

(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2007-527240
(P2007-527240A)

(43) 公表日 平成19年9月27日(2007.9.27)

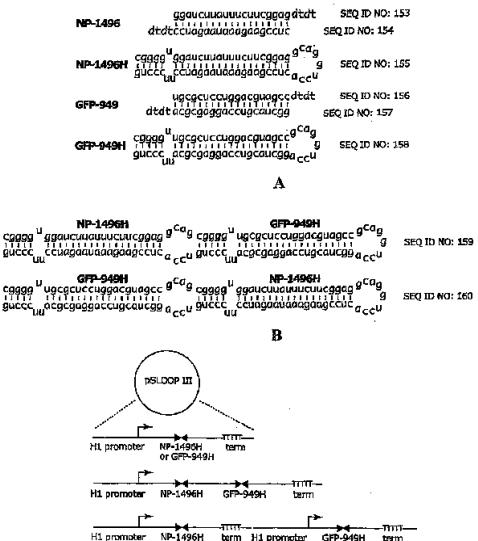
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 12N 15/09 (2006.01)	C 12N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 61K 48/00 (2006.01)	A 61K 48/00	4 B O 2 4
A 61K 31/7105 (2006.01)	A 61K 31/7105	4 B O 6 3
A 61K 31/713 (2006.01)	A 61K 31/713	4 B O 6 5
A 61P 37/08 (2006.01)	A 61P 37/08	4 C O 7 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-501881 (P2007-501881)	(71) 出願人	504348998 マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 142-1493, ケンブリッジ, フ アイブ ケンブリッジ センター
(86) (22) 出願日	平成17年3月1日 (2005.3.1)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成18年10月24日 (2006.10.24)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/006445	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02005/085443		
(87) 國際公開日	平成17年9月15日 (2005.9.15)		
(31) 優先権主張番号	60/549,070		
(32) 優先日	平成16年3月1日 (2004.3.1)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】アレルギー性鼻炎および喘息のためのRNA i ベースの治療

(57) 【要約】

本発明は、（例えば、IgE媒介性過敏症）によって媒介される病状および疾患の処置のための1つ以上のRNAi因子（例えば、siRNA、shRNA、またはRNAiベクター）を含有する組成物ならびにこの目的に有効なRNAi因子を同定するための系を提供する。組成物は、アレルギー性鼻炎および／または喘息の処置に適切である。さらに、本発明は、RNAi因子／送達因子組成物および使用方法を提供する。本発明の特定の実施形態では、RNAi因子を含有する組成物は呼吸経路によって送達される。



C

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

IgE媒介性疾患または病状の発症、病原性、または症状に関係するタンパク質をコードする標的転写物を標的化する、RNAi因子。

【請求項 2】

前記疾患が、アレルギー性鼻炎または喘息である、請求項1に記載のRNAi因子。

【請求項 3】

前記転写物が、FCR鎖、FCR鎖、c-Kitt、Lynn、Syk、ICO
S、OX40L、CD40、CD80、CD86、RelA、RelB、4-1BBリガ
ンド、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TL
R8、TLR9、CD83、SLAM、共通鎖およびCOX-2からなる群より選択さ
れるタンパク質をコードする、請求項1に記載のRNAi因子。 10

【請求項 4】

前記RNAi因子がRNAiベクターである、請求項3に記載のRNAi因子。

【請求項 5】

前記RNAi因子がsiRNAまたはshRNAである、請求項3に記載のRNAi因子。
。

【請求項 6】

前記siRNAまたはshRNAが、少なくとも15ヌクレオチド長の二重鎖部分を含む
、請求項5に記載のRNAi因子。 20

【請求項 7】

前記siRNAまたはshRNAが、約19ヌクレオチド長の二重鎖部分を含む、請求項
5に記載のRNAi因子。

【請求項 8】

前記siRNAまたはshRNAは、配列が少なくとも15個の連続するヌクレオチドに
わたって表1～26に列挙した配列と実質的に相補的である部分を含むアンチセンス鎖を
含む、請求項5に記載のRNAi因子。

【請求項 9】

前記siRNAまたはshRNAは、配列が少なくとも15個の連続するヌクレオチドに
わたって表1～26に列挙した配列と100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を
含む、請求項5に記載のRNAi因子。 30

【請求項 10】

前記siRNAまたはshRNAは、配列が少なくとも15個の連続するヌクレオチドに
わたって配列番号1～315のいずれかに列挙した配列と実質的に同一である部分を含む
センス鎖を含む、請求項5に記載のRNAi因子。

【請求項 11】

前記siRNAまたはshRNAは、配列が少なくとも15個の連続するヌクレオチドに
わたって配列番号1～315のいずれかに列挙した配列と100%同一である部分を含む
センス鎖を含む、請求項5に記載のRNAi因子。 40

【請求項 12】

エアゾール送達のために処方された、請求項1に記載のRNAi因子を含有する、組成物
。

【請求項 13】

乾燥粉末として処方された、請求項1に記載のRNAi因子を含有する、組成物。

【請求項 14】

IgE媒介性疾患または病状を処置または予防する方法であって、該方法は、

- (a) IgE媒介性病状の危険性があるか罹患している被験体を準備する工程；および
- (b) 請求項1に記載のRNAi因子を該被験体に投与する工程；

を包含する、方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記 I g E 媒介性病状が、アレルギー性鼻炎または喘息である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記転写物が、 F C R 鎖、 F C R 鎖、 c - K i t 、 L y n 、 S y k 、 I C O S 、 O X 4 0 L 、 C D 4 0 、 C D 8 0 、 C D 8 6 、 R e l A 、 R e l B 、 4 - 1 B B リガンド、 T L R 1 、 T L R 2 、 T L R 3 、 T L R 4 、 T L R 5 、 T L R 6 、 T L R 7 、 T L R 8 、 T L R 9 、 C D 8 3 、 S L A M 、共通 鎖および C O X - 2 からなる群より選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記組成物が、吸入送達によって被験体の呼吸器系に直接投与される、請求項 1 4 に記載 10 の方法。

【請求項 1 8】

薬学的に受容可能なキャリアをさらに含有する、請求項 1 に記載の R N A i 因子を含有する、組成物。

【請求項 1 9】

送達因子をさらに含有する、請求項 1 に記載の R N A i 因子を含有する、組成物。

【請求項 2 0】

敗血症、ショック、または熱傷関連損傷の処置方法であって、(i) 敗血症、ショックまたは熱傷関連損傷の処置を必要とする被験体を準備する工程、および(ii) 該被験体に T o 1 1 様レセプターを標的化する R N A i 因子を含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。 20

【請求項 2 1】

標的転写物を標的化する s i R N A もしくは s h R N A 、またはハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして標的転写物を標的化する s i R N A もしくは s h R N A を形成する 1 つ以上の R N A 分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を含有する組成物であって、該標的転写物が、 F C R 鎖、 F C R 鎖、 c - K i t 、 L y n 、 S y k 、 I C O S 、 O X 4 0 L 、 C D 4 0 、 C D 8 0 、 C D 8 6 、 R e l A 、 R e l B 、 4 - 1 B B リガンド、 T L R 1 、 T L R 2 、 T L R 3 、 T L R 4 、 T L R 5 、 T L R 6 、 T L R 7 、 T L R 8 、 T L R 9 、 C D 8 3 、 S L A M 、共通 鎖および C O X - 2 からなる群より選択されるタンパク質をコードする、組成物。 30

【請求項 2 2】

前記タンパク質が、 F C R I 鎖である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記タンパク質が、 F C R I 鎖である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記タンパク質が、 c - K i t である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記タンパク質が、 L y n である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記タンパク質が、 S y k である、請求項 2 1 に記載の組成物。 40

【請求項 2 7】

前記タンパク質が、 I C O S である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記タンパク質が、 O X 4 0 L である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記タンパク質が、 C D 4 0 である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記タンパク質が、 C D 8 0 である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記タンパク質が、 C D 8 6 である、請求項 2 1 に記載の組成物。 50

【請求項 3 2】

前記タンパク質が、R e l Aである、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記タンパク質が、R e l Bである、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記タンパク質が、4 - 1 B B リガンドである、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記タンパク質が、T L R 1である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記タンパク質が、T L R 2である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記タンパク質が、T L R 3である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記タンパク質が、T L R 4である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記タンパク質が、T L R 5である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記タンパク質が、T L R 6である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記タンパク質が、T L R 7である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記タンパク質が、T L R 8である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記タンパク質が、T L R 9である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記タンパク質が、C D 8 3である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記タンパク質が、S L A Mである、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記タンパク質が、共通 鎖である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 7】

前記タンパク質が、C O X - 2である、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 8】

前記s i R N Aまたはs h R N Aが、少なくとも15ヌクレオチド長の二重鎖部分を含む、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 4 9】

前記s i R N Aまたはs h R N Aが、約19ヌクレオチド長の二重鎖部分を含む、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 5 0】

前記s i R N Aまたはs h R N Aが、少なくとも15ヌクレオチド長の二重鎖部分および少なくとも1つの一本鎖3'突出を含む、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 5 1】

前記s h R N Aが、二重鎖構造を形成し得る自己相補領域を有する1つのR N A鎖を含む、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 5 2】

前記s i R N Aが、二重鎖構造を形成し得る2つの相補性R N A鎖を含む、請求項2 1に記載の組成物。

【請求項 5 3】

前記二重鎖構造が、少なくとも15ヌクレオチド長である、請求項5 1に記載の組成物。

【請求項 5 4】

10

20

30

40

50

前記二重鎖構造が、少なくとも 15 ヌクレオチド長である、請求項 5 2 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

前記二重鎖構造が、約 19 ヌクレオチド長である、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

前記二重鎖構造が、約 19 ヌクレオチド長である、請求項 5 2 に記載の組成物。

【請求項 5 7】

前記 siRNA または shRNA が前記標的転写物の領域に完全に相補的である部分を含み、該部分が少なくとも 15 ヌクレオチド長である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 5 8】

前記 siRNA または shRNA が多くとも 1 つのヌクレオチド以外は前記標的転写物の部分に完全に相補的である部分を含み、該部分が少なくとも 15 ヌクレオチド長である、請求項 2 1 に記載の組成物。 10

【請求項 5 9】

前記 siRNA または shRNA が多くとも 2 つのヌクレオチド以外は前記標的転写物の部分に完全に相補的である部分を含み、該部分が少なくとも 15 ヌクレオチド長である、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 6 0】

前記 siRNA または shRNA は、センス鎖配列が配列番号 1 ~ 315 に示す配列のいずれかに記載の少なくとも 15 個の連続ヌクレオチドからなるコア二重鎖領域を有するか、該コア二重鎖領域のセンス鎖配列が、配列番号 1 ~ 315 に示す配列のいずれかに記載の少なくとも 15 個の連続ヌクレオチドからなり、但し、該 15 個の連続ヌクレオチドのうちの 1 つまたは 2 つのヌクレオチドのいずれかが該配列とは異なり得る、請求項 2 1 に記載の組成物。 20

【請求項 6 1】

前記 siRNA または shRNA は、センス鎖配列が配列番号 1 ~ 315 に示す配列のいずれかに記載の少なくとも 17 個の連続ヌクレオチドからなるコア二重鎖領域を有するか、該コア二重鎖領域のセンス鎖配列が、配列番号 1 ~ 315 に示す配列のいずれかに記載の少なくとも 15 個の連続ヌクレオチドからなる、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 6 2】

少なくとも 1 つの修飾を含むという点で siRNA または shRNA とは異なる、請求項 2 1 に記載の siRNA または shRNA のアナログ。 30

【請求項 6 3】

前記修飾が、siRNA または shRNA の安定性の増加、siRNA または shRNA の吸収の増強、siRNA または shRNA の細胞侵入の増強、またはこれらの任意の組み合わせを生じる、請求項 6 2 に記載のアナログ。

【請求項 6 4】

前記修飾が、塩基、糖、またはヌクレオシド間結合を修飾する、請求項 6 2 に記載のアナログ。

【請求項 6 5】

前記修飾がヌクレオチド 2' 修飾ではない、請求項 6 2 に記載のアナログ。 40

【請求項 6 6】

前記修飾がヌクレオチド 2' 修飾である、請求項 6 2 に記載のアナログ。

【請求項 6 7】

前記アナログが、少なくとも 1 つのリボヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドに置換されているという点で siRNA または shRNA とは異なる、請求項 2 1 に記載の siRNA または shRNA のアナログ。

【請求項 6 8】

請求項 2 1 に記載の組成物を含む、細胞。

【請求項 6 9】

前記細胞が、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして siRNA または shRNA 50

を形成する1つ以上のRNAの転写のためのテンプレートを含む核酸を含む、請求項68に記載の細胞。

【請求項70】

請求項21に記載の組成物を含む、トランスジェニック動物。

【請求項71】

前記トランスジェニック動物が、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてsiRNAまたはshRNAを形成する1つ以上のRNAの転写のためのテンプレートを含む核酸を含む、請求項70に記載のトランスジェニック動物。

【請求項72】

薬学的組成物であって：

請求項21に記載の組成物；および
薬学的に受容可能なキャリア；
を含有する、薬学的組成物。

【請求項73】

前記組成物がエアゾールとして処方される、請求項72に記載の薬学的組成物。

【請求項74】

前記組成物が鼻内噴霧剤として処方される、請求項72に記載の薬学的組成物。

【請求項75】

前記組成物が、同一転写物を標的化する複数の異なるsiRNAまたはshRNAを含有する、請求項72に記載の薬学的組成物。

【請求項76】

前記組成物が、異なる転写物を標的化する複数のsiRNAまたはshRNAを含む、請求項72に記載の薬学的組成物。

【請求項77】

前記組成物が、アレルギー性鼻炎または喘息の処置のための食品医薬品局承認薬をさらに含む、請求項72に記載の薬学的組成物。

【請求項78】

IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状を処置または予防する方法であって、

IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の危険性があるか罹患している被験体を準備する工程；および

請求項72に記載の組成物を該被験体に投与する工程；
を包含する、方法。

【請求項79】

前記疾患または病状がアレルギー性鼻炎である、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

前記疾患または病状が喘息である、請求項78に記載の方法。

【請求項81】

前記組成物がエアゾールとして投与される、請求項78に記載の方法。

【請求項82】

前記組成物が鼻内噴霧剤として投与される、請求項78に記載の方法。

【請求項83】

敗血症、ショック、または熱傷関連損傷の処置方法であって、(i)敗血症、ショック、または熱傷関連損傷の処置を必要とする被験体を準備する工程；および(ii)該被験体にToll様レセプターを標的化するRNai因子を含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項84】

前記Toll様レセプターがTLR4である、請求項83に記載の方法。

【請求項85】

前記熱傷関連損傷が心筋損傷である、請求項83に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8 6】

前記組成物が、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして、F C R I 鎖、F C R I 鎖、c - K i t、L y n、S y k、I C O S、O X 4 0 L、C D 4 0、C D 8 0、C D 8 6、R e l A、R e l B、4 - 1 B B リガンド、T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、C D 8 3、S L A M、共通鎖およびC O X - 2 からなる群より選択されるタンパク質をコードする転写物を標的化するs i R N Aまたはs h R N Aを形成する1つ以上のR N Aの転写物のためのテンプレートを含む核酸を含有する、請求項21に記載の組成物。

【請求項 8 7】

前記核酸が、R N AポリメラーゼI I Iのプロモーターを含む、請求項86に記載の組成物。 10

【請求項 8 8】

前記プロモーターがU 6 プロモーターまたはH 1 プロモーターである、請求項86に記載の組成物。

【請求項 8 9】

前記核酸が、R N Aヘアピンの転写のためのテンプレートとして機能する配列を含み、該配列が、転写開始部位およびその後のポリAカセットと極めて近接して並列し、それにより、転写されたヘアピン中の突出が最も小さくなるか全くなくなる、請求項86に記載の組成物。

【請求項 9 0】

請求項86に記載の核酸を含む、ベクター。 20

【請求項 9 1】

前記ベクターが、遺伝子治療への適用に適切なベクターである、請求項90に記載のベクター。

【請求項 9 2】

前記ベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびアデノ関連ウイルスベクターからなる群より選択される、請求項91に記載のベクター。

【請求項 9 3】

請求項90に記載のベクターを含む、細胞。 30

【請求項 9 4】

I g E媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状を処置または予防する方法であって、該方法は、

I g E媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の危険性があるか罹患している被験体を準備する工程；および

請求項86に記載の組成物を該被験体に投与する工程；
を包含する、方法。

【請求項 9 5】

前記疾患または病状がアレルギー性鼻炎または喘息である、請求項94に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記組成物がエアゾールとして投与される、請求項91に記載の方法。 40

【請求項 9 7】

前記組成物が鼻内噴霧剤として投与される、請求項91に記載の方法。

【請求項 9 8】

カチオン性ポリマーをさらに含有する、請求項21に記載の組成物。

【請求項 9 9】

前記カチオン性ポリマーが、イミダゾール基修飾P L L、ポリエチレンイミン、ポリビニルピロリドンおよびキトサンからなる群より選択される、請求項98に記載の組成物。

【請求項 1 0 0】

前記カチオン性ポリマーが、ポリ(- アミノエステル)ポリマーからなる群より選択さ 50

れる、請求項 9 8 に記載の組成物。

【請求項 10 1】

アルギニンリッチペプチドまたはヒスチジンリッチペプチドをさらに含有する、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 10 2】

前記アルギニンリッチペプチドが、少なくとも 5 つのアルギニン残基を含むポリアルギニンである、請求項 10 1 に記載の組成物。

【請求項 10 3】

肺への導入に適切な界面活性剤をさらに含有する、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 10 4】

前記転写物を発現する細胞または生物に請求項 2 1 に記載の組成物を投与する工程を包含する標的転写物の発現を阻害する方法であって、前記 s i R N A または s h R N A が標的転写物を標的化する、方法。

【請求項 10 5】

I g E 媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状を処置または予防する方法であって、該方法は、

I g E 媒介性疾患または病状の危険性があるか罹患している被験体を準備する工程；および

標的転写物を標的化する s i R N A もしくは s h R N A 、またはハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして標的転写物を標的化する s i R N A もしくは s h R N A を形成する 1 つ以上の R N A 分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を該被験体に投与する工程であって、該標的転写物の直接的または間接的な阻害により、I g E の產生もしくは分泌の阻害、I g E 分泌 B 細胞の増殖もしくは生存の減少、またはこれらの任意の組み合わせが生じる、工程；

を包含する、方法。

【請求項 10 6】

前記 s i R N A または s h R N A が、F C R I 鎖、F C R I 鎖、c - K i t 、L y n 、S y k 、I C O S 、O X 4 0 L 、C D 4 0 、C D 8 0 、C D 8 6 、R e l A 、R e l B 、4 - 1 B B リガンド、T L R 1 、T L R 2 、T L R 3 、T L R 4 、T L R 5 、T L R 6 、T L R 7 、T L R 8 、T L R 9 、C D 8 3 、S L A M 、共通 鎖および C O X - 2 からなる群より選択されるタンパク質をコードする転写物を標的化する、請求項 10 5 に記載の方法。

【請求項 10 7】

不適切もしくは過剰な肥満細胞活性またはI g E 媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患もしくは病状を処置または予防する方法であって、該方法は、

不適切もしくは過剰な肥満細胞活性によって特徴づけられる疾患もしくは病状の危険性があるか罹患している被験体を準備する工程；および

標的転写物を標的化する s i R N A もしくは s h R N A またはハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして標的転写物を標的化する s i R N A もしくは s h R N A を形成する 1 つ以上の R N A 分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を該被験体に投与する工程であって、該標的転写物の阻害により、肥満細胞の活性または肥満細胞の生存が減少する、工程

を包含する、方法。

【請求項 10 8】

前記 s i R N A または s h R N A が、F C R I 鎖、F C R I 鎖、c - K i t 、L y n および S y k からなる群より選択されるタンパク質をコードする転写物を標的化する、請求項 10 7 に記載の方法。

【請求項 10 9】

不適切もしくは過剰な T h 2 ヘルパー細胞応答またはI g E 媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患もしくは病状を処置または予防する方法であって、該方法は、

10

20

30

40

50

不適切もしくは過剰な Th2 ヘルパー細胞応答によって特徴づけられる疾患もしくは病状の危険性があるか罹患している被験体を準備する工程；および

標的転写物を標的化する siRNA もしくは shRNA またはハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして標的転写物を標的化する siRNA もしくは shRNA を形成する 1 つ以上の RNA 分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を該被験体に投与する工程であって、該標的転写物の阻害により、Th2 細胞応答が減少するか排除される、工程；を包含する、方法。

【請求項 110】

前記 siRNA または shRNA が、 FC RI 鎖、 FC RI 鎖、 c - Kit 、 Lyn 、 Syk 、 ICOS 、 OX40L 、 CD40 、 CD80 、 CD86 、 RelA 、 RelB 、 4 - 1BB リガンド、 TLR1 、 TLR2 、 TLR3 、 TLR4 、 TLR5 、 TLR6 、 TLR7 、 TLR8 、 TLR9 、 CD83 、 SLAM 、共通鎖および COX - 2 からなる群より選択されるタンパク質をコードする転写物を標的化する、請求項 109 に記載の方法。 10

【請求項 111】

RNAi 因子が IgE 媒介性過敏症または不適切もしくは過剰な肥満細胞活性によって特徴づけられる病状の処置に適切な配列を含むと同定する方法であって、該方法は、

(i) 適切な刺激への曝露の前、同時、または後に候補 RNAi 因子を肥満細胞に送達する工程；

(i i) メディエーターの産生または分泌を評価する工程； 20

(i i i) 該 RNAi 因子の存在下で産生または分泌されたメディエーターの量と該 RNAi 因子の非存在下で産生または分泌された量とを比較する工程；および

(i v) 該 RNAi 因子の存在下で産生または分泌されたメディエーターの量が該 RNAi 因子の非存在下で産生または分泌されたメディエーターの量よりも少ない場合、該 RNAi 因子が適切な配列を含むと同定する工程；

を包含する、方法。

【請求項 112】

RNAi 因子が IgE 媒介性過敏症または不適切もしくは過剰な Th2 ヘルパー細胞活性によって特徴づけられる病状の処置に適切な配列を含むと同定する方法であって、該方法は、 30

(i) 候補 RNAi 因子を T 細胞および APC を含む培養物に送達する工程；

(i i) T 細胞の増殖を評価し、および / または Th2 細胞に特徴的なサイトカインの産生もしくは分泌を評価する工程；

(i i i) 該 RNAi 因子の存在下での該 T 細胞増殖の程度または該サイトカインの産生もしくは分泌の程度と siRNA の非存在下での該 T 細胞増殖の程度または該サイトカインの産生もしくは分泌の程度とを比較する工程；

(i v) 該 RNAi 因子の存在下での該 T 細胞増殖の程度または該サイトカインの産生もしくは分泌の程度が、 RNAi 因子の非存在下での該 T 細胞増殖の程度または該サイトカインの産生もしくは分泌の程度よりも小さい場合、該 RNAi 因子が適切な配列を含むと同定する工程； 40

を包含する、方法。

【請求項 113】

RNAi 因子が IgE 媒介性過敏症によって特徴づけられる病状の処置に適切な配列を含むと同定する方法であって、該方法は、

(i) 候補 RNAi 因子を、 B 細胞を含む培養物に送達する工程；

(i i) IgE の産生または分泌を評価する工程；

(i i i) siRNA の存在下で産生または分泌された IgE の量と該 RNAi 因子の非存在下で産生または分泌された量とを比較する工程；および

(i v) 該 RNAi 因子の存在下で産生または分泌された IgE の量が該 RNAi 因子の非存在下で産生または分泌された IgE の量よりも少ない場合、該 RNAi 因子が適切 50

な配列を含むと同定する工程；
を包含する、方法。

【請求項 114】

前記 IgE が抗原特異的である、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

RNAi 因子が IgE 媒介性過敏症によって特徴づけられる病状の処置に適切な配列を含むと同定する方法であって、該方法は、

(i) 候補 RNAi 因子を被験体に送達する工程；

(ii) 血清 IgE レベル、T 細胞の増殖、Th2 細胞に特徴的なサイトカインの産生、気道炎症、気道反応性、気道壁再構築および肺機能からなる群より選択される IgE 媒介性過敏症の指標についての値を得る工程；

(iii) 該 RNAi 因子の存在下で得られた値と該 RNAi 因子の非存在下で得られた値とを比較する工程；ならびに

(iv) siRNA の存在下で得られた値が該 RNAi 因子の非存在下で得られた値よりも低い場合、該 RNAi 因子が適切な配列を含むと同定する工程；
を包含する、方法。

【請求項 116】

前記血清 IgE が抗原特異的であり、前記 T 細胞が抗原特異的である、請求項 115 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願に対する相互参照)

本出願は、2004年3月1日に出願された米国仮特許出願第 60/549,070 号の優先権の利益を主張し、これは、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(政府の支援)

合衆国政府は、本発明の開発に使用した助成金を提供した。特に、本発明の開発は、国立衛生研究所助成金番号 5 - RO1 - AI44477、5 - RO1 - AI44478、5 - RO1 - CA60686、1 - RO1 - AI50631 および RO1 - AI40146 の支援を受けた。合衆国政府は、本発明に一定の権利を有し得る。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

アレルギー性鼻炎および喘息などのアレルギー性疾患は、少なくとも一部が他の点では一般的に無害な異物（アレルゲン）に対する過敏反応に起因すると広く考えられている。アレルギー性鼻炎および喘息は、アレルギー反応が起こる主な位置が異なる：アレルギー性鼻炎は鼻粘膜であり、喘息は下気道である。米国の人口の約 10% が、アレルギー性鼻炎に罹患している。他のいずれの医学的問題よりも多数の患者がアレルギー性疾患の診察を受けている。アレルギーはまた、仕事および学習の時間を奪う最大の原因であり、私生活にならびに医療制度および経済に直接および間接的に与える負担は甚大である。先進国において、5 ~ 10 人に 1 人は喘息を罹患していると見積もられており、発生率は過去 20 年間で劇的に増加している（非特許文献 1）。

【0004】

アレルギー性鼻炎および喘息は両方とも、肥満細胞および好塩基球からの薬理学的に活性なメディエーターの放出を含む。メディエーターにより、平滑筋が収縮し、血管透過性および血管拡張が増加し、鼻水および流涙などの代表的なアレルギー症状を生じる。これらのメディエーターはまた、気道過敏症、粘液分泌、および気道閉塞などの喘息症状の発症に直接または間接的に関与する。喘息は、代表的には、急性炎症および慢性炎症の両方によって特徴付けられ、急性炎症は主に偶発性気管支収縮の原因であり、慢性炎症および

10

20

30

40

50

気道壁再構築は、慢性喘息で頻発する気道過反応性および固定性気道閉塞に寄与することが示唆されている（非特許文献2）。

【非特許文献1】Umetsu, D.ら、「Nature Immunology」、2002年、第3巻、第8号、p. 715-720

【非特許文献2】Bousquet, J.ら、「Am. J. Crit. Care Med.」、2000年、第161巻、p. 1720-1745

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

多数の薬物（例えば、抗ヒスタミン薬、コルチコステロイドおよびうっ血除去薬）は、アレルギー性鼻炎の症状の一過性の緩和に利用可能である。アレルゲン免疫療法は、特に小児に治癒的であり得るが、処置をうける患者の約半分で有効でなく、代表的には、首尾の良い完治には何度も注射する必要がある。喘息は、種々の薬剤（気管支拡張薬およびコルチコステロイドが挙げられる）を使用して処置され得る。しかし、これらの治療薬はいずれも十分に効果的ではなく、その多くが望ましくない副作用を有する。したがって、アレルギー性鼻炎および喘息のための有効な治療および予防に対する必要性が依然として当該分野に存在する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

（発明の要旨）

本発明は、IgEおよび/またはIgEを産生する細胞が主な役割を果たす種々の疾患および病状の処置のための新規の治療薬を提供する。特に、本発明は、IgE媒介性過敏症（I型過敏症ともいう）に関する疾患または病状（例えば、アレルギー性鼻炎および喘息）ならびにその徴候の改善（例えば、症状の緩和）のための新規の治療薬を提供する。この治療薬は、RNAi（標的RNAに相補的な部分を含む二本鎖RNAにより、細胞中に存在する場合に標的RNAを阻害する現象）に基づく。RNAiの機構は、一般的に、標的RNAの切断またはその翻訳の阻害を含む。本発明のRNAi因子は、細胞転写物の発現を阻害し、それにより、IgE媒介性疾患に直接または間接的に寄与するタンパク質の合成を防止する。RNAiを使用した標的遺伝子発現の阻害は、基本的に新規の治療アプローチを示す。

【0007】

本発明者らは、免疫系細胞で発現される多数の遺伝子のうちでIgE媒介性疾患の病原性に関与する可能性が高いと同定した阻害のための標的遺伝子の特定の組を選択した。本発明の1つの局面は、好ましくはRNA転写レベルでのこの組における1つ以上の遺伝子の発現を阻害することが顕著に有利であるという認識である。本発明者らはまた、好ましい標的遺伝子の配列に基づいて新規のRNAi因子を設計した。さらに、本発明者らは、RNAi因子が、呼吸器系に直接送達されるか、静脈に送達された場合に被験体の呼吸器系での遺伝子発現を有效地に阻害し得ることを発見した。本発明者らは、特定の送達薬は、薬剤を呼吸器系に直接か静脈内に送達させるために使用した場合に動物モデルにおいてRNAi因子の有効性を顕著且つ予想外に増強することをさらに発見した。

【0008】

本発明は、喘息および/またはアレルギー性鼻炎の発症、病原性および/または症状に関与する分子をコードする種々の転写物のいずれかを標的化するRNAi因子を提供する。種々の実施形態において、本発明は、肥満細胞もしくは好塩基球の活性および/またはB細胞によるIgEの産生に直接的または間接的に関与する1つ以上の標的転写物を標的化する短い干渉RNA（siRNA）および/または短いヘアピンRNA（shRNA）を含有する組成物を提供する。本発明の特定の実施形態では、siRNAは、約19ヌクレオチド長であるが、17ヌクレオチド長と29ヌクレオチド長との間の範囲である相補領域を有し、必要に応じて1つまたは2つの一本鎖突出さらに含む2つのRNA鎖を含む。本発明の特定の実施形態では、shRNAは、自己相補領域を有する1つのRNA分子

10

20

30

40

50

を含む。1つのRNA鎖は、ステムおよびループ、および必要に応じて、RNAの5'末端および/または3'末端に1つ以上の非対合部分を含むヘアピン構造を形成する。このようなRNA種は、自己ハイブリダイズすると言われる。

【0009】

さらに、本発明は、細胞内でのその存在によって1つ以上のRNAが転写され、自己ハイブリダイズするか相互にハイブリダイズしてshRNAまたはsiRNAを形成し、肥満細胞もしくは好塩基球の活性および/またはB細胞によるIgEの産生に関する少なくとも1つの標的転写物の発現を阻害するベクターを提供する。

【0010】

本発明は、組成物（例えば、本発明のRNAi因子（siRNA、shRNAおよび/またはベクター）を含有する薬学的組成物）ならびにこのような組成物の送達方法をさらに提供する。例えば、本発明は、構築物が細胞中に導入された場合に、肥満細胞もしくは好塩基球の活性および/またはB細胞によるIgEの産生に直接的または間接的に関与する、標的転写物を宿主細胞内に標的化するsiRNAまたはshRNAが産生されるように細胞内で活性な発現シグナル（例えば、プロモーターまたはプロモーター/エンハンサー）に作動可能に連結された核酸を含むベクターを提供する。一般に、ベクターは、細胞内でのその存在によって1つ以上のリボ核酸（RNA）が転写され、自己ハイブリダイズするか相互にハイブリダイズして短いヘアピンRNA（shRNA）または短い干渉RNA（siRNA）を形成し、それらが肥満細胞もしくは好塩基球の活性および/またはB細胞によるIgEの産生に直接的または間接的に関与する少なくとも1つの標的転写物の細胞内における発現を阻害する、DNAプラスミドもしくはRNAプラスミドまたはウイルスベクター（例えば、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなど）であり得る。本発明の特定の実施形態では、ベクターは、転写によって相補領域を含むRNAが合成され、そのRNAがハイブリダイズして標的転写物を標的化するshRNAを形成するようプロモーターに作動可能に連結された核酸セグメントを含む。本発明の特定の実施形態では、ベクターは、反対方向の2つのプロモーターに隣接した核酸セグメントを含み、プロモーターからの転写によって2つの相補的なRNAが合成され、これらが相互にハイブリダイズして標的転写物を標的化するsiRNAを形成するようにプロモーターが核酸セグメントに作動可能に連結された核酸セグメントを含む。本発明は、さらに、ベクターを含む組成物を提供する。

【0011】

本発明の任意の組成物は、本明細書中に記載のsiRNA、shRNAおよび/またはベクターに加えて、送達薬と呼ばれるsiRNA、shRNAまたはベクターの送達および/または取り込みを容易にする1つ以上の物質を含有し得る。これらの物質としては、カチオン性ポリマー、ペプチド分子トランスポーター（アルギニンリッチペプトイドまたはアルギニンリッチペプチドおよびヒスチジンリッチペプチドが挙げられる）、カチオン性脂質および中性脂質、リボソーム、特定の非カチオン性ポリマー、炭水化物および界面活性物質が挙げられる。適切な送達薬は、同時係属中の米国特許出願10/674,159号（US2004242518として公開）および10/674,087号（US2005008617として公開）、およびWO2004028471およびWO2004029213として公開されたPCT出願（本明細書中に参考として援用される）に記載されている。組成物は、種々の経路（静脈内、吸入、鼻腔内、エアゾールとして、腹腔内、筋肉内、皮内、経口などが挙げられる）によって投与され得る。呼吸器系（例えば、鼻腔内、吸入など）を標的化する送達方法は、特に目的のものである。

【0012】

本発明は、さらに、IgE媒介性過敏症（例えば、アレルギー性鼻炎および喘息）に関連する疾患または病状の処置方法もしくは予防方法、または症状の緩和方法であって、抗原などの誘発刺激物への曝露前、曝露中、または曝露後の適切な時間枠内に1つ以上の本発明のRNAi因子を含有する組成物をこれらの病状の危険性があるか罹患している被験

10

20

30

40

50

体に投与することによる、方法を提供する。s i R N A および / または s h R N A は、化学合成され得るか、インビトロ転写を使用して產生され得るか、細胞内に產生され得る。組成物は、種々の経路（静脈内、吸入、鼻腔内、エアゾールとして、腹腔内、筋肉内、皮内、経口などが挙げられる）によって投与され得る。本発明の特定の好ましい実施形態では、組成物は、1種以上のs i R N Aを含有する。

【0013】

本発明はまた、一般に、アレルギー性鼻炎および / または喘息ならびにI g E媒介性障害の処置または予防に有用な配列を有するR N A i因子の同定のための系を提供する。説明するために、本発明の組成物をアレルギー性鼻炎および / または喘息の処置に使用することを本明細書中で想定する。しかし、その使用は、これらの病状に制限されないことに留意すべきである。本発明の組成物は、I g Eが関与する任意の種々の病状（食品アレルギー、虫刺されまたは食品アレルギーに対するアナフィラキシー反応、寄生虫感染などが挙げられる）の処置および / または予防に使用され得る。さらに、これらは、例えば、遺伝子自体の研究、候補医薬品の試験などの研究目的のために標的遺伝子の発現を阻害することが望ましい種々の他の目的のために使用され得る。

【0014】

本発明は、さらに、アレルギー性鼻炎、喘息および他のI g E媒介性病状の病態生理学ならびにこれらの病状における異なる細胞型および分子の役割の分析および特徴付けならびに種々の生物学的プロセス（肥満細胞、好塩基球、樹状細胞、T細胞、およびB細胞が挙げられる）の研究のための系および試薬を提供する。

【0015】

本出願は、種々の特許、特許出願、学術論文および他の出版物（その全体が本明細書中で参考として援用される）を言及する。さらに、以下の標準的な参考文献が本明細書中で参考として援用される：Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Immunology, Current Protocols in Protein Science, and Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002年7月版；Sambrook, Russell, and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001；Goldsby, R.Aら、Kuby Immunology, 第4版, W.H. Freeman and Co., New York, 2000；Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第10版, McGraw-Hill, 2001およびPhysician's Desk Reference, 第56版, ISBN: 1563634112 Medical Economics, 2002。

【0016】

他で定義しない限り、本明細書中で使用した全ての技術用語および科学用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般に理解されている意味と同じ意味を有する。範囲が与えられた場合、終点はその範囲に含まれる。本発明の種々の実施形態がマーカッシュ群の言語またはその代替形態で記載されている場合、本明細書中に明確に引用されていない場合でさえも、マーカッシュ群およびリストの全サブセットおよび各メンバーも暗黙の内に示されていると理解されるべきである。本明細書中に記載のものと類似するか等価な方法および材料を本発明の実施または試験で使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。矛盾する場合、本明細書（定義が含まれる）が支配する。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみを目的とし、本発明を制限することを意図しない。

【0017】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

10

20

20

30

40

50

【0018】

(定義)

本明細書中で使用される場合、数に関する用語「約(approximately)」または「約/about」とは、他で記載するか、文脈から明確でない限り、一般的にその数値のいずれかの方向(より多いかより少ない)で5%の範囲内に含まれる数値を含むと見なす。

【0019】

用語「相補的」とは、特定の塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、または核酸の間の正確な対合能力をいうために当該分野で受け入れられている意味に従って本明細書中で使用される。例えば、アデニン(A)とウリジン(U)とは相補的であり、アデニン(A)とチミジン(T)とは相補的であり、グアニン(G)とシトシン(C)とは相補的である。第1の核酸配列の一定の位置でのヌクレオチドが第2の核酸配列中の反対に位置するヌクレオチドに相補的である場合、ヌクレオチドは相補塩基対を形成し、核酸はその位置で相補的である。当業者は、核酸が逆平行の方向で整列している(すなわち、一方の核酸が5' 3'方向であり、他方が3' 5'方向である)ことを認識している。

【0020】

2つの核酸またはその一部の相補性の程度を、2つの核酸またはその一部を相補性が最大になるように逆平行の方向でアラインメントした場合に、評価枠にわたる総ヌクレオチド数に対する比率として相補塩基対を形成する両鎖中の総ヌクレオチド数を決定することによって評価し得る。例えば、AAAAAAAGAAおよびTTTGTATは、塩基対中の全部で16個のうちの12個のヌクレオチドが相補的であるため、75%相補的である。評価枠にわたり少なくとも70%相補的である核酸を、この枠にわたって実質的に相補的であると見なす。詳細には、評価枠が15~16ヌクレオチド長である場合、実質的に相補的な核酸は、枠内に0~3個のミスマッチを有しても良く、枠が17ヌクレオチド長の場合、実質的に相補的な核酸は枠内に0~4個のミスマッチを有しても良く、枠が18ヌクレオチド長の場合、実質的に相補的な核酸は枠内に0~5個のミスマッチを有しても良く、枠が19ヌクレオチド長の場合、実質的に相補的な核酸は枠内に0~6個のミスマッチを有しても良い。許容されるミスマッチの数は、枠内に存在するそれぞれのさらなるヌクレオチドにつき1ヌクレオチド増加する。特定の実施形態では、ミスマッチは連続した位置には存在しない。特定の実施形態では、枠は、2ヌクレオチド長よりも長いミスマッチのストレッチを含まない。好ましい実施形態では、15~19ヌクレオチドの評価枠は0~1個(好ましくは0個)のミスマッチを含み、20~29ヌクレオチドの評価枠には0~2個(好ましくは0~1個、より好ましくは0個)のミスマッチを含む。

【0021】

本明細書中で使用される、「遺伝子」とは、当該分野で理解されている意味を有する。一般に、遺伝子は、コード配列(オープンリーディングフレーム)に加えて、遺伝子調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)および/またはイントロン配列を含むと見なされる。「遺伝子」の定義は、タンパク質をコードしないが、むしろ構造RNA分子または機能的RNA分子をコードする核酸に対する言及を包含することがさらに認識される。明確にするために、本出願で使用される場合、用語「遺伝子」とは、一般に、タンパク質をコードする核酸の一部をいい、この用語は、必要に応じて、調節配列を包含し得ることに留意すべきである。この定義は、非タンパク質をコードする発現単位への用語「遺伝子」の適用を排除すること意図するのではなく、むしろ、ほとんどの場合、本明細書中で使用されるこの用語はタンパク質をコードする核酸をいうことを意図する。

【0022】

「遺伝子産物」または「発現産物」とは、一般に、遺伝子から転写されたRNAまたは遺伝子から転写されたRNAによってコードされるポリペプチドである。

【0023】

本明細書中で使用される場合、用語「ハイブリダイズする」とは、2つの相補核酸配列の間の相互作用をいう。語句「高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」とは

10

20

30

40

50

、当該分野で認識されている高ストリンジエンシー条件下で維持される十分に安定な相互作用を説明する。ハイブリダイゼーション反応実施のための手引きは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、N.Y.、6.3.1-6.3.6, 1989およびより最近の改訂版（その全てが参考として援用される）に見出すことができる。Sambrook, RussellおよびSambrook、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、2001も参照のこと。水性の方法および非水性の方法が参考として記載され、いずれかが使用され得る。代表的には、約50～100ヌクレオチド長にわたる核酸配列に関しては、以下の種々のストリンジエンシーレベルが定義されている：低ストリンジエンシー（例えば、約45での $6 \times$ 塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）、その後の少なくとも50での $0.2 \times$ SSC、 0.1% SDSでの2回の洗浄）（中・低ストリンジエンシー条件については、洗浄温度を55に上昇させることができる）；中程度のストリンジエンシー（例えば、約45での $6 \times$ SSC、その後の60での $0.2 \times$ SSC、 0.1% SDSでの1回以上の洗浄）；高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション（例えば、約45での $6 \times$ SSC、その後の65での $0.2 \times$ SSC、 0.1% SDSでの1回以上の洗浄）；および非常に高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件（例えば、65での0.5Mリン酸ナトリウム、 0.1% SDS、その後の65での $0.2 \times$ SSC、 1% SDSでの1回以上の洗浄）など。高ストリンジエンシー条件下でのハイブリダイゼーションは、非常に高い相補性を有する配列間のみで起こる。当業者は、異なるストリンジエンシードに対するパラメーターは、一般に、ハイブリダイズする配列の長さ、RNAまたはDNAを含むか否かなどの種々の要因に基づいて異なることを認識している。例えば、高、中、または低ストリンジエンシーのハイブリダイゼーションの適温は、一般に、オリゴヌクレオチドなどのより短い配列でより長い配列よりも低い。

【0024】

「同一性」とは、2つ以上の核酸配列が同一である範囲をいう。評価枠にわたる2つの核酸間の同一性の程度を、平行方向で核酸を整列させること、評価枠内の各鎖中の同一ヌクレオチドが占める位置の比率を決定すること、いずれかの鎖中のギャップの導入を可能にすることによって計算することができる。代表的には、同一性の程度を、少なくとも15ヌクレオチド長（例えば、19ヌクレオチド長）の評価枠にわたって決定する。

【0025】

転写物の発現を参照して、またはポリペプチドもしくは細胞の機能活性に関して本明細書中で使用される場合、「不適切な、または過剰な」とは、（i）代表的な環境条件下で野生型細胞または健常な被験体で通常おこるよりも高いレベルでおこるか（代表的には、疾患の症状または徵候などの検出可能な結果に寄与するかまたはそれを引き起こすレベル）、および／または（ii）代表的な環境条件下で野生型細胞または健常な被験体で通常おこるものとは異なる一過性のまたは空間的なパターンで起こる（代表的には、疾患の症状または徵候などの検出可能な結果に寄与するかそれを引き起こす様式）発現または活性をいう。不適切または過剰な発現または活性としては、通常はこのような発現または活性を示さない細胞型における発現または活性が挙げられる。細胞または被験体が転写物の不適切もしくは過剰な発現またはポリペプチドもしくは機能活性の不適切もしくは過剰な活性を示すか否かを、例えば、この発現または活性と正常な（例えば、野生型）被験体が有する発現または活性、ヒストリカルコントロール、この被験体の以前の値などとの比較によって決定することができる。しかし、本発明の特定の実施形態では、発現または活性は、正常と見なされる範囲内に含まれる場合でさえも、被験体において不適切または過剰と見なされる。

【0026】

転写物またはポリペプチドの過剰または不適切な発現「に関連する」、「によって特徴づけられる」、または「を特徴とする」とは、一般に、疾患または病状の存在下で、転写

10

20

30

40

50

物またはポリペプチドの過剰または不適切な発現が頻繁に（例えば、症例の大部分）、代表的に、または一貫して起こることを意味する。過剰または不適切な発現が疾患または病状の存在下で常に起こる必要はなく、実際、過剰または不適切な発現は小集団（例えば、疾患または病状を罹患した被験体の5%未満）でのみ起こり得る。一般に、転写物またはポリペプチドの過剰または不適切な発現は、疾患もしくは病状またはその症状に直接的または間接的に起因するか寄与する。発現または活性が過剰または不適切であるか否かは状況に依存し得ることに留意すべきである。例えば、リガンドのレセプターの発現は、リガンドの非存在下では有効でなくてもよいが、リガンドの存在下では、疾患または症状が生じる場合、このような発現は過剰または不適切と見なされ得る。治療の文脈では、句「に関連する」、「によって特徴づけられる」、または「を特徴とする」とは一般に、処置すべき病状または疾患の少なくとも1つの症状が転写物またはコードされるポリペプチドに起因するか、それによって悪化するか、または寄与し、その結果、転写物またはポリペプチドの発現の減少が、疾患または病状の1つ以上の特徴または症状を緩和、減少または予防することを意味する。

10

【0027】

本明細書中で使用される場合、「単離された」とは、1)通常は天然で会合している少なくともいくつかの成分から分離されているか、2)手作業を含むプロセスによって調製されているか精製されているか、そして/または3)天然に存在しないことを意味する。

20

【0028】

本明細書中で使用される場合、「作動可能に連結された」とは、1つの核酸配列の発現が、他の核酸配列によって制御されているか、調節されているか、調整されているなどの2つの核酸配列の間の関係をいう。例えば、核酸配列の転写は、作動可能に連結されたプロモーター配列によって指向され、核酸の翻訳後プロセシングは、作動可能に連結されたプロセシング配列によって指向され、核酸配列の翻訳は、作動可能に連結された翻訳調節配列によって指向され、核酸またはポリペプチドの輸送または局在化は作動可能に連結された輸送配列または局在化配列によって指向され、ポリペプチドの翻訳後プロセシングは、作動可能に連結されたプロセシング配列によって指向される。好ましくは、第2の核酸配列に作動可能に連結された核酸配列は、このような配列に直接的または間接的に共有結合されるが、任意の有効な三次元結合が許容可能である。

30

【0029】

本明細書中で使用される場合、「精製された」とは、多くの他の化合物または物質からの分離されたことを意味する。化合物または物質は、部分的に精製されているか、実質的に精製されているか、純粋であってもよく、実質的に全ての他の化合物または物質から取り出されている場合、純粋である（すなわち、好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99%を超えて純粋である）。

30

【0030】

用語「調節配列」とは、作動可能に連結された配列の発現（特に、転写であるが、いくつかの場合、スプライシングまたは他のプロセシングなどの他の事象）を指向、増強、または阻害する核酸配列領域を記載するために本明細書中で使用される。この用語は、プロモーター、エンハンサーなどの発現シグナルおよび他の転写調節エレメントを含む。本発明のいくつかの実施形態では、調節配列は、ヌクレオチド配列の構成的発現を指向し得、他の実施形態では、調節配列は、組織特異的発現および/または誘導性発現を指向し得る。例えば、哺乳動物細胞中で使用に適した組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、リンパ特異的プロモーター（例えば、C a l a m e ら、A d v . I mm u n o l . 4 3 : 2 3 5 、 1 9 8 8 を参照のこと）（例えば、T細胞レセプターサブユニット遺伝子のプロモーター（例えば、W i n o t o ら、E M B O J . 8 : 7 2 9 , 1 9 8 9 を参照のこと）および免疫グロブリン遺伝子（例えば、B a n e r j i ら、C e l l 3 3 : 7 2 9 、 1 9 8 3 ; Q u e e n ら、C e l l 3 3 : 7 4 1 、 1 9 8 3 を参照のこと）など）およびニューロン特異的プロモーター（例えば、神経フィラメントプロモーター；B y r

40

50

neら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473、1989) が挙げられる。発生調節プロモーターも含まれ、例えば、マウス *hox* プロモーター (Kesselら、Science 249: 374、1990) および - フェトプロテインプロモーター (Campesら、Genes Dev. 3: 537、1989) が挙げられる。本発明のいくつかの実施形態では、調節配列は、鼻道、気道、および / または肺内の上皮細胞で活性なプロモーターおよび / またはエンハンサーを含み得る。例えば、界面活性タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターを使用し得る。

【0031】

本明細書中で使用される場合、用語「RNAi因子」とは、細胞内に存在することにより RNAi を生じ、それにより、RNAi 因子が標的化される転写物の発現が減少する RNA 分子およびベクター（人為的に修飾されていない天然に存在する分子以外）を包含する。この用語には、詳細には、siRNA、shRNA、および RNAi ベクターが含まれる。この用語を、米国特許出願番号 60/549,070 号で使用されている、用語「RNAi 誘導物質」の同義語として使用する。

【0032】

本明細書中で使用される場合、「RNAi ベクター」とは、細胞内でのその存在によって 1 つ以上の RNA の転写を生じ、自己ハイブリダイズするか相互にハイブリダイズして shRNA または siRNA を形成するベクターである。本発明の種々の実施形態では、この用語は、細胞内でのその存在によって 1 つ以上の RNA が産生され、自己ハイブリダイズするか相互にハイブリダイズして shRNA または siRNA を形成するプラスミド（例えば、DNA ベクター（その配列がウイルス由来の配列エレメントを含み得る））、またはウイルス（人為的に修飾されていない天然に存在するウイルスまたはプラスミド以外）を包含する。一般に、ベクターは、ベクターが細胞内に存在する場合にハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして siRNA または shRNA を形成する 1 つ以上の RNA 分子が転写されるように発現シグナルに作動可能に連結された核酸を含む。したがって、ベクターは、RNA またはその前駆体の細胞内合成のためのテンプレートを含む。RNAi を媒介するために、（例えば、ウイルスエンベロープの細胞膜との融合後の）細胞中のウイルスゲノムの存在は、細胞内のウイルスの存在を構成するのに十分と見なされる。さらに、RNAi を媒介するために、ベクターは、細胞内に導入されるか、細胞に侵入するか、先祖細胞から受け継がれた場合、その後に細胞内または先祖細胞内で修飾またはプロセシングされるか否かに無関係に、細胞内に存在すると見なされる。RNAi ベクターは、細胞内のベクターの存在によって、相互にハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして転写物を標的化する siRNA または shRNA を形成する 1 つ以上の RNA 産生する場合（すなわち、細胞内のベクターの存在により、転写物を標的化する 1 つ以上の siRNA または shRNA を産生する場合）、転写物を標的化すると見なされる。RNAi ベクターを使用して、標的化される転写物を発現する細胞内で RNAi を媒介し、そして / または転写物を発現するか発現しない細胞中で siRNA 分子または shRNA 分子を産生することができる。siRNA または shRNA を、これらを産生する細胞から精製し、本明細書中に記載の任意の目的のために使用することができる。用語「RNAi ベクター」を、米国特許出願番号 60/549,070 号で使用されている、用語「RNAi 誘導ベクター」の同義語として使用する。

【0033】

「短い干渉 RNA (siRNA)」は、約 15 ~ 29 塩基対長の RNA 二重鎖部分および必要に応じてさらに 1 つまたは 2 つの一本鎖突出（例えば、一方または両方の鎖上の 3' 突出）を含む。例えば、二重鎖部分は、17 ~ 19 ヌクレオチド長であり得るか、15 と 29 との間の任意の他の部分的範囲または特定の値であり得る（例えば、19、21 ~ 23、19 ~ 23、24 ~ 27、27 ~ 29）。以下により詳細に示すように、siRNA を、一緒にハイブリダイズする 2 つの RNA 分子から形成することができるか、自己ハイブリダイズ部分を含む 1 つの RNA 分子から生成することができる。本発明の特定の実施形態によれば、siRNA 分子の遊離 5' 末端はリン酸基を有し、そして / または遊離

10

20

30

40

50

3' 末端は水酸基を有する一方で、他の実施形態によれば、遊離 5' 末端はリン酸基を欠き、そして / または遊離 3' 末端は水酸基を欠く。一般に、s i R N A 分子の遊離 5' 末端はリン酸基を有し、遊離 3' 末端は水酸基を有することが好ましい。s i R N A の二重鎖部分は、1つ以上の非対合ヌクレオチドからなる1つ以上のバルジ (bulge) を含み得るが、代表的には含まない。バルジは、例えば、以下であり得る：(i) ミスマッチ (2つの鎖が評価枠内で相補性を最大にするために相互にアラインメントされる場合、またはアラインメントした鎖中の相互の反対側の2つのヌクレオチドが非相補的である場合に起る)、(ii) 2つの鎖を評価枠内で相補性を最大にするためにアラインメントした場合に、一方の鎖が他方の鎖に関して「余剰な」ヌクレオチドを含む領域、または(iii) 上記の組み合わせ。

10

【0034】

s i R N A の一方の鎖（「アンチセンス鎖」または「ガイド鎖」ということができる）は、標的転写物とハイブリダイズする部分を含む。本発明の特定の好ましい実施形態では、s i R N A のアンチセンス鎖は、標的転写物領域と正確に相補的であり（100% 相補性）、これは、s i R N A が、1つのミスマッチまたはバルジを伴わずに標的転写物とハイブリダイズすることを意味する。本発明の他の実施形態では、s i R N A と標的転写物の標的化された部分との間に1つ以上のミスマッチが存在し得る。100% 相補性が達成されない本発明の特定の実施形態では、一般に、任意のミスマッチまたはバルジが s i R N A 末端またはその付近に位置することが好ましい。

20

【0035】

用語「短いヘアピン R N A」は、R N A i を媒介するのに十分に長い二本鎖（二重鎖）構造を形成するためにハイブリダイズするかハイブリダイズすることができる少なくとも2つの相補部分およびループを形成する代表的には約1ヌクレオチド長と10ヌクレオチド長との間の少なくとも1つの一本鎖部分を含むR N A 分子をいう。二本鎖領域は、17～19ヌクレオチド長であり得るか、15と29との間の任意の他の部分的範囲または特定の値であり得る（例えば、19、21～23、19～23、24～27、27～29）。二重鎖部分は、1つ以上の非対合ヌクレオチドからなる1つ以上のバルジを含み得るが、その必要はない。以下により詳細に示すように、s h R N A は、保存された細胞 R N A i 機構によって s i R N A にプロセシングされると考えられる。したがって、s h R N A は s i R N A の前駆体であり、一般に、標的転写物の発現を同様に阻害し得る。

30

【0036】

本明細書中で使用される場合、用語「被験体」とは、I g E が少なくとも部分的に原因因子または要因である疾患または病状の疑いがあるか罹患している任意の個体をいう。この用語は、動物（例えば、家畜（ニワトリ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコなど）、野生動物、非ヒト霊長類、およびヒト）を含む。

【0037】

R N A i 因子は、1) R N A i 因子の存在下での標的転写物の安定性が、非存在下と比較して減少する場合、そして / または 2) R N A i 因子の配列が、少なくとも約15、より好ましくは少なくとも約17、さらにより好ましくは少なくとも約18または19から約21～23ヌクレオチドのストレッチの標的転写物と少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の正確な配列相補性示す場合、そして / または 3) 薬剤の一部（例えば、s i R N A の1つの鎖または s h R N A の自己相補部分の1つ）がインビトロで小さな（50ヌクレオチド未満の）R N A 分子のハイブリダイゼーションのためのストリッジメントな条件下および / または 哺乳動物細胞の細胞質または核内で代表的に見出される条件下で標的転写物とハイブリダイズする場合に、本明細書中に記載の目的のための標的転写物を標的化すると見なされる。その細胞内での存在によって転写物を標的化する s i R N A または s h R N A が産生される R N A i ベクターも、標的転写物に標的化されると見なす。転写物の標的化効果が転写物の合成のためのテンプレートを含む遺伝子の発現を減少または阻害することであるため、転写物に標的化する R N A i 因子もその遺伝子を

40

50

標的化すると見なす。したがって、本明細書中で使用されるように、転写物を標的化する RNAi 因子は、転写物の合成のためのテンプレートを提供する遺伝子を標的化すると理解される。

【 0 0 3 8 】

本明細書中で使用される場合、「処置」とは、一般に、以下の 1 つ以上を包含し得る：このような用語を適用する疾患、障害、もしくは病状またはこのような疾患、障害、もしくは病状の 1 つ以上の症状または徵候の逆転、緩和、進行の阻害、可能性の防止もしくは減少。「予防」は、疾患、障害、病状、またはこれらの症状もしくは徵候またはこれらの重症度を悪化させないか、生じさせないことをいう。

【 0 0 3 9 】

一般に、用語「ベクター」は、細胞内への第 2 の核酸分子の侵入（例えば、導入、輸送など）を媒介することができる核酸分子をいう。導入された核酸は、一般に、ベクター核酸分子に連結（例えば、挿入）される。ベクターは、自律複製を指向する配列を含み得るか、宿主細胞 DNA に組み込まれるのに十分な配列を含み得る。有用なベクターとしては、例えば、プラスミドベクター（代表的には、DNA 分子であるが、RNA プラスミドも公知である）、コスミドベクター、およびウイルスベクターが挙げられる。当該分野で周知であるように、用語「ウイルスベクター」は、代表的には核酸分子導入または組み込みを容易にするウイルス由来の核酸エレメントを含む核酸分子（例えば、プラスミド）（例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターが挙げられる）または核酸導入を媒介するウイルスまたはウイルス粒子（例えば、レトロウイルスまたはレンチウイルスが挙げられる）のいずれかをいう。当業者に明らかなように、ウイルスベクターには、核酸に加えて、種々のウイルス成分が含まれ得る。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 4 0 】

（本発明の特定の好ましい実施形態の詳細な説明）

（ I . 概説 ）

本発明は、IgE 媒介性疾患または病状に関するか、IgE の分泌および / または IgE に対する応答に関する細胞の生存、増殖および / または少なくとも 1 つの生物学的活性に重要な発現産物をコードする 1 つ以上の遺伝子から転写された転写物を標的化する siRNA 、 shRNA および / または RNAi ベクターなどの RNAi 因子を含有する組成物を提供する。任意のこれらの転写物は、本発明の RNAi 媒介性阻害の適切な標的である。生物学的活性は、任意の細胞活性（生存、増殖、合成、分泌、脱顆粒（例えば、炎症メディエーターの）、移動、細胞 - 細胞相互作用などが挙げられるが、これらに限定されない）であり得る。

【 0 0 4 1 】

肥満細胞の IgE 媒介性脱顆粒は、アレルギー性鼻炎および喘息の両方で役割を果たす。アレルゲンへの曝露によって B 細胞が活性化され、それにより、IgE 分泌形質細胞が形成される。分泌された IgE 分子は、血液中の好塩基球上および肥満細胞上の IgE 特異的 Fc レセプターに結合する。アレルゲンへのその後の曝露に対する応答中に、肥満細胞関連 IgE 分子はアレルゲンに結合し、それにより、結合した IgE と IgE 分子が結合したレセプターとが架橋し、肥満細胞の脱顆粒が誘発される。脱顆粒は、アレルギー症状の根底にある平滑筋および血管の変化の主な原因であるヒスタミンなどのメディエーターの放出を含む。その後のメディエーターの脱顆粒および放出を伴う肥満細胞への IgE の結合多くの喘息症状の原因である。IgE 媒介性アレルギーおよび喘息の病原性の考察については、Goldsby , R. 、 Kubayy ImmunoLOGY , 第 4 版、 W . H . Freeman 、 2000 ; Umetsu , D. ら、 Nature Immunology , 3 (8) : 715 - 720 , 2002 を参照のこと。

【 0 0 4 2 】

本発明の特定の実施形態に従って、RNAi 因子を使用して、肥満細胞の少なくとも 1 つの生物学的活性を阻害するか、その数を減少させるか、これらを排除するか（例えば、

10

20

30

40

50

気道中で)、そして/またはB細胞によるIgEの産生を阻害する。生物学的活性は、生存、増殖、合成、分泌、移動、細胞-細胞相互作用などのいずれかの細胞の活性であり得るが、これらに限定されない。特定の好ましい実施形態では、生物学的活性の阻害により、肥満細胞が「不活化」され、その結果、肥満細胞は病原性効果(pathogenic effect)を発揮しない。本発明は、多数の異なるタンパク質をコードする転写物を標的化するRNAi因子およびIgE媒介性疾患(アレルギーおよび喘息が挙げられる)の処置におけるRNAi因子の使用方法を提供する。本発明の特定の好ましい実施形態を、以下に詳述する。本明細書中で考察されているIgE媒介性病状を、「IgE媒介性過敏症」または「過敏反応」ということができるが、被験体のIgEに対する応答は、高める必要がないことに留意すべきである。一般に、この用語は、アレルゲンに対する任意の望ましくないかまたは不適切な炎症反応をいうことができる。

10

【0043】

一般に、「X転写物」と記載される転写物(例えば、「CD40転写物」)は、「X遺伝子」(例えば、CD40遺伝子)(すなわち、CD40タンパク質をコードするmRNAが適切な細胞型で転写される遺伝子)から転写された転写物を意味する。転写物を特定のタンパク質を「コードする」ということができるが、RNAi因子によって標的化される転写物領域は完全に転写物のコード部分からなる必要も、その一部からなる必要もないことに留意すべきである。標的化される領域は、例えば、本発明の種々の実施形態における5'または3'非翻訳領域またはイントロンであり得る。

20

【0044】

(II.RNAiおよびRNAi因子の設計)

どのような遺伝子標的が選択されても、本発明のsiRNAまたはshRNAなどのRNAi因子の設計は、好ましくは特定の指針に従う。一般に、阻害されることが望ましい転写物に特異的な配列を標的化することが望ましい。また、多くの場合、本発明の細胞または被験体に送達される因子は、活性な抑制因子になる前に1つ以上のプロセシング工程を受け得る(さらなる考察については以下を参照のこと)。このような場合、当業者は、そのプロセシングに必要であり得る配列を含むように関連因子を設計することが好ましいと認識する。

【0045】

WO01/75164号に記載のように、小さな阻害RNAは、ショウジョウバエにおけるRNA干渉(RNAi)現象の研究で最初に発見された。特に、ショウジョウバエにおいて、長い二本鎖RNAがDicerと呼ばれるRNアーゼIII様酵素(Bernsteinら、Nature 409:363、2001)によって2つの21ヌクレオチド(nt)鎖(それぞれ5'リン酸基および3'水酸基を有し、2つのnt-3'突出に隣接する19nt二重鎖領域が存在するように他の鎖と正確に相補的な19ntの領域を含む)から構成される小さなdsRNAにプロセシングされることが見出された。図1は、ショウジョウバエで見出されたsiRNAの略図を示す。構造は、センス鎖310およびアンチセンス鎖315を含む19ヌクレオチドの二本鎖(DS)部分300を含む。各鎖は、2ntの3'突出320を有する。

30

【0046】

これらの小さなdsRNA(siRNA)は、dsRNA鎖の1つと相補的な領域を含む任意の遺伝子の発現をサイレントにするように作用し、これはおそらく、ヘリカーゼ活性がsiRNA中の19bpの二重鎖をほぐしてsiRNAの1つの鎖と標的転写物との間で別の二重鎖が形成されるためである。次いで、この新規の二重鎖は、エンドヌクレアーゼ複合体(RISC)を標的RNAに導き、1つの位置で切断して(「スライス」)、非保護RNA末端が得られる。これは、ただちに細胞機構によって分解される(図2)。下記のように、短いRNA種(ミクロRNA)によって媒介されるさらなるサイレンシング機構も公知である(例えば、Ruvkun, G.、Science, 294, 797-799、2001; Zeng, Y.ら、Molecular Cell, 9, 1-20、2002を参照のこと)。機構の考察および機構を示す図は、本発明の作用機構に対して

40

50

いかなる制限も示唆しないことを意図する。RNAiのさらなる考察は、Dykxhorn, D.ら、Nature Reviews Molecular Cell Biology、4:457-467に見出される。

【0047】

Dicer酵素のホモログがE. coliからヒトまでの範囲の多様な種に存在するという発見(Sharp, Genes Dev. 15; 485, 2001; Zamore, Nat. Struct. Biol. 8: 746, 2001)により、RNAi様機構が種々の異なる細胞型(哺乳動物細胞、さらにヒト細胞を含む)で遺伝子発現をサイレンシングすることができるという可能性が高まった。しかし、不運なことに、長いdsRNA(例えば、約30ヌクレオチドより長い二本鎖領域を有するdsRNA)は、哺乳動物細胞においてインターフェロン応答を活性化することが公知である。したがって、特異的遺伝子サイレンシングよりもむしろ、長いdsRNAの哺乳動物細胞への導入により、翻訳のインターフェロン媒介性非特異的抑制が生じると予想され、おそらく細胞が死滅する。したがって、長いdsRNAは、哺乳動物細胞中での特定の遺伝子の発現の特異的阻害に有用であると考えられる。

【0048】

しかし、siRNAは、哺乳動物細胞に導入された場合、標的遺伝子の発現を有效地に減少させることができることが見出された。同時係属中の特許出願である米国特許出願番号10/674,159号および同10/674,087号に記載のように、本発明者らは、種々の転写物(CD8などの内因性転写物およびウイルス転写物の両方が含まれる)を標的化するsiRNAおよび/またはshRNAにより、哺乳動物細胞中の標的転写物レベルが大きく減少したことを示した。本発明者らはまた、種々のRNAi因子が哺乳動物細胞、組織培養、ニワトリ胚、およびインタクトな動物(マウス)におけるインフルエンザウイルス転写物の発現を阻害することができることも示した。したがって、RNAi因子での処置は、標的転写物の発現の減少または阻害のための有効な戦略である。特に、本発明者らは、標的転写物の発現が、RNAi因子送達のための種々の送達因子および方法を使用してインタクトな生きた動物の呼吸経路(例えば、肺)中で阻害され得、それにより、喘息などの呼吸経路に影響を与える疾患および病状を処置するためのRNAi使用の実行可能性を確立し得ることを実証した。流体力学的トランسفエクションを使用せずに標的転写物の有効な阻害が達成されたことに留意すべきである。

【0049】

本発明での使用に好ましいsiRNAおよびshRNAは、15~29の間のヌクレオチド長(例えば、約19ヌクレオチド長)の塩基対合領域(二重鎖部分または二重鎖領域という)を含み、必要に応じて、遊離末端またはループ状の末端を有し得る。例えば、図3は、本発明で利用され得る種々の構造を示す。図3Aは、上記のショウジョウバエ系で活性であることが見出された構造を示し、また哺乳動物細胞で活性な種も示す。本発明は、IgE媒介疾患および病状(アレルギー性鼻炎および喘息が挙げられるが、これらに限定されない)を処置または予防するための哺乳動物細胞への図3Aに示す構造を有するsiRNAの投与を包含する。しかし、投与された因子がこの構造を有する必要はない。例えば、投与した組成物は、投与した因子がインターフェロン応答の誘導などの負の事象を生じない限り、インビボで図3Aの構造にプロセシングされ得る任意の構造を含み得る。(siRNAまたはshRNAの合成、プロセシング、または活性に関して本明細書中で使用される場合、用語「インビボ」は、一般に、無細胞系とは対照的に細胞内で起こる事象をいうことに留意すること。一般に、細胞は、組織培養中で維持され得るか、インタクトな生物の一部であり得る)。本発明はまた、本明細書中で考察されるように、このような因子の投与によって標的転写物レベルが十分に減少する限り、図3Aに示す構造に正確にプロセシングされない因子の投与を包含し得る。図3Bおよび図3Cは、本発明でRNAi因子として使用するための2つの別の構造を示す。

【0050】

図3Bおよび3Cは、RNA干渉を媒介するために使用され得るさらなる構造を示す。

10

20

30

40

50

これらのヘアピン（ステム・ループ）構造を細胞内でプロセシングして、図3Aなどに記載のsiRNA構造を得ることができる。図3Bは、相互にハイブリダイズしてステム400、ループ410、および突出320として示す二重鎖領域を形成する2つの相補部分を含むRNA分子を含む因子（shRNA）を示す。好ましくは、ステムは15～29ヌクレオチド長の間（例えば、約19nt長）であり、ループは1～20nt長、より好ましくは約4～10nt長、最も好ましくは約6～8nt長であり、そして／または突出は約1～20nt長、より好ましくは約2～15nt長である。本発明の特定の実施形態では、ステムは最小で19ヌクレオチド長であり、約29ヌクレオチド長まであり得る。当業者は、4ヌクレオチドまたはそれ以上のループはより短いループよりも立体障害を受ける可能性が低く、従って、好ましいと認識する。いくつかの実施形態では、突出は、5'・リン酸または3'・水酸基を含む。以下に考察するように、図3Bに示す構造を有する因子を、インビポまたはインビトロ転写によって容易に生成し得、いくつかの好ましい実施形態では、多くの場合突出が複数のU残基（例えば、1と5との間のU残基）を含むよう、転写物テールが突出に含められる。ループは、阻害されることが望ましい標的転写物に相補的な部分（すなわち、shRNAのアンチセンス部分）の5'または3'末端のいずれかに位置づけられ得る。

10

【0051】

図3Cは、約19bp長のステム400を形成するのに十分な相補性要素を含む環状のRNAを含む因子を示す。このような因子は、本明細書中に記載の種々の他のRNAi因子と比較して改良された安定性を示し得る。

20

【0052】

siRNAの記載では、siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖をいうことが多いの場合好都合である。以下でさらに考察するように、一般に、siRNAのセンス鎖の二重鎖部分の配列は標的転写物の標的化された部分と実質的に同一である一方で、siRNAのアンチセンス鎖はこの領域中の標的転写物と実質的に相補的である。shRNAは自己ハイブリダイズする1つのRNA分子を含むが、得られた二重鎖構造はセンス鎖およびアンチセンス鎖または部分を含むと見なされ得ることが認識される。したがって、アンチセンス鎖またはアンチセンス部分が二重鎖を形成するか形成し得る分子のセグメントであり、かつ標的転写物の標的化された部分と実質的に相補的であり、センス鎖またはセンス部分が二重鎖を形成するか形成し得る分子のセグメントであり、かつ標的転写物の標的化された部分と配列が実質的に同一である場合、shRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖またはセンス部分およびアンチセンス部分ということが本明細書中では好都合である。

30

【0053】

説明のために、以下の考察は、siRNAまたはshRNAよりもむしろsiRNAをいうことができる。しかし、当業者に明らかなように、siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖に関する教示は、一般に、対応するshRNAのステム部分のセンス部分およびアンチセンス部分に適用可能である。したがって、一般に、以下の検討を、本発明のshRNAの設計、選択、および送達にも適用する。

【0054】

図3に示す任意の構造または本明細書中に記載の任意の他の有効な構造を有する因子は、完全に天然のRNAヌクレオチドから構成され得るか、その代わりに1つ以上のヌクレオチドアナログを含み得ることが当業者に認識される。広範な種々のこのようなアナログが当該分野で公知であり、ホスホチオエートが治療用核酸の研究で最も一般的に使用されている（ホスホチオエートを利用した場合に関与する検討のいくつかの考察については、例えば、Agarwal、Biochim. Biophys. Acta 1489: 53、1999を参照のこと）。特に、本発明の特定の実施形態では、例えば、エキソヌクレアーゼによる消化を減少させるために1つ以上の遊離鎖末端にヌクレオチドアナログを含ませることによってsiRNA構造を安定化することが望ましい。1つ以上の遊離末端にデオキシヌクレオチド（例えば、デオキシチミジンなどのピリジン）を含ませることにより、この目的を果たし得る。あるいは、またはさらに、特に、siRNAの1つの鎖

40

50

(または s h R N A のステム部分の 1 つの鎖) と標的転写物との相互作用によって形成される任意のハイブリッドと比較して、ステムの安定性を増加または減少させるために 1 つ以上のヌクレオチドアナログを含ませることが望ましい。

【 0 0 5 5 】

本発明の特定の実施形態に従って、種々のヌクレオチド修飾が、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかで選択的に使用される。例えば、アンチセンス鎖で非修飾リボヌクレオチドを利用する一方で、センス鎖中のいくつかまたは全ての位置で修飾リボヌクレオチドおよび / または修飾もしくは非修飾デオキシリボヌクレオチドを使用することが好ましい。本発明の特定の実施形態に従って、s i R N A のアンチセンス鎖および / またはセンス鎖の二重鎖部分で非修飾リボヌクレオチドのみを使用する一方で、アンチセンス鎖および / またはセンス鎖の突出部は修飾リボヌクレオチドおよび / またはデオキシリボヌクレオチドを含み得る。特に、本発明の特定の実施形態に従って、同時係属中の米国特許出願番号 10 / 674,159 号に記載のように、センス鎖は、センス鎖と相補的な転写物のサイレンシングを減少または消失させる一方で、アンチセンス鎖と相補的な転写物のサイレンシングを防止する修飾を含む。

【 0 0 5 6 】

多数のヌクレオチドアナログおよびヌクレオチド修飾物が当該分野で公知であり、ハイブリダイセーションおよびヌクレアーゼ耐性などの特性に対するその効果を調査した。例えば、塩基、糖、およびヌクレオシド間結合に対する種々の修飾を、選択された位置でオリゴヌクレオチドに導入し、得られた効果を非修飾オリゴヌクレオチドと比較した。多数の修飾が、相補核酸とハイブリダイズする能力、安定性などのオリゴヌクレオチドの 1 つ以上の局面を変化させることが示された。例えば、有用な 2' 修飾としては、ハロ基、アルコキシ基およびアリルオキシ基が挙げられる。米国特許第 6,403,779 号；同第 6,399,754 号；同第 6,225,460 号；同第 6,127,533 号；同第 6,031,086 号；同第 6,005,087 号；同第 5,977,089 号およびその参考文献は、本発明の実施に有用であり得る広範な種々のヌクレオチドアナログおよび修飾物を開示している。Crooke, S. (編) 「Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications」(第 1 版)、Marcel Dekker; ISBN: 0824705661 ; 第 1 版 (2001) およびその参考文献も参照のこと。当業者が認識するように、アナログおよび修飾物は、例えば、ウイルス遺伝子の発現を有効に減少させるアナログおよび修飾物を選択するための本明細書中に記載のアッセイまたは他の適切なアッセイを使用して試験され得る。

【 0 0 5 7 】

本発明の特定の実施形態では、アナログまたは修飾物は、例えば、s i R N A の吸収性を増加させ(例えば、粘液層を通過する吸収性の増加、吸収の増加など)、血流中または細胞内での安定性を増加させ、細胞膜を通過する能力を増加させる。当業者に明らかなように、アナログまたは修飾物は、T_mを変化させることができ、それにより、s i R N A 配列と標的との間のミスマッチの耐性が増加し得る一方で、依然として有効に抑制し得る。

【 0 0 5 8 】

本発明に従って使用される有効な s i R N A 薬はヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログではない 1 つ以上の部分を含み得ることが当業者にさらに認識される。

【 0 0 5 9 】

一般に、本発明の s i R N A および s h R N A は、好ましくは、インビボでこの鎖と標的転写物との間に正確なハイブリッドを形成し得るように、標的転写物部分(標的部分)と実質的に相補的な鎖(「ガイド」鎖または「アンチセンス」鎖)を含む領域(「阻害領域」または「二重鎖領域」)を含む。本発明の特定の好ましい実施形態では、s i R N A または s h R N A のアンチセンス鎖は、標的転写物と完全に(100%)相補的であり、他の実施形態では、1 つ以上の非相補残基が、s i R N A または s h R N A アンチセンス

10

20

30

40

50

鎖および標的転写物によって形成された二重鎖内に位置する。この二重鎖の中心部分のミスマッチを回避することが好ましい（例えば、E 1 b a s h i r ら、EMBO J. 20: 6877, 2001（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。一般に、s i R N A のアンチセンス鎖は標的転写物の標的化された部分と実質的に相補的である一方で、s i R N A またはs h R N A のセンス鎖の配列はアンチセンス鎖と実質的に相補的である。したがって、代表的には、センス鎖は、標的転写物の標的化された部分と実質的に同一の部分を含む。しかし、当業者は、s i R N A またはs h R N A のアンチセンス鎖と標的部分との間に形成された二重鎖によって示された相補性パーセントは、s i R N A またはs h R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖との間に形成された二重鎖（阻害領域）によって示された相補性パーセントと同一である必要はないことを認識する。

10

【0060】

本発明の特定の好ましい実施形態では、s i R N A またはs h R N A のアンチセンス鎖は、標的転写物中のエクソン配列を含む標的部分とハイブリダイズする。イントロン配列とのハイブリダイズは排除されないが、一般に、哺乳動物細胞中で好ましくないようである。本発明の特定の好ましい実施形態では、s i R N A またはs h R N A のアンチセンス鎖は、エクソン配列と排他的にハイブリダイズする。本発明のいくつかの実施形態では、s i R N A またはs h R N A のアンチセンス鎖は、1つのエクソン中にのみ配列を含む標的部分とハイブリダイズし、他の実施形態では、標的部分は、一次転写物のスプライシングまたは他の修飾によって作製される。転写物のサイレンシングおよび分解を生じるs i R N A 鎖またはs h R N A 鎖とのハイブリダイゼーションに利用可能な任意の標的領域は、本発明に従って利用され得る。それにもかかわらず、当業者は、いくつかの例では、s i R N A またはs h R N A のハイブリダイゼーション標的として標的遺伝子転写物の特定の領域を選択することが望ましいことを認識する。例えば、分解されることが望ましくない他の転写物を共有し得る標的遺伝子転写物の分泌を回避することが望ましい場合もある。コード領域および転写物の5'末端よりもむしろ3'末端に近い領域が本発明の特定の実施形態では好ましい。

20

【0061】

s i R N A 配列およびs h R N A 配列は、種々のアプローチにしたがって選択され得る。上記のように、s i R N A およびs h R N A は、好ましくは、アンチセンス鎖と標的転写物との間にインビオでハイブリッドを形成し得るような標的転写物の一部（「標的部分」）と実質的に相補的であるか、好ましくは完全に相補的なアンチセンス鎖、およびアンチセンス鎖と実質的または完全に相補的な部分を含むセンス鎖を含む領域（「二重鎖領域」）を含む。「コア領域」とも呼ばれる二重鎖領域は3'突出を含まないが、突出はまた、存在する場合、標的転写物またはその相補物と相補的であり得ると理解される（例えば、アンチセンスs i R N A（またはs h R N A）鎖の3'突出は標的転写物と相補的であってもよく、センスs i R N A（またはs h R N A）鎖の3'突出は標的転写物中の対応するヌクレオチド（すなわち、標的部位のすぐ3'側のヌクレオチド）と同一であり得る）。s i R N A またはs h R N A のアンチセンス鎖が標的部分と完全に相補的であり、s i R N A およびs h R N A のアンチセンス鎖が二重鎖領域の形成に関与する部分内で相互に完全に相補的であることが一般に好ましいが、完全な相補性より低い相補性が許容可能であり、本発明の特定の実施形態では望ましい。標的転写物と100%未満相補的なアンチセンス鎖を含むs i R N A およびs h R N A は、R N A i を媒介し得る。さらに、コア領域内で相互に完全ではなくても相補的なアンチセンス鎖およびセンス鎖を含むs i R N A およびs h R N A もR N A i を媒介し得る。

30

【0062】

本明細書中で説明するために、s i R N A コア領域またはs h R N A コア領域の長さは、19ヌクレオチドであると推測され、19ヌクレオチド配列をN19という。しかし、コア領域は、15ヌクレオチド長～29ヌクレオチド長の範囲であり得る。代表的には、2つの各鎖の長さは、約21ヌクレオチドと約25ヌクレオチドとの間であるが、他の長さも許容可能である。代表的には、突出は、存在する場合、2ヌクレオチド長であるが、

40

50

1ヌクレオチド長または2ヌクレオチド長より長くてもよい。さらに、標的転写物と相補的なアンチセンス鎖部分が標的転写物と完全に相補的であるようにsiRNA N19阻害領域を選択されると推測されるが、上記のように、1つ以上のミスマッチが許容される。

【0063】

一般に、転写阻害経路（転写物切断経路）を介して標的転写物の発現を減少させる最大の能力を有するsiRNAが望ましい場合、二重鎖領域中のミスマッチを回避することが望ましい。しかし、下記のように、標的転写物の発現を減少させる最大能力より小さい能力を示すsiRNAまたはshRNAを選択することが望ましいか、転写抑制に関する別の経路を介して作用するsiRNAを使用することが望ましい。このような状況では、siRNAまたはshRNAの二重鎖部分に1つ以上のミスマッチを組み込むことが望ましい。本発明の特定の実施形態では、好ましくは、阻害領域中の4残基未満または約15%未満の残基がミスマッチである。本発明の特定の実施形態では、好ましくは、阻害領域内のアンチセンス鎖部分中の4残基未満または約15%未満の残基がミスマッチである。

【0064】

いくつかの場合、全アンチセンス鎖（存在する場合、3'突出を含む）が標的転写物と完全に相補的であるように、siRNA配列またはshRNA配列が選択される。突出がUU、TTまたはdTdTである場合、これは、標的化された転写物の19bp標的領域の前にAAが存在する（すなわち、標的領域のすぐ5'側の2つのヌクレオチドはAAである）ことを必要とする。同様に、全センス鎖（3'突出を含む）が標的転写物と完全に同一であるように、siRNA配列またはshRNA配列が選択され得る。突出がUU、TT、またはdTdTである場合、これは、標的化された転写物の19bpの標的領域のあとにUUが存在する（すなわち、標的転写物の標的領域のすぐ3'側の2つのヌクレオチドがUUである）ことを必要とする。しかし、突出が標的転写物と相補的または同一である必要はない。任意の所望の配列（例えば、UU）は、siRNAまたはshRNAのアンチセンスおよび/またはセンス19bpコア領域の3'末端に簡単に付加されて3'突出を生成し得る。一般に、1つ以上のピリミジン（通常、U、T、またはdT）を含む突出が利用される。siRNAまたはshRNAを化学合成する場合、UよりもむしろTを使用することがより好都合であり得るが、TよりもむしろdTの使用により、安定性が増加し得る。上記のように、突出の存在は任意であるが、存在する場合、標的配列自体のいかなる関係も有する必要はない。

【0065】

例えば、siRNAおよびshRNAは、(i)5'末端で2つのAA残基および3'末端で2つのUU残基に隣接した19nt領域（標的部分）からなる標的転写物中の23nt領域を同定し、その後、(ii)23nt領域のうちの1~21のヌクレオチドと完全に相補的なアンチセンス鎖および23nt領域のnt3~23と完全に同一のセンス鎖を有するsiRNAおよびshRNAを選択することによって選択され得る。標的転写物がmRNAである場合、cDNAのセンス鎖はcDNAがUよりもむしろTを含むこと以外はmRNAと同一であるので、siRNA配列およびshRNA配列は、mRNA配列自体よりもむしろ対応するcDNA配列を参照して選択され得ることが認識される。

【0066】

全てのsiRNAおよびshRNAが、任意の特定の標的遺伝子の発現の減少または阻害に等しく有効であるわけではなく（例えば、Hollen, T.ら、Nucleic Acid Res., 30(8):1757-1766、異なるsiRNAの多様な効果についての報告を参照のこと）、種々の検討材料を使用して、選択されたsiRNAが有効であり得る可能性を高め得る。例えば、イントロンよりもむしろエクソン内の標的部分を選択することが好ましい場合もある。一般に、標的転写物の3'末端付近の標的部分は、標的転写物の5'末端付近または中央の部分を標的する方が好ましい場合もある。siRNAは、一般に、RNAi Technical Reference & Application Guide, Dharmacaon Research, Inc., L

10

20

30

40

50

a f a y e t t e , C O 8 0 0 2 6 (R N A 試薬の供給業者) から入手可能、または D h a r m a c o n T e c h n i c a l B u l l e t i n # 0 0 3 - R e v i s i o n B 、「 siRNA Oligonucleotides for RNAi Applications 」に記載の原理にしたがって設計され得る。 R N A i T e c h n i c a l R e f e r e n c e & A p p l i c a t i o n G u i d e は、 siRN A および shRN A の設計パラメーター、合成などに関連する情報を豊富に含み、本明細書中で参考として援用される。

【 0 0 6 7 】

一般に、 3 0 % と 6 0 % との間の G C 含量を有する siRN A および shRN A を選択し、 3 つ以上の同一のヌクレオチドの文字列（例えば、 G G G 、 C C C など）を回避することが好ましい。他の転写物の阻害を回避しながら標的転写物の特異的阻害を達成するために、可能な範囲で siRN A または shRN A が送達される細胞または生物中に存在する他の配列に対して固有であるか有意な相同意を欠く配列を選択することが望ましい。提案された siRN A 配列または shRN A 配列のいずれかの鎖と相同な任意の配列を同定するための公的に利用可能なデータベース（例えば、 G e n b a n k 、 d r a f t h u m a n g e n o m e s e q u e n c e など）の検索および 1 つ以上の実質的に同一の配列が見出される siRN A または shRN A の使用の回避によってこのことが達成され得る。対応するマウス遺伝子およびヒト遺伝子中の同一または高度に保存された（例えば、 1 9 ヌクレオチドあたり 3 つ、より好ましくは 2 つ、さらにより好ましくは 1 つのヌクレオチドが異なり、最も好ましくは完全に同一である）転写物部分を標的化する siRN A または shRN A を選択することが好ましい。これにより、マウス細胞株およびマウス疾患モデル中の R N A i 因子を試験することができ、マウスにおける標的遺伝子の阻害に有効であると同定された配列もヒトにおける対応標的遺伝子の阻害に有効である可能性が増加する。

【 0 0 6 8 】

表 1 ~ 2 6 は、 F C R 鎖、 F C R 鎖、 c - K i t 、 L y n 、 S y k 、 I C O S 、 O X 4 0 L 、 C D 4 0 、 C D 8 0 、 C D 8 6 、 R e l A 、 R e l B 、 4 - 1 B B リガンド、 T L R 1 、 T L R 2 、 T L R 3 、 T L R 4 、 T L R 5 、 T L R 6 、 T L R 7 、 T L R 8 、 T L R 9 、 C D 8 3 、 S L A M 、 共通 鎖および C O X - 2 をそれぞれコードする転写物の好ましい標的部分の配列を列挙する。

【 0 0 6 9 】

本発明の特定の実施形態に従って、表に列挙された任意の配列に基づいて siRN A を設計するために、配列のヌクレオチド 1 ~ 1 9 は、 siRN A センス鎖のコア（二重鎖）領域の配列（すなわち、二重鎖形成に関与する部分）として選択される。この配列に相補的な配列が、アンチセンス鎖のために選択される。 2 n t の 3 ' 突出が、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方に付加される。本発明の特定の実施形態では、上記のように、突出は d T d T であるが、他の突出を使用され得る。本発明の特定の実施形態では、センス鎖の 3 ' 突出は、センス鎖が c D N A 配列（必要に応じて、 T が U に置換される）の 2 1 n t 部分と同一であるように、表に列挙した 1 9 ヌクレオチド配列のすぐ 3 ' 側の遺伝子中の 2 つのヌクレオチドからなる。本発明の特定の実施形態では、アンチセンス鎖の 3 ' 突出は、アンチセンス鎖が c D N A 配列の 2 1 n t 部分と相補的であるように、 1 9 ヌクレオチドセンス鎖のすぐ 5 ' 側の 2 つのヌクレオチドに相補的な遺伝子中の 2 つのヌクレオチドからなる。各配列のヌクレオチド 1 ~ 2 1 に相補的な配列が、対応するアンチセンス鎖として選択される。例えば、 c D N A 配列 F C R - 2 6 8 (T T G G T C A T T G T G A G T G C C A = 配列番号 3 1 6) に基づいて siRN A を設計するために、配列 5 ' - U U G G U C A U U G U G A G U G C C A - 3 ' (配列番号 1) が、センス鎖のコア領域として選択され、相補配列 5 ' - U G G C A C U C A C A A U G A C C A A - 3 ' (配列番号 3 1 7) がアンチセンス鎖のコア領域として選択される。 d T d T からなる 2 n t の 3 ' 突出が各鎖に付加されて、配列 5 ' - U U G G U C A U U G U G A G U G C C A d T d T - 3 ' (配列番号 3 1 8) (センス鎖) および 5 ' - U G G C A C U C A C A 50

10

20

30

40

50

A U G A C C A A d T d T - 3' (配列番号 319) (アンチセンス鎖) を生じる。

【0070】

センス鎖とアンチセンス鎖とのハイブリダイゼーションにより、19 塩基対のコア二重鎖領域を有する siRNA を生じ、各鎖は 2 ヌクレオチドの 3' OH 突出を有する。センスおよびアンチセンスの siRNA 配列は、表に列挙した各鎖から同様に得ることができる。19 nt のコア領域を使用して、センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれかまたは両方に異なる 3' 突出を有する種々の siRNA 分子が設計され得ることが認識される。一般に、本発明は、センス鎖が高度に保存されたコア領域を含み、3' 突出が変化し得る siRNA を包含する。センス鎖中の 3' 突出は、cDNA 配列中のコア領域のすぐ 3' 側に存在するヌクレオチドと対応する必要はない。アンチセンス鎖中の 3' 突出は、cDNA 配列中のコア領域のすぐ 5' 側に存在するヌクレオチドと相補的である必要はない。
10

【0071】

上記の説明に従って、表中に示す配列が使用されて、各鎖に同一の 3' 突出を有する 19 nt 二重鎖コア領域からなる構造を有さない種々の siRNA を設計し得る。例えば、突出配列は変化し得、突出の一方または両方の存在は、遺伝子発現の有効な siRNA 媒介阻害に不可欠ではない。さらに、siRNA の二重鎖部分の好ましい長さは 19 ヌクレオチドであり得るが、より長いかより短い二重鎖部分が有効であり得る。したがって、表中に示す配列にしたがって設計した siRNA は、センス鎖中に列挙したヌクレオチドのサブセットのみを含み得る。

【0072】

したがって、本発明は、表中に列挙した配列中の 19 ヌクレオチドの全部または一部を含む配列を有するセンス鎖を有する siRNA を提供する。一般に、表中に示す配列にしたがって設計した siRNA のセンス鎖の配列は、列挙した配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 17 個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは 19 個の連続したヌクレオチドを含む。一般に、表中に示す配列にしたがって設計した siRNA のアンチセンス鎖の配列は、列挙した配列の一部と完全に相補的である少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 17 個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは 19 個の連続したヌクレオチドを含む。
20

【0073】

本発明の特定の実施形態では、表中に示す配列にしたがって設計した siRNA のセンス鎖の配列は、列挙した配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 17 個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは 19 個の連続したヌクレオチドを含み、これらは、1 つのヌクレオチドが列挙した配列とは異なる。本発明の特定の実施形態では、表中に示す配列にしたがって設計した siRNA のアンチセンス鎖の配列は、1 つのヌクレオチドが異なり得ること以外は、列挙した配列の一部と完全に相補的である少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 17 個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは 19 個の連続したヌクレオチドを含む。
30

【0074】

本発明の特定の実施形態では、表中に示す配列にしたがって設計した siRNA のセンス鎖の配列は、列挙した配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 17 個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは 19 個の連続したヌクレオチドを含み、これらは、2 つまでのヌクレオチドが列挙した配列とは異なる。本発明の特定の実施形態では、表中に示す配列にしたがって設計した siRNA のアンチセンス鎖の配列は、2 つのヌクレオチドが異なり得ること以外は、列挙した配列の一部と完全に相補的である少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 17 個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは 19 個の連続したヌクレオチドを含む。
40

【0075】

本発明の特定の実施形態では、表中に示す配列にしたがって設計した siRNA のセンス鎖の配列は、列挙した配列の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド、より好ましく
50

は少なくとも 17 個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは 19 個の連続したヌクレオチドを含み、これらは、3つまでのヌクレオチドが列挙した配列とは異なる。本発明の特定の実施形態では、表中に示す配列にしたがって設計した siRNA のアンチセンス鎖の配列は、3つのヌクレオチドが異なり得ること以外は、列挙した配列の一部と完全に相補的である少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 17 個の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは 19 個の連続したヌクレオチドを含む。これらの実施形態のいずれかでは、相違は、元の配列と 1 つのヌクレオチド、または、本発明の特定の実施形態では、1つを超えるヌクレオチドの挿入、欠失、または置換であり得る。本発明は、siRNA について上記のセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する shRNA を提供する。上記の相違を有する siRNA または shRNA のアンチセンス鎖配列およびセンス鎖配列は、それぞれ列挙した配列と実質的に相補的であるか実質的に同一であると見なす。

10

20

30

40

50

【0076】

当業者は、siRNA が上記原理にしたがった融点 (T_m) 範囲および解離温度 (T_d) 範囲を示し得ると認識する。 T_m を、50 % の核酸およびその完全な相補物が溶液中で二重鎖である温度と定義し、 T_d を特定の塩濃度での温度と定義し、50 % のオリゴヌクレオチドおよびその完全なフィルター結合相補物が二重鎖である総鎖濃度は、1つの分子がフィルター上に固定される状態に関する。許容可能な T_m の代表例を、本明細書中の実施例に開示する siRNA 配列に基づいて、実験的または適切な経験もしくは理論に基づく式を使用した当該分野で周知の方法を使用して決定することができる。

【0077】

実際の T_m の 1 つの一般的な決定方法は、UV 分光光度計で温度自動調整セルを使用することである。温度を吸光度に対してプロットすると、2つのプラトーを有する S 字曲線が認められる。プラトーの間を読み取った吸光度が、 T_m に相当する。 T_d の最も簡潔な式は、以下のウォレス (Wallace) の法則である： $T_d = 2(A + T) + 4(G + C)$ (Wallace, R. B.; Shaffer, J.; Murphy, R. F.; Bonner, J.; Hirose, T.; Itakura, K., Nucleic Acids Res. 6, 3543 (1979))。固定化標的鎖の性質は、標的とプローブの両方が溶液中で遊離している場合、値に対して認められた T_m の正味の現象を提供する。減少の大きさは、約 7 ~ 8 である。1価のカチオン濃度に適切な値の範囲内で pH 5 ~ 9 の 50 ヌクレオチドより長い配列に有効な DNA についての別の有用な式は、以下である： $T_m = 81.5 + 16.6 \log M + 41(XG + XC) - 500/L - 0.62F$ 、ここで、M は 1 価カチオンのモル濃度であり、XG および XC は配列中の G および C のモル分率であり、L は二重鎖中で最も短い鎖の長さであり、F はホルムアミドのモル濃度である (Howley, P. M.; Israel, M. F.; Law, M. F.; Martin, M. A.; J. Biol. Chem. 254, 4876)。RNA についての類似の式は以下である： $T_m = 79.8 + 18.5 \log M + 58.4(XG + XC) + 11.8(XG + XC)2 - 820/L - 0.35F$ 、DNA - RNA ハイブリッドについては、 $T_m = 79.8 + 18.5 \log M + 58.4(XG + XC) + 11.8(XG + XC)2 - 820/L - 0.50F$ である。これらの式は、固定化標的ハイブリッドから導かれる。いくつかの研究により、接相互作用についての熱力学的基準を使用して T_m の正確な式が導かれている。DNA および RNA についての式は以下である： $T_m = (1000H)/A + S + R \ln(Ct/4) - 273.15 + 16.6 \ln [Na^+]$ 、ここで、H (Kcal/mol) はハイブリッドの最近接エンタルピーの変化の和であり、A (eu) は、ヘリックス開始の補正を含む定数であり、S (eu) は最近接エントロピーの変化の和であり、R は気体定数 (1.987 cal deg⁻¹ mol⁻¹) であり、Ct は鎖の総モル濃度である。鎖が自己相補性を示す場合、Ct / 4 は Ct に置換される。熱力学的パラメーターの値は、文献から利用可能である。DNA については、Breslauer ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3746 - 3750, 1986 を参照のこと。RNA : DNA 二重鎖については、

Sugimoto, N ら、 Biochemistry, 34(35):11211-6, 1995 を参照のこと。RNAについて、Freier, S. M. ら、 Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 9373-9377, 1986, Rychlik, W. ら、 Nucl. Acids Res. 18(21), 6409-6412, 1990 を参照のこと。T_mを計算するための種々のコンピュータプログラムは広範に利用可能である。例えば、URLがwww.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.htmlのウェブサイトを参照のこと。本発明の特定の実施形態に従って、好ましい siRNA は、Semizarov, D. ら、 Proc. Natl. Acad. Sci., 100(11), pp. 6347-6352 に記載の設計基準にしたがって選択される。

10

【0078】

本発明のいくつかの実施形態では、siRNA または shRNA のアンチセンス鎖は、1つ以上の 3' UTR 配列を含むか、完全に 3' UTR 内に存在する標的部位とハイブリダイズする。本発明のこのような実施形態は、siRNA / テンプレート二重鎖中に多数のミスマッチを許容し得、特に、二重鎖の中央領域内にミスマッチを許容し得る。実際、いくつかのミスマッチは、3' UTR 中での siRNA / テンプレート二重鎖形成が伝統的な RNA 阻害に関連するが、それとは異なる機構によってテンプレート転写物によってコードされるタンパク質の発現を阻害し得るので、望ましい。特に、テンプレート転写物の 3' UTR に結合する siRNA がその安定性の減少よりもむしろ転写物の翻訳を減少させることができることを示唆する証拠が存在する。例えば、標的転写物とハイブリダイズした場合、このような siRNA は、頻繁に、ミスマッチ領域によって分離された完全に相補的な 2 つのストレッチを含む。種々の構造が可能である。例えば、siRNA もしくは shRNA、および / または siRNA もしくは shRNA のアンチセンス鎖と標的転写物とによって形成される二重鎖は、完全ではない相補性の 1 つ以上の領域（例えば、ミスマッチヌクレオチド、バルジなど）を含み得る。代表的には、完全に相補的なストレッチは、少なくとも 5 ヌクレオチド長（例えば、6、7 またはそれ以上のヌクレオチド長）である一方で、ミスマッチ領域は、例えば、1、2、3 または 4 ヌクレオチド長であり得る。

20

【0079】

標的転写物に対して完全ではない相補性を示すアンチセンス鎖を含む短い二本鎖 RNA は、標的転写物の切断に加えて、または切断の代わりに、または切断の前に起こる翻訳抑制によって遺伝子発現をサイレンシングすることができる。例えば、図 4 に示すように、上記で考察したショウジョウバエ系および種々の生物でも siRNA を生成する DICER 酵素は、小さな一時的 RNA (small temporal RNA) (stRNA) 基質を、標的転写物の 3' UTR 内に結合した場合、転写物の翻訳を遮断する阻害剤にプロセシングすることもできることが公知である（図 4 を参照のこと；Grishok, A. ら、Cell 106, 23-24, 2001; Huttvagner, G. ら、Science, 293, 834-838, 2001; Ketting, R. ら、Genes Dev., 15, 2654-2659）。一般にミクロ RNA (miRNA) と呼ばれる類似の約 22 ヌクレオチドの RNA が多数の生物（哺乳動物が含まれる）で同定されており、この転写後遺伝子スプライシング機構が広範囲に及び得ることが示唆される（Lagos-Quintana, M. ら、Science, 294, 853-858, 2001; Pasquinielli, A. ら、Trends in Genetics, 18(4), 171-173, 2002 および上記の 2 つの論文中の参考文献）。ミクロ RNA は、約 4 ~ 15 nt のループおよび代表的にはシステム中に 1 つ以上のミスマッチ領域またはバルジ領域を含む約 70 nt の前駆体ヘアピン RNA として転写される。このような前駆体からプロセシングされたミクロ RNA は、哺乳動物細胞中に標的部位を含む標的転写物の翻訳を遮断することが示されているが（Zeng, Y. ら、Molecular Cell, 9, 1-20, 2002）、これらはまた、その標的を認識して RNA 切断を指向することもできる（Huttvagner, G. および Zamore, P. D. ら、Science 50

30

40

50

n c e 、 2 9 7 : 2 0 5 6 - 2 0 6 0 、 2 0 0 2 ; Z e n g , Y . ら、 M o l . C e l l 9 : 1 3 2 7 - 1 3 3 3 、 2 0 0 2) 。 A m b r o s , V . らは、 ミクロ R N A アノテーションおよび内因性 s i R N A と m i R N A との区別のための均一系を提案している (A m b r o s , V . ら、 R N A 、 : 2 7 7 - 2 7 9 、 2 0 0 3) 。 B a r t e l , D . 、 C e l l 、 1 1 6 (2) : 2 8 1 - 9 7 、 2 0 0 4 も参照のこと。

【 0 0 8 0 】

s i R N A および / または m i R N A の前駆体を模倣するために設計されたヘアピン構造は、標的転写物の発現を減少または阻害し得る分子に細胞内でプロセシングされる (M c M a n u s , M . T . ら、 R N A 、 8 : 8 4 2 - 8 5 0 、 2 0 0 2) 。 1 0 0 % 相補的な二重鎖構造を形成する 2 つの R N A 鎖からなる古典的 s i R N A に基づいたこれらのヘアピン構造を、 クラス I ヘアピンまたはクラス II ヘアピンに分類した。 クラス I ヘアピンは、 アンチセンス s i R N A 鎖 (すなわち、 インヒビターが望ましい標的転写物に相補的な鎖) の 5 ' 末端または 3 ' 末端にループが組み込まれているが、 その他の点では古典的 s i R N A と同一であった。 クラス II ヘアピンは、 ステム中の 1 つ以上のヌクレオチドミスマッチに加えて、 二重鎖のアンチセンス鎖の 3 ' 末端または 5 ' 末端のいずれかに 1 9 n t 二重鎖およびループを含むという点で m i R N A 前駆体と類似していた。 これらの分子を、 サイレンシングを媒介することができる小さな R N A 二重鎖構造に細胞内でプロセシングした。 これらは、 天然に存在する m i R N A の場合と考えられるので、 翻訳抑制よりもむしろ標的 m R N A の分解によってその効果を発揮するようであった。 完全に相補的な二重鎖構造を有するが、 そのアンチセンス鎖が標的と完全ではない相補性の二重鎖 (すなわち、 バルジを含む二重鎖) を形成する s i R N A は、 翻訳の阻害によって遺伝子発現をサイレンシングするようであった (D o e n c h , J . ら、 G e n e s & D e v . 、 1 7 : 4 3 8 - 4 4 2 、 2 0 0 3) 。

【 0 0 8 1 】

したがって、 二重鎖構造を含む R N A 分子 (その一部が標的転写物と実質的または完全に相補的である) が少なくとも 2 つの異なる機構によってサイレンシングを媒介することが明白である。 本発明の目的のために、 任意のこのよう R N A (その一部が、 分解の誘発、 翻訳の阻害、 または他の手段によって標的転写物に結合してその発現を減少させる) は、 R N A i 因子と見なされ、 本発明の実施で有用である。 本明細書中に記載の任意の組成物または方法は、 一定の R N A 構造に特異的に制限され得る。

【 0 0 8 2 】

当業者は、 本発明の R N A i 因子が、 任意の利用可能な技術 (化学合成、 インビオまたはインビトロでの酵素切断もしくは化学的切断、 またはインビオまたはインビトロでのテンプレート転写が含まれるが、 これらに限定されない) にしたがって調製され得ることを容易に認識する。 上記のように、 本発明の R N A i 因子は、 自己相補部分を含む 1 つの R N A 鎖 (s h R N A) または相互にハイブリダイズした 2 つ (またはそれ以上) の鎖 (s i R N A) として送達され得る。 例えば、 2 つの異なる 2 1 n t の R N A 鎖 (それぞれ他方に相補的な 1 9 n t 領域を含む) が生成され、 各鎖が一緒にハイブリダイズして図 3 A などに示す構造を作製し得る。

【 0 0 8 3 】

あるいは、 各鎖は、 インビトロまたはインビオのいずれかでのプロモーターからの転写によって生成され得る。 例えば、 2 つの別個の転写可能領域 (それぞれ、 他方に相補的な 1 9 n t 領域を含む 2 1 n t 転写物を生成する) を含む構築物が提供され得る。 あるいは、 図 5 に示すように 2 つの異なる転写物 (それぞれ他方と少なくとも部分的に相補的である) が生成されるように配置された、 反対のプロモーター P 1 および P 2 ならびにターミネーター t 1 および t 2 を含む 1 つの構築物が使用され得る。

【 0 0 8 4 】

別の実施形態では、 本発明の R N A i 因子 (例えば、 s h R N A) が、 例えば、 自己相補領域を含む 1 つの転写単位の転写によって 1 つの転写物として生成される。 図 6 は、 本発明の 1 つのこのよう実施形態を示す。 上記のように、 第 1 の相補領域および第 2 の相

10

20

30

40

50

補領域を含み、必要に応じてループ領域を含むテンプレートが使用される。このようなテンプレートは、プロモーター（必要に応じて他の調節エレメント）を適切に選択してインビトロまたはインビオ転写のために使用され得る。本発明は、1つ以上のs i R N A鎖またはs h R N A鎖の転写のためのテンプレートとして機能し得る遺伝子構築物を含む。

【0085】

種々の利用可能な系（T 7、S P 6、およびT 3プロモーター／ポリメラーゼ系（例えば、Promega、Clontech、New England Biolabsなどから市販されている系）が挙げられる）を使用してインビトロ転写が行われ得る。当業者に認識されるように、T 7またはT 3プロモーターの使用は、代表的には、5'末端に2つのG残基を有するs i R N A配列を必要とする一方で、S P 6プロモーターの使用は、代表的には、5'末端にGA配列を有するs i R N A配列を必要とする。ベクター（T 7、S P 6、またはT 3プロモーターを含む）は当該分野で周知であり、s i R N Aの転写を指向するように容易に修飾され得る。s i R N Aがインビトロで合成される場合、被験体へのトランスフェクションまたは送達前にハイブリダイズさせることが可能である。本発明のs i R N A組成物は完全に二本鎖（ハイブリダイズした）分子からなる必要はないと理解すべきである。例えば、s i R N A組成物は、少量の一本鎖R N Aを含み得る。これは、例えば、センスR N A鎖とアンチセンスR N A鎖との比の不均一、自己相補R N A部分の合成前の転写の終結などに起因して、ハイブリダイズした分子とハイブリダイズしていない分子との間の均衡の結果として起こり得る。一般に、好ましい組成物は、少なくとも約80%の二本鎖R N A、少なくとも約90%の二本鎖R N A、少なくとも約95%の二本鎖R N A、さらに少なくとも約99~100%の二本鎖R N Aを含む。しかし、s i R N A組成物は、十分に有効な二本鎖R N Aを含む場合、80%未満のハイブリダイズしたR N Aを含み得る。

【0086】

当業者は、本発明のs i R N A因子がインビオで生成される場合、一般に、1つ以上の転写単位の転写を介して產生されることが好ましいと認識する。一次転写物を、必要に応じて、（例えば、1つ以上の細胞酵素によって）プロセシングして、遺伝子阻害を達成する最終的な因子を生成し得る。適切なプロモーターおよび／または調節エレメントが、哺乳動物細胞中の関連する転写単位の発現を可能にするために容易に選択され得ることがさらに認識される。本発明のいくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターを使用することが望ましい場合もあり、他の実施形態では、構成的発現が望ましい場合もある。

【0087】

本発明の特定の好ましい実施形態では、1つ以上のs i R N Aまたはs h R N Aの転写単位のインビオ発現を指向するために使用されるプロモーターは、R N AポリメラーゼI I I (P o l I I I)のプロモーターである。P o l I I Iは、4~5個のT残基のストレッチ内で終結する小さな転写物の合成を指向する。U 6プロモーターまたはH 1プロモーターなどの特定のP o l I I Iプロモーターは、転写領域内にc i s活性化調節エレメント（最初に転写されたヌクレオチド以外）を必要とせず、それにより、所望のs i R N A配列が容易に選択可能であるため、本発明の特定の実施形態で好ましい。天然に存在するU 6プロモーターの場合、最初に転写されたヌクレオチドはグアノシンであり、天然に存在するH 1プロモーター場合、最初に転写されたヌクレオチドはアデニンである（例えば、Y u , J . ら、Proc . Natl . Acad . Sci . 、99(9)、6047-6052(2002)；Sui , G . ら、Proc . Natl . Acad . Sci . 、99(8)、5515-5520(2002)；P addison , P . ら、Genes and Dev . 、16、948-958(2002)；Brummelkamp , T . ら、Science 、296, 550-553(2002)；Miyagashi , M . およびT aira , K . 、Nat . Biotech . 、20、497-500(2002)；Paul , C . ら、Nat . Biotech . 、20、505-508(2002)；T usch l , T . ら、Nat . Biotech . 、20、446-448(2002)を参照のこと）。したがって、本発明の特定の実施形態では、例えば、転写がU

10

20

30

40

50

6 プロモーターによって駆動される場合、好ましい s h R N A 配列の 5' ヌクレオチドは G である。本発明の特定の他の実施形態では、例えば、転写物が H 1 プロモーターによって駆動される場合、5' ヌクレオチドは A であり得る。

【 0 0 8 8 】

本発明の特定の実施形態に従って、例えば X i a , H . ら、 N a t . B i o t e c h n o l . 、 2 0 、 p p . 1 0 0 6 - 1 0 1 0 、 2 0 0 2 に記載される R N A ポリメラーゼ I I (P o l I I) のプロモーターがまた使用され得る。これに記載されるように、ヘアピン配列が転写開始部位およびその後のポリ A 力セットと極めて近接して並列し、それにより、転写されたヘアピン中の突出が最小になるか全くなくなる構築物が使用され得る。本発明の特定の実施形態では、上記要件を満たす場合、組織特異的、細胞特異的、または誘導性 P o l I I プロモーターが使用され得る。例えば、肥満細胞特異的プロモーター、T 細胞特異的プロモーター、または B 細胞特異的プロモーターを使用することが望ましい場合もある。本明細書中に記載の特定の標的遺伝子は、このようなプロモーターを含み、その他は当該分野で公知である。

【 0 0 8 9 】

図 7 および図 8 などに示す構築物のインビオ発現は、ベクターへの構築物の導入および例えば被験体中の哺乳動物細胞へのベクターの導入によって達成され得ることが望ましいことが認識される。任意の種々のベクターが、特定の実施形態によって選択され得、呼吸経路中の 1 つ以上の細胞に構築物を送達し得るベクターを選択することが望ましい場合もある。ウイルスベクターまたは非ウイルスベクター（例えば、プラスミド）のいずれかが使用され得る。本発明は、 s i R N A および / または s h R N A の転写単位を含むベクターならびにこのようなベクターを含むか、1 つ以上の s i R N A 鎖または s h R N A 鎖の転写のテンプレートとして機能し得る発現可能な転写単位を含むように操作された細胞を含む。本発明の特定の好ましい実施形態では、本発明のベクターは、哺乳動物細胞への s i R N A または s h R N A の発現構築物の送達に適切なプラスミドまたは遺伝子治療ベクターである。このようなベクターは、喘息症状またはアレルギー症状の悪化を引き起こす疑いのある刺激物の曝露前または曝露後に被験体に投与され、これらの病状を予防または処置し得る。以下にさらに記載のように、本発明の R N A i ベクターは、任意の種々の送達因子を含む組成物中で送達され得る。

【 0 0 9 0 】

したがって、本発明は、細胞内でのその存在によって 1 つ以上の R N A が転写され、自己ハイブリダイズするか相互にハイブリダイズして s h R N A または s i R N A を形成し、細胞中で上記のタンパク質のうちの 1 つのタンパク質をコードする少なくとも 1 つの転写物の発現を阻害する種々のウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを提供する。本発明の特定の実施形態では、2 つの個別の相補 s i R N A 鎖が、2 つのプロモーター（それぞれ 1 つの s i R N A 鎖の転写を指向する（すなわち、転写が起こるように s i R N A のテンプレートに作動可能に連結する））を含む 1 つのベクターを使用して転写される。2 つのプロモーターは同一方向にあってもよく、この場合、それぞれ s i R N A 鎖の 1 つのテンプレートに作動可能に連結される。あるいは、プロモーターは、プロモーター由來の転写によって 2 つの相補 R N A 鎖が合成されるように 1 つのテンプレートに反対方向に隣接し得る。

【 0 0 9 1 】

本発明の他の実施形態では、2 つの相補領域を含む 1 つの R N A 分子（例えば、 s h R N A ）の転写を駆動するプロモーターを含むベクターが使用される。本発明の特定の実施形態では、複数のプロモーター（それぞれ 2 つの相補領域を含む 1 つの R N A 分子の転写を駆動する）を含むベクターが使用される。あるいは、1 つのプロモーターまたは複数のプロモーターのいずれかから複数の異なる s h R N A が転写され得る。種々の配置が可能である。例えば、1 つのプロモーターは、複数の自己相補領域（それぞれ、ハイブリダイズして複数のステム - ループ構造を生成し得る）を含む 1 つの R N A 転写物の合成を指向し得る。これらの構造は、例えば、 D I C E R によってインビオで切断されて、複数の異

10

20

30

40

50

なる s h R N A を生成し得る。このような転写物は、好ましくは、転写物の 3' 末端に終結シグナルを含むが、各 s h R N A 単位の間には含まないと認識される。複数の s i R N A を生成し得る 1 つの R N A は、インビボで產生される必要はないが、その代わりに、化学合成され得るか、インビトロ転写を使用して產生され得、外因的に提供し得ることも認識される。

【 0 0 9 2 】

本発明の別の実施形態では、ベクターは複数のプロモーターを含み、それらは、それぞれハイブリダイズして s h R N A を形成する自己相補 R N A 分子の合成を指向する。複数の s h R N A は全て同一の転写物を標的化し得るか、異なる転写物を標的化し得る。転写物の任意の組み合わせが標的化され得る。例えば、図 7 B を参照のこと。一般に、本発明の特定の実施形態に従って、細胞中に発現される s i R N A および / または s h R N A は、15 ~ 29 ヌクレオチド長（例えば、約 19 ヌクレオチド長）の塩基対合（二重鎖）領域を含む。

【 0 0 9 3 】

当業者は、本発明の s i R N A または s h R N A のインビボ発現が、長期間（例えば、数日より長く、好ましくは少なくとも数週間～数ヶ月、より好ましくは少なくとも 1 年またはそれ以上、おそらく、一生）にわたって s i R N A または s h R N A を產生する細胞を產生することを可能にすることをさらに認識する。

【 0 0 9 4 】

s i R N A および s h R N A を細胞内発現させるために組成物中で使用される好ましいウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターが挙げられる。例えば、頂上面 (a p i c a l s u r f a c e) からインタクトな気道上皮を有効に形質導入するフィロウイルスエンベロープタンパク質シードタイプ H I V ベクターに基づくベクターを記載している K o b i n g e r , G . P . ら、N a t B i o t e c h n o l 1 1 9 (3) : 2 2 5 - 3 0 , 2 0 0 1 を参照のこと。F U G W レンチウイルスベクターを記載している L o i s , C . ら、S c i e n c e 、2 9 5 : 8 6 8 - 8 7 2 , 2 0 0 2 年 2 月 1 日 ; S o m i a , N . ら、J . V i r o l . 7 4 (9) : 4 4 2 0 - 4 4 2 4 , 2 0 0 0 ; M i y o s h i , H . ら、S c i e n c e 2 8 3 : 6 8 2 - 6 8 6 , 1 9 9 9 ; および米国特許第 6 , 0 1 3 , 5 1 6 号も参照のこと。

【 0 0 9 5 】

本発明の特定の実施形態では、ベクターは、細胞内でのその存在によって、自己ハイブリダイズするか相互にハイブリダイズして細胞中の少なくとも 1 つの転写物の発現を阻害する s h R N A または s i R N A を形成する 1 つ以上の R N A が転写されるレンチウイルスベクターである。それを説明するために、ベクターはレンチウイルスベクターであると予想される。適切なレンチウイルスベクターは、例えば、R u b i n s o n , D . ら、N a t u r e G e n e t i c s , 第 3 3 卷、pp . 4 0 1 - 4 0 6 , 2 0 0 3 に記載されている。しかし、他のレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターも使用され得ることが理解されるべきである。本発明の種々の実施形態に従って、レンチウイルスベクターは、レンチウイルス導入プラスミドまたはレンチウイルス粒子（例えば、細胞を感染させ得るレンチウイルス）のいずれかであり得る。本発明の特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、転写によって相補領域を含む R N A が合成され、その相補領域がハイブリダイズして標的転写物を標的化する s h R N A を形成するように、プロモーターに作動可能に連結された核酸セグメントを含む。本発明の特定の実施形態に従って、s h R N A は、約 19 ヌクレオチド長の塩基対合領域を含む。本発明の特定の実施形態に従って、R N A は、自己ハイブリダイズして、ループまたは一本鎖領域によって分離された複数の塩基対合領域が得られるように、2 個を超える相補領域を含み得る。塩基対合領域は同一または異なる配列を有し得るので、1 つの転写物の同一もしくは異なる領域または異なる転写物を標的化し得る。

【 0 0 9 6 】

本発明の特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、2 つのプロモーターが反対

10

20

30

40

50

方向で隣接する核酸セグメントを含み、そのプロモーターは、核酸セグメントに作動可能に連結され、従ってプロモーターからの転写は、相互にハイブリダイズして標的転写物を標的化する siRNA を形成する 2 つの相補 RNA の合成を生じる。本発明の特定の実施形態に従って、siRNA は、約 19 ヌクレオチド長の塩基対合領域を含む。本発明の特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、少なくとも 2 つのプロモーターおよび少なくとも 2 つの核酸セグメントを含み、各プロモーターは、核酸セグメントに作動可能に連結され、従ってプロモーターからの転写は、相互にハイブリダイズして標的転写物を標的化する siRNA を形成する 2 つの相補 RNA の合成を生じる。

【 0 0 9 7 】

上記のように、レンチウイルスベクターは、レンチウイルス導入プラスミドまたは感染性レンチウイルス粒子（例えば、レンチウイルスまたはシードタイプレンチウイルス）であり得る。例えば、レンチウイルス導入プラスミド、レンチウイルス粒子、およびレンチウイルス発現系のさらなる考察については、米国特許第 6,013,516 号および参考文献 113～117 を参照のこと。当該分野で周知のように、レンチウイルスは、RNA ゲノムを有する。したがって、レンチウイルスベクターがレンチウイルス粒子（例えば、感染性レンチウイルス）である場合、ウイルスゲノムは、逆転写および第 2 の鎖合成を受けて RNA 転写のためのテンプレートを含む DNA を產生する。さらに、本明細書中でプロモーター、調節要素などの要素に対する参照がなされる場合、これらの要素の配列は本発明のレンチウイルス粒子内で RNA 形態で存在し、本発明のレンチウイルス導入プラスミド中で DNA 形態で存在すると理解されるべきである。さらに、RNA 合成のためのテンプレートがレンチウイルス粒子中に存在する RNA 「によって提供される」場合、RNA が逆転写および第 2 の鎖合成を受けて RNA 合成（転写）のためのテンプレートとして機能することができる DNA を產生しなければならないと理解すべきである。 siRNA または shRNA の合成のためのテンプレートを提供するベクターは、このような合成が起こる細胞に導入された場合に siRNA または shRNA を提供すると見なされる。

【 0 0 9 8 】

本発明の siRNA または shRNA は、任意の利用可能な方法によって細胞に導入され得る。例えば、siRNA、shRNA またはこれらをコードするベクターは、従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術によって細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、種々の当該分野で認識されている細胞への外来核酸（例えば、DNA または RNA）の導入技術（リン酸カルシウム共沈、塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラント媒介トランスフェクション、リポフェクチンなどが挙げられる）をいうことを意図する。注入またはエレクトロポレーションも使用され得る。下記のように、本発明の 1 つの局面は、siRNA または shRNA の合成のためのテンプレートを含む siRNA、shRNA およびベクター（DNA ベクターまたはウイルスベクターのどちらか）を細胞に導入するための種々の送達因子（カチオン性ポリマー、種々のペプチド分子トランスポーター（アルギニンリッチペプチド、ヒスチジンリッチペプチド、ならびにカチオン性脂質および中性脂質が挙げられる）、種々の非カチオン性ポリマー、リポソーム、炭水化物、および界面活性物質が挙げられるが、これらに限定されない）の使用を包含する。本発明はまた、以下にさらに記載されるように、例えば、送達因子への送達増強部分の付加などによる任意の種々の方法で修飾された送達薬の使用を包含する。

【 0 0 9 9 】

本発明は、本発明の RNAi 因子を含むように操作された任意の細胞を包含する。好ましくは、細胞は、哺乳動物細胞、特に、ヒトである。本発明のいくつかの実施形態では、細胞は、非ヒト生物内の非ヒト細胞である。例えば、本発明は、本発明の RNAi 因子を含むか発現するように操作されたトランスジェニック非ヒト動物を包含する。このような動物は、本発明の RNAi 因子の機能および／もしくは活性ならびに／または IgE 産生、IgE 媒介性過敏症、肥満細胞もしくは好塩基球の分解などに関与する機構の研究に有

10

20

30

40

50

用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、動物の1つ以上の細胞が導入遺伝子を含む非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラットまたはマウスなどのげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト靈長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリおよび両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、外因性DNAまたは再構成（例えば、好ましくは、トランスジェニック動物の細胞のゲノムに組み込まれているかそこで生じる内因性染色体DNAの欠失）である。導入遺伝子は、トランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織中のRNAi因子の発現のためのテンプレートとして機能するか、この発現を指向し得る。本発明の特定の実施形態に従って、トランスジェニック動物は、アレルギー性鼻炎および喘息などのIgE媒介性疾患および病状の潜在的な治療薬の試験のための動物モデル（例えば、げっ歯類、ヒツジ、または非ヒト靈長類）として多様に使用される。

10

【0100】

（I I I . 肥満細胞を阻害または不活化するためのRNAi因子および使用方法）

（（A）Fc RIサブユニットをコードする転写物を標的化するRNAi因子）

肥満細胞は、高親和性IgEレセプターFc RIを介してIgEに結合する。（例えば、肥満細胞、IgE媒介性肥満細胞脱顆粒の分子的機構、およびIgE媒介性病状における肥満細胞の役割の考察については、Goldsbury, R.ら、Kuby Immunology、第4版、W.H. Freeman、2000およびその参考文献を参照のこと）。Fc RIは、鎖、鎖、および鎖からなる。鎖はT細胞および他の細胞型によって発現されるが、鎖および鎖は、主に、マウスおよびヒトの両方において肥満細胞および好塩基球によって発現される。

20

【0101】

本発明の1つの実施形態に従って、Fc RI発現は、Fc RIの鎖または鎖をコードする転写物を標的化するRNAi因子（例えば、siRNA、shRNA、またはRNAiベクター）の送達によって阻害される。このレセプターなしでは細胞はIgEに結合することができず、それにより、アレルゲンによって活性化することができないので、このような阻害は肥満細胞を有効に安全にする（disarm）。本発明の特定の実施形態では、Fc RIの鎖および鎖をコードする転写物を標的化するRNAi因子は、個別に、または組み合わせて送達される。本発明は、Fc RIの鎖または鎖をコードする転写物を標的化するRNAi因子（例えば、shRNA、shRNA、およびRNAiベクター（例えば、プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクター））ならびに1つ以上の本発明のRNAi因子を含有する組成物（例えば、薬学的組成物）を提供する。

30

【0102】

本発明は、細胞または生物にFc RIの鎖をコードする転写物を標的化するRNAi因子を投与する工程を包含する、Fc RIの鎖の発現を阻害する方法を提供する。特に、本発明は、(i)細胞もしくは生物にFc RIの鎖をコードする転写物を標的化するsiRNAもしくはshRNAを投与する工程、または(ii)細胞もしくは生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてFc RIの鎖をコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つ以上のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を包含するFc RIの鎖の発現を阻害する方法を提供する。

40

【0103】

本発明は、さらに、細胞または生物にFc RIの鎖をコードする転写物を標的化するRNAi因子を投与する工程を包含する、Fc RIの鎖の発現を阻害する方法を提供する。特に、本発明は、(i)細胞もしくは生物にFc RIの鎖をコードする転写物を標的化するsiRNAもしくはshRNAを投与する工程、または(ii)細胞もしくは生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてFc RIの鎖をコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つ以上のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を包含するFc RIの鎖の発現を

50

阻害する方法を提供する。この方法は、IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。

【0104】

Fc RI の鎖および鎖をコードする転写物のいくつかの適切な標的部位の配列を、表1(鎖)および表2(鎖)に列挙する。特定の好ましい本発明の siRNA のセンス鎖は、表1または表2に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましい siRNA は、表1または表2に列挙した標的部位に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表1または表2に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補物(ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離された)を含む第2の部分を有する shRNA は、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。10

【0105】

((B)c-Kintをコードする転写物を標的化するRNAi因子)

肥満細胞の発生および生存は、細胞表面レセプター c-Kint の発現を必要とする(c-Kint および造血系におけるその役割の考察については、例えば、Ashman, L.K.、Int J Biochem Cell Biol. 1999年10月；31(10)：1037-51 を参照のこと)。本発明の1つの実施形態に従って、c-Kint 発現は、c-Kint をコードする転写物を標的化する siRNA の送達によって阻害される。本発明は、c-Kint をコードする転写物を標的化する RNAi 因子(例えば、shRNA、siRNA、および RNAi ベクター(例えば、プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクター))ならびに1つ以上の本発明の RNAi 因子を含有する組成物(例えば、薬学的組成物)を提供する。20

【0106】

本発明は、さらに、細胞または生物に c-Kint をコードする転写物を標的化する RNAi を投与する工程を包含する、c-Kint の発現を阻害する方法を提供する。特に、本発明は、細胞または生物に c-Kint をコードする転写物を標的化する siRNA または shRNA を投与する工程、または(iii)細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして c-Kint をコードする転写物を標的化する siRNA または shRNA を形成する1つ以上の RNA 分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程による、c-Kint の発現を阻害する方法を提供する。この方法は、IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。30

【0107】

c-Kint をコードする転写物のいくつかの適切な標的部位の配列を、表3に列挙する。特定の好ましい本発明の siRNA のセンス鎖は、表3に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましい siRNA は、表3に列挙した標的部位に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表3に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補物(ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離された)を含む第2の部分を有する shRNA が、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。

【0108】

((C)LynまたはSykをコードする転写物を標的化するRNAi因子)

上記のように、肥満細胞上の Fc RI の架橋は、細胞内シグナル伝達経路を活性化し、最終的に脱顆粒を生じる。2つの重要なシグナル伝達分子は、プロテインチロシンキナーゼ Lyn および Syk である。研究により、Lyn および Syk を欠損するマウスが肥満細胞機能を欠損することが示されている(例えば、Costello, P.ら、Oncogene, 13(12)：2595、1996; Zhang, S.ら、Mol. Cell. Biol., 22(23)：8144-8154、2002を参照のこと)。本発明者は、RNAi を使用した転写レベルまたは翻訳レベルでの Lyn または Syk の発現の阻害は、肥満細胞機能を調節し、それにより、疾患における肥満細胞の役割を軽減する強力な方法であることを認識している。本発明の1つの実施形態に従って、Lyn および /4050

または S y k の発現は、これらのタンパク質をコードする転写物を標的化する 1 つ以上の R N A i 因子の送達によって阻害される。

【 0 1 0 9 】

本発明は、 L y n または S y k の転写物を標的化する R N A i 因子 (s i R N A 、 s h R N A 、 または R N A i ベクターなど) 、各センス R N A 鎖およびアンチセンス R N A 鎖 (s i R N A) または 1 つの自己相補 s i R N A 鎖 (s h R N A) のいずれかとしての本発明の s i R N A または s h R N A を產生するための本発明の R N A i 因子およびベクター (プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクターが挙げられる) を含有する組成物 (例えば、薬学的組成物) を提供する。

【 0 1 1 0 】

本発明は、さらに、細胞または生物に L y n をコードする転写物を標的化する R N A i 因子を投与する工程を包含する、 L y n の発現を阻害する方法を提供する。特に、本発明は、細胞または生物に L y n をコードする転写物を標的化する s i R N A または s h R N A を投与する工程、または (i i) 細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして L y n をコードする転写物を標的化する s i R N A または s h R N A を形成する 1 つ以上の R N A 分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を包含する、 L y n の発現を阻害する方法を提供する。この方法は、 I g E 媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。

【 0 1 1 1 】

L y n をコードする転写物のいくつかの適切な標的部分の配列を、表 4 に列挙する。特定の好ましい本発明の s i R N A のセンス鎖は、表 4 に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましい s i R N A は、表 4 に列挙した標的部分に 100 % 相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表 4 に列挙した配列と 100 % 相補的である部分を含む第 1 の部分およびその配列が配列のステム形成相補物 (ループを形成する非関連配列によって第 1 の部分から分離された) を含む第 2 の部分を有する s h R N A は、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。

【 0 1 1 2 】

本発明は、さらに、細胞または生物に S y k をコードする転写物を標的化する R N A i 因子を投与する工程を包含する、 S y k の発現を阻害する方法を提供する。特に、本発明は、 (i) 細胞または生物に S y k をコードする転写物を標的化する s i R N A または s h R N A を投与する工程、または (i i) 細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして S y k をコードする転写物を標的化する s i R N A または s h R N A を形成する 1 つ以上の R N A 分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を包含する、 S y k の発現を阻害する方法を提供する。この方法は、 I g E 媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。

【 0 1 1 3 】

S y k をコードする転写物のいくつかの適切な標的部分の配列を、表 5 に列挙する。特定の好ましい本発明の s i R N A のセンス鎖は、表 5 に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましい s i R N A は、表 5 に列挙した標的部分に 100 % 相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表 5 に列挙した配列と 100 % 相補的である部分を含む第 1 の部分およびその配列が配列のステム形成相補物 (ループを形成する非関連配列によって第 1 の部分から分離された) を含む第 2 の部分を有する s h R N A は、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。

【 0 1 1 4 】

(I V . I g E 產生を阻害するための R N A i 因子およびその使用方法)

上記のように、血清 I g E は、肥満細胞媒介性アレルギー性鼻炎および喘息において主な役割を果たす。 I g E 分泌を生じる B 細胞抗体応答には一般的には、 T 細胞の補助が必要である。 T 細胞活性化は、代表的には、抗原提示細胞 (A P C) (樹状細胞 (D C) 、マクロファージ、および B 細胞が含まれる) による T 細胞へのアレルゲンの提示を含む。未熟な樹状細胞は、通常、体内の種々の部位 (例えば、皮膚および粘膜) における上皮の

10

20

30

40

50

下部に存在する。これらの細胞がアレルゲンに遭遇すると、アレルゲンを取り込み、流入領域リンパ節に移動し、ここで、プロセシングされたアレルゲン由来のペプチドフラグメントがT細胞に提示される。樹状細胞上のICOS（「誘導性同時刺激物質」の略語である）と呼ばれる同時刺激分子は、T細胞の誘導で重要な役割を果たし、それにより、B細胞にIgEを産生するように促し得る（例えば、Tafuri, Aら、Nature, 409: 105-9, 2001; Gonzalo, J.A.ら、Nat Immunol. 2(7): 597-604, 2001を参照のこと）。したがって、ICOS発現の非存在下では、アレルゲン刺激は、B細胞によるIgEの分泌を生じない。本発明の1つの実施形態に従って、ICOS発現は、ICOSをコードする転写物を標的化するRNAi因子（siRNA、shRNA、またはRNAiベクターなど）の送達によって阻害される。10

【0115】

したがって、本発明は、ICOS転写物を標的化するRNAi因子、各センスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖（siRNA）または1つの自己相補RNA分子（shRNA）のいずれかとしてのsiRNAおよび/またはshRNAを产生するための本発明のRNAi因子およびベクター（例えば、プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクター）を含有する組成物（例えば、薬学的組成物）を提供する。本発明は、細胞または生物にICOSをコードする転写物を標的化するRNAi因子を投与する工程を包含する、ICOSの発現を阻害する方法を提供する。特に、本発明は、（i）細胞または生物にICOSをコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAなどのRNAi因子を投与する工程、または（ii）細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてICOSをコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つ以上のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を含むRNAiベクターを投与する工程を包含する、ICOSの発現を阻害する方法を提供する。この方法は、IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。20

【0116】

ICOSをコードする転写物のいくつかの適切な標的部分の配列を、表6に列挙する。特定の好ましい本発明のsiRNAのセンス鎖は、表6に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましいsiRNAは、表6に列挙した標的部分に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表6に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補物（ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離された）を含む第2の部分を有するshRNAは、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。30

【0117】

（V. 樹状細胞およびマクロファージにおける遺伝子のRNAi阻害）

IgEの分泌を生じるB細胞抗体応答は、一般に、代表的には、2型Tヘルパー細胞（Th2）由来のT細胞の補助を必要とする。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、アレルゲン特異的記憶Th2細胞がそれ自体の活性化後のB細胞抗体応答の刺激に関与する可能性が高い。Th2細胞の活性化は、代表的には、APCによるこれらの細胞へのアレルゲンの提示を必要とする。これらのうち、樹状細胞が特に重要である。DCが抗原に遭遇すると、DCはこれらを取り込み、流入領域リンパ節に移動し、ここで、アレルゲン由来のペプチドフラグメントをT細胞に提示する。種々の遺伝子の活性化状態および発現に依存して、樹状細胞は、（ペプチド-MHC複合体として）DC提示アレルゲンを認識するT細胞を活性化または不活性化し得る。DCおよびその機能の概説については、Banchereau, J.およびSteinman, R.、Nature, 392: 245-252, 1998を参照のこと。40

【0118】

本発明は、RNAiを使用したT細胞と抗原提示細胞（例えば、樹状細胞およびマクロファージ）との間の相互作用の変化が、アレルギー性鼻炎および喘息に関与するT細胞を50

不活性化し、そして／または完全もしくは部分的に排除し、それにより治療効果を達成するためのアプローチを提供するという認識を包含する。本発明は、A P Cによる抗原提示およびT細胞活性化で役割を果たす種々のタンパク質をコードする転写物を標的化するR N A i因子（例えば、s i R N A、s h R N A、およびR N A iベクター）を提供する。これらのタンパク質およびR N A i因子を、以下にさらに詳述する。

【0119】

((A) F C R I の鎖をコードする転写物を標的化するR N A i因子)

上記のように、鎖、鎖、および鎖からなるF C R Iは、I g Eの高親和性レセプターである。肥満細胞に加えて、アトピー性鼻炎および喘息を罹患する患者由来のD C 10はまたは、これらの病状を罹患していない個体の代表的な状況と対照的に、レセプターを発現する。（例えば、N o v a k , N . ら、J C l i n . I n v e s t . 、1 1 1 (7) : 1 0 4 7 、2 0 0 3 およびその参考文献を参照のこと）。D Cによって発現したF c

R I レセプターは、鎖を欠く三量体形態である。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、D C上のF c R Iは、有効な取り込み、プロセシング、およびT細胞への提示のための抗原集中分子(a n t i g e n - f o c u s i n g m o l e c u l e)として機能し得る。鎖がI g Eに結合するので、本発明に従って、鎖をコードする転写物を標的化するR N A i因子を使用して、D Cおよび／またはマクロファージによるF c

R I 発現を阻害する。F c R Iをコードする転写物を標的化するR N A i因子は、上記で考察している。

【0120】

((B) O X 4 0 リガンド(O X 4 0 L)をコードする転写物を標的化するR N A i因子)

O X 4 0 およびO X 4 0 Lは、T細胞同時刺激（すなわち、他の細胞によるT細胞の刺激）に重要なレセプター・リガンド対である(G r a m a g l i a , I . ら、J l m m u n o l . 、1 6 1 (1 2) : 6 5 1 0 - 7 、1 9 9 8)。O X 4 0 は活性化T細胞で発現するのに対して、O X 4 0 LはD C、B細胞、小グリア細胞、および内皮細胞で発現する。アレルギー性喘息のマウスモデルでは、O X 4 0 Lは、アレルギー性炎症におけるT h 2 応答に強く関与していた(H o s h i n o , A . ら、E u r . J . I mm u n o l . 、3 3 (4) : 8 6 1 - 9 、2 0 0 3)。本発明に従って、O X 4 0 Lをコードする転写物を標的化するR N A i因子を使用して、D Cおよび／またはマクロファージによるO X 30 4 0 L発現を阻害し、それにより、これらのA P Cに対するT h 2 細胞応答を干渉する。本発明に従って、O X 4 0 Lの合成阻害に起因するT h 2 応答の減少によってI g Eの產生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

【0121】

本発明は、O X 4 0 Lをコードする転写物を標的化するR N A i因子（例えば、s i R N A、s h R N A、およびR N A iベクター）、各センスR N A鎖およびアンチセンスR N A鎖(s i R N A)または1つの自己相補R N A分子(s h R N A)のいずれかとしてのR N A i因子を产生するための本発明のR N A i因子およびベクター（プラスミドおよび遺伝子治療ベクターが挙げられる）を含有する組成物（例えば、薬学的組成物）を提供する。本発明は、O X 4 0 Lをコードする転写物を標的化するR N A i因子を投与する工程を包含する、O X 4 0 Lの発現を阻害する方法を提供する。特に、本発明は、(i)細胞または生物にO X 4 0 Lをコードする転写物を標的化するs i R N Aまたはs h R N AなどのR N A i因子を投与する工程、または(ii)細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてO X 4 0 Lをコードする転写物を標的化するs i R N Aまたはs h R N Aを形成する1つ以上のR N A分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を含むR N A iベクターを投与する工程を包含する、O X 4 0 Lの発現を阻害する方法を提供する。この方法は、I g E媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。

【0122】

O X 4 0 Lをコードする転写物のいくつかの適切な標的部分の配列を、表7に列挙する

10

20

30

40

50

。特定の好ましい本発明の siRNA のセンス鎖は、表 7 に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましい siRNA は、表 7 に列挙した標的部に 100% 相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表 7 に列挙した配列と 100% 相補的である部分を含む第 1 の部分およびその配列が配列のステム形成相補物（ループを形成する非関連配列によって第 1 の部分から分離された）を含む第 2 の部分を有する shRNA は、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。

【0123】

((C) CD40 を標的化する RNAi 因子)

CD40 発現は、APC の活性化時に誘導される。活性化された T 細胞での CD40 と CD40L (CD154) との相互作用は、T 細胞応答において非常に重要な役割を果たす (CD40 ならびにその免疫および寛容の役割に関する概説については、Curr Opin Hematol 2003 年 7 月; 10 (4): 272-8、2003 を参照のこと)。APC による CD40 発現の欠如は、寛容の誘導に十分である（例えば、通常または以前の応答に対する被験体の抗原に対する応答の欠如または有意な減少）。本発明に従って、CD40 転写物を標的化する 1 つ以上の RNAi 因子を使用して、DC および / またはマクロファージによる CD40 発現を阻害し、それにより、これらの APC に対する Th2 細胞応答を妨害する。Th2 応答の減少により、IgE の産生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

【0124】

本発明は、CD40 をコードする転写物を標的化する RNAi 因子 (siRNA、shRNA および RNAi ベクターが挙げられる)、各センス RNA 鎖およびアンチセンス RNA 鎖として siRNA を產生するか、1 つの自己相補 RNA 分子として shRNA を產生するための本発明の siRNA、shRNA、およびベクター（プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクターが挙げられる）を含有する薬学的組成物を提供する。本発明は、細胞または生物に CD40 をコードする転写物を標的化する RNAi 因子を投与する工程を包含する、CD40 の発現を阻害する方法を提供する。特に、本発明は、(i) 細胞または生物に CD40 をコードする転写物を標的化する siRNA または shRNA を投与する工程、または (ii) 細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして CD40 転写物を標的化する siRNA または shRNA を形成する 1 つ以上の RNA 分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を包含する、CD40 の発現を阻害する方法を提供する。この方法は、IgE 媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。

【0125】

CD40 をコードする遺伝子のいくつかの適切な標的部の配列を、表 8 に列挙する。特定の好ましい本発明の siRNA のセンス鎖は、表 8 に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましい siRNA は、表 8 に列挙した標的部に 100% 相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表 8 に列挙した配列と 100% 相補的である部分を含む第 1 の部分およびその配列が配列のステム形成相補物（ループを形成する非関連配列によって第 1 の部分から分離された）を含む第 2 の部分を有する shRNA は、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。

【0126】

((D) CD80 および CD86 を標的化する RNAi 因子)

CD80 および CD86 は、T 細胞活性化において非常に重要な役割を果たす同時刺激分子である。これらは、T 細胞上で発現する CD28 および CTLA4 と相互作用する。本発明に従って、CD80 または CD86 をコードする転写物を標的化する RNAi 因子を使用して、DC および / またはマクロファージによる CD80 および / または CD86 の発現を阻害し、それにより、これらの APC に対する Th2 細胞応答を妨害する。Th2 応答の減少により、IgE の産生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

【0127】

10

20

30

40

50

本発明は、CD80またはCD86をコードする転写物を標的化するRNAi因子（例えば、siRNA、shRNA、およびRNAiベクター）、各センスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖（siRNA）または1つの自己相補RNA分子（shRNA）のいずれかとしてのRNAi因子を产生するための本発明のRNAi因子およびベクター（プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクターが挙げられる）を含有する組成物（例えば、薬学的組成物）を提供する。本発明は、細胞または生物にCD80を標的化するRNAi因子を投与する工程を包含する、CD80の発現を阻害する方法をさらに提供する。特に、本発明は、（i）細胞または生物にCD80をコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを投与する工程、または（ii）細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてCD80をコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つ以上のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を包含する、CD80の発現を阻害する方法を提供する。この方法は、IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。本発明は、細胞または生物に、CD86を標的化するRNAi因子を投与する工程を包含する、CD86の発現を阻害する方法をさらに提供する。特に、本発明は、（i）細胞または生物にCD86をコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを投与する工程、または（ii）細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてCD86をコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つ以上のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を包含する、CD86の発現を阻害する方法を提供する。この方法は、IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。本発明の特定の実施形態に従って、CD80およびCD86を標的化するRNAi因子は、個別または組み合わせて投与される。

10

20

30

40

50

【0128】

CD80またはCD86をコードする転写物のいくつかの適切な標的部分の配列を、表9および表10に列挙する。特定の好ましい本発明のsiRNAのセンス鎖は、表9および表10に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましいsiRNAは、表9または表10に列挙した標的部分に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表9または表10に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補物（ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離された）を含む第2の部分を有するshRNAは、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。

【0129】

（（E）Relファミリーメンバーを標的化するRNAi因子）

転写因子のNF-Bファミリーは、活性化DCおよびマクロファージ中で誘導される（Granellei-Piperno, A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(24) : 10944、1995）。NF-Bは、5つのファミリーのメンバー：p50、p52、RelA(p65)、c-RelおよびRelBからなる。RelB/p50ヘテロ二量体は、APC機能の増加およびCD40のアップレギュレーションに関連する。DCにおけるRelBの欠損により、自己免疫応答が抑制され得る。（Valero, R.ら、J. Immunol. 169(1) : 185-92、2002）。本発明に従って、RelBをコードする転写物を標的化するsiRNAを使用して、DCおよび/またはマクロファージによるRelB発現を阻害し、それにより、これらのAPCに対するTh2細胞応答を妨害する。Th2応答の減少により、IgEの産生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

【0130】

本発明は、RelAまたはRelBをコードする転写物を標的化するRNAi因子（siRNA、shRNA、およびRNAiベクターが挙げられる）、各センスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖（siRNA）または1つの自己相補RNA分子（shRNA）としてこれらを产生するための本発明のRNAi因子およびベクター（プラスミド、ウイ

ルスペクター、遺伝子治療ベクターが挙げられる)を含有する組成物(例えば、薬学的組成物)を提供する。本発明は、さらに、(i)細胞または生物にRe1AまたはRe1Bをコードする転写物を標的化するRNAi因子(例えば、siRNAまたはshRNA)を投与する工程、または(ii)細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてRe1AまたはRe1Bをコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つ以上のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を包含する、Re1Bの発現を阻害する方法を提供する。この方法は、IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。

【0131】

Re1AまたはRe1Bをコードする遺伝子のいくつかの適切な標的部分の配列を、表11および表12に列挙する。特定の好ましい本発明のsiRNAのセンス鎖は、表11または表12に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましいsiRNAは、表11または表12に列挙した標的部分に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表11または表12に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補物(ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離された)を含む第2の部分を有するshRNAは、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。

【0132】

((F)4-1 BBリガンドを標的化するRNAi因子)

4-1 BBと4-1 BBリガンドとは、T細胞同時刺激のための別のレセプター-リガンド対である。4-1 BBは、活性化T細胞中で発現されるのに対して、4-1 BBリガンドは病原体と遭遇した場合にDC中で発現される。(4-1 BBおよび他の同時刺激分子の役割の概説については、Croft, M.、Cytokine Growth Factor Rev.、2003年6月-8月；14(3-4)：265-73、2003およびその参考文献を参照のこと。またKwon, B.ら、Trends Immunol.、23(8)：378-80、2002を参照のこと)。本発明に従って、4-1 BBリガンドをコードする転写物を標的化するRNAi因子を使用して、DCおよび/またはマクロファージによる4-1 BBリガンド発現を阻害し、それにより、これらのAPCに対するTh2細胞応答を妨害する。Th2応答の減少により、IgEの産生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

【0133】

本発明は、4-1 BBリガンドをコードする転写物を標的化するRNAi因子(siRNA、shRNA、およびRNAiベクターなど)、各センスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖(siRNA)または1つの自己相補RNA分子(shRNA)としてこれらを產生するための本発明のRNAi因子およびベクター(プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクターが挙げられる)を含有する組成物(例えば、薬学的組成物)を提供する。本発明は、さらに、(i)細胞または生物に4-1 BBリガンドをコードする転写物を標的化するRNAi因子(例えば、siRNAまたはshRNA)を投与する工程、または(ii)細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして4-1 BBリガンドをコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つ以上のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を包含する、4-1 BBリガンドの発現を阻害する方法を提供する。この方法は、IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。

【0134】

4-1 BBリガンドをコードする遺伝子のいくつかの適切な標的部分の配列を、表13に列挙する。特定の好ましい本発明のsiRNAのセンス鎖は、表13に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましいsiRNAは、表13に列挙した標的部分に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表13に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補物(ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離された)を含む第2の部分を有す

10

20

30

40

50

る s h R N A は、本明細書中に記載のように容易に設計され得る。

【 0 1 3 5 】

((G) T o l 1 様レセプターを標的化する R N A i 因子)

T o l 1 様レセプターは、免疫応答の開始で役割を果たすパターン認識レセプターである。概説については、D a b b a g h K および L e w i s D B . 、 C u r r O p i n I n f e c t D i s , 1 6 (3) : 1 9 9 - 2 0 4 , 2 0 0 3 、ならびに L i e n , E . 、 A n n A l l e r g y A s t h m a I m m u n o l . , 8 8 (6) : 5 4 3 - 7 , 2 0 0 2 、およびその参考文献を参照のこと。本発明に従って、T o l 1 様レセプターをコードする転写物を標的化する R N A i 因子を使用して、D C および / またはマクロファージによるこれらのレセプター発現を阻害し、それにより、これらのA P C に対する T h 2 細胞応答を妨害する。T h 2 応答の減少により、I g E の產生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

10

【 0 1 3 6 】

本発明は、T o l 1 様レセプターをコードする転写物を標的化する R N A i 因子 (s i R N A および s h R N A など) 、本発明の R N A i 因子を含む組成物 (例えば、薬学的組成物) 、ならびに個々のセンス R N A 鎖およびアンチセンス R N A 鎖 (s i R N A) または 1 つの自己相補性 R N A 分子 (s h R N A) のいずれかとして生じるベクター (プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクターが含まれる) を提供する。本発明は、さらに、(i) 細胞または生物に T o l 1 様レセプターをコードする転写物を標的化する R N A i 因子 (例えば、 s i R N A または s h R N A) を投与する工程、あるいは (i i) 細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして T o l 1 様レセプター転写物を標的化する s i R N A または s h R N A を形成する、1 つまたは複数の R N A 分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を含む、T o l 1 様レセプターの発現を阻害する方法を提供する。この方法は、I g E 媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状の予防および処置に有用である。

20

【 0 1 3 7 】

F c R I の 鎖および 鎖をコードする遺伝子のいくつかの適切な標的部分の配列を、表 1 4 ~ 2 2 に列挙する。特定の好ましい本発明の s i R N A のセンス鎖は、表 1 4 ~ 2 2 に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましい s i R N A は、表 1 4 ~ 2 2 に列挙した標的部分に 1 0 0 % 相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表 1 4 ~ 2 2 に列挙した配列と 1 0 0 % 相補的である部分を含む第 1 の部分およびその配列が配列のステム形成相補体 (ループを形成する非関連配列によって第 1 の部分から分離される) を含む第 2 の部分を有する s h R N A を、本明細書中の他の箇所に記載のように容易に設計することができる。

30

【 0 1 3 8 】

本発明はまた、T o l 1 様レセプターの活性化を含む経路の活性が起こる種々の他の病状の処置のための本発明の R N A i 因子の使用を含む。このような病状には、敗血症、ショック、および熱傷関連損傷が含まれる。T o l 1 様レセプター 4 (T L R 4) (哺乳動物内毒素レセプターの重要なエレメント) の変異体形態を発現するか T o l 1 様レセプター 4 を発現しないマウスは、熱傷後心筋収縮不全に耐性であることが示されている (T h o m a s J A ら , A m J P h y s i o l H e a r t C i r c P h y s i o l . , 2 8 3 (4) : H 1 6 4 5 - 5 5 , 2 0 0 2) 。敗血症性ショックにおける T o l 1 様レセプターの役割を考察する概説については、C r i s t o f a r o P および O p a l S M , E x p e r t O p i n T h e r T a r g e t s , 7 (5) : 6 0 3 - 1 2 , 2 0 0 3 およびその参考文献を参照のこと。本発明は、(i) 敗血症、ショック、または熱傷関連損傷の処置を必要とする被験体を提供する工程と、(i i) 上記被験体に T o l 1 様レセプターを標的化する R N A i 因子を含む組成物を投与する工程とを含む、敗血症、ショック、または熱傷関連損傷の処置方法を提供する。本発明の特定の実施形態では、T o l 1 様レセプターは T L R 4 である。本発明の特定の実施形態では、熱傷関連損傷は、心筋損傷 (例えば、虚血 / 再灌流傷害、心筋細胞アポトーシスなど) である。本

40

50

発明のRNAi因子を、本明細書中に記載の任意の方法および／またはカテーテル（例えば、心臓への直接送達用）を使用して送達することができる。

【0139】

((H) CD83を標的化するRNAi因子)

CD83は、DC成熟時にCD80およびCD86などの同時刺激分子を強力に上方制御する。CD80およびその機能の概説については、Lechmann M.ら, Trends Immunol. 23(6):273-5, 2002を参照のこと。DC媒介性T細胞増殖は、可溶性CD83によって完全に阻害される(Lechmann M.ら, J Exp Med., 194(12):1813-21, 2001)。本発明によれば、CD83をコードする転写物を標的化するRNAi因子は、DCによるCD83発現を阻害し、それにより、これらのAPCに対するTh2細胞応答を妨害するために使用される。Th2応答の減少により、IgEの産生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

【0140】

本発明は、CD83をコードする転写物を標的化するRNAi因子(siRNA, shRNA、およびRNAiベクターなど)、本発明のRNAi因子を含む組成物(例えば、薬学的組成物)、ならびに個々のセンスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖(siRNA)または1つの自己相補性RNA分子(shRNA)のいずれかとして生じるベクター(プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクターが含まれる)を提供する。本発明は、さらに、(i)細胞または生物にCD83をコードする転写物を標的化するRNAi因子(siRNAまたはshRNAなど)を投与する工程、または(ii)細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてCD83をコードする転写物に標的化されるsiRNAまたはshRNAを形成する、1つまたは複数のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を含む、CD83の発現を阻害する方法を提供する。本発明の特定の実施形態では、CD83をコードする転写物を標的化するRNAi因子を、CD80および／またはCD86をコードする転写物を標的化するRNAi因子と共に送達する。

【0141】

CD83をコードする転写物のいくつかの適切な標的部分の配列を、表23に列挙する。特定の好ましい本発明のsiRNAのセンス鎖は、表23に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましいsiRNAは、表23に列挙した標的部分に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表23に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補体(ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離される)を含む第2の部分を有するshRNAを、本明細書中に記載のように容易に設計することができる。

【0142】

((I) SLAMに標的化されるRNAi因子)

シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAM)は、活性化DC上に発現し、T細胞による炎症性サイトカインの産生を直接増大させる。SLAMおよび免疫系でのその役割についての概説は、Veillette A.およびLatour S., Curr Opin Immunol. 15(3):277-85, 2003を参照のこと。本発明により、SLAMをコードする転写物転写物を標的化するsiRNAを使用して、DCおよび／またはマクロファージによるSLAM発現を阻害し、それにより、これらのAPCに対するTh2細胞応答を妨害する。Th2応答の減少により、IgEの産生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

【0143】

本発明は、SLAMをコードする転写物を標的化するRNAi因子(siRNA, shRNA、およびRNAiベクターが含まれる)、本発明のRNAi因子を含む組成物(例えば、薬学的組成物)、ならびに個々のセンスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖(siRNA)または1つの自己相補性RNA分子(shRNA)のいずれかとして生じるベ

10

20

20

30

40

50

クター（プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクターが含まれる）を提供する。本発明は、さらに、（i）細胞または生物にSLAMをコードする転写物を標的化するRNAi因子（siRNAまたはshRNAなど）を投与する工程、または（ii）細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてSLAMをコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つまたは複数のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を含む、SLAMの発現を阻害する方法を提供する。

【0144】

SLAMをコードする転写物のいくつかの適切な標的部分の配列を、表24に列挙する。特定の好ましい本発明のsiRNAのセンス鎖は、表24に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましいsiRNAは、表24に列挙した標的部分に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表24に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補体（ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離される）を含む第2の部分を有するshRNAを、本明細書中の他の箇所に記載のように容易に設計することができる。

10

【0145】

（（J）共通鎖を標的化するRNAi因子）

DCの活性化により、IL-2R、IL-4R、IL-7R、およびIL-15Rが誘導される。これらのレセプターの発現は、DCの生存および機能に重要であり得る。これらのレセプターは全て共通鎖を含む。本発明によれば、共通鎖（c）を標的化するsiRNAの送達によってこれらのレセプターの発現が同時に阻害され、それにより、DCの生存および機能を妨害する。Th2応答の減少により、IgEの産生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

20

【0146】

本発明は、共通鎖をコードする転写物を標的化するRNAi因子（siRNA、shRNA、およびRNAiベクターが含まれる）、本発明のRNAi因子を含む組成物（例えば、薬学的組成物）、ならびに個々のセンスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖（siRNA）または1つの自己相補性RNA分子（shRNA）のいずれかとして生じるベクター（プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクターが含まれる）を提供する。本発明は、さらに、（i）細胞または生物に共通鎖をコードする転写物を標的化するRNAi因子（siRNAまたはshRNAなど）を投与する工程、または（ii）細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズして共通鎖をコードする転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つまたは複数のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を含む、共通鎖の発現を阻害する方法を提供する。

30

【0147】

共通鎖をコードする遺伝子のいくつかの適切な標的部分の配列を、表25に列挙する。特定の好ましい本発明のsiRNAのセンス鎖は、表25に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましいsiRNAは、表25に列挙した標的部分に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表25に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補体（ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離される）を含む第2の部分を有するshRNAを、本明細書中の他の箇所に記載のように容易に設計することができる。

40

【0148】

（（K）シクロオキシゲナーゼ2を標的化するRNAi因子）

プロスタグランジンHシンターゼ（PGHS）としても公知のシクロオキシゲナーゼ-2は、アラキドン酸からプロスタノイドへの変換のための律速酵素である。COX-2の誘導体および調節は、多数の炎症性障害の病態生理学的プロセスにおける重要な要素であり、喘息の病因において重要な役割を果たし得る。COX-2欠損マウスは、アレルギー性肺応答の減少を示すと考えられる。COX-2は、活性化DCにおいて誘導される。本

50

発明により、COX-2をコードする転写物を標的化するRNAi因子を使用して、DCおよび/またはマクロファージによるCOX-2発現を阻害し、それにより、これらのAPCに対するTh2細胞応答を妨害する。Th2応答の減少により、IgEの産生が減少し、それにより、肥満細胞の脱顆粒が減少して治療効果が得られる。

【0149】

本発明は、COX-2をコードする転写物を標的化するRNAi因子(siRNA、shRNA、およびRNAiベクターが含まれる)、本発明のRNAi因子を含む組成物(例えば、薬学的組成物)、ならびに個々のセンスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖(siRNA)または1つの自己相補性RNA分子(shRNA)のいずれかとして生じるベクター(プラスミド、ウイルスベクター、遺伝子治療ベクターが含まれる)を提供する。10 本発明は、さらに、(i)細胞または生物にCOX-2をコードする転写物を標的化するRNAi因子(siRNAまたはshRNAなど)を投与する工程、または(ii)細胞または生物に、ハイブリダイズするか自己ハイブリダイズしてCOX-2転写物を標的化するsiRNAまたはshRNAを形成する1つまたは複数のRNA分子の転写のためのテンプレートを含む核酸を投与する工程を含む、共通鎖の発現を阻害する方法を提供する。

【0150】

COX-2をコードする転写物のいくつかの適切な標的部分の配列を、表26に列挙する。特定の好ましい本発明のsiRNAのセンス鎖は、表26に列挙した配列を有する部分を含む。特定の好ましいsiRNAは、表26に列挙した標的部分に100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。その配列が表26に列挙した配列と100%相補的である部分を含む第1の部分およびその配列が配列のステム形成相補体(ループを形成する非関連配列によって第1の部分から分離される)を含む第2の部分を有するshRNAを、本明細書中に記載のように容易に設計することができる。20

【0151】

(V I . 配列)

表1~26は、それぞれ、FCR鎖、FCR鎖、c-Kit、Lyn、Syk、ICOS、OX40L、CD40、CD80、CD86、RelA、RelB、4-1BBリガンド、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、CD83、SLAM、共通鎖、およびCOX-2をコードする転写物の好ましい標的部分の配列を列挙する。好ましいsiRNAおよびshRNAは、表1~26に列挙した配列と実質的または100%相補的である部分を含むアンチセンス鎖を含む。特定の好ましいsiRNAおよびshRNAのセンス鎖の配列は、表1~26に列挙した配列と同一である部分を含む。センス鎖配列を、ゲノム中に存在する配列に照らして5'~3'方向に列挙する(ゲノム配列は、UよりもむしろTを含む)。30

【0152】

各表は、ヒト遺伝子発現の阻害に適切な配列および対応するマウス遺伝子発現の阻害に適切な配列を含む。多くの場合、配列は、同一であるか非常に類似している。配列名の前に置かれた文字「H」は、配列がヒト遺伝子を標的化することを示す一方で、他の配列はマウス配列を標的化する。例えば、FCR-268は、FCRをコードするマウスmRNA中の268位から286位までの範囲(268位および286位の両方を含む)の配列を示す。HFCR-338は、ヒト遺伝子中の338位から356位までの範囲(スクレオチド338および356の両方を含む)の配列を示す。表は、ヒトおよびマウスマRNAのGenbank登録番号を含む。40

【0153】

【表1】

表1—FcεRα標的部部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号 : NM_010184.1)	
FcεRα-268	UUGGUCAUUGUGAGUGCCA	(配列番号 1)
FcεRα-290	CAAGACAGUGGAAAAUACA	(配列番号 2)
FcεRα-310	AUGUCAGAAGCAAGGAUUG	(配列番号 3)
FcεRα-413	UCCUUUGACAUCAUCAGAUGC	(配列番号 4)
FcεRα-456	GCAAGGUGAUCUACUACAG	(配列番号 5)
FcεRα-673	GAUUCUGUUUGCUGUGGAC	(配列番号 6)
FcεRα-738	GAGAUUCAGAAGACUGGAA	(配列番号 7)
FcεRα-914	CAGGAAUUGCAUAAAUGCU	(配列番号 8)
ヒト配列	(Genbank 登録番号 : NM_002001.1)	
HFcεRα-338	GAAUAUUGUGAAUGCCAAA	(配列番号 9)
HFcεRα-360	GAAGACAGUGGAGAAUACA	(配列番号 10)
HFcεRα-380	AUGUCAGCACCAACAAGUU	(配列番号 11)
HFcεRα-487	UCUUCCUCAGGUGCCAUGG	(配列番号 12)
HFcεRα-515	CUGGGAUGUGUACAAGGUG	(配列番号 13)
HFcεRα-743	GAUUCUGUUUGCUGUGGAC	(配列番号 14)
HFcεRα-818	AACCAGGAAAGGCUUCAGA	(配列番号 15)
HFcεRα-974	CGUCUGUGCUCAAGGAUUU	(配列番号 16)

【0154】

【表2】

表2—FcεRβ標的部部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

30

マウス配列	(Genbank 登録番号 : J05019.1)	
FcεRβ-206	GAUAUGCCUUUGUUUUGGA	(配列番号 17)
FcεRβ-677	UUACAGUGAGUUGGAAGAC	(配列番号 18)
ヒト配列	(Genbank 登録番号 : NM_000139.2)	
HFcεRβ-310	GAUAUGCCUUUGUUUUGGA	(配列番号 19)
HFcεRβ-784	UUACAGUGAGUUGGAAGAC	(配列番号 20)

40

【0155】

【表3-1】

表3-c-Kit-t 標的部部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	:	Y00864.1)
c-Kit-356	GUUUGUUAGAGAUCCUGCC	(配列番号	21)
c-Kit-885	GAUUCUGGAGUGUUCAUGU	(配列番号	22)
c-Kit-924	GGAUCAGCAAUUGUCACAA	(配列番号	23)
c-Kit-1267	CAAAACCAGAAAUCUGAC	(配列番号	24)
c-Kit-1517	CAACGAUGUGGGCAAGAGU	(配列番号	25)
c-Kit-1704	CGAGGAGAUAAAUGGAAAC	(配列番号	26)
c-Kit-1746	CAACUUCCUUAUGAUCACA	(配列番号	27)
c-Kit-1767	UGGGAGUUUCCAGAAACA	(配列番号	28)
c-Kit-2020	CCCUGGUCAUUACAGAAUA	(配列番号	29)
c-Kit-2041	GUUGCUALUGGUGAUCUUUU	(配列番号	30)
c-Kit-2366	UCCUCGCCUCCAAGAAUUG	(配列番号	31)
c-Kit-2388	UUCACAGAGACUJUGGCAGC	(配列番号	32)
c-Kit-2430	CGGAUCACAAAGAUUUGCG	(配列番号	33)
c-Kit-2457	CUAGCCAGAGACAUCAGGA	(配列番号	34)
c-Kit-2517	GUGAAGUGGAUGGCACCAG	(配列番号	35)
c-Kit-2574	GUCUGGUCCUAUGGGAUUU	(配列番号	36)
c-Kit-2669	UCAAGGAAGGCUUCCGGAU	(配列番号	37)
c-Kit-2727	UCAUGAAGACUUGCUGGGA	(配列番号	38)
c-Kit-4518	UUCAGGUUAUGUUGGCCUUUA	(配列番号	39)

【0156】

【表3-2】

c-Kit-5075 ACUGUUGACAGUUCUGAAG (配列番号 40)

<u>ヒト配列</u>	(Genbank 登録番号 : X06182.1)	
Hc-kit-346	GUUUGUUAGAGAUCCUGCC	(配列番号 41)
Hc-kit-812	GGUGACUUCAAUUAUGAAC	(配列番号 42)
Hc-kit-869	GAUUCUGGAGUGUUCAUGU	(配列番号 43)
Hc-kit-908	GGAUCAGCAAAUGUCACAA	(配列番号 44)
Hc-kit-1251	CAAAACCAGAAAUCUGAC	(配列番号 45)
Hc-kit-1501	UACAAACGAUGUGGGCAAGA	(配列番号 46)
Hc-kit-1700	GAGGAGAUAAAUGGAAACA	(配列番号 47)
Hc-kit-1742	CAACUCCUUAUGAUCACA	(配列番号 48)
Hc-kit-1763	AAUGGGAGUUUCCAGAAA	(配列番号 49)
Hc-kit-2016	CCCUGGUCAUUACAGAAUA	(配列番号 50)
Hc-kit-2037	UUGUUGCUAUGGUGAUCUU	(配列番号 51)
Hc-kit-2365	UUCCUCGCCUCCAAGAAUU	(配列番号 52)
Hc-kit-2387	UUCACAGAGACUUGGCAGC	(配列番号 53)
Hc-kit-2429	CGGAUCACAAAGAUUUGUG	(配列番号 54)
Hc-kit-2456	CUAGCCAGAGACAUCAAGA	(配列番号 55)
Hc-kit-2516	UGUGAAGUGGAUGGCACCU	(配列番号 56)
Hc-kit-2573	GUCUGGUCCUAUGGGAUUU	(配列番号 57)
Hc-kit-2668	AUCAAGGAAGGCUUCCGGA	(配列番号 58)
Hc-kit-2726	UAAUGAAGACUUGCUGGGA	(配列番号 59)
Hc-kit-4512	GAUUCAGGUAUGUUGCCUU	(配列番号 60)
Hc-kit-5061	UGUUGACAGUUCUGAAGAA	(配列番号 61)

【0 1 5 7】

【表4】

表4-Lyn 標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号 : M57696.1)	
Lyn-140	GAAGACUCAACCAGUACGU	(配列番号 62)
Lyn-172	CUAUUAUGUGAGAGAUCC	(配列番号 63)
Lyn-196	GUCCAAUAAAACAGCAAAGG	(配列番号 64)
Lyn-259	AAGAUCCAGAGGAACAAGG	(配列番号 65)
Lyn-626	GCACUACAAAAUUAGAAGU	(配列番号 66)
Lyn-777	CAGAAGCCAUGGGAUAAAG	(配列番号 67)
Lyn-864	GUCUGGAUGGGUUACUAUA	(配列番号 68)
Lyn-954	GCCAACCUCAUAGAAGACCU	(配列番号 69)
Lyn-1058	UAGUUUGCUGGAUUUCCUC	(配列番号 70)
Lyn-1154	UACAUUCGAGCGGAAGAACU	(配列番号 71)
Lyn-1271	GUACACAGCAAGGGAAGGU	(配列番号 72)
Lyn-1388	GAUUGUCACCUAUGGGAAAG	(配列番号 73)
Lyn-1408	UUCCUACCCAGGGAGAAC	(配列番号 74)
Lyn-1477	UGGAGAACUGCCCCAGAUGA	(配列番号 75)
 ヒト配列 (Genbank 登録番号 : M16038.1)		
HLyn-352	GAAGACUCAACCAGUACGU	(配列番号 76)
HLyn-384	CUAUUAUGUGAGAGAUCC	(配列番号 77)
HLyn-408	UCCAAUAAAACAGCAAAGGC	(配列番号 78)
HLyn-470	AAGAUCCAGAGGAACAAGG	(配列番号 79)
HLyn-838	GCACUACAAAAUUAGAAGU	(配列番号 80)
HLyn-989	CAGAAGCCAUGGGAUAAAG	(配列番号 81)
HLyn-1076	GUCUGGAUGGGUUACUAUA	(配列番号 82)
HLyn-1166	AAGCCAACCUCAUAGAACAC	(配列番号 83)
HLyn-1270	CAGUUUGCUGGAUUUCCUG	(配列番号 84)
HLyn-1366	UACAUUCGAGCGGAAGAACU	(配列番号 85)
HLyn-1483	GUACACAGCAAGGGAAGGU	(配列番号 86)
HLyn-1600	AAUUGUCACCUAUGGGAAA	(配列番号 87)
HLyn-1620	AAUUCCUACCCAGGGAGAAC	(配列番号 88)
HLyn-1689	UGGAGAACUGCCCCAGAUGA	(配列番号 89)

【0158】

【表5】

表5-Syk 標的部分およびRNAi 因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号 : U25685)		
Syk-172	AGGAAGGCACACCUACAUACA	(配列番号	90)
Syk-307	AAGAAGCCUUCAACCGGC	(配列番号	91)
Syk-373	AACCUCAUCAGGGAAUUAUG	(配列番号	92)
Syk-1009	AUGGACACAGAGGUACG	(配列番号	93)
Syk-1169	UGAAAACCGUGGCUGUGAA	(配列番号	94)
Syk-1450	UUUGUGCACAGAGAUCUGG	(配列番号	95)
Syk-1537	CUGCGUGCUGAUGAAAACU	(配列番号	96)
Syk-1606	GAAUGCAUCAACUACUACA	(配列番号	97)
ヒト配列	(Genbank 登録番号 : L28824)		
HSyk-322	AGGAAGGCACACCUACAUACA	(配列番号	98)
HSyk-457	AAGAAGCCUUCAACCGGC	(配列番号	99)
HSyk-523	AACCUCAUCAGGGAAUUAUG	(配列番号	100)
HSyk-1174	AUGGACACAGAGGUACG	(配列番号	101)
HSyk-1334	UGAAAACCGUGGCUGUGAA	(配列番号	102)
HSyk-1615	UUUGUGCACAGAGAUCUGG	(配列番号	103)
HSyk-1702	CUGCGUGCUGAUGAAAACU	(配列番号	104)
HSyk-1771	GAAUGCAUCAACUACUACA	(配列番号	105)

【0159】

【表6】

表6-ICOS 標的部分およびRNAi 因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号 : NM_017480.1)		
ICOS-96	UAACAGGAGAAUCAAUGG	(配列番号	107)
ICOS-578	AGUGAAUACAUUUCAUGG	(配列番号	108)
ICOS-765	AUUCUGCUGGUGUUUUUU	(配列番号	109)
ICOS-1665	UAUUUAGCCUGAAAGCUGC	(配列番号	110)
ヒト配列	(Genbank 登録番号 : NM_012092.1)		
HICOS-76	UAACAGGAGAAUCAAUGG	(配列番号	111)
HICOS-555	GGUGAAUACAUUUCAUGA	(配列番号	112)
HICOS-735	CUUCUGCUGGUGUUUUUU	(配列番号	113)
HICOS-1668	CAUUUAGCCUGAAAGCUGC	(配列番号	114)

【0160】

【表7】

表7—OX40L標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	:	U12763.1)
OX40L-175	GAUGAGAAUCUGGAAAACG	(配列番号	115)
OX40L-211	AAGUGGAAGAAGACGCUA	(配列番号	116)
OX40L-1279	CUUCCUCAAAGAACUACC	(配列番号	117)
OX40L-1336	UGCAAAGAAAACCAGGAGA	(配列番号	118)

10

ヒト配列	(Genbank 登録番号	:	X79929.1)
HOX40L-188	AAGAUUCGAGAGGAACAAAG	(配列番号	119)
HOX40L-302	GUAUCCUCGAAUUCAAAGU	(配列番号	120)
HOX40L-668	UGGUGAAUUCUGUGUCCUU	(配列番号	121)
HOX40L-943	UACUAGGCACCUUJUGUGAG	(配列番号	122)

【0 1 6 1】

【表8】

表8—CD40標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

20

マウス配列	(Genbank 登録番号	:	M83312.1)
CD40-299	AGAAUCAGACACUGUCUGU	(配列番号	123)
CD40-1242	AACAGGUAGUGGAAUGAUG	(配列番号	124)
CD40-1287	AUUCCAAGGCAGGUAGAU	(配列番号	125)
CD40-1403	UUGUCAUUUGACCUCCAUG	(配列番号	126)
CD40-1422	UGUGCUCUGUGGUAAUGUA	(配列番号	127)
CD40-1452	CACAUGUGCACAUAUCCUA	(配列番号	128)

30

ヒト配列	(Genbank 登録番号	:	Z15017.1)
HCD40-148	GCUGUGUAUCUUCAUAGAA	(配列番号	129)
HCD40-223	ACGAUACAGAGAUGCAACA	(配列番号	130)
HCD40-635	UACUCAGAGCUGCAAUAAC	(配列番号	131)
HCD40-707	UUGAAUUGCAACCCAGGUGC	(配列番号	132)
HCD40-734	UUGUCAAUGUGACUGAUCC	(配列番号	133)

【0 1 6 2】

40

【表9】

表9—CD80標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	:	XM_148237.1)
CD80-145	CUACAUUCUGUUUCUCGA	(配列番号	134)
CD80-233	CAAAGCAUCUGAAGCUAUG	(配列番号	135)
CD80-1358	CUUGAUGACUGAAGUGGAA	(配列番号	136)
CD80-148	GCAACUUGAU AUGUCAUGU	(配列番号	137)

10

ヒト配列	(Genbank 登録番号	:	NM_005191.1)
HCD80-257	UCUUCUACGUGAGCAAUUG	(配列番号	138)
HCD80-411	CAAGUGUCCAUACCUAAU	(配列番号	139)
HCD80-472	UCAGGUGUUUAUCCACGUGA	(配列番号	140)
HCD80-767	UGGCUGAAGUGACGUUAUC	(配列番号	141)
HCD80-1201	AGGAAUGAGAGAUUGAGAA	(配列番号	142)
HCD80-1271	AAGAUCUGAAGGUAGGCCUC	(配列番号	143)
HCD80-1482	AUGUUUCCAUUCUGCCAUC	(配列番号	144)

20

【0 1 6 3】

【表10】

表10—CD86標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	:	NM_019388.1)
CD86-194	AGUAUUUUGGCAGGACCAAG	(配列番号	145)
CD86-488	CAUAAA UUGACCUGCACG	(配列番号	146)
CD86-594	CAAGAUAAUGUCACAGAAC	(配列番号	147)
ヒト配列	(Genbank 登録番号	:	NM_006889.1)
HCD86-291	AGUAUUUUGGCAGGACCAAG	(配列番号	148)
HCD86-585	CAUAAA UUGACCUGCUA	(配列番号	149)
HCD86-697	CAAGAUAAUGUCACAGAAC	(配列番号	150)

30

【0 1 6 4】

【表11】

表11-RetA標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	: BC003818)	
RelA-255	AGCACAGAUACCACCAAGA	(配列番号 151)	
RelA-282	ACCAUCAAGAUCAAUGGCU	(配列番号 152)	
RelA-672	AACACUGCCGAGCUCAAGA	(配列番号 153)	
RelA-682	AGCUCAAGAUCUGCCGAGU	(配列番号 154)	
RelA-1707	AUUGC GGACAUGGACUUUCU	(配列番号 155)	10
RelA-1735	UGAGUCAGAUCAGCUCCUA	(配列番号 156)	

ヒト配列

(Genbank 登録番号 : BC011603)

HRelA-214	AGCACAGAUACCACCAAGA	(配列番号 157)	
HRelA-241	ACCAUCAAGAUCAAUGGCU	(配列番号 158)	
HRelA-631	AACACUGCCGAGCUCAAGA	(配列番号 159)	
HRelA-641	AGCUCAAGAUCUGCCGAGU	(配列番号 160)	
HRelA-1181	AUUGC GGACAUGGACUUUCU	(配列番号 161)	20
HRelA-1209	UGAGUCAGAUCAGCUCCUA	(配列番号 162)	

【0165】

【表12】

表12-RetB標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	: BC019765)	
RetB-794	UUUAACAACCUGGGCAUCC	(配列番号 163)	
RetB-840	CUGCCAUUGAGCGGAAGAU	(配列番号 164)	
RetB-1583	CUCCUGGACGAUGGCUUUG	(配列番号 165)	30
RetB-1788	UUGUGGGCAGCAACAUGUU	(配列番号 166)	

ヒト配列

(Genbank 登録番号 : BC028013)

HRetB-747	UUUAACAACCUGGGCAUCC	(配列番号 167)	
HRetB-793	CUGCCAUUGAGCGGAAGAU	(配列番号 168)	
HRetB-1533	CUCCUGGACGAUGGCUUUG	(配列番号 169)	
HRetB-1738	UUGUGGGCAGCAACAUGUU	(配列番号 170)	40

【0166】

【表13】

表13-4-1 BBL標的部分およびRNAi因子のセンス

鎖配列

<u>マウス配列</u>	(Genbank 登録番号 : L15435.1)	
4-1BBL-309	UAGUCGCUUUGGUUUUGCUC	(配列番号 171)
4-1BBL-418	AGAGAAUAAUGCAGACCAAG	(配列番号 172)
4-1BBL-987	UAUCCUUCUUGUGACUCCU	(配列番号 173)
4-1BBL-1016	UCCUCAAGCUGCUAUGUUU	(配列番号 174)

10

ヒト配列 (Genbank 登録番号 : U03398.1)

H4-1BBL-298	AAUGUUCUGCUGAUCGAUG	(配列番号 175)
H4-1BBL-374	UGAGCUACAAAGAGAGGACAC	(配列番号 176)
H4-1BBL-1019	AGGAUCCUGAGUUUGUGAA	(配列番号 177)
H4-1BBL-1207	CUGUAAUGUGGCCAGCAUUG	(配列番号 178)
H4-1BBL-1240	GGCUAUAGAAACAUCUAGA	(配列番号 179)
H4-1BBL-1283	UAUGGUAAUACGUGAGGAA	(配列番号 180)

20

【0167】

【表14】

表14-TLR1標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

<u>マウス配列</u>	(Genbank 登録番号 : AY009154.1)	
TLR1-468	UUUGGAUUUGUCCCCACAAU	(配列番号 181)
TLR1-1698	GGAUUUCUUCCAGAGCUGU	(配列番号 182)
TLR1-2246	GUUACAAAGUCCAUCUUUGU	(配列番号 183)

30

<u>ヒト配列</u>	(Genbank 登録番号 : NM_003263.2)	
HTLR1-565	CUUGGAUUUGUCCCCACAAAC	(配列番号 184)
HTLR1-1795	UGAUUUCUUCCAGAGCUGC	(配列番号 185)
HTLR1-2343	GUUACAAAGUCCAUCUUUGU	(配列番号 186)

【0168】

【表15】

表15-TLR2標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

<u>マウス配列</u>	(Genbank 登録番号 : AF216289.1)	
TLR2-477	GAAAAGCCUUGACCUGUCU	(配列番号 187)
TLR2-2460	CGAACUGGACUUCUCCCCAC	(配列番号 188)
<u>ヒト配列</u>	(Genbank 登録番号 : NM_003264.2)	
HTLR2-312	AAAAAGCCUUGACCUGUCC	(配列番号 189)
HTLR2-2295	UGAACUGGACUUCUCCCCAU	(配列番号 190)

40

【0169】

【表16】

表16-TLR3標的の部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	: NM_126166.2)
TLR3-1178	GAAGUGGACAAUUCUCACC	(配列番号 191)
TLR3-1711	GCCAGGAAUGGAGAGGUUCU	(配列番号 192)
TLR3-1876	CUCUUCGUAACUUGACCAU	(配列番号 193)
TLR3-1904	AAGCAACAAACAACAUAGCC	(配列番号 194)
TLR3-2046	CUGUCUCACCUCCACAUUCU	(配列番号 195)
TLR3-2309	CUGCACGUGUGAAAGUAUU	(配列番号 196)
TLR3-2848	GAAGAUUCAAGGUACAUCA	(配列番号 197)

10

20

ヒト配列	(Genbank 登録番号	: NM_003265.2)
HTLR3-914	AAAGUGGACAAUUCUCACU	(配列番号 198)
HTLR3-1447	GCCAGGAAUGGAGAGGUUCU	(配列番号 199)
HTLR3-1612	CUCUUCGUAACUUGACCAU	(配列番号 200)
HTLR3-1640	AAGCAACAAACAACAUAGCC	(配列番号 201)
HTLR3-1782	CUGUCUCACCUCCACAUCC	(配列番号 202)
HTLR3-2045	UUGCACGUGUGAAAGUAUU	(配列番号 203)
HTLR3-2584	AAAGAUUCAAGGUACAUCA	(配列番号 204)
HTLR3-2682	AACCAUGCACUCUGUUUGC	(配列番号 205)

20

【0170】

【表17】

表17-TLR4標的の部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	: NM_021297.1)
TLR4-266	UGGAUUUAUCCAGGUGUGA	(配列番号 206)
TLR4-410	UGGUGGCUGUGGAGACAAA	(配列番号 207)
TLR4-2138	ACUACAGAGACUUUAUUC	(配列番号 208)
TLR4-2169	UUGCUGCCAACAUCAUCC	(配列番号 209)

30

ヒト配列	(Genbank 登録番号	: U88880.1)
HTLR4-412	UGGAUUUAUCCAGGUGUGA	(配列番号 210)
HTLR4-556	UGGUGGCUGUGGAGACAAA	(配列番号 211)
HTLR4-2287	ACUACAGAGACUUUAUUC	(配列番号 212)
HTLR4-2317	UUGCUGCCAACAUCAUCC	(配列番号 213)

40

【0171】

【表18】

表18－TLR5標的的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	: NM_016928.1)
TLR5-1160	CAGCUUCAACUAUAUCAGU	(配列番号 214)
TLR5-3130	CUUUGCUAAACACCUGGA	(配列番号 215)

ヒト配列	(Genbank 登録番号	: NM_003268.3)
HTLR5-800	GAGCUUCAACUAUAUCAGG	(配列番号 216)
HTLR5-2770	CUUUGCUAAACACCUGGA	(配列番号 217)

10

【0172】

【表19】

表19－TLR6標的的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号	: NM_011604.1)
TLR6-550	UUGCUCACUUGCAUCUAAG	(配列番号 218)
TLR6-2005	AUGAUUCUGCCUGGGUGAA	(配列番号 219)
TLR6-2073	CAUGAGAGGAACUUUGUCC	(配列番号 220)

20

ヒト配列	(Genbank 登録番号	: NM_006068.2)
HTLR6-563	UUGCUCACUUGCAUCUAAG	(配列番号 221)
HTLR6-2018	AUGAUUCUGCCUGGGUGAA	(配列番号 222)
HTLR6-2086	CAUGAGAGGAACUUUGUCC	(配列番号 223)

【0173】

【表20】

表20-TLR7標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号 : NM_133211.2)	
TLR7-272	GAUGGUUUCCUAAAACUCU	(配列番号 224)
TLR7-584	UUUACCUGGAUGGAAACCA	(配列番号 225)
TLR7-736	UGUUAUUAUCGAAAUCUU	(配列番号 226)
TLR7-824	AAGAUAAACAAUUGUCACAGC	(配列番号 227)
TLR7-947	UUCUUGACCUAAGUGGAAA	(配列番号 228)
TLR7-1782	CCAAACUCUUAUUGGCAGU	(配列番号 229)
TLR7-2556	CUGUGAUGCUGUGUGGUUU	(配列番号 230)
TLR7-2706	AAACCUGAUUCUGUUCUCA	(配列番号 231)
 ヒト配列		
	(Genbank 登録番号 : NM_016562.2)	
HTLR7-218	GAUGGUUUCCUAAAACUCU	(配列番号 232)
HTLR7-530	UUUACCUGGAUGGAAACCA	(配列番号 233)
HTLR7-682	UGUUAUUAUCGAAAUCUU	(配列番号 234)
HTLR7-770	AAGAUAAACAAUUGUCACAGC	(配列番号 235)
HTLR7-893	UUCUUGACCUAAGUGGAAA	(配列番号 236)
HTLR7-1728	CCAAACUCUUAUUGGCAGU	(配列番号 237)
HTLR7-2502	CUGUGAUGCUGUGUGGUUU	(配列番号 238)
HTLR7-2652	AAACCUGAUUCUGUUCUCA	(配列番号 239)

【0174】

【表21】

表21-TLR8標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号 : NM_133212.1)	
TLR8-2589	ACUGGGAUGUUUGGUUUAU	(配列番号 240)
TLR8-2821	UAACCUAUGCAGAGCAUA	(配列番号 241)
TLR8-2921	UUGCAGAGGCUAAUGGAUG	(配列番号 242)
TLR8-2939	GAGAACAUUGGAUGUGAUUA	(配列番号 243)
 ヒト配列		
	(Genbank 登録番号 : NM_016610.2)	
HTLR8-2763	ACUGGGAUGUUUGGUUUAU	(配列番号 244)
HTLR8-2995	CAACCUAUGCAGAGCAUC	(配列番号 245)
HTLR8-3095	UUGCAGAGGCUAAUGGAUG	(配列番号 246)
HTLR8-3113	GAGAACAUUGGAUGUGAUUA	(配列番号 247)

【0175】

【表22】

表22-TLR9標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

<u>マウス配列</u>	(Genbank 登録番号 : AF314224.1)		
TLR9-1103	AACCUGUCCUUCAAUUACC	(配列番号	248)
TLR9-1200	ACGGCAUCUUCUCCGCUC	(配列番号	249)
TLR9-1283	AUGAACUUCAUCAACCAGG	(配列番号	250)
TLR9-2156	AAGGCCUGACCAAUGGCA	(配列番号	251)
<u>ヒト配列</u>	(Genbank 登録番号 : NM_017442.2)		10
HTLR9-1652	AACCUGUCCUUCAAUUACC	(配列番号	252)
HTLR9-1749	ACGGCAUCUUCUCCGCUC	(配列番号	253)
HTLR9-1832	AUGAACUUCAUCAACCAGG	(配列番号	254)
HTLR9-2702	AAGGCCUGACCAAUGGCA	(配列番号	255)

【0176】

【表23】

表23-FcεRα標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

20

<u>マウス配列</u>	(Genbank 登録番号 : AJ245551.1)		
CD83-454	GACACUCAUCAUUUCACC	(配列番号	256)
CD83-841	GCUAUCUGGUCAACCUCGU	(配列番号	257)
CD83-881	AAGCUAUGGUGAGAUGCAG	(配列番号	258)
CD83-955	CUGAGGACAGCUGUCCUCU	(配列番号	259)
CD83-1071	CAGUGGGAAAUUUUAGCA	(配列番号	260)
CD83-1251	CAUGUACUUGUCAAAGAAG	(配列番号	261)
<u>ヒト配列</u>	(Genbank 登録番号 : NM_004233.2)		30
HCD83-779	AACACUCAUCAUUUCACU	(配列番号	262)
HCD83-1176	GCUAUCUGGUCAACCUCU	(配列番号	263)
HCD83-1217	AAGCUAUGGUGAGAUGCAG	(配列番号	264)
HCD83-1290	CUGAGGACAGCUGUCCUCU	(配列番号	265)
HCD83-1406	CAGUGGGAAAUUUUAGCA	(配列番号	266)
HCD83-1584	UAUGUACUUGUCAAAGAAG	(配列番号	267)

【0177】

【表24】

表24-SLAM標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

<u>マウス配列</u>	(Genbank 登録番号 : NM_013730.1)	
SLAM-100	UUUCUCUCCCUGGCUUUUG (配列番号 268)	
SLAM-123	GAGCUACGGAACAGGUGGA (配列番号 269)	
<u>ヒト配列</u>	(Genbank 登録番号 : AY040554.1)	
HSLAM-40	UUUCUCUCCCUGGCUUUUG (配列番号 270)	10
HSLAM-63	AAGCUACGGAACAGGUGGG (配列番号 271)	

【0 1 7 8】

【表25】

表25-共通γ鎖標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

<u>マウス配列</u>	(Genbank 登録番号 : NM_013563.1)	
IL-2R γ -209	GAGUACAUGAAUUGCACUU (配列番号 272)	
IL-2R γ -501	UGAGUGAAUCCCAGCUAGA (配列番号 273)	20
IL-2R γ -933	CCUGGAGUGGUGUGUCUAA (配列番号 274)	
IL-2R γ -972	AGCCAGACUACAGUGAACG (配列番号 275)	
<u>ヒト配列</u>	(Genbank 登録番号 : NM_000206.1)	
HIL-2R γ -216	GAGUACAUGAAUUGCACUU (配列番号 276)	
HIL-2R γ -508	UGAGUGAAUCCCAGCUAGA (配列番号 277)	
HIL-2R γ -940	CCUGGAGUGGUGUGUCUAA (配列番号 278)	
HIL-2R γ -979	AGCCAGACUACAGUGAACG (配列番号 279)	30

【0 1 7 9】

【表26-1】

表26-FcεRα標的部分およびRNAi因子のセンス鎖配列

マウス配列	(Genbank 登録番号 : M94967.1)		
COX2-175	CAGCAAAUCCUUGCUGUUC	(配列番号	280)
COX2-232	GAUUUGACCAGUAUAAGUG	(配列番号	281)
COX2-337	CAAACACAGUGCACUACAU	(配列番号	282)
COX2-448	AUUUGAUUGACAGUCCACC	(配列番号	283)
COX2-489	UACAAAAGCUGGGAAGCCU	(配列番号	284)
COX2-681	UUCUUUGCCCAGCACUUCA	(配列番号	285)
COX2-714	AAGACAGAUCAUAAGCGAG	(配列番号	286)
COX2-809	UAAACUGCGCCUUUUCAAG	(配列番号	287)
COX2-818	CCUUUUCAAGGAUGGAAAA	(配列番号	288)
COX2-896	AGAGAUGAUCUACCCUCCU	(配列番号	289)
COX2-954	GUCUUUGGUCUGGUGCCUG	(配列番号	290)
COX2-973	GUCUGAUGAUGUAUGCCAC	(配列番号	291)
COX2-1433	CUCCAUUGACCAGAGCAGA	(配列番号	292)
COX2-1452	GAGAUGAAAUAACCAGUCUC	(配列番号	293)
COX2-1473	AAUGAGUACCGCAAACGCU	(配列番号	294)
COX2-1516	UUGAAGAACUUACAGGAGA	(配列番号	295)
COX2-1657	UUGGAGCACCAUUCUCCUU	(配列番号	296)
COX2-1764	ACUGCCUAAUUCAGUCUC	(配列番号	297)
ヒト配列	(Genbank 登録番号 : M90100.1)		
HCOX2-147	CAGCAAAUCCUUGCUGUUC	(配列番号	298)
HCOX2-204	GAUUUGACCAGUAUAAGUG	(配列番号	299)
HCOX2-309	CAAACACAGUGCACUACAU	(配列番号	300)
HCOX2-420	AUUUGAUUGACAGUCCACC	(配列番号	301)
HCOX2-461	UACAAAAGCUGGGAAGCCU	(配列番号	302)
HCOX2-653	UUCUUUGCCCAGCACUUCA	(配列番号	303)
HCOX2-686	AAGACAGAUCAUAAGCGAG	(配列番号	304)
HCOX2-781	UAAACUGCGCCUUUUCAAG	(配列番号	305)
HCOX2-790	CCUUUUCAAGGAUGGAAAA	(配列番号	306)

10

20

30

40

【0180】

【表26-2】

HCOX2-868	AGAGAUGAUCUACCCUCCU	(配列番号	307)
HCOX2-926	GUCUUUGGUCUGGUGGCCUG	(配列番号	308)
HCOX2-945	GUCUGAUGAUGUAUGGCCAC	(配列番号	309)
HCOX2-1405	UUCCAUUGACCAGAGCAGG	(配列番号	310)
HCOX2-1424	CAGAUGAAAUACCAGUCUU	(配列番号	311)
HCOX2-1445	AAUGAGUACCGCAAACGCU	(配列番号	312)
HCOX2-1488	UUGAAGAACUUACAGGAGA	(配列番号	313)
HCOX2-1629	UUGGAGCACCAUUCUCCUU	(配列番号	314)
HCOX2-1736	ACUGCCUCAAUUCAGUCUC	(配列番号	315)

(VII. IgE媒介性過敏症を軽減または排除するRNAi因子の同定、試験、および選択方法)

本明細書中に記載の技術および試薬を、他の遺伝子または遺伝子領域を標的化するさらなる新規のRNAi因子の設計に容易に適用することができる。本明細書中で考察するように、これらの因子を、IgE媒介性応答、疾患、および病状の阻害におけるその活性について試験することができる。本発明の種々の実施形態では、siRNAまたはshRNAなどのRNAi因子を、最初に候補RNAi因子を細胞に導入すること（例えば、細胞へのsiRNAまたはshRNAの内因性合成を指示するベクターまたは構築物の外因性投与または導入による）によって試験する。次いで、候補RNAi因子が標的転写物レベルを減少させる能力を、例えば、ノーザンプロット、スクレアーゼ保護アッセイ、逆転写（RT）-PCT、リアルタイムRT-PCR、マイクロアレイ分析などを使用した標的転写物量の測定によって評価する。候補RNAi因子が標的転写物によってコードされるポリペプチドの産生を（転写レベルまたは翻訳後レベルのいずれかで）阻害する能力を、種々の抗体ベースのアプローチ（ウェスタンプロット、免疫アッセイ、フローサイトメトリー、タンパク質マイクロアレイなどが含まれるが、これらに限定されない）を使用して測定することができる。一般に、標的転写物量または標的転写物によってコードされるポリペプチド量のいずれかを測定する任意の方法を使用することができる。一般に、特定の好みしいインヒビターにより、標的転写物レベルが、インヒビターの非存在下（例えば、インヒビターを欠く類似のコントロール細胞において）で存在するレベルの少なくとも1/2、好みしくは少なくとも1/4、より好みしくは少なくとも1/8、少なくとも1/16、少なくとも1/64またはさらに小さい程度に減少する。

【0181】

本発明は、siRNAおよびshRNAなどのRNAi因子を同定し、その効率を試験する種々のさらなる方法を提供する。例えば、本発明のRNAi因子を、細胞応答（IgEなどの種々の刺激に対する肥満細胞の脱顆粒、DC、マクロファージ、B細胞、または小グリア細胞などによる刺激に対するTh2細胞応答（例えば、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、およびIL-13などのサイトカインの増殖、放出））に対するインビトロでのその効果を評価するために試験することができる。このようなアッセイを行う方法は、当該分野で周知である。一般に、上記試験のいずれかのために、本発明のRNAi因子が送達された細胞（試験細胞）を、本発明の組成物を受けていない類似または匹敵する細胞（コントロール細胞）と比較することができる。したがって、本発明は、RNAi因子がIgE媒介性過敏症または過剰もしくは不適切な肥満細胞活性によって特徴づけられる病状の処置に適切な配列を含むと同定する方法を提供し、この方法は、以下：(i)適切な刺激への曝露の前、同時、または後に候補RNAi因子を肥満細胞に送達する工程と、(ii)メディエーターの産生または分泌を評価する工程と、(iii)上記RNAi因子の存在下で産生または分泌されたメディエーターの量と上記RNAi因子の非存在下で産生または分泌された量とを比較する工程と、(iv)上記RNAi

10

20

30

40

50

因子の存在下で産生または分泌されたメディエーターの量が上記 R N A i 因子の非存在下で産生または分泌されたメディエーターの量よりも少ない場合、上記 R N A i 因子が適切な配列を含むと同定する工程とを含む。本発明の種々の実施形態では、R N A i 因子は、s i R N A、s h R N A、またはR N A i ベクターであり得る。実施例2を参照のこと(これは、候補 s i R N A が肥満細胞の脱顆粒を阻害する能力の試験を記載する)。

【0182】

本発明の R N A i 因子を、被験体(例えば、げっ歯類、非ヒト霊長類、またはヒト)に投与し、肥満細胞、T h 2 細胞、D C、B 細胞などの細胞を被験体から回収することができる。本発明の R N A i 因子が標的転写物および/またはそのコードタンパク質の発現を阻害する能力を、上記のように測定する。上記のように、一定の R N A i 因子は、肥満細胞の生存および/または増殖に寄与し、および/または必要であるタンパク質をコードする転写物(例えば、c - K i t)を標的化する。本発明の R N A i 因子の投与後の肥満細胞数の減少がその効率の指標である場合、本発明の R N A i 因子の肥満細胞数に対する効果を測定することもできる。

【0183】

本発明は、さらに、R N A i 因子がI g E 媒介性過敏症または不適切もしくは過剰なT h 2 ヘルパー細胞活性によって特徴づけられる病状の処置に適切な配列を含むと同定する方法を提供し、この方法は、(i) 候補 R N A i 因子をT 細胞およびA P C を含む培養物に送達する工程と、(ii) T 細胞の増殖を評価する工程、および/またはT h 2 細胞に特徴的なサイトカインの産生もしくは分泌を評価する工程と、(iii) 上記 R N A i 因子の存在下での上記 T 細胞の増殖または上記サイトカインの産生もしくは分泌の程度とR N A i 因子の非存在下での上記 T 細胞の増殖または上記サイトカインの産生もしくは分泌の程度とを比較する工程と、(iv) 上記 R N A i 因子の存在下での上記 T 細胞の増殖または上記サイトカインの産生もしくは分泌の程度がR N A i 因子の非存在下での T 細胞の増殖または上記サイトカインの産生もしくは分泌の程度よりも小さい場合、上記 R N A i 因子が適切な配列を含むと同定する工程とを含む。(試験は、R N A i 因子が存在しないコントロールを含み得るが、阻害の非存在下で産生または分泌されるメディエーター量または阻害の非存在下での T 細胞増殖量もしくはサイトカイン産生もしくは放出量に関する以前の情報を使用することもできる。)これらのアッセイを使用して、任意の転写物を標的化する R N A i 因子を試験することができるが、本明細書中に記載の転写物を標的化する因子に制限されない。

【0184】

特定の本発明の R N A i 因子は、I g E 産生に寄与するか必要であるタンパク質をコードする転写物を標的化する。細胞培養物中のB 細胞によるI g E 産生または被験体におけるI g E レベルに対する本発明の R N A i 因子の効果を測定することができる。本発明の R N A i 因子の投与後のI g E レベルの減少、またはR N A i 因子の非存在下で期待されるI g E 応答に対する R N A i 因子の存在下での抗原投与後のI g E 応答の減少は、R N A i 因子の有効性についての1つの指標である。本発明は、R N A i 因子がI g E 媒介性過敏症によって特徴づけられる病状の処置に適切な配列を含むと同定する方法を提供し、この方法は、(i) 候補 R N A i 因子を、B 細胞を含む培養物に送達する工程と、(ii) I g E の産生または分泌を評価する工程と、(iii) 上記 R N A i 因子の存在下で産生または分泌されたI g E の量と上記 R N A i 因子の非存在下で産生または分泌されたI g E の量とを比較する工程と、(iv) 上記 R N A i 因子の存在下で産生または分泌されたI g E の量が上記 R N A i 因子の非存在下で産生または分泌されたI g E の量よりも少ない場合、上記 R N A i 因子が適切な配列を含むと同定する工程とを含む。本発明は、さらに、R N A i 因子がI g E 媒介性過敏症によって特徴づけられる病状の処置に適切な配列を含むと同定する別の方法を提供し、この方法は、(i) 候補 R N A i 因子を被験体に送達する工程と、(ii) 血清I g E レベル、T 細胞の増殖、T h 2 細胞に特徴的なサイトカインの産生、気道炎症、気道反応性、気道壁再構築、および肺機能からなる群から選択されるI g E 媒介性過敏症の指標についての値を得る工程と、(iii) 上記 R N A i 因子の存

10

20

30

40

50

在下で得られた値と上記RNAi因子の非存在下で得られた値とを比較する工程と、(iv) RNAi因子の存在下で得られた値が上記RNAi因子の非存在下で得られた値よりも低い場合、上記RNAi因子が適切な配列を含むと同定する工程とを含む。

【0185】

その二重鎖部分が特定の配列を含んでRNAiを引き起こす、RNAi因子の有効性が、1つのRNAi因子の型（例えば、RNAiベクター）によって確立される場合、一般に、その配列が、他のRNAi因子の型（例えば、siRNAまたはshRNA）についても有用であることに留意すべきである。したがって、例えば、レンチウイルスベクターなどのRNAiベクターが、喘息またはアレルギー性鼻炎の病状の動物モデルにおいてそのような症状を軽減する場合、RNAiベクターによって得られるテンプレートと同一の二重鎖部分を有するsiRNAまたはshRNAはまた、一般に、喘息またはアレルギー性鼻炎の症状の軽減に有用である。したがって、上記方法は、有効なRNAi因子自体の同定よりもむしろ適切な配列（すなわち、二重鎖部分の配列）を含むRNAi因子の同定に関して記載されている。しかし、適切な配列を含むRNAi因子の同定により、本質的にRNAi因子自体が同定され、同一配列を含む二重鎖部分を有するRNAi因子も同定されると理解すべきである。

【0186】

潜在的な阻害RNAi因子を、アレルギーおよび/または喘息について開発された任意の種々の動物モデル（例えば、げっ歯類、ヒツジ、または非ヒト靈長類モデル）を使用して試験することができる。本発明の治療薬の試験に有用な適切な動物モデルの例については、Isenberg-Feig, H.ら, "Animal models of allergic asthma", Curr Allergy Asthma Rep., 3(1):70-8, 2003およびその参考文献を参照のこと。Wegner CD, Gundel RG, Abraham WMら, J Allergy Clin Immunol, 91:917-29, 1993; Temelkovski, J.ら, Thorax, Volume 53(10):849-856, 1998も参照のこと。多くのこのようなモデルは、オボアルブミンなどのタンパク質抗原の全身投与およびその後の吸入攻撃誘発後の種々の応答の評価に基づく。これらは、抗原に特異的な血清IgEレベル、抗原特異的T細胞の増殖、気道炎症（例えば、気道内のリンパ球、好中球、および好酸球（eosophilin）などの炎症細胞の蓄積）、気道反応性（例えば、メタコリン攻撃誘発への応答）、気道壁再構築（例えば、気道肥厚）、および肺機能などの指標を含む。TLR（例えば、TLR4）を標的化するRNAi因子を、任意の種々の動物モデルにおいて、敗血症、ショック、または熱傷関連損傷について試験することができる。

【0187】

候補siRNA、shRNA構築物または宿主細胞内でのこのようなsiRNAまたはshRNAの合成を指示することができるベクターを含む（すなわち、適切な発現シグナルに作動可能に連結されたsiRNAまたはshRNAの転写のためのテンプレートを含む）組成物、または候補RNAi因子を含むように加工もしくは操作された細胞を、抗原への曝露前、同時、もしくは曝露後、または公知の曝露を行わずに、ヒトまたは動物被験体に投与することができる。潜在的なインヒビターを受容していない類似の曝露被験体と比較して、組成物がIgE媒介性過敏症を予防または軽減するか、このような過敏症に関連する病状および疾患（例えば、アレルギー性鼻炎および喘息）に関連する症状の出現を遅延もしくは予防し、および/またはその重症度を低下させる能力を評価する。

【0188】

上記のように、IgE媒介性応答において重要な種々のタンパク質を標的化する多数のRNAi因子が設計されている。いくつかの強力な阻害剤を利用することができるため、それらは容易に、組み合わせて最適に使用される。例えば、異なる転写物を標的化するRNAi因子は、IgE産生および/またはIgEに対する応答が得られる複数の経路の阻害またはIgE媒介性応答に関する複数の細胞型における経路の阻害による相乗効果（すなわち、各効果の和を超える効果）を有し得る。したがって、最も有効な組み合わせを

10

20

30

40

50

見出すために、RNAi因子を、2つまたはそれ以上組み合わせて試験することができる。

【0189】

他方では、望ましくない副作用を回避するために、その標的転写物の発現を最大より弱く阻害するRNAi因子を使用することが望ましくあり得る。したがって、本発明は、上記転写物を標的化するRNAi因子を単独または組み合わせて体系的に試験する工程を含む。1つのアプローチによれば、その配列が転写物全体にわたる非重複siRNAまたはshRNAを、上記のように細胞または細胞株中においてインビトロで合成および試験するか、アレルギーマウスなどの動物モデルにおいてインビトロで合成および試験する。さらに、siRNAまたはshRNAの潜在性を、トランスフェクションのために使用したRNA量の適定によって比較することができる。例えば、異なる量(0.025nmol、0.05nmol、0.1nmol、および0.25nmolなど)のRNAを、単独または組み合わせて、肥満細胞にトランスフェクションするかエレクトロポレーションし得、刺激に対する脱顆粒(ヒスタミン、プロスタグランジン、アラキドン酸などのメディエーターの放出)を測定することができる(詳細については、実施例2を参照のこと)。本発明のRNAi因子がTh2応答を減少または排除する能力を、インビトロ(例えば、T細胞とDCとの混合培養物中)またはインビトロのいずれかで測定することもできる。RNAi因子の有効性を、アレルギー性気道炎症のマウスモデルを使用して評価することもできる。種々の量のRNAi因子を、感作マウスに投与することもできる。これらのマウスの抗原攻撃誘発に対する応答を、種々の方法(炎症性サイトカイン(例えば、MIP-1

10

、MIP-1、IL-4、IL-5、IL-13など)の発現の測定、肺中の好酸球数および好中球数の測定、ならびに肺機能試験の実施が含まれる)で評価することができる(詳細については、実施例3を参照のこと)。このような実験からの結果は、各RNAi因子の相対的潜在性だけでなく、最大阻害に必要な最小量の決定のための一助となる。後者は、それぞれどの程度を組み合わせて使用すべきであるかを決定するのに有用である。

20

【0190】

(VIII. 送達因子を含むRNAi組成物)

本発明者らは、有効なRNAi療法(IgE媒介性反応に関連する病状および疾患の予防および治療が含まれる)は、一般に、細胞へのRNAi因子(siRNA、shRNA、およびRNAiベクターなど)の有効な導入によって増強されることを認識する。本発明の特定の実施形態により、RNAi因子を、呼吸管中の細胞または他の粘膜面の内層細胞に投与する。一般に、RNAi因子を、体内または体表の任意の部位(肥満細胞の脱顆粒またはAPCとIgE産生B細胞との間で細胞相互作用が起こり得る場所が含まれるが、これらに限定されない)または肥満細胞、好塩基球、APC、IgE産生B細胞、および/またはTh2細胞が生じ得る任意の場所に送達することができる。したがって、本発明は、インタクトな生物(例えば、哺乳動物)中の細胞へのsiRNA、shRNA、および/またはRNAiベクターの送達を増強するための任意の種々の非ウイルス送達因子を含む組成物を提供する。本明細書中で使用される、「送達」の概念には、siRNA、shRNA、またはベクターの細胞取り込み、および細胞内RNAi機構(例えば、エンドソームからのsiRNAまたはshRNAの放出)に利用可能なsiRNAまたはshRNAの作製に関するその後の任意の工程に加えて、身体への侵入部位からそれが機能する細胞の位置へのsiRNA、shRNA、またはRNAiベクターの輸送が含まれる。

30

40

【0191】

したがって、本発明は、以下を含む組成物を包含する:(i)上記で考察される任意の転写物を標的化するsiRNAもしくはshRNAなどのRNAi因子、および/またはその細胞内での存在によって上記で考察される任意の転写物を標的化する、siRNAもしくはshRNAなどのRNAi因子が産生されるRNAiベクター、ならびに(ii)任意の種々の送達因子(カチオン性ポリマー、修飾カチオン性ポリマー、ペプチド分子ト

50

ランスポーター（アルギニンまたはヒスチジンリッチペプチドが含まれる）、炭水化物、脂質（カチオン性脂質、中性脂質、およびその組み合わせが含まれる）、リポソーム、リポポリプレックス、非カチオン性ポリマー、肺への導入に適切な界面活性物質、または上記の任意の混合物などが含まれるが、これらに限定されない）。特定の送達因子は、転写物が阻害されることが望ましい細胞へのRNAi因子またはベクターの送達を増加させるか選択的送達を増加させる部分を組み込む。本発明の特定の実施形態では、送達因子は生分解性である。本発明での使用に適切な特定の送達因子は、以下、および発明の名称「Compositions and Methods for Delivery of Short Interfering RNA and Short Hairpin RNA to Mammals」である同時係属中の米国特許出願10/674,087号に記載されている。送達因子は、組み合わせて使用することができる。10

【0192】

DNAトランスフェクションのためのキャリアとしてカチオン性ポリマーベースの系が調査されている(Han, S. - O. ら, Mol. Therapy 2:302-317, 2000)。カチオン性ポリマーがDNAの細胞内取り込みを促進する能力は、DNAに結合して、巨大なプラスミドDNA分子をより有効なエンドサイトーシスのためのより小さなDNA／ポリマー複合体に縮合する能力に部分的に起因すると考えられる。DNA／カチオン性ポリマー複合体はまた、細胞表面糖タンパク質の負電荷のシラン酸残基との静電相互作用のために、生体接着剤として作用する(Soane, R. J. ら, Int. J. Pharm. 178:55-65, 1999)。さらに、イミダゾール基修飾ポリリジン(PLL)などのいくつかのポリマーは、エンドソーム膜の破壊を明らかに促進し、それにより、サイトゾルにDNAを放出させる(Putnam, D. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1200-1205, 2000)。したがって、本発明は少なくとも1つのRNAi因子およびカチオン性ポリマーを含む組成物ならびにこのような組成物の投与による標的遺伝子発現の阻害方法を提供する。RNAi因子は、阻害によってIgE媒介性過敏症が軽減されるタンパク質またはペプチドをコードする転写物（例えば、その阻害によって以下のいずれかが起こるタンパク質またはペプチドをコードする転写物に標的化する：（1）B細胞によるIgE産生の減少、（2）肥満細胞数の減少、（3）肥満細胞活性化の減少、（4）Th2細胞数の減少（例えば、アレルゲンが被験体の過敏症を誘発するものであるアレルゲン特異的Th2細胞数の減少）、（5）Th2細胞活性化の減少（例えば、アレルゲンが被験体の過敏症を誘発するものであるアレルゲン特異的Th2細胞活性化の減少））。本発明の特定の実施形態によれば、RNAi因子の投与により、Fc RI鎖、Fc RI鎖、c-Kit、Lyn、Syk、ICOS、OX40L、CD40、CD80、CD86、RelA、RelB、4-1BBリガンド、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、CD83、SLAM、共通鎖、およびCOX-2からなる群から選択されるタンパク質の発現が減少する。本発明の特定の実施形態によれば、DCおよび/またはマクロファージにおける発現が阻害される。本発明の特定の実施形態によれば、RNAi因子を、上記タンパク質の1つをコードする転写物を標的し、それにより、そのタンパク質発現が減少する。しかし、本発明の他の実施形態によれば、RNAi因子は、コードされた産物が上記の任意のタンパク質の発現または活性に必要であるか、またはそれに寄与する、いくつかの他の転写物を標的化する。このような産物には、例えば、上記タンパク質の1つをコードする転写物の転写またはプロセシングに関与する転写因子またはRNAプロセシング因子が含まれる。IgE媒介性過敏症に関連する疾患または病状の処置のために、本発明のRNAi因子を、単独で、または相互に組み合わせておよび/もしくは他の治療と組み合わせて、投与することができる。203040

【0193】

本発明は、上記の種々のRNAi因子およびこれらを含む組成物を提供する。特に、本発明は、(i) Fc RI鎖、Fc RI鎖、c-Kit、Lyn、Syk、ICOS、OX40L、CD40、CD80、CD86、RelA、RelB、4-1BBリガンド、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、CD83、SLAM、共通鎖、およびCOX-2からなる群から選択されるタンパク質の発現が減少する。本発明の特定の実施形態によれば、DCおよび/またはマクロファージにおける発現が阻害される。本発明の特定の実施形態によれば、RNAi因子を、上記タンパク質の1つをコードする転写物を標的し、それにより、そのタンパク質発現が減少する。しかし、本発明の他の実施形態によれば、RNAi因子は、コードされた産物が上記の任意のタンパク質の発現または活性に必要であるか、またはそれに寄与する、いくつかの他の転写物を標的化する。このような産物には、例えば、上記タンパク質の1つをコードする転写物の転写またはプロセシングに関与する転写因子またはRNAプロセシング因子が含まれる。IgE媒介性過敏症に関連する疾患または病状の処置のために、本発明のRNAi因子を、単独で、または相互に組み合わせておよび/もしくは他の治療と組み合わせて、投与することができる。50

ンド、T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、C D 8 3、S L A M、共通鎖、およびC O X - 2からなる群から選択されるタンパク質をコードする転写物を標的化するR N A i 因子、および(i i)カチオン性ポリマーを含む組成物を投与する工程を含む、I g E 媒介性過敏症に関連する病状および疾患を処置および/または予防する方法を提供する。本発明は、種々のこのようなR N A i 因子およびこれらを含む組成物を提供する。

【0194】

一般に、カチオン性ポリマーは、およそ生理学的p H(例えば、約7.0~7.6、好みくは約7.2~7.6、より好みくは7.4のp H範囲)で正電荷のポリマーである。このようなカチオン性ポリマーには、イミダゾール基修飾P L L(Putnamら)、ポリエチレンイミン(P E I)(Boussif, O.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92: 7297-7301, 1995)、ポリビニルピロリドン(P V P)(Astafieva, I.ら, FEBS Lett. 389: 278-280, 1996)、およびキトサン(Davis, S. S., Pharm. Sci. Technol. Today 2: 450-457, 1999; Roy, K.ら, Nat. Med. 5: 387-391, 1999)が含まれるが、これらに限定されない。10

【0195】

特定のこれらのポリマーが、第一級アミン基、イミン基、グアニジン基、および/またはイミダゾール基を含むことが認識される。好みいカチオン性ポリマーは、比較的低い毒性、および高いD N A トランスフェクション効率を有する。好みいカチオン性ポリマーは、比較的低い毒性、および高いD N A トランスフェクション効率を有する。20

【0196】

適切なカチオン性ポリマーには、任意の上記のポリマーのサブセットを含むコポリマー(例えば、リジン-ヒスチジンコポリマーなど)も含まれる。コポリマー中において、種々のサブユニットの比率は等しい必要はなく、例えば、細胞傷害性を最小にしながら核酸と複合体を形成する能力などの性質を最適にするように選択することができる。さらに、サブユニットは、規則正しく交互に並ぶ必要はない。所望の性質に関して種々のポリマーを評価するための適切なアッセイを、実施例に記載する。好みいカチオン性ポリマーには、上記の任意の種々の修飾がさらに組み込まれたポリマーなどのポリマーも含まれる。適切な修飾には、アセチル基、スクシニル基、アシリル基、またはイミダゾール基での修飾が含まれるが、これらに限定されない。一般に、特定の好みい修飾により、カチオン性ポリマーの正電荷が減少する。特定の好みい修飾により、第一級アミンが第二級アミンに変換される。このようなさらなる基を組み込むためのカチオン性ポリマーの修飾方法は、当該分野で周知である(例えば、引例32を参照のこと)。例えば、ポリマー合成後に、共役によって種々の残基の-アミノ基を所望の修飾基に置換することができる。一般に、ポリマーがR N A i 因子の送達を増強する能力を過度に減少させることなく、非置換ポリマーと比較して細胞傷害性を適切に減少させるのに十分な置換率を選択することが望ましい。したがって、本発明の特定の実施形態では、ポリマー中の25%と75%との間の残基が置換される。本発明の特定の実施形態では、ポリマー中の約50%の残基が置換される。最初の適切に選択した単量体サブユニットのコポリマー(すなわち、いくつかに既に所望の修飾が組み込まれているサブユニット)の形成によって類似の効果を得ることができることに留意すべきである。3040

【0197】

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、P E Iなどのカチオン性ポリマーは、D N A を細胞表面でアニオン性プロテオグリカンと相互作用することができる正電荷の粒子に小型化または縮合されて、エンドサイトーシスによって細胞に侵入すると考えられる。このようなポリマーは、エンドソームp Hを緩衝してD N A を分解から保護する「プロトンスポンジ」として作用する性質を有し得る。連続的プロトン流入により、エンドソームの浸透圧による膨潤および破壊も誘導され、D N A 粒子の細胞質への逃避機構が提供される(例えば、本発明の実施で有用なP E Iおよび他のカチオン性ポリマーに関するさら

1020304050

なる情報については、引例 85～87、米国特許第6,013,240号、WO9602655号を参照のこと）。本発明の特定の実施形態によれば、jet P E ITM (Qb1ogene, Carlsbad, CA) (P E Iの直鎖形態) (米国特許第6,013,240号)として公知の市販のP E I試薬を使用する。

【0198】

本発明者らは、インフルエンザウイルスRNAを標的化するP E I、P L L、またはP L A、およびs i R N Aを含む組成物をインフルエンザウイルス感染の前または後のいずれかに静脈内投与した場合にマウスでインフルエンザウイルスの產生が有意に阻害されることを示した。阻害は、用量依存性であり、異なるインフルエンザウイルスRNAを標的化する2つのs i R N Aを使用した場合にさらなる効果を示す。したがって、s i R N Aは、P E I、P L L、またはP L Aなどのカチオン性ポリマーと組み合わせた場合、肺に達し、細胞に侵入し、ウイルス複製周期を有効に阻害することができる。これらの所見により、肺内で発現する他の転写物を標的化するs i R N Aを含む類似の組成物は、肺内の細胞に効率的に送達されてその標的遺伝子の発現を阻害することが示唆される。

【0199】

種々のさらなるカチオン性ポリマーを使用することもできる。ジアクリレートおよびアミン単量体由来の新規のカチオン性ポリマーおよびオリゴマーの巨大ライブラリーを開発し、D N Aトランスフェクションで試験した。これらのポリマーを、本明細書中で、ポリ(-アミノエステル)(P A E)ポリマーという。例えば、7個のジアクリレート単量体および20個のアミン単量体由来の140個のポリマーのライブラリーが記載されており(Lynn, D. M.ら, J. Am. Chem. Soc. 123: 8155-8156, 2001)、類似または同一の方法を使用してより巨大なライブラリーを生成することができる。このライブラリーの140個のメンバーのうち、70個が十分な水溶性を示すことが見出された(2mg / mL、25mM酢酸緩衝液、pH = 5.0)。70個の水溶性ポリマーのうちの56個が、電気泳動移動度の変化によって示されるように、D N Aと相互作用した。より重要には、56個のポリマーのうちの2個がC O S - 7細胞へのD N Aトランスフェクションを媒介した。新規のポリマーのトランスフェクション効率は、P E Iの4～8倍高く、リポフェクタミン2000と同等かそれ以上であった。したがって、本発明は、カチオン性ポリマーがポリ(-アミノエステル)である、少なくとも1つのs i R N A分子およびカチオン性ポリマーを含む組成物およびこのような組成物の投与による標的遺伝子発現の阻害方法を提供する。

【0200】

研究により、転写因子(H I V T a tタンパク質(27, 28)、単純ヘルペスウイルスのV P 22タンパク質(29)、およびショウジョウバエのアンテナベディアタンパク質(30)が含まれる)が細胞表面から原形質膜に浸透し得ることが示されている。膜貫通を担うペプチドセグメントは、11～34個のアミノ酸残基からなり、非常にアルギニンに富み、アルギニンリッチペプチド(A R P)と呼ばれる。非常に巨大なポリペプチドと共有結合した場合、A R Pは、原形質膜を通過して融合ポリペプチドを輸送することができる(31～33)。同様に、オリゴヌクレオチドがA R Pに共有結合した場合、これらはさらにより迅速に細胞によって取り込まれる(34、35)。最近の研究により、8個のアルギニンのポリマーはこの膜貫通輸送に十分であることが示されている(36)。カチオン性ポリマーと同様に、A R Pおよびポリアルギニン(P L A)も正電荷であり、s i R N Aに結合することができる可能性が高く、おそらくA R PまたはP L Aにs i R N Aが共有結合する必要はないことが示唆される。

【0201】

したがって、本発明は、少なくとも1つのR N A i因子およびアルギニンリッチペプチドを含む組成物およびこのような組成物ならびにこのような組成物の投与による標的遺伝子発現の阻害方法を提供する。特に、本発明は、(i)その阻害によってI g E媒介性過敏症が低減される任意のタンパク質またはペプチドをコードする転写物を標的するR N A i因子、および(ii)アルギニンリッチペプチド、を含む組成物を投与する工程を包含

10

20

30

40

50

する、IgE媒介性過敏症に関連する病状または障害を処置および／または予防する方法を提供する。本発明の特定の実施形態によれば、RNAi因子の投与は、FcRI鎖、FcRI鎖、c-Kit、Lyn、Syk、ICOS、OX40L、CD40、CD80、CD86、RelA、RelB、4-1BBリガンド、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、CD83、S10
LAM、共通鎖、およびCOX-2からなる群から選択されるタンパク質をコードする転写物を標的化する。本発明の特定の実施形態によれば、DCおよび／またはマクロファージにおける発現が阻害される。アルギニンリッチペプチドには、引例46～51に記載のものおよび当業者にあきらかなその変形形態が含まれるが、これらに限定されない。アルギニンリッチペプチドには、ポリアルギニン（すなわち、アルギニン残基のみからなるペプチド）が含まれる。

【0202】

一般に、好ましいアルギニンリッチペプチドは、約50アミノ酸長未満である。本発明の特定の実施形態によれば、アルギニンリッチペプチドは、約7アミノ酸と34アミノ酸長との間の長さを有するペプチドである。本発明の特定の実施形態によれば、ペプチドは、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%のアルギニンを含む場合、アルギニンリッチである。本発明の特定の実施形態によれば、アルギニンリッチペプチドは、6個と20個との間のアルギニン残基を含む（すなわち、アルギニンリッチペプチドは、6個のアルギニンを含むか、7個のアルギニンを含むか、または8個のアルギニンを含む、など）。本発明の特定の実施形態によれば、アルギニンリッチペプチド（ポリアルギニン）は、6個と20個との間のアルギニン残基からなる（すなわち、アルギニンリッチペプチドは、6個のアルギニンを含むか、7個のアルギニンを含むか、または8個のアルギニンを含む、など）。本発明の特定の実施形態によれば、siRNAおよびアルギニンリッチペプチドが共有結合するのに対して、本発明の他の実施形態では、RNAi因子およびアルギニンリッチペプチドが混合するが、相互に共有結合しない。

【0203】

種々の他の送達因子を、本発明の種々の実施形態で使用することができる。例えば、米国特許出願番号10/674,087号により詳細に記載されるように、肺への導入に適切な界面活性物質、標的細胞の表面上に存在する分子に結合する抗体またはリガンドなどの送達増強部分を組み込んだ送達因子、または上記のカチオン性ポリマーと異なる任意の種々のポリマーおよびポリマーマトリクスも使用することができる。このようなポリマーには、多数の非カチオン性ポリマー（すなわち、生理学的pHで正電荷を持たないポリマー）が含まれる。このようなポリマーは、一定の利点（例えば、細胞傷害性が低く、いくつかの場合、FDA承認されている）を有し得る。多数の適切なポリマーは、他の状況で薬物および遺伝子の送達を増強することが示されている。このようなポリマーには、例えば、本発明のRNAi因子の送達のためのナノ粒子に処方することができるポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（グリコリド）（PLG）、およびポリ（DL-ラクチド-コ-グリコリド）（PLGA）が含まれる。上記のコポリマーおよび組み合わせも使用することができる。本発明の特定の実施形態では、カチオン性ポリマーを使用して、siRNA、shRNA、またはベクターを縮合し、縮合した複合体を、PLGAまたは別の非カチオン性ポリマーによって保護する。使用することができる他のポリマーには、Pluronnic 85と複合化することができるポリビニルアルコールまたはポリ（N-エチル-4-ビニルピリジウムプロミド）等の非縮合ポリマーが含まれる。本発明で使用される他のポリマーには、カチオン性ポリマーと非カチオン性ポリマーとの間の組み合わせが含まれる。例えば、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）（PLGA）グラフティングポリ（L-リジン）および他の組み合わせ（PLA、PLG、またはPLGAおよび任意のカチオン性ポリマーまたは修飾カチオン性ポリマー（上記で考察のものなど）が含まれる）を使用することができます。

【0204】

10

20

30

40

50

(IX. 処置への適用)

本発明のRNAi因子を含む組成物を使用して、IgEによって媒介される任意の疾患または病状（例えば、IgE媒介性過敏症に関連する任意の疾患または病状（アレルギー性鼻炎および喘息が含まれるが、これらに限定されない））を予防または処置することができる。好ましくは、RNAi因子の量は、IgE媒介性過敏症の1つまたは複数の症状の軽減または予防に十分である。したがって、本発明は、(i) IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患もしくは病状の危険性があるかまたはその疾患もしくは病状に罹患している被験体を提供する工程と、(ii) FcRI鎖、FcRII鎖、c-Ki1、Lyn、Syk、ICOS、OX40L、CD40、CD80、CD86、RelA、RelB、4-1BBリガンド、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、CD83、SLAM、共通鎖、およびCOX-2からなる群から選択されるタンパク質をコードする転写物を標的化するRNAi因子を含む組成物を被験体に投与する工程とを含む、IgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患または病状を処置または予防する方法を提供する。本発明は、さらに、不適切もしくは過剰な肥満細胞活性によって特徴づけられる疾患もしくは病状の危険性があるかまたはその疾患もしくは病状に罹患している被験体を提供する工程と、肥満細胞の活性または肥満細胞の生存を減少させるRNAi因子組成物を被験体に投与する工程とを含む、不適切もしくは過剰な肥満細胞活性またはIgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患もしくは病状を処置または予防する方法を提供する。さらに、本発明は、不適切もしくは過剰なTh2ヘルパー細胞応答によって特徴づけられる疾患もしくは病状の危険性があるかまたはその疾患もしくは病状に罹患している被験体を提供する工程と、Th2細胞応答を減少させるか排除するRNAi因子を含む組成物を被験体に投与することとを含む、不適切もしくは過剰なTh2ヘルパー細胞応答またはIgE媒介性過敏症によって特徴づけられる疾患もしくは病状を処置または予防する方法を提供する。

【0205】

RNAi因子を含む本発明の組成物は、1つの標的転写物中の1つの部位を標的化する1つの種を含み得るか、1つまたは複数の転写物中の1つまたは複数の部位を標的化する複数の異なる種を含み得る。

【0206】

本発明のいくつかの実施形態では、異なる転写物を標的化する異なるRNAi因子の集団を含む組成物を使用することが望ましい。例えば、異なる細胞型（例えば、DC、マクロファージ、B細胞、Th2細胞）で発現する転写物を標的化する種々のRNAi因子を使用することが望ましくあり得る。あるいは、1つの細胞型で多数の異なる転写物を阻害することが望ましくあり得る。これらのストラテジーのいずれかにより、単一転写物が阻害された場合に同等な治療効果を達成するために必要とされる阻害度と比較して、任意の単一転写物の阻害レベルを減少させる一方で、治療効果を得ることができる。

【0207】

本発明の特定の実施形態によれば、本発明の組成物は、1つの転写物を標的化する1つを超えるRNAi因子を含み得る。一例を挙げれば、標的転写物のコード領域を標的化する少なくとも1つのsiRNAまたはshRNAおよび3'UTRを標的化する少なくとも1つのsiRNAまたはshRNAを含むことが望ましくあり得る。この戦略は、組成物中の少なくとも1つのsiRNAまたはshRNAが分解のために転写物を標的化することができる一方で、少なくとも1つの他のものが、分解を回避するための任意の転写物の翻訳を阻害するので、関連転写物によってコードされる産物が生成されないという別の確信を得ることができる。

【0208】

本発明は、「治療カクテル」（複数のsiRNAもしくはshRNAを投与するアプローチ、および1つのベクターが複数の標的を阻害するsiRNAもしくはshRNAの合成、またはプロセシングされて複数のsiRNAもしくはshRNAを生成し得るRNAの合成を指示するアプローチが含まれるが、これらに限定されない）を含む。

10

20

30

40

50

【0209】

IgE媒介性過敏症の1つまたは複数の症状または特徴を阻害、軽減、または予防するために、本発明のRNAi因子と1つまたは複数の他の治療薬の投与を組み合わせることがしばしば望ましい。本発明の特定の好ましい実施形態では、本発明のRNAi因子を、他の薬剤の1つまたは複数と組み合わせる。他の薬剤としては、例えば、以下が挙げられる：抗ヒスタミン薬（フェキソフェナジン、ロラタジン、セチリジンなどのH1レセプターアンタゴニストが含まれる）；コルチコステロイド（プレドニゾン、ベクロメタゾン、トリアムシノロン、フルチカゾンなど）；気管支拡張薬（エピネフリン、エピネフリンアナログ、およびイソプロテレノールなどの-アドレナリン作動性アゴニスト、ならびにアルブテロール、メタプロテロノール、サルメテロールなどの2選択性アドレナリン作動性アゴニストが含まれる）；クロモリンナトリウム、ネドクロミル、または関連化合物；テオフィリンなどのメチルキサンチンまたは関連化合物、など。上記リストは、包括よりもむしろ表示のみを意図することに留意すべきである。さらなる情報および他の適切な薬剤については、例えば、上記で参照したGoodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeuticsを参照のこと。本発明の異なる実施形態では、用語「～と組み合わせた」または「～との組み合わせ」は、RNAi因子が他の薬剤と同一の混合物中に存在することか、個体の処置計画が1つまたは複数のRNAi因子および他の薬剤の両方を含み、必ずしも同一の混合物中においてもしくは同時に送達されないことかの、いずれかを意味し得る。本発明の特定の実施形態によれば、薬剤は、喘息またはアレルギー性鼻炎などのIgE媒介性過敏症に関連する病状の処置について米国食品医薬品局で承認されている。

【0210】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明の組成物の投与を特定の細胞および/または細胞型（例えば、肥満細胞、DC、マクロファージ、Th2細胞）に標的化することが望ましくあり得る。本発明のいくつかの実施形態では、本発明の組成物の投与を身体の特定の領域（例えば、上気道および/または下気道など）に標的化することが望ましくあり得る。本発明の他の実施形態では、最も広範な送達の選択肢が利用可能であることが望ましい。

【0211】

上記のように、本発明の治療プロトコールは、被験体が過敏性であるアレルゲンへの曝露前、曝露と同時、または曝露後における、有効量のRNAi因子の投与を含み得る。例えば、予想される曝露前に、個体は、siRNAを受容することができるか、あるいは推測されるか既知である曝露と実質的に同時（例えば、数秒、数分、または数時間以内）に処置することができる。勿論、任意の時間（継続的時間または慣習に基づく時間）に、個体は、本発明の処置を受けることができる。

【0212】

遺伝子療法プロトコールは、適切な発現シグナルに作動可能に連結された阻害siRNAまたはshRNAの転写のためのテンプレートを含む有効量の遺伝子療法ベクターを被験体に投与する工程を含み得る。上記の代わりに、または上記に組み合わせて使用することができる別のアプローチは、被験体から細胞集団（例えば、幹細胞または免疫系細胞）を単離し、必要に応じて組織培養で細胞を増殖し、このような遺伝子療法ベクターをインビトロで細胞に投与することである。次いで、細胞を、被験体に戻すことができる。必要に応じて、siRNAまたはshRNAを発現する細胞を、これらを被験体に導入する前にインビトロで選択することができる。本発明のいくつかの実施形態では、細胞株または被験体ではない個体由来の細胞であり得る細胞集団を使用することができる。被験体からの幹細胞、免疫系細胞などの単離方法およびこれらを被験体へ戻す方法は、当該分野で周知である。このような方法は、例えば、化学療法を受けた患者における骨髄移植、末梢血幹細胞移植などのために使用される。

【0213】

さらに別のアプローチでは、経口遺伝子療法を使用することができる。例えば、米国特

10

20

30

40

50

許第6,248,720号は、微粒子中に保護的に含まれて保護される、プロモーターの制御下にある遺伝子を、作動可能な形態で細胞に送達させ、それにより、非浸襲性遺伝子送達が達成される方法および組成物を記載している。微粒子の経口投与後、遺伝子は上皮細胞（吸収小腸上皮細胞が含まれる）に取り込まれ、腸管関連リンパ系組織に取り込まれ、さらに、粘膜上皮から離れた細胞に輸送される。本明細書中に記載のように、微粒子は、遺伝子を粘膜上皮から離れた部位に送達することができる（すなわち、微粒子は上皮バリアを通過して全身循環に入り、それにより、他の位置で細胞がトランスフェクトされる）。

【0214】

本発明は、非ヒト種（イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ブタ、およびウマが含まれるが、これらに限定されない）の処置のための本発明の組成物の使用を含む。 10

【0215】

好みの実施形態では、本発明の遺伝子療法組成物および方法は、ヒトまたはヒトの一部を形成する細胞に対する特許請求を含まない。

【0216】

（X.薬学的処方物）

本発明の組成物を、任意の利用可能な経路（非経口（例えば、静脈内）、筋肉内、皮内、皮下、経口、鼻腔内、気管支、眼、経皮（局所）、経粘膜、直腸、および腔経路が含まれるが、これらに限定されない）による送達のために処方することができる。好みの送達経路には、非経口、経粘膜、鼻腔内、気管支、および経皮が含まれる。本発明の薬学的組成物は、代表的には、薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせた、送達後に siRNA または shRNA が産生されるベクターを含む。本明細書中で使用される、用語「薬学的に許容可能なキャリア」には、薬物投与に適合する溶媒、分散媒、コーティング、抗菌薬および抗真菌薬、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。補助的活性化合物を組成物に組み込むこともできる。 20

【0217】

意図する投与経路と適合するように薬学的組成物を処方する。非経口、皮内、または皮下への適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含むことができる：注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールもしくは他の合成溶媒などの滅菌希釈剤、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌薬、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤、酢酸、クエン酸、またはリン酸などの緩衝液、塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの浸透圧調整剤。塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基を使用して pH を調整することができる。非経口調製物を、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または複数回投与用バイアルに封入することができる。 30

【0218】

注射用途に適切な薬学的組成物は、代表的には、滅菌注射様の溶液または分散液の即時調製のための滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および滅菌粉末を含む。静脈内投与のためには、適切なキャリアとしては、生理学的食塩水、静菌水、Cremophor

ELTM BASF, Parsippany, NJ またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が含まれる。全ての場合、組成物は滅菌されているべきであり、シリンジで容易に利用可能な範囲の流動性であるべきである。好みの薬学的処方物は、製造および保存条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。一般に、関連キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、ならびにこれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒であり得る。例えば、レクチンなどのコーティングの使用、分散媒の場合の必要な粒子サイズの維持、および界面活性剤の使用によって適切な流動性を維持することができる。種々の抗菌薬および抗真菌薬（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、およびチメロサールなど）によっ 40

て、微生物作用を防止することができる。多くの場合、薬剤（例えば、糖、ポリアルコール（マンニトール、ソルビトールなど）、塩化ナトリウム）を組成物中に含めることによって等張性を調整することが好ましい。吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を組成物中に含めることによって、注射可能な組成物の吸収を延長することができる。

【0219】

滅菌注射溶液を、適切な溶媒中での必要量の活性化合物への必要に応じた上記列挙の成分の1つまたは組み合わせの組み込み、および必要な場合その後の濾過滅菌によって、調製することができる。一般に、基剤としての分散媒および上記列挙の成分由来の必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルへの活性化合物の組み込みによって、分散液を調製する。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、前に濾過滅菌した溶液から活性成分の粉末および任意のさらなる所望の成分が得られる、真空乾燥および凍結乾燥である。

【0220】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。経口治療薬投与の目的のために、活性化合物を賦形剤と共に組み込み、錠剤、トローチ、またはカプセル（例えば、ゼラチンカプセル）の形態で使用することができる。経口組成物を、含嗽剤として使用するための液体キャリアを使用して調製することもできる。薬学的に適合性の結合剤および／またはアジュバント物質を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、任意の以下の成分または類似の性質の化合物を含み得る：微結晶性セルロース、トラガカントガム、またはゼラチンなどの結合剤、デンプンまたはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、Primogel、またはコーンスタークなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムまたはSteroteなどの滑沢剤、コロイド状二酸化ケイ素などの滑剤（glidant）、スクロースまたはサッカリンなどの甘味料、またはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ香料などの香味物質。経口送達用処方物は、薬剤を有利に組み込んで、胃腸管内での安定性を改善し得、そして／または吸収を増強し得る。

【0221】

吸入による投与のために、本発明のRNAi因子を、好ましくは、適切な噴射剤（例えば、二酸化炭素などのガス）を含む加圧コンテナもしくは分注器、または噴霧器から、エアゾールスプレーの形態で送達する。本発明は、特に、上気道および／または下気道への鼻内噴霧剤、吸入器、または他の直接送達を使用した本発明の組成物の送達を企図する。さらに、本発明の特定の実施形態によれば、気道内での細胞による核酸取り込みを容易にするためのキャリアを、薬学的の組成物に含める。（例えば、S.-O. Han, R.I. Mahato, Y.K. Sung, S.W. Kim, "Development of biomaterials for gene therapy", Molecular Therapy 2:302317, 2000.を参照のこと）。本発明の特定の実施形態によれば、実施例3に詳細に記載するように、siRNAまたはshRNA／キャリア組成物を、エアゾール投与のための巨大な多孔質粒子として処方する。

【0222】

経粘膜手段または経皮手段によって全身投与することもできる。経粘膜または経皮投与のために、透過すべきバリアに適切な浸透剤を処方に於いて使用する。このような浸透剤は、当該分野で一般に公知であり、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸、およびフシジン酸誘導体が含まれる。鼻内噴霧剤または坐剤の使用によって経粘膜投与を達成することができる。経皮投与のために、当該分野で公知のように、活性化合物を、軟膏（ointment）、軟膏（salve）、ゲル、またはクリームに処方する。

【0223】

化合物を、直腸送達のための座剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドなどの従来の座剤の基剤）または持続性浣腸剤（retention enema）の形態で調製することもできる。

10

20

20

30

40

50

【0224】

1つの実施形態では、活性化合物を、化合物を身体からの急速な排除から保護するキャリアを使用して調製する（例えば、移植片およびマイクロカプセル化送達系を含む徐放性処方物）などの。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルソエステル、およびポリ乳酸などの生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。このような処方物の調製方法は、当業者に明らかである。材料を、Alza Corporation および Nova Pharmaceuticals, Inc. から購入することもできる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染細胞を標的化するリポソームが含まれる）を、薬学的に許容可能なキャリアとして使用することもできる。これらを、例えば、例えば、米国特許第4,522,811号に記載の当業者に公知の方法にしたがって調製することができる。10

【0225】

投与を容易にするためおよび投薬量を均一にするために、経口または非経口組成物を投薬単位形態で処方することが有利である。本明細書中で使用される、「投薬単位形態」は、処置される被験体の単位投薬に適切な物理的に個別の単位をいい、各単位は、必要な薬学的キャリアと組み合わせて、所望の治療効果が得られるように計算された所定量の活性化合物を含む。

【0226】

このような化合物の毒性および治療有効性を、例えば、LD₅₀（集団の50%が死滅する用量）およびED₅₀（集団の50%において治療的に有効である用量）の決定のための細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療指數であり、LD₅₀ / ED₅₀ 比として示すことができる。高い処置指數を示す化合物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物を使用することができるが、非感染細胞に対する潜在的な損傷を最小にし、それにより、副作用を軽減させるために、罹患組織部位にこのような化合物を標的化する送達系の設計には注意を払うべきである。20

【0227】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを、ヒトにおける使用のための投薬量範囲を処方することに使用することができる。このような化合物の投薬量は、毒性がほとんどないか全くないED₅₀を含む循環濃度範囲内であることが好ましい。投薬量は、使用される投薬形態および利用される投与経路に依存してこの範囲内で変化し得る。本発明の方法で使用される任意の化合物のために、処置有効用量を、最初に細胞培養アッセイから評価することができる。細胞培養物で決定されるIC₅₀（すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するための用量を、動物モデル中に処方することができる。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿レベルを、例えば、高速液体クロマトグラフィの助けを使用して測定することができる。30

【0228】

薬学的組成物の処置有効量は、代表的には、約0.001~30mg/kg体重、好ましくは約0.01~25mg/kg体重、より好ましくは約0.1~20mg/kg体重、さらにより好ましくは約1~10mg/kg体重、2~9mg/kg体重、3~8mg/kg体重、4~7mg/kg体重、または5~6mg/kg体重の範囲である。薬学的組成物を、必要に応じて種々の間隔および異なる期間で投与することができる（例えば、1週間に1回を、約1週間~10週間、2週間~8週間、約3週間~7週間、約4週間、5週間、6週間など）。当業者は、特定の要因（疾患または障害の重症度、以前の処置、全体的な健康状態、および/または被験体の年齢、ならびに他の疾患の存在が挙げられるが、これらに限定されない）が被験体の有効な処置に必要な投薬量およびタイミングに影響を与えることを認識する。一般に、本明細書中に記載のRNAi因子での被験体の処置には、単回処置が含まれ得るか、多くの場合、一連の処置が含まれ得る。40

【0229】

10

20

30

40

50

用量の例としては、被験体またはサンプル重量 1 kgあたりでの、本発明の siRNA の量 (mg または μ g) が挙げられる (例えば、約 1 mg / kg ~ 約 500 mg / kg、約 100 μ g / kg ~ 約 5 mg / kg、または約 1 μ g / kg ~ 約 50 μ g / kg)。RNAi 因子の適切な用量は、その潜在能力に依存し、そして必要に応じて、例えば、事前に選択しておいた所望の応答が得られるまで用量を増加しながら投与することによって、特定のレシピエントに合わせることができることが、さらに理解される。任意の特定の動物被験体についての特定の用量レベルは種々の要因 (使用される特定の化合物の活性、被験体の年齢、体重、全体的健康状態、性別、および食事、投与時間、投与経路、排泄速度、任意の薬物の組み合わせ、および調節すべき発現または活性の程度が挙げられる) に依存し得ることが、理解される。

10

【0230】

上記のように、本発明は、非ヒト動物の処置のための本発明の組成物の使用を含む。したがって、投与用量および投与方法を、獣医学用薬物学および医薬品の公知の原理にしたがって選択することができる。指針は、例えば、Adams, R. (編), Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 第8版, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001 に見出すことができる。

【0231】

プラスミドまたは遺伝子療法ベクターを、例えば、静脈内注射、局所投与、または定位注入によって被験体に送達することができる (例えば、Chenら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054 - 3057 を参照のこと)。本発明の特定の実施形態では、プラスミドまたは遺伝子療法ベクターを、経口または吸入で送達させ得、カプセル化するかもしくは他の方法で操作してこれらを分解から保護し得、組織または細胞への取り込みを増強し得る。プラスミドを、遺伝子療法ベクターとして使用することができ、したがって、用語「遺伝子療法ベクター」はプラスミドを含み得ることに留意すること。しかし、一般に、用語「遺伝子療法ベクター」は、しばしば、例えば、細胞内での複製および / または細胞ゲノムへの核酸配列の組み込みによって裸の DNA ベクターを哺乳動物細胞に導入した場合に代表的に得られるよりも、より持続的に治療薬を発現させることができるベクターをいうために使用される。プラスミドまたは遺伝子療法ベクターの薬学的調製物は、許容可能な希釗剤中の遺伝子療法ベクターを含み得るか、遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれた徐放マトリクスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターを、組換え細胞からインタクトなままで產生することができる場合 (例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター)、薬学的調製物は、この遺伝子送達系を產生する 1 つまたは複数の細胞を含み得る。

20

30

30

【0232】

本発明の薬学的組成物は、投与のための使用説明書と共にコンテナ、パック、または分注器中に備えられ得る。

【実施例】

【0233】

(実施例 1 : siRNA の設計)

40

表 1 ~ 26 に列挙した配列を標的およびセンス鎖として選択した。各配列について、列挙した配列と完全に相補的な配列を、対応するアンチセンス鎖として選択した。dTdT からなる 2nt の 3' 突出部を、各鎖に添加した。例えば、cDNA 配列 FC-R-268 (TTGGTCATTG TGAGTGCC A = 配列番号 316) に基づいて siRNA を設計するために、配列 5' - UUGGUCAUUGUGAGUGCCA - 3' (配列番号 1) をセンス鎖のコア領域として選択し、相補配列 5' - UGGCACUCACAA UGACCAA - 3' (配列番号 317) を、アンチセンス鎖のコア領域として選択する。dTdT からなる 2nt の 3' 突出部を、各鎖に付加し、配列 5' - UUGGUCAUUGUGAGUGCCA dTdT - 3' (配列番号 318) (センス鎖) および 5' - UGGCACUCACAAUGACCAA dTdT - 3' (配列番号 319) (アンチセン

50

ス鎖)を得た。

【0234】

センス鎖とアンチセンス鎖とのハイブリダイズにより、各鎖が2ヌクレオチドの3'OH突出部を有する、19塩基対のコアニ重鎖領域を有するsiRNAが得られる。

【0235】

(実施例2：抗原誘導性肥満細胞応答に対する本発明のsiRNAの効果)

本実施例は、抗原に応答した好塩基球および肥満細胞による炎症の種々のメディエーターの放出に対する本発明のsiRNA組成物の投与効果を決定するための実験を記載する。

【0236】

(試薬) 他で記載しない限り、試薬は、Moriya, K.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12539 - 12544, 1997に記載の供給元から入手する。

【0237】

(細胞、細胞培養、および細胞調製) RBL-2H3は、高親和性IgEレセプターを有する好塩基球白血病細胞株である。これらの細胞を、これらのレセプターの凝集によってか、またはカルシウムイオノフォアによって、ヒスタミンおよび他のメディエーターを分泌するように活性化する。Barsumian Eら, Eur. J Immunol. 11: 317 - 323, 1981。これらは、肥満細胞中の分泌のためのFcERIおよび生化学的経路を研究するために広範に使用した。RBL-2H3細胞(CRL-2256株)を、American Type Culture Collection (Manassas, VA, http://www.atcc.org)から入手し、Moriya, K.らに記載のように培養で維持する。Moriyaらに記載のように、RBL-2H3細胞を、DNP特異的IgE、ならびに放射性標識myo-イノシトール、アラキドン酸、および5-ヒドロキシトリグリセリドと一晩インキュベートする。細胞を、抗原(DNP-BSA、10ng/mL)または分泌刺激薬A23187およびホルボル12-ミリストート-13-アセテート(それぞれ、100nmおよび20M)により、37℃で15分間刺激する。

【0238】

Holgate, S. T.ら, J. Immunol., 124: 2093 - 2099, 1980に記載のようにラット腹腔内肥満細胞を得る。DNP-BSA(0.3μg/ml)との37℃で15分間のインキュベーションによって細胞を刺激する。Saitoら, Int. Arch. Allergy Immunol., 107: 63 - 65, 1995に記載の方法によって、培養ヒト肥満細胞を得る。Moriyaらに記載のように、細胞を培養中に維持する。記載されるように(Moriya),感作のために、ヒト肥満細胞をヒトIgEおよび放射性標識アラキドン酸と一緒にインキュベートし、次いで、抗ヒトIgEで刺激する。

【0239】

(siRNA) 上記のようにsiRNAを設計する。GC含量に関する詳細な説明に記載の選択基準の遵守および連續した同一ヌクレオチドの文字列の排除に加えて、siRNAを、通常、Technical Bulletin # 003-Revision B, "siRNA Oligonucleotides for RNAi Applications", Dharmacron Research, Inc., Lafayette, CO 80026(RNA試薬の供給業者)に記載の原理にしたがって設計した。Technical Bulletins #003。げっ歯類細胞株および動物モデルにおける試験効率を高めるために、選択したsiRNAは、複数の種(例えば、ヒトおよび1つまたは複数のげっ歯類(例えば、マウス、ラット))で同一の配列部分に対応する。

【0240】

2'ACE保護化学を使用したDharmacron Research(Lafaye

10

20

30

40

50

t t e , C O) によって、全 s i R N A を合成する。製造者の説明書にしたがって s i R N A 鎮を脱保護し、等モル比で混合し、95 への加熱および35 までは30秒毎に1 、5 までは1分毎に1 のゆっくりとした温度低下によってアニーリングする。

【0241】

(s i R N A 投与) Li , L . ら , J Biol Chem. , 278 (7) : 47
25 - 4729 , 2003 に記載のようなリポソームトランスフェクションアプローチを使用して、 F C R I 鎮、 F C R I 鎮、 c - Kit 、 Lyn 、 Syk 、 ICOS 、
OX40L 、 CD40 、 CD80 、 CD86 、 RelA 、 RelB 、 4 - 1BB リガンド、
TLR1 、 TLR2 、 TLR3 、 TLR4 、 TLR5 、 TLR6 、 TLR7 、 TLR8
、 TLR9 、 CD83 、 SLAM 、共通 鎮、および COX - 2 (単独または組み合わせのいずれか) を標的化する s i R N A を含む s i R N A 組成物を、 RBL - 2H3 細胞、
ラット腹腔肥満細胞、およびヒト肥満細胞に導入する。あるいは、米国特許出願 60 / 4
46 、 377 号に記載のように、細胞に s i R N A をエレクトロポレーションする。
10

【0242】

(メディエーター放出の測定) Cunha - Melho , J . R . ら , J Immunol , 143 : 2617 - 2625 , 1989 、および Collado - Escobar , J Immunol. , 144 : 3449 - 3457 , 1990 に記載のように、
標識リン酸イノシトールおよびアラキドン酸および 5 - HT 全体の蓄積を決定した。ヒスタミンの放出を、酵素免疫アッセイによって決定する。 Moriyama に記載のように、
ペプチドロイコトリエン、プロスタグランジン、および TNF の放出の測定を、酵素免疫アッセイを使用して行う。本発明の s i R N A で処置した細胞中のこれらのメディエーターの1つまたは複数の放出の、 s i R N A で処置していない細胞の放出レベルに対する減少は、 s i R N A が肥満細胞応答の阻害および IgE 媒介性応答の減少および IgE 媒介性過敏症に関連する疾患または病状の徴候および症状の軽減に有効であることを示す。
類似の方法を使用して、 shRNA または RNAi ベクターを試験することができる。 s i R N A 、 shRNA 、または RNAi ベクターを、上記の任意の送達因子と組み合わせて投与することができる。
20

【0243】

(実施例 3 : マウスモデルにおける本発明の s i R N A の効果)

この実施例は、アレルギー性気道炎症および反応性亢進の代表的なマウスモデルにおける、肺の種々の炎症応答に対する特定の本発明の s i R N A の投与の効果の評価を記載する (Poynter , M . ら , Am . J Pathol . 160 (4) : 1325 - 1334 , 2002) 。
30

【0244】

6 週齢の雌 BALB / c マウスを、 Jackson Laboratories (Bar Harbor , ME) から購入し、収容し、標準的な条件下で維持する。マウスを、多数の群に分け、各群に下記の異なるプロトコールにしたがって s i R N A 組成物を投与する。以前に記載のように (Cieslewicz , G . ら , J Clin. Invest. , 104 : 301 - 308 , 1999 ; Takeda , T . ら , J Exp. Med. , 186 : 449 - 454 , 1997) 、 0 日目および 14 日目の腹腔内注射によって、各群のマウスに、 Alum (2.25 mg 、 Imject Alum , Pierce , Rockford , IL) と共に OVA (20 μg 、グレード V オボアルブミン、 Sigma , St . Louis , MO) を投与し、 21 、 22 、および 23 日目にエアゾール化 OVA で攻撃誘発する。腹腔内注射による致死量のペントバルビタールによってマウスを安樂死させる。
40

【0245】

F C R I 鎮、 F C R I 鎮、 c - Kit 、 Lyn 、 Syk 、 ICOS 、 OX40L 、 CD40 、 CD80 、 CD86 、 RelA 、 RelB 、 4 - 1BB リガンド、 TLR1 、 TLR2 、 TLR3 、 TLR4 、 TLR5 、 TLR6 、 TLR7 、 TLR8 、 TLR9 、 CD83 、 SLAM 、共通 鎮、および COX - 2 (単独または組み合わせのいずれ
50

か)を標的化する siRNA を含む siRNA 組成物を、抗原攻撃誘発に関して種々の異なる時間で個々のマウス群に投与する。例えば、いくつかの群に、抗原攻撃誘発の数週間前、数日前、または数時間前に siRNA 組成物を投与する。いくつかの群に、21日目、22日目、および/または23日目に siRNA 組成物を投与する。いくつかの群に、抗原攻撃誘発後に siRNA 組成物を投与する。特定の群に、種々の異なる経路(吸入、静脈内など)によって単回用量の siRNA を投与する一方で、他の群に種々の時間間隔によって分離した一連の処置を施す。種々の範囲の用量を使用する。これらの種々の処置スキームの有効性の比較により、最適な投与計画を選択可能である。

【0246】

一般に、任意の利用可能な経路(経口または静脈内が含まれる)を使用して、siRNA を送達することができる。しかし、アレルギー性鼻炎および喘息は、鼻腔路、上気道、および肺中の細胞による応答に関与するので、気道中の細胞に siRNA を送達する方法が注目される。多数の異なる方法(点滴注入、エアゾール(液体および乾燥粉末の両方)吸入、気管内投与、および静脈内注射が含まれる)を使用して、小分子薬物、タンパク質、およびDNA / ポリマー複合体をマウスの上気道および/または肺に送達した。点滴注入により、通常、マウスを軽度に麻酔し、垂直方向に直立させたままにした。少量(例えば、30 ~ 50 μL)の治療薬(すなわち、下記の siRNA または siRNA / ポリマー複合体)を、流体が吸入される一方の鼻腔にゆっくりと適用する(Densmore, C. L. ら, Mol. Therapy 1 : 180 - 188, 1999)。動物を短時間直立させたままにして、点滴注入した流体を肺に到達させる(Arppé, J. ら, Int'l. J. Pharm. 161 : 205 - 214, 1998)。点滴注入は上気道および肺の両方への治療薬の送達に有効であり、同一マウスに対して複数回繰り返すことができる。

【0247】

エアゾールによって、通常、液体および乾燥粉末は異なる方法で適用される。液体エアゾールは、マウスがおかれた密封プラスチックケージ中に噴霧器によって生成される(Densmoreら)。エアゾールは、動物の呼吸によって吸入されるので、この方法は非効率かつ不正確であり得る。乾燥粉末エアゾールは、通常、麻酔マウスに対する強制換気によって投与される。エアゾール粒子が巨大かつ多孔質である限り、この方法は、非常に有効であり得る(以下を参照のこと)(Edwards, D. A. ら, Science 276 : 1868 - 1871, 1997)。気管内投与のためには、治療薬を含む溶液を、チューブを介して麻酔したマウスの肺に注入する(Griesenbach, U. ら, Gene Ther. 5 : 181 - 188, 1998)。これは、肺への送達には非常に有効であるが、上気道では失敗する。タンパク質およびポリエチレンイミンと複合体形成した少量のDNA(約1 μg)の静脈内注射は、肺の上皮細胞および間質組織中の細胞をトランスフェクトすることが示されている(Orson, F. M. ら, Gene Therapy 9 : 463 - 471, 2002)。

【0248】

抗原攻撃誘発の48時間後の気管支肺胞洗浄(BAL)の実施および洗浄液中に存在する炎症細胞数の測定によって気道炎症を評価する。簡単に述べれば、点滴注入による安樂死の直後にBALを回収し、800 μLの0.9%NaClで回復させる。BAL中の総細胞を計数し、 2×10^4 細胞をガラススライド上で800 rpmにて遠心分離する。Cytospinを、Hema32キット(Biochemical Sciences, Inc., Swedesboro, NJ)を使用して染色し、500細胞について示差的細胞計数を行う。異なる siRNA および種々の処置プロトコールによって処置したマウス由来の BAL 中のマクロファージ数、好酸球数、好中球数、およびリンパ球数を、異なる群間で比較し、かつ siRNA を受容していないコントロール(ビヒクルのみ)または関連のない siRNA を受容したコントロールと比較する。いくつかの動物では、BALを行なうよりもむしろ、肺を取り出し、PBSで洗浄し、10%ホルマリン中で固定し、H&Eで染色する。細胞数を、視覚的に計数する。本発明の siRNA で処置したマウスに

10

20

30

40

50

由来する B A L または肺切片中のマクロファージ数、好酸球数、好中球数、および / またはリンパ球数の、処置していないマウス中の数に対する減少は、その s i R N A が有効であることを示す。 s i R N A を受容していないか関連のない s i R N A を受容したマウスで認められる粘液の多量の細胞質内蓄積および増殖性円柱上皮細胞の存在に対する、本発明の s i R N A で処置したマウスにおける粘液蓄積の減少および少数の立方細胞の存在は、その s i R N A が I g E 媒介性応答の減少ならびに I g E 媒介性過敏症に関連する疾患または病状の徵候および症状の減少において有効であることを示す。

【 0 2 4 9 】

より慢性の応答を、上記で引用した T e m e l k o v s k i らおよび F o s t e r , P . S . ら , L a b I n v e s t . , 8 2 (4) : 4 5 5 - 4 6 2 , 2 0 0 2 に記載の慢性喘息炎症の改良マウスモデル（これらの引用文献においては、感作マウスは、低レベルの O V A による慢性吸入攻撃誘発に供される）を使用して評価する。このプロトコールに供したいくつかの群では、慢性吸入攻撃誘発中に間隔をあけて s i R N A 処置を行う一方で、別の群では、最初の抗原攻撃誘発前または数日後までのみに s i R N A 処置を行う。上皮下線維症、気道上皮の肥大、および肺気道の粘液細胞過形成 / 異常形成などの慢性炎症の指標を、 F o s t e r らに記載のように評価する。本発明の s i R N A で処置したマウスにおける上皮下線維症、気道上皮の肥大、および肺気道の粘液細胞過形成 / 異常形成の、 s i R N A を受容していないか関連のない s i R N A を受容したマウスで観察されるレベルに対する減少の程度は、その s i R N A が I g E 媒介性応答ならびに I g E 媒介性過敏症に関連する疾患または病状の徵候および症状の軽減に有効であることを示す。

【 0 2 5 0 】

O V A に特異的な血清 I g E を、標準的技術を使用して測定する。本発明の s i R N A で処置したマウスにおける O V A 特異的血清 I g E レベルの、 s i R N A を受容していないか関連のない s i R N A を受容したマウスにおける O V A 特異的血清 I g E レベルに対する低下は、その s i R N A が I g E 媒介性応答ならびに I g E 媒介性過敏症に関連する疾患または病状の徵候および症状の軽減に有効であることを示す。

【 0 2 5 1 】

肺機能を以下のように評価する。マウスを、ペントバルビタールで麻酔する。 I r v i n , C . G . ら , A m . J P h y s i o l . , 2 7 2 : L 1 0 5 3 - 1 0 5 8 , 1 9 9 7 に記載のように、各群由来の気管切開マウスを、肺機能の評価のために機械的に換気する。以前に記載のように (T a k e d a ら) 、圧力、流れ、および体積を使用して、吸入用量のエアゾール化メタコリンによる攻撃誘発後の肺耐性を計算する。処置していないマウスにおける肺耐性に対する本発明の s i R N A で処置したマウスにおける肺耐性レベルの低下は、その s i R N A が I g E 媒介性応答ならびに I g E 媒介性過敏症に関連する疾患または病状の徵候および症状の軽減に有効であることを示す。あるいは、 H a n s e n , G . ら , J C l i n . I n v e s t . , 1 0 3 : 1 7 5 - 1 8 3 , 1 9 9 9 に記載の全身プレチスマグラフにおかれた覚醒マウスにおけるメタコリン誘導性気道閉塞の測定によって気道応答を評価する。類似の方法を使用して、 s h R N A ベクターまたは R N A i ベクターを試験することができる。上述の s i R N A 、 s h R N A 、または R N A i ベクターを、上記の任意の送達因子と組み合わせて投与することができる。

【 0 2 5 2 】

（実施例 4 : R N A i 因子の細胞取り込みを容易にする送達因子の評価）

本実施例は、種々の送達因子の、 R N A i 因子の細胞取り込みを増強する能力についての試験を記載する。

【 0 2 5 3 】

（カチオン性ポリマー） カチオン性ポリマーが D N A の細胞内取り込みを促進する能力は、 D N A と結合して、巨大なプラスミド D N A 分子をより有効なエンドサイトシスのためのより小さな D N A / ポリマー複合体に縮合する能力に部分的に由来すると考えられる。 s i R N A 二重鎖は、約 2 1 ヌクレオチド長でしかなく、おそらくさらにより縮合することはできないことが示唆される。しかし、カチオン性ポリマーが負電荷の s i R N

10

20

30

40

50

Aと結合して負電荷の細胞表面と相互作用する能力により、s i R N Aの細胞内取り込みを容易にすることができる。したがって、s i R N Aトランスフェクションにおける公知のカチオン性ポリマー（イミダゾール基修飾P L L（17）、ポリエチレンイミン（P E I）（22）、ポリビニルピロリドン（P V P）（23）、およびキトサン（24, 25）が挙げられるが、これらに限定されない）の能力を調査する。

【0254】

さらに、R o b e r t L a n g e r の研究室で開発された新規のカチオン性ポリマーおよびオリゴマーを調査する。D N Aトランスフェクションにおけるジアクリレート単量体およびアミン単量体由来の新規のカチオン性ポリマーおよびオリゴマーの巨大ライブラーを合成および試験するための有効な戦略は、L a n g e r および共同研究者によって開発された。これらのポリマーを、本明細書中で、ポリ（-アミノエスチル）（P A E）ポリマーという。その最初の「原理の証明（p r o o f - o f - p r i n c i p l e）」研究では、7個のジアクリレート単量体および20個のアミン単量体から140個のポリマーのライブラーを合成した（19）。140個のメンバーのうち、70個が十分な水溶性を示すことが見出された（2 m g / m l、25 m M酢酸緩衝液、p H = 5.0）。70個の水溶性ポリマーのうちの56個が、電気泳動移動度の変化によって示されるよう、D N Aと相互作用した。より重要には、56個のポリマーのうちの2個がC O S - 7細胞へのD N Aトランスフェクションを媒介した。新規のポリマーのトランスフェクション効率は、P E Iより4~8倍高く、リポフェクタミン2000と同等かそれ以上であった。

10

20

30

40

【0255】

最初の研究から、より巨大な群を構築し、2, 400個のカチオン性ポリマーのライブラーをスクリーニングし、有効なD N Aトランスフェクションを促進する別の約40個のポリマーを得た（D . A n d e r s o n およびR . L a n g e r 、私信）。構造のはらつきはD N A結合およびトランスフェクション効率に有意に影響を与えるので（18）、s i R N Aの細胞内取り込みを促進する能力について多数のポリマーを試験することが好ましい。さらに、インビボ系への移行中に、特定のポリマーがインビボでの性能、吸収、分布、代謝、および排出（A D M E）の研究結果として排除され得る可能性がある。したがって、インビボ試験は重要である。

【0256】

まとめると、少なくとも約50個のカチオンポリマーを、s i R N Aトランスフェクション実験で試験する。上記のように、これらのほとんどはP A Eおよびイミダゾール基修飾P L Lである。P E I、P V P、およびキトサンを、業者から購入する。これらのポリマーを迅速かつ効率よくスクリーニングするために、首尾よく細胞をトランスフェクトするP A Eポリマーのライブラーを、96ウェルプレート中の溶液に予め移す。この標準的な96ウェル形式でのポリマーの保存により、滅菌L a b c y t e E D R 384 S / 96 Sマイクロピベッターロボットを使用して半自動化スクリーニングを容易に開発することが可能である。適切なポリマー-s i R N A比および最も効率的な送達条件を規定するために、ポリマー量を適定する（所定量のs i R N Aを使用する）。下記のように、特定のアッセイに依存して、半自動化スクリーニングはわずかに異なる。

【0257】

（s i R N A / ポリマー複合体の特徴付け） s i R N Aの細胞内取り込みを容易にするための種々のカチオン性ポリマーについて、これらは、s i R N Aと複合体を形成し得るべきである。（19）に記載のプロトコールと類似のプロトコールに従った電気泳動移動度シフトアッセイ（E M S A）によってこの問題を試験する。簡単に述べれば、上記で考察した任意のタンパク質（F C R I 鎖、F C R I 鎖、c - K i t 、L y n 、S y k 、I C O S 、O X 4 0 L 、C D 4 0 、C D 8 0 、C D 8 6 、R e l A 、R e l B 、4 - 1 B B リガンド、T L R 1 、T L R 2 、T L R 3 、T L R 4 、T L R 5 、T L R 6 、T L R 7 、T L R 8 、T L R 9 、C D 8 3 、S L A M 、共通鎖、およびC O X - 2 ）をコードする転写物を標的化するs i R N Aを、マイクロピベッターロボットを使用して、9

50

6 ウェルプレート中で約 50 個のポリマーの各々と 1 : 0 . 1 、 1 : 0 . 3 、 1 : 0 . 9 、 1 : 2 . 7 、 1 : 8 . 1 、 および 1 : 2 4 . 3 の比 (s i R N A / ポリマー、 w / w) で混合する。混合物を、マルチチャネルピッパーを使用して、500 サンプルまでアッセイできる 4 % アガロースゲルスラブ (s l a b) にロードする。 s i R N A の移動パターンを、臭化エチジウム染色によって視覚化する。ポリマーの存在下で s i R N A の移動度が減少する場合、 s i R N A はポリマーと複合体を形成している。 s i R N A - ポリマー比に基づいて、中和比 (n e u t r a l i z i n g r a t i o) を同定することが可能であり得る。種々のカチオン性ポリマーは、 D N A と複合体を形成することが示されているので、それらは s i R N A と複合体を形成することが予想される。 s i R N A と結合しないポリマーはあまり好ましくなく、さらなる実験は s i R N A と結合するポリマーに注目する。

【 0 2 5 8 】

イミダゾール基修飾 P L L 、 P E I 、 P V P 、キトサン、およびいくつかの P A E ポリマーの細胞傷害性を、細胞株中で単独または D N A との複合体で測定した。細胞傷害性は結合した分子に依存して変化するため、 s i R N A との複合体形成した種々のポリマーの細胞傷害性を、種々の細胞中（例えば、上皮細胞株、肥満細胞株、 T 細胞株、 D C 細胞株）で測定する。適切な細胞株には、例えば、 M D C K 細胞が含まれる。簡単に述べれば、滅菌 L a b c y t e マイクロピッターロボットを使用して、 s i R N A を種々の量の上記ポリマーと混合する。複合体を、 96 ウェルプレート中で上皮細胞に 4 時間適用する。次いで、ポリマー含有培地を、通常の増殖培地と交換する。 24 時間後、細胞の代謝活性を、 M T T アッセイ (26) を使用して 96 ウェル形式で測定する。 s i R N A / ポリマー複合体の細胞傷害性は D N A / ポリマー複合体の細胞傷害性と類似すると予想される。最も低い使用量で 90 % またはそれ以上の細胞を死滅させるポリマーはあまり好ましくなく、さらなる調査は、最も低い使用量で 90 % を超える細胞を死滅させないポリマーに注目する。

【 0 2 5 9 】

培養細胞による s i R N A 取り込み。一旦 s i R N A / ポリマー複合体が特徴づけられた場合、それらの s i R N A の細胞取り込みを促進する能力を試験する。この試験は、 2 つの異なるアッセイ系を使用して培養細胞から開始する。蛍光強度の測定によって G F P 発現が容易に定量されるため、第 1 のアプローチでは、 G F P 発現細胞における G F P 発現に対する本明細書中で G F P - 949 と呼ばれる G F P 特異的 s i R N A (センス : 5 ' - G G C U A C G U C C A G G A G C G C A U U - 3 ' (配列番号 320) ; アンチセンス : 5 ' - U G C G C U C C U G G A C G U A G C C U U - 3 ' (配列番号 321)) の効果を測定する。簡単に述べれば、上記と同一の比率の G F P - 949 / ポリマーを、 96 ウェルプレート中の細胞に適用する。種々の異なる細胞型を使用することができる。便宜上、 M D C K 細胞など十分に特徴づけられている細胞株を使用することができる。他の適切な細胞には、肥満細胞株、樹状細胞株などが挙げられる。ネガティブコントロールとして、 s i R N A を含まないか任意の試験 s i R N A と配列が無関係の s i R N A を使用する。ポジティブコントロールとして、エレクトロポレーションによって G F P - 949 を細胞に導入する。 36 時間後、細胞を 96 ウェルプレート中で溶解し、溶解物の蛍光強度を蛍光プレートリーダーによって測定する。種々のポリマーの s i R N A の細胞取り込みを促進する能力は、 G F P 強度の全体的減少によって示される。あるいは、細胞を、 96 ウェル形式でサンプルを取扱うように装備されたフローサイトメトリーを使用して、 G F P 発現について分析する。種々のポリマーが s i R N A の細胞取り込みを促進する能力を、 G F P 強度が減少した細胞のパーセンテージおよび G F P 強度の減少程度によって示す。これらのアッセイ由来の結果により、最も効率的なトランスフェクションに最適な s i R N A : ポリマー比が明らかになる。

【 0 2 6 0 】

第 2 のアプローチでは、肥満細胞活性の阻害を直接測定する。上記のように、種々の比率での s i R N A / ポリマー（例えば、 F c R I 鎖、 F C R I 鎖、 c - K i t 、

10

20

30

40

50

Lyn、Sykなどを標的化する siRNA)を、96ウェルプレート中で肥満細胞に適用する。ポジティブコントロールとして、トランスフェクションまたはエレクトロポレーションによってsiRNAを導入する。ネガティブコントロールとして、GFP-949などの無関係のsiRNAを使用するか、siRNAを使用しない。

【0261】

siRNA / ポリマーで処置した肥満細胞培養物において、処置していないものよりメディエーター放出が実質的に低い場合、このポリマーがsiRNAトランスフェクションを促進すると結論づける。トランスフェクションまたはエレクトロポレーションによってsiRNAが導入された培養物中のメディエーター放出の比較により、siRNAおよびsiRNA / ポリマー組成物の相対トランスフェクション効率を評価する。

10

【0262】

最初の2つのスクリーニングからの最も有効なカチオン性ポリマーを、siRNAおよびポリマーの両方の滴定によって96ウェルプレートにおけるウイルス感染アッセイにおいて検証する。得られた結果に基づいて、最も有効なsiRNA : ポリマー比での多数の最も有効なポリマーの能力を、24ウェルプレートおよび6ウェルプレートにてMDCK細胞および / または肥満細胞でさらに分析する。多数の最も有効なポリマーを、実施例5に記載のマウスでのさらなる研究のために選択する。

【0263】

(他の送達因子) 培養細胞へのsiRNAの細胞内取り込みの有効な促進のための別のカチオン性ポリマーとして、アルギニンリッチペプチドを、siRNAトランスフェクション実験で調査する。ARPが負電荷のリン脂質との相互作用によって原形質膜を直接透過すると考えられるのに対して(33)、ほとんどの現在使用されているカチオン性ポリマーはエンドサイトーシスによるDNAの細胞取り込みを促進すると考えられるため、ARPのsiRNA細胞内取り込みの促進効率を調査する。カチオン性ポリマーと同様に、ARPおよびポリアルギニン(PLA)も正に荷電し、siRNAに結合することができる可能性が高く、ARPまたはPLAへのsiRNAの共有結合はおそらく必要ないことが示唆される。したがって、ARPまたはPLAを、他のカチオン性ポリマーと同様に処理する。Tatおよび異なる長さのPLA(Sigmaから入手される)由来のARPがsiRNAの細胞取り込みを促進する能力を、上記のように決定する。

20

【0264】

(実施例5:マウスにおけるsiRNAおよびsiRNA / キャリア組成物の試験) 同定されたポリマーがマウスの気道中の細胞によるsiRNA取り込みを促進する能力を、米国特許出願番号10/674,159号に記載のように評価し、マウスにおけるアレルギーおよび喘息の徴候および症状の防止および処置における、siRNA / キャリア組成物(siRNA / ポリマー組成物、siRNA / カチオン性ポリマー組成物、siRNA / アルギニンリッチペプチド組成物など)の有効性を、実施例3に記載のように試験する。マウスにおけるこのような徴候および / または症状のsiRNA阻害の証明により、例えば、siRNAの鼻腔内投与または肺投与によってアレルギー性鼻炎および / または喘息を予防または処置するためのヒトにおける潜在的用途に関する証拠が得られる。類似の方法を使用して、shRNAまたはRNAiベクターを試験することができる。siRNA、shRNA、またはRNAiベクターを、上記の任意の送達因子と組み合わせて投与することができる。

30

【0265】

(実施例6:DNAベクターから転写された本発明のshRNAの効果) 有効なsiRNA療法は、インビオで適切な細胞に十分な量のsiRNAを送達する能力に依存する。上記アプローチの代わりとして、siRNA前駆体を転写して有効なsiRNAにプロセシングするDNAベクターを使用することができる。

40

【0266】

本発明者らは、以前に、DNAベクターから転写されたRNAi因子が同一細胞に導入された合成siRNAと同程度にCD8発現を阻害することができることを示した。詳

50

細には、本発明者らは、マウス CD8⁺CD4⁺T細胞株においてCD8-61と呼ばれるCD8遺伝子を標的化するように設計された5つのsiRNAのうちの1つがCD8を阻害するが、CD4発現を阻害しないことを見出した(12)。CD8-61 siRNAの種々のヘアピン誘導体の試験により、本発明者らは、CD8-61FがCD8-61と類似の阻害活性を有することを見出した(44)。CD8-61FをpSLOOP III(H1 RNAプロモーターによって転写が駆動されるDNAベクター)に構築し、プラスミドpSLOOP III-CD8-61Fを得た。H1 RNAプロモーターは小型であり(45)、ポリメラーゼIII(po1 III)によって転写される。Po1 IIIプロモーターを使用した、なぜならこれは、通常小さなRNAを転写し、以前にsiRNA型サイレンシングを行うために使用されていたからである(46)。DNAベクターを試験するために、本発明者らは、CD8発現ベクターでトランスフェクトされているHeLa細胞を使用した。pSLOOP III-CD8-61FプラスミドのCD8発現HeLa細胞への一過性トランスフェクションにより、合成CD8-61 siRNAでトランスフェクトしたHeLa細胞と同程度までCD8発現を減少させた。対照的に、プロモーターのない(promoter-less)ベクターのトランスフェクションでは、CD8発現は有意に減少されなかった。これらの結果は、DNAベクターからRNAヘアピンを転写し、RNAサイレンシングのためのsiRNAへとプロセシングすることができることを示す。類似のアプローチを使用して、本明細書中に記載の転写物(例えば、FC RI鎖、FC RI鎖、c-Kit、Lyn、Syk、ICOS、OX40L、CD40、CD80、CD86、RelA、RelB、4-1BBリガンド、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、CD83、SLAM、共通鎖、およびCOX-2をコードする転写物)に特異的なsiRNA前駆体を発現するDNAベクターを設計することができる。

【0267】

(培養細胞および動物モデルにおけるDNAベクターから転写したshRNAから生成されたsiRNAの研究) DNAベクターからsiRNA前駆体を発現するために、siRNA二重鎖へとプロセシングすることができるsiRNAのヘアピン誘導体(標的転写物に特異的)を同定する。例えば、図7Aは、HFc_R-338およびGFP-949 siRNAならびにそのヘアピン誘導体/前駆体の模式図を示す。類似のヘアピン誘導体/前駆体を、本明細書中に記載の任意の本発明のsiRNAのために構築することができる。(shRNAの設計が対応するsiRNA(すなわち、同一または実質的に同一の二重鎖部分を有するsiRNA)の設計に基づき得る(すなわち、由来し得る)ため、shRNAを対応するsiRNAの「誘導体」ということができることに留意のこと。しかし、細胞内で、shRNAは対応するsiRNAの「前駆体」として機能する(すなわち、ヘアピンがプロセシングされて対応するsiRNAが生成する)。したがって、当業者に明らかなように、この用語を、文脈に依存して交換可能または代替的に使用することができる)。図7Bは、2つの異なる順序でのHFc_R-338およびGFP-949 Hのヘアピタンデムアレイを示す。類似のヘアピタンデムアレイを、本明細書中に記載の任意の本発明のsiRNAのために構築することができる(すなわち、任意の2つの本発明のsiRNAを1つのヘアピタンデムアレイに組み込むことができる)。

【0268】

図7Cは、pSLOOP III発現ベクターを示す。siRNAのヘアピン誘導体/前駆体を、pSLOOP IIIに、ベクターのみで(上)、タンデムアレイ中に(中央)、または独立プロモーターおよび終結配列と同時に(下)クローン化する。さらに、2つまたはそれ以上のsiRNA前駆体を転写することができるベクターを产生する。米国特許出願番号10/674,159号における記載と同一の一般的アプローチを使用する(siRNAヘアピン誘導体を、インフルエンザウイルス産生を阻害する能力について試験するのではなく、siRNAヘアピン誘導体を、マウスまたは他の動物モデルにおいて肥満細胞応答(例えば、メディエーター放出)、T細胞応答、IgE産生、および/またはIgE媒介性過敏症の徴候および症状を阻害する能力について試験するということ)を除

10

20

30

40

50

く)。

【0269】

(等価物)

当業者は、慣習的実験のみを使用して、本明細書中に記載の本発明の特定の実施形態の多数の等価物を認識するか、または確認することができる。本発明の範囲は、上記説明に制限されることを意図しない、むしろ本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲に記載事項に示される。

【0270】

【化1】

参考文献

10

20

1. Vaucheret, H., C. Beclin, and M. Fagard. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 114:3083-3091.
2. Sharp, P.A. 2001. RNA interference-2001. *Genes Dev.* 15:485-490.
3. Brantl, S. 2002. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochem. Biophys. Acta* 1575:15-25.
4. Baulcombe, D. 2002. RNA silencing. *Curr. Biol.* 12:R82-R84.
5. Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and M. C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
6. Elbashir, S., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.

【0271】

【化2】

7. McManus, M.T., and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by short interfering RNAs. *Nature Rev. Gene.* 3:737-747.
8. Kumar, M., and G.G. Carmichael. 1998. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1415-1434.
9. Gitlin, L., S. Karelsky, and R. Andino. 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418:430-434.
10. 10. Pderoso de Lima, M.C., S. Simoes, P. Pires, H. Faneca, and N. Duzgunes. 2001. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47:277-294.
11. 11. Holen, T., M. Amarzguioui, M.T. Wiiger, E. Babaie, and H. Prydz. 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acids Res.* 30:1757-1766.
12. 12. McManus, M.T., B.B. Haines, C.P. Dillon, C.E. Whitehurst, L. Van Parijs, J. Chen, and P.A. Sharp. 2002. siRNA-mediated gene silencing in T-lymphocytes. *J. Immunol.* Nov 15;169(10):5754-60.
13. 13. Elbashir, S.M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20:6877-6888.
14. 14. Yang, D., H. Lu, and J.W. Erickson. 2000. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* 10:1191-1200.
15. 15. Caplen, N.J., J. Fleenor, A. Fire, and R.A. Morgan. 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RAN interference. *Gene* 252:95-105.
16. 16. Edwards, D.A., J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan, and R. Langer. 1997. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* 276:1868-1871.
17. 17. Putnam, D., C.A. Gentry, D.W. Pack, and R. Langer. 2000. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1200-1205.
18. 18. Lynn, D.M., and R. Langer. 2000. Degradable Poly(-amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 122:10761-10768.

【0 2 7 2】

【化3】

19. Lynn, D.M., D.G. Anderson, D. Putnam, and R. Langer. 2001. Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: parallel synthesis and screening of a degradable polymer library. *J. Am. Chem. Soc.* 123:8155-8156.
20. Han, S.-O., R.I. Mahato, Y.K. Sung, and S.W. Kim. 2000. Development of Biomaterials for gene therapy. *Mol. Therapy* 2:302-317.
21. Soane, R.J., M. Frier, A.C. Perkins, N.S. Jones, S.S. Davis, and L. Illum. 1999. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.* 178:55-65. 10
22. Boussif, O., F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7297-7301.
23. Astafieva, I., I. Maksimova, E. Lukyanin, V. Alakhov, and A. Kabanov. 1996. Enhancement of the polycation-mediated DNA uptake and cell transfection with Pluronic P85 block copolymer. *FESB Lett.* 389:278-280. 20
24. Davis, S.S. 1999. Delivery of peptide and non-peptide drugs through the respiratory tract. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2:450-457.
25. Roy, K., H.-Q. Mao, S.-K. Huang, and K.W. Leong. 1999. Oral delivery with chitosan/DNA nanoparticles generates immunologic protection in murine model of peanut allergic rhinitis. *Nat. Med.* 5:387-391.
26. Hansen, M.B., S.E. Nielsen, and K. Berg. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119:203-210. 30
27. Green, M., and P.M. Loewenstein. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55:1179-1188.
28. Frankel, A.D., and C.O. Pabo. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189-1193.
29. Elliott, G., and P. O'Hare. 1997. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88:223-233.
30. Joliot, A., C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, and A. Prochiantz. 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868. 40

【化4】

31. Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, and J. Barsoum. 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:664-668.
32. Schwarze, S.R., A. Ho, A. Vocero-Akbani, and S.F. Dowdy. 1999. In vivo protein transduction:delivery of a biologically active protein. *Science* 285:1569-1572.
33. Derossi, D., G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1998. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8:84-87. 10
34. Troy, C.M., D. Derossi, A. Prochiantz, L.A. Greene, and M.L. Shelanski. 1996. Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J. Neurosci.* 16:253-261.
35. Allinquant, B., P. Hantraye, P. Mailleux, K. Moya, C. Bouillot, and A. Prochiantz. 1995. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J. Cell Biol.* 128:919-927.
36. Futaki, S., T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, and Y. Sugiura. 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276:5836-5840. 20
37. Densmore, C.L., F.M. Orson, B. Xu, B.M. Kinsey, J.C. Waldrep, P. Hua, B. Bhogal, and V. Knight. 1999. Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol. Therapy* 1:180-188.
38. Arppe, J., M. Widgred, and J.C. Waldrep. 1998. Pulmonary pharmacokinetics of cyclosporin A liposomes. *Intl. J. Pharm.* 161:205-214.
39. Griesenbach, U., A. chonn, R. Cassady, V. Hannam, C. Ackerley, M. Post, A.K. Transwell, K. Olek, H. O'Brodovich, and L.-C. Tsui. 1998. Comparison between intratracheal and intravenous administration of liposome-DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy. *Gene Ther.* 5:181-188. 30
40. Orson, F.M., L. Song, A. Gautam, C.L. DEnsmore, B. Bhogal, and B.M. Kinsey. 2002. Gene delivery to the lung using protein/polyethyleneimine/plasmid complexes. *Gene Therapy* 9:463-471.
41. Gautam, A., C.L. DEnsmore, E. Golunski, B. Xu, and J.C. Waldrep. 2001. 40 Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol. Therapy* 3:551-556.

【0 2 7 4】

【化5】

42. Tabata, Y., and Y. Ikada. 1988. Effect of size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *J. Biomed. Mater. Res.* 22:837-842.
43. Vanbever, R., J.D. Mintzes, J. Wang, J. Nice, D. chen, R. Batycky, L. R., and D.A. Edwards. 1999. Formulation and physcial characterization of large porous particles for inhalation. *Pharmaceutical Res.* 16:1735-1742.
44. McManus, M.T., C.P. Peterson, B.B. Haines, J. Chen, and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* 8:842-850. 10
45. Myslinski, E., J.C. Ame, A. Krol, and P. Carbon. 2001. An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1 RNA gene. *Nucleic Acids Res.* 29:2502-2509.
46. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.
47. Paddison, P.J., A.A. Caudy, E. Bernstein, G.J. Hannon, and D.S. Conklin. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-sepcific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16:948-958. 20
48. Gil, J., and M. Esteban. 2000. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5:107-114.
49. Bitko, V., and S. Barik. 2001. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetic of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.* 1:34-43.
50. Garcia-Sastre, A. (2002) *Microbes & Inf.* 4, 647-655.
51. Katze, M. G., He, Y. & Gale Jr., M. (2002) *Nature Rev. Immunol.* 2, 675-687. 30
52. Diaz, M. O., Ziemin, S., Le Beau, M. M., Pitha, P., Smith, S. D., Chilcote, R. R. & Rowley, J. D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5259-5263.
53. Diaz, M. O., Pomykala, H. M., Bohlander, S. K., Maltepe, E., Malik, K., Brownstein, B. & Olopade, O. I. (1994) *Genomics* 22, 540-552.
54. Kim, M.-J., Latham, A. G. & Krug, R. M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10096-10101.
55. Medcalf, L., Poole, E., Elton, D. & Digard, P. (1999) *J. Virol.* 73, 7349-7356.
56. Shapiro, G. I. & Krug, R. M. (1988) *J. Virol.* 62, 2285-2290. 40
57. Beaton, A. R. & Krug, R. M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6282-6286.

【図面の簡単な説明】

【0275】

【図1】図1は、ショウジョウバエ系で認められるsiRNAの構造を示す。

【図2】図2は、ショウジョウバエにおけるRNA干渉に関する工程の略図を示す。

【図3】図3は、本発明で有用な種々の例示的RNAi因子の構造を示す。

【図4】図4は、Dicer酵素がシステム中に塩基ミスマッチを有する基質を切断して標的転写物の3'UTRに結合して翻訳を阻害する阻害産物を生成する別の阻害経路(マイ

クロ RNA 翻訳抑制経路) の図である。

【図 5】図 5 は、本発明の siRNA の両鎖を転写するために使用され得る構築物の一例を示す。

【図 6】図 6 は、ハイブリダイズして本発明の shRNA を形成する 1 つの RNA 分子を転写するために使用され得る構築物の一例を示す。

【図 7 A】図 7 A は、HFc R - 338 および GFP - 949 siRNA ならびにそのヘアピン誘導体 / 前駆体の略図を示す。

【図 7 B】図 7 B は、2 つの異なる順序での HFc R - 338H および GFP - 949H のタンデムアレイを示す。

【図 7 C】図 7 C は、pSLOOP III 発現ベクターを示す。 siRNA のヘアピン前駆体(すなわち、shRNA 配列)を、pSLOOP III ベクターのみ(上)、タンデムアレイ(中央)、または独立プロモーターおよび終結配列と同時に(下)クローニングする。
10

【図 1】

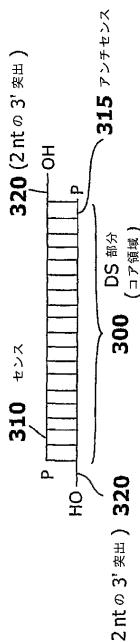


FIGURE 1

【図 2】

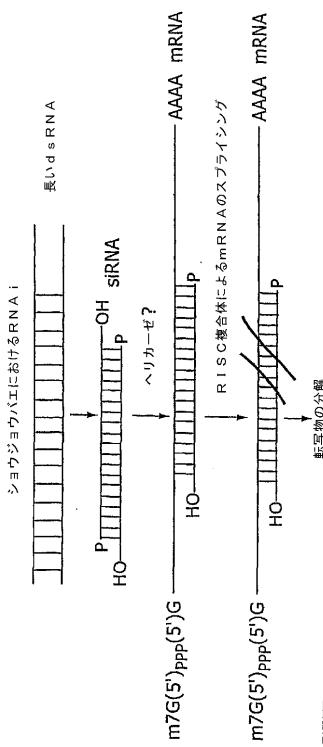


FIGURE 2

【図3】

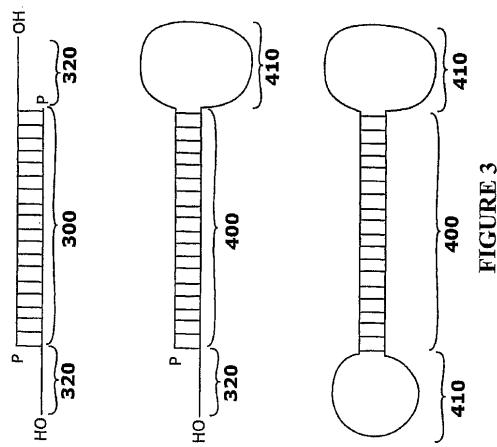


FIGURE 3

【図4】

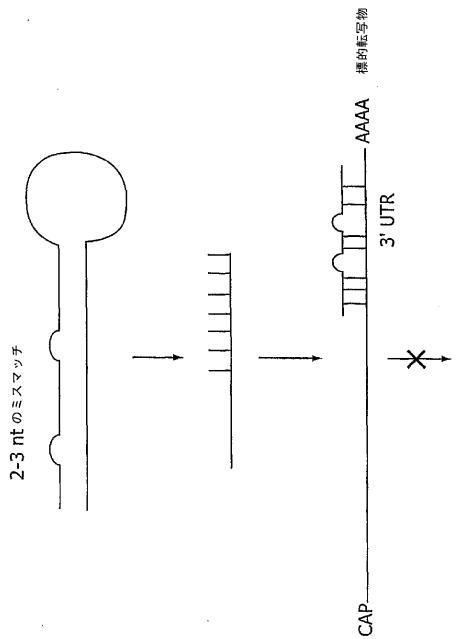


FIGURE 4

【図5】

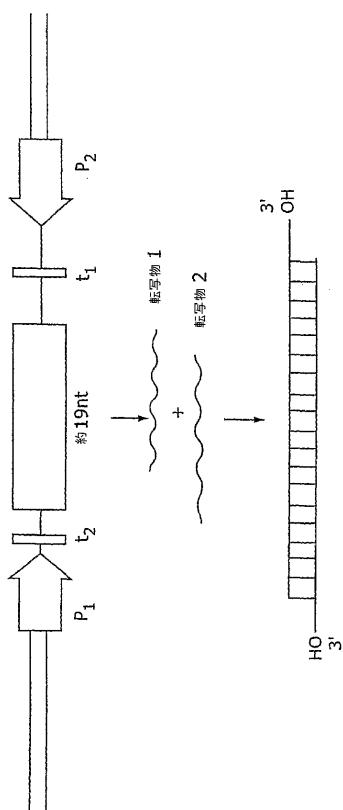


FIGURE 5

【図6】

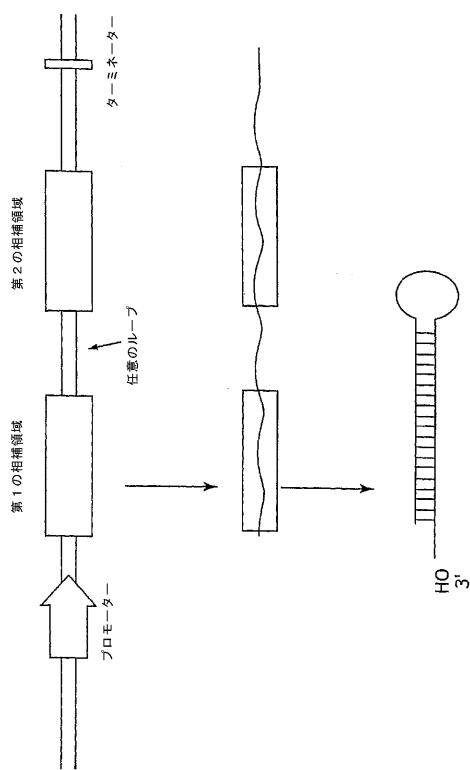


FIGURE 6

【 図 7 A 】

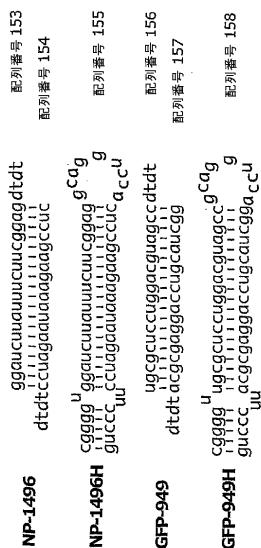


FIGURE 7A

【 図 7 B 】

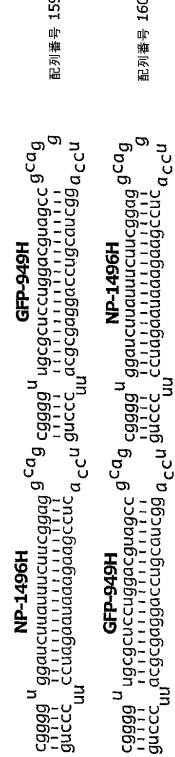


FIGURE 7B

【 図 7 C 】

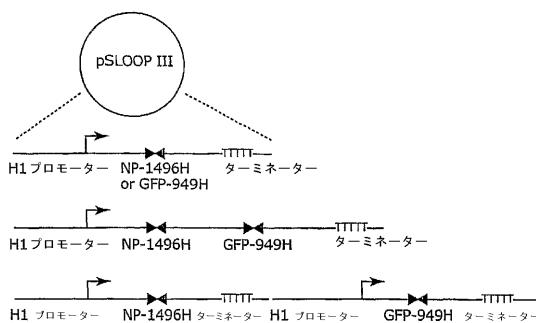


FIGURE 7C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/006445

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/11 A61K31/713 A61P11/00 A61P11/06

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)
C12N A61K

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)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI LIXIN ET AL: "RasGRP4 regulates the expression of prostaglandin D2 in human and rat mast cell lines." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 7, 14 February 2003 (2003-02-14), pages 4725-4729, XP002351946 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1,2,14, 15,18,19
Y	WO 96/37605 A (SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATION; PIROTKZY, EDUARDO;) 28 November 1996 (1996-11-28) the whole document	1-19,21, 22, 48-82, 86-116

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "Q" 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

1 November 2005

Date of mailing of the international search report

03 JAN 2006

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/006445

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/081628 A (RIBOZYME PHARMACEUTICALS, INCORPORATED; BLATT, LAWRENCE; CHOWRIRA, BHA) 17 October 2002 (2002-10-17) page 20 - page 21 page 31 - page 32 page 47, line 15 - line 17 example 1	1,2, 12-15, 17-19
Y	-----	1-19,21, 22, 48-82, 86-116
X	WO 03/099298 A (MAX-PLANCK GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.; TUSCHL,) 4 December 2003 (2003-12-04) page 19 - page 20 page 22 page 29 - page 37	1,2,14, 15,18,19
X	WO 01/48190 A (EXIQON A/S; ORUM, HENRIK; KOCH, TROEL; SKOUV, JAN; JAKOBSEN, MOGEN, HA) 5 July 2001 (2001-07-05) examples	1-3,5-11
A	DENSMORE C L ET AL: "AEROSOL DELIVERY OF ROBUST POLYETHYLENEIMINE-DNA COMPLEXES FOR GENETHERAPY AND GENETIC IMMUNIZATION". MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA,, US, vol. 1, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 180-188; XP002943396 ISSN: 1525-0016 cited in the application	-----
A	WO 99/60166 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC; BENNETT, CLARENCE, FRANK; ECKER, DAVID, J;) 25 November 1999 (1999-11-25)	-----
A	ARENZ CHRISTOPH ET AL: "RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application?" NATURWISSENSCHAFTEN, vol. 90, no. 8, August 2003 (2003-08), pages 345-359; XP002324624 ISSN: 0028-1042	-----
E	WO 2005/080410 A (GENESIS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION LIMITED; WATSON, JAMES, D) 1 September 2005 (2005-09-01) the whole document	1-19,21, 22, 48-82, 86-116

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/006445

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 14-17, 78-82, 94-97, 104-110 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Invention 1.: claims 1-19, 21, 48-82, 86-116 (all partially) an...

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2005/ 006445

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**Continuation of Box II.1**

Although claims 14-17,78-82,94-97,104-110 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

Present claims 1,2,12-15,17-19,105,107,109 relate to compounds which have a given desired property or effect, namely their capacity to inhibit expression, via RNA interference, of a target involved in development, pathogenesis or symptoms of an IgE-mediated disease. However, the description does provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for very few of such compounds, and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of the claim (PCT Guidelines 9.19 and 9.20). The search of said claims was consequently restricted to the specifically disclosed compounds having the desired property or effect, i.e. to interfering RNAs targeting the Fc epsilon RI alpha chain, and to the broad concept of a compound having the desired property or effect.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/ US2005/ 006445

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1.: claims 1-19,21,48-82,86-116 (all partially) and claim 22

An RNAi agent targeting the Fc ϵ psilonR alpha chain; derivatives thereof; compositions comprising it; vectors, cells and transgenic animals expressing it; and its uses in therapy of asthma and allergic rhinitis, and in screening methods.

Inventions 2. to 26.: claims 1-19,21,48-82,86-116 (all partially) and claims 20,23-47,83-85 (as far as applicable)

As for subject 1., but concerning respectively the target genes as listed in claim 3 and in tables 2-26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/US2005/006445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9637605	A 28-11-1996	AU	6008296 A	11-12-1996
		CA	2222197 A1	28-11-1996
		EP	0828827 A2	18-03-1998
		NO	975423 A	25-11-1997
		US	5892023 A	06-04-1999
WO 02081628	A 17-10-2002	EP	1386004 A2	04-02-2004
WO 03099298	A 04-12-2003	AU	2003237686 A1	12-12-2003
WO 0148190	A 05-07-2001	AU	3041701 A	09-07-2001
		CA	2395320 A1	05-07-2001
		EP	1240322 A2	18-09-2002
		JP	2003524637 T	19-08-2003
WO 9960166	A 25-11-1999	AU	757894 B2	13-03-2003
		AU	4006899 A	06-12-1999
		CA	2333087 A1	25-11-1999
		EP	1080225 A1	07-03-2001
		JP	2002515513 T	28-05-2002
WO 2005080410	A 01-09-2005	NONE		

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	4 C 0 8 6
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/12	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,L,U,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チェン , ジャンズー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6 , ブルックリン , スターンズ ロード 1 7
, アパートメントナンバー 6

(72)発明者 エイセン , ハーマン エヌ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 6 8 , ウェイバン , ホームステッド ストリート 9

(72)発明者 ジー , キン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0 , ケンブリッジ , ハーベイ ストリート 5
5 , アパートメント 1 アール

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA40 BB20 CB01 CB17 DA14 DA36 DA37

4B024 AA01 AA11 BA21 BA31 BA61 BA63 CA04 CA05 CA06 CA09
CA10 CA11 DA02 EA02 FA02 FA07 GA11 GA18 HA08 HA14
HA17

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ20 QQ52 QQ79 QR48 QR69 QR77 QS12
QS24 QS28 QS36 QX02

4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC20 BA02 BA24 CA44 CA46
4C076 AA12 AA24 AA95 BB25 CC04 CC10 EE16 EE25 EE37 EE41
FF34

4C084 AA13 MA05 MA13 MA59 ZA341 ZA342 ZA591 ZA592 ZA611 ZA612
ZB111 ZB112 ZB131 ZB132

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA13 MA59

(99)

JP 2007-527240 A 2007.9.27

NA13 NA14 ZA34 ZA61 ZB11 ZB13