

(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2008-523157

(P2008-523157A)

(43) 公表日 平成20年7月3日 (2008. 7. 3)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 31/7105 (2006.01) | A 6 1 K 31/7105 Z N A | 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A | 4 C 0 7 6 |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 47/30 (2006.01) | A 6 1 K 47/30 | 4 C 0 8 6 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く | | |

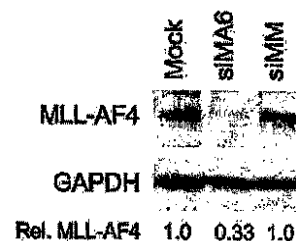
| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|-------------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2007-546979 (P2007-546979) | (71) 出願人 | 505369158 |
| (86) (22) 出願日 | 平成17年12月14日 (2005. 12. 14) | | アルナイラム ファーマシューティカルズ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成19年6月28日 (2007. 6. 28) | | インコーポレイテッド |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2005/045827 | | A L N Y L A M P H A R M A C E U T I |
| (87) 国際公開番号 | W02006/066158 | | C A L S, I N C. |
| (87) 国際公開日 | 平成18年6月22日 (2006. 6. 22) | | アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチュー |
| (31) 優先権主張番号 | 60/635, 936 | | セッツ州 ケンブリッジ サード ストリ |
| (32) 優先日 | 平成16年12月14日 (2004. 12. 14) | | ート 3 0 0 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100068755 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/668, 392 | | 弁理士 恩田 博宣 |
| (32) 優先日 | 平成17年4月5日 (2005. 4. 5) | (74) 代理人 | 100105957 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 恩田 誠 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/698, 414 | | |
| (32) 優先日 | 平成17年7月12日 (2005. 7. 12) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 M L L - A F 4 の R N A i 調節およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、M L L - A F 4 融合遺伝子の発現を調節するための組成物及び方法に関し、より詳細には、化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドにより M L L - A F 4 の下方制御を調節する方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表 1 (配列番号 5、10、12、14、18、20、22、24、26、30 及び 32) に提供された薬剤番号 1 乃至 12 のセンス鎖配列からの少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドであるヌクレオチド配列を含むセンス鎖と、表 1 (配列番号 6、7、11、13、15、19、21、23、25、27、31 及び 33) に提供された薬剤番号 1 乃至 12 のアンチセンス鎖配列からの少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、とからなる iRNA 剤。

【請求項 2】

各々が、表 1 (センス鎖：配列番号 5、10、12、14、18、20、22、24、26、30 及び 32 並びにアンチセンス鎖：配列番号 6、7、11、13、15、19、21、23、25、27、31 及び 33) の薬剤番号 1 乃至 12 の配列のうちの一つと本質的に同一である少なくとも 16、17 又は 18 個のヌクレオチドの配列を含むセンス鎖中のヌクレオチド配列とアンチセンス鎖中のヌクレオチド配列とを含む iRNA 剤であって、鎖あたり 1、2 又は 3 個以下のヌクレオチドがそれぞれ他のヌクレオチドによって置換されている (例えば、アデノシンがウラシルによって置換されている) が、培養ヒト SEM 細胞中における MLL - AF4 の発現を阻害する能力をほぼ維持している、iRNA 剤。

10

【請求項 3】

前記センス鎖は、表 1 に提供された薬剤番号 1、2、5 及び 9 のセンス鎖配列 (配列番号 5、14 及び 24) からの少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖は表 1 に提供された薬剤番号 1、2、5 及び 9 のアンチセンス鎖配列 (配列番号 6、7、15 及び 25) からの少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含み、前記 iRNA 剤は、同剤とのインキュベーション後に、培養ヒト SEM 細胞中の MLL - AF4 mRNA の量を、同剤とともにインキュベーションしなかった細胞と比較して 60% 超減少させる、請求項 1 に記載の iRNA 剤。

20

【請求項 4】

前記アンチセンス RNA 鎖は長さが 30 ヌクレオチド以下であり、前記 iRNA 剤の二重鎖領域の長さが 15 乃至 30 ヌクレオチド対である、請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の iRNA 剤。

30

【請求項 5】

1 乃至 4 個の不對ヌクレオチドを有する少なくとも一つのヌクレオチド突出部分を含む、請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の iRNA 剤。

【請求項 6】

前記ヌクレオチド突出部分が 2 又は 3 の不對ヌクレオチドを有する、請求項 5 に記載の iRNA 剤。

【請求項 7】

前記ヌクレオチド突出部分 iRNA 剤のアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 5 又は 6 に記載の iRNA 剤。

40

【請求項 8】

請求項 1 に記載の iRNA 剤であって、

前記 iRNA 剤は、

(a) センス鎖配列の配列番号 5、10、12、14、18、20、22、24、26、30 及び 32 の (5' から 3' へ向かって) 1 位 ~ 19 位又は 1 位 ~ 21 位のヌクレオチド配列の群から選択されるヌクレオチド配列から構成されたセンス鎖と、前記センス鎖が同センス鎖配列の 1 位 ~ 21 位のヌクレオチドの配列を有することが選択された場合にはアンチセンス鎖配列の配列番号 6、7、11、13、15、19、21、23、25、27、31 及び 33 の (5' から 3' へ向かって) 1 位 ~ 21 位又は 3 位 ~ 21 位のヌクレオチドの配列、並びに前記センス鎖が同センス鎖配列の 1 位 ~ 19 位のヌクレオチド配列を有することが選択された場合にはアンチセンス鎖配列の配列番号 6、7、11、13、

50

15、19、21、23、25、27、31及び33の3位～21位のヌクレオチドの配列、の群から選択されるヌクレオチド配列を有するアンチセンス鎖と、により形成される2本鎖構造と、

(b) 前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖の少なくとも一方の3'-末端に1乃至4個の不对ヌクレオチドからなる少なくとも1つの1本鎖の突出部分であって、前記1本鎖突出部分は、前記センス鎖の3'-末端にある場合には同センス鎖配列の20位及び21位のヌクレオチドを各位置に選択的に含むことと、前記アンチセンス鎖の3'-末端にある場合には同アンチセンス鎖配列の22位及び23位のヌクレオチドを各位置に選択的に含むこと、のうちの少なくとも一方である、1本鎖の突出部分と、
から構成されており、

前記2本鎖構造が前記センス鎖配列の1位～21位のヌクレオチド配列を有するセンス鎖と、前記アンチセンス鎖配列の1位～21位のヌクレオチド配列を有するアンチセンス鎖と、により形成されている場合には、前記iRNA剤は、同センス鎖の3'-末端に1乃至4個の不对オリゴヌクレオチドの1本鎖突出部分を含んでいない、iRNA剤。

【請求項9】

前記センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号14のヌクレオチド配列から構成され、かつ前記アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号15のヌクレオチド配列から構成される、請求項8に記載のiRNA剤。

【請求項10】

前記iRNA剤は同剤とのインキュベーション後に、培養ヒトSEM細胞中のMLL-AF4 mRNAの量を、同剤とともにインキュベーションしなかった細胞と比較して40%超減少させる、請求項1乃至9のいずれか一項に記載のiRNA剤。

【請求項11】

前記iRNA剤に生物試料中での高い安定性を与える修飾を更に含む、請求項1乃至10のいずれか一項に記載のiRNA剤。

【請求項12】

ホスホロチオエート又は2'-修飾ヌクレオチドを含む、請求項1乃至11のいずれか一項に記載のiRNA剤。

【請求項13】

ウリジンが2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも一つの5'-ウリジン-アデニン-3'(5'-UA-3')ジヌクレオチド；5'-ウリジンが2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも一つの5'-ウリジン-グアニン-3'(5'-UG-3')ジヌクレオチド；5'-シチジンが2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも一つの5'-シチジン-アデニン-3'(5'-CA-3')ジヌクレオチド；又は5'-ウリジンが2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも一つの5'-ウリジン-ウリジン-3'(5'-UU-3')ジヌクレオチド、を含む、請求項1乃至12のいずれか一項に記載のiRNA剤。

【請求項14】

前記2'-修飾が、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、及び2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)からなる群より選択される、請求項12又は13に記載のiRNA剤。

【請求項15】

コレステロール部分を含む、請求項1乃至14のいずれか一項に記載のiRNA剤。

【請求項16】

前記コレステロール部分が前記iRNA剤のセンス鎖の3'-末端に結合している、請求項15に記載のiRNA剤。

【請求項17】

前記iRNA剤は肝臓の細胞により取り込まれるように標的化されている、請求項1乃至

10

20

30

40

50

16のいずれか一項に記載のiRNA剤。

【請求項18】

前記iRNA剤は消化管の細胞により取り込まれるように標的化されている、請求項1乃至16のいずれか一項に記載のiRNA剤。

【請求項19】

(a) 請求項1乃至18のいずれか一項に記載のiRNA剤と、

(b) 製薬的に許容可能な担体と、

からなる製薬組成物。

【請求項20】

前記iRNA剤のヒト及びマウスの少なくとも一方における血漿中での半減期を延長させるか、又は細胞中における同iRNA剤の取り込みを容易にするための処方化剤を更に含む、請求項19に記載の製薬組成物。

10

【請求項21】

前記処方化剤はポリカチオンを含む、請求項20に記載の製薬組成物。

【請求項22】

前記製薬組成物は増殖性疾患の治療に有用である、請求項19乃至21のいずれか一項に記載の製薬組成物。

【請求項23】

前記増殖性疾患は、癌、好ましくは白血病、より好ましくは急性リンパ芽球性白血病である、請求項22に記載の製薬組成物。

20

【請求項24】

前記製薬組成物は、例えばヒトのような対象に同製薬組成物を投与することにより、同対象の細胞又は組織中でのMLL-AF4融合遺伝子の発現を低減すること及びt(4;11)-陽性細胞の増殖率を抑制することのうちの少なくとも一方を可能にする、請求項19乃至23のいずれか一項に記載の製薬組成物。

【請求項25】

増殖性疾患を有するヒト対象または同増殖性疾患の発生する危険性のあるヒト対象を治療するための方法であって、請求項1乃至18のいずれか一項に記載のiRNA剤を同ヒト対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項26】

前記増殖性疾患は、癌、好ましくは急性リンパ芽球性白血病である、請求項25に記載の方法。

30

【請求項27】

前記iRNA剤は対象の細胞又は組織中でのMLL-AF4の発現を低減すること及びt(4;11)-陽性細胞の増殖率を抑制することのうちの少なくとも一方を可能にするのに十分な量にて投与される、請求項25又は26に記載の方法。

【請求項28】

請求項1乃至18のいずれか一項に記載のiRNA剤の一つを製薬的に許容可能な担体と処方化させる工程を含む、製薬組成物を製造するための方法。

【請求項29】

前記iRNA剤のヒト及びマウスの少なくとも一方における血漿中での半減期を延長させるか、又は細胞中における同iRNA剤の取り込みを容易にするための処方化剤とともに同iRNA剤を処方化する工程を更に含む、請求項28に記載の方法。

40

【請求項30】

前記処方化剤はポリカチオンである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記製薬組成物は増殖性疾患の治療に有用である、請求項28乃至30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

前記増殖性疾患は、癌、好ましくは白血病、より好ましくは急性リンパ芽球性白血病であ

50

る、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記製薬組成物は、例えばヒトのような対象に同製薬組成物を投与することにより、同対象の細胞又は組織中での M L L - A F 4 融合遺伝子の発現を低減すること及び t (4 ; 1 1) - 陽性細胞の増殖率を抑制することのうちの少なくとも一方を可能にする、請求項 2 8 乃至 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

細胞中の M L L - A F 4 R N A の量を低減すること及び t (4 ; 1 1) - 陽性細胞の増殖率を抑制することのうちの少なくとも一方を実施するための方法であって、前記単数又は複数の細胞を請求項 1 乃至 1 8 のいずれか一項に記載の i R N A 剤と接触させる工程を含む、方法。

10

【請求項 3 5】

前記方法はインビトロにて実施される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記細胞が対象の細胞であり、かつ前記対象が増殖性疾患、好ましくは癌、より好ましくは急性リンパ芽球性白血病に罹患していると診断されている、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

請求項 1 乃至 1 8 のいずれか一項に記載の i R N A 剤を製造する方法であって、前記方法は、同 i R N A 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖を合成する工程を含み、前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖のうちの少なくとも一つは少なくとも一つのヌクレオチド修飾を含む、方法。

20

【請求項 3 8】

前記ヌクレオチド修飾は、前記 i R N A 剤に生物試料中での高い安定性を与える修飾である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 i R N A 剤を対象に投与する工程を更に含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記対象は増殖性疾患、好ましくは癌に罹患しているものとして診断されている、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記対象は急性リンパ芽球性白血病に罹患しているものとして診断されている、請求項 3 9 に記載の方法。

30

【請求項 4 2】

前記対象がヒトである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 3】

M L L - A F 4 遺伝子の発現を阻害すると考えられている i R N A 剤を評価するための方法であって、前記方法は、

(a) i R N A 剤を提供する工程であって、第一の鎖が M L L - A F 4 m R N A のヌクレオチド配列と十分に相補的であり、かつ第二の鎖が第一の鎖とハイブリダイズするべく同第一の鎖と十分に相補的である、工程と、

40

(b) 前記 i R N A 剤を M L L - A F 4 遺伝子を含む細胞と接触させる工程と、

(c) 細胞と前記 i R N A 剤を接触させる前の M L L - A F 4 遺伝子の発現又は接触させていない対照細胞の M L L - A F 4 遺伝子の発現と、細胞と前記 i R N A 剤を接触させた後の M L L - A F 4 遺伝子の発現と、を比較する工程と、

(d) 前記 i R N A 剤が M L L - A F 4 遺伝子の発現を阻害するのに有用であるかどうかを判定する工程であって、細胞中に存在する M L L - A F 4 R N A の量又は同細胞によって分泌されるタンパク質の量が、細胞と i R N A 剤とを接触させる前の存在量若しくは分泌量よりも少ない場合、又はそのような接触を受けていない細胞による存在量若しくは分泌量よりも少ない場合、同 i R N A 剤は有用であると判定する工程と、

からなる方法。

50

【請求項 4 4】

前記 iRNA 剤は請求項 1 乃至 18 のいずれか一項に記載の iRNA 剤である、請求項 4 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、MLL - AF4 の発現を調節するための組成物および方法に関するものであり、より詳細には、化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドによる MLL - AF4 の下方制御に関するものである。

【背景技術】

10

【0002】

本願は、2004 年 12 月 14 日出願の米国仮特許出願第 60 / 635 , 936 号、2005 年 4 月 5 日出願の米国仮特許出願第 60 / 668 , 392 号および 2005 年 7 月 12 日出願の米国仮特許出願第 60 / 698 , 414 号の利益を主張する。3 つすべての仮特許出願は、参照により全体として本明細書に援用される。

【0003】

種々の異なる白血病に関して、融合遺伝子を発生させる染色体異常が観察されている（非特許文献 1）。仮に、これらの発癌遺伝子が白血病の表現型を維持するために重要であれば、かかる腫瘍特異性の発癌遺伝子は、強い特異性を有する新たな治療アプローチのための有望な標的となるはずである。しかしながら、白血病の進行とは対照的に、白血病の持続に関する中心的役割は、少数の白血病融合遺伝子について確立されているのみである。

20

【0004】

染色体 11q23 に位置する混合系統白血病（MLL）遺伝子は、ヒト白血病に関連する多数の染色体転座に関与している（非特許文献 2）。それらの中で最も一般的なものは、転座 t(4;11)(q21;q23)であり、かかる転座は MLL 遺伝子を、染色体 4q21 に位置する AF4 遺伝子と融合させる（非特許文献 3、非特許文献 4、非特許文献 5）。この転座は、高リスクの急性リンパ芽球性白血病（ALL）の顕著な特徴であり、特に乳児では予後不良をもたらす（非特許文献 6）。

【0005】

30

野生型 MLL 遺伝子は、トリソックス遺伝子群（family）の一員であり、431 kD のタンパク質をコード化する。かかるタンパク質はタンパク質分解処理され、互いにヘテロ二量化した 2 つの断片 - 300 kD および 180 kD になる（非特許文献 7、非特許文献 8、非特許文献 9、非特許文献 10）。MLL タンパク質は、DNA 結合のための AT フック・ドメイン、DNA メチル転移酵素（DMT）およびメチル結合ドメインタンパク質 1（MBD1）との相同性を示す MT ドメイン、ジンク・フィンガーを含む植物ホメオドメイン（PHD）、並びに SET ヒストン・メチル転移酵素ドメインを含む複雑な構造を有する（非特許文献 2）。MLL は、ホックス遺伝子の転写を制御するメカニズムに関与している（非特許文献 11）。興味深いことに、ホックス遺伝子 Hoxa7 および Hoxa9 とホメオティック遺伝子 Meis-1 との組み合わせは、異なる幾つかの MLL 融合遺伝子によって誘導される形質転換のために必要である。このような決定的な役割は、MLL - AF4 に関してはまだ報告されていない。にもかかわらず、3 つすべてのホメオティック遺伝子の発現レベルは、初代 t(4;11) ALL において上昇する。

40

【0006】

AF4 遺伝子は、核局在化シグナルおよび GTP 結合ドメインを含むセリン / プロリン・リッチタンパク質をコード化する。かかるタンパク質は細胞核に局在し（非特許文献 12）、おそらく、転写活性化機能に関与するのであると思われる。MLL ノックアウト・マウスが胚致死であるのに対し（非特許文献 13）、AF4 欠乏マウスは、不完全な T 細胞発生、および B 細胞発生の適度の改変を示す（非特許文献 14）。

【0007】

50

特に、 $t(4;11)$ 転座は2つの融合遺伝子、 $AF4-MLL$ および $MLL-AF4$ を生み出す。白血病誘発に関するいずれの融合遺伝子の重要性も、まだ完全には理解されていない。 $AF4-MLL$ は、ユビキチン媒介 $AF4$ 分解に干渉してマウス胚由来線維芽細胞を形質転換することが最近になって示された(非特許文献15)。しかしながら、 $t(4;11)$ 陰性白血病細胞系での $MLL-AF4$ の異所性発現は、細胞周期進行を阻害し、アポトーシスを引き起こす(非特許文献16)。皮肉なことに、すべての $(4;11)$ ALL 患者の20%は、転写レベルまたはゲノム・レベルで $AF4-MLL$ を欠くのに対して、 $MLL-AF4$ は、異所性発現時の前アポトーシス活性にもかかわらず、常に検出可能である(非特許文献17、非特許文献18)。興味深いことに、いくつかの研究は、 $MLL-AF4$ 融合発癌遺伝子が $t(4;11)$ の状況において細胞生存を支援することを示唆する。 $t(4;11)$ 転座のある細胞は、長期間にわたる血清枯渇を生き延び(非特許文献19)、 $CD95$ 媒介アポトーシスに対して耐性である(非特許文献20)。

【0008】

白血病誘発に関するこの融合発癌遺伝子の役割をより正確に定義するべく、出願人は、白血病細胞内における $MLL-AF4$ 発現を阻害するために RNA 干渉($RNAi$)を適用した。 $RNAi$ は、 $mRNA$ の酵素開裂および破壊を生じる細胞プロセスであって、配列特異性を有する2本鎖の小さな干渉性 RNA ($siRNA$)によって導かれる(非特許文献21)。細胞に $siRNA$ をトランスフェクトすると、 RNA 誘導型サイレンシング複合体と称される細胞質に位置付けられた(*cytoplasmatically located*)リボ核タンパク質複合体が発生する。 $siRNA$ 鎖の一方を捨てることによりこの複合体が活性化され(非特許文献22、非特許文献23)、残鎖は $RISC$ を、相補性を有する RNA 配列に向かわせ、 $RISC$ 成分 $Ag0-2$ により、標的 RNA のエンドヌクレアーゼ分解による開裂をきたす(非特許文献24、非特許文献25、非特許文献26)。外来的に追加された合成 $siRNA$ は、遺伝子発現をサイレンシングさせるための非常に有力な、配列特異性の薬剤として働くことが示されており(非特許文献27)、遺伝子機能の分析ののみならず、遺伝子特異性の治療アプローチにとっても大きな可能性を秘めていることが明らかとなった(非特許文献28、非特許文献29)。

【非特許文献1】ラビッツ(Rabbits), T. H., 「Nature」第372巻、143-149頁(1994年)

【非特許文献2】エルnst(Ernst), P. ら、「Curr Opin Hematol」、第9巻、282~287頁(2002年)

【非特許文献3】グウ(Gu), Y. ら、「Cell」第71巻、701~708頁(1992年)

【非特許文献4】マッカーブ(McCabe), N. R. ら、「Proc Natl Acad Sci USA」第89巻、11794~11798頁(1992年)

【非特許文献5】ドーマー(Domer), P. H. ら、「Proc Natl Acad Sci USA」第90巻、7884~7888頁(1993年)

【非特許文献6】プイ(Pui), C. H. ら、「Lancet」第359巻、1909~1915頁(2002年)

【非特許文献7】ナカムラ(Nakamura), T. ら、「Mol Cell」第10巻、1119~1128頁(2002年)

【非特許文献8】ヨコヤマ(Yokoyama), A. ら、「Blood」第100巻、3710~3718頁(2002年)

【非特許文献9】シー(Hsieh), J. J. ら、「Cell」第115巻、293~303頁(2003年)

【非特許文献10】シー(Hsieh), J. J. ら、「Mol Cell Biol」第23巻、186~194頁(2003年)

【非特許文献11】エートン(Ayton), P. M. およびクリアリー(Clearly), M. L., 「Oncogene」第20巻、5695~5707頁(2001年)

【非特許文献12】リー(Li), Q. ら、「Blood」第92巻、3841~384

10

20

30

40

50

7 頁 (1 9 9 8 年)

【非特許文献 1 3】ユー (Yu) , B . D . ら、 「 Proc Natl Acad Sci USA 」 第 9 5 巻、 1 0 6 3 2 ~ 1 0 6 3 6 頁 (1 9 9 8 年)

【非特許文献 1 4】イスナール (Isnard) , P . ら、 「 Blood 」 第 9 6 巻、 7 0 5 ~ 7 1 0 頁 (2 0 0 0 年)

【非特許文献 1 5】バーセン (Bursen) , A . ら、 「 Oncogene 」 第 2 3 巻、 6 2 3 7 ~ 6 2 4 9 頁 (2 0 0 4 年)

【非特許文献 1 6】カスリーニ (Caslini) , C . ら、 「 Leukemia 」 第 1 8 巻、 1 0 6 4 ~ 1 0 7 1 頁 (2 0 0 4 年)

【非特許文献 1 7】ダウニング (Downing) , J . R . ら、 「 Blood 」 第 8 3 巻 ; 3 3 0 ~ 3 3 5 頁 (1 9 9 4 年) 10

【非特許文献 1 8】ライヘル (Reichel) , M . ら、 「 Oncogene 」 第 2 0 巻、 2 9 0 0 ~ 2 9 0 7 頁 (2 0 0 1 年)

【非特許文献 1 9】カージー (Kersey) , J . H . ら、 「 Leukemia 」 第 1 2 巻、 1 5 6 1 ~ 1 5 6 4 頁 (1 9 9 8 年)

【非特許文献 2 0】デリエ (Dorrie) , J . ら、 「 Leukemia 」 第 1 3 巻、 1 5 3 9 ~ 1 5 4 7 頁 (1 9 9 9 年)

【非特許文献 2 1】ダイクスフーム (Dykxhoorn) , D . M . ら、 「 Nat Rev Mol Cell Biol 」 第 4 巻、 4 5 7 ~ 4 6 7 頁 (2 0 0 3 年)

【非特許文献 2 2】コヴォロヴァ (Khvorova) , A . ら、 「 Cell 」 第 1 1 5 巻、 2 0 9 ~ 2 1 6 頁 (2 0 0 3 年) 20

【非特許文献 2 3】シュバルツ (Schwarz) , D . S . ら、 「 Cell 」 第 1 1 5 巻、 1 9 9 ~ 2 0 8 頁 (2 0 0 3 年)

【非特許文献 2 4】マイスター (Meister) , G . ら、 「 Mol Cell 」 第 1 5 巻、 1 8 5 ~ 1 9 7 頁 (2 0 0 4 年)

【非特許文献 2 5】ランド (Rand) , T . A . ら、 「 Proc Natl Acad Sci USA 」 第 1 0 1 巻、 1 4 3 8 5 ~ 1 4 3 8 9 頁 (2 0 0 4 年)

【非特許文献 2 6】ソング (Song) , J . J . ら、 「 Science 」 第 3 0 5 巻、 1 4 3 4 ~ 1 4 3 7 頁 (2 0 0 4 年)

【非特許文献 2 7】エルバシル (Elbashir) , S . M . ら、 「 Nature 」 第 4 1 1 巻、 4 9 4 ~ 4 9 8 頁 (2 0 0 1 年) 30

【非特許文献 2 8】チェン (Cheng) , J . C . 、 ムーア (Moore) , T . B . およびサカモト (Sakamoto) , K . M . 「 Mol Genet Metab 」 第 8 0 巻、 1 2 1 ~ 1 2 8 頁 (2 0 0 3 年)

【非特許文献 2 9】ハイデンライヒ (Heidenreich) , O . 「 Curr Pharm Biotechnol 」 第 5 巻、 3 4 9 ~ 3 5 4 頁 (2 0 0 4 年)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

本研究において出願人は、 t (4 ; 1 1) 細胞内における MLL - AF 4 遺伝子発現を特異的に阻害するために RNAi を用いた。出願人は、融合転写 MLL - AF 4 の枯渇がクローン形成能力および増殖を抑制し、 t (4 ; 1 1) 陽性白血病細胞内においてアポトーシスを誘導し、 SCID マウス異種移植モデル内においてかかる細胞の生着を危うくすることを明らかにする。 40

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本発明は、対象の、例えばヒトのような哺乳動物の、 MLL - AF 4 レベルを低減するための組成物および方法を提供する。この方法は、 MLL - AF 4 融合遺伝子の発現を (例えば、少なくとも 2 %、 4 %、 6 %、 1 0 %、 1 5 %、 2 0 % またはそれ以上) 低下させる、または t (4 ; 1 1) 陽性細胞の増殖率を抑制する、あるいはその両方を行う i R 50

NA 剤を、対象に投与することを含む。かかる iRNA 剤は、本明細書に記載されているものであり得るか、または、活性配列の 1 つに基づく dsRNA であって MLL - AF4 融合遺伝子の、例えばヒトの MLL - AF4 融合遺伝子のような哺乳動物 MLL - AF4 融合遺伝子の、同一の領域を標的とする dsRNA であり得る。iRNA 剤は、鎖当たり 30 個未満のヌクレオチドを、例えば 21 ~ 23 個のヌクレオチドを含み、表 1 の薬剤番号 1 乃至 12 で提供される薬剤の 1 つから構成されるか、1 つを含むか、または 1 つから誘導され得る。2 本鎖 iRNA 剤は平滑末端を有するか、または、より好ましくは、同薬剤の 3' 末端の一方または両方からヌクレオチド 1 ~ 4 個の突出部分を有することができる。これらの好ましい iRNA 剤は、対象内のすべての非 MLL - AF4 遺伝子配列に対して 4 個以上のヌクレオチド・ミスマッチを含むことが好ましい。

10

【0011】

第 1 の態様において、本発明は特に、センス鎖であってかかるセンス鎖が、表 1 で提供される薬剤番号 1 乃至 12 のセンス鎖配列（配列番号 5、10、12、14、18、20、22、24、26、30 および 32）からの少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドであるヌクレオチド配列を含むセンス鎖と、アンチセンス鎖であってかかるアンチセンス鎖が、表 1 で提供される薬剤番号 1 乃至 12 のアンチセンス配列（配列番号 6、7、11、13、15、19、21、23、25、27、31 および 33）からの少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖と、を含む iRNA 剤、例えば、薬剤番号 5、センス鎖配列 5' - AAGAAAGCAGACCUACUCCA - 3'（配列番号 14）、アンチセンス鎖配列 5' - UGGAGUAGGUCUGCUUUUUCUUUU - 3'（配列番号 15）、を提供する。表 1 の薬剤番号 1 乃至 12 の iRNA 剤は、培養ヒト SEM 細胞（白血病細胞系）内に存在する MLL - AF4 mRNA の量を、これらの薬剤とのインキュベーション後、かかる薬剤と共にインキュベーションされなかった細胞に比べて 40 % 超低減するという有利なかつ驚くべき能力を有する（図 1 参照）。

20

【0012】

第 2 の態様において本発明は、センス鎖内のヌクレオチド配列とアンチセンス鎖内のヌクレオチド配列とを含む iRNA 剤であって、各鎖が少なくとも 16、17 または 18 個のヌクレオチドの配列を含み、かかる配列が、培養ヒト SEM 細胞内において MLL - AF4 発現を阻害するための能力を本質的に保持しながら鎖当たり 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドがそれぞれ他のヌクレオチドと置換されている（例えばアデノシンがウラシルに置き換えられている）点を除いて、表 1 の薬剤 1 乃至 12 の配列（センス鎖：配列番号 5、10、12、14、18、20、22、24、26、30 および 32、アンチセンス鎖：配列番号 6、7、11、13、15、19、21、23、25、27、31 および 33）の 1 つと本質的に同一である、iRNA 剤を提供する。

30

【0013】

本発明の iRNA 剤は、表 1 で提供される薬剤 1、2、5 および 9 のセンス鎖配列（配列番号 5、14 および 24）から得られた少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むセンス鎖と、表 1 で提供される薬剤 1、2、5 および 9 のアンチセンス鎖配列（配列番号 6、7、15 および 25）の少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含むアンチセンス鎖とを含むことができ、かかる iRNA 剤は、これらの薬剤とのインキュベーション後に培養ヒト SEM 細胞内に存在する MLL - AF4 mRNA の量を、かかる薬剤と共にインキュベーションされなかった細胞に比べて 60 % 超低減する。本発明の iRNA 剤のアンチセンス鎖は、30 個以下のヌクレオチド長であり得、かかる iRNA 剤の 2 本鎖領域は、15 ~ 30 対のヌクレオチド対長であり得る。iRNA 剤は、少なくとも 1 つのヌクレオチド突出部分（overhang）を含むことができ、かかる突出部分は、1 ~ 4 個の不對ヌクレオチドを、好ましくは 2 または 3 個の不對ヌクレオチドを有する。ヌクレオチド突出部分は、iRNA 剤のアンチセンス鎖の 3' 末端に位置することができる。

40

【0014】

さらに、本発明の iRNA 剤は、(a) センス鎖配列の配列番号 5、10、12、14、18、20、22、24、26、30 および 32 の（5' から 3' へ向かって）1 位 ~

50

19位または1位～21位のヌクレオチド配列の群から選択されるヌクレオチド配列を有するセンス鎖と、センス鎖が前記センス鎖配列の1位～21位のヌクレオチド配列を有することが選択された場合にはアンチセンス鎖配列の配列番号6、11、13、15、19、21、23、25、27、31および33の(5'から3'へ向かって)1位～21位または3位～21位のヌクレオチド配列、並びに、センス鎖が前記センス鎖配列の1位～19位のヌクレオチド配列を有することが選択された場合にはアンチセンス鎖配列の配列番号6、11、13、15、19、21、23、25、27、31および33の3位～21位のヌクレオチド配列、の群から選択されるヌクレオチド配列を有するアンチセンス鎖と、により形成される2本鎖構造と、(b)かかるセンス鎖及び/またはアンチセンス鎖の3'末端に1～4個の不對ヌクレオチドからなる少なくとも1つの1本鎖突出部分であって、同1本鎖突出部分は、センス鎖の3'末端にある場合には、前記センス鎖配列20位および21位のヌクレオチドを各位置に選択的に含み、および/または、アンチセンス鎖の3'末端にある場合には、前記アンチセンス鎖配列の22位および23位のヌクレオチドを各位置に選択的に含む、1本鎖突出部分と、から構成されており、かかる2本鎖構造が、前記センス鎖配列の1位～21位のヌクレオチド配列を有するセンス鎖、および前記アンチセンス鎖配列の1位～21位のヌクレオチド配列を有するアンチセンス鎖により形成される場合には、かかるiRNA剤はセンス鎖の3'末端に1～4個の不對オリゴヌクレオチドの1本鎖突出部分を含んでいない。特に、センス鎖のヌクレオチド配列は、配列番号14のヌクレオチド配列から構成され得、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は、配列番号14のヌクレオチド配列から構成され得る。

10

20

【0015】

本発明のiRNA剤は、培養ヒトSEM細胞内に存在するMLL-AF4 mRNAの量を、このiRNA剤とのインキュベーション後、かかる薬剤と共にインキュベーションされなかった細胞に比べて40%より多く低減するように意図されている。それらのiRNA剤は、生体試料内において同iRNA剤の安定性を増大させる修飾をさらに含むことができ、かかる修飾は、ホスホロチオエートまたは2'修飾ヌクレオチドであり得る。例えば、iRNA剤は、ウリジンが2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも一つの5'-ウリジン-アデニン-3'(5'-UA-3')ジヌクレオチド；5'-ウリジンが2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも一つの5'-ウリジン-グアニン-3'(5'-UG-3')ジヌクレオチド；5'-シチジンが2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも一つの5'-シチジン-アデニン-3'(5'-CA-3')ジヌクレオチド；又は5'-ウリジンが2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも一つの5'-ウリジン-ウリジン-3'(5'-UU-3')ジヌクレオチドを更に含むことができる。2'修飾は、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)および2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)の群から選択できる。

30

40

【0016】

iRNA剤はさらに、コレステロール部分を含むことができ、かかるコレステロール部分は、iRNA剤のセンス鎖の3'末端に結合することが好ましい。iRNA剤は、肝臓の細胞または消化管の細胞による取り込みに対して標的化され得る。

【0017】

第3の態様において本発明は、医薬組成物であって、(a)本発明のiRNA剤と、(b)薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を提供する。

この医薬組成物は、ヒト血清またはマウス血清、あるいはヒト血清およびマウス血清内においてiRNA剤の半減期を延長させるかまたは細胞内へのiRNA剤の取り込みを促進する処方化剤を更に含むことができる。処方化剤はポリカチオンを含むことができる。かかる医薬組成物は、増殖性疾患の、例えば癌腫、好ましくは白血病、より好ましくは急

50

性リンパ芽球性白血病の、治療に役立つものであることが好ましい。医薬組成物は、対象、例えばヒトに、医薬組成物が投与されると、対象の細胞または組織内における M L L - A F 4 融合遺伝子発現を（例えば、少なくとも 2 %、4 %、6 %、10 %、15 %、20 %またはそれ以上）低下させる、または t (4 ; 1 1) 陽性細胞の増殖率を抑制する、あるいはその両方を行う能力を備えることが好ましい。

【 0 0 1 8 】

第 4 の態様において本発明は、増殖性疾患に罹患しているか、または同疾患を発症する危険性のあるヒト対象を治療する方法であって、かかるヒト対象に本発明の i R N A 剤を投与する工程を含む方法を提供する。かかる増殖性疾患は好ましくは癌腫であり、より好ましくは急性リンパ芽球性白血病である。その場合、i R N A 剤は、対象の細胞または組織内における M L L - A F 4 の発現を（例えば、少なくとも 2 %、4 %、6 %、10 %、15 %、20 %またはそれ以上）低下させるために、または t (4 ; 1 1) 陽性細胞の増殖率を抑制するために、あるいはその両方を行うために十分な量にて投与できる。

10

【 0 0 1 9 】

第 5 の態様において本発明は、医薬組成物を作成する方法であって、本発明の i R N A 剤の 1 つを医薬担体と共に処方する工程を含む方法を提供し、選択的に、ヒト血清またはマウス血清、あるいはヒト血清およびマウス血清内において i R N A 剤の半減期を延長させるかまたは細胞内への i R N A 剤の取り込みを促進する処方化剤とともに i R N A 剤を処方する工程をさらに含む。処方化剤はポリカチオンを含むことができる。本発明の方法の医薬組成物は、増殖性疾患の治療に役立つものであることが好ましく、増殖性疾患は、好ましくは癌腫であり、より好ましくは白血病であり、最も好ましくは急性リンパ芽球性白血病である。ある好ましい実施形態では、本発明の方法の医薬組成物は、対象、例えばヒトに、同医薬組成物が投与されると、対象の細胞または組織内における M L L - A F 4 融合遺伝子発現を（例えば、少なくとも 2 %、4 %、6 %、10 %、15 %、20 %またはそれ以上）低下させること、または t (4 ; 1 1) 陽性細胞の増殖率を抑制すること、あるいはその両方を行うことができる。

20

【 0 0 2 0 】

第 6 の態様において本発明は、細胞内における M L L - A F 4 R N A の量を（例えば、少なくとも 2 %、4 %、6 %、10 %、15 %、20 %またはそれ以上）低減する、または t (4 ; 1 1) 陽性細胞の増殖率を抑制する、あるいはその両方を行う方法であって、かかる細胞を本発明の i R N A 剤に接触させる工程を含む方法を提供する。一実施形態では、この方法はインビトロにて行われる。代替的に、細胞は対象の細胞であって、対象は増殖性疾患を、好ましくは癌腫を、より好ましくは急性リンパ芽球性白血病を、罹患していると診断されている。細胞は、腫瘍内に位置することができるか、またはマイクロクロン細胞であり得る。

30

【 0 0 2 1 】

第 7 の態様において本発明は、本発明の i R N A 剤を作成する方法であって、かかる方法が、i R N A 剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖を合成する工程を含み、かかるセンス鎖及び/またはアンチセンス鎖が少なくとも 1 つのヌクレオチド修飾を含み、好ましくは前記ヌクレオチド修飾が生体試料内において i R N A 剤の安定性を増大させる修飾である方法を提供する。前記の方法は、対象に i R N A 剤を投与する工程をさらに含む。一実施形態では、対象は増殖性疾患を、好ましくは癌腫、より好ましくは急性リンパ芽球性白血病を罹患していると診察される。その場合、対象はヒトであり得る。

40

【 0 0 2 2 】

【表 1】

表 1 : MLL-AF4 siRNAの配列^d

| 薬剤 番号 | 鎖識別情報 | 配列 ^c | 配列番号 |
|----------|--------------------|-----------------------------------|------|
| 1 | MA3s ^a | 5' - AAAAG/CAGACCUACUCCAAUG - 3' | 5 |
| | MA3as ^b | 3' - UCUUUUC/GUCUGGAUGAGGUAC - 5' | 6 |
| 2 | MA3s | 5' - AAAAG/CAGACCUACUCCAAUG - 3' | 5 |
| | MA3as | 3' - UCUUUUC/GUCUGGAUGAGGUU - 5' | 7 |
| 3 | MA4s | 5' - GAAAAG/CAGACCUACUCCAAU - 3' | 10 |
| | MA4as | 3' - UUCUUUC/GUCUGGAUGAGGUUA - 5' | 11 |
| 4 | MA5s | 5' - AGAAAAG/CAGACCUACUCCAA - 3' | 12 |
| | MA5as | 3' - UUUUUUC/GUCUGGAUGAGGUU - 5' | 13 |
| 5 | MA6s | 5' - AAGAAAAG/CAGACCUACUCCA - 3' | 14 |
| | MA6as | 3' - UUUUUUC/GUCUGGAUGAGGU - 5' | 15 |
| 6 | MA8s | 5' - AAAAGAAAAG/CAGACCUACUC - 3' | 18 |
| | MA8as | 3' - GGUUUUCUUUC/GUCUGGAUGAG - 5' | 19 |
| 7 | MA9s | 5' - CAAAAGAAAAG/CAGACCUACU - 3' | 20 |
| | MA9as | 3' - UGGUUUCUUUC/GUCUGGAUGA - 5' | 21 |
| 8 | MA10s | 5' - CAAAAGAAAAG/CAGACCUAC - 3' | 22 |
| | MA10as | 3' - UGGUUUCUUUC/GUCUGGAUG - 5' | 23 |
| 9 | MA11s | 5' - ACCAAAAGAAAAG/CAGACCUA - 3' | 24 |
| | MA11as | 3' - UUGGUUUUCUUUC/GUCUGGAU - 5' | 25 |
| 10 | MA12s | 5' - AACCAAAAGAAAAG/CAGACCU - 3' | 26 |
| | MA12as | 3' - UUUUGGUUUUCUUUC/GUCUGGA - 5' | 27 |
| 11 | MA14s | 5' - AAAACCAAAAGAAAAG/CAGAC - 3' | 30 |
| | MA14as | 3' - GUUUUGGUUUUCUUUC/GUCUG - 5' | 31 |
| 12 | siMARS | 5' - ACUUUAAGCAGACCUACUCCA - 3' | 32 |
| | | 3' - CCUGAAAUUCGUCUGGAUGAGGU - 5' | 33 |

^a「s」はセンス鎖を示す^b「as」はアンチセンス鎖を示す^c「/」は11番染色体及び4番染色体配列間の融合を示す^d2本鎖siRNA剤は明細書中では「siMAXx」として参照される

第8の態様において本発明は、MLL-AF4遺伝子の発現を阻害すると考えられるiRNA剤を評価する方法であって、かかる方法が、(a)iRNA剤を提供する工程と、同工程において、第1の鎖が、MLL-AF4 mRNAのヌクレオチド配列に対して十分な相補性を有し、第2の鎖が、第1の鎖とハイブリダイズするために同第1の鎖に対して十分な相補性を有することと、(b)MLL-AF4遺伝子を含む細胞にiRNA剤を接触させる工程と、(c)iRNA剤を細胞に接触させる前のMLL-AF4遺伝子発現または接触していない対照細胞のMLL-AF4遺伝子発現と、iRNA剤を細胞に接触させた後のMLL-AF4遺伝子発現と、を比較する工程と、(d)iRNA剤が、MLL

10

20

30

40

50

- A F 4 遺伝子発現を阻害するために有用であるかどうかを判定する工程であって、細胞中に存在する M L L - A F 4 R N A の量、または細胞により分泌されるタンパク質の量が、i R N A 剤を細胞に接触させる前の存在量もしくは分泌量よりも少ないか、またはそのように接触していない細胞による存在量もしくは分泌量よりも少ない場合に、同 i R N A 剤が有用であると判定する工程とを含む方法、を提供する。

【 0 0 2 3 】

本方法の一実施形態では、i R N A 剤は、上記の通りの本発明の i R N A 剤である。

i R N A 剤は、天然型のリボヌクレオチド・サブユニットのみを含み得るか、または、i R N A 剤に含まれる 1 つ以上のかかるリボヌクレオチド・サブユニットの糖もしくは塩基に対する修飾を 1 つ以上含むように合成され得る。i R N A 剤は、かかる薬剤の安定性、分布または細胞への取り込みを改善するために選択されるリガンド、例えばコレステロールに付着するようにさらに修飾され得る。かかる薬剤はさらに、単離形態であり得るか、または、本明細書に記載されている方法に用いられる医薬組成物の一部であり得る。

10

【 0 0 2 4 】

別の実施形態では、本明細書に記載されているように、コレステロール部分（例えばセンス鎖の 3' 末端に）、2' 修飾（例えば 2' - O - メチルまたは 2' - デオキシ - 2' - フルオロ - 修飾）およびホスホロチオエート（例えば、センス鎖およびアンチセンス鎖の 3' - 端の 1 個または 2 個のヌクレオチド上に）が、同一 i R N A 剤内に存在する。

【 0 0 2 5 】

i R N A 剤、例えば本明細書に記載されている i R N A 剤は、M L L - A F 4 融合遺伝子発現がある種の役割を演じる対象内に存在する疾病または疾患の治療のためのものであることが好ましい。i R N A 剤の投与は、M L L - A F 4 融合により媒介される疾患の予防的治療のためにも実施できる。

20

【 0 0 2 6 】

本発明は、M L L - A F 4 の調節例えば阻害を行う i R N A 剤の調製物であって、かなり純粋な調製物または薬学的に許容可能な調製物を含む調整物を特徴とする。M L L - A F 4 を標的とする i R N A 剤が対象に投与でき、その対象は、M L L - A F 4 融合遺伝子またはその他の t (4 ; 1 1) 染色体転座の存在を特徴とする疾患を、発症する危険性があるかまたは罹患している（例えば、罹患していると診断されている）。i R N A 剤は、かかる疾患またはその症状の開始を遅らせるために、かかる疾患と診断されたかもしくはかかる疾患を罹患しているかまたはかかる疾患の危険性のある個人に投与できる。これらの疾患は、急性リンパ芽球性白血病を含む、t (4 ; 1 1) 関連の白血病のような増殖性疾患を含む。例えば、M L L - A F 4 を標的とする i R N A 剤は、1 つ以上の器官（骨髄外での血液細胞の形成）、例えば脾臓、肝臓またはリンパ節において乳児急性リンパ芽球性白血病、白血球増加症または髄外疾患を罹患している（例えば、罹患していると診断された）対象に投与できる。

30

【 0 0 2 7 】

また、i R N A 剤は、骨髄のような特定の組織を標的とすることもでき、組織（例えば組織の腫瘍）内の M L L - A F 4 発現レベルは、M L L - A F 4 i R N A 剤の投与後、低下する。i R N A 剤は、i R N A 剤が血流内に広がっている時間を最大にするために修飾されることが好ましい。例えば i R N A 剤は、ヒト血清アルブミン（H S A）と結合することができる。

40

【 0 0 2 8 】

本発明の方法および組成物では、i R N A 剤は、送達剤、例えば、本明細書に記載されている送達剤で、例えばリボソームで修飾されるか、またはかかる送達剤と結合され得る。かかる修飾は、かかる薬剤の循環時間を増大させるために、血清アルブミン（S A）、例えばヒト血清アルブミン（H S A）、またはその断片との結合を媒介し得る。

【 0 0 2 9 】

本薬剤、本方法および本組成物は、細胞内において M L L - A F 4 融合 m R N A を選択的に分解するために、R N A 干渉に関与する細胞メカニズムを利用する。従って、本発明

50

の方法は通例、本発明の iRNA 剤の 1 つに細胞を接触させる工程を含む。かかる方法は、細胞に対して直接実施できるか、または、本発明の iRNA 剤の 1 つを対象に投与することにより、哺乳動物対象に対して実施できる。好ましい実施形態では、細胞は少なくとも 2 回、好ましくは 48 時間間隔で、iRNA 剤に接触させられる。細胞内において MLL - AF4 融合 mRNA が減少すると、生成される MLL - AF4 融合タンパク質の量が低減し、生物では MLL - AF4 融合物媒介型疾病の効果を減らすことができる。

【0030】

本発明の特徴である方法および組成物、例えば、本明細書に記載されている増殖性疾患を治療するための方法および組成物は、記載された iRNA 剤のいずれかと共に利用できる。加えて、本発明の特徴である方法および組成物は、本明細書に記載されている疾病または疾患の治療、および対象、例えば動物、ヒトのような哺乳動物の治療に利用できる。

10

【0031】

本発明の特徴である方法および組成物、例えば、本明細書に記載されている増殖性疾患を治療するための方法および iRNA 組成物は、本明細書に記載されている用量及び / または処方で、そして、本明細書に記載されている投与経路でも利用できる。

【0032】

本発明の特徴である 1 つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面および以下の詳細な説明に記される。本発明のその他の特徴、目的および利点は、この詳細な説明、図面および請求項から明らかになるであろう。本願はすべての目的のために、引用された全ての参照、特許および特許出願を参照により全体として組み込む。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

解説を容易にするために、本明細書では時として、「ヌクレオチド」または「リボヌクレオチド」という用語を、RNA 剤の 1 つまたは複数の単量体サブユニットに関して使用する。本明細書では、「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語の使用は、修飾 RNA またはヌクレオチド代替物に関する場合、以下でさらに記載するように、1 つまたは複数の位置における、修飾ヌクレオチドまたは代替置換部分も指すことがあると理解されよう。

【0034】

本明細書で使用される場合、「RNA 剤」は、無修飾 RNA、修飾 RNA、またはヌクレオシド代替物であり、これらはすべて本明細書に記載されている。多数の修飾 RNA およびヌクレオチド代替物が記載されているが、好ましいものの例には、ヌクレアーゼ分解に対して、無修飾 RNA が有するものより大きな抵抗性を有するものが含まれる。好ましいものの例には、2' 糖修飾、単一鎖突出部分内、好ましくは 3' 単一鎖突出部分内の修飾、あるいは、特に 1 本鎖の場合、1 つもしくは複数のリン酸基または 1 つもしくは複数のリン酸基類似体を含む 5' 修飾を有するものが含まれる。

30

【0035】

本明細書で使用される場合、「iRNA 剤」(「干渉 RNA 剤」の略)は、標的遺伝子、例えば標的融合遺伝子 MLL - AF4 の発現を下方制御できる RNA 剤である。理論に拘泥するものではないが、iRNA 剤は、当技術分野では時に RNA i と呼ばれる標的 mRNA の転写後の切断、または転写前もしくは翻訳前の機構を含めた多数の機構のうちの 1 つまたは複数によって作用し得る。iRNA 剤は、2 本鎖 iRNA 剤であり得る。

40

【0036】

「ds iRNA 剤」(「2 本鎖 iRNA 剤」の略)は、本明細書で使用される場合、複数、好ましくは 2 本の鎖を含み、その中で鎖間ハイブリダイゼーションが 2 本鎖構造領域を形成できる iRNA 剤である。本明細書では、「鎖」は、連続したヌクレオチド(天然には存在しないヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドも含まれる)の配列を指す。2 本以上の鎖が別々の分子であっても、それらの各鎖が別々の分子の一部を形成してもよく、また、それらが、例えばリンカー、例えばポリエチレングリコールリンカーによって共有結合で相互連結され、1 分子のみを形成していてもよい。少なくとも 1 本の鎖は、標的 R

50

RNAに十分に相補的な領域を含むものであり得る。そのような鎖は「アンチセンス鎖」と称される。アンチセンス鎖に相補的な領域を含むdsRNA剤中に含まれている第2の鎖は「センス鎖」と称されている。しかしながら、dsRNA剤は、少なくとも一部が自己相補的であり、2本鎖領域を含む、例えばヘアピンまたはフライパンハンドル構造を形成する単一のRNA分子から形成されていてもよい。そのような場合、「鎖」という用語は、同一RNA分子の別の領域に相補的なRNA分子の領域の1つを指す。

【0037】

哺乳動物細胞では、長いdsRNA剤によってインターフェロン応答が誘導されることがあり、それがしばしば有害であるが、短いdsRNA剤は、インターフェロン応答を、少なくとも細胞および/または宿主に有害となる程度までには誘導しない(マンシュエル(Manche, L.)ら、Mol. Cell Biol. 1992年、第12巻、5238頁;リーエスピー(Lee, SB)、エステバンエム(Esteban, M)、Virology、1994年、第199巻、491頁;キャストリジェーシー(Castelli, JC)ら、J. Exp. Med. 1997年、第186巻、967頁;チェンエックス(Zheng, X.)、ベビラクアピーシー(Bevilacqua, PC)、RNA、2004年、第10巻、1934頁;ハイデル(Heidel)ら、Nature Biotechnol.、2004年、第22巻、1579頁)。本発明のiRNA剤は、十分に短い分子を含有しており、それらは正常な哺乳動物細胞で有害な非特異的インターフェロン応答を誘発しない。したがって、対象へのiRNA剤組成物(例えば本明細書に記載の通り製剤化されたもの)の投与を用いて、インターフェロン応答を回避しながら、上記対象に含まれているMLL-AF4融合発現細胞におけるMLL-AF4融合遺伝子の発現をサイレンシングすることができる。十分に短くて、有害なインターフェロン応答を誘発しない分子を、本明細書では、siRNA剤またはsiRNAと称する。「siRNA剤」または「siRNA」は、本明細書で使用される場合、十分に短くて、ヒト細胞で有害なインターフェロン応答を誘導しないiRNA剤、例えばdsRNA剤を指し、それは例えば60ヌクレオチド未満、好ましくは50、40、または30ヌクレオチド未満の2本鎖領域を有する。

【0038】

dsRNA剤およびsiRNA剤を含めた、本明細書に記載の単離されたiRNA剤は、例えばRNA分解によるMLL-AF4融合遺伝子のサイレンシングを媒介することができる。便宜のために、そのようなRNAは、本明細書では、サイレンシングされるRNAとも称される。そのような遺伝子は、標的遺伝子とも称される。サイレンシングされるRNAは、例えば白血病細胞のような細胞に対して内因性であるMLL-AF4融合遺伝子の遺伝子産物であることが好ましい。

【0039】

本明細書で使用される場合、「RNAiを媒介する」という用語は、薬剤が標的遺伝子を配列特異的な様式でサイレンシングする能力を指す。「標的遺伝子をサイレンシングする」とは、それによって、上記薬剤に接触していないときに標的遺伝子の特定の産物を含有および/または分泌する細胞が、上記薬剤に接触しているときに、上記薬剤に接触していない同様な細胞と比較して、そのような遺伝子産物を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%少なく含有および/または分泌するであろう過程を意味する。標的遺伝子のそのような産物は、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)、タンパク質、または調節エレメントであり得る。

【0040】

本明細書で使用される場合、「相補的」という用語は、本発明の化合物と標的RNA分子、例えばMLL-AF4 mRNA分子との間で安定かつ特異的な結合が生じるのに十分な程度の相補性を示すのに使用される。特異的な結合は、特異的な結合が望ましい条件下で、すなわちインビボ試験または治療処置の場合には生理条件下で、あるいはインビトロ試験の場合では同試験が実施される条件下で、非標的配列へのオリゴマー化合物の非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性を必要とする。非標的配列は、通常、少なくと

10

20

30

40

50

も 4 ヌクレオチドの相違を有する。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される場合、iRNA 剤が標的 RNA、例えば標的 mRNA (例えば標的 MLL - AF4 mRNA) に「十分に相補的である」のは、上記 iRNA 剤によって、細胞内での、上記標的 RNA によってコードされたタンパク質の産生が減少する場合である。上記 iRNA 剤は、標的 RNA に「正確に相補的」(サブユニットを含む SRMS を除く)であってもよく、例えば上記標的 RNA と上記 iRNA 剤とがアニールするものでもよい。正確に相補的な領域では、ワトソンクリック塩基対のみでハイブリット形成されていることが好ましい。「十分に相補的な」iRNA 剤は、標的 MLL - AF4 RNA に正確に相補的な内部領域(例えば少なくとも 10 ヌクレオチド)を含み得る。さらに、一部の実施形態では、上記 iRNA 剤が単一ヌクレオチドの相違を特異的に識別する。この場合、上記 iRNA 剤は、単一ヌクレオチド相違の(例えば 7 ヌクレオチド以内の)領域で正確な相補性が存在する場合にのみ RNA i を媒介する。好ましい iRNA 剤は、表 1 に示すセンス配列およびアンチセンス配列に基づいているか、もしくはそれからなるか、もしくはそれを含むであろう。

10

【 0 0 4 2 】

本明細書での使用において、「本質的には同一」は、第 2 のヌクレオチド配列と比較して第 1 のヌクレオチド配列に関して使用される場合、最大 1、2、または 3 ヌクレオチドまでの置換(例えばアデノシンがウラシルで置換されている)を除いて、第 1 のヌクレオチド配列が第 2 のヌクレオチド配列に同一であることを意味する。「培養ヒト SEM 細胞で MLL - AF4 発現を阻害する能力を本質的に保持している」ということは、ヌクレオチドの欠失、添加または置換によって、表 1 の iRNA 剤のうちの 1 つに同一ではないが、それに由来する iRNA 剤に関して本明細書で使用される場合、それが由来した表 1 の iRNA 剤との比較における、得られた iRNA 剤の阻害活性の低下が 20% 阻害以下であることを意味する。例えば、培養ヒト SEM 細胞中に存在する MLL - AF4 mRNA の量を 40% 低下させる、表 1 の iRNA 剤に由来する iRNA 剤は、培養ヒト SEM 細胞中で MLL - AF4 発現を阻害する能力を本質的に保持しているものとみなされるためには、それ自体が、培養ヒト SEM 細胞中に存在する MLL - AF4 mRNA の量を少なくとも 40% 低下させなければならない。選択的に、本発明に特徴的な iRNA 剤は、培養ヒト SEM 細胞中に存在する MLL - AF4 mRNA の量を少なくとも 40% 低下させるものでもよい。

20

30

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される場合、「対象」は、MLL - AF4 融合タンパク質発現によって媒介された障害の治療を受けている哺乳類生物を指す。対象は、ウシ、ウマ、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギ、または霊長類など、いかなる哺乳動物でもよい。好ましい実施形態では、対象はヒトである。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される場合、MLL - AF4 融合発現に関連した障害は、1)、MLL - AF4 融合タンパク質の存在によって一部媒介され、かつ 2) 存在している、MLL - AF4 融合タンパク質のレベルを低減することによって結果に影響を与えることができるいかなる生物学的または病理学的状態も指す。MLL - AF4 融合発現に関連した特定の障害について以下に述べる。

40

【 0 0 4 5 】

(MLL - AF4 誤発現に関連した障害)

MLL - AF4 融合産物は、乳児急性リンパ芽球性白血病のような急性リンパ芽球性白血病(ALL)に関連していた。ALL に罹患した患者は典型的には顕著な白血球の増加と複数の器官における髄外疾患とを呈し、化学療法に対する応答不良であり、予後不良である。

【 0 0 4 6 】

(iRNA 剤の設計および選択)

50

本発明は、iRNA剤でインキュベートした後の培養細胞における、インビトロでのMLL-AF4融合遺伝子サイレンシングの実証、およびその結果である増殖抑制効果に基づいている。

【0047】

配列情報と望ましい特徴とに基づいて、iRNA剤を合理的に設計することができる。例えば、候補となる2本鎖の相対的融解温度に従ってiRNA剤を設計することができる。通常、2本鎖は、アンチセンス鎖の3'末端より、アンチセンス鎖の5'末端で、より低い融解温度を有するはずである。

【0048】

また、例えば、標的遺伝子として働くであろう遺伝子の遺伝子歩行分析を行うことによって、候補となるiRNA剤を設計することができる。転写領域のすべてまたは一部に相当する、オーバーラップ、隣接、または近接した候補薬剤を生成させ、試験することができる。各iRNA剤を、標的遺伝子発現を下方制御する能力に関して試験および評価することができる(下記、「候補となるiRNA剤の評価」を参照)。

【0049】

以下に示す実施例1は、遺伝子歩行のアプローチをヒトMLL-AF4 mRNAの融合部位を標的とする潜在的なiRNA剤を評価するために使用したことを示す。与えられた結果に基づいて、表1はMLL-AF4を標的とする活性iRNA剤を提供している。以下の実施例に示されるように、表1の薬剤番号1乃至12のiRNA剤は、これらの薬剤と共にインキュベーションした後の培養MLL-AF4融合遺伝子発現細胞中に存在するMLL-AF4融合mRNAの量が、上記薬剤と共にインキュベートされていない細胞と比較して40%超低減するという長所および驚くべき能力を有する。

【0050】

これらの結果に基づいて、本発明は、表1に示されている薬剤のセンス鎖配列における少なくとも15の連続したヌクレオチドを有するセンス鎖と、表1に薬剤番号1-12にて示されている薬剤のアンチセンス鎖配列における少なくとも15の連続したヌクレオチドを有するアンチセンス鎖とを含有するiRNA剤を特に提供する。

【0051】

以下の実施例1に示したiRNA剤は、薬剤番号2のものを除いて、長さ21ヌクレオチドのセンス鎖と、長さ23ヌクレオチドのアンチセンス鎖とで構成されている。しかしながら、これらの長さは潜在的に最適であり得るが、上記iRNA剤はこれらの長さに限定されない。長さが特定の範囲内である場合には、有効性は鎖の長さより、むしろヌクレオチド配列の関数であるので、当業者は、より短いiRNA剤またはより長いiRNA剤も同様に有効であり得ることを十分に認識している。例えば、ヤンディ(Yang, D.)ら(PNAS、2002年、第99巻、9942~9947頁)は、長さが21塩基対と30塩基対との間にあるiRNA剤が同様な効力を有することを実証した。他では、長さ約15塩基対にまで短くしたiRNA剤による効果的な遺伝子サイレンシングが示されている(バイロムダブリュ.エム.(Byrom, W.M.)ら、「Inducing RNAi with siRNA Cocktails Generated by RNase III」、Tech Notes、第10(1)巻、アンピオン社(Ambion, Inc.)、米国テキサス州オースティン(Austin)所在)。

【0052】

したがって、表1に提示した配列の1つに由来するiRNA剤を産生するために、表1に提示した配列から、15~22ヌクレオチドの間の部分配列を選択することが可能であり、かつ本発明で企図されている。代替的に、表1に提示した配列のうちの1つに1個または数個のヌクレオチドを添加してもよい。この場合、必須ではないが、添加されたヌクレオチドが標的遺伝子、例えばMLL-AF4融合遺伝子のそれぞれの配列に相補的となるような様式が好ましい。このようにして派生するすべてのiRNA剤もそれらが培養ヒトSEM細胞におけるMLL-AF4発現を阻害する能力を本質的に保持するという場合には、本発明のiRNA剤に含まれる。

10

20

30

40

50

【0053】

iRNA剤のアンチセンス鎖は、長さが14、15、16、17、18、19、25、29、40または50ヌクレオチド以上であるべきである。上記アンチセンス鎖は、長さが60、50、40、または30ヌクレオチド以下であるべきである。好ましい長さの範囲は、15～30、17～25、19～23、および19～21ヌクレオチドである。

【0054】

iRNA剤のセンス鎖は、長さが14、15、16、17、18、19、25、29、40または50ヌクレオチド以上であるべきである。上記センス鎖は、長さが60、50、40または30ヌクレオチド以下であるべきである。好ましい長さの範囲は、15～30、17～25、19～23、および19～21ヌクレオチドである。

10

【0055】

iRNA剤の2本鎖部分は、長さが15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、29、40または50ヌクレオチド対以上であるべきである。上記2本鎖部分は、長さが60、50、40または30ヌクレオチド対以下であるべきである。好ましい長さの範囲は、15～30、17～25、19～23、および19～21ヌクレオチド対である。

【0056】

通常、本発明のiRNA剤は、MLL-AF4融合遺伝子と十分な相補性を有する領域を含み、上記iRNA剤またはその断片がMLL-AF4融合遺伝子の下方制御を媒介できる十分なヌクレオチドの長さを有する。表1のiRNA剤のアンチセンス鎖は、ヒトMLL-AF4融合遺伝子のmRNA配列に完全に相補的であり、それらのセンス鎖は、上記アンチセンス鎖上の2つの3'末端ヌクレオチドを除いて、上記アンチセンス鎖に完全に相補的である。しかしながら、上記iRNA剤と上記標的との間に完全な相補性が存在している必要はなく、但し、それらの対応性は、上記iRNA剤またはその切断産物が、例えばMLL-AF4 mRNAのRNAi切断による配列特異的なサイレンシングを誘導するのを可能にするのに十分でなければならない。

20

【0057】

したがって、本発明のiRNA剤には、培養ヒトSEM細胞におけるMLL-AF4発現を阻害する能力を本質的に保持しながら、それぞれ、鎖当たり1、2、または3つ以下のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換されている（例えばアデノシンがウラシルで置換されている）ことを除いて、下記に定義する通り、それぞれが、表1の配列の1つに本質的に同一である少なくとも16、17または18ヌクレオチドの配列からなるセンス鎖およびアンチセンス鎖からなる薬剤が含まれる。したがって、これらの薬剤は、表1の配列の1つに同一であるが、標的MLL-AF4 mRNA配列に関して、もしくはセンス鎖とアンチセンス鎖との間に、1、2または3塩基のミスマッチが導入されている少なくとも15ヌクレオチドを有するものであろう。標的MLL-AF4 mRNA配列とのミスマッチ、特にアンチセンス鎖におけるミスマッチは、末端領域で最もよく許容され、存在する場合には、1箇所または複数の末端領域内、例えば5'および/または3'末端の6、5、4、または3ヌクレオチド以内にあることが好ましく、センス鎖の5'末端またはアンチセンス鎖の3'末端の6、5、4、または3ヌクレオチド以内にあることが最も好ましい。上記センス鎖は、分子の全体的な2本鎖特性を維持するのに十分なだけアンチセンス鎖に相補的であればよい。

30

40

【0058】

上記センス鎖およびアンチセンス鎖は、上記iRNA剤が、その分子の一端または両端に単一鎖または不對領域を含有するように選択されることが好ましい。したがって、iRNA剤は、好ましくは突出部分、例えば1または2つの5'または3'突出部分、但し好ましくは2～3ヌクレオチドの3'突出部分1つを含有するように対合したセンス鎖およびアンチセンス鎖を含有する。ほとんどの実施形態は、3'突出部分を有するであろう。好ましいsiRNA剤は、上記iRNA剤の各末端に長さが1～4ヌクレオチド、好ましくは2または3ヌクレオチドの1本鎖の突出部分、好ましくは3'突出部分を有するであ

50

ろう。上記突出部分は、一方の鎖がもう一方より長い結果、または同じ長さの2本の鎖がずれている結果であり得る。5'末端はリン酸化されていることが好ましい。

【0059】

2本鎖領域の好ましい長さは、15から30ヌクレオチドの間、最も好ましくは18、19、20、21、22および23ヌクレオチドの長さ、例えば上記に論じたsiRNA剤の範囲である。siRNA剤は、長いdsRNAからの天然Dicer調製物に長さおよび構造が類似したものでよい。siRNA剤の2本の鎖が、例えば共有結合によって、連結されている実施形態も含まれる。ヘアピン構造、または必要な2本鎖領域と、好ましくは3'突出部分とを提供する他の1本鎖構造も本発明に包含される。

【0060】

(候補となるiRNA剤の評価)

候補となるiRNA剤を、それが標的遺伝子発現を下方制御する能力に関して評価することができる。例えば、候補となるiRNA剤を用意し、標的遺伝子、例えばMLL-AF4融合遺伝子を内因的に発現するか、あるいはMLL-AF4融合遺伝子をそれから発現することができるコンストラクトでトランスフェクションされていることによって発現する細胞、例えばSEM細胞に接触させることができる。上記候補となるiRNA剤との接触の前および後の標的遺伝子発現のレベルを、例えばmRNAまたはタンパク質レベルで比較することができる。標的遺伝子から発現されたRNAまたはタンパク質の量が、上記iRNA剤と接触した後に低下していると判定された場合、上記iRNA剤が標的遺伝子発現を下方制御すると結論付けることができる。細胞中の標的MLL-AF4RNAまたはMLL-AF4タンパク質のレベルは、いかなる望ましい方法でも測定できる。例えば、標的RNAのレベルは、ノーザンブロット解析、逆転写連結ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、またはRNAアーゼプロテクションアッセイで測定することができる。タンパク質のレベルは、例えば、ウェスタンブロット解析または免疫蛍光によって測定することができる。

【0061】

(iRNA剤の安定性試験、修飾、および再試験)

候補となるiRNA剤を、そのiRNA剤が対象の体内に導入された際などの安定性、例えばエンドヌクレアーゼまたはエクソヌクレアーゼによる切断に対する感受性に関して評価することができる。同方法は、修飾、特に切断、例えば対象の体内に存在する成分による切断の影響を受けやすい部位を同定する方法を利用することができる。

【0062】

切断の影響を受けやすい部位が同定された場合、例えば切断部位への2'修飾、例えば2'-O-メチル基の導入によって、上記潜在的切断部位が切断に抵抗性を有するように作製された、さらなるiRNA剤を設計および/または合成することができる。このさらなるiRNA剤を、安定性に関して再試験することができ、あるiRNA剤が望ましい安定性を示すことが見出されるまで、この工程を繰り返すことができる。

【0063】

(インビボ試験)

MLL-AF4遺伝子発現を阻害できるものとして同定されたiRNA剤を、動物モデル(例えばマウスまたはラットなどの哺乳動物)中でのインビボでの機能に関して試験することができる。例えば、上記iRNA剤を動物、例えばMLL-AF4融合遺伝子を発現するように作製された動物に投与して、その生体内分布、安定性、およびそれがMLL-AF4遺伝子発現を阻害する能力に関して評価することができる。

【0064】

上記iRNA剤は、注射などによって標的組織に直接投与することができ、あるいは上記iRNA剤を、それがヒトに投与されるのと同じ様に動物モデルに投与することもできる。

【0065】

上記iRNA剤を細胞内分布に関して評価することもできる。この評価には、上記iR

10

20

30

40

50

RNA 剤が細胞内に摂取されたかどうかの判定も含めることができる。この評価には、上記 iRNA 剤の安定性（例えば半減期）の測定も含めることができる。iRNA 剤のインビボ評価は、追跡可能なマーカー（例えば、フルオレセインなどの蛍光マーカー： ^3H S、 ^{32}P 、 ^{33}P 、もしくは ^3H などの放射性標識；金粒子；または免疫組織化学用抗原粒子）に結合した iRNA 剤の使用によって容易に行うことができる。

【0066】

上記 iRNA 剤を、それが MLL - AF4 遺伝子発現を下方制御する能力に関して評価することができる。インビボでの MLL - AF4 遺伝子発現のレベルは、例えば、insitu ハイブリダイゼーション、または上記 iRNA 剤への組織の曝露の前および後における同組織からの RNA の単離によって測定することができる。組織を採取するために動物を屠殺する必要がある場合、未処置のコントロール動物が比較対象となろう。標的 MLL - AF4 mRNA は、限定されるものではないが、RT - PCR、ノーザンブロット、分岐 DNA アッセイ、または RNA アーゼプロテクションアッセイを含めたいかなる望ましい方法でも検出することができる。代替的又は付随的に、上記 iRNA 剤で処理された組織抽出物のウェスタンブロット解析を行うことによって、MLL - AF4 遺伝子発現をモニタリングすることもできる。

10

【0067】

（iRNA 化学）

ここでは、RNA i を媒介して、MLL - AF4 の発現を阻害する単離された iRNA 剤、例えば dsRNA 剤について述べる。

20

ここで論じる RNA 剤には、他には無修飾の RNA に加えて、例えば効力を向上させるために修飾された RNA、およびヌクレオチド代替物のポリマーも含まれる。無修飾の RNA は、その中で、核酸成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸部分が天然に存在しているもの、好ましくはヒト体内に生来的に存在しているものと同じであるか、もしくは本質的に同じである分子を指す。当技術分野は、まれであるか、もしくは一般的でないが、天然に存在する RNA を修飾 RNA と称することがある。例えば、リンバッハ (Limbach) ら (1994 年)、Nucleic Acids Res. 第 22 巻、2183 ~ 2196 頁を参照されたい。しばしば修飾 RNA と称される（明らかに、それらが通常は転写後修飾の結果であるため）、そのようなまれであるか、もしくは一般的でない RNA は、本明細書で使用される場合、無修飾 RNA という用語の範囲内にある。本明細書で使用される場合、修飾 RNA は、その中で、1 つまたは複数の核酸成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸部分が、天然に存在しているもの、好ましくはヒト体内に生来的に存在しているものと異なる分子を指す。それらは修飾「RNA」と称されるが、それらには修飾により RNA ではない分子も当然ながら含まれる。ヌクレオチド代替物は、その中で、ハイブリダイゼーションが実質的にリボリン酸骨格で見られるものと類似するように、それらの塩基の正しい空間的關係での提示が可能となっている非リボリン酸骨格構造物、例えばリボリン酸骨格の非荷電模倣体で、リボリン酸骨格が置換されている分子である。上記のすべての例が本明細書に論じられている。

30

【0068】

本明細書に記載の修飾は、本明細書に記載のいかなる 2 本鎖 RNA および RNA 様分子、例えば iRNA 剤にも組み入れら得る。上記修飾は、iRNA 剤のアンチセンス鎖およびセンス鎖の一方または両方を修飾することが望ましい。核酸が重合体のサブユニットまたは単量体である場合には、下記の修飾の多くは核酸中で反復される位置で起こり、例えば、塩基もしくはリン酸部分、またはリン酸部分の非結合性 O の修飾である。一部の場合には、上記修飾が核酸中の対象となる位置のすべてで起こるのであるが、多くの場合、そして実際にはほとんどの場合には、そうならないであろう。一例として、修飾は、3' または 5' 末端位置でのみ起こることもあり、あるいは末端領域、例えば鎖の末端ヌクレオチドの位置または最終 2、3、4、5、または 10 ヌクレオチドでのみ起こることもある。修飾は、2 本鎖領域に起こっても、1 本鎖領域に起こっても、あるいはそれら両方に起こってもよい。例えば、非結合性 O の位置でのホスホロチオエート修飾は、一方または両方

40

50

の末端で起こることも、あるいは末端領域、例えば鎖の末端ヌクレオチドの位置または最終2、3、4、5、または10ヌクレオチドでのみ起こることも、あるいは2本鎖および1本鎖領域、特に末端で起こることもある。同様に、修飾は、センス鎖で起こることも、アンチセンス鎖で起こることも、それら両方で起こることもある。一部の場合には、センス鎖およびアンチセンス鎖が同じ修飾または同じクラスの修飾を有するであろう。しかしながら、他の場合には、センス鎖およびアンチセンス鎖は異なった修飾を有するであろう。例えば、一部の場合には、一方の鎖、例えばセンス鎖のみを修飾することが望ましい場合がある。

【0069】

iRNA剤に修飾を導入する2つの主要な目的は、生物学的環境における分解に対するそれらの安定化、および下記に詳細に論じる薬理学的特性、例えば薬動学的特性の改良である。iRNA剤の糖、塩基、または骨格への他の適当な修飾は、共有されている2004年1月16日出願の国際出願第PCT/US2004/01193号パンフレットに記載されている。iRNA剤は、共有されている2004年4月16日出願の国際出願第PCT/US2004/011822号パンフレットに記載の塩基のような天然に存在しない塩基を含有することもできる。iRNA剤は、非糖質環状担体分子のような天然に存在しない糖を含むこともできる。iRNA剤で使用する天然に存在しない糖の例示的特性は、共有されている2003年4月16日出願の国際出願第PCT/US2004/11829号パンフレットに記載されている。

10

【0070】

iRNA剤は、ヌクレアーゼ抵抗性の増強に有用なヌクレオチド間結合（例えばキラルホスホロチオエート結合）を含有できる。付随的に、又は代替的に、ヌクレアーゼ抵抗性を増強させるために、iRNA剤にリボース模倣体を含有させることができる。ヌクレアーゼ抵抗性を増強させるための例示的ヌクレオチド間結合およびリボース模倣体は、共有されている2004年3月8日出願の国際出願第PCT/US2004/07070号パンフレットに記載されている。

20

【0071】

iRNA剤は、リガンド結合単量体サブユニットおよびオリゴヌクレオチド合成用の単量体を含有できる。例示的な単量体は、共有されている2004年8月10日出願の米国特許出願第10/916185号明細書に記載されている。

30

【0072】

iRNA剤は、共有されている2004年3月8日出願の国際出願第PCT/US2004/07070号パンフレットに記載されているようなZXY構造を有することができる。

【0073】

iRNA剤は、両親媒性部分と複合体形成され得る。iRNA剤と共に使用するための例示的な両親媒性部分は、共有されている2004年3月8日出願の国際出願第PCT/US2004/07070号パンフレットに記載されている。

【0074】

iRNA剤のセンス配列及びアンチセンス配列はパリンδροームであり得る。パリンδροームiRNA剤の例示的な特徴は、共有されている2004年3月8日出願の国際出願第PCT/US2004/07070号パンフレットに記載されている。

40

【0075】

別の実施形態では、iRNA剤は、モジュール複合体の特性を有する送達薬剤と複合体形成され得る。この複合体は、(a)濃縮剤（例えば、核酸を、例えばイオンまたは静電気相互作用を介して、誘引、例えば結合できる薬剤）；(b)融合誘導剤（例えば、細胞膜に融合し、かつ/またはそれを通して輸送される性能を有する薬剤）；および、(c)標的化化学基、例えば細胞または組織標的化剤、例えば特定の細胞型に結合するレクチン、糖タンパク、脂質、またはタンパク質（例えば抗体）、のうちの1つまたは複数（好ましくは2つ以上、より好ましくは3つすべて）に結合される担体物質を含み得る。送達物

50

質と複合体形成される iRNA 剤は、共有されている 2004 年 3 月 8 日出願の国際出願第 PCT/US 2004/07070 号パンフレットに記載されている。

【0076】

iRNA 剤は、iRNA 2 本鎖のセンス配列とアンチセンス配列との間などに、非標準的な対合を備え得る。非標準的な iRNA 剤の例示的特徴は、共有されている 2004 年 3 月 8 日出願の国際出願第 PCT/US 2004/07070 号パンフレットに記載されている。

【0077】

(ヌクレアーゼ抵抗性の強化)

iRNA 剤、例えば MLL-AF4 融合体を標的とする iRNA 剤は、同薬剤が有するヌクレアーゼ抵抗性を強化することができる。

抵抗性を強化する方法の 1 つは、共有されている 2004 年 5 月 4 日出願の米国特許仮出願第 60/559917 号明細書に記載の通り、切断部位を同定し、そのような部位を修飾して、切断を阻害することである。例えば、ジヌクレオチド 5' - UA - 3'、5' - UG - 3'、5' - CA - 3'、5' - UU - 3'、又は 5' - CC - 3' を切断部位として利用できる。特定の実施形態では、iRNA 剤のすべてのピリミジンが、2' 修飾を有し、そのため、その iRNA 剤は、エンドヌクレアーゼに対する抵抗性が強化される。ヌクレアーゼ抵抗性の強化は、例えば、共有されている 2004 年 5 月 27 日出願の米国特許仮出願第 60/574744 号明細書に記載の通り、ウリジンが 2' 修飾ヌクレオチドである、少なくとも 1 つの 5' - ウリジン - アデニン - 3' (5' - UA - 3') ジヌクレオチド；5' - ウリジンが 2' 修飾ヌクレオチドである、少なくとも 1 つの 5' - ウリジン - グアニン - 3' (5' - UG - 3') ジヌクレオチド；5' - シチジンが 2' 修飾ヌクレオチドである、少なくとも 1 つの 5' - シチジン - アデニン - 3' (5' - CA - 3') ジヌクレオチド；5' - ウリジンが 2' 修飾ヌクレオチドである、少なくとも 1 つの 5' - ウリジン - ウリジン - 3' (5' - UU - 3') ジヌクレオチド；または 5' - シチジンが 2' 修飾ヌクレオチドである、少なくとも 1 つの 5' - シチジン - シチジン - 3' (5' - CC - 3') ジヌクレオチドをもたらし 5' ヌクレオチド修飾を行うことによって実現できる。上記 iRNA 剤は、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つのそのようなジヌクレオチドを含み得る。

【0078】

2' 修飾ヌクレオチドは、例えば 2' 修飾されたりボース単位を含み、例えば 2' ヒドロキシ基 (OH) は、種々の異なった「オキシ」または「デオキシ」置換基で修飾または置換され得る。

【0079】

「オキシ」- 2' ヒドロキシ基修飾の例には、アルコキシもしくはアリアルオキシ (OR、例えば R = H、アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアル、または糖)；ポリエチレングリコール (PEG)、すなわち $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ；例えばメチレン架橋によって 2' ヒドロキシ基が同じリボース糖の 4' 炭素に連結されている「ロケット」核酸 (LNA)、O-AMINE、およびアミノアルコキシ、すなわち $O(CH_2)_nAMINE$ (例えば、AMINE = NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)が含まれる。メトキシエチル基 (MOE) ($OCH_2CH_2OCH_3$ 、PEG 誘導体)のみを含有するオリゴヌクレオチドは、強固なホスホロチオエート修飾で修飾されたものに匹敵するヌクレアーゼ安定性を示すことは、注目に値する。

【0080】

「デオキシ」修飾には、水素 (すなわち、デオキシリボース糖、これらは部分的 dsRNA の突出部分に特に重要である)；ハロ (例えばフルオロ)；アミノ (例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、ジヘテロアリアルアミノ、またはアミノ酸)；NH (CH

10

20

30

40

50

${}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-AMINE}$ (AMINE = NH_2 ; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ)、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (R = アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖)、シアノ; メルカプト; アルキル-チオ-アルキル; チオアルコキシ; 及びアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル、およびアルキニルが含まれ、これらは、選択的に、例えばアミノ官能基で置換することができる。

【0081】

好ましい置換基は、 $2' - \text{メトキシエチル}$ 、 $2' - \text{OCH}_3$ 、 $2' - \text{O - アリル}$ 、 $2' - \text{C - アリル}$ 、および $2' - \text{フルオロ}$ である。

10

オリゴヌクレオチド骨格におけるフラノース糖の包含も、エンドヌクレオチド鎖切断を低減できる。iRNA 剤は、さらに $3'$ 陽イオン基を包含させることによって、あるいは $3' - 3'$ 連結を伴う $3'$ 末端でのヌクレオシドの反転によって修飾され得る。別の代替法では、アミノアルキル基、例えば、 $3' \text{C}5 - \text{アミノアルキル dT}$ で $3'$ 末端をブロックすることができる。他の $3'$ 結合体も、 $3' - 5'$ エクソヌクレオチド分解性の切断を阻害できる。理論に拘泥するものではないが、ナプロキセンまたはイブプロフェンなどの $3'$ 結合体は、エクソヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドの $3'$ 末端に結合するのを立体的にブロックすることによって、エクソヌクレオチド分解性の切断を阻害し得る。小さなアルキル鎖、アリール基、または複素環式結合もしくは修飾糖 (D - リボース、デオキシリボース、グルコースなど) でさえも、 $3' - 5'$ エクソヌクレアーゼをブロックすることができる。

20

【0082】

ヌクレオチド分解性の切断はまた、リン酸リンカーの修飾、例えばフォスフォロチオエート結合を導入することにより阻害され得る。従って、好ましい iRNA 剤は、通常は酸素が占めている架橋部以外の位置にヘテロ原子を含有する修飾リン酸基の特定のキラル形に関して豊富または純粋であるヌクレオチド 2 量体を含有する。ヘテロ原子は、S、Se、 Nr_2 又は Br_3 であり得る。ヘテロ原子が S である場合、Sp 連結に関して豊富であるか、純粋なキラルであることが好ましい。豊富であるとは、少なくとも 70、80、90、95、または 99% が好ましい形態であることを意味する。修飾リン酸結合は、 $5' -$ 又は $3' -$ 末端、好ましくは、iRNA 剤の $5' -$ 末端の位置付近に導入された場合エクソヌクレオチド分解性の切断を阻害する上においては特に効果的である。

30

【0083】

$5' -$ 結合は、 $5' - 3' -$ エクソヌクレオチド分解性の切断も阻害する。理論に拘泥するものではないが、ナプロキセンまたはイブプロフェンなどの $5'$ 結合体は、エクソヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドの $5'$ 末端に結合するのを立体的にブロックすることによって、エクソヌクレオチド分解性の切断を阻害し得る。小さなアルキル鎖、アリール基、または複素環式結合もしくは修飾糖 (D - リボース、デオキシリボース、グルコースなど) でさえも、 $3' - 5' -$ エクソヌクレアーゼをブロックすることができる。

【0084】

iRNA 剤は、2 本鎖 iRNA 剤が少なくとも一方の末端に 1 本鎖ヌクレオチド突出部分を含んでいる場合に、ヌクレアーゼに対する抵抗性を増大させることができる。好ましい実施形態では、上記ヌクレオチド突出部分は、1 乃至 4 個の、好ましくは 2 乃至 3 個の不对ヌクレオチドを含有する。好ましい実施形態では、末端ヌクレオチド対に直接隣接している上記 1 本鎖の突出部分の不对ヌクレオチドがプリン塩基を含有し、上記末端ヌクレオチド対が G - C 対であるか、もしくは相補的な最終 4 ヌクレオチド対のうち少なくとも 2 対が G - C 対である。さらに別の実施形態では、上記ヌクレオチド突出部分は、1 または 2 つの不对ヌクレオチドを有することがあり、例示的实施形態では、上記ヌクレオチド突出部分が $5' - \text{GC} - 3'$ である。好ましい実施形態では、上記ヌクレオチド突出部分が、上記アンチセンス鎖の $3'$ 端にある。一実施形態では、上記 iRNA 剤は、2 nt の突出部分 $5' - \text{GC} - 3'$ が形成されるように、上記アンチセンス鎖の $3'$ 末端に $5'$

40

50

- C G C - 3 ' というモチーフを含有する。

【 0 0 8 5 】

したがって、iRNA 剤は、例えば対象の体内に存在するヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼまたはエクソヌクレアーゼによる分解を阻害するように修飾された単量体を含有できる。これらの単量体は、本明細書ではNRMすなわちヌクレアーゼ抵抗性促進単量体と称され、対応する修飾は、NRM修飾と称される。多くの場合、これらの修飾は、iRNA 剤の他の特性、例えばタンパク質、例えば運搬体タンパク質、例えば血清アルブミンまたはRISCのメンバー、と相互作用する能力、または第1の配列および第2の配列の、お互いと2本鎖を形成する能力、もしくは別の配列、例えば標的分子と2本鎖を形成する能力、も調節するであろう。

10

【 0 0 8 6 】

1つまたは複数の異なったNRM修飾を、iRNA 剤の中、または、iRNA 剤の配列の中に導入することができる。1つの配列中またはiRNA 剤中で1つのNRM修飾を複数回用いることができる。

【 0 0 8 7 】

NRM修飾には、末端にのみ配置できる一部のものも、いかなる位置にも配置できる他のものも含めることができる。一部のNRM修飾は、ハイブリダイゼーションを抑制する可能性があり、したがって、それらは末端領域のみで使用するのが好ましく、それらを切断部位、または対象の配列もしくは遺伝子を標的とする配列、特にアンチセンス鎖上の切断領域にて用いないことが好ましい。それらは、上記ds iRNA 剤の2つの鎖の間で十分なハイブリダイゼーションが維持される場合に、センス鎖の任意の場所にて使用できる。一部の実施形態では、NRMが標的外のサイレンシングを最小にし得るので、NRMを切断部位またはセンス鎖の切断領域に配置するのが望ましい。

20

【 0 0 8 8 】

ほとんどの場合、NRM修飾は、それらがセンス鎖に含まれるか、もしくはアンチセンス鎖に含まれるかに応じて異なって分配されるであろう。アンチセンス鎖に含まれる場合には、エンドヌクレアーゼ切断を妨害または阻害する修飾は、RISC媒介の切断を受ける領域、例えば切断部位または切断領域に挿入されるべきでない(本願明細書に援用する、エルバシル(Elbashir)ら、2001年、Genes and Dev. 第15巻、188頁に記載されている)。標的の切断は、20または21ntのアンチセンス鎖のほぼ中央、すなわち上記アンチセンス鎖に相補的な標的mRNAの最初のヌクレオチドの上流のほぼ10または11ヌクレオチドで起こる。本明細書で 사용되는場合、切断部位は、標的またはそれにハイブリダイズするiRNA 剤の鎖における、切断部位のいずれかの側のヌクレオチドを指す。切断領域は、いずれかの方向における、上記切断部位の1、2、または3ヌクレオチド以内にあるヌクレオチドを意味する。

30

【 0 0 8 9 】

そのような修飾は、末端領域、例えばセンス鎖またはアンチセンス鎖の末端位置、または上記末端の2、3、4、もしくは5番目の位置を含めた位置に導入することができる。

(テザーリガンド)

薬理学的特性を含めたiRNA 剤の特性は、リガンド、例えば、テザーリガンドを導入することによって、影響を受け、調整され得る。

40

【 0 0 9 0 】

多種多様な構成要素、例えば、リガンドを、iRNA 剤、例えば、リガンド結合単量体サブユニットの担体に連結することができる。リガンド結合単量体サブユニットの場合について以下にその例を説明するが、これは単に好適な例に過ぎず、同構成要素はiRNA 剤のその他の点にも結合することができる。

【 0 0 9 1 】

好ましい部分は、干渉テザー(tether)を介して直接的または間接的に担体に、好ましくは共有結合するリガンドである。好ましい実施形態では、このリガンドは干渉テザーを介して担体に結合される。リガンド結合単量体が伸長する鎖に取り込まれるとき、

50

リガンドまたはテザーリガンドは、リガンド結合単量体上に存在し得る。いくつかの実施形態では、このリガンドは、「前駆体」リガンド結合単量体サブユニットが伸長する鎖に取り込まれた後で、同「前駆体」リガンド結合単量体サブユニットに取り込まれる。例えば、 $TAP-(CH_2)_nNH_2$ などのアミノ末端テザーなどを有する単量体は、伸長するセンスまたはアンチセンス鎖に取り込まれてよい。その後の操作において、すなわち、前駆体単量体サブユニットが鎖に取り込まれた後で、求電子基、例えば、ペンタフルオロフェニルエステルまたはアルデヒド基を有するリガンドは、リガンドの求電子基と前駆体リガンド結合単量体サブユニットテザーの末端求核基との結合によって、その後前駆体リガンド結合単量体に結合され得る。

【0092】

好ましい実施形態では、リガンドは、取り込まれたiRNA剤の分布、標的化または寿命を改変する。好ましい実施形態では、リガンドは、例えば、このようなリガンドを備えていない種と比較して、選択した標的、例えば、分子、細胞または細胞種、細胞区画もしくは器官区画などの区画、組織、器官または身体の領域に対する親和性を増強する。

【0093】

好ましいリガンドは、輸送、ハイブリダイゼーションおよび特異性の特性を改善することができ、得られた天然もしくは修飾オリゴリボヌクレオチド、または本明細書で説明した単量体および/または天然もしくは修飾リボヌクレオチドの任意の組合せを含むポリマー分子のヌクレアーゼ抵抗性も改善することができる。

【0094】

一般的に、リガンドは、例えば、取り込みを高めるための治療調節剤、例えば、分布をモニタリングするための診断用化合物もしくはレポーター群、架橋剤、ヌクレアーゼ抵抗性を付与する部分および天然もしくは通常にはない核塩基を含むことができる。一般的な例には、脂溶性分子、脂質、レクチン、ステロイド（例えば、ウバオール、ヘシゲニン（hecigenin）、ジオスゲニン）、テルペン（例えば、トリテルペン、例えば、サルササボゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸）、ビタミン、炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリンまたはヒアルロン酸）、タンパク質、タンパク質結合剤、インテグリン標的化分子、ポリカチオン、ペプチド、ポリアミンおよびペプチド模倣体が含まれる。

【0095】

リガンドは、天然物質または組換えもしくは合成分子、例えば、合成ポリアミノ酸などの合成ポリマーであり得る。ポリアミノ酸の例には、ポリリジン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ（L-ラクチド-コ-グリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマーまたはポリホスファジンが含まれる。ポリアミンの例には、ポリエチレンイミン、ポリリジン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチドポリアミン、ペプチド様ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、陽イオン部分、例えば、陽イオン性脂質、陽イオン性ポルフィリン、ポリアミンの4級塩またはアルファヘリックスペプチドが含まれる。

【0096】

リガンドにはまた、標的化化学基、例えば、細胞または組織標的化剤、例えば、甲状腺刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、サーファクタントタンパク質A、ムチン炭水化物、グリコシル化ポリアミノ酸、トランスフェリン、ビスホスホン酸、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、またはRGDペプチドもしくはRGDペプチド模倣体が含まれる。

【0097】

リガンドは、例えば糖タンパク質、例えば低密度リボタンパク質（LDL）のようなり

10

20

30

40

50

ポタンパク質、ヒト血清アルブミン (HSA) のようなアルブミン、又はペプチドのようなタンパク質、コ-リガンドに対して特異的な親和性を有する分子、或いは癌細胞、内皮細胞又は骨細胞のような特定のタイプの細胞に結合する抗体のような抗体であり得る。リガンドはまた、ホルモン及びホルモン受容体を含み得る。それらはまた、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース又は多価フコースのような非ペプチド種を含み得る。リガンドは、例えばリボ多糖体、p38MAPキナーゼのアクチベータ又はNF- κ Bのアクチベータであり得る。

【0098】

リガンドは、例えば、細胞骨格を破壊することによって、例えば、細胞の微小管、微小繊維および/または中間径繊維を破壊することによって、細胞へのiRNA剤の取り込みを増加させることができる物質、例えば、薬剤であり得る。この薬剤は、例えば、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド (japlakinolide)、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホライドA、インダノシンまたはミオセルビン (myoserbin) であり得る。

【0099】

一態様では、リガンドは脂質または脂質をベースにした分子である。このような脂質または脂質をベースにした分子は、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン (HSA) に結合することが好ましい。HSA結合リガンドは、標的組織、例えば、肝臓の実質細胞を含めた肝組織との結合体の分布を可能にする。HSAに結合できるその他の分子もリガンドとして使用できる。例えば、ネプロキシン (neproxin) またはアスピリンを使用できる。脂質または脂質をベースにしたリガンドは、(a) 結合体の分解に対する抵抗性を増強し、(b) 標的細胞または細胞膜への標的化または輸送を増強し、および/または (c) 血清タンパク質、例えば、HSAへの結合を調節するために使用することができる。

【0100】

脂質をベースにしたリガンドは、標的組織に対する結合体の結合を調節するために、例えば、制御するために使用され得る。例えば、HSAに一層強力に結合する脂質または脂質をベースにしたリガンドは、腎臓を標的とする傾向が少なく、したがって、身体から排出される傾向が低い。HSAにあまり強く結合しない脂質または脂質をベースにしたリガンドは、結合体を腎臓に対する標的とするために使用することができる。

【0101】

好ましい実施形態では、脂質をベースにしたリガンドはHSAに結合する。これは、結合体が好ましくは腎臓以外の組織に分布するような十分な親和性で同HSAに結合することが好ましい。しかしながら、この親和性はHSAリガンドの結合が離れることできないほど強力ではないことが好ましい。

【0102】

別の態様では、リガンドは、標的細胞によって、例えば増殖細胞によって取り込まれる部分、例えば、ビタミンまたは栄養素である。これらは、例えば、悪性型または非悪性型の、例えば、癌細胞の、望ましくない細胞増殖を特徴とする障害を治療するために特に有用である。ビタミンの例には、ビタミンA、EおよびKが含まれる。その他のビタミンの例は、ビタミンB群、例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ピオチン、ピリドキサルまたは癌細胞によって取り込まれるその他のビタミンもしくは栄養素である。

【0103】

別の態様では、リガンドは、細胞透過性薬剤、好ましくはヘリックス細胞透過性薬剤である。この薬剤は両親媒性であることが好ましい。薬剤の例は、tatまたはアンテナペディアなどのペプチドである。この薬剤がペプチドの場合、修飾可能であり、ペプチジル模倣体、反転異性体 (invertomer)、非ペプチドまたは偽ペプチド結合が含まれ、Dアミノ酸も使用できる。ヘリックス剤は、好ましくは親油性相および疎油性相を有するアルファヘリックス剤であることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0104】

(5'-リン酸修飾)

好ましい実施形態では、iRNA剤は、5'がリン酸化されているか、または5'プライム末端にホスホリル類似体を含む。アンチセンス鎖の5'-リン酸修飾には、RISC媒介遺伝子サイレンシングに適合したものが含まれる。適切な修飾には、5'-モノホスファート((HO)2(O)P-O-5')；5'-ジホスファート((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-トリホスファート((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-グアノシンキャップ(7-メチル化または非メチル化)(7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-アデノシンキャップ(Appp)、および任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造(N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-モノチオホスファート(ホスホロチオエート；(HO)2(S)P-O-5')；5'-モノジチオホスファート(ホスホロジチオエート；(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'-ホスホロチオラート((HO)2(O)P-S-5')；酸素/硫黄で置換されたモノホスファート、ジホスファートおよびトリホスファート(例えば、5'-アルファ-チオトリホスファート、5'-ガンマ-チオトリホスファートなど)の任意の更なる組み合わせ、5'-ホスホロアミデート((HO)2(O)P-NH-5'、(HO)(NH2)(O)P-O-5')、5'-アルキルホスホネート(R=アルキル=メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、RP(OH)(O)-O-5'-、(OH)2(O)P-5'-CH2-)、5'-アルキルエーテルホスホネート(R=アルキルエーテル=メトキシメチル(MeOCH2-)、エトキシメチル、など、例えば、RP(OH)(O)-O-5'-)が含まれる。

10

20

【0105】

センス鎖は、同センス鎖を不活性化し、活性型RISCの形成を阻止し、それによって標的外効果を潜在的に減少させるために修飾され得る。これは、センス鎖の5'-リン酸化を阻止する修飾によって、例えば、5'-O-メチルリボヌクレオチドで修飾することによって実現することができる(ニカネン(Nykaenen)ら、2001年、「ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway」Cell、第107巻、309~321頁を参照のこと)。リン酸化を阻止するその他の修飾、例えば、O-MeよりもHによる5'-OHの簡単な置換も使用され得る。代替的に、大きな嵩高い基を5'-リン酸塩に添加して、ホスホジエステル結合に変更してもよい。

30

【0106】

(iRNA剤の細胞への輸送)

理論に結びつけることは望まないが、コレステロール結合iRNA剤とリボタンパク質のある種の成分(例えば、コレステロール、コレステリルエステル、リン脂質)との間の化学的類似性は、iRNA剤と血液中のリボタンパク質(例えば、LDL、HDL)との結合および/またはiRNA剤とコレステロールに親和性を有する細胞成分、例えば、コレステロール輸送経路の成分との相互作用を引き起こす可能性がある。リボタンパク質ならびにその成分は、細胞によって、様々な能動的および受動的輸送機構によって、例えば、限定はしないが、LDL受容体結合LDLのエンドサイトーシス、酸化された、もしくはその他の修飾をされたLDLのスカベンジャー受容体Aとの相互作用によるエンドサイトーシス、肝臓におけるHDLコレステロールのスカベンジャー受容体B1の媒介による取り込み、ピノサイトーシスまたはABC(ATP結合カセット)輸送タンパク質、例えば、ABC-A1、ABC-G1もしくはABC-G4によるコレステロールの膜通過輸送によって取り込まれ、処理される。したがって、コレステロール結合iRNA剤は、このような輸送機構を有する細胞、例えば、肝臓の細胞による取り込みの促進を受けることができた。このように、本発明は、このような成分(例えば、コレステロール)の天然リ

40

50

ガンドを iRNA 剤に結合させるか、またはこの成分（例えば、LDL、HDL）の天然リガンドと関連する、もしくは結合する iRNA 剤に化学的部分（例えば、コレステロール）を結合させることによって、ある種の細胞表面成分、例えば、受容体を発現する細胞に iRNA 剤を標的化させる証拠および一般的方法を提供する。

【0107】

（その他の実施形態）

RNA、例えば、iRNA 剤は、インビボにおいて、例えば、細胞に送達された外来 DNA 鋳型から細胞内で産生され得る。例えば、この DNA 鋳型は、ベクターに挿入され、遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈注射、局所投与によって（米国特許第 5328470 号）、または定位注射によって（例えば、チェン（Chen）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第 91 巻、3054～3057 頁、1994 年）対象に送達され得る。遺伝子治療ベクターの医薬調製物は、許容できる希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含むことができ、または遺伝子送達担体が包埋された徐放性マトリックスを含み得る。DNA 鋳型は、例えば、2 個の転写単位を含むことができ、一方は iRNA 剤の上鎖を含む転写物を生成し、他方は iRNA 剤の下鎖を含む転写物を生成する。この鋳型が転写されたとき、iRNA 剤が生成され、遺伝子サイレンシングを媒介する siRNA 剤断片に処理される。

10

【0108】

（製剤）

本明細書で説明した iRNA は、対象に投与するために製剤化することができる。

20

説明を容易にするために、この項における製剤、組成物および方法は、ほとんどは無修飾 iRNA 剤に関して論じる。しかしながら、これらの製剤、組成物および方法は、その他の iRNA 剤、例えば、修飾 iRNA 剤で実施することができ、このような実施は本発明の範囲内であることを理解されたい。

【0109】

製剤化された iRNA 剤組成物は、様々な状態をとることができる。いくつかの例では、この組成物は少なくとも部分的な結晶、均一な結晶、および/または無水物（例えば、水分が 80、50、30、20 または 10 % 未満）である。他の例では、iRNA 剤は水相、例えば、水を含む溶液に含まれている。

【0110】

30

水相または結晶組成物を、例えば、送達媒体、例えば、リボソーム（特に水相用）または粒子（例えば、結晶組成物に適し得る微粒子）に取り込むことができる。一般的に、iRNA 剤組成物は、企図した投与方法に適合する方法で製剤化される。

【0111】

iRNA 剤調製物は、他の薬剤、例えば、他の治療剤または iRNA 剤を安定化する薬剤、例えば、iRNP を形成するために iRNA 剤と複合体化するタンパク質と、組み合わせて、製剤化することができる。さらに他の薬剤には、キレート剤、例えば、EDTA（例えば、 Mg^{2+} などの 2 価陽イオンを除去するため）、塩、RNAアーゼ阻害剤（例えば、RNAsin などの特異性の広い RNAアーゼ阻害剤）などが含まれる。

【0112】

40

一実施形態では、iRNA 剤調製物には、2 個以上の iRNA 剤（類）、例えば、第 2 の遺伝子に関して、又は同一遺伝子に関して RNAi を媒介する第 2 の iRNA 剤を含む。更に他の調製物には、少なくとも 3 個、5 個、10 個、20 個、50 個または 100 個以上の異なる iRNA 剤種を含めることができる。このような iRNA 剤は、同数の異なる遺伝子に関して RNAi を媒介することができる。

【0113】

このような調製物中の 2 個以上の iRNA が同一遺伝子を標的とする場合、それらは重複も隣接もしていない標的配列を有すること可能で、あるいはこの標的配列は重複していても隣接していてもよい。

【0114】

50

選択的に、本発明の iRNA 剤は、リボソームを用いて製剤化され得る。種々の組成のリボソームが種々の製薬的に活性な成分を部位特異的に送達するために使用され得る (ウィッチ, シー. (Witschi C) ら、Pharm. Res., 1999 年、第 16 巻、382 - 390 頁、イェ, エム. ケイ. (Yeh, M. K.) ら、Pharm. Res., 1996 年、1693 - 1698 頁)。リボソームとカーゴ (cargo) との間の相互作用は通常、特にカチオン性脂質送達系では疎水性の相互作用又は電荷の引力に依存する (ゼルフアティ, オー. (Zelphati, O.) ら、J. Biol. Chem., 2001 年、第 276 巻、35103 - 35110 頁)。HIV tat ペプチド保持リボソームはまた、エンドサイトーシス経路を迂回して、カーゴを直接細胞質に送達するために構築され、かつ使用されてきた (トルチリン, ブイ. ビー. (Torchilin, V. P.) ら、Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes, 2001 年、第 1511 巻、397 - 411 頁、トルチリン, ブイ. ビー. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001 年、第 98 巻、8786 - 8791 頁)。糖グラフトリボソームに封入されると、イセチオン酸ペンタミジン及び誘導体は、通常のリボソームに封入された薬物或いはフリーの薬物と比較してより効果的であることが発見された (パネリー, ジー. (Banerjee, G.) ら、J. Antimicrob. Chemother., 1996 年、第 38 (1) 巻、145 - 150 頁)。温度感受性のタキソールのリボソーム製剤 (熱媒介型標的化薬物送達) は、局所的な高温療法と組み合わせて腫瘍を有するマウスにインビボで投与したところ、高温療法を組み合わせた、又は組み合わせていない、同用量のフリーのタキソールと比較して、腫瘍体積が有意に低減し、生存時間の増加が観察された (シェルマ, ディー. (Sherma, D.) ら、Melanoma Res., 1998 年、第 8 (3) 巻、240 - 244 頁)。インシュリン、IFN- α 、IFN- γ 、及びプロスタグランジン E₁ の送達のためにリボソーム製剤を局所に適用することは、ある程度の成功を収めている (セビッチ, ジー. (Cevc G.) ら、Biochim. Biophys. Acta, 1998 年、第 1368 巻、201 - 215 頁、フォルドバリ, エム. (Foldvari M.) ら、J. Liposome Res., 1997 年、第 7 巻、115 - 126 頁、ショート, エス. エム. (Short S. M.) ら、Pharm. Res., 1996 年、第 13 巻、1020 - 1027 頁、フォルドバリ, エム. ら、Urology, 1998 年、第 52 (5) 巻、838 - 843 頁、米国特許第 5853755 号明細書)。

【0115】

抗体は、リボソームを組織特異的又は細胞特異的に取り込む別の標的装置の代表である (マストロバティスタ, イ. (Mastrobattista, E.) ら、Biochim. Biophys. Acta, 1999 年、第 1419 (2) 巻、353 - 363 頁、マストロバティスタ, イ. ら、Adv. Drug Deliv. Rev., 1999 年、第 40 (1 - 2) 巻、103 - 127 頁)。リボソームのアプローチは、封入された活性成分が徐々に放出されるという能力、免疫系及びタンパク質分解酵素を回避できるという能力、腫瘍を標的化して腫瘍組織への優先的な蓄積及びその漏出しやすい新生血管からの管外遊出による転移を引き起こす能力を含む種々の利点を提供する。例えばポリビニルピロリドンナノ粒子及びマレイレート化ウシ血清アルブミンのようなその他の担体も抗癌剤を新生物細胞に送達するために使用され得る (シャルマ, ディ. (Sharma, D.) ら、Oncol. Res., 1996 年、第 8 (7 - 8) 巻、281 - 286 頁、ムクホパディアイ, エイ. (Mukhopadhyay, A.) ら、FEBS Lett., 1995 年、第 376 (1 - 2) 巻、95 - 98 頁)。従って、非常に多様性かつ合理的な設計及び修飾が容易である標的化及び封入技術を使用して、本発明の iRNA 剤の所望とする細胞への送達が容易になる。

【0116】

上記したように、本発明の製薬組成物はリボソーム成分を含み得る。本発明に従って、リボソームは細胞の原形質膜と融合可能な脂質成分からなり、それにより、同リボソームがカーゴ、即ち核酸分子組成物を細胞に送達可能となる。幾らかの好ましいリボソームは

、当業者に周知である遺伝子送達法において一般的に使用されるリボソームを含む。幾らかの好ましいリボソーム送達ビヒクルは、多重膜リボソーム（MLV）、脂質及び押出脂質（Extruded lipid）を含むが、本発明はそのようなリボソームに限定されるものではない。MLVを調製する方法は当業者には周知である。押出脂質もまた意図される。押出脂質は、MLV脂質と同様に調製される脂質であるが、その全体の内容が本明細書において援用されているテンプレトン（Templet on）らの文献（Nature Biotech., 1997年、第15巻、647-652頁）に記載されているように、調製後にサイズの小さいフィルタから押し出されるものである。小さな単層リボソーム（SUV）もまた、本発明の組成物及び方法において使用され得る。その他好ましいリボソーム送達ビヒクルはポリカチオン脂質組成物を有するリボソーム（即ち、カチオン性リボソーム）を含む。例えば、カチオン性リボソーム組成物は、コレステロールと複合体化される任意のカチオン性リボソームを含むが、限定されることなく、DOTMA及びコレステロール、DOTAP及びコレステロール、DOTIM及びコレステロール、及びDDAB及びコレステロールを含む。本発明で使用されるリボソームは、約10乃至1000ナノメートル（nm）の範囲を含む任意のサイズ又はその間の任意のサイズであり得る。

10

【0117】

リボソーム送達ビヒクルは、哺乳動物の特定の部位を標的化するために修飾され得、それによりその部位において本発明のiRNA剤を標的化し、かつ使用する。適切な修飾は、送達ビヒクルの脂質部分の化学式を操作することを含む。送達ビヒクルの脂質部分の化学式の操作は、同送達ビヒクルの細胞外及び細胞内標的化を誘導する。例えば、リボソームの脂質二重層の電荷を変える化学物質をリボソームの脂質の化学式に加え、それにより同リボソームは特定の電荷特性を有する特定の細胞と融合する。一実施形態において、外因性の標的分子をリボソームに添加することによる標的化（即ち、抗体）のようなその他の標的化機構は本発明のリボソームの必要な成分とはならない。その理由は、免疫学的に活性な器官における効果的な免疫活性は、送達経路が静脈内又は腹腔内である場合には、更なる標的化機構の援助がなくても組成物により既に提供され得るからである。しかしながら、幾らかの実施形態において、リボソームは、標的分子が結合し得る特定の細胞又は組織を標的化するために、同リボソームに組み込まれ得る抗体、可溶性レセプター又はリガンドのような標的化剤を使用して、特定の標的細胞又は組織に指向され得る。リボソームの標的化は、例えば、ホ（Ho）ら、Biochemistry, 1986年、第25巻、5500-6頁、ホら、J Biol Chem, 1987年a、第262巻、13979-84頁、ホら、J Biol Chem, 1987年b、第262巻、13973-8頁及びハン（Huang）らの米国特許第4957735号明細書に記載されており、それらの各文献は、本明細書においてその全体が参照により援用される。一実施形態において、血漿タンパク質又はその他の要因によるリボソームのオプソニン化に起因する細網内皮系細胞による注入リボソームの効果的な取り込みを回避することが望ましい場合には、ガングリオシド（アレン（Allen）ら、FEBS Lett, 1987年、第223巻、42-6頁）又はポリエチレングリコール（PEG）由来の脂質（クリバノフ（Klibanov）ら、FEBS Lett, 1990年、第268巻、235-7頁）のような親水性の脂質が従来のリボソームの二重層内に組み込まれ、いわゆる立体的に安定化した、即ち「ステルス」リボソームが形成される（ウッドル（Woodle）ら、Biochim. Biophys. Acta, 1992年、第1113巻、171-99頁）。そのようなリボソームの変更例は、例えば、ウンガー（Unger）らに付与された米国特許第5705187号明細書、チョイ（Choi）らに付与された米国特許第5820873号明細書、チロシュ（Tirosh）らに付与された米国特許第5817856号明細書、タガワ（Tagawa）らに付与された米国特許第5686101号明細書、ハンらに付与された米国特許第5043164号明細書及びウッドルらに付与された米国特許第5013556号明細書に記載されており、それらの全ては本明細書においてその全体が参照により援用される。

20

30

40

50

【0118】

(治療方法および送達経路)

iRNA剤、例えば、MLL-AF4を標的とするiRNA剤を含む組成物は、様々な経路によって対象に送達することができる。例示的な経路には、クモ膜下、実質、静脈内、経鼻、経口および眼内送達が含まれる。本発明のiRNA剤を投与する好ましい手段は、非経口投与によるものである。

【0119】

iRNA剤は、投与に適した医薬組成物に取り込むことができる。例えば、組成物は、1種または複数種のiRNA剤および薬学的に許容される担体を含むことができる。本明細書では、「薬学的に許容される担体」という用語は、医薬品投与に適合した任意の、およびすべての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤及び吸収遅延剤などを含むものとする。薬学的に活性のある物質のためにこのような媒体および作用物質を使用することは、当該技術分野では周知である。従来の媒体または作用物質が活性化化合物に不適合である場合を除いて、それらは組成物に使用されるものとする。補充的な活性化化合物もこの組成物に組み入れることができる。

【0120】

本発明の医薬品組成物は、局所治療または全身治療が望ましいかどうかに応じて、および治療する部位に応じていくつかの方法で投与することが可能である。投与は、局所投与(眼内、経鼻、経皮を含む)、経口投与又は非経口投与であり得る。非経口投与には、静脈点滴、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射、またはクモ膜下腔内もしくは心室内投与が含まれる。

【0121】

送達の経路は、患者の障害に応じて変更され得る。一般的に、本発明のiRNAの送達は、対象への全身送達を実現するために実施される。これを実現する好ましい手段は、非経口投与による。

【0122】

非経口投与用製剤には、緩衝剤、希釈剤およびその他の適切な添加物も含有できる滅菌水性溶液が含まれる。静脈内注射は、例えばリザーバに取り付けられた心室内カテーテルにより促進され得る。静脈内での使用では、溶質の総濃度は、調製物を等張にするために制御されるべきである。

【0123】

投与は、対象によって提供され得るか、または例えば治療奉仕者のような別の人によって提供され得る。治療奉仕者は、人に治療を提供することに関与する任意の存在、例えば、病院、ホスピス、診療所、外来患者向け診療所で医療に従事する人、例えば、医者、看護師もしくはその他の専門家などの医療従事者、または配偶者または親などの保護者であり得る。投薬は、測定された用量で、または計測された用量を送達する分配器で提供され得る。

【0124】

「治療有効量」という用語は、望ましい生理学的応答をもたらすために、治療する対象において所望するレベルの薬剤を提供するのに必要な、組成物中に存在する量のことである。

【0125】

「生理学的有効量」という用語は、所望とする緩和または治療的效果を与えるために対象に送達される量である。

「薬学的に許容される担体」という用語は、その担体が肺に著しく有害な毒性効果を与えず肺に取り込まれることが可能であることを意味する。

【0126】

「共投与」という用語は、2種以上の薬剤、特に2種以上のiRNA剤を対象に投与することである。薬剤は、単一の医薬組成物に含有され、同時に投与され得るか、または薬剤は別々の製剤に含有され、順番に対象に投与され得る。2種の薬剤が同時に対象にて検

出されることができる限り、2種の薬剤は共投与されたとと言える。

【0127】

担体として有用な医薬賦形剤の種類には、ヒト血清アルブミン(HSA)などの安定化剤、炭水化物、アミノ酸およびポリペプチドなどの賦形剤、pH調整剤または緩衝剤；塩化ナトリウムなどの塩などがある。これらの担体は、結晶形であっても、アモルファス形であってもよく、2つの混合物であってもよい。

【0128】

特に有用である賦形剤には、適合性のある炭水化物、ポリペプチド、アミノ酸またはそれらの組合せが含まれる。適切な炭水化物には、ガラクトース、D-マンノース、ソルブースなどの単糖類、ラクトース、トレハロースなどの二糖類、2-ヒドロキシプロピル-
-シクロデキストリンなどのシクロデキストリン、およびラフィノース、マルトデキストリン、デキストランなどの多糖類、マンニトール、キシリトールなどのアルジトール類が含まれる。好ましい炭水化物群には、ラクトース、トレハロース、ラフィノース、マルトデキストリンおよびマンニトールが含まれる。適切なポリペプチドには、アスパルテームが含まれる。アミノ酸には、アラニンおよびグリシンが含まれ、グリシンが好ましい。

【0129】

適切なpH調整剤または緩衝剤には、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムなどの有機酸および塩基から調製された有機塩が含まれ、クエン酸ナトリウムが好ましい。

【0130】

投与量。iRNA剤は、体重1kg当たり約75mg未満、または体重1kg当たり約70、60、50、40、30、20、10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001または0.0005mg未満の単位用量で、および体重1kg当たりiRNA剤200nmol未満(例えば、約 4.4×10^{16} コピー)の単位用量で、または体重1kg当たりiRNA剤1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、0.075、0.015、0.0075、0.0015、0.00075、0.00015nmol未満の単位用量で投与され得る。例えば、この単位用量は、注射(例えば、静脈内もしくは筋肉内注射、クモ膜下注射、または器官への直接注射)によって、吸入投与、または局所塗布によって投与され得る。

【0131】

器官へ直接(例えば、肝臓に直接)iRNA剤を送達することは、器官当たり約0.0001mg~約3mg、または好ましくは器官当たり約0.0001~約0.001mg、器官当たり約0.03~3.0mg、眼当たり約0.1~3.0mgまたは器官当たり約0.3~3.0mgの程度の投与量であり得る。

【0132】

投与量は、疾患または障害を治療または予防するのに有効な量であり得る。

一実施形態では、単位用量を1日1回より少ない頻度で、例えば、2日、4日、8日または30日毎に1回より少ない頻度で投与する。他の実施形態では、単位用量は一定頻度(例えば、規則正しい頻度)では投与されない。例えば、単位用量を1回で投与することが可能である。iRNA剤が媒介するサイレンシングは、iRNA剤組成物を投与した後、数日間維持され得るので、多くの場合、1日1回より少ない頻度で、場合によっては全治量期間中1回のみ組成物を投与することが可能である。

【0133】

一実施形態では、例えば、2本鎖iRNA剤、またはsiRNA剤(例えば、前駆体、例えば、siRNA剤中に処理されることができるより大きなiRNA剤、またはiRNA剤、例えば、2本鎖iRNA剤、もしくはsiRNA剤、もしくはそれらの前駆体をコードするDNA)の初回量および1回または複数の維持用量が対象に投与される。一回又は複数回の維持用量は、一般的に初回量よりも少なく、例えば、初回量の2分の1少ない。維持治療計画は、1日当たり体重1kgに対して0.01~75mgの範囲、例えば、

1日当たり体重1kgに対して70、60、50、40、30、20、10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001または0.0005mgの一回又は複数回の用量で対象を治療することを含み得る。維持用量は、5、10または30日毎に1回以下投与することが好ましい。さらに、治療計画は、特定の疾患の性質、重症度および患者の全体的状態に応じて変化し得る期間の間、維持され得る。好ましい実施形態では、投与量は1日1回以下、例えば、24、36、48時間以上に1回以下、例えば、5日または8日毎に1回以下にて送達され得る。処置後、患者の状態の変化および疾患状態の徴候の軽減をモニタリングすることができる。化合物の投与量は、患者が現在の用量レベルに有意に応答しない場合増加させることができ、あるいは疾患状態の徴候の軽減が認められた場合、疾患状態が消失した場合、または望ましくない副作用が認められた場合、用量を減少させることができる。

10

【0134】

効果的な用量は、特定の環境下で所望するように、または適切だと考えられるように、単回投与で、または2回以上の投与で投与することができる。反復注入又は頻繁な注入を促進することが望ましい場合、送達装置、例えば、ポンプ、半永久的ステント（例えば、静脈内、腹腔内、嚢内または関節包内）またはリザーバを埋め込むことが適切であり得る。

【0135】

処理が成功した後、疾患状態の再発を防ぐために、本発明の化合物を体重1kg当たり0.001g～100gの範囲の維持用量で投与する維持治療を患者に受けさせることが望ましい（米国特許第6107094号）。

20

【0136】

iRNA剤組成物の濃度は、障害を治療もしくは予防するのに有効であるか、またはヒトの生理学的状態を調節するために十分な量である。投与するiRNAの薬剤の濃度または量は、薬剤について測定されたパラメータ、および経鼻、頬側または肺投与などの投与方法に依存される。例えば、経鼻用製剤は、鼻孔の刺激または灼熱感を回避するために、いくつかの成分をはるかに低い濃度にしなければならない傾向がある。適切な経鼻用製剤を提供するために、経口用製剤を10～100倍希釈することが時として望ましい。

【0137】

非限定的ではあるが、疾患もしくは障害の重症度、以前の治療法、対象の一般的健康状態および/または年齢、その他の既存の疾患を含めたある種の因子が、対象を効果的に治療するために必要な投与量に影響を及ぼし得る。治療に使用するsiRNAなどのiRNA剤の効果的投与量は、特定の治療の期間中、増加または減少し得ることも理解されたい。投与量の変化は、本明細書に記載されているように、診断試験法の結果から得られ、明らかとなり得る。例えば、iRNA剤組成物投与後に対象をモニタリングすることができる。モニタリングからの情報に基づいて、iRNA剤組成物の追加量を投与することができる。

30

【0138】

投薬は、数日から数ヶ月続く治療期間中、または全治するまで、もしくは疾患状態の消失が実現するまで、治療する疾患状態の重症度および応答性に左右される。最適な投薬計画は、患者の身体における薬剤蓄積の測定によって計算することができる。当業者であれば、最適な投与量、投薬方法および反復率を容易に決定することができるだろう。最適な投与量は、個々の化合物の相対的能力に応じて変更可能であり、前述したようにインビトロおよびインビボ動物モデルにおいて効果的であることが発見されたEC50に基づいて一般的に判断することができる。

40

【0139】

本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、それらはさらに限定するものではない。

【実施例】

【0140】

50

試薬の入手先

試薬の入手先が本明細書に具体的に挙げられていない場合、このような試薬は、分子生物学用試薬の任意の供給元から、分子生物学での適用に標準的な量／純度で入手することができる。

【0141】

実施例1：siRNA合成

1本鎖RNAは、Expedite 8909合成機（アプライドバイオシステムズ、アプレラドイチュランド社（Applied Biosystems、Applera Deutschland GmbH）、[ドイツ国、ダルムシュタット（Darmstadt）所在]および固相担体として微細孔性ガラス（CPG、500、グレンリサーチ社（Glen Reserach）、[米国バージニア州スターリング（Starling）所在]）を使用して、1μmolのスケールで固相合成によって作製された。RNAおよび2'-O-メチルヌクレオチドを含有するRNAは、それぞれ対応するホスホラミダイトおよび2'-O-メチルホスホラミダイトを使用して固相合成によって作製された（プロリゴバイオケミ社（Proligo Biochemie GmbH）、[ドイツ国、ハンブルク（Hamburg）所在]）。これらの構成単位を、「Current protocols in nucleic acid chemistry」、ボカージュ・エス・エル（Beaucage, S.L.）ら（編）、John Wiley & Sons, Inc. [アメリカ合衆国ニューヨーク]に記載されたような標準的なヌクレオシドホスホラミダイト化学物質を使用してオリゴボヌクレオチド鎖の配列内の選択部位に取り込ませた。ホスホロチオエート結合は、ヨウ素酸化剤溶液をアセトニトリル（1%）に溶解したボカージュ試薬（クルアケム社（Chruachem Ltd）[英国グラスゴー（Glasgow）所在]）の溶液と置換することによって導入された。他の付随する試薬は、マリנקロットベーカー社（Mallinckrodt Baker）[ドイツ国、グリサイム（Griesheim）所在]から入手した。

【0142】

粗オリゴボヌクレオチドの陰イオン交換HPLCによる脱保護および精製は、確立された方法に従って実施された。収率および濃度は、分光光度計（DU 640B、ベックマンコールター社（Beckman Coulter GmbH）、[ドイツ国、アンターシュリースハイム（Unterschleißheim）所在]）を使用して、波長260nmでそれぞれのRNAの溶液のUV吸収によって測定した。2本鎖RNAは、アニーリング緩衝液（20mMのリン酸ナトリウム、pH6.8、100mMの塩化ナトリウム）中において相補鎖の等モル溶液を混合し、85～90℃の水浴中で3分間加熱し、3～4時間かけて室温まで冷却することによって作製した。精製したRNA溶液を使用するまで-20℃で保存した。

【0143】

実施例2：siRNAのデザイン

効率的なMLL-AF4 siRNAを同定するために、MLL-AF4融合部位のいずれかの側を含み、かつ側面に位置する配列のsiRNAのスキャンを実施した（非特許文献5、非特許文献3、マシャレク（Marshall）ら、Br. J. Haematology、第90巻、308-320頁（1995年））。スキャンを実施するために、本願の発明者らは、MLL-AF4融合部位を含む配列と重複し、かつ同配列から1つのヌクレオチドずつ段階的に下流側に移動させた標的部位を有する14個の異なるsiRNAを合成した。siRNA配列及びそれらの融合mRNAの標的部位を表2に示した。表2に示されるsiRNAの2本鎖は、以下においてはsiMAXと参照され、Xは表2において示されるそれぞれの対応する2本鎖を構成するセンス及びアンチセンス鎖の単位における整数を意味する。例えば、siMA5は、MA5s及びMA5asから形成された2本鎖を意味する。しかしながら、siMAXはMA3s及びMAXas（表1における薬剤番号2）により形成される2本鎖を意味し、siMAMmは、MAMms及びMAMmasにより形成されるミスマッチ2本鎖を意味する。

【 0 1 4 4 】

加えて、一つの *s i R N A* が *R S 4 ; 1 1* 細胞における融合部位変種と相同して合成された（本明細書においては *s i M A R S*）。*s i M A R S* のセンス鎖の位置 1 乃至 2 1 は、*G e n b a n k* 登録番号 *L 2 2 1 7 9* の位置 4 3 3 8 - 4 3 5 8 に対応する（バージョン番号： *L 2 2 1 7 9 . 1* *G I : 3 4 7 3 7 6*、非特許文献 5）。

【 0 1 4 5 】

【表 2】

表 2 : MLL-AF4 siRNA の配列^d融合 mRNA: ACAAAAACCAAAAGAAAAG / CAGACCUACUCCAAUGAAG^c (配列番号 42)^c

| | | 配列番号 |
|--------------------|--------------------------------------|------|
| MA1s ^a | 5' - AAG / CAGACCUACUCCAAUGAA -3' | 1 |
| MA1as ^b | 3' - UUUUC / GUCUGGAUGAGGUUACUU -5 | 2 |
| MA2s | 5' - AAAG / CAGACCUACUCCAAUGA - 3' | 3 |
| MA2as | 3' - CUUUUC / GUCUGGAUGAGGUUACU - 5' | 4 |
| MA3s | 5' - AAAAG / CAGACCUACUCCAAUG - 3' | 5 |
| MA3as | 3' - UCUUUUC / GUCUGGAUGAGGUUAC - 5' | 6 |
| MAxas | 3' - UCUUUUC / GUCUGGAUGAGGUU - 5' | 7 |
| MAms | 5' - AAAAG / CUGACCUUCUCCAAUG - 3' | 8 |
| MAmas | 3' - UCUUUUC / GACUGGAAGAGGUUAC - 3' | 9 |
| MA4s | 5' - GAAAAG / CAGACCUACUCCAAU - 3' | 10 |
| MA4as | 3' - UUCUUUC / GUCUGGAUGAGGUUA - 5' | 11 |
| MA5s | 5' - AGAAAAG / CAGACCUACUCCAA - 3' | 12 |
| MA5as | 3' - UUUCUUUC / GUCUGGAUGAGGUU - 5' | 13 |
| MA6s | 5' - AAGAAAAG / CAGACCUACUCCA - 3' | 14 |
| MA6as | 3' - UUUUCUUUC / GUCUGGAUGAGGU - 5' | 15 |
| MA7s | 5' - AAAGAAAAG / CAGACCUACUCC - 3' | 16 |
| MA7as | 3' - GUUUUCUUUC / GUCUGGAUGAGG - 5' | 17 |
| MA8s | 5' - AAAAGAAAAG / CAGACCUACUC - 3' | 18 |
| MA8as | 3' - GGUUUUCUUUC / GUCUGGAUGAG - 5' | 19 |
| MA9s | 5' - CAAAAGAAAAG / CAGACCUACU - 3' | 20 |
| MA9as | 3' - UGGUUUCUUUC / GUCUGGAUGA-5' | 21 |
| MA10s | 5' - CCAAAGAAAAG / CAGACCUAC - 3' | 22 |
| MA10as | 3' - UUGGUUUUCUUUC / GUCUGGAUG - 5' | 23 |
| MA11s | 5' - ACCAAAAGAAAAG / CAGACCUA - 3' | 24 |
| MA11as | 3' - UUUGGUUUUCUUUC / GUCUGGAU - 5' | 25 |
| MA12s | 5' - AACCAAAGAAAAG / CAGACCU - 3' | 26 |
| MA12as | 3' - UUUUGGUUUUCUUUC / GUCUGGA - 5' | 27 |
| MA13s | 5' - AAACCAAAGAAAAG / CAGACC - 3' | 28 |
| MA13as | 3' - UUUUGGUUUUCUUUC / GUCUGG - 5' | 29 |
| MA14s | 5' - AAAACCAAAGAAAAG / CAGAC - 3' | 30 |
| MA14as | 3' - GUUUUGGUUUUCUUUC / GUCUG - 5' | 31 |
| siMARSs | 5' - ACUUUAAGCAGACCUACUCCA - 3' | 32 |
| siMARSas | 3' - CCUGAAAUUCGUCUGGAUGAGGU - 5' | 33 |
| siAGF1s | 5' - CCUCGAAAUUCGUACUGAGAAG - 3' | 34 |
| siAGF1as | 3' - UUGGAGCUUUAAGCAUGACUCU - 5' | 35 |
| siAGF6s | 5' - CCUCGAAAUUCGUUCUGAGAAG - 3' | 36 |
| siAGF6as | 3' - UUGGAGCUUUAAGCAAGACUCU - 5' | 37 |
| siGL2s | 5' - CGUACGCGGAAUACUUCGATT - 3' | 38 |
| siGL2as | 3' - TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU - 5' | 39 |
| siK4s | 5' - GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA - 3' | 40 |
| siK4as | 3' - UCCUACUCCUAGCAAAGCGUACU - 5' | 41 |

^a「s」はセンス鎖を示す^b「as」はアンチセンス鎖を示す^c「/」は11番染色体及び4番染色体配列間の融合部位を示す^d2本鎖 siRNA 剤は明細書中では「siMAN」として参照される

n=1~14、MA3sとMAxasの2本鎖に対してはsiMAx、

2本鎖MAms+MAmsに対してはsiMAm

のミスマッチ対照 *si* A F 6 (A M L / M T G 8 を標的とするもの) 並びに *si* R N A *si* K 4 及び *si* G L 2 (ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ mRNA を標的とするもの) (ハイデンライヒ (H e i d e n r e i c h) ら、B l o o d、第 1 0 1 巻、3 1 5 7 - 3 1 6 3 頁 (2 0 0 3 年)) を使用した。*si* A G F 1 のセンス鎖の 1 乃至 2 1 位は、A M L 1 / M T G 8 (G e n b a n k 取得番号 D 1 3 9 7 9) の 2 1 0 2 乃至 2 1 2 2 位に対応する。*si* A G F 6 は *si* A G F 1 とは、センス鎖配列の 8 及び 1 3 位における A から U への変更及びアンチセンス配列に対する対応する変化を除いては、同一である。*si* G L 2 のセンス鎖の 1 乃至 2 1 位は、P . p y r a l i s l u c i f e r a s e (G e n b a n k 取得番号 M 1 5 0 7 7) の 5 1 4 乃至 5 3 3 位に対応する。*si* K 4 のセンス鎖の 1 乃至 2 1 位は、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ I I (G e n b a n k 取得番号 L 1 1 0 1 7) の 4 1 8 4 乃至 4 2 0 2 位に対応する。

10

【 0 1 4 6 】

si M A x、*si* A G F 1、*si* A G F 6 及び *si* G L 2 を除く *si* R N A は、2 1 のヌクレオチド長のセンス鎖と 2 3 のヌクレオチド長のアンチセンス鎖から構成されており、*si* R N A はアンチセンス鎖により 2 個のヌクレオチドが一つの 3' - 突出部分を形成する。*si* M A x、*si* A G F 1、*si* A G F 6 及び *si* G L 2 は、2 1 のヌクレオチド長のセンス鎖及びアンチセンス鎖から構成されており、両端に 2 個のヌクレオチドの 3' - 突出部分を形成する。

【 0 1 4 7 】

実施例 3：細胞培養

研究された複数の遺伝子から発現された mRNA のレベルを低減する種々の *si* R N A の効果を細胞株 S E M (グレイル (G r e i l) ら、B r J H a e m a t o l .、第 8 6 巻、2 7 5 - 2 8 3 頁、1 9 9 4 年)、R S 4 ; 1 1 (ストング、アール・シー。(S t o n g , R . C .) ら、B l o o d、第 6 5 巻、2 1 - 3 1 頁、1 9 8 5 年) (ドイツ国、ブラウンシュワイクに所在の D S M Z から入手した) 及び M V 4 ; 1 1 (ランゲ、ピー・エイチ。(L a n g e , B . H .) 及びウィンフィールド、エイチ・エヌ。(W i n f i e l d , H . N .)、C a n c e r、第 6 0 巻、4 6 4 - 4 7 2 頁、1 9 8 7 年) (ドイツ国ハノーバー医学校のジェイ・クラウター (K r a u t e r) から入手した) で試験した。これらは染色体転座 t (4 ; 1 1) (q 2 1 ; q 2 3) を保持するが、異なる切断点により異なる M L L - A F 4 変種を発現する。更に、本研究にて使用された白血病細胞株は H L 6 0 (コリンズ、エス・ジェイ。(C o l l i n s , S . J .) ら、N a t u r e、第 2 7 0 巻、3 4 7 - 3 4 9 頁、1 9 7 7 年)、K 5 6 2 (ロツィオ、シー・ビー。(L o z z i o , C . B .) 及び ロツィオ ビー・ビー。(L o z z i o , B . B .)、J . N a t l C a n c e r I n s t、第 5 0 巻、5 3 5 - 5 3 8 頁、1 9 7 3 年)、K a s u m i - 1 (アソウ、エイチ。(A s o u , H .) ら、B l o o d、第 7 7 巻、2 0 3 1 - 2 0 3 6 頁、1 9 9 1 年)、S K N O - 1 (マトザキ、エス。(M a t o z a k i , S .) ら、B r J H a e m a t o l、第 8 9 巻、8 0 5 - 8 1 1 頁、1 9 9 5 年) 及び U 9 3 7 (サンドストローム、シー。(S u n d s t r o m , C .) 及び ニルソン、ケイ。(N i l s s o n , K .)、I n t J C a n c e r、第 1 7 巻、5 6 5 - 5 7 7 頁、1 9 7 6 年) であった。S K N O - 1 細胞は 2 0 % F C S (S e r a P l u s、パンバイオテック社 (P A N B o i t e c h G m b H)) 及び 7 n g / m l の G M - C S F を補充した R I M I 1 6 4 0 G l u t a m a x 培地 (インビトロゲン (I n v i t r o g e n)、ドイツ国カールスルーエ所在) で維持され、その他の細胞株の全ては、3 7 及び 5 % C O ₂ にて 1 0 % の F C S を補充した R I M I 1 6 4 0 G l u t a m a x 培地で維持された。健全な患者の骨髄からの初代ヒト C D 3 4 + 細胞は、チュービンゲン (T u e b i n g e n) に所在の大学小児病院から凍結したストックとして入手した。

20

30

40

【 0 1 4 8 】

実施例 4：siRNA 処理

S E M の *si* R N A エレクトロポレーションを既に述べたように実施した (ドゥネ (D u n n e) ら、O l i g o n u c l e o t i d e s、第 1 3 巻、3 7 5 - 8 0 頁、2 0 0

50

3年及びハイデンライヒら、Blood、第101巻、3157-3163頁、2003年)。エレクトロポレーションは、10msで350Vの矩形パルスを使用したFischerのエレクトロポレータ(フィッシャー(Fischer)、ドイツ国、バイデルベルグ所在)にて実施した。室温にて15分間インキュベートした後に、細胞を培地で20倍に希釈して、37の5%CO₂下にてインキュベートした。

【0149】

実施例5: RT-PCR

内因性MLL-AF4、MLL、AF4、HOXA7、HOXA9、OAS1及びSTAT1のレベルをリアルタイムのPCRにて試験した。RNAの全抽出をRNeasy(Rneasy)キット(キアーゲン(QuiaGen)、ドイツ国、ヒルデン所在)を使用して、製造者により提案されたように実施した。次に、全RNAの1mgを、ポリメラーゼ連鎖反応と組み合わせられたリアルタイムの逆転写(RT-PCR)に使用した。逆転写反応は、25mMのランダム6量体、5xRT緩衝液、1mMのdNTPMix、20UのRNase阻害剤(MBI)及び100UのMMLV-RT、RNaseH(プロメガ(Promega)、ドイツ国、ハイデルベルグ所在)を使用して実施した。混合物を室温にて10分間、42にて45分間、そして99にて3分間インキュベートした。それぞれの遺伝子のmRNAレベルはGAPDHmRNAレベルに正規化した。

10

【0150】

リアルタイムのPCR反応は、MLL-AF4、MLL、AF4、HOXA7、HOXA9、OAS1及びSTAT1に対するプライマーを使用して実施した。GAPDHとハイブリダイズするプライマーを対照として使用した。TaqManリアルタイムPCR反応に対するマスターミックス(MLL-AF4)は、62.5nMのフォワードプライマー及びリバープライマー、62.5%(v/v)のSybr-GreenMixを含んでいた。GAPDH反応に対するマスターミックスは、375nMのフォワードプライマー及びリバープライマー及び62.5%(v/v)のSybr-GreenMixを含んでいた。そうでない場合には、RT-PCRは、マルチネス(Martinez)らのBMC Cancer、第4巻、44頁(2004年)の記載に従って実施した。使用したプライマーの配列を表3に列挙した。

20

【0151】

【表 3】

表 3 : P C R プライマー配列

| 遺伝子 | センス/アンチセンスプライマー | 配列番号 |
|-------------|-------------------------------|------|
| MLL- AF4 | 5'-ACAGAAAAAAGTGGCTCCCCG-3' / | 43 |
| | 5'-TATTGCTGTCAAAGGAGGCGG-3' | 44 |
| MLL: | 5'-ACAGAAAAAAGTGGCTCCCCG-3' / | 45 |
| | 5'-GCAAACCACCCTGGGTGTTA-3' | 46 |
| AF4: | 5'-CAGAAGCCACGGCTTATGT-3' / | 47 |
| | 5'-TATTGCTGTCAAAGGAGGCGG-3' | 48 |
| HOXA7: | 5'-CGCCAGACCTACACGCG-3' / | 49 |
| | 5'-CAGGTAGCGGTTGAAGTGGAA-3' | 50 |
| HOXA9: | 5'-CCACCATCCCCGCACA-3' / | 51 |
| | 5'-AACAGGGTTTGCCTTGGA-3' | 52 |
| OAS1: | 5'-TCCAAGGTGGTAAAGGGTGG-3' / | 53 |
| | 5'-AGGTCAGCGTCAGATCGGC-3' | 54 |
| GAPDH: | 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' / | 55 |
| | 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' | 56 |
| STAT1: | 5'-CATCACATTACATGGGTGGA-3' / | 57 |
| | 5'-GGTTCAACCGCATGGAAGTC-3' | 58 |

10

20

プライマーはPRIMER-EXPRESSソフトウェア（アプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）、アメリカ合衆国カリフォルニア州フォスターシティ所在）を使用して設計した。

【0152】

実施例 6 : コロニー形成試験

siRNAを用いた細胞エレクトロポレーションの24時間後に10000個の細胞を、24ウェルプレート中に、20% FCS及び0.56%メチルセルロースを含む0.5 mlのRPMI 1640培地中に接種した。RS4;11の場合、細胞数はウェル当り20000個に増加した。接種してから14日後に、20個以上の細胞を含むコロニーを計数した。これらの条件で、モック-トランスフェクト細胞（siRNAを使用しないでエレクトロポレーションした場合）は、試験した細胞株に応じてウェル当り50乃至100のコロニーを形成した。ヒトコロニー形成細胞試験はMethoCult（登録商標）メチルセルロースベースの培地（セルシステムズ（Cell Systems）、ドイツ国、セントカテリーネン所在）を使用して実施した。エレクトロポレーションの後、5000個のヒト初代CD34+細胞を、1 mlのメチルセルロース培地を含む35 mmの培養皿中に二つずつ接種した。CFU-GEMMs及びCFU-GMsの数は接種してから10日後に計数した。

30

40

【0153】

実施例 7 : MTT試験

細胞は48時間以内に2回エレクトロポレーションして、96ウェルのプレートに、ウェル当り100 μ lにて0.5 \times 10⁵個の細胞密度にて接種した。各24時間後に10 μ lのMTT溶液（ロッシュ（Roche）、ドイツ国、マンハイム所在）を加えた。37にて4時間インキュベーション後、細胞を製造業者の指示に従って可溶化溶液で溶解した。対照波長として、560 nm及び650 nmにて、ELISAリーダ（ダイネックス（Dynex）、ドイツ国、フランクフルト/M所在）を用いてOD測定を実施した。細胞数は細胞希釈系列により計数した。ヒトコロニー形成細胞試験は、MethoCult（登録商標）メチルセルロースベースの培地（セルシステムズ、ドイツ国、セントカテリーネン所在）を使用して実施した。ヒト初代細胞をエレクトロポレーションし、続いて

50

、5000個の細胞を、1mlのメチルセルロース培地を含む35mmの培養皿中に接種した。各サンプルは2つずつ接種し、CFU-GEMMs及びCFU-GMsの数は接種してから10日後に計数した。

【0154】

実施例8：細胞周期分析及びアポトーシス試験

細胞周期分析は、既に記載したように(32)実施した。次に、得られたデータを分析し、ModFitプログラム(ベリティ(Verity)、アメリカ合衆国、トップシャム所在)を使用して評価した。アポトーシスは、供給者の指示に従って、ヒトアネキシン(Annexin)V/FITCキット(ベンダーメドシステムズ(Bender MedSystems)、オーストリア国ウィーン所在)を使用して試験した。要約すると、2-5×10⁵個の細胞をエレクトロポレーション後、指示された時点にてPBSで洗浄し、室温にて10分間、アネキシンV-FITC溶液の存在下にてインキュベーションした。細胞をPBSで再び洗浄し、ヨウ化プロピジウムで染色した。次にサンプルを、FACSCalibur(ベクトンディッキンソン(Becton Dickinson)、ドイツ国、バイデルベルク所在)を使用したフローサイトメトリーにて直ちに分析した。

【0155】

実施例9：ウェスタンブロッティング

細胞の全タンパク質量を得るために、RNeasy(RNeasy)カラムのフロースルー部分に存在するタンパク質を2容量のアセトンで沈殿させ、尿素緩衝液(9Mの尿素、4(w/w)%の3-[(3-クロラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-プロパンスルホネート(CHAPS)、1(w/w)%ジチオスレイトール)中に溶解した。全溶解物(MLL-AF4検出に対しては50µg、その他の全てのイムノプロットに対しては10µg)を(32)に記載したように分析した。イムノプロットの検出に以下の抗体を使用した：切断したカスパーゼ-3(Asp175)(1:1000、Cell Signaling Technology、#9661)；チューブリンAb-4(1mg/l、NeoMarkers MS-719-P0、アメリカ合衆国フレモント所在)Bcl-XL(1:500、BDPharMingen、#556499)；MLLT2(1:600、Orbigen、#10852)；GAPDH(1:20,000、HyTest、#5G4)。

【0156】

実施例10：SCIDマウスの異種移植術

4-5週齢の雌のCB-17/lcrCrj-SCID/SCIDマウスをチャールズリバー・ジャーマニー(Charles River Germany)から入手した。SEM細胞(20×10⁷)を1日目にエレクトロポレーションし、3日目に指定されたsiRNAの500nMを使用しない(モック)か、又は使用した。4日目に細胞をマウスの腹腔内に注射した。動物は、チュービンゲン(Tuebingen)の地方審議会により承認されたプロトコルに従って維持及び処理した。

【0157】

実施例11：組織学

器官を除去し、室温にて中性に緩衝化された4%のホルマリンにて4-5日固定し、脱水し、パラフィン中に埋め込み、切断した。組織はヘマトキシリン(Meyerのヘマルム溶液、メルク(Merck)、ドイツ国ダルムスタット所在)及びエオシン(Eosin Y、メルク、ドイツ国ダルムスタット所在)を使用して、光学顕微鏡法のために染色した。光学顕微鏡法は、20×Plan-Neofluar又は40×Plan-Neofluar 1.3オイルレンズを使用して、Zeiss AxioPlan顕微鏡(ツァイス(Zeiss)、ドイツ国、グッティンゲン所在)を使用して実施した。画像は、顕微鏡に備えられたAxio Vision 4 Software及びAdobe Photoshop(アドーベシステムズ(Adobe Systems)、アメリカ合衆国、カリフォルニア州、サンホセ所在)を使用して捕捉した。

【0158】

実施例 12 : 統計学的分析

コロニー形成試験は、対応のないスチューデント t 検定により分析した。生存曲線は、ログランク試験により分析した。

実施例 13 : MLL - AF4 発現の阻害に対する活性を備えた siRNA の同定

高効率 MLL - AF4 siRNA を同定するために、MLL - AF4 融合部位の siRNA スキャンを実施した。そのために、本願の発明者らは、各々が一つのヌクレオチドずつ移動している標的部位を備えた 14 個の異なる siRNA を合成した。異なる siRNA の効果は、5 歳の ALL 再発患者から得られた t (4 ; 11) - 陽性白血病細胞株 SEM にて試験した (グレイル (Grail)、ジェイ・ら、Br J Haematol、第 86 巻、275 - 283 頁、1994 年)。試験した 14 の全ての siRNA のうち、二つの siRNA、即ち、siMA3 及び siMA6 は、MLL - AF4 mRNA レベルが 60 % 超減少した (図 1A)。MLL - AF4 転写レベルの低減は用量依存性であり、750 nM の siRNA で 70 % の最大値に達した (データは図示せず)。経時変化の実験では、siRNA トランスフェクション後 24 乃至 48 時間の間に MLL - AF4 mRNA の量がその最小値に達し、4 日にて通常にレベルに回復することが示された (図 1B)。更に、siMA6 は野生型の AF4 にも MLL mRNA レベルにも影響を与えなかった (図 1C) 一方で、siMA3 は AF4 レベルを実質的に低減した (データは図示せず)。ミスマッチ対照 siRNA である siMM は MLL - AF4 にも対応する野生型の対立遺伝子転写産物にも影響を与えなかった。MLL - AF4 mRNA のレベルの低減は、MLL - AF4 タンパク質中の付随物の 67 % の減少により反映されている (図 1D)。

10

20

【0159】

MLL - AF4 融合部位は、異なる t (4 ; 11) 陽性細胞株の間にて変化する。SEM 細胞は MLL エクソン 9 AF4 エクソン 4 (e9 - e4) 融合を含む転写物を発現し、RS4 ; 11 はエクソン 10 - エクソン 4 (e10 - e4) 変種を発現する。67 % の相同性にも関わらず、siMA6 は RS4 ; 11 細胞中における e10 - e4 イソ型のレベルを低減しなかった (非特許文献 5) のに対し、完全に相同性である siRNA、siMARs は、AF4 又は MLL の発現に影響を与えることなく、RS4 ; 11 における MLL - AF4 e10 - e4 を 60 % 低減した。

【0160】

siMA6 も siMM も STAT1 又は 2' - 5' - オリゴデニレートシンターゼ 1 の発現を誘導せず (図 1F)、それは、これらの siRNA がインターフェロンの応答を誘発しないことを示している (スレッツ、シー・エー・ (Sledz, C. A.) ら、Nat Cell Biol、第 5 巻、834 - 839 頁、2003 年)。polyIC でのトランスフェクションは OAS1 の転写レベルを 50 倍以上も増大し、STAT1 mRNA のレベルを 10 倍以上も増大し (図 1F)、これらの白血球細胞においてインターフェロン応答経路を誘導することを示す。それらの高い特異性により、MLL - AF4 siRNA である siMA6 及びミスマッチ対照 siRNA である siMM は、白血病性表現型のための MLL - AF4 発現の重要性を証明するために選択されている。

30

【0161】

実施例 14 : MLL - AF4 は白血病性クローン形成能力に影響を与える

白血病性クローン形成能力 (clonogenicity) に対する MLL - AF4 の適合性を研究するために、本願の発明者らは t (4 ; 11) - 陽性 SEM 細胞を siRNA でトランスフェクトし、半固体の培地にてインキュベートした。siMA6 - 媒介型の MLL - AF4 の枯渇は、コロニーの数を 5 倍低減した (図 2A)。この影響は特異的である。その理由は t (8 ; 21) - 陽性白血球細胞株 Kasumi - 1 のコロニー形成は siMA6 により影響されなかったからである。逆に、AML1 / MTG8 特異的 siRNA である siAGF1 でのトランスフェクションは、SEM コロニー形成を干渉することなく Kasumi - 1 のコロニー形成を損ねた (マルチネス エヌ・ (Martinez, N.) ら、BMC Cancer、第 4 巻、44 頁、2004 年)。ミスマッチ対照

40

50

(*siMM*及び*siAGF6*)はいずれも白血病性クローン形成能力に影響を与えなかった。さらに、*t*(4;11)-陰性白血病性細胞株HL60、K562、SKNO-1及びU937も、*siMA6*により影響を受けないMLL-AF4変種を発現する*t*(4;11)-陽性白血病性細胞株RS4;11及びMV4;11も、*siRNA*トランスフェクションによりコロニー形成が損なうことのなかったことが示された(データ図示しない)。特に、MLL-AF4e10-e4変種の*siMARS*媒介型抑制はRS4;11のコロニー形成を2倍も低減し、別の*t*(4;11)細胞株に対するMLL-AF4のコロニー形成効率の依存性を示す(図2B)。初代ヒト造血性CD34+細胞のMLL-AF4*siRNA*のエレクトロポレーションは、GEMMコロニー数にもGMコロニー数にも影響を与えなかった(図2C)。このように影響を与えないことは、非効率な*siRNA*のトランスフェクションに寄与していない。その理由は、本明細書で使用する細胞株もヒト造血性CD34+細胞も機能的な*siRNA*で効率的にトランスフェクトされたからである(シェア エム・(Sherr, M.)ら、Blood、第101巻、1566-1569頁、2003年、ハイデンライヒ オー・ら、Blood、第101巻、3157-3163頁、2003年、ドゥネ ジェイ(Dunne, J.)ら、Oligonucleotides、第13巻、375-380頁、2003年)。

10

20

30

40

50

【0162】

実施例15:MLL-AF4の抑制が、白血病性の増殖及び細胞周期の進行を阻害する次に、懸濁した培地での白血病性の増殖の制御におけるMLL-AF4の役割を調べた。*siMA6*の単回のエレクトロポレーションは*t*(4;11)-陽性SEM細胞の倍加時間に影響を与えなかった(データ図示しない)が、2日おきに*siRNA*のエレクトロポレーションを繰り返すと、*siMA6*によるSEM細胞の増殖及び*siMARS*によるRS4;11細胞の増殖の阻害が維持された(図2D)。従って、増殖は、対応するMLL-AF4融合部位に相同性を有する*siRNA*により阻害されるのみであり、これらMLL-AF4*siRNA*の特異性を示す。モック又は*siRNA*でエレクトロポレーションされたSEM又はRS4;11細胞は1.4日の倍加時間で増殖し、エレクトロポレーションの繰り返しとその増殖に重大な影響を与えないことを示す。

【0163】

MLL-AF4の枯渇による*t*(4;11)-陽性細胞の増殖の低減は、細胞周期の分配における変化に匹敵していなかった。MLL-AF4*siRNA*の反復的なエレクトロポレーションを伴う10日間の経時変化の間、S相細胞のフラクションは、SEM及びRS4;11細胞のいずれにおいても、それぞれ50乃至30%及び20%減少し、G0/G1相のフラクション細胞における増大を伴っていた(図2E)。特に、*siMA6*は、SEM細胞においてのみ細胞周期の分配に影響を与えた一方、*siMARS*はRS4;11細胞においてのみそれらの変化を引き起こした。従って、MLL-AF4の枯渇は、G1相からS相まで*t*(4;11)-陽性細胞の進行に否定的に干渉する。G1/Sの遷移を損なうことは、細胞の老化には関係していない。それは、-ガラクトシダーゼ活性に関連した老化は、MLL-AF4の枯渇により増大しないからである(データ図示しない)。

【0164】

実施例16:MLL-AF4の枯渇は、*t*(4;11)-陽性SEM細胞のアポトーシスを誘導する

SEM及びRS4;11細胞の細胞周期の分析は、10日間にわたるMLL-AF4の連続的な枯渇が対照と比較してサブ(*sub*)G1細胞の数を10倍も増大し、アポトーシス細胞の数を増大したことを示した(図3A)。アネキシンV及びヨウ化プロピジウムでの染色は、MLL-AF4細胞の4日間の抑制がアポトーシス細胞における3倍の増大をSEM細胞にて示し、それにより、同時点にて見られる*sub*G1細胞の増大と一致した(図3B)。特に、ほとんど不活性な*siRNA*である*siMA13*(図1Aを参照)は、アポトーシス細胞の数に僅かに影響を与えるのみであり、MLL-AF4の枯渇の程度とアポトーシスの速度との間には直接相関関係のあることを示唆している。この結果は

、カスパーゼ - 3 のタンパク質分解活性及び *si*MA6 でのトランスフェクションによる抗アポトーシスタンパク質 *Bcl-XL* の量の低減により確証された (図 3 C)。

【0165】

実施例 17: *MLL-AF4* の抑制は *Hox* 遺伝子の発現を増大する

MLL-AF4 を含む *MLL* 癌タンパク質の発現は *Hoxa7* 及び *Hoxa9* を含む数種類の *Hox* 遺伝子並びに別のホメオティック遺伝子である *Meis1* の発現の増大と関連している。従って、本願の発明者らは、*MLL-AF4* レベルに依存するこれら 3 種類の遺伝子の発現を分析した。*MLL-AF4 siRNA* である *siMA6* で SEM 細胞を 2 回連続してトランスフェクションすると、*Hoxa7 mRNA* のレベルが二倍減少した (図 4)。 *Hoxa9* の僅かの低減も観察された。RS4; 11 細胞において、*Hoxa9* は *siMRAS* のトランスフェクションにより低減したが、*Hoxa9* は低減しなかった。RS4; 11 細胞中にて *Hoxa9* が低減しないことは、SEM 細胞中と比較して、*MLL-AF4* の抑制の効果が低いことによるものであろう (図 1 D, E)。

10

【0166】

実施例 18: *MLL-AF4* は *t(4; 11)* - 陽性細胞の白血病性細胞の生着に対して重要である

SCID マウスにおける白血病性細胞の成長は、高リスクの *B-ALL* と関係していることが示されてきた (ウッケン, エフ.エム. (Uckun, F.M.) ら、*Blood*、第 85 巻、873 - 878 頁、1995 年)。従って、本願の発明者らは *siRNA* の媒介する *MLL-AF4* の枯渇が細胞の生着 (*engraftment*) 及びインビボにおける白血病の進行に影響を与えるかどうかを調べるために *t(4; 11)* - SCID マウスのモデルを使用した (ポークック, シー.エフ. (Pocock, C.F.) ら、*Br J Haematol*、第 90 巻、855 - 867 頁、1995 年)。モック、或いは対照の *siRNA* で処理された SEM 細胞の SCID マウスへの腹腔内移植は移植後 70 日以内において白血病に関連して 100% 死亡し、生存日数の中央値はそれぞれ 52 及び 52 日であった (図 5 A)。 *MLL-AF4* が枯渇した SEM 細胞の異種移植術は、生存日数の中央値が 82 日であり、125 日での全体に対する生存率が 38% (*p* は 0.01 未満) で、あまり深刻でない表現型を引き起こした。疾病にて死亡した動物は、卵巣腫瘍と、脾腫と、骨髄、脾臓及び肝臓における重篤な白血病性芽球浸透と、を示す一方、*siMA6* 群の生存動物の器官は移植後 228 日において白血病性浸透の兆候を全く示さなかった (図 5 B, C)。結論として、*siRNA* 媒介型 *MLL-AF4* の抑制は、異種移植型 SCID マウスにおける *t(4; 11)* 陽性細胞の白血病性細胞の生着を低減した。

20

30

【0167】

実施例 19: 結論

MLL-AF4 発現の阻害は、培養懸濁液中における白血病性の増殖並びに *t(4; 11)* 細胞株のコロニー形成を減少した。このコロニー形成能力及び増殖の低減は、アポトーシスの増大に付随して起こった。更に、*MLL-AF4* の枯渇は、*Hoxa7*、*Hoxa9* 及び *Meis-1* の発現の低減に付随して起こり、それが同様にアポトーシスに寄与していると思われる。最後に、*siRNA* 媒介型 *MLL-AF4* の抑制は、異種移植 SCID マウスにおける白血病性細胞の生着を重大に損ねるものであった。SCID マウスにおける効果的な細胞の生着は *ALL* 患者における再発の可能性が予測されているので (ウッケン, エフ.エム. ら、*Blood*、第 85 巻、873 - 878 頁、1995 年)、これらのデータは *MLL-AF4* 機能の干渉が患者の転帰を改善し得ることを示唆している。

40

【0168】

t(4; 11) 白血病細胞においてのみ発現することと、白血病の維持におけるその中心的な役割とにより、*MLL-AF4* はこの非常に進行性の白血病の治療に対する優れた標的である。しかしながら、この融合タンパク質に特異的な小さな分子の阻害剤は現在のところ利用可能ではない。本願の発明者らは、この融合部位と相同である *siRNA* が *MLL-AF4* を効果的に抑制することを示している。更に、本願の発明者らは、この融合遺伝子の二つの異なる変種が高効率かつ排他的な特異性にて標的化され得ることを示して

50

いる。この排他的な特異性はまた、これらの *s i R N A* の観察された抗白血病性特性が直接的に *M L L - A F 4* の抑制によるものであり、他の遺伝子の意図していない阻害又はインターフェロンの応答の誘導のような標的以外の効果によるものでないことを証明した。本願の発明者らの結果は、*M L L - A F 4 s i R N A* が特異的ではあるが、柔軟性であり、よって $t(4;11)$ *A L L* の治療に対する優れた治療のツールを提供することを示唆している。

【0169】

その他の実施形態

本発明の種々の実施形態を記載してきた。しかしながら、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく種々の変更がなされることは理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0170】

【図1A】*M L L - A F 4 s i R N A* の活性および特異性を示す。*M L L - A F m R N A* 融合部位の *s i R N A* スキャンを示す。*G A P D H m R N A* レベルにより正規化された *M L L - A F 4 m R N A* レベルが示される。表示した *s i R N A* の標的部位は、1個の単一ヌクレオチドだけ融合部位の *A F 4* 部分から *M L L* 部分に移された。総 *R N A* は、500 nM の *s i R N A* を用いたエレクトロポレーションの24時間後に単離され、リアルタイム *R T - P C R* により分析された。X軸の数字は、表2の *s i R N A* の付番に対応する (*s i M A n*、 $n = 1 \sim 14$)。エラー・バーは標準偏差を示す。

【図1B】*M L L - A F 4 s i R N A* の活性および特異性を示す。*M L L - A F 4* 枯渇の経時変化を示す。総 *R N A* は、モックエレクトロポレーションまたは750 nM の *s i R N A* である *s i M A 6* もしくはミスマッチ対照 *s i M A m m* を用いたエレクトロポレーションの後、表示した時点で単離された。リアルタイム *R T - P C R* は、図1Aの通りに行われた。

【図1C】*M L L - A F 4 s i R N A* の活性および特異性を示す。*S E M* 細胞内の *M L L - A F 4*、*A F 4* および *M L L* の *m R N A* レベルに対する *M L L - A F 4 s i R N A s i M A 6* およびミスマッチ対照 *s i M M* の効果を示す。分析は図1Aの通りに行われた。

【図1D】*M L L - A F 4 s i R N A* の活性および特異性を示す。*s i R N A* トランスフェクションによる *M L L - A F 4* タンパク質の枯渇を示す。総細胞溶解物は、モックエレクトロポレーションまたは500 nM の *s i R N A s i M A 6* もしくはミスマッチ対照 *s i M A m m* を用いたエレクトロポレーションの48時間後に単離された。*M L L - A F 4* は、*A F 4* のC末端を標的とする抗体を用いて検出された。*G A P D H* はローディングコントロールとして、また、正規化のために提供された。正規化 *M L L - A F 4* タンパク質レベルは下部に表示されている。

【図1E】*M L L - A F 4 s i R N A* の活性および特異性を示す。*R S 4 ; 11* 細胞内の *M L L - A F 4*、*A F 4* および *M L L* の *m R N A* レベルに対する *M L L - A F 4 s i R N A* である *s i M A 6* および *s i M A R S* 並びにミスマッチ対照 *s i M M* の効果を示す。分析は図1Aの通りに行われた。*s i M A 6* は、*S E M* 細胞内で発現した *M L L - A F 4* 変種と相同であり、*s i M A R S* は、*R S 4 ; 11* 細胞内に存在する変種を標的とする。

【図1F】*M L L - A F 4 s i R N A* の活性および特異性を示す。*M L L - A F 4 s i R N A* は、インターフェロン応答を誘導しない。*S E M* 細胞は、表示した *R N A* でトランスフェクションされた。ポリ *I C (7.5 \mu g / m g)* は、インターフェロン応答遺伝子 *O A S 1* および *S T A T 1* の誘導に対する陽性対照として提供されている。分析は図1Aの通りに行われた。

【図2A】*M L L - A F 4* 枯渇が、 $t(4;11)$ 陽性白血病細胞のコロニー形成および増殖を阻害することを示す。*M L L - A F 4* および *A M L 1 / M T G 8 s i R N A* の特異性を示す。*S E M* 細胞は *M L L - A F 4* を発現するのに対して、*K a s u m i - 1* 細胞は *A M L 1 / M T G 8* を発現する。*s i M A 6* 処理済み *S E M* 細胞または *s i A G F 1* 処理済み *K a s u m i - 1* 細胞により形成されたコロニーの数は、各々のミスマッチ対照で処理された細胞による数よりも顕著に少ない ($p < 0.001$)。

10

20

30

40

50

【図2B】MLL-AF4枯渇が、 $t(4;11)$ 陽性白血病細胞のコロニー形成および増殖を阻害することを示す。RS4;11クローン形成能力の阻害は、MLL-AF4融合部位に対する完全な相同性に依存する。siMARS処理済みRS4;11細胞により形成されたコロニーの数は、モック処理済みRS4;11細胞、e9-e4変種特異的なsiMA6で処理されたRS4;11細胞、またはe9-e4ミスマッチ対照siMammによる数よりも顕著に少ない($p < 0.0001$)。

【図2C】MLL-AF4枯渇が、 $t(4;11)$ 陽性白血病細胞のコロニー形成および増殖を阻害することを示す。MLL-AF4を標的とするsiRNAは、初代ヒトCD34+造血細胞のコロニー形成に影響を与えない。初代ヒトCD34+造血細胞は、750nMのsiMA6(SEM細胞内で発現したMLL-AF4e9-e4変種を標的とするsiRNA)、siMARS(RS4;11細胞内で発現したMLL-AF4e10-e4変種を標的とするsiRNA)、またはe9-e4ミスマッチ対照siMMを用いてエレクトロポレーションされた。エラー・バーは標準偏差を示す。

【図2D】MLL-AF4枯渇が、 $t(4;11)$ 陽性白血病細胞のコロニー形成および増殖を阻害することを示す。siRNA処理済みのSEM細胞およびRS4;11細胞の成長曲線を示す。細胞は1日おきに、モックエレクトロポレーションされたか、または750nMのsiMA6、siMARSもしくはミスマッチ対照siMammを用いてエレクトロポレーションされた。細胞数は、MTT試験を用いて割り出された。各々の細胞系に存在する融合部位変種に対して相補性を有するsiRNAのみが、成長を抑制した。エラー・バーは標準偏差を示す。

【図2E】MLL-AF4枯渇が、 $t(4;11)$ 陽性白血病細胞のコロニー形成および増殖を阻害することを示す。SEM細胞およびRS4;11細胞の細胞周期分布に対するMLL-AF4siRNAの効果を示す。グラフは、表示した周期相(cycle phase)における細胞の割合を示す。細胞周期分布は、図2Dに示された経時変化実験から得られた細胞を用いて、表示された日にフロー・サイトメトリーにより割り出された。

【図3A】MLL-AF4枯渇が、 $t(4;11)$ 陽性SEM細胞およびRS4;11細胞のアポトーシスを誘導することを示す。サブG1細胞の画分に対するMLL-AF4抑制の効果を示す。図2Dおよび2Eに示された経時変化から得られた細胞が、フロー・サイトメトリーによりDNA量について分析された。

【図3B】MLL-AF4枯渇が、 $t(4;11)$ 陽性SEM細胞およびRS4;11細胞のアポトーシスを誘導することを示す。SEM細胞のアネキシンV染色を示す。アネキシンV陽性SEM細胞は、表示したsiRNAの750nMを用いた2回目のエレクトロポレーションの4日後にフロー・サイトメトリーにより定量化された。アネキシンVおよびアネキシンV/ヨウ化プロピジウム陽性細胞の割合が、対応する象限に示されている。

【図3C】MLL-AF4枯渇が、 $t(4;11)$ 陽性SEM細胞およびRS4;11細胞のアポトーシスを誘導することを示す。MLL-AF4抑制は、カスパーゼ3の活性化を引き起こし、Bcl-XLタンパク質レベルを低下させる。免疫プロットは、タンパク質分解により活性化されたカスパーゼ3およびBcl-XLタンパク質を示す。チューブリンおよびGAPDHは、ローディングコントロールとして提供されている。

【図4】MLL-AF4抑制が、Hoxa7およびHoxa9の遺伝子発現に影響を与えることを示す。総RNAは、表示されたsiRNAの500nMを用いた2回目のエレクトロポレーションの48時間後に単離され、リアルタイムRT-PCRにより分析された。エラー・バーは標準偏差を示す。

【図5A】MLL-AF4抑制が、白血病性細胞の生着を減少させることを示す。SEM細胞を移植されたSCIDマウスの生存曲線を示す。SEM細胞は移植前に、2回モックエレクトロポレーションされたか、またはsiRNA siMA6またはそのミスマッチ対照siMammを用いて2回エレクトロポレーションされた。MLL-AF4e9-e4特異的siRNA siMA6での事前処理は、モック事前処理または対照siRNA事前処理に比べて顕著に、生存時間の中央値を延長し、生存率全体を増大させた(ログランク検定によれば $p < 0.01$)。

10

20

30

40

50

【図 5 B】MLL - AF4 抑制が、白血病性細胞の生着を減少させることを示す。骨髓の FACS 分析を示す。動物の骨髓細胞が、非ヒト CD 45 抗体で染色され、フロー・サイトメトリーにより分析された。siMA6 で処理された動物は、CD 45 陽性細胞の数がかなり少なかった。

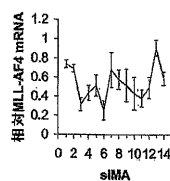
【図 5 C】MLL - AF4 抑制が、白血病性細胞の生着を減少させることを示す。肝臓および脾臓の組織構造を示す。原倍率：200 倍、縮尺バー：50 μ m。モック細胞または siMM 事前処理済み細胞を移植されたマウスは、分析の時点で瀕死状態であった。siMA6 事前処理済み細胞を移植された動物は、白血病関連の病的状態の徴候を示すことなく、移植から 228 日後に死亡した。

【図 5 D】MLL - AF4 抑制が、白血病性細胞の生着を減少させることを示す。脾臓サイズの比較を示す。左側の脾臓は、モック処理済み動物に由来し、中央の脾臓は、ミスマッチ対照 siRNA siMM で処理された動物に由来し、右の脾臓は、MLL - AF4 に特異的な siRNA siMA6 で処理された動物に由来する。

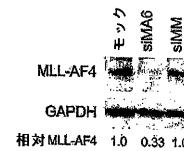
【図 5 E】MLL - AF4 抑制が、白血病性細胞の生着を減少させることを示す。器官重量のグラフを表示する。器官重量は全体重に対して正規化された。生存 siMA6 群動物の肝臓および脾臓の正規化重量は、モック群または siMM ミスマッチ対照群の重量よりも顕著に小さかった（各々、 $p < 0.05$ および $p < 0.001$ ）。

10

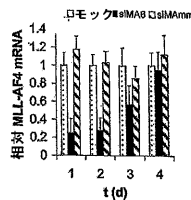
【図 1 A】



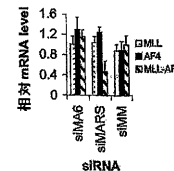
【図 1 D】



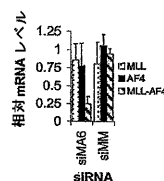
【図 1 B】



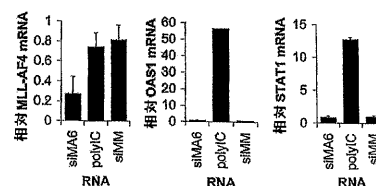
【図 1 E】



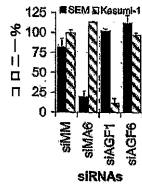
【図 1 C】



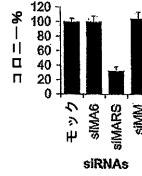
【図 1 F】



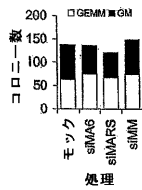
【図 2 A】



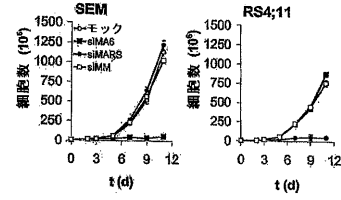
【図 2 B】



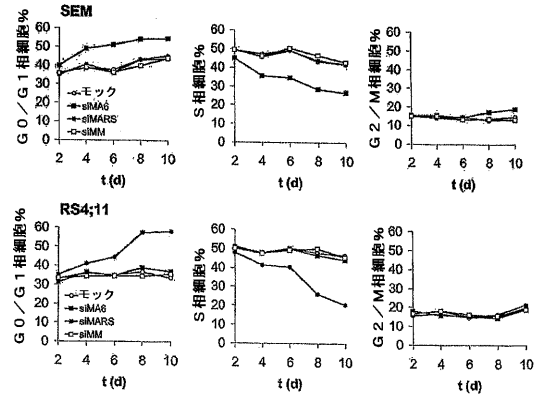
【図 2 C】



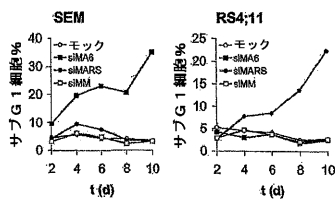
【図 2 D】



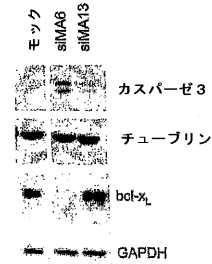
【図 2 E】



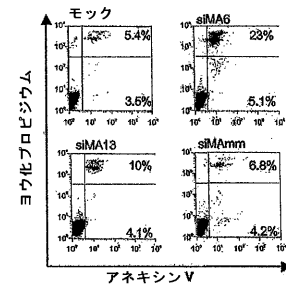
【図 3 A】



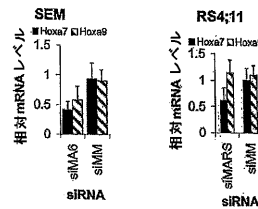
【図 3 C】



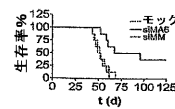
【図 3 B】



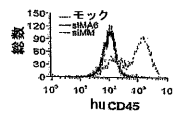
【図 4】



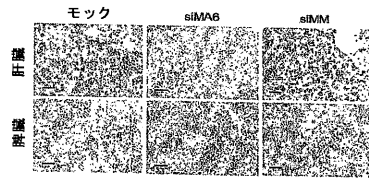
【図 5 A】



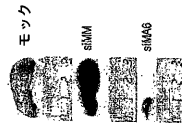
【図 5 B】



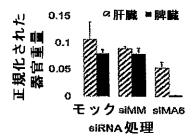
【図 5 C】



【図 5 D】



【図 5 E】



【配列表】

2008523157000001.app

【 国際調査報告 】

| | | |
|--|---|---|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US05/45827 |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07H 21/04(2006.01) USPC: 536/24.5 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) U.S. : 536/24.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X,P | US 2005/0245475 A1 (KHVOROVA et al) 3 November 2005 (03.11.2005), see whole document, especially pages 5-10. | 1-6, 8 |
| Y | GREIL et al. Suppression of MLL-AP4 by small interfering RNAs inhibits proliferation and induces apoptosis in T(4;11)-positive SEM cells. Blood. 2004, Vol. 104, page 191b, see abstract# 4433. | 1-6, 8 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 19 December 2006 (19.12.2006) | | Date of mailing of the international search report 29 JAN 2007 |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201 | | Authorized officer Brian Whiteman <i>Felicia D. Roberts</i> Telephone No. (571) 272-1600 <i>for</i> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/45827

Box No. 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:
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:
3. ☒ Claims Nos.: 7 and 10-42
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. 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:
Please See Continuation 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 additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
 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.: 1-6 and 8 (SEQ ID NO 5 and 6)
- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/45827

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-6, 8, and 9, drawn to an iRNA comprising a sense strand and an antisense strand, wherein each strand is at least 15 contiguous nucleotides from SEQ ID NO: 5 and 6, respectively.

Group II, claim(s) 43, drawn to a method of evaluating an iRNA agent thought to inhibit the expression of an MLL-AF4 gene.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

If applicants elect Group I:

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

- a) SEQ ID NO: 10, 12, 14, 18, 20, 22, 24, 26, 30, and 32
- b) SEQ ID NO: 7, 11, 13, 15, 19, 21, 23, 25, 27, 31, and 33.

The claims are deemed to correspond to the species listed above in the following manner:

- a) claims 1-6, 8, and 9.

The following claim(s) are generic: no claims are generic.

- b) claims 1-6, 8, and 9.

The following claim(s) are generic: no claims are generic.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of Group I is considered to be an iRNA.

The special technical feature of Group II is considered to be a method of evaluating an iRNA agent thought to inhibit expression of an MLL-AF4 gene.

Accordingly, Groups I and II are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single general inventive concept.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/45827

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: a) each sense strand has a different structure and function and b) each antisense strand has a different structure and function.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, STN
search terms: iRNA, RNAi, sirna, sina, dsRNA, ml-af4

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 K 47/48 (2006.01) | | A 6 1 K 47/48 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01) | | A 6 1 P 35/02 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | | C 1 2 N 15/00 | A |

(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,LV,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,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,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 ハイデンライヒ、オラフ

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 4 テュービンゲン フリードリヒ - シャール - シュトラーセ 2 2

(72)発明者 フォルンロヒャー、ハンス - ペーター

ドイツ連邦共和国 9 5 4 4 8 パイロイト アルベルト - アインシュタイン - リング 4 3 アー

(72)発明者 ハトビガー、フィリップ

ドイツ連邦共和国 9 5 3 2 6 クルムバッハ ロートシュタインベーク 1 6 アー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10 CA11 DA03
GA11 GA14 GA18 HA08 HA14 HA17
4B063 QA01 QA18 QQ52 QQ53 QR32 QR35 QR36 QR42 QR55 QR62
QR66 QR69 QR77 QR82 QS12 QS16 QS25 QS34 QS36 QX02
4C076 AA95 CC26 CC42 DD70 EE01 EE59 FF65 FF68
4C084 AA13 MA05 NA14 NA15 ZB261 ZB271 ZC021
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14 NA15 ZB26
ZB27 ZC02