

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5697988号  
(P5697988)

(45) 発行日 平成27年4月8日(2015.4.8)

(24) 登録日 平成27年2月20日(2015.2.20)

| (51) Int.Cl.   |               | F I              |                       |
|----------------|---------------|------------------|-----------------------|
| <b>C 1 2 N</b> | <b>15/113</b> | <b>(2010.01)</b> | C 1 2 N 15/00 Z N A G |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>48/00</b>  | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 K 48/00         |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>31/713</b> | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 K 31/713        |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>9/127</b>  | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 K 9/127         |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>47/24</b>  | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 K 47/24         |

請求項の数 46 (全 142 頁) 最終頁に続く

|               |                               |           |                               |
|---------------|-------------------------------|-----------|-------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2010-539978 (P2010-539978)  | (73) 特許権者 | 506016303                     |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年12月23日(2008.12.23)       |           | プロチバ バイオセラピューティクス インコーポレイティッド |
| (65) 公表番号     | 特表2011-507534 (P2011-507534A) |           | カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州           |
| (43) 公表日      | 平成23年3月10日(2011.3.10)         |           | バーナビー グレンライオン パークウェイ 100-8900 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/CA2008/002285             | (74) 代理人  | 100102978                     |
| (87) 国際公開番号   | W02009/082817                 |           | 弁理士 清水 初志                     |
| (87) 国際公開日    | 平成21年7月9日(2009.7.9)           | (74) 代理人  | 100102118                     |
| 審査請求日         | 平成23年12月19日(2011.12.19)       |           | 弁理士 春名 雅夫                     |
| (31) 優先権主張番号  | 61/017,075                    | (74) 代理人  | 100160923                     |
| (32) 優先日      | 平成19年12月27日(2007.12.27)       |           | 弁理士 山口 裕孝                     |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       | (74) 代理人  | 100119507                     |
| (31) 優先権主張番号  | 61/045,228                    |           | 弁理士 刑部 俊                      |
| (32) 優先日      | 平成20年4月15日(2008.4.15)         |           |                               |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           |                               |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 干渉RNAを使用したポロ様キナーゼ発現のサイレンシング方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするための修飾siRNA分子であって、該修飾siRNA分子が、SEQ ID NO:57からなるセンス鎖、相補的なアンチセンス鎖、および15~19ヌクレオチド長の二本鎖領域を含み、

該アンチセンス鎖が、二本鎖領域内に少なくとも1つの2'OMe-グアノシンヌクレオチドと少なくとも1つの2'OMe-ウリジンヌクレオチドとを含む、修飾siRNA分子。

## 【請求項2】

SEQ ID NO:57における5'-NN-3'配列が、前記修飾siRNA分子のセンス鎖における3'突出に対応する、請求項1記載の修飾siRNA分子。

## 【請求項3】

3'突出内のヌクレオチドのうちの1個または複数個が修飾ヌクレオチドを含む、請求項2記載の修飾siRNA分子。

## 【請求項4】

二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの30%未満が修飾ヌクレオチドを含む、請求項1記載の修飾siRNA分子。

## 【請求項5】

対応する未修飾siRNA配列より低免疫刺激性である、請求項1記載の修飾siRNA分子。

## 【請求項6】

アンチセンス鎖がSEQ ID NO:403からなる、請求項1記載の修飾siRNA分子。

## 【請求項 7】

センス鎖がSEQ ID NO:400からなる、請求項1記載の修飾siRNA分子。

## 【請求項 8】

センス鎖がSEQ ID NO:400からなり、アンチセンス鎖がSEQ ID NO:403からなる、請求項1記載の修飾siRNA分子。

## 【請求項 9】

担体系をさらに含む、請求項1記載の修飾siRNA分子。

## 【請求項 10】

担体系が、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項9記載の修飾siRNA分子。

10

## 【請求項 11】

担体系が、核酸-脂質粒子である、請求項10記載の修飾siRNA分子。

## 【請求項 12】

請求項1記載の修飾siRNA分子と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

## 【請求項 13】

請求項1記載の修飾siRNA分子、  
カチオン性脂質、および  
非カチオン性脂質  
を含む、核酸-脂質粒子。

20

## 【請求項 14】

カチオン性脂質が、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLenDMA)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、ジステアリルジメチルアンモニウム (DSDMA)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシプロピルアミン (DODMA)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スperlミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスperlミン (DOGS)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシプタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CLinDMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',1-2'-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、2,3-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン (DLinDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbDAP)、1,2-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinCDAP)、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

30

40

## 【請求項 15】

カチオン性脂質がDLinDMAである、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 16】

非カチオン性脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレイル-ホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレイル-ホスファチジルエタノールアミン (POPE)、パルミトイルオレイル-ホスファチジルグリセロール (POPG)、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン (DPPC)、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリスチル-ホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホ

50

スファチジルエタノールアミン、ジエラドイル-ホスファチジルエタノールアミン (DEPE)、ステアロイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (SOPE)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、コレステロール、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

【請求項17】

非カチオン性脂質が、DSPC、DPPC、またはDSPEである、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

【請求項18】

粒子の凝集を阻害する複合脂質をさらに含む、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

【請求項19】

粒子の凝集を阻害する複合脂質が、ポリエチレングリコール (PEG) -脂質コンジュゲート、ポリアミド (ATTA) -脂質コンジュゲート、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、請求項18記載の核酸-脂質粒子。

【請求項20】

PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-ジアシルグリセロール、PEGジアルキルオキシプロピル、PEG-リン脂質、PEG-セラミド、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、請求項19記載の核酸-脂質粒子。

【請求項21】

前記ポリエチレングリコール (PEG) -脂質コンジュゲートが、ポリエチレングリコール (PEG) -ジアルキルオキシプロピル (DAA) コンジュゲートを含む、請求項19記載の核酸-脂質粒子。

【請求項22】

修飾siRNA分子が核酸-脂質粒子に完全に封入されている、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

【請求項23】

請求項13記載の核酸-脂質粒子と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項24】

非カチオン性脂質がリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

【請求項25】

リン脂質が、粒子中に存在する全脂質の4モル% ~ 10モル%を構成し、かつコレステロールが、粒子中に存在する全脂質の30モル% ~ 40モル%を構成する、請求項24記載の核酸-脂質粒子。

【請求項26】

カチオン性脂質が、粒子中に存在する全脂質の50モル% ~ 65モル%を構成する、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

【請求項27】

PEG-脂質コンジュゲートが、粒子中に存在する全脂質の1モル% ~ 15モル%を構成する、請求項19記載の核酸-脂質粒子。

【請求項28】

請求項1記載の修飾siRNA分子を含む、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNAを細胞へ導入するための組成物。

【請求項29】

修飾siRNA分子が担体系の中にある、請求項28記載の組成物。

【請求項30】

担体系が、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ビロソーム、核酸複合体、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項29記載の組成物。

【請求項31】

担体系が、  
修飾siRNA分子、

10

20

30

40

50

カチオン性脂質、  
 および非カチオン性脂質  
 を含む核酸-脂質粒子である、請求項29記載の組成物。

【請求項32】

核酸-脂質粒子が、粒子の凝集を防止する複合脂質をさらに含む、請求項31記載の組成物。

【請求項33】

細胞が哺乳動物体内にある、請求項28記載の組成物。

【請求項34】

請求項1記載の修飾siRNA分子を含む、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNAのインビボ送達のための組成物。 10

【請求項35】

修飾siRNA分子が担体系の中にある、請求項34記載の組成物。

【請求項36】

担体系が、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項35記載の組成物。

【請求項37】

担体系が、  
 修飾siRNA分子、  
 カチオン性脂質、  
 および非カチオン性脂質 20

を含む核酸-脂質粒子である、請求項35記載の組成物。

【請求項38】

核酸-脂質粒子が、粒子の凝集を防止する複合脂質をさらに含む、請求項37記載の組成物。

【請求項39】

請求項1記載の修飾siRNA分子を含む、哺乳動物対象において癌を処置するための薬学的組成物。

【請求項40】

癌が肝臓癌である、請求項39記載の薬学的組成物。 30

【請求項41】

肝臓癌が肝細胞癌である、請求項40記載の薬学的組成物。

【請求項42】

請求項1記載の修飾siRNA分子を含む、化学療法薬の効果に対して細胞を感作するための薬学的組成物であって、化学療法薬を投与する前に、細胞に接触させられる、前記薬学的組成物。

【請求項43】

前記ポリエチレングリコール (PEG) -脂質コンジュゲートが、粒子中に存在する全脂質の4モル% ~ 15モル%を構成する、請求項19記載の核酸-脂質粒子。

【請求項44】

前記ポリエチレングリコール (PEG) -ジアルキルオキシプロピル (DAA) コンジュゲートが、PEG-ジミリスチルオキシプロピルコンジュゲートを含む、請求項21記載の核酸-脂質粒子。 40

【請求項45】

前記二本鎖領域中の核酸の15% ~ 30%が修飾ヌクレオチドを含む、請求項1記載の修飾siRNA分子。

【請求項46】

前記修飾siRNA分子が、19ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む、請求項1記載の修飾siRNA分子。

【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本願は、2007年12月27日出願の米国仮出願第61/017,075号、2008年4月15日出願の米国仮出願第61/045,228号、および2008年9月26日出願の米国仮出願第61/100,653号（これらの開示は、全ての目的のため参照により本明細書に完全に組み入れられる）に基づく優先権を主張する。

## 【背景技術】

## 【0002】

## 発明の背景

細胞増殖およびプログラム細胞死は、生物の成長および発達において重要な役割を果たしている。癌のような増殖性疾患においては、細胞増殖および/またはプログラム細胞死の過程が、しばしば、攪乱される。例えば、癌細胞は、おそらく変異のため、細胞周期の正の調節因子の過剰発現または細胞周期の負の調節因子の減少のいずれかを通して、無調節の細胞分裂を有していることがある。または、癌細胞は、アポトーシスの負の調節因子の過剰発現を通して、プログラム細胞死を受ける能力を失っていることもある。従って、癌細胞のチェックポイントコントロールおよびプログラム細胞死の過程を回復するであろう、新しい治療剤を開発する必要がある存在している。

## 【0003】

RNA干渉 (RNAi) は、二本鎖RNA (dsRNA) の認識が、最終的に、遺伝子発現の転写後抑制をもたらす、進化的に保存された過程である。この抑制は、相補塩基対合を通してmRNAの特異的な分解を誘導する、低分子干渉RNA (siRNA) と呼ばれる短いdsRNAによって媒介される。いくつかのモデル系において、この天然の応答は、遺伝子機能の調査のための強力なツールへと開発されている（例えば、Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188-200(2001) ; Hammond et al., *Nat. Rev. Genet.*, 2:110-119(2001) 参照）。より最近、合成21ヌクレオチドdsRNA二重鎖の哺乳動物細胞への導入が、遺伝子発現を効率的にサイレンシングし得ることが発見された。正確な機序はまだ不明であるが、RNAiは、関心対象の遺伝子を不活化するための新しい方式を提示する。特に、癌のような新生物障害の処置のため、RNAiは、ある種の遺伝子、例えば、抗アポトーシス分子、増殖因子、増殖因子受容体、有糸分裂紡錘体タンパク質、細胞周期タンパク質、血管形成因子、癌遺伝子、細胞内シグナル伝達因子、分子シャペロン、およびそれらの組み合わせの発現をモジュレートする（例えば、低下させる）ための可能性のある新しいアプローチを提供する。

## 【0004】

一つのそのような標的は、ポロ様キナーゼとして公知のセリン/トレオニンプロテインキナーゼのファミリーのメンバーをコードするポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 遺伝子である（例えば、Nigg, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10:776-783(1998) 参照）。真核生物において、細胞周期進行の調節は、サイクルを通じて発現が変動する遺伝子群によって制御される。サイクリン依存性キナーゼおよびそれらの関連調節サブユニット、サイクリンは、細胞周期の第一の調節因子である。これらのヘテロダイマー複合体は、下流の標的をリン酸化することにより作用し、次に、その標的が、細胞周期の後続の期に移行するために必要な核タンパク質を解放するシグナリング事象を誘発する。PLK-1のようなポロ様キナーゼは、これらのヘテロダイマー複合体の活性化および不活化に寄与する。

## 【0005】

細胞が細胞周期を進行する際、ポロ様キナーゼは、細胞周期の複数の段階を制御するために、量、活性、および局在の変動を受ける（Hamanaka et al., *J. Biol. Chem.*, 270:21086-21091(1995)）。このキナーゼのファミリーは、中心体成熟（Lane et al., *J. Cell. Biol.*, 135:1701-1713(1996)）、双極紡錘体形成（Golsteyn et al., *J. Cell. Biol.*, 129:1617-1628(1995)）、DNA傷害チェックポイント順応（Arnaud et al., *Chromosoma*, 107:424-429(1998)）、および後期促進複合体の調節（Kotani et al., *Mol. Cell*, 1:371-380(1998)）においても機能する。

10

20

30

40

50

## 【0006】

PLK-1は、有糸分裂通過のために必要とされる、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 遺伝子ポロ (polo) の哺乳動物カウンターパートとして同定されたこのキナーゼファミリーの最初のメンバーであった (Golsteyn et al., *J.Cell.Sci.*, 107:1509-1517(1994); Hamanaka et al., *Cell.Growth Differ.*, 5:249-257(1994); Holtrich et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91:1736-1740(1994); Lake et al., *Mol.Cell.Biol.*, 13:7793-7801(1993))。PLK-1の発現は、細胞の有糸分裂活性と関連しており (Golsteyn et al., *J.Cell.Sci.*, 107:1509-1517(1994); Lake et al., *Mol.Cell.Biol.*, 13:7793-7801(1993))、肺、結腸、胃、平滑筋、および食道を含むいくつかの起源の腫瘍において高いことが示された (Holtrich et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91:1736-1740(1994))。PLK-1の過剰発現または構成性発現が、哺乳動物細胞の悪性形質転換を誘導することも示されている (Mundt et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 239:377-385(1997); Smith et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 234:397-405(1997))。成長中のマウスNIH3T3繊維芽細胞へのPLK-1アンチセンスRNAの微量注入は、トリチウム標識されたチミジンの取り込みを阻止することが示され、このことから、PLK-1発現が、増殖中の細胞に制限されており、増殖中の細胞によって必要とされていることが示唆された (Hamanaka et al., *Cell.Growth Differ.*, 5:249-257(1994))。

10

## 【0007】

この結論のさらなる支持は、PLK-1発現のレベルの上昇が、非小細胞肺癌 (Wolf et al., *Oncogene*, 14:543-549(1997))、乳癌および肺癌 (Yuan et al., *Am.J.Pathol.*, 150:1165-1172(1997))、食道癌 (Tokumitsu et al., *Int.J.Oncol.*, 15:687-692(1999))、ならびに頭頸部の扁平上皮癌 (Knecht et al., *Cancer Res.*, 59:2794-2797(1999)) の有意な予後指標であることを示す研究に見出される。従って、PLK-1の活性、発現、または機能の薬理的モジュレーションは、病理学的状態における治療的介入の適切な点であり得る。

20

## 【0008】

現在、PLK-1の合成を効率的に阻害する公知の治療剤は存在せず、PLK-1機能をモジュレートすることを目標とした調査戦略は、抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を含んできた。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用したPLK-1発現の阻害は、培養A549細胞における細胞生存性の減少およびヌードマウスA549異種移植片における抗腫瘍活性をもたらした (Elez et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 209:352-356(2000))。同様に、米国特許第6,906,186号は、インビトロ細胞培養系におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用したPLK-1発現の阻害を記載している。しかしながら、これらの戦略は、治療プロトコルとしては試験されておらず、従って、インビボでPLK-1機能を効率的に阻害することができる薬剤の長年の必要性は依然として残っている。

30

## 【0009】

このように、PLK-1発現を特異的にモジュレートするための組成物および方法が必要とされている。本発明は、これらおよびその他の必要性を解決する。

## 【発明の概要】

## 【0010】

本発明は、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現を標的とする干渉RNA (例えば、siRNA、aiRNA、miRNA) を含む組成物、およびPLK-1発現をサイレンシングするためのそのような組成物の使用方法を提供する。より具体的には、本発明は、PLK-1発現をサイレンシングする未修飾の干渉RNA分子および化学的に修飾された干渉RNA分子、ならびに、例えば、肝細胞癌 (HCC) のような癌を処置するための、それらの使用方法を提供する。本発明は、本明細書に記載された干渉RNA分子、カチオン性脂質、および非カチオン性脂質を含み、粒子の凝集を阻害する複合脂質をさらに含んでもよい、血清安定核酸-脂質粒子 (例えば、SNA LP) も提供する。本発明は、本明細書に記載された干渉RNA分子を哺乳動物対象へ投与することにより、PLK-1遺伝子発現をサイレンシングする方法をさらに提供する。本発明は、免疫刺激特性を有するPLK-1干渉RNAを同定し、かつ/または修飾する方法をさらに提供する。逐次、PLK-1干渉RNAを送達した後、化学療法薬を送達することを含む、化学療法薬

40

50

の効果に対して癌細胞のような細胞を感作する方法も、提供される。

【0011】

一つの局面において、本発明は、PLK-1発現をサイレンシングすることができる、約15～約60ヌクレオチド長（例えば、15～60、15～50、15～40、15～30、15～25、もしくは19～25ヌクレオチド長、または15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、もしくは25ヌクレオチド長）の二本鎖領域を含む、修飾siRNA分子を提供する。

【0012】

典型的には、修飾siRNA分子は、二本鎖領域内に1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、修飾siRNAは、二本鎖領域内に約1%～約100%（例えば、約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%）の修飾ヌクレオチドを含む。好ましい態様において、二本鎖領域内のヌクレオチドの約25%未満（例えば、約25%、20%、15%、10%、もしくは5%未満）、または約1%～約25%（例えば、約1%～25%、5%～25%、10%～25%、15%～25%、20%～25%、もしくは10%～20%）が、修飾ヌクレオチドを含む。

【0013】

いくつかの態様において、修飾siRNAは、2'-O-メチル（2'OMe）ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'F）ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル）（MOE）ヌクレオチド、ロックド核酸（LNA）ヌクレオチド、およびそれらの混合物を含むが、これらに限定はされない、修飾ヌクレオチドを含む。好ましい態様において、修飾siRNAは、例えば、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、2'OMe-アデノシンヌクレオチド、2'OMe-シトシンヌクレオチド、およびそれらの混合物のような2'OMeヌクレオチド（例えば、2'OMeプリンヌクレオチドおよび/または2'OMeピリミジンヌクレオチド）を含む。ある種の例において、修飾siRNAは、2'OMe-シトシンヌクレオチドを含まない。他の態様において、修飾siRNAはヘアピンループ構造を含む。

【0014】

修飾siRNAは、siRNA分子の二本鎖領域の一方の鎖（即ち、センスもしくはアンチセンス）または両方の鎖に、修飾ヌクレオチドを含み得る。好ましくは、siRNA二重鎖の二本鎖領域内の選択された位置においてウリジンヌクレオチドおよび/またはグアノシンヌクレオチドが修飾される。ウリジンヌクレオチド修飾に関しては、センス鎖および/またはアンチセンス鎖のウリジンヌクレオチドのうち少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、またはそれ以上が、2'OMe-ウリジンヌクレオチドのような修飾ウリジンヌクレオチドであり得る。いくつかの態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の全てのウリジンヌクレオチドが、2'OMe-ウリジンヌクレオチドである。グアノシンヌクレオチド修飾に関しては、センス鎖および/またはアンチセンス鎖のグアノシンヌクレオチドのうち少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、またはそれ以上が、2'OMe-グアノシンヌクレオチドのような修飾グアノシンヌクレオチドであり得る。いくつかの態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の全てのグアノシンヌクレオチドが、2'OMe-グアノシンヌクレオチドである。

【0015】

いくつかの態様において、修飾siRNA分子は、対応する未修飾siRNA配列より低免疫刺激性である。ある種の態様において、修飾siRNAは、対応する未修飾siRNA配列より、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%、低免疫刺激性である。他の態様において、修飾siRNAは、対応する未修飾siRNA配列より、少なくとも約70%（例えば、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）、低免疫刺激性である。修飾siRNA分子および対応する未修飾siRNA分子の免疫刺激特性は、例えば、（SNALP送達系または本明細書に開示されたその他のリポプレックス系のような）適切な脂質に基づく送達系を使用した哺乳動物への全身投与または哺乳動物応答細胞のトランスフェクション

10

20

30

40

50

の約2～約12時間後に、INF- および/またはIL-6を測定することにより、決定され得ることが、当業者には容易に明らかであろう。

【0016】

ある種の態様において、修飾siRNA分子は、対応する未修飾siRNAのものの10倍以下のIC<sub>50</sub>（即ち、最大半量阻害濃度）を有する（即ち、修飾siRNAは、対応する未修飾siRNAのIC<sub>50</sub>の10倍以下であるIC<sub>50</sub>を有する）。他の態様において、修飾siRNAは、対応する未修飾siRNA配列のものの3倍以下のIC<sub>50</sub>を有する。さらに他の態様において、修飾siRNAは、対応する未修飾siRNAのものの2倍以下のIC<sub>50</sub>を有する。当業者に公知の方法を使用して、用量応答曲線を作成し、修飾siRNAおよび対応する未修飾siRNAに関するIC<sub>50</sub>値を容易に決定することができるが、当業者には容易に明らかであろう。

10

【0017】

さらにもう一つの態様において、修飾siRNAは、対応する未修飾siRNA配列と比べて、標的配列の発現の少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%をサイレンシングすることができる。

【0018】

いくつかの態様において、修飾siRNAは、例えば、二本鎖領域のセンス鎖および/またはアンチセンス鎖に、リン酸骨格修飾を含まない。他の態様において、修飾siRNAは、例えば、二本鎖領域のセンス鎖および/またはアンチセンス鎖に、2'-デオキシヌクレオチドを含まない。ある種の例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の二本鎖領域の3'末のヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドではない。ある種の他の例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の二本鎖領域の3'末に近いヌクレオチド（例えば、3'末の1、2、3、または4ヌクレオチド以内）は、修飾ヌクレオチドではない。

20

【0019】

本発明の修飾siRNA分子は、二本鎖領域の片側もしくは両側に1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、もしくはそれ以上のヌクレオチドの3'突出を有していてもよいし、または二本鎖領域の片側もしくは両側に突出を欠いていてもよい（即ち、平滑末端を有していてもよい）。好ましくは、修飾siRNAは、二本鎖領域の片側に2ヌクレオチドの3'突出を有する。ある種の例において、アンチセンス鎖の3'突出は、標的配列に対する相補性を有し、センス鎖の3'突出は、標的配列の相補鎖に対する相補性を有する。または、3'突出は、標的配列またはその相補鎖に対する相補性を有していない。いくつかの態様において、3'突出は、2'-デオキシ（2'H）ヌクレオチドのようなヌクレオチドを1個、2個、3個、4個、またはそれ以上含む。ある種の好ましい態様において、3'突出は、デオキシチミジン（dT）ヌクレオチドおよび/またはウリジンヌクレオチドを含む。他の態様において、二本鎖領域の片側または両側の3'突出のヌクレオチドのうちの1個または複数個が、修飾ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドの非限定的な例は、上記の通りであり、2'OMeヌクレオチド、2'-デオキシ-2'Fヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-2-MOEヌクレオチド、LNAヌクレオチド、およびそれらの混合物を含む。好ましい態様において、siRNAのセンス鎖および/またはアンチセンス鎖に存在する3'突出の1個、2個、3個、4個、またはそれ以上のヌクレオチドが、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、2'OMe-アデノシンヌクレオチド、2'OMe-シトシンヌクレオチド、およびそれらの混合物のような2'OMeヌクレオチド（例えば、2'OMeプリンヌクレオチドおよび/または2'OMeピリミジンヌクレオチド）を含む。

30

40

【0020】

本発明のsiRNA分子は、PLK-1発現をサイレンシングする修飾siRNA配列を少なくとも一つ含んでいてもよいし、またはそれらのカクテル（例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはそれ以上）を含んでいてもよい。ある種の例において、本明細書に記載された修飾siRNAのうちの一つまたは複数が、PLK-1発現をサイレンシングする一つまたは複数（例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の未修飾siRNA配列とのカクテルの中に存在する。いくつかの態様において、修飾siRNA分子は、表

50

1~7に示された未修飾配列の少なくとも一つまたはそれらのカクテルの化学的に修飾された（例えば、2'OMe修飾された）バージョンを含む。他の態様において、修飾siRNA分子は、表3、6、および10~11に示された修飾配列の少なくとも一つまたはそれらのカクテルを含む。好ましくは、修飾siRNA分子は、PLK1424 2/6、PLK1424 U4/GU、PLK1424 U4/G、PLK 773 G/GU、PLK1425 3/5、およびそれらの混合物からなる群より選択される。

#### 【0021】

いくつかの態様において、対応する未修飾siRNA配列は、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、またはそれ以上の5'-GU-3'モチーフを含む。5'-GU-3'モチーフは、未修飾siRNA配列のセンス鎖にあってもよいし、アンチセンス鎖にあってもよいし、または両方の鎖にあってもよい。5'-GU-3'モチーフは相互に隣接していてもよいし、または、それらは1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、もしくはそれ以上のヌクレオチドによって分離されていてもよい。

10

#### 【0022】

ある種の態様において、修飾siRNAは、例えば、修飾siRNAを哺乳動物の細胞へ送達するための、担体系をさらに含む。本発明において使用するのに適している担体系の例には、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、およびそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。ある種の例において、siRNAは、リボプレックスが形成されるよう、カチオン性脂質のような脂質と複合体化される。ある種の他の例において、修飾siRNAは、ポリプレックスが形成されるよう、カチオン性ポリマー（例えば、ポリエチレンイミン（PEI））のようなポリマーと複合体化される。修飾siRNAは、シクロデキストリンまたはそのポリマーと複合体化されてもよい。好ましくは、修飾siRNAは、核酸-脂質粒子に封入される。

20

#### 【0023】

本発明は、本明細書に記載された修飾siRNA分子と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物も提供する。

#### 【0024】

もう一つの局面において、本発明は、PLK-1発現を標的とする核酸-脂質粒子を提供する。核酸-脂質粒子は、PLK-1発現をサイレンシングする修飾siRNA分子、カチオン性脂質、および非カチオン性脂質を含む。ある種の例において、核酸-脂質粒子は、粒子の凝集を阻害する複合脂質をさらに含む。好ましくは、核酸-脂質粒子は、PLK-1発現をサイレンシングする修飾siRNA分子、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を阻害する複合脂質を含む。

30

#### 【0025】

カチオン性脂質は、例えば、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLinDMA）、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLenDMA）、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド（DODAC）、ジオクタデシルジメチルアンモニウム（DODMA）、ジステアリルジメチルアンモニウム（DSDMA）、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド（DDAB）、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTAP）、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール（DC-Chol）、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（DMRIE）、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スベルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート（DOSPA）、ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン（DOGS）、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン（CLinDMA）、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',1-2'-オクタデカジエンオキシ)プロパン（CpLinDMA）、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン（DMOBA）、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン（DOcarbDAP）、2,3-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン（DLinDAP）、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバ

40

50

ミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbdAP)、1,2-ジリノレオイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinCDAP)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-XTC2-DMA)、またはそれらの混合物であり得る。CLinDMAのようなカチオン性脂質は、付加的なカチオン性脂質と共に、米国特許公開第20060240554号に記載されている。DLin-K-DMAのようなカチオン性脂質は、付加的なカチオン性脂質と共に、2008年1月2日出願の米国仮出願第61/018,627号、2008年5月1日出願の米国仮出願第61/049,568号、および2008年10月9日出願の米国仮出願第61/104,219号に記載されている。DLin-K-XTC2-DMAのようなカチオン性脂質は、付加的なカチオン性脂質と共に、2008年10月9日出願の米国仮出願第61/104,212号に記載されている。カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約2モル%～約60モル%、約5モル%～約45モル%、約5モル%～約15モル%、約20モル%～約50モル%、約30モル%～約50モル%、約40モル%～約50モル%、または約40モル%を構成することができる。

10

## 【 0 0 2 6 】

非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジエタノールアミン (POPE)、パルミトイルオレイオール-ホスファチジルグリセロール (POPG)、ジパルミトイル-ホスファチジエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイル-ホスファチジエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジエタノールアミン (DSPE)、モノメチル-ホスファチジエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジエタノールアミン、ジエライドイル-ホスファチジエタノールアミン (DEPE)、ステアロイルオレオイル-ホスファチジエタノールアミン (SOPE)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、コレステロール、またはそれらの混合物を含むが、これらに限定はされない、アニオン性脂質または中性脂質であり得る。非カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約5モル%～約90モル%、約10モル%～約85モル%、約20モル%～約85モル%、約10モル% (例えば、DSPCもしくはDPPCのようなリン脂質のみ)、または約60モル% (例えば、約10モル%のDSPCもしくはDPPCのようなリン脂質および約48モル%のコレステロール)を構成することができる。

20

## 【 0 0 2 7 】

粒子の凝集を阻害する複合脂質は、ポリエチレングリコール (PEG)-脂質コンジュゲート、ポリアミド (ATTA)-脂質コンジュゲート、カチオン性ポリマー-脂質コンジュゲート (CPL)、またはそれらの混合物であり得る。一つの好ましい態様において、核酸-脂質粒子は、PEG-脂質コンジュゲートまたはATTA-脂質コンジュゲートのいずれかを含む。ある種の態様において、PEG-脂質コンジュゲートまたはATTA-脂質コンジュゲートは、CPLと共に使用される。粒子の凝集を阻害する複合脂質には、例えば、PEG-ジアシルグリセロール (DAG)、PEGジアルキルオキシプロピル (DAA)、PEG-リン脂質、PEG-セラミド (Cer)、またはそれらの混合物を含む、ポリエチレングリコール-脂質コンジュゲートが含まれ得る。PEG-DAAコンジュゲートは、PEG-ジラウリルオキシプロピル (C12)、PEG-ジミリストイルオキシプロピル (C14)、PEG-ジパルミチルオキシプロピル (C16)、およびPEG-ジステアリルオキシプロピル (C18) であり得る。本発明において使用するのに適している付加的なPEG-脂質コンジュゲートには、2008年3月26日出願の米国仮出願第61/039,748号に記載されたPEG-C-DOMG、および米国特許第7,404,969号に記載された1-[8'-(1,2-ジミリストイル-3-プロパンオキシ)-カルボキサミド-3',6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-メチル-ポリ(エチレングリコール) (2KPEG-DMG) が含まれるが、これらに限定はされない。いくつかの態様において、粒子の凝集を阻害する複合脂質は、式: A-W-Y [式中、Aは脂質モエティであり、Wは親水性ポリマーであり、かつYはポリカチオン性モエティである] を有するCPLである。Wは、約250～約7000ダルトンの分子量を有する、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸/ポリグリコール酸コポリマー、またはそれらの組み合わせからなる群より選択されるポリマーであり得る

30

40

50

。いくつかの態様において、Yは選択されたpHにおいて少なくとも4価の正の電荷を有する。いくつかの態様において、Yは、リジン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、それらの誘導体、またはそれらの組み合わせであり得る。粒子の凝集を防止する複合脂質は、粒子中に存在する全脂質の0モル%～約20モル%、約0.5モル%～約20モル%、約1モル%～約15モル%、約4モル%～約10モル%、または約2モル%であり得る。

【0028】

いくつかの態様において、核酸-脂質粒子は、コレステロールまたはその誘導体をさらに含む。適当なコレステロール誘導体の例には、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテル、およびコレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテルが含まれるが、これらに限定はされない。コレステロールまたはコレステロール誘導体は、粒子中に存在する全脂質の0モル%～約10モル%、約2モル%～約10モル%、約10モル%～約60モル%、約20モル%～約45モル%、約30モル%～約50モル%、または約48モル%であり得る。

10

【0029】

本発明の一つの特定の態様において、核酸-脂質粒子は、40モル%のDLinDMA、10モル%のDSPC、2モル%のPEG-cDMA、および48モル%のコレステロールを含む。

【0030】

本発明の他の態様において、核酸-脂質粒子は、(a) PLK-1発現をサイレンシングする一つまたは複数の未修飾siRNAおよび/または修飾siRNA；(b) 粒子中に存在する全脂質の約50モル%～約85モル%を構成するカチオン性脂質；(c) 粒子中に存在する全脂質の約13モル%～約49.5モル%を構成する非カチオン性脂質；ならびに(d) 粒子中に存在する全脂質の約0.5モル%～約2モル%を構成し、粒子の凝集を阻害する複合脂質：を含む。好ましい態様において、核酸-脂質粒子中のsiRNAが、水性溶液中でヌクレアーゼによる分解に対して抵抗性であるよう、siRNAは核酸-脂質粒子の脂質に完全に封入される。好ましい態様において、核酸-脂質粒子は、哺乳動物に対して実質的に非毒性である。

20

【0031】

これらのSNALP態様において、核酸-脂質粒子は、上記のカチオン性脂質のうちの一つまたは複数を含み得る。好ましい態様において、カチオン性脂質はDLinDMAである。カチオン性脂質は、典型的には、粒子中に存在する全脂質の約50モル%～約85モル%、約50モル%～約80モル%、約50モル%～約75モル%、約50モル%～約65モル%、または約55モル%～約65モル%を構成する。

30

【0032】

これらのSNALP態様における非カチオン性脂質は、アニオン性脂質または中性脂質であり得る。一つの態様において、非カチオン性脂質は、コレステロールまたはその誘導体を含む。この態様において、コレステロールまたはコレステロール誘導体は、粒子中に存在する全脂質の約30モル%～約40モル%を構成する。もう一つの態様において、非カチオン性脂質はリン脂質を含む。さらにもう一つの態様において、非カチオン性脂質は、リン脂質とコレステロールまたはコレステロール誘導体との混合物を含む。

【0033】

これらのSNALP態様において使用するのに適しているリン脂質には、DPPC、DSPC、DOPE、POPC、POPE、POPG、DPPE、DMPE、DSPE、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、DEPE、SOPE、EPC、およびそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。非カチオン性脂質が、リン脂質とコレステロールまたはコレステロール誘導体との混合物である場合、リン脂質は、粒子中に存在する全脂質の約4モル%～約10モル%を構成し、コレステロールまたはコレステロール誘導体は、粒子中に存在する全脂質の約30モル%～約40モル%を構成する。コレステロール誘導体を使用される場合、コレステロール誘導体には、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテル、およびコレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテルが含まれるが、これらに限定はされない。好ましい態様において、リン脂質にはDPPCが含まれる。

40

50

## 【 0 0 3 4 】

これらの態様のSNALPは、粒子の凝集を阻害する複合脂質も含むことができる。適当な複合脂質の例には、PEG-脂質コンジュゲート、ポリアミド(ATTA)-脂質コンジュゲート、カチオン性ポリマー-脂質コンジュゲート(CPL)、またはそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。一つの好ましい態様において、核酸-脂質粒子はPEG-脂質コンジュゲートまたはATTA-脂質コンジュゲートのいずれかを含む。ある種の態様において、PEG-脂質コンジュゲートまたはATTA-脂質コンジュゲートは、CPLと共に使用される。好ましい態様において、複合脂質はPEG-脂質である。

## 【 0 0 3 5 】

適当なPEG-脂質の例には、PEG-DAG、PEG-DAA、PEG-リン脂質、PEG-セラミド(Cer)、またはそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。好ましい態様において、PEG-脂質はPEG-DAAコンジュゲートである。適当なPEG-DAAコンジュゲートの例には、PEG-ジラウリルオキシプロピル(C12)、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(C14)、PEG-ジパルミチルオキシプロピル(C16)、およびPEG-ジステアリルオキシプロピル(C18)が含まれるが、これらに限定はされない。好ましい態様において、PEG-DAAコンジュゲートはPEG-ジミリスチルオキシプロピル(C14)である。もう一つの好ましい態様において、PEG-DAAコンジュゲートはPEG-ジステアリルオキシプロピル(C18)である。付加的なPEG-脂質コンジュゲートには、非限定的に、PEG-C-DOMG、2KPEG-DMG、およびそれらの混合物が含まれる。複合脂質は、典型的には、粒子中に存在する全脂質の約0.5モル%~約2モル%を構成する。

## 【 0 0 3 6 】

典型的には、これらの態様のSNALPは、約1~約100の脂質:核酸比を有する。好ましい態様において、これらのSNALPは、約5~約15の脂質:核酸比を有する。もう一つの好ましい態様において、これらのSNALPは、約6の脂質:核酸比を有する。典型的には、これらのSNALPは、約50nm~約150nmの平均直径を有する。好ましい態様において、これらのSNALPは、約70nm~約90nmの平均直径を有する。

## 【 0 0 3 7 】

本発明の一つの特定の態様において、SNALPは、(a) PLK-1発現をサイレンシングする一つまたは複数の未修飾siRNAおよび/または修飾siRNA; (b) 粒子中に存在する全脂質の約56.5モル%~約66.5モル%を構成するカチオン性脂質; (c) 粒子中に存在する全脂質の約31.5モル%~約42.5モル%を構成する非カチオン性脂質; ならびに(d) 粒子中に存在する全脂質の約1モル%~約2モル%を構成し、粒子の凝集を阻害する複合脂質:を含む。SNALPのこの態様は、一般に、本明細書において「1:62」製剤と呼ばれる。好ましい態様において、カチオン性脂質はDLinDMAであり、非カチオン性脂質はコレステロールであり、複合脂質はPEG-DAAコンジュゲートである。これらが1:62製剤の好ましい態様であるが、他のカチオン性脂質、他のコレステロール誘導体を含む非カチオン性脂質、および複合脂質が、本明細書に記載されるような1:62製剤において使用されてもよいことを、当業者は認識するであろう。

## 【 0 0 3 8 】

本発明のもう一つの特定の態様において、SNALPは、(a) PLK-1発現をサイレンシングする一つまたは複数の未修飾siRNAおよび/または修飾siRNA; (b) 粒子中に存在する全脂質の約52モル%~約62モル%を構成するカチオン性脂質; (c) 粒子中に存在する全脂質の約36モル%~約47モル%を構成する非カチオン性脂質; ならびに(d) 粒子中に存在する全脂質の約1モル%~約2モル%を構成し、粒子の凝集を阻害する複合脂質:を含む。SNALPのこの態様は、一般に、本明細書において「1:57」製剤と呼ばれる。好ましい態様において、カチオン性脂質はDLinDMAであり、非カチオン性脂質は(DPPCのような)リン脂質とコレステロールとの混合物であり[リン脂質は、粒子中に存在する全脂質の約5モル%~約9モル%を構成し、コレステロール(またはコレステロール誘導体)は、粒子中に存在する全脂質の約32モル%~約37モル%を構成する]、PEG-脂質はPEG-DAAである。これらが1:57製剤の好ましい態様であるが、他のカチオン性脂質、(他のリン脂質および

10

20

30

40

50

他のコレステロール誘導体を含む)非カチオン性脂質、ならびに複合脂質が、本明細書に記載されるような1:57製剤において使用されてもよいことを、当業者は認識するであろう。

【0039】

いくつかの態様において、核酸-脂質粒子は、表1~7および10~11に示された配列を含むかまたはからなる未修飾siRNA分子または修飾siRNA分子を、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上含む。他の態様において、核酸-脂質粒子は、PLK1424 U4/GU、PLK1424 U4/G、PLK773 G/GU、PLK1425 3/5、およびそれらの混合物からなる群より選択される修飾siRNA分子を含む。

【0040】

本発明の核酸-脂質粒子は、PLK-1発現をサイレンシングするsiRNA分子の治療的送達のために有用である。一つの態様において、本明細書に記載された修飾siRNA分子が、核酸-脂質粒子へと製剤化され、粒子が、そのような処置を必要とする哺乳動物(例えば、マウスのようなげっ歯類、またはヒト、チンパンジー、もしくはサルのような霊長類)へ投与される。ある種の例において、治療的に有効な量の核酸-脂質粒子が、例えば、肝細胞癌(HCC)のような癌を処置するため、哺乳動物へ投与され得る。核酸-脂質粒子の投与は、例えば、経口、鼻腔内、静脈内、腹腔内、筋肉内、関節内、病巣内、気管内、皮下、または皮内のような、当技術分野において公知の任意の経路によることができる。

【0041】

ある種の態様において、核酸-脂質粒子中のsiRNA分子は、少なくとも20分間、30分間、45分間、もしくは60分間の37 °Cでのヌクレアーゼへの粒子の曝露の後、または少なくとも30分間、45分間、もしくは60分間、もしくは少なくとも2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、26時間、28時間、30時間、32時間、34時間、もしくは36時間の37 °Cでの血清中での粒子のインキュベーションの後、実質的に分解されない。

【0042】

いくつかの態様において、siRNA分子は、核酸-脂質粒子に完全に封入される。他の態様において、siRNA分子は粒子の脂質部分と複合体化される。

【0043】

本発明は、本明細書に記載された核酸-脂質粒子と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物をさらに提供する。

【0044】

さらにもう一つの局面において、本明細書に記載されたsiRNA分子は、PLK-1発現をサイレンシングする方法において使用される。特に、PLK-1遺伝子の転写および/または翻訳をダウンレギュレートするかまたはサイレンシングすることによる、哺乳動物における疾患または障害の処置のためのインビトロおよびインビボの方法を提供することが、本発明の目的である。一つの態様において、本発明は、細胞を、本明細書に記載されたsiRNA分子と接触させることによる、PLK-1遺伝子の発現(例えば、mRNAおよび/またはタンパク質のレベル)をサイレンシングするsiRNAを細胞へ導入する方法を提供する。もう一つの態様において、本発明は、本明細書に記載されたsiRNA分子を哺乳動物へ投与することによる、PLK-1遺伝子の発現をサイレンシングするsiRNA分子のインビボ送達の方法を提供する。siRNA分子の投与は、例えば、経口、鼻腔内、静脈内、腹腔内、筋肉内、関節内、病巣内、気管内、皮下、または皮内のような、当技術分野において公知の任意の経路によることができる。

【0045】

これらの方法において、PLK-1発現をサイレンシングするsiRNA分子は、典型的には、担体系を用いて製剤化され、siRNA分子を含む担体系が、そのような処置を必要とする哺乳動物へ投与される。または、ヒトなどの哺乳動物から細胞を取り出し、担体系を使用してsiRNAをインビトロで送達し、次いで、その細胞を注射等により哺乳動物へ投与する。本発明において使用するのに適している担体系の例には、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミ

10

20

30

40

50

セル、ピロソーム、核酸複合体（例えば、リポプレックス、ポリプレックス等）、およびそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。担体系は、PLK-1発現をサイレンシングするsiRNA分子を少なくとも一つ含んでいてもよいし、またはそれらのカクテル（例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）を含んでいてもよい。ある種の態様において、担体系は、表1~7および10~11に示された配列の少なくとも一つ、またはそれらのカクテルを含む。

【0046】

いくつかの態様において、PLK-1発現をサイレンシングするsiRNA分子は、siRNA分子、カチオン性脂質、および非カチオン性脂質を含む核酸-脂質粒子の中にある。好ましくは、siRNA分子は、siRNA分子、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を阻害する複合脂質を含む核酸-脂質粒子の中にある。治療的に有効な量の核酸-脂質粒子が、哺乳動物（例えば、マウスのようなげっ歯類、またはヒト、チンパンジー、もしくはサルのような霊長類）へ投与され得る。

10

【0047】

いくつかの態様において、哺乳動物は細胞増殖性障害を有する。この態様のある種の局面において、哺乳動物は、新生物（例えば、癌）、過形成、再狭窄、心肥大、免疫障害、および炎症からなる群より選択される細胞増殖性障害を有する。好ましくは、細胞増殖性障害は、癌のような新生物障害である。いくつかの態様において、癌には、肝細胞癌（HCC）、乳頭腫、プラストグリオーマ（blastoglioma）、カボジ肉腫、黒色腫、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、星状細胞腫、頭部癌、頸部癌、膀胱癌、乳癌、肺癌、結腸直腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、胃癌、白血病、リンパ腫、ホジキン病、骨肉腫、精巣癌、およびパーキンソン病が含まれるが、これらに限定はされない。

20

【0048】

一つの態様において、核酸-脂質粒子の全注射用量の少なくとも約1%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、または20%が、注射の約1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、8時間後、12時間後、16時間後、18時間後、または24時間後に、血漿中に存在する。他の態様において、核酸-脂質粒子の全注射用量の約20%超、30%超、40%超、または60%、70%、または80%もが、注射の約1時間後、4時間後、6時間後、8時間後、10時間後、12時間後、20時間後、または24時間後に、血漿中に存在する。もう一つの態様において、投与の部位に対して近位または遠位の部位におけるsiRNA分子の効果（例えば、標的PLK-1配列のダウンレギュレーション）は、核酸-脂質粒子の投与の約12時間後、24時間後、48時間後、72時間後、もしくは96時間後、または約6日後、8日後、10日後、12日後、14日後、16日後、18日後、19日後、20日後、22日後、24日後、26日後、もしくは28日後に検出可能である。さらなる態様において、標的PLK-1配列の発現のダウンレギュレーションは、投与の約12時間後、24時間後、48時間後、72時間後、もしくは96時間後、または約6日後、8日後、10日後、12日後、14日後、16日後、18日後、19日後、20日後、22日後、24日後、26日後、もしくは28日後に検出可能である。いくつかの態様において、PLK-1遺伝子のダウンレギュレーションは、哺乳動物に由来する生物学的試料の中のmRNAまたはタンパク質のレベルを検出することにより決定される。他の態様において、PLK-1配列の発現のダウンレギュレーションは、哺乳動物に由来する生物学的試料の中の細胞の生存性または細胞のアポトーシスの誘導を測定することにより検出される。

30

40

【0049】

核酸-脂質粒子は、循環系において安定しており、血管外部位および標的細胞集団への接近をもたらす薬力学的挙動のために必要とされるサイズを有しているため、静脈内核酸送達において使用するのに適している。本発明は、核酸-脂質粒子を含む薬学的に許容される組成物も提供する。

【0050】

さらなる局面において、本明細書に記載されたsiRNA分子は、化学療法薬の効果に対して細胞を感作する方法において使用される。特に、化学療法薬の投与と組み合わせられた、PLK-1遺伝子の転写および/または翻訳をダウンレギュレートするかまたはサイレンシ

50

ングすることによる、哺乳動物における細胞増殖性障害の処置のためのインビトロおよびインビボの方法を提供することが、本発明の目的である。本明細書に詳細に記載されるように、ヒトのような哺乳動物は、化学療法薬投与の前、間、および/または後に、適当な用量の（例えば、核酸-脂質粒子へ製剤化された）一つまたは複数の未修飾siRNA分子または修飾siRNA分子により処置され得る。好ましい態様において、ヒトなどの哺乳動物における癌細胞などの細胞は、化学療法薬を投与する前に、PLK-1発現をサイレンシングするsiRNAと接触させられる。

【0051】

付加的な局面において、本発明は、PLK-1発現を標的とする本明細書に記載された非対称干渉RNA (aiRNA) 分子を含む組成物、およびPLK-1発現をサイレンシングするためのそのような組成物の使用方法を提供する。

10

【0052】

関連する局面において、本発明は、PLK-1発現を標的とする本明細書に記載されたマイクロRNA (miRNA) 分子を含む組成物、およびPLK-1発現をサイレンシングするためのそのような組成物の使用方法を提供する。

[本発明1001]

ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングすることができる、約15~約60ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む修飾siRNA分子であって、二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの1個または複数個が修飾ヌクレオチドを含む、修飾siRNA分子。

[本発明1002]

2'-O-メチル (2'OMe) ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ (2'F) ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル) (MOE) ヌクレオチド、ロックド核酸 (LNA) ヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択される修飾ヌクレオチドを含む、本発明1001の修飾siRNA分子。

20

[本発明1003]

2'OMeヌクレオチドを含む、本発明1001の修飾siRNA分子。

[本発明1004]

二本鎖領域内に1個または複数個の修飾ヌクレオチドを有するセンス鎖を含む、本発明1001の修飾siRNA分子。

[本発明1005]

二本鎖領域内に1個または複数個の修飾ヌクレオチドを有するアンチセンス鎖をさらに含む、本発明1004の修飾siRNA分子。

30

[本発明1006]

二本鎖領域内に1個または複数個の修飾ヌクレオチドを有するアンチセンス鎖を含む、本発明1001の修飾siRNA分子。

[本発明1007]

二本鎖領域内に1個または複数個の修飾ヌクレオチドを有するセンス鎖をさらに含む、本発明1006の修飾siRNA分子。

[本発明1008]

その一方の鎖または両方の鎖に3'突出を含む、本発明1001の修飾siRNA分子。

40

[本発明1009]

3'突出内のヌクレオチドのうちの1個または複数個が修飾ヌクレオチドを含む、本発明1008の修飾siRNA分子。

[本発明1010]

二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの約25%未満が修飾ヌクレオチドを含む、本発明1001の修飾siRNA分子。

[本発明1011]

対応する未修飾siRNA配列より低免疫刺激性である、本発明1001の修飾siRNA分子。

[本発明1012]

SEQ ID NO:2の核酸配列を含むアンチセンス鎖を含む、本発明1001の修飾siRNA分子。

50

[本発明1013]SEQ ID NO:1の核酸配列を含むセンス鎖を含む、本発明1001の修飾siRNA分子。[本発明1014]SEQ ID NO:4の核酸配列を含むアンチセンス鎖を含む、本発明1001の修飾siRNA分子。[本発明1015]SEQ ID NO:3の核酸配列を含むセンス鎖を含む、本発明1001の修飾siRNA分子。[本発明1016]SEQ ID NO:403の核酸配列からなるアンチセンス鎖を含む、本発明1001の修飾siRNA分子。[本発明1017]SEQ ID NO:400の核酸配列からなるセンス鎖を含む、本発明1001の修飾siRNA分子。[本発明1018]PLK1424 2/6、PLK1424 U4/GU、PLK1424 U4/G、PLK773 G/GU、PLK1425 3/5、およびそれらの混合物からなる群より選択される、本発明1001の修飾siRNA分子。[本発明1019]PLK1424 2/6である、本発明1001の修飾siRNA分子。[本発明1020]担体系をさらに含む、本発明1001の修飾siRNA分子。[本発明1021]担体系が、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、およびそれらの混合物からなる群より選択される、本発明1020の修飾siRNA分子。[本発明1022]担体系が、核酸-脂質粒子である、本発明1021の修飾siRNA分子。[本発明1023]本発明1001の修飾siRNA分子と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。[本発明1024]本発明1001の修飾siRNA分子、  
カチオン性脂質、および  
非カチオン性脂質  
を含む、核酸-脂質粒子。[本発明1025]カチオン性脂質が、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLenDMA)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムプロミド (DDAB)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、ジステアリルジメチルアンモニウム (DSDMA)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシプロピルアミン (DODMA)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スぺルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスぺルミン (DOGS)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CLinDMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサベントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',1-2'-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、2,3-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン (DLinDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbDAP)、1,2-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinCDAP)、およびそれらの混合物からなる群より選択

10

20

30

40

50

されるメンバーである、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1026]

カチオン性脂質がDLinDMAである、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1027]

非カチオン性脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (POPE)、パルミトイルオレイオール-ホスファチジルグリセロール (POPG)、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン (DPPC)、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジェラドイル-ホスファチジルエタノールアミン (DEPE)、ステアロイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (SOPE)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、コレステロール、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、本発明1024の核酸-脂質粒子。

10

[本発明1028]

非カチオン性脂質が、DSPC、DPPC、またはDSPEである、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1029]

粒子の凝集を阻害する複合脂質をさらに含む、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1030]

粒子の凝集を阻害する複合脂質が、ポリエチレングリコール (PEG) -脂質コンジュゲート、ポリアミド (ATTA) -脂質コンジュゲート、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、本発明1029の核酸-脂質粒子。

20

[本発明1031]

PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-ジアシルグリセロール、PEGジアルキルオキシプロピル、PEG-リン脂質、PEG-セラミド、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、本発明1030の核酸-脂質粒子。

[本発明1032]

粒子の凝集を阻害する複合脂質が、ポリエチレングリコール (PEG) -ジアルキルオキシプロピル (PEG-DAA) コンジュゲートを含む、本発明1030の核酸-脂質粒子。

30

[本発明1033]

カチオン性脂質が、粒子中に存在する全脂質の約20モル% ~ 約50モル%を構成する、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1034]

カチオン性脂質が、粒子中に存在する全脂質の約40モル%を構成する、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1035]

非カチオン性脂質が、粒子中に存在する全脂質の約5モル% ~ 約90モル%を構成する、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1036]

非カチオン性脂質が、粒子中に存在する全脂質の約10モル%を構成する、本発明1024の核酸-脂質粒子。

40

[本発明1037]

非カチオン性脂質が、粒子中に存在する全脂質の約60モル%を構成する、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1038]

PEG-DAAコンジュゲートが、粒子中に存在する全脂質の0モル% ~ 約20モル%を構成する、本発明1032の核酸-脂質粒子。

[本発明1039]

PEG-DAAコンジュゲートが、粒子中に存在する全脂質の約2モル%を構成する、本発明10

50

32の核酸-脂質粒子。

[本発明1040]

コレステロールをさらに含む、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1041]

コレステロールが、粒子中に存在する全脂質の約10モル%～約60モル%を構成する、本発明1040の核酸-脂質粒子。

[本発明1042]

コレステロールが、粒子中に存在する全脂質の約48モル%を構成する、本発明1040の核酸-脂質粒子。

[本発明1043]

修飾siRNA分子が核酸-脂質粒子に完全に封入されている、本発明1024の核酸-脂質粒子。

[本発明1044]

本発明1024の核酸-脂質粒子と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1045]

(a) ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNA分子、

(b) 粒子中に存在する全脂質の約50モル%～約85モル%を構成するカチオン性脂質、

(c) 粒子中に存在する全脂質の約13モル%～約49.5モル%を構成する非カチオン性脂質、および

(d) 粒子中に存在する全脂質の約0.5モル%～約2モル%を構成し、粒子の凝集を阻害する複合脂質

を含む、核酸-脂質粒子。

[本発明1046]

siRNA分子が、表1～7および10～11に示された配列のうちの少なくとも一つを含む、本発明1045の核酸-脂質粒子。

[本発明1047]

カチオン性脂質が、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)

、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLenDMA)、N,N-ジオレイル-N

,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウム

プロミド (DDAB)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアン

モニウムクロリド (DOTAP)、ジステアリルジメチルアンモニウム (DSDMA)、N-(1-(2,3-

ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジ

メチル-2,3-ジオレイルオキシプロピルアミン (DODMA)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエ

タン)-カルバモイル)コレステロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-

イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DMRIE)、2,3-ジオレ

イルオキシ-N-[2(スベルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウ

ムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン(DOGS)

、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-

-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CLinDMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3-ベ

ータ-オキシ)-3'-オキサベントキシ)-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',1-2'-オクタデカジエンオ

キシ)プロパン (CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOB

A)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、2,3-ジ

リノレイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン (DLinDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイル

カルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbdAP)、1,2-ジリノレイルカルバミル

-3-ジメチルアミノプロパン (DLinCDAP)、およびそれらの混合物からなる群より選択さ

れるメンバーである、本発明1045の核酸-脂質粒子。

[本発明1048]

カチオン性脂質がDLinDMAを含む、本発明1047の核酸-脂質粒子。

[本発明1049]

非カチオン性脂質がコレステロールまたはその誘導体を含む、本発明1045の核酸-脂質

10

20

30

40

50

粒子。

[本発明1050]

コレステロールまたはその誘導体が、粒子中に存在する全脂質の約30モル%～約45モル%を構成する、本発明1049の核酸-脂質粒子。

[本発明1051]

コレステロール誘導体が、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテル、およびコレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテルからなる群より選択されるメンバーである、本発明1049の核酸-脂質粒子。

[本発明1052]

非カチオン性脂質がリン脂質を含む、本発明1045の核酸-脂質粒子。

[本発明1053]

非カチオン性脂質がリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む、本発明1045の核酸-脂質粒子。

[本発明1054]

リン脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、パルミトイルオレイルホスファチジルグリセロール (POPG)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、モノメチルホスファチジルエタノールアミン、ジメチルホスファチジルエタノールアミン、ジエライドイルホスファチジルエタノールアミン (DEPE)、ステアロイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (SOPE)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、本発明1052または1053の核酸-脂質粒子。

[本発明1055]

リン脂質が、粒子中に存在する全脂質の約4モル%～約10モル%を構成し、かつコレステロールが、粒子中に存在する全脂質の約30モル%～約40モル%を構成する、本発明1053の核酸-脂質粒子。

[本発明1056]

コレステロール誘導体が、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテル、およびコレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテルからなる群より選択されるメンバーである、本発明1053の核酸-脂質粒子。

[本発明1057]

リン脂質がDPPCを含む、本発明1054の核酸-脂質粒子。

[本発明1058]

粒子の凝集を阻害する複合脂質が、ポリエチレングリコール (PEG) -脂質コンジュゲート、ポリアミド (ATTA) -脂質コンジュゲート、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、本発明1045の核酸-脂質粒子。

[本発明1059]

PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-ジアシルグリセロール、PEGジアルキルオキシプロピル、PEG-リン脂質、PEG-セラミド、PEG-コレステロール、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである、本発明1058の核酸-脂質粒子。

[本発明1060]

粒子の凝集を阻害する複合脂質が、ポリエチレングリコール (PEG) -ジアルキルオキシプロピル (PEG-DAA) コンジュゲートを含む、本発明1058の核酸-脂質粒子。

[本発明1061]

siRNA分子が核酸-脂質粒子に封入されている、本発明1045の核酸-脂質粒子。

10

20

30

40

50

[本発明1062]

- (a) ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNA分子、
- (b) 粒子中に存在する全脂質の約56.5モル% ~ 約66.5モル%を構成するカチオン性脂質、
- (c) 粒子中に存在する全脂質の約31.5モル% ~ 約42.5モル%を構成する非カチオン性脂質、および
- (d) 粒子中に存在する全脂質の約1モル% ~ 約2モル%を構成し、粒子の凝集を阻害する複合脂質を含む、核酸-脂質粒子。

[本発明1063]

siRNA分子が、表1~7および10~11に示された配列のうちの少なくとも一つを含む、本発明1062の核酸-脂質粒子。

[本発明1064]

カチオン性脂質がDLinDMAを含む、本発明1062の核酸-脂質粒子。

[本発明1065]

非カチオン性脂質がコレステロールを含む、本発明1062の核酸-脂質粒子。

[本発明1066]

粒子の凝集を阻害する複合脂質がPEG-DAAコンジュゲートを含む、本発明1062の核酸-脂質粒子。

[本発明1067]

- (a) ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNA分子、
- (b) 粒子中に存在する全脂質の約52モル% ~ 約62モル%を構成するカチオン性脂質、
- (c) 粒子中に存在する全脂質の約36モル% ~ 約47モル%を構成する非カチオン性脂質、および
- (d) 粒子中に存在する全脂質の約1モル% ~ 約2モル%を構成し、粒子の凝集を阻害する複合脂質を含む、核酸-脂質粒子。

[本発明1068]

siRNA分子が、表1~7および10~11に示された配列のうちの少なくとも一つを含む、本発明1067の核酸-脂質粒子。

[本発明1069]

カチオン性脂質がDLinDMAを含む、本発明1067の核酸-脂質粒子。

[本発明1070]

非カチオン性脂質がDPPCとコレステロールとの混合物を含む、本発明1067の核酸-脂質粒子。

[本発明1071]

DPPCが、粒子中に存在する全脂質の約5モル% ~ 約9モル%を構成し、かつコレステロールが、粒子中に存在する全脂質の約32モル% ~ 約37モル%を構成する、本発明1070の核酸-脂質粒子。

[本発明1072]

粒子の凝集を阻害する複合脂質がPEG-DAAコンジュゲートを含む、本発明1067の核酸-脂質粒子。

[本発明1073]

本発明1045、1062、または1067のいずれかの核酸-脂質粒子と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1074]

細胞を本発明1045、1062、または1067のいずれかの核酸-脂質粒子と接触させる工程を含む、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNAを細胞へ導入するための方法。

[本発明1075]

10

20

30

40

50

細胞が哺乳動物体内にある、本発明1074の方法。

[本発明1076]

本発明1045、1062、または1067のいずれかの核酸-脂質粒子を哺乳動物対象へ投与する工程を含む、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNAのインピボ送達のための方法。

[本発明1077]

投与が、経口、鼻腔内、静脈内、腹腔内、筋肉内、関節内、病巣内、気管内、皮下、および皮内からなる群より選択される、本発明1076の方法。

[本発明1078]

治療的に有効な量の本発明1045、1062、または1067のいずれかの核酸-脂質粒子を哺乳動物対象へ投与する工程を含む、その必要のある哺乳動物対象において癌を処置するための方法。

10

[本発明1079]

癌が肝臓癌である、本発明1078の方法。

[本発明1080]

肝臓癌が肝細胞癌である、本発明1079の方法。

[本発明1081]

細胞を本発明1001の修飾siRNA分子と接触させる工程を含む、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNAを細胞へ導入するための方法。

[本発明1082]

修飾siRNAが担体系の中にある、本発明1081の方法。

20

[本発明1083]

担体系が、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、およびそれらの混合物からなる群より選択される、本発明1082の方法。

[本発明1084]

担体系が、  
修飾siRNA分子、  
カチオン性脂質、  
および非カチオン性脂質  
を含む核酸-脂質粒子である、本発明1082の方法。

30

[本発明1085]

核酸-脂質粒子が、粒子の凝集を防止する複合脂質をさらに含む、本発明1084の方法。

[本発明1086]

細胞が哺乳動物体内にある、本発明1081の方法。

[本発明1087]

本発明1001の修飾siRNA分子を哺乳動物対象へ投与する工程を含む、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNAのインピボ送達のための方法。

[本発明1088]

修飾siRNAが担体系の中にある、本発明1087の方法。

[本発明1089]

担体系が、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、およびそれらの混合物からなる群より選択される、本発明1088の方法。

40

[本発明1090]

担体系が、  
修飾siRNA分子、  
カチオン性脂質、  
および非カチオン性脂質  
を含む核酸-脂質粒子である、本発明1088の方法。

[本発明1091]

核酸-脂質粒子が、粒子の凝集を防止する複合脂質をさらに含む、本発明1090の方法。

50

[本発明1092]

治療的に有効な量の本発明1001の修飾siRNA分子を哺乳動物対象へ投与する工程を含む、その必要のある哺乳動物対象において癌を処置するための方法。

[本発明1093]

癌が肝臓癌である、本発明1092の方法。

[本発明1094]

肝臓癌が肝細胞癌である、本発明1093の方法。

[本発明1095]

(a) 免疫刺激特性を有しかつ約15～約60ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む、PLK-1発現をサイレンシングすることができる未修飾siRNA配列を準備する工程、および

(b) 1個または複数個のヌクレオチドを修飾ヌクレオチドに置換することにより、未修飾siRNA配列を修飾し、それにより、未修飾siRNA配列より低免疫刺激性でありかつPLK-1発現をサイレンシングすることができる修飾siRNA分子を作製する工程

を含む、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングする免疫刺激性siRNAを修飾するための方法。

[本発明1096]

修飾siRNA分子が、2'-O-メチル (2'OMe) ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ (2'F) ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル) (MOE) ヌクレオチド、ロックド核酸 (LNA) ヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択される修飾ヌクレオチドを含む、本発明1095の方法。

[本発明1097]

修飾siRNA分子が2'OMeヌクレオチドを含む、本発明1095の方法。

[本発明1098]

未修飾siRNA配列の二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの約25%未満が、修飾ヌクレオチドに置換される、本発明1095の方法。

[本発明1099]

(c) 修飾siRNA分子を哺乳動物応答細胞と、該応答細胞が検出可能な免疫応答を生ずるのに適した条件の下で、接触させることにより、修飾siRNA分子が低免疫刺激性であることを確認する工程

をさらに含む、本発明1095の方法。

[本発明1100]

(a) PLK-1発現をサイレンシングすることができる未修飾siRNA分子を、哺乳動物応答細胞と、該応答細胞が検出可能な免疫応答を生ずるのに適した条件の下で接触させる工程

、

(b) 応答細胞における検出可能な免疫応答の存在により、未修飾siRNA配列を、免疫刺激性siRNAとして同定する工程、および

(c) 1個または複数個のヌクレオチドを修飾ヌクレオチドに置換することにより、未修飾siRNA配列を修飾し、それにより、未修飾siRNA配列より低免疫刺激性である修飾siRNA分子を作製する工程

を含む、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングする免疫刺激性siRNAを同定し、かつ修飾するための方法。

[本発明1101]

修飾siRNA分子が、2'-O-メチル (2'OMe) ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ (2'F) ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル) (MOE) ヌクレオチド、ロックド核酸 (LNA) ヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択される修飾ヌクレオチドを含む、本発明1100の方法。

[本発明1102]

修飾siRNA分子が2'OMeヌクレオチドを含む、本発明1100の方法。

[本発明1103]

未修飾siRNA配列の二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの約25%未満が、修飾ヌクレオ

10

20

30

40

50

チドに置換される、本発明1100の方法。

[本発明1104]

哺乳動物応答細胞が末梢血単核細胞または樹状細胞である、本発明1100の方法。

[本発明1105]

検出可能な免疫応答が、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\delta$ 、IL-6、IL-12、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインまたは増殖因子の産生を含む、本発明1100の方法。

[本発明1106]

検出可能な免疫応答が、テトラトリコペプチドリピートを含むインターフェロンにより誘導されるタンパク質1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1)) の誘導を含む、本発明1100の方法。

10

[本発明1107]

化学療法薬を投与する前に、細胞を、ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) 発現をサイレンシングするsiRNA分子と接触させる工程を含む、化学療法薬の効果に対して細胞を感作するための方法。

[本発明1108]

細胞が、PLK-1発現をサイレンシングする修飾siRNA分子と接触させられる、本発明1107の方法。

[本発明1109]

前記siRNA分子が担体系の中にある、本発明1107の方法。

20

[本発明1110]

担体系が、前記siRNA分子、カチオン性脂質、および非カチオン性脂質を含む核酸-脂質粒子である、本発明1109の方法。

[本発明1111]

細胞が癌細胞である、本発明1107の方法。

[本発明1112]

癌細胞が哺乳動物体内にある、本発明1111の方法。

30

[本発明1113]

化学療法薬が、パクリタキセル、フルオロウラシル (5-FU)、イリノテカン、ソラフェニブ、およびそれらの混合物からなる群より選択される、本発明1107の方法。

【0053】

本発明のその他の目的、特色、および利点は、以下の詳細な説明および図面より、当業者に明白になるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】HT29細胞およびNeuro2A細胞における選択されたSNALP製剤化PLK-1 siRNA配列のRNAi活性を証明するデータを例示する。

40

【図2】細胞生存性に対するPLK-1 SNALPの強力な効果が、PLK-1 mRNAのサイレンシングによることを証明するデータを例示する。

【図3】HT29細胞およびNeuro2A細胞における付加的なSNALP製剤化PLK-1 siRNA配列のRNAi活性を証明するデータを例示する。

【図4】HT29細胞およびLS174T細胞におけるSNALP製剤化されたPLK1424およびPLK773の活性を証明するデータを例示する。

【図5】SNALP製剤化されたPLK1424およびPLK773が、LS174T細胞においてアポトーシスを誘導することを証明するデータを例示する。

【図6】HT29細胞およびNeuro2A細胞における付加的なSNALP製剤化PLK-1 siRNA配列のRNAi活性を証明するデータを例示する。

50

【図7】PLK1424 siRNA配列における異なる2'OMe修飾パターンがよく耐容され、修飾siRNA分子が強力な活性を保持していたことを証明するデータを例示する。

【図8】2'OMe修飾PLK1424 siRNAが、マウスFLT3L DC培養物において検出可能なIL-6またはIFN- $\gamma$ の応答を誘導しなかったことを証明するデータを例示する。

【図9】PLK773 siRNA配列における異なる2'OMe修飾パターンがよく耐容され、修飾siRNA分子が強力な活性を保持していたことを証明するデータを例示する。

【図10】PLK1425 siRNA配列における異なる2'OMe修飾パターンがよく耐容され、修飾siRNA分子が強力な活性を保持していたことを証明するデータを例示する。

【図11】PLK-1 SNALPおよびパクリタクセル（タキソール）による逐次組み合わせ処理が、Neuro2A細胞およびHepG2細胞の成長の阻害を有意に増強したことを証明するデータを例示する。

10

【図12】PLK-1 SNALPおよびパクリタクセル（タキソール）による逐次組み合わせ処理が、Neuro2A細胞において誘導されるアポトーシスのレベルを有意に増強したことを証明するデータを例示する。

【図13】Hep3B肝臓腫瘍を保持しているマウスにおいて、SNALP製剤化PLK1424の処理計画が、処理に関連した毒性の明白な兆候なしに、よく耐容されることを証明するデータを例示する。

【図14】SNALP製剤化PLK1424による処理が、Hep3B腫瘍保持マウスの生存の有意な増加を引き起こしたことを証明するデータを例示する。

【図15】SNALP製剤化PLK1424による処理が、SNALP投与の24時間後に、マウスにおいて成長中の肝臓内Hep3B腫瘍におけるPLK-1 mRNAレベルを50%低下させたことを証明するデータを例示する。

20

【図16】PLK1424 SNALPにより処理されたマウスにおいて、PLK-1 mRNAの特異的切断産物が5'RACE-PCRにより検出可能であったことを証明するデータを例示する。10 $\mu$ lのPCR産物/ウェルを、1.5%アガロースゲルに負荷した。レーン番号：(1)分子量(MW)マーカー；(2)PBSマウス1；(3)PBSマウス2；(4)PBSマウス3；(5)Luc SNALPマウス1；(6)Luc SNALPマウス2；(7)PLK SNALPマウス1；(8)PLK SNALPマウス2；(9)PLK SNALPマウス3；および(10)鋳型を含まない対照。

【図17】対照(Luc)SNALP処理マウスは、Hep3B腫瘍において正常な有糸分裂を示したが(上パネル)、PLK1424 SNALP処理マウスは、Hep3B腫瘍において多数の異常な有糸分裂および腫瘍細胞アポトーシスを示した(下パネル)ことを証明するデータを例示する。

30

【図18】PEG-cDSAを含有している1:57 PLK-1 SNALPの複数回投与が、確立されたHep3B皮下(S.C.)腫瘍の退行を誘導したことを証明するデータを例示する。

【図19】単回静脈内SNALP投与後のS.C.Hep3B腫瘍における1:57 PLK SNALPのmRNAサイレンシングを証明するデータを例示する。

【図20】PLK1-cDSA SNALPが大きいS.C.Hep3B腫瘍の成長を阻害したことを証明するデータを例示する。

【図21】Hep3B肝臓内腫瘍における腫瘍由来PLK-1 mRNAのサイレンシングを証明するデータを例示する。

【図22】PEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含有している1:57 PLK-1 SNALPの血液クリアランスプロフィールを証明するデータを例示する。

40

【図23】PLK-1 siRNA配列のインビトロ活性スクリーニングを証明するデータを例示する。ヒトPLK-1 mRNAを標的とするネイティブPLK-1 siRNA配列の活性を、HT29細胞生存性アッセイにおいて判定した。細胞を、1nM(白色バー)、5nM(灰色バー)、および25nM(黒色バー)のSNALP製剤化されたPLK-1 siRNAまたはLuc siRNAにより処理した。細胞生存性を、CellTiter Blueレザズリン色素を使用して、72時間後に判定した。2ラウンドのsiRNA設計(A&B、C)を実施した。配列番号は、hPLK-1 mRNAオープンリーディングフレーム(Genbankアクセッション番号NM\_005030)におけるsiRNA標的部位を表す。

【図24】インビトロのPLK-1 siRNAの活性を証明するデータを例示する。(A)PLK1424処理、(B)PLK773処理、または(C)Luc siRNA処理に関する、mRNAサイレンシングとHT2

50

9細胞生存性との間の相関。PLK-1 mRNAは24時間後にbDNA分析により決定された。デュプリケートプレートが72時間後に細胞生存性に関して判定された。(D) PLK1424 siRNAは、LS 174T細胞、HT29細胞、Hep3B細胞、およびHepG2細胞の培養物の生存性の用量依存的な低下を引き起こす。細胞は、5nM (黒色バー)、2.5nM、1.25nM、0.63nM、および0.31nM (白色バー) siRNAのPLK1424 SNALPにより72時間処理された。(A) ~ (D)の値は、PBS対照と比べた生存性またはPLK-1 mRNA (%)として表されており、トリプリケート培養物において実施された三つの別々の実験の平均値 (+/- SD)を反映している。(E)減少した細胞生存性は、アポトーシスの誘導に関連している。SNALPに封入されたPLK773、PLK1424、またはLuc対照siRNAによる処理の24時間後および48時間後に、LS 174T細胞におけるカスパーゼ3/7活性が判定された。データは、トリプリケート培養物におけるPBSに対する誘導の倍率(トリプリケート培養物の平均値 +/- SD)を表している。

【図25】SNALP製剤化siRNAにより誘導されるインターフェロン応答のインビボ特徴決定を証明するデータを例示する。(a) SNALP製剤化ネイティブ(未修飾) ApoB1 siRNAのi.v.投与後の血清IFN および肝臓IFIT1 mRNAの誘導の時間経過。Balb/cマウス(各群n=4)に2.5mg/kgのsiRNAまたは脂質媒体を投与し;4時間後、8時間後、および16時間後に、血清IFN (pg/mL)および完全肝臓溶解物由来のIFIT1 mRNA(GAPDHに対して)を、それぞれELISAおよびbDNAアッセイにより判定した。(b、c)標的組織におけるIFIT1 mRNA誘導の測定は、siRNAの残余の免疫刺激活性を解明することができる。マウスを、ネイティブApoB-1 siRNA、またはセンス(S)鎖もしくは両方の鎖(S+AS)のいずれかに選択的な2'OMeヌクレオチドを含有しているApoB-1 siRNAにより処理した。(b)血清IFN および(c)肝臓IFIT1 mRNAを、投与の4時間後に判定した(平均値+SD、n=4)。ApoB-1 2'OMe(S)処理マウスにおいては、IFIT1 mRNA誘導により、全身性サイトカイン誘導の非存在下での残余の免疫刺激活性が認められた。この応答は、siRNA二重鎖のAS鎖への付加的な2'OMeヌクレオチドの組み込みによって完全に抑止された。全てのsiRNAが、完全なRNAi活性を保持していた。

【図26】2'OMe修飾されたPLK-1 siRNAおよびKSP siRNAの、未修飾siRNAと比較したインビボ活性を証明するデータを例示する。(A) PLK1424 siRNAおよび(B) PLK773 siRNAの2'OMe修飾パネルの活性。未修飾のPLK1424 siRNAまたはPLK773 siRNA(黒)を、Hep3B細胞生存性アッセイにおいて、それぞれの2'OMeセンス/アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む2'OMe修飾二重鎖1/A、2/A、1/B、2/B、1/C、または2/C(表6参照)と比較した。データは、PBS処理細胞と比べたトリプリケート培養物の平均生存性であり、SNALP製剤化siRNAを使用した二つの独立の実験を表している。(C)インビボの未修飾PLK-1 siRNAおよび2'OMe PLK-1 siRNAによるサイトカイン誘導。マウスFit3L DCを、SNALPへ製剤化された5µg/mLの未修飾のPLK773もしくはPLK1424 siRNA二重鎖(773、1424)およびそれらを構成するセンス(S)もしくはアンチセンス(AS)オリゴヌクレオチド、または2'OMe siRNA二重鎖PLK773-1/BおよびPLK1424-2/Aにより処理した。24時間後、培養上清中のIFN およびIL-6をアッセイした。値は、トリプリケート培養物において実施された三つの別々の実験の平均値+SDである。(D、E)マウスNeuro2a細胞におけるSNALP製剤化KSP2263 siRNAの活性。(D)PBS対照に対して相対的なKSP mRNAサイレンシングと細胞生存性との間の相関。KSP mRNAは、24時間後にbDNA分析により決定された。デュプリケートプレートが72時間後に、細胞生存性に関して判定された。(E)Neuro2a細胞生存性アッセイにおいて、未修飾KSP2263 siRNAを、2'OMe修飾二重鎖(表6参照)のパネルと比較した活性スクリーニング。データは、PBS処理と比べたトリプリケート培養物の平均値 +/- SDを表す。

【図27】インビボの5'RACE-PCRによるPLK1424およびKSP2263に特異的なmRNA切断産物の検出を証明するデータを例示する。(A)HT29細胞を、10nMのSNALP製剤化されたPLK1424、Luc siRNA、またはPBSにより処理した。トランスフェクションの24時間後にRNAを単離し、5'-RACE-PCRにより、特異的なPLK-1 mRNA切断産物に関してアッセイした。(B)Neuro2a細胞を、SNALP製剤化されたKSP2263 siRNA、PLK773 siRNA、またはPBSにより処理した。トランスフェクションの24時間後にRNAを単離し、5'-RACE-PCRにより、特異的なマウスKSP mRNA切断産物に関してアッセイした。RNAi特異的な476bpのPLK-1 mRNA切断産物およ

10

20

30

40

50

び102bpのKSP mRNA切断産物の同一性は、直接オリゴヌクレオチド配列決定により確認された。

【図28】2'OMe修飾されたPLK-1 siRNA、KSP siRNA、またはLuc siRNAが、マウスにおいて測定可能なIFN応答を誘導しないことを証明するデータを例示する。SNALP製剤化されたLuc(未修飾) siRNA、および2'OMe修飾されたLuc-U/U siRNA、PLK1424-2/A siRNA、PLK773-1/B siRNA、またはKSP2263-U/U siRNAを、Balb/Cマウスへ2mg/kgでi.v.投与した。(A)4時間後に、bDNA分析により、肝臓および脾臓におけるIFIT1 mRNAをGAPDH mRNAと比べて判定した。(B)6時間後に、血清IFNをELISAにより判定した。SNALP製剤化2'OMe siRNAは、PBS媒体と比べて、IFNタンパク質またはIFIT1 mRNAの検出可能な増加を誘導しなかった。値は平均値+SD(n=4)を表す。

10

【図29】肝臓腫瘍におけるPLK-1 siRNAおよびKSP siRNAの治療活性を証明するデータを例示する。PLK1424-2/A処理は、肝臓Hep3B腫瘍を保持しているスキッド(scid)/ベージュ(beige)マウスにおいて有意な生存有利を付与する。マウスに、週2回(10日目~28日目)、6×2mg/kgで、SNALP製剤化されたPLK1424-2/A(n=15)またはLuc-U/U(n=8)を静脈内投与した。(A)10日目の初期体重に対する%として表された投薬期間中の体重(平均値+SD)。(B)腫瘍負荷による安楽死までの日数の Kaplan-Meierプロット。PLK1424-2/A処理は、対照処理と比べて有意な生存有利を提供した(p=0.03、ログランクマンテルコックス検定)。(C)PLK1424-2/A siRNA(8日目、11日目、14日目、18日目、および21日目に5×2mg/kg siRNA)の最終投与の24時間後のマウスにおける残余肝臓Hep3B腫瘍負荷。バーは、ヒト特異的bDNAアッセイにより決定された個々のマウスの肝臓1mg当たりのhGAPDH mRNA(トリプリケート分析の平均値+/-SD)を表す(腫瘍なし=腫瘍未接種マウスに由来する肝臓)。付加的なデータに関しては、図32を参照すること。(D)KSP2263-U/U処理は、肝臓Neuro2a腫瘍を保持しているA/Jマウスにおいて生存有利を付与する。マウスに、5×4mg/kgで、SNALP製剤化されたKSP2263-U/UまたはLuc-U/U(n=8)を静脈内投与した(腫瘍接種後8日目~21日目、3日毎×5)。腫瘍負荷および終点による安楽死までの日数の Kaplan-Meierプロットは、生存に関する人道的サロゲートとしての臨床的スコアに基づく。PLK1424製剤およびLuc製剤に関して、平均SNALP粒子サイズおよび(多分散)は、それぞれ、83(0.09)nmおよび90(0.12)nmであった。

20

【図30】PLK1424 SNALPが肝臓Hep3B-nu/nuマウスモデルにおいて有意な生存有利を付与することを証明するデータを例示する。確立された肝臓腫瘍を保持しているマウスを、PLK1424-2/A SNALPまたはLuc-U/U SNALP(腫瘍接種後11日目~28日目、週2回、2mg/kg)により処理し、人道的終点により定義された安楽死まで腫瘍負荷に関してモニタリングした。データは二つの独立の研究を表す。PLK1424対Lucの生存中央値は、研究(A)においては45日目および67日目にそれぞれp=0.02、研究(B)においては42日目および不確定日にそれぞれp=0.008であった(ログランクマンテルコックス検定)。80日目を越えて生存した動物は、全て、100日目の研究終了時に、腫瘍なしであることが見出された。

30

【図31】PLK1424-2/A SNALPが、投薬完了後に巨視的な腫瘍負荷を有意に低下させることを証明するデータを例示する。結果は、図37Cに記載された個々のマウスに由来するものである。肝左葉外側区域に巨視的な腫瘍負荷を示す(A)PBS対照および(B)PLK1424-2/A SNALPにより処理されたマウスに由来する肝臓。(C)腫瘍接種後8日目~21日目の研究期間中の(A)および(B)に示された個々のマウスの体重。個々のマウスにおいて、体重減少は、腫瘍負荷と直接関連した。

40

【図32】PLK-1 SNALPがマウスにおいてよく耐容されることを証明するデータを例示する。PLK-1サイレンシングまたは脂質媒体のいずれかに関連した可能性のある累積毒性を判定するため、CD1 ICRマウスの群に、PBS、PLK773-1/B SNALP、またはLuc-U/U SNALPを投与した。腫瘍研究における有効な投薬計画と等価な2mg/kg siRNAで、週2回、マウスを処理した。臨床化学および全血球数を、5回目(15日目)および9回目(29日目)の24時間後に評価した。siRNA処理は、15日処理期間でも29日処理期間でも、(A)血清肝酵素アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、またはソルビトールデヒドロゲナーゼ(SDH);(B)全wbc数、リンパ球数、または

50

好中球数、および(C)血小板数の有意な変化を誘導しなかった。全ての値が平均値 $\pm$ SD (n=6)である。赤血球パラメーターの変化は観察されなかった。

【図33】RNAi機序による肝臓腫瘍における標的mRNAサイレンシングを証明するデータを例示する。SNALP製剤化siRNA投与後の腫瘍における(A、B)標的mRNAサイレンシングおよび(C、D)RNAi特異的なmRNA切断産物の検出。確立された肝臓内Hep3B腫瘍を有するスキッド/ベージュマウスに、2mg/kg用量のSNALP製剤化されたPLK1424-2/A siRNAまたはLuc-U/U siRNAを単回投与し、RNAi活性を(A)腫瘍溶解物中のPLK-1 mRNAおよび(C)5'RACE-PCR分析により判定した。(A)siRNA投与の24時間後の腫瘍(ヒト)PLK-1:GAPDH mRNA比(4匹の動物の平均値 $\pm$ SD)。(C)RACE-PCRは、(A)において分析された腫瘍に由来するPLK-1 mRNAの特異的な5'切断産物を検出する。レーンは、個々のPBS (n=2)、Luc-U/U (n=2)、およびPLK1424-2/A (n=3)により処理されたマウスに由来するPCR産物を表す。SNALP製剤化KSP2263-U/U siRNAにより処理されたマウスから切除された肝臓Neuro2a腫瘍の(B)マウスKSP mRNAおよび(D)5'RACE-PCR分析。データは(A)および(C)と同様に表されている。+ = KSP2263-U/U siRNAにより処理されたインビトロNeuro2a細胞溶解物に由来する陽性対照；- = 鋳型を含まない対照。RACE-PCRは、腫瘍に由来するマウスKSP mRNAの特異的な5'切断産物を検出する。予測された476bpのPLK-1 PCR産物および102bpのKSP PCR産物(矢印)の同一性は、直接DNA配列決定により確認された。PLK1424、Luc、およびKSP2263の製剤に関して、平均SNALP粒子サイズおよび(多分散)は、それぞれ、83 (0.09) nm、90 (0.12) nm、および88 (0.07) nmであった。

【図34】肝臓腫瘍内のRNAi活性の継続時間を証明するデータを例示する。(A)SNALP製剤化PLK1424-2/A siRNA (2mg/kg)の単回静脈内投与の24時間後、48時間後、96時間後、7日後、および10日後のHep3B肝臓腫瘍の5'-RACE-PCR分析。PLK1424特異的RACE-PCR産物(矢印)の特異性は、1日目および7日目に配列決定により確認された。(B)(A)において分析された単離された腫瘍RNAにおける対応するPLK-1 mRNAのレベル。RNAiの継続時間は、Luc-U/U SNALP処理マウスと比較されたmRNAサイレンシングの継続時間と相関した。データは、平均hPLK-1:hGAPDH mRNA比 $\pm$ SD (各時点n=3)を表す。PLK1424およびLucに関して、平均SNALP粒子サイズおよび(多分散)は、それぞれ、83 (0.09) nmおよび90 (0.12) nmであった。

【図35】KSP2263 siRNAによる単星状体紡錘体形成の誘導を証明するデータを例示する。HeLa細胞を、20nMの(A)Luc siRNAまたは(B)KSP2263 siRNAにより16時間処理し、次いで、 $\alpha$ -チューブリン(FITC)に関して免疫染色した。DNAをDAPIで染色し、蛍光画像を捕獲し、重ね合わせた。対照細胞は、KSP2263処理細胞における単星状体紡錘体と比較して、中期での正常な双極紡錘体を示す。

【図36】KSP2263-U/Uが肝臓腫瘍細胞におけるKSP阻害に典型的な明瞭な表現型変化を誘導することを証明するデータを例示する。SNALPへ製剤化された(A)Luc-U/U siRNAまたは(B)KSP2263-U/U siRNA (2mg/kg siRNA)の単回静脈内投与の24時間後の肝臓Neuro2a腫瘍組織学。画像は、200倍の拡大率であり、少なくとも6匹の個々のマウスに由来する腫瘍を代表している。ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色は、KSP2263-U/U処理マウスにおいて、単星状体紡錘体に典型的な異常な核形またはアポトーシス表現型を有する腫瘍細胞を明らかにしている。(C)4mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、または0.5mg/kg siRNAのSNALP製剤化KSP2263-U/Uにより処理されたマウスに由来するH&E染色腫瘍組織の定量的組織学。凝縮クロマチン構造を有する腫瘍細胞を陽性と判定し、10個の視野より得られた全腫瘍細胞に対する%として計算した。陽性細胞は、異常な有糸分裂および典型的な有糸分裂ならびにアポトーシスの形状を含んでいた。値は3匹のマウスの平均値 $\pm$ SDである。KSP2263およびLucに関して、平均SNALP粒子サイズおよび(多分散)は、それぞれ、88 (0.07) nmおよび82 (0.08) nmであった。

【図37】PLK1424-2Aが、肝臓腫瘍細胞において、PLK-1阻害に典型的な明瞭な表現型変化を誘導することを証明するデータを例示する。2mg/kgのSNALP製剤化された(A、C)Luc-U/U siRNAまたは(B、D)PLK1424-2/A siRNAの単回静脈内投与の24時間後のH&E腫瘍組織学。(A、B)200倍および(C、D)400倍の拡大率での画像は、少なくとも7匹の個々の

10

20

30

40

50

マウスに由来する腫瘍の代表である。PLK1424およびLucに関して、平均SNALP粒子サイズおよび（多分散）は、それぞれ、72（0.04）nmおよび72（0.02）nmであった。

【図38】肝臓腫瘍モデルにおけるPEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含むPLK1424 SNALPの比較を証明するデータを例示する。（A）マウスにおけるIV投与後のPEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含む<sup>3</sup>H標識SNALPの血液クリアランス（Judge et al., Mol. Ther., 13:328-337(2006)による）。データは、注射の0.25時間後、0.5時間後、1時間後、2時間後、4時間後、および8時間後に全血中に残存している注射用量に対する平均%（+/- SD、n = 4）として表されている。（B）いずれかのPLK1424-2/A SNALP製剤の単回2mg/kg投与の24時間後の肝臓Hep3B腫瘍におけるPLK-1 mRNAサイレンシング（平均PLK1:GAPDH比+/- SD、n = 4マウス）。（C）PEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含むPLK1424-2/A SNALPによる処理は、肝臓内Hep3B腫瘍を保持しているスキッド/ページュマウスにおいて有意な生存有利を付与する。接種後10日目～28日目、週2回（6回）、2mg/kgで、PEG cDMAもしくはPEG-cDSAを含むPLK1424-2/A SNALP、またはLuc-U/U SNALP（PEG-cDMA）をマウスに投与した。腫瘍負荷による安楽死までの時間を、生存に対する人道的サロゲートとして臨床的スコアに基づき判定した。両方のPLK1424-2/A SNALP組成物が、対照と比べて有意な生存利点を提供した（p < 0.05、ログランクマンテルコックス検定）。

【図39】皮下腫瘍におけるC14 PEG-脂質またはC18 PEG-脂質のいずれかを含むPLK-1 SNALPの治療活性を証明するデータを例示する。（A）代替的なPLK1424-2/A SNALP製剤による皮下腫瘍成長の阻害。Hep3B腫瘍接種後10日目～21日目に、PEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含むPLK1424-2/A SNALPを、マウスに投与した（6 × 2mg/kg、静脈内）。値は平均腫瘍体積（mm<sup>3</sup>）+/- SD（n = 5）である。対照 = Luc-U/U siRNA SNALP（PEG-cDMA）。（B）PLK1424-2/A siRNAまたはLuc-U/U siRNAの単回投与（2mg/kg）後の皮下Hep3B腫瘍における対応するhPLK-1:hGAPDH mRNA比；平均値 + SD（n = 4）。（C）Hep3B腫瘍におけるPLK1424-2/A PEG-cDSA SNALPの用量応答。接種後18日目～29日目の間、確立された（およそ100mm<sup>3</sup>）腫瘍を保持しているマウスに、2～3日毎に、PLK1424-2/A PEG-cDSA SNALP（6 × 3mg/kg、1mg/kg、もしくは0.5mg/kg）、Luc PEG-cDSA SNALP（6 × 3mg/kg）、またはPBS媒体を投与した。値は平均腫瘍体積（mm<sup>3</sup>）（n = 5）を表す。PLK1424 PEG-cDMA、PLK1424 PEG-cDSA、Luc PEG-cDMA、およびLuc PEG-cDSAに関して、平均SNALP粒子サイズおよび（多分散）は、それぞれ、81（0.10）nm、71（0.03）nm、82（0.12）nm、および74（0.05）nmであった。

【図40】PLK1424 siRNA配列における異なる化学的修飾パターンがよく耐容され、修飾siRNA分子が、ヒト腫瘍細胞を死滅させる強力な活性を保持していたことを証明するデータを例示する。

【図41】修飾PLK1424 siRNAが、陰性対照より大きいIFN- 応答を誘導しなかったことを証明するデータを例示する。

【図42】PLK1424 1/3 siRNA、PLK1424 2/3 siRNA、PLK1424 2/4 siRNA、およびPLK1424 2/6 siRNAにより、空SNALPのものを超える有意なIFIT1誘導が存在しなかったことを証明するデータを例示する。

【図43】Hep3B腫瘍において試験された全てのPLK1424 siRNAがインビボで等価なレベルのPLK-1 mRNAサイレンシングを生じたことを証明するデータを例示する。

【発明を実施するための形態】

【0055】

発明の詳細な説明

1. 序論

肝細胞癌（HCC）は、世界で5番めに多い固形腫瘍であり、4番目に多い癌による死因であり、毎年およそ400,000人の死亡の原因となっている（Thomas et al., J. Clin. Oncol., 23:2892-2899(2005)）。HCCのためのいくつかの代替的な処置オプションが存在するが、現在、HCCのために有効な化学療法計画は存在せず、予後は極めて乏しいままである。外科的切除または完全肝臓移植が、根治の可能性のある唯一の治療と見なされている；しかしながら、HCC患者の70～85%は、進行した腫瘍を呈し、しばしば、侵襲的な手術が禁忌で

10

20

30

40

50

ある基礎肝疾患を患っている (Llovet et al., J.Natl.Cancer Inst., 100:698-711(2008) )。最近、多重キナーゼ阻害剤ソラフェニブが、進行した疾患を有する患者の生存時間の改善 (プラセボの7.9ヶ月に対して10.7ヶ月) を示す第III相データ (Llovet et al., J.Hepatol., 48 Suppl 1:S20-37(2008) ) に基づき、切除不能HCCの処置のため承認された。他の処置オプションが利用可能でないため、ソラフェニブは、この患者集団のためのケアの標準の一部になるであろう。肝臓は腫瘍転移性疾患の好発部位でもあり ; 例えば、結腸直腸癌患者のおよそ50%が、患者の死亡率の有意な増加をもたらす、肝臓への転移を発症する (Steele et al., Annals Surgery, 210:127-138(1989) )。全身投与された従来の化学療法薬およびターゲティングされた化学療法薬による組み合わせ治療は、これらの患者の生存時間を改善する ; しかしながら、転移性結腸癌の非外科的治療は未だ困難である。HCC および肝臓への転移性疾患は、より有効な処置オプションのための新規治療剤の開発を必要とする、重大な未解決の医学的必要性を表すことが、明らかである。

10

## 【 0 0 5 6 】

低分子干渉RNAは、RNAiという内因性の細胞過程を通して遺伝子発現を抑制するために設計された強力な標的的特異的分子である (Elbashir et al., Nature, 411:494-498(2001) )。この基本の遺伝子サイレンシング機序の特徴決定以来、広域の疾患のための可能性のある新規の治療剤のクラスとして、siRNAの開発は大きく進展した。しかしながら、siRNA治療薬の可能性の現実化に対する第一の障害は、siRNAの疾患部位へのターゲティングおよび細胞内送達を容易にする薬物送達媒体の必要性である (Zimmermann et al., Nature, 441:111-114(2006) ; de Fougerolles et al., Nat.Rev.Drug Discov., 6:443-453(2007) ; Behl 20 ke, Mol.Ther., 13:644-670(2006) )。いくつかのグループは、siRNAの薬理学的特性を改善するために代替ヌクレオチド化学の使用を調査し (Soutschek et al., Nature, 432:173-178(2004) ; Hall et al., Nucleic Acids Res., 32:5991-6000(2004) ; Morrissey et al., Hepatology, 41:1349-1356(2005) )、他のグループは、ポリエチレンイミン (Urban-Klein et al., Gene Ther., 12:461-466(2005) ; Schifflers et al., Nucleic Acids Res., 32:e149(2004) ) およびシクロデキストリンポリマー (Heidel et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 104:5715-5721(2007) ) のようなポリカチオンとの複合体化により、または脂質に基づく担体への封入により (Zimmermann et al. (前記) ; Morrissey et al., Nat.Biotechnol., 23:1002-1007(2005) ; Judge et al., Mol.Ther., 13:494-505(2006) )、インビボsiRNA送達を改善した。特に興味深いのは、適当なサイズの電荷中性担体が、腫瘍のような臨床的な関心対象の部位において観察される有窓上皮を通過することができる、受動ターゲティングとも呼ばれる、「浸透および保持の増強 (enhanced permeation and retention) 」効果 (Mayer et al., Cancer Letters, 53:183-190(1990) ; Seymour, Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst., 9:135-187(1992) ) を利用することを目標とした戦略である。この効果を利用し、標的部位における有意な濃縮を達成するためには、担体は、小さく (100nm程度の直径) 、長く循環血中に存在し、それにより、「初回通過」器官、肺、肝臓の毛細管床、および細網内皮系の食細胞を迂回することができなければならない。腫瘍標的部位におけるsiRNAの蓄積を濃縮するそのような系の利点は、ターゲティングされていない低分子薬物に比べて付加的な選択性を有する分子的治療薬を開発する可能性を提示する。

20

30

## 【 0 0 5 7 】

siRNAの多くの腫瘍学標的が文献に記載されているが、インビボの報告された治療効果がRNAiによって媒介されたものであるという直接の証拠は、顕著に欠けている。標的は、一般に以下の三つの広いカテゴリーへ分類される : ( i ) 細胞周期または細胞分裂に関与しており、ダウンレギュレートされた時、直接、細胞障害性であるもの ; ( ii ) 増殖因子、それらの受容体、または血管形成因子のような、腫瘍細胞成長、腫瘍の進行または転移を支持するもの ; および ( iii ) 抗アポトーシスタンパク質、薬物耐性遺伝子、およびDNA修復酵素のような従来の治療アプローチに対する腫瘍の感受性を増加させるもの。本発明は、必須の細胞周期タンパク質ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) の発現を標的とすることに関する。

40

## 【 0 0 5 8 】

50

細胞周期の進行は、サイクリン依存性キナーゼファミリーおよびポロ様キナーゼファミリーのもののようなキナーゼによって制御される。ポロ様キナーゼは、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において最初に同定された、独特のホスホペプチド結合ポロボックスドメインを特徴とするセリン/トレオニンキナーゼであるポロにちなんで命名された (Barr et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5:429-440(2004))。四つの哺乳動物PLKファミリーメンバー、PLK-1、PLK-2 (Snkとしても公知)、PLK-3 (PrkまたはFnkとしても公知)、およびPLK-4 (Sakとしても公知) が、特徴決定されており、細胞周期の調節において非重複性の役割を有することが示されている (Barr et al. (前記))。全てが、予測される核移行シグナル (Taniguchi et al., *J. Biol. Chem.*, 277:48884-48888(2002)) を有しており、細胞周期の様々な段階に關与する核基質に対して協調して作用すると考えられている。哺乳動物細胞において、PLK-1は、Cdc25Cホスファターゼ、サイクリンB、有糸分裂紡錘体のコヒーシサブユニット、後期促進複合体のサブユニット、哺乳動物キネシン様タンパク質1 MKLP-1、およびその他のキネシン関連タンパク質をリン酸化するよう作用する。この多様な基質の列挙は、有糸分裂および細胞質分裂におけるPLK-1の多数の役割を例示している (Barr et al. (前記))。多くのヒト腫瘍型において観察されるPLK-1の過剰発現は、患者の予後の負の予知因子であり (Strebhardt et al., *Nat. Rev. Cancer*, 6:321-330(2006))、PLK-1活性の阻害は、有糸分裂停止および腫瘍細胞アポトーシスを急速に誘導する (Stegmaier et al., *Curr. Biol.*, 17:316-322(2007); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:5789-5794(2003))。PLK-1の枯渇は、低分子薬物のアポトーシス促進活性に対して癌細胞を感作するようにも作用する (Spankuch et al., *Oncogene*, 26:5793-5807(2007))。これは、DNA傷害および紡錘体組み立てチェックポイントにおける機能的な役割による可能性が高い。これらの特色の組み合わせのため、PLK-1は、腫瘍学における治療的介入の興味深い標的である。

【0059】

そのため、siRNAによるPLK-1のような癌関連遺伝子のターゲティングされたサイレンシングは、新規の治療戦略として非常に有望である。しかしながら、未修飾PLK-1 siRNA配列は、免疫刺激性であることがあり、例えば、自然免疫細胞からの強力な炎症応答を刺激することがあり、特に、細胞内取り込みを容易にする送達媒体と会合している場合、そうである。これは、炎症応答に關連した毒性および標的以外の遺伝子に対する作用のため、PLK-1 siRNA分子の治療的開発にとって大きな障害となっている。本発明は、siRNAの一方の鎖または両方の鎖への2'-O-メチル (2'OMe) ウリジンヌクレオチドおよび/またはグアノシンヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドの選択的な組み込みを使用して、PLK-1 siRNAに対する免疫応答を低下させるかまたは完全に抑止することにより、これらの限界を克服する。特に、siRNA二重鎖の二本鎖領域内への最小かつ選択的な2'OMe修飾の導入によって、PLK-1 siRNA配列の免疫刺激特性およびPLK-1発現をサイレンシングする能力を、釣り合わせるかまたは最適化することができる。これは、未修飾siRNAの使用に關連したサイトカイン誘導、毒性、および標的以外に対する効果なしに、治療的に実行可能なsiRNA用量で達成され得る。

【0060】

従って、本発明は、PLK-1発現をサイレンシングする化学的に修飾されたsiRNA分子およびその使用法を提供する。本発明は、本明細書に記載された修飾siRNA分子、カチオン性脂質、および非カチオン性脂質を含み、粒子の凝集を阻害する複合脂質をさらに含んでもよい、核酸-脂質粒子 (例えば、SNALP) も提供する。本発明は、本明細書に記載された修飾siRNA分子を哺乳動物対象へ投与することにより、PLK-1遺伝子発現をサイレンシングする方法をさらに提供する。ある種の態様において、本発明は、HCCのような肝臓癌および肝臓転移性疾患の処置のための、ヒトPLK-1を標的とするsiRNA治療薬を提供する。本発明は、免疫刺激特性を有するPLK-1 siRNAを同定しかつ/または修飾する方法をさらに提供する。逐次、PLK-1 siRNAを送達し、その後、化学療法薬を送達することを含む、化学療法薬の効果に対して癌細胞のような細胞を感作する方法も、提供される。

【0061】

10

20

30

40

50

従って、本発明は、合理的に設計されたsiRNAが、安全かつ効率的な全身送達媒体を使用して送達された時、意図されない免疫刺激の非存在下で、確認されたRNAiの機序を通して、治療的なPLK-1遺伝子サイレンシングに影響を及ぼすことができることを証明する。

【0062】

### II. 定義

本明細書において使用されるように、以下の用語は、他に特記されない限り、それらに与えられている意味を有する。

【0063】

「ポロ様キナーゼ1」、「PLK-1」、「ポロ様キナーゼ」、または「PLK」という用語は、2個の機能ドメイン：(1) キナーゼドメイン；および(2) ポロボックスドメインを含有しているセリン/トレオニンキナーゼをさす（例えば、Barr et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:429-440(2004)参照）。PLK-1の活性および細胞濃度は、細胞分裂の正確な調節のために重要である。PLK-1の発現および活性は、細胞周期のG0期、G1期、およびS期を通じて低いが、G2期に上昇し始め、M期にピークに達する。PLK-1は、有糸分裂および細胞分裂にとって必須であり、以下の過程に寄与する：中心体成熟、ならびにCdc25CおよびサイクリンB1のリン酸化による成熟促進因子の活性化；双極紡錘体形成；ならびにDNA傷害チェックポイント順応（DNA傷害は、G2および有糸分裂においてPLK-1を阻害する）。PLK-1は、有糸分裂の中止および細胞質分裂のための後期促進複合体の成分の活性化にも関与している。PLK-1は、肝細胞腫および結腸癌を含む多くの癌型において過剰発現されており、PLK-1発現は、しばしば、乏しい患者の予後と相関する。PLK-1（野生型またはキナーゼ不活型）の過剰発現は、多重核生成（遺伝的不安定性）をもたらす。機能亢進性のPLK-1は、DNA傷害チェックポイントを無視する。構成性のPLK-1発現は、NIH 3T3細胞の形質転換を引き起こす。PLK-1は、p53腫瘍抑制因子をリン酸化し、それにより、p53のアポトーシス促進効果を阻害する。ヒトPLK-1 mRNA配列は、Genbankアクセッション番号NM\_005030、X73458、BC014846、BC003002、HSU01038、およびL19559に示されている。マウスPLK-1 mRNA配列は、Genbankアクセッション番号NM\_011121に示されている。PLK-1は、セリン/トレオニンプロテインキナーゼ13（STPK13）としても公知である。

【0064】

「干渉RNA」または「RNAi」または「干渉RNA配列」という用語は、干渉RNAが標的遺伝子と同一の細胞内にある場合に、（即ち、干渉RNAの配列に相補的なmRNAの分解を媒介するかまたは翻訳を阻害することにより）標的遺伝子の発現を低下させるかまたは阻害することができる一本鎖RNA（例えば、成熟miRNA）または二本鎖RNA（即ち、siRNA、aiRNA、またはpre-miRNAのような二重鎖RNA）をさす。従って、干渉RNAとは、mRNA配列に相補的な一本鎖RNA、または2本の相補鎖もしくは単一の自己相補的な鎖により形成された二本鎖RNAをさす。干渉RNAは、標的遺伝子との実質的なもしくは完全な同一性を有していてもよいし、またはミスマッチ領域（即ち、ミスマッチモチーフ）を含んでいてもよい。干渉RNAの配列は、全長標的遺伝子に対応していてもよいし、またはその部分配列に対応していてもよい。

【0065】

干渉RNAには、「低分子干渉RNA」または「siRNA」、例えば、約15~60、15~50、または15~40（二重鎖）ヌクレオチド長、より典型的には、約15~30、15~25、または19~25（二重鎖）ヌクレオチド長の干渉RNAが含まれ、好ましくは、約20~24、21~22、または21~23（二重鎖）ヌクレオチド長である（例えば、二本鎖siRNAの各相補配列は、15~60、15~50、15~40、15~30、15~25、または19~25ヌクレオチド長、好ましくは、約20~24、21~22、または21~23ヌクレオチド長であり、二本鎖siRNAは、約15~60、15~50、15~40、15~30、15~25、または19~25塩基対長、好ましくは、約18~22、19~20、または19~21塩基対長である）。siRNA二重鎖は、約1~約4ヌクレオチド、または約2~約3ヌクレオチドの3'突出、および5'リン酸末端を含んでいてもよい。siRNAの例には、非限定的に、一方の鎖がセンス鎖であり、他方が相補的なアンチセンス鎖である、2本の別々の分子より組み立てられた二本鎖ポリヌクレオチド分子；センス領域およびアンチセンス領域

が、核酸に基づくリンカーまたは核酸に基づかないリンカーによって連結された、一本鎖分子から組み立てられた二本鎖ポリヌクレオチド分子；自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造を有する二本鎖ポリヌクレオチド分子；ならびに、インビボまたはインビトロでプロセシングされ、活性二本鎖siRNA分子を作製することができる、二つ以上のループ構造ならびに自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有するステムを含む環状一本鎖ポリヌクレオチド分子が含まれる。

【0066】

好ましくは、siRNAは化学合成される。siRNAは、大腸菌RNase IIIまたはダイサーにより、より長いdsRNA（例えば、約25ヌクレオチド長より大きなdsRNA）の切断によって作製されてもよい。これらの酵素は、dsRNAを生物学的に活性のsiRNAへとプロセシングする（例えば、Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9942-9947(2002) ; Calegari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:14236(2002) ; Byrom et al., Ambion TechNotes, 10(1):4-6(2003) ; Kawasaki et al., Nucleic Acids Res., 31:981-987(2003) ; Knight et al., Science, 293:2269-2271(2001) ; およびRobertson et al., J. Biol. Chem., 243:82(1968)参照）。好ましくは、dsRNAは、少なくとも50ヌクレオチド～約100、200、300、400、または500ヌクレオチド長である。dsRNAは、1000、1500、2000、5000ヌクレオチド長、またはそれ以上であってもよい。dsRNAは、遺伝子転写物全体をコードしてもよいし、または部分的な遺伝子転写物をコードしてもよい。ある種の例において、siRNAはプラスミドによってコードされてもよい（例えば、ヘアピンループを有する二重鎖へと自動的に折り畳まれる配列として転写されてもよい）。

【0067】

本明細書において使用されるように、「ミスマッチモチーフ」または「ミスマッチ領域」という用語は、その標的配列に対して100%の相補性を有していない、干渉RNA（例えば、siRNA、aiRNA、miRNA）配列の部分さをす。干渉RNAは、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、またはそれ以上のミスマッチ領域を有していてもよい。ミスマッチ領域は、連続していてもよいし、または1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、もしくはよりそれ以上のヌクレオチドによって分離されていてもよい。ミスマッチモチーフまたはミスマッチ領域は、単一のヌクレオチドを含んでいてもよいし、または2個、3個、4個、5個、またはそれ以上のヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0068】

干渉RNAの「有効量」または「治療的に有効な量」とは、所望の効果、例えば、干渉RNAの非存在下で検出される正常発現レベルと比較した標的配列の発現の障害を生ずるために十分な量である。干渉RNAにより得られた値が、対照と比べて、約90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、または0%である場合、標的遺伝子または標的配列の発現の障害が達成されている。標的遺伝子または標的配列の発現を測定するための適当なアッセイには、例えば、ドットプロット、ノーザンプロット、インサイチュウハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能のような当業者に公知の技術を使用したタンパク質またはmRNAのレベルの調査のみならず、当業者に公知の表現型アッセイも含まれる。

【0069】

干渉RNAによる免疫応答を「減少させる」、「減少させること」、「低下させる」、または「低下させること」とは、所定の干渉RNA（例えば、修飾干渉RNA）に対する免疫応答の検出可能な減少を意味するものとする。修飾干渉RNAによる免疫応答の減少の量は、未修飾干渉RNAの存在下での免疫応答のレベルと比べて決定され得る。検出可能な減少とは、未修飾干渉RNAの存在下で検出される免疫応答より約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれ以上、低いものであり得る。干渉RNAに対する免疫応答の減少は、典型的には、インビトロの応答細胞によるサイトカイン産生（例えば、IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6、もしくはIL-12）の減少、または干渉RNAの投与後の哺乳動物対象の血清中のサイトカイン産生の減少により測定される。

## 【0070】

本明細書において使用されるように、「応答細胞」という用語は、未修飾siRNAのような免疫刺激性の干渉RNAと接触した時に、検出可能な免疫応答を生ずる細胞、好ましくは、哺乳動物細胞をさす。例示的な応答細胞には、例えば、樹状細胞、マクロファージ、末梢血単核細胞 (PBMC)、脾細胞等が含まれる。検出可能な免疫応答には、例えば、TNF-、IFN-、IFN-、IFN-、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、TGF、およびそれらの組み合わせのような、サイトカインまたは増殖因子の産生が含まれる。

## 【0071】

「実質的同一性」とは、ストリンジェントな条件の下で参照配列にハイブリダイズする配列、または参照配列の指定された領域において指定された同一率を有する配列をさす。

10

## 【0072】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という語句は、ある核酸が、標的配列、典型的には、複雑な核酸混合物の中の標的配列にハイブリダイズし、他の配列にはハイブリダイズしない条件をさす。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる状況においては異なるであろう。より長い配列は、より高温で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範囲の案内は、Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)に見出される。一般に、ストリンジェントな条件は、明確なイオン強度pHでの特定の配列の融点 ( $T_m$ ) より約5~10 低く選択される。 $T_m$ とは、平衡時に、標的に相補的なプローブの50%が、標的配列にハイブリダイズする (明確なイオン強度、pH、および核酸濃度の下での) 温度である (標的配列が過剰に存在するため、 $T_m$ においては、平衡時に、プローブの50%が占められる)。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加によっても達成され得る。選択的または特異的なハイブリダイゼーションのため、陽性シグナルは、バックグラウンドの少なくとも2倍、好ましくは、バックグラウンドハイブリダイゼーションの10倍である。

20

## 【0073】

例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、以下の通りであり得る：50%ホルムアミド、5×SSC、および1%SDS、42 でのインキュベーション、または5×SSC、1%SDS、65 でのインキュベーション、そして0.2×SSCおよび0.1%SDS、65 での洗浄。PCRのため、約36 の温度が、低ストリンジェンシー増幅のため典型的であるが、アニーリング温度は、プライマーの長さに依って、約32 ~ 48 の間で変動し得る。高ストリンジェンシーPCR増幅のためには、約62 の温度が典型的であるが、高ストリンジェンシーアニーリング温度は、プラスミドの長さおよび特異性に依って、約50 ~ 約65 の範囲であり得る。高ストリンジェンシー増幅の場合にも、低ストリンジェンシー増幅の場合にも、典型的なサイクル条件には、90 ~ 95 30秒~2分の変性期、30秒~2分持続するアニーリング期、および約72 1~2分の伸長期が含まれる。低ストリンジェンシー増幅反応および高ストリンジェンシー増幅反応のためのプロトコルおよび指針は、例えば、Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y. に提供されている。

30

40

## 【0074】

ストリンジェントな条件の下で相互にハイブリダイズしない核酸であっても、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一である場合には、やはり実質的に同一である。これは、例えば、遺伝暗号により許容される最大のコドン縮重を使用して、核酸のコピーが作出された場合に起こる。そのような場合、核酸は、典型的には、中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下でハイブリダイズする。例示的な「中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」には、37 での40%ホルムアミド、1M NaCl、1%SDSの緩衝液におけるハイブリダイゼーション、45 での1×SSCにおける洗浄が含まれる。陽性ハイブリダイゼーションは、バックグラウンドの少なくとも2倍である。当

50

業者は、代替的なハイブリダイゼーション条件および洗浄条件が、類似したストリンジェンシーの条件を提供するために利用され得ることを容易に認識するであろう。ハイブリダイゼーションパラメーターを決定するための付加的な指針は、多数の参照、例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. に提供されている。

【0075】

二つ以上の核酸に関する「実質的に同一の」または「実質的同一性」という用語は、以下の配列比較アルゴリズムのうちの一つを使用して、または手動アラインメントおよび目視検査により測定されるような、比較ウィンドウまたは指定された領域における最大の一一致のために比較され整列化された場合に、同一であるか、または指定された割合の同一ヌクレオチド（即ち、指定された領域における少なくとも約60%、好ましくは、少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性）を有する、二つ以上の配列または部分配列をさす。この定義は、前後関係が示す場合には、類似して配列の相補鎖もさす。好ましくは、実質的同一性は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60ヌクレオチド長である領域に存在する。

【0076】

配列比較のためには、典型的には、一つの配列を参照配列とし、テスト配列をそれと比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、テスト配列および参照配列をコンピューターへ入力し、必要であれば、サブシーケンス座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用してもよいし、または代替的なパラメータを指定してもよい。次いで、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメータに基づき、参照配列と比べたテスト配列の配列同一率を計算する。

【0077】

「比較ウィンドウ」とは、本明細書において使用されるように、二つの配列が最適に整列化された後、ある配列が同数の連続位置の参照配列と比較され得る、約5～約60、一般的には約10～約45、より一般的には約15～約30からなる群より選択される多数の連続位置のうちの一つのセグメントの参照を含む。比較のための配列の整列化の方法は、当技術分野において周知である。比較のための配列の最適の整列化は、例えば、Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482(1981)のローカルホモロジアルゴリズム、Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443(1970)のホモロジアラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444(1988)の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実行（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）、または手動アラインメントおよび目視検査（例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (1995 supplement) 参照）によって実施され得る。

【0078】

配列同一率および配列類似率を決定するのに適しているアルゴリズムの好ましい例は、それぞれ、Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402(1977)およびAltschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410(1990)に記載されているBLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムである。BLASTおよびBLAST 2.0は、本発明の核酸の配列同一率を決定するため、本明細書に記載されたパラメータと共に使用される。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を通じて公に入手可能である。

【0079】

BLASTアルゴリズムは、二つの配列の間の類似性の統計分析も実施する（例えば、Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787(1993)参照）。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の一つの尺度は、二つのヌクレオチド配列の間のマッチが偶然起こるであろう確率の指標を提供する、最小合計確率（smallest sum probability）（ $P(N)$ ）である。例えば、テスト核酸の参照核酸との比較において、最小合計確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、その核酸は、参照配列に類似していると見なされる。

## 【0080】

「核酸」という用語は、本明細書において使用されるように、一本鎖型または二本鎖型いずれかの少なくとも2個のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含有しているポリマーをさし、DNAおよびRNAを含む。DNAは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドDNA、凝縮前DNA、PCR産物、ベクター（P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体）、発現カセット、キメラ配列、染色体DNA、またはこれらの群の誘導体および組み合わせの形態であり得る。RNAは、siRNA、非対称干渉RNA（aiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、mRNA、tRNA、rRNA、vRNA、およびそれらの組み合わせの形態であり得る。核酸には、合成の、天然に存在する、天然には存在しない、公知のヌクレオチドアナログまたは修飾された骨格残基もしくは結合を含有しており、参照核酸と類似した結合特性を有する核酸が含まれる。そのようなアナログの例には、非限定的に、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、およびペプチド核酸（PNA）が含まれる。特に限定されない限り、その用語には、参照核酸と類似した結合特性を有する、天然ヌクレオチドの公知のアナログを含有している核酸が包含される。他に示されない限り、特定の核酸配列には、明示された配列のみならず、それらの保存的に修飾されたバリエーション（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP、および相補配列も暗示的に包含される。特に、縮重コドン置換は、一つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの3番目の位置が、混合塩基および/またはデオキシイノシン残基に置換された配列を作製することにより達成され得る（Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081(1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98(1994)）。「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース（DNA）または糖リボース（RNA）、塩基、およびリン酸基を含有している。ヌクレオチドは、リン酸基を通して共に連結されている。「塩基」には、プリンおよびピリミジンが含まれ、これらには、さらに、天然化合物アデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、および天然アナログ、ならびにアミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、およびハロゲン化アルキルのような新たな反応基を置く修飾を含むが、これらに限定はされない、プリンおよびピリミジンの合成誘導体が含まれる。

10

20

## 【0081】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチドまたはポリペプチド前駆体の産生のために必要なコーディング配列の部分長または全長を含む核酸（例えば、DNAまたはRNA）配列をさす。

30

## 【0082】

「遺伝子産物」とは、本明細書において使用されるように、RNA転写物またはポリペプチドのような遺伝子の産物をさす。

## 【0083】

「脂質」という用語は、脂肪酸のエステルを含むが、これに限定はされず、水に不溶性であるが多くの有機溶媒には可溶性であることを特徴とする有機化合物の群をさす。それらは、一般的に、少なくとも三つのクラスへ分類される：（1）脂肪および油のみならず、ロウも含む「単純脂質」；（2）リン脂質および糖脂質を含む「複合脂質」；ならびに（3）ステロイドのような「誘導脂質」。

40

## 【0084】

「脂質小胞」とは、水性体積が両親媒性脂質二重層に封入されているリポソーム；または、干渉RNA配列を含むプラスミドのような大きい分子成分を含んでいる内部を、脂質が覆っており、低下した水性内部を有するリポソーム；または、封入された成分が比較的無秩序な脂質混合物内に含有されている脂質凝集物もしくはミセルを含むが、これらに限定はされない、干渉RNAのような化合物を送達するために使用され得る任意の脂質組成物をさす。脂質小胞という用語には、非限定的に、SPLP、pSPLP、SNALP、リポソーム、ミセル、ピロソーム、脂質-核酸複合体、およびそれらの混合物を含む、多様な脂質に基づく担体系のうちの任意のものが包含される。

## 【0085】

50

本明細書において使用されるように、「脂質に封入された」とは、核酸（例えば、干渉RNA）のような化合物に、完全な封入、部分的な封入、またはその両方を提供する脂質製剤をさすことができる。好ましい態様において、核酸は、（例えば、SPLP、pSPLP、SNALP、またはその他の核酸-脂質粒子が形成されるよう）脂質製剤に完全に封入される。

【0086】

本明細書において使用されるように、「SNALP」という用語は、安定な核酸-脂質粒子をさす。SNALPは、核酸（例えば、siRNA、aiRNA、miRNA、ssDNA、dsDNA、ssRNA、短いヘアピンRNA（shRNA）、dsRNA、または干渉RNAが転写されるプラスミドを含むプラスミド）が脂質に完全に封入されている、脂質（例えば、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を防止する複合脂質）より作製された粒子を表す。本明細書において使用されるように、「SNALP」という用語には、脂質に封入された核酸（例えば、プラスミド）を含む核酸-脂質粒子をさすために使用される用語であるSPLPが含まれる。SNALPおよびSPLPは、典型的には、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および脂質コンジュゲート（例えば、PEG-脂質コンジュゲート）を含有している。SNALPおよびSPLPは、静脈内（i.v.）注射後、延長された循環系寿命を示すことができ、遠位部位（例えば、投与部位から物理的に離れた部位）に蓄積し、これらの遠位部位において、トランスフェクトされた遺伝子の発現または標的遺伝子発現のサイレンシングを媒介することができるため、全身適用のために極めて有用である。SPLPには、PCT公開番号WO 00/03683に示されたような封入された縮合剤-核酸複合体を含む「pSPLP」が含まれる。

【0087】

本発明の核酸-脂質粒子は、典型的には、約50nm～約150nm、より典型的には、約60nm～約130nm、より典型的には、約70nm～約110nm、最も典型的には、約70～約90nmの平均直径を有し、かつ実質的に非毒性である。さらに、核酸は、本発明の核酸-脂質粒子中に存在する場合、水性溶液中でヌクレアーゼによる分解に対して抵抗性である。核酸-脂質粒子およびそれらの調製法は、例えば、米国特許公開第20040142025号および米国特許公開第20070042031号に開示されている。

【0088】

「脂質製剤」または「脂質に基づく製剤」とは、干渉RNAのような核酸を関心対象の標的部位へ送達するために使用され得るSNALPをさすために本明細書において使用される。カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および脂質コンジュゲートから典型的に形成される脂質製剤において、核酸は脂質に封入され、それにより、核酸はヌクレアーゼ分解から保護される。

【0089】

「脂質コンジュゲート」という用語は、核酸-脂質粒子の凝集を阻害する複合脂質をさす。そのような脂質コンジュゲートには、ポリアミドオリゴマー（例えば、ATTA-脂質コンジュゲート）、ジアルキルオキシプロピルにカップリングされたPEG、ジアシルグリセロールにカップリングされたPEG、コレステロールにカップリングされたPEG、ホスファチジルエタノールアミンにカップリングされたPEG、セラミドにコンジュゲートされたPEG（例えば、米国特許第5,885,613号参照）、カチオン性PEG脂質、およびそれらの混合物のようなPEG-脂質コンジュゲートが含まれるが、これらに限定はされない。PEGは、脂質に直接コンジュゲートされてもよいし、またはリンカーモエティを介して脂質に連結されてもよい。例えば、非エステル含有リンカーモエティおよびエステル含有リンカーモエティを含む、脂質にPEGをカップリングするのに適している任意のリンカーモエティが使用され得る。好ましい態様において、非エステル含有リンカーモエティが使用される。

【0090】

「両親媒性脂質」という用語は、脂質材料の疎水性部分が疎水相の方を向き、親水性部分が水相の方を向いている適当な材料を一部さす。親水性特徴は、炭水化物、リン酸基、カルボキシル基、スルファト基、アミノ基、スルフヒドリル基、ニトロ基、ヒドロキシル基等のような、極性基または電荷を有する基の存在に由来する。疎水性は、飽和および不飽和の長鎖脂肪族炭化水素基、および一つまたは複数の芳香族基、脂環式基、または複素

10

20

30

40

50

環式基により置換されたそのような基を含むが、これらに限定はされない、無極性基の内含により付与され得る。両親媒性化合物の例には、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が含まれるが、これらに限定はされない。

【0091】

リン脂質の代表例には、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、およびジリノレオイルホスファチジルコリンが含まれるが、これらに限定はされない。スフィンゴ脂質、糖スフィンゴ脂質ファミリー、ジアシルグリセロール、および  $\alpha$ -アシルオキシ酸のようなリンを欠くその他の化合物も、両親媒性脂質と呼ばれる群に含まれる。さらに、上記の両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールを含むその他の脂質と混合されてもよい。

10

【0092】

「中性脂質」という用語は、選択されたpHにおいて、電荷を有していないかまたは中性の双性の型で存在する多数の脂質種のうちの任意のものをさす。生理的pHにおいて、そのような脂質には、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシド、およびジアシルグリセロールが含まれる。

【0093】

「非カチオン性脂質」という用語は、両親媒性脂質のみならず、その他の中性脂質またはアニオン性脂質もさす。

20

【0094】

「アニオン性脂質」という用語は、生理的pHで、負の電荷を有する任意の脂質をさす。これらの脂質には、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リジルホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレイオルホスファチジルグリセロール (POPG)、および中性脂質に接合されたその他のアニオン性修飾基が含まれるが、これらに限定はされない。

30

【0095】

「カチオン性脂質」という用語は、生理的pH (例えば、約7.0のpH) のような選択されたpHで、正味の正の電荷を保持している多数の脂質種のうちの任意のものをさす。驚くべきことに、複数の不飽和部位、例えば、少なくとも2個または3個の不飽和部位を有するアルキル鎖を含むカチオン性脂質は、増加した膜流動性を有する核酸-脂質粒子を形成するために特に有用であることが見出されている。本発明においても有用である多数のカチオン性脂質および関連アナログが、米国特許公開第20060083780号および第20060240554号；米国特許第5,208,036号；第5,264,618号；第5,279,833号；第5,283,185号；第5,753,613号；および第5,785,992号；ならびにPCT公開WO 96/10390に記載されている。カチオン性脂質の例には、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLenDMA)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、ジオクタデシルジメチルアンモニウム (DODMA)、ジステアリルジメチルアンモニウム (DSDMA)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (DOGS)、3-ジメチルアミノ-2

40

50

-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CLinDMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',1-2'-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、2,3-ジリノレオイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン (DLinDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbDAP)、1,2-ジリノレオイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinCDAP)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-XTC2-DMA)、およびそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。いくつかの場合、カチオン性脂質は、プロトン化可能な三級アミン頭部、C18アルキル鎖、頭部とアルキル鎖との間のエーテル結合、および0~3個の二重結合を含む。そのような脂質には、例えば、DSDMA、DLinDMA、DLenDMA、およびDODMAが含まれる。カチオン性脂質は、エーテル結合およびpH滴定可能な頭部を含んでいてもよい。そのような脂質には、例えば、DODMAが含まれる。

10

## 【0096】

「疎水性脂質」という用語は、飽和および不飽和の長鎖脂肪族炭化水素基、ならびに1個または複数個の芳香族基、脂環式基、または複素環式基によって置換されていてもよいそのような基を含むが、これらに限定はされない、無極性基を有する化合物をさす。適当な例には、ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、N,N-ジアルキルアミノ、1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパン、および1,2-ジアルキル-3-アミノプロパンが含まれるが、これらに限定はされない。

20

## 【0097】

「融合性の」という用語は、リポソーム、SNALP、またはその他の薬物送達系の、細胞の膜と融合する能力をさす。膜は、原形質膜であってもよいし、または細胞器官、例えば、エンドソーム、核等を囲む膜であってもよい。

## 【0098】

本明細書において使用されるように、「水性溶液」という用語は、完全にまたは部分的に水を含む組成物をさす。

## 【0099】

本明細書において使用されるように、「有機脂質溶液」という用語は、完全にまたは部分的に、脂質を有する有機溶媒を含む組成物をさす。

30

## 【0100】

「遠位部位」とは、本明細書において使用されるように、隣接した毛細血管床に限定されず、生物の全身に広く分布する部位を含む、物理的に離れた部位をさす。

## 【0101】

核酸-脂質粒子に関して「血清安定」とは、遊離のDNAまたはRNAを有意に分解するであろう血清への曝露またはヌクレアーゼアッセイの後に、粒子が有意に分解されないことを意味する。適当なアッセイには、例えば、標準的な血清アッセイ、DNAseアッセイ、またはRNAseアッセイが含まれる。

40

## 【0102】

「全身送達」とは、本明細書において使用されるように、生物において干渉RNAのような化合物の広い体内分布をもたらす送達をさす。ある種の化合物の全身送達をもたらす投与技術もあるし、そうでないものもある。全身送達とは、有用な、好ましくは、治療的な量の化合物が、身体各部の大部分に曝されることを意味する。広い体内分布を入手するためには、一般に、化合物が、投与部位に対して遠位の疾患部位に到達する前に、(例えば、初回通過器官(肝臓、肺等)により、または迅速な非特異的な細胞結合により)急速に分解されるかまたは除去されることがないように血中寿命が必要とされる。核酸-脂質粒子の全身送達は、例えば、静脈内、皮下、および腹腔内を含む、当技術分野において公知の任意の手段によることができる。好ましい態様において、核酸-脂質粒子の全身送

50

達は静脈内送達による。

【0103】

「局所送達」とは、本明細書において使用されるように、干渉RNAのような化合物の、生物体内の標的部位への直接の送達をさす。例えば、化合物は、腫瘍のような疾患部位、または炎症部位のようなその他の標的部位、または肝臓、心臓、膵臓、腎臓等のような標的器官へ、直接注射により局所送達され得る。

【0104】

「哺乳動物」という用語は、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ハムスター、モルモット、ウサギ、家畜等のような任意の哺乳動物種をさす。

【0105】

「癌」という用語は、異常細胞の無制御の成長を特徴とする疾患クラスの任意のメンバーをさす。その用語には、悪性、良性、軟部組織、または固形のいずれを特徴とするかに関わらず、全ての公知の癌および新生物状態が含まれ、転移前癌および転移後癌を含む全ての病期およびグレードの癌が含まれる。種々の型の癌の例には、肝臓癌、肺癌、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、胃癌（胃の癌）、食道癌；胆嚢癌、膵臓癌、虫垂癌、乳癌、卵巣癌；子宮頸癌、前立腺癌、腎臓癌（例えば、腎細胞癌）、中枢神経系の癌、神経膠芽腫、皮膚癌、リンパ腫、絨毛癌、頭頸部癌、骨原性肉種、および血液癌が含まれるが、これらに限定はされない。肝臓癌の特定の型の非限定的な例には、肝細胞癌、（他の何らかの非肝臓癌細胞型の転移により引き起こされた）二次性肝臓癌、および肝芽腫が含まれる。本明細書において使用されるように、「腫瘍」には、1個または複数個の癌細胞が含まれる。

【0106】

III. 態様の説明

本発明は、PLK-1発現を標的とする干渉RNA（例えば、siRNA、aiRNA、miRNA等）を含む組成物、およびPLK-1発現をサイレンシングするためのそのような組成物の使用方法を提供する。

【0107】

一つの局面において、本発明は、PLK-1発現をサイレンシングすることができる、約15～約60ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む修飾siRNA分子を提供し、ここで二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの1個または複数個は修飾ヌクレオチドを含む。

【0108】

一つの態様において、修飾siRNA分子は、2'-O-メチル（2'OMe）ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'F）ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル）（MOE）ヌクレオチド、ロックド核酸（LNA）ヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択される修飾ヌクレオチドを含む。好ましい態様において、修飾siRNA分子は2'OMeヌクレオチドを含む。非限定的な例として、2'OMeヌクレオチドは、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択され得る。

【0109】

もう一つの態様において、修飾siRNA分子は、約15～約30ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む。ある種の例において、修飾siRNA分子は、修飾siRNA分子の一方の鎖に修飾ヌクレオチドを含む。ある種の他の例において、修飾siRNA分子は、修飾siRNA分子の両方の鎖に修飾ヌクレオチドを含む。典型的には、二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの2個、3個、4個、5個、6個、7個、またはそれ以上が、修飾ヌクレオチドを含む。

【0110】

ある種の態様において、二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの約25%未満が修飾ヌクレオチドを含む。他の態様において、二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの約20%未満が修飾ヌクレオチドを含む。さらに他の態様において、二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの約15%未満が修飾ヌクレオチドを含む。付加的な態様において、二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの約10%～約20%が修飾ヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

## 【0111】

さらなる態様において、修飾siRNA分子は、対応する未修飾siRNA配列より低免疫刺激性である。そのような態様において、低下した免疫刺激特性を有する修飾siRNA分子は、有利なことに、標的PLK-1配列に対するRNAi活性を保持している。もう一つの態様において、siRNA配列への、例えば、siRNA二重鎖の二本鎖領域内への最小かつ選択的な2'OMe修飾の導入によって、本明細書に記載された修飾siRNA分子の免疫刺激特性およびPLK-1発現をサイレンシングする能力を釣り合わせるかまたは最適化することができる。

## 【0112】

ある種の例において、修飾siRNA分子は、対応する未修飾siRNA配列より少なくとも約70%低免疫刺激性である。ある種の他の例において、修飾siRNA分子は、対応する未修飾siRNA配列のものの10倍以下であるIC<sub>50</sub>を有する。

10

## 【0113】

いくつかの例において、修飾siRNA分子は、修飾siRNA分子の一方の鎖に3'突出を含む。他の例において、修飾siRNA分子は、修飾siRNA分子の両方の鎖に3'突出を含む。いくつかの例において、修飾siRNA分子は、ヘアピンループ構造を含む。

## 【0114】

修飾siRNA分子は、典型的には、siRNA分子の二本鎖領域内に1個もしくは複数個の修飾ヌクレオチドを有する、センス鎖、アンチセンス鎖、またはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。

## 【0115】

ある種の態様において、修飾siRNA分子のセンス鎖は、表1に示されたセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの好ましい態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:1の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの好ましい態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:3の核酸配列を含むかまたはからなる。ある種の他の態様において、修飾siRNA分子のアンチセンス鎖は、表1に示されたアンチセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの好ましい態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:2の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの好ましい態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:4の核酸配列を含むかまたはからなる。本明細書に記載されるように、表1に示されたセンス鎖配列および/またはアンチセンス鎖配列のヌクレオチドのうち1個または複数個は、siRNA分子の二本鎖領域内に位置する修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、「dTdT」または「UU」3'突出を含有する。他の例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、標的配列またはその相補鎖に対する相補性を有する3'突出を含有する。さらなる例において、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'突出は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド(例えば、2'OMeヌクレオチド)を1個、2個、3個、4個、またはそれ以上含む。

20

30

## 【0116】

いくつかの態様において、修飾siRNA分子のセンス鎖は、表2に示されたセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。他の態様において、修飾siRNA分子のアンチセンス鎖は、表2に示されたアンチセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。本明細書に記載されるように、表2に示されたセンス鎖配列および/またはアンチセンス鎖配列のヌクレオチドのうち1個または複数個は、siRNA分子の二本鎖領域内に位置する修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、「dTdT」または「UU」3'突出を含有する。他の例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、標的配列またはその相補鎖に対する相補性を有する3'突出を含有する。さらなる例において、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'突出は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド(例えば、2'OMeヌクレオチド)を1個、2個、3個、4個、またはそれ以上含む。

40

## 【0117】

ある種の態様において、修飾siRNA分子のセンス鎖は、表3に示された未修飾センス鎖配

50

列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの好ましい態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:51の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの好ましい態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:58の核酸配列を含むかまたはからなる。さらにもう一つの好ましい態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:65の核酸配列を含むかまたはからなる。ある種の他の態様において、修飾siRNA分子のアンチセンス鎖は、表3に示された未修飾アンチセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの好ましい態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:52の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの好ましい態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:59の核酸配列を含むかまたはからなる。さらにもう一つの好ましい態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:66の核酸配列を含むかまたはからなる。本明細書に記載されるように、表3に示された未修飾のセンス鎖配列および/またはアンチセンス鎖配列のヌクレオチドのうち1個または複数個は、siRNA分子の二本鎖領域内に位置する修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、「dTdT」または「UU」3'突出を含有する。他の例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、標的配列またはその相補鎖に対する相補性を有する3'突出を含有する。さらなる例において、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'突出は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド（例えば、2'OMeヌクレオチド）を1個、2個、3個、4個、またはそれ以上含む。

【0118】

いくつかの態様において、修飾siRNA分子のセンス鎖は、表3に示された修飾センス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの好ましい態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:57の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの好ましい態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:64の核酸配列を含むかまたはからなる。さらにもう一つの好ましい態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:67の核酸配列を含むかまたはからなる。いくつかの例において、センス鎖は、「dTdT」または「UU」3'突出を含有する。他の例において、センス鎖は、標的配列の相補鎖に対する相補性を有する3'突出を含有する。さらなる例において、センス鎖の3'突出は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド（例えば、2'OMeヌクレオチド）を1個、2個、3個、4個、またはそれ以上含む。

【0119】

他の態様において、修飾siRNA分子のアンチセンス鎖は、表3に示された修飾アンチセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの好ましい態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:54の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの好ましい態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:56の核酸配列を含むかまたはからなる。さらにもう一つの好ましい態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:63の核酸配列を含むかまたはからなる。付加的な好ましい態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:68の核酸配列を含むかまたはからなる。いくつかの例において、アンチセンス鎖は、「dTdT」または「UU」3'突出を含有する。他の例において、アンチセンス鎖は、標的配列に対する相補性を有する3'突出を含有する。さらなる例において、アンチセンス鎖の3'突出は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド（例えば、2'OMeヌクレオチド）を1個、2個、3個、4個、またはそれ以上含む。

【0120】

いくつかの態様において、修飾siRNA分子のセンス鎖は、表4~5に示されたセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。ある種の他の態様において、修飾siRNA分子のアンチセンス鎖は、表4~5に示されたアンチセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。本明細書に記載されるように、表4~5に示されたセンス鎖配列および/またはアンチセンス鎖配列のヌクレオチドのうち1個または複数個は、siRNA分子の二本鎖領域内に位置する修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、「dTdT」または「UU」3'突出を含有する。他の例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、標的配列またはその相補鎖に対する相補性を有する3'突出を含有する。さらなる例において、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'突出は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド（例えば、2'OM

10

20

30

40

50

eヌクレオチド)を1個、2個、3個、4個、またはそれ以上含む。

【0121】

ある種の態様において、修飾siRNA分子のセンス鎖は、表6に示された未修飾センス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの良い態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:211の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの良い態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:218の核酸配列を含むかまたはからなる。ある種の他の態様において、修飾siRNA分子のアンチセンス鎖は、表6に示された未修飾アンチセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの良い態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:212の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの良い態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:219の核酸配列を含むかまたはからなる。本明細書に記載されるように、表6に示された未修飾のセンス鎖配列および/またはアンチセンス鎖配列のヌクレオチドのうち1個または複数個は、siRNA分子の二本鎖領域内に位置する修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の「UU」3'突出のウリジンヌクレオチドの一方または両方は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド(例えば、2'OMe-ウリジンヌクレオチド)を含む。

10

【0122】

いくつかの態様において、修飾siRNA分子のセンス鎖は、表6に示された修飾センス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの良い態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:214の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの良い態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:220の核酸配列を含むかまたはからなる。いくつかの例において、

20

【0123】

他の態様において、修飾siRNA分子のアンチセンス鎖は、表6に示された修飾アンチセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの良い態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:215の核酸配列を含むかまたはからなる。もう一つの良い態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:216の核酸配列を含むかまたはからなる。さらにもう一つの良い態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:223の核酸配列を含むかまたはからなる。いくつかの例において、アンチセンス鎖の「UU」3'突出のウリジンヌクレオチドの一方または両方は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド(例えば、2'OMe-ウリジンヌクレオチド)を含む。

30

【0124】

いくつかの態様において、修飾siRNA分子のセンス鎖は、表7に示されたセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。他の態様において、修飾siRNA分子のアンチセンス鎖は、表7に示されたセンス鎖配列のうちの一つに相補的な配列を含むかまたはからなる(「UU」3'突出を除く)。本明細書に記載されるように、表7に示されたセンス鎖配列および/または相補的なアンチセンス鎖配列のヌクレオチドのうち1個または複数個は、siRNA分子の二本鎖領域内に位置する修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の「UU」3'突出のウリジンヌクレオチドの一方または両方は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド(例えば、2'OMe-ウリジンヌクレオチド)を含む。

40

【0125】

いくつかの態様において、修飾siRNA分子のセンス鎖は、表10に示された修飾されたセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの良い態様において、センス鎖は、SEQ ID NO:400の核酸配列を含むかまたはからなる。他の態様において、修飾siRNA分子のアンチセンス鎖は、表10に示された修飾アンチセンス鎖配列のうちの一つを含むかまたはからなる。一つの良い態様において、アンチセンス鎖は、SEQ ID NO:403の核酸配列を含むかまたはからなる。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の3'突出のヌクレオチドの一方または両方は、本明細書に記載されたもののような修飾ヌクレオチド(例えば、2'OMe-ウリジンヌクレオチド)を含む。

50

## 【 0 1 2 6 】

ある種の態様において、修飾siRNA分子は、表11に示されたsiRNA分子のうちの一つまたは複数からなる群より選択される。好ましい態様において、修飾siRNA分子はPLK1424 2/6である。

## 【 0 1 2 7 】

ある種の他の態様において、修飾siRNA分子は、PLK1424 2/6、PLK1424 U4/GU、PLK1424 U4/G、PLK773 G/GU、PLK1425 3/5、およびそれらの混合物からなる群より選択される。

## 【 0 1 2 8 】

もう一つの態様において、修飾siRNA分子は、担体系をさらに含む。ある種の例において、担体系は、核酸-脂質粒子、リボソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、およびそれらの混合物からなる群より選択される。一般に、核酸複合体は、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、シクロデキストリン、またはそれらの混合物と複合体化された修飾siRNA分子を含み得る。非限定的な例として、修飾siRNA分子は、ポリエチレンイミン (PEI) であるカチオン性ポリマーと複合体化され得る。好ましい態様において、単体系は核酸-脂質粒子である。

10

## 【 0 1 2 9 】

他の態様において、本発明は、本明細書に記載された修飾siRNA分子と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。

## 【 0 1 3 0 】

もう一つの局面において、本発明は、本明細書に記載された修飾siRNA分子と、カチオン性脂質と、非カチオン性脂質とを含む核酸-脂質粒子を提供する。

20

## 【 0 1 3 1 】

いくつかの態様において、カチオン性脂質は、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLenDMA)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、ジステアリルジメチルアンモニウム (DSDMA)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシプロピルアミン (DODMA)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (DOGS)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CLinDMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',1,2'-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、2,3-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン (DLinDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbDAP)、1,2-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinCDAP)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-XTC2-DMA)、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである。好ましい態様において、カチオン性脂質はDLinDMAである。

30

40

## 【 0 1 3 2 】

ある種の態様において、非カチオン性脂質はアニオン性脂質である。ある種の他の態様において、非カチオン性脂質は中性脂質である。

## 【 0 1 3 3 】

いくつかの態様において、非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン

50

(DSPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルコリン(POPC)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、パルミトイルオレイオール-ホスファチジルグリセロール(POPG)、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン(DPPC)、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン(DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジエラドイル-ホスファチジルエタノールアミン(DEPE)、ステアロイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)、卵ホスファチジルコリン(EPC)、コレステロール、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである。好ましい態様において、非カチオン性脂質は、DSPC、DPPC、またはDSPEである。

10

## 【0134】

もう一つの態様において、核酸-脂質粒子は、粒子の凝集を阻害する複合脂質をさらに含む。ある種の例において、粒子の凝集を阻害する複合脂質は、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質コンジュゲート、ポリアミド(ATTA)-脂質コンジュゲート、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである。いくつかの態様において、PEG-脂質コンジュゲートは、PEG-ジアシルグリセロール、PEGジアルキルオキシプロピル、PEG-リン脂質、PEG-セラミド、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである。好ましい態様において、粒子の凝集を阻害する複合脂質は、PEG-ジアルキルオキシプロピル(PEG-DAA)コンジュゲートを含む。ある種の例において、PEG-DAAコンジュゲートは、PEG-ジラウリルオキシプロピル(C<sub>12</sub>)コンジュゲート、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(C<sub>14</sub>)コンジュゲート、PEG-ジパルミチルオキシプロピル(C<sub>16</sub>)コンジュゲート、およびPEG-ジステアリルオキシプロピル(C<sub>18</sub>)コンジュゲートからなる群より選択されるメンバーである。好ましい態様において、PEG-DAAコンジュゲートはPEG-ジミリスチルオキシプロピル(C<sub>14</sub>)コンジュゲートである。付加的なPEG-脂質コンジュゲートには、例えばPEG-C-DOMG、2KPEG-DMG、またはそれらの混合物が含まれる。

20

## 【0135】

いくつかの態様において、カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約20モル%~約50モル%を構成する。好ましい態様において、カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約40モル%を構成する。

30

## 【0136】

他の態様において、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約5モル%~約90モル%を構成する。ある種の例において、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約10モル%を構成する。ある種の他の例において、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約60モル%を構成する。

## 【0137】

さらなる態様において、PEG-DAAコンジュゲートは、粒子中に存在する全脂質の0モル%~約20モル%を構成する。好ましい態様において、PEG-DAAコンジュゲートは、粒子中に存在する全脂質の約2モル%を構成する。

## 【0138】

付加的な態様において、核酸-脂質粒子は、コレステロールをさらに含む。ある種の例において、コレステロールは、粒子中に存在する全脂質の約10モル%~約60モル%を構成する。好ましい態様において、コレステロールは、粒子中に存在する全脂質の約48モル%を構成する。

40

## 【0139】

もう一つの態様において、核酸-脂質粒子中の修飾siRNA分子は、20分間の37 °Cでのヌクレアーゼへの粒子の曝露の後、実質的に分解されない。関連する態様において、核酸-脂質粒子中の修飾siRNA分子は、30分間の37 °Cでの血清中での粒子のインキュベーションの後、実質的に分解されない。好ましい態様において、修飾siRNAは、核酸-脂質粒子に完全に封入される。

50

## 【 0 1 4 0 】

ある種の例において、粒子は、約0.01～約0.2のsiRNA:脂質重量比を有する。ある種の他の例において、粒子は、約0.02～約0.1のsiRNA:脂質重量比を有する。さらに他の例において、粒子は、約0.08のsiRNA:脂質重量比を有する。

## 【 0 1 4 1 】

いくつかの例において、粒子は、約50nm～約150nmの直径中央値を有する。他の例において、粒子は、約70nm～約90nmの直径中央値を有する。

## 【 0 1 4 2 】

さらにもう一つの局面において、本発明は、

(a) PLK-1発現をサイレンシングするsiRNA分子；

(b) 粒子中に存在する全脂質の約50モル%～約85モル%を構成するカチオン性脂質；

(c) 粒子中に存在する全脂質の約13モル%～約49.5モル%を構成する非カチオン性脂質；および

(d) 粒子中に存在する全脂質の約0.5モル%～約2モル%を構成し、粒子の凝集を阻害する複合脂質

を含む核酸-脂質粒子を提供する。

## 【 0 1 4 3 】

一つの態様において、siRNA分子は、約15～約60ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む。もう一つの態様において、siRNA分子は、表1～7および10～11に示された配列のうち少なくとも一つを含む。

## 【 0 1 4 4 】

ある種の態様において、カチオン性脂質は、DLinDMA、DLenDMA、DODAC、DDAB、DOTAP、DSDMA、DOTMA、DODMA、DC-Chol、DMRIE、DOSPA、DOGS、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、D0carbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、DLin-K-DMA、DLin-K-XTG2-DMA、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである。好ましい態様において、カチオン性脂質はDLinDMAを含む。

## 【 0 1 4 5 】

もう一つの態様において、非カチオン性脂質はコレステロールまたはその誘導体を含む。ある種の例において、コレステロールまたはその誘導体は、粒子中に存在する全脂質の約30モル%～約45モル%を構成する。一般に、コレステロール誘導体は、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテル、およびコレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテルからなる群より選択されるメンバーである。

## 【 0 1 4 6 】

一つの代替的な態様において、非カチオン性脂質はリン脂質を含む。もう一つの別の態様において、非カチオン性脂質は、リン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。そのような態様において、リン脂質は、DPPC、DSPC、DOPE、POPC、POPE、POPG、DPPE、DMPE、DSPE、DEPE、SOPE、EPC、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーであり得る。ある種の例において、リン脂質は、粒子中に存在する全脂質の約4モル%～約10モル%を構成し、かつコレステロールは、粒子中に存在する全脂質の約30モル%～約40モル%を構成する。好ましい態様において、リン脂質はDPPCを含む。

## 【 0 1 4 7 】

さらにもう一つの態様において、粒子の凝集を阻害する複合脂質は、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質コンジュゲート、ポリアミド(ATTA)-脂質コンジュゲート、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである。いくつかの態様において、PEG-脂質コンジュゲートは、PEG-ジアシルグリセロール、PEGジアルキルオキシプロピル、PEG-リン脂質、PEG-セラミド、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである。好ましい態様において、粒子の凝集を阻害する複合脂質は、PEG-ジアルキルオキシプロピル(PEG-DAA)コンジュゲートを含む。ある種の例において、PEG-DAAコンジュゲ

10

20

30

40

50

ートは、PEG-ジラウリルオキシプロピル (C<sub>12</sub>) コンジュゲート、PEG-ジミリスチルオキシプロピル (C<sub>14</sub>) コンジュゲート、PEG-ジパルミチルオキシプロピル (C<sub>16</sub>) コンジュゲート、およびPEG-ジステアリルオキシプロピル (C<sub>18</sub>) コンジュゲートからなる群より選択されるメンバーである。一つの好ましい態様において、PEG-DAAコンジュゲートはPEG-ジミリスチルオキシプロピル (C<sub>14</sub>) コンジュゲートである。もう一つの好ましい態様において、PEG-DAAコンジュゲートはPEG-ジステアリルオキシプロピル (C<sub>18</sub>) コンジュゲートである。付加的なPEG-脂質コンジュゲートには、例えば、PEG-C-DOMG、2KPEG-DMG、またはそれらの混合物が含まれる。

【0148】

さらなる態様において、核酸-脂質粒子中の核酸は、20分間の37 °Cでのヌクレアーゼへの粒子の曝露の後、実質的に分解されない。関連する態様において、核酸-脂質粒子中の核酸は、30分間の37 °Cでの血清中での粒子のインキュベーションの後、実質的に分解されない。好ましい態様において、核酸は、核酸-脂質粒子に完全に封入される。

10

【0149】

ある種の態様において、粒子は、約1~約100の脂質:siRNA重量比を有する。ある種の他の態様において、粒子は、約5~約15の脂質:siRNA重量比を有する。好ましくは、粒子は、約6の脂質:siRNA重量比を有する。いくつかの例において、粒子は、約50nm~約150nmの直径中央値を有する。他の例において、粒子は、約70nm~約90nmの直径中央値を有する。

【0150】

一つの好ましい態様において、本発明は、  
 (a) PLK-1発現をサイレンシングするsiRNA分子；  
 (b) 粒子中に存在する全脂質の約56.5モル%~約66.5モル%を構成するカチオン性脂質；  
 (c) 粒子中に存在する全脂質の約31.5モル%~約42.5モル%を構成する非カチオン性脂質；および  
 (d) 粒子中に存在する全脂質の約1モル%~約2モル%を構成し、粒子の凝集を阻害する複合脂質を含む核酸-脂質粒子を提供する。

20

【0151】

一つの態様において、siRNA分子は、約15~約60ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む。もう一つの態様において、siRNA分子は、表1~7および10~11に示された配列のうちの少なくとも一つを含む。

30

【0152】

ある種の態様において、カチオン性脂質は、DLinDMA、DLenDMA、DODAC、DDAB、DOTAP、DSDMA、DOTMA、DODMA、DC-Chol、DMRIE、DOSPA、DOGS、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、DLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである。好ましくは、カチオン性脂質はDLinDMAを含む。

【0153】

他の態様において、非カチオン性脂質はコレステロールまたはその誘導体を含む。好ましくは、非カチオン性脂質はコレステロールを含む。

40

【0154】

さらなる態様において、粒子の凝集を阻害する複合脂質は、PEG-ジアシルグリセロール、PEGジアルキルオキシプロピル、PEG-リン脂質、PEG-セラミド、およびそれらの混合物からなる群より選択されるPEG-脂質コンジュゲートである。好ましくは、粒子の凝集を阻害する複合脂質は、PEG-DAAコンジュゲートを含む。付加的なPEG-脂質コンジュゲートには、例えば、PEG-C-DOMG、2KPEG-DMG、またはそれらの混合物が含まれる。

【0155】

もう一つの好ましい態様において、本発明は、  
 (a) PLK-1発現をサイレンシングするsiRNA分子；

50

(b) 粒子中に存在する全脂質の約52モル%～約62モル%を構成するカチオン性脂質；  
 (c) 粒子中に存在する全脂質の約36モル%～約47モル%を構成する非カチオン性脂質；  
 および  
 (d) 粒子中に存在する全脂質の約1モル%～約2モル%を構成し、粒子の凝集を阻害する複合脂質を含む核酸-脂質粒子を提供する。

## 【0156】

一つの態様において、siRNA分子は、約15～約60ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む。もう一つの態様において、siRNA分子は、表1～7および10～11に示された配列のうちの少なくとも一つを含む。

10

## 【0157】

ある種の態様において、カチオン性脂質は、DLinDMA、DLenDMA、DODAC、DDAB、DOTAP、DSDMA、DOTMA、DODMA、DC-Chol、DMRIE、DOSPA、DOGS、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、D0carbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、DLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、およびそれらの混合物からなる群より選択されるメンバーである。好ましくは、カチオン性脂質はDLinDMAを含む。

## 【0158】

ある種の他の態様において、非カチオン性脂質はリン脂質である。代替的な態様において、非カチオン性脂質はリン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。リン脂質は、例えば、DPPC、DSPC、DOPE、POPC、POPE、POPG、DPPE、DMPE、DSPE、DEPE、SOPE、EPC、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、またはそれらの混合物であり得る。好ましくは、非カチオン性脂質はDPPCとコレステロールとの混合物を含む。そのような場合、DPPCは、典型的には、粒子中に存在する全脂質の約5モル%～約9モル%を構成し、かつコレステロールは、典型的には、粒子中に存在する全脂質の約32モル%～約37モル%を構成する。

20

## 【0159】

さらなる態様において、粒子の凝集を阻害する複合脂質は、PEG-ジアシルグリセロール、PEGジアルキルオキシプロピル、PEG-リン脂質、PEG-セラミド、およびそれらの混合物からなる群より選択されるPEG-脂質コンジュゲートである。好ましくは、粒子の凝集を阻害する複合脂質には、PEG-DAAコンジュゲートが含まれる。付加的なPEG-脂質コンジュゲートには、例えば、PEG-C-DOMG、2KPEG-DMG、またはそれらの混合物が含まれる。

30

## 【0160】

さらなる局面において、本発明は、本明細書に記載された核酸-脂質粒子と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。

## 【0161】

もう一つの局面において、本発明は、本明細書に記載された核酸-脂質粒子と細胞を接触させることを含む、PLK-1発現をサイレンシングするsiRNAを細胞へ導入する方法を提供する。

## 【0162】

一つの態様において、細胞は哺乳動物体内にある。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

40

## 【0163】

さらにもう一つの局面において、本発明は、本明細書に記載された核酸-脂質粒子を哺乳動物対象へ投与することを含む、核酸のインビボ送達の方法を提供する。

## 【0164】

いくつかの態様において、投与は、経口、鼻腔内、静脈内、腹腔内、筋肉内、関節内、病巣内、気管内、皮下、および皮内からなる群より選択される。好ましい態様において、哺乳動物対象はヒトである。

## 【0165】

さらなる局面において、本発明は、治療的に有効な量の本明細書に記載された核酸-脂

50

質粒子を哺乳動物対象へ投与することを含む、その必要のある哺乳動物対象において癌を処置する方法を提供する。

【0166】

ある種の態様において、癌は肝臓癌（例えば、肝細胞癌）である。好ましい態様において、哺乳動物対象はヒトである。

【0167】

もう一つの局面において、本発明は、本明細書に記載された修飾siRNA分子と細胞を接触させることを含む、PLK-1発現をサイレンシングするsiRNAを細胞へ導入する方法を提供する。

【0168】

一つの態様において、修飾siRNA分子は、担体系の中にある。担体系は、例えば、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、またはそれらの混合物であり得る。典型的には、核酸複合体は、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、シクロデキストリン、またはそれらの混合物と複合体化された修飾siRNA分子を含む。ある種の例において、修飾siRNA分子は、ポリエチレンイミン（PEI）であるカチオン性ポリマーと複合体化される。好ましい態様において、担体系は、修飾siRNA分子と、カチオン性脂質と、非カチオン性脂質とを含む核酸-脂質粒子である。

【0169】

ある種の態様において、核酸-脂質粒子は、粒子の凝集を防止する複合脂質をさらに含む。他の態様において、核酸-脂質粒子の存在は、粒子の投与の少なくとも1時間後に検出可能である。さらに他の態様において、多数の粒子のうちの10%超が、投与の約1時間後に哺乳動物の血漿中に存在する。さらなる態様において、細胞は哺乳動物体内にある。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0170】

さらにもう一つの局面において、本発明は、本明細書に記載された修飾siRNA分子を哺乳動物対象へ投与することを含む、PLK-1発現をサイレンシングするsiRNAのインビボ送達の方法を提供する。

【0171】

一つの態様において、修飾siRNA分子は、担体系の中にある。担体系は、例えば、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、またはそれらの混合物であり得る。典型的には、核酸複合体は、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、シクロデキストリン、またはそれらの混合物と複合体化された修飾siRNA分子を含む。ある種の例において、修飾siRNA分子は、ポリエチレンイミン（PEI）であるカチオン性ポリマーと複合体化される。好ましい態様において、担体系は、修飾siRNA分子と、カチオン性脂質と、非カチオン性脂質とを含む核酸-脂質粒子である。

【0172】

ある種の態様において、核酸-脂質粒子は、粒子の凝集を防止する複合脂質をさらに含む。他の態様において、投与は、経口、鼻腔内、静脈内、腹腔内、筋肉内、関節内、病巣内、気管内、皮下、および皮内からなる群より選択される。好ましい態様において、哺乳動物対象はヒトである。

【0173】

さらにもう一つの局面において、本発明は、治療的に有効な量の本明細書に記載された修飾siRNA分子を哺乳動物対象へ投与することを含む、その必要のある哺乳動物対象において癌を処置する方法を提供する。

【0174】

ある種の態様において、癌は、肝臓癌（例えば、肝細胞癌）である。好ましい態様において、哺乳動物対象はヒトである。

【0175】

さらなる局面において、本発明は、  
(a) 免疫刺激特性を有し、かつ約15～約60ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む、PLK-1発

10

20

30

40

50

現をサイレンシングすることができる未修飾siRNA配列を準備する段階；および  
 (b) 1個または複数個のヌクレオチドを修飾ヌクレオチドに置換することにより、未修飾siRNA配列を修飾し、それにより、未修飾siRNA配列より低免疫刺激性であり、かつPLK-1発現をサイレンシングすることができる修飾siRNA分子を作製する段階を含む、PLK-1発現をサイレンシングする免疫刺激性siRNAを修飾する方法を提供する。

【0176】

一つの態様において、修飾siRNA分子は、2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、ロックド核酸(LNA)ヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択される修飾ヌクレオチドを含む。好ましい態様において、修飾siRNA分子は2'OMeヌクレオチドを含む。非限定的な例として、2'OMeヌクレオチドは、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択され得る。

10

【0177】

典型的には、未修飾siRNA配列のヌクレオチドのうち2個、3個、4個、5個、6個、7個、またはそれ以上が、修飾ヌクレオチドに置換されている。いくつかの態様において、未修飾siRNA配列の二本鎖領域のヌクレオチドのうち約25%未満が、修飾ヌクレオチドに置換される。他の態様において、未修飾siRNA配列の二本鎖領域のヌクレオチドのうち約20%未満が、修飾ヌクレオチドに置換される。さらに他の態様において、未修飾siRNA配列の二本鎖領域のヌクレオチドのうち約15%未満が、修飾ヌクレオチドに置換される。付加的な態様において、未修飾siRNA配列の二本鎖領域のヌクレオチドのうち約10%~約20%が、修飾ヌクレオチドに置換される。

20

【0178】

ある種の例において、修飾siRNA分子は、未修飾siRNA配列より少なくとも約70%低免疫刺激性である。ある種の他の例において、修飾siRNA分子は、未修飾siRNA配列のもの10倍以下である $IC_{50}$ を有する。

【0179】

いくつかの態様において、方法は、  
 (c) 修飾siRNA分子を哺乳動物応答細胞と、該応答細胞が検出可能な免疫応答を生ずるのに適した条件の下で接触させることにより、修飾siRNA分子が低免疫刺激性であることを確認する段階をさらに含む。

30

【0180】

関連する局面において、本発明は、  
 (a) PLK-1発現をサイレンシングすることができる未修飾siRNA配列を、哺乳動物応答細胞と、該応答細胞が検出可能な免疫応答を生ずるのに適した条件の下で接触させる段階；  
 (b) 応答細胞における検出可能な免疫応答の存在により、未修飾siRNA配列を、免疫刺激性siRNAとして同定する段階；および  
 (c) 1個または複数個のヌクレオチドを修飾ヌクレオチドに置換することにより、未修飾siRNA配列を修飾し、それにより、未修飾siRNA配列より低免疫刺激性である修飾siRNA分子を作製する段階を含む、PLK-1発現をサイレンシングする免疫刺激性siRNAを同定しかつ修飾する方法を提供する。

40

【0181】

一つの態様において、修飾siRNA分子は、2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、ロックド核酸(LNA)ヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択される修飾ヌクレオチドを含む。好ましい態様において、修飾siRNA分子は2'OMeヌクレオチドを含む。非限定的な例として、2'OMeヌクレオチドは、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群

50

より選択され得る。

【0182】

典型的には、未修飾siRNA配列のヌクレオチドのうちの2個、3個、4個、5個、6個、7個、またはそれ以上が、修飾ヌクレオチドに置換される。いくつかの態様において、未修飾siRNA配列の二本鎖領域のヌクレオチドのうちの約25%未満が、修飾ヌクレオチドに置換される。他の態様において、未修飾siRNA配列の二本鎖領域のヌクレオチドのうちの約20%未満が、修飾ヌクレオチドに置換される。さらに他の態様において、未修飾siRNA配列の二本鎖領域のヌクレオチドのうちの約15%未満が、修飾ヌクレオチドに置換される。付加的な態様において、未修飾siRNA配列の二本鎖領域のヌクレオチドのうちの約10%～約20%が、修飾ヌクレオチドに置換される。

10

【0183】

ある種の例において、修飾siRNA分子は、未修飾siRNA配列より少なくとも約70%低免疫刺激性である。ある種の他の場合、修飾siRNA分子は、未修飾siRNA配列のものの10倍以下であるIC<sub>50</sub>を有する。

【0184】

いくつかの態様において、哺乳動物応答細胞は、末梢血単核細胞または樹状細胞である。他の態様において、検出可能な免疫応答は、TNF-、IFN-、IFN-、IFN-、IL-6、IL-12、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインまたは増殖因子の産生を含む。さらなる態様において、検出可能な免疫応答は、テトラトリコペプチドリピートを含むインターフェロンにより誘導されるタンパク質1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1)) mRNAの誘導を含む。

20

【0185】

もう一つの局面において、本発明は、化学療法薬の投与前に、PLK-1発現をサイレンシングするsiRNA分子と細胞を接触させることを含む、化学療法薬の効果に対して細胞を感作する方法を提供する。

【0186】

一つの態様において、siRNA分子は、約15～約60ヌクレオチド長の二本鎖領域を含む。もう一つの態様において、細胞は、PLK-1発現をサイレンシングする修飾siRNA分子と接触させられる。ある種の例において、二本鎖領域のヌクレオチドのうちの1個または複数個が修飾ヌクレオチドを含む。好ましくは、修飾ヌクレオチドは、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択される。ある種の他の例において、修飾siRNA分子は対応する未修飾siRNA配列より低免疫刺激性である。

30

【0187】

いくつかの態様において、siRNA分子は担体系の中にある。担体系の非限定的な例には、核酸-脂質粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、およびそれらの混合物が含まれる。好ましい態様において、担体系は、siRNA分子と、カチオン性脂質と、非カチオン性脂質とを含む核酸-脂質粒子である。

【0188】

他の態様において、核酸-脂質粒子は、粒子の凝集を防止する複合脂質をさらに含む。ある種の例において、細胞は癌細胞である。さらなる態様において、癌細胞は哺乳動物体内にある。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

40

【0189】

ある種の態様において、化学療法薬は、パクリタクセル、フルオロウラシル (5-FU)、イリノテカン、ソラフェニブ、およびそれらの混合物からなる群より選択される。

【0190】

さらなる局面において、本発明は、PLK-1発現を標的とする本明細書に記載された非対称干渉RNA (aiRNA) 分子を含む組成物、およびPLK-1発現をサイレンシングするためのそのような組成物の使用方法を提供する。

【0191】

50

一つの態様において、aiRNA分子は、約10～約25（塩基対合）ヌクレオチド長の二本鎖（二重鎖）領域を含み、5'突出および3'突出を含むアンチセンス鎖を含み、かつPLK-1発現をサイレンシングすることができる。

【0192】

ある種の例において、aiRNA分子は、約12～20、12～19、12～18、13～17、または14～17（塩基対合）ヌクレオチド長、より典型的には、12、13、14、15、16、17、18、19、または20（塩基対合）ヌクレオチド長の二本鎖（二重鎖）領域を含む。ある種の他の例において、アンチセンス鎖の5'突出および3'突出は、標的PLK-1 mRNAに対して相補的である配列を含み、任意で、非ターゲティング配列をさらに含んでいてもよい。いくつかの態様において、アンチセンス鎖の5'突出および3'突出は、各々、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、またはよりそれ以上のヌクレオチドを含むかまたはからなる。PLK-1 mRNAを標的とする例示的なaiRNA分子は、表8に提供される。

10

【0193】

他の態様において、aiRNA分子は、2'-O-メチル（2'OMe）ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'F）ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル）（MOE）ヌクレオチド、ロックド核酸（LNA）ヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択される修飾ヌクレオチドを含む。好ましい態様において、aiRNA分子は2'OMeヌクレオチドを含む。非限定的な例として、2'OMeヌクレオチドは、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択され得る。

20

【0194】

関連する局面において、本発明は、PLK-1発現を標的とする本明細書に記載されたマイクロRNA（miRNA）分子を含む組成物、およびPLK-1発現をサイレンシングするためのそのような組成物の使用方法を提供する。

【0195】

一つの態様において、miRNA分子は、約15～約60ヌクレオチド長を含み、かつPLK-1発現をサイレンシングすることができる。

【0196】

ある種の例において、miRNA分子は、約15～50、15～40、または15～30ヌクレオチド長、より典型的には、約15～25または19～25ヌクレオチド長を含み、好ましくは、約20～24、21～22、または21～23ヌクレオチド長である。好ましい態様において、miRNA分子は、PLK-1 mRNAを標的とする成熟miRNA分子である。PLK-1 mRNAを標的とする例示的なmiRNA分子は、表9に提供される。

30

【0197】

いくつかの態様において、miRNA分子は、2'-O-メチル（2'OMe）ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'F）ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル）（MOE）ヌクレオチド、ロックド核酸（LNA）ヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択される修飾ヌクレオチドを含む。好ましい態様において、miRNA分子は2'OMeヌクレオチドを含む。非限定的な例として、2'OMeヌクレオチドは、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、およびそれらの混合物からなる群より選択され得る。

40

【0198】

IV. 干渉RNA

A. siRNA

本発明の未修飾siRNA分子および修飾siRNA分子は、PLK-1発現をサイレンシングすることができ、典型的には、約15～60ヌクレオチド長である。修飾siRNA分子は、一般に、対応する未修飾siRNA配列より低免疫刺激性であり、かつ標的PLK-1配列に対するRNAi活性を保持している。いくつかの態様において、修飾siRNAは、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、2'OMe-アデノシンヌクレオチド、および/または2'OMe-シトシンヌクレオチドのような、2'OMeプリンヌクレオチドまたは2'OMeピリミジンヌクレ

50

オチドを少なくとも1個含有している。好ましい態様において、ウリジンヌクレオチドおよび/またはグアノシンヌクレオチドのうちの1個または複数個が修飾されている。修飾ヌクレオチドは、siRNAの一方の鎖（即ち、センスもしくはアンチセンス）に存在してもよいし、または両方の鎖に存在してもよい。siRNA配列は、突出（例えば、Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188(2001)もしくはNykanen et al., *Cell*, 107:309(2001)に記載されたような、3'突出もしくは5'突出）を有していてもよいし、または突出を欠いていてもよい（即ち、平滑末端を有していてもよい）。

#### 【0199】

修飾siRNAは、一般に、siRNA二重鎖の二本鎖領域に、約1%～約100%（例えば、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%）の修飾ヌクレオチドを含む。ある種の態様において、siRNAの二本鎖領域のヌクレオチドのうちの1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上が、修飾ヌクレオチドを含む。

10

#### 【0200】

いくつかの態様において、siRNAの二本鎖領域のヌクレオチドのうちの約25%未満（例えば、約25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%未満）が、修飾ヌクレオチドを含む。

20

#### 【0201】

他の態様において、siRNAの二本鎖領域のヌクレオチドのうちの約1%～約25%（例えば、約1%～25%、2%～25%、3%～25%、4%～25%、5%～25%、6%～25%、7%～25%、8%～25%、9%～25%、10%～25%、11%～25%、12%～25%、13%～25%、14%～25%、15%～25%、16%～25%、17%～25%、18%～25%、19%～25%、20%～25%、21%～25%、22%～25%、23%～25%、もしくは24%～25%）または約1%～約20%（例えば、約1%～20%、2%～20%、3%～20%、4%～20%、5%～20%、6%～20%、7%～20%、8%～20%、9%～20%、10%～20%、11%～20%、12%～20%、13%～20%、14%～20%、15%～20%、16%～20%、17%～20%、18%～20%、もしくは19%～20%）が、修飾ヌクレオチドを含む。

30

#### 【0202】

さらなる態様において、例えば、siRNAの一方の鎖または両方の鎖がウリジンヌクレオチドおよび/またはグアノシンヌクレオチドにおいて選択的に修飾される場合、得られた修飾siRNAは、約30%未満の修飾ヌクレオチド（例えば、約30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満の修飾ヌクレオチド）または約1%～約30%の修飾ヌクレオチド（例えば、約1%～30%、2%～30%、3%～30%、4%～30%、5%～30%、6%～30%、7%～30%、8%～30%、9%～30%、10%～30%、11%～30%、12%～30%、13%～30%、14%～30%、15%～30%、16%～30%、17%～30%、18%～30%、19%～30%、20%～30%、21%～30%、22%～30%、23%～30%、24%～30%、25%～30%、26%～30%、27%～30%、28%～30%、もしくは29%～30%の修飾ヌクレオチド）を含み得る。

40

#### 【0203】

##### 1. siRNA配列の選択

適当なsiRNA配列は、当技術分野において公知の任意の手段を使用して同定され得る。典型的には、Elbashir et al., *Nature*, 411:494-498(2001)およびElbashir et al., *EMBO J.*, 20:6877-6888(2001)に記載された方法が、Reynolds et al., *Nature Biotech.*, 22(3):326-330(2004)に示された合理的設計の規則と組み合わせられる。

#### 【0204】

一般に、関心対象の標的遺伝子に由来する転写物のAUG開始コドンの3'側のヌクレオチ

50

ド配列を、ジヌクレオチド配列（例えば、AA、NA、CC、GG、またはUU（N=C、G、またはU））に関してスキャンする（例えば、Elbashir et al., EMBO J., 20:6877-6888(2001)参照）。ジヌクレオチド配列の直ぐ3'側のヌクレオチドを、可能性のあるsiRNA配列（即ち、標的配列またはセンス鎖配列）として同定する。典型的には、ジヌクレオチド配列の直ぐ3'側の19個、21個、23個、25個、27個、29個、31個、33個、35個、またはよりそれ以上のヌクレオチドを、可能性のあるsiRNA配列として同定する。いくつかの態様において、ジヌクレオチド配列は、AA配列またはNA配列であり、AAジヌクレオチドまたはNAジヌクレオチドの直ぐ3'側の19ヌクレオチドを可能性のあるsiRNA配列として同定する。siRNA配列は、通常、標的遺伝子の長さに沿って異なる位置に間隔をあけて存在する。siRNA配列のサイレンシング効率をさらに増強するため、可能性のあるsiRNA配列を、例えば、標的細胞または標的生物の、他のコーディング配列と相同な領域を含有していない部位を同定するために分析することができる。例えば、約21塩基対の適当なsiRNA配列は、典型的には、標的細胞または標的生物のコーディング配列と相同な16~17個超の連続塩基対を有しないであろう。siRNA配列をRNA Pol IIIプロモーターから発現させたい場合には、4個超の連続するAまたはTを欠くsiRNA配列が選択される。

10

**【0205】**

可能性のあるsiRNA配列が同定されたならば、相補的な配列（即ち、アンチセンス鎖配列）を設計することができる。可能性のあるsiRNA配列を、当技術分野において公知の多様な基準を使用して分析することもできる。例えば、サイレンシング効率を増強するため、以下の特色のうちの一つまたは複数を有する配列を同定する合理的設計アルゴリズムにより、siRNA配列を分析することができる：（1）約25%~約60%G/CのG/C含量；（2）センス鎖の15~19位に少なくとも3個のA/U；（3）内部リピートなし；（4）センス鎖の19位がA；（5）センス鎖の3位がA；（6）センス鎖の10位がU；（7）センス鎖の19位がG/Cではない；および（8）センス鎖の13位がGではない。これらの特色の各々の適当な値を割り当てるアルゴリズムが組み入れられた、siRNAの選択のために有用なsiRNA設計ツールは、例えば、<http://boz094.ust.hk/RNAi/siRNA>に見出され得る。上記の特徴のうちの一つまたは複数を有する配列が、可能性のあるsiRNA配列としてのさらなる分析および試験のため選択され得ることを、当業者は認識するであろう。

20

**【0206】**

さらに、以下の基準のうちの一つまたは複数を有する可能性のあるsiRNA配列は、しばしば、siRNAとして排除され得る：（1）4個以上の連続する同一塩基のストレッチを含む配列；（2）Gのホモポリマーを含む配列（即ち、これらのポリマーの構造的特徴による可能性のある非特異的効果を低下させるため；（3）三重塩基モチーフ（例えば、GGG、CCC、AA、またはTTT）を含む配列；（4）7個以上の連続するG/Cのストレッチを含む配列；および（5）内部フォールドバック構造をもたらず、候補内に4塩基以上の直接リピートを含む配列。しかしながら、上記の特徴の一つまたは複数を有する配列であっても、可能性のあるsiRNA配列としてのさらなる分析および試験のため選択され得ることを、当業者は認識するであろう。

30

**【0207】**

いくつかの態様において、可能性のあるsiRNA配列は、例えば、Khvorova et al., Cell, 115:209-216(2003)；およびSchwarz et al., Cell, 115:199-208(2003)に記載されるような、siRNA二重鎖非対称性にに基づき、さらに分析され得る。他の態様において、可能性のあるsiRNA配列は、例えば、Luo et al., Biophys. Res. Commun., 318:303-310(2004)に記載されるように、mRNA標的部位における二次構造に基づき、さらに分析され得る。例えば、mRNA二次構造は、塩基対合およびステムループの形態の比較的小さい二次構造が存在する、mRNA標的部位への接近可能性にとって好都合なsiRNA配列を選択するMfoldアルゴリズム（<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>で入手可能）を使用してモデル化され得る。

40

**【0208】**

可能性のあるsiRNA配列が同定されたならば、その配列は、例えば、インビトロサイト

50

カインアッセイまたはインビボ動物モデルを使用して、免疫刺激特性の存在に関して分析され得る。GUリッチモチーフ（例えば、5'-GU-3'、5'-UGU-3'、5'-GUGU-3'、5'-UGUGU-3'等）のようなsiRNA配列のセンス鎖および/またはアンチセンス鎖のモチーフも、配列が免疫刺激性であるか否かの指標を提供することができる。siRNA分子が免疫刺激性であることが見出されたならば、次いで、それを、本明細書に記載されるように、免疫刺激特性を減少させるために修飾することができる。非限定的な例として、siRNAが免疫刺激性siRNAであるかまたは非免疫刺激性siRNAであるかを決定するためには、細胞が検出可能な免疫応答を生ずるような条件の下で、siRNA配列を哺乳動物応答細胞と接触させることができる。哺乳動物応答細胞は、未感作の哺乳動物（即ち、以前にsiRNA配列の遺伝子産物と接触したことがない哺乳動物）に由来し得る。哺乳動物応答細胞は、例えば、末梢血単核細胞（PBMC）、マクロファージ等であり得る。検出可能な免疫応答には、例えば、TNF-、IFN-、IFN-、IFN-、IL-6、IL-12、またはそれらの組み合わせのようなサイトカインまたは増殖因子の産生が含まれ得る。次いで、免疫刺激性であることが同定されたsiRNA分子は、センス鎖および/またはアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの少なくとも1個を修飾ヌクレオチドに交換することにより、免疫刺激特性を減少させるために修飾され得る。例えば、siRNA二重鎖の二本鎖領域内のヌクレオチドのうちの約30%未満（例えば、約30%、25%、20%、15%、10%、または5%未満）が、2'OMeヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドに交換され得る。次いで、修飾siRNAは、免疫刺激特性が低下したかまたは抑止されたことを確認するため、上記のような哺乳動物応答細胞と接触させられ得る。

【0209】

免疫応答を検出するための適当なインビトロアッセイには、Davidら（米国特許第4,376,110号）の二重モノクローナル抗体サンドイッチイムノアッセイ技術；モノクローナル-ポリクローナル抗体サンドイッチアッセイ（Wide et al., in Kirkham and Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. and S. Livingstone, Edinburgh(1970)）；Gordonら（米国特許第4,452,901号）の「ウェスタンブロット」法；標識されたりガンドの免疫沈降（Brown et al., J. Biol. Chem., 255:4980-4983(1980)）；例えば、Raines et al., J. Biol. Chem., 257:5154-5160(1982)により記載されたような酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）；蛍光色素の使用を含む免疫細胞化学的技術（Brooks et al., Clin. Exp. Immunol., 39:477(1980)）；および活性の中和（Bowen-Pope et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2396-2400(1984)）が含まれるが、これらに限定はされない。上記イムノアッセイに加え、米国特許第3,817,827号；第3,850,752号；第3,901,654号；第3,935,074号；第3,984,533号；第3,996,345号；第4,034,074号；および第4,098,876号に記載されたものを含む、多数のその他のイムノアッセイも利用可能である。

【0210】

免疫応答を検出するためのインビボモデルの非限定的な例には、例えば、Judge et al., Mol. Ther., 13:494-505(2006)に記載されたようなインビボマウスサイトカイン誘導アッセイが含まれる。ある種の態様において、以下のように実施され得るアッセイ：(1) siRNAを、外側尾静脈への標準的な静脈内注射により投与することができる；(2) 投与の約6時間後、心臓穿刺により血液を収集し、サイトカイン分析のため血漿として加工することができる；そして(3) 製造業者の指示に従って、サンドイッチELISAキットを使用して、サイトカインを定量化することができる（例えば、マウスおよびヒトのIFN-（PBL Biomedical; Piscataway, NJ）；ヒトのIL-6およびTNF-（eBioscience; San Diego, CA）；およびマウスのIL-6、TNF-、およびIFN-（BD Biosciences; San Diego, CA））。

【0211】

サイトカインおよび増殖因子に特異的に結合するモノクローナル抗体は、複数の供給元から市販されており、当技術分野において公知の方法を使用して作製されてもよい（例えば、Kohler et al., Nature, 256: 495-497(1975)およびHarlow and Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publication, New York(1999)参照）。モノクローナル抗体の作製は、以前に記載されており、当技術分野において公知の任意の手段によって達成され得る（Buhring et al., in Hybridoma, Vol. 10, No. 1, pp. 77-78(1991)）。いくつ

10

20

30

40

50

かの方法において、モノクローナル抗体は、検出を容易にするため、（例えば、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、電気的手段、光学的手段、または化学的手段により検出可能な任意の組成物により）標識される。

#### 【0212】

### 2. siRNA分子の作製

siRNAは、いくつかの形態で提供され得、例えば、一つもしくは複数の単離された低分子干渉RNA (siRNA) 二重鎖として、比較的長い二本鎖RNA (dsRNA) として、またはDNAプラスミド内の転写カセットから転写されるsiRNAもしくはdsRNAとして提供され得る。siRNA配列は、突出（例えば、Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188(2001)もしくはNykanen et al., *Cell*, 107:309(2001)に記載されるような3'突出もしくは5'突出を有していてもよいし、または突出を欠いてもよい（即ち、平滑末端を有していてもよい）。

10

#### 【0213】

長いRNA前駆体を提供するためにRNA集団を使用することができ、または選択された標的配列との実質的なもしくは完全な同一性を有する長いRNA前駆体を、siRNAを作製するために使用することができる。RNAは、当業者に周知の方法に従って、細胞または組織から単離されてもよいし、合成されてもよいし、かつ/またはクローニングされてもよい。RNAは、混合集団（細胞または組織から入手されたもの、cDNAから転写されたもの、サブトラクシオンを受けたもの、選択されたもの等）であってもよいし、または単一の標的配列を表していてもよい。RNAは、（例えば、組織または細胞の試料から単離された）天然に存在するものであってもよいし、（例えば、T7ポリメラーゼもしくはSP6ポリメラーゼおよびPCR産物またはクローニングされたcDNAを使用して）インビトロ合成されてもよいし、または化学合成されてもよい。

20

#### 【0214】

長いdsRNAを形成するため、合成RNAの場合には、相補鎖もインビトロで転写し、dsRNAが形成されるようハイブリダイズさせる。天然に存在するRNA集団が使用される場合には、例えば、RNA集団に対応するcDNAを転写することによって、またはRNAポリメラーゼを使用することによって、（例えば、大腸菌RNase IIIまたはダイサーによる消化のためのdsRNAが形成されるよう）RNA相補鎖も提供される。次いで、RNA前駆体を、消化のための二本鎖RNAが形成されるようハイブリダイズさせる。dsRNAは、対象に直接投与されてもよいし、または投与前にインビトロで消化されてもよい。

30

#### 【0215】

RNAの単離、RNAの合成、核酸のハイブリダイゼーション、cDNAライブラリーの作製およびスクリーニング、ならびにPCRの実施のための方法は、当技術分野において周知であり（例えば、Gubler and Hoffman, *Gene*, 25:263-269(1983); Sambrook et al. (前記); Ausubel et al. (前記) 参照)、PCR法（米国特許第4,683,195号および第4,683,202号; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990) 参照）も同様である。発現ライブラリーも当業者に周知である。本発明において有用な一般的な方法を開示している付加的な基礎的な教科書には、Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); および *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994) が含まれる。

40

#### 【0216】

好ましくは、siRNAは化学合成される。本発明のsiRNA分子を含むオリゴヌクレオチドは、Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845(1987); Scaringe et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:5433(1990); Wincott et al., *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684(1995); および Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, 74:59(1997)に記載されたもののような、当技術分野において公知の多様な技術のうちの任意のものを使用して合成され得る。オリゴヌクレオチドの合成は、5'末のジメトキシトリチルおよび3'末のホスホラミダイトのような一般的な核酸の保護基およびカップリング基を使用する。非限定的な例として、小規模合成は0.2 μモルスケールプロトコルを使用して、Applied Biosystemsの合成装置で実施され得る。または、

50

0.2 μモルスケールでの合成は、Protogene (Palo Alto, CA) 製の96穴プレート合成装置で実施されてもよい。しかしながら、より大規模またはより小規模の合成も、本発明の範囲内である。オリゴヌクレオチド合成のための適当な試薬、RNA脱保護の方法、およびRNA精製の方法は、当業者に公知である。

#### 【0217】

本発明のsiRNA分子は、切断可能リンカーによって分離された単一の連続オリゴヌクレオチド断片または鎖として両方の鎖を合成し、続いて、siRNA二重鎖が形成されるようハイブリダイズする別々の断片または鎖を提供するため、切断可能リンカーを切断する、タンDEM合成技術を介して合成されてもよい。リンカーは、ポリヌクレオチドリンカーまたは非ヌクレオチドリンカーであり得る。siRNAのタンDEM合成は、マルチウェル/マルチプレート合成プラットフォームにも、バッチリアクター、合成カラム等を利用した大規模合成プラットフォームにも、容易に適合し得る。または、siRNA分子は、二つの別個のオリゴヌクレオチド（一方のオリゴヌクレオチドがsiRNAのセンス鎖を含み、他方がアンチセンス鎖を含む）から組み立てられてもよい。例えば、各鎖を別々に合成し、合成および/または脱保護の後、ハイブリダイゼーションまたはライゲーションによって接合することができる。ある種の他の例において、siRNA分子は、ヘアピン二次構造を有するsiRNA二重鎖が形成されるよう、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域がハイブリダイズする、単一の連続オリゴヌクレオチド断片として合成されてもよい。

#### 【0218】

### 3. siRNA配列の修飾

ある種の局面において、本発明のsiRNA分子は、2本の鎖（各鎖は約15～約60ヌクレオチド長である）を有し、かつ二本鎖領域内に少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを有する二重鎖を含む。有利なことに、修飾siRNAは、対応する未修飾siRNA配列より低免疫刺激性であるが、標的配列の発現をサイレンシングする能力を保持している。好ましい態様において、siRNA分子へ導入される化学的修飾の程度は、siRNAの免疫刺激特性の低下または抑止と、RNAi活性の保持との間のバランスをとる。非限定的な例として、PLK-1を標的とするsiRNA分子は、PLK-1発現をサイレンシングする能力を保持しながら、siRNAが生ずる免疫応答を排除するため、siRNA二重鎖内の選択的なウリジンヌクレオチドおよび/またはグアノシンヌクレオチドにおいて最小限に修飾され得る（例えば、約30%、25%、20%、15%、10%、または5%未満、修飾され得る）。

#### 【0219】

本発明において使用するのに適している修飾ヌクレオチドの例には、2'-O-メチル(2'OMe)基、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)基、2'-デオキシ基、5-C-メチル基、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)基、4'-チオ基、2'-アミノ基、または2'-C-アリル基を有するリボヌクレオチドが含まれるが、これらに限定はされない。例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag Ed. (1984)に記載されたもののようなノーザンコンフォメーションを有する修飾ヌクレオチドも、本発明のsiRNA分子において使用するのに適している。そのような修飾ヌクレオチドには、非限定的に、ロックド核酸(LNA)ヌクレオチド（例えば、2'-O,4'-C-メチレン-(D-リボフラノシル)ヌクレオチド）、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、2'-メチル-チオ-エチルヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-クロロ(2'Cl)ヌクレオチド、および2'-アジドヌクレオチドが含まれる。ある種の例において、本発明のsiRNA分子は、1個または複数個のG-クランプヌクレオチドを含む。G-クランプヌクレオチドとは、二重鎖内の相補グアニンヌクレオチドのワトソンクリック表面およびフーグスティーン表面の両方に水素結合する能力を付与する修飾を施されたシトシンアナログをさす（例えば、Lin et al., J. Am. Chem. Soc., 120:8531-8532(1998)参照）。さらに、例えば、C-フェニル、C-ナフチル、その他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミドのようなヌクレオチド塩基アナログ、3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、および6-ニトロインドールのようなニトロアゾール誘導体を有するヌクレオチド（例えば、Loakes, Nucl. Acids Res., 29:2437-2447(2001)参照）が、本発明のsiRNA分子に組み入れら

れ得る。

【0220】

ある種の態様において、本発明のsiRNA分子は、末端キャップモエティ、リン酸骨格修飾等のような一つまたは複数の化学的修飾をさらにも含む。末端キャップモエティの例には、非限定的に、反転デオキシ脱塩基残基、グリセリル修飾、4',5'-メチレンヌクレオチド、1-( $\beta$ -D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、1,5-アンヒドロヘキサトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド、 $\beta$ -ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、スレオ-ペントフラノシルヌクレオチド、非環式3',4'-セコヌクレオチド、非環式3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環式3,5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-反転ヌクレオチドモエティ、3'-3'-反転脱塩基モエティ、3'-2'-反転ヌクレオチドモエティ、3'-2'-反転脱塩基モエティ、5'-5'-反転ヌクレオチドモエティ、5'-5'-反転脱塩基モエティ、3'-5'-反転デオキシ脱塩基モエティ、5'-アミノ-アルキルホスフェート、1,3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート、3-アミノプロピルホスフェート、6-アミノヘキシルホスフェート、1,2-アミノドデシルホスフェート、ヒドロキシプロピルホスフェート、1,4-ブタンジオールホスフェート、3'-ホスホロアミデート、5'-ホスホロアミデート、ヘキシルホスフェート、アミノヘキシルホスフェート、3'-ホスフェート、5'-アミノ、3'-ホスホロチオエート、5'-ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、および架橋型もしくは非架橋型のメチルホスホネート、または5'-メルカプトモエティが含まれる(例えば、米国特許第5,998,203号;Beaucage et al.,Tetrahedron 49:1925 (1993)参照)。リン酸骨格修飾(即ち、修飾されたヌクレオチド間結合をもたらす)の非限定的な例には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミデート、カルバメート、カルボキシメチル、アセトアミデート、ポリアミド、スルホネート、スルホンアミド、スルファメート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、およびアルキルシリル置換が含まれる(例えば、Hunziker et al.,Nucleic Acid Analogues:Synthesis and Properties,in Modern Synthetic Methods,VCH,331-417(1995);Mesmaeker et al.,Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides,in Carbohydrate Modifications in Antisense Research,ACS,24-39(1994)参照)。そのような化学的修飾は、siRNAのセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末および/または3'末においてなされ得る。

【0221】

いくつかの態様において、siRNA分子のセンス鎖および/またはアンチセンス鎖は、約1~約4個(例えば、1個、2個、3個、または4個)の2'-デオキシリボヌクレオチド、および/または修飾ヌクレオチドと未修飾ヌクレオチドとの任意の組み合わせを有する3'末端突出をさらにも含んでいてもよい。本発明の修飾siRNA分子へ導入され得る修飾ヌクレオチドおよび化学的修飾の型の付加的な例は、例えば、英国特許GB 2,397,818 B、米国特許公開第20040192626号、第20050282188号、および第20070135372号に記載されている。

【0222】

本発明の修飾siRNA分子は、任意で、siRNAの一方の鎖または両方の鎖に、1個または複数個の非ヌクレオチドを含んでいてもよい。本明細書において使用されるように、「非ヌクレオチド」という用語は、糖および/またはリン酸の置換を含む、1個または複数個のヌクレオチド単位の代わりに核酸鎖へ組み入れられ得、残りの塩基が活性を示すことを可能にする任意の基または化合物をさす。基または化合物は、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシル、またはチミンのような一般的に認識されているヌクレオチド塩基を含有しておらず、従って、1'位に塩基を欠くという点で脱塩基である。

【0223】

他の態様において、siRNAの化学的修飾には、化学的に修飾されたsiRNA分子へのコンジュゲートの付着が含まれる。コンジュゲートは、例えば、生分解性リンカーのような共有結合性の付着を介して、化学的に修飾されたsiRNAのセンス鎖および/またはアンチセンス鎖の5'末および/または3'末に付着させられ得る。コンジュゲートは、例えば、カルバメート基またはその他の連結基を通して、化学的に修飾されたsiRNAに付着させられても

よい（例えば、米国特許公開第20050074771号、第20050043219号、および第20050158727号参照）。ある種の例において、コンジュゲートは、化学的に修飾されたsiRNAの細胞への送達を容易にする分子である。本発明の化学的に修飾されたsiRNAへの付着のために適しているコンジュゲート分子の例には、非限定的に、コレステロールのようなステロイド、ポリエチレングリコール（PEG）のようなグリコール、ヒト血清アルブミン（HSA）、脂肪酸、カロテノイド、テルペン、胆汁酸、葉酸類（例えば、葉酸、葉酸アナログ、およびそれらの誘導体）、糖（例えば、ガラクトース、ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルコース、マンノース、フルクトース、フコース等）、リン脂質、ペプチド、細胞取り込みを媒介することができる細胞受容体のリガンド、ならびにそれらの組み合わせ（例えば、米国特許公開第20030130186号、第20040110296号、および第20040249178号；米国特許第6,753,423号参照）が含まれる。他の例には、親油性モエティ、ビタミン、ポリマー、ペプチド、タンパク質、核酸、低分子、オリゴ糖、炭水化物クラスタ、インターカレーター、副溝結合剤、切断剤、ならびに米国特許公開第20050119470号および第20050107325号に記載された架橋剤コンジュゲート分子が含まれる。さらに他の例には、2'-O-アルキルアミン、2'-O-アルコキシアルキルアミン、ポリアミン、C5-カチオン性修飾ピリミジン、カチオン性ペプチド、グアニジニウム基、アミジニウム基、米国特許公開第20050153337号に記載されたカチオン性アミノ酸コンジュゲート分子が含まれる。付加的な例には、疎水性基、膜活性化化合物、細胞透過性化合物、細胞ターゲティングシグナル、相互作用修飾剤、および米国特許公開第20040167090号に記載された立体安定化剤コンジュゲート分子が含まれる。さらなる例には、米国特許公開第20050239739号に記載されたコンジュゲート分子が含まれる。化学的に修飾されたsiRNA分子に対して使用されるコンジュゲートの型およびコンジュゲーションの程度は、RNAi活性を保持しながら改善されたsiRNAの薬物動態学的プロファイル、生物学的利用能、および/または安定性に関して評価され得る。そのため、当業者は、多様な周知のインビトロ細胞培養物またはインビボ動物モデルのうちの任意のものを使用して、改良された特性および完全なRNAi活性を有するものを同定するため、様々なコンジュゲートが付着した化学的に修飾されたsiRNA分子をスクリーニングすることができる。

#### 【0224】

#### B. aiRNA

siRNAと同様に、非対称干渉RNA（aiRNA）も、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）を動員し、アンチセンス鎖の5'末から10位のヌクレオチドと11位のヌクレオチドとの間での標的mRNAの配列特異的な切断を媒介することにより、哺乳動物細胞において多様な遺伝子の効率的なサイレンシングをもたらすことができる（Sun et al., Nat. Biotech., 26:1379-1382(2008)）。典型的には、aiRNA分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を有する短いRNA二重鎖を含み、その二重鎖は、アンチセンス鎖の3'末および5'末に突出を含有している。センス鎖の両端が相補アンチセンス鎖と比較して短いため、aiRNAは、一般に、非対称である。いくつかの局面において、本発明のaiRNA分子は、siRNA分子に関して使用されるものに類似した条件の下で、設計され、合成され、アニーリングされ得る。非限定的な例として、aiRNA配列は、siRNA配列を選択するための上記の方法を使用して、選択され作製され得る。

#### 【0225】

もう一つの態様において、関心対象のmRNAを標的とするため、アンチセンス鎖の3'末および5'末に突出を有する、様々な長さ（例えば、約10~25、12~20、12~19、12~18、13~17、または14~17塩基対、より典型的には、12、13、14、15、16、17、18、19、または20塩基対）のaiRNA二重鎖が設計され得る。ある種の例において、aiRNA分子のセンス鎖は、約10~25、12~20、12~19、12~18、13~17、または14~17ヌクレオチド長、より典型的には、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である。ある種の他の例において、aiRNA分子のアンチセンス鎖は、約15~60、15~50、または15~40ヌクレオチド長、より典型的には、約15~30、15~25、または19~25ヌクレオチド長であり、好ましくは、約20~24、21~22、または21~23ヌクレオチド長である。

10

20

30

40

50

## 【0226】

いくつかの態様において、5'アンチセンス突出は、1個、2個、3個、4個、またはそれ以上の非ターゲティングヌクレオチド（例えば、「AA」、「UU」、「dTdT」等）を含有している。他の態様において、3'アンチセンス突出は、1個、2個、3個、4個、またはそれ以上の非ターゲティングヌクレオチド（例えば、「AA」、「UU」、「dTdT」等）を含有している。ある種の局面において、本明細書に記載されたaiRNA分子は、例えば、二本鎖（二重鎖）領域および/またはアンチセンス突出に1個または複数個の修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。非限定的な例として、aiRNA配列は、siRNA配列に関して上に記載された修飾ヌクレオチドのうちの1個または複数個を含んでいてもよい。好ましい態様において、aiRNA分子は、例えば、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、またはそれらの混合物のような2'OMeヌクレオチドを含む。

10

## 【0227】

ある種の態様において、本発明のaiRNA分子は、siRNA分子、例えば、PLK-1サイレンシング活性を示す本明細書に記載されたsiRNA分子のうちの一つのアンチセンス鎖に相当するアンチセンス鎖を含む。いくつかの例において、PLK-1 mRNAを標的とするaiRNAは、核酸-脂質粒子のような本明細書に記載された担体系を使用して投与される。好ましい態様において、核酸-脂質粒子は以下のものを含む：(a) PLK-1 mRNAを標的とする一つまたは複数のaiRNA分子；(b) カチオン性脂質（例えば、DLinDMA）；ならびに(c) 非カチオン性脂質（例えば、DSPC、DPPC、DSPE、および/またはコレステロール）。ある種の例において、核酸-脂質粒子は、粒子の凝集を防止する複合脂質（例えば、PEG-DAA）をさらに含んでいてもよい。PLK-1発現をモジュレート（例えば、サイレンシング）するのに適しているaiRNA分子の非限定的な例は、実施例17の表8に提供される。

20

## 【0228】

## C.miRNA

一般に、マイクロRNA (miRNA) は、遺伝子発現を調節する約21~23ヌクレオチド長の一本鎖RNA分子である。miRNAは、遺伝子によってコードされ、そのDNAから転写されるが、miRNAはタンパク質へは翻訳されず（非コーディングRNA）；その代わり、各第一転写物（pri-miRNA）が、pre-miRNAと呼ばれる短いステムループ構造へプロセシングされ、最終的に、機能的な成熟miRNAへとプロセシングされる。成熟miRNA分子は、一つまたは複数のメッセンジャーRNA (mRNA) 分子に部分的にまたは完全に相補的であり、それらの主要な機能は、遺伝子発現をダウンレギュレートすることである。miRNAの同定は、例えば、Lagos-Quintana et al., Science, 294:853-858 ; Lau et al., Science, 294:858-862 ; および Lee et al., Science, 294:862-864に記載されている。

30

## 【0229】

miRNAをコードする遺伝子は、プロセシングされた成熟miRNA分子よりはるかに長い。miRNAは、まず、キャップおよびポリAテールを有する第一転写物またはpri-miRNAとして転写され、細胞核において、pre-miRNAとして公知の短いおよそ70ヌクレオチドのステムループ構造へプロセシングされる。このプロセシングは、動物においては、ヌクレアーゼドロシャ (Drosha) および二本鎖RNA結合タンパク質パシャ (Pasha) からなるマイクロプロセッサー複合体として公知のタンパク質複合体によって実施される (Denli et al., Nature, 432:231-235(2004))。次いで、これらのpre-miRNAは、エンドヌクレアーゼダイサーとの相互作用によって細胞質において成熟miRNAへプロセシングされる。ダイサーは、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) の形成も開始させる (Bernstein et al., Nature, 409:363-366(2001))。DNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかが、miRNAを与えるための鋳型として機能することができる。

40

## 【0230】

ダイサーがpre-miRNAステムループを切断する時、二つの相補的な短いRNA分子が形成されるが、一方のみがRISC複合体へ組み込まれる。この鎖はガイド鎖として公知であり、5'末の安定性に基づき、RISC複合体内の触媒活性RNaseアルゴノートタンパク質によって選択される (Preall et al., Curr. Biol., 16:530-535(2006))。抗ガイド鎖またはパッセン

50

ジャー鎖として公知の残りの鎖は、RISC複合体基質として分解される (Gregory et al., Cell, 123:631-640(2005))。活性RISC複合体への組み込みの後、miRNAは、相補的なmRNA分子と塩基対合し、標的mRNA分解および/または翻訳サイレンシングを誘導する。

#### 【0231】

哺乳動物miRNAは、一般的に、標的mRNA配列の3'UTR内の部位に相補的である。ある種の例において、標的mRNAへのmiRNAのアニーリングは、タンパク質翻訳機構を阻止することにより、タンパク質翻訳を阻害する。ある種の他の例において、標的mRNAへのmiRNAのアニーリングは、RNA干渉 (RNAi) に類似している過程を通して、標的mRNAの切断および分解を容易にする。miRNAは、標的とされたmRNAに対応するゲノム部位のメチル化も標的とすることができる。一般に、miRNAは、集合的にmiRNPと呼ばれるタンパク質の補完物と会合して機能する。

10

#### 【0232】

ある種の局面において、本明細書に記載されたmiRNA分子は、約15~100、15~90、15~80、15~75、15~70、15~60、15~50、または15~40ヌクレオチド長、より典型的には、15~30、15~25、または19~25ヌクレオチド長であり、好ましくは、約20~24、21~22、または21~23ヌクレオチド長である。ある種の他の局面において、本明細書に記載されたmiRNA分子は1個または複数個の修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。非限定的な例として、miRNA配列は、siRNA配列に関して上に記載された修飾ヌクレオチドのうち1個または複数個を含んでいてもよい。好ましい態様において、miRNA分子は、例えば、2'OMe-グアノシンヌクレオチド、2'OMe-ウリジンヌクレオチド、またはそれらの混合物のような2'OMeヌクレオチドを含む。

20

#### 【0233】

いくつかの態様において、PLK-1 mRNAを標的とするmiRNAは、核酸-脂質粒子のような本明細書に記載された担体系を使用して投与される。好ましい態様において、核酸-脂質粒子は以下のものを含む：(a) PLK-1 mRNAを標的とする一つまたは複数のmiRNA分子；(b) カチオン性脂質 (例えば、DLinDMA)；ならびに(c) 非カチオン性脂質 (例えば、DSPC、DPPC、DSPE、および/またはコレステロール)。ある種の例において、核酸-脂質粒子は、粒子の凝集を防止する複合脂質 (例えば、PEG-DAA) をさらに含んでいてもよい。PLK-1発現をモジュレート (例えば、サイレンシング) するのに適しているmiRNA分子の非限定的な例は、実施例18の表9に提供される。

30

#### 【0234】

他の態様において、PLK-1 mRNAを標的とするmiRNAの活性を阻止する一つまたは複数の薬剤が、本明細書に記載された担体系 (例えば、核酸-脂質粒子) を使用して投与される。阻止剤の例には、立体的阻止オリゴヌクレオチド、ロックド核酸オリゴヌクレオチド、およびモルホリノオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定はされない。そのような阻止剤は、miRNAに直接結合してもよいし、または標的mRNAのmiRNA結合部位に結合してもよい。

#### 【0235】

### V. 干渉RNAを含有している担体系

一つの局面において、本発明は、一つまたは複数の本明細書に記載された干渉RNA、例えば、未修飾の、または修飾された、siRNA、aiRNA、またはmiRNAを含有している担体系を提供する。いくつかの態様において、担体系は、安定化された核酸-脂質粒子 (例えば、SNALPまたはSPLP)、カチオン性脂質、またはリボソーム核酸複合体 (即ち、リボプレックス)、リボソーム、ミセル、ピロソーム、またはそれらの混合物のような脂質に基づく担体系である。他の態様において、担体系は、カチオン性ポリマー-核酸複合体 (即ち、ポリプレックス) のようなポリマーに基づく担体系である。付加的な態様において、担体系は、シクロデキストリンポリマー-核酸複合体のようなシクロデキストリンに基づく担体系である。さらなる態様において、担体系は、カチオン性ペプチド-核酸複合体のようなタンパク質に基づく担体系である。好ましくは、担体系は、SNALPまたはSPLPのような安定化された核酸-脂質粒子である。当業者は、本発明の干渉RNAが、裸の分子としても

40

50

送達され得ることを認識するであろう。

【0236】

A. 安定化された核酸-脂質粒子

本発明の安定化された核酸-脂質粒子 (SNALP) は、典型的には、本明細書に記載されるような干渉RNA分子、カチオン性脂質 (例えば、式IまたはIIのカチオン性脂質)、および非カチオン性脂質を含む。SNALPは、脂質コンジュゲート (即ち、粒子の凝集を阻害する複合脂質) をさらに含んでいてもよい。いくつかの態様において、SNALPは、本明細書に記載された修飾干渉RNA分子のうちの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはそれ以上を、単独で、または少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはそれ以上の未修飾干渉RNA分子と組み合わせて、含むことができる。

10

【0237】

本発明のSNALPは、典型的には、約50nm~約150nm、より典型的には、約60nm~約130nm、より典型的には、約70nm~約110nm、最も典型的には、約70~約90nmの平均直径を有し、実質的に非毒性である。さらに、核酸は、核酸-脂質粒子中に存在する場合、水性溶液中でヌクレアーゼによる分解に対して抵抗性である。核酸-脂質粒子およびそれらの調製法は、例えば、米国特許第5,753,613号; 第5,785,992号; 第5,705,385号; 第5,976,567号; 第5,981,501号; 第6,110,745号; および第6,320,017号; ならびにPCT公開WO 96/40964に開示されている。

【0238】

1. カチオン性脂質

多様なカチオン性脂質のうちの任意のものが、本発明の安定化された核酸-脂質粒子において、単独で、または一つまたは複数の他のカチオン性脂質種または非カチオン性脂質種と組み合わせて、使用され得る。

20

【0239】

本発明において有用なカチオン性脂質は、生理的pHにおいて正味の正の電荷を保持している多数の脂質種のうちの任意のものであり得る。そのような脂質には、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、ジオクタデシルジメチルアンモニウム (DODMA)、ジステアリルジメチルアンモニウム (DSDMA)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムプロミド (DDAB)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミノウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (DOGS)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CLinDMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',1'-2'-オクタデカジエンオキシ)プロパン (CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、2,3-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン (DLinDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbDAP)、1,2-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinCDAP)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-XTC2-DMA)、およびそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。多数のこれらの脂質および関連アナログが、米国特許公開第20060083780号および第20060240554号; 米国特許第5,208,036号; 第5,264,618号; 第5,279,833号; 第5,283,185号; 第5,753,613号; および第5,785,992号; ならびにPCT公開WO 96/10390に記載されている。さらに、多数の市販のカチオン性脂質の調製物が入手可能であり、本発明において使用され得る。これらには、例えば、LIPOFECTIN (登録商標) (GIBCO/BRL (Grand Island, Ne

30

40

50



いくつかの態様において、カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約2モル%～約60モル%、約5モル%～約50モル%、約10モル%～約50モル%、約20モル%～約50モル%、約20モル%～約40モル%、約30モル%～約40モル%、または約40モル%を構成する。

【0243】

他の態様において、カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約50モル%～約85モル%、約50モル%～約80モル%、約50モル%～約75モル%、約50モル%～約65モル%、または約55モル%～約65モル%を構成する。

【0244】

粒子の意図された使用に依って、成分の割合を変動させてもよいこと、および特定の製剤の送達効率が、例えば、エンドソーム放出パラメーター（ERP）アッセイを使用して測定され得ることは、当業者には容易に明白であろう。

【0245】

## 2. 非カチオン性脂質

本発明の安定化された核酸-脂質粒子において使用される非カチオン性脂質は、安定な複合体を生ずることができる、多様な、電荷を有しない中性脂質、両性脂質、またはアニオン性脂質のうちの任意のものであり得る。

【0246】

非カチオン性脂質の非限定的な例には、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン（ESM）、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジセチルホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（POPE）、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルグリセロール（POPG）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（DOPE-mal）、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン（DSPA）、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジエライドイル-ホスファチジルエタノールアミン（DEPE）、ステアロイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（SOPE）、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、およびそれらの混合物のようなリン脂質が含まれる。その他のジアシルホスファチジルコリンリン脂質およびジアシルホスファチジルエタノールアミンリン脂質も、使用され得る。これらの脂質のアシル基は、好ましくは、 $C_{10}$ ～ $C_{24}$ 炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、またはオレオイルである。

【0247】

非カチオン性脂質の付加的な例には、コレステロール、ならびにコレスタノール、コレスタノン、コレステノン、およびコプロスタノールのようなその誘導体のようなステロールが含まれる。

【0248】

いくつかの態様において、SNALP中に存在する非カチオン性脂質は、コレステロールを含むかまたはからなる（例えば、リン脂質不含SNALP）。他の態様において、SNALP中に存在する非カチオン性脂質は、一つまたは複数のリン脂質を含むかまたはからなる（例えば、コレステロール不含SNALP）。さらなる態様において、SNALP中に存在する非カチオン性脂質は、一つまたは複数のリン脂質とコレステロールとの混合物を含むかまたはからなる。

【0249】

10

20

30

40

50

本発明において使用するのに適している非カチオン性脂質の他の例には、例えば、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、アセチルパルミテート、グリセロールリシノレエート、ヘキサデシルステレエート、イソプロピルミリステート、両性アクリルポリマー、トリエタノールアミン-ラウリルスルフェート、アルキル-アリアルスルフェートポリエチルオキシ化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチルアンモニウムブロミド、セラミド、スフィンゴミエリン等のような非リン含有脂質が含まれる。

#### 【0250】

いくつかの態様において、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約5モル% ~ 約90モル%、約10モル% ~ 約85モル%、約20モル% ~ 約80モル%、約10モル% (例えば、リン脂質のみ)、または約60モル% (例えば、リン脂質およびコレステロール) を構成する。コレステロールまたはコレステロール誘導体は、存在する場合、典型的には、粒子中に存在する全脂質の約0モル% ~ 約10モル%、約2モル% ~ 約10モル%、約10モル% ~ 約60モル%、約12モル% ~ 約58モル%、約20モル% ~ 約55モル%、約30モル% ~ 約50モル%、または約48モル% を構成する。

10

#### 【0251】

他の態様において、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約13モル% ~ 約49.5モル%、約20モル% ~ 約45モル%、約25モル% ~ 約45モル%、約30モル% ~ 約45モル%、約35モル% ~ 約45モル%、約20モル% ~ 約40モル%、約25モル% ~ 約40モル%、または約30モル% ~ 約40モル% を構成する。

20

#### 【0252】

ある種の態様において、リン脂質不含核酸-脂質粒子中に存在するコレステロールは、粒子中に存在する全脂質の約30モル% ~ 約45モル%、約30モル% ~ 約40モル%、約35モル% ~ 約45モル%、または約35モル% ~ 約40モル% を構成する。非限定的な例として、リン脂質不含核酸-脂質粒子は、粒子中に存在する全脂質の約37モル%のコレステロールを含むことができる。

#### 【0253】

ある種の他の態様において、リン脂質とコレステロールとの混合物を含有している核酸-脂質粒子中に存在するコレステロールは、粒子中に存在する全脂質の約30モル% ~ 約40モル%、約30モル% ~ 約35モル%、または約35モル% ~ 約40モル% を構成する。非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む核酸-脂質粒子は、粒子中に存在する全脂質の約34モル%のコレステロールを含むことができる。

30

#### 【0254】

核酸-脂質粒子がリン脂質とコレステロールとの混合物を含有している態様において、リン脂質は、粒子中に存在する全脂質の約2モル% ~ 約12モル%、約4モル% ~ 約10モル%、約5モル% ~ 約10モル%、約5モル% ~ 約9モル%、または約6モル% ~ 約8モル% を構成し得る。非限定的な例として、リン脂質とコレステロールとの混合物を含む核酸-脂質粒子は、粒子中に存在する全脂質の約7モル%のDPPCのようなリン脂質を含むことができる。

#### 【0255】

### 3. 脂質コンジュゲート

カチオン性脂質および非カチオン性脂質に加えて、本発明の安定化された核酸-脂質粒子は脂質コンジュゲートを含んでいてもよい。複合脂質は、粒子の凝集を防止するため有用である。適当な複合脂質には、PEG-脂質コンジュゲート、ATTA-脂質コンジュゲート、カチオン性ポリマー-脂質コンジュゲート (CPL)、およびそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。ある種の態様において、粒子は、CPLと共に、PEG-脂質コンジュゲートまたはATTA-脂質コンジュゲートのいずれかを含む。

40

#### 【0256】

好ましい態様において、脂質コンジュゲートはPEG-脂質である。PEG-脂質の例には、例えば、PCT公開WO 05/026372に記載されたようなジアルキルオキシプロピルにカップリングされたPEG (PEG-DAA)、例えば、米国特許公開第20030077829号および第2005008689号

50

に記載されたようなジアシルグリセロールにカップリングされたPEG (PEG-DAG)、ホスファチジルエタノールアミンのようなリン脂質にカップリングされたPEG (PEG-PE)、例えば、米国特許第5,885,613号に記載されたようなセラミドにコンジュゲートされたPEG、コレステロールまたはその誘導体にコンジュゲートされたPEG、ならびにそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。付加的なPEG-脂質には、非限定的に、PEG-C-DMG、2KPEG-DMG、およびそれらの混合物が含まれる。

#### 【0257】

PEGは、2個の末端ヒドロキシル基を有するエチレンPEG反復単位の直鎖型の水溶性ポリマーである。PEGは分子量によって分類される；例えば、PEG 2000は、約2,000ダルトンの平均分子量を有し、PEG 5000は、約5,000ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、Sigma Chemical Co.およびその他の会社から市販されており、例えば、モノメトキシポリエチレングリコール (MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシネート (MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシンイミジルスクシネート (MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコール-アミン (MePEG-NH<sub>2</sub>)、モノメトキシポリエチレングリコール-トレシレート (MePEG-TRES)、およびモノメトキシポリエチレングリコール-イミダゾリル-カルボニル (MePEG-IM) を含む。米国特許第6,774,180号および第7,053,150号に記載されたもの (例えば、mPEG (20KDa) アミン) のようなその他のPEGも、本発明のPEG-脂質コンジュゲートを調製するために有用である。さらに、モノメトキシポリエチレングリコール-酢酸 (MePEG-CH<sub>2</sub>COOH) は、例えば、PEG-DAAコンジュゲートを含む、PEG-脂質コンジュゲートを調製するために特に有用である。

#### 【0258】

好ましい態様において、PEGは、約550ダルトン～約10,000ダルトン、より好ましくは、約750ダルトン～約5,000ダルトン、より好ましくは、約1,000ダルトン～約5,000ダルトン、より好ましくは、約1,500ダルトン～約3,000ダルトン、さらに好ましくは、約2,000ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、アルキル基、アルコキシ基、アシル基、またはアリール基により置換されていてもよい。PEGは、脂質に直接コンジュゲートされていてもよいし、またはリンカーモエティを介して脂質に連結されていてもよい。例えば、非エステル含有リンカーモエティおよびエステル含有リンカーモエティを含む、PEGを脂質にカップリングするのに適している任意のリンカーモエティが使用され得る。好ましい態様において、リンカーモエティは非エステル含有リンカーモエティである。本明細書において使用されるように、「非エステル含有リンカーモエティ」という用語は、カルボン酸エステル結合 (-OC(O)-) を含有していないリンカーモエティをさす。適当な非エステル含有リンカーモエティには、アミド (-C(O)NH-)、アミノ (-NR-)、カルボニル (-C(O)-)、カルバメート (-NHC(O)O-)、尿素 (-NHC(O)NH-)、ジスルフィド (-S-S-)、エーテル (-O-)、スクシニル (-O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、スクシンアミジル (-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、エーテル、ジスルフィドが含まれ、(カルバメートリンカーモエティおよびアミドリンカーモエティの両方を含有しているリンカーのような) それらの組み合わせも含まれるが、これらに限定はされない。好ましい態様において、カルバメートリンカーが、PEGを脂質にカップリングするために使用される。

#### 【0259】

他の態様において、エステル含有リンカーモエティが、PEGを脂質にカップリングするために使用される。適当なエステル含有リンカーモエティには、例えば、カーボネート (-OC(O)O-)、スクシノイル、リン酸エステル (-O-(O)POH-O-)、スルホン酸エステル、およびそれらの組み合わせが含まれる。

#### 【0260】

変動する鎖長および飽和度の多様なアシル鎖基を有するホスファチジルエタノールアミンが、脂質コンジュゲートが形成されるよう、PEGにコンジュゲートされ得る。そのようなホスファチジルエタノールアミンは、市販されているか、または当業者に公知の従来の技術を使用して単離もしくは合成され得る。C<sub>10</sub>～C<sub>20</sub>の範囲の炭素鎖長を有する飽和または不飽和の脂肪酸を含有しているホスファチジル-エタノールアミンが好ましい。一価不

10

20

30

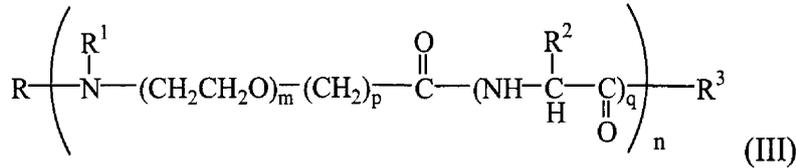
40

50

飽和脂肪酸または二価不飽和脂肪酸および飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸との混合物を含むホスファチジルエタノールアミンも使用され得る。適当なホスファチジルエタノールアミンには、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、およびジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (DSPE) が含まれるが、これらに限定はされない。

【 0 2 6 1 】

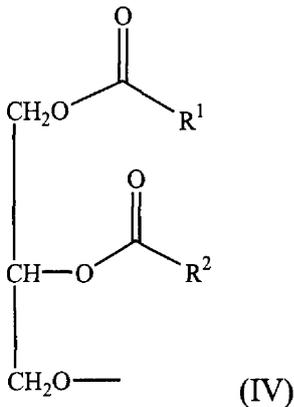
「ATTA」または「ポリアミド」という用語は、非限定的に、米国特許第6,320,017号および第6,586,559号に開示された化合物をさす。これらの化合物には、式：



を有する化合物が含まれる。式中、Rは、水素、アルキル、およびアシルからなる群より選択されるメンバーであり；R<sup>1</sup>は、水素およびアルキルからなる群より選択されるメンバーであり；または、任意で、RおよびR<sup>1</sup>およびそれらが結合している窒素は、アジドモエティを形成しており；R<sup>2</sup>は、水素、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアリール、およびアミノ酸の側鎖より選択される群のメンバーであり；R<sup>3</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、メルカプト、ヒドラジノ、アミノ、およびNR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>（式中、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は、独立に、水素またはアルキルである）からなる群より選択されるメンバーであり；nは4~80であり；mは2~6であり；pは1~4であり；かつqは0または1である。その他のポリアミドも本発明の化合物において使用され得ることは、当業者に明白であろう。

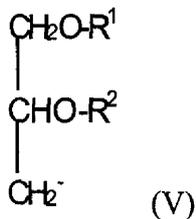
【 0 2 6 2 】

「ジアシルグリセロール」という用語は、2個の脂肪族アシル鎖、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>を有する化合物をさす。R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、両方とも、エステル結合によってグリセロールの1位および2位に結合した2~30個の炭素を独立に有する。アシル基は、飽和であってもよいし、または変動する不飽和度を有していてもよい。適当なアシル基には、ラウロイル (C<sub>12</sub>)、ミリストイル (C<sub>14</sub>)、パルミトイル (C<sub>16</sub>)、ステアロイル (C<sub>18</sub>)、およびイコソイル (icosoyl) (C<sub>20</sub>) が含まれるが、これらに限定はされない。好ましい態様において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同一である、即ち、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が両方ともミリストイルである（即ち、ジミリストイル）、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が両方ともステアロイルである（即ち、ジステアロイル）、等である。ジアシルグリセロールは、以下の一般式を有する。



【 0 2 6 3 】

「ジアルキルオキシプロピル」という用語は、2個のアルキル鎖、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>を有する化合物をさす。R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、両方とも、2~30個の炭素を独立に有する。アルキル基は、飽和であってもよいし、または変動する不飽和度を有していてもよい。ジアルキルオキシプロピルは以下の一般式を有する：

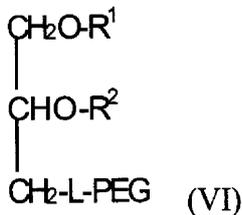


式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、独立に選択され、約10～約22個の炭素原子を有する長鎖アルキル基である。

【0264】

好ましい態様において、PEG-脂質は、以下の式を有するPEG-DAAコンジュゲートである

10



式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、独立に選択され、約10～約22個の炭素原子を有する長鎖アルキル基であり；PEGはポリエチレングリコールであり；かつ、Lは、上記のような非エステル含有リンカーモエティまたはエステル含有リンカーモエティである。長鎖アルキル基は、飽和であってよいし、または不飽和であってよい。適当なアルキル基には、ラウリル(C<sub>12</sub>)、ミリスチル(C<sub>14</sub>)、パルミチル(C<sub>16</sub>)、ステアリル(C<sub>18</sub>)、およびイコシル(C<sub>20</sub>)が含まれるが、これらに限定はされない。好ましい態様において、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同一である、即ち、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が両方ともミリスチルである(即ち、ジミリスチル)、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が両方ともステアリルである(即ち、ジステアリル)、等である。

20

【0265】

上記式VI中、PEGは、約550ダルトン～約10,000ダルトン、より好ましくは、約750ダルトン～約5000ダルトン、より好ましくは、約1000ダルトン～約5000ダルトン、より好ましくは、約1500ダルトン～約3000ダルトンの範囲、さらに好ましくは、約2000ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、アルキル、アルコキシ、アシル、またはアリールにより置換されていてもよい。好ましい態様において、末端ヒドロキシル基は、メトキシ基またはメチル基により置換されている。

30

【0266】

好ましい態様において、「L」は非エステル含有リンカーモエティである。適当な非エステル含有リンカーには、アミドリンカーモエティ、アミノリンカーモエティ、カルボニルリンカーモエティ、カルバメートリンカーモエティ、尿素リンカーモエティ、エーテルリンカーモエティ、ジスルフィドリンカーモエティ、スクシンアミジルリンカーモエティ、およびそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定はされない。好ましい態様において、非エステル含有リンカーモエティは、カルバメートリンカーモエティである(即ち、PEG-C-DAAコンジュゲート)。もう一つの好ましい態様において、非エステル含有リンカーモエティは、アミドリンカーモエティである(即ち、PEG-A-DAAコンジュゲート)。さらにもう一つの好ましい態様において、非エステル含有リンカーモエティは、スクシンアミジルリンカーモエティである(即ち、PEG-S-DAAコンジュゲート)。

40

【0267】

PEG-DAAコンジュゲートは、当業者に公知の標準的な技術および試薬を使用して合成される。PEG-DAAコンジュゲートは、様々なアミド結合、アミン結合、エーテル結合、チオ結合、カルバメート結合、および尿素結合を含有しているであろうことが認識されるであろう。当業者は、これらの結合を形成するための方法および試薬が、周知であり、容易に利用可能であることを認識するであろう。例えば、March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY(Wiley 1992) ; Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS(VCH 1989) ; および Furn

50

iss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5th ed. (Longman 1989) 参照。  
存在する官能基が、PEG-DAAコンジュゲートの合成中の異なる点で、保護および脱保護を必要とするかもしれないことも、認識されるであろう。当業者は、そのような技術が周知であることを認識するであろう。例えば、Green and Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991) 参照。

【0268】

好ましくは、PEG-DAAコンジュゲートは、ジラウリルオキシプロピル ( $C_{12}$ ) -PEGコンジュゲート、ジミリスチルオキシプロピル ( $C_{14}$ ) -PEGコンジュゲート、ジパルミチルオキシプロピル ( $C_{16}$ ) -PEGコンジュゲート、またはジステアリルオキシプロピル ( $C_{18}$ ) -PEGコンジュゲートである。その他のジアルキルオキシプロピルも本発明のPEG-DAAコンジュゲートにおいて使用され得ることを、当業者は容易に認識するであろう。

10

【0269】

上記のものに加えて、その他の親水性ポリマーが、PEGの代わりに使用され得ることは、当業者に容易に明白であろう。PEGの代わりに使用され得る適当なポリマーの例には、ポリビニルピロリドン、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミドおよびポリジメチルアクリルアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ならびにヒドロキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースのような誘導体化されたセルロースが含まれるが、これらに限定はされない。

【0270】

上記の成分に加えて、本発明の粒子（例えば、SNALPまたはSPLP）は、カチオン性ポリ(エチレングリコール) (PEG) 脂質またはCPLをさらに含んでもよい（例えば、Chen et al., Bioconj. Chem., 11:433-437(2000)参照）。本発明において使用するための適当なSPLPおよびSPLP-CPL、ならびにSPLPおよびSPLP-CPLの作製法および使用法は、例えば、米国特許第6,852,334号およびPCT公開WO 00/62813に開示されている。

20

【0271】

適当なCPLには、式VII:

A-W-Y (VII)

の化合物が含まれる。式中、A、W、およびYは、下記の通りである。

【0272】

式VIIに関して、「A」は、脂質アンカーとして機能する両親媒性脂質、中性脂質、または疎水性脂質のような脂質モエティである。適当な脂質の例には、ジアシルグリセロリル、ジアルキルグリセロリル、N-N-ジアルキルアミノ、1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパン、および1,2-ジアルキル-3-アミノプロパンが含まれるが、これらに限定はされない。

30

【0273】

「W」は、親水性のポリマーまたはオリゴマーのような、ポリマーまたはオリゴマーである。好ましくは、親水性ポリマーは、非免疫原性であるか、または低い固有の免疫原性を保有している生体適合性ポリマーである。または、親水性ポリマーは、もし適切なアジュバントと共に使用されるのであれば、弱抗原性であってもよい。適当な非免疫原性ポリマーには、PEG、ポリアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸/ポリグリコール酸コポリマー、およびそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定はされない。好ましい態様において、ポリマーは、約250~約7,000ダルトンの分子量を有する。

40

【0274】

「Y」はポリカチオン性モエティである。ポリカチオン性モエティという用語は、選択されたpH、好ましくは、生理的pHにおいて、正の電荷、好ましくは、少なくとも2個の正の電荷を有する化合物、誘導体、または官能基をさす。適当なポリカチオン性モエティには、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、リジン、およびヒスチジンのような塩基性アミノ酸およびそれらの誘導体；スペルミン；スペルミジン；カチオン性 dendrimer；ポリアミン；ポリアミン糖；ならびにアミノ多糖が含まれる。ポリカチオン性モエティの

50

構造は、テトラリジンのような直鎖型であってもよいし、分岐型またはデンドリマー型であってもよい。ポリカチオン性モエティは、選択されたpH値において、約2価～約15価の正の電荷、好ましくは、約2価～約12価の正の電荷、より好ましくは、約2価～約8価の正の電荷を有する。利用すべきポリカチオン性モエティの選択は、望まれる粒子の適用の型によって決定され得る。

【0275】

ポリカチオン性モエティ上の電荷は、粒子モエティ全体に分布していてもよいし、または、粒子モエティのある特定の区域における不連続の濃度の電荷密度、例えば、電荷スパイクであってもよい。電荷密度が粒子上に分布している場合、電荷密度は、均等に分布していてもよいし、または不均等に分布していてもよい。ポリカチオン性モエティの電荷分布の全ての変動が、本発明に包含される。

10

【0276】

脂質「A」および非免疫原性ポリマー「W」は、様々な方法によって、好ましくは、共有結合性付着によって付着させられ得る。当業者に公知の方法が、「A」および「W」の共有結合性付着のために使用され得る。適当な結合には、アミド結合、アミン結合、カルボキシル結合、カーボネート結合、カルバメート結合、エステル結合、およびヒドラゾン結合が含まれるが、これらに限定はされない。結合を実現するためには、「A」および「W」が相補的な官能基を有していなければならないことが、当業者には明白であろう。これらの二つの基（一方は脂質上、他方はポリマー上）の反応が、所望の結合を提供するであろう。例えば、脂質がジアシルグリセロールであり、活性エステルを形成するため、例えば、NHSおよびDCCにより末端ヒドロキシルを活性化し、次いで、ポリアミドのようなアミノ基を含有しているポリマーと反応させた場合（例えば、米国特許第6,320,017号および第6,586,559号参照）、アミド結合が二つの基の間に形成されるであろう。

20

【0277】

ある種の例において、ポリカチオン性モエティには、ターゲティングリガンドまたはカルシウムを錯体化するためのキレートモエティのようなリガンドが付着していてもよい。好ましくは、リガンドが付着させられた後、カチオン性モエティは正の電荷を維持する。ある種の例において、付着させられるリガンドは正の電荷を有する。適当なリガンドには、反応性官能基を有する化合物または装置が含まれるが、これらに限定はされず、脂質、両親媒性脂質、担体化合物、バイオアフィニティ化合物、バイオマテリアル、バイオポリマー、生物医学的装置、分析的に検出可能な化合物、治療的活性を有する化合物、酵素、ペプチド、タンパク質、抗体、免疫刺激剤、放射標識、蛍光原、ビオチン、薬物、ハプテン、DNA、RNA、多糖、リボソーム、ピロソーム、ミセル、免疫グロブリン、官能基、その他のターゲティングモエティ、または毒素が含まれる。

30

【0278】

いくつかの態様において、脂質コンジュゲート（例えば、PEG-脂質）は、粒子中に存在する全脂質の約0モル%～約20モル%、約0.5モル%～約20モル%、約1.5モル%～約18モル%、約4モル%～約15モル%、約5モル%～約12モル%、または約2モル%を構成する。

【0279】

他の態様において、脂質コンジュゲート（例えば、PEG-脂質）は、粒子中に存在する全脂質の約0.1モル%～約10モル%、約0.1モル%～約5モル%、約0.2モル%～約5モル%、約0.3モル%～約5モル%、約0.4モル%～約5モル%、約0.5モル%～約5モル%、約0.5モル%～約2モル%、約0.5モル%～約1.5モル%、約0.5モル%～約1モル%、約1モル%～約2モル%、または約1.5モル%を構成する。

40

【0280】

当業者は、脂質コンジュゲートの濃度が、利用される脂質コンジュゲート、および核酸-脂質粒子が融合性になる速度に依って、変動し得ることを認識するであろう。

【0281】

脂質コンジュゲートの組成および濃度を制御することによって、脂質コンジュゲートが核酸-脂質粒子から排出される速度を制御し、次に、核酸-脂質粒子が融合性になる速度を

50

制御することができる。例えば、PEG-ホスファチジルエタノールアミンコンジュゲートまたはPEG-セラミドコンジュゲートが脂質コンジュゲートとして使用される場合、核酸-脂質粒子が融合性になる速度は、例えば、脂質コンジュゲートの濃度を変動させることにより、PEGの分子量を変動させることにより、またはホスファチジルエタノールアミンもしくはセラミドのアシル鎖基の鎖長および飽和度を変動させることにより、変動し得る。さらに、例えば、pH、温度、イオン強度等を含む他の変数、核酸-脂質粒子が融合性になる速度を変動させかつ/または制御するために使用することができる。核酸-脂質粒子が融合性になる速度を制御するために使用され得るその他の方法は、この開示を参照することにより当業者に明白になるであろう。

【0282】

10

#### B. 付加的な担体系

本発明において使用するのに適している付加的な脂質に基づく担体系の非限定的な例には、リポプレックス（例えば、米国特許公開第20030203865号；およびZhang et al., J. Control Release, 100:165-180(2004)参照）、pH感受性リポプレックス（例えば、米国特許公開第20020192275号参照）、可逆的にマスキングされたりポプレックス（例えば、米国特許公開第20030180950号参照）、カチオン性脂質に基づく組成物（例えば、米国特許第6,756,054号；および米国特許公開第20050234232号参照）、カチオン性リポソーム（例えば、米国特許公開第20030229040号、第20020160038号、および第20020012998号；米国特許第5,908,635号；ならびにPCT公開WO 01/72283参照）、アニオン性リポソーム（例えば、米国特許公開第20030026831号参照）、pH感受性リポソーム（例えば、米国特許公開第20020192274号；およびAU 2003210303参照）、抗体によりコーティングされたりポソーム（例えば、米国特許公開第20030108597号；およびPCT公開WO 00/50008参照）、細胞型特異的リポソーム（例えば、米国特許公開第20030198664号参照）、核酸およびペプチドを含有しているリポソーム（例えば、米国特許第6,207,456号参照）、放出可能な親水性ポリマーにより誘導体化された脂質を含有しているリポソーム（例えば、米国特許公開第20030031704号参照）、脂質に捕捉された核酸（例えば、PCT公開WO 03/057190およびWO 03/059322参照）、脂質に封入された核酸（例えば、米国特許公開第20030129221号；および米国特許第5,756,122号参照）、その他のリポソーム組成物（例えば、米国特許公開第20030035829号および第20030072794号；ならびに米国特許第6,200,599号参照）、リポソームおよびエマルジョンの安定化された混合物（例えば、EP1304160参照）、エマルジョン組成物（例えば、米国特許第6,747,014参照号）、ならびに核酸マイクロエマルジョン（例えば、米国特許公開第20050037086号参照）が含まれる。

20

30

【0283】

本発明において使用するのに適しているポリマーに基づく担体系の例には、カチオン性ポリマー-核酸複合体（即ち、ポリプレックス）が含まれるが、これに限定はされない。ポリプレックスを形成するためには、典型的には、細胞表面でアニオン性プロテオグリカンと相互作用し、エンドサイトーシスによって細胞に入ることができる正の電荷を有する粒子へと核酸を凝縮する、直鎖型、分岐型、星型、または樹枝状のポリマー構造を有するカチオン性ポリマーと、核酸（例えば、干渉RNA）を複合体化させる。いくつかの態様において、ポリプレックスは、ポリエチレンジアミン（PEI）（例えば、米国特許第6,013,240号参照；直鎖型PEI、In vivo jetPEI（商標）としてQbiogene, Inc.（Carlsbad, CA）より市販されている）、ポリプロピレンジアミン（PPI）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリ-L-リジン（PLL）、ジエチルアミノエチル（DEAE）-デキストラン、ポリ（-アミノエステル）（PAE）ポリマー（例えば、Lynn et al., J. Am. Chem. Soc., 123:8155-8156(2001)参照）、キトサン、ポリアミドアミン（PAMAM） dendrimer（例えば、Kukowska-Latallo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:4897-4902(1996)参照）、ポルフィリン（例えば、米国特許第6,620,805号参照）、ポリビニルエーテル（例えば、米国特許公開第20040156909号参照）、多環式アミジニウム（例えば、米国特許公開第20030220289号参照）、一級アミン基、イミン基、グアニジン基、および/またはイミダゾール基を含むその他のポリマー（例えば、米国特許第6,013,240号；PCT公開WO/9602655；PCT公開WO95/21931；Zhang et

40

50

al., J. Control Release, 100:165-180(2004) ; および Tiera et al., Curr. Gene Ther., 6:59-71(2006) 参照)、ならびにそれらの混合物のようなカチオン性ポリマーと複合体化された核酸(例えば、干渉RNA)を含む。他の態様において、ポリプレックスには、米国特許公開第20060211643号、第20050222064号、第20030125281号、および第20030185890号、ならびにPCT公開WO 03/066069に記載されたようなカチオン性ポリマー-核酸複合体; 米国特許公開第20040071654号に記載されたような生分解性ポリ( -アミノエステル)ポリマー-核酸複合体; 米国特許公開第20040142475号に記載されたようなポリマー性マトリックスを含有している微粒子; 米国特許公開第20030157030号に記載されたようなその他の微粒子組成物; 米国特許公開第20050123600号に記載されたような凝縮核酸複合体; ならびにAU 2002358514およびPCT公開WO 02/096551に記載されたようなナノカプセル組成物およびマイクロカプセル組成物が含まれる。

10

## 【0284】

ある種の例において、干渉RNAは、シクロデキストリンまたはそのポリマーと複合体化され得る。シクロデキストリンに基づく担体系の非限定的な例には、米国特許公開第20040087024号に記載されたシクロデキストリン修飾ポリマー-核酸複合体; 米国特許第6,509,323号、第6,884,789号、および第7,091,192号に記載された直鎖型シクロデキストリンコポリマー-核酸複合体; ならびに米国特許第7,018,609号に記載されたシクロデキストリンポリマー-複合体化剤-核酸複合体が含まれる。ある種の他の例において、干渉RNAは、ペプチドまたはポリペプチドと複合体化されてもよい。タンパク質に基づく担体系の例には、PCT公開WO95/21931に記載されたカチオン性オリゴペプチド-核酸複合体が含まれるが、これに限定はされない。

20

## 【0285】

## VI. 核酸-脂質粒子の調製

本明細書に記載された干渉RNAが脂質二重層に封入され、分解から保護される、本発明の血清安定核酸-脂質粒子は、連続混合法、直接希釈法、界面活性剤透析法、または成分の混合中に単一の相を提供するため有機溶媒を利用する逆相法の変法を含むが、これらに限定はされない、当技術分野において公知の任意の方法によって形成され得る。

## 【0286】

好ましい態様において、カチオン性脂質は、式IおよびIIの脂質またはそれらの組み合わせである。他の好ましい態様において、非カチオン性脂質は、卵スフィンゴミエリン(ESM)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルコリン(POPC)、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン(DPPC)、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、14:0 PE(1,2-ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン(DMPE))、16:0 PE(1,2-ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン(DPPE))、18:0 PE(1,2-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE))、18:1 PE(1,2-ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE))、18:1トランスPE(1,2-ジエライドイル-ホスファチジルエタノールアミン(DEPE))、18:0-18:1 PE(1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE))、16:0-18:1 PE(1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE))、ポリエチレングリコールに基づくポリマー(例えば、PEG 2000、PEG 5000、PEG修飾ジアシルグリセロール、またはPEG修飾ジアルキルオキシプロピル)、コレステロール、またはそれらの組み合わせである。さらに他の好ましい態様において、有機溶媒は、メタノール、クロロホルム、塩化メチレン、エタノール、ジエチルエーテル、またはそれらの組み合わせである。

30

40

## 【0287】

好ましい態様において、本発明は、連続混合法、例えば、第一レザバーに干渉RNAのような核酸を含む水性溶液を準備すること、第二レザバーに有機脂質溶液を準備すること、および核酸(例えば、干渉RNA)が封入されたりポソームが実質的に瞬間的に生成するよう有機脂質溶液が水性溶液と混合されるよう、水性溶液を有機脂質溶液と混合することを

50

含む工法を介して作製された核酸-脂質粒子を提供する。この工法およびこの工法を実施するための装置は、米国特許公開第20040142025号に詳細に記載されている。

【0288】

混合チャンバーのような混合環境へ脂質溶液および緩衝溶液を連続的に導入する作業は、緩衝溶液による脂質溶液の連続的な希釈を引き起こし、それにより、混合時に実質的に瞬間的にリポソームが生成する。本明細書において使用されるように、「緩衝液による脂質溶液の連続的な希釈」という語句（および変化形）は、一般に、小胞作製を実現するために十分な力で、水和過程において脂質溶液が十分に急速に希釈されることを意味する。核酸を含む水性溶液の有機脂質溶液との混合によって、有機脂質溶液は、緩衝溶液（即ち、水性溶液）の存在下で連続的な段階希釈を受け、核酸-脂質粒子が生成する。

10

【0289】

連続混合法を使用して形成された血清安定核酸-脂質粒子は、典型的には、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、または約70nm～約90nmのサイズを有する。このように形成された粒子は、凝集せず、任意で、均一の粒子サイズを達成するために整粒される。

【0290】

もう一つの態様において、本発明は、リポソーム溶液を形成すること、および制御された量の希釈緩衝液を含有している収集容器へ直ちに直接リポソーム溶液を導入することを含む、直接希釈法を介して作製された核酸-脂質粒子を提供する。好ましい局面において、収集容器は、希釈を容易にするため収集容器の内容物を攪拌するために配置された一つまたは複数の要素を含む。一つの局面において、収集容器中に存在する希釈緩衝液の量は、そこに導入されるリポソーム溶液の容量と実質的に等しい。非限定的な例として、45%エタノール中のリポソーム溶液は、等しい容量の希釈緩衝液を含有している収集容器へ導入された時、有利に、より小さい粒子を与えるであろう。

20

【0291】

さらにもう一つの態様において、本発明は、希釈緩衝液を含有している第三レザバーが第二混合領域に流体カップリングされる直接希釈法を介して作製された核酸-脂質粒子を提供する。この態様において、第一混合領域において形成されたリポソーム溶液は、第二混合領域の希釈緩衝液と直ちに直接混合される。好ましい局面において、第二混合領域は、リポソーム溶液および希釈緩衝液の流れが反対の180°の流れとして遭遇するように配置されたT型コネクタを含む；しかしながら、より浅い角度、例えば、約27°～約180°を提供するコネクタが使用されてもよい。ポンプ機序が、緩衝液の制御可能な流れを第二混合領域へ送達する。一つの局面において、第二混合領域に提供される希釈緩衝液の流速は、第一混合領域からそこに導入されるリポソーム溶液の流速と実質的に等しくなるよう制御される。この態様は、有利に、第二混合領域においてリポソーム溶液と混合される希釈緩衝液の流れのより優れた制御を可能にし、従って、第二混合過程を通じた緩衝液中のリポソーム溶液の濃度のより優れた制御も可能にする。希釈緩衝液の流速のそのような制御は、有利に、低下した濃度での小さい粒子サイズの形成を可能にする。

30

【0292】

これらの工法およびこれらの直接希釈法を実施するための装置は、米国特許公開第20070042031号に詳細に記載されている。

40

【0293】

直接希釈法を使用して形成された血清安定核酸-脂質粒子は、典型的には、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、または約70nm～約90nmのサイズを有する。このように形成された粒子は、凝集せず、任意で、均一の粒子サイズを達成するために整粒される。

【0294】

いくつかの態様において、粒子は、界面活性剤透析を使用して形成される。特定の形成機序に拘束されるものではないが、コーティングされた核酸複合体を形成するため、干渉RNAのような核酸を、カチオン性脂質の界面活性剤溶液と接触させる。これらのコーティ

50

ングされた核酸は、凝集し沈殿することができる。しかしながら、界面活性剤の存在が、この凝集を低下させ、脂質二重層に核酸が封入されている粒子が形成されるよう、コーティングされた核酸が過剰の脂質（典型的には、非カチオン性脂質）と反応することを可能にする。従って、血清安定核酸-脂質粒子は以下のように調製され得る：

(a) コーティングされた核酸-脂質複合体を形成するため、界面活性剤溶液中のカチオン性脂質と核酸を合わせること；

(b) 核酸-脂質複合体および非カチオン性脂質を含む界面活性剤溶液を形成するため、非カチオン性脂質をコーティングされた核酸-脂質複合体と接触させること；ならびに

(c) 血清中で安定しており、かつ約50nm～約150nmのサイズを有する、脂質二重層に核酸が封入されている血清安定核酸-脂質粒子の溶液を提供するため、工程(b)の界面活性剤溶液を透析すること。

10

#### 【0295】

コーティングされた核酸-脂質複合体の最初の溶液は、界面活性剤溶液中のカチオン性脂質と核酸を合わせるにより形成される。これらの態様において、界面活性剤溶液は、好ましくは、15～300mM、より好ましくは、20～50mMの臨界ミセル濃度を有する中性界面活性剤の水性溶液である。適当な界面活性剤の例には、例えば、N,N'-((オクタノイルイミノ)-ビス-(トリメチレン))-ビス-(D-グルコンアミド) (BIGCHAP)；BRIJ 35；デオキシ-BIGCHAP；ドデシルポリ(エチレングリコール)エーテル；Tween 20；Tween 40；Tween 60；Tween 80；Tween 85；Mega 8；Mega 9；Zwittergent (登録商標) 3-08；Zwittergent (登録商標) 3-10；Triton X-405；ヘキシル-β-D-グルコピラノシド、ヘプチル-β-D-グルコピラノシド、オクチル-β-D-グルコピラノシド、およびノニル-β-D-グルコピラノシド；ならびにヘプチルチオグルコピラノシドが含まれ；オクチル-β-D-グルコピラノシドおよびTween-20が最も好ましい。界面活性剤溶液中の界面活性剤の濃度は、典型的には、約100mM～約2M、好ましくは、約200mM～約1.5Mである。

20

#### 【0296】

カチオン性脂質および核酸は、典型的には、約1:1～約20:1の電荷比(+/-)が生じるよう、約1:1～約12:1の比率で、または約2:1～約6:1の比率で、合わせられるであろう。さらに、溶液中の核酸の全体濃度は、典型的には、約25 μg/ml～約1mg/ml、約25 μg/ml～約200 μg/ml、または約50 μg/ml～約100 μg/mlであろう。界面活性剤溶液中の核酸とカチオン性脂質との組み合わせは、典型的には、コーティングされた複合体を形成するために十分な期間、室温で、維持される。または、核酸およびカチオン性脂質を、界面活性剤溶液中で合わせ、最高約37℃、約50℃、約60℃、または約70℃の温度にまで加温してもよい。温度に特に感受性である核酸の場合、コーティングされた複合体は、比較的低い温度、典型的には、約4℃未満で形成され得る。

30

#### 【0297】

次いで、核酸-脂質複合体および非カチオン性脂質の界面活性剤溶液を提供するため、コーティングされた核酸-脂質複合体の界面活性剤溶液を、非カチオン性脂質と接触させる。この工程において有用な非カチオン性脂質には、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジリエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、およびセレプロシドが含まれる。好ましい態様において、非カチオン性脂質は、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジリエタノールアミン、セラミド、またはスフィンゴミエリンである。これらの脂質のアシル基は、好ましくは、C<sub>10</sub>～C<sub>24</sub>炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基である。より好ましくは、アシル基は、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、またはオレオイルである。特に好ましい態様において、非カチオン性脂質は、DSPC、DOPE、POPC、卵ホスファチジルコリン(EPC)、コレステロール、またはそれらの混合物である。最も好ましい態様において、核酸-脂質粒子はインビボの増強された特性を有する融合性粒子であり、非カチオン性脂質はDSPCまたはDOPEである。さらに、本発明の核酸-脂質粒子はコレステロールをさらに含んでいてもよい。他の好ましい態様において、非カチオン性脂質は、例えば、米国特許第5,820,873号および米国特許公開第20030077829号に記載されたような、PEG 2,000

40

50

、PEG 5,000、およびジアシルグリセロールにコンジュゲートされたPEGのようなポリエチレングリコールに基づくポリマー、セラミド、またはリン脂質をさらに含んでもよい。さらなる好ましい態様において、非カチオン性脂質は、PEG 2,000、PEG 5,000、およびジアルキルオキシプロピルにコンジュゲートされたPEGのようなポリエチレングリコールに基づくポリマーをさらに含んでもよい。

【0298】

本発明の方法において使用される非カチオン性脂質の量は、典型的には、50 $\mu$ gの核酸に対して約2～約20mgの全脂質である。好ましくは、全脂質の量は、核酸50 $\mu$ g当たり約5～約10mgである。

【0299】

核酸-脂質複合体および非カチオン性脂質の界面活性剤溶液の形成の後、界面活性剤は、好ましくは、透析によって、除去される。界面活性剤の除去は、核酸を囲む脂質二重層の形成をもたらす、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、または約70nm～約90nmのサイズを有する血清安定核酸-脂質粒子を提供する。このように形成された粒子は、凝集せず、任意で、均一の粒子サイズを達成するために整粒される。

【0300】

血清安定核酸-脂質粒子は、リポソームを整粒するための利用可能な方法のうちの任意のものによって整粒され得る。整粒は、所望のサイズ範囲および比較的狭い粒子サイズ分布を達成するために実施され得る。

【0301】

所望のサイズに粒子を整粒するため、いくつかの技術が利用可能である。リポソームのために使用され、本発明の粒子にも同様に適用可能な一つの整粒法は、米国特許第4,737,323号に記載されている。パス式またはプローブ式いずれかの超音波処理により粒子懸濁物を超音波処理することは、約50nm未満のサイズの粒子への漸進的なサイズ低下を生ずる。ホモジナイゼーションは、より大きい粒子をより小さいものへ断片化するための、剪断エネルギーに頼るもう一つの方法である。典型的なホモジナイゼーション手順において、粒子は、選択された粒子サイズ、典型的には、約60～約80nmが観察されるまで、標準的なエマルジョンホモジナイザーで再循環させられる。いずれの方法においても、粒子サイズ分布は、従来のレーザービーム粒子サイズ識別またはQELSによってモニタリングされ得る。

【0302】

小孔ポリカーボネート膜または非対称セラミック膜を通した粒子の押し出しも、粒子サイズを比較的明確なサイズ分布にまで低下させるための有効な方法である。典型的には、所望の粒子サイズ分布が達成されるまで、懸濁物は、1回または複数回、膜へ循環させられる。粒子は、漸進的なサイズの低下を達成するため、連続的に小さくなる孔の膜を通して押し出されてもよい。

【0303】

もう一つの態様の群において、血清安定核酸-脂質粒子は、以下のように調製され得る：

- (a) 有機溶媒中でカチオン性脂質と非カチオン性脂質とを含む混合物を調製すること；
- (b) 明瞭な単一の相を提供するため、核酸の水性溶液を工程(a)の混合物と接触させること；および
- (c) 血清中で安定しており、かつ約50nm～約150nmのサイズを有する、脂質二重層に核酸が封入された核酸-脂質粒子の懸濁物を提供するため、有機溶媒を除去すること。

【0304】

この態様の群において有用な核酸（例えば、干渉RNA）、カチオン性脂質、および非カチオン性脂質は、上記の界面活性剤透析法に関して記載されたのと同様である。

【0305】

有機溶媒の選択は、典型的には、溶媒の極性、および溶媒が粒子形成の後期段階で除去され得る容易さの考慮を含むであろう。可溶化剤としても使用される有機溶媒は、核酸お

10

20

30

40

50

よび脂質の明瞭な単相混合物を提供するために十分な量である。適当な溶媒には、クロロホルム、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、シクロペンタン、ベンゼン、トルエン、メタノール、またはプロパノール、イソプロパノール、ブタノール、tert-ブタノール、イソ-ブタノール、ペンタノール、およびヘキサノールのようなその他の脂肪族アルコールが含まれるが、これらに限定はされない。二つ以上の溶媒の組み合わせも、本発明において使用され得る。

【0306】

カチオン性脂質および非カチオン性脂質の有機溶液との核酸の接触は、典型的には水性溶液である第一の核酸の溶液と、第二の脂質の有機溶液とを共に混合することにより達成される。当業者は、この混合が、多数の方法によって、例えば、ボルテックスミキサーの使用のような、機械的手段によって行なわれ得ることを理解するであろう。

10

【0307】

核酸を脂質の有機溶液と接触させた後、有機溶媒が除去され、それにより、血清安定核酸-脂質粒子の水性懸濁物が形成される。有機溶媒を除去するために使用される方法は、典型的には、減圧下での蒸発、または不活性ガス（例えば、窒素またはアルゴン）の混合物への流入を含むであろう。

【0308】

このように形成された血清安定核酸-脂質粒子は、典型的には、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、または約70nm～約90nmのサイズを有するであろう。粒子のサイズのさらなる低下またはサイズの均一性を達成するため、上記のように整粒が実施されてもよい。

20

【0309】

その他の態様において、方法は、本発明の組成物を使用した細胞への送達を達成するために有用な非脂質ポリカチオンを添加することをさらに含むであろう。適当な非脂質ポリカチオンの例には、ヘキサジメトリンブロミド（Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin, USA) よりPOLYBRENE（登録商標）という商品名で販売されている）またはヘキサジメトリンのその他の塩が含まれるが、これらに限定はされない。その他の適当なポリカチオンには、例えば、ポリ-L-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ポリアリルアミン、およびポリエチレンジアミンの塩が含まれる。

【0310】

ある種の態様において、核酸-脂質粒子の形成は、単相系（例えば、BlighおよびDyerの単相、または類似の水性溶媒と有機溶媒との混合物）で実施されてもよいし、または適当な混合を用いて二相系で実施されてもよい。

30

【0311】

複合体の形成が単相系で実施される場合、カチオン性脂質および核酸は、各々、ある容量の単相混合物に溶解させられる。二つの溶液の組み合わせは、単一の混合物を提供し、その中で複合体が形成される。または、複合体は、カチオン性脂質が（水相中に存在する）核酸に結合し、それを有機相へと「引き寄せる」、二相混合物において形成されてもよい。

【0312】

もう一つの態様において、血清安定核酸-脂質粒子は、以下のように調製され得る：  
(a) 核酸-脂質混合物を形成するため、核酸を非カチオン性脂質および界面活性剤を含む溶液と接触させること；  
(b) 核酸の負の電荷の部分を中和し、核酸および脂質の電荷中和された混合物を形成するため、カチオン性脂質を核酸-脂質混合物と接触させること；ならびに  
(c) 核酸が分解から保護される核酸-脂質粒子を提供するため、電荷中和された混合物から界面活性剤を除去すること。

40

【0313】

一つの態様の群において、非カチオン性脂質および界面活性剤の溶液は、水性溶液である。核酸の、非カチオン性脂質および界面活性剤の溶液との接触は、典型的には、第一の

50

核酸の溶液と、第二の脂質および界面活性剤の溶液とを共に混合することにより達成される。当業者は、この混合が、多数の方法、例えば、ボルテックスミキサーの使用のような機械的手段によって行なわれ得ることを理解するであろう。好ましくは、核酸溶液も界面活性剤溶液である。本発明の方法において使用される非カチオン性脂質の量は、典型的には、使用されるカチオン性脂質の量に基づき決定され、典型的には、カチオン性脂質の量の約0.2~約5倍、好ましくは、使用されるカチオン性脂質の量の約0.5~約2倍である。

【0314】

いくつかの態様において、核酸は、例えば、米国特許出願第09/744,103号に記載されたように、予備凝縮される。

【0315】

このように形成された核酸-脂質混合物は、存在する核酸（またはその他のポリアニオン性材料）に関連した負の電荷の部分を中和するため、カチオン性脂質と接触させられる。使用されるカチオン性脂質の量は、典型的には、核酸の負の電荷の少なくとも50%を中和するために十分なものであろう。好ましくは、負の電荷は、少なくとも70%中和され、より好ましくは、少なくとも90%中和されるであろう。本発明において有用なカチオン性脂質には、例えば、DLinDMAおよびDLenDMAが含まれる。これらの脂質および関連アナログは、米国特許公開第20060083780に記載されている。

【0316】

カチオン性脂質の核酸-脂質混合物との接触は、多数の技術のうちの任意のものにより、好ましくは、カチオン性脂質の溶液と、核酸-脂質混合物を含有している溶液とを共に混合することにより、達成され得る。二つの溶液を混合すると（または、その他の様式で接触させると）、核酸に関連した負の電荷の部分が中和される。にも関わらず、核酸は、非凝縮状態を維持し、親水性特徴を獲得する。

【0317】

カチオン性脂質を核酸-脂質混合物と接触させた後、界面活性剤（または界面活性剤と有機溶媒との混合物）を除去し、それにより、核酸-脂質粒子を形成する。界面活性剤を除去するために使用される方法は、典型的には、透析を含むであろう。有機溶媒が存在する場合、除去は、典型的には、減圧での蒸発、または不活性ガス（例えば、窒素またはアルゴン）の混合物への流入を含むであろう。

【0318】

このように形成された粒子は、典型的には、約50nm~数ミクロン、約50nm~約150nm、約60nm~約130nm、約70nm~約110nm、または約70nm~約90nmのサイズを有するであろう。粒子のサイズのさらなる低下またはサイズの均一性を達成するため、核酸-脂質粒子は、超音波処理、濾過、またはリポソーム製剤において使用され、当技術分野において公知であるその他の整粒技術に供されてもよい。

【0319】

他の態様において、方法は、本発明の組成物を使用した細胞のリポフェクションを達成するために有用な非脂質ポリカチオンを添加することをさらに含むであろう。適当な非脂質ポリカチオンの例には、ヘキサジメトリンブロミド（Aldrich Chemical Co.（Milwaukee, Wisconsin, USA）よりPOLYBRENE（登録商標）という商品名で販売されている）またはヘキサジメトリンのその他の塩が含まれる。他の適当なポリカチオンには、例えば、ポリ-L-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ポリアリルアミン、およびポリエチレンイミンの塩が含まれる。これらの塩の添加は、好ましくは、粒子が形成された後、なされる。

【0320】

もう一つの局面において、血清安定核酸-脂質粒子は、以下のように調製され得る：  
（a）疎水性の核酸-脂質複合体を提供するため、約15%~35%の水および約65%~85%の有機溶媒を含む溶液の中で、約0.85~約2.0の+/-電荷比を生ずるために十分な量のカチオン性脂質を、核酸と接触させること；  
（b）核酸-脂質混合物を提供するため、溶液中の疎水性の核酸-脂質複合体を非カチオン

10

20

30

40

50

性脂質と接触させること；ならびに

(c) 核酸が分解から保護される核酸-脂質粒子を提供するため、核酸-脂質混合物から有機溶媒を除去すること。

【0321】

本発明のこの局面において有用な核酸（例えば、干渉RNA）、非カチオン性脂質、カチオン性脂質、および有機溶媒は、界面活性剤を使用する上記の方法に関して記載されたものと同一である。一つの態様の群において、工程(a)の溶液は単相である。態様のもう一つの群において、工程(a)の溶液は二相である。

【0322】

好ましい態様において、非カチオン性脂質は、ESM、DSPC、DOPC、POPC、DPPC、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、DMPE、DPPE、DSPE、DOPE、DEPE、SOPE、POPE、PEGに基づくポリマー（例えば、PEG 2000、PEG 5000、PEG修飾ジアシルグリセロール、もしくはPEG修飾ジアルキルオキシプロピル）、コレステロール、またはそれらの組み合わせである。さらに他の好ましい態様において、有機溶媒は、メタノール、クロロホルム、塩化メチレン、エタノール、ジエチルエーテル、またはそれらの組み合わせである。

【0323】

一つの態様において、核酸は、本明細書に記載されるような干渉RNAであり；カチオン性脂質は、DLindMA、DLendMA、DODAC、DDAB、DOTMA、DOSPA、DMRIE、DOGS、またはそれらの組み合わせであり；非カチオン性脂質は、ESM、DOPE、PEG-DAG、DSPC、DPPC、DPPE、DMPE、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、DSPE、DEPE、SOPE、POPE、コレステロール、またはそれらの組み合わせ（例えば、DSPCおよびPEG-DAA）であり；そして、有機溶媒は、メタノール、クロロホルム、塩化メチレン、エタノール、ジエチルエーテル、またはそれらの組み合わせである。

【0324】

上記のように、核酸のカチオン性脂質との接触は、典型的には、好ましくは、ボルテックスミキサーの使用のような機械的手段によって、第一の核酸の溶液および第二の脂質の溶液を共に混合することによって、達成される。得られた混合物は、上記のような複合体を含有している。次いで、これらの複合体を、非カチオン性脂質の添加および有機溶媒の除去によって粒子へ変換する。非カチオン性脂質の添加は、典型的には、非カチオン性脂質の溶液を複合体を含有している混合物へ単純に添加することによって達成される。逆の添加が使用されてもよい。その後の有機溶媒の除去は、当業者に公知であり、上にも記載された方法によって、達成され得る。

【0325】

本発明のこの局面において使用される非カチオン性脂質の量は、典型的には、電荷中和された核酸-脂質複合体を提供するために使用されるカチオン性脂質の量（モル基準）の約0.2～約15倍の量である。好ましくは、その量は、使用されるカチオン性脂質の量の約0.5～約9倍である。

【0326】

一つの態様において、上記の方法に従って調製された核酸-脂質粒子は、正味の電荷中性であるか、またはより大きな遺伝子リポフェクション活性を粒子に提供する全体電荷を保持している。好ましくは、粒子の核酸成分は、望まれないタンパク質の産生に干渉する核酸である。他の好ましい態様において、非カチオン性脂質はコレステロールをさらに含んでいてもよい。

【0327】

いくつかの態様において、形成された核酸-脂質粒子における核酸脂質比（重量/重量比）は、約0.01～約0.2、約0.02～約0.1、約0.03～約0.1、または約0.01～約0.08の範囲であろう。出発材料の比も、この範囲内にある。他の態様において、核酸-脂質粒子調製は、全脂質10mg当たり約400 μgの核酸、または約0.01～約0.08の核酸脂質重量比、より好ましくは、核酸50 μg当たり1.25mgの全脂質に相当する約0.04の核酸脂質重量比を使用す

10

20

30

40

50

る。他の好ましい態様において、粒子は、約0.08の核酸:脂質重量比を有する。

【0328】

他の態様において、形成された核酸-脂質粒子における脂質核酸比(重量/重量比)は、約1(1:1)~約100(100:1)、約5(5:1)~約100(100:1)、約1(1:1)~約50(50:1)、約2(2:1)~約50(50:1)、約3(3:1)~約50(50:1)、約4(4:1)~約50(50:1)、約5(5:1)~約50(50:1)、約1(1:1)~約25(25:1)、約2(2:1)~約25(25:1)、約3(3:1)~約25(25:1)、約4(4:1)~約25(25:1)、約5(5:1)~約25(25:1)、約5(5:1)~約20(20:1)、約5(5:1)~約15(15:1)、約5(5:1)~約10(10:1)の範囲、約5(5:1)、6(6:1)、7(7:1)、8(8:1)、9(9:1)、10(10:1)、11(11:1)、12(12:1)、13(13:1)、14(14:1)、または15(15:1)であろう。出発材料の比も、この範囲内にある。

10

【0329】

前述のように、複合脂質は、CPLをさらに含んでいてもよい。SNALP-CPL(CPL含有SNALP)を作製するための多様な一般的な方法は、本明細書に記述される。二つの一般的な技術には、「後挿入」技術、即ち、例えば、予め形成されたSNALPへのCPLの挿入、および、例えば、SNALP形成工程の間にCPLを脂質混合物に含める「標準」技術が含まれる。後挿入技術は、主として、SNALP二重層膜の外面にCPLを有するSNALPをもたらし、標準技術は、内面および外面の両方にCPLを有するSNALPを提供する。方法は、(コレステロールを含有していてもよい)リン脂質から作製された小胞のために特に有用であり、(PEG-DAAおよびPEG-DAGのような)PEG-脂質を含有している小胞のためにも特に有用である。SNALP-CPLを作製する方法は、例えば、米国特許第5,705,385号;第6,586,410号;第5,981,501号;第6,534,484号;および第6,852,334号;米国特許公開第20020072121号;ならびにPCT公開WO 00/62813に教示されている。

20

【0330】

VII. キット

本発明は、キット形態の核酸-脂質粒子も提供する。キットは、核酸-脂質粒子の様々な要素(例えば、核酸および粒子の個々の脂質成分)を保持するために区画されたコンテナを含み得る。いくつかの態様において、キットは、エンドソーム膜脱安定化剤(例えば、カルシウムイオン)をさらに含んでいてもよい。キットは、典型的には、再水和および投与に関する指示と共に、本発明の核酸-脂質粒子組成物を、好ましくは脱水形態で、含有している。

30

【0331】

本明細書において説明されたように、本発明のSNALPは、関心対象の特定の組織または器官を優先的に標的とするよう調整され得る。SNALPの優先的なターゲティングは、SNALP自体の組成を制御することによって実施される。例えば、実施例14および15に示されるように、1:57 PEG-cDSA SNALP製剤は、肝臓外の腫瘍を優先的に標的とするために使用され得、1:57 PEG-cDMA SNALP製剤は、肝臓を優先的に標的とするために使用され得ることが見出された。しかしながら、ある種の例において、SNALPのターゲティングをさらに増強するため、ターゲティングモエティを粒子の表面に付着させることが望ましいかもしれない。(本発明の粒子において使用されるもののような)脂質にターゲティングモエティ(例えば、抗体、タンパク質)を付着させる方法は、当業者に公知である。

40

【0332】

VIII. 核酸-脂質粒子の投与

形成後、本発明の血清安定核酸-脂質粒子(SNALP)は、核酸(例えば、干渉RNA)の細胞への導入のために有用である。従って、本発明は、核酸(例えば、干渉RNA)を細胞へ導入する方法も提供する。方法は、まず、上記のような粒子を形成し、次いで、核酸の細胞への送達が起こるために十分な期間、粒子を細胞と接触させることにより、インビトロまたはインビボで実施される。

【0333】

本発明の核酸-脂質粒子は、混合されたまたは接触したほぼ任意の細胞型に吸着するこ

50

とができる。吸着した後、粒子は、細胞の一部によってエンドサイトーシスを受けるか、脂質を細胞膜と交換するか、または細胞と融合することができる。粒子の核酸部分の転移または取り込みは、これらの経路のうちの任意のものを介して起こり得る。特に、融合が起こる場合、粒子膜は細胞膜へ組み込まれ、粒子の内容物が細胞内液と組み合わせる。

#### 【0334】

本発明の核酸-脂質粒子は、単独で投与されてもよいし、または投与経路および標準的な薬学的実務に従い選択された薬学的に許容される担体（例えば、生理食塩水もしくはリン酸緩衝液）と混合されて投与されてもよい。一般に、普通の緩衝生理食塩水（例えば、135~150mM NaCl）が、薬学的に許容される担体として利用されるであろう。他の適当な担体には、例えば、アルブミン、リポタンパク質、グロブリン等のような増強された安定性のための糖タンパク質を含んでいる、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン等が含まれる。付加的な適当な担体は、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)に記載されている。本明細書において使用されるように、「担体」には、全ての任意の溶媒、分散媒、媒体、コーティング、希釈剤、抗菌剤、抗真菌剤、等張化剤、吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁物、コロイド等が含まれる。「薬学的に許容される」という語句は、ヒトへ投与された時、アレルギー反応または類似の不都合な反応を生じない分子エンティティおよび組成物をさす。

10

#### 【0335】

薬学的に許容される担体は、一般に、粒子形成後に添加される。従って、粒子が形成された後、粒子は、普通の緩衝生理食塩水のような薬学的に許容される担体で希釈され得る。

20

#### 【0336】

薬学的製剤中の粒子の濃度は、広く変動することができ、即ち、最低約0.05重量%未満、通常、少なくとも約2~5重量%、最大約10~90重量%であり得、選択された特定の投与モードに従い、主として、液体の容量、粘性等によって選択されるであろう。例えば、処置に関連した液体負荷を低下させるため、濃度を増加させることができる。これは、アテローム性動脈硬化症に関連したうっ血性心不全または重度の高血圧を有する患者において、特に望ましいかもしれない。または、刺激性の脂質から構成された粒子は、投与の部位における炎症を軽減するため、低濃度に希釈され得る。

#### 【0337】

本発明の薬学的組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌され得る。水性溶液は、無菌条件下で使用のためにパッケージングされてもよいし、またはろ過され、凍結乾燥され、凍結乾燥調製物が投与前に無菌水性溶液と組み合わせられてもよい。組成物は、pH調整剤、緩衝剤、浸透圧調整剤等、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、および塩化カルシウムのような生理的条件に近づくために必要とされるような薬学的に許容される補助物質を含有していてもよい。さらに、粒子懸濁物は、保管時のフリーラジカルおよび脂質過酸化による損害から脂質を保護する脂質保護剤を含んでいてもよい。アルファトコフェロールのような親油性フリーラジカルクエンチャーおよびフェリオキサミンのような水溶性の鉄特異的キレーターが適当である。

30

#### 【0338】

##### A. インビボ投与

インビボ治療のための全身送達、即ち、循環系のような身体系を介した遠位標的細胞への治療用核酸の送達は、PCT公開WO 05/007196、WO 05/121348、WO 05/120152、およびWO 04/002453に開示されたもののような核酸-脂質粒子を使用して達成されている。本発明は、血清中のヌクレアーゼによる分解から核酸を保護し、非免疫原性であり、サイズが小さく、かつ反復投薬のために適している、完全に封入された核酸-脂質粒子も提供する。

40

#### 【0339】

インビボ投与の場合、投与は、当技術分野において公知の任意の様式、例えば、注射、経口投与、吸入（例えば、鼻腔内または気管内）、経皮適用、または直腸投与によるものであり得る。投与は、単回投与または分割投与を介して達成され得る。薬学的組成物は、

50

非経口的に、即ち、関節内、静脈内、腹腔内、皮下、または筋肉内に投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、ポラス注射によって静脈内または腹腔内へ投与される（例えば、米国特許第5,286,634号参照）。細胞内核酸送達は、Straubinger et al., *Methods Enzymol.*, 101:512(1983) ; Mannino et al., *Biotechniques*, 6:682(1988) ; Nicolau et al., *Crit.Rev.Ther Drug Carrier Syst.*, 6:239(1989) ; および Behr, *Acc.Chem.Res.*, 26:274(1993) にも記述されている。脂質に基づく治療薬を投与するさらに他の方法は、例えば、米国特許第3,993,754号 ; 第4,145,410号 ; 第4,235,871号 ; 第4,224,179号 ; 第4,522,803号 ; および第4,588,578号に記載されている。脂質-核酸粒子は、疾患部位における直接注射によって投与されてもよいし、または疾患部位から遠位の部位における注射によって投与されてもよい（例えば、Culver, *HUMAN GENE THERAPY*, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. pp.70-71(1994)参照）。

10

#### 【0340】

本発明の組成物は、単独で、または他の適当な成分と組み合わせて、吸入（例えば、鼻腔内または気管内）を介して投与されるエアロゾル製剤にされてもよい（即ち、「噴霧」されてもよい）（Brigham et al., *Am.J.Sci.*, 298:278(1989)参照）。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等のような加圧された許容される噴霧剤の中に置かれ得る。

#### 【0341】

ある種の態様において、薬学的組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および/またはその他のエアロゾル送達媒体によって送達されてもよい。鼻エアロゾルスプレーを介して核酸組成物を肺に直接送達する方法は、例えば、米国特許第5,756,353号および第5,804,212号に記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂およびリゾホスファチジル-グリセロール化合物を使用した薬物の送達（米国特許第5,725,871号）も、薬学分野において周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックスの形態の経粘膜薬物送達が、米国特許第5,780,045号に記載されている。

20

#### 【0342】

例えば、関節内（関節中）経路、静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路、腹腔内経路、および皮下経路のような、非経口投与のために適している製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および意図されたレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含有していてもよい水性および非水性の等張の滅菌注射溶液、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、濃化剤、安定剤、および保存剤を含んでいてもよい水性および非水性の滅菌懸濁物が含まれる。本発明の実務において、組成物は、好ましくは、例えば、静脈内注入により、経口的に、局所的に、腹腔内に、膀胱内に、またはくも膜下腔内に投与される。

30

#### 【0343】

一般に、静脈内投与される場合、核酸-脂質製剤は、適当な薬学的担体を用いて製剤化される。多くの薬学的に許容される担体が、本発明の組成物および方法において利用され得る。本発明において使用するための適当な製剤は、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)に見出される。多様な水性担体、例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン等が使用され得、アルブミン、リポタンパク質、グロブリン等のような増強された安定性のための糖タンパク質を含んでいてもよい。一般に、普通の緩衝生理食塩水（135~150mM NaCl）が、薬学的に許容される担体として利用されるであろうが、その他の適当な担体も十分であろう。これらの組成物は、濾過のような従来のリボソーム滅菌技術によって滅菌され得る。組成物は、pH調整剤、緩衝剤、浸透圧調整剤、湿潤剤等、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート等のような生理的条件に近づくために必要とされるような薬学的に許容される補助物質を含有していてもよい。これらの組成物は、上に言及された技術を使用して滅菌されてもよいし、または無菌条件下で作製されてもよい。得られた水性溶液は、無菌条件下で使用のためにパッケージングされてもよいし、またはろ過され、凍結乾燥され、凍結乾燥調製物が、投与前に無菌水性溶液と組み合わせられてもよい

40

50

## 【0344】

ある種の適用において、本明細書に開示された核酸-脂質粒子は、経口投与を介して個体に送達され得る。粒子は賦形剤に取り込まれ、摂取可能な錠剤、パッカル錠、トローチ、カプセル、丸剤、ロゼンジ、エリキシル、口腔洗浄剤、懸濁物、経口スプレー、シロップ、ウエハース等の形態で使用され得る（例えば、米国特許第5,641,515号、第5,580,579号、および第5,792,451号参照）。これらの経口剤形は、以下のものも含有してよい：結合剤、ゼラチン；賦形剤、滑沢剤、および/または風味剤。単位剤形がカプセルである場合、それは、上記の材料に加えて、液体の担体を含有し得る。様々なその他の材料が、コーティングとして、または投薬単位の物理的形態を他に修飾するため、存在してもよい。当然、単位剤形の調製において使用される材料は、薬学的に純粋で、かつ利用される量において実質的に非毒性であるべきである。

10

## 【0345】

典型的には、これらの経口製剤は、少なくとも約0.1%またはそれ以上の核酸-脂質粒子を含有することができるが、当然、粒子の割合は、変動してもよく、便利には、全製剤の重量または容量の約1%もしくは2%～約60%もしくは70%、またはそれ以上であり得る。当然、各々の治療的に有用な組成物の中の粒子の量は、適当な投薬量が化合物の所定の単位用量で入手されるよう調製され得る。可溶性、生物学的利用能、生物学的半減期、投与経路、生成物の貯蔵寿命のような因子、およびその他の薬理学的考慮が、そのような薬学的製剤の調製の当業者によって企図されるであろう。従って、多様な投薬量および処置計画が望ましいかもしれない。

20

## 【0346】

経口投与のために適している製剤は、以下のものからなることができる：(a) 水、生理食塩水、またはPEG 400のような希釈剤に懸濁した有効量のパッケージングされた核酸（例えば、干渉RNA）のような液状溶液；(b) 予定された量の核酸（例えば、干渉RNA）を、液体、固体、顆粒、またはゼラチンとして各々含有しているカプセル、サシェ、または錠剤；(c) 適切な液体中の懸濁物；および(d) 適当なエマルジョン。錠剤形態は、乳糖、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、第二リン酸カルシウム、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、微晶質セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、およびその他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、風味剤、色素、崩壊剤、ならびに薬学的に適合性の担体のうちの一つまたは複数を含み得る。ロゼンジ形態は、風味剤、例えば、ショ糖の中に核酸（例えば、干渉RNA）を含んでいてよく、ゼラチンおよびグリセリンのような不活性基剤の中に核酸（例えば、干渉RNA）を含む香錠、または核酸（例えば、干渉RNA）に加えて、当技術分野において公知の担体を含有しているショ糖エマルジョンおよびアラビアゴムエマルジョン、ゲル等を含んでいてもよい。

30

## 【0347】

もう一つの使用例において、核酸-脂質粒子は、広範囲の局所剤形へ取り込まれてもよい。例えば、核酸-脂質粒子を含有している懸濁物を、ゲル、オイル、エマルジョン、局所クリーム、ペースト、軟膏、ローション、フォーム、ムース等として製剤化し投与することができる。

40

## 【0348】

本発明の核酸-脂質粒子の薬学的調製物を調製する際は、空の粒子または外表面に核酸が会合した粒子を低下させるかまたは排除するため精製された大量の粒子を使用することが好ましい。

## 【0349】

本発明の方法は、多様な宿主において実施され得る。好ましい宿主には、霊長類（例えば、ヒトおよびチンパンジーならびにその他の非ヒト霊長類）、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、げっ歯類（例えば、ラットおよびマウス）、ウサギ、ならびにブタのような哺乳動物種が含まれる。

50

## 【0350】

投与される粒子の量は、核酸脂質比、使用される特定の核酸、診断されている疾患状態、患者の年齢、体重、および状態、ならびに医師の判断に依るであろうが、一般には、体重1kg当たり約0.01～約50mg、好ましくは、体重1kg当たり約0.1～約5mg、または投与（例えば、注射）1回当たり $10^8 \sim 10^{10}$ 個の粒子であろう

## 【0351】

## B. インビトロ投与

インビトロ適用のため、核酸（例えば、干渉RNA）の送達は、植物起源であってもよいし、または動物起源であってもよく、脊椎動物であってもよいし、または無脊椎動物であってもよく、任意の組織または型のものであってよい、培養物中で成長した任意の細胞に対してなされ得る。好ましい態様において、細胞は、動物細胞、より好ましくは、哺乳動物細胞、最も好ましくは、ヒト細胞である。

10

## 【0352】

細胞と核酸-脂質粒子との接触は、インビトロで実施される場合、生物学的に適合性の培地において行なわれる。粒子の濃度は、特定の適用に依って広く変動するが、一般には、約 $1 \mu\text{mol} \sim 10 \text{mmol}$ である。核酸-脂質粒子による細胞の処理は、一般には、約1～48時間、好ましくは、約2～4時間の期間、生理的温度（約37℃）で実施される。

## 【0353】

好ましい態様の一つの群において、核酸-脂質粒子懸濁物は、約 $10^3 \sim 10^5$ 細胞/ml、より好ましくは、 $2 \times 10^4$ 細胞/mlの細胞密度を有する、60～80%コンフルエントな播種された細胞へ添加される。細胞に添加される懸濁物の濃度は、好ましくは、約 $0.01 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ 、より好ましくは、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ である。

20

## 【0354】

エンドソーム放出パラメーター（ERP）アッセイを使用して、SNALPまたはその他の脂質に基づく担体系の送達効率が最適化され得る。ERPアッセイは、米国特許公開第20030077829号に詳細に記載されている。より具体的には、ERPアッセイの目的は、結合/取り込みまたはエンドソーム膜の融合/不安定化に対する相対的な効果に基づき、SNALPの様々なカチオン性脂質およびヘルパー脂質成分の効果を識別することである。このアッセイは、SNALPまたはその他の脂質に基づく担体系の各成分が、どのように送達効率に影響を与えるかを定量的に決定し、それにより、SNALPまたはその他の脂質に基づく担体系を最適化することを可能にする。通常、ERPアッセイは、レポータータンパク質（例えば、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）等）の発現を測定し、いくつかの例において、発現プラスミドのために最適化されたSNALP製剤は、干渉RNAを封入するためにも適切であろう。他の例において、ERPアッセイは、干渉RNA（例えば、siRNA）の存在下または非存在下での標的配列の転写または翻訳のダウンレギュレーションを測定するために適合し得る。様々なSNALPまたはその他の脂質に基づく製剤の各々に関してERPを比較することによって、細胞への最も大きな取り込みを有する最適化された系、例えば、SNALPまたはその他の脂質に基づく製剤を容易に決定することが可能である。

30

## 【0355】

## C. 干渉RNAの送達のための細胞

本発明の組成物および方法は、インビボおよびインビトロの多様な細胞型を処置するために使用される。適当な細胞には、例えば、造血系前駆（幹）細胞、繊維芽細胞、ケラチノサイト、肝細胞、内皮細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、骨芽細胞、ニューロン、静止リンパ球、最終分化細胞、細胞周期が長いまたは休止状態の初代細胞、柔組織細胞、リンパ球系細胞、上皮細胞、骨細胞等が含まれる。好ましい態様において、干渉RNA（例えば、siRNA）は、例えば、肺癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、肛門癌細胞、胆管癌細胞、小腸癌細胞、胃癌（胃の癌）細胞、食道癌細胞、胆嚢癌細胞、肝臓癌細胞、膵臓癌細胞、虫垂癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、子宮頸癌細胞、前立腺癌細胞、腎臓癌細胞、中枢神経系の癌細胞、神経膠芽腫腫瘍細胞、皮膚癌細胞、リンパ腫細胞、絨毛癌腫瘍細胞、頭頸部癌細胞、骨原性肉腫腫瘍細胞、および血液癌細胞のような癌細胞に送達される。

40

50

## 【0356】

干渉RNA（例えば、siRNA）が封入されている核酸-脂質粒子のインビボ送達は、任意の細胞型の細胞を標的とするのに適している。方法および組成物は、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、およびモルモット）、ウサギ、ブタ、ならびに霊長類（例えば、サル、チンパンジー、およびヒト）のような哺乳動物を含む極めて多様な脊椎動物の細胞で利用され得る。

## 【0357】

細胞の組織培養が必要とされるかもしれないという点で、それは、当技術分野において周知である。例えば、Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3rd Ed., Wiley-Liss, New York (1994)、Kuchler et al., Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977)、およびそれらの中に引用された参照が、細胞の培養に関する一般的な案内を提供している。培養細胞株は、しばしば、細胞の単層の形態であろうが、細胞懸濁物が使用されてもよい。

## 【0358】

## D. SNALPの検出

いくつかの態様において、核酸-脂質粒子は、粒子の投与の約8時間後、12時間後、24時間後、48時間後、60時間後、72時間後、もしくは96時間後、または6日後、8日後、10日後、12日後、14日後、16日後、18日後、19日後、22日後、24日後、25日後、もしくは28日後、対象において検出可能である。粒子の存在は、細胞、組織、または対象由来のその他の生物学的試料において検出され得る。粒子は、例えば、粒子の直接検出、干渉RNA（例えば、siRNA）配列の検出、関心対象の標的配列の検出（即ち、関心対象の配列の発現もしくは発現低下の検出）、またはそれらの組み合わせによって検出され得る。

## 【0359】

## 1. 粒子の検出

核酸-脂質粒子は、当技術分野において公知の任意の方法を使用して検出され得る。例えば、当技術分野において周知の方法を使用して、SNALPまたはその他の担体系の成分に直接または間接的に標識をカップリングすることができる。極めて多様な標識が使用され得、標識の選択は、必要とされる感度、SNALP成分とのコンジュゲーションの容易さ、安定性要件、ならびに利用可能な機器および廃棄規定に依る。適当な標識には、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、およびフルオレセインイソチオシアネート（FITC）およびOregon Green（商標）のような誘導体；ローダミン、およびテキサスレッド、テトラロージミンイソチオシアネート（tetra-rhodimine isothiocyanate）（TRITC）等のような誘導体、ジゴキシゲニン、ピオチン、フィコエリトリン、AMCA、CyDyes（商標）等）のようなスペクトル標識； $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 等のような放射標識；西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等のような酵素；コロイド金または色ガラスまたはポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等のようなプラスチックビーズ等のようなスペクトル比色分析標識が含まれるが、これらに限定はされない。標識は、当技術分野において公知の任意の手段を使用して検出され得る。

## 【0360】

## 2. 核酸の検出

核酸（例えば、干渉RNA）は、当業者に周知の多数の手段のうちの任意のものによって本明細書において検出され定量化される。核酸の検出は、サザン分析、ノーザン分析、ゲル電気泳動、PCR、放射標識、シンチレーション計数、およびアフィニティクロマトグラフィのような周知の方法によって進む。分光光度法、X線撮影、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）、薄層クロマトグラフィ（TLC）、およびハイパーディフュージョン（hyperdiffusion）クロマトグラフィのような付加的な生化学的分析法も利用され得る。

## 【0361】

核酸ハイブリダイゼーション形式の選択は、重大ではない。多様な核酸ハイブリダイゼーション形式が当業者に公知である。例えば、一般的なフォーマットには、サンドイッチ

アッセイおよび競合アッセイまたは置換アッセイが含まれる。ハイブリダイゼーション技術は、例えば、"Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach," Eds. Hames and Higgins, IRL Press(1985)に一般に記載されている。

【0362】

ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、検出される標的核酸を増大させる核酸増幅系の使用を通して増強され得る。分子プローブとして使用するための配列を増幅するため、またはその後のサブクローニングのための核酸断片を作製するのに適しているインビトロ増幅技術は公知である。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、Q-レプリカーゼ増幅、およびその他のRNAポリメラーゼによって媒介される技術(例えば、NASBA(商標))を含む、そのようなインビトロ増幅法に関して熟練者を導くのに十分な技術の例は、Sambrook et al., In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2000); および Ausubel et al., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.(2002); ならびに米国特許第4,683,202号; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications(Innis et al. eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA(1990); Arnheim & Levinson(October 1, 1990), C&EN 36; The Journal Of NIH Research, 3:81(1991); Kwok et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173(1989); Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874(1990); Lomell et al., J. Clin. Chem., 35:1826(1989); Landegren et al., Science, 241:1077(1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291(1990); Wu and Wallace, Gene, 4:560(1989); Barringer et al., Gene, 89:117(1990); および Sooknanan and Malek, Biotechnology, 13:563(1995)に見出される。インビトロで増幅された核酸をクローニングする改善された方法は、米国特許第5,426,039号に記載されている。当技術分野において記載されているその他の方法は、核酸配列に基づく増幅(NASBA(商標)、Cangene, Mississauga, Ontario) および Q-レプリカーゼ系である。PCRプライマーまたはLCRプライマーが、選択配列が存在する場合のみ、伸長されるかまたはライゲートされるよう設計されるこれらの系は、変異体を直接同定するために使用され得る。または、選択配列は、一般に、例えば、非特異的PCRプライマーを使用して増幅されてもよく、増幅された標的部位が、後に、変異を示す特異的な配列に関して探索される。

【0363】

例えば、インビトロ増幅法において、プローブとして使用するための核酸、遺伝子プローブとして使用するための核酸、または阻害剤成分としての核酸は、典型的には、Beaucage et al., Tetrahedron Letts., 22:1859-1862(1981)によって記載された固相ホスホラミダイトリエステル法に従って、例えば、Needham VanDevanter et al., Nucleic Acids Res., 12:6159(1984)に記載されたような自動合成装置を使用して、化学合成される。ポリヌクレオチドの精製は、必要であれば、典型的には、未変性アクリルアミドゲル電気泳動によって、または Pearson et al., J. Chrom., 255:137-149(1983)に記載されたような陰イオン交換HPLCによって実施される。合成ポリヌクレオチドの配列は、Maxam and Gilbert(1980) in Grossman and Moldave(eds.) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499の化学的分解法を使用して確認され得る。

【0364】

転写のレベルを決定するための代替的な手段は、インサイチューハイブリダイゼーションである。インサイチューハイブリダイゼーションアッセイは、周知であり、Angerer et al., Methods Enzymol., 152:649(1987)に一般に記載されている。インサイチューハイブリダイゼーションアッセイにおいては、細胞を、固体支持体、典型的には、ガラススライドに固定する。DNAを探索すべき場合には、細胞を熱またはアルカリで変性させる。次いで、標識されている特異的プローブのアニールングを可能にするため、中程度の温度で、細胞をハイブリダイゼーション溶液と接触させる。プローブは、好ましくは、放射性同位元素または蛍光性レポーターで標識される。

【0365】

IX. 化学療法剤の投与

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、本発明は、化学療法薬と組み合わせて（例えば、適当な担体系を使用して）PLK-1干渉RNAを投与することにより、化学療法薬の効果に対して細胞を感作する方法を提供する。方法は、標準的な組織培養技術を使用してインビトロで実施されてもよいし、または本明細書に記載されたように、または当技術分野において公知の任意の手段を使用して、干渉RNAおよび化学療法薬を投与することによりインビボで実施されてもよい。好ましい態様において、この治療剤の組み合わせは、ヒトのような哺乳動物の体内の癌細胞に送達される。

【0366】

ある種の局面において、化学療法を開始しようとしている患者は、まず、適当な用量のPLK-1干渉RNA（例えば、siRNA）を含有している一つまたは複数の核酸-脂質粒子（例えば、SNALP）により前処置される。患者は、化学療法薬投与前の任意の合理的な時点で、適当な用量の一つまたは複数の核酸-脂質粒子により前処置され得る。非限定的な例として、その用量の一つまたは複数の核酸-脂質粒子は、化学療法薬投与の約96、84、72、60、48、36、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、もしくは0.1時間前、またはそれらの間の時点で投与され得る。

【0367】

さらに、化学療法を開始しようとしている患者は、化学療法薬投与前の異なる時点で、PLK-1干渉RNA（例えば、siRNA）を含有している核酸-脂質粒子（例えば、SNALP）の複数回投与によって前処置されてもよい。従って、本発明の方法は、化学療法薬投与前に、核酸-脂質粒子の二回目の用量を投与することをさらに含み得る。ある種の例において、一回目の用量の核酸-脂質粒子は、二回目の用量の核酸-脂質粒子と同一である。ある種の他の例において、一回目の用量の核酸-脂質粒子は、二回目の用量の核酸-脂質粒子と異なる。好ましくは、二回の前処置用量は、同一のPLK-1干渉RNA配列を含有している同一の核酸-脂質粒子、例えば、SNALPを使用する。核酸-脂質粒子の二回目の用量が、一回目の用量の後の任意の合理的な時点で行われ得ることを、当業者は認識するであろう。非限定的な例として、一回目の用量が、化学療法薬投与の約12時間前に投与された場合、二回目の用量は、化学療法薬投与の約11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、もしくは0.1時間前、またはそれらの間の時点で投与され得る。核酸-脂質粒子の二回目の用量が、同一の用量であってもよいし、または異なる用量であってもよいことを、当業者は認識するであろう。本発明の付加的な態様において、患者は、化学療法薬投与前に、三回目、四回目、五回目、六回目、七回目、八回目、九回目、十回目、またはそれ以上の同一であるかまたは異なる核酸-脂質粒子の用量によって前処理されてもよい。

【0368】

患者は、化学療法薬投与中の任意の合理的な時点で、適当な用量のPLK-1干渉RNA（例えば、siRNA）を含有している一つまたは複数の核酸-脂質粒子（例えば、SNALP）によって処置されてもよい。従って、本発明の方法は、化学療法薬投与中に、ある用量の核酸-脂質粒子を投与することをさらに含むことができる。当業者は、核酸-脂質粒子の複数回投与が化学療法薬投与中の異なる時点で投与され得ることを認識するであろう。非限定的な例として、未修飾PLK-1 siRNA配列および/または修飾PLK-1 siRNA配列を含有しているSNALPIは、化学療法薬投与の開始時、化学療法薬投与の進行中、および/または化学療法薬投与の終了時に投与され得る。核酸-脂質粒子の前処置および中間処置（即ち、化学療法薬投与中）の用量が、同一の用量であってもよいし、または異なる用量であってもよいことも、当業者は認識するであろう。

【0369】

さらに、患者は、化学療法薬投与後の任意の合理的な時点で、適当な用量のPLK-1干渉RNA（例えば、siRNA）を含有している一つまたは複数の核酸-脂質粒子（例えば、SNALP）により処置され得る。従って、本発明の方法は、化学療法薬投与後に、ある用量の核酸-脂質粒子を投与することをさらに含み得る。非限定的な例として、その用量の一つまたは

複数の核酸-脂質粒子は、化学療法薬投与の約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、60、72、84、96、108時間後、またはそれより後、またはそれらの間の時点で投与され得る。ある種の例において、化学療法薬投与の前後に、同一の核酸-脂質粒子が使用される。ある種の他の例において、異なる核酸-脂質粒子が、化学療法薬投与後に使用される。核酸-脂質粒子の複数回投与が、化学療法薬投与後の異なる時点で投与され得ることを、当業者は認識するであろう。核酸-脂質粒子の前処置および後処置（即ち、化学療法薬投与後）の用量が、同一の用量であってもよいし、または異なる用量であってもよいことも、当業者は認識するであろう。

#### 【0370】

化学療法薬は、必要に応じて、適当な薬学的賦形剤と共に投与され得、容認される投与モードのうちの任意のものを介して実施され得る。従って、投与は、例えば、経口、頬、舌下、歯肉、口蓋、静脈内、局所、皮下、経皮（transcutaneous）、経皮（transdermal）、筋肉内、関節内、非経口、細動脈内、皮内、脳室内、頭蓋内、腹腔内、膀胱内、くも膜下腔内、病巣内、鼻腔内、直腸、膣、または吸入であり得る。「同時投与」とは、化学療法薬が、第二の薬物または治療剤（例えば、核酸-脂質粒子、もう一つの化学療法薬、化学療法に関連した副作用を低下させるために有用な薬物、放射線治療剤、ホルモン治療剤、免疫治療剤等）の投与と同時に、直前に、または直後に投与されることを意味する。

#### 【0371】

本発明において使用するのに適している化学療法薬の非限定的な例には、白金に基づく薬物（例えば、オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、スピロプラチン（spiroplatin）、イプロプラチン（iproplatin）、サトラプラチン等）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、イホスファミド、クロラムブシル、プスルファン、メルファラン、メクロレタミン、ウラムスチン（uramustine）、チオテパ、ニトロソ尿素等）、代謝拮抗薬（例えば、5-フルオロウラシル（5-FU）、アザチオプリン、メトトレキサート、ロイコボリン、カペシタビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、ペメトレキセド、ラルチトレキセド等）、植物アルカロイド（例えば、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピノレルピン、ピンデシン、ポドフィロトキシン、パクリタクセル（タキソール）、ドセタキセル等）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド（VP16）、リン酸エトポシド、テニポシド等）、抗腫瘍抗生物質（例えば、ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン等）、チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、ゲフィチニブ（Iressa（登録商標））、スニチニブ（Sutent（登録商標）；SU11248）、エルロチニブ（Tarceva（登録商標）；OSI-1774）、ラパチニブ（GW572016；GW2016）、カネルチニブ（CI 1033）、セマキシニブ（SU5416）、パタラニブ（PTK787/ZK222584）、ソラフェニブ（BAY 43-9006）、イマチニブ（Gleevec（登録商標）；STI571）、ダサチニブ（BMS-354825）、レフルノミド（SU101）、バンデタニブ（Zactima（商標）；ZD6474）等）、それらの薬学的に許容される塩、それらの立体異性体、それらの誘導體、それらのアナログ、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。

#### 【0372】

本明細書に記載された核酸-脂質粒子および/または化学療法薬は、ステロイド（例えば、デキサメタゾン）、フィナステリド、アロマターゼ阻害薬、タモキシフェン、およびゴセレリンのような性腺刺激ホルモン放出ホルモンアゴニスト（GnRH）を含むが、これらに限定はされない、従来のホルモン治療剤と同時投与されてもよい。

#### 【0373】

さらに、本明細書に記載された核酸-脂質粒子および/または化学療法薬は、免疫刺激剤（例えば、カルメットゲラン桿菌（BCG）、レバミソール、インターロイキン-2、アルファ-インターフェロン等）、モノクローナル抗体（例えば、抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗HLA-DR、および抗VEGFモノクローナル抗体）、免疫毒素（例えば、抗CD33モノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体-カリチアマイシンコンジュゲート、抗CD22モノクローナル抗体-シュードモナス外毒素コンジュゲート等)、ならびに放射線免疫治療(例えば、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、または $^{131}\text{I}$ にコンジュゲートされた抗CD20モノクローナル抗体等)を含むが、これらに限定はされない、従来の免疫治療剤と同時投与されてもよい。

【0374】

さらなる態様において、本明細書に記載された核酸-脂質粒子および/または化学療法薬は、任意で、腫瘍抗原に対する抗体にコンジュゲートされた、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{87}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、および $^{212}\text{Bi}$ のような放射性核種を含むが、これらに限定はされない、従来の放射線治療剤と同時投与されてもよい。

10

【0375】

治療的に有効な量の化学療法薬は、例えば、少なくとも2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、またはそれ以上、繰り返し投与されてもよいし、または、用量は連続注入によって投与されてもよい。用量は、好ましくは、正確な投薬量の単純な投与のために適した単位剤形で、例えば、錠剤、丸剤、ペレット、カプセル、粉末、溶液、懸濁物、エマルジョン、坐剤、停留浣腸、クリーム、軟膏剤、ローション、ゲル、エアロゾル、フォーム等のような、固形、半固形、凍結乾燥粉末、または液状の剤形の形態をとり得る。投与される化学療法薬の投薬量は、投与される特定の化学療法薬または化学療法薬のセット、投与のモード、適用の型、患者の年齢、および患者の身体状態を含むが、これらに限定はされない、多数の因子に依って変動するであろうことを、当業者は認識するであろう。好ましくは、所望の結果を生ずるために必要とされる最低の用量および濃度が使用されるべきである。子供、高齢者、衰弱した患者、ならびに心疾患および/または肝疾患を有する患者に関しては、投薬量が適切に調整されるべきである。さらなる案内は、投薬量の評価のための実験動物モデルを使用した当技術分野において公知の研究より入手され得る。

20

【0376】

本明細書において使用されるように、「単位剤形」という用語は、ヒト対象およびその他の哺乳動物のための単位投薬量として適当な物理的に不連続の単位をさし、各単位は、適当な薬学的賦形剤と会合した、所望の作用発現、耐容性、および/または治療効果を生ずるよう計算された予定された量の化学療法薬を含有している(例えば、アンプル)。さらに、より濃縮された剤形を調製し、次いで、それから、より希薄な単位剤形を作製することもできる。より濃縮された剤形は、実質的に多い、例えば、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれ以上の量の化学療法薬を含有しているであろう。

30

【0377】

そのような剤形を調製する方法は、当業者に公知である(例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA(1990)参照)。剤形は、典型的には、従来の薬学的担体または賦形剤を含み、その他の医用薬剤、担体、アジュバント、希釈剤、組織透過性増強剤、可溶化剤等を付加的に含んでいてもよい。適切な賦形剤は、当技術分野において周知の方法によって、特定の剤形および投与経路のため調整され得る(例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(前記)参照)。

40

【0378】

適当な賦形剤の例には、乳糖、デキストロース、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸、トラガカントゴム、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、生理食塩水、シロップ、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、およびCarbopol、例えば、Carbopol 941、Carbopol 980、Carbopol 981等のようなポリアクリル酸が含まれ得るが、これらに限定はされない。剤形は、タルク、ステアリン酸マグネシウム、および鉱油のような滑沢剤；湿潤剤；乳化剤；懸濁化剤；ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシ安息香酸エチル、およびヒドロキシ安息香酸プロピル(即ち、パラベン)のような保存剤；無機および有機の酸および塩基のようなpH調整剤；甘

50

味剤；ならびに風味剤を付加的に含んでもよい。剤形には、生分解性ポリマービーズ、デキストラン、およびシクロデキストリン包含複合体も含まれ得る。

【0379】

経口投与の場合、治療的に有効な用量は、錠剤、カプセル、エマルジョン、懸濁物、溶液、シロップ、スプレー、ロゼンジ、粉末、および徐放性製剤の形態であり得る。経口投与のための適当な賦形剤には、薬学的等級のマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、ゼラチン、ショ糖、炭酸マグネシウム等が含まれる。

【0380】

いくつかの態様において、治療的に有効な用量は、丸剤、錠剤、またはカプセルの形態をとり、従って、剤形は、化学療法薬と共に、以下のうちの任意のものを含有してもよい：乳糖、ショ糖、第二リン酸カルシウム等のような希釈剤；デンプンまたはその誘導体のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等のような滑沢剤；ならびにデンプン、アラビアゴム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロース、およびそれらの誘導体のような結合剤。化学療法薬は、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）担体の中に配置された坐剤へ製剤化されてもよい。

10

【0381】

例えば、経口投与、局所投与、または静脈内投与のための溶液または懸濁物を形成するためには、化学療法薬、および、任意で、一つまたは複数の薬学的に許容されるアジュバントを、例えば、水性生理食塩水（例えば、0.9%w/v塩化ナトリウム）、水性デキストロース、グリセロール、エタノール等のような担体に溶解させるかまたは分散させることにより、液状剤形を調製することができる。化学療法薬は停留浣腸へ製剤化されてもよい。

20

【0382】

局所投与の場合、治療的に有効な用量は、エマルジョン、ローション、ゲル、フォーム、クリーム、ゼリー、溶液、懸濁物、軟膏、および経皮パッチの形態であり得る。吸入による投与の場合、化学療法薬は、噴霧器を介して、乾燥粉末として、または液状で送達され得る。非経口投与の場合、治療的に有効な用量は、無菌注射可能溶液および無菌のパッケージングされた粉末の形態であり得る。好ましくは、注射可能溶液は、約4.5～約7.5のpHで製剤化される。

【0383】

治療的に有効な用量は、凍結乾燥形態で提供されてもよい。そのような剤形は、投与前の再生のため、緩衝液、例えば、重炭酸緩衝液を含んでもよいし、または、例えば、水による再生のため、緩衝剤が凍結乾燥剤形に含まれていてもよい。凍結乾燥剤形は、適当な血管収縮薬、例えば、エピネフリンをさらに含んでもよい。凍結乾燥剤形は、注射器に提供され得、任意で、再生された剤形を直ちに対象へ投与することができるよう、再生のための緩衝液と組み合わせてパッケージングされてもよい。

30

【実施例】

【0384】

X. 実施例

本発明を、具体的な実施例により、さらに詳しく説明する。以下の実施例は、例示目的のために提示され、決して、本発明を限定するためのものではない。本質的に同一の結果を与えるよう変化させるかまたは修飾することができる、多様な重大でないパラメータを、当業者は容易に認識するであろう。

40

【0385】

実施例1. 材料および方法

siRNA: これらの研究において使用された全てのsiRNA分子が、University of Calgary (Calgary, AB)、Dharmacon Inc. (Lafayette, CO)、またはIntegrated DNA Technologies (Coralville, IA) によって化学合成された。siRNAは、標準的な手法を使用して、脱塩されアニーリングされた。

【0386】

50

siRNAの脂質への封入：他に示されない限り、siRNA分子は、以下の脂質から構成される核酸-脂質粒子へ封入された：それぞれモル比48:10:2:40の合成コレステロール（Sigma-Aldrich Corp. ; St.Louis,MO）；リン脂質DSPC（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン；Avanti Polar Lipids；Alabaster,AL）；PEG-脂質PEG-cDMA（3-N-[-メトキシポリ(エチレングリコール)2000]カルバモイル]-1,2-ジミレスチルオキシ-プロピルアミン；およびカチオン性脂質DLinDMA（1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N,N-ジメチル)アミノプロパン）。換言すると、他に示されない限り、siRNAは、以下の「2:40」SNALP製剤のリポソームへ封入された：2%PEG-cDMA；40%DLinDMA；10%DSPC；および48%コレステロール。いくつかの態様において、siRNA分子は、以下の脂質から構成される核酸-脂質粒子へ封入された：それぞれモル比1.4:57.1:7.1:34.3の脂質コンジュゲートPEG-cDMA；カチオン性脂質DLinDMA；リン脂質DPPC（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン；Avanti Polar Lipids；Alabaster,AL）；および合成コレステロール。換言すると、siRNAは、以下の「1:57」製剤のSNALPへ封入された：1.4%PEG-cDMA；57.1%DLinDMA；7.1%DPPC；および34.3%コレステロール。他の態様において、siRNA分子は、以下の脂質から構成されるリン脂質不含SNALPへ封入された：それぞれモル比1.5:61.5:36.9の脂質コンジュゲートPEG-cDMA；カチオン性脂質DLinDMA；および合成コレステロール。換言すると、siRNAは、以下の「1:62」製剤のリン脂質不含SNALPへ封入された：1.5%PEG-cDMA；61.5%DLinDMA；および36.9%コレステロール。媒体対照のため、同一の脂質組成を有する空の粒子を、siRNAの非存在下で形成した。1:57製剤および1:62製剤は目標製剤であり、製剤中に存在する脂質（カチオン性および非カチオン性の両方）の量、ならびに存在する脂質コンジュゲートの量は、変動し得ることが理解されるべきである。典型的には、1:57製剤において、カチオン性脂質の量は57モル%±5モル%であり、脂質コンジュゲートの量は、1.5モル%±0.5モル%であり、1:57製剤の残りは非カチオン性脂質（例えば、リン脂質、コレステロール、またはその二つの混合物）から構成されるであろう。同様に、1:62製剤において、カチオン性脂質の量は62モル%±5モル%であり、脂質コンジュゲートの量は1.5モル%±0.5モル%であり、1:62製剤の残りは非カチオン性脂質（例えば、コレステロール）から構成されるであろう。

#### 【0387】

細胞生存性アッセイ：インビトロ細胞培養物の細胞生存性は、市販の試薬CellTiter-Blue（登録商標）（Promega Corp. ; Madison,WI）（代謝活性を有する細胞によって蛍光発生活生成物レゾルフィンへ還元されるレサズリン色素）を使用して判定された。様々な癌細胞株を、標準的な組織培養技術を使用してインビトロで培養した。siRNA製剤および/または化学療法薬による処理の48~72時間後、細胞生存性の尺度である細胞の代謝活性を定量化するため、CellTiter-Blue（登録商標）試薬を培養物に添加した。

#### 【0388】

標的mRNA定量：SNALPにより処理された細胞培養物における標的mRNAの低下を定量化するため、QuantiGene（登録商標）分岐DNAアッセイ（Panomics, Inc. ; Fremont,CA）を使用した。製造業者の指示に従って細胞溶解物を調製し、PLK1 mRNA定量化のため直接使用した。媒体（PBS）処理対照細胞と比べた相対PLK-1 mRNAレベルを表す。mRNAの検出のために使用された特異プローブセットは、ヒトPLK-1 mRNA（Genbankアクセッション番号NM\_05030）を標的とするよう設計された。これらのプローブセットはマウスPLK-1と交差反応性である。

#### 【0389】

アポトーシス/カスパーゼ3/7アッセイ：siRNA処理細胞におけるカスパーゼ3および7の酵素活性のレベルを、市販の試薬Apo-ONE（登録商標）（Promega Corp.,Madison,WI）を使用して判定した。このアッセイは、カスパーゼ3/7基質（Z-DEVD）2-ローダミン110の蛍光発生活生成物への特異的な酵素的切断に基づいており、培養細胞におけるアポトーシスのレベルを定量化するために使用される。多数の癌細胞株で、siRNA製剤および/または化学療法薬による処理の24~48時間後に、カスパーゼ3/7活性の相対レベルを判定した。

#### 【0390】

10

20

30

40

50

サイトカイン誘導アッセイ：100ng/mlマウスFlt3リガンド（PeproTech Inc. ; Rocky Hill, NJ）が補足された培地を使用して、Gillietら（J.Exp.Med., 195:953-958）によって記載されたようにして、Flt3リガンド由来マウス樹状細胞（Flt3L DC）を作製した。雌Balb/Cマウスの大腿骨および脛骨を単離し、無菌PBSで洗った。骨の端を切断し、完全培地（RPMI1640、10%熱不活化FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、25mM HEPES、50 μM 2-メルカプトエタノール）に骨髓を採集した。骨髓細胞を70 μmのストレーナーに通し、1000rpmで7分間遠心分離し、100ng/mlマウスFlt3Lが補足された完全培地に $2 \times 10^6$ 細胞/mlで再懸濁させた。2mlの細胞を6穴プレートに播種し、1mlの新鮮な完全培地を2日毎または3日毎に添加した。培養9日目、非接着細胞を完全培地で洗浄し、 $0.5 \sim 2.5 \times 10^5$ 細胞/ウェルの範囲の濃度で96穴プレートへ播種した。2'OME修飾PLK-1 SNALPおよび未修飾（0/0）PLK-1 SNALPを、PBSで希釈し、5 μg/ml siRNAでFlt3L DC培養物に添加した。細胞を37 °Cで24時間インキュベートした後、ELISAによって上清をサイトカインに関してアッセイした。

10

## 【0391】

サイトカインELISA：製造業者の指示に従ってサンドイッチELISAキットを使用して、培養上清中のインターフェロン- $\gamma$  およびIL-6を定量化した。これらは、マウスIFN- $\gamma$ （PBL Biomedical ; Piscataway, NJ）およびマウスIL-6（eBioscience ; San Diego, CA）であった。

## 【0392】

実施例2. 候補PLK-1 siRNA分子の選択

20

ヒトPLK-1 mRNA配列（Genbankアクセッション番号NM\_005030）またはマウスPLK-1 mRNA配列（Genbankアクセッション番号NM\_011121）を、Whitehead Institute for Biomedical Research siRNA設計アルゴリズム（例えば、Elbashir et al., Genes Dev., 15:188-200(2001) ; Schwarz et al., Cell, 115:199-208(2003) ; およびKhvorova et al. Cell, 115: 209-216(2003)参照、<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>にて入手可能）へ帰することにより、候補PLK-1 siRNA配列を同定した。以下の基準を満たすsiRNAを選択した：（1）NN(N19)NN標的配列；（2）熱力学的により不安定的な5'アンチセンス末（差<-2.0）；（3）30~70%のG/C含量；および（4）同一塩基の4ヌクレオチドストレッチなし。選択された配列を確認し、ヒトおよびマウス両方の標的配列における位置を同定した。

## 【0393】

30

次いで、ヒトおよびマウスの配列データベースに対するBLASTn検索を、全ての選択された配列に対して実施した。内部ヌクレオチドのうちの>15個と交差ハイブリダイズする配列を排除した。

## 【0394】

候補配列を表1~2に示す。

（表1）ヒトPLK-1発現を標的とするsiRNA配列

| siRNA   | センス鎖 (5' → 3')        | SEQ ID NO: | アンチセンス鎖 (5' → 3')   | SEQ ID NO: |
|---------|-----------------------|------------|---------------------|------------|
| PLK1424 | AGAUCACCCUCCUAAAUA    | 1          | UAUUUAAGGAGGGUGAUCU | 2          |
| PLK773  | AGACCUACCUCGGGAUCAA   | 3          | UUGAUCCGGAGGUAGGUCU | 4          |
| PLK126  | GGUCCUAGUGGACCCACGC   | 5          | GCGUGGGUCCACUAGGACC | 6          |
| PLK412  | CUCCUGGAGCUGCACAAGA   | 7          | UCUUGUGCAGCUCCAGGAG | 8          |
| PLK694  | GUGGAUGUGUGGUCCAUUG   | 9          | CAAUGGACCACACAUCCAC | 10         |
| PLK772  | GAGACCUACCUCGGGAUCA   | 11         | UGAUCCGGAGGUAGGUCUC | 12         |
| PLK832  | GCCGCCUCCUCAUCCAGA    | 13         | UCUGGAUGAGGGAGGGCGC | 14         |
| PLK837  | CUCCUCAUCCAGAAGAUG    | 15         | CAUCUUCUGGAUGAGGGAG | 16         |
| PLK1081 | CCAGUGGUUCGAGAGACAG   | 17         | CUGUCUCUGAACCACUGG  | 18         |
| PLK1195 | GAGGUCAGGAUCCUGCCU    | 19         | AGGCAGGAUCCUCAGCCU  | 20         |
| PLK1229 | GGGUCAGCAAGUGGGUGGA   | 21         | UCCACCCACUUGCUGACCC | 22         |
| PLK1232 | UCAGCAAGUGGGUGGACUA   | 23         | UAGUCCACCCACUUGCUGA | 24         |
| PLK1233 | CAGCAAGUGGGUGGACUAU   | 25         | AUAGUCCACCCACUUGCUG | 26         |
| PLK1242 | GGUGGACUAUUCGGACAAG   | 27         | CUUGUCCGAUAGUCCACC  | 28         |
| PLK1345 | GACAGCCUGCAGUACAUAUAG | 29         | CUAUGUACUGCAGGCUGUC | 30         |
| PLK1556 | GCGCAUCAUCCUGCACCU    | 31         | AGGUGCAGGAUGAUGGCGC | 32         |

## 【 0 3 9 5 】

表1中の「PLK」の後の数字は、ヒトPLK-1 mRNA配列NM\_005030の開始コドン(ATG)に対するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位をさす。ある種の態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、および/またはロックド核酸(LNA)ヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は「dTdT」または「UU」3'突出を含有している。他の例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、標的配列またはその相補鎖に対する相補性を有する3'突出を含有している。非限定的な例として、PLK1424センス鎖(SEQ ID NO:1)は「UU」3'突出を含有していてもよく、PLK1424アンチセンス鎖(SEQ ID NO:2)は「UC」3'突出を含有していてもよい。もう一つの非限定的な例として、PLK773センス鎖(SEQ ID NO:3)は「GA」3'突出を含有していてもよく、PLK773アンチセンス鎖(SEQ ID NO:4)は「CU」3'突出を含有していてもよい。さらなる態様において、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'突出は、上記のもののような修飾ヌクレオチドを1個、2個、3個、4個、またはそれ以上含んでいてもよい。

## 【 0 3 9 6 】

(表2) マウスPLK-1発現を標的とするsiRNA配列

| siRNA    | センス鎖 (5' → 3')      | SEQ ID NO: | アンチセンス鎖 (5' → 3')   | SEQ ID NO: |
|----------|---------------------|------------|---------------------|------------|
| mPLK1399 | CCCAUCCAAUUCUUGAU   | 33         | AUCAAGGAAUUGGAUGGG  | 34         |
| mPLK1424 | AGAUCACUCUCCUCAACUA | 35         | UAGUUGAGGAGAGUGAUCU | 36         |
| mPLK1425 | GAUCACUCUCCUCAACUAU | 37         | AUAGUUGAGGAGAGUGAUC | 38         |
| mPLK1428 | CACUCUCCUCAACUAUUC  | 39         | GAAAUAGUUGAGGAGAGUG | 40         |
| mPLK1434 | CCUCAACUAUUCGCAAU   | 41         | AUUGCGGAAAUAGUUGAGG | 42         |
| mPLK1607 | AGGACCACACCAAACUUAU | 43         | AUAAGUUUGGUGUGGUCCU | 44         |
| mPLK1608 | GGACCACACCAAACUUAUC | 45         | GAUAAGUUUGGUGUGGUCC | 46         |
| mPLK1650 | GACCUACAUCAACGAGAAG | 47         | CUUCUCGUUGAUGUAGGUC | 48         |
| mPLK1668 | GAGGGACUCCAAACGUAC  | 49         | GUACGUUGGAAGUCCUC   | 50         |

## 【 0 3 9 7 】

表2中の「mPLK」の後の数字は、マウスPLK-1 mRNA配列NM\_011121の開始コドン(ATG)に対するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位をさす。ある種の態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、および/またはロックド核酸(LNA)ヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は「dTdT」または「UU」3'突出を含有している。他の例において、センス鎖および/またはアン

チセンス鎖は、標的配列またはその相補鎖に対する相補性を有する3'突出を含有している。さらなる態様において、3'突出は、上記のもののような修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

#### 【0398】

実施例3. PLK-1を標的とするsiRNAは癌細胞の成長を阻害する

様々なPLK-1 siRNAを、SNALP (「2:40」SNALP製剤：2% PEG-cDMA；40% DLinDMA；10% DSPC；および48% コレステロール)として製剤化し、インビトロの細胞増殖に対する阻害効果に関して評価した。HT29 (ヒト結腸腺癌)細胞またはNeuro2A (マウス神経芽腫)細胞を、ある範囲のsiRNA濃度で、様々なPLK-1 SNALPにより処理し、細胞生存性に対する効果を評価した。細胞培養物の生存性は、PBS処理対照に対して相対的な生存性(%)として表される。図1Aは、PLK1424を含有しているSNALPが、ヒト腫瘍細胞を死滅させるために高度に強力であったことを示す。マウス細胞株においては不活性であったことから示されるように、このsiRNA配列はヒトPLK-1に特異的である(図1B)。PLK1081またはPLK1345のいずれかを含有しているSNALPも、ヒト腫瘍細胞の成長を阻害したが、より高いsiRNA濃度であった(図1A)。マウスPLK-1およびヒトPLK-1で保存されるよう設計されたPLK1345は、より高いsiRNA濃度で、マウスNeuro2A細胞の成長を阻害するために有効であった(図1B)。ルシフェラーゼ(Luc)を標的とするsiRNAを、対照SNALPとして使用した。

10

#### 【0399】

実施例4. PLK-1を標的とするsiRNAによる癌細胞におけるPLK-1 mRNAの用量依存性のサイレンシング

20

PLK-1 SNALP (「2:40」SNALP製剤：2% PEG-cDMA；40% LinDMA；10% DSPC；および48% コレステロール)を、HT29細胞においてPLK-1 mRNAをサイレンシングする能力に関して試験した。細胞を比較的高濃度(およそ10,000細胞/ウェル)でデュプリケートで播種した。QuantiGene (登録商標)分析を、mRNAダウンレギュレーションのレベルを検出するため、トランスフェクションの24時間後に実施した。トランスフェクトされた細胞の視覚的スコアを、トランスフェクションの48時間後に入手した。細胞生存性分析を、トランスフェクションの72時間後に実施した。図2Aは、24時間後の、非ターゲティング(GFP)siRNA対照に対して相対的な、PLK1424およびPLK1081によるPLK-1 mRNAのサイレンシングを示す。図2Bは、72時間後の細胞生存性に対するこれらのsiRNAの後続的な効果を示す。結果は、細胞生存性に対するPLK-1 SNALPの強力な効果が、PLK-1 mRNAのサイレンシングによることを確認している。

30

#### 【0400】

実施例5. PLK-1を標的とする付加的なsiRNAは癌細胞の成長を阻害する

付加的なPLK-1 siRNA分子を、SNALP (「2:40」SNALP製剤：2% PEG-cDMA；40% DLinDMA；10% DSPC；および48% コレステロール)として製剤化し、インビトロの細胞増殖に対する阻害効果に関して評価した。HT29細胞またはNeuro2A細胞を、それぞれ、5000細胞/ウェルおよび2500細胞/ウェルでトリプリケートで播種した。PLK-1 SNALP投薬量は以下の通りであった：25nM；5nM；および1nM。細胞生存性分析を、トランスフェクションの72時間後に実施した。非ターゲティング(GFP)siRNAを含有しているSNALPを陰性対照として使用した。図3Aは、PLK694、PLK773、PLK832、PLK1195、PLK1229、PLK1233、PLK1424、およびPLK1556がヒト腫瘍細胞を死滅させるために有効であり、PLK1424が最も強力な効果を示したことを示している。図3Bは、mPLK1424およびmPLK1425が、最も高活性のマウス特異的siRNA配列であったことを示している。PLK773およびPLK1229が、最も強力なヒト/マウス交差反応性siRNA分子であった。

40

#### 【0401】

実施例6. PLK-1を標的とするsiRNAは異なる結腸癌細胞株において活性である

PLK1424 siRNAまたはPLK773 siRNAを含有しているSNALP (「2:40」SNALP製剤：2% PEG-cDMA；40% DLinDMA；10% DSPC；および48% コレステロール)を、HT29ヒト結腸癌細胞およびLS174Tヒト結腸癌細胞において細胞生存性に対する効果およびPLK-1 mRNAのサイレンシングに関して試験した。細胞をおよそ10,000細胞/ウェルでトリプリケートで播種した

50

。SNALP投薬量は以下の通りであった：30nM；10nM；3.3nM；1.1nM；0.37nM；および0.12nM。トランスフェクションの24時間後に、分岐DNA mRNAアッセイを実施した。トランスフェクションの72時間後に、細胞生存性アッセイを実施した。非ターゲティング（GFP）siRNAを含有しているSNALPを、陰性対照として使用した。図4は、PLK1424 SNALPおよびPLK773 SNALPが、HT29細胞およびLS174T細胞の両方において、PLK-1 mRNAレベルを低下させ、細胞成長を阻害するために有効であったことを示している。細胞生存性に対する効果は、標的PLK-1 mRNAのサイレンシングと関連した。

#### 【0402】

実施例7. PLK-1を標的とするsiRNAは結腸癌細胞においてアポトーシスを誘導する

PLK1424 siRNAまたはPLK773 siRNAを含有しているSNALP（「2:40」SNALP製剤：2%PEG-cDMA；40%DLinDMA；10%DSPC；および48%コレステロール）を、LS174T細胞のアポトーシスの誘導に対する効果に関してさらに試験した。細胞をおよそ10,000細胞/ウェルでトリプリケートで播種した。SNALP投薬量は以下の通りであった：30nM；10nM；および3.3nM。カスパーゼ3/7アッセイを、トランスフェクションの24時間後、48時間後、および72時間後に実施した。非ターゲティング（GFP）siRNAを含有しているSNALPを、陰性対照として使用した。図5は、PLK1424 SNALPおよびPLK773 SNALPが、試験された全てのSNALP用量で、LS174T細胞において有意な量のアポトーシスを誘導したことを示している。

#### 【0403】

実施例8. PLK-1を標的とする付加的なsiRNAは癌細胞の成長を阻害する

付加的なPLK-1 siRNA分子を、SNALP（「2:40」SNALP製剤：2%PEG-cDMA；40%DLinDMA；10%DSPC；および48%コレステロール）として製剤化し、インビトロの細胞成長に対する阻害効果に関して評価した。HT29細胞またはNeuro2A細胞を、それぞれ、5000細胞/ウェルおよび2500細胞/ウェルでトリプリケートで播種した。PLK-1 SNALP投薬量は以下の通りであった：30nM；10nM；および3.3nM。細胞生存性分析を、トランスフェクションの72時間後に実施した。非ターゲティング（GFP）siRNAを含有しているSNALPを、陰性対照として使用した。図6Aは、PLK772、PLK1232、PLK1242、およびPLK1424が、ヒト腫瘍細胞を死滅させるために有効であり、PLK1424が最も強力な効果を示したことを示している。図6Bは、mPLK1607、mPLK1608、およびmPLK1668が最も高活性のマウス特異的PLK-1 siRNA配列であったことを示している。PLK1232が、最も強力なヒト/マウス交差反応性siRNA分子であった。

#### 【0404】

実施例9. 修飾PLK-1 siRNAは非免疫刺激性でありかつ癌細胞の成長を阻害する

siRNA二重鎖の二本鎖領域内の選択的な位置に2'-O-メチル（2'OMe）ヌクレオチドを含有しているPLK-1 siRNA分子を、SNALP（「2:40」SNALP製剤：2%PEG-cDMA；40%DLinDMA；10%DSPC；および48%コレステロール）として製剤化し、インビトロの細胞成長に対する阻害効果に関して評価した。修飾PLK-1 siRNAの配列は、表3に示される。HT29細胞を5000細胞/ウェルでトリプリケートで播種した。ある範囲のPLK-1 SNALP投薬量によるトランスフェクションの72時間後に、細胞生存性分析を実施した。非ターゲティング（GFP）siRNAを含有しているSNALPを、陰性対照として使用した。

#### 【0405】

（表3）センスおよびアンチセンスのPLK-1 RNAポリヌクレオチドを含むsiRNA二重鎖

10

20

30

40

| siRNA         | PLK-1 siRNA配列   | DS領域内の修飾率 (%) |
|---------------|---|---------------|
| PLK1424       | 5'-AGAUCACCCUCCUUAAAUANN-3' (SEQ ID NO:51)<br>3'-NNUCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5' (SEQ ID NO:52)   | 0/38 = 0%     |
| PLK1424 U3/GU | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEQ ID NO:53)<br>3'-NNUC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUUAU-5' (SEQ ID NO:54)                    | 5/38 = 13.2%  |
| PLK1424 U3/UG | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEQ ID NO:53)<br>3'-NNUC <u>U</u> AG <u>U</u> GG <u>G</u> AGGAA <u>U</u> UUUUAU-5' (SEQ ID NO:55) | 7/38 = 18.4%  |
| PLK1424 U3/G  | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEQ ID NO:53)<br>3'-NNUCUA <u>G</u> <u>U</u> GG <u>G</u> AGGAAUUUUAU-5' (SEQ ID NO:56)            | 6/38 = 15.8%  |
| PLK1424 U4/GU | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEQ ID NO:57)<br>3'-NNUC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUUAU-5' (SEQ ID NO:54)                    | 6/38 = 15.8%  |
| PLK1424 U4/UG | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEQ ID NO:57)<br>3'-NNUC <u>U</u> AG <u>U</u> GG <u>G</u> AGGAA <u>U</u> UUUUAU-5' (SEQ ID NO:55) | 8/38 = 21%    |

|              |  |              |
|--------------|--|--------------|
| PLK1424 U4/G | 5'-AGAU <u>CACCCUCCU</u> UAAA <u>U</u> ANN-3' (SEQ ID NO:57)<br>3'-NNUCUAG <u>UGG</u> GAGGAAUUUUAU-5' (SEQ ID NO:56) | 7/38 = 18.4% |
| PLK773       | 5'-AGACCUACCCUCCGGAUCAANN-3' (SEQ ID NO:58)<br>3'-NNUCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEQ ID NO:59)                            | 0/38 = 0%    |
| PLK773 U/U   | 5'-AGACCU <u>ACC</u> UCCGGAUCAANN-3' (SEQ ID NO:60)<br>3'-NNUC <u>UG</u> GAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEQ ID NO:61)           | 6/38 = 15.8% |
| PLK773 U/G   | 5'-AGACCU <u>ACC</u> UCCGGAUCAANN-3' (SEQ ID NO:60)<br>3'-NNUCU <u>G</u> GAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEQ ID NO:62)           | 7/38 = 18.4% |
| PLK773 U/GU  | 5'-AGACCU <u>ACC</u> UCCGGAUCAANN-3' (SEQ ID NO:60)<br>3'-NNUC <u>UG</u> GAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEQ ID NO:63)           | 6/38 = 15.8% |
| PLK773 G/U   | 5'-AGACCUACCCUCCGGAUCAANN-3' (SEQ ID NO:64)<br>3'-NNUC <u>UG</u> GAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEQ ID NO:61)                   | 5/38 = 13.2% |
| PLK773 G/G   | 5'-AGACCUACCCUCCGGAUCAANN-3' (SEQ ID NO:64)<br>3'-NNUCU <u>G</u> GAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEQ ID NO:62)                   | 6/38 = 15.8% |
| PLK773 G/GU  | 5'-AGACCUACCCUCCGGAUCAANN-3' (SEQ ID NO:64)<br>3'-NNUC <u>UG</u> GAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEQ ID NO:63)                   | 5/38 = 13.2% |
| PLK1425      | 5'-GAUCACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:65)<br>3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:66)                              | 0/38 = 0%    |
| PLK1425 3/2  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:67)<br>3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:66)                     | 3/38 = 7.9%  |
| PLK1425 3/5  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:67)<br>3'-NNC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:68)            | 5/38 = 13.2% |
| PLK1425 3/6  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:67)<br>3'-NNCUAGUGG <u>G</u> AGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:69)            | 6/38 = 15.8% |
| PLK1425 3/7  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:67)<br>3'-NNC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:70)            | 7/38 = 18.4% |
| PLK1425 3/8  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:67)<br>3'-NNC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:71)            | 7/38 = 18.4% |
| PLK1425 4/2  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:72)<br>3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:66)                     | 4/38 = 10.5% |
| PLK1425 4/5  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:72)<br>3'-NNC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:68)            | 6/38 = 15.8% |
| PLK1425 4/6  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:72)<br>3'-NNCUAGUGG <u>G</u> AGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:69)            | 7/38 = 18.4% |
| PLK1425 4/7  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:72)<br>3'-NNC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:70)            | 8/38 = 21%   |
| PLK1425 4/8  | 5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAUAUNN-3' (SEQ ID NO:72)<br>3'-NNC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEQ ID NO:71)            | 8/38 = 21%   |

カラム1: 「PLK」の後の数字は、ヒトPLK-1 mRNA配列NM\_005030の開始コドン(ATG)に対するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位をさす。

カラム2: 2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチドは、太字および下線で示される。siRNAは、代替的にまたは付加的に、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、および/またはロックド核酸(LNA)ヌクレオチドを含んでいてもよい。N=デオキシチミジン(dT)ヌクレオチド、修飾ウリジン(U)リボヌクレオチドもしくは未修飾ウリジン(U)リボヌクレオチド、または標的配列もしくはその相補鎖に対する相補性を有する修飾リボヌクレオチドもしくは未修飾リボヌクレオチド。

カラム3: siRNA二重鎖の二本鎖(DS)領域内の修飾ヌクレオチドの数および割合が提供さ

10

20

30

40

50

れる。

【0406】

図7は、PLK1424 siRNA配列における異なる化学的修飾パターンがよく耐容され、修飾siRNA分子が強力な活性を保持していたことを示している。最も高活性の修飾siRNA分子、PLK1424 U4/GUおよびPLK1424 U3/GUは、ヒト腫瘍細胞を死滅させるため、未修飾PLK1424配列と同程度に強力であった。PLK1424 U4/GおよびPLK1424 U3/Gは、未修飾PLK1424配列のものと類似した活性を示した。2'OMe修飾PLK1424 siRNAを含有しているSNALPを、マウスFLT3L DC培養物において、免疫刺激活性に関しても試験した。図8は、修飾PLK1424 siRNAが、この細胞培養系において、検出可能なサイトカイン（即ち、IL-6またはIFN- $\gamma$ ）応答を誘導しなかったことを示す。

10

【0407】

図9は、PLK773 siRNA配列における異なる化学的修飾パターンがよく耐容され、修飾siRNA分子が強力な活性を保持していたことを示している。最も高活性の修飾siRNA分子、PLK773 G/GUは、ヒト腫瘍細胞を死滅させるため、未修飾PLK1424配列より強力であった。PLK773 G/UおよびPLK773 U/GUは、未修飾PLK773配列のものと類似した活性を示した。

【0408】

図10は、PLK1425 siRNA配列における異なる化学的修飾パターンがよく耐容され、修飾siRNA分子が強力な活性を保持していたことを示している。最も高活性の修飾siRNA分子、PLK1425 3/5は、ヒト腫瘍細胞を死滅させるため、未修飾PLK1425配列より強力であった。修飾されたアンチセンス鎖5、7、または8を含有しているPLK1425 siRNAは、RNAi活性を保持していた。

20

【0409】

この実施例は、PLK-1 siRNA二重鎖内の選択的な位置における最小の2'OMe修飾が、RNAi活性を保持しつつ、PLK-1 siRNAの免疫刺激特性を減少させるために十分であることを例示している。特に、二本鎖領域内のヌクレオチド位の約25%未満における選択的な2'OMe-ウリジン修飾および/または2'OMe-グアノシン修飾は、サイレンシングおよび非免疫刺激特性の望ましい組み合わせをPLK-1 siRNAに提供する。

【0410】

実施例10. PLK-1 SNALP前処理は化学療法薬の効果に対して癌細胞を感作する

化学療法薬処理の前のSNALPの逐次投薬が、ヒトおよびマウスの細胞株においてインビトロで相乗効果を生ずるか否かを決定するために、PLK1424 U4/GU siRNAまたはPLK773 G/GU siRNAを含有しているSNALP（「2:40」SNALP製剤：2%PEG-cDMA；40%DLinDMA；10%DSPC；および48%コレステロール）を評価した。HepG2（ヒト肝細胞癌）細胞およびNeuro2A細胞を、それぞれ、10,000細胞/ウェルおよび5000細胞/ウェルでトリプリケートで播種した。修飾PLK-1 siRNA分子を含有しているSNALPを、ある範囲の投薬量で、播種の24時間後に細胞に添加した。SNALP処理の24時間後、培地を交換し、化学療法薬をある範囲の投薬量で細胞に添加した。例えば、パクリタクセル（タキソール）用量は、ヒト細胞に関しては0.31nM～10nMの範囲、マウス細胞に関しては6.25nM～200nMの範囲であった。細胞生存性分析またはアポトーシスアッセイを、それぞれ、化学療法薬処理の48時間後または24時間後に実施した。非ターゲティング（Luc）siRNAを含有しているSNALPを、陰性対照として使用した。

30

40

【0411】

図11は、PLK-1 SNALPの後のパクリタクセルの逐次投与が、Neuro2A細胞およびHepG2細胞の両方の死滅を有意に増強したことを示している。特に、最適用量以下の用量のPLK-1 SNALPおよびパクリタクセルは、一方の薬剤単独より有効であった。類似した相乗効果が、より高いSNALP用量でのPLK-1 SNALPの後のフルオロウラシル（5-FU）またはイリノテカンによる逐次組み合わせ治療に関して観察された。図12は、PLK-1 SNALPの後のパクリタクセルの逐次組み合わせ投薬が、両方のSNALP濃度で、アポトーシス誘導のレベルを有意に増強したことを示す。増加したアポトーシスは、細胞生存性に対するこの薬物組み合わせの増強された効果と関連した。

50

## 【0412】

この実施例は、PLK-1 siRNAを含有しているSNALPによる前処理が、パクリタクセル、5-FU、およびイリノテカンのような化学療法薬の毒性効果に対して癌細胞を感作することを例示している。この実施例は、PLK-1 SNALPの後の化学療法薬の逐次投与が、この投薬の組み合わせにより観察された細胞生存性の減少と相関して、癌細胞において有意なレベルのアポトーシスを誘導することをさらに例示している。

## 【0413】

実施例11. 付加的な候補ヒトPLK-1 siRNA分子の選択

付加的なヒトPLK-1 siRNA配列を設計した。ヒトPLK-1 mRNA配列 (Genbankアクセッション番号NM\_005030) を、Whitehead Institute for Biomedical Research siRNA設計アルゴリズム (例えば、Elbashir et al., Genes Dev., 15:188-200(2001); Schwarz et al., Cell, 115:199-208(2003); およびKhvorova et al Cell, 115: 209-216(2003)参照、<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>にて入手可能) へ帰することにより、候補PLK-1 siRNA配列を同定した。以下の基準を満たすsiRNAを選択した (表4): (1) NA(N19)NN標的配列; (2) 熱力学的により不安定な5'アンチセンス末 (差 < -2.0); (3) 30~70%のG/C含量; および (4) 同一塩基の4ヌクレオチドストレッチなし。第二のsiRNAのセット (表5) を、以下の基準に基づき選択した: (1) NN(N19)NN標的配列; (2) 熱力学的により不安定な5'アンチセンス末 (差 < -2.0); (3) > -6 (-6~0) の5'アンチセンス末の熱力学; (4) 30~70%のG/C含量; および (5) 同一塩基の4ヌクレオチドストレッチなし。選択された配列を確認し、ヒトPLK-1標的配列における位置を同定した。

## 【0414】

次いで、ヒトおよびマウスの配列データベースに対するBLASTn検索を、全ての選択された配列に対して実施した。内部ヌクレオチドのうちの > 17と交差ハイブリダイズする配列を排除した。

## 【0415】

候補配列を表4~5に示す。

## 【0416】

(表4) ヒトPLK-1発現を標的とする付加的なsiRNA配列

10

20

| siRNA    | センス鎖 (5' → 3')       | SEQ ID NO: | アンチセンス鎖 (5' → 3')   | SEQ ID NO: |
|----------|----------------------|------------|---------------------|------------|
| PLK(-23) | GGUCUGCAGCGCAGCUUCG  | 73         | CGAAGCUGCUCGAGACC   | 74         |
| PLK(-15) | GCGCAGCUUCGGGAGCAUG  | 75         | CAUGCUCGCGAGCUCGC   | 76         |
| PLK272   | AGCCGCACCAGAGGGAGAA  | 77         | UUCUCCUCUGGUGCGGCU  | 78         |
| PLK273   | GCCGCACCAGAGGGAGAAG  | 79         | CUUCUCCUCUGGUGCGGC  | 80         |
| PLK288   | GAAGAUGUCCAUGGAAUA   | 81         | UAUUCCAUGGACAUUCU   | 82         |
| PLK363   | GGACAACGACUUCGUGUUC  | 83         | GAACACGAAGUCGUUGUC  | 84         |
| PLK420   | GCUGCACAAGAGGAGGAAA  | 85         | UUUCCUCUCUUGUGCAGC  | 86         |
| PLK429   | GAGGAGGAAAGCCUGACU   | 87         | AGUCAGGGCUUUCUCCUC  | 88         |
| PLK431   | GGAGGAAAGCCUGACUGA   | 89         | UCAGUCAGGGCUUUCUCC  | 90         |
| PLK438   | AGCCUGACUGAGCCUGAG   | 91         | CUCAGGCUCAGUCAGGCU  | 92         |
| PLK439   | GCCUGACUGAGCCUGAGG   | 93         | CCUCAGGCUCAGUCAGGCG | 94         |
| PLK450   | GCCUGAGGCCCGAUACUAC  | 95         | GUAGUAUCGGGCCUCAGGC | 96         |
| PLK456   | GGCCCGAUACUACCUACGG  | 97         | CCGUAGGUAGUAUCGGGCC | 98         |
| PLK498   | CCUGCACCGAAACCGAGUU  | 99         | AACUCGGUUCGUGCAGG   | 100        |
| PLK504   | CCGAAACCGAGUUAUUCAU  | 101        | AUGAAUACUCGCUUUCGG  | 102        |
| PLK589   | CUGGCAACCAAAGUCGAAU  | 103        | AUUCGACUUUGGUUGCCAG | 104        |
| PLK618   | GAGGAAGAAGACCCUGUGU  | 105        | ACACAGGGUCUUCUCCUC  | 106        |
| PLK627   | GACCCUGUGUGGGACUCCU  | 107        | AGGAGUCCACACAGGGUC  | 108        |
| PLK629   | CCCUGUGUGGGACUCCUAA  | 109        | UUAGGAGUCCACACAGGG  | 110        |
| PLK663   | GGUCUGAGCAAGAAAGGG   | 111        | CCCUUUCUUGCUCAGCACC | 112        |
| PLK693   | GGUGAUGUGUGGUCCAUAU  | 113        | AAUGGACCACACAUCCACC | 114        |
| PLK710   | UUGGGUGUAUCAUGUAUAC  | 115        | GUUAUCAUGAUACCCAA   | 116        |
| PLK736   | GUGGGCAAACCACCUUUG   | 117        | CAAAGGUGGUUUGCCAC   | 118        |
| PLK744   | ACCACCUUUGAGACUUCU   | 119        | AGAAGUCUCAAAGGUGGU  | 120        |
| PLK745   | CCACCUUUGAGACUUCU    | 121        | AAGAAGUCUCAAAGGUGG  | 122        |
| PLK774   | GACCUACCUCCGGAUCAAG  | 123        | CUUGAUCCGGAGGUAGGUC | 124        |
| PLK776   | CCUACCUCCGGAUCAAGAA  | 125        | UUCUUGAUCCGGAGGUAGG | 126        |
| PLK780   | CCUCCGGAUCAAGAAGAAU  | 127        | AUUCUUCUUGAUCCGGAGG | 128        |
| PLK884   | CCAUUAACGAGCUGCUUAA  | 129        | UUAAGCAGCUCGUUAAUGG | 130        |
| PLK894   | GCUGCUUAAUGACGAGUUC  | 131        | GAACUCGUAUUAAGCAGC  | 132        |
| PLK903   | UGACGAGUUCUUACUUCU   | 133        | AGAAGUAAAGAUCUGUCA  | 134        |
| PLK1024  | GUCCCAAUAAGGCUUGG    | 135        | CCAAGCCUUUAUUGAGGAC | 136        |
| PLK1137  | GACGUCGACAGUGCAAU    | 137        | AUUGACACUGUCAGCUCG  | 138        |
| PLK1235  | GCAAGUGGGUGGACUAUUC  | 139        | GAAUAGUCCACCCACUUGC | 140        |
| PLK1319  | CACGCCUCAUCCUCUACAA  | 141        | UUGUAGAGGAUGAGGCGUG | 142        |
| PLK1321  | CGCCUCAUCCUCUACAAUG  | 143        | CAUUGUAGAGGAUGAGGCG | 144        |
| PLK1347  | CAGCCUGCAGUACAUAAGAG | 145        | CUCUAUGUACUGCAGGCUG | 146        |
| PLK1363  | GAGCGUGACGGCACUGAGU  | 147        | ACUCAGUGCCGUCACGCUC | 148        |
| PLK1404  | UCCCAACUCCUUGAUGAAG  | 149        | CUUCAUCAAGGAGUUGGGA | 150        |
| PLK1409  | ACUCCUUGAUGAAGAAGAU  | 151        | AUCUUCUUCAUCAAGGAGU | 152        |
| PLK1422  | GAAGAUACCCUCCUAAA    | 153        | UUUAAGGAGGGUGAUCUUC | 154        |
| PLK1430  | CCCUCUUAAAUAUUUCCG   | 155        | CGGAAUAUUUAAGGAGGG  | 156        |
| PLK1457  | UGACGAGCACUUGCUGAA   | 157        | UUCAGCAAGUCUCGCUCA  | 158        |
| PLK1550  | CCCGCAGCGCAUCAUCCU   | 159        | AGGAUGAUGGCGUCGCGGG | 160        |
| PLK1577  | GCAACGGCAGCGUGCAGAU  | 161        | AUCUGCACGUCGCGUUGC  | 162        |
| PLK1580  | ACGGCAGCGUGCAGAUCAA  | 163        | UUGAUCUGCACGUCGCGGU | 164        |
| PLK1581  | CGGCAGCGUGCAGAUCAAC  | 165        | GUUGAUCUGCACGUCGCGG | 166        |
| PLK1586  | GCGUGCAGAUACAUCUUCU  | 167        | AAGAAGUUGAUCUGCACGC | 168        |
| PLK1620  | GCUCAUCUUGUGCCACUG   | 169        | CAGUGGGCACAAGAUGAGC | 170        |
| PLK1640  | UGGCAGCCGUGACCUACAU  | 171        | AUGUAGGUCACGGCUGCCA | 172        |
| PLK1645  | GCCGUGACCUACAUCGACG  | 173        | CGUCGAUGUAGGUCACGGC | 174        |
| PLK1658  | UCGACGAGAAGCGGGACUU  | 175        | AAGUCCGCUUCUCGUGCA  | 176        |
| PLK1667  | AGCGGGACUCCGCACAUA   | 177        | UAUGUGCGGAAGUCCCGCU | 178        |
| PLK1668  | GCGGGACUCCGCACAUAAC  | 179        | GUAUGUGCGGAAGUCCCGC | 180        |
| PLK1704  | GGAGUACGGCUGCUGCAAG  | 181        | CUUGCAGCAGCCGUACUCC | 182        |
| PLK1775  | GCUCACGUCGCGCCAGCAA  | 183        | UUGCUGGCCGAGCGUGAGC | 184        |
| PLK1794  | CCGUCUCAAGGCCUCCUAA  | 185        | UUAGGAGGCCUUGAGACGG | 186        |

【 0 4 1 7 】

表4中の「PLK」の後の数字は、ヒトPLK-1 mRNA配列NM\_005030の開始コドン(ATG)に対するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位をさす。ある種の態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)

10

20

30

40

50

ヌクレオチド、および/またはロックド核酸(LNA)ヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は「dTdT」または「UU」3'突出を含有している。他の例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、標的配列またはその相補鎖に対する相補性を有する3'突出を含有している。さらなる態様において、3'突出は、上記のもののような修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

## 【0418】

(表5) ヒトPLK-1発現を標的とする付加的なsiRNA配列

| siRNA   | センス鎖(5'→3')         | SEQ ID NO: | アンチセンス鎖(5'→3')       | SEQ ID NO: |
|---------|---------------------|------------|----------------------|------------|
| PLK287  | AGAAGAUGUCCAUGGAAAU | 187        | AUUUCCAUGGACAUCUUCU  | 188        |
| PLK461  | GAUACUACCUACGGCAAAU | 189        | AUUUGCCGUAGGUAGUAUC  | 190        |
| PLK500  | UGCACCGAAACCGAGUUAU | 191        | AUAACUCGGUUUCGGUGCA  | 192        |
| PLK591  | GGCAACCAAAGUCGAAUAU | 193        | AUAUUCGACUUUGGUUGCC  | 194        |
| PLK630  | CCUGUGUGGGACUCCUAAU | 195        | AUUAGGAGUCCCACACAGG  | 196        |
| PLK632  | UGUGUGGGACUCCUAAUUA | 197        | UAAUAGGAGUCCCACACA   | 198        |
| PLK1016 | CCCUCACAGUCCUCAAUAA | 199        | UUUUAGGAGGACUGUGAGGG | 200        |
| PLK1017 | CCUCACAGUCCUCAAUAAA | 201        | UUUUUAGGAGGACUGUGAGG | 202        |
| PLK1018 | CUCACAGUCCUCAAUAAAG | 203        | CUUUUAGGAGGACUGUGAG  | 204        |
| PLK1795 | CGUCUCAAGGCCUCCUAAU | 205        | AUUAGGAGGCCUUGAGACG  | 206        |
| PLK1796 | GUCUCAAGGCCUCCUAAUA | 207        | UAUUAGGAGGCCUUGAGAC  | 208        |
| PLK1797 | UCUCAAGGCCUCCUAAUAG | 209        | CUUUUAGGAGGCCUUGAGA  | 210        |

## 【0419】

表5中の「PLK」の後の数字は、ヒトPLK-1 mRNA配列NM\_005030の開始コドン(ATG)に対するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位をさす。ある種の態様において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、および/またはロックド核酸(LNA)ヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は「dTdT」または「UU」3'突出を含有している。他の例において、センス鎖および/またはアンチセンス鎖は、標的配列またはその相補鎖に対する相補性を有する3'突出を含有している。さらなる態様において、3'突出は、上記のもののような修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

## 【0420】

実施例12. PLK-1を標的とするsiRNAはHep3B腫瘍保持マウスの生存を増加させる

PLK-1 siRNAを含有しているSNALP(「1:57」SNALP製剤: 1.4%PEG-cDMA; 57.1%DLinDMA; 7.1%DPPC; および34.3%コレステロール)を、Hep3B肝臓腫瘍を保持しているCD1 nu/nuマウスの生存に対する効果に関して試験した。

## 【0421】

実験群

20匹のCD1 nu/nuマウスに、以下のように接種した。

| 群 | マウスの数  | 腫瘍接種                                 | SNALP            | マウスの数 | SNALP投薬(IV)   | SNALP用量         | 屠殺  | アッセイ |
|---|--------|--------------------------------------|------------------|-------|---|-----------------|-----|------|
| A | 20匹に接種 | I.H.<br>1.5x10 <sup>6</sup><br>Hep3B | Luc 1:57         | 9     | 11日目、14日目、<br>17日目、21日目、<br>25日目、28日目、<br>32日目、35日目、<br>39日目、42日目 | 10 x 2<br>mg/kg | 瀕死時 | 生存体重 |
| B |        |                                      | PLK 1424<br>1:57 | 9     |   |                 |     |      |

## 【0422】

被験物

全ての試料を、作業濃度への希釈前に濾過滅菌した。全てのチューブに、製剤化日、脂質組成、および核酸濃度を記した。SNALP試料は0.2mg/ml核酸で提供された。各SNALP最低20mlが、研究を実施するために必要とされた。この研究のための製剤は、以下のものを含

有していた。

| 群 | 被験物の説明  |
|---|---|
| A | Luc U/U SNALP 1:57 (28mM 脂質)  |
| B | PLK1424 U4/GU SNALP 1:57 (28mM 脂質)<br>PLK1424 U4/G SNALP 1:57 (28mM 脂質) |

### 【 0 4 2 3 】

手順

0日目

手術直前に、SC注射によって、マウスにアナフェン（Anafen）を与える（生理食塩水20  $\mu$ l中100  $\mu$ g）。イソフルランガス吸入によって個々のマウスに麻酔をかけ、過度の眼乾燥を防止するため眼科用粘稠剤を適用する。ノーズコーンからガス麻酔下に維持しながら、正中を横切る単一の1.5cm切開を胸骨下で作製する。次いで、オートクレーブ処理された綿棒を使用して、肝左葉外側区域を露出させる。PBSに懸濁した腫瘍細胞25  $\mu$ lを、ルーアーチップ型ハミルトン（Hamilton）注射器（50  $\mu$ l）および30G（3/8"）針を使用して、浅い角度で葉へ注射する。細胞を、徐々に（およそ30s）注射し、針を引き出した直後に刺創に綿球を適用する。出血が停止した後（およそ1分）、筋壁の5～6針の縫合および3～4個の皮膚クリップにより、切開を閉じる。細胞懸濁物を、各注射の直前に十分に混合する。マウスを、ペーパータオルが内張りされたクリーンケージ内で麻酔より回復させ、2～4時間入念にモニタリングする。次いで、動物を通常の飼育施設に戻す。

10

20

1日目

全てのマウスにイソフルランガスによって軽く麻酔をかけ、縫合を調査する。次いで、SC注射によって動物にアナフェンを与える（生理食塩水20  $\mu$ l中100  $\mu$ g）。

10日目

マウスを適切な処理群へ無作為化する。

11日目

群A、B - 11日目：全ての動物に、外側尾静脈を介したIV注射によって2mg/kgのSNALPを投与する。マウスは体重に従って（10ml/kg）投薬される。初期体重に基づき、5日連続で投薬を繰り返す。

30

14～35日目

群A、B - 14日目、17日目、21日目、25日目、28日目、32日目、35日目：全ての動物に、外側尾静脈を介したIV注射によって2mg/kgのSNALPを再投与する。マウスは体重に従って（10ml/kg）投薬される。

体重群：5週間は投薬日に、次いで、研究終了まで週2回、マウスを計量する。

終点：腫瘍負荷および製剤はよく耐容されると予想される。処理または腫瘍負荷に関連した苦痛の兆候を示すマウスは、飼育スタッフの裁量で終結させる。

終結：

致死用量のケタミン/キシラジンによりマウスに麻酔をかけた後、頸部脱臼を行う。

データ分析：

生存および体重をアッセイする。

40

### 【 0 4 2 4 】

結果

図13は、Hep3B肝臓内（I.H.）腫瘍モデルにおけるPLK1424 SNALPの治療的投薬の間のマウスの平均体重を示す。処理計画は、処理に関連する毒性の明白な兆候なしに、よく耐容された。

### 【 0 4 2 5 】

図14は、SNALP製剤化PLK1424による処理が、Hep3B腫瘍保持マウスの生存の有意な増加を引き起こしたことを示す。このインビボ抗腫瘍効果は、明白な毒性または免疫刺激の非存在下で観察された。

50

## 【0426】

実施例13.PLK-1を標的とするsiRNAはHep3B腫瘍保持マウスの生存を増加させる

この研究の目的は以下の通りであった：

- 1.PLK1424 SNALPの単回IV投与後の、確立されたHep3B肝臓腫瘍におけるmRNAサイレンシングのレベルを決定すること。
- 2.RACE-PCRを使用して、特異的なRNA切断産物を検出することにより、mRNAサイレンシングの機序を確認すること。
- 3.組織病理学によって腫瘍細胞アポトーシスの誘導を確認すること。

## 【0427】

「1:57」SNALP製剤（1.4%PEG-cDMA；57.1%DLinDMA；7.1%DPPC；および34.3%コレステロール）を、この研究のために使用した。

## 【0428】

実験群

20匹のスキッド/ページマウスに、以下のように接種した：

| 群 | マウスの数      | 腫瘍接種                               | SNALP    | マウスの数 | SNALP投薬(IV)         | 屠殺      | アッセイ                        |
|---|------------|------------------------------------|----------|-------|---------------------|---------|-----------------------------|
| A | 20匹に<br>接種 | I.H.<br>1x10 <sup>6</sup><br>Hep3B | PBS      | 6     | 1 x 2 mg/kg<br>20日目 | 処理の24h後 | 腫瘍QG<br>腫瘍RACE-PCR<br>組織病理学 |
|   |            |                                    | Luc 1:57 | 7     |                     |         |                             |
| B |            |                                    | PLK 1424 | 7     |                     |         |                             |
| C |            |                                    | 1:57     |       |                     |         |                             |

## 【0429】

被験物

全ての試料を、作業濃度への希釈前に濾過滅菌した。全てのチューブに、製剤化日、脂質組成、および核酸濃度を記した。SNALP試料は0.2mg/ml核酸で提供された。最低2mlのSNALPが、研究を実施するために必要とされた。この研究のための製剤は、以下のものを含有していた：

| 群 | 被験物の説明                   |
|---|--------------------------|
| A | PBS                      |
| B | Luc U/U 1:57 SNALP       |
| C | PLK1424 U4/GU 1:57 SNALP |

## 【0430】

手順

0日目

手術直前に、SC注射によって、マウスにアナフェンを与える（生理食塩水20μl中100μg）。イソフルランガス吸入によって個々のマウスに麻酔をかけ、過度の眼乾燥を防止するため眼科用粘稠剤を適用する。ノーズコーンからガス麻酔下に維持しながら、正中を横切る単一の1.5cm切開を胸骨下で作製する。次いで、オートクレーブ処理された綿棒を使用して、肝左葉外側区域を露出させる。PBSに懸濁した腫瘍細胞25μlを、ルアーチップ型ハミルトン注射器（50μl）および30G（3/8"）針を使用して、浅い角度で葉へ注射する。細胞を、徐々に（およそ30s）注射し、針を引き出した直後に刺創に綿球を適用する。出血が停止した後（およそ1分）、筋壁切開を5~6針の縫合により閉じる。皮膚切開を3~4個の金属皮膚クリップで閉じる。細胞懸濁物を、各注射の直前に十分に混合する。マウスを、ペーパータオルが内張りされたクリーンケージ内で麻酔より回復させ、2~4時間入念

にモニタリングする。次いで、動物を通常の飼育施設に戻す。

1日目

全てのマウスにイソフルランガスによって軽く麻酔をかけ、縫合を調査する。次いで、SC注射によって動物にアナフェンを与える（生理食塩水20 μl中100 μg）。

7日目

マウスを適切な処理群へ無作為化する。

20日目

群A~C：マウスを計量し、次いで、外側尾静脈を介したIV注射により、PBS、Luc、またはPLK1424 SNALPのいずれかを投与する。SNALPは、体重に従って2mg/kgまたは等価な容量（10ml/kg）で投薬される。

10

21日目

群A~C：全ての動物を計量し、次いで、致死麻酔により麻酔をかける。各群の全てのマウスに由来する腫瘍保持肝葉を計量し、RNA分析のためRNALaterへと収集する。

終点：腫瘍負荷および製剤はよく耐容されると予想される。処理または腫瘍負荷に関連した苦痛の兆候を示すマウスは、飼育スタッフの裁量で終結させる。

終結：

マウスに致死用量のケタミン/キシラジンにより麻酔をかけた後、頸部脱臼を行う。

データ分析：

bDNA (QC) アッセイおよびRACE-PCRによる肝臓腫瘍のmRNA分析  
組織病理学による腫瘍細胞アポトーシス

20

【0431】

結果

腫瘍進行を判定するため、14日目以降、体重をモニタリングした。20日目に、最も大きな体重減少を示す6匹のマウスを、3つの群の各々へ無作為化し処理した。6匹のマウスは全て、屠殺時（21日目）に実質的な大きいI.H.腫瘍を有していた。従って、残りの14匹のマウスの処理を、21日目に開始した（22日目に屠殺）。14匹中10匹のマウスが実質的な腫瘍を有し；14匹中2匹のマウスが小さい/推定腫瘍を有し；14匹中2匹のマウスは可視の腫瘍負荷を有していなかった。

【0432】

30

図15は、ヒト（腫瘍）特異的PLK-1 mRNAレベルを測定するために使用されたQuantigene アッセイからのデータを示す。PLK1424 U4/GU SNALPの単回2mg/kg用量は、マウスにおいて成長中の肝臓内Hep3B腫瘍におけるPLK-1 mRNAレベルを約50%低下させた。

【0433】

図16は、PLK1424 SNALPにより処理されたマウスにおいて、PLK-1 mRNAの特異的な切断産物が5' RACE-PCRによって検出可能であったことを示す。特異的なPCR産物は、PBSまたは対照（Luc）SNALPのいずれかにより処理されたマウスにおいては検出可能でなかった。PCR産物のヌクレオチド配列決定によって、PLK1424 siRNAにより媒介されたRNA干渉による、PLK-1 mRNA内の予測切断部位が確認された。

【0434】

40

図17は、Luc SNALP（上）またはPLK1424 SNALP（下）のいずれかにより処理されたマウスにおけるHep3B腫瘍組織学を示す。Luc SNALP処理マウスは、Hep3B腫瘍における正常な有糸分裂を示したが、PLK1424 SNALP処理マウスは、Hep3B腫瘍における多数の異常な有糸分裂および腫瘍細胞アポトーシスを示した。

【0435】

結論

この実施例は、Hep3B腫瘍保持マウスへのPLK1424 SNALPの単回投与が、PLK-1 mRNAの有意なインビボのサイレンシングを誘導したことを例示する。このPLK-1 mRNAの低下は、5' RACE-PCR分析を使用して、RNA干渉によって媒介されることが確認された。重要なこととして、SNALP製剤化PLK1424によるPLK-1 mRNAサイレンシングは、腫瘍細胞増殖（有糸分裂

50

)を深刻に妨害し、後続的な腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こした。先の実施例において証明されたように、この抗腫瘍効果は、腫瘍保持マウスにおける延長された生存時間に通じた。

【0436】

実施例14.皮下Hep3B腫瘍モデルにおけるPEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含有しているPLK-1 SNALPの比較

この実施例は、1:57製剤中のPEG-脂質PEG-cDSA(3-N-[-メトキシポリ(エチレングリコール)2000)カルバモイル]-1,2-ジステアリルオキシプロピルアミン)の、遠位の(例えば、皮下)腫瘍を全身的に標的とするための利用可能性を示す。特に、この実施例は、PEG-cDMA(C<sub>14</sub>)またはPEG-cDSA(C<sub>18</sub>)のいずれかを含有しているPLK-1 SNALPの腫瘍ターゲ

10

ティング能を比較する。読み出しは、腫瘍成長阻害およびPLK1 mRNAサイレンシングである。使用されたPLK-1 siRNAはPLK1424 U4/GUであった。その配列は表3に提供される。

【0437】

皮下(S.C.)Hep3B腫瘍をスキッド/ベージュマウスにおいて確立した。PLK-1 SNALPの複数回投与の抗腫瘍効力を、以下の群に関して評価した(各群n=5):(1)「Luc-cDMA」-PEG-cDMA Luc SNALP;(2)「PLK-cDMA」-PEG-cDMA PLK-1 SNALP;および(3)「PLK-cDSA」-PEG-cDSA PLK-1 SNALP。腫瘍が直径約5mmに達した後(10日目)、6×2mg/kg siRNAの投与を開始した。10日目、12日目、14日目、17日目、19日目、および21日目に投薬を実施した。週2回、ノギスによって腫瘍を測定した。

【0438】

図18は、PEG-cDSAを含有しているPLK-1 SNALPの複数回投与が、確立されたHep3B S.C.腫瘍の退行を誘導したことを示す。特に、PLK1-cDSA処理マウスにおける腫瘍5個中5個が、平坦な外観を示し、腫瘍部位における変色によってのみ測定可能であった。

20

【0439】

図19は、単回静脈内SNALP投与後のS.C.Hep3B腫瘍におけるPLK SNALPのmRNAサイレンシングを示す。PLK1-cDSA SNALPにより観察されたサイレンシングの程度は、図18に示される複数回投与と研究の抗腫瘍活性と相関した。

【0440】

次いで、24日目に大きいS.C.腫瘍を発症したLuc-cDMA SNALP処理群に、24日目、26日目、28日目、31日目、33日目、および35日目に、PLK-cDSA SNALPを投与した。最初のPLK-1 SNALP処理群には付加的な投薬は行わなかった。大きい確立された腫瘍によるこのクロスオーバー投薬研究の結果は、PLK1-cDSA SNALPが大きいS.C.Hep3B腫瘍の成長を阻害したことを示す図20に提供される。

30

【0441】

PLK-1 mRNAサイレンシングに対するPEG-cDMAおよびPEG-cDSAの1:57 SNALPの効果の比較を、スキッド/ベージュマウスにおける確立された肝臓内Hep3B腫瘍を使用して実施した。PEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含有しているPLK-1 SNALPを、2mg/kgの用量で、単回静脈内投与した。肝臓/腫瘍試料をSNALP処理の24時間後および96時間後に収集した。対照=24時間後の2mg/kg Luc-cDMA SNALP。

【0442】

図21は、PLK-cDMA SNALPおよびPLK-cDSA SNALPが、24時間後に類似したサイレンシング活性を有していたが、PLK-cDSA SNALPは、肝臓内腫瘍におけるmRNAサイレンシングの継続時間を増加させ得ることを示している。

40

【0443】

図22は、PEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含有しているPLK-1 SNALPの血液クリアランスプロフィールを示す。PLK-cDSA SNALPに関して観察された延長された血液循環時間は、遠位の(例えば、皮下)腫瘍部位における蓄積および活性の増加を可能し得る。

【0444】

従って、この研究は、PEG-cDSA SNALP製剤が、肝臓外の腫瘍を優先的に標的とするために使用され得、PEG-cDMA SNALPが、肝臓を優先的に標的とするために使用され得ることを

50

示す。

#### 【0445】

実施例15. siRNAに基づく癌治療薬のRNAiにより媒介される作用機序の確認

癌関連遺伝子の発現を特異的にサイレンシングする低分子干渉RNA (siRNA) は、腫瘍学における新規の治療アプローチを提示する。しかしながら、それらの治療活性の基礎となる真の機序を描写することは、やはり重大である。この実施例は、必須の細胞周期タンパク質ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) およびキネシン紡錘体タンパク質 (KSP; Eg5としても公知) を標的とする化学的に修飾されたsiRNAの開発を記載する。脂質ナノ粒子 (SNALP) へ製剤化されたsiRNAは、肝臓腫瘍モデルおよび皮下腫瘍モデルの両方において強力な抗腫瘍効力を示し、広範な有糸分裂妨害および腫瘍細胞アポトーシスを引き起こすために十分な程度  
10  
の標的遺伝子サイレンシングを単回静脈内投与後に示した。作用の特異性およびsiRNA機序を、以下のことによって確認した：(1) 測定可能な免疫応答を誘導せず、従って、非特異的効力の可能性を排除する、適切に設計されたsiRNA製剤の使用；(2) 腫瘍細胞におけるRNAi特異的なmRNA切断産物の誘導；(3) この活性RNAiサインの、標的mRNAサイレンシングの継続時間との相関；および(4) 組織学的バイオマーカーによる機能的な標的阻害の確認。この実施例は、siRNAに基づく癌治療薬の開発における意味のある進歩を表す結果を提供し、RNAiが、siRNAにより媒介される治療効果の第一の機序であるという結論を支持するために必要とされる技術的要件を強調するために役立つ。

#### 【0446】

序論

低分子干渉RNA (siRNA) は、RNA干渉 (RNAi) という内因性の細胞過程を通して遺伝子発現を抑制するために設計された標的特異的な二本鎖RNA分子である(1)。この基本の遺伝子サイレンシング機序の特徴決定以来、癌、ウイルス感染、および代謝障害を含む広域の疾患のための可能性のある新規の治療剤のクラスとして、siRNAの開発は著しく進歩した。

#### 【0447】

腫瘍学における多くのsiRNA標的が文献に記載されているが、腫瘍モデルにおける治療効果がRNAiによって媒介されるという直接の証拠は、顕著に欠けている。siRNAに起因する抗腫瘍活性の解釈は、TLR依存性の機序(2~4)および非依存性の機序(5、6)を通して免疫応答を活性化する傾向を含む、標的以外に対する核酸の効果の可能性があるため、  
30  
困難である。これらの型の応答は、主として、抗血管形成効果、アポトーシス促進効果、および細胞性免疫を増強するアジュバント効果を発揮するインターフェロンおよび炎症性サイトカインの作用を通して、抗腫瘍効果を誘発することが公知である(7、8)。これらの機序の多くは、機能性のリンパ球およびNK細胞の集団を欠くスキッド/ベージュマウスを含む、ヒト腫瘍異種移植片のための宿主として典型的に使用される免疫不全マウス系統においても、やはり活性である(9、10)。核酸による自然免疫応答の誘導も、有意な毒物学的影響を有することがある(11)。リポソーム性プラスミドDNAを含む、ある種の組換えサイトカインおよびTLRアゴニストによる臨床的経験(12、13)は、ヒト対象が、前臨床モデルと比較して、これらの薬剤の毒性効果に対して非常に感受性である場合があることを示している。従って、臨床的開発のため、免疫刺激性のsiRNAを考慮する場合には  
40  
、付加的な慎重さが必要とされる(14、15)。

#### 【0448】

修飾ヌクレオチド化学のsiRNAへの取り込みは、薬理学的特性およびヌクレアーゼ抵抗特性を改善するため、広く利用されている(16)。本発明者らは、siRNA分子に対する広範な化学的修飾が、哺乳動物免疫系による認識の防止という付加的な利益を提供し得ることを最初に報告した(17)。このことから、インピボで本質的に低い免疫刺激可能性を有する2'-O-メチル(2'OMe)修飾siRNA構築物が合理的に設計された(18)。

#### 【0449】

全身投与されたsiRNAが、測定可能な免疫活性化の非存在下で、RNAiにより媒介される抗癌効力を誘発し得るという証拠を確立するため、本発明者らは、直接腫瘍細胞を死滅さ  
50

せる、よく特徴決定された機序を有するバリデートされた癌標的として、必須の細胞周期タンパク質キネシン紡錘体タンパク質 (KSP、Eg5) (19) およびポロ様キナーゼ1 (PLK-1) (20) を選択した。KSPは、有糸分裂の間、染色体分離を駆動する有糸分裂紡錘体運動タンパク質である。KSPの阻害は、双極有糸分裂紡錘体の形成を阻止し、細胞周期停止、有糸分裂チェックポイントの活性化、およびアポトーシスの誘導を引き起こす (21)。哺乳動物細胞において、PLK-1は、Cdc25C、サイクリンB、コヒーシサブユニットSCC-1、後期促進複合体のサブユニット、哺乳動物キネシン様タンパク質1、およびその他のキネシン関連タンパク質をリン酸化するよう作用する。この多様な基質の列挙は、有糸分裂および細胞質分裂におけるPLK-1の多数の役割を反映している (22)。多くのヒト腫瘍型において観察されるPLK-1の過剰発現は、患者の予後の負の予知因子であり (20)、PLK-1活性の阻害は、有糸分裂停止および腫瘍細胞アポトーシスを急速に誘導する (23、24)。PLK-1の枯渇は、低分子薬物のアポトーシス促進活性に対して癌細胞を感作するよう作用する (25)。これは、DNA傷害および紡錘体組み立てチェックポイントにおけるPLK-1の役割のためである可能性が高い。

#### 【0450】

siRNA治療薬の可能性の現実化に対する第一の障害のうちの一つは、siRNAの疾患部位ターゲティング、細胞取り込み、および細胞質送達を容易にする薬物送達媒体の必要性である (26~28)。一般的な送達のアプローチには、ポリエチレンイミン (29、30) およびシクロデキストリンポリマー (31) のようなポリカチオンとのsiRNAの複合体化、またはカチオン性脂質に基づく担体への組み込み (17、18、26、32) が含まれる。本発明者らは、マウスおよび非ヒト霊長類の肝臓にsiRNAをターゲティングするための有効な全身送達媒体としての安定核酸-脂質粒子 (SNALP) の開発を以前に記載し、内因性肝細胞およびウイルスの遺伝子転写物 (17) のサイレンシングにおける治療効果を証明した。臨床的な関心対象の組織へのSNALPの蓄積は、適当なサイズ (およそ100nm以下の直径) の電荷中性担体が、腫瘍、炎症の部位、および健康な肝臓の有窓上皮を通過することができる、受動的な疾患部位ターゲティング (33、34) を利用する。これは、さもなければ、標的細胞選択性を増強するため、siRNA送達媒体への組み込みの候補となり得る、ペプチド、抗体、および受容体リガンドのような活性ターゲティングモエティの要件を回避する (31、35、36)。

#### 【0451】

この実施例は、新規の癌治療薬としてのSNALP製剤化siRNAの開発を記載する。結果は、PLK-1またはKSPを標的とする合理的に設計されたsiRNAが、効果的な全身送達媒体を用いて送達された時、固形腫瘍における治療的遺伝子サイレンシングに影響を与えることができることを証明している。特異性および作用機序は、標的阻害に典型的な腫瘍細胞における有糸分裂妨害を引き起こす、RNAiにより媒介される標的mRNAのサイレンシングを証明する、方法論の組み合わせを使用して確認される。これは、適切に設計された化学的に修飾されたsiRNAの使用を通して、免疫刺激の完全な非存在下で達成され得る。

#### 【0452】

結果

PLK-1 siRNA活性のインビトロ特徴決定

PLK-1は、その阻害が、増殖中の腫瘍細胞培養物における有糸分裂停止およびアポトーシスを引き起こすことが公知である、腫瘍学におけるバリデートされた遺伝子標的に相当する (20)。本発明者らは、新規のPLK-1 siRNAのパネルを設計し、ヒトHT29結腸癌細胞株における抗増殖活性に関してスクリーニングした (図23)。このスクリーニングによって、PLK1424が最も強力なヒトsiRNAであることが同定され、PLK773が、PLK-1配列相同性に基づく最も強力なマウス、ラット、およびヒトの交差反応性siRNAであることが同定された。これらのリードsiRNAを、げっ歯動物および非ヒト霊長類の肝臓へsiRNAを効果的にターゲティングすることが示されているSNALP組成物へ製剤化した (26)。製剤化されたPLK1424 siRNAおよびPLK773 siRNAによるHT29細胞の処理は、細胞生存性の用量依存的な減少を引き起こし、それは、PLK-1 mRNAサイレンシングの程度と関連した (図24A~C)。PL

K1424 siRNAは、LS174T結腸癌ならびにHepG2およびHe3B肝細胞癌（HCC）細胞株を含むある範囲のヒト癌細胞株において強力な活性を示し（図24D）、それは、siRNAトランスフェクションの48時間後の用量依存的なアポトーシスの誘導と関連していた（図24E）。

#### 【0453】

インビボ適用のためのPLK-1 siRNAおよびKSP siRNAの設計

合成siRNAのインビボ判定の前に、考慮中の生物学的系に対する可能性のある免疫刺激効果を予想し、このリスクを軽減する措置をとることが必須である（11）。本発明者らは、siRNAへの2'OMe-グアノシン残基または2'OMe-ウリジン残基の選択的な導入が、免疫応答を活性化する能力を抑止することを以前に報告した（18、37）。この最初の戦略は、RNAi活性に対する負の影響の可能性を最小限に抑えるため、2'OMe修飾をsiRNAセンス鎖に制限することを提案した（18）。このアプローチは合成siRNAにとって広く適用可能なままであるが（37）、本発明者らは、最初の研究の拡張を通して、2'OMe修飾センス鎖を取り込んだある種のsiRNA配列、例えば、U(S)-ApoB1二重鎖（18）が、軽度の免疫刺激活性を保持し得ることを見出した。これは、マウスにおけるSNALP製剤化U(S)-ApoB1 siRNAの静脈内投与の後、測定可能な血清サイトカイン応答はないにも関わらず、肝臓および脾臓においてIFNにより誘導可能なp56 IFIT1 mRNAが誘導されたことによるのみ立証された（図25）。しかしながら、この残余IFIT1誘導は、二重鎖アンチセンス（AS）鎖への2'OMeヌクレオチドの選択的な導入により、完全に抑止され得た（図25）。これらの所見は、腫瘍学標的に対する2'OMe siRNAの設計および試験のための原理を提供した。

#### 【0454】

測定可能な免疫刺激効果を保有しないが、完全なRNAi活性を保持している二重鎖を作製するため、類似したsiRNA設計アプローチをPLK1424およびPLK773に適用した。この工程は、観察され得る抗腫瘍効果の特異性を結論付けるためのインビボ研究を実施するための前提条件と見なされた。2'OMe-Uヌクレオチドまたは2'OMe-Gヌクレオチドを、ネイティブのセンスオリゴヌクレオチドおよびASオリゴヌクレオチドへ置換して、修飾されたPLK1424およびPLK773の二重鎖のパネル（表6）を形成し、次いで、それをRNAi活性の保存に関してスクリーニングした。修飾されたAS鎖AまたはBを含有している2'OMe-PLK1424二重鎖は、修飾されたセンス鎖1または2のいずれかと対合した時、ネイティブPLK1424配列に類似した抗増殖活性を示した。AS鎖Cを含有している2'OMe-PLK1424は、より高い濃度で抗増殖活性を示した（図26A）。2'OMe-PLK773二重鎖のパネルは、ネイティブPLK773配列と比較して、中程度の活性の差を示した（図26B）。本発明者らは、インビトロ免疫刺激モデルにおける評価のため、PLK1424-2/AおよびPLK773-1/B siRNA二重鎖（指定された2'OMe修飾されたセンス鎖/AS鎖を含む）を選択した。予想通り、ネイティブのPLK1424 siRNAおよびPLK773 siRNAならびにそれらの構成一本鎖RNA（ssRNA）は、高レベルのIFN およびIL-6の両方を産生するよう、マウスFlt3リガンド由来樹状細胞を刺激したが（図26C）、この免疫反応性は、PLK1424-2/A二重鎖およびPLK773-1/B二重鎖においては完全に抑止された。

#### 【0455】

（表6）2'OMe修飾パターンを有するPLK-1 siRNA、KSP siRNA、およびLuc siRNAの配列

| 名称        | 鎖  | 配列 (5'-3' 21mer)        | SEQ ID NO: |
|-----------|----|-------------------------|------------|
| PLK1424   | S  | AGAUCACCCUCCUAAAUAUU    | 211        |
| PLK1424   | AS | UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU   | 212        |
| PLK1424-1 | S  | AGAUCACCCUCCUAAAUAUU    | 213        |
| PLK1424-2 | S  | AGAUCACCCUCCUAAAUAUU    | 214        |
| PLK1424-A | AS | UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU   | 215        |
| PLK1424-B | AS | UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU   | 216        |
| PLK1424-C | AS | UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU   | 217        |
|           |    |                         |            |
| PLK773    | S  | AGACCUACCCGGAUCAAUU     | 218        |
| PLK773    | AS | UUGAUCCGGAGGUAGGUCUUU   | 219        |
| PLK773-1  | S  | AGACCUACCCGGAUCAAUU     | 220        |
| PLK773-2  | S  | AGACCUACCCGGAUCAAUU     | 221        |
| PLK773-A  | AS | UUGAUCCGGAGGUAGGUCUUU   | 222        |
| PLK773-B  | AS | UUGAUCCGGAGGUAGGUCUUU   | 223        |
| PLK773-C  | AS | UUGAUCCGGAGGUAGGUCUUU   | 224        |
|           |    |                         |            |
| KSP2263   | S  | CUGAAGACCUGAAGACAAUdTdT | 225        |
| KSP2263   | AS | AUUGUCUUCAGGUCUUCAGdTdT | 226        |
| KSP2263-U | S  | CUGAAGACCUGAAGACAAUdTdT | 227        |
| KSP2263-G | S  | CUGAAGACCUGAAGACAAUdTdT | 228        |
| KSP2263-U | AS | AUUGUCUUCAGGUCUUCAGdTdT | 229        |
| KSP2263-G | AS | AUUGUCUUCAGGUCUUCAGdTdT | 230        |
|           |    |                         |            |
| Luc       | S  | GAUUAUGUCCGGUUAUGUAUU   | 231        |
| Luc       | AS | UACAUAACCGGACAUAUUCUU   | 232        |
| Luc-U     | S  | GAUUAUGUCCGGUUAUGUAUU   | 233        |
| Luc-U     | AS | UACAUAACCGGACAUAUUCUU   | 234        |

2'-O-メチル (2'OMe)ヌクレオチドは、太字および下線で示される。センス (S) 鎖またはアンチセンス (AS) 鎖は、代替的にまたは付加的に2'-デオキシ-2'-フルオロ (2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル) (MOE)ヌクレオチド、および/またはロックド核酸 (LNA)ヌクレオチドを含んでいてもよい。

#### 【 0 4 5 6 】

このsiRNA設計アプローチの利用可能性を示すため、同一の方法論を、公開されているKSPを標的とするsiRNA (38) に適用した。選択されたKSP siRNA (最初の記載からKSP2263と呼ばれる) は、マウスおよびヒトのKSP mRNAとの完全な配列相同性を有し、ヒトおよびマウスの両方の癌細胞株において強力な抗増殖効果を示した。一例として、SNALP製剤化KSP2263によるマウスNeuro2a細胞の処理は、トランスフェクションの24時間後にKSP mRNAの用量依存的な低下を誘導し、それは、72時間後の後続的な細胞生存性の減少と関連した (図26D)。次いで、2'OMe-Uヌクレオチドまたは2'OMe-Gヌクレオチドを含有している修飾KSP2263二重鎖のパネル (表6) を、このアッセイにおいてスクリーニングした。この場合、二つの修飾されたセンス鎖およびAS鎖の組み合わせが、各々、ネイティブKSP2263配

10

20

30

40

50

列と等価な効力を有する二重鎖を作製し、このことから、RNAi活性の保存が確認された(図26E)。本発明者らは、さらなる特徴決定のため、2'OMe修飾バリエーションKSP2263-U/Uを選択した。

#### 【0457】

##### 5'RACE-PCRによるRNAi機序の確認

RISCにより媒介される標的mRNAの加水分解により作製された特異的RNA切断産物の検出は、RNAiが遺伝子サイレンシングの機序であることを確認する決定マーカーである(39、40)。活性化されたRISCは、siRNA AS鎖の10位および11位に相補的なヌクレオチドの間で正確に標的mRNAを切断し、siRNA配列に独特のmRNA切断産物を作製する。これは、適切に設計された5'RACE-PCR(rapid amplification of cDNA ends-PCR)法を使用して、細胞において検出され得る。本発明者らは、ヒトPLK-1 mRNAのPLK1424特異的切断産物およびマウスKSP mRNAのKSP2263特異的切断産物を検出するためのRACE-PCRアッセイを開発した。PLK1424-2/AによるHT29細胞の処理は、予測された476bp 5'RACE-PCR産物を作製し、5'ライゲーション部位にかかるオリゴヌクレオチド配列決定によって、(ATG開始部位に対する)5'1433位において切断されたヒトPLK-1 mRNA産物としてのその同一性を確認した(図27)。同様に、2129位において切断されたマウスKSP mRNAに対応する予測された102bp RACE-PCR産物が、KSP2263-U/U siRNAにより処理されたNeuro2a細胞より増幅された(図27)。

#### 【0458】

##### インビボの2'OMe PLK-1 siRNAおよび2'OMe KSP siRNAに対する免疫応答の特徴決定

インビボの2'OMe siRNAによる免疫刺激の抑止を確認するため、Balb/cマウスを、SNALP製剤化されたPLK1424-2/A、PLK773-1/B、KSP2263-U/U、またはルシフェラーゼを標的とする対照2'OMe siRNA(Luc-U/U)により静脈内処理した。IFIT1 mRNAおよび血清サイトカインを、これらのマーカーのピーク応答のおよその時間に基づき、SNALP投与の4~6時間後に判定した。これらの研究においては、SNALP製剤化ネイティブLuc siRNA(表6)を、免疫刺激の陽性対照として使用した。この未修飾siRNAの静脈内投与は、PBS処理対照と比較して、肝臓および脾臓において、それぞれ、83倍および247倍のIFIT1 mRNAの増加を誘導した(図28A)。これは、これらの動物における全身性IFN $\gamma$ の検出と一致していた(図28B)。対照的に、PLK1424-2/A siRNA、PLK773-1/B siRNA、KSP2263-U/U siRNA、またはLuc-U/U siRNAは、測定可能なIFN $\gamma$ 、またはPBS処理動物と比べた肝臓または脾臓におけるIFIT1 mRNAの増加を誘導せず、このことから、SNALP製剤化されたsiRNAが、この製剤の第一標的器官としての肝臓においても、または二次リンパ組織においても、識別可能なIFNシグナリングを引き起こさないことが確認された(図28)。以前に報告されたように(18)、SNALP製剤化2'OMe siRNAの投与は、IL-6、IL-10、IL-12、TNF、またはIFN $\gamma$ を含むその他の血清サイトカインの増加を誘導せず、初代ヒト免疫細胞培養物における免疫反応性の類似した欠如を示した。

#### 【0459】

このsiRNAの設計およびスクリーニングのアプローチは、化学的修飾がRNAi活性に関してよく耐容され、免疫刺激を完全に抑止すると予測されるsiRNAを迅速に同定するため、任意の所定の配列に適用され得る。siRNAのための他の化学的修飾戦略とは異なり、インビボ研究を目的とする送達媒体SNALPは、血清中で24時間を超えてヌクレアーゼ分解から未修飾siRNAを保護することが公知であるため(18)、ヌクレアーゼ抵抗性の増強は第一の設計考慮ではなかった。しかしながら、2'OMe修飾パターンは、以下のものの回避を考慮に入れることができる：(1)RISCの効率的な活性化が9位と10位の間でのsiRNAセンス鎖の最初の切断を含み、これが、この結合へのヌクレアーゼ抵抗性化学の導入により阻害され得るという観察に基づき(41、42)、センス鎖の9位；および(2)修飾された化学がRISCへの効率的なRNA負荷に干渉するかもしれない、5'アンチセンス末端(43、44)。

#### 【0460】

##### 全身siRNA投与による腫瘍成長の治療的阻害

SNALP製剤化されたPLK1424-2/A siRNAおよびKSP2263-U/U siRNAの薬力学および治療効

力を調査するため、正所肝臓腫瘍モデルを確立した。これらは、ヒトHCCの代表的なモデルとしてのスキッド/ベージュマウスにおけるHep3B異種移植片および免疫適格A/Jマウスにおける同系のNeuro2a腫瘍モデルであった。原発性肝臓内腫瘍を確立するため、腫瘍細胞を肝左葉外側区域へ直接注射した(45)。この手法は、両方のモデルにおいて、マウスの90%超において、組織学的に明瞭な限局性の腫瘍結節をもたらした。

#### 【0461】

SNALP製剤化PLK1 siRNAの治療効力を評価するため、確立されたHep3B肝臓腫瘍を保持しているマウスを、対照群が広範な腫瘍負荷の症候を示すまで、3週間、週2回、静脈内投与により2mg/kgのPLK1424-2/A siRNAまたはLuc-U/U siRNAにより処理した。本発明者らは、Hep3B-スキッド/ベージュマウスモデルにおいて、進行的な体重減少が、肝臓腫瘍負荷の優れた指標であることを見出した。Luc-U/U処理マウスにおける体重減少は、腫瘍移植の12~16日後に認められ、残りの研究期間を通じて進行した(図29A)。対照的に、PLK1424-2/A SNALP処理マウスは、典型的には、処理の継続時間にわたり体重を維持し、このことから、siRNA製剤がよく耐容されることが示され、治療的利益が示唆された。死亡は、動物研究における許容される終点ではない；従って、体重減少、身体状態、および腹部膨脹の総計である毎日の臨床的スコアに従って、人道的終点を定義した。この侵襲性の正所モデルにおいて、Luc-U/U群における最初の安楽死までの時間は、腫瘍接種の28日後であり、生存時間中央値は32日であった。それと比較して、PLK1424-2/A SNALP処理マウスにおいては、最初の安楽死までの時間および生存中央値は、それぞれ、44日および51日へと有意に延長された( $p < 0.05$ ; 図29B)。類似した生存時間の延長が、宿主として胸腺欠損nu/nuマウスを利用した反復研究において観察された(図30)。

#### 【0462】

次いで、腫瘍移植後22日目(5回目のsiRNA用量の1日後)、PLK1424-2/Aの投薬の完了時に、Hep3B肝臓腫瘍負荷の程度を判定した。剖検時、対応する対照動物における広範な巨視的な腫瘍負荷と比較して、PLK1424-2/A処理マウス6匹中2匹のみが、肝葉への細胞移植の部位の付近に限局性の可視の腫瘍を有していた(図31)。ヒトGAPDH(hGAPDH)mRNAに対する種特異的プローブセットは、正常マウス肝臓に由来するバックグラウンドシグナルの2~6倍の範囲の低レベルのこの腫瘍由来のシグナルを、PLK1424-2/A処理マウス6匹中5匹において検出し(図29C)、このことから、腫瘍成長が、この処理計画により有意に抑制されたが、完全には根絶されなかったことが示された。

#### 【0463】

全身siRNA投与の耐容性をより精密に調査するため、複数回投与毒性研究を、マウスサロゲートPLK773-1/Bを使用して実施した。2mg/kgのSNALP製剤化PLK773-1/Bの週2回(治療的投薬計画を反映)の反復投与は、15日間および29日間の連続処理の後に判定された血清肝酵素、全wbc数、リンパ球数、好中球数、血小板数、またはrbcパラメーターの有意な変化を引き起こさなかった(図32)。これらの結果は、正所腫瘍モデルにおいて確立された治療的投薬計画が、最小の肝細胞毒性を引き起こし、低分子抗有糸分裂薬の全身投与により高頻度に観察される型の重度の骨髄機能障害を引き起こさないことを示した。

#### 【0464】

同系のNeuro2a肝臓腫瘍におけるSNALP製剤化KSP2263-U/U siRNAの治療効果を、次に評価した。このモデルにおいて、Luc-U/U SNALP(4mg/kg、3日毎×5)を受容したマウスの生存時間中央値が20日であったのに対し、KSP2263-U/U処理群においては28日であり(図29D)、このことから、もう一つの腫瘍学標的のためのSNALP製剤化siRNAによる治療効力が示された。

#### 【0465】

インビボのRNAiにより媒介される腫瘍遺伝子サイレンシングの確認

2'OME siRNAがマウスにおいて測定可能な免疫応答を誘導しなかったことが証明されたが、RNAiが、これらのPLK-1 siRNAおよびKSP siRNAの製剤の強力な治療効果の基礎となる第一の機序であることを示すことが、まだ重大であった。SNALP製剤化PLK1424-2/Aの単回静脈内投与(2mg/kg)は、投与の24時間後、肝臓Hep3B腫瘍における腫瘍由来ヒトPLK-1(

10

20

30

40

50

hPLK-1) mRNAの有意な低下を引き起こした (PBS処理マウスにおけるhPLK-1 mRNAレベルの45% +/-6.8% ; 図33A)。マウスKSP mRNA発現の類似した低下が、肝臓Neuro2a腫瘍モデルにおいて等価な用量のKSP2263-U/Uを使用して達成された (図33B)。腫瘍におけるKSPおよびPLK-1の発現とは対照的に、周辺の非増殖性肝臓におけるこれらの両遺伝子の内因性発現は、極めて低く、これらの研究において利用された分岐DNAアッセイの検出レベル未満であることが見出された。PLK-1およびKSPのような細胞周期遺伝子の発現は、典型的には、細胞が細胞周期を中止する際にダウンレギュレートされるため (22)、siRNAまたは送達媒体により誘導される非特異的な抗増殖効果は、腫瘍内のそれらの発現の一般的な減少を引き起こすであろう。従って、本発明者らは、5'-RACE PCR法によって、RNAiが、インピボのmRNAサイレンシングを担う機序であることを確認した。予測されたサイズのPCR産物が、PLK1424-2/A SNALP投与の24時間後に採取された肝臓Hep3B腫瘍試料より容易に増幅された (図33C)。3匹の個々のマウスに由来する476bp PCR産物のオリゴヌクレオチド配列決定は、hPLK-1 mRNAの予測された5'切断末としてのその同一性を確認した。このPCR産物は、Luc-U/U siRNA処理マウスより採取された腫瘍、または非腫瘍保持動物に由来する肝臓試料には認められなかった。RACE-PCR分析は、KSP2263-U/U処理動物の腫瘍におけるRNAiにより媒介されるKSP mRNA切断の特異的な誘導も確認した (図33D)。

#### 【0466】

腫瘍におけるRNAiの継続時間をモニタリングするための5'-RACE-PCR

腫瘍内の活性RNAiの継続時間を決定するため、Hep3B腫瘍保持マウスのコホートを、PLK1424-2/A SNALP (静脈内投与による2mg/kg) により処理し、5'RACE-PCRによる分析のため、投与の24時間後、48時間後、96時間後、7日後、および10日後に腫瘍を収集した。活性PLK-1 mRNA切断は、48時間後および96時間後に強力なままであり、単回siRNA投与の7日後にもまだ認められた。10日目、PLK1424処理動物において弱いシグナルが検出された (図34A)。RACE-PCRによって決定されたRNAiの継続時間は、これらの肝臓腫瘍におけるhPLK-1 mRNAサイレンシングのレベルと密接に関連し (図34B)、このことから、RNAiがPLK-1 mRNAの低下のための第一の機序であったというさらなる確認が提供された。切断されたmRNA種は、細胞細胞質において本質的に不安定であるため、標的mRNAの活性RISCにより媒介された切断が、単回siRNA処理後に7~10日間持続したと結論付けることができる。これは、活性RNAiが、細胞障害性レベル未満のレベルで腫瘍細胞のサブセットにおいて起こったか、または、最初は非増殖性であった集団において起こり、それらの集団が、その後、細胞周期に入り、PLK-1 mRNAを再発現したことを示唆している。

#### 【0467】

組織学によって判定されたRNAiにより媒介される抗腫瘍活性

KSP阻害剤 (46) およびPLK-1阻害剤 (47、48) を含む多くの抗有糸分裂薬が、基礎となる作用機序を反映する明瞭な核表現型を誘導する。従って、本発明者らは、インピボのRNAiにより媒介される遺伝子サイレンシングの程度が、腫瘍細胞において所望の抗有糸分裂効果を誘導するために十分であるか否かを判定するため、従来の組織学をバイオマーカーとして使用した。KSPの阻害は、双極紡錘体形成および中心体分離を防止して、特徴的な単星状体紡錘体の形成をもたらす。本発明者らは、KSP2263-U/U siRNAによる腫瘍細胞の処理が、インピボで明瞭な単星状体核表現型を誘導することをまず確認した (図35)。KSP2263-U/U処理マウスに由来するNeuro2a腫瘍における従来の組織学は、SNALP投与の24時間後、単星状体細胞およびアポトーシス細胞 (46) に典型的な異常な有糸分裂像を有する相当数の腫瘍細胞を明らかにした (図36A、B)。KSP2263-U/U処理に対するこの劇的な薬力学的応答は、用量依存性であり、定量的な組織学スコアに基づき、最大の効果は、2mg/kg siRNAで観察された (図36C)。この分析は、対照腫瘍における典型的な有糸分裂像を示す細胞のおよそ3%に対し、siRNA処理の24時間後、凝縮クロマチン構造を有する全Neuro2a腫瘍細胞のおよそ13%を推定した。

#### 【0468】

PLK1424-2/SNALP処理マウスに由来するHep3B肝臓腫瘍の組織学的分析も、凝縮クロマチン構造および異常有糸分裂像を有する多量の腫瘍細胞を明らかにした (図37)。これらの

10

20

30

40

50

表現型変化は、PLK-1阻害によって誘導される染色体分離の調節異常およびアポトーシスと一致し(47)、対照処理動物の腫瘍組織学において認められた典型的な有糸分裂像とは極めて対照的であった。

#### 【0469】

これらの分子および細胞の薬力学的研究は、SNALP製剤化されたPLK siRNAまたはKSP siRNAの単回静脈内投与によって達成される、RNAiにより媒介されるサイレンシングの程度が、腫瘍細胞の実質的な割合において有糸分裂機能障害を引き起こすのに十分であることを確認した。両モデルにおける薬物活性の組織学的判定は、確立された腫瘍の全体に「影響を受けた」細胞が分布することを証明し、このことから、脂質送達媒体の良好な浸透が示された。総合すると、このテストバッテリーは、測定可能な免疫応答の非存在下での、これらのSNALP製剤化siRNAの強力な治療効果が、RNAiの結果であることの決定的な証拠を提供した。

#### 【0470】

皮下腫瘍におけるSNALP製剤化siRNAの治療活性

腫瘍学におけるこの技術の一般的な利用可能性を拡張するため、この肝臓を標的とするSNALP製剤(26)の性能を、肝臓外の腫瘍へのsiRNAの送達に関して試験した。SNALPのようなポリ(エチレン)グリコール複合脂質(PEG-脂質)を含有している媒体の場合、脂質粒子とより強力に会合し、血液コンパートメントにおいてより大きな遮蔽を提供する、より長いアルキル鎖をPEG-脂質に組み込むことにより、血液滞留時間および腫瘍蓄積の増加が達成され得る(49)。C14 PEG-脂質(PEG-cDMA)のC18アナログPEG-cDSA(50)への交換は、肝臓腫瘍における治療効力を改変することなく、マウスにおけるPLK1424-2/A SNALPの血液循環時間を有意に増加させる効果を有していた(図38; 生存中央値 Luc対照PEG-cDMA = 33日に対して、PLK PEG-cDMA = 51日、PLK PEG-cDSA = 53日;  $p < 0.05$ )。

#### 【0471】

比較的短い血液循環時間および肝臓への迅速な分布にも関わらず、PLK1424-2/Aを含有しているPEG-cDMA SNALPの反復投与は、Luc-U/U siRNA処理対照と比較して、皮下Hep3B腫瘍成長の有意な阻害を引き起こした(図39A)。等価なPEG-cDSA SNALPに製剤化されたPLK1424-2/Aは、より強力な抗腫瘍効果を示し、投薬期間を通して、確立された腫瘍(およそ7mmの直径)の退行を誘導した(図39A)。この活性の差は、皮下腫瘍においてこれらのPLK1424-2/A SNALPによって誘導された遺伝子サイレンシングの程度と相関していた(図39B)。肝臓腫瘍モデルと同様に、これは、RACE-PCRおよび腫瘍組織学の両方により、RNAiによって媒介されていることが確認された。最後に、PEG-cDSA PLK1424-2/A製剤の治療的用量応答を、皮下モデルにおいて確立した。腫瘍成長の用量依存性の阻害は、0.5~3.0mg/kg PLK1424-2/A siRNAで認められた(図39C)。試験された最低用量レベルにおいて、これは、2週間にわたる3mg/kg siRNAの全累積用量に相当した。

#### 【0472】

考察

核酸に基づく薬物に関する作用機序の描写は、基礎となる免疫刺激または核酸によって誘導されるその他の非特異的な効果によって歴史的に混乱してきた(51、52)。これは、siRNAに基づく治療薬という急成長中の領域にとって、深刻な問題であり続けている(11)。標的のmRNAまたはタンパク質のダウンレギュレーションの判定は必要であるが、これらの変化は、siRNAによって誘導される標的以外に対する効果の症候でもあるかもしれないため、RNAiが基礎となる機序であると結論付けるのには十分でない。腫瘍学適用のためのSNALP製剤化siRNAの開発に関するこの実施例は、前臨床モデルにおける強力なsiRNAにより媒介される抗腫瘍効力の基礎となる特異性および作用機序の両方を確認するために使用された方法論を記載する。これは、以下のアプローチの組み合わせを含んでいた:(1)免疫応答を活性化する能力が認められず、従って、非特異的な効力の可能性を最大限に排除する、活性siRNA製剤および対照siRNA製剤の両方の設計;(2)直接抗腫瘍効果および機能的な標的阻害の特殊な組織学的バイオマーカーを有するバリデートされた腫瘍学標的(PLK-1およびKSP)の選択;(3)腫瘍細胞におけるRNAi特異的なmRNA切断産物の誘導を

10

20

30

40

50

確認するためのRACE-PCRの使用；ならびに(4)この活性RNAiサインの、腫瘍における標的mRNAサイレンシングの継続時間との相関。この実施例は、RNAiが第一の作用機序であることを正式に証明する、siRNAの抗腫瘍効果を記載している最初の報告である。さらに、この前臨床研究設計アプローチは、腫瘍学におけるその他の標的へ一般化され、RNAi領域における研究者らによって容易に採用され得る。

#### 【0473】

混乱させる免疫刺激の効果なしに、腫瘍における遺伝子サイレンシングの治療的可能性を評価するため、送達媒体で投与された場合の未修飾(ネイティブ)RNA二重鎖の免疫刺激活性が完全に消失した2'OMe修飾siRNAを設計した。ネイティブsiRNA二重鎖の大多数が、エンドソームのTLR7経路および/またはTLR8経路を通して自然免疫応答を活性化する固有の能力を有し、細胞取り込みが送達媒体によって容易にされた場合、特にそうであることは、よく確立されている(2、3、18、53)。21bp以上の長さの裸の(製剤化されていない)siRNA二重鎖も、脈絡膜新血管新生のモデルにおいて、内皮細胞上の細胞表面TLR3を活性化して、非特異的な抗血管形成効果を引き起こすことが報告されている(4)。腫瘍モデルにおけるsiRNAによる免疫活性化の結果は、免疫エフェクター機能の活性化を通して、活性型および非ターゲット型の両方の免疫刺激性siRNA構築物によって誘発される、強力な抗腫瘍効果によって、最近、例示された(15)。本明細書に記載された2'OMe siRNAは、マウスにおいて測定可能なサイトカイン応答を誘導しなかった。これらの送達媒体の第一標的器官に相当する肝臓においても、または二次リンパ組織においても、IFN誘導可能遺伝子IFIT1の誘導は存在しなかった。IFIT1発現は、組織内の局所的なIFNシグナリングに対して応答性であり、IFN非依存性経路を通して、TLR3を含むdsRNA受容体を介しても直接誘導される(54~56)。従って、その測定は、特定の全身性サイトカインの誘導と比較して、より広く、siRNAにより媒介される免疫活性化の指標となると見なされ得る。総合すると、これらの結果は、2'OMe siRNAの適切な設計が、エンドソームTLR7/8(2、3、18、53)の活性化のみならず、TLR3(56)の活性化も妨げることができることを示す。これは、SNALPのような送達媒体へのsiRNAの封入が、細胞表面上のTLR3への曝露から効果的にRNAを遮蔽するという事実を反映している可能性が高い。研究者は、好ましい送達媒体および動物モデルの環境において、選択されたsiRNAに対する免疫応答の完全な抑止を確認することが重要である。

#### 【0474】

主に、ヌクレアーゼ抵抗性二重鎖を作製することを目的として、siRNAを化学的に修飾するための多数の戦略が提唱されている(16)。この実施例は、二重鎖の両方の鎖へ2'OMe-G残基、2'OMe-U残基、または2'OMe-A残基を組み込む戦略が、非免疫刺激性のsiRNAを作製するであろうことを例示する。siRNA設計のための一つのそのような方法は、二重鎖の両方の鎖の全体において交互の2'OMeヌクレオチドを利用する(57)。Santelら(58)は、腫瘍モデルにおいて、血管内皮をトランスフェクトするリポプレックス製剤を使用して、血管形成性の標的CD31に対するこれらの2'OMe siRNAを試験した。これらの研究における抗腫瘍効果は、見かけ上、明らかな免疫刺激の非存在下で、CD31発現および腫瘍血管の特異的な低下と相関していた。著者らは、そのモデルにおいてRNAiの誘導を確認せず、siRNA投与の24時間後の全身性IFNのみを考慮したが、その報告は、最小の免疫刺激能を有すると予測される化学的に修飾されたsiRNA構築物を使用した、腫瘍学における極少数の公開されたRNAi研究のうちの一つに相当する。このsiRNA設計は、裸の分子として、TLR3を活性化しないと予測される、平滑末端19mer長二重鎖に基づくことに注意すべきである(4)。この仮定は、細胞表面TLR3またはその他のRNA受容体の関与を可能にしない短いsiRNAの複合体化を確実にするため、これらのリポプレックス化siRNAに関して正式に試験される必要がある。

#### 【0475】

siRNAによる標的サイレンシングには、低分子薬物による機能的阻害と比べて、いくつかの利点があるかもしれない。キナーゼ阻害剤が比較的無差別的であるのに対して、その性質のため、RNAiは、高度に特異的であり、密接に関連したタンパク質の選択的な阻害を

10

20

30

40

50

可能にする。現在のPLK-1阻害剤は、例えば、PLK-2およびPLK-3のキナーゼ活性も阻害し（23、59）、これらのファミリーメンバーの同時の阻害が、細胞分裂の制御において反対の効果を有するかもしれないという懸念を提起する（60）。RNAiによるタンパク質枯渇に対する生物学的応答、例えば、PLK-1遺伝子サイレンシングの際のキナーゼおよびポロボックスの両方の機能性の喪失も、低分子による機能的阻害とは異なっている（61）。siRNAにより達成され得る薬物効果の継続時間は、もう一つの魅力的な利点である。RNAiが哺乳動物細胞内で確立された後、遺伝子サイレンシングは、相補mRNAの存在下で、活性化されたRISCの相対的安定性のため、何日もの間、持続することができる（26、62）。従って、siRNA治療薬に関する薬物活性の維持は、有効な血中薬物濃度を維持するための要件から切り離される。本発明者らは、本発明者らの腫瘍モデルにおける活性RNAiが、RACE-PCRによる特異的なmRNA切断産物の検出に基づき、最長10日間、持続することを見出した。興味深いことに、この効果の継続時間は、mRNAレベルでのサイレンシングがsiRNA投与の14～28日後に徐々に消散した、健康マウス肝臓におけるApoB発現を標的とする比較可能な研究において観察されたものより実質的に短かった（26）。腫瘍におけるRNAiの弱化は、PLK-1によりサイレンシングされた腫瘍細胞の効率的な死滅、および致死用量未満の用量のPLK-1 siRNAを受容した細胞の増殖を通じた活性化されたRISCの希釈に起因する可能性が最も高いと考えられる（62）。

#### 【0476】

この実施例は、SNALP製剤化siRNAの全身投与が、固形腫瘍におけるmRNAのRNAiにより媒介される切断を誘発して、有糸分裂の妨害および腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するために十分な大きさで、標的発現をサイレンシングし得ることを証明する。この特異的な薬物効果は、ヒトHCCのモデルにおける頑強な治療的抗癌活性に通じる。臨床的徴候の著しい改善と相関する腫瘍成長の有意な阻害は、最終的に、生存時間の有意な増加をもたらした。

#### 【0477】

多重キナーゼ阻害剤ソラフェニブは、限定された第III相データ（63）に基づき、切除不能HCCの処置のために最近承認され、ソラフェニブはこの適応症のためのケアの標準になる可能性が高い。その結果、低分子薬物と組み合わせられたSNALP製剤化siRNAの使用には、利用可能性がある。実際、本発明者らの研究は、ソラフェニブおよびPLK-1 SNALPの組み合わせが、マウスにおいてよく耐容され、腫瘍モデルにおける有望な活性の兆候を示すことを示している。

#### 【0478】

現在の処置オプションは、原発性肝臓癌または肝臓転移性疾患を有する患者のために限定されており、予後は乏しいままである。肝臓腫瘍および播種性腫瘍を標的とすることができる全身送達媒体とカップリングされた、PLK-1およびKSPのような癌の進行における鍵遺伝子を標的とする治療用siRNAの臨床的開発は、この重大な未解決の医学的必要性のための刺激的な好機を提示する。

#### 【0479】

方法

siRNA。ヒトPLK-1（Genbankアクセッション番号NM\_005030）を標的とするsiRNA配列を、標準的なsiRNA設計アルゴリズムを使用して選択した（40、64）。PLK-1 siRNAの標的配列は表7にリストされる。全てのsiRNAが、Integrated DNA Technologiesによってオリゴヌクレオチドとして合成され、脱塩され脱保護されたRNAとして受容された。アニーリングされた二重鎖の完全性を、20%PAGEによって確認した。siRNAを、以前に記載されたようにして（26）、合成コレステロール（Sigma）、DSPC（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン；Avanti Polar Lipids）、PEG-cDMA（3-N-(-メトキシポリ(エチレングリコール)2000)カルバモイル-1,2-ジミレスチルオキシ-プロピルアミン）、およびDLinDMA（1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N,N-ジメチル)アミノプロパン）から構成されたSNALPへ製剤化した。インビボ研究のため使用された製剤は、9:1の最終的な脂質:siRNA重量比を含んでいた。示された実験においては、PEG-cDMAを、等モル濃度でC18アナログPEG-cDS

Aに置換した(50)。全ての安定化された脂質粒子が、使用前にPBS中で透析され、6ヶ月を超えて、4 で保存された湿った調製物として安定していた。

【0480】

(表7) ヒトPLK-1を標的とするsiRNA配列

| siRNA | センス鎖(5' → 3')         | SEQ ID NO: |
|-------|-----------------------|------------|
| 126   | GGUCCUAGUGGACCCACGCUU | 235        |
| 272   | AGCCGCACCAGAGGGAGAAUU | 236        |
| 273   | GCCGCACCAGAGGGAGAAGUU | 237        |
| 363   | GGACAACGACUUCGUGUUCUU | 238        |
| 412   | CUCCUGGAGCUGCACAAGAUU | 239        |
| 450   | GCCUGAGGCCCGAUACUACUU | 240        |
| 498   | CCUGCACCGAAACCGAGUUUU | 241        |
| 618   | GAGGAAGAAGACCCUGUGUUU | 242        |
| 627   | GACCCUGUGUGGGACUCCUUU | 243        |
| 629   | CCCUGUGUGGGACUCCUAAUU | 244        |
| 630   | CCUGUGUGGGACUCCUAAUUU | 245        |
| 693   | GGUGGAUGUGUGGUCCAUUUU | 246        |
| 694   | GUGGAUGUGUGGUCCAUUGUU | 247        |
| 736   | GUGGGCAAACCACCUUUUGUU | 248        |
| 744   | ACCACCUUUUGAGACUUCUUU | 249        |
| 745   | CCACCUUUUGAGACUUCUUUU | 250        |
| 772   | GAGACCUACCUCCGGAUCAUU | 251        |
| 773   | AGACCUACCUCCGGAUCAAAU | 218        |
| 776   | CCUACCUCCGGAUCAAGAAU  | 252        |
| 780   | CCUCCGGAUCAAGAAGAAUUU | 253        |
| 832   | GCCGCCUCCUCAUCCAGAUU  | 254        |
| 837   | CUCCUCAUCCAGAAGAUGUU  | 255        |
| 1137  | GCAGCUGCACAGUGUCAAUUU | 256        |
| 1195  | GAGGCUGAGGAUCCUGCCUUU | 257        |
| 1229  | GGGUCAGCAAGUGGGUGGAUU | 258        |
| 1232  | UCAGCAAGUGGGUGGACUAAU | 259        |
| 1233  | CAGCAAGUGGGUGGACUAAUU | 260        |
| 1242  | GGUGGACUAAUCCGACAAGUU | 261        |
| 1319  | CACGCCUCAUCCUCUACAAUU | 262        |
| 1321  | CGCCUCAUCCUCUACAAUGUU | 263        |
| 1347  | CAGCCUGCAGUACAUAGAGUU | 264        |
| 1404  | UCCCAACUCCUUGAUGAAGUU | 265        |
| 1409  | ACUCCUUGAUGAAGAAGAUUU | 266        |
| 1424  | AGAUCACCCUCCUAAAUAUU  | 211        |
| 1457  | UGAGCGAGCACUUGCUGAAUU | 267        |
| 1550  | CCCAGCAGCACAUCAUCCUUU | 268        |
| 1556  | GCGCAUCAUCCUGCACCUUU  | 269        |
| 1577  | GCAACGGCAGCGUGCAGAUUU | 270        |
| 1580  | ACGGCAGCGUGCAGAUCAAUU | 271        |
| 1620  | GCUCAUCUUGUGCCACUGUU  | 272        |
| 1658  | UCGACGAGAAGCGGGACUUUU | 273        |

【0481】

表7中、「siRNA」の下の数字は、ヒトPLK-1 mRNA配列NM\_005030の開始コドン(ATG)に対するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位をさす。ある種の態様において、センス鎖は、2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、および/またはロックド核酸(LNA)ヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドを含む。

【0482】

10

20

30

40

50

細胞培養物。アメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) (ATCC; Manassas, VA) より細胞株Hep3B、HepG2、HT29、LS174T、およびNeuro2a細胞を入手し、10%熱不活化FBSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含む推奨された基本培地中で培養した。インビボ腫瘍研究のため、Hep3B細胞またはNeuro2a細胞をT175フラスコにおいて培養し、採集し、移植前にPBSで1回洗浄した。インビトロsiRNA活性アッセイのため、細胞株をSNALP製剤化siRNAの存在下で96穴プレートにおいて培養した。細胞生存性をレサズリン色素CellTiter Blue (Promega Corp) を使用して、72時間後に判定した。対応するPLK-1またはKSPのmRNAサイレンシング活性を、bDNAアッセイ (Panomics Inc.) によって、24時間後にレプリケートプレートにおいて判定した。siRNA処理細胞におけるカスパーゼ3および7の酵素活性のレベルを、蛍光性カスパーゼ3/7基質 (Z-DEVD) 2-ローダミン110試薬Apo-ONE (Promega Corp.) を使用して判定した。

10

## 【0483】

インビトロ免疫刺激アッセイ。マウスFlt3L樹状細胞培養物は、以前に記載されたようにして作製された(65)。簡単に説明すると、Balb/Cマウス由来の骨髄を、完全培地 (RPMI 1640、10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、25mM HEPES、50μM 2-メルカプトエタノール) 中に採集し、70ミクロンのストレーナーに通し、100ng/mLマウスFlt3L (PeproTech) が補足された完全培地に $2 \times 10^6$ 細胞/mLで再懸濁させた。細胞を6穴プレートに播種し、新鮮なFlt3L培地1mLを3日毎に添加した。培養9日目に、非接着細胞を、 $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルの濃度で96穴プレートへ播種した。製剤化されたsiRNAをPBSで希釈し、24時間、細胞に添加した後、ELISAによって上清をサイトカインに関してアッセイした。

20

## 【0484】

インビボ免疫刺激アッセイ。全ての動物研究が、Canadian Council on Animal Care指針に準じて、Institutional Animal Care and Use Committeeによって承認されたプロトコルに従い、Protiva Biotherapeuticsにおいて実施された。6~8週齢のBalb/CマウスをHarlanより入手し、使用前に2週間の順応期間に供した。外側尾静脈への標準的な静脈内注射を介してPBS中のSNALP製剤化siRNA (2mg/kg) をマウスへ投与した。心臓穿刺によって血液を収集し、サイトカイン分析のため血漿として加工した。肝臓および脾臓を、IFIT1 mRNA分析のため、RNALater (Sigma Co.) へ収集した。

30

## 【0485】

肝臓内腫瘍モデル。Hep3BまたはNeuro2a腫瘍細胞の直接肝臓内注射によって、マウスにおいて肝臓腫瘍を確立した(45)。雌スキッド/ベージュマウス (Charles River Laboratories) および雄A/Jマウス (Jackson Laboratories) を、それぞれ、Hep3B腫瘍およびNeuro2a腫瘍の宿主として使用した。動物は手術直前にSC注射によってアナフェンを受容した。個々のマウスに、イソフルランガス吸入によって麻酔をかけ、過度の眼乾燥を防止するため眼科用粘稠剤を適用した。ガス麻酔下に維持しながら、正中を横切る単一の1.5cm切開を胸骨下で作製し、肝左葉外側区域を露出させた。25μL PBSに懸濁した $1 \times 10^6$ 個のHep3B細胞または $1 \times 10^5$ 個のNeuro2a細胞を、ハミルトン注射器および30G針を使用して、浅い角度で徐々に葉へ注射した。次いで、出血を止めるため、刺創に綿球を適用した後、縫合した。マウスを、無菌ケージ内で麻酔より回復させ、2~4時間入念にモニタリングした後、通常の飼育施設に戻した。

40

## 【0486】

腫瘍移植の8~11日後、マウスを処理群へ無作為化した。個々の動物の体重に従ってmg siRNA/kg基準で計算されたsiRNA SNALP製剤またはPBS媒体対照 (10mL/kg注射容量) を、外側尾静脈を介した標準的な静脈内注射によって投与した。次いで、発達中の腫瘍負荷および処置耐容性の指標として、研究の継続時間を通じて、体重をモニタリングした。効力研究のため、定義された人道的終点を、生存のサロゲートとして決定した。判定は、腫瘍負荷による安楽死の日を定義するため、臨床的徴候、体重減少、および腹部膨脹の組み合わせに基づき、資格を有する飼育技術者によってなされた。

## 【0487】

50

皮下腫瘍モデル。雌スキッドノベージュマウスにおいて、50  $\mu$ L PBS中の $3 \times 10^6$ 個の細胞の左後側腹部への皮下注射によって、Hep3B腫瘍を確立した。腫瘍が触知可能になった接種の10~17日後に、マウスを処理群へ無作為化した。siRNA SNALP製剤を、上記のように投与した。デジタルノギスを使用して、腫瘍成長を判定するため、2次元(幅×長さ)で腫瘍を測定した。腫瘍体積を方程式 $a \times b \times b/2$ (式中、aおよびb=それぞれ、群平均値 $\pm$  SDとして表された最長直径および最短直径)を使用して計算した。

【0488】

腫瘍組織中のヒトPLK-1およびGAPDHのmRNAの測定。腫瘍をRNALaterへ直接採集し、加工まで4で保管した。100mgの腫瘍組織を、Fastprep組織ホモジナイザーにおいて50mg/ml プロテイナーゼK(EpiCentre)を含有しているTissue and Lysis Solution(EpiCentre Biototechnologies)の中でホモジナイズした後、15分間、65の水浴中でインキュベートし、溶解物を清浄化するため遠心分離した。図33B中のmRNA分析は、5'-RACE-PCRプロトコルに従い単離された精製されたRNAで実施された。製造業者の指示(Quantigene 1.0マニュアル)通りに、QuantiGene bDNAアッセイ(Panomics)によって、腫瘍溶解物中のヒトPLK-1およびヒトGAPDHのmRNAを測定した。ヒト特異的なPLK-1(NM\_005030)およびGAPDH(NM\_002046)のプロープセットは、Panomicsによって設計され、マウスカウンターパートmRNAに対する最小の交差反応性を有することが証明された。データは、個々の動物の平均PLK-1:GAPDH比 $\pm$  SDとして表された。腫瘍負荷は、腫瘍保持マウス由来の完全肝臓をホモジナイズし、肝臓内の全hGAPDHシグナル(RLU)を測定することにより判定された。値は、全肝臓1mg当たりのhGAPDH RLUとして表された。

【0489】

マウス組織中のIFIT1 mRNAの測定。マウスの肝臓および脾臓を、上記のように、IFIT1 mRNAを定量するため、bDNAアッセイのため加工した。IFIT1プロープセットは、マウスIFIT1 mRNA(NM\_008331の4~499位)に特異的であり、GAPDHプロープセットはマウスGAPDH mRNA(NM\_008084の9~319位)に特異的であった。データは、GAPDH RLUに対するIFIT1の相対光単位(RLU)の比として示される。

【0490】

5'RNAリガーゼ媒介RACE(5'RLM RACE)。TRIZOL(Invitrogen,Carlsbad,CA)における直接溶解によって、インビトロ培養細胞から全RNAを単離した。インビボ腫瘍試料の場合には、組織をRNALater(Sigma Co.)へ採集し、加工前に少なくとも24時間、4で保管した。30mgの腫瘍組織を、1mL TRIZOL中でホモジナイズし、次いで、全RNAを単離するため加工した。RNA品質をゲル電気泳動(1%アガロースTBE)によって確認した。5'RLM RACEを、修飾を加えたInvitrogen GeneRacerマニュアルに従って実施した。プライマーは、Primer 3ソフトウェアを使用して設計された。10  $\mu$ gの全RNAを、1.3ngのGeneRacer RNAアダプター

(5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3';

SEQ ID NO:274)

と混合し、5分間、65に加熱し、氷上で急冷した後、ライゲーションを行った。RNAライゲーションは、1×リガーゼ緩衝液、30U RNase-Out(Invitrogen)、および30U RNAリガーゼ(Ambion Inc,Austin,TX)中で1時間、37で実施された。次いで、試料を、核酸用の製造業者の指示通り(Millipore Inc)、Microcon 100フィルターを使用して透析る過によって精製した。10  $\mu$ LのRNAライゲーション産物を、Superscript III(Invitrogen)および予測されたPLK1424 siRNA切断部位の下流に設計されたPLK-1特異的プライマー

(5'-GGACAAGGCTGTAGAACCCACAC-3'; SEQ ID NO:275)

を使用して逆転写した。逆転写は、50分間55で実施され、続いて70で15分間不活化され、氷上で急冷された。予測されたPLK1424切断部位にかかるよう、GeneRacerアダプター内の順方向(GR5)プライマーおよびPLK-1 mRNAの3'末内の逆方向(PLK1424rev)プライマーをそれぞれ使用して、5'RLM RACE PCRを実施した。PCRプライマー配列は以下の通り

であった：

GR5 – 5'- CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' (SEQ ID NO:276)

；および

PLK1424rev – 5'-

CCAGATGCAGGTGGGAGTGAGGA-3' (SEQ ID NO:277)

。PCRは、94 2分（1サイクル）、94 30秒および72 1分（5サイクル）、94 30秒および70 1分（5サイクル）、94 30秒、65 30秒、および68 1分（25サイクル）、ならびに68 10分（1サイクル）のタッチダウンPCR条件を使用して、BIO-RAD iCyclerを使用して実施された。PCR産物を、2%TBEアガロース1000（Invitrogen）ゲル上で泳動し、1 μg/ml臭化エチジウムにより染色した。以下の配列決定プライマーを使用して、ゲル精製された産物の直接配列決定によって、PCR産物の同一性を確認した：

GeneRacer 5' Seq – 5'-

ACTGGAGCACGAGGACAC-3' (SEQ ID NO:278); および PLK1424 3' Seq – 5'-

GAGACGGGCAGGGATATAG-3' (SEQ ID NO:279)

。類似したアッセイ条件およびプライマー設計を、以下の独特のプライマーを使用して、KSP2263 siRNAによって切断されたKSP mRNA産物を増幅するために利用した。

KSP特異的cDNAプライマー

5'- GCTGCTCTCGTGGTTCAGTTCTC-3' (SEQ ID NO:280)

、RACEプライマー-KSPrev

5'- GCCCAACTACTGCTTAACTGGCAAA-3' (SEQ ID NO:281)

、およびKSP配列決定プライマー

5'-TGGGTTTCCTTTATTGTCTT-3' (SEQ ID NO:282)

#### 【 0 4 9 1 】

組織学。siRNA投与の24時間後にマウスから腫瘍を採集し、10%緩衝ホルマリンで直接固定した。次いで、パラフィン包埋組織切片として組織を加工し、従来の組織学的技術を使用してヘマトキシリンおよびエオシンにより染色した。染色された切片の定量分析を、凝縮クロマチン構造を示す有糸分裂/アポトーシス細胞の数を、全腫瘍細胞に対する割合として計数することにより実施した。各腫瘍に関する値を、400倍の拡大率での10個の視野の平均から導出した。

#### 【 0 4 9 2 】

サイトカインELISA。全てのサイトカインを、サンドイッチELISAキットを使用して定量化した。これらは、マウスインターフェロン- $\gamma$ （PBL Biomedical ; Piscataway,NJ）ならびにヒトおよびマウスのIL-6（BD Biosciences ; San Diego,CA）であった。

#### 【 0 4 9 3 】

ApoB-1 siRNA配列。以下のApoB-1 siRNA（5'-3'）配列を、図25に示される実験において使用した：

センス– GUCAUCACACUGAAUACCAAU

(SEQ ID NO:283); 2'OMe センス– GUCAUCACACUGAAUACCAAU (SEQ ID NO:284);

アンチセンス(AS)– AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAC (SEQ ID NO:285); 2'OMe AS–

AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAC (SEQ ID NO:286)

。2'OMeヌクレオチドは、太字および下線で示される。

## 【 0 4 9 4 】

統計分析。生存時間の比較は、ログランク（マンテルコックス）検定によって、 Kaplan-Meierプロットで実施された。P値が0.05未満である場合、差を有意と見なした。

## 【 0 4 9 5 】

参考文献

- (1) Elbashir, S.M. et al. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
- (2) Judge, A.D. et al. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23: 457-462.
- (3) Hornung, V. et al. 2005. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11: 263-270.
- (4) Kleinman, M.E. et al. 2008. Sequence and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452:591-597. 10
- (5) Hornung, V. et al. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314: 994-997.
- (6) Marques, J.T. et al. 2006. A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 24: 559-565.
- (7) Krieg, A.M. 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5: 471-484. 20
- (8) von Marschall, Z. et al. 2003. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 95:437-448.
- (9) Lanuti, M. et al. 2000. Cationic lipid:bacterial DNA complexes elicit adaptive cellular immunity in murine intraperitoneal tumor models. *Cancer Res* 60: 2955-2963.
- (10) Buhtoiarov, I.N., Lum, H.D., Berke, G., Sondel, P.M., and Rakhmilevich, A.L. 2006. Synergistic activation of macrophages via CD40 and TLR9 results in T cell independent antitumor effects. *J Immunol* 176: 309-318. 30
- (11) Judge, A., and MacLachlan, I. 2008. Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. *Hum Gene Ther* 19: 111-124.
- (12) Michie, H.R. et al. 1988. Detection of Circulating Tumor Necrosis Factor after Endotoxin Administration. *N. Engl. J. Med.* 318: 1481-1486.
- (13) Stevenson, H.C. et al. 1985. A phase I evaluation of poly(I,C)-LC in cancer patients. *J Biol Response Mod.* 4: 650-655. 40
- (14) Schlee, M., Barchet, W., Hornung, V., and Hartmann, G. 2007. Beyond double-stranded RNA-type I IFN induction by 3pRNA and other viral nucleic acids. *Curr Top Microbiol Immunol* 316: 207-230.
- (15) Poeck, H. et al. 2008. 5'-triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med.* 14: 1256-1263.

- (16) Manoharan, M. 2004. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 570-579.
- (17) Morrissey, D.V. et al. 2005. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23: 1002-1007.
- (18) Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C., and MacLachlan, I. 2006. Design of non-inflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 13: 494-505. 10
- (19) Knight, S.D., and Parrish, C.A. 2008. Recent progress in the identification and clinical evaluation of inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Curr Top Med Chem* 8: 888-904.
- (20) Strebhardt, K., and Ullrich, A. 2006. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6: 321-330.
- (21) Tao, W. et al. 2005. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 8: 49-59. 20
- (22) Barr, F.A., Sillje, H.H., and Nigg, E.A. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:429-440.
- (23) Steegmaier, M. et al. 2007. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol* 17: 316-322.
- (24) Liu, X., and Erikson, R.L. 2003. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5789-5794.
- (25) Spankuch, B., Kurunci-Csacsco, E., Kaufmann, M., and Strebhardt, K. 2007. Rational combinations of siRNAs targeting Plk1 with breast cancer drugs. *Oncogene* 26: 5793-5807. 30
- (26) Zimmermann, T.S. et al. 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111-114.
- (27) de Fougerolles, A., Vornlocher, H.P., Maraganore, J., and Lieberman, J. 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6: 443-453.
- (28) Behlke, M.A. 2006. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther.* 13: 644-670. 40
- (29) Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F., and Aigner, A. 2005. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther.* 12: 461-466.

- (30) Schifflers R.M et al. 2004. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* 32: e149.
- (31) Heidel, J.D. et al. 2007. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5715-5721.
- (32) Santel, A. et al. 2006. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther* 13: 1222-1234. 10
- (33) Mayer, L., Bally, M., Cullis, P., Wilson, S., and Emerman, J. 1990. Comparison of free and liposome encapsulated doxorubicin tumor drug uptake and anti-tumor efficacy in the SC115 murine mammary tumor. *Cancer Letters* 53: 183-190.
- (34) Seymour, L.W. 1992. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 9: 135-187.
- (35) Chono, S., Li, S.D., Conwell, C.C., and Huang, L. 2008. An efficient and low immunostimulatory nanoparticle formulation for systemic siRNA delivery to the tumor. *J Control Release* 131: 64-69. 20
- (36) Peer, D., Park, E.J., Morishita, Y., Carman, C.V., and Shimaoka, M. 2008. Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. *Science* 319: 627-630.
- (37) Robbins, M. et al. 2008. Misinterpreting the therapeutic effects of siRNA caused by immune stimulation. *Hum Gene Ther.* PMID 18713023.
- (38) Weil, D., Garcon, L., Harper, M., Dumenil, D., Dautry, F., and Kress, M. 2002. Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *Biotechniques* 33: 1244-1248. 30
- (39) Soutschek, J. et al. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178.
- (40) Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15: 188-200.
- (41) Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123: 607-620. 40
- (42) Leuschner, P.J., Ameres, S.L., Kueng, S., and Martinez, J. 2006. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 7: 314-320.
- (43) Prakash, T. et al. 2005. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *J. Med. Chem.* 48: 4247-4253.

- (44) Chiu, Y., and Rana, T. 2003. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 9: 1034-1048.
- (45) Yao, X. et al. 2003. A novel orthotopic tumor model to study growth factors and oncogenes in hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 9: 2719-2726.
- (46) Sakowitz, R. et al. 2004. Antitumor activity of kinesin inhibitor. *Cancer Research* 64: 3276-3280.
- (47) Lenart, P. et al. 2007. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* 17: 304-315. 10
- (48) Spankuch-Schmitt, B., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, M., and Strebhardt, K. 2002. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 94: 1863-1877.
- (49) Ambegia, E. et al. 2005. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1669: 155-163. 20
- (50) Heyes, J., Hall, K., Tailor, V., Lenz, R., and MacLachlan, I. 2006. Synthesis and characterisation of novel poly(ethylene glycol)-lipid conjugates suitable for use in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 112: 280-290.
- (51) Krieg, A.M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 709-760.
- (52) Castro, J.E. et al. 2006. Thymidine-phosphorothioate oligonucleotides induce activation and apoptosis of CLL cells independently of CpG motifs or BCL-2 gene interference. *Leukemia* 20: 680-688. 30
- (53) Diebold, S.S. et al. 2006. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol* 36: 3256-3267.
- (54) Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15623-15628.
- (55) Geiss, G. et al. 2001. A comprehensive view of regulation of gene expression by double-stranded RNA-mediated cell signaling. *J Biol Chem* 276: 30178-30182. 40
- (56) Sarkar, S.N., Smith, H.L., Rowe, T.M., and Sen, G.C. 2003. Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 278: 4393-4396.
- (57) Czauderna, F. et al. 2003. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 31: 2705-2716.

(58) Santel, A. et al. 2006. RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther* 13: 1360-1370.

(59) Johnson, E.F., Stewart, K.D., Woods, K.W., Giranda, V.L., and Luo, Y. 2007. Pharmacological and functional comparison of the polo-like kinase family: insight into inhibitor and substrate specificity. *Biochemistry* 46: 9551-9563.

(60) Malumbres, M., and Barbacid, M. 2007. Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17: 60-65. 10

(61) McInnes, C. et al. 2006. Inhibitors of Polo-like kinase reveal roles in spindle-pole maintenance. *Nat Chem Biol* 2: 608-617.

(62) Bartlett, D.W., and Davis, M.E. 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 34: 322-333.

(63) Llovet, J.M., and Bruix, J. 2008. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 48 Suppl 1:S20-37. 20

(64) Schwarz, D.S. et al. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 119-208.

(65) Gilliet, M. et al. 2002. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 195: 953-958.

【 0 4 9 6 】

実施例16. コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテルの合成

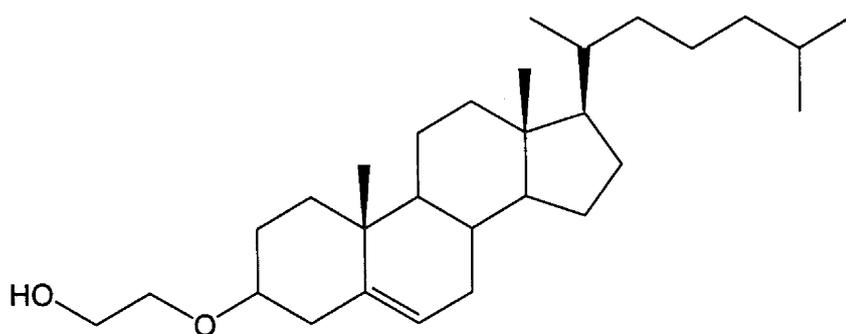
工程1: コレステロール (5.0g、12.9mmol) および攪拌バーを含有している250mlの丸底フラスコを密封し、窒素フラッシングした。トルエンスルホニルクロリド (5.0g、26.2mmol) を別の100mLの丸底フラスコへ計量し、やはり密封し、窒素フラッシングした。無水ピリジン (2×50ml) を各フラスコに送った。次いで、トルエンスルホニルクロリド溶液を、カニユーレを介して、250mlのフラスコへ移し、反応物を一夜攪拌した。ピリジンを回転式エバポレーターによって除去し、メタノール (80ml) を残さへ添加した。次いで、均質の懸濁物が入手されるまで、1時間、これを攪拌した。懸濁物をろ過し、アセトニトリル (50ml) により洗浄し、減圧下で乾燥させ、ふわふわした白色固形物としてコレステリルトシレートを得た (6.0g、86%)。 30

【 0 4 9 7 】

工程2: コレステリルトシレート (2.0g、3.7mmol)、1,4-ジオキサン (50mL)、およびエチレングリコール (4.6g、74mmol) を、攪拌バーを含有している100mlのフラスコに添加した。フラスコに冷却器を取り付け、一夜、還流した。次いで、ジオキサンを回転式エバポレーターによって除去し、反応混合物を水 (100ml) に懸濁させた。溶液を分液漏斗に移し、クロロホルム (3×100ml) により抽出した。有機相を合わせ、水 (2×150ml) により洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を除去した。粗生成物を、カラムクロマトグラフィ (5%アセトン/ヘキサン) によって精製し、白色固形物として生成物を得た (1.1g、69%)。 40

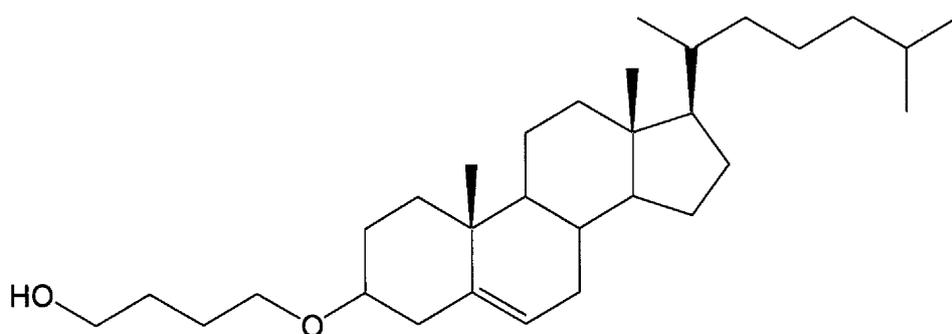
【 0 4 9 8 】

コレステロール誘導体コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテルおよびコレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテルの構造は、以下の通りである： 50



コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテル

10



コレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテル

20

【0499】

実施例17. PLK-1を標的とする例示的なaiRNA分子

表8は、PLK-1発現をモジュレート（例えば、サイレンシング）するのに適しているaiRNA分子の非限定的な例を提供する。aiRNA分子の第一のセットはPLK1424 siRNAアンチセンス鎖配列（SEQ ID NO:2）を含む。aiRNA分子の第二のセットはPLK773 siRNAアンチセンス鎖配列（SEQ ID NO:4）を含む。

30

【0500】

5'アンチセンス突出は、1個、2個、3個、4個、またはそれ以上の非ターゲティングヌクレオチド（例えば、「AA」、「UU」、「dTdT」等）を含有していてもよい。好ましくは、5'アンチセンス突出は、2個の非ターゲティングヌクレオチドを含有している。3'アンチセンス突出は、1個、2個、3個、4個、またはそれ以上の非ターゲティングヌクレオチドを含有していてもよい。aiRNA分子は、一つまたは複数の修飾ヌクレオチドを、例えば、二本鎖（二重鎖）領域および/またはアンチセンス突出に、含んでいてもよい。修飾ヌクレオチドの例は、本明細書に記載されており、2'-O-メチル（2'OMe）ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'F）ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル）（MOE）ヌクレオチド、およびロックド核酸（LNA）ヌクレオチドを含む。aiRNA分子は、本明細書に記載された担体系のうちの一つ（例えば、核酸粒子）をさらに含んでいてもよく、肝臓癌（例えば、肝細胞癌）のような癌の処置における利用可能性を有する。

40

【0501】

（表8）センスおよびアンチセンスのPLK-1 RNAポリヌクレオチドを含むaiRNA二重鎖

| aiRNA             | PLK-1 aiRNA配列   |                                  |
|-------------------|---|----------------------------------|
| PLK1424 (12 bp/1) | 5' -CCCUCCUAAAAU-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'      | (SEQ ID NO:287)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (12 bp/2) | 5' -ACCCUCCUAAAA-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'      | (SEQ ID NO:288)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (12 bp/3) | 5' -CACCCUCCUAAA-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'      | (SEQ ID NO:289)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (13 bp/1) | 5' -ACCCUCCUAAAAU-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'     | (SEQ ID NO:290)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (13 bp/2) | 5' -CACCCUCCUAAAA-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'     | (SEQ ID NO:291)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (13 bp/3) | 5' -UCACCCUCCUAAA-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'     | (SEQ ID NO:292)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (14 bp/1) | 5' -CACCCUCCUAAAAU-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'    | (SEQ ID NO:293)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (14 bp/2) | 5' -UCACCCUCCUAAA-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'     | (SEQ ID NO:294)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (14 bp/3) | 5' -AUCACCCUCCUAAA-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'    | (SEQ ID NO:295)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (15 bp/1) | 5' -UCACCCUCCUAAAAU-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'   | (SEQ ID NO:296)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (15 bp/2) | 5' -AUCACCCUCCUAAAA-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'   | (SEQ ID NO:297)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (15 bp/3) | 5' -GAUCACCCUCCUAAA-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'   | (SEQ ID NO:298)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (16 bp/1) | 5' -AUCACCCUCCUAAAAU-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'  | (SEQ ID NO:299)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (16 bp/2) | 5' -GAUCACCCUCCUAAAA-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'  | (SEQ ID NO:300)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK1424 (17 bp)   | 5' -GAUCACCCUCCUAAAAU-3'<br>3' -UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5' | (SEQ ID NO:301)<br>(SEQ ID NO:2) |
| PLK773 (12 bp/1)  | 5' -ACCUCCGGAUCA-3'<br>3' -UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'       | (SEQ ID NO:302)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (12 bp/2)  | 5' -UACCUCCGGAUC-3'<br>3' -UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'       | (SEQ ID NO:303)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (12 bp/3)  | 5' -CUACCUCCGGAU-3'<br>3' -UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'       | (SEQ ID NO:304)<br>(SEQ ID NO:4) |

10

20

30

|                  |  |                                  |
|------------------|--|----------------------------------|
| PLK773 (13 bp/1) | 5'-UACCUCCGGAUCA-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'     | (SEQ ID NO:305)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (13 bp/2) | 5'-CUACCUCCGGAUC-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'     | (SEQ ID NO:306)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (13 bp/3) | 5'-CCUACCUCCGGAU-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'     | (SEQ ID NO:307)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (14 bp/1) | 5'-CUACCUCCGGAUCA-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'    | (SEQ ID NO:308)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (14 bp/2) | 5'-CCUACCUCCGGAUC-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'    | (SEQ ID NO:309)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (14 bp/3) | 5'-ACCUACCUCCGGAU-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'    | (SEQ ID NO:310)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (15 bp/1) | 5'-CCUACCUCCGGAUCA-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'   | (SEQ ID NO:311)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (15 bp/2) | 5'-ACCUACCUCCGGAUC-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'   | (SEQ ID NO:312)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (15 bp/3) | 5'-GACCUACCUCCGGAU-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'   | (SEQ ID NO:313)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (16 bp/1) | 5'-ACCUACCUCCGGAUCA-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'  | (SEQ ID NO:314)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (16 bp/2) | 5'-GACCUACCUCCGGAUC-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'  | (SEQ ID NO:315)<br>(SEQ ID NO:4) |
| PLK773 (17 bp)   | 5'-GACCUACCUCCGGAUCA-3'<br>3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5' | (SEQ ID NO:316)<br>(SEQ ID NO:4) |

10

20

## 【 0 5 0 2 】

実施例18.PLK-1を標的とする例示的なmiRNA分子

表9は、PLK-1発現をモジュレート（例えば、サイレンシング）するのに適しているmiRNA分子の非限定的な例を提供する。本明細書に記載されたmiRNA分子は、1個または複数個の修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。修飾ヌクレオチドの例は、本明細書に記載されており、2'-O-メチル（2'OMe）ヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'F）ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)（MOE）ヌクレオチド、およびロックド核酸（LNA）ヌクレオチドを含む。miRNA配列の5'末および/または3'末は、1個、2個、3個、4個、またはそれ以上の非ターゲットングヌクレオチドを含有していてもよい。ある種の例において、表9に示されたmiRNA配列のうちの一つの断片が、PLK-1発現をモジュレート（例えば、サイレンシング）するために使用されてもよい。ある種の他の例において、表9に示されたmiRNA分子のうちの一つまたは複数と、それらの標的PLK-1 mRNA配列との間の相互作用を阻止する薬剤が、PLK-1発現をモジュレート（例えば、サイレンシング）するために使用されてもよい。miRNA分子またはそれらの阻止剤は、本明細書に記載された担体系のうちの一つ（例えば、核酸粒子）をさらに含んでいてもよく、肝細胞癌のような癌の処置における利用可能性を有する。

30

40

## 【 0 5 0 3 】

表9にリストされた成熟miRNA配列のいずれかに対応する未修飾pre-miRNA配列または修飾pre-miRNA配列も、本発明において使用するため、例えば、PLK-1発現をモジュレート（例えば、サイレンシング）するのに適している。pre-miRNA配列は、本明細書に記載された担体系のうちの一つ（例えば、核酸粒子）をさらに含んでいてもよく、肝臓癌（例えば肝細胞癌）のような癌の処置における利用可能性を有する。

## 【 0 5 0 4 】

（表9）ヒトPLK-1発現を標的とするmiRNA配列

| 成熟miRNA<br>の名称   | 成熟miRNAの<br>アクセッション番号 | 成熟miRNAの配列 (5' → 3')      | 成熟miRNAの<br>SEQ ID NO: | pre-miRNAの<br>アクセッション番号 |
|------------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|
| hsa-miR-509-3-5p | MIMAT0004975          | UACUGCAGACGUGGCAAUCAUG    | 317                    | MI0005717               |
| mmu-miR-705      | MIMAT0003495          | GGUGGGAGGUGGGGUGGGCA      | 318                    | MI0004689               |
| hsa-miR-509-5p   | MIMAT0004779          | UACUGCAGACAGUGGCAAUCA     | 319                    | MI0003196               |
| hsa-miR-505*     | MIMAT0004776          | GGGAGCCAGGAAGUAUUGAUGU    | 320                    | MI0003190               |
| mmu-miR-762      | MIMAT0003892          | GGGGCUGGGCCGGGACAGAGC     | 321                    | MI0004215               |
| hsa-miR-149*     | MIMAT0004609          | AGGGAGGGACGGGGCUGUGC      | 322                    | MI0000478               |
| hsa-miR-183      | MIMAT0000261          | UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU    | 323                    | MI0000273               |
| hsa-miR-9*       | MIMAT0000442          | AUAAAAGCUAGAUAACCGAAAGU   | 324                    | MI0000466               |
| mmu-miR-673-3p   | MIMAT0004824          | UCCGGGGCUGAGUUCUGUGCACC   | 325                    | MI0004601               |
| hsa-miR-630      | MIMAT0003299          | AGUAUUCUGUACCAGGGAAGGU    | 326                    | MI0003644               |
| hsa-miR-491-3p   | MIMAT0004765          | CUUAUGCAAGAUCCCUUCUAC     | 327                    | MI0003126               |
| hsa-miR-559      | MIMAT0003223          | UAAAGUAAAUAUGCACCAAAA     | 328                    | MI0003565               |
| hsa-miR-593*     | MIMAT0003261          | AGGCACCAGCCAGGCAUUGCUCAGC | 329                    | MI0003605               |
| mmu-miR-327      | MIMAT0004867          | ACUUGAGGGGCAUGAGGAU       | 330                    | MI0005493               |
| hsa-let-7f-2*    | MIMAT0004487          | CUAUACAGUCUACUGUCUUUCC    | 331                    | MI0000068               |
| hsa-miR-100      | MIMAT0000098          | AACCCGAGAACCGAACUUGUG     | 332                    | MI0000102               |
| hsa-miR-767-3p   | MIMAT0003883          | UCUGCUCAUACCCCAUGGUUUCU   | 333                    | MI0003763               |
| hsa-miR-532-3p   | MIMAT0004780          | CCUCCACACCCAAGGCUUGCA     | 334                    | MI0003205               |
| hsa-miR-106b*    | MIMAT0004672          | CCGCACUGUGGUACUUGCUGC     | 335                    | MI0000734               |
| hsa-miR-568      | MIMAT0003232          | AUGUAUAAAUGUAUACACAC      | 336                    | MI0003574               |
| hsa-miR-652      | MIMAT0003322          | AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG     | 337                    | MI0003667               |
| hsa-let-7e*      | MIMAT0004485          | CUAUACGGCCUCCUAGCUUUC     | 338                    | MI0000066               |
| hsa-miR-340      | MIMAT0004692          | UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU    | 339                    | MI0000802               |
| hsa-miR-198      | MIMAT0000228          | GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC    | 340                    | MI0000240               |
| hsa-miR-548b-5p  | MIMAT0004798          | AAAAGUAUUGUGGUUUUGGCC     | 341                    | MI0003596               |
| hsa-miR-452*     | MIMAT0001636          | CUCAUCUGCAAAGAAGUAAGUG    | 342                    | MI0001733               |
| hsa-miR-148b*    | MIMAT0004699          | AAGUUCUGUAUACACUCAGGC     | 343                    | MI0000811               |
| hsa-let-7g*      | MIMAT0004584          | CUGUACAGGCCACUGCCUUGC     | 344                    | MI0000433               |
| hsa-miR-488      | MIMAT0004763          | UUGAAAGGCUAUUUCUUGGUC     | 345                    | MI0003123               |
| mmu-miR-693-5p   | MIMAT0003472          | CAGCCACAUCCGAAAGUUUUC     | 346                    | MI0004662               |
| hsa-miR-136      | MIMAT0000448          | ACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGGA   | 347                    | MI0000475               |
| hsa-miR-744      | MIMAT0004945          | UGCGGGGCUAGGGCUAACAGCA    | 348                    | MI0005559               |
| hsa-miR-324-3p   | MIMAT0000762          | ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG      | 349                    | MI0000813               |
| hsa-miR-320      | MIMAT0000510          | AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA    | 350                    | MI0000542               |
| hsa-miR-99a      | MIMAT0000097          | AACCCGUAAGUCCGAUCUUGUG    | 351                    | MI0000101               |
| hsa-miR-590-5p   | MIMAT0003258          | GAGCUUAUUCUAUAAAAGUGCAG   | 352                    | MI0003602               |
| hsa-miR-622      | MIMAT0003291          | ACAGUCUGCUGAGGUUGGAGC     | 353                    | MI0003636               |
| hsa-miR-151-5p   | MIMAT0004697          | UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU     | 354                    | MI0000809               |
| hsa-miR-142-5p   | MIMAT0000433          | CAUAAAGUAGAAAGCACUACU     | 355                    | MI0000458               |
| hsa-miR-648      | MIMAT0003318          | AAGUGUGCAGGGCACUGGU       | 356                    | MI0003663               |
| hsa-miR-643      | MIMAT0003313          | ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAG    | 357                    | MI0003658               |
| hsa-miR-19a*     | MIMAT0004490          | AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA    | 358                    | MI0000073               |
| hsa-miR-516b     | MIMAT0002859          | AUCUGGAGGUAAGAAGCACUUU    | 359                    | MI0003172               |
| hsa-miR-296-5p   | MIMAT0000690          | AGGGCCCCCUCAAUCCUGU       | 360                    | MI0000747               |
| hsa-miR-619      | MIMAT0003288          | GACCUGGACAUGUUUGGCCAGU    | 361                    | MI0003633               |
| mmu-miR-742      | MIMAT0004237          | GAAAGCCACCAUGCUGGGUAAA    | 362                    | MI0005206               |
| hsa-miR-147b     | MIMAT0004928          | GUGUGCGAAAUGCUUCUGCUA     | 363                    | MI0005544               |
| mmu-miR-466h     | MIMAT0004884          | UGUGUGCAUGUGCUUGUGUGUA    | 364                    | MI0005511               |

10

20

30

|                 |              |                         |     |           |
|-----------------|--------------|-------------------------|-----|-----------|
| mmu-miR-700     | MIMAT0003490 | CACGCGGGAACCGAGUCCACC   | 365 | MI0004684 |
| hsa-miR-941     | MIMAT0004984 | CACCCGGCUGUGGACAUGUGC   | 366 | MI0005763 |
| hsa-miR-21      | MIMAT0000076 | UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA  | 367 | MI0000077 |
| mmu-miR-666-5p  | MIMAT0003737 | AGCGGGCACAGCUGUGAGAGCC  | 368 | MI0004553 |
| hsa-miR-17*     | MIMAT0000071 | ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG  | 369 | MI0000071 |
| hsa-miR-188-3p  | MIMAT0004613 | CUCCCAUGCAGGGUUUGCA     | 370 | MI0000484 |
| hsa-miR-520d-5p | MIMAT0002855 | CUACAAAGGGGAAGCCUUUC    | 371 | MI0003164 |
| hsa-miR-19a     | MIMAT0000073 | UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA   | 372 | MI0000073 |
| hsa-miR-153     | MIMAT0000439 | UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC  | 373 | MI0000463 |
| hsa-miR-554     | MIMAT0003217 | GCUAGUCCUGACUCAGCCAGU   | 374 | MI0003559 |
| hsa-miR-610     | MIMAT0003278 | UGAGCUAAAUGUGUGUGGGA    | 375 | MI0003623 |
| hsa-miR-454     | MIMAT0003885 | UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU | 376 | MI0003820 |
| hsa-miR-10b*    | MIMAT0004556 | ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAAU  | 377 | MI0000267 |
| hsa-miR-654-5p  | MIMAT0003330 | UGGUGGGCCGCAGAACAUGUGC  | 378 | MI0003676 |
| mmu-miR-466f-5p | MIMAT0004881 | UACGUGUGUGUGCAUGUGCAUG  | 379 | MI0005507 |
| hsa-miR-210     | MIMAT0000267 | CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA  | 380 | MI0000286 |
| hsa-miR-603     | MIMAT0003271 | CACACACUGCAAUUACUUUUGC  | 381 | MI0003616 |
| hsa-miR-216b    | MIMAT0004959 | AAAUCUCUGCAGGCAAAUGUGA  | 382 | MI0005569 |
| mmu-miR-704     | MIMAT0003494 | AGACAUGUGCUCUGCUCCUAG   | 383 | MI0004688 |
| hsa-miR-331-5p  | MIMAT0004700 | CUAGGUAUGGUCUCCAGGGAUCC | 384 | MI0000812 |
| mmu-miR-434-3p  | MIMAT0001422 | UUUGAACCAUCACUCGACUCCU  | 385 | MI0001526 |
| hsa-miR-589     | MIMAT0004799 | UGAGAACCACGUCUGCUCUGAG  | 386 | MI0003599 |
| hsa-miR-548b-3p | MIMAT0003254 | CAAGAACCUCAGUUGCUUUUGU  | 387 | MI0003596 |
| hsa-miR-10a*    | MIMAT0004555 | CAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA   | 388 | MI0000266 |
| hsa-miR-604     | MIMAT0003272 | AGGCUGCGAAUUCAGGAC      | 389 | MI0003617 |
| hsa-miR-485-3p  | MIMAT0002176 | GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU  | 390 | MI0002469 |
| mmu-miR-883b-3p | MIMAT0004851 | UACUGCAACAUCUCUCAGUAU   | 391 | MI0005477 |
| hsa-miR-329     | MIMAT0001629 | AACACACCUGGUAAACCUCUUU  | 392 | MI0001725 |
| hsa-miR-585     | MIMAT0003250 | UGGGCGUAUCUGUAUGCUA     | 393 | MI0003592 |
| hsa-miR-551b    | MIMAT0003233 | GCGACCAUACUUGGUUUCAG    | 394 | MI0003575 |
| hsa-miR-886-3p  | MIMAT0004906 | CGCGGGUGCUUACUGACCCUU   | 395 | MI0005527 |
| mmu-miR-714     | MIMAT0003505 | CGACGAGGCGCGUCGUCGCGC   | 396 | MI0004699 |
| mmu-miR-293     | MIMAT0000371 | AGUGCCGCAGAGUUUGUAGUGU  | 397 | MI0000391 |
| hsa-miR-95      | MIMAT0000094 | UUCAACGGUAUUUAUUGAGCA   | 398 | MI0000097 |
| hsa-miR-99b     | MIMAT0000689 | CACCCGUAAGAACCACCUUGCG  | 399 | MI0000746 |

成熟miRNA配列およびpre-miRNA配列に関するアクセッション番号は、Sanger InstituteのmiRBase Sequence Databaseに見出され得るエントリーに相当する。miRBase Sequence Databaseは、公開されたmiRNA配列およびアノテーションの検索可能データベースである。

【 0 5 0 5 】

実施例19. 付加的な修飾PLK-1 siRNAは非免疫刺激性でありかつ癌細胞の成長を阻害する siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖の選択的な位置に2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチドを含有しているPLK-1 siRNA分子を、SNALPとして製剤化し、インビトロの細胞成長に対する阻害効果に関して評価した。修飾PLK-1 siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列は、表10に示される。表10の配列から作製された例示的な二本鎖修飾PLK-1 siRNA分子は、表11に示される。

【 0 5 0 6 】

(表10) 修飾PLK-1 siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列

| siRNA     | 5' → 3' 配列  | 鎖      | SEQ ID NO: |
|-----------|---|--------|------------|
| PLK1424-1 | AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU | センス    | 214        |
| PLK1424-2 | AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU | センス    | 400        |
| PLK1424-3 | UAUUUAAGGAGGGUGA <u>U</u> CUUU                            | アンチセンス | 215        |
| PLK1424-4 | UAUUUAAGGAGGGUGA <u>U</u> CUUC                            | アンチセンス | 401        |
| PLK1424-5 | UAUUUAAGGAGGGUGA <u>U</u> CU <u>U</u> C                   | アンチセンス | 402        |
| PLK1424-6 | UAUUUAAGGAGGGUGA <u>U</u> CU <u>U</u> C                   | アンチセンス | 403        |
| PLK1424-7 | UAUUUAAGGAGGGUGA <u>U</u> CUUU                            | アンチセンス | 216        |
| PLK1424-8 | UAUUUAAGGAGGGUGA <u>U</u> CUUU                            | アンチセンス | 404        |
| PLK773-1  | AGACCUACCUC <u>C</u> GGAUCAAUU                            | センス    | 220        |
| PLK773-2  | AGACCUACCUC <u>C</u> GGAUCAAGA                            | センス    | 405        |
| PLK773-3  | UUGAUCCG <u>G</u> AG <u>G</u> UAGG <u>U</u> CUUU          | アンチセンス | 223        |
| PLK773-4  | UUGAUCCG <u>G</u> AG <u>G</u> UAGG <u>U</u> CUCU          | アンチセンス | 406        |
| PLK773-5  | UUGA <u>U</u> CCG <u>G</u> AG <u>G</u> UAGG <u>U</u> CUCU | アンチセンス | 407        |

10

カラム1: 「PLK」の後の数字は、ヒトPLK-1 mRNA配列NM\_005030の開始コドン(ATG)に対するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位をさす。

カラム2: 2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチドは、太字および下線で示される。siRNAは、代替的にまたは付加的に、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、および/またはロックド核酸(LNA)ヌクレオチドを含んでいてもよい。

20

【0507】

(表11) 修飾されたセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列を含むPLK-1 siRNA分子

| siRNA       | PLK-1 siRNA 配列   | 2' OMe修飾 (%)  | DS領域内の修飾 (%) |
|-------------|--|---------------|--------------|
| PLK1424 1/3 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:214)<br>3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:215) | 6/42 = 14.3%  | 6/38 = 15.8% |
| PLK1424 1/4 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:214)<br>3'-CUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:401) | 6/42 = 14.3%  | 6/38 = 15.8% |
| PLK1424 1/5 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:214)<br>3'-CUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:402) | 7/42 = 16.7%  | 6/38 = 15.8% |
| PLK1424 1/6 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:214)<br>3'-CUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:403) | 8/42 = 19%    | 7/38 = 18.4% |
| PLK1424 1/7 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:214)<br>3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:216) | 7/42 = 16.7%  | 7/38 = 18.4% |
| PLK1424 1/8 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:214)<br>3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:404) | 9/42 = 21.4%  | 9/38 = 23.7% |
| PLK1424 2/3 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:400)<br>3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:215) | 7/42 = 16.7%  | 6/38 = 15.8% |
| PLK1424 2/4 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:400)<br>3'-CUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:401) | 7/42 = 16.7%  | 6/38 = 15.8% |
| PLK1424 2/5 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:400)<br>3'-CUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:402) | 8/42 = 19%    | 6/38 = 15.8% |
| PLK1424 2/6 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:400)<br>3'-CUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:403) | 9/42 = 21.4%  | 7/38 = 18.4% |
| PLK1424 2/7 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:400)<br>3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:216) | 8/42 = 19%    | 7/38 = 18.4% |
| PLK1424 2/8 | 5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AUU-3' (SEQ ID NO:400)<br>3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU <u>U</u> -5' (SEQ ID NO:404) | 10/42 = 23.8% | 9/38 = 23.7% |

30

40

50

カラム1: 「PLK」の後の数字は、ヒトPLK-1 mRNA配列NM\_005030の開始コドン(ATG)に対するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位をさす。

カラム2: 2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチドは、太字および下線で示される。siRNA二重鎖は、代替的にまたは付加的に、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ヌクレオチド、および/またはロックド核酸(LNA)ヌクレオチドを含んでいてもよい。

カラム3: siRNA分子内の2'OMe修飾ヌクレオチドの数および割合が提供される。

カラム4: siRNA分子の二本鎖(DS)領域内の修飾ヌクレオチドの数および割合が提供される。

#### 【0508】

細胞生存性アッセイ。インビトロPLK-1 siRNA活性アッセイのため、HT29細胞を、SNALP製剤化PLK-1 siRNAの存在下で96穴プレートにおいて培養した。ある範囲のPLK-1 SNALP投薬量によるトランスフェクションの72時間後、細胞生存性分析を実施した。図40は、PLK1424 siRNA配列における異なる化学的修飾パターンがよく耐容され、修飾siRNA分子が、ヒト腫瘍細胞を死滅させる強力な活性を保持していたことを示す。

#### 【0509】

インビボ免疫刺激アッセイ。2'OMe修飾PLK1424 siRNAを含有しているSNALPの免疫刺激活性に関して試験するため、動物研究を実施した。6週齢雌CD1 ICRマウスを、この研究において使用した。PBSに再懸濁したSNALP製剤化siRNAを、外側尾静脈への標準的な静脈内注射を介してマウスへ投与し、次いで、SNALP投与の4時間後に屠殺した。処理計画の耐容性を、動物の外観および挙動によってモニタリングした。心臓穿刺によって血液を収集し、ELISAによるIFN- $\gamma$  およびIL-6のタンパク質レベルのサイトカイン分析のため、血漿として加工した。同動物に由来する肝臓および脾臓を、bDNA(QG)アッセイによるIFIT1 mRNA分析のため、RNALater(Sigma Co.)へ収集した。

被験物

| 群 | 被験物                             | siRNA        | n | ロット          | siRNA<br>用量 | 処理日 | 終点 | データ&試料収集  |
|---|---------------------------------|--------------|---|--------------|-------------|-----|----|---|
| A | PBS                             | N/A          | 4 |              | N/A         |     |    | 投薬時の体重  |
| B | 1:57 PEG-cDMA<br>(28mM)<br>pH負荷 | PLK1424 1/3  | 4 | 390-062608-1 | 3<br>mg/kg  | 0日目 | 4h | 注射の4時間後の<br>最終血漿<br><br>肝左葉外側区域の<br>半分をRNALaterへ<br>全脾臓をRNALater<br>へ |
| C |                                 | PLK1424 2/3  | 4 | 390-062608-2 |             |     |    |   |
| D |                                 | PLK1424 2/4  | 4 | 390-062608-3 |             |     |    |   |
| E |                                 | PLK1424 2/5  | 4 | 390-062608-4 |             |     |    |   |
| F |                                 | PLK1424 2/6  | 4 | 390-062608-5 |             |     |    |   |
| G |                                 | BimA mod 2/3 | 4 | 390-062608-7 |             |     |    |   |
| H |                                 | 空            | 4 | 390-062608-8 |             |     |    |   |

#### 【0510】

図41は、修飾PLK1424 siRNAが、「PBS」および「空」の陰性対照より大きいIFN- $\gamma$  応答を誘導しなかったことを示す。BimA siRNA陽性対照のみが、検出レベルを超える血漿中IFN- $\gamma$  タンパク質を誘導した(15.6pg/ml)。図42は、PLK1424 1/3 siRNA、PLK1424 2/3 siRNA、PLK1424 2/4 siRNA、およびPLK1424 2/6 siRNAにより、空SNALPのものを超える有意なIFIT1誘導が存在しなかったことを示す。IFIT1 QG分析は、軽度の免疫刺激を解明するため、免疫原性の測定に関してIFN- $\gamma$  ELISAより高感度であった。

#### 【0511】

皮下腫瘍モデル。スキッド/ベージュマウスにおいて、左後側腹部への腫瘍細胞の皮下注射によって、Hep3B腫瘍を確立した。次いで、PLK1424 siRNA SNALP製剤を、3mg/kgの一回用量として静脈内注射によって投与した。PLK-1 mRNAノックダウンの程度を、SNALP投与の約24時間後に、Hep3B腫瘍において決定した。図43は、試験された全てのPLK1424 siRNAが、等価なレベルのPLK-1 mRNAサイレンシングをインビボで起こしたことを示す。

#### 【0512】

インビボPEG-脂質抗体誘導アッセイ。脂質コンジュゲートPEG-cDMAを含有している1:57

10

20

30

40

50

SNALP製剤に封入された2'OMe修飾PLK1424 siRNAに対する抗体応答の誘導に関して試験するため、動物研究を実施した。6週齢雌CD1 ICRマウスをこの研究において使用した。0日目、7日目、および14日目に、外側尾静脈への標準的な静脈内注射を介して、PBSに再懸濁したSNALP製剤化siRNAをマウスへ投与した。次いで、21日目にマウスを屠殺した。処理計画の耐容性を、動物の外観、挙動、および体重によってモニタリングした。7日目、14日目、および21日目、血漿中の抗PEG-脂質IgG抗体およびIgM抗体を、ELISAによって測定した。

【0513】

PLK1424 1/3 siRNAを含有しているSNALPは、対応する未修飾PLK1424 siRNA配列を含有しているSNALPより実質的に低免疫原性であった。特に、PLK1424 1/3 SNALPは、PEG-脂質コンジュゲートPEG-cDMAに対するIgG抗体またはIgM抗体の応答を生じる、有意に低い可能性を有していた。さらに、PLK1424 2/3 siRNA、PLK1424 2/4 siRNA、またはPLK1424 2/6 siRNAのいずれかを含有しているSNALPは、PEG-脂質に対する検出可能な抗体応答をほぼ全く生じなかった。実際、PLK1424 2/6 SNALPは、一貫して、試験された全てのPLK-1 siRNA配列の中で最低のPEG-cDMAに対する抗体応答を有していた。そのため、本発明は、未修飾siRNA配列の免疫原特性を実質的に低下させるかまたは抑止するためにPLK-1 siRNA配列を設計し最適化する方法を提供する。

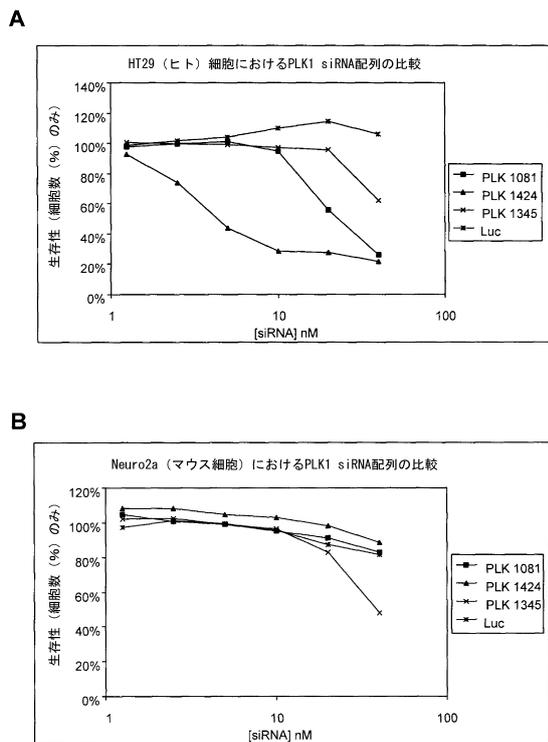
10

【0514】

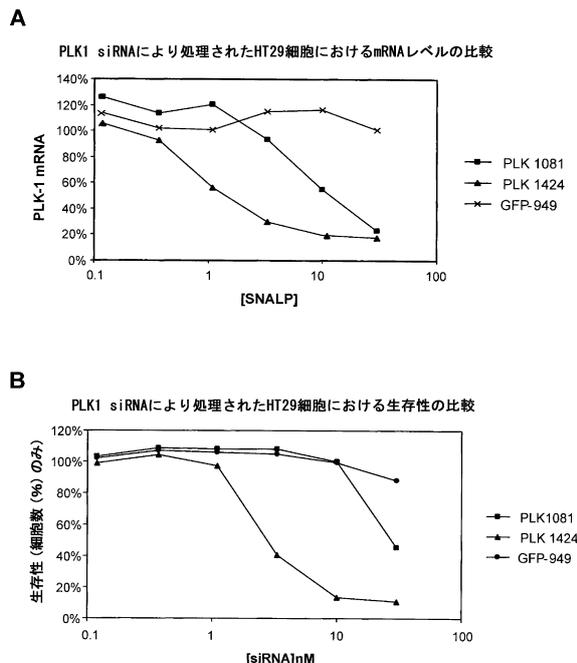
上記の説明は、例示的なものであって、限定的なものではないことが理解されるべきである。上記の説明を参照することにより、当業者には、多くの態様が明白になるであろう。従って、本発明の範囲は、上記の説明を参照して決定されるべきでなく、その代わり、特許請求の範囲が権利を有する等価物の完全な範囲と共に、添付の特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。特許出願、特許、PCT公開、およびGenbankアクセッション番号を含む、全ての文書および参照の開示が、全ての目的のため、参照によって本明細書に組み入れられる。

20

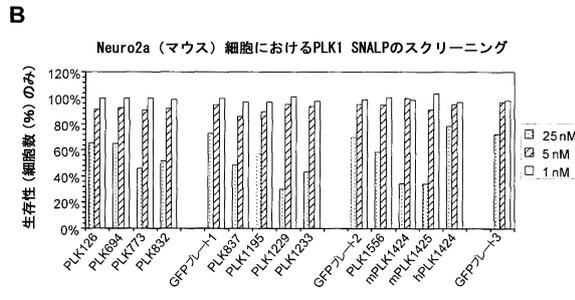
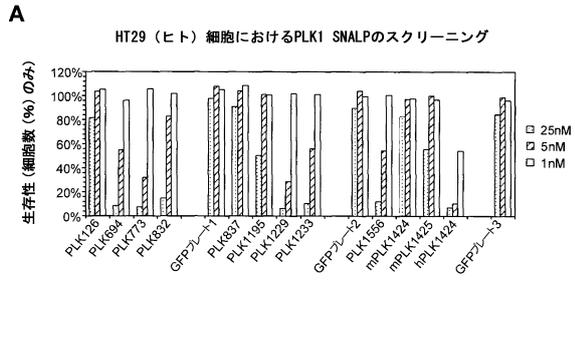
【図1】



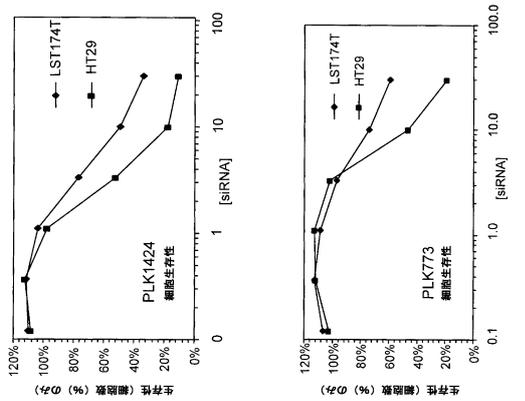
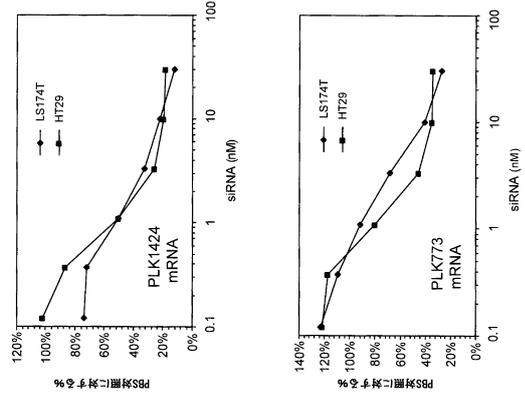
【図2】



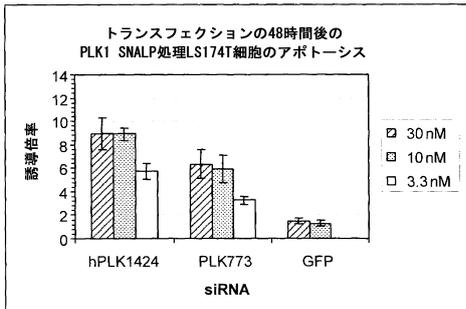
【図3】



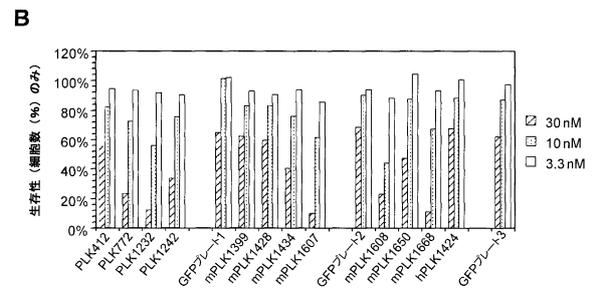
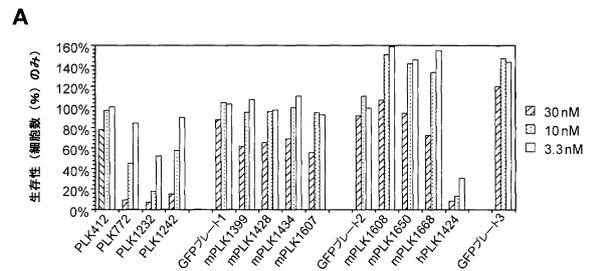
【図4】



【図5】



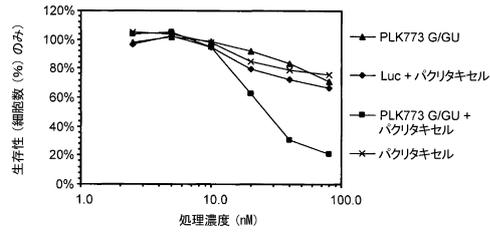
【図6】



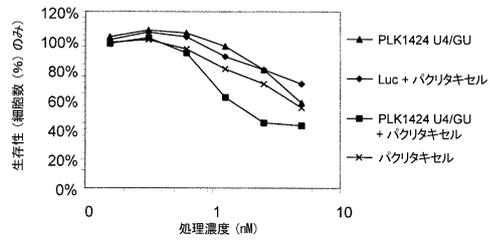


【図 1 1】

逐次のPLK773 SNALPおよびバクリタキセルの後のNeuro2Aの生存性

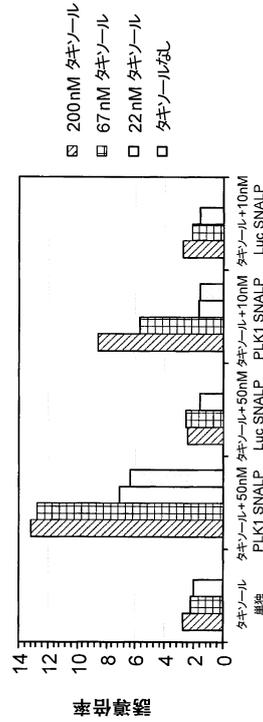


逐次のPLK1424 SNALPおよびバクリタキセルの後のHepG2の生存性

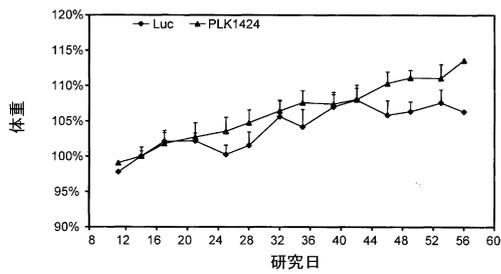


【図 1 2】

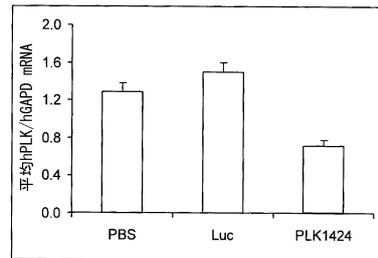
Neuro2A細胞におけるタキソールと組み合わせたPLK-1 SNALPによるアポトーシス誘導



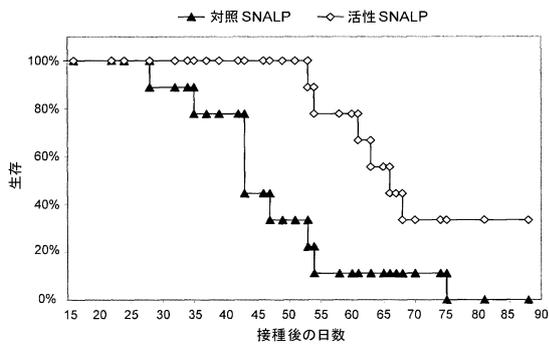
【図 1 3】



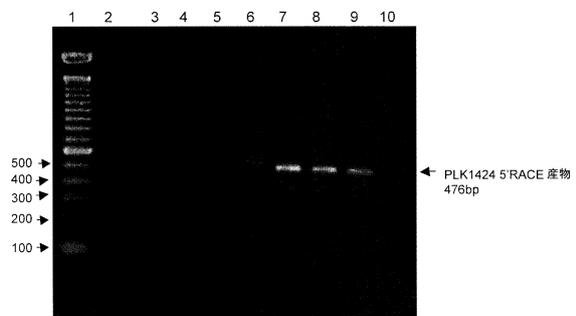
【図 1 5】



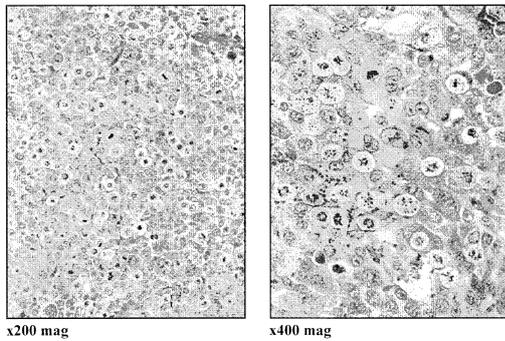
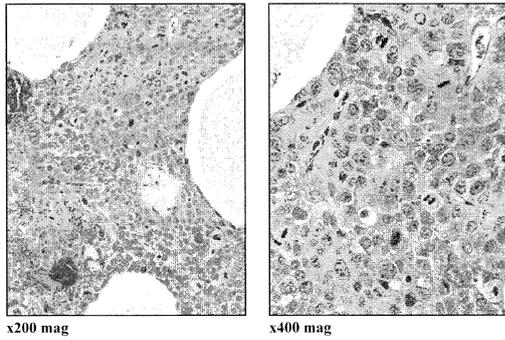
【図 1 4】



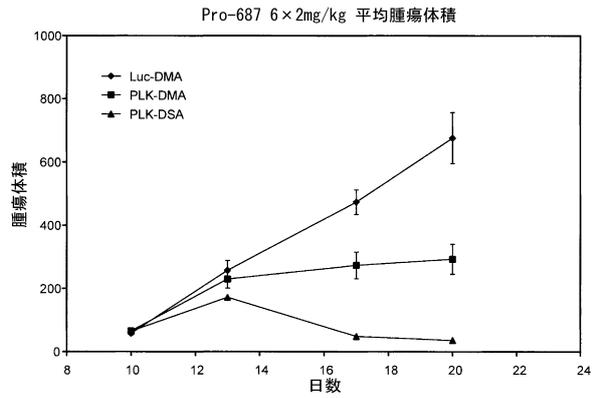
【図 1 6】



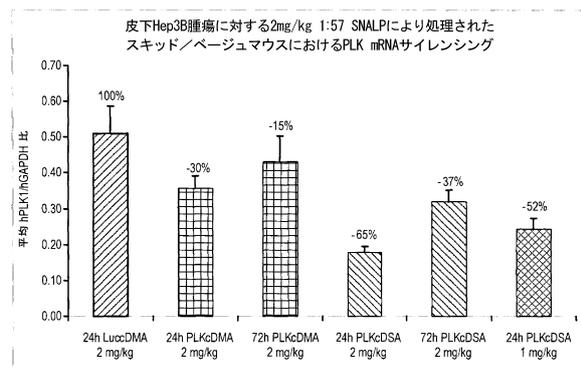
【 図 17 】



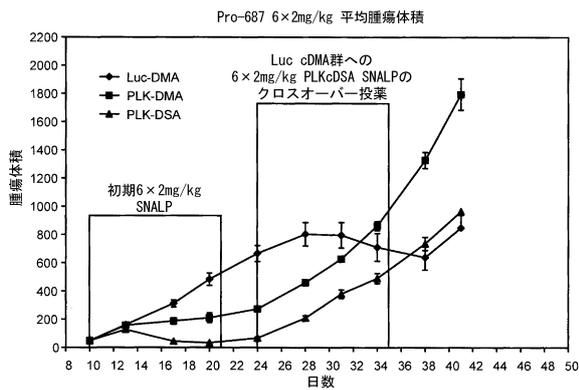
【 図 18 】



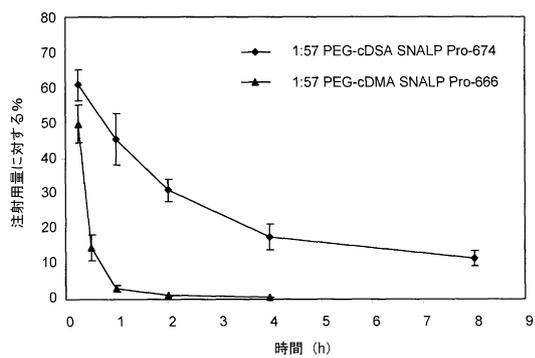
【 図 19 】



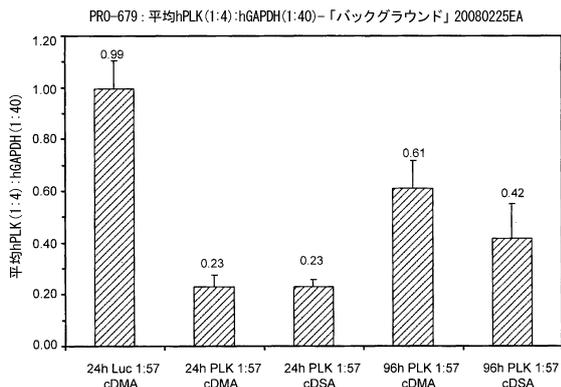
【 図 20 】



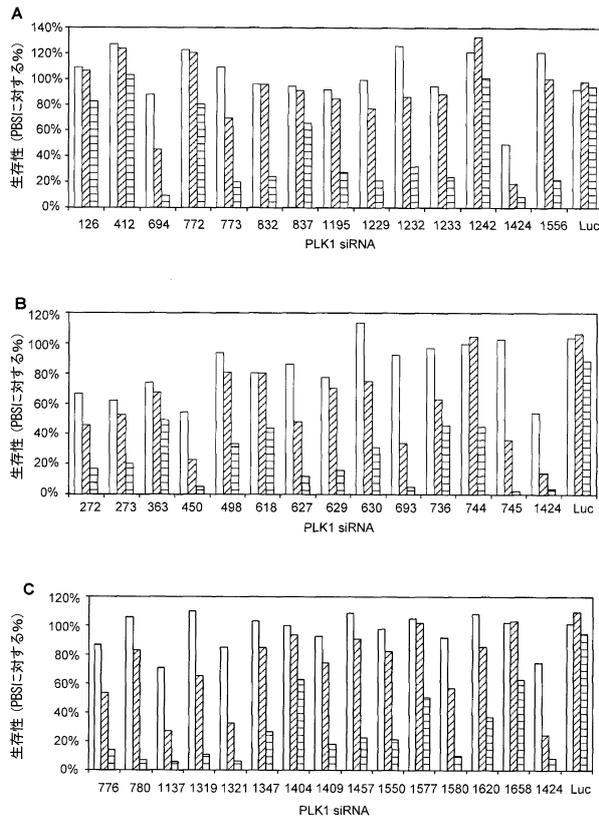
【 図 22 】



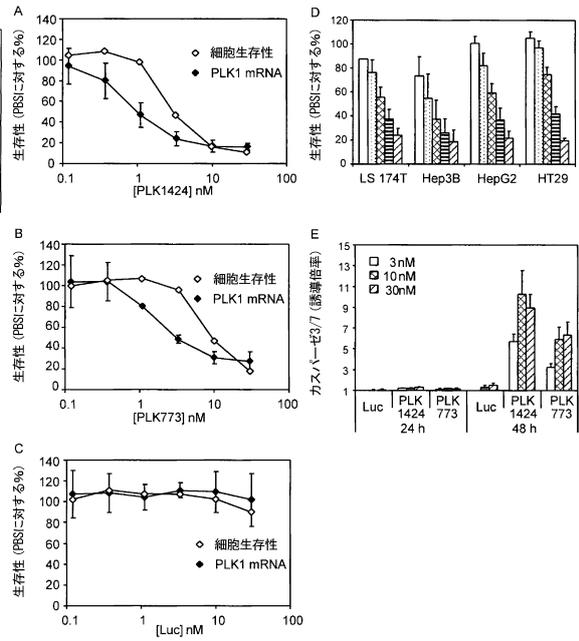
【 図 21 】



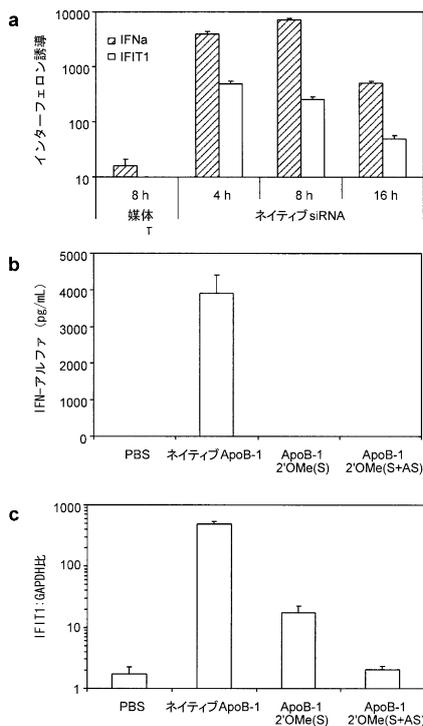
【 2 3 】



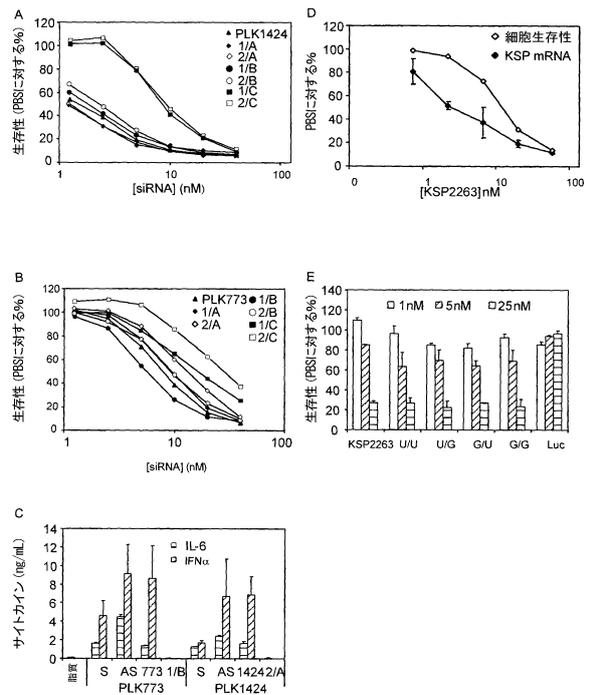
【 2 4 】



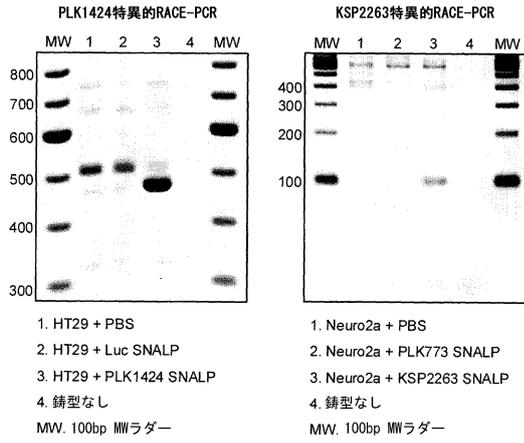
【 2 5 】



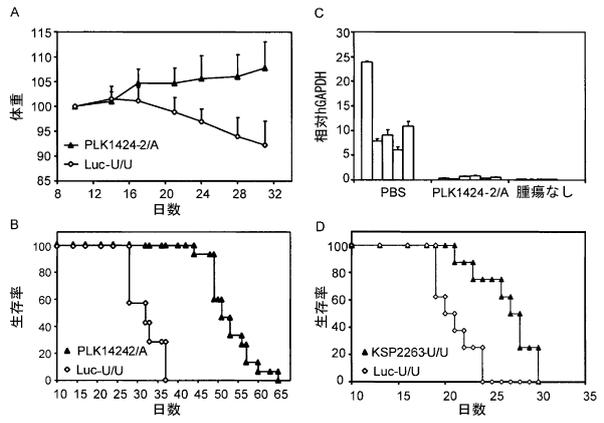
【 2 6 】



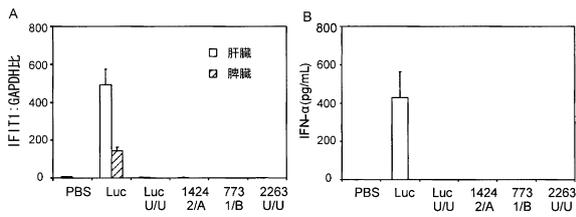
【図 27】



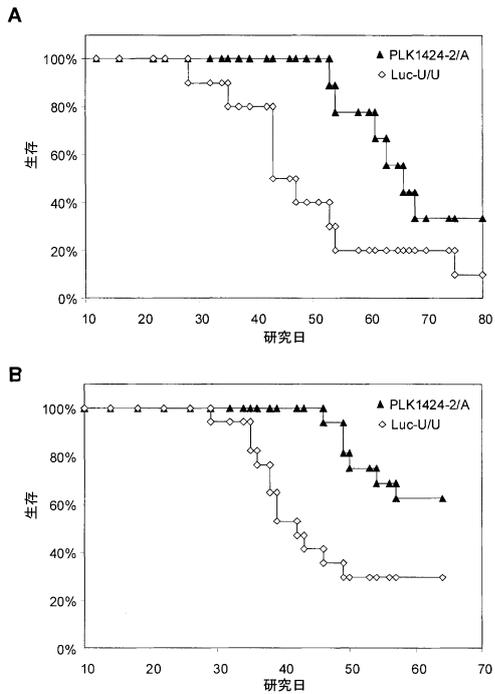
【図 29】



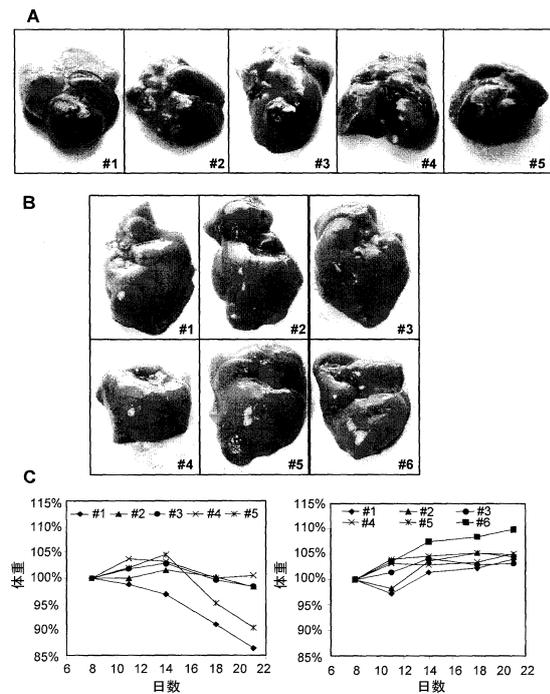
【図 28】



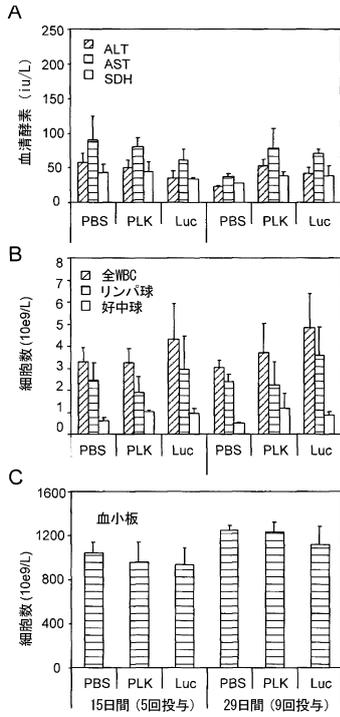
【図 30】



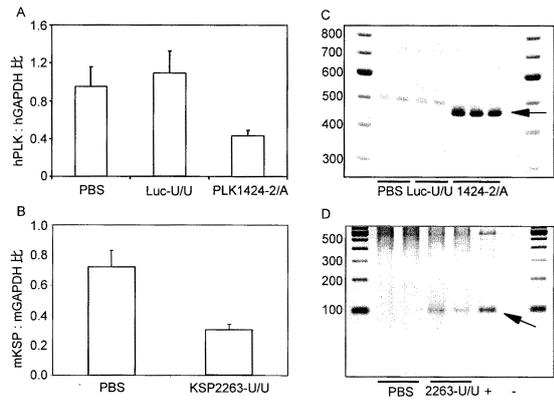
【図 31】



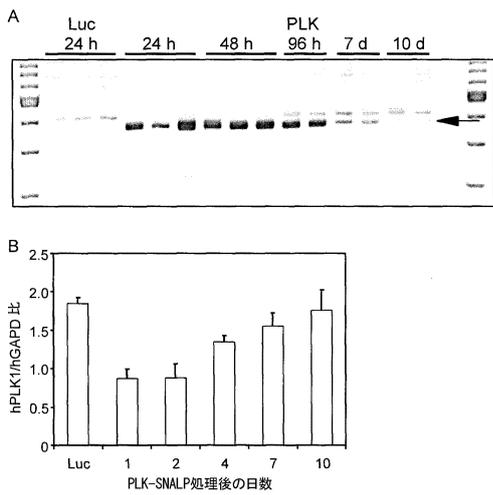
【 3 2 】



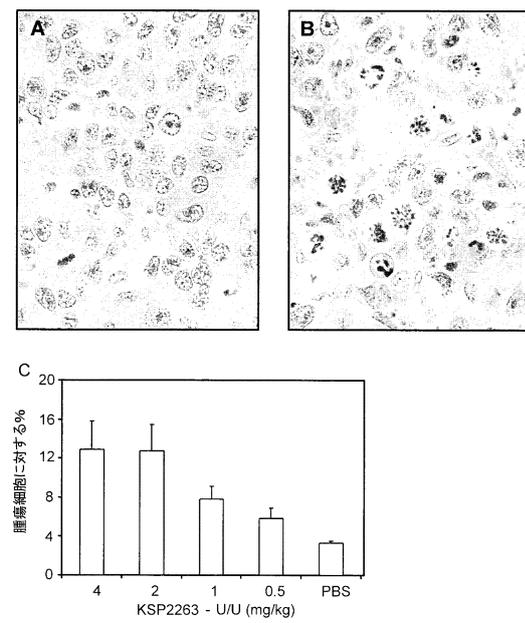
【 3 3 】



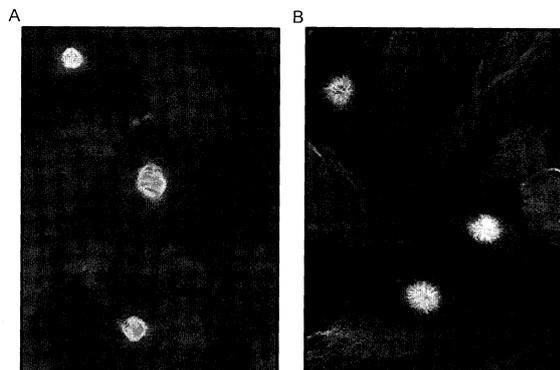
【 3 4 】



【 3 6 】

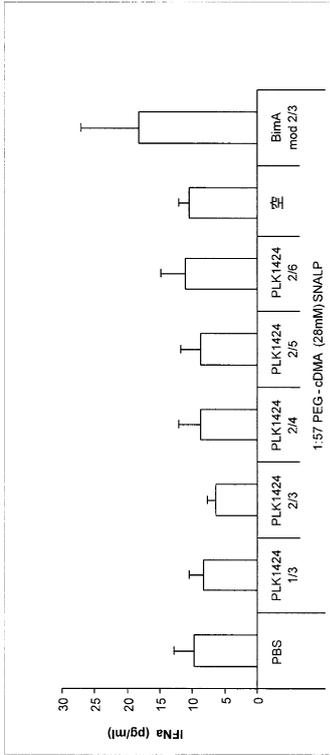


【 3 5 】

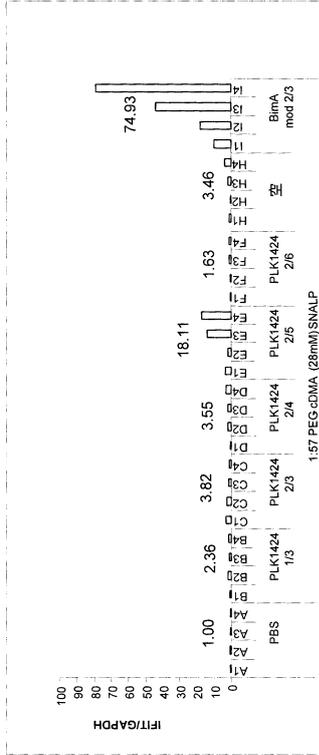




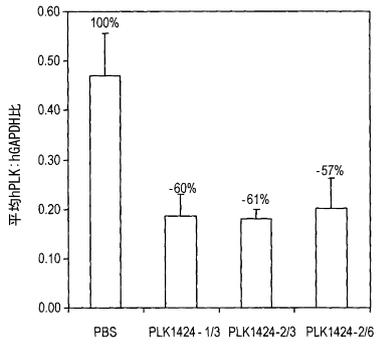
【 4 1 】



【 4 2 】



【 4 3 】



**【配列表】**

0005697988000001.app

## フロントページの続き

|               |           |               |       |
|---------------|-----------|---------------|-------|
| (51)Int.Cl.   |           | F I           |       |
| A 6 1 K 47/28 | (2006.01) | A 6 1 K 47/28 |       |
| A 6 1 P 43/00 | (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 |
| A 6 1 K 45/00 | (2006.01) | A 6 1 K 45/00 |       |
| A 6 1 P 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |       |
| C 0 7 H 21/02 | (2006.01) | C 0 7 H 21/02 |       |

(31)優先権主張番号 61/100,653

(32)優先日 平成20年9月26日(2008.9.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マクラ克蘭 イアン

カナダ国 プリティッシュ コロンビア州 ミッション アブス テラス 8040

(72)発明者 ジャッジ アダム

カナダ国 プリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト 第11 アベニュー 1936

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 国際公開第2006/035515(WO,A1)

米国特許出願公開第2007/0265438(US,A1)

国際公開第2007/051303(WO,A1)

中国特許出願公開第1651450(CN,A)

Mol. Cell. Biol., 2006, Vol.26, No.6, p.2093-2108

Mol. Ther., 2006, Vol.13, No.3, p.494-505

J. Mol. Biol., 2007, Vol.365, No.1, p.90-108

Curr. Biol., 2005, Vol.15, p.1078-1089

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

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