

(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2018-512373

(P2018-512373A)

(43) 公表日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
<b>A61K 31/713</b> (2006.01)	A 61 K 31/713	Z N A	4 C 076
<b>A61K 48/00</b> (2006.01)	A 61 K 48/00		4 C 084
<b>A61K 9/51</b> (2006.01)	A 61 K 9/51		4 C 086
<b>A61K 9/127</b> (2006.01)	A 61 K 9/127		
<b>A61K 47/44</b> (2017.01)	A 61 K 47/44		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-534275 (P2017-534275)	(71) 出願人	000003964 日東電工株式会社 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号
(86) (22) 出願日	平成27年12月28日 (2015.12.28)	(74) 代理人	110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成29年8月23日 (2017.8.23)	(72) 発明者	イン, ウエンビン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オーサンサイド ピアデルモンティ 501
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/067559	(72) 発明者	味呑 憲二郎 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電工株式会社内
(87) 國際公開番号	W02016/106404	(72) 発明者	マジェッティ, バラット アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ ノーベルドライブ4353
(87) 國際公開日	平成28年6月30日 (2016.6.30)		
(31) 優先権主張番号	62/184, 204		
(32) 優先日	平成27年6月24日 (2015.6.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/266, 672		
(32) 優先日	平成27年12月13日 (2015.12.13)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	特願2014-266198 (P2014-266198)		
(32) 優先日	平成26年12月26日 (2014.12.26)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

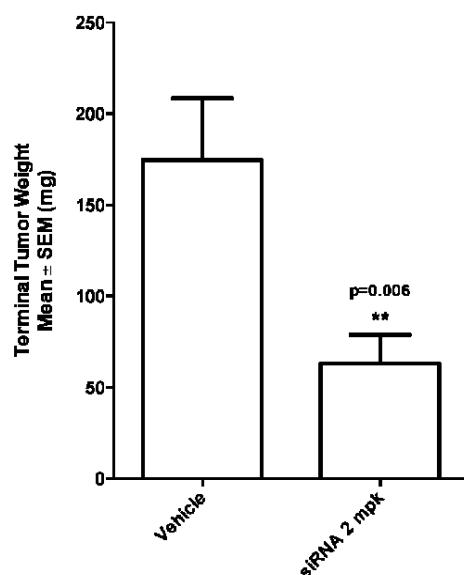
(54) 【発明の名称】 K R A S 突然変異に関連する悪性腫瘍に対する治療のための方法及び組成物

## (57) 【要約】

本発明は、KRAS突然変異に関連する悪性腫瘍の1つ以上の症状を予防、治療又は改善するための方法及び組成物を提供する。哺乳動物の腫瘍細胞を同定する工程、ここで腫瘍細胞は(i) KRAS遺伝子の突然変異及び(ii) KRASタンパク質の異常な発現レベルの少なくとも1つを有する;哺乳動物に、GST- の発現を減少させるのに活性な1つ以上のRNAi分子を含む治療有効量の組成物を投与する工程を含む。

【選択図】図1

FIG. 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

GST- の標的配列に対応するヌクレオチド配列を含むRNAi分子及び薬学的に許容される賦形剤を含む、KRAS遺伝子の突然変異又は野生型KRAS遺伝子の過剰発現に関連する腫瘍の治療又は処置のための医薬組成物。

**【請求項 2】**

前記RNAi分子が、配列番号287の標的配列に対応するヌクレオチド配列を含む二重鎖領域を有する、請求項1記載の医薬組成物。

**【請求項 3】**

前記RNAi分子が、配列番号184に対応するヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖と、配列番号158に対応するヌクレオチド配列を含むセンス鎖とを有する、請求項1記載の医薬組成物。

**【請求項 4】**

前記RNAi分子がsiRNA又はshRNAである、請求項1記載の医薬組成物。

**【請求項 5】**

前記薬学的に許容される賦形剤が、1種以上の脂質化合物を含む、請求項1記載の医薬組成物。

**【請求項 6】**

前記薬学的に許容される賦形剤が脂質ナノ粒子を含む、請求項1記載の医薬組成物。

**【請求項 7】**

前記薬学的に許容される賦形剤がRNAi分子を封入する脂質ナノ粒子を含む、請求項1記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

KRAS突然変異に関連する悪性腫瘍の1つ以上の症状を、それを必要とする哺乳動物において予防、治療又は改善する方法であつて、

(i) KRAS遺伝子の突然変異及び(ii) KRASタンパク質の異常な発現レベルの少なくとも1つを含む、哺乳動物の腫瘍細胞を同定する工程；及び

前記哺乳動物に、GST- の発現を減少させるのに活性な1つ以上のRNAi分子を含む組成物の治療有効量を投与する工程を含む方法。

**【請求項 9】**

前記哺乳動物がヒトであり、前記GST- がヒトGST- である、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

前記RNAi分子がsiRNA又はshRNAである、請求項8記載の方法。

**【請求項 11】**

前記RNAi分子が、配列番号287の標的配列に対応するヌクレオチド配列を含む二重鎖領域を有する、請求項8記載の方法。

**【請求項 12】**

前記RNAi分子が、配列番号184に対応するヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖と、配列番号158に対応するヌクレオチド配列を含むセンス鎖とを有する、請求項8記載の方法。

**【請求項 13】**

前記RNAi分子が、前記哺乳動物におけるGST- の発現を減少させる、請求項8記載の方法。

**【請求項 14】**

前記投与が、哺乳動物におけるGST- の発現を少なくとも5日間で少なくとも5%減少させる、請求項8記載の方法。

**【請求項 15】**

前記投与が、前記哺乳動物の悪性腫瘍の体積を、少なくとも5%、又は少なくとも10%、又は少なくとも20%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は少なくとも50%減少させる、請求項8記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 1 6】**

前記方法は、前記悪性腫瘍の1つ以上の症状を軽減するか、又は前記悪性腫瘍の進行を遅延させるか若しくは終了させる、請求項8記載の方法。

**【請求項 1 7】**

前記投与が、前記被験体における悪性腫瘍細胞の増殖を減少させる、請求項8記載の方法。

**【請求項 1 8】**

前記投与が、前記被験体における悪性腫瘍細胞の少なくとも2%、又は少なくとも5%、又は少なくとも10%、又は少なくとも15%、又は少なくとも20%の増殖を低下させる、請求項8記載の方法。

**【請求項 1 9】**

前記腫瘍細胞が、正常細胞と比較して野生型KRASタンパク質の発現レベルの増加したものである、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 0】**

前記腫瘍細胞が、野生型GST- RNA又はタンパク質を過剰発現する、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 1】**

腫瘍細胞が、残基12、13及び61のうち1以上でKRASタンパク質に変異を有している、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 2】**

前記腫瘍細胞がKRASタンパク質に変異を含み、前記腫瘍が肺癌、結腸癌及び膵臓癌から選択される癌である、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 3】**

前記腫瘍細胞がKRASタンパク質に変異を含み、腫瘍が肺腺癌、粘液腺腫、膵管腺癌及び結腸直腸癌からなる群から選択される肉腫である、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 4】**

前記悪性腫瘍が、肺腺癌、粘液腺腫、膵管腺癌、大腸癌、乳癌及び線維肉腫の群から選択される肉腫である、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 5】**

前記悪性腫瘍が、肺、結腸、膵臓、胆嚢、肝臓、乳房及びそれらの任意の組み合わせの群から選択される解剖学的領域に位置する、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 6】**

前記投与が1日当たり1~12回行われる、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 7】**

前記投与が、1、2、3、4、5、6又は7日間の期間行われる、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 8】**

前記投与が、1、2、3、4、5、6、8、10又は12週間の期間行われる、請求項8記載の方法。

**【請求項 2 9】**

前記投与が、12週間までの期間、1日当たり少なくとも1回、RNAi分子の0.01~2mg/kgの用量である、請求項8記載の方法。

**【請求項 3 0】**

前記投与が、GST- RNAi分子について、平均AUC(0-最終)が1~1000 μg\*分/mLであり、平均C<sub>max</sub>が0.1~50 μg/mLである、請求項8記載の方法。

**【請求項 3 1】**

前記投与が、静脈内注射、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、経口、局所、輸液又は吸入である、請求項8記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、核酸を基礎とする分子からなる生物医薬品及び治療剤の分野に関する。より詳細には、本発明は、癌細胞がKRAS突然変異を含むか又は異常なKRAS発現レベルを示すKRAS関連癌を予防、治療又は改善するための腫瘍療法に関する。本発明はさらに、GST- の発現を阻害する1つ以上のRNAi分子を含有する医薬組成物に関する。

## 【0002】

この出願は、100,000バイトのサイズであるND5123946WO\_SL.txtと名付けられた2015年1月20日に作成されたASCIIファイルとして電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【背景技術】

## 【0003】

グルタチオンS-トランスフェラーゼ (IUBMB EC 2.5.1.18) は、多くの疎水性化合物と還元型グルタチオンを有する求電子性化合物との結合を触媒することで解毒に重要な役割を果たす酵素のファミリーである。それらの生化学的、免疫学的及び構造的特性に基づいて、可溶性GSTは、4つの主なクラス：アルファ、ミュー、パイ及びシータに分類される。これらのタイプのいくつかは、近接した又は最終的な発癌物質、特にマイケル反応アクセプター、ジフェノール、キノン、イソチオシアネート、ペルオキシド、ビシナルジメルカブタンなどを含む求電子剤を解毒することによって発癌を防止するように作用することが示唆されている。しかしながら、腫瘍性細胞では、特定の形態が発現することが知られており、抗癌剤に対する耐性に関与することが知られている。

## 【0004】

GST- 遺伝子 (GSTP1) は、生体異物代謝において機能すると考えられる、機能的に異なる、GSTP1変異タンパク質をコードする多型遺伝子であり、癌の感受性において役割を果たす可能性がある。GST- 遺伝子は、腫瘍細胞において豊富に発現している。例えば、Aliya S. et al. Mol Cell Biochem., 2003年11月; 253 (1-2) : 319-327。グルタチオンS-トランスフェラーゼ- は、ヒトにおいてGSTP1遺伝子によってコードされる酵素である。例えば、Bora PS. et al. (Oct. 1991) J. Biol. Chem., 266 (25) : 16774-16777。GST- アイソザイムはGSHのいくつかのアルキル化抗癌剤とのコンジュゲーションを触媒することが示されており、これはGST- の過剰発現が腫瘍細胞抵抗をもたらすことを示唆している。

## 【0005】

胃癌、食道癌、結腸癌、肺腺癌、肝細胞癌及び胆道癌を含む様々な消化管悪性腫瘍を有する患者において、血清GST- レベルの上昇が観察された。良性の胃腸疾患有する患者は正常なGST- を有したが、慢性肝炎及び肝硬変を有する患者の一部はわずかに上昇した。ステージIII又はIVの胃癌患者の80%以上及びステージI並びにIIの患者の約50%において、血清GST- の上昇を示した。例えば、Niitsu Y. et al. Cancer, 1989年1月15日; 63 (2) : 317-23。口腔癌患者において血漿中のGST- レベルの上昇が認められたが、良性口腔疾患有患者は正常なGST- レベルであった。GST- は、化学療法に対する応答の評価、術後腫瘍切除能又は腫瘍負荷のモニタリング、及び口腔癌患者における腫瘍の再発の予測のための有用なマーカーであることが判明した。例えば、Hirata S. et al. Cancer, 1992 Nov 15:70 (10) :2381-7参照。

## 【0006】

免疫組織化学的研究により、組織学的に腺癌又は扁平上皮癌に分類される多くの癌がGST- を発現することが明らかにされている。血漿又は血清のGST- レベルは、消化管の癌患者の30~50%において増加する。このタイプはまた、シスプラチニン及びダウノルビシンなどの抗癌剤に対する耐性に関与することが示唆されており、癌組織におけるその発現は、癌患者における予後値とすることができる。

## 【0007】

正常ヒトKRAS遺伝子 (V-Ki-ras2キルステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ) のタンパク質産物は、正常組織においてシグナル伝達機能を果たし、KRAS遺伝子の変異は、多くの癌の発生の推定上の一步である。たとえば、Kranenburg O. 2005年11月、Biochim.

10

20

30

40

50

Biophys. Acta、1756 (2) : 81-82参照。KRASタンパク質はGTPアーゼであり、いくつかのシグナル伝達経路に関与している。KRASは、成長因子の増殖に必要なタンパク質及びc-Raf並びにPI3-キナーゼなどの他の受容体のシグナルを活性化する分子オン/オフスイッチとして機能する。

【0008】

KRASにおける突然変異は、肺腺癌、粘液腺腫、膵管腺癌及び大腸癌などの悪性腫瘍に関連する可能性がある。ヒト大腸癌において、KRAS突然変異は、AP-1の活性化を介してGST-の過剰発現を誘導すると考えられる。例えば、Miyanishiら、Gastroenterology、2001; 121 (4) : 865-74参照。

【0009】

突然変異KRASは、結腸癌 (Burmer GC、Loeb LA、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86 (7) :2403-2407)、膵臓癌 (Almoguera Cら、1988、Cell、53 (4) : 549-554) 及び肺癌 (Tam IYら、2006、Clin. Cancer Res.、12 (5) :1647-1653) において見いだされている。KRASは肺腺癌におけるRAS変異の90%を占める (Forbes Sら、Cosmic 2005. Br J Cancer、2006; 94 : 318-322)。

10

【0010】

KRAS遺伝子は、大腸癌においても増幅されることがある。KRAS増幅は、KRAS突然変異と相互に排他的となる。例えば、Valtorta Eら、2013、Int. J.Cancer、133 (5) :1259-65 参照。野生型KRASの増幅も、卵巣癌、胃癌、子宮癌及び肺癌において観察されている。例えば、Chen Yら、2014、PLoS ONE、9 (5) :e98293参照。

20

【0011】

GST- の発現は、いくつかの抗癌剤に対する耐性に関連し得る種々の癌細胞において増加する。例えば、Banら、Cancer Res.、1996,56 (15) :3577-82; Nakajimaら、J Pharmacol Exp Ther.、2003、306 (3) :861-9。

【0012】

GST- を抑制する薬剤は、細胞内でアポトーシスを誘導するものとして開示されている。しかし、そのような組成物及び技術はまた、オートファジーを引き起こし、種々の薬剤による作用の組み合わせを必要とした。例えば、US2014/0315975A1を参照されたい。さらに、GST- の抑制は、腫瘍を縮小又は抑制することは見出されていない。例えば、GST-を過剰発現する癌において、腫瘍の重量はGST- の抑制によって影響されなかつたが、他の効果が観察された。例えば、Hokaiwadoら、Carcinogenesis、2008,29 (6) : 1134-1138を参照されたい。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

KRASに関連する悪性疾患有する患者のための治療を開発するための方法及び組成物が緊急に必要とされている。

【0014】

悪性腫瘍を予防又は治療するための方法及び組成物が必要とされている。悪性腫瘍を予防、治療、低減又は縮小するためのRNAi分子、及び他の構造並びに組成物に対する継続的な必要性が存在する。

40

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、GST- のsiRNA阻害剤による処置によって、悪性腫瘍の大きさをin vivoで低下させることができるといった驚くべき発見に関する。

【0016】

いくつかの実施形態では、KRAS突然変異を含む又は異常なKRAS発現レベルを示す悪性腫瘍は、GST- の発現を調節するsiRNA剤による処置によって減少させることができる。

【0017】

本発明は、悪性腫瘍に対する核酸に基づく治療化合物のための方法及び組成物に関する

50

。いくつかの実施形態において、本発明は、GST- の発現をサイレンシングすることができるRNAi分子、構造及び組成物を提供する。本開示の構造及び組成物は、悪性腫瘍の予防、治療又はサイズ縮小に使用することができる。

【0018】

本発明は、被験体における新生物を治療するために使用できる組成物及び方法を提供する。特に、本発明は、不要なオートファジーを伴わずにKRAS関連新生物を治療するためのGST- 核酸分子又はポリペプチドの発現を減少させることができる治療用組成物を提供する。

【0019】

いくつかの態様では、本発明は、GST- 核酸分子の少なくともフラグメントに対応するか又はそれに相補的であり、細胞内でGST- 発現を減少させる阻害性核酸分子を含む。

【0020】

さらなる態様において、本発明は、GST- 核酸分子の少なくともフラグメントに対応するか、又はそれに相補的であり、細胞におけるGST- 発現を減少させる二本鎖阻害核酸分子を特徴とする。特定の実施形態では、二本鎖核酸分子は、siRNA又はshRNAである。

【0021】

いくつかの態様において、本発明は、上述した阻害性核酸分子をコードするベクターを含む。ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又はレンチウイルスベクターとすることができる。さらなる実施形態では、ベクターは、哺乳動物細胞における発現に適したプロモーターを含むことができる。さらなる実施形態は、KRAS突然変異を含有するか又は異常なKRAS発現レベルを示す癌細胞であって、ベクター又は上記態様のいずれか1つの阻害性核酸分子を含むことができる癌細胞を含んでいる。さらなる実施形態では、細胞はインビボにおける腫瘍性細胞であってもよい。

【0022】

いくつかの実施形態では、本発明は、KRAS突然変異を含むか又は異常なKRAS発現を示す悪性腫瘍細胞におけるGST- 発現を減少させる方法を含む。方法は、GST- 核酸分子の少なくとも一部に対応するか又はそれに相補的な阻害性核酸分子の有効量と細胞を接触させる工程を含み、当該阻害性核酸分子がGST- ポリペプチドの発現を阻害することができ、これにより細胞中のGST- 発現を減少させる。

【0023】

特定の実施形態では、阻害性核酸分子は、遺伝子発現を阻害するために活性であるアンチセンス核酸分子、低分子干渉RNA (siRNA) 又は二本鎖RNA (dsRNA) とすることができる。

【0024】

さらなる実施形態では、本発明の方法は、悪性腫瘍におけるGST- 転写又は翻訳を減少させることができる。

【0025】

特定の実施形態では、本発明は、悪性腫瘍細胞におけるGST- 発現を減少させる方法であり、当該細胞がヒト細胞、腫瘍細胞、インビボ細胞又はインビトロ細胞とすることができる。

【0026】

本発明の実施形態はまた、KRAS突然変異を含有するか又は異常なKRAS発現レベルを示す新生物を有する被験体を治療するための方法を提供することができる。方法は、GST- 核酸分子に対応するか又はそれに相補的な阻害性核酸分子の有効量を被験体に投与する工程を含み、当該阻害性核酸分子がGST- ポリペプチドの発現を阻害し、これにより新生物を治療する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、治療前又は治療なしのサイズと比較して新生物のサイズを減少させることができる。

【0027】

様々な実施形態において、阻害性核酸分子は、リポソーム、ポリマー、マイクロスフェ

10

20

30

40

50

ア、ナノ粒子、遺伝子治療ベクター、又は裸のDNAベクター中に送達することができる。

【0028】

さらなる態様において、本発明は、例えば、新生物癌細胞がKRAS突然変異を含有するか又は異常なKRAS発現レベルを示す新生物を有するヒト患者等の被検者を治療する方法を特徴としている。特定の実施形態では、本方法は、阻害性核酸分子の有効量を被験体に投与する工程を含み、ここで阻害性核酸分子がGST- ポリペプチドの発現を阻害する、アンチセンス核酸分子、siRNA又はdsRNAである。

【0029】

特定の実施形態では、新生物の細胞はGST- を過剰発現する。

【0030】

特定の実施形態において、新生物は、悪性腫瘍、又は肺癌、又は膵臓癌とすることができる。

【0031】

本発明の実施形態は以下を含む：

KRAS遺伝子の突然変異又は野生型KRAS遺伝子の過剰発現に関連する腫瘍の処置又は治療のための医薬組成物であって、当該組成物はRNAi分子及び薬学的に許容される賦形剤を含み、RNAi分子はGST- における標的配列に対応するヌクレオチド配列を含んでいる。

【0032】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、GST- mRNAの標的配列に対応するヌクレオチド配列を含む二重鎖領域を有するRNAi分子を含んでいる。

【0033】

特定の態様において、RNAi分子は、遺伝子発現を抑制するために活性であるsiRNA又はshRNAである。

【0034】

医薬組成物は、1つ以上の脂質化合物のような薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。脂質化合物は、脂質ナノ粒子を含むことができる。特定の実施形態では、脂質ナノ粒子はRNAi分子を封入（カプセル化）することができる。

【0035】

本発明はさらに、それを必要とする哺乳動物におけるKRAS突然変異に関連する悪性腫瘍の1つ以上の症状を予防、治療又は改善するための方法であって、

(i) KRAS遺伝子の突然変異及び(ii) KRASタンパク質の異常な発現レベルの少なくとも1つを含む、哺乳動物の腫瘍細胞を同定する工程；及び

前記哺乳動物に、GST- の発現を減少させるのに活性な1つ以上のRNAi分子を含む組成物の治療有効量を投与する工程を含む。

【0036】

このような方法では、哺乳動物をヒトとすることができます、GST- をヒトGST- とすることができる。RNAi分子は、siRNA、shRNA又はマイクロRNAとすることができる。

【0037】

特定の実施形態では、RNAi分子は二重鎖領域を有することができ、二重鎖領域はGST- mRNAの標的配列に対応するヌクレオチド配列を含むことができる。RNAi分子は、哺乳動物においてGST- の発現を減少させることができる。

【0038】

いくつかの実施形態では、投与は、哺乳動物におけるGST- の発現を少なくとも5日間で少なくとも5%減少させることができる。特定の実施形態では、投与は、哺乳動物の悪性腫瘍の体積を、少なくとも5%、又は少なくとも10%、又は少なくとも20%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は少なくとも50%減少させることができる。さらなる実施形態では、この方法は、悪性腫瘍の1つ以上の症状を軽減することができ、又は悪性腫瘍の進行を遅延若しくは終了させることができる。

【0039】

特定の実施形態では、投与は、被験体における悪性腫瘍細胞の増殖を減少させることができ

10

20

30

40

50

できる。投与は、被験体の悪性腫瘍細胞の少なくとも2%、又は少なくとも5%、又は少なくとも10%、又は少なくとも15%、又は少なくとも20%の増殖を減少させることができる。

【0040】

一般に、腫瘍細胞は、正常細胞におけるレベルと比較して、野生型KRASタンパク質の発現のレベルを増加させることができる。いくつかの実施形態において、腫瘍細胞は、野生型GST- RNA又はタンパク質を過剰発現する。

【0041】

特に、腫瘍細胞は、残基12、13及び61の1つ以上においてKRASタンパク質に変異を有することができる。

10

【0042】

本発明は、腫瘍細胞がKRASタンパク質に変異を有することができ、腫瘍を肺癌、大腸癌及び膵臓癌から選択される癌とすることを企図している。

【0043】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞はKRASタンパク質に変異を有することができ、腫瘍を肺癌、粘液腺腫、膵管腺癌及び大腸癌からなる群から選択される肉腫とすることができる。特定の実施形態では、悪性腫瘍は、肺癌、粘液腺腫、膵管腺癌、大腸癌、乳癌及び線維肉腫の群から選択される肉腫とすることができる。また、悪性腫瘍は、肺、結腸、膵臓、胆嚢、肝臓、乳房、及びそれらの任意の組み合わせの群から選択される解剖学的領域に位置することができる。

20

【0044】

本発明の態様は、1日1回から12回の投与を行う方法を提供することができる。投与は、1、2、3、4、5、6又は7日間の期間にわたって行うことができる。特定の実施形態では、投与は、1、2、3、4、5、6、8、10又は12週間の期間にわたって行うことができる。

【0045】

投与のための用量は、12週間までの期間において、1日に少なくとも1回、RNAi分子の0.01～2mg/kgとすることができます。いくつかの実施形態では、投与は、GST- RNAi分子について、1～1000μg/分/mLの平均AUC(0-最終)及び0.1～50μg/mLの平均C<sub>max</sub>を提供することができる。

30

【0046】

投与は、静脈内注射、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、経口、局所、輸液又は吸入とすることができます。

【0047】

これらの態様及び他の態様は、以下の図面と併せて以下の実施形態の説明から明らかになるであろうが、これらに対する変形及び修飾は、本開示の新規な概念の精神及び範囲から逸脱することなく影響を受けることができる。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1は、GST- を標的とする本発明のsiRNAがインビボにおいて同所性肺癌腫瘍を著しく減少させたことを示している。GST- siRNAを、A549同所性肺癌腫瘍を提示する無胸腺ヌードマウスに2mg/kgの用量でリポソーム製剤として投与した。最終原発腫瘍重量は、処置群及びビヒクリ对照群の剖検時に測定した。GST- siRNAは、この6週間の研究において肺癌腫瘍の阻害に対して有意な効力を示した。図1に示すように、43日後、GST- siRNAは著しく有利な腫瘍阻害を示し、最終原発腫瘍平均重量は対照と比較して2.8倍有意に減少した。

40

【図2】図2は、GST- siRNAについてインビボにおける腫瘍阻害効力を示している。A549細胞を用いた癌異種移植モデルを、0.75mg/kgで比較的低用量のsiRNAで使用した。GST- siRNAは、数日以内に有利な腫瘍阻害を示した。36日後、GST- siRNAは著しく有利な腫瘍阻害を示し、最終腫瘍平均体積は対照と比較して約2倍有意に減少した。

【図3】図3は、図2のエンドポイントにおけるGST- siRNAのインビボでの腫瘍阻害効力

50

を示している。GST- siRNAは、平均腫瘍重量が2倍以上減少するといった有利な腫瘍阻害を示した。

【図4】図4は、本発明のGST- siRNAがインビトロにおいてアポトーシスにより癌細胞死を大幅に増加させたことを示している。GST- siRNAは、細胞生存率の低下に関連するアポトーシスのバイオマーカーであるPUMAのアップレギュレーションを引き起こした。図4に示すように、PUMAの発現は、GST- siRNAのトランスフェクションの2~6日後に大きく増加した。

【図5】図5は、本発明のGST- siRNAがA549異種移植片腫瘍に対するインビオにおけるノックダウン効果を示している。GST- mRNAの用量依存的ノックダウンが、胸腺欠損ヌード(nu/nu)雌マウス(Charles River)において、GST- を標的とするsiRNAを用いることで観察された。図5に示すように、4mg/kgの用量では、注入後24時間でGST- mRNAにおいて約40%の有意な減少が検出された。

【図6】図6は、本発明のGST- siRNAがin vivoで臍臓癌異種移植片腫瘍を阻害したことを示している。GST- siRNAは、6~8週齢の胸腺欠損ヌード雌マウスの臍臓癌異種移植片腫瘍にリポソーム製剤で投与した場合、インビオで遺伝子サイレンシング効力をもたらした。図6に示すように、用量応答は、GST- を標的とするsiRNAの0.375mg/kg~3mg/kgの範囲の用量で得られた。GST- siRNAは投与後数日以内に有利な腫瘍阻害を示し、腫瘍体積はエンドポイントで約2倍減少した。

【図7】図7は、本発明のGST- siRNAにおける血清安定性が増加したことを示している。図7に示すように、GST- siRNAのセンス鎖(図7、上部)及びアンチセンス鎖(図7、下部)の血清中の半減期( $t_{1/2}$ )は約100分であった。

【図8】図8は、血漿中において、本発明のGST- siRNAが製剤として安定性が向上したことを示している。図8は、50%ヒト血清中のGST- siRNAのリポソーム製剤のPBS中のインキュベーション及び様々な時点での残存するsiRNAの検出を示している。図8に示すように、GST- siRNAの製剤の血漿中半減期( $t_{1/2}$ )は100時間より有意に長かった。

【図9】図9は、GST- siRNAのガイド鎖のインビトロノックダウンを示す。図9に示すように、GST- siRNAのガイド鎖ノックダウンは、効果を示さないスクランブル配列を有する対照と比較して、ほぼ指数関数的であった。

【図10】図10は、図9のGST- siRNAにおけるパッセンジャー鎖についてのインビトロノックダウンを示している。図10に示すように、GST- siRNAについてパッセンジャー鎖のオフターゲットノックダウンは緩やかに低減しており、本質的に効果が無いことを示している。

【図11】図11は、いくつかの高活性GST- siRNAのガイド鎖についてインビトロノックダウンを示している。図11に示すように、GST- siRNAのガイド鎖ノックダウン活性はほぼ指数関数的であった。

【図12】図12は、図11のGST- siRNAのパッセンジャー鎖についてインビトロノックダウンを示している。図12に示すように、GST- siRNAのパッセンジャー鎖のオフターゲットノックダウン活性は、約500pM未満に有意に低下した。

【図13】図13は、高活性GST- siRNAのガイド鎖についてのインビトロノックダウンを示している。図13に示すように、GST- siRNAのガイド鎖ノックダウン活性はほぼ指数関数的であった。

【図14】図14は、図13のGST- siRNAのパッセンジャー鎖についてのインビトロノックダウンを示している。図14に示すように、GST- siRNAのパッセンジャー鎖のオフターゲットノックダウン活性は有意に減少した。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0049】

本発明は、被験体における新生物の治療のため、GST- 核酸分子又はポリペプチドの発現を減少させる治療組成物を利用する方法を提供する。ここで新生物は、KRAS突然変異を含むか又は異常なKRAS発現レベルを示す細胞と関連している。

#### 【0050】

10

20

30

40

50

本発明の治療用組成物は、阻害性核酸分子、例えばsiRNA、shRNA及びアンチセンスRNAを含むことができる。

【0051】

GST- は、GSTP1遺伝子によってコードされ、グルタチオン抱合を触媒する酵素を示す。GST- は、ヒトを含む様々な動物に存在し、その配列情報はNCBIデータベースアクセスション番号（例えば、ヒト：NP\_000843 (NM\_000852)、ラット：NP\_036709 (NM\_012577)、マウス：NP\_038569 (NM\_013541) 等）で与えられる。

【0052】

「GST- ポリペプチド」は、GST- コード配列によってコードされるタンパク質の少なくとも一部と実質的に同一であるタンパク質又はタンパク質改変体又はその断片を意味する。「GST- 核酸分子」とは、GST- ポリペプチド又はその変異体又はその断片をコードするポリヌクレオチドを意味する。

10

【0053】

生物個体間の遺伝子配列又はアミノ酸配列の変異の発生は、タンパク質の生理学的機能を損なうものでなくともよい。本発明におけるGST- 及びGSTP1遺伝子は、本明細書に記載のGST- 配列と同一の配列を有するタンパク質又は核酸に限定されるものではなく、上記配列と1以上のアミノ酸が異なる配列、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸又は塩基が異なる配列であって、既知のGST- と同等の機能を有するものを含むことができる。

20

【0054】

ヒトグルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子 (GST- )、完全CDS、GenBankアクセスション番号：U12472の配列を表1に示す。

【0055】

【表1】

ヒトGSTπ遺伝子の完全配列(配列番号1)

1	gtggctcacc	tgtaccgc	acttgggaag	ccgaggcgtg	cagatcacct	aagtcaggag		
61	ttcgagacca	gcccgccaa	catggtaaa	ccccgtct	actaaaaata	aaaaatcag		
121	ccagatgtgg	cacgcaccta	tatccaccta	ctcgggaggc	tgaagcagaa	tgcttaacc		
181	gagaggcgg	ggttgcagt	agccgcccag	atcgccac	tgcactccag	cctggccac		
241	agcgtgagac	tactcataaa	ataaaataaa	ataaaataaa	ataaaataaa	ataaaataaa		
301	ataataaaat	aaaataaaat	aaaataaaat	ataaaataaa	ataaaataaa	ataaaataaa		
361	ataaaataaa	ataaaagcaa	tttccttcc	tctaagcggc	ctccacccct	ctcccctgcc	10	
421	ctgtgaacgg	gggaagctcc	ggatgcgc	aattaggaa	tttccccccg	cgatgtcccg		
481	gcgcgccagt	tcggcgcaca	tcttcgct	cggtcctt	cctgtgtct	gtttactccc		
541	taggcccctg	gacctggaa	agagggaaag	gttcccgc	agctgcgcgg	cgactccggg		
601	gactccaggg	cgccccctg	cggcgcacgc	cgggtgcagc	ggccgcggg	ctggggccgg		
661	cgggactccg	cgggaccctc	cagaagagcg	gccggcggct	gactcagcac	tggggcggag		
721	gggcgggaca	cccttataag	gctcgagcg	cgagcctcg	ctggagttc	gccgcgcag		
781	tcttcgcccac	cagttagtac	gcggccgcgt	ccccggggat	ggggctcaga	gtccagcat		
841	ggggccaacc	cgcagcatca	ggccgggctc	ccggcggcct	ccccacccctg	agaccgggaa	20	
901	cggggcctag	gggaccagg	acgtcccagt	gccgttagcg	gtttcaggg	ggcccgagc		
961	gcctcgggaa	ggatggac	cccgggggcg	ggagggcagc	tcactcaccg	cgccctggca		
1021	tcctccccgg	gctccacaaa	ttttcttgc	tgcgtcagt	gccgcctac	accgtggct		
1081	attttccagt	tcgaggttag	agcatgtgtc	tggcagggaa	gggaggcagg	ggctggggct		
1141	gcagcaccca	cagccccac	ccggagagat	ccgaaccccc	ttatccctcg	tgcgtgtc		
1201	ttaccccccgg	cctccttcct	gttccccgccc	tctccgc	tgcctgtcc	ccgccccagt		
1261	gttgtgtgaa	atttcggag	gaacctgttt	ccctgttccc	tccctgcact	cctgaccct		
1321	ccccgggtt	ctgcgaggcg	gagtcggccc	gttccccaca	tctcgactt	ctccctcccc		
1381	gcaggccgct	gcgcggccct	gcgcgtct	ctggcagatc	agggccagag	ctggaaggag	30	
1441	gaggtggta	ccgtggagac	gtggcaggag	ggctcacta	aagcctcctg	cgttaagtgc		
1501	catccccggg	caaggggagg	gggtgctggg	ccttaggggg	ctgtgactag	gatcggggga		
1561	cgcggccaa	tcagtcccc	tccctgagcc	atgcctcccc	caacagctat	acgggcagct		
1621	ccccaaatcc	caggacggag	acctcaccc	gtaccagtcc	aataccatcc	tgcgtcacct		
1681	gggcccgcacc	cttggtgagt	cttgcaccc	caagtcagg	gcaggcatgg	gcaaggctct		
1741	ccccccggag	ccctttgtt	taaatcagct	ccccgcagc	cctctggagt	ggaggaaact		
1801	gagacccact	gaggttacgt	agtttgc	aggtcaagcc	tgggtgcctg	caatccttgc		
1861	cctgtgccag	gctgcctccc	aggtgtcagg	tgagctctg	gcacctgctg	tgtggcagtc		
1921	tctcatcctt	ccacgcacat	cctcttcccc	tcctcccagg	ctggggctca	cagacagccc		
1981	cctgggtggc	ccatccccag	tgactgtgtt	gatcaggcgc	ccagtcacgc	ggcctgctcc		
2041	cctccaccca	accccaggc	tctatggaa	ggaccagcag	gaggcagccc	tggtgacat		
2101	ggtgaatgac	ggcgtggagg	acctccgct	caaatacatc	tccctcatct	acaccaacta		
2161	tgtgagcatc	tgcaccaggg	ttgggcactg	ggggctgaac	aaagaaaggg	gtttcttgc	40	

2221 ccctcaccccc ccttaccctt caggtggctt gggctgaccc cttcttgggt cagggtgcag  
 2281 gggctgggtc agctctggc cagggggcc tggacaaga cacaacctgc acccttattg  
 2341 cctggacat caaccaccca agtaacgggt catggggcg agtgcagga cagagaccc  
 2401 cagcaactgg tggtttctgc ttcctgggg tggccagagg tggaggagga tttgtgccag  
 2461 tttctggatg gagccgctgg cgcttttagc tgaggaaaat atgagacaca gagcactttg  
 2521 ggtaccaggg accagttcag cagaggcagc gtgtgtggcg tgtgtgtgcg tgtgtgtgcg  
 2581 tgtgtgtgtg tacgcttgca tttgtgtcgg gtggtaagg agatagagat gggcgccag  
 2641 taggcccagg tcccgaaaggc cttgaaccca ctggtttggta gtctcctaag ggcaatgggg  
 2701 gccattgaga agtctgaaca gggctgtgtc tgaatgtgag gtctagaagg atcctccaga  
 2761 gaagccagct ctaaagcttt tgcaatcatc tggtgagaga acccagcaag gatggacagg  
 2821 cagaatggaa tagagatgag ttggcagctg aagtggacag gatttggtagc tagcctgggt  
 2881 gtggggagca agcagaggag aatctggac tctgggtgtct ggcctggggc agacgggggt  
 2941 gtctcagggg ctgggaggga tgagagtagg atgatacatg gtgtgtgcg gcaggaggcg  
 3001 ggcaaggatg actatgtgaa ggcactgccc gggcaactga agcctttga gaccctgctg  
 3061 tcccagaacc agggaggcaa gacccatttgcgtt gttggagacc aggtgagcat ctggcccat  
 3121 gctgttcctt cctcgccacc ctctgcttcc agatggacac aggtgtgagc catttggta  
 3181 gcaaagcaga gcagacccatggatgggtct taggcccattt cctctccagc  
 3241 ctgctccgc tggctgagtc cctagccccctt ctgcctgcgatctccttc gctgactaca  
 3301 acctgctgga cttgctgctg atccatgagg tcctagccccctt gatgcgttcc  
 3361 ccctgctctc agcatatgtg gggcgccctca gtgcccggcc caagctcaag gccttcctgg  
 3421 cctccctga gtacgtgaac ctcccatca atggcaacgg gaaacagtga gggttgggg  
 3481 gactctgagc gggaggcaga gtttgccttc ctttctccag gaccaataaa agggctaaga  
 3541 gagctactat gacactgtg tttcctggta cggggcttag gggttctcag cctc

10

20

30

## 【0056】

KRAS関連悪性腫瘍又はKRAS関連癌は、本明細書において、(a)体細胞KRAS突然変異を含む癌細胞又は腫瘍細胞、若しくは(b)KRASの異常発現レベルを有する癌細胞又は腫瘍細胞であって、特に限定されないが、正常な非癌細胞で見出されるレベルと比較したときの、KRASをコードするDNAの増幅、KRAS遺伝子の過剰発現又はKRAS遺伝子の過小発現を含む癌細胞又は腫瘍細胞、として定義される。

## 【0057】

表2は、KRASタンパク質のアミノ酸配列を示し、癌に関連する突然変異を同定している。

## 【0058】

## 【表2】

KRASタンパク質のアミノ酸配列及び癌に関連する突然変異(配列番号2)

KRASタンパク質コーディング配列、アイソフォーム2A(識別子:P01116-1)					
10	20	30	40	50	
MTEYKLVVVG	AGGVGKSA	L IQLNHFVD	EYDPTIEDSY	RKQVVIDGET	
60	70	80	90	100	
CLLDILD	TAG QEEYSAMRDQ	YMRTGEGFLC	VFAINNTKSF	EDIHHYREQI	
110	120	130	140	150	10
KRVKDSEDVP	MVLVGNKCDL	PSRTVDTKQA	QDLARSYGIP	FIETSAKTRQ	
160	170	180			
RVEDAFYTLV	REIRQYRLKK	ISKEEKTPGC	VKIKKCIIM		
位置12の変異:					
G→A(大腸癌サンプルにおける)					
G→C(肺癌における)					
G→D(膵臓癌、胃癌(GASC)及び肺癌における)					
G→S(肺癌及び胃癌における)					
G→V(肺癌、膵臓癌、結腸癌及び胃癌における)					
位置13の変異:					
G→D(乳癌細胞株及び胃癌における)					
G→R(毛様細胞性星状細胞腫における;Rasパスウェイの増幅)					
位置61の変異:					
Q→H(肺癌における)					
Q→R(大腸癌における)					

## 【0059】

QIAGENのTHERASCREEN KRAS TESTは、大腸癌細胞におけるKRAS遺伝子の7つの突然変異の存在を検出するために設計された遺伝子検査である。

## 【0060】

治療用組成物

被験体がKRAS突然変異又はKRAS増幅に関連する、例えば肺癌又は膵臓癌といった新生物を有すると診断された後、GST- の抑制を伴う治療方法が選択される。

## 【0061】

一実施形態では、本発明の阻害性核酸分子は、約1～100mg/kg、例えば、1、5、10、20、25、50、75又は100mg/kgの投薬量で全身投与される。

## 【0062】

さらなる実施形態において、投薬量を約25～500mg/m<sup>2</sup>/日の範囲とすることができます。

## 【0063】

ここで、GST- を抑制する薬剤としては、GST- の産生及び/又は活性を抑制する薬剤、GST- の分解及び/又は不活性化を促進する薬剤などが挙げられる。GST- 産生を抑制する薬剤としては、RNAi分子、リボザイム、アンチセンス核酸、GST- をコードするDNAのDNA/RNAキメラポリヌクレオチド又はそれらを発現するベクターが挙げられる。

## 【0064】

GST- 及びRNAi分子

当業者は、報告された配列が経時的に変化することがあり、それに応じて本明細書中の核酸分子に必要な変化を組み込むことができることを理解するであろう。

## 【0065】

本発明の実施形態は、小核酸分子を用いたGST- 発現の遺伝子サイレンシングのための組成物及び方法を提供することができる。核酸分子としては、RNA干渉(RNAi分子)、短鎖干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)及び短鎖ヘアピンRNA

10

20

30

40

50

(shRNA)分子において活性な分子が含まれる。そのような分子は、GST- 遺伝子発現に対するRNA干渉を媒介することができる。

【0066】

本明細書に開示される組成物及び方法はまた、被験体における様々な種類の悪性腫瘍の治療において使用することができる。

【0067】

本発明の核酸分子及び方法は、GST- をコードする遺伝子の発現をダウンレギュレートするために使用される。

【0068】

本発明の組成物及び方法は、1以上の核酸分子を含むことができ、単独で或いは組み合わせて、GST- タンパク質及び/又はGST- タンパク質をコードする遺伝子、例えば、悪性腫瘍等の疾患、並びにGST- に関連する状態又は疾病の維持及び/又は発症に関与するタンパク質及び/又はGST- をコードする遺伝子の発現を調節又は制御することができる。

10

【0069】

本発明の組成物及び方法は、GST- の例示的な配列を参照して記載される。当業者は、本発明の様々な態様及び実施形態が、関連するGST- 遺伝子、配列、又はホモログ遺伝子及び転写変異体といった変異体、並びにGST- 遺伝子に関連する一塩基多型 (SNP) を含む多型を対象とすることを理解するであろう。

20

【0070】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法は、GST-pi遺伝子、例えばヒトGST-piの発現をダウンレギュレートする二本鎖短干渉核酸 (siRNA) 分子を提供することができる。

20

【0071】

本発明のRNAi分子は、GST- を標的とすることことができ、及び、例えば相補的配列を用いて、又は非標準塩基対、例えばミスマッチ及び/又はウォブル塩基対を組み込むことによって更なる標的配列を提供できる任意の相同配列を標的とすることができます。

【0072】

ミスマッチが同定される場合、非標準的な塩基対、例えば、ミスマッチ及び/又はウォブル塩基を用いて、2つ以上の遺伝子配列を標的とする核酸分子を生成することができる。

30

【0073】

例えば、UU及びCC塩基対などの非標準塩基対を使用して、配列相同性を有する異なるGST- 標的のための配列を標的にできる核酸分子を生成できる。したがって、RNAi分子は、相同遺伝子間で保存されているヌクレオチド配列を標的とすることができます、単一のRNAi分子を用いて2つ以上の遺伝子の発現を阻害することができる。

【0074】

いくつかの態様では、本発明の組成物及び方法は、GST- mRNAに対して活性であるRNAi分子を含み、RNAi分子はGST- 配列をコードする任意のmRNAに相補的な配列を含む。

40

【0075】

いくつかの実施形態では、本開示のRNAi分子は、GST- RNAに対して活性を有することができ、RNAi分子は、変異体GST- をコードする配列を有するRNA、例えば、悪性腫瘍に関連することができる当該分野で公知の突然変異GST-pi遺伝子のRNAに相補的な配列を含んでいる。

【0076】

さらなる実施形態では、本発明のRNAi分子は、GST- 遺伝子発現のサイレンシングを媒介することができるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0077】

GST- mRNAを標的とする本発明のRNAi分子の例を表3に示す。

【0078】

50

【表3】

GST-πのRNAi分子配列

ID	Ref Pos	配列番号	センス鎖 (5'-->3') 配列番号 3~67	配列番号	アンチセンス鎖 (5'-->3') 配列番号 68~132
A1	652	3	UCCCAGAACCAAGGGAGGCtt	68	UGCCUCCCUGGUUCUGGGAca
A10	635	4	CUUUUGAGACCCUGCUGUCtt	69	GACAGCAGGGUCUAAAAGgc
A11	649	5	CUGUCCCAGAACCAAGGGAGtt	70	CUCCCUGGUUCUGGGACAGca
A12	650	6	UGUCCCAGAACCAAGGGAGGtt	71	CCUCCCUGGUUCUGGGACAgc
A13	631	7	AAGCCUUUUGAGACCCUGCtt	72	GCAGGGUCUAAAAGGCUUca
A14	638	8	UUGAGACCCUGCUGUCCCAtt	73	UGGGACAGCAGGGUCUCAAaa
A15	636	9	UUUUGAGACCCUGCUGUCCtt	74	GGACAGCAGGGUCUAAAAGg
A16	640	10	GAGACCCUGCUGUCCCAGtt	75	UCUGGGACAGCAGGGUCUcaa
A17	332	11	GCUGGAAGGAGGAGGUGGUtt	76	ACCACCUCCUCCUCCAGCtc
A18	333	12	CUGGAAGGAGGAGGUGGUtt	77	CACCACCUCCUCCUCCAGCt
A19	321	13	UCAGGGCCAGAGCUGGAAGtt	78	CUUCCAGCUCUGGCCUGAtc
A2	639	14	UGAGACCCUGCUGUCCCAGtt	79	CUGGGACAGCAGGGUCUcaa
A20	323	15	AGGGCCAGAGCUGGAAGGAtt	80	UCCUCCAGCUCUGGCCUga
A21	331	16	AGCUGGAAGGAGGAGGUGGtt	81	CCACCUCCUCCUCCAGCt
A22	641	17	AGACCCUGCUGUCCCAGAAtt	82	UUCUGGGACAGCAGGGUCUca
A23	330	18	GAGCUGGAAGGAGGAGGUGtt	83	CACCUCCUCCUCCAGCUCtg
A25	647	19	UGCUGUCCCAGAACCAAGGtt	84	CCCUGGUUCUGGGACAGCAGg
A26	653	20	CCCAGAACCAAGGGAGGCAAtt	85	UUGCCUCCCUGGUUCUGGGAc
A3	654	21	CCAGAACCAAGGGAGGCAAGtt	86	CUUGCCUCCCUGGUUCUGGga
A4	637	22	UUUUGAGACCCUGCUGUCCCtt	87	GGGACAGCAGGGUCUAAAAGa
A5	642	23	GACCCUGCUGUCCCAGAACtt	88	GUUCUGGGACAGCAGGGUCt
A6	319	24	GAUCAGGGCCAGAGCUGGAtt	89	UCCAGCUCUGGCCUGAUAtg
A7	632	25	AGCUUUUUGAGACCCUGCtt	90	AGCAGGGUCUAAAAGGCt
A8	633	26	GCCUUUUGAGACCCUGCUGtt	91	CAGCAGGGUCUAAAAGGt
A9	634	27	CCUUUUGAGACCCUGCUGtt	92	ACAGCAGGGUCUAAAAGGt
AG7	632	28	CGCCUUUUGAGACCCUGCtt	93	UGCAGGGUCUAAAAGGCGt
AK1	257	29	CCUACACCGUGGUCUAUUUtt	94	AAAUAGACCACGGUGUAGGgc
AK10	681	30	UGUGGGAGACCAGAUCUCCtt	95	GGAGAUCUGGUCUCCCACAt
AK11	901	31	GCGGGAGGCAGAGUUUGCtt	96	GGCAAACUCUGCCUCCCGt
AK12	922	32	CCUUUCUCCAGGACCAAUAtt	97	UAUUGGUCCUGGAGAAAGGaa
AK13/A24	643	33	ACCCUGCUGUCCCAGAACtt	98	GGUUCUGGGACAGCAGGGU
AK2	267	34	GGUCUAAAUCCCAGUUCGAtt	99	UCGAACUGGGAAAUAGACCac
AK3	512	35	CCCUGGUGGACAUGGUGAAtt	100	UUCACCAUGUCCACCAGGGt
AK4	560	36	ACAUCUCCCUCAUCAUCACtt	101	GUGUAGAUGAGGGAGAUGUat

10

20

30

40

ID	Ref Pos	配列番号	センス鎖 (5'→3') 配列番号 3~67	配列番号	アンチセンス鎖 (5'→3') 配列番号 68~132
AK5	593	37	GCAAGGAUGACUAUGUGAAtt	102	UUCACAUAGUCAUCCUJUGCcc
AK6	698	38	CCUUCGCUGACUACAACCtt	103	AGGUUGUAGUCAGCGAAGGag
AK7	313	39	CUGGCAGAUCAGGGCCAGAtt	104	UCUGGCCUGAUCUGCCAGca
AK8	421	40	GACGGAGACCUCACCCUGUtt	105	ACAGGGUGAGGUCCUCGUCct
AK9	590	41	CGGGCAAGGAUGACUAUGUtt	106	ACAUAGUCAUCCUUGCCGcc
AU10	635	42	CUUUUGAGACCCUGCUGUAtt	107	UACAGCAGGGUCUCAAAAGGgc
AU23	330	43	GAGCUGGAAGGAGGAGGUAtt	108	UACCUCCUCCUUCCAGCUCtg
AU24	643	44	ACCCUGCUGUCCCAGAACAtt	109	UGUUCUGGGACAGCAGGGUct
AU25	648	45	UGCUGUCCCAGAACCCAGGAtt	110	UCCUGGUUCUGGGACAGCAgg
AU7	632	46	AGCCUUUUGAGACCCUGCUGAtt	111	UGCAGGGUCUCAAAAGGCUtc
AU9	634	47	CCUUUUGAGACCCUGCUGAtt	112	UCAGCAGGGUCUCAAAAGGct
B1	629	48	UGAAGCCUUUUGAGACCCUtt	113	AGGGUCUCAAAAGGCUUCAg
B10	627	49	ACUGAAGCCUUUUGAGACCCtt	114	GGUCUCAAAAGGCUUCAGUtg
B11	596	50	AGGAUGACUAUGUGAAGGCtt	115	GCCUUCACAUAGUCAUCCUtg
B12	597	51	GGAUGACUAUGUGAAGGCAtt	116	UGCCUUCACAUAGUCAUCCtt
B13	598	52	GAUGACUAUGUGAAGGCACtt	117	GUGCCUUCACAUAGUCAUct
B14	564	53	CUCCCUCACUACACCAACAtt	118	GUUGGUGUAGAUGAGGGAGAt
B2	630	54	GAAGCCUUUUGAGACCCUGtt	119	CAGGGUCUCAAAAGGCUUCag
B3	563	55	UCUCCCUCACUACACCAACAtt	120	UUGGUGUAGAUGAGGGAGAtg
B4	567	56	CCUCAUCUACACCAACUAUtt	121	AUAGUUGGUGUAGAUGAGGGga
B5	566	57	CCCUCAUCUACACCAACUAAtt	122	UAGUUGGUGUAGAUGAGGGag
B6	625	58	CAACUGAAGCCUUUUGAGAtt	123	UCUAAAAGGCUUCAGUUGcc
B7	626	59	AACUGAAGCCUUUUGAGACCTt	124	GUCUAAAAGGCUUCAGUUgc
B8	628	60	CUGAAGCCUUUUGAGACCCtt	125	GGGUCUAAAAGGCUUCAGtt
B9	565	61	UCCCUCAUCUACACCAACUtt	126	AGUUGGUGUAGAUGAGGGAg
BG3	563	62	GCUCCCUCACUACACCAAtt	127	UUGGUGUAGAUGAGGGAGCtg
BU2	630	63	GAAGCCUUUUGAGACCCUAtt	128	UAGGGUCUCAAAAGGCUUCag
BU10	627	64	ACUGAAGCCUUUUGAGACAtt	129	UGUCUAAAAGGCUUCAGUtg
BU14	565	65	CUCCCUCACUACACCAAAAtt	130	UUUGGUGUAGAUGAGGGAGAt
BU4	567	66	CCUCAUCUACACCAACUAAtt	131	UUAGUUGGUGUAGAUGAGGGga
C1-934	934	67	ACCAAUAAAUUUCUAAGAtt	132	UCUUAGAAAUUUUAUUGGUcc

## 【 0 0 7 9 】

表3の要点：大文字のA、G、C及びUはそれぞれリボA、リボG、リボC及びリボUを指す。小文字a、u、g、c、tはそれぞれ2'-デオキシ-A、2'-デオキシ-U、2'-デオキシ-G、2'-デオキシ-C及びデオキシチミジンを意味する。

## 【 0 0 8 0 】

GST- mRNAを標的とする本発明のRNAi分子の例を表4に示す。

## 【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

【表4】

GST-πのRNAi分子配列

ID	配列番号	センス鎖 (5'→3') 配列番号 133~158	配列番号	アンチセンス鎖 (5'→3') 配列番号 159~184
BU2'	133	GAAGCCUUUUGAGACCCUANN	159	UAGGGUCUAAAAGGCUUCNN
14	134	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	160	UAGGGUCUAAAAGGCUUC <u>UU</u>
15	135	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	161	uagggu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
16	136	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	162	Uagggu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
17	137	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	163	UAggg <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
18	138	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	164	UAGgg <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
19	139	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	165	UAGGgu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
20	140	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	166	uAgGgU <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
21	141	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	167	UAgGgU <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
22	142	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	168	UaGgGu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
23	143	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	169	UAGgGu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
24	144	GAAGCCUUUUGAGACCCUatt	170	Uagggu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
25	145	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	171	<u>U</u> AGGGUCUAAAAGGCUUCUU
26	146	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	172	fUAGGGUCUAAAAGGCUUCUU
27	147	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	173	uAGGGUCUAAAAGGCUUCUU
28	148	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	174	UsAGGGUCUAAAAGGCUUCUU
29	149	GAAGCCUUUUGAGACCCU <u>U</u> UU	175	fUAGGGUCUfCAAAAGGCUUCUU
30	150	GAAGCCUUUUGAGfACCCU <u>U</u> UU	176	fUAGGGUCUfCAFfAAGGCUUCUU
31	151	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	177	<u>U</u> AGGGUCUAAAAGGCUUCUU
31'	152	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	178	fUAGGGUCU <u>CAAAAGGCUUCUU</u>
32	153	GAAGCCUUUUGAGACCCUA <u>UU</u>	179	UAGGGUCUAAAAGGCUUCUU
39	154	<u>GAAGCCUUUUGAGACCCU</u> <u>U</u> UU	180	UAGgGu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
45	155	<u>GAAGCCUUUUGAGACCCU</u> <u>U</u> UU	181	<u>U</u> AGgGu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
46	156	<u>GAAGCCUUUUGAGACCCU</u> <u>U</u> UU	182	<u>U</u> AGgGu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
47	157	<u>GAAGCCUUUUGAGACCCU</u> <u>U</u> UU	183	<u>U</u> AGgGu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU
48	158	<u>GAAGCCUUUUGAGACCCU</u> <u>U</u> UU	184	fUAGgGu <u>U</u> CAAAAGGCUUCUU

## 【0082】

表4の要点：大文字のA、G、C及びUはそれぞれリボA、リボG、リボC及びリボUを意味する。小文字a、u、g、c、tはそれぞれ2'-デオキシ-A、2'-デオキシ-U、2'-デオキシ-G、2'-デオキシ-C及びデオキシチミジン(dT=T=t)を意味する。下線は、2'-OMe置換体を意味する、例えばU。小文字のfは、2'-デオキシ-2'-フルオロ置換を意味し、例えばfUは2'-デオキシ-2'-フルオロ-Uである。Nは、A、C、G、U、U、a、c、g、u、t、又は修飾ヌクレオチド、逆方向(inverted)ヌクレオチド又は化学修飾ヌクレオチドである。

40

## 【0083】

GST-mRNAを標的とする本発明のRNAi分子の例を表5に示す。

## 【0084】

【表5】  
GST-πのRNAi分子配列

ID	配列番号	センス鎖 (5'→3') 配列番号 185~196	配列番号	アンチセンス鎖 (5'→3') 配列番号 197~208
A9'	185	CCUUUUGAGACCCUGCUGUNN	197	ACAGCAGGGUCUCAAAAGGNN
1	186	CCUCAUCUACACCAACUAUU	198	AUAGUJGGUGUAGAUGAGGUU
2	187	CCUCAUCUACACCAACUAUU	199	auaguuggUGUAGAUGAGGUU
3	188	CCUCAUCUACACCAACUAUU	200	AuaguuggUGUAGAUGAGGUU
4	189	CCUCAUCUACACCAACUAUU	201	AUaguuggUGUAGAUGAGGUU
5	190	CCUCAUCUACACCAACUAUU	202	AUaguuggUGUAGAUGAGGUU
6	191	CCUCAUCUACACCAACUAUU	203	AUAGuuggUGUAGAUGAGGUU
7	192	CCUCAUCUACACCAACUAUU	204	aUaGuUgGUGUAGAUGAGGUU
8	193	CCUCAUCUACACCAACUAUU	205	AUaGuUgGUGUAGAUGAGGUU
9	194	CCUCAUCUACACCAACUAUU	206	AuAgUuGgUGUAGAUGAGGUU
10	195	CCUCAUCUACACCAACUAUU	207	AUAgUuGgUGUAGAUGAGGUU
20	196	<u>CCUCAUCUACACCAACUAUU</u>	208	AuaguuggUGUAGAUGAGGUU

## 【0085】

表5の要点：大文字のA、G、C及びUはそれぞれリボA、リボG、リボC及びリボUを意味する。小文字a、u、g、c、tはそれぞれ2'-デオキシ-A、2'-デオキシ-U、2'-デオキシ-G、2'-デオキシ-C及びデオキシチミジン(dT=T=t)を意味する。下線は、2'-OMe置換体を意味する、例えばU。小文字のfは、2'-デオキシ-2'-フルオロ口置換を意味し、例えばfUは2'-デオキシ-2'-フルオロ-Uである。Nは、A、C、G、U、U、a、c、g、u、t、又は修飾ヌクレオチド、逆方向(inverted)ヌクレオチド又は化学修飾ヌクレオチドである。

## 【0086】

GST- mRNAを標的とする本発明のRNAi分子の例を表6に示す。

## 【0087】

10

20

30

## 【表6】

## GST-πのRNAi分子配列

ID	配列番号	センス鎖 (5'-->3') 配列番号 209~223	配列番号	アンチセンス鎖 (5'-->3') 配列番号 224~238
B13'	209	GAUGACUAUGUGAAGGCACNN	224	GUGCCUUCACAUAGUCAUCNN
4	210	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	225	UGCCUUCACAUAGUCAUCUU
5	211	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	226	ugccuu <u>ca</u> CAUAGUCAUCUU
6	212	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	227	Ugccuu <u>ca</u> CAUAGUCAUCUU
7	213	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	228	UGccuu <u>ca</u> CAUAGUCAUCUU
8	214	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	229	UGCc <u>uu</u> CAUAGUCAUCUU
9	215	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	230	UGCC <u>uu</u> CAUAGUCAUCUU
10	216	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	231	uGc <u>Cu</u> U <u>c</u> ACAUAGUCAUCUU
11	217	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	232	UGc <u>Cu</u> U <u>c</u> ACAUAGUCAUCUU
12	218	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	233	UgCc <u>Uu</u> CaCAUAGUCAUCUU
13	219	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	234	UGCc <u>Uu</u> CaCAUAGUCAUCUU
14	220	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	235	Ugccuu <u>ca</u> CAUAGUCAUCUU
15	221	GGAUGACUAUfGfGAAGGCAUU	236	UGCfCUUCACAUAGUCAUCUU
17	222	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	237	UGCCUUCACAU <u>AGUCAUCUU</u>
18	223	GGAUGACUAUGUGAAGGCAUU	238	UGCCUUCACAU <u>AGUCAUCUU</u>

## 【0088】

表6の要点：大文字のA、G、C及びUはそれぞれリボA、リボG、リボC及びリボUを意味する。小文字a、u、g、c、tはそれぞれ2'-デオキシ-A、2'-デオキシ-U、2'-デオキシ-G、2'-デオキシ-C及びデオキシチミジン(dT=T=t)を意味する。下線は、2'-OMe置換体を意味する、例えばU。小文字のfは、2'-デオキシ-2'-フルオロ置換を意味し、例えばfUは2'-デオキシ-2'-フルオロ-Uである。Nは、A、C、G、U、U、a、c、g、u、t、又は修飾ヌクレオチド、逆方向(inverted)ヌクレオチド又は化学修飾ヌクレオチドである。

## 【0089】

GST- mRNAを標的とする本発明のRNAi分子の例を表7に示す。

## 【0090】

10

20

30

【表7】  
GST-πのRNAi分子配列

ID	配列番号	センス鎖 (5'→3') 配列番号 239~250	配列番号	アンチセンス鎖 (5'→3') 配列番号 251~262
B2'	239	GAAGCCUUUUGAGACCCUGNN	251	CAGGGUCUCAAAAGGCUCNN
1	240	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	252	CAGGGUCUCAAAAGGCUCUU
2	241	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	253	cagggucuCAAAAGGCUCUU
3	242	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	254	CagggucuCAAAAGGCUCUU
4	243	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	255	CAgggucuCAAAAGGCUCUU
5	244	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	256	CAGggucuCAAAAGGCUCUU
6	245	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	257	CAGGgucuCAAAAGGCUCUU
7	246	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	258	cAgGgUcUCAAAAGGCUCUU
8	247	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	259	CAgGgUcUCAAAAGGCUCUU
9	248	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	260	CaGgGuCuCAAAAGGCUCUU
10	249	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	261	CAGgGuCuCAAAAGGCUCUU
11	250	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	262	CagggucuCAAAAGGCUCUU

10

20

## 【0091】

表7の要点：大文字のA、G、C及びUはそれぞれリボA、リボG、リボC及びリボUを意味する。小文字a、u、g、c、tはそれぞれ2'-デオキシ-A、2'-デオキシ-U、2'-デオキシ-G、2'-デオキシ-C及びデオキシチミジン(dT=T=t)を意味する。下線は、2'-OMe置換体を意味する、例えばU。小文字のfは、2'-デオキシ-2'-フルオロ口置換を意味し、例えばfUは2'-デオキシ-2'-フルオロ-Uである。Nは、A、C、G、U、U、a、c、g、u、t、又は修飾ヌクレオチド、逆方向(inverted)ヌクレオチド又は化学修飾ヌクレオチドである。

## 【0092】

GST- mRNAを標的とする本発明のRNAi分子の例を表8に示す。

30

## 【0093】

## 【表8】

## GST-πのRNAi分子配列

ID	配列番号	センス鎖 (5'→3') 配列番号 263~274	配列番号	アンチセンス鎖 (5'→3') 配列番号 275~286
B4'	263	CCUCAUCUACACCAACUAUNN	275	AUAGUUGGUGUAGAUGAGGN
1	264	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	276	AUAGUUGGUGUAGAUGAGGU
2	265	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	277	auaguuggUGUAGAUGAGGU
3	266	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	278	AuaguuggUGUAGAUGAGGU
4	267	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	279	AUaguuggUGUAGAUGAGGU
5	268	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	280	AUAguggUGUAGAUGAGGU
6	269	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	281	AUAGuuggUGUAGAUGAGGU
7	270	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	282	aUaGuUgGUGUAGAUGAGGU
8	271	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	283	AUaGuUgGUGUAGAUGAGGU
9	272	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	284	AuAgUuGgUGUAGAUGAGGU
10	273	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	285	AUAgUuGgUGUAGAUGAGGU
20	274	<u>CCUCAUCUACACCAACUAUUU</u>	286	AuaguuggUGUAGAUGAGGU

## 【0094】

表8の要点：大文字のA、G、C及びUはそれぞれリボA、リボG、リボC及びリボUを意味する。小文字a、u、g、c、tはそれぞれ2'-デオキシ-A、2'-デオキシ-U、2'-デオキシ-G、2'-デオキシ-C及びデオキシチミジン(dT=T=t)を意味する。下線は、2'-OMe置換体を意味する、例えばU。小文字のfは、2'-デオキシ-2'-フルオロ置換を意味し、例えばfUは2'-デオキシ-2'-フルオロ-Uである。Nは、A、C、G、U、U、a、c、g、u、t、又は修飾ヌクレオチド、逆方向(inverted)ヌクレオチド又は化学修飾ヌクレオチドである。

## 【0095】

本明細書中で使用される場合、RNAi分子は、siRNA(低分子干渉RNA)、miRNA(マイクロRNA)、shRNA(ショートヘアピンRNA)、ddRNA(DNA指向性RNA)、piRNA(Piwi相互作用RNA)、又はrasiRNA(反復関連siRNA)及びその改変形態といった二重RNAを含んでいるがこれに限定されない。これらのRNAi分子は、市販されているか、又は既知の配列情報などに基づいて設計及び調製され得る。アンチセンス核酸には、RNA、DNA、PNA、又はその複合体が含まれる。本明細書中で使用される場合、DNA/RNAキメラポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を阻害するDNA及びRNAからなる二本鎖ポリヌクレオチドを含むがこれに限定されない。

## 【0096】

実施形態では、本発明の薬剤は治療剤としてsiRNAを含む。siRNA分子は、約10~50又はそれ以上のヌクレオチドの長さを有することができる。siRNA分子は、約15~45ヌクレオチドの長さを有することができる。siRNA分子は、約19~40ヌクレオチドの長さを有することができる。siRNA分子は、19~23ヌクレオチドの長さを有することができる。本発明のsiRNA分子は、標的mRNAに対するRNAiを媒介することができる。Ambion、Inc. (Austin、TX) 及びMIT(Cambridge、MA)のWhitehead Institute of Biomedical Researchのような商業的に入手可能な設計ツール及びキットにより、siRNAの設計及び生産が可能である。

## 【0097】

## GST-πを調節し、悪性腫瘍を治療するための方法

本発明の実施形態は、GST-π及び/又はGST-πタンパク質の発現をダウンレギュレート又は阻害するために使用することができるRNAi分子を提供することができる。

10

20

30

40

50

## 【0098】

いくつかの実施形態において、本発明のRNAi分子は、悪性腫瘍など疾患又は状態に関連し得るGST- ハプロタイプ多型から生じるGST- 及び/又はGST- タンパク質の発現をダウンレギュレート又は阻害するために使用することができる。

## 【0099】

GST- タンパク質又はmRNAレベルのモニタリングを使用して、遺伝子サイレンシングを特徴づけることができる、本発明の化合物及び組成物の有効性を決定することができる。

## 【0100】

本開示のRNAi分子は、1つ以上の遺伝子の発現を調節するために、単独で又は他のsiRNAと組み合わせて使用することができる。

10

## 【0101】

本開示のRNAi分子は、GST- に関連する疾患（悪性腫瘍を含む）の予防又は治療、又は症状もしくは症状の改善のために、単独で又は組み合わせて、又は他の既知の薬物と組み合わせて使用することができる。

## 【0102】

本発明のRNAi分子は、配列特異的様式でGST- の発現を調節又は阻害するために使用することができる。

## 【0103】

本開示のRNAi分子は、一連の連続したヌクレオチドがGST- mRNAに少なくとも部分的に相補的であるガイド鎖を含むことができる。

20

## 【0104】

特定の態様において、悪性腫瘍は、本発明のRNAi分子を用いたRNA干渉によって治療することができる。

## 【0105】

悪性腫瘍の治療は、適切な細胞ベースのモデル、ならびにエクスピボ又はインビボの動物モデルにおいて特徴づけることができる。

## 【0106】

悪性腫瘍の治療は、罹患組織の細胞におけるGST- mRNAのレベル又はGST- タンパク質のレベルを決定することによって特徴づけられる。

30

## 【0107】

悪性腫瘍の治療は、罹患した器官又は組織の非侵襲的な医学的走査によって特徴づけられる。

## 【0108】

本発明の実施形態は、それを必要とする被験体におけるGST- 関連疾患又は状態の症状を予防、治療、又は改善するための方法を含むことができる。

## 【0109】

いくつかの実施形態では、被験体における悪性腫瘍の症状を予防、治療又は改善するための方法は、本発明のRNAi分子を被験体に投与することでGST- 遺伝子の発現を当該被験体又は生物において調節することを含む。

## 【0110】

いくつかの実施形態では、本発明は、細胞又は生物を本発明のRNAi分子と接触させることによって、細胞又は生物におけるGST- 遺伝子の発現をダウンレギュレートする方法を企図する。

## 【0111】

GST- 阻害性核酸分子は、GST- 発現を減少させるために一本鎖又は二本鎖核酸分子として採用されるヌクレオチドオリゴマーであっても良い。1つのアプローチでは、当該GST- 阻害性核酸分子は、RNA干渉（RNAi）媒介性のGST- 遺伝子発現ノックダウンに使用される二本鎖RNAである。一実施形態では、二本鎖RNA（dsRNA）分子が作製され、これは本発明のヌクレオチドオリゴマーにおける8~25（例えば8, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25）の連続したヌクレオチドを含むことができる。dsRNAは、二重

50

鎖を有するRNAの2つの相補鎖又は自己二重鎖を有する单一のRNA鎖（小さなヘアピン（sh）RNA）とすることができます。

【0112】

いくつかの実施形態において、dsRNAは、約21又は22塩基対であるが、より短くても長くてもよく、約29ヌクレオチドまでであってもよい。二本鎖RNAは、標準的な技術、例えば化学合成又はインビトロ転写を用いて作製することができる。キットは、例えばAmbion (Austin, Tex.) 及びEpicentre (Madison, Wis.) から入手可能である。

【0113】

哺乳動物細胞においてdsRNAを発現させるための方法は、Brummelkamp et al. *Science* 296 : 550-553, 2002; Paddison et al. *Genes & Devel.* 16 : 948-958, 2002; Paulら *Nature Biotechnol.* 20 : 505-508, 2002; Suiら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 : 5515-5520, 2002; Yuら *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 : 6047-6052, 2002; Miyagishiら、*Nature Biotechnol.* 20 : 497-500, 2002; 及びLeeら、*Nature Biotechnol.* 20 : 500-505 2002を参照されたい。これらの各々は参考により本明細書に組み込まれる。

10

【0114】

GST- 遺伝子に「対応する」阻害性核酸分子は、少なくとも二本鎖遺伝子の断片を含み、二本鎖阻害性核酸分子の各鎖が標的GST- 遺伝子の相補鎖に結合できる。阻害性核酸分子は、参考となるGST- 配列と完全に対応する必要はない。

【0115】

一実施形態において、siRNAは、標的核酸と少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%又はさらには99%の配列同一性を有する。例えば、1~2塩基対のミスマッチを有する19塩基対の二重鎖は、本発明の方法において有用であると考えられる。他の実施形態においては、阻害性核酸分子のヌクレオチド配列は、1, 2, 3, 4, 5又はそれ以上のミスマッチを示す。

20

【0116】

本発明によって提供される阻害性核酸分子は、siRNAに限定されず、GST- 核酸分子又はポリペプチドの発現を減少させるのに十分な任意の核酸分子を含む。本明細書で提供されるDNA配列のそれぞれは、例えば、GST- の発現を減少させるための治療用アンチセンス核酸分子の発見及び開発において使用することができる。本発明はさらに、触媒性RNA分子又はリボザイムを提供する。そのような触媒RNA分子は、インビボでGST- 核酸分子の発現を阻害するために使用することができる。アンチセンスRNA内にリボザイム配列を含めることにより、RNA切断活性が分子上に付与され、それによって構築物の活性が向上する。標的RNA特異的リボザイムの設計及び使用は、Haseloffら、*Nature* 334 : 585-591, 1988及び米国特許出願公開第2003/0003469 A1号に記載されている。これらの各々は参考により本明細書に組み込まれる。

30

【0117】

本発明の様々な実施形態において、触媒核酸分子は、ハンマーへッド又はヘアピンモチーフに形成される。このようなハンマーへッドモチーフの例は、Rossiら、*Aids Research and Human Retroviruses*、8 : 183, 1992に記載されている。ヘアピンモチーフの例は、Hampelら、*Biochemistry*、28 : 4929, 1989及びHampel et al. *Nucleic Acids Research*, 18 : 299, 1990に記載されている。当業者であれば、酵素的核酸分子に必要とされるのは、標的遺伝子RNA領域の1つ以上に相補的な特異的基質結合部位であることを認識し、分子にRNA切断活性を付与するその基質結合部位内又はその周囲のヌクレオチド配列を有することを認識する。

40

【0118】

表9は、GST- のmRNAコード配列を示す。

【0119】

## 【表9】

グルタチオン S-トランスフェラーゼ-π1 mRNA コード配列、NCBI 参照配列:NM\_000852.3、GenID:2950、  
Hugo 遺伝子命名委員会:HGNC:4638、ヒトタンパク質参照データベース:HPRD:00614(配列番号 287)

```

1 tggaaagag ggaaaggctt ccccgccag ctgcgcggcg actccgggaa ctccaggcg
61 cccctctgcg gccgacgccc ggggtgcagc ggccggcgaa gctggggccg gcgggagtc
121 gcgggaccct ccagaagagc ggccggcgcc gtgactcagc actggggcgag cggggggcg
181 gaccaccctt ataaggctcg gaggccgcga ggccttcgct ggagtttcgc cgccgcagtc
241 ttcgcacca tgccgccta caccgtggtc tatttccag ttcgaggccg ctgcgcggcc
301 ctgcgcatgc tgctggcaga tcagggccag agctggaagg aggaggtgg gaccgtggag
361 acgtggcagg agggctcaact caaaagcctcc tgcctatacgt ggcagctccc caagttccag
421 gacggagacc tcaccctgta ccagtccaaat accatcctgc gtcacctggg cccgacccctt
481 gggctctatg ggaaggacca gcaggaggca gcccgggtgg acatggtaa tgacggcgtg
541 gaggacctcc gctgcaaata catctccctc atctacacca actatgaggc gggcaaggat
601 gactatgtga aggcaactgcc cggcaactg aagccttttgg agaccctgct gtcccagaac
661 cagggaggca agacccatgttgtggagac cagatctccct tcgctgacta caacctgctg
721 gacttgctgc tgatccatga ggtccctagcc cctggctgcc tggatgcgtt cccctgctc
781 tcagcatatg tggggcgccct cagtggccgg cccaaagctca aggcccttcct ggccctccct
841 gagtacgtga acctcccccatt caatggcaac gggaaacagt gagggttggg gggactctga
901 gcgggaggca gagttgcct tccttcctcc aggaccaata aaatttctaa gagagctaaa
961 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

10

20

30

## 【0120】

GST- 產生又は活性を抑制する薬物は、特異性が高く、副作用の可能性が低いという点で、RNAi 分子、リボザイム、アンチセンス核酸、GST- をコードするDNAのDNA/RNAキメラポリヌクレオチド又はそれを発現するベクターであってもよい。

## 【0121】

GST- の抑制は、GST- 抑制が利用されていない場合と比較して、細胞中のGST- の発現又は活性が抑制されることによって決定され得る。GST- の発現は、任意の公知の技術によって評価することができる。これらの例示としては、抗GST- 抗体を利用した方法、EIA、ELISA、IRA、IRMA、ウエスタンプロット法、免疫組織化学法、免疫細胞化学法、フローサイトメトリー法、GST- 又はその固有の断片をコードする核酸又は転写産物 (mRNA) 又は当該核酸のスプライシング産物と特異的にハイブリダイズする核酸を利用するハイブリダイゼーション方法、ノーザンプロット法、サザンプロット法及び様々なPCR法を挙げることができる。

30

## 【0122】

GST- の活性は、例えばRaf-1 (特にリン酸化Raf-1) 又はEGFR (特にリン酸化EGFR) のようなGST- への結合を含むタンパク質の既知の活性を分析することによって評価することができる。これには、例えば、免疫沈降法、ウエスタンプロット法、質量分析法、プルダウン法、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法等を挙げることができる。

40

## 【0123】

GST- が特定の細胞で発現されているかどうかは、細胞内のGST- の発現を検出することで決定することができる。GST- の発現は、当該分野で公知の任意の技術によって検出することができる。

## 【0124】

突然変異したKRASの例には、特に限定されないが、継続的なKRASの活性化を引き起こし、内在性GTPaseを阻害する突然変異又はグアニンヌクレオチド交換速度を増加させる突然変異が含まれる。そのような突然変異の特定の例には、例えば、ヒトKRASにおけるアミノ酸12、13及び/又は61の突然変異 (内因性GTPaseを阻害する) 、及びヒトKRASにおけるア

50

ミノ酸116及び/又は119の突然変異（グアニンヌクレオチド交換速度の増加）（Bos、Cancer Res.1989; 49 (17) : 4682-9、Leviら、Cancer Res. 1991; 51 (13) : 3497-502）。

【0125】

本発明のいくつかの実施形態では、突然変異KRASは、ヒトKRASのアミノ酸12, 13, 61, 116及び119の少なくとも1つに突然変異を有するKRASとすることができます。本発明の一実施形態では、突然変異KRASは、ヒトKRASのアミノ酸12に突然変異を有する。いくつかの実施形態において、突然変異KRASは、GST- の過剰発現を誘導するものであってもよい。突然変異KRASを有する細胞は、GST- の過剰発現を示してもよい。

【0126】

突然変異KRASの検出は、任意の公知の技術、例えば、既知の突然変異配列にトクイテキナ核酸プローブ手段により選択的ハイブリダイゼーション、酵素ミスマッチ切断方法、配列決定方法（Bos、Cancer Res.1989; 49 (17) : 4682-9）及びPCR-RFLP法（Miyanishiら、Gastroenterology.2001; 121 (4) : 865-74）を用いて行うことができる。

10

【0127】

GST- 発現の検出は、任意の公知の技術を用いて行うことができる。GST- が過剰発現されているか否かは、例えば、KRAS変異を有する細胞におけるGST- の発現の程度を、正常KRASを有する同じタイプの細胞におけるGST- の発現の程度と比較することによって評価することができる。この状況では、突然変異KRASを有する細胞におけるGST- の発現の程度が、正常KRASを有する同型の細胞におけるGST- の発現の程度を超える場合、GST- は過剰発現されている。

20

【0128】

一態様では、本発明は、上記態様のいずれかの阻害性核酸分子をコードするベクターを特徴とする。特定の実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又はレンチウイルスベクターである。別の実施形態では、ベクターは、哺乳動物細胞における発現に適したプロモーターを含む。

【0129】

本発明の組成物中に処方される活性RNA干渉誘導成分の量は、投与の利益を上回る副作用を引き起こさない量とすることができる。このような量は、培養細胞を用いたインビトロ試験、マウス、ラット、イヌ、ブタ等のモデル動物での試験により測定することができる、これらの試験方法は当業者には明らかである。

30

【0130】

配合される活性成分の量は、薬剤又は組成物が投与される様式に依存して変更すれば良い。例えば、組成物の複数の単位が1回の投与に使用される場合、組成物の1単位中に処方される活性成分の量は、1回の投与に必要な有効成分の量を前記複数単位で割ることによって決定することができる。

【0131】

本発明はまた、GST- を抑制する薬剤又は組成物の製造方法、並びに薬剤悪性腫瘍を縮小又は収縮させるための剤又は組成物を製造する際のGST- を抑制する薬剤の使用に関する。

30

【0132】

RNA干渉

RNA干渉（RNAi）は、短い干渉RNA（siRNA）によって媒介される動物における配列特異的転写後遺伝子サイレンシングを意味する。例えば、Zamoreら、Cell、2000、Vol. 101、25~33頁；Fireら、Nature、1998、Vol. 391、806811頁；Sharp、Genes & Development、1999、Vol. 13、pp. 139-141参照。

40

【0133】

細胞内のRNAi応答は、二本鎖RNA（dsRNA）によって誘発することができるが、メカニズムはまだ完全には理解されていない。細胞内の特定のdsRNAは、ダイサー酵素、リボヌクレアーゼIII酵素の作用を受けることができる。例えば、Zamoreら、Cell、2000、Vol. 101、25~33頁；Hammondら、Nature、2000、Vol. 404、pp.293-296参照。ダイサーは、dsRN

50

AをsiRNAであるdsRNAのより短い断片に加工することができる。

【0134】

一般に、siRNAは、約21～約23ヌクレオチドの長さとすることができます、約19ヌクレオチド長の塩基対二重鎖領域を含むことができる。

【0135】

RNAiは、RNA誘発サイレンシング複合体（RISC）として知られているエンドヌクレアーゼ複合体に関する。siRNAは、RISC複合体に入るアンチセンス又はガイド鎖であって、siRNA二本鎖のアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNA標的の切断を媒介するアンチセンス又はガイド鎖を有する。siRNAの他方の鎖はパッセンジャー鎖である。標的RNAの切断は、siRNA二本鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域の中央で起こる（例えば、Elbashirら、*Genes & Development*、2001、Vol. 15、188～200頁参照）。

10

【0136】

本明細書で使用する「センス鎖」という用語は、siRNA分子の対応するアンチセンス鎖の少なくとも一部に部分的又は完全に相補的なsiRNA分子のヌクレオチド配列を指す。siRNA分子のセンス鎖は、標的核酸配列と相同性を有する核酸配列を含むことができる。

【0137】

本明細書で使用される「アンチセンス鎖」という用語は、標的核酸配列の少なくとも一部に部分的又は完全に相補的なsiRNA分子のヌクレオチド配列を指す。siRNA分子のアンチセンス鎖は、siRNA分子の対応するセンス鎖の少なくとも一部に相補的な核酸配列を含むことができる。

20

【0138】

RNAi分子は、配列特異的様式でRNA干渉を媒介することによって遺伝子発現をダウンレギュレート又はノックダウンすることができる。例えば、Zamoreら、*Cell*、2000、Vol. 101、25～33頁；Elbashirら、*Nature*、2001、Vol. 411、494～498頁；Kreutzerら、WO2000/044895；Zernicka-Goetzら、WO2001/36646；Fireら、WO1999/032619；Plaetinckら、WO2000/01846；Melloら、国際公開第2001/029058号パンフレット参照。

30

【0139】

本明細書中で使用される場合、遺伝子発現に関して「阻害する」、「ダウンレギュレートする」又は「縮小する」という用語は、遺伝子の発現又は1つ以上のタンパク質をコードするmRNA分子のレベル、若しくは1つ又は複数のコードされたタンパク質の活性が、本発明のRNAi分子又はsiRNAの非存在下で観察される活性よりも低下することを意味している。例えば、発現のレベル、mRNAのレベル又はコードされたタンパク質活性のレベルが、本発明のRNAi分子又はsiRNAの非存在下で観察される活性よりも、少なくとも1%、又は少なくとも10%、又は少なくとも20%、又は少なくとも50%、又は少なくとも90%、又はそれ以上で低下すれば良い。

【0140】

RNAi分子はまた、ウイルス遺伝子発現をノックダウンするために使用することができ、よってウイルス複製に影響を及ぼす。

【0141】

RNAi分子は、別個のポリヌクレオチド鎖：センス鎖又はパッセンジャー鎖と、アンチセンス鎖又はガイド鎖とから作製することができる。ガイド鎖とパッセンジャー鎖とは、少なくとも部分的に相補的である。ガイド鎖及びパッセンジャー鎖は、約15～約49塩基対を有する二重鎖領域を形成することができる。

40

【0142】

いくつかの実施形態では、siRNAの二重鎖領域は、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, 又は49個の塩基対を含むことができる。

【0143】

特定の実施形態において、RNAi分子は、RISC複合体において活性であり、RISCに対して活性な二重鎖領域の長さを有することができる。

50

## 【0144】

さらなる実施形態において、RNAi分子は、RISC複合体において活性であるRNAi分子に変換されるダイサー基質として活性とすることができます。

## 【0145】

いくつかの態様では、RNAi分子は、長い分子の対向する末端に相補的なガイドとパッセンジャー配列部分とを有することができ、その結果、分子は相補配列部分において二重鎖領域を形成することができ、各鎖はヌクレオチド又は非ヌクレオチドリンカーのいずれかによって当該二重鎖領域の一端で結合する。例えば、ヘアピン配列システム及びループ配列である。各鎖とリンカー相互作用は、共有結合又は非共有相互作用とすることができます。

## 【0146】

本開示のRNAi分子は、核酸のセンス領域を核酸のアンチセンス領域に結合するヌクレオチド、非ヌクレオチド又はヌクレオチド/非ヌクレオチド混合リンカーを含んでいてもよい。ヌクレオチドリンカーは、長さが2ヌクレオチド以上、例えば約3, 4, 5, 6, 7, 8, 9又は10ヌクレオチドのリンカーとすることができます。ヌクレオチドリンカーは、核酸アプタマーとしても良い。本明細書で使用する「アプタマー」又は「核酸アプタマー」は、標的分子に特異的に結合する核酸分子を意味し、ここで核酸分子はその天然の状況において標的分子によって認識される配列を含む配列を有する。あるいは、アプタマーは、標的分子に結合する核酸分子であってもよく、ここで標的分子は核酸に天然に結合しなくてよい。例えば、アプタマーは、タンパク質のリガンド結合ドメインに結合し、それにより天然に存在するリガンドとタンパク質との相互作用を防止するために使用することができます。例えば、Goldら、Annu Rev Biochem、1995、Vol. 64、763-797頁；Brodyら、J.Biotechnol.，2000、Vol. 74、5～13頁；Hermannら、Science、2000、Vol. 287、pp. 820-825参照。

10

20

30

## 【0147】

非ヌクレオチドリンカーの例は、無塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素又は他の高分子化合物、例えば2～100個のエチレンギリコール単位を有するポリエチレンギリコールなどの高分子化合物を挙げることができる。いくつかの例は、Seelaら、Nucleic Acids Research、1987、Vol. 15、3113～3129頁；Cloadら、J. Am. Chem. Soc.，1991、Vol. 113、6324-6326頁；Jaeschkeら、Tetrahedron Lett.，1993、Vol. 34、301頁；Arnoldら、WO1989/002439；Usmanら、WO1995/006731；Dudyczら、WO1995/011910；及びFerentzら、J. Am. Chem. Soc.，1991、Vol. 113、pp. 4000-4002に記載されている。

30

## 【0148】

RNAi分子は、二重鎖領域から1つ以上のオーバーハングを有することができる。オーバーハングは、塩基対形成されていない一本鎖領域であり、長さが1～8ヌクレオチド又はそれ以上としても良い。オーバーハングは、鎖の3'末端が1～8ヌクレオチドの一本鎖領域を有する3'末端オーバーハングとしても良い。オーバーハングは、鎖の5'末端が1～8ヌクレオチドの一本鎖領域を有する5'末端オーバーハングとしても良い。

30

## 【0149】

RNAi分子のオーバーハングは、同じ長さを有していても良いし、異なる長さとしても良い。

40

## 【0150】

RNAi分子は、二重鎖領域がオーバーハングなしで終わり、鎖が二重鎖領域の末端まで塩基対合する、一つ以上の平滑末端を有するものとすることができます。

## 【0151】

本開示のRNAi分子は、1つ以上の平滑末端を有することができ、又は1つ以上のオーバーハングを有することができ、若しくは平滑末端とオーバーハングとの組み合わせを有することができる。

## 【0152】

RNAi分子の鎖の5'末端は、平滑末端にあってもよく又はオーバーハングにあってもよい

50

。RNAi分子の鎖の3'末端は、平滑末端にあってもよく又はオーバーハングにあってもよい。

【0153】

RNAi分子の鎖の5'末端は平滑末端にあり、3'末端はオーバーハングにあってもよい。RNAi分子鎖の3'末端は平滑末端にあり、5'末端はオーバーハングにあってもよい。

【0154】

いくつかの実施形態では、RNAi分子の両端は平滑末端である。

【0155】

さらなる実施形態において、RNAi分子の両端はオーバーハングを有する。

【0156】

5'-及び3'-末端のオーバーハングは、異なる長さであってもよい。

【0157】

特定の実施形態では、RNAi分子は、アンチセンス鎖の5'末端及びセンス鎖の3'末端がオーバーハングヌクレオチドを有さない平滑末端を有するものでもよい。

【0158】

さらなる実施形態では、RNAi分子は、アンチセンス鎖の3'末端及びセンス鎖の5'末端がオーバーハングヌクレオチドを有さない平滑末端を有するものでもよい。

【0159】

RNAi分子は、二重鎖領域における塩基対合においてミスマッチを有していてもよい。

【0160】

RNAi分子のオーバーハングにおける任意のヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドとすることができます。

【0161】

1つ以上のデオキシリボヌクレオチドは5'末端に存在してもよい、ここでRNAi分子の他方の鎖の3'末端がオーバーハングを有さなくともよく、デオキシリボヌクレオチドオーバーハングを有さなくともよい。

【0162】

1つ以上のデオキシリボヌクレオチドは3'末端に存在してもよい、ここでRNAi分子の他の鎖の5'末端がオーバーハングを有さなくともよく、デオキシリボヌクレオチドオーバーハングを有さなくともよい。

【0163】

いくつかの実施形態において、RNAi分子のオーバーハングヌクレオチドの1つ以上又は全てを2'-デオキシリボヌクレオチドとしてもよい。

【0164】

ダイサー基質RNAi分子

いくつかの態様において、RNAi分子は、RISC活性RNAi分子を生成するようにプロセシングされるダイサー基質として適した長さにすることができます。例えば、Rossiら、US2005/0244858参照。

【0165】

ダイサー基質dsRNAは、活性RNAi分子を生成するためにダイサーによって処理されるのに十分な長さとすることができます、さらに以下の特性の1つ以上を含んでいてもよい：(i)ダイサー基質dsRNAは、例えば、アンチセンス鎖上に3'オーバーハングを有するような非対称とすることができます、(ii)ダイサー基質dsRNAは、ダイサー結合の配向を指示し、dsRNAを処理して活性なRNAi分子とするためにセンス鎖上に改変された3'末端を有していてよい。

【0166】

RNAi分子の使用方法

本発明の核酸分子及びRNAi分子は、分子の直接的な適用によって、又は担体若しくは希釈剤と組み合わせた分子を用いて、細胞又は組織に送達することができる。

【0167】

10

20

30

40

50

本発明の核酸分子及びRNAi分子は、担体又は希釈剤若しくは、ウイルス配列、ウイルス物質又は脂質若しくはリポソーム製剤などの細胞への侵入を補助又は促進するように機能する他の送達ビヒクルを用いた分子の直接的な適用によって、細胞、組織、器官又は被験体に送達又は投与することができる。

【0168】

本発明の核酸分子及びRNAi分子は、カチオン性脂質と複合体を形成するか、リポソーム内にパッケージするか、或いは標的細胞又は組織に送達することができる。核酸又は核酸複合体は、直接皮膚適用、経皮適用又は注射によって生体外又は生体内の関連する組織に局所投与することができる。

【0169】

送達系は、例えば、水性及び非水性ゲル、クリーム、エマルジョン、マイクロエマルジョン、リポソーム、軟膏、水性及び非水性溶液、ローション、エアロゾル、炭化水素ベース及び粉末を含んでも良好く、そして可溶化剤及び浸透増強剤等の添加物を含んでも良好。

【0170】

本発明のGST- 阻害性核酸分子は、薬学的に許容される希釈剤、担体又は賦形剤の単位剤形で投与することができる。従来の製薬実務を用いて、過度の細胞増殖によって引き起こされる疾患に罹患している患者に化合物を投与するための適切な製剤又は組成物を提供することができる。患者は症状が現れる前に投与を開始することができる。例えば、非経口、静脈内、動脈内、皮下、腫瘍内、筋肉内、頭蓋内、眼窩内、眼科、脳室内、肝内、囊内、髄腔内、膀胱内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、坐薬、又は経口投与が含まれる。例えば、治療用製剤は、液体溶液又は懸濁液の形態とすることができます。経口投与の場合、製剤は、錠剤又はカプセル剤の形態とすることができます。鼻腔内製剤としては、粉末、点鼻薬又はエアロゾルの形態とすることができます。

【0171】

本開示の組成物及び方法は、核酸分子の発現を可能にするように、少なくとも1つの本発明のRNAi分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを含むことができる。

【0172】

本発明の核酸分子及びRNAi分子は、DNA又はRNAベクターに挿入された転写単位から発現させることができます。組換えベクターは、DNAプラスミド又はウイルスベクターとすることができます。核酸分子の一過性発現を提供するウイルスベクターを使用することができます。

【0173】

例えば、ベクターは、二重鎖のRNAi分子の両方の鎖をコードする配列、又は自己相補的であってRNAi分子を形成する単一の核酸分子を含んでも良好。発現ベクターは、2つ以上の核酸分子をコードする核酸配列を含んでも良好。

【0174】

核酸分子は、真核生物のプロモーターから細胞内で発現することができる。当業者は、任意の核酸が、適切なDNA/RNAベクターから真核細胞において発現できることを理解している。

【0175】

いくつかの態様では、発現コンストラクトを細胞に導入するためにウイルスコンストラクトを使用することができ、これは当該発現コンストラクトによりコードされるdsRNA構築物の転写のためである。

【0176】

脂質製剤は、静脈内、筋肉内又は腹腔内注射によって、若しくは経口的に又は吸入によって、若しくは当該分野で公知の他の方法によって動物に投与することができる。

【0177】

オリゴヌクレオチドを投与するための薬学的に許容される製剤は公知であり、使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【0178】

上記方法の一実施形態では、阻害性核酸分子は、約5~500mg/m<sup>2</sup>/日、例えば、5、25、50、100、125、150、175、200、225、250、275又は300mg/m<sup>2</sup>/日である。

## 【0179】

製剤を製造するための当該分野で公知の方法は、例えば、"Remington : The Science and Practice of Pharmacy" Ed. A. R. Gennaro, Lippincourt Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2000で見つけることができる。

## 【0180】

非経口投与のための製剤は、例えば、賦形剤、滅菌水又は生理食塩水、ポリエチレンジリコールなどのポリアルキレンジリコール、植物起源の油又は水素化ナフタレンを含むことができる。生体適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマー又はポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーを使用して、化合物の放出を制御することができる。GST- 阻害性核酸分子のための他の潜在的に有用な非経口送達システムには、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、移植可能な注入システム及びリボソームが含まれる。吸入のための製剤は、賦形剤、例えばラクトースを含むことができ、又は例えばポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココール酸塩及びデオキシコール酸塩を含む水溶液であってもよく、又は点鼻薬の形態で投与する油性溶液であってもよい。

10

## 【0181】

処方物は、新生物の疾患又は状態の治療を提供するために、治療上有効な量（例えば、病的状態を予防、排除又は軽減する量）でヒト患者に投与することができる。本発明の又クレオチドオリゴマーの好ましい投与量は、障害のタイプ及び程度、特定の患者の全体的な健康状態、化合物賦形剤の製剤及びその投与経路などの変数に依存することができる。

20

## 【0182】

悪性腫瘍を減少させるための上記の方法の全ては、インピトロ方法又はインピボ方法のいずれであっても良い。投薬量は、当技術分野で知られているように、培養細胞等を用いたin vitro試験によって決定され得る。有効量は、KRAS関連腫瘍における腫瘍サイズを少なくとも10%、少なくとも20%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%、最大100%まで縮小する量としても良い。

30

## 【0183】

本発明の医薬組成物は、KRAS関連疾患の治療に有効である。疾患としては、異常細胞増殖による疾患、KRAS突然変異による疾患、GST- 過剰発現による疾患などが挙げられる。

## 【0184】

異常細胞増殖による疾患としては、悪性腫瘍、過形成、ケロイド、クッシング症候群、原発性アルドステロン症、赤血球増加症、真性赤血球増加症、白血球増加症、過形成性瘢痕、扁平苔癬及び白子症が挙げられる。

## 【0185】

KRAS突然変異による疾患の例には、悪性腫瘍（癌又は悪性新生物とも呼ばれる）が含まれる。

40

## 【0186】

GST- 過剰発現による疾患の例には、悪性腫瘍が含まれる。

## 【0187】

癌の例には、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、脂肪肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、血管肉腫、カボジ肉腫、リンパ管肉腫、滑膜肉腫、軟骨肉腫及び骨肉腫などの肉腫、脳腫瘍、頭頸部癌腫、乳癌、肺癌、食道癌、胃癌、十二指腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、脾臓癌、胆嚢癌、胆管癌、腎臓癌、尿管癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、皮膚癌、白血病及び悪性リンパ腫などのがん腫を挙げることができる。

## 【0188】

癌は、上皮悪性腫瘍及び非上皮悪性腫瘍を含む。癌は、身体のあらゆる部位、例えば、

50

脳、頭頸部、胸部、四肢、肺、心臓、胸腺、食道、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（結腸、盲腸、虫垂、直腸）、肝臓、胰臓、胆嚢、腎臓、尿管、膀胱、前立腺、精巣、子宮、卵巣、皮膚、線条筋、平滑筋、滑膜、軟骨、骨、甲状腺、副腎、腹膜、腸間膜、骨髄、血液、血管系、リンパ節などのリンパ系、リンパ液等に存在することができる。

## 【0189】

本発明の一実施形態において、癌は、上記に定義された突然変異KRASを有する癌細胞を含む。別の実施形態では、癌は、ホルモン依存性増殖因子又は増殖因子非依存性増殖を示す癌細胞を含む。さらなる実施形態において、癌は、GST- 過剰発現を示す癌細胞を含む。

## 【実施例】

## 【0190】

実施例1：GST- を標的とする本発明のsiRNAは、インビトロで遺伝子サイレンシングに活性であることが見出された。遺伝子ノックダウンのためのGST- siRNAの用量依存的活性は、約250ピコモル (pM) 未満のIC50、及び1pM程度の低いIC50を示すことが判明した。

## 【0191】

インビトロトランスフェクションをA549細胞株で行い、siRNAノックダウン効率を決定した。表10に示すように、GST- mRNAの用量依存的ノックダウンが、表3のsiRNAで観察された。

## 【0192】

## 【表10】

A549細胞株におけるGST- $\pi$ mRNAの用量依存的ノックダウン

siRNA構造	IC50 (pM)
A9(配列番号27及び92)	24
B2(配列番号54及び119)	121
B3(配列番号55及び120)	235
B4(配列番号56及び121)	229
B13(配列番号52及び117)	17
BU2(配列番号63及び128)	31

## 【0193】

表10に示すように、表3のGST- siRNAの活性は、17～235pMの範囲であり、インビトロで使用される薬物剤を含む多くの用途に適している。

## 【0194】

実施例2：siRNAのアンチセンス鎖のシード領域に位置するデオキシヌクレオチドを有する本発明のGST- siRNAの構造は、インビトロにおける遺伝子ノックダウン活性を予想外に且つ有利に増加させることができた。

## 【0195】

インビトロトランスフェクションをA549細胞株で行い、構造BU2'（配列番号133及び159）に基づくGST- siRNAのノックダウン効率を決定した。表11に示すように、構造BU2'に基づくGST- siRNAを用いて、GST- mRNAの用量依存的ノックダウンが観察された。

## 【0196】

10

20

30

40

## 【表11】

構造 BU2'に基づくGST- $\pi$ siRNAに関して、A549細胞株におけるGST- $\pi$ mRNAの用量依存的ノックダウン

GST- $\pi$ siRNA 構造	IC50 (pM)
二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しない BU2 (配列番号 63 及び 128)	31
アンチセンス鎖のシード領域における位置 3、5 及び 7 に デオキシヌクレオチド有する BU2 (配列番号 141 及び 167)	5
アンチセンス鎖のシード領域における位置 4、6 及び 8 に デオキシヌクレオチド有する BU2 (配列番号 143 及び 169)	8
アンチセンス鎖のシード領域における位置 4、6 及び 8 に デオキシヌクレオチド有する BU2 (配列番号 158 及び 184)	5

10

## 【0197】

表11に示すように、アンチセンス鎖のシード領域に3つのデオキシヌクレオチドを有する構造BU2'に基づくGST- $\pi$ siRNAの活性は、二重鎖領域のデオキシヌクレオチドを有しないGST- $\pi$ siRNAと比較して、驚くべきことに予想外に6倍まで増加した。

## 【0198】

20

これらのデータは、アンチセンス鎖のシード領域の位置3、5及び7、又は位置4、6及び8に3つのデオキシヌクレオチドを有する構造を有するGST- $\pi$ siRNAが、二重鎖領域のデオキシヌクレオチドを有しないGST- $\pi$ siRNAと比較して驚くほど高い遺伝子ノックダウン活性を有することを示している。

## 【0199】

アンチセンス鎖のシード領域に3つのデオキシヌクレオチドを有するGST- $\pi$ siRNAについて表11に示される活性は、5~8pMの範囲であり、インビポで使用される薬物剤を含む多くの用途に非常に適していた。

## 【0200】

30

実施例3: siRNAのアンチセンス鎖のシード領域に位置するデオキシヌクレオチドを有する本発明のGST- $\pi$ siRNAの構造は、インビトロで遺伝子ノックダウン活性を予想外に且つ有利に増加させることができた。

## 【0201】

インビトロトランスフェクションをA549細胞株で行い、構造A9'（配列番号185及び197）に基づくGST- $\pi$ siRNAのノックダウン効率を決定した。表12に示すように、GST- $\pi$ mRNAの用量依存的ノックダウンが、構造A9'に基づくGST- $\pi$ siRNAで観察された。

## 【0202】

## 【表12】

構造 A9'に基づく GST- $\pi$  siRNA に関して、A549 細胞株における GST- $\pi$  mRNA の用量依存的ノックダウン

GST- $\pi$ siRNA 構造	IC50 (pM)
二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しない A9 (配列番号 27 及び 92)	24
アンチセンス鎖のシード領域における位置 4、6 及び 8 に デオキシヌクレオチドを有する A9 (配列番号 195 及び 207)	1
アンチセンス鎖のシード領域における位置 1、3、5 及び 7 に デオキシヌクレオチドを有する A9 (配列番号 192 及び 204)	5
アンチセンス鎖のシード領域における位置 3~8 に デオキシヌクレオチドを有する A9 (配列番号 189 及び 201)	6
アンチセンス鎖のシード領域における位置 5~8 に デオキシヌクレオチドを有する A9 (配列番号 191 及び 203)	7
アンチセンス鎖のシード領域における位置 3、5 及び 7 に デオキシヌクレオチドを有する A9 (配列番号 193 及び 205)	15

10

20

30

## 【0203】

表12に示すように、アンチセンス鎖のシード領域に3~6個のデオキシヌクレオチドを有する構造A9'に基づくGST- $\pi$  siRNAの活性は、驚くべきことに、二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しないGST- $\pi$  siRNAと比較して24倍まで増加した。

## 【0204】

これらのデータは、アンチセンス鎖のシード領域における位置4、6及び8、又は位置1、3、5及び7、又は位置3~8、又は位置5~8位、又は位置3、5及び7に3~6個のデオキシヌクレオチドを有する構造を有するGST- $\pi$  siRNAが、二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しないGST- $\pi$  siRNAと比較して予想外に高い遺伝子ノックダウン活性を有することを示している。

## 【0205】

アンチセンス鎖のシード領域に3~6個のデオキシヌクレオチドを有するGST- $\pi$  siRNAについて表12に示す活性は、1~15pMの範囲であり、これは、インビポで使用される薬物剤を含む多くの用途に非常に適していた。

## 【0206】

実施例4: siRNAのアンチセンス鎖のシード領域に位置するデオキシヌクレオチドを有するGST- $\pi$  siRNAの構造は、インビトロにおける遺伝子ノックダウン活性を予想外に且つ有利に増加させることができた。

## 【0207】

インビトロトランスフェクションをA549細胞株で行い、構造B13'（配列番号209及び224）に基づくGST- $\pi$  siRNAのノックダウン効率を決定した。表13に示すように、GST- $\pi$  mRNAの用量依存的ノックダウンが、構造B13'に基づくGST- $\pi$  siRNAで観察された。

## 【0208】

40

## 【表13】

構造B13'に基づくGST- $\pi$ siRNAに関して、A549細胞株におけるGST- $\pi$ mRNAの用量依存的ノックダウン

GST- $\pi$ siRNA 構造	IC50 (pM)
二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しないB13(配列番号52及び117)	17
アンチセンス鎖のシード領域における位置4、6及び8にデオキシヌクレオチド有するB13(配列番号219及び234)	11

## 【0209】

10

表13に示すように、アンチセンス鎖のシード領域に3つのデオキシヌクレオチドを有する構造B13'に基づくGST- siRNAの活性は、二重鎖領域のデオキシヌクレオチドを有しないGST- siRNAと比較して予想外に増加した。

## 【0210】

これらのデータは、アンチセンス鎖のシード領域の位置4、6及び8に3つのデオキシヌクレオチドを有する構造を有するGST- siRNAが、二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを含まないGST- siRNAと比較して予想外に高い遺伝子ノックダウン活性を有することが示している。

## 【0211】

20

アンチセンス鎖のシード領域に3つのデオキシヌクレオチドを有するGST- siRNAについて表13に示す活性は、11pMのピコモルの範囲であり、インビポで使用される薬物剤を含む多くの用途に非常に適していた。

## 【0212】

実施例5: siRNAのアンチセンス鎖のシード領域に位置するデオキシヌクレオチドを有するGST- siRNAの構造は、インビトロで遺伝子ノックダウン活性を予想外に且つ有利に増加させた。

## 【0213】

インビトロトランスフェクションをA549細胞株で行い、構造B4' (配列番号263及び275)に基づくGST- siRNAのノックダウン効率を決定した。表14に示すように、GST- mRNAの用量依存的ノックダウンが構造B4'に基づくGST- siRNAで観察された。

30

## 【0214】

## 【表14】

構造B4'に基づくGST- $\pi$ siRNAに関して、A549細胞株におけるGST- $\pi$ mRNAの用量依存的ノックダウン

GST- $\pi$ siRNA 構造	IC50 (pM)
二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しないB4(配列番号56及び121)	229
アンチセンス鎖のシード領域における位置3~8にデオキシヌクレオチドを有するB4(配列番号267及び279)	113

## 【0215】

40

表14に示すように、アンチセンス鎖のシード領域に6個のデオキシヌクレオチドを有する構造B4'に基づくGST- siRNAの活性は、二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しないGST- siRNAと比較して予想外に2倍以上増加した。

## 【0216】

これらのデータは、アンチセンス鎖のシード領域内の位置3~8に位置する6個のデオキシヌクレオチドを有する構造を有するGST- siRNAが、二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しないGST- siRNAと比較して驚くほど高い遺伝子ノックダウン活性を有することを示している。

## 【0217】

50

アンチセンス鎖のシード領域に6個のデオキシヌクレオチドを有するGST- siRNAの表14に示す活性は、113pMのピコモルの範囲であり、インビボで使用される薬物剤を含む多くの用途に非常に適していた。

【0218】

実施例6：siRNAのアンチセンス鎖のシード領域に位置するデオキシヌクレオチドを有するGST- siRNAの構造は、インビトロで遺伝子ノックダウン活性を予想外に且つ有利に増加させた。

【0219】

インビトロトランスフェクションをA549細胞株で行い、構造B2'（配列番号239及び251）に基づくGST- siRNAのノックダウン効率を決定した。表15に示すように、構造B2'に基づくGST- siRNAを用いて、GST- mRNAの用量依存的ノックダウンが観察された。

10

【0220】

【表15】

構造B2'に基づくGST- $\pi$ siRNAに関して、A549細胞株におけるGST- $\pi$ mRNAの用量依存的ノックダウン

20

GST- $\pi$ siRNA 構造	IC50 (pM)
二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しないB2(配列番号54及び119)	121
アンチセンス鎖のシード領域における位置5~8に デオキシヌクレオチドを有するB2(配列番号245及び257)	30
アンチセンス鎖のシード領域における位置1、3、5及び7に デオキシヌクレオチドを有するB2(配列番号246及び258)	50
アンチセンス鎖のシード領域における位置3、5及び7に デオキシヌクレオチドを有するB2(配列番号246及び259)	100

【0221】

表15に示すように、アンチセンス鎖のシード領域内に3~4個のデオキシヌクレオチドを有する構造B2'に基づくGST- siRNAの活性は、二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを有しないGST- siRNAと比較して驚くべきことに4倍まで増加した。

30

【0222】

これらのデータは、アンチセンス鎖のシード領域の位置5~8、又は位置1、3、5及び7、又は位置3、5及び7に位置する3~4個のデオキシヌクレオチドを有する構造を有するGST- siRNAが、二重鎖領域にデオキシヌクレオチドを含まないGST- siRNAと比較して予想外に高い遺伝子ノックダウン活性を有することを示している。

20

【0223】

アンチセンス鎖のシード領域に3~4個のデオキシヌクレオチドを有するGST- siRNAについて表15に示す活性は、30~100pMの範囲であり、これは、インビボで使用される薬物剤を含む多くの用途に非常に適している。

40

【0224】

実施例7：1つ以上の2'-デオキシ-2'-フルオロ置換ヌクレオチドを含むGST- siRNAの構造は、インビトロで予想外に増加した遺伝子ノックダウン活性を示した。

【0225】

インビトロトランスフェクションをA549細胞株で行い、構造BU2'（配列番号133及び159）に基づくGST- siRNAのノックダウン効率を決定した。表16に示すように、構造BU2'に基づくGST- siRNAを用いて、GST- mRNAの用量依存的ノックダウンが観察された。

【0226】

## 【表16】

構造 BU2'に基づくGST- $\pi$  siRNAに関して、A549細胞株におけるGST- $\pi$  mRNAの用量依存的ノックダウン

GST- $\pi$ siRNA構造	IC50 (pM)
2'-F デオキシヌクレオチドを有しない BU2 (配列番号 63 及び 128)	31
アンチセンス鎖の 3'末端の位置 1に1つを含む、7つの 2'-F デオキシヌクレオチドを有する BU2 (配列番号 150 及び 176)	3
アンチセンス鎖の 3'末端の位置 1に1つを含む、7つの 2'-F デオキシヌクレオチドを有する BU2 (配列番号 149 及び 175)	11
アンチセンス鎖の 3'末端の位置 1に1つの 2'-F デオキシヌクレオチドを有する BU2 (配列番号 146 及び 172)	13

10

20

30

40

## 【0227】

表16に示すように、1つ以上の2'-Fデオキシヌクレオチドを有する構造BU2'に基づくGST- $\pi$  siRNAの活性は、2'-Fデオキシヌクレオチドを有しないGST- $\pi$  siRNAと比較して、驚くべきことに10倍まで増加した。

## 【0228】

これらのデータは、1つ以上の2'-Fデオキシヌクレオチドを有する構造を有するGST- $\pi$  siRNAが、2'-Fデオキシヌクレオチドを有しないGST- $\pi$  siRNAと比較して予想外に高い遺伝子ノックダウン活性を有することを示している。

## 【0229】

1つ以上2'-Fデオキシヌクレオチドを有するGST- $\pi$  siRNAについて表16に示す活性は、3~13pMの範囲であり、インビポで使用される薬物剤を含む多くの用途に非常に適していた。

## 【0230】

実施例8: 1つ以上の2'-デオキシ-2'-フルオロ置換ヌクレオチドを含むGST- $\pi$  siRNAの構造は、インビトロで意外にも増加した遺伝子ノックダウン活性を示した。

## 【0231】

インビトロトランスフェクションをA549細胞株で行い、構造B13' (配列番号209及び224)に基づくGST- $\pi$  siRNAのノックダウン効率を決定した。表17に示すように、GST- $\pi$  mRNAの用量依存的ノックダウンが構造B13'に基づくGST- $\pi$  siRNAで観察された。

## 【0232】

## 【表17】

構造 B13'に基づくGST- $\pi$  siRNAに関して、A549細胞株におけるGST- $\pi$  mRNAの用量依存的ノックダウン

GST- $\pi$ siRNA構造	IC50 (pM)
2'-F デオキシヌクレオチドを有しない B13 (配列番号 52 及び 117)	17
非オーバーハング位置に3つの 2'-F デオキシヌクレオチドを有する B13 (配列番号 221 及び 236)	6

## 【0233】

表17に示すように、非オーバーハング位置に3つの2'-Fデオキシヌクレオチドを有する構造B13'に基づくGST- $\pi$  siRNAの活性は、驚くべきことに、2'-Fデオキシヌクレオチドを有しないGST- $\pi$  siRNAと比較して約3倍増加した。

## 【0234】

これらのデータは、1つ以上の2'-Fデオキシヌクレオチドを有する構造を有するGST- $\pi$  siRNA

50

RNAが、2'-Fデオキシヌクレオチドを有しないGST- siRNAと比較して予想外に高い遺伝子ノックダウン活性を有することを示している。

#### 【0235】

1つ以上の2'-Fデオキシヌクレオチドを有するGST- siRNAについて表17に示される活性は、6pMのピコモルの範囲であり、インビボで使用される薬物剤を含む多くの用途に非常に適していた。

#### 【0236】

実施例9：同所性A549肺癌マウスモデル。本発明のGST- siRNAは、インビボで同所性肺癌腫瘍の顕著な減少を示すことができる。この実施例において、GST- siRNAは、無胸腺ヌードマウスの同所性肺癌腫瘍にリポソーム製剤で投与された場合、in vivoで遺伝子ノックダウン効力をもたらした。

10

#### 【0237】

一般に、同所性腫瘍モデルは、薬効及び効力、ならびに改善された予測能力に関して直接の臨床的関連性を示すことができる。同所性腫瘍モデルにおいて、腫瘍細胞は、細胞が由来する同種の器官に直接移植される。

#### 【0238】

ヒト肺癌A549に対するsiRNA製剤の抗腫瘍有効性を、処置群及びビヒクル対照群の剖検時に測定した最終原発腫瘍重量を比較することによって評価した。

#### 【0239】

図1は、構造BU2（配列番号63及び128）に基づくGST- siRNAのインビボでの同所性肺癌腫瘍阻害を示している。同所性A549肺癌マウスモデルを、GST- を標的とするsiRNAの2mg/kgで比較的低用量で使用した。

20

#### 【0240】

GST- siRNAは、この6週間の研究において有意で予想外に有利な肺腫瘍阻害効力を示した。図1に示すように、43日後、GST- siRNAは著しく有利な腫瘍阻害効力を示し、最終腫瘍平均重量は対照と比較して2.8倍有意に減少した。

#### 【0241】

この研究のために、5~6週齢の雄Ncr nu/nuマウスを使用した。実験期間中、実験動物をHEPA濾過環境に維持した。使用前にsiRNA製剤を4℃で保存し、マウスに注射する10分前に室温に温めた。

30

#### 【0242】

外科的同所移植（S01）の日に、このA549ヒト肺癌同所性モデルについて、ストック腫瘍を、A549腫瘍異種移植片を有する動物の皮下部位から採取し、RPMI-1640培地に入れた。壊死組織を除去し、生存組織を1.5~2mm<sup>3</sup>に切断した。動物をイソフルラン吸入で麻酔し、手術領域をヨウ素及びアルコールで滅菌した。約1.5cmの横断切開を、マウスの左胸壁に、一対の外科用ハサミを用いて行った。3番目と4番目の肋間に肋間切開を行い、左肺を露出させた。1つのA549腫瘍断片を8-0の外科的縫合糸（ナイロン）で肺の表面に移植した。胸壁は6-0の外科用縫合糸（シルク）で閉じられた。肺は、胸腔内の残りの空気を引き出すために、25G×1/2針の3ccシリンジを使用して胸腔内穿刺により再膨張させた。胸壁は6-0の外科用縫合糸で閉じられた。上記操作の全ての手順は、HEPA濾過層流フードの下で7倍の倍率顕微鏡を用いて行った。

40

#### 【0243】

腫瘍移植の3日後、モデル担癌マウスを、群当たり10匹のマウスの群に無作為に分けた。目的の群については、腫瘍移植の3日後に10匹のマウスの治療を開始した。

#### 【0244】

目的の群について、処方物は、（イオン化可能な脂質：コレステロール：DOPE：DOPC：DPPE-PEG-2K：DSPE-PEG-2K）のリポソーム組成物とした。リポソームはGST- siRNAをカプセル化した。

#### 【0245】

試験エンドポイントについては、処置開始後42日で実験マウスを屠殺した。原発腫瘍を

50

切除し、その後の分析のために電子天秤で秤量した。

【0246】

化合物の毒性の評価について、処置群及び対照群におけるマウスの平均体重は、実験期間全体にわたって正常範囲内に維持された。毒性の他の症状はマウスにおいて観察されなかった。

【0247】

実施例10：本発明のGST- siRNAは、インビボで癌異種移植片腫瘍の顕著な減少を示した。GST- siRNAは、リポソーム製剤で癌異種移植片腫瘍に投与された場合、インビボで遺伝子ノックダウン効力をもたらした。

【0248】

図2は、GST- siRNA（配列番号158及び184）の腫瘍阻害効力を示す。癌異種移植モデルを、GST- を標的とするsiRNAの0.75mg/kgで比較的低用量で使用した。

【0249】

GST- siRNAは、投与後数日以内に有意で予想外に有利な腫瘍阻害効力を示した。36日後、GST- siRNAは著しく有利な腫瘍阻害効力を示し、腫瘍体積は対照と比較して2倍減少した。

【0250】

図3に示すように、GST- siRNAは、最終日に有意で予想外に有利な腫瘍阻害効力を示した。特に、腫瘍重量は2倍以上減少した。

【0251】

組成物（イオン化可能な脂質：コレステロール：DOPE：DOPC：DPPE-PEG-2K）（25：30：20：20：5）を有するリポソーム製剤としてGST- siRNAを2回の注射（1日目及び15日目）で投与した。

【0252】

癌異種移植モデルのため、A549細胞株をATCCから得た。10%ウシ胎仔血清及び100U/mlペニシリン及び100μg/mlストレプトマイシンを補充した培養培地で細胞を維持した。接種の48時間前に細胞を分割して、回収時に対数増殖期になるようにした。細胞をトリプシン-EDTAで軽くトリプシン処理し、組織培養から回収した。生存細胞の数を計数し、トリパンブルーの存在下で血球計算盤で測定した（生存細胞のみを数える）。細胞を、血清を含まない培地で $5 \times 10^7$ /mlの濃度に再懸濁した。次いで、細胞懸濁液を、氷解凍したBDマトリゲルと1：1の比率でよく混合して注射に使用した。

【0253】

マウスは、チャールズ・リバー・ラボラトリの胸腺ヌードマウス（nu/nu）雌マウス、免疫不全、6～8週齢、1群当たり7～8匹のマウスとした。

【0254】

腫瘍モデル調製のために、マウス1匹につき1接種量の25G針及びシリングを用いて、 $2.5 \times 10^6$ 個のA549細胞の接種物0.1mlを右脇腹に皮下接種した。マウスは接種のために麻酔をかけられなかった。

【0255】

腫瘍体積の測定及び無作為化のために、腫瘍サイズを最も近い0.1mmまで測定した。腫瘍体積は、式：腫瘍体積=長さ×幅<sup>2</sup>/2を用いて計算した。確立された腫瘍が約120～175mm<sup>3</sup>に達すると、平均腫瘍体積は約150mm<sup>3</sup>であり、処置群の平均腫瘍体積がビヒクル対照群の平均腫瘍体積の10%以内になるように、マウスを様々なビヒクル対照及び処置群に割り当てる。理想的には、腫瘍体積のCV%を25%未満とした。同じ日に、試験品及び対照ビヒクルを投薬レジメンに従って投与した。腫瘍体積を第1週に3回、研究終了の日を含む残りの週に2回モニターした。

【0256】

投薬投与のために、投与日に、試験品を-80℃の冷凍庫から取り出し、氷上で解凍した。注射器にアプライする前に、処方剤を含むボトルを手で数回戻した。全ての試験品には、0.75mg/kgでIV、q2wX2、10ml/kgで投与した。

10

20

30

40

50

## 【0257】

体重については、マウスを最も近い0.1gまで秤量した。体重をモニターし、初回投与の7日以内に毎日記録した。研究の終了日を含む残りの数週間、体重を数週間監視し、週に2回記録した。

## 【0258】

最初の投薬の28日後に腫瘍を採取するために、腫瘍体積を測定し、重量測定のために腫瘍を切開し、PDバイオマーカー研究のために保存した。腫瘍重量を記録した。

## 【0259】

実施例11：本発明のGST- siRNAは、*in vitro*で癌細胞のアポトーシスにより癌細胞死の増加を示した。GST- siRNAはGST- ノックダウンをもたらし、アポトーシスのバイオマーカーであるPUMAのアップレギュレーションをもたらし、細胞生存率の低下を伴った。

10

## 【0260】

シード領域におけるデオキシヌクレオチド、2'-F置換デオキシヌクレオチド及び2'-OMe置換リボヌクレオチドの組合せを含むGST- siRNA配列番号158及び184は、予期せず癌細胞のアポトーシスを増加させた。

## 【0261】

GST- siRNA配列番号158及び184に対するPUMAの発現レベルを図4に示した。図4に示すように、PUMAの発現は、GST- siRNAのトランスフェクションの2~4日後に大きく增加了。

20

## 【0262】

これらのデータは、シード領域におけるデオキシヌクレオチド、2'-F置換デオキシヌクレオチド及び2'-OMe置換リボヌクレオチドの組み合わせを含むGST- siRNAの構造が、予想外に癌細胞のアポトーシスを増加させることを示している。

## 【0263】

PUMAバイオマーカーに関するプロトコルは以下の通りとした。トランスフェクションの1日前に、10%FBSを含む100 μlのDMEM ( HyCloneカタログ番号SH30243.01 ) を96ウェルプレートに $2 \times 10^3$ 細胞/ウェルで播種し、5%CO<sub>2</sub>の空気中で加湿雰囲気を含む37℃インキュベーターで培養した。翌日、トランスフェクションの前に、培地を、2%FBSを含む90 μlのOpti-MEM I還元血清培地 ( Life Technologiesカタログ番号31985-070 ) と交換した。次いで、0.2 μlのLipofectamine RNAiMAX ( Life Technologiesカタログ番号13778-100 ) を4.8 μlのOpti-MEM Iと室温で5分間混合した。1 μlのsiRNA ( ストック濃度1 μM ) を4 μlのOpti-MEM Iと混合し、RNAiMAX溶液と混合し、次いで穏やかに混合した。混合物を室温で10分間インキュベートし、RNA-RNAiMAX複合体を形成させた。10 μlのRNA-RNAiMAX複合体をウェル当たりに添加し、siRNAの最終濃度を10nMとした。細胞を2時間インキュベートし、培地を2%FBSを含む新鮮なOpti-MEM I還元血清培地に交換した。トランスフェクションの1、2、3、4及び6日後、細胞を氷冷PBSで1回洗浄し、次いで50 μlのCell-to-Ct溶解緩衝液 ( Life Technologiesカタログ番号4391851C ) を用いて室温で約5~30分溶解した。5 μlの停止溶液を添加し、室温で2分間インキュベートした。PUMA ( BBC3、Cat # Hs00248075、Life Technologies ) のmRNAレベルをTaqmanを用いてqPCRにより測定した。

30

## 【0264】

実施例12：本発明のGST- siRNAは、インビボで癌異種移植片腫瘍の顕著な減少を示すことができた。GST- siRNAは、リポソーム製剤で癌異種移植腫瘍に投与された場合、インビボで遺伝子ノックダウン効力を提供することができる。

40

## 【0265】

図5は、GST- siRNA ( 配列番号63及び128 ) の腫瘍阻害効力を示している。GST- mRNAの用量依存的ノックダウンは、GST- を標的とするsiRNAでインビボで観察された。癌異種移植片モデルを、GST- を標的とするsiRNAの0.75mg/kgで比較的低用量と共に使用した。

## 【0266】

50

GST- siRNAは、投与後数日以内に有意で予想外に有利な腫瘍阻害効力を示した。図5に示すように、GST- siRNAで処理すると、脂質製剤に注射してから4日後にGST- mRNA発現が有意に減少した。4mg/kgの高用量では、注入後24時間で約40%の有意な減少が検出された。

#### 【0267】

GST- siRNAを、組成物（イオン化可能な脂質：コレステロール：DOPE：DOPC-PE G-2K）（25：30：20：20：5）を有する10mL/kgのリポソーム製剤として単回注射で投与した。

#### 【0268】

癌異種移植片モデルのため、A549細胞株をATCCから得た。細胞を、10%ウシ胎仔血清及び100U/mlペニシリン及び100μg/mlストレプトマイシンを補充したRPMI-1640中で維持した。接種の48時間前に細胞を分割して、回収時に対数増殖期になるようにした。細胞をトリプシン-EDTAで軽くトリプシン処理し、組織培養から回収した。生存細胞の数を計数し、トリパンブルーの存在下で血球計算盤で測定した（生存細胞のみを数える）。血清を含まないRPMI培地で細胞を $4 \times 10^7$ /mlの濃度に再懸濁した。次いで、細胞懸濁液を、氷解凍したBDマトリゲルと1：1の比率でよく混合して注射に使用した。

#### 【0269】

マウスは、チャールズ・リバー・ラボラトリー胸腺ヌード（nu/nu）雌マウス、免疫不全、6～8週齢、1群当たり3匹のマウスであった。

#### 【0270】

腫瘍モデル調製のために、マウス1匹につき1接種量の25G針及び注射器を用いて、 $2 \times 10^6$ のA549細胞の接種材料0.1mlを右脇腹に皮下接種した。マウスは接種のために麻酔をかけられなかった。

#### 【0271】

腫瘍体積の測定及び無作為化のために、腫瘍サイズを最も近い0.1mmまで測定した。腫瘍体積は、式：腫瘍体積=長さ×幅<sup>2</sup>/2を用いて計算した。腫瘍容積を週2回モニターした。確立された腫瘍が約350～600mm<sup>3</sup>に達すると、マウスを様々な時点で群に割り当てた。同じ日に、試験品を投与レジメンに従って投与した。

#### 【0272】

投薬投与のために、確立された腫瘍が約350～600mm<sup>3</sup>に達した日に、試験品を4の冷蔵庫から取り出した。シリンジにアプライする前に、処方剤を含むボトルを手で数回戻して均一な溶液を作製した。

#### 【0273】

体重については、マウスを最も近い0.1gまで秤量した。研究の終了日を含む残りの数週間、体重を数週間監視し、週2回記録した。

#### 【0274】

腫瘍の収集のために、動物を過量のCO<sub>2</sub>で犠牲にし、投与後0、24、48、72及び96（任意）及び168時間で腫瘍を解剖した。腫瘍を最初に湿潤し、KD、分布及びバイオマーカー分析のために3つの部分に分けた。試料を液体窒素中で急速冷凍し、処理する準備が整うままで-80で保存した。

#### 【0275】

実施例13：本発明のGST- siRNAは、インビボで膵臓癌異種移植片腫瘍を阻害した。GST- siRNAは、リポソーム製剤で膵臓癌異種移植片腫瘍に投与された場合、インビボで遺伝子ノックダウン効力をもたらした。

#### 【0276】

この異種移植モデルでは、各マウスに、 $2.5 \times 10^6$ のPANC-1細胞接種物0.1mlを右脇腹に皮下接種した。胸腺欠損ヌード雌マウス（6～8週齢、Charles River）を用いた。腫瘍の大きさは、最も近い0.1mmまで測定した。確立された腫瘍が約150～250mm<sup>3</sup>（平均腫瘍体積約200mm<sup>3</sup>）に達すると、マウスを、処置群の平均腫瘍体積がビヒクリ对照群における平均腫瘍体積の10%以内になるように、様々なビヒクリ対照及び処置群に割り当てた。同じ日

10

20

30

40

50

に、試験品及び対照ビヒクルを投薬レジメンに従って投与した。腫瘍容積を第1週に3回、研究終了日を含めて残りの週では2回モニターした。

#### 【0277】

図6は、GST- siRNA（配列番号63及び128）の腫瘍阻害効力を示している。図6に示すように、用量応答は、GST- を標的とするsiRNAの0.375mg/kg～3mg/kgの範囲の用量で得られた。GST- siRNAは、投与後数日以内に有意で、且つ予想外に有利な腫瘍阻害効力を示した。したがって、GST- siRNAは、エンドポイントで有意で、且つ予想外に有利な腫瘍阻害効力を示した。

#### 【0278】

GST- siRNAを、組成物（イオン化可能な脂質：コレステロール：DOPE：DOPC：DPPE-PE G-2K）（25：30：20：20：5）を有するリポソーム製剤で投与した。 10

#### 【0279】

実施例14：本発明のGST- siRNAは、増加した血清安定性を示した。

図7は、ヒト血清中でのインキュベーション及びHPLC/LC/MSによる様々な時点での残りのsiRNAの検出を示している。図7に示すように、GST- siRNA（配列番号63及び128）のセンス鎖（図7、上段）及びアンチセンス鎖（図7、下段）の両方の血清中の半減期（ $t_{1/2}$ ）は約100分であった。

#### 【0280】

実施例15：本発明のGST- siRNAは、血漿中での製剤中の安定性の向上を示した。

図8は、血漿中での製剤のインキュベーション及び様々な時点での残りのsiRNAの検出を示している。図8に示すように、GST- siRNA製剤（配列番号63及び128）の血漿中半減期（ $t_{1/2}$ ）は100時間よりも有意に長かった。 20

#### 【0281】

GST- siRNAを、組成物（イオン化脂質：コレステロール：DOPE：DOPC：DPPE-PEG-2K）（25：30：20：20：5）を有するリポソーム製剤で調製した。リポソームナノ粒子のz平均サイズは40.0nmであり、siRNAは91%カプセル化されていた。

#### 【0282】

製剤をPBS中の50%ヒト血清中で40分、1.5時間、3時間、24時間及び96時間インキュベートした。GST- siRNAの量は、ELISAベースのアッセイによって決定した。

#### 【0283】

実施例16：本発明のGST- siRNAは、パッセンジャー鎖によるオフターゲット効果の低下を示した。 30

#### 【0284】

GST- siRNA（配列番号158及び184）について、図9は、効果を示さなかったスクランブル配列を有する対照と比較して、ガイド鎖についてのインビトロノックダウンがほぼ指數関数的であったことを示している。このsiRNAのIC50を5pMで測定した。図10は、同じGST- siRNAのパッセンジャー鎖のインビトロノックダウンを示している。図10に示すように、GST- siRNAについてパッセンジャー鎖のオフターゲットノックダウンは100倍以上大きく減少した。

#### 【0285】

GST- siRNA（配列番号189及び201）、（配列番号191及び203）及び（配列番号192及び204）について、図11は、ガイド鎖のインビトロノックダウンはおよそ指數関数的であったことを示している。これらのsiRNAのIC50を、それぞれ6、7及び5pMで測定した。図12に示すように、これらのGST- siRNAのパッセンジャー鎖のインビトロノックダウンは、少なくとも10倍まで有意に減少した。これらのGST- siRNAはすべて、二重鎖領域のシード領域にデオキシヌクレオチドを有し、当該二重鎖領域には他の修飾はなかった。 40

#### 【0286】

GST- siRNA（配列番号219及び234）について、図13は、この高活性なGST- siRNAのガイド鎖についてのインビトロノックダウンがほぼ指數関数的であったことを示している。このsiRNAのIC50を11pMで測定した。図14に示すように、このGST- siRNAのパッセンジャー 50

ー鎖に対するインピトロノックダウンは、100倍を超えて有意に減少した。このGST- siRNAは、二重鎖領域のシード領域にデオキシヌクレオチドを有し、当該二重鎖領域には他の修飾はなかった。

【0287】

オフターゲット効果は、*Renilla*ルシフェラーゼ遺伝子をコードする発現レポータープラスミドpsiCHECK-2を用いて決定した（二重ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム、Promega、カタログ番号：E1960）。siRNA濃度は典型的には50pMであった。プロトコル：1日目、HeLa細胞を $5 \sim 7.5 \times 10^3$ /100  $\mu$ l/ウェルで播種した。2日目、約80%の細胞コンフルエンスでの同時トランスフェクション。3日目に、細胞を採取してルシフェラーゼ活性測定を行った。ルシフェラーゼ活性を、プロメガ社のルシフェラーゼアッセイシステム（E4550）を用いて、製造業者のプロトコルに従って測定した。

10

【0288】

psiCHECK-2ベクターは、*Renilla*ルシフェラーゼのレポーター遺伝子に融合した標的遺伝子の発現の変化をモニタリングすることができる。siRNA構築物を多重クローニング領域にクローニングし、ベクターをHeLa細胞にsiRNAとともに同時トランスフェクションした。特定のsiRNAが標的mRNAに結合し、RNAiプロセスを開始する場合、融合*Renilla*ルシフェラーゼ：構築mRNAは切断され、続いて分解され、*Renilla*ルシフェラーゼシグナルを減少させる。

【0289】

例えば、BU2'構造を有するsiRNAのためのプラスミド挿入物は以下の通りとした：

20

PsiCHECK-2 (F) プラスミド挿入物：

配列番号288

ctcgag gggcaacTGAAGCCTTTGAGACCCTGcTgTcccag gcggccgc

PsiCHECK-2 (R) プラスミド挿入物：

配列番号289

ctcgag cTggacagCAGGGTCTCAAAAGGCTTCagTTgccc gcggccgc

【0290】

実施例17：本発明のGST- siRNAは、シード依存性の意図しないオフターゲット遺伝子サイレンシングである、miRNA様オフターゲット効果が有利に減少したことを示した。

30

【0291】

GST- siRNA（配列番号158及び184）、（配列番号189及び201）、（配列番号191及び203）、（配列番号192及び204）及び（配列番号219及び234）に関して、miRNAを模倣するオフターゲット活性は、本質的に無視できることが判明した。これらのGST- siRNAのシード依存性の意図しないオフターゲット遺伝子サイレンシングは、ガイド鎖の標的活性よりも少なくとも10倍～100倍小さかった。

【0292】

miRNA関連オフターゲット効果を試験するために、アンチセンス鎖の5'末端の1~8位の位置である、シード含有領域全体に相補的ではあるが残りの非シード領域（位置9~21）相補的ではない、1~4回反復のシード適合標的配列を、ルシフェラーゼmRNAの3'UTRに対応する領域に導入して、シード依存性の意図しないオフターゲット効果の効率を決定した。プラスミド挿入物を用いて、シード領域における完全なマッチング及び非シード領域におけるミスマッチ（バルジ）を有するmiRNAを模倣した。

40

【0293】

例えば、BU2'構造を有するsiRNAについてのプラスミド挿入物は以下の通りとした：

40

PsiCHECK-2 (Fmi1) プラスミド挿入物：

配列番号290

ctcgag gggcaacTCTACGCAAAACAGACCCTGcTgTcccag gcggccgc

PsiCHECK-2 (Fmi2) プラスミド挿入物：

配列番号291

ctcgag gggcaacTCTACGCAAAACAGACCCTGcT CTACGCAAAACAGACCCTGcT gTcccag gcggccgc

50

PsiCHECK-2 (Fmi3) プラスミド挿入物 :

配列番号292

ctcgag gggcaacTCTACGCAAAACAGACCCTGcT CTACGCAAAACAGACCCTGcT CTACGCAAAACAGACCCTGcT  
gTcccag gcggccgc

PsiCHECK-2 (Fmi4) プラスミド挿入物 :

配列番号293

ctcgag gggcaacTCTACGCAAAACAGACCCTGcT CTACGCAAAACAGACCCTGcT CTACGCAAAACAGACCCTGcT  
cT CTACGCAAAACAGACCCTGcT gTcccag gcggccgc

【0294】

さらなる定義

10

本明細書中で使用される用語は、一般に、本発明の文脈内で、及び各用語が使用される特定の文脈において、当技術分野における通常の意味を有する。用語が詳細に説明されているか否か、又は本明細書で論じられているかどうかは特に重要ではない。本開示における実施例の説明は例示的なものに過ぎず、決して本発明の範囲及び意味を限定するものではない。

【0295】

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。以下の参考文献は、本発明で使用される特定の用語の一般的な定義を提供することができる：Singletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology（第2版、1994）；ケンブリッジ科学技術辞典（Walker ed., 1988）；R. Rieger et al., The Genetics、5th Ed.（編）、Springer Verlag（1991）；Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology（1991）

20

【0296】

「新生物（neoplasia）」は、細胞分裂の不適切な高レベル、不適切な低レベルのアポトーシス、又はその両方によって引き起こされるか又は結果として起こる任意の疾患を意味することができる。例えば、癌は新生物の一例である。癌は、例えば、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、急性骨髓芽球性白血病、急性前骨髓球性白血病、急性骨髓单球性白血病、急性单球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ球性白血病、真性赤血球増加症、リンパ腫（ホジキン病、非ホジキン病）、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖症等の白血病、及び、非上皮性悪性腫瘍（肉腫）及び上皮性悪性腫瘍（線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管路表皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーリング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、囊胞腺癌、髓様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、神経鞘腫、髓膜腫、黑色腫、神経芽細胞腫及び網膜芽細胞腫）といった固形腫瘍が含まれる。リンパ増殖性障害もまた、増殖性疾患であると考えられている。

30

【0297】

「核酸」は、リボ核酸又はデオキシリボ核酸又はその類似体のオリゴマー又はポリマーを意味する。この用語は、天然に存在する塩基、糖及び糖間（骨格）結合からなるオリゴマーならびに同様に機能する非天然部分を有するオリゴマーを含む。そのような修飾又は置換オリゴヌクレオチドは、例えば、ヌクレアーゼの存在下での安定性の向上などの特性のために、しばしば天然形態よりも好ましい。

40

【0298】

「実質的に同一」とは、タンパク質又は核酸分子が、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか1つ）又は核酸配列（例えば、本明細書中に記載される核酸配列）と少なくとも50%の同一性を示すことを意味する。好ましくは、そのよう

50

な配列は、比較のために使用される配列とアミノ酸レベル又は核酸において少なくとも60%、より好ましくは80%又は85%、さらにより好ましくは90%、95%又はさらには99%同一である。

#### 【0299】

配列同一性は、典型的には、配列分析ソフトウェア（例えば、Genetics Computer GroupのSequence Analysisソフトウェアパッケージ、University of Wisconsin Biotechnology Centre、1710 University Avenue、Madison、Wis. 53705、BLAST、BESTFIT、GAP、又はPILEUP/Prettyboxプログラム）を使って測定される。そのようなソフトウェアは、様々な置換、欠失、及び/又は他の修飾に相同性の程度を割り当てることによって、同一又は類似の配列をマッチさせる。保存的置換は、典型的には、以下の群内の置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシンである。同一性の程度を決定するための例示的なアプローチでは、 $e^{-3}$ と $e^{-1}$ との間の確率スコアが密接に関連する配列を示すBLASTプログラムを使用することができる。

10

#### 【0300】

「阻害性核酸」とは、単鎖又は二本鎖RNA、siRNA（短い干渉RNA）、shRNA（ショートヘアピンRNA）又はアンチセンスRNA若しくはその一部若しくはその模倣物を意味し、哺乳動物細胞に投与された場合に、標的遺伝子の発現の減少をもたらす（例えば、10%、25%、50%、75%、又はさらには90~100%）。典型的には、核酸インヒビターは、標的核酸分子の少なくとも一部又はそのオルソログを含むか又は対応するか、又は標的核酸分子の相補鎖の少なくとも一部を含む。

20

#### 【0301】

「アンチセンス核酸」とは、RNA-RNA又はRNA-DNA相互作用によって標的RNAに結合し、標的RNAの活性を変化させる非酵素的核酸分子を意味する（総説として、Steinら 1993; Woolfら、米国特許第5,849,902号）。典型的には、アンチセンス分子は標的配列に相補的であり、アンチセンス分子の単一の連続した配列に沿っている。しかし、特定の実施形態では、アンチセンス分子は基質分子がループを形成し、及び/又はアンチセンス分子が結合してアンチセンス分子がループを形成するように基質に結合することができる。したがって、アンチセンス分子は、2つ（又はそれ以上）の非隣接基質配列に相補的であっても良いし、又はアンチセンス分子の2つ（又はそれ以上）の非隣接配列部分が標的配列又はその両方に相補的であってもよい。現在のアンチセンス戦略の総説についてはSchmajuk N Aら、1999; Delihas Nら、1997; Aboul-Fadi T、2005参照。

30

#### 【0302】

「siRNA」という用語は、低分子干渉RNAを指す。siRNAは、参照又は標的遺伝子配列に「対応する」又は一致する二本鎖RNAである。このマッチングは、siRNAの各鎖が標的配列の少なくとも一部に結合することができる限り完全である必要はない。siRNAを用いて遺伝子発現を阻害することができる（例えば、Bass、2001、Nature、411、428,429; Elbashi rら、2001、Nature、411、494、498；及びZamoreら、Cell 101：25-33（2000））。

40

#### 【0303】

本明細書に記載された実施形態は限定的ではなく、当業者は、本明細書に記載の修飾の特定の組み合わせを、改善されたRNAi活性を有する核酸分子を同定するための過度の実験なしに試験することができるることを容易に理解することができる。

#### 【0304】

本明細書中で具体的に言及される全ての刊行物、特許及び文献は、あらゆる目的のためにその全体が参考として援用される。

#### 【0305】

本発明は、記載された特定の方法論、プロトコル、材料、及び試薬に限定されず、これらは変化し得ることが理解される。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではないことも理解されたい。説

50

明の範囲及び精神から逸脱することなく、本明細書に開示された説明に様々な置換及び変更を加えることができ、これらの実施形態はこの説明及び添付の特許請求の範囲内にあることは、当業者にとって極めて明らかである。

#### 【0306】

単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈上他に明確に指示されていない限り、複数の言及を含むことに留意されたい。同様に、用語「a」（又は「an」）、「1つ以上」及び「少なくとも1つの」は、本明細書では交換可能に使用することができる。用語「含む（comprises）」、「含む（comprising）」、「含有する（containing）」、「含む（including）」及び「有する」は、互換的に使用することができ、広範かつ制限なしに読まれるべきである。

10

#### 【0307】

本明細書中の値の範囲の記載は、本明細書中に別段の指示がない限り、範囲内の各別個の値を個々に参照する簡略方法として役立つことを意図しており、それぞれの個別値は個々に記載されているかのように組み入れられる。ここで、マーカッシュグループについては、当業者は、この説明が個々のメンバーならびにマーカッシュグループのメンバーのサブグループを含むことを認識するであろう。

#### 【0308】

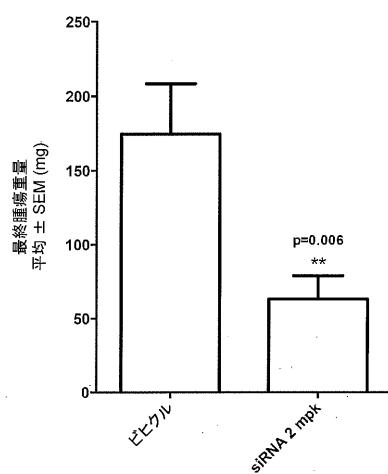
それ以上の詳述なしに、当業者は、上記の説明に基づいて、本発明を最大限に利用することができると考えられる。したがって、以下の特定の実施形態は、単なる例示として解釈されるものであり、決して本開示の残りの部分を限定するものではない。

20

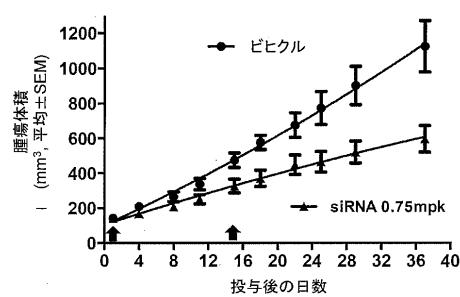
#### 【0309】

本明細書に開示される特徴の全ては、任意の組み合わせで組み合わせることができる。本明細書で開示された各特徴は、同じ、等価の目的、又は同様の目的を果たす代替の特徴と置き換えることができる。

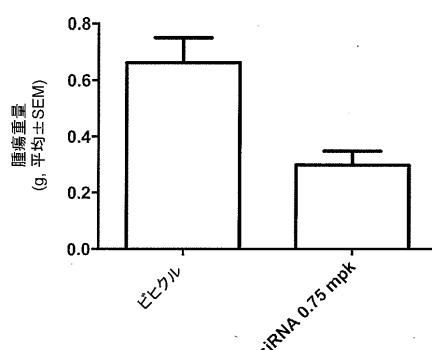
【図1】



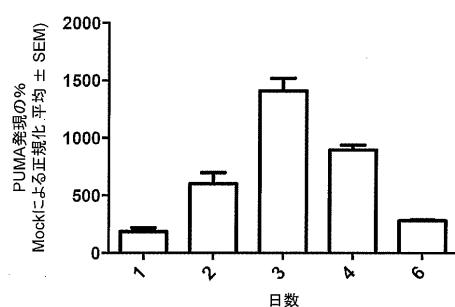
【図2】



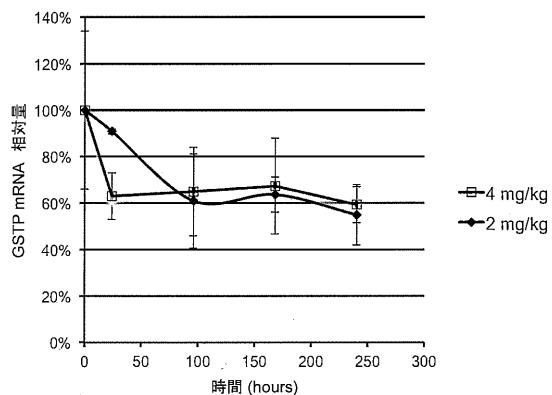
【図3】



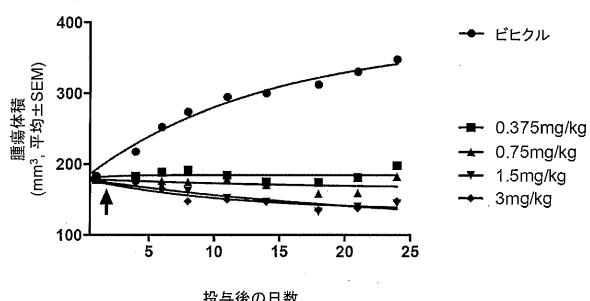
【図4】



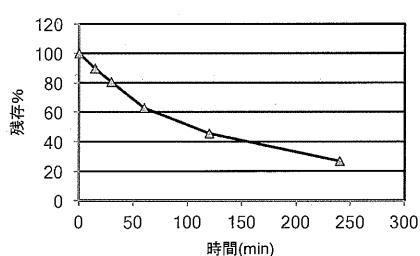
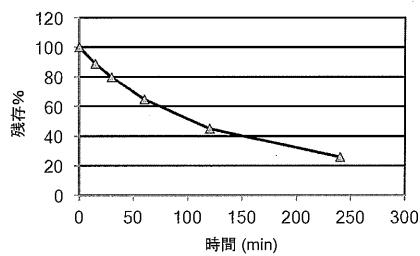
【図5】



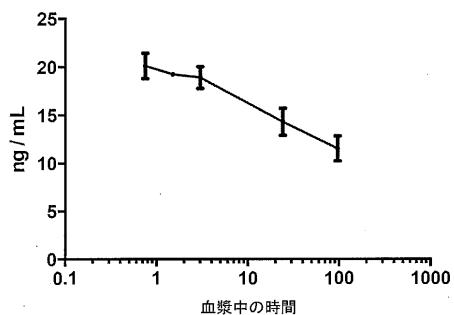
【図6】



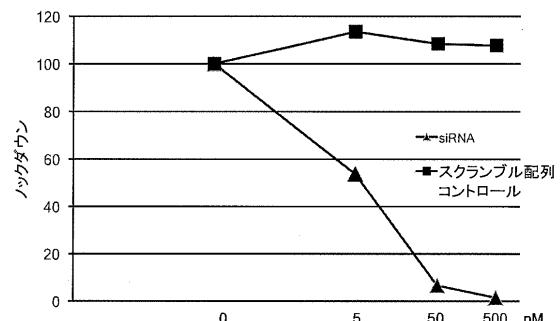
【図7】



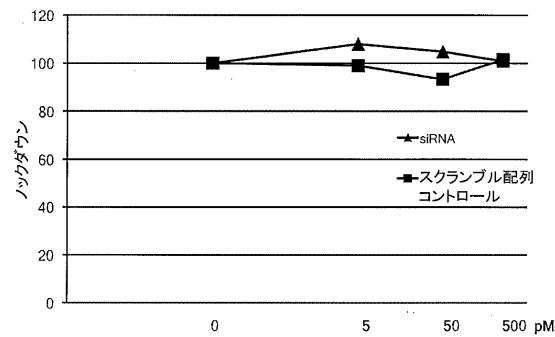
【図8】



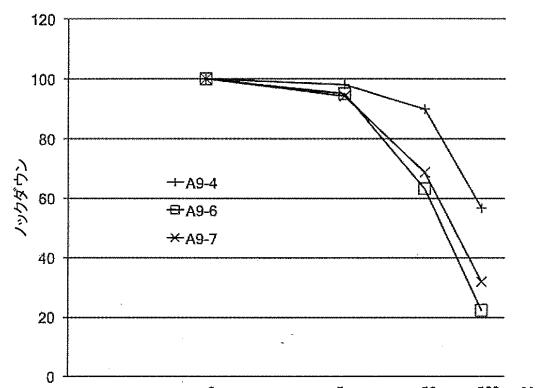
【図9】



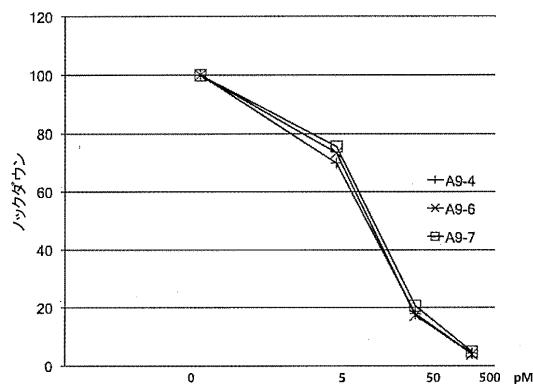
【図 1 0】



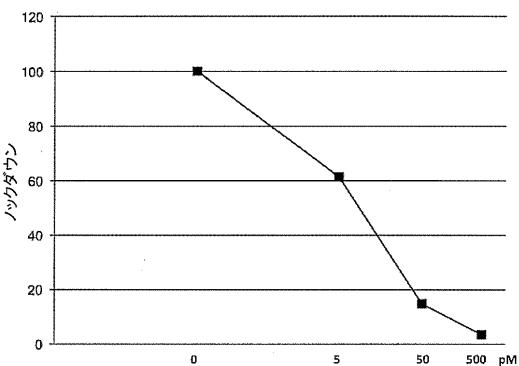
【図 1 2】



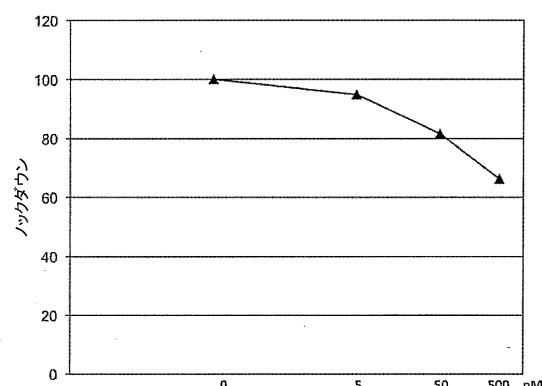
【図 1 1】



【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

2018512373000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/067559																								
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 31/52; A61K 31/7088; A61K 31/7105; A61K 31/711; A61K 31/713; A61K 38/45 (2016.01) CPC - A61K 31/7088; A61K 31/713; A61K 38/45; C12N 2310/14; C12Y 205/01018 (2016.05) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																										
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 31/52; A61K 31/7088; A61K 31/7105; A61K 31/711; A61K 31/713; A61K 38/45; A61K 45/00; A61P 35/00 (2016.01) CPC - A61K 31/52; A61K 31/7088; A61K 31/7105; A61K 31/711; A61K 31/713; A61K 38/45; C12N 15/1137; C12N 2310/14; C12Y 205/01018 (2016.05) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/375; 514/44A (keyword delimited)																										
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed. Search terms used: (mai% or siRNA% or (micro ma%) or dsRNA% or miRNA% or ssRNA% or shRNA%) ((glutathione S transferase pi) OR (GST pi) OR GSTpi OR GSTP1)																										
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">US 2014/0315975 A1 (NIITSU et al) 23 October 2014 (23.10.2014) entire document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1, 2, 4-11, 13, 16, 17, 20-28, 31</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;"></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">US 2014/0134158 A1 (BARDELLI et al) 15 May 2014 (15.05.2014) entire document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">WO 2004/094636 A1 (GALAPAGOS GENOMICS N.V. et al) 04 November 2004 (04.11.2004) entire document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-31</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">RUAN et al. "Analysis of EGFR signalling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells by quantitative phosphoproteomics," <i>Proteome Science</i>, 28 June 2011 (28.06.2011), Vol. 9, Pgs. 1-11. entire document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-31</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">SINGHAL et al. "1,3-Bis(3,5-dichlorophenyl) urea compound 'COH-SR4' inhibits proliferation and activates apoptosis in melanoma," <i>Biochemical Pharmacology</i>, 01 December 2012 (01.12.2012), Vol. 84, Iss. 11, Pgs. 1419-1427. entire document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-31</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">HOKAIWADO et al. "Glutathione S-transferase PI mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells," <i>Carcinogenesis</i>, 15 April 2008 (15.04.2008), Vol. 29, Pgs. 1134-1138. entire document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-31</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2014/0315975 A1 (NIITSU et al) 23 October 2014 (23.10.2014) entire document	1, 2, 4-11, 13, 16, 17, 20-28, 31	Y		19	Y	US 2014/0134158 A1 (BARDELLI et al) 15 May 2014 (15.05.2014) entire document	19	A	WO 2004/094636 A1 (GALAPAGOS GENOMICS N.V. et al) 04 November 2004 (04.11.2004) entire document	1-31	A	RUAN et al. "Analysis of EGFR signalling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells by quantitative phosphoproteomics," <i>Proteome Science</i> , 28 June 2011 (28.06.2011), Vol. 9, Pgs. 1-11. entire document	1-31	A	SINGHAL et al. "1,3-Bis(3,5-dichlorophenyl) urea compound 'COH-SR4' inhibits proliferation and activates apoptosis in melanoma," <i>Biochemical Pharmacology</i> , 01 December 2012 (01.12.2012), Vol. 84, Iss. 11, Pgs. 1419-1427. entire document	1-31	A	HOKAIWADO et al. "Glutathione S-transferase PI mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells," <i>Carcinogenesis</i> , 15 April 2008 (15.04.2008), Vol. 29, Pgs. 1134-1138. entire document	1-31
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
X	US 2014/0315975 A1 (NIITSU et al) 23 October 2014 (23.10.2014) entire document	1, 2, 4-11, 13, 16, 17, 20-28, 31																								
Y		19																								
Y	US 2014/0134158 A1 (BARDELLI et al) 15 May 2014 (15.05.2014) entire document	19																								
A	WO 2004/094636 A1 (GALAPAGOS GENOMICS N.V. et al) 04 November 2004 (04.11.2004) entire document	1-31																								
A	RUAN et al. "Analysis of EGFR signalling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells by quantitative phosphoproteomics," <i>Proteome Science</i> , 28 June 2011 (28.06.2011), Vol. 9, Pgs. 1-11. entire document	1-31																								
A	SINGHAL et al. "1,3-Bis(3,5-dichlorophenyl) urea compound 'COH-SR4' inhibits proliferation and activates apoptosis in melanoma," <i>Biochemical Pharmacology</i> , 01 December 2012 (01.12.2012), Vol. 84, Iss. 11, Pgs. 1419-1427. entire document	1-31																								
A	HOKAIWADO et al. "Glutathione S-transferase PI mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells," <i>Carcinogenesis</i> , 15 April 2008 (15.04.2008), Vol. 29, Pgs. 1134-1138. entire document	1-31																								
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																										
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																										
Date of the actual completion of the international search 31 May 2016	Date of mailing of the international search report 24 JUN 2016																									
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/067559
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter</i>. 1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input checked="" type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter</i>. 1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter</i>. 1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments: SEQ ID NOs: 158, 184, and 287 were searched.</p>		

## フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 9/72 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/72	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A
<b>C 1 2 N 15/113 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00	G

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,A0,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ワン , リー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ イーグルキャニオンプレイス 17308  
 (72)発明者 リュー , ジーフア  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンマルコス マイララーゴウェイ 933  
 (72)発明者 アダミ , ロジヤー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド シショフロンテラ 7100  
 F ターム(参考) 4C076 AA19 AA65 AA93 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 CC27 DD06F  
 DD63F FF32  
 4C084 AA13 MA13 MA24 MA38 MA52 MA56 MA66 NA14 ZB262  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA13 MA24 MA38 MA52 MA56  
 MA66 NA14 ZB26