれる。

【0133】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、エキスビオで生成された自己抗原特異的T細胞の移入を伴う養子免疫療法であり得る。養子免疫療法において使用されるT細胞は、抗原特異的T細胞の増殖または遺伝子操作を通じたT細胞の再方向付けのいずれかによって生成することができる（Park, Rosenberg et al. 2011）。腫瘍特異的T細胞の単離および移入は、黒色腫の治療に良好であることが示されている。T細胞における新規特異性は、トランスジェニックT細胞受容体またはキメラ抗原受容体（CAR）の遺伝子移入を通じて良好に生成されている（Jena, Dotti et al. 2010）。CARは、単一の融合分子内の1つ以上のシグナル伝達ドメインに関連する標的

化部分からなる合成受容体である。一般に、CARの結合部分は、可動性リンカーによって繋がれたモノクローナル抗体の軽鎖および可変断片を含む、単鎖抗体（scFv）の抗原結合ドメインからなる。受容体またはリガンドドメインに基づく結合部分はまた、良好に使用されている。第1世代CARのシグナル伝達ドメインは、CD3ゼータまたはFc受容体ガンマ鎖の細胞質領域に由来する。CARは、リンパ腫および固形腫瘍を含む種々の悪性腫瘍からの腫瘍細胞の表面に発現される抗原に対してT細胞を良好に再方向付けできる（Jena, Dotti et al. 2010）。

【0134】

一実施形態では、本出願は、がんの治療のための併用療法を提供し、その併用療法は、養子T細胞療法およびチェックポイント阻害剤を含む。一態様では、養子T細胞療法は、自己および/または同種T細胞を含む。別の態様では、自己および/または同種異系T細胞は、腫瘍抗原に対して標的化される。

【0135】

D. 手術

がんを患う人々のおよそ60%は、防止、診断、または進行度診断、治癒、および緩和目的の手術を含む何らかの種類の手術を受ける。治癒目的の手術は、例えば本発明の治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、および/または代替的な療法などの他の療法と併せて使用され得るがん治療である。

【0136】

治癒目的の手術は、がん組織のすべてまたは一部を物理的に除去、切除、および/または破壊する切除を含む。腫瘍切除とは、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去を指す。腫瘍切除に加えて、手術による治療には、レーザー手術、凍結手術、電気手術、および顕微鏡制御手術（モース手術）が含まれる。本発明は、表在性がん、前がん、または偶発的な量の正常組織の除去と併せて使用され得ることがさらに企図される。

【0137】

がん性細胞、組織、または腫瘍の一部またはすべてが切除されると、体内に空洞が形成される場合がある。治療は、さらなる抗がん療法による灌流、直接注射、または領域への局所適用によって達成され得る。そのような治療は、例えば、1、2、3、4、5、6、もしくは7日毎、または1、2、3、4、および5週間毎、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12カ月毎に繰り返されてもよい。これらの治療は、同様に、様々な投与量のものであってもよい。

【0138】

E. 他の薬剤

治療の治療効力を向上させるために、他の薬剤が本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用され得ることが企図される。これらのさらなる薬剤には、細胞表面受容体およびGAP接合部の上方制御に影響する薬剤、細胞増殖抑制剤および分化剤、細胞接着の阻害薬、アポトーシス誘導因子に対する過剰増殖性細胞の感受性を増大させる薬剤、または他の生物学的薬剤が含まれる。GAP接合部の数を増加させることによる細胞間シグナル伝達の増大は、近隣の過剰増殖性細胞集団に対する抗過剰増殖作用を増大させ得る。他の実施形態では、細胞増殖抑制剤または分化剤は、治療の抗過剰増殖効力を向上させるために、本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用することができる。細胞接着の阻害剤は、本実施形態の効力を向上させることが企図される。細胞接着阻害剤の例は、焦点接着キナーゼ（FAK）阻害剤およびロバスタチンである。アポトーシスに対する過剰増殖性細胞の感受性を増大させる他の薬剤、例えば抗体c225が、治療効力を向上させるために、本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用され得ることがさらに企図される。

【0139】

VIII. キットおよび診断

本発明の様々な態様では、治療剤および/または他の治療剤および送達剤を含有するキットが想定される。いくつかの実施形態では、本発明は、本発明の療法を調製および/または施すためのキットを企図する。キットは、本発明の活性なまたは有効な薬剤（複数可

10

20

30

40

50

）を投与するのに使用することができる試薬を含んでもよい。キットの試薬は、遺伝子発現の少なくとも１つの阻害剤（例えば、ＳＴＡＴ３オリゴヌクレオチド）、１つ以上の脂質成分、併用療法の１つ以上の抗がん成分、ならびに本発明の成分を調製、製剤化、および／または投与するか、あるいは本発明の方法の１つ以上のステップを行うための試薬を含んでもよい。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、キットはまた、エッペンドルフチューブ、アッセイプレート、シリンジ、ボトル、またはチューブなどのキットの構成成分と反応しないであろう容器である適当な容器手段も含んでもよい。容器は、プラスチックまたはガラスなどの滅菌可能な材料から作製してもよい。

【０１４１】

キットは、該方法の手順ステップを概説する指示書シートをさらに含むことができ、本明細書に記載されるかまたは当業者に既知であるものと実質的に同じ手順に従う。

【実施例】

【０１４２】

Ⅰ X . 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示された技術は、本発明の実施でよく機能する、本発明者によって発見された技術を表し、したがって、その実施のための好ましい様式を構成するとみなされ得るのは当業者によって認識されるべきである。しかしながら、当業者であれば、本開示の観点から、開示された具体的な実施形態において多くの変更を加えることができ、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果を依然として得ることができると認識すべきである。

【０１４３】

実施例１ - ＳＴＡＴ３を標的化したＰ - エトキシオリゴヌクレオチド

ＳＴＡＴ３を標的化するオリゴヌクレオチドは、ＳＴＡＴ３の発現を阻害するリボソームＳＴＡＴ３アンチセンス製剤で使用するために設計された。ＳＴＡＴ３の連続したｃＤＮＡ配列は、配列番号５に提供され、ＳＴＡＴ３のタンパク質配列は、配列番号６に提供される。オリゴヌクレオチドのそれぞれの配列を、表４に示す。

【表４】

表４．ＳＴＡＴ３アンチセンス配列

配列番号	配列
1	5' -CAA AGT GGC ATG TGA TTC-3'
2	5' -GCT ATA CTG CTG GTC AAT-3'
3	5' -CTT CGT AGA TTG TGC TGA-3'
4	5' -CTG ATA ATT CAA CTC AGG-3'

【０１４４】

リボソームＳＴＡＴ３アンチセンス製剤は、本明細書に記載の方法に従って製造された。質量分析試験は、オリゴヌクレオチド原薬の約８０％が、３～７個のホスホジエステル骨格結合を有したことを示した。粒子試験は、９０％のリボソームが２３１９ｎｍ以下の粒子径を有し、５０％のリボソームが３６８ｎｍ以下の粒子径を有し、約１８％のリボソームが３００ｎｍ以下の粒子径を有したことを示した。

【０１４５】

実施例２ - ｐ - エトキシオリゴヌクレオチドによるＳＴＡＴ３発現の阻害

リボソームＳＴＡＴ３アンチセンスがＳＴＡＴ３の発現を阻害する能力は、２つの肺腺がん細胞株、Ｈ１９７５およびＨＣＣ ８２７で試験した。配列番号４に対応するリボソームＳＴＡＴ３アンチセンス（１８０μｇ／ｍＬ）または同等量の空のリボソームを、各細胞株とともに４日間インキュベートした。図１のデータが示すように、空のリボソームではなくリボソームＳＴＡＴ３アンチセンスとのインキュベーションは、 - アクチンと

比較して、S T A T 3 発現のレベルを低減させた。

【 0 1 4 6 】

実施例 3 - リボソーム S T A T 3 アンチセンスによるがん細胞生存率の阻害

リボソーム S T A T 3 アンチセンスが非小細胞肺がん細胞の生存率を阻害する能力は、3つの肺腺がん細胞株：H 1 9 7 5、H C C 8 2 7、および H 3 5 8 で試験した。配列番号 1 ~ 4 のうちの 1 つに対応するリボソーム S T A T 3 アンチセンスを、各細胞株とともに 4 日間インキュベートした。図 2 A ~ C のデータが示すように、リボソーム S T A T 3 アンチセンスとのインキュベーションは、各細胞株の細胞生存率を低下させ、配列番号 4 に対応するリボソーム S T A T 3 アンチセンスが、最も強力であった。

【 0 1 4 7 】

リボソーム S T A T 3 アンチセンスが白血病細胞の成長を阻害する能力は、3つのヒト白血病細胞株：K - 5 6 2、M V 4 - 1 1、および K a s u m i - 1 で試験した。配列番号 4 に対応するリボソーム S T A T 3 アンチセンスを、各細胞株とともに 4 日間インキュベートした。図 3 A のデータが示すように、リボソーム S T A T 3 アンチセンスとのインキュベーションは、各細胞株の細胞生存率を低下させた。

【 0 1 4 8 】

リボソーム S T A T 3 アンチセンスがリンパ腫細胞の増殖を阻害する能力は、5つのヒトリンパ腫細胞株：D O H H - 2、S U - D H L - 4、S U - D H L - 6、S U - D H L - 1 0、および R L で試験した。配列番号 4 に対応するリボソーム S T A T 3 アンチセンスを、各細胞株とともに 4 日間インキュベートした。図 3 B のデータが示すように、リボソーム S T A T 3 アンチセンスとのインキュベーションは、各細胞株の細胞生存率を低下させた。

* * *

【 0 1 4 9 】

本明細書に開示および特許請求される方法はすべて、本開示の観点から過度の実験なしで行い、実行することができる。本発明の組成物および方法は好ましい実施形態の観点から記述したが、これらの方法に、および本明細書に記載される方法のステップまたはステップの順序において、本発明の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく変更を適用してもよいことは当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的および生理学的に関連するある特定の薬剤は、本明細書において記載された薬剤に代わりに用いながらも、同じまたは類似の結果を達成することができることが明らかであろう。当業者にとって明らかでないすべてのそのような同様な置換および改変は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨、範囲、および概念内にあるとみなされる。

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載されたものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する範囲で、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

米国特許第 4 , 6 5 9 , 7 7 4 号

米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 7 1 号

米国特許第 4 , 8 7 0 , 2 8 7 号

米国特許第 4 , 9 5 9 , 4 6 3 号

米国特許第 5 , 1 4 1 , 8 1 3 号

米国特許第 5 , 2 1 4 , 1 3 6 号

米国特許第 5 , 2 2 3 , 6 1 8 号

米国特許第 5 , 2 6 4 , 5 6 6 号

米国特許第 5 , 3 7 8 , 8 2 5 号

米国特許第 5 , 4 2 8 , 1 4 8 号

米国特許第 5 , 4 4 6 , 1 3 7 号

米国特許第 5 , 4 6 6 , 7 8 6 号

米国特許第 5 , 4 7 0 , 9 6 7 号

米国特許第 5 , 5 3 9 , 0 8 2 号

米国特許第 5 , 5 5 4 , 7 4 4 号	
米国特許第 5 , 5 7 4 , 1 4 6 号	
米国特許第 5 , 6 0 2 , 2 4 0 号	
米国特許第 5 , 6 0 2 , 2 4 4 号	
米国特許第 5 , 6 1 0 , 2 8 9 号	
米国特許第 5 , 6 1 4 , 6 1 7 号	
米国特許第 5 , 6 2 3 , 0 7 0 号	
米国特許第 5 , 6 5 2 , 0 9 9 号	
米国特許第 5 , 6 7 0 , 6 6 3 号	
米国特許第 5 , 6 7 2 , 6 9 7 号	10
米国特許第 5 , 6 8 1 , 9 4 7 号	
米国特許第 5 , 7 0 0 , 9 2 2 号	
米国特許第 5 , 7 0 5 , 6 2 9 号	
米国特許第 5 , 7 0 8 , 1 5 4 号	
米国特許第 5 , 7 1 4 , 3 3 1 号	
米国特許第 5 , 7 1 4 , 6 0 6 号	
米国特許第 5 , 7 1 9 , 2 6 2 号	
米国特許第 5 , 7 3 6 , 3 3 6 号	
米国特許第 5 , 7 3 9 , 1 6 9 号	
米国特許第 5 , 7 6 0 , 3 9 5 号	20
米国特許第 5 , 7 6 3 , 1 6 7 号	
米国特許第 5 , 7 6 6 , 8 5 5 号	
米国特許第 5 , 7 7 3 , 5 7 1 号	
米国特許第 5 , 7 7 7 , 0 9 2 号	
米国特許第 5 , 7 8 6 , 4 6 1 号	
米国特許第 5 , 7 9 2 , 8 4 7 号	
米国特許第 5 , 8 0 1 , 0 0 5 号	
米国特許第 5 , 8 2 4 , 3 1 1 号	
米国特許第 5 , 8 3 0 , 8 8 0 号	
米国特許第 5 , 8 4 6 , 9 4 5 号	30
米国特許第 5 , 8 5 5 , 9 1 1 号	
米国特許第 5 , 8 5 8 , 9 8 8 号	
米国特許第 5 , 8 5 9 , 2 2 1 号	
米国特許第 5 , 8 7 2 , 2 3 2 号	
米国特許第 5 , 8 8 6 , 1 6 5 号	
米国特許第 5 , 8 9 1 , 6 2 5 号	
米国特許第 5 , 9 0 8 , 8 4 5 号	
米国特許第 9 , 7 4 4 , 1 8 7 号	
Amin et al. , Oncogene , 22 : 5 3 9 9 - 5 4 0 7 , 2 0 1 3 .	
Austin - Ward and Villaseca , Revista Medica de Chile , 126 (7) : 8 3 8 - 8 4 5 , 1 9 9 8 .	40
Bailey and Sullivan , Biochimica . Biophys . Acts . , 239 - 252 , 2000 .	
Bangham et al. , J . Mol . Biol , 13 (1) : 253 - 259 , 1965 .	
Bukowski et al. , Clinical Cancer Res . , 4 (10) : 2337 - 2347 , 1998 .	
Christodoulides et al. , Microbiology , 144 (Pt 11) : 3027 - 3037 , 1998 .	
Davidson et al. , J . Immunother . , 21 (5) : 389 - 3	50

- 98, 1998.
- Deamer and Uster, In: Liposome Preparation: Methods and Mechanisms, Ostro (Ed.), Liposomes, 1983.
- Dokka et al., Pharm Res, 17:521-25, 2000.
- duBois et al., J Clin Oncol, 17:46-51, 1999.
- Dubey et al., J. Drug Target, 12:257-264, 2004.
- Duxbury et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 311:786-792, 2003.
- Duxbury et al., Oncogene, 23:1448-1456, 2004. 10
- Egholm et al., Nature, 365(6446):566-568, 1993.
- Elbashir et al., Nature, 411(6836):494-498, 2001.
- 欧州出願 01219
- 欧州出願 266, 032
- Fagard et al., JAKSTAT, 2:e22882, 2013.
- Farhood et al., Biochim. Biophys. Act, 289-295, 1995.
- Fire et al., Nature, 391(6669):806-811, 1998. 20
- Flenniken et al., Dev. Biol., 179:382-401, 1996.
- Froehler et al., Nucleic Acids Res., 14(13):5399-5407, 1986.
- Gabizon, Cancer Invest., 19:424-436, 2001.
- Ghosh and Bachhawat, In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- Gregoriadis, In: Drug Carriers in Biology and Medicine, Gregoriadis (Ed.), 287-341, 1979. 30
- Gutierrez-Puente et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 291:865-869, 1999.
- Halder et al., Clinical Cancer Research, 11:8829-36, 2005.
- Han et al., Ann Surg Oncol, 4:264-268, 1997.
- Hanibuchi et al., Int. J. Cancer, 78(4):480-485, 1998.
- Hannon and Rossi, Nature, 431:371-378, 2004. 40
- Hardee et al., G3 (Bethesda) 3:2173-2185, 2013.
- Hassani et al., J. Gene Med., 7(2):198-207, 2005.
- Hecker et al., Cancer Research, 62:2699-2707, 2002.
- Hellstrand et al., Acta Oncologica, 37(4):347-353, 1998.
- Hortobagyi et al., J. Clin. Oncol., 19:3422-3433, 2001. 50

- Hsia et al., *J Cell Biol*, 160:753 - 67, 2003.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329 - 5336, 1998.
- Jackson et al., *Nat. Biotechnol.*, 21:635 - 637, 2003.
- Jemal et al., *CA Cancer J. Clin.*, 55(1):10 - 30, 2005.
- Judson et al., *Cancer*, 86:1551 - 56, 1999.
- Kaneda et al., *Science*, 243:375 - 378, 1989.
- Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266:3361 - 3364, 1991. 10
- Kim et al., *Nat. Biotechnol.*, 22:321 - 325, 2004.
- Kinch et al., *Clin. Exp. Metastasis*, 20:59 - 68, 2003.
- Klein et al., *Gastroenterology*, 125:9 - 18, 2003.
- Kohn et al., *Int J Cancer*, 97:336 - 43, 2002.
- Kornberg and Baker, *DNA Replication*, 2nd Ed., Freeman, San Francisco, 1992. 20
- Kornberg et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45:4463 - 69, 2004.
- Kornberg, *Head Neck*, 20:634 - 639, 1998.
- Kostarelos et al., *Int J Cancer*, 112:713 - 21, 2004.
- Krasnicip et al., *Int. J. Cancer*, 105(4):561 - 67, 2003.
- Landen, *Cancer Res*, 65:6910 - 18, 2005.
- Langley et al., *Cancer Research*, 63:2971 - 76, 2003. 30
- Lewis et al., *Cell*, 115:787 - 798, 2003.
- Lewis et al., *Nat. Genet.*, 32:107 - 108, 2002.
- Lori et al., *Am. J. Pharmacogenomics*, 2:245 - 52, 2002.
- Matsuda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:16 - 22, 2004.
- McCaffrey et al., *Nature*, 418:38 - 39, 2002.
- McGuire et al., *New England Journal of Medicine*, 334:1 - 6, 1996.
- McLean et al., *Expert Opin Pharmacother*, 4:227 - 34, 2003. 40
- Miklossy et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12:611 - 629, 2013.
- Miller et al., *Biochemistry*, 37(37):12875 - 83, 1998.
- Mitchell et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 690:153 - 166, 1993.
- Mitchell et al., *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856 - 869, 1990.
- Mitra et al., *Nature Reviews Molecular Cell* 50

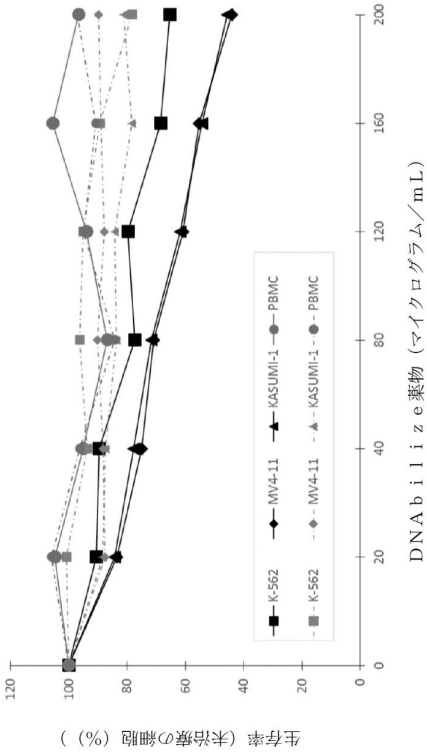
- Biology, 6:56-68, 2005.
- Mitra et al., Proc Am Assoc Cancer Res, 2005.
- Morton et al., Arch. Surg., 127:392-399, 1992.
- Nemoto et al., Pathobiology, 65:195-203, 1997.
- Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
- Noblitt et al., Cancer Gene Ther., 11:757-766, 2004.
- Ogawa et al., Oncogene, 19:6043-6052, 2000. 10
- Owens et al., Cancer Res, 55:2752-2755, 1995.
- Park et al., Cancer Lett., 118:153-160, 1997.
- PCT出願WO92/20702
- PCT出願WO02/100435A1
- PCT出願WO03/015757A1
- PCT出願WO04/002453A1
- PCT出願WO04029213A2
- Pietras et al., Oncogene 17(17):2235-2249, 1998.
- Qin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24): 14411-14416, 1998. 20
- Ravindranath and Morton, Intern. Rev. Immunol., 7:303-329, 1991.
- Reich et al., Mol. Vis., 9:210-216, 2003.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- Rosenberg et al., Ann. Surg. 210(4):474-548, 1989.
- Rosenberg et al., N. Engl. J. Med., 319:1676, 1988. 30
- Ryther et al., Gene Ther., 12(1):5-11, 2004.
- Sambrook et al., In: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.
- Schaller and Parsons, Trends in Cell Biology, 3:258-62, 1993.
- Schaller et al., Mol Biol Cell, 10:3489-3505, 1999.
- Schaller, Biochim Biophys Acta, 1540:1-21, 2001. 40
- Schaller, J Endocrinol, 150:1-7, 1996.
- Schaller, Trends Cell Biol, 3:258-262, 1993.
- Scheit, In: Synthesis and Biological Function, Wiley-Interscience, NY, 171-172, 1980.
- Schlaepfer and Hunter, Trends in Cell Biology, 8:151-57, 1998.
- Schlaepfer et al., Prog Biophys Mol Biol, 71:435-78, 1999.
- Scuto et al., Cancer Res., 71:3182-3188, 2011. 50

- Sein et al., *Oncogene*, 19:5539-42, 2000.
- Sheta et al., *J Natl Cancer inst*, 92:1065-73, 2000.
- Shibata et al., *Cancer Res*, 58:900-903, 1998.
- Sieg et al., *Nat Cell Biol*, 2:249-56, 2000.
- Sioud and Sorensen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 312:1220-1225, 2003.
- Siwak et al., *Clin Cancer Res*, 8:955-56, 2002.
- Sledz et al., *Nat. Cell Biol.*, 5:834-839, 2003. 10
- Song et al., *Nature Med.* 9:347-351, 2003.
- Sonoda et al., *Journal of Biological Chemistry*, 275:16309-15, 2000.
- Sood et al., *Am J Pathol*, 165:1087-1095, 2004.
- Sood et al., *Cancer Biology & Therapy*, 1:511-17, 2002.
- Sorensen et al., *J. Mol. Biol.*, 327:761-66, 2003.
- Soutschek et al., *Nature*, 432:173-178, 2004.
- Spagnou et al., *Biochemistry*, 43:13348-13356, 2004. 20
- Sulman et al., *Genomics*, 40:371-374, 1997.
- Szoka and Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194-4198, 1978.
- Thaker et al., 36th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists, Miami, Fla., 2005.
- Thaker et al., *Clin. Cancer Res.*, 10:5145-5150, 2004.
- Thurston et al., *J. Clin. Invest.*, 101(7):1401-1413, 1998. 30
- Uchida et al., *Mol. Ther.*, 10:162-171, 2004.
- Voskoglou-Nomikos et al., *Clin. Cancer Res.*, 9:4227-4239, 2003.
- Walker-Daniels et al., *Prostate*, 41:275-80, 1999.
- Wianny et al., *Nat. Cell Biol.*, 2:70-75, 2000.
- Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu et al., *J. Hematol. Oncol.*, 4:31, 2011.
- Xia et al., *Nat. Biotechnol*, 20:1006-10, 2002. 40
- Yang et al., *Oncogene*, 22:5694-701, 2003.
- Zelinski et al., *Cancer Res.*, 61:2301, 2001.
- Zhang et al., *J. Biol. Chem.*, 279:10677-684, 2004.

【図 3 A】

【図 3 A】

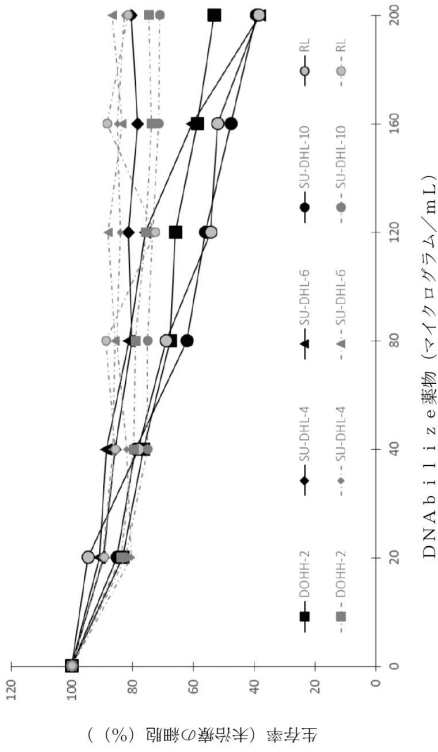
リボソームSTAT3アンチセンスは、白血病細胞株の成長を阻害する



【図 3 B】

【図 3 B】

リボソームSTAT3アンチセンスは、リンパ腫細胞株の成長を阻害する



【配列表】

0007237009000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A

弁護士 山本 健策

(72)発明者

アシザワ , アナ タリ

アメリカ合衆国 テキサス 7 7 4 0 1 , ベルエアー , ベルエアー ブールバード 4 7 1 0 , ス
イート 2 1 0 , バイオ - パス ホールディングス , インコーポレイテッド 気付

審査官

木原 啓一郎

(56)参考文献

米国特許第 0 6 0 1 5 8 8 6 (U S , A)

特表平 1 1 - 5 1 2 0 9 9 (J P , A)

特表 2 0 0 7 - 5 2 3 0 7 4 (J P , A)

(58)調査した分野

(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0