

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506385

(P2005-506385A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.C1.<sup>7</sup>

F 1

テーマコード(参考)

**A61K 48/00**  
**A61K 31/7088**  
**A61P 35/00**  
**// C12N 15/09**

A 61 K 48/00 Z N A  
A 61 K 31/7088  
A 61 P 35/00  
C 12 N 15/00

4 B 02 4  
4 C 08 4  
4 C 08 6  
A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2003-538370 (P2003-538370)	(71) 出願人	504164930 リボファーマ アーゲー ドイツ連邦共和国 95326 クルムバ ッハ、フリッツ・ホルンシューフーシュト ラーセ 9
(86) (22) 出願日	平成14年10月25日 (2002.10.25)	(74) 代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月26日 (2004.4.26)	(72) 発明者	オッカー, マティアス ドイツ連邦共和国 91083 バイエル スドルフ、イン デル フット 50 ア ー
(86) 國際出願番号	PCT/EP2002/011970	(72) 発明者	ヘロルド, クリストフ ドイツ連邦共和国 91054 エアラン ゲン、フィエアツィグマンシュトラーゼ 24
(87) 國際公開番号	W02003/035870		
(87) 國際公開日	平成15年5月1日 (2003.5.1)		
(31) 優先権主張番号	101 55 280.7		
(32) 優先日	平成13年10月26日 (2001.10.26)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
(31) 優先権主張番号	101 58 411.3		
(32) 優先日	平成13年11月29日 (2001.11.29)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
(31) 優先権主張番号	101 60 151.4		
(32) 優先日	平成13年12月7日 (2001.12.7)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】脾臓癌を処置するための医薬

## (57) 【要約】

本発明は、脾臓の癌を処置するための薬剤に関し、この薬剤は K - r a s 遺伝子の発現を阻害するのに適した 2 本鎖リボ核酸 ( d s R N A ) を含む。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

膵臓癌を処置するための医薬であって、該医薬が、R N A 干渉によってK - r a s 遺伝子の発現を阻害するのに好適な2本鎖リボ核酸(d s R N A)を含む、前記医薬。

**【請求項 2】**

K - r a s 遺伝子が、K - r a s の恒常的な活性化をもたらすように変異している、請求項1に記載の医薬。

**【請求項 3】**

K - r a s 遺伝子が、コドン12、13または61で変異している、請求項1または2に記載の医薬。

**【請求項 4】**

K - r a s 遺伝子において、コドン12は、アルギニン、セリン、アラニン、バリン、システインまたはアスパラギン酸をコードし、コドン13は、アスパラギン酸をコードし、または、コドン61はヒスチジンまたはロイシンをコードする、請求項1～3のいずれかに記載の医薬。

**【請求項 5】**

d s R N A の鎖S1が、K - r a s 遺伝子と少なくとも断片的に相補的な領域を有し、特に25個より少ない連続したヌクレオチドからなる、請求項1～4のいずれかに記載の医薬。

**【請求項 6】**

相補的な領域が、19～24個、好ましくは20～24個、特に好ましくは21～23個、そして特に22または23個のヌクレオチドを有する、請求項1～5のいずれかに記載の医薬。

**【請求項 7】**

鎖S1が、30個より少ない、好ましくは25個より少ない、特に好ましくは21～24個、そして特に23個のヌクレオチドを有する、請求項1～6のいずれかに記載の医薬。

**【請求項 8】**

d s R N A の少なくとも1つの末端が、1～4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる1本鎖のオーバーハングを有する、請求項1～7のいずれかに記載の医薬。

**【請求項 9】**

1本鎖のオーバーハングが、鎖S1の3'末端に位置する、請求項8に記載の医薬。

**【請求項 10】**

d s R N A が、1つの末端のみに、特に鎖S1の3'末端に位置する末端のみに、1本鎖のオーバーハングを有する、請求項1～9のいずれかに記載の医薬。

**【請求項 11】**

d s R N A が、鎖S1に加えて鎖S2を有する、請求項1～10のいずれかに記載の医薬。

**【請求項 12】**

鎖S1が23ヌクレオチド長であり、鎖S2が21ヌクレオチド長であり、かつ、鎖S1の3'末端が2個のヌクレオチドで構成された1本鎖のオーバーハングを有するが、鎖S1の5'末端に位置するd s R N A の末端は平滑である、請求項11に記載の医薬。

**【請求項 13】**

鎖S1が、K - r a s 遺伝子の一次R N A 転写物またはプロセシングされたR N A 転写物と相補的である、請求項1～12のいずれかに記載の医薬。

**【請求項 14】**

d s R N A が、添付の配列表に示すとおりの、配列番号1の配列を有する鎖S2と配列番号2の配列を有する鎖S1、または、配列番号3の配列を有する鎖S2と配列番号4の配列を有する鎖S1、または、配列番号5の配列を有する鎖S2と配列番号6の配列を有する鎖S1とからなる、請求項1～13のいずれかに記載の医薬。

**【請求項 15】**

10

20

30

40

50

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

【請求項 1 6】

医薬が、吸入、経口摂取、注入または注射、特に静脈内、腹腔内もしくは腫瘍内注入または注射に好適な製剤である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 1 7】

製剤が、特に、d s R N A と、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水または生理学的に許容されるバッファー、特にリン酸緩衝食塩水とからのみなる、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の医薬。 10

【請求項 1 8】

医薬が、好ましさの低い順に、1日体重 1 k gあたり 5 m g、2 . 5 m g、2 0 0  $\mu$  g、1 0 0  $\mu$  g、5 0  $\mu$  g、そして最適には 2 5  $\mu$  g の最大用量を達成するのが可能な量で d s R N A を含む少なくとも 1 用量単位で存在する、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 1 9】

R N A 干渉によって K - r a s 遺伝子の発現を阻害するのに好適な 2 本鎖リボ核酸 ( d s R N A ) の、膵臓癌を処置するための医薬の製造への使用。

【請求項 2 0】

R N A 干渉によって K - r a s 遺伝子の発現を阻害するのに好適な 2 本鎖リボ核酸 ( d s R N A ) の、膵臓癌を処置するための使用。 20

【請求項 2 1】

K - r a s 遺伝子が、K - r a s の恒常的な活性化をもたらすように変異している、請求項 1 9 または 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 2】

K - r a s 遺伝子が、コドン 1 2 、1 3 または 6 1 で変異している、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 3】

K - r a s 遺伝子において、コドン 1 2 は、アルギニン、セリン、アラニン、バリン、システインまたはアスパラギン酸をコードし、コドン 1 3 は、アスパラギン酸をコードし、または、コドン 6 1 はヒスチジンまたはロイシンをコードする、請求項 1 9 ~ 2 2 のいずれかに記載の使用。 30

【請求項 2 4】

d s R N A の鎖 S 1 が、K - r a s 遺伝子と少なくとも断片的に相補的な領域を有し、特に 2 5 個より少ない連続したヌクレオチドからなる、請求項 1 9 ~ 2 3 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 5】

相補的な領域が、1 9 ~ 2 4 個、好ましくは 2 0 ~ 2 4 個、特に好ましくは 2 1 ~ 2 3 個、そして特に 2 2 または 2 3 個のヌクレオチドを有する、請求項 1 9 ~ 2 4 のいずれかに記載の使用。 40

【請求項 2 6】

鎖 S 1 が、3 0 個より少ない、好ましくは 2 5 個より少ない、特に好ましくは 2 1 ~ 2 4 個、そして特に 2 3 個のヌクレオチドを有する、請求項 1 9 ~ 2 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 7】

d s R N A の少なくとも 1 つの末端が、1 ~ 4 個、特に 2 または 3 個のヌクレオチドからなる 1 本鎖のオーバーハングを有する、請求項 1 9 ~ 2 6 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 8】

1 本鎖のオーバーハングが、鎖 S 1 の 3 ' 末端に位置する、請求項 2 7 に記載の使用。 50

**【請求項 29】**

d s R N A が、1つの末端のみに、特に鎖 S 1 の 3' 末端に位置する末端のみに、1本鎖のオーバーハンギングを有する、請求項 19 ~ 28 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 30】**

d s R N A が、鎖 S 1 に加えて鎖 S 2 を有する、請求項 19 ~ 29 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 31】**

鎖 S 1 が 23 ヌクレオチド長であり、鎖 S 2 が 21 ヌクレオチド長であり、かつ、鎖 S 1 の 3' 末端が 2 個のヌクレオチドで構成された 1 本鎖のオーバーハンギングを有するが、鎖 S 1 の 5' 末端に位置する d s R N A の末端は平滑である、請求項 30 に記載の使用。 10

**【請求項 32】**

鎖 S 1 が、K - r a s 遺伝子の一次 R N A 転写物またはプロセシングされた R N A 転写物と相補的である、請求項 19 ~ 31 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 33】**

d s R N A が、添付の配列表に示すとおりの、配列番号 1 の配列を有する鎖 S 2 と配列番号 2 の配列を有する鎖 S 1 、または、配列番号 3 の配列を有する鎖 S 2 と配列番号 4 の配列を有する鎖 S 1 、または、配列番号 5 の配列を有する鎖 S 2 と配列番号 6 の配列を有する鎖 S 1 とからなる、請求項 19 ~ 32 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 34】**

d s R N A が、溶液中に、特に生理学的に許容されるバッファーまたは生理食塩水中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、カプシド、カプソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項 19 ~ 33 のいずれかに記載の使用。 20

**【請求項 35】**

d s R N A が、吸入、経口摂取、注入または注射、特に静脈内、腹腔内もしくは腫瘍内注入または注射に好適な製剤中に存在する、請求項 19 ~ 34 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 36】**

製剤が、特に、d s R N A と、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水または生理学的に許容されるバッファー、特にリン酸緩衝食塩水とからのみなる、請求項 35 に記載の使用。 30

**【請求項 37】**

d s R N A が、経口的に、吸入、注入または注射によって、特に静脈内、腹腔内もしくは腫瘍内注入または注射によって投与される、請求項 19 ~ 36 に記載の使用。

**【請求項 38】**

d s R N A が、好ましさの低い順に、1 日体重 1 k gあたり 5 m g、2 . 5 m g、2 0 0 μ g、1 0 0 μ g、5 0 μ g、そして最適には 2 5 μ g の最大用量で用いられる、請求項 19 ~ 37 のいずれかに記載の使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、膵臓癌を処置するための医薬および膵臓癌を処置するための使用、ならびにかかる医薬を製造するための使用に関する。 40

**【0002】**

膵臓癌および膵臓の腺癌は、それぞれ、最も予後の不良な癌に含まれる。膵臓癌の原因についてはほとんど知られていない。今まで、適切な処置法はない。他の遺伝子変化は別として、膵臓癌細胞は、K - r a s 遺伝子に頻繁に変異を示す。変異は、特にコドン 12 、13 および 61 において検出された。K - r a s 遺伝子は、G T P 結合 K - r a s タンパク質をコードする原癌遺伝子である。K - r a s は、細胞の細胞膜の細胞質側に位置し、受容体チロシンキナーゼと会合している。G T P の結合は K - r a s を活性化する。不活性化は、結合した G T P のリン酸残基の加水分解によって生じる。この結果形成された 50

GDP の遊離、そして GTP の新たな結合は、K-ras の再活性化をもたらすことができる。上記の変異は、K-ras の 1 個のアミノ酸の置換を、そして、その恒常的な活性化をもたらすことができる。K-ras の活性化は、とりわけプロテインキナーゼ C を活性化させる。

#### 【 0 0 0 3 】

細胞内で標的遺伝子の発現を阻害する方法は DE 101 00 586 C1 から知られており、該方法においては、2 本鎖構造を有するオリゴリボヌクレオチドを細胞内に導入する。2 本鎖構造の 1 鎖は、標的遺伝子と相補的である。なお、この阻害の基礎となる原理は RNA 干渉と呼ばれる。

本発明の課題は、従来技術による欠点を克服することである。特に、有効な医薬および膵臓癌を処置するための使用を利用可能とする。さらに、かかる医薬を製造するための使用を利用可能とする。

#### 【 0 0 0 4 】

この課題は、請求項 1、19 および 20 に記載の特徴によって解決される。有利な態様は、請求項 2 ~ 18 および 21 ~ 38 に記載の特徴によりもたらされる。

この発明によれば、膵臓癌、特にヒトにおけるものを処置するための医薬が意図され、ここで、該医薬は、K-ras 遺伝子の発現を RNA 干渉により阻害するのに好適な 2 本鎖リボ核酸 (dsRNA) を含む。dsRNA 中のすべてのヌクレオチドが、標準的なワトン - クリック塩基対を有する必要はない。特に、個々の、非相補的塩基対は、仮にあったとしても、有効性を損なうことはほとんどない。塩基対の可能な最大数はまた、dsRNA に含まれる最短の鎖におけるヌクレオチドの数である。

#### 【 0 0 0 5 】

本医薬は、膵臓癌において、K-ras 遺伝子の発現を阻害するのに十分な量で、dsRNA を含むことができる。本医薬はまた、該医薬のいくつかの単位の合計が、合わせてこの十分な量を含むように設計することもできる。当該十分量は、投与の形態に依存する。必要な量を保証するために、dsRNA は、増大する量または投薬量で投与することができる。そして、この量で K-ras 遺伝子の発現の阻害が生じているかを決定するために、膵臓癌から採取した組織試料を既知の方法で試験することができる。これらの方法は、例えば、分子生物学的、生化学的、または免疫学的方法を含む。

#### 【 0 0 0 6 】

驚くべきことに、K-ras 遺伝子の発現を選択的に阻害することができる dsRNA で処置することにより、膵臓癌細胞の増殖を阻害することができ、そして生存腫瘍細胞数を減少させ得ることが示された。さらに驚くべきことに、非悪性細胞の増殖挙動は、かかる処置によってもおおむね影響を受けない。本医薬は、膵臓癌細胞のアポトーシス率を増加させることができる。かかる医薬を用い、in vivo で膵臓腫瘍の増殖を効果的に阻害することが可能である。

#### 【 0 0 0 7 】

K-ras 遺伝子が、K-ras の恒常的な活性化をもたらすように変異されていてよい。本発明による医薬によるかかる遺伝子の発現の阻害は、膵臓癌の増殖の阻害において特に有効である。K-ras 遺伝子は、コドン 12、13 または 61 において変異されていることができる。変異した K-ras 遺伝子において、コドン 12 はアルギニン、セリン、アラニン、バリン、システインまたはアスパラギン酸をコードすることができ、または、コドン 13 は、アスパラギン酸をコードすることができ、または、コドン 61 はヒスチジンまたはロイシンをコードすることができる。野生型 K-ras 遺伝子において、コドン 12 およびコドン 13 はそれぞれグリシンをコードし、コドン 61 はグルタミン酸をコードする。

#### 【 0 0 0 8 】

好ましくは、dsRNA の 1 つの鎖 S1 は、K-ras 遺伝子と少なくとも断片的に (segmentally) 相補的である、特に 25 個より少ない連續したヌクレオチドからなる領域を有する。かかる dsRNA は、K-ras 遺伝子の発現を阻害するのに特に好適である。

10

20

30

40

50

「K-ras遺伝子」は、腫瘍細胞内のK-rasをコードする2本鎖DNAのDNA鎖であって、転写のための鑄型(matrix)として用いられるすべての転写された領域を含むDNA鎖と相補的なものを意味すると解される。したがって、K-ras遺伝子は一般的にはセンス鎖である。鎖S1は、したがって、K-ras遺伝子の発現中に形成される、mRNAなどのRNA転写物またはそのプロセシング産物と相補的であることができる。

## 【0009】

相補的なdsDNA領域は、19~24個、好ましくは20~24個、特に好ましくは21~23個、そして特に22個または23個のヌクレオチドを有することができる。この構造を有するdsRNAは、K-ras遺伝子を阻害するのに特に有効である。dsRNAの鎖S1は、30個より少ない、好ましくは25個より少ない、特に好ましくは21~24個、そして特に23個のヌクレオチドを有することができる。これらのヌクレオチドの数はまた、dsRNAにおける塩基対の可能な最大数でもある。かかるdsRNAは、細胞内で特に安定である。

## 【0010】

dsRNAの少なくとも1つの末端が1~4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる1本鎖のオーバーハンギングを有する場合、特に有利であることが示された。かかるdsRNAは、少なくとも1つの末端に1本鎖のオーバーハンギングを有さないdsRNAと比較して、K-ras遺伝子の発現を阻害するのにより優れた有効性を示す。ここで、1つの末端とは、5'および3'鎖末端が存在するdsRNAの領域である。したがって、鎖S1のみからなるdsRNAは、ループ構造および1つのみの末端を有する。鎖S1および鎖S2からなるdsRNAは2つの末端を有する。いずれの場合においても、1つの末端は鎖S1上の、および鎖S2上の鎖末端により形成される。

## 【0011】

1本鎖のオーバーハンギングは、好ましくは鎖S1の3'末端に位置する。この一本鎖オーバーハンギングの位置は、医薬の効力のさらなる増加をもたらす。1つの例において、dsRNAは1つの末端、特に鎖S1の3'末端に位置する末端のみに1本鎖のオーバーハンギングを有する。2つの末端を有するdsRNAの他方の末端は平滑であり、すなわちオーバーハンギングがない。かかるdsRNAは、種々の細胞培養培地中、ならびに血液および血清中で特に安定であることが示された。

## 【0012】

好ましくは、dsRNAは鎖S1に加えて鎖S2を有しており、すなわち、2本の1本鎖からなる。本医薬は、鎖S1(アンチセンス鎖)が23ヌクレオチド長であり、鎖S2が21ヌクレオチド長であり、かつ、鎖S1の3'末端が2ヌクレオチドで構成される1本鎖のオーバーハンギングを有する場合に、特に有効である。ここで、鎖S1の5'末端に位置するdsRNAの末端は平滑である。鎖S1は、K-ras遺伝子の一次RNA転写物またはプロセシングされたRNA転写物と相補的であることができる。好ましくは、dsRNAは、添付の配列表に示すとおりの、配列番号1の配列を有する鎖S2と配列番号2の配列を有する鎖S1、または、配列番号3の配列を有する鎖S2と配列番号4の配列を有する鎖S1、または、配列番号5の配列を有する鎖S2と配列番号6の配列を有する鎖S1とからなる。かかるdsRNAは、K-ras遺伝子の発現を阻害するのに特に有効である。

## 【0013】

本医薬において、dsRNAは、溶液中に、特に生理学的に許容されるバッファーまたは生理食塩水中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、カプシド、カプソイド(capsoid)または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在することができる。

生理学的に許容されるバッファーは、リン酸緩衝生理食塩水であることができる。ミセル構造、リポソーム、カプシド、カプソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルは、dsRNAの腫瘍細胞への取り込みを促進することができる。高分子ナノもしくはマイクロカプセルは、ポリブチルシアノアクリレートなどの少なくとも1種の生分解性ポリマ

10

20

30

40

50

ーからなる。高分子ナノもしくはマイクロカプセルは、それに含まれたまたは結合した d s R N A を、体内で輸送し、放出することができる。

#### 【 0 0 1 4 】

本医薬は、吸入、経口摂取、注入または注射、特に静脈内、腹腔内もしくは腫瘍内注入または注射に好適な製剤であることができる。吸入、注入または注射に好適な製剤は、最も単純には、d s R N A と、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水または生理学的に許容されるバッファー、特にリン酸緩衝整理食塩水とからなることができる。驚くべきことに、かかる溶媒またはバッファーに単純に溶解され、投与された d s R N A は、当該 d s R N A が特殊なビヒクルに包まれる (be packaged) ことを要することなく、腫瘍細胞に取り込まれ、そして K - r a s 遺伝子の発現を阻害することが示された。

10

#### 【 0 0 1 5 】

好ましくは、本医薬は、好ましさの低い順に、1日体重 1 k gあたり 5 m g、2 . 5 m g、2 0 0 μ g、1 0 0 μ g、5 0 μ g、そして最適には 2 5 μ g の最大用量を達成するのが可能な量で d s R N A を含む、少なくとも 1 用量単位で存在する。d s R N A が、この用量においても K - r a s 遺伝子の発現を阻害するのに顕著な有効性を發揮することが示された。用量単位は、単回の 1 日用量の投与または摂取のために設計することができる。この場合、1 日用量の全体が、単一の用量単位に含まれている。用量単位が 1 日数回投与または摂取されるように設計されている場合、各用量に含まれる d s R N A 量は、1 日の総用量を達成するために、相応してより少ない。用量単位はまた、単回の数日間におよぶ投与または摂取のために、例えば、d s R N A が数日にわたって放出されるように設計されることができる。この場合、用量単位は相応して複数の 1 日用量を含む。

20

#### 【 0 0 1 6 】

さらに、本発明によれば、R N A 干渉によって K - r a s 遺伝子の発現を阻害するためには好適な 2 本鎖リボ核酸の、膵臓癌を処置するための医薬を製造するための使用が意図される。さらにまた、本発明によれば、R N A 干渉によって K - r a s 遺伝子の発現を阻害するためには好適な 2 本鎖リボ核酸の、膵臓癌を処置するための使用が意図される。

本発明の使用の有利な態様については、上述の記載を参照されたい。

#### 【 0 0 1 7 】

以下において、本発明を図を用いて例示的に説明する。「M」の略字は、「m o l / l」の代わりに用いられ、濃度を示す。

30

用いた 2 本鎖オリゴリボヌクレオチドは、配列表中配列番号 1 ~ 配列番号 8 として示した以下の配列を有する。

#### 【 0 0 1 8 】

K R A S 1 は、コドン 1 2 に第 1 の点突然変異を有する Y A P C 細胞中のヒト K - r a s 遺伝子の配列と相補的である。

#### 【表 1】

S2: 5' - agu ugg agc ugu ugg cgu agg-3' (配列番号 1)

S1: 3' - ca uca acc ucg aca acc gca ucc-5' (配列番号 2)

40

K R A S 1 ' は、コドン 1 2 に第 1 の点突然変異を有する、N M R I マウスに皮下移植されたヒト膵臓腺癌中のヒト K - r a s 遺伝子の配列と相補的である。

#### 【表 2】

S2: 5' - agu ugg agc uga ugg cgu agg-3' (配列番号 3)

S1: 3' - ca uca acc ucg acu acc gca ucc-5' (配列番号 4)

40

#### 【 0 0 1 9 】

K R A S 2 は、ヒト K - r a s 遺伝子からの野生型の配列と相補的である。

#### 【表 3】

50

S2: 5'- agu ugg agc ugg ugg cgu agg-3' (配列番号 5)

S1: 3'- ca uca acc ucg acc acc gca ucc-5' (配列番号 6)

N E O は、ネオマイシン耐性遺伝子からの配列と相補的である。

【表4】

S2: 5'- c aag gau gag gau cgu uuc gca-3' (配列番号 7)

S1: 3'-ucu guc cua cuc cua gca aag cg -5' (配列番号 8)

10

【0020】

German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig (No. ACC 382)から得ることができる、ヒト肺臓癌細胞株YAP Cを、37、5%CO<sub>2</sub>の恒常条件下で、10%のウシ胎児血清(FCS)および100μg/mlのペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI 1640培地(Biochrom, Berlin)中で培養した。

【0021】

トランスフェクションは、6穴プレート中でオリゴフェクタミン(Invitrogen, Karlsruhe)を用いて行った。150,000個の細胞を各ウェルに入れた。2本鎖オリゴリボヌクレオチドのトランスフェクションは、オリゴフェクタミンについてInvitrogenにより推奨されているプロトコルに従って行った(データは、6穴プレート中の1ウェルに関する)。10μlの2本鎖オリゴリボヌクレオチド(0.1~10μM)を、添加物を含まない175μlの細胞培養培地で希釈した。3μlのオリゴフェクタミンを、添加物を含まない12μlの細胞培養培地で希釈し、室温で10分インキュベートした。このようにして希釈したオリゴフェクタミンを、既に希釈してある2本鎖オリゴリボヌクレオチドに加え、混合し、室温で20分インキュベートした。この間、トランスフェクトする細胞を、添加物を含まない細胞培養培地で1回洗浄し、800μlの新鮮な細胞培養培地を加えた。次に、上述のオリゴフェクタミン-dsRNA混合液200μlを各ウェルに加え、最終トランスフェクション容量が1000μlになるようにした。

【0022】

この結果、2本鎖オリゴリボヌクレオチドの最終濃度は1~100nMとなる。トランスフェクションアッセイを、4時間、37でインキュベートした。その後、30%のFCSを添加した500μlの細胞培養培地を各ウェルに加え、FCSの最終濃度が10%となるようにした。次に、このアッセイを24~120時間、37でインキュベートした。

アポトーシス率を決定するために、上清液をインキュベーション後に回収し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、トリプシンを用いて剥離し、100gで10分間遠心分離した。上清液を捨て、ペレットを低張なヨウ化プロピジウム溶液中、暗中にて、4で30分インキュベートした。分析は、蛍光セルソーター(fluorescence-supported cell sorter) FACSCalibur(BD GmbH, Heidelberg)によるフローサイトメトリー法により行った。

【0023】

図1は、増加する濃度のKRAS1-dsRNAによるトランスフェクション後のインキュベーション時間に応じた、ヒト肺臓癌細胞YAP Cのアポトーシス率(パーセント)を示す。これから、KRAS1が、ヒト肺臓癌細胞において、濃度依存的なアポトーシスを誘導することを見ることができる。アポトーシス率は、インキュベーション時間と共に増加した。非処置YAP C細胞(コントロール)、および2本鎖オリゴリボヌクレオチドなしに上述のトランスフェクション法を行った細胞(模擬または偽トランスフェクション)も、120時間のインキュベーションの後、最大で5%のアポトーシスを示したにすぎないのでに対し、100nMのKRAS1によるトランスフェクションは、120時間後のアポトーシス率を24%に増加させた。野生型K-rasと相補的なKRAS2-ds

40

50

R N A は、 Y A P C 細胞において、同様の効率でアポトーシスを誘導した。

【 0 0 2 4 】

トランスフェクションの、増殖および生存細胞数への効果をそれぞれ決定するために、50,000個の Y A P C 細胞を 6 穴プレートの各ウェルに入れ、上述のとおりにトランスフェクトした。生存細胞数は、24 ~ 120 時間のインキュベーション後にトリパンブルー排除染色を行い、ノイバウエル計算版にて計数することにより決定した。結果を図 2 に示す。K R A S 1 は、Y A P C 細胞の増殖を濃度に依存して阻害することができた。生存細胞数は、わずか 1 n M の K R A S 1 を用いることにより、統計学的に有意に減少させることができた(120 時間後、非処置コントロールに対して  $p = 0.001$ )。

【 0 0 2 5 】

野生型 K - r a s と相補的な K R A S 2 d s R N A のトランスフェクションは、100 n M の濃度で、生存細胞数の減少をもたらした。非悪性ヒト皮膚線維芽細胞は、K R A S 1 または K R A S 2 でトランスフェクトされても、その増殖挙動に変化を示さなかった。

【 0 0 2 6 】

in vivo 実験のために、2 ~ 3 mm の直径を有するヒト膵臓腺癌組織片を N M R I マウス (Harlan Winkelmann GmbH, Borchsen) に皮下移植した。腫瘍が 6 ~ 7 mm の大きさに増殖した後、それぞれ生理食塩水に溶解した、体重 kgあたり 200  $\mu$  g の K R A S 1' または N E O を、毎日腹腔内注射した。生理食塩水を、コントロールとして注射した。腫瘍は、毎日スライドゲージまたは標準テンプレート (standardized template) を用いて測定した。図 3 は、腹腔内注射による処置の開始からの日数 (i.p. 日数) として計った時間に応じて測定した腫瘍体積を、平均値  $\pm$  平均値の標準誤差として  $\text{mm}^3$  で示している。これから、K - r a s 遺伝子と相補的な d s R N A が、腫瘍の増殖を阻害する能力を有することを見ることができる。腫瘍の増殖は、K - r a s 遺伝子と相補的な d s R N A の、200  $\mu$  g / kg の用量での毎日の腹腔内適用によって阻害され、24 日間の処置後の腫瘍体積は、コントロール群で見られた腫瘍体積の 62 % でしかなかった。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 7 】

【図 1】ヒト K - r a s 遺伝子の一次配列と相補的な d s R N A でトランスフェクトした後のインキュベーション時間に応じた、ヒト膵臓癌細胞 Y A P C のアポトーシス率(パーセント)を示した図である。

【図 2】d s R N A でトランスフェクトした後の生存細胞数を示した図である。

【図 3】N M R I マウスにおける、皮下に移植したヒト膵臓腺癌の体積を示した図である。

10

20

30

【図1】

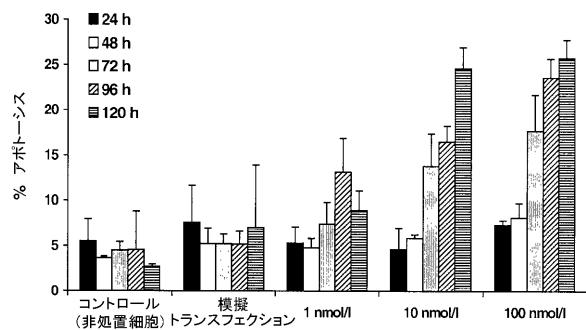


図 1

【図3】

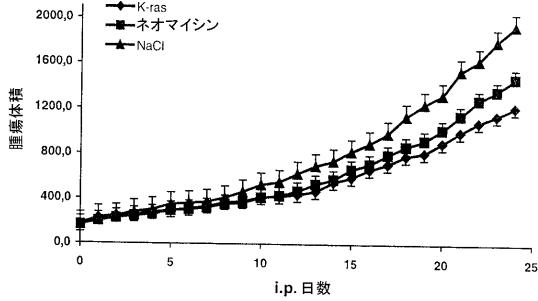


図 3

【図2】

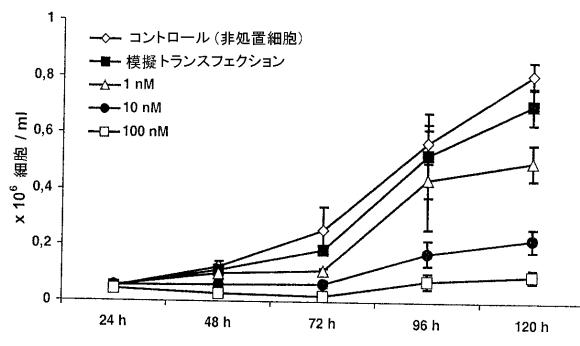


図 2

## 【国際公開パンフレット】

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



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

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/035870 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation\*: C12N 15/11, A61K 31/713, C12N 15/88, C07K 14/18, 14/82 [DE/DE]; Glotzdorf 26, 95466 Weidenberg (DE); LIM-MER, Stefan [DE/DE]; Gutenbergstrasse 9, 95512 Neudrossenfeld (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11970

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

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 55 280 7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE;  
101 58 411 3 29. November 2001 (29.11.2001) DE;  
101 60 151 4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE  
PCT/EP02/00151 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
PCT/EP02/00152 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
102 30 996 5 9. Juli 2002 (09.07.2002) DE;

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

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OCKER, Matthias [DE/DE]; In der Ilut 50 a, 91083 Baiersdorf (DE). HEROLD, Christoph [DE/DE]; Vierzigaunistrasse 24, 91054 Erlangen (DE). GEICK, Anke [DE/DE]; Ludwig-Thoma-Straße 68, 95447 Bayreuth (DE). SCHUPP-PAN, Detlef [DE/DE]; Baumzil 2, 91088 Bayreuth (DE). VORNLOCHER, Hans-Peter [DE/DE]; Lise-Meitner-Platz 4, 95448 Bayreuth (DE). KREUTZER, Roland

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, TC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TU, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchebericht  
vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen entdeckt werden.

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

**WO 03/035870**

A1

(54) Title: DRUG FOR TREATING A CARCINOMA OF THE PANCREAS

(54) Bezeichnung: MEDIKAMENT ZUR BEHANDLUNG EINES PANKREASKARZINOMS

(57) Abstract: The invention relates to a drug for treating a carcinoma of the pancreas, said drug containing a double strand ribonucleic acid (dsRNA) suitable for inhibition of the expression of a K-ras gene.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines K-ras-Gens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.

**Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms**

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms sowie eine Verwendung zur 5 Herstellung eines solchen Medikaments.

Das Pankreaskarzinom bzw. Adenokarzinom des Pankreas gehört zu den Karzinomen mit den schlechtesten Prognosen. Über die Ursachen der Entstehung des Pankreaskarzinoms ist wenig bekannt. Eine ausreichend erfolgreiche Therapie existiert bisher nicht. Neben anderen genetischen Veränderungen weisen die Zellen des Pankreaskarzinoms häufig eine Mutation im K-ras-Gen auf. Mutationen wurden dabei vor allem in den Codons 12, 10 13 und 61 nachgewiesen. Das K-ras-Gen ist ein Proto-Onkogen, welches für das GTP-bindende Protein K-ras kodiert. K-ras ist 15 auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran von Zellen lokalisiert und mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen assoziiert. Bindung von GTP aktiviert K-ras. Die Inaktivierung erfolgt durch hydrolytische Abspaltung eines Phosphatrests vom gebundenen 20 GTP. Durch Freisetzen des dabei gebildeten GDPs und erneutem Binden von GTP kann K-ras wieder aktiviert werden. Die genannten Mutationen können zu einem Austausch einer Aminosäure in K-ras und dadurch zu dessen permanenter Aktivierung führen. Die Aktivierung von K-ras aktiviert unter anderem Protein-Kinase C.

Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der 25 Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist dabei komplementär zum Zielgen. Das der Hemmung zu Grunde liegende Prinzip wird inzwischen als RNA-Interferenz bezeichnet.

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein wirksames Medikament und eine Verwendung zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms bereitgestellt werden. Weiterhin soll eine  
5 Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments bereitgestellt werden.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 19 und 20 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den  
10 Merkmalen der Ansprüche 2 bis 18 und 21 bis 38.

Erfindungsgemäß ist ein Medikament zur Behandlung eines, insbesondere humanen, Pankreaskarzinoms vorgesehen, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines K-ras-  
15 Gens mittels RNA-Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen kanonische Watson-Crick-  
20 Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementäre Basenpaare beeinträchtigen die Wirksamkeit kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang.  
25

Das Medikament kann die dsRNA in einer zu der Hemmung der Expression des K-ras-Gens in dem Pankreaskarzinom ausreichenden Menge enthalten. Das Medikament kann auch so konzipiert sein, dass mehrere Einheiten des Medikaments zusammen die ausreichende Menge in der Summe enthalten. Die ausreichende Menge hängt von der Verabreichungsform ab. Zur Ermittlung einer ausreichenden Menge kann die dsRNA in steigenden Mengen bzw. Dosierungen verabreicht werden. Danach kann an einer aus dem Pankreaskarzinom entnommenen Gewebeprobe mit bekannten Methoden ermittelt werden, ob bei dieser Menge eine Hemmung der  
30  
35

Expression des K-ras-Gens eingetreten ist. Bei den Methoden kann es sich z.B. um molekularbiologische, biochemische oder immunologische Methoden handeln.

5 Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass durch die Behandlung mittels dsRNA, welche gezielt die Expression des K-ras-Gens hemmen kann, die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen gehemmt und sogar die Zahl vitaler Tumorzellen reduziert werden kann. Erstaunlicherweise bleibt das Proliferationsverhalten nicht maligner Zellen weitgehend unbeeinflusst von einer solchen Behandlung. Das Medikament kann eine Steigerung der Apoptose-Rate in den Zellen des Pankreaskarzinoms bewirken. In vivo ist es durch ein solches Medikament möglich, das Wachstum eines Pankreastumors effektiv zu hemmen.

10 15 Das K-ras-Gen kann derart mutiert sein, dass dadurch eine permanente Aktivierung von K-ras bewirkt wird. Die Hemmung der Expression eines solchen Gens durch das erfindungsgemäße Medikament bewirkt eine besonders effektive Hemmung des Wachstums des Pankreaskarzinoms. Das K-ras-Gen kann dabei in den Codons 12, 13 oder 61 mutiert sein. Im mutierten K-ras-Gen kann das Codon 12 für Arginin, Serin, Alanin, Valin, Cystein oder Asparaginsäure, das Codon 13 für Asparaginsäure oder das Codon 61 für Histidin oder Leucin kodieren. Im Wildtyp des K-ras-Gens kodiert das Codon 12 und das Codon 13 jeweils für Glycin und das Codon 61 für Glutaminsäure.

20 25 30 Vorzugsweise weist ein Strang S1 der dsRNA einen zum K-ras-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich auf. Eine solche dsRNA ist besonders gut zur Hemmung der Expression des K-ras-Gens geeignet. Unter dem "K-ras-Gen" wird der DNA-Strang der doppelsträngigen für K-ras kodierenden DNA in der Tumorzelle verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem K-ras-Gem handelt es sich also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des K-ras-Gens gebildeten RNA-Transkript 5 oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein.

Der komplementäre Bereich der dsRNA kann 19 bis 24, bevorzugt 10 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Inhibition des K-ras-Gens. Der 15 Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare. Eine solche dsRNA ist intrazellulär besonders beständig.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des K-ras-Gens auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus 25 dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet.

30

Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Medikaments. In einem Ausführungsbeispiel weist die

dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Das andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Eine solche dsRNA 5 hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut und Serum als besonders beständig erwiesen.

Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d.h. sie ist aus zwei Einzelsträngen gebildet. Besonders wirksam ist das Medikament, wenn der Strang S1 (Antisinn-Strang) eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 10 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende 15 der dsRNA ist dabei glatt ausgebildet. Der Strang S1 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des K-ras-Gens komplementär sein. Vorzugsweise besteht die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz 20 SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll. Eine solche dsRNA ist in der Hemmung der Expression des K-ras-Gens besonders wirksam.

25 Die dsRNA kann in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder 30 einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegen. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein. Eine micellare Struktur, ein Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel 35 kann die Aufnahme der dsRNA in die Tumorzellen erleichtern.

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

Die polymere Nano- oder Mikrokapsel besteht aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymer, z.B. Polybutylcyanoacrylat. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel kann darin enthaltene oder daran gebundene dsRNA im Körper transportieren und freisetzen.

Das Medikament kann eine Zubereitung aufweisen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Eine zur Inhalation, Infusion oder Injektion geeignete Zubereitung kann im einfachsten Fall aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Lösungsmittel oder einem solchen Puffer gelöste und verabreichte dsRNA von den Tumorzellen aufgenommen wird und die Expression des K-ras-Gens hemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

Vorzugsweise liegt das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vor, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht. Es hat es sich nämlich gezeigt, dass die dsRNA bereits in dieser Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Hemmung der Expression des K-ras-Gens aufweist. Die Verabreichungseinheit kann für eine einmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert sein. Dann ist die gesamte Tagesdosis in einer Verabreichungseinheit enthalten. Ist die Verabreichungseinheit für eine mehrmalige Verabreichung bzw.

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

7

5 Einnahme pro Tag konzipiert, so ist die dsRNA darin in einer entsprechend geringeren das Erreichen der Tagesdosis ermöglichen Menge enthalten. Die Verabreichungseinheit kann auch für eine einzige Verabreichung bzw. Einnahme für mehrere Tage konzipiert sein, z. B. indem die dsRNA über mehrere Tage freigesetzt wird. Die Verabreichungseinheit enthält dann ein entsprechend Mehrfaches der Tagesdosis.

10 Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms vorgesehen. Weiterhin ist erfundungsgemäß die Verwendung einer zur 15 Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms vorgesehen.

20 Wegen der vorteilhaften Ausgestaltung der erfundungsgemäßen Verwendungen wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Als Abkürzung der Konzentrationsangabe "mol/l" wird dabei "M" verwendet. Es zeigen:

25

Fig. 1 die prozentuale Apoptose-Rate von humanen Pankreas-  
karzinomzellen YAP C in Abhängigkeit von der Inkuba-  
tionszeit nach Transfektion mit einer zu einer  
30 ersten Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen komplemen-  
tären dsRNA,

Fig. 2 die Anzahl vitaler Zellen nach Transfektion mit ei-  
ner dsRNA und

35

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

Fig. 3 das Volumen subkutan implantiert humaner Pan-  
kreasadenokarzinome in NMRI-Mäusen.

Die eingesetzten doppelsträngigen Oligoribonukleotide weisen  
5 folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:8  
bezeichneten, Sequenzen auf:

KRAS1, welche zu einer eine erste Punktmutation im Codon 12  
aufweisenden Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen in YAP C-  
10 Zellen komplementär ist:

S2: 5'- agu ugg agc ugu ugg cgu agg-3' (SEQ ID NO: 1)  
S1: 3'-ca uca acc ucg aca acc gca ucc-5' (SEQ ID NO: 2)

15 KRAS1', welche zu einer eine erste Punktmutation im Codon 12  
aufweisenden Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen in einem huma-  
nen subkutan in NMRI-Mäusen implantierten Pankreasadenokarzi-  
nom komplementär ist:

20 S2: 5'- agu ugg agc uga ugg cgu agg-3' (SEQ ID NO: 3)  
S1: 3'-ca uca acc ucg acu acc gca ucc-5' (SEQ ID NO: 4)

KRAS2, welche zu der Wildtyp-Sequenz aus dem humanen K-ras-  
Gen komplementär ist:

25 S2: 5'- agu ugg agc ugg ugg cgu agg-3' (SEQ ID NO: 5)  
S1: 3'- ca uca acc ucg acc acc gca ucc-5' (SEQ ID NO: 6)

NEO, welche zu einer Sequenz aus dem Neomycin-Resistenz-Gen  
30 komplementär ist:

S2: 5'- c aag gau gag gau cgu uuc gca-3' (SEQ ID NO: 7)  
S1: 3'-ucu guc cua cuc cua gca aag cg -5' (SEQ ID NO: 8)

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinie YAP C, welche unter der Nr. ACC 382 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig bezogen werden können,  
5 wurden unter konstanten Bedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640-Medium (Fa. Biochrom, Berlin) mit 10% fötalem Kälberse-  
rum (FKS) und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die Transfektionen wurden in einer 6-Well-Platte mit Oligo-  
10 fectamine (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Pro Well wurden 150 000 Zellen ausgesetzt. Die Transfektion der doppelsträngigen Oligoribonukleotide wurde nach dem von Invitro-  
gen für Oligofectamine empfohlenen Protokoll durchgeführt  
(Angaben beziehen sich auf eine Vertiefung bzw. ein Well ei-  
15 ner 6-Well-Platte):

10 µl des doppelsträngigen Oligoribonukleotids (0,1 - 10 µM) wurden mit 175 µl Zellkulturmedium ohne Zusätze verdünnt. 3 µl Oligofectamine wurden mit 12 µl Zellkulturmedium ohne Zu-  
20 sätze verdünnt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das so verdünnte Oligofectamine wurde zu den bereits verdünnten doppelsträngigen Oligoribonukleotiden gegeben, gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen einmal mit Zellkultur-  
25 medium ohne Zusätze gewaschen und 600 µl frisches Zellkultur-  
medium zugegeben. Danach wurden pro Well 200 µl des beschrie-  
benen Oligofectamine-dsRNA-Gemisches zugegeben, so dass das Endvolumen für die Transfektion 1000 µl betrug. Hierdurch ergibt sich eine Endkonzentration der doppelsträngigen Oligori-  
30 bonukleotide von 1-100 nM. Der Transfektionsansatz wurde vier Stunden bei 37°C bebrütet. Danach wurden pro Well 500 µl Zellkulturmedium mit 30% FKS zugegeben, so dass die Endkon-  
zentration an FKS 10% betrug. Dieser Ansatz wurde für 24 bis 120 Stunden bei 37°C inkubiert.

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

Zur Bestimmung der Apoptose-Rate wurden die Überstände nach der Inkubation gesammelt, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mittels Trypsin abgelöst und 10 Minuten mit 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit hypotoner Propidiumjodidlösung 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch im Fluoreszenz-unterstützten Zellsortierer FACSCalibur (Fa. BD GmbH, Heidelberg).

10

Fig. 1 zeigt die prozentuale Apoptose-Rate humaner Pankreas-karzinomzellen YAP C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach Transfektion mit steigenden Konzentrationen der dsRNA KRAS1. Daraus ist ersichtlich, dass KRAS1 konzentrationsabhängig Apoptose in humanen Pankreaskarzinomzellen induziert. Die Apoptose-Rate steigt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit an. Während unbehandelte YAP C-Zellen (Kontrolle) und Zellen, mit welchen das beschriebene Verfahren zur Transfektion ohne doppelsträngiges Oligoribonukleotid durchgeführt wurde (Mocktransfektion bzw. Scheintransfektion), auch nach 120 h Inkubation nur maximal 5% Apoptose aufwiesen, konnte durch Transfektion mit 100 nM KRAS1 die Apoptose-Rate nach 120 h auf 24% gesteigert werden. Mit gleicher Effektivität induzierte die zum Wildtyp von K-ras komplementäre dsRNA 25 KRAS2 Apoptose in YAP C-Zellen.

Zur Bestimmung des Einflusses der Transfektionen auf die Proliferation bzw. die Zahl vitaler Zellen, wurden pro Vertiefung einer 6-Well-Platte 50 000 YAP-C-Zellen ausgesetzt und wie oben beschrieben transfiziert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit der Trypanblau-Ausschluss-Färbung nach 24 bis 120 h Inkubationszeit durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Ergebnis ist in Fig. 2 dargestellt. Die Proliferation von YAP C-Zellen konnte durch KRAS1 konzentrationsabhängig gehemmt werden. Die Zahl vitaler Zellen konnte

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

11

bereits durch 1 nM KRAS1 statistisch signifikant ( $p = 0,001$  vs. unbehandelte Kontrolle nach 120 h) reduziert werden.

Eine Transfektion mit der zum K-ras-Wildtyp komplementären 5 dsRNA KRAS2 führte bei einer Konzentration von 100 nM zu einer Reduktion der Zahl vitaler Zellen. Nicht-maligne humane Hautfibroblasten zeigten keine Änderung ihres Proliferationsverhaltens durch Transfektion mit KRAS1 oder KRAS2.

10 Für in vivo-Untersuchungen sind NMRI-Mäusen (Harlan Winkelmann GmbH, Borchsen) Gewebefragmente von 2 - 3 mm Durchmesser aus einem humanen Pankreasadenokarzinom subkutan implantiert worden. Nachdem die Tumoren eine Größe von 6 - 7 mm erreicht hatten, wurden täglich 200 µg KRAS1' oder NEO pro kg Körpergewicht, jeweils gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle wurde eine physiologische Kochsalzlösung injiziert. Die Tumore wurden täglich mittels einer Schiebelehre bzw. einer standardisierten Schablone vermessen. In Fig. 3 ist das in mm<sup>3</sup> gemessene Tumorvolumen als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts in Abhängigkeit von der in Tagen bemessenen Zeit ab Beginn der Behandlung durch die intraperitonealen Injektionen (Tage i.p.) dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die zum K-ras-Gen komplementäre dsRNA in der Lage ist, das Wachstum der 15 Tumore zu hemmen. Durch tägliche intraperitoneale Applikation der zum K-ras-Gen komplementären dsRNA in einer Dosierung von 20 200 µg/kg wurde das Wachstum des Tumors derart gehemmt, dass 25 das Tumorvolumen nach 24 Tagen Behandlung nur 62% des Tumorvolumens der Kontrollgruppe betragen hat.

30

## Patentansprüche

1. Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.
2. Medikament nach Anspruch 1, wobei das K-ras-Gen derart mutiert ist, dass dadurch eine permanente Aktivierung von K-ras bewirkt wird.
3. Medikament nach Anspruch 1 oder 2, wobei das K-ras-Gen in den Codons 12, 13 oder 61 mutiert ist.
4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im K-ras-Gen das Codon 12 für Arginin, Serin, Alanin, Valin, Cystein oder Asparaginsäure, das Codon 13 für Asparaginsäure oder das Codon 61 für Histidin oder Leucin kodiert.
5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum K-ras-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbeson-

dere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.

9. Medikament nach Anspruch 8, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

5 10. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

10 11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.

12. Medikament nach Anspruch 11, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

15 13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des K-ras-Gens komplementär ist.

20 14. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

25 15. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struk-

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

14

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

- 5 16. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
- 10 17. Medikament nach Anspruch 16, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
- 15 18. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vorliegt, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.
- 20 19. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms.
- 25 20. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung eines Pankreas-Karzinoms.
- 30

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20, wobei das K-ras-Gen derart mutiert ist, dass dadurch eine permanente Aktivierung von K-ras bewirkt wird.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei das K-ras-Gen in den Codons 12, 13 oder 61 mutiert ist.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei im K-ras-Gen das Codon 12 für Arginin, Serin, Alanin, Valin, Cystein oder Asparaginsäure, das Codon 13 für Asparaginsäure oder das Codon 61 für Histidin oder Leucin kodiert.
- 10 24. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 23, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum K-ras-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
- 15 25. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 24, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
- 20 26. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 25, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
- 25 27. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 26, wobei zu mindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
28. Verwendung nach Anspruch 27, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
- 30 29. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 28, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des

Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

30. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 29, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.

5 31. Verwendung nach Anspruch 30, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.  
10

32. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 31, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des K-ras-Gens komplementär ist.

15 33. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 32, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.  
20

34. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 33, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.  
25

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 34, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere  
30

zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

36. Verwendung nach Anspruch 35, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.  
5
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 36, wobei die dsRNA oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, verabreicht wird.  
10
38. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 37, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und  
15 Tag verwendet wird.

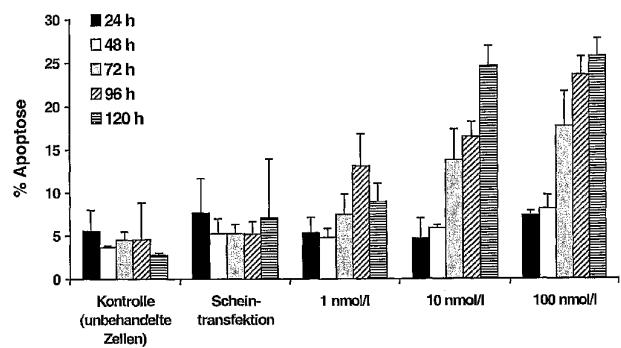


Fig. 1

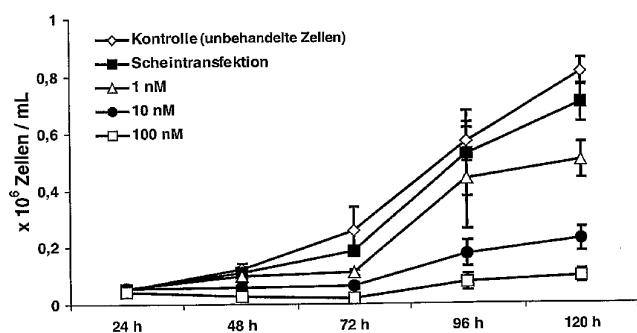


Fig. 2

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

3/3

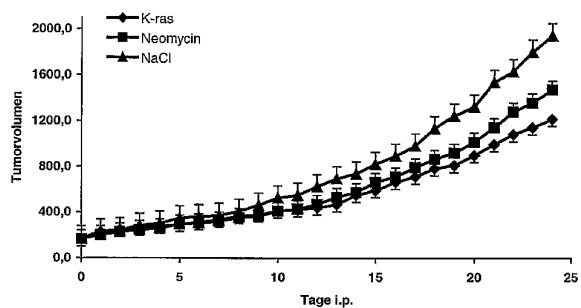


Fig. 3

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

I

SEQUENZPROTOKOLL  
<110> Ribopharma AG  
5 <120> Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms  
<130> 422271EH  
<140>  
10 <141>  
<160> 8  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
15 <210> 1  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
20 <400> 1  
aguuggagcu guuggcguag g 21  
  
25 <210> 2  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
30 <400> 2  
ccuacgcca cagcucaac uac 23  
  
35 <210> 3  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
40 <400> 3  
aguuggagcu gauggcguag g 21  
  
45 <210> 4  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
50 <400> 4  
ccuacgcca cagcucaac uac 23  
  
55 <210> 5  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens  
60 <400> 5  
aguuggagcu gguggcguag g 21  
<210> 6

WO 03/035870

PCT/EP02/11970

2

<211> 23  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

5 <400> 6 ccuacccac cagcuuccaaac uac 23

<210> 7  
10 <211> 22  
<212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz

15 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang  
einer zu einer Sequenz des Neomycin-Resistenzgens  
komplementären dsRNA

20 <400> 7 caaggauagag gaucguuucg ca 22

<210> 8  
<211> 23  
25 <212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des  
Neomycin-Resistenzgens komplementären dsRNA

30 <400> 8 gcgaaaacgau ccucauccug ucu 23

35

**【手続補正書】**

【提出日】平成15年7月11日(2003.7.11)

**【手続補正1】**

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

**【補正の内容】**

【特許請求の範囲】

**【請求項1】**

膵臓癌を処置するための医薬であって、該医薬が、RNA干渉によってK-ras遺伝子の発現を阻害するのに好適な2本鎖リボ核酸(dsRNA)を含み、dsRNAの鎖S1が、K-ras遺伝子と少なくとも断片的に相補的な領域を有し、dsRNAが、鎖S1の3'末端に位置する末端のみに1本鎖のオーバーハングを有する、前記医薬。

**【請求項2】**

K-ras遺伝子が、K-rasの恒常的な活性化をもたらすように変異している、請求項1に記載の医薬。

**【請求項3】**

K-ras遺伝子が、コドン12、13または61で変異している、請求項1または2に記載の医薬。

**【請求項4】**

K-ras遺伝子において、コドン12は、アルギニン、セリン、アラニン、バリン、システインまたはアスパラギン酸をコードし、コドン13は、アスパラギン酸をコードし、または、コドン61はヒスチジンまたはロイシンをコードする、請求項1～3のいずれかに記載の医薬。

**【請求項5】**

少なくとも断片的に相補的な領域が、25個より少ない連続したヌクレオチドからなる、請求項1～4のいずれかに記載の医薬。

**【請求項6】**

相補的な領域が、19～24個、好ましくは20～24個、特に好ましくは21～23個、そして特に22または23個のヌクレオチドを有する、請求項1～5のいずれかに記載の医薬。

**【請求項7】**

鎖S1が、30個より少ない、好ましくは25個より少ない、特に好ましくは21～24個、そして特に23個のヌクレオチドを有する、請求項1～6のいずれかに記載の医薬。

**【請求項8】**

1本鎖のオーバーハングが、1～4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる、請求項1～7のいずれかに記載の医薬。

**【請求項9】**

dsRNAが、鎖S1に加えて鎖S2を有する、請求項1～8のいずれかに記載の医薬。

**【請求項10】**

鎖S1が23ヌクレオチド長であり、鎖S2が21ヌクレオチド長であり、かつ、鎖S1の3'末端が2個のヌクレオチドで構成された1本鎖のオーバーハングを有するが、鎖S1の5'末端に位置するdsRNAの末端は平滑である、請求項9に記載の医薬。

**【請求項11】**

鎖S1が、K-ras遺伝子の一次RNA転写物またはプロセシングされたRNA転写物と相補的である、請求項1～10のいずれかに記載の医薬。

**【請求項12】**

dsRNAが、添付の配列表に示すとおりの、配列番号1の配列を有する鎖S2と配列番号2の配列を有する鎖S1、または、配列番号3の配列を有する鎖S2と配列番号4の配列を有する鎖S1、または、配列番号5の配列を有する鎖S2と配列番号6の配列を有す

る鎖 S 1 とからなる、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 1 3】

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

【請求項 1 4】

医薬が、吸入、経口摂取、注入または注射、特に静脈内、腹腔内もしくは腫瘍内注入または注射に好適な製剤である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 1 5】

製剤が、特に、d s R N A と、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水または生理学的に許容されるバッファー、特にリン酸緩衝食塩水とからのみなる、請求項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 1 6】

医薬が、好ましさの低い順に、1日体重 1 k gあたり 5 m g、2 . 5 m g、2 0 0  $\mu$  g、1 0 0  $\mu$  g、5 0  $\mu$  g、そして最適には 2 5  $\mu$  g の最大用量を達成するのが可能な量で d s R N A を含む、少なくとも 1 用量単位で存在する、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 1 7】

R N A 干渉によって K - r a s 遺伝子の発現を阻害するのに好適な 2 本鎖リボ核酸 ( d s R N A ) の、膵臓癌を処置するための医薬の製造への使用であって、該医薬は、d s R N A の鎖 S 1 が、K - r a s 遺伝子と少なくとも断片的に相補的な領域を有し、d s R N A が、鎖 S 1 の 3 ' 末端に位置する末端のみに 1 本鎖のオーバーハングを有する、前記使用。

【請求項 1 8】

R N A 干渉によって K - r a s 遺伝子の発現を阻害するのに好適な 2 本鎖リボ核酸 ( d s R N A ) の、膵臓癌を処置するための使用。

【請求項 1 9】

K - r a s 遺伝子が、K - r a s の恒常的な活性化をもたらすように変異している、請求項 1 7 または 1 8 に記載の使用。

【請求項 2 0】

K - r a s 遺伝子が、コドン 1 2 、1 3 または 6 1 で変異している、請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 1】

K - r a s 遺伝子において、コドン 1 2 は、アルギニン、セリン、アラニン、バリン、システインまたはアスパラギン酸をコードし、コドン 1 3 は、アスパラギン酸をコードし、または、コドン 6 1 はヒスチジンまたはロイシンをコードする、請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 2】

少なくとも断片的に相補的な領域が、2 5 個より少ない連続したヌクレオチドからなる、請求項 1 7 ~ 2 1 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 3】

相補的な領域が、1 9 ~ 2 4 個、好ましくは 2 0 ~ 2 4 個、特に好ましくは 2 1 ~ 2 3 個、そして特に 2 2 または 2 3 個のヌクレオチドを有する、請求項 1 7 ~ 2 2 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 4】

鎖 S 1 が、3 0 個より少ない、好ましくは 2 5 個より少ない、特に好ましくは 2 1 ~ 2 4 個、そして特に 2 3 個のヌクレオチドを有する、請求項 1 7 ~ 2 3 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 5】

1本鎖のオーバーハングが、1～4個、特に2または3個のヌクレオチドからなる、請求項17～24のいずれかに記載の使用。

【請求項26】

d s R N A が、鎖S1に加えて鎖S2を有する、請求項17～25のいずれかに記載の使用。

【請求項27】

鎖S1が23ヌクレオチド長であり、鎖S2が21ヌクレオチド長であり、かつ、鎖S1の3'末端が2個のヌクレオチドで構成された1本鎖のオーバーハングを有するが、鎖S1の5'末端に位置するd s R N Aの末端は平滑である、請求項26に記載の使用。

【請求項28】

鎖S1が、K-ras遺伝子の一次R N A転写物またはプロセシングされたR N A転写物と相補的である、請求項17～27のいずれかに記載の使用。

【請求項29】

d s R N A が、添付の配列表に示すとおりの、配列番号1の配列を有する鎖S2と配列番号2の配列を有する鎖S1、または、配列番号3の配列を有する鎖S2と配列番号4の配列を有する鎖S1、または、配列番号5の配列を有する鎖S2と配列番号6の配列を有する鎖S1とからなる、請求項17～28のいずれかに記載の使用。

【請求項30】

d s R N A が、溶液中に、特に生理学的に許容されるバッファーまたは生理食塩水中に、またはミセル構造、好ましくはリポソーム、カプシド、カプソイドまたは高分子ナノもしくはマイクロカプセルに囲まれて、または高分子ナノもしくはマイクロカプセルに結合して存在する、請求項17～29のいずれかに記載の使用。

【請求項31】

d s R N A が、吸入、経口摂取、注入または注射、特に静脈内、腹腔内もしくは腫瘍内注入または注射に好適な製剤中に存在する、請求項17～30のいずれかに記載の使用。

【請求項32】

製剤が、特に、d s R N Aと、生理学的に許容される溶媒、好ましくは生理食塩水または生理学的に許容されるバッファー、特にリン酸緩衝食塩水とからのみなる、請求項31に記載の使用。

【請求項33】

d s R N A が、経口的に、吸入、注入または注射によって、特に静脈内、腹腔内もしくは腫瘍内注入または注射によって投与される、請求項17～32に記載の使用。

【請求項34】

d s R N A が、好ましさの低い順に、1日体重1kgあたり5mg、2.5mg、200μg、100μg、50μg、そして最適には25μgの最大用量で用いられる、請求項17～33のいずれかに記載の使用。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat'l Application No. PCT/EP 02/11970
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/28 C07K14/18 C07K14/82		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	BRUMMELKAMP THIJN R ET AL: "Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference," CANCER CELL, UNITED STATES SEP 2002, vol. 2, no. 3, September 2002 (2002-09), pages 243-247, XP009006464 ISSN: 1535-6108 the whole document ---	1-13, 15-32, 34-38
P, Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11 October 2001 (2001-10-11) the whole document ---	14,33
Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6 June 2002 (2002-06-06) the whole document ---	1-38
P, Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6 June 2002 (2002-06-06) the whole document ---	1-38
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
*B* earlier document but published on or after the International filing date		
*L* document which may prove relevant to patentability of claim(s) or which has already anticipated the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
*C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*D* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
*E* 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		
*F* 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		
*G* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
*H* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search  27 February 2003	Date of mailing of the International search report  13/03/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5615 Patentam 2 NL - 2200 RJ Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 851 opo nl. Fax: (+31-70) 340-3015	Authorized officer  Armandola, E	

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat'l Application No PCT/EP 02/11970
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 the whole document ---	1-38
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ;LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3 August 2000 (2000-08-03)  the whole document ---	1-7,11, 13,15, 17, 19-26, 30,34-37
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 101, no. 1, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 the whole document ---	5-12, 24-32
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD, LONDON, GB, vol. 411, no. 6836, 2001, pages 494-498, XP002213433 ISSN: 0028-0836 the whole document ---	5-12, 24-32
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, vol. 15, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 the whole document ---	5-12, 24-32
P,Y	TUSCHL THOMAS: "Expanding small RNA interference." NATURE BIOTECHNOLOGY, UNITED STATES MAY 2002, vol. 20, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 446-448, XP002232258 ISSN: 1087-0156 page 448; figure 1 ---	1-38 -/-

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/EP 02/11970
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KITA K ET AL: "Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER. UNITED STATES 9 FEB 1999, vol. 80, no. 4, 9 February 1999 (1999-02-09), pages 553-558, XP002232259 ISSN: 0020-7136 the whole document ---	1-38
Y	NAKANO M ET AL: "Suppression of colorectal cancer growth using an adenovirus vector expressing an antisense K-ras RNA." MOLECULAR THERAPY: THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY. UNITED STATES APR 2001, vol. 3, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 491-499, XP002232260 ISSN: 1525-0016 the whole document ---	1-38
Y	AOKI K ET AL: "Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity." CANCER RESEARCH. UNITED STATES 1 SEP 1995, vol. 55, no. 17, 1 September 1995 (1995-09-01), pages 3810-3816, XP001145722 ISSN: 0008-5472 the whole document ---	1-38
Y	AOKI K ET AL: "Suppression of Ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with Ki-ras mutation but not those without Ki-ras mutation." MOLECULAR CARCINOGENESIS. UNITED STATES OCT 1997, vol. 20, no. 2, October 1997 (1997-10), pages 251-258, XP001145717 ISSN: 0899-1987 the whole document ---	1-38
		-/-

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat'l Application No PCT/EP 02/11970
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKADA Y ET AL: "Antisense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes inhibit invasiveness of human pancreatic cancer cell lines." PANCREATOLOGY: OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF PANCREATOLOGY (IAP)... ET AL!. SWITZERLAND 2001, vol. 1, no. 4, 2001, pages 314-319, XP009006374 ISSN: 1424-3903 the whole document ---	1-38
Y	WICKSTROM E: "Oligonucleotide treatment of ras-induced tumors in nude mice." MOLECULAR BIOTECHNOLOGY. UNITED STATES MAY 2001, vol. 18, no. 1, May 2001 (2001-05), pages 35-55, XP001145693 ISSN: 1073-6085 the whole document ---	1-38
Y	GIANNINI C D ET AL: "Enzymatic and antisense effects of a specific anti-Ki-ras ribozyme in vitro and in cell culture." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 1 JUL 1999, vol. 27, no. 13, 1 July 1999 (1999-07-01), pages 2737-2744, XP001145723 ISSN: 0305-1048 the whole document ---	1-38
P,Y	OCKER M. ET AL.: "bc1-2 specific siRNA molecules inhibit growth of pancreatic cancer in vitro and in vivo" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 38, November 2002 (2002-11), pages S142-S143, XP004403918 ISSN: 0959-8049 the whole document ---	1-4, 15-23, 34-38
A	WIANNY F ET AL: "Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development" NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN PUBLISHERS, GB, vol. 2, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 70-75, XP002138445 ISSN: 1465-7392 --- . --- . -/-	

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat Application No PCT/EP 02/11970
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 6, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765 -----	

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			Internal PCT/EP	Application No 02/11970
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0175164	A 11-10-2001	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002	
WO 0244321	A 06-06-2002	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002	
WO 0044914	A 03-08-2000	AU 2634800 A CA 2361201 A1 EP 1147204 A1 WO 0044914 A1 US 2002114784 A1	18-08-2000 03-08-2000 24-10-2001 03-08-2000 22-08-2002	

Form PCT/ISA/210 (International search) (July 1999)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen  
PCT/EP 02/11970

<b>A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b>		
IPK 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 C07K14/18 C07K14/82		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierte Mindeststoff (Klassifizierungssystem und Klassifikationsymbole) IPK 7 C12N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindeststoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter den recherchierten Gebieten fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESIEHENDE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	BRUMMELKAMP THIJN R ET AL: "Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference." CANCER CELL. UNITED STATES SEP 2002, Bd. 2, Nr. 3, September 2002 (2002-09), Seiten 243-247, XP009006464 ISSN: 1535-6108 das ganze Dokument	1-13, 15-32, 34-38
P, Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11. Oktober 2001 (2001-10-11) das ganze Dokument	14,33
Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6. Juni 2002 (2002-06-06) das ganze Dokument	1-38
P, Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6. Juni 2002 (2002-06-06) das ganze Dokument	1-38
	-/-	-/-
<input checked="" type="checkbox"/>	Wesentliche Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<p>* Bezeichnen Kategorien von angebrachten Veröffentlichungen:      ** Veröffentlichung, das den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als Beobachtung betrachtet anzusehen ist      *' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist      *'' Veröffentlichung, die festgestellt ist, einer Prioritätsanspruch zuverlässig anzuschauen zu lassen, sodass dieses Veröffentlichungsdatum bezeugt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie z.B. eine Erfindung, die auf einer Ausstellung oder anderen Meldungen beruht)      *# Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenlegung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht, die nicht als Veröffentlichung im Sinne des PCT angesehen werden, aber nach dem Bezugssatz vom internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist      *#* Später Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie relevant ist      ** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung allein aufgrund dieser Veröffentlichung als neu oder auf offensichtliche Fälschung hinzuweisen scheint      **# Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn das Veröffentlichungsergebnis in einem anderen Veröffentlichungstyp oder Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist      *# Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendetermin des Internationalen Recherchenberichts	
27. Februar 2003	13/03/2003	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchebehörde	Bevollmächtigter Bedensteller	
Euroösische Patentamt, P.O. 5810 Patentamt 2 NL - 2280 HV Haarlem Tel. 031-70390-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax 031-70390-3016	Armandola, E	

Formblatt PCT/SA/210 (Blatt 2) (Jul 1999)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen  
PCT/EP 02/11970

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Bericht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ---	1-38
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ;LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3. August 2000 (2000-08-03)  das ganze Dokument ---	1-7, 11, 13, 15, 17, 19-26, 30, 34-37
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 101, Nr. 1, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ---	5-12, 24-32
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, Bd. 411, Nr. 6836, 2001, Seiten 494-498, XP002213433 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument ---	5-12, 24-32
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, Bd. 15, Nr. 2, 15. Januar 2001 (2001-01-15), Seiten 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 das ganze Dokument ---	5-12, 24-32
P, Y	TUSCHL THOMAS: "Expanding small RNA interference." NATURE BIOTECHNOLOGY, UNITED STATES MAY 2002, Bd. 20, Nr. 5, Mai 2002 (2002-05), Seiten 446-448, XP002232258 ISSN: 1087-0156 Seite 448; Abbildung 1 ---	1-38 -/-

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

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Inventar-Nr. <input type="checkbox"/> Aktenzeichen PCT/EP 02/11970
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KITA K ET AL: "Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER. UNITED STATES 9 FEB 1999, Bd. 80, Nr. 4, 9. Februar 1999 (1999-02-09), Seiten 553-558, XP002232259 ISSN: 0020-7136 das ganze Dokument ---	1-38
Y	NAKANO M ET AL: "Suppression of colorectal cancer growth using an adenovirus vector expressing an antisense K-ras RNA." MOLECULAR THERAPY: THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY. UNITED STATES APR 2001, Bd. 3, Nr. 4, April 2001 (2001-04), Seiten 491-499, XP002232260 ISSN: 1525-0016 das ganze Dokument ---	1-38
Y	AOKI K ET AL: "Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity." CANCER RESEARCH. UNITED STATES 1 SEP 1995, Bd. 55, Nr. 17, 1. September 1995 (1995-09-01), Seiten 3810-3816, XP001145722 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument ---	1-38
Y	AOKI K ET AL: "Suppression of Ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with Ki-ras mutation but not those without Ki-ras mutation." MOLECULAR CARCINOGENESIS. UNITED STATES OCT 1997, Bd. 20, Nr. 2, Oktober 1997 (1997-10), Seiten 251-258, XP001145717 ISSN: 0899-1987 das ganze Dokument ---	1-38 -/-

Formblatt PCT/SAV210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationale Aktenzeichen PCT/EP 02/11970
C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEBESENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	NAKADA Y ET AL: "Antisense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes inhibit invasiveness of human pancreatic cancer cell lines." PANCREATOLOGY: OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF PANCREATOLOGY (IAP)... ET AL.: SWITZERLAND 2001, Bd. 1, Nr. 4, 2001, Seiten 314-319, XP009006374 ISSN: 1424-3903 das ganze Dokument ---	1-38
Y	WICKSTROM E: "Oligonucleotide treatment of ras-induced tumors in nude mice." MOLECULAR BIOTECHNOLOGY. UNITED STATES MAY 2001, Bd. 18, Nr. 1, Mai 2001 (2001-05), Seiten 35-55, XP001145693 ISSN: 1073-6085 das ganze Dokument ---	1-38
Y	GIANININI C D ET AL: "Enzymatic and antisense effects of a specific anti-Ki-ras ribozyme in vitro and in cell culture." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 1 JUL 1999, Bd. 27, Nr. 13, 1. Juli 1999 (1999-07-01), Seiten 2737-2744, XP001145723 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument ---	1-38
P,Y	OCKER M. ET AL.: "bcl-2 specific siRNA molecules inhibit growth of pancreatic cancer in vitro and in vivo" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, Bd. 38, November 2002 (2002-11), Seiten S142-S143, XP004403918 ISSN: 0959-8049 das ganze Dokument ---	1-4, 15-23, 34-38
A	WIANNY F ET AL: "Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development" NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN PUBLISHERS, GB, Bd. 2, Nr. 2, Februar 2000 (2000-02), Seiten 70-75, XP002138445 ISSN: 1465-7392 ---	-/-

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

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen  
PCT/EP 02/11970

## C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Beirat kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
A	PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 6, Nr. 5, November 2000 (2000-11), Seiten 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765	—

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

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Albenzahlen  
PCT/EP 02/11970

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0175164	A	11-10-2001	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002
WO 0244321	A	06-06-2002	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002
WO 0044914	A	03-08-2000	AU 2634800 A CA 2361201 A1 EP 1147204 A1 WO 0044914 A1 US 2002114784 A1	18-08-2000 03-08-2000 24-10-2001 03-08-2000 22-08-2002

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

---

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 PCT/EP02/00151  
(32) 優先日 平成14年1月9日(2002.1.9)  
(33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)  
(31) 優先権主張番号 PCT/EP02/00152  
(32) 優先日 平成14年1月9日(2002.1.9)  
(33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)  
(31) 優先権主張番号 102 30 996.5  
(32) 優先日 平成14年7月9日(2002.7.9)  
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N,0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ガイック , アンケ  
ドイツ連邦共和国 9 5 4 4 7 バイロイト、ルートヴィッヒ - トマ - シュトラーセ 6 8  
(72) 発明者 シュッパン , デトレフ  
ドイツ連邦共和国 9 1 0 8 8 ブーベンロイト、バウムツァイル 2  
(72) 発明者 フォルンロッヒャー , ハンス - ペーター  
ドイツ連邦共和国 9 5 4 4 8 バイロイト、リズ - マイトナー - プラツ 4  
(72) 発明者 クロイツァー , ローラント  
ドイツ連邦共和国 9 5 4 6 6 ヴァイデンベルク、グロツツドルフ 2 6  
(72) 発明者 リンマー , シュテファン  
ドイツ連邦共和国 9 5 5 1 2 ノイドロッセンフェルト、グーテンベルクシュトラーセ 9  
F ターム(参考) 4B024 AA01 CA02 CA06 CA11 GA11 GA13 HA17  
4C084 AA13 ZB262  
4C086 AA01 EA16 ZB26