

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-516586  
(P2011-516586A)

(43) 公表日 平成23年5月26日(2011.5.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A61K 47/44 (2006.01)	A61K 47/44	4C076
A61K 31/7088 (2006.01)	A61K 31/7088	4C084
A61K 31/7105 (2006.01)	A61K 31/7105	4C086
A61K 48/00 (2006.01)	A61K 48/00	
A61K 47/18 (2006.01)	A61K 47/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-504295 (P2011-504295)  
 (86) (22) 出願日 平成21年4月15日(2009.4.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年12月10日(2010.12.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2009/000496  
 (87) 国際公開番号 W02009/127060  
 (87) 国際公開日 平成21年10月22日(2009.10.22)  
 (31) 優先権主張番号 61/045,228  
 (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)

(71) 出願人 510179098  
 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  
 カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州  
 バーナビー グレンライオン パークウェイ 100-8900  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸送達用の脂質製剤

(57) 【要約】

本発明は、一つまたは複数の活性薬剤または治療剤を含む、新規で安定な脂質粒子、その脂質粒子の製造方法、ならびにその脂質粒子を送達および/または投与方法を提供する。さらに詳細には、本発明は、核酸(一つまたは複数の干渉性RNAなど)を含む安定的な核酸-脂質粒子(SNALP)、SNALPの製造方法、ならびにSNALPを送達および/または投与方法を提供する。

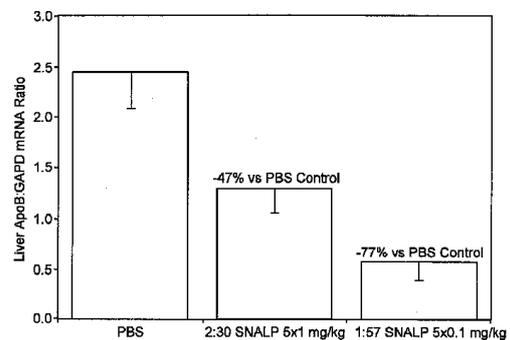
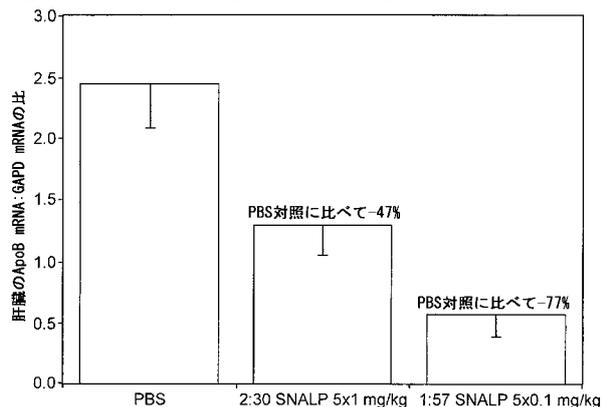


FIG. 3

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下を含む核酸-脂質粒子:

(a) 核酸;

(b) 該粒子中に存在する総脂質の約50mol%~約85mol%を構成する陽イオン性脂質;

(c) 該粒子中に存在する総脂質の約13mol%~約49.5mol%を構成する非陽イオン性脂質;および

(d) 該粒子中に存在する総脂質の約0.5mol%~約2mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する複合化脂質。

## 【請求項 2】

核酸が、低分子干渉性RNA (siRNA)を含む、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

10

## 【請求項 3】

siRNAが、約15~約60個のヌクレオチドを含む、請求項2記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 4】

siRNAが、少なくとも1個の改変ヌクレオチドを含む、請求項2記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 5】

siRNAが、少なくとも1個の2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチドを含む、請求項2記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 6】

陽イオン性脂質が、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)、またはそれらの混合物を含む、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

20

## 【請求項 7】

陽イオン性脂質が、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキサラン(DLin-K-C2-DMA)を含む、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 8】

陽イオン性脂質が、粒子中に存在する総脂質の約56.5mol%~約66.5mol%を構成する、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 9】

陽イオン性脂質が、粒子中に存在する総脂質の約52mol%~約62mol%を構成する、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

30

## 【請求項 10】

非陽イオン性脂質が、コレステロールまたはその誘導体を含む、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 11】

コレステロールまたはその誘導体が、粒子中に存在する総脂質の約31.5mol%~約42.5mol%を構成する、請求項10記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 12】

非陽イオン性脂質が、リン脂質を含む、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 13】

非陽イオン性脂質が、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1記載の核酸-脂質粒子。

40

## 【請求項 14】

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)、またはそれらの混合物を含む、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 15】

リン脂質が、粒子中に存在する総脂質の約4mol%~約10mol%を構成し、コレステロールが、粒子中に存在する総脂質の約30mol%~約40mol%を構成する、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 16】

50

リン脂質が、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約30mol%を構成し、コレステロールが、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約30mol%を構成する、請求項13記載の核酸-脂質粒子。

【請求項17】

粒子の凝集を阻害する複合化脂質が、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質コンジュゲートを含む、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

【請求項18】

PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-ジアシルグリセロール(PEG-DAG)コンジュゲート、PEG-ジアルキルオキシプロピル(PEG-DAA)コンジュゲート、またはそれらの混合物を含む、請求項17記載の核酸-脂質粒子。

10

【請求項19】

PEG-DAAコンジュゲートが、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(PEG-DMA)コンジュゲート、PEG-ジステアリルオキシプロピル(PEG-DSA)コンジュゲート、またはそれらの混合物を含む、請求項18記載の核酸-脂質粒子。

【請求項20】

PEGが、約2,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項19記載の核酸-脂質粒子。

【請求項21】

粒子の凝集を阻害する複合化脂質が、該粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約2mol%を構成する、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

【請求項22】

核酸-脂質粒子中の核酸が、血清中で37℃、30分間の該粒子のインキュベーション後に実質的に分解されない、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

20

【請求項23】

核酸が、核酸-脂質粒子に完全に封入されている、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

【請求項24】

約5～約15の脂質:核酸質量比を有する、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

【請求項25】

約40nm～約150nmの直径中央値を有する、請求項1記載の核酸-脂質粒子。

【請求項26】

請求項1記載の核酸-脂質粒子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

30

【請求項27】

以下を含む核酸-脂質粒子:

(a) siRNA;

(b) 該粒子中に存在する総脂質の約56.5mol%～約66.5mol%を構成する陽イオン性脂質;

(c) 該粒子中に存在する総脂質の約31.5mol%～約42.5mol%を構成するコレステロールまたはその誘導体;および

(d) 該粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約2mol%を構成するPEG-脂質コンジュゲート

【請求項28】

陽イオン性脂質が、DLmDMAを含む、請求項27記載の核酸-脂質粒子。

40

【請求項29】

陽イオン性脂質が、DLin-K-C2-DMAを含む、請求項27記載の核酸-脂質粒子。

【請求項30】

PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-DAAコンジュゲートを含む、請求項27記載の核酸-脂質粒子。

【請求項31】

約61.5mol%の陽イオン性脂質、約36.9%のコレステロールまたはその誘導体、および約1.5mol%のPEG-脂質コンジュゲートを含む、請求項27記載の核酸-脂質粒子。

【請求項32】

請求項27記載の核酸-脂質粒子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

50

## 【請求項 3 3】

以下を含む核酸-脂質粒子:

(a) siRNA;

(b) 該粒子中に存在する総脂質の約52mol%~約62mol%を構成する陽イオン性脂質;

(c) 該粒子中に存在する総脂質の約36mol%~約47mol%を構成する、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;および

(d) 該粒子中に存在する総脂質の約1mol%~約2mol%を構成するPEG-脂質コンジュゲート。

## 【請求項 3 4】

陽イオン性脂質が、DLinDMAを含む、請求項33記載の核酸-脂質粒子。

10

## 【請求項 3 5】

陽イオン性脂質が、DLin-K-C2-DMAを含む、請求項33記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 3 6】

リン脂質が、DPPCを含む、請求項33記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 3 7】

PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-DAAコンジュゲートを含む、請求項33記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 3 8】

約57.1mol%の陽イオン性脂質、約7.1mol%のリン脂質、約34.3mol%のコレステロールまたはその誘導体、および約1.4mol%のPEG-脂質コンジュゲートを含む、請求項33記載の核酸-脂質粒子。

20

## 【請求項 3 9】

約57.1mol%の陽イオン性脂質、約20mol%のリン脂質、約20mol%のコレステロールまたはその誘導体、および約1.4mol%のPEG-脂質コンジュゲートを含む、請求項33記載の核酸-脂質粒子。

## 【請求項 4 0】

請求項33記載の核酸-脂質粒子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 4 1】

細胞に核酸を導入するための方法であって、細胞と請求項1、27、または33記載の核酸-脂質粒子とを接触させることを含む、方法。

30

## 【請求項 4 2】

細胞が哺乳動物の中にある、請求項41記載の方法。

## 【請求項 4 3】

核酸のインピボ送達のための方法であって、哺乳動物対象に請求項1、27、または33記載の核酸-脂質粒子を投与することを含む、方法。

## 【請求項 4 4】

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、請求項43記載の方法。

## 【請求項 4 5】

処置を必要とする哺乳動物対象における疾患または障害を処置するための方法であって、哺乳動物対象に治療有効量の請求項1、27、または33記載の核酸-脂質粒子を投与することを含む、方法。

40

## 【請求項 4 6】

疾患または障害が、ウイルス感染、肝疾患または肝障害、およびがんからなる群より選択される、請求項45記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2008年4月15日に出願された米国仮特許出願第61/045,228号の優先権を主張

50

し、この出願の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

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導く、進化上保存された過程である。この抑制は、相補的塩基対形成によりmRNAの特異的分解を誘導する低分子干渉性RNA (siRNA) とも呼ばれる低分子dsRNAにより仲介される。いくつかのモデルシステムにおいて、この自然応答は、遺伝子機能の研究のための強力なツールに発展した (例えば、Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188-200 (2001) (非特許文献1); Hammond et al., *Nat. Rev. Genet.*, 2:110-119 (2001) (非特許文献2) を参照)。最近になって、哺乳動物細胞に21ヌクレオチド長の合成dsRNA二重鎖を導入することで、効率的に遺伝子発現をサイレンシングできることが発見された。

10

【0003】

正確なメカニズムはまだ不明であるが、RNAiは、関心対象の遺伝子の転写および翻訳を下方調節またはサイレンシングするための潜在的で新しいアプローチを提供する。例えば、がんなどの腫瘍性障害の処置のためにある種の遺伝子の発現を調節する (例えば減少させる) ことが望ましい。また、肝炎などの肝疾患および肝障害に関連する遺伝子の発現をサイレンシングすることも望ましい。アテローム性動脈硬化症およびその症状発現 (例えば高コレステロール血症、心筋梗塞、および血栓症) の処置のために、ある種の遺伝子の発現を減少させることが、さらに望ましい。

20

【0004】

安全で有効な核酸送達システムが、RNAiが治療的に有用であるために必要である。ウイルスベクターは、比較的効率的な遺伝子送達システムであるが、野生型への復帰変異の潜在性および免疫反応の懸念などの様々な制約に悩む。結果として、非ウイルス性遺伝子送達システムが、ますます注目を浴びている (Worgall et al., *Human Gene Therapy*, 8:37 (1997) (非特許文献3); Peeters et al., *Human Gene Therapy*, 7:1693 (1996) (非特許文献4); Yei et al., *Gene Therapy*, 1: 192 (1994) (非特許文献5); Hope et al., *Molecular Membrane Biology*, 15:1 (1998) (非特許文献6))。さらに、ウイルスシステムは、肺、肝臓、および脾臓などの「初回通過」器官へのトランスフェクションを制限しながら、循環から迅速に浄化される。その上に、これらのシステムは、その後の注射による送達を危うくする免疫反応を誘導する。

30

【0005】

プラスミドDNA-陽イオン性リポソーム複合体は、現在、最も一般に用いられている非ウイルス性遺伝子送達ビヒクルである (Felgner, *Scientific American*, 276:102(1997) (非特許文献7); Chonn et al., *Current Opinion in Biotechnology*, 6:698(1995) (非特許文献8))。例えば、昆虫細胞にトランスフェクトするための両親媒性化合物、中性脂質、および洗剤から作られた陽イオン性リポソーム複合体は、米国特許第6,458,382号 (特許文献1) に開示されている。陽イオン性リポソーム複合体はまた、米国特許出願公開第20030073640号 (特許文献2) に開示されている。

40

【0006】

陽イオン性リポソーム複合体は、全身適用に適さず、かつ少なからぬ有毒副作用を誘起するおそれのある、大型で、定義が不十分なシステムである (Harrison et al., *Biotechniques*, 19:816(1995) (非特許文献9); Li et al., *The Gene*, 4:891(1997) (非特許文献10); Tam et al., *Gene Ther.*, 7:1867(2000) (非特許文献11))。リポブックスは、大型の正電荷を帯びた凝集物として、インビボ投与されると迅速に浄化され、初回通過器官、特に肺で最高の発現レベルが観察される (Huang et al., *Nature Biotechnology*, 15:620(1997) (非特許文献12); Templeton et al., *Nature Biotechnology*, 15:647(1997) (非特許文献13); Hofland et al., *Pharmaceutical Research*, 14:742(1997) (非特許文献14))。

50

## 【 0 0 0 7 】

他のリポソーム送達システムには、例えば、逆ミセル、陰イオン性リポソーム、およびポリマー性リポソームの使用が含まれる。逆ミセルは、米国特許第6,429,200号（特許文献3）に開示されている。陰イオン性リポソームは、米国特許出願公開第20030026831号（特許文献4）に開示されている。デキストリンまたはグリセロール-ホスホコリンポリマーを組入れているポリマー性リポソームは、それぞれ米国特許出願公開第20020081736号（特許文献5）および第20030082103号（特許文献6）に開示されている。

## 【 0 0 0 8 】

封入された核酸を含む、全身送達用の遺伝子送達システムは、小型（すなわち、直径約100nm未満）であるべきであり、罹患組織への送達を達成するために、循環中で長期間無傷な状態を保つべきである。このことは、細胞および血管区画の他の構成要素と相互作用しない、高度に安定で血清に耐性の核酸含有粒子を必要とする。その粒子は、また、所望の核酸の細胞内送達を容易にするために、疾患部位での標的細胞と容易に相互作用すべきである。

10

## 【 0 0 0 9 】

最近の研究は、二重層性脂質小胞に封入された単一プラスミドから成る、小型（例えば直径約70nm）の「安定化プラスミド-脂質粒子」（SPLP）に核酸を封入することができることを示した（Wheeler et al., *Gene Therapy*, 6:271(1999)（非特許文献15））。これらのSPLPは、典型的には、「融合誘発性」脂質であるジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）および低レベルの陽イオン性脂質を含み、ポリ（エチレングリコール）（PEG）のコーティングの存在により水性媒質中で安定化されている。SPLPは、静脈内（i.v.）注射後に循環中で長寿命を示し、遠位腫瘍部位の領域での血管透過性が高まることが原因で、その部位に優先的に蓄積し、これらの腫瘍部位で導入遺伝子の発現を仲介することができることから、全身適用される。ルシフェラーゼマーカ-遺伝子を含むSPLPのi.v.注射後に腫瘍部位で観察された導入遺伝子の発現レベルは、プラスミドDNA-陽イオン性リポソーム複合体（リポプレックス）またはネイキッドDNAを用いて達成することのできるレベルよりも優れている。

20

## 【 0 0 1 0 】

したがって、当技術分野において、siRNAなどの核酸を細胞に導入するための、新規でより効率的な方法および組成物に対する強い必要性が、依然存在する。加えて、当技術分野において、がんおよびアテローム性動脈硬化症などの疾患および障害を処置または予防するために、関心対象の遺伝子の発現を下方調節する方法が必要性とされている。本発明は、これらの必要性および他の必要性に取り組むものである。

30

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 1 1 】

- 【 特許文献 1 】 米国特許第6,458,382号
- 【 特許文献 2 】 米国特許出願公開第20030073640号
- 【 特許文献 3 】 米国特許第6,429,200号
- 【 特許文献 4 】 米国特許出願公開第20030026831号
- 【 特許文献 5 】 米国特許出願公開第20020081736号
- 【 特許文献 6 】 米国特許出願公開第20030082103号

40

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 1 2 】

- 【 非特許文献 1 】 Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188-200 (2001)
- 【 非特許文献 2 】 Hammond et al., *Nat. Rev. Genet.*, 2:110-119 (2001)
- 【 非特許文献 3 】 Worgall et al., *Human Gene Therapy*, 8:37 (1997)
- 【 非特許文献 4 】 Peeters et al., *Human Gene Therapy*, 7:1693 (1996)
- 【 非特許文献 5 】 Yei et al., *Gene Therapy*, 1: 192 (1994)
- 【 非特許文献 6 】 Hope et al., *Molecular Membrane Biology*, 15:1 (1998)

50

- 【非特許文献7】Felgner, Scientific American, 276:102(1997)  
 【非特許文献8】Chonn et al., Current Opinion in Biotechnology, 6:698(1995)  
 【非特許文献9】Harrison et al., Biotechniques, 19:816(1995)  
 【非特許文献10】Li et al., The Gene, 4:891(1997)  
 【非特許文献11】Tam et al., Gene Ther., 7:1867(2000)  
 【非特許文献12】Huang et al., Nature Biotechnology, 15:620(1997)  
 【非特許文献13】Templeton et al., Nature Biotechnology, 15:647(1997)  
 【非特許文献14】Hofland et al., Pharmaceutical Research, 14:742(1997)  
 【非特許文献15】Wheeler et al., Gene Therapy, 6:271(1999)

【発明の概要】

10

【0013】

発明の簡単な概要

本発明は、一つまたは複数の活性薬剤または治療剤を含む、新規で血清安定性の脂質粒子、脂質粒子の製造方法、ならびに脂質粒子を送達および/または投与する方法（例えば疾患または障害の処置のために）を提供する。

【0014】

好ましい態様では、脂質粒子中の活性薬剤または治療剤が水溶液中で酵素分解（例えばヌクレアーゼまたはプロテアーゼによる）に耐性になるように、活性薬剤または治療剤は、脂質粒子の脂質部分に完全に封入されている。他の好ましい態様では、脂質粒子は、ヒトなどの哺乳動物に対して実質的に無毒である。

20

【0015】

一局面では、本発明は、(a)一つまたは複数の活性薬剤または治療剤；(b)粒子中に存在する総脂質の約50mol%～約85mol%を構成する、一つまたは複数の陽イオン性脂質；(c)粒子中に存在する総脂質の約13mol%～約49.5mol%を構成する、一つまたは複数の非陽イオン性脂質；および(d)粒子中に存在する総脂質の約0.5mol%～約2mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する一つまたは複数の複合化脂質を含む、脂質粒子を提供する。

【0016】

さらに詳細には、本発明は、核酸（例えば、siRNA、aiRNA、および/またはmiRNAなどの、一つまたは複数の干渉性RNA分子）を含む血清安定性の核酸-脂質粒子（SNALP）、SNALPの製造方法、ならびにSNALPを送達および/または投与する方法（例えば疾患または障害の処置のために）を提供する。

30

【0017】

ある態様では、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）は、(a)核酸（例えば、干渉性RNA）；(b)粒子中に存在する総脂質の約50mol%～約85mol%を構成する陽イオン性脂質；(c)粒子中に存在する総脂質の約13mol%～約49.5mol%を構成する非陽イオン性脂質；および(d)粒子中に存在する総脂質の約0.5mol%～約2mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する複合化脂質、を含む。

【0018】

好ましい一態様では、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）は、(a) siRNA；(b)粒子中に存在する総脂質の約56.5mol%～約66.5mol%を構成する陽イオン性脂質；(c)粒子中に存在する総脂質の約31.5mol%～約42.5mol%を構成するコレステロールまたはその誘導体；および(d)粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約2mol%を構成するPEG-脂質コンジュゲート、を含む。この核酸-脂質粒子の好ましい態様を、本明細書において一般に「1:62」製剤と呼ぶ。

40

【0019】

別の好ましい態様では、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）は、(a) siRNA；(b)粒子中に存在する総脂質の約52mol%～約62mol%を構成する陽イオン性脂質；(c)粒子中に存在する総脂質の約36mol%～約47mol%を構成する、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；および(d)粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約2mol%を構成するPEG-脂質コンジュゲートを含む。核酸-脂質粒子のこの好ましい態様を、本明細書において一般に「1

50

:57」製剤と呼ぶ。

【0020】

本発明はまた、本明細書に記載された脂質粒子（例えばSNALP）および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。

【0021】

別の局面では、本発明は、細胞に活性薬剤または治療剤（例えば核酸）を導入するための方法であって、細胞と核酸-脂質粒子（例えばSNALP）などの本明細書記載の脂質粒子とを接触させることを含む方法を提供する。

【0022】

なお別の局面では、本発明は、活性薬剤または治療剤（例えば核酸）のインビボ送達のための方法であって、哺乳動物対象に核酸-脂質粒子（例えばSNALP）などの本明細書記載の脂質粒子を投与することを含む方法を提供する。

10

【0023】

さらなる局面では、本発明は、それを必要とする哺乳動物対象において疾患または障害を処置するための方法であって、哺乳動物対象に治療有効量の核酸-脂質粒子（例えばSNALP）などの本明細書記載の脂質粒子を投与することを含む方法を提供する。

【0024】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明および図面から当業者に明らかになる。

【図面の簡単な説明】

20

【0025】

【図1A】ヒト大腸がん細胞株におけるEg5 siRNAを含む1:57 SNALPの活性を実証するデータを示す図である。

【図1B】ヒト大腸がん細胞株におけるEg5 siRNAを含む1:57 SNALPの活性を実証するデータを示す図である。

【図2】マウスにおける静脈内投与後の、ApoB siRNAを含む1:57 SNALPの活性を実証するデータを示す図である。

【図3】マウスにおける静脈内投与後の、ApoB siRNAを含む1:57 SNALPの活性を実証する追加的なデータを示す図である。各棒線は、動物5匹の群平均を示す。誤差の縦棒は、標準偏差を示す。

30

【図4】マウスにおける静脈内投与後の、ApoB siRNAを含む1:57および1:62 SNALPの活性を実証するデータを示す図である。

【図5】マウスにおける静脈内投与後の、ApoB siRNAを含む1:62 SNALPの活性を実証するデータを示す図である。

【図6】血中臨床化学パラメーターの点から、クエン酸緩衝液により調製したApoB siRNAを含む1:57 SNALPの認容性が、PBSの直接希釈と比べて有意差がなかったことを実証するデータを示す図である。

【図7】ギアポンプにより調製したApoB siRNAを含む1:57 SNALPの有効性が、シリンジプレスにより調製した同SNALPと類似していたことを実証するデータを示す図である。

【図8】ApoB siRNAを含む1:57 SNALPを投与した24時間後に、体重にほとんど影響がなかったことを実証するデータを示す図である。

40

【図9】ApoB siRNAを含む1:57 SNALPの投与後に、血小板数に明らかな変化がなかったことを実証するデータを示す図である。

【図10A】臨床的に有意な肝臓酵素上昇（3×ULN）が、特定薬用量のApoB siRNAを含む1:57 SNALPで生じたことを実証するデータを示す図である。

【図10B】臨床的に有意な肝臓酵素上昇（3×ULN）が、特定薬用量のApoB siRNAを含む1:57 SNALPで生じたことを実証するデータを示す図である。

【図11】ApoB siRNAを含む低脂質:薬物（L:D）の1:57 SNALPの効力が、被験薬用量で高L:DのSNALPと同じく良好であったことを実証するデータを示す図である。

【図12】Apo Bタンパク質および総コレステロールのレベルが、6:1の投入L:D比（最終

50

比7:1)でApoB siRNAを含む1:57 SNALP、および9:1の投入L:D比(最終比10:1)の1:57 SNALPにより同程度減少したことを実証するデータを示す図である。

【図13】PLK-1をターゲティングするsiRNAを有する1:57 SNALPの治療方式が、担Hep3B肝臓腫瘍マウスにおいて認容性良好であり、処置関連毒性の明らかな徴候を示さないことを実証するデータを示す図である。

【図14】PLK-1 siRNAを含む1:57 SNALPを用いた処置が、担Hep3B腫瘍マウスの生存に有意な増大を引き起こしたことを実証するデータを示す図である。

【図15】PLK-1 siRNAを含む1:57 SNALPを用いた処置が、SNALP投与の24時間後に、マウスにおいて成長している肝臓内Hep3B腫瘍中のPLK-1 mRNAレベルを50%減少させたことを実証するデータを示す図である。

【図16】PLK-1 siRNAを含む1:57 SNALPで処置されたマウスにおいて、PLK-1 mRNAの特異的切断生成物が、5'RACE-PCRにより検出可能であったことを実証するデータを示す図である。10 $\mu$ lのPCR生成物/ウェルを1.5%アガロースゲルにロードした。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)テンプレートなしの対照。

【図17】対照(Luc)の1:57 SNALP処置マウスは、Hep3B腫瘍に正常な有糸分裂を示した(上欄)が、PLK-1 siRNAを含む1:57 SNALPで処置されたマウスは、Hep3B腫瘍に多数の異常有糸分裂および腫瘍細胞のアポトーシスを示した(下欄)ことを実証するデータを示す図である。

【図18】PEG-cDSAを含む1:57 PLK-1 SNALPの複数回投薬が、樹立Hep3B皮下(S.C.)腫瘍の退縮を誘導したことを実証するデータを示す図である。

【図19】S.C. Hep3B腫瘍に1:57 PLK SNALPを使用して、SNALPの単回静脈内投与後にPLK-1 mRNAがサイレンシングされたことを実証するデータを示す図である。

【図20】PLK-1 PEG-cDSA SNALPが、大型S.C. Hep3B腫瘍の成長を阻害したことを実証するデータを示す図である。

【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実証するデータを示す図である。

【図22】PEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含む1:57 PLK-1 SNALPの血中浄化プロファイルを実証するデータを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

発明の詳細な説明

## 1. 導入

本発明は、一つには、約50mol%~約85mol%の陽イオン性脂質、約13mol%~約49.5mol%の非陽イオン性脂質、および約0.5mol%~約2mol%の脂質コンジュゲートを含む脂質粒子が、治療用核酸(例えば干渉性RNA)などの活性薬剤のインビトロまたはインビボ送達に使用された場合に有利であるという驚くべき発見に基づく。特に、本明細書の実施例に例示するように、本発明は、有利には、封入された核酸(例えばsiRNAなどの干渉性RNA)の活性増加および製剤のインビボ認容性改善を与えることにより、以前に記載された核酸-脂質粒子組成物に比べて治療指数の有意な増加を得る、安定的な核酸-脂質粒子(SNALP)を提供する。追加的に、本発明のSNALPは、循環中で安定であり、例えば、血清中でヌクレアーゼによる分解に耐性であり、かつヒトなどの哺乳動物に実質的に無毒である。非限定的な例として、実施例4の図3は、本発明のSNALPの一態様(「1:57 SNALP」)が、10倍低い用量で、標的遺伝子のサイレンシングを、以前に記載された核酸-脂質粒子(「2:30 SNALP」)と比較して10倍を超える有効性で仲介したことを示す。同様に、実施例3の図2に、「1:57 SNALP」製剤は、以前に記載された核酸-脂質粒子(「2:40 SNALP」)よりも標的遺伝子の発現のサイレンシングが実質的に有効であったことを示す。

【0027】

ある態様では、本発明は、siRNA分子などの干渉性RNAの送達のための改良された組成物

を提供する。特に、本明細書の実施例は、本発明の改良された脂質粒子製剤が、標的遺伝子のmRNAおよび/または蛋白質レベルの下方調節に非常に有効であることを示す。さらに、本明細書における実施例は、あるモル比の脂質構成要素の存在が、本発明のこれらの脂質粒子製剤の活性の改善または増強を招くことを例示する。例えば、本明細書に記載された「1:57 SNALP」および「1:62 SNALP」製剤は、インビボで有効性および認容性の改善を提供し、血清安定性で、実質的に無毒で、血管外部位にアクセス可能で、そして標的細胞集団に到達可能なことから特に好都合な、本発明の例示的な製剤である。

#### 【0028】

本発明の脂質粒子および組成物は、様々な目的のために、例えば関連する、または封入された治療剤を、インビトロおよびインビボの両方で細胞に送達することに使用することができる。したがって、本発明は、処置を必要とする対象における疾患または障害を処置するための方法であって、対象と、一つまたは複数の適切な治療剤を含む本明細書記載の脂質粒子とを接触させることによる方法を提供する。

10

#### 【0029】

本発明の脂質粒子の様々な態様の例と同様に、それを含む組成物および製剤、ならびに治療剤を送達し、標的遺伝子およびタンパク質の発現を調節するためのそれらの使用を、以下にさらに詳細に記載する。

#### 【0030】

### II. 定義

本明細書において使用するときの以下の用語は、特に規定しない限り、それに属するとされる意味を有する。

20

#### 【0031】

「干渉性RNA」または「RNAi」または「干渉性RNA配列」という用語は、干渉性RNAが標的遺伝子または配列と同じ細胞の中にある場合に、標的遺伝子または配列の発現を（例えば干渉性RNA配列に相補的なmRNAの分解を仲介またはその翻訳を阻害することにより）減少または阻害することのできる一本鎖RNA（例えば成熟miRNA）または二本鎖RNA（すなわち、siRNA、aiRNA、またはプレmiRNAなどの二重鎖RNA）を指す。したがって、干渉性RNAは、標的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鎖により形成した二本鎖RNAを指す。干渉性RNAは、標的遺伝子もしくは配列に実質的もしくは完全な同一性を有することがあるか、またはミスマッチ領域（すなわちミスマッチモチーフ）を構成することがある。干渉性RNAの配列は、完全長標的遺伝子またはその部分配列に対応することができる。

30

#### 【0032】

干渉性RNAには、「低分子干渉性RNA」または「siRNA」、例えば、約15~60、15~50、または15~40（二重）ヌクレオチド長、さらに典型的には約15~30、15~25、または19~25（二重）ヌクレオチド長の干渉性RNAが含まれ、干渉性RNAは、好ましくは約20~24、21~22、または21~23（二重）ヌクレオチド長である（例えば、二本鎖siRNAの各相補鎖は、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個のヌクレオチドまたは約2~約3個のヌクレオチドの3'オーバーハングおよび5'リン酸末端を含みうる。siRNAの例には、非限定的に、二つの別々の鎖分子から集合した二本鎖ポリヌクレオチド分子（ここで、一方の鎖はセンス鎖であり、他方は相補的アンチセンス鎖である）；一本鎖分子から集合した二本鎖ポリヌクレオチド分子（ここでセンスおよびアンチセンス領域は核酸または非核酸に基づくリンカーにより連結している）；自己相補的センスおよびアンチセンス領域を有するヘアピン型二次構造を有する二本鎖ポリヌクレオチド分子；ならびに二つまたはそれ以上のループ構造と、自己相補的センスおよびアンチセンス領域を有するステムとを有する環状一本鎖ポリヌクレオチド分子（ここで、環状ポリヌクレオチドは、インビボまたはインビトロでプロセッシングされて活性二本鎖siRNA分子を発生することができる）が

40

50

含まれる。

【0033】

好ましくは、siRNAは化学合成される。siRNAは、また、より長いdsRNA（例えば、約25ヌクレオチド長を超えるdsRNA）を大腸菌（*E. coli*）RNase IIIまたはDicerにより切断することにより発生させることができる。これらの酵素は、dsRNAを生物学的に活性なsiRNAにプロセッシングする（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)を参照）。好ましくは、dsRNAは、少なくとも50ヌクレオチド長～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りうる。dsRNAは、遺伝子転写物全体または遺伝子転写物の部分をコードすることができる。場合によっては、siRNAは、プラスミドによりコードされることがある（例えば、ヘアピンループを有する二重鎖に自動的に折り畳まれる配列として転写される）。

10

【0034】

本明細書において使用する「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、干渉性RNA（例えば、siRNA、aiRNA、miRNA）配列の、その標的配列に100%の相補性を有さない部分を指す。干渉性RNAは、少なくとも1、2、3、4、5、6個またはそれ以上のミスマッチ領域を有しうる。ミスマッチ領域は、連続的なことがあるか、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個もしくはそれ以上のヌクレオチドで分離されていることがある。ミスマッチモチーフまたはミスマッチ領域は、1個のヌクレオチドを含むことがあるか、または2、3、4、5個もしくはそれ以上のヌクレオチドを含むことがある。

20

【0035】

干渉性RNAなどの活性薬剤または治療剤の「有効量」または「治療有効量」は、所望の効果（例えば、干渉性RNAの非存在下で検出された普通の発現レベルに比した標的配列の発現の阻害）を生じるために十分な量である。標的遺伝子または標的配列の発現阻害は、干渉性RNAで得られた値が対照に比べて約90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、または0%の場合に達成される。標的遺伝子または標的配列の発現を測定するために適したアッセイには、例えば、ドットプロット、ノーザンプロット、インサイチュハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能などの当業者に公知の技術を使用したタンパク質またはRNAレベルの検査と同様に、当業者に公知の表現型アッセイが含まれる。

30

【0036】

干渉性RNAにより免疫反応を「減少させる」、「減少させること」、「低減する」、または「低減すること」により、所与の干渉性RNA（例えば改変された干渉性RNA）に対する免疫反応の検出可能な減少を意味することが意図される。改変された干渉性RNAによる免疫反応の減少量は、未改変の干渉性RNA存在下での免疫反応のレベルに比べて決定することができる。検出可能な減少は、未改変の干渉性RNAの存在下で検出された免疫反応よりも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれ以上に低いことがある。干渉性RNAに対する免疫反応の減少は、典型的には、レスポンダー細胞によるサイトカイン（例えば、IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6、またはIL-12）のインビトロ生成の減少または干渉性RNA投与後の哺乳動物対象の血清中サイトカインの生成の減少により測定される。

40

【0037】

本明細書において使用する「レスポンダー細胞」という用語は、未改変のsiRNAなどの免疫刺激性干渉性RNAと接触した場合に、検出可能な免疫反応を生成する細胞、好ましくは哺乳動物細胞を指す。レスポンダー細胞の例には、例えば、樹状細胞、マクロファージ、末梢血単核細胞（PBMC）、脾臓細胞等が含まれる。検出可能な免疫反応には、例えば、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\delta$ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12

50

、IL-13、TGF、およびそれらの組合せなどの、サイトカインまたは成長因子の生成が含まれる。

【0038】

「実質的な同一性」は、ストリンジェントな条件で参照配列にハイブリダイズする配列、または参照配列の特定領域にわたり特定百分率の同一性を有する配列を指す。

【0039】

「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、核酸が、典型的には核酸の複合混合物中で、その標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる状況で異なるものである。より長い配列は、より高い温度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の詳しい手引きは、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、所定のイオン強度のpHで特定配列についての熱融解点 ( $T_m$ ) よりも約5~10 低く選択される。 $T_m$ は、標的に相補的なプローブの50%が(所定のイオン強度、pH、および核酸濃度で)平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度である(標的配列が過剰に存在することから、 $T_m$ では、平衡状態でプローブの50%が占有される)。ストリンジェントな条件は、また、ホルムアミドなどの不安定化剤を添加して達成することができる。選択的または特異的ハイブリダイゼーションについて、陽性シグナルは、バックグラウンドハイブリダイゼーションの少なくとも2倍、好ましくはバックグラウンドの10倍である。

10

20

【0040】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、以下の通りであることができる: 50%ホルムアミド、5×SSC、および1% SDS、42 でインキュベーションするか、または、5×SSC、1% SDS、65 でインキュベーションし、0.2×SSCおよび0.1% SDS中で65 で洗浄する。PCRについて、約36 の温度が低ストリンジェンシーの増幅に典型的であるが、アニーリング温度は、プライマー長に依存して約32 ~ 48 の間を変動しうる。高ストリンジェンシーのPCR増幅について、約62 の温度が典型的であるが、高ストリンジェンシーのアニーリング温度は、プライマー長および特異性に依存して約50 ~ 約65 に変動しうる。高および低ストリンジェンシーの増幅の両方に典型的なサイクル条件には、90 ~ 95 で30秒~2分間の変性期、30秒~2分間継続するアニーリング期、および約72 で1~2分間の伸長期が含まれる。低および高ストリンジェンシーの増幅反応についてプロトコールおよび手引きは、例えば、Innis et al., *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.(1990)に提供されている。

30

【0041】

ストリンジェントな条件で相互にハイブリダイズしない核酸は、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ならば、なお実質的に同一である。例えば、遺伝コードにより許される最大のコドン縮重を用いて核酸コピーを作製する場合に、このことが起こる。そのような場合に、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でハイブリダイズする。「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」の例には、37 で40%ホルムアミド、1M NaCl、1%SDSの緩衝液中でのハイブリダイゼーション、および45 で1×SSC中での洗浄が含まれる。陽性のハイブリダイゼーションは、少なくともバックグラウンドの2倍である。当業者は、同様なストリンジェンシー条件を提供するために、代替的なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を利用できることを容易に認識しているであろう。ハイブリダイゼーションのパラメーターを決定するための追加的な手引きは、多数の参考文献、例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds.に提供されている。

40

【0042】

二つまたはそれ以上の核酸に関連して「実質的に同一」または「実質的な同一性」という用語は、以下の配列比較アルゴリズムの一つを用いて、または手動アライメントおよび

50

目視検査により測定したときに、比較ウィンドウまたは指定領域にわたって最大一致になるように比較および整列させた場合に、同じであるか、または同じであるヌクレオチドの特定パーセンテージ（すなわち、特定領域にわたって少なくとも約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、二つまたはそれ以上の配列または部分配列を指す。この定義はまた、文脈が示す場合には、配列の相補体も同じように指す。好ましくは、実質的な同一性は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60ヌクレオチド長の領域にわたって存在する。

#### 【0043】

配列比較について、典型的には一つの配列が被験配列と比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合に、被験配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータを使用することができるか、または、代替的なパラメータを指定することができる。次に、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて参照配列に対する被験配列の配列同一率を計算する。

10

#### 【0044】

本明細書において使用する「比較ウィンドウ」は、約5～約60個、通常には約10～約45個、さらに通常には約15～約30個からなる群より選択される、いくつかの連続する位置の任意の一つのセグメントの参照であって、ある配列を同数の連続位置の参照配列と、それら二つの配列を最適にアライメントした後で比較することのできるセグメントの参照を含む。比較のために配列をアライメントする方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアライメントは、例えば、Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482(1981)の局所相同性アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443(1970)の相同性アライメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444(1988)の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータインプリメンテーションにより（Wisconsin Genetics Software Package, Genetic s Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFAST A）、または手動アライメントおよび目視検査により（例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds.(1995 増補)を参照）行うことができる。

20

#### 【0045】

配列同一率および配列類似率の決定に適したアルゴリズムの好ましい例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらは、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BLAST2.0は、本明細書に記載のパラメータを用いて本発明の核酸の配列同一率を決定するために用いられる。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から公的に入手可能である。

30

#### 【0046】

BLASTアルゴリズムは、また、二つの配列の間の類似性の統計解析を行う（例えば、Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:873-5787(1993)を参照）。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の一尺度は、最小合計確率（ $P(N)$ ）であり、これは、二つのヌクレオチド配列間の一致が偶然起こる確率の指標を提供する。例えば、被験核酸と参照核酸の比較における最小合計確率が、約0.2未満、さらに好ましくは約0.01未満、そして最も好ましくは約0.001未満ならば、核酸は参照配列に類似すると見なされる。

40

#### 【0047】

本明細書において使用する「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態の、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有するポリマーを指し、核酸にはDNAおよびRNAが含まれる。DNAは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドDNA、凝縮前のDNA、PCR生成物、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體および組合せの形態でありうる。RNAは、siRNA、非対称干渉性RNA（aiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、mRNA、

50

tRNA、rRNA、tRNA、ウイルスRNA (vRNA)、およびそれらの組合せの形態でありうる。核酸には、合成、天然、および非天然であり、かつ参照核酸と類似した結合特性を有する、公知のヌクレオチドアナログまたは改変された主鎖残基もしくは連結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、ホスホルアミデート、ホスホン酸メチル、キラル-ホスホン酸メチル、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。具体的に限定されない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有する、天然ヌクレオチドの公知のアナログを有する核酸を包含する。特に示さない限り、特定の核酸配列はまた、保存的に改変されたその変異体 (例えば縮重コドン置換)、アレル、オソログ、SNP、および相補的配列ならびに明示された配列を暗黙的に包含する。具体的には、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) コドンの第三の位置が、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発生させることにより達成することができる (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) またはリボース (RNA)、塩基、およびリン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基を介して一緒に結合している。「塩基」には、プリンおよびピリミジンが含まれ、さらに、天然化合物であるアデニン、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、ならびにプリンおよびピリミジンの合成誘導体が含まれ、合成誘導体には、非限定的に、アミン、アルコール、チオール、カルボン酸エステル、およびハロゲン化アルキルなどの新しい反応性基を配置する改変が含まれる。

10

20

## 【0048】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチドまたは前駆ポリペプチドの生成に必要な、部分長または完全長のコード配列を含む核酸 (例えばDNAまたはRNA) 配列を指す。

## 【0049】

本明細書において使用する「遺伝子生成物」は、RNA転写物またはポリペプチドなどの遺伝子生成物を指す。

## 【0050】

「脂質」という用語は、水に不溶であるが多数の有機溶媒に可溶であることを特徴とする、非限定的に脂肪酸エステルを含む有機化合物の群を指す。それらは、普通は以下の少なくとも三つのクラスに分類される: (1) 脂肪、油およびロウが含まれる「単純脂質」;

30

## 【0051】

(2) リン脂質および糖脂質が含まれる「複合脂質」;ならびに (3) ステロイドなどの「誘導脂質」。

「脂質粒子」は、関心対象の標的部位に核酸 (例えば干渉性RNA) などの活性薬剤または治療剤を送達するために使用することのできる脂質製剤を指すために本明細書において使用される。典型的には、陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、および粒子の凝集を防止する複合化脂質から形成される本発明の脂質粒子において、活性薬剤または治療剤を脂質に封入することにより、その薬剤を酵素分解から保護することができる。

## 【0052】

本明細書において使用する「SNALP」という用語は、安定的な核酸-脂質粒子を指す。SNALPは、脂質 (例えば陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、および粒子の凝集を防止する複合化脂質) から作られた粒子を指し、ここで、核酸 (例えば、siRNA、aiRNA、miRNA、ssDNA、dsDNA、ssRNA、低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、dsRNA、または干渉性RNAが転写されるプラスミドを含めたプラスミド) は、脂質に完全に封入されている。本明細書において使用する「SNALP」という用語には、SPLPが含まれ、SPLPは、脂質に封入された核酸 (例えばプラスミド) を含む核酸-脂質粒子を指すために使用される用語である。SNALPおよびSPLPは、典型的には陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、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) を含む。SNALPおよびSPLPは、静脈内 (i.v.) 注射後に循環寿命の延長を示すことができ、遠位部位 (例えば、投与部位から物理的に隔離された部位) に蓄積することができ、かつこれらの遠位部位でのトランスフェクトされた遺伝子

40

50

の発現または標的遺伝子の発現のサイレンシングを仲介できることから、全身適用に極めて有用である。SPLPには、PCT公開番号第WO 00/03683（その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる）に示されるような、封入された凝縮剤-核酸複合体を含む「pSPLP」が含まれる。

【0053】

本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、典型的には約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、または約70～約90nmの平均直径を有し、実質的に無毒である。加えて、核酸は、本発明の脂質粒子中に存在する場合、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に耐性である。核酸-脂質粒子およびそれらの調製方法は、例えば、米国特許出願公開第20040142025号および第20070042031号（その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる）に開示されている。

10

【0054】

本明細書において使用する「脂質封入性」は、完全に封入された、部分封入された、またはその両方の、核酸（例えば干渉性RNA）などの活性薬剤または治療剤を提供する脂質粒子を表すことができる。好ましい態様では、核酸は、（例えば、SPLP、pSPLP、SNALP、または他の核酸-脂質粒子を形成するために）脂質粒子に完全に封入される。

【0055】

「脂質コンジュゲート」という用語は、脂質粒子の凝集を防止する複合化脂質を指す。そのような脂質コンジュゲートには、非限定的に、ポリアミドオリゴマー（例えばATTA-脂質コンジュゲート）、PEG-脂質コンジュゲート、ジアルキルオキシプロピルとカップリングしたPEG、ジアシルグリセロールとカップリングしたPEG、コレステロールとカップリングしたPEG、ホスファチジルエタノールアミンとカップリングしたPEG、セラミドと複合化したPEG（例えば米国特許第5,885,613号を参照、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる）、陽イオン性PEG脂質、およびそれらの混合物が含まれる。PEGは、脂質と直接複合化することができ、またはリンカー部分を介して脂質に連結することがある。例えば、非エステル含有リンカー部分およびエステル含有リンカー部分を含めた、脂質とPEGをカップリングするために適した任意のリンカー部分を使用することができる。好ましい態様では、非エステル含有リンカー部分が使用される。

20

【0056】

「両親媒性脂質」という用語は、部分的に、脂質物質の疎水性部分が疎水性相に配向し、一方で親水性部分が水相に配向する、任意の適切な物質を指す。親水性は、炭水化物、リン酸、カルボン酸、スルファト、アミノ、スルフヒドリル、ニトロ、ヒドロキシル及びその他の基のような極性基または荷電基の存在に由来する。疎水性は、非限定的に、長鎖飽和および不飽和脂肪族炭化水素基、ならびに一つまたは複数の芳香族基、脂環式基、または複素環式基により置換されたそのような基を含めた、無極性基の包含により付与することができる。両親媒性化合物の例には、非限定的に、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が含まれる。

30

【0057】

リン脂質の代表例には、非限定的に、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、ホスファチジリンシトール、ホスファチド酸、パルミトイルオレ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、およびジリノレイルホスファチジルコリンが含まれる。スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質ファミリー、ジアシルグリセロール、および -アシルオキシ酸などのリンを欠如する他の化合物もまた、両親媒性脂質として指定された群の中に含まれる。追加的に、上記両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールを含めた他の脂質と混合することができる。

40

【0058】

「中性脂質」という用語は、選択されたpHで非荷電または中性双性イオン形態のいずれかで存在するいくつかの脂質種のいずれかを指す。生理的pHで、そのような脂質には、例

50

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。

【0059】

「非陽イオン性脂質」という用語は、任意の両親媒性脂質と同様に、任意の他の中性脂質または陰イオン性脂質を指す。

【0060】

「陰イオン性脂質」という用語は、生理的pHで負荷電している任意の脂質を指す。これらの脂質には、非限定的に、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、リシルホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレオイル (palmitoyl oleoyl) ホスファチジルグリセロール (POPG)、および他の陰イオン性修飾基が中性脂質と結合したものが含まれる。

10

【0061】

「陽イオン性脂質」という用語は、生理的pH (例えば約7.0のpH) などの選択されたpHで正味の正電荷を保持するいくつかの脂質種のいずれかを指す。驚くことに、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陽イオン性脂質は、膜流動性が増加した脂質粒子を形成するために特に有用であることが見い出された。本発明においても有用ないくつかの陽イオン性脂質および関連アナログは、米国特許出願公開第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公開番号第WO 96/10390に記載されており、それらの開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。陽イオン性脂質の非限定的な例は、本明細書に詳細に記載されている。場合によっては、陽イオン性脂質は、プロトン化可能な第三級アミンの (例えばpH滴定可能な) 頭基、C18アルキル鎖、頭基とアルキル鎖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。

20

【0062】

「疎水性脂質」という用語は、非限定的に、長鎖飽和および不飽和脂肪族炭化水素基が含まれる無極性基を有する化合物を指し、そのような基は、一つまたは複数の芳香族基、脂環式基、または複素環式基により置換されていてもよい。適切な例には、非限定的に、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。

30

【0063】

「融合誘発性」という用語は、SNALPなどの脂質粒子が細胞の膜と融合する能力を指す。膜は、原形質膜またはオルガネラ、例えばエンドソーム、核等を囲む膜のいずれかでありうる。

【0064】

本明細書において使用する「水溶液」という用語は、全体的または部分的に水を含む組成物を指す。

40

【0065】

本明細書において使用する「有機脂質溶液」という用語は、全体的または部分的に、脂質を有する有機溶媒を含む組成物を指す。

【0066】

本明細書において使用する「遠位部位」は、隣接毛細血管床に限らず、生体全体に広く分布する部位を含めた、物理的に隔離された部位を指す。

【0067】

SNALPなどの核酸-脂質粒子に関連した「血清安定性」は、血清への曝露または遊離DNAまたはRNAを大きく分解するであろうヌクレアーゼアッセイ後に、その粒子があまり分解

50

されないことを意味する。適切なアッセイには、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。

【0068】

本明細書において使用する「全身送達」は、生体内で干渉性RNAなどの活性薬剤または治療剤の広い生体内分布を導く脂質粒子の送達を指す。ある薬剤の全身送達を導くことができる投与技法もあれば、導くことができない投与技法もある。全身送達は、有用な、好ましくは治療的な量の薬剤が身体の大部分に曝露することを意味する。広い生体内分布を得るために、一般に、その薬剤は、投与部位から遠位の疾患部位に到達する前に迅速に分解または浄化されない血中寿命（例えば、第一通過器官（肝臓、肺等）または迅速な非特異的細胞結合により）を必要とする。脂質粒子の全身送達は、例えば静脈内、皮下、および腹腔内を含めた、当技術分野で公知の任意の手段によることがある。好ましい態様では、脂質粒子の全身送達は、静脈内送達による。

10

【0069】

本明細書において使用する「局所送達」は、生体内の標的部位に干渉性RNAなどの活性薬剤または治療剤を直接的に送達することを指す。例えば、薬剤は、腫瘍などの疾患部位または炎症部位などの他の標的部位または肝臓、心臓、膵臓、腎臓などの標的器官に直接注射により局所送達することができる。

【0070】

「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、家畜などの任意の哺乳動物種を指す。

20

【0071】

「がん」という用語は、異常細胞の制御できない成長を特徴とする疾患クラスの任意のメンバーを指す。この用語には、悪性、良性、軟組織または固形として特徴づけられるのにかかわらず全ての公知のがんおよび腫瘍状態、ならびに転移前のがんおよび転移後のがんを含めた全ての病期および悪性度のがんが含まれる。異なる種類のがんの例には、非限定的に、肺がん、大腸がん、直腸がん、肛門がん、胆管がん、小腸がん、胃がん、食道がん、胆嚢がん、肝臓がん、膵臓がん、虫垂がん、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、前立腺がん、腎臓がん（例えば腎細胞がん）、中枢神経系のがん、神経膠芽腫、皮膚がん、リンパ腫、絨毛がん、頭頸部がん、骨原性肉腫、および血液がんが含まれる。特定種類のがんの非限定的な例には、肝細胞がん（HCC）、二次肝臓がん（例えば、いくつかの他の種類の非肝臓性がん細胞の転移により起こるもの）、および肝芽腫が含まれる。本明細書において使用する「腫瘍」は、一つまたは複数のがん性細胞を含む。

30

【0072】

### III. 態様の説明

本発明は、一つまたは複数の活性薬剤または治療剤を含む、新規な血清安定性の脂質粒子、脂質粒子の製造方法、ならびに脂質粒子を送達および/または投与する方法（例えば、疾患または障害の処置のために）を提供する。

【0073】

一局面では、本発明は、以下を含む脂質粒子を提供する：(a)一つまたは複数の活性薬剤または治療剤；(b)粒子中に存在する総脂質の約50mol%～約85mol%を構成する一つまたは複数の陽イオン性脂質；(c)粒子中に存在する総脂質の約13mol%～約49.5mol%を構成する一つまたは複数の非陽イオン性脂質；および(d)粒子中に存在する総脂質の約0.5mol%～約2mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する一つまたは複数の複合化脂質。

40

【0074】

ある態様では、脂質粒子中の活性薬剤または治療剤が、水溶液中で、例えばヌクレアーゼまたはプロテアーゼによる酵素分解に耐性であるように、活性薬剤または治療剤は、脂質粒子の脂質部分に完全に封入される。ある他の態様では、脂質粒子は、ヒトなどの哺乳動物に対して実質的に無毒である。

【0075】

いくつかの態様では、活性薬剤または治療剤は、核酸を含む。場合によっては、核酸は

50

、例えば、siRNA、aiRNA、miRNA、またはそれらの混合物などの干渉性RNA分子を含む。ある他の場合には、核酸は、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、またはそれらの混合物などの、一本鎖もしくは二本鎖DNA、RNA、またはDNA/RNAハイブリッドを含む。

【0076】

他の態様では、活性薬剤または治療剤は、ペプチドまたはポリペプチドを含む。場合によっては、そのペプチドまたはポリペプチドは、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体断片；ヒト化抗体、組換え抗体、組換えヒト抗体、Primatized（商標）抗体などの抗体、またはそれらの混合物を含む。ある他の場合には、ペプチドまたはポリペプチドは、サイトカイン、成長因子、アポトーシス因子、分化誘導因子、細胞表面受容体、リガンド、ホルモン、小分子（例えば、有機小分子または化合物）、またはそれらの混合物を含む。

10

【0077】

好ましい態様では、活性薬剤または治療剤は、siRNAを含む。一態様では、siRNA分子は、約15～約60ヌクレオチド長（例えば約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。本発明のsiRNA分子は、インビトロおよび/またはインビボで標的配列の発現をサイレンシングすることができる。

【0078】

いくつかの態様では、siRNA分子は、少なくとも一つの改変ヌクレオチドを含む。ある好ましい態様では、siRNA分子は、二本鎖領域に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の改変ヌクレオチドを含む。場合によっては、siRNAは、二本鎖領域に約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%）の改変ヌクレオチドを含む。好ましい態様では、二本鎖領域の約25%未満（例えば、約25%、20%、15%、10%、または5%未満）または約1%～約25%（例えば、約1%～25%、5%～25%、10%～25%、15%～25%、20%～25%、または10%～20%）のヌクレオチドが、改変ヌクレオチドを含む。

20

【0079】

他の態様では、siRNA分子は、非限定的に、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めた改変ヌクレオチドを含む。好ましい態様では、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などの2'OMeヌクレオチド（例えば、2'OMeプリンおよび/またはピリミジンヌクレオチド）を含む。場合によっては、siRNAは、2'OMe-シトシンヌクレオチドを含まない。他の態様では、siRNAは、ヘアピンループ構造を含む。

30

【0080】

siRNAは、siRNA分子の二本鎖領域の一方の鎖（すなわち、センスまたはアンチセンス）または両方の鎖に改変ヌクレオチドを含んでもよい。好ましくは、ウリジンおよび/またはグアノシンヌクレオチドは、siRNA二重鎖の二本鎖領域の選択的位置で改変されている。ウリジンヌクレオチド改変に関して、センスおよび/またはアンチセンス鎖中の1、2、3、4、5、6個、またはそれ以上のウリジンヌクレオチドは、2'OMe-ウリジンヌクレオチドなどの改変ウリジンヌクレオチドであることができる。いくつかの態様では、センスおよび/またはアンチセンス鎖中の各ウリジンヌクレオチドは、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改変に関して、センスおよび/またはアンチセンス鎖中の少なくとも1、2、3、4、5、6個、またはそれ以上のグアノシンヌクレオチドは、2'OMe-グアノシンヌクレオチドなどの改変グアノシンヌクレオチドであることができる。いくつかの態様では、センスおよび/またはアンチセンス鎖中の各グアノシンヌクレオチドは、2'OMe-グアノシンヌクレオチドである。

40

50

## 【0081】

ある態様では、siRNA配列中の少なくとも1、2、3、4、5、6、7個、またはそれ以上の5'-GU-3'モチーフは、ミスマッチを導入して5'-GU-3'モチーフを除去することにより、および/または2'OMeヌクレオチドなどの改変ヌクレオチドを導入することにより、改変してもよい。5'-GU-3'モチーフは、siRNA配列のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の中であることができる。5'-GU-3'モチーフは、相互に隣接していてもよいし、またはその代わりに、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個、またはそれ以上のヌクレオチドにより分離されていてもよい。

## 【0082】

いくつかの好ましい態様では、改変されたsiRNA分子は、対応する非改変siRNA配列よりも免疫刺激性が低い。そのような態様では、免疫刺激性が低減した改変siRNA分子は、好都合にも、標的配列に対するRNAi活性を保持する。別の態様では、改変siRNA分子の免疫刺激性および標的遺伝子の発現をサイレンシングするその能力は、例えばsiRNA二重鎖の二本鎖領域内などの、siRNA配列内の最小で選択的な2'OMe改変の導入により平衡化または最適化することができる。場合によっては、改変siRNAは、対応する非改変siRNAよりも免疫刺激性が少なくとも約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%、99%、または100%低い。例えば、哺乳動物における全身投与または適切な脂質ベースの送達システム（本明細書に開示されたSNALP送達システムなど）を使用した哺乳動物レスポナー細胞のトランスフェクションの約2～約12時間後にINF- $\alpha$  および/またはIL-6レベルを測定することにより、改変siRNA分子および対応する非改変siRNA分子の免疫刺激性を決定できることは、当業者に容易に明らかであろう。

## 【0083】

ある態様では、改変siRNA分子の $IC_{50}$ （すなわち最大半値阻害濃度）は、対応する非改変siRNAの10倍未満または10倍に等しい（すなわち、改変siRNAは、対応する非改変siRNAの $IC_{50}$ の10倍未満または10倍に等しい $IC_{50}$ を有する）。他の態様では、改変siRNAは、対応する非改変siRNA配列の3倍未満または3倍に等しい $IC_{50}$ を有する。なお他の態様では、改変siRNAは、対応する非改変siRNAの2倍未満または2倍に等しい $IC_{50}$ を有する。用量反応曲線を作製することができ、改変siRNAおよび対応する非改変siRNAについての $IC_{50}$ 値は、当業者に公知の方法を使用して容易に決定できることが、当業者に容易に明らかであろう。

## 【0084】

なお別の態様では、改変siRNA分子は、対応する非改変siRNA配列に比べて、標的配列の発現を少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%サイレンシングすることができる。

## 【0085】

いくつかの態様では、siRNA分子は、例えば、二本鎖領域のセンスおよび/またはアンチセンス鎖にリン酸主鎖の改変を含まない。他の態様では、siRNAは、例えば、二本鎖領域のセンスおよび/またはアンチセンス鎖に1、2、3、4個、またはそれ以上のリン酸主鎖改変を含む。好ましい態様では、siRNAは、リン酸主鎖改変を含まない。

## 【0086】

さらなる態様では、siRNAは、例えば、二本鎖領域のセンスおよび/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。なおさらなる態様では、siRNAは、例えば、二本鎖領域のセンスおよび/またはアンチセンス鎖に1、2、3、4個、またはそれ以上の2'-デオキシヌクレオチドを含む。好ましい態様では、siRNAは、2'-デオキシヌクレオチドを含まない。

## 【0087】

場合によっては、センスおよび/またはアンチセンス鎖中の二本鎖領域の3'末端のヌクレオチドは、改変ヌクレオチドではない、ある他の場合には、センスおよび/またはアンチセンス鎖中の二本鎖領域の3'末端近くの（例えば、3'末端の1、2、3、または4個のヌク

10

20

30

40

50

レオチド内の)ヌクレオチドは、改変ヌクレオチドではない。

【0088】

本明細書に記載するsiRNA分子は、二本鎖領域の片側または両側に1、2、3、4個、またはそれ以上のヌクレオチドの3'オーバーハングを有することがあるか、または、二本鎖領域の片側または両側にオーバーハングを欠如することがある(すなわち、平滑末端を有する)。好ましくは、siRNAは、二本鎖領域の各側に2個のヌクレオチドの3'オーバーハングを有する。場合によっては、アンチセンス鎖の3'オーバーハングは、標的配列に相補的であり、センス鎖の3'オーバーハングは、標的配列の相補鎖に相補性を有する。または、3'オーバーハングは、標的配列またはその相補鎖に相補性を有さない。いくつかの態様では、3'オーバーハングは、2'-デオキシ(2'H)ヌクレオチドなどの1、2、3、4個、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。ある好ましい態様では、3'オーバーハングは、デオキシチミジン(dT)および/またはウリジンヌクレオチドを含む。他の態様では、二本鎖領域の片側または両側の3'オーバーハング中の一つまたは複数のヌクレオチドは、改変ヌクレオチドを含む。改変ヌクレオチドの非限定的な例は上述されているが、それらには、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が含まれる。好ましい態様では、siRNAのセンスおよび/またはアンチセンス鎖に存在する3'オーバーハング中の1、2、3、4個の、またはそれ以上のヌクレオチドは、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などの2'OMeヌクレオチド(例えば、2'OMeプリンおよび/またはピリミジンヌクレオチド)を含む。

10

20

【0089】

siRNAは、標的遺伝子発現をサイレンシングする非改変および/または改変siRNA配列の少なくとも一つまたはカクテル(例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上)を含みうる。siRNAのカクテルは、一つまたは複数の標的遺伝子の同じ領域もしくはドメイン(例えば、「ホットスポット」)、および/または異なる領域もしくはドメインに対する配列を含みうる。場合によっては、標的遺伝子の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個、またはそれ以上)の改変siRNAが、カクテル中に存在する。ある他の場合には、標的遺伝子の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個、またはそれ以上)の非改変siRNA配列がカクテル中に存在する。

30

【0090】

いくつかの態様では、siRNA分子のアンチセンス鎖は、標的配列またはその部分に少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的な配列を含むか、またはそれから成る。他の態様では、siRNA分子のアンチセンス鎖は、標的配列またはその部分に100%相補的な配列を含むか、またはそれから成る。さらなる態様では、siRNA分子のアンチセンス鎖は、標的配列またはその部分に特異的にハイブリダイズする配列を含むか、またはそれから成る。

【0091】

さらなる態様では、siRNA分子のセンス鎖は、標的配列またはその部分に少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の配列を含むか、またはそれから成る。追加的な態様では、siRNA分子のセンス鎖は、標的配列またはその部分に100%同一の配列を含むか、またはそれから成る。

40

【0092】

本発明の脂質粒子(例えば、siRNAなどの干渉性RNAを含むSNALP)において、陽イオン性脂質は、例えば、以下の一つまたは複数を含みうる: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)、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキサラン(DLin-K-C2-DMA;「XTC2」)、2,2-ジリノレイル-4-(3-ジメチルアミノプロピル)-[1,3]-ジオキサラン(DLin-K-C3-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-(4-ジメチルアミノブチル)-[1,

50

3]-ジオキサラン (DLin-K-C4-DMA)、2,2-ジリノレイル-5-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサラン (DLin-K6-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-N-メチルペピアジノ (methylpepiazin o) -[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-MPZ)、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)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイルオキシ (dilinoleyoxy) -3- (ジメチルアミノ) アセトキシプロパン (DLin-DAC)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-モルホリノプロパン (DLin-MA)、1,2-ジリノレイル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinDAP)、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-S-DMA)、1-リノレオイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-2-DMAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DLin-TMA.Cl)、1,2-ジリノレイル-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DLin-TAP.Cl)、1,2-ジリノレイルオキシ-3- (N-メチルピペラジノ) プロパン (DLin-MPZ)、3- (N,N-ジリノレイルアミノ) -1,2-プロパンジオール (DLinAP)、3- (N,N-ジオレイルアミノ) -1,2-プロパンジオ (propanedio) (DOAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3- (2-N,N-ジメチルアミノ) エトキシプロパン (DLin-EG-DMA)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DODMA)、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (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- -オキシブタン-4-オキシ)-1- (cis,cis-9,12- オクタデカジエノキシ) プロパン (CLinDMA)、2-[5'- (コレスタ-5-エン-3- -オキシ) -3'-オキサペントキシ) -3- ジメチル-1 - (cis,cis-9',1-2'-オクタデカジエノキシ) 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)、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)、またはまたはそれらの混合物。ある好ましい態様では、陽イオン性脂質は、DLinDMA、DLin-K-C2-DMA (「XTC2」)、またはそれらの混合物である。

10

20

30

40

50

#### 【0093】

DLin-K-C2-DMA (「XTC2」)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLin-K6-DMA、およびDLin-K-MPZなどの陽イオン性脂質、ならびに追加的な陽イオン性脂質の合成は、2008年10月9日に出願された米国仮出願第61/104,212号に記載されており、その仮出願の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。DLin-K-DMA、DLin-C-DAP、DLin-DAC、DLin-MA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMAP、DLin-TMA.Cl、DLin-TAP.Cl、DLin-MPZ、DLinAP、DOAP、およびDLin-EG-DMA、ならびに追加的な陽イオン性脂質の合成は、2008年12月31日に出願されたPCT出願第PCT/US08/88676号に記載されており、その出願の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。CLinDMAなどの陽イオン性脂質および追加的な陽イオン性脂質の合成は、米国特許出願公開第20060240554号に記載されており、その出願の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

#### 【0094】

いくつかの態様では、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約50mol%～約90mol%、約50mol%～約85mol%、約50mol%～約80mol%、約50mol%～約75mol%、約50mol%～約70mol%、約50mol%～約65mol%、または約50mol%～約60mol%を構成しうる。

#### 【0095】

他の態様では、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約55mol%～約90mol%、約

55mol%～約85mol%、約55mol%～約80mol%、約55mol%～約75mol%、約55mol%～約70mol%、または約55mol%～約65mol%を構成しうる。

【0096】

なお他の態様では、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約60mol%～約90mol%、約60mol%～約85mol%、約60mol%～約80mol%、約60mol%～約75mol%、または約60mol%～約70mol%を構成しうる。

【0097】

なおさらに他の態様では、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約65mol%～約90mol%、約65mol%～約85mol%、約65mol%～約80mol%、または約65mol%～約75mol%を構成しうる。

10

【0098】

さらなる態様では、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約70mol%～約90mol%、約70mol%～約85mol%、約70mol%～約80mol%、約75mol%～約90mol%、約75mol%～約85mol%、または約80mol%～約90mol%を構成しうる。

【0099】

追加的な態様では、陽イオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の（少なくとも）約50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、または90mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）を構成しうる。

【0100】

本発明の脂質粒子（例えば、siRNAなどの干渉性RNAを含むSNALP）において、非陽イオン性脂質は、例えば、一つまたは複数の陰イオン性脂質および/または中性脂質を含みうる。好ましい態様では、非陽イオン性脂質は、以下の中性脂質構成要素の一つを含む：（1）コレステロールまたはその誘導体；（2）リン脂質；または（3）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。

20

【0101】

コレステロール誘導体の例には、非限定的に、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、コレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテル、およびそれらの混合物が含まれる。コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテルの合成は本明細書に記載されている。

30

【0102】

リン脂質は、非限定的に、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）、パルミトイルオレオイル-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を含めた中性脂質であってもよい。ある好ましい態様では、リン脂質は、DPPC、DSPC、またはそれらの混合物である。

40

【0103】

いくつかの態様では、非陽イオン性脂質（例えば、一つまたは複数のリン脂質および/またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約60mol%、約15mol%～約60mol%、約20mol%～約60mol%、約25mol%～約60mol%、約30mol%～約60mol%、約10mol%～約55mol%、約15mol%～約55mol%、約20mol%～約55mol%、約25mol%～約55mol%、約30mol%～約55mol%、約13mol%～約50mol%、約15mol%～約50mol%または約20mol%～約50mol%を構成しうる。非陽イ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に、それらの混合物は、粒子中に存在する総脂質の最大約40、50、または

50

60mol%を構成しうる。

【0104】

他の態様では、非陽イオン性脂質（例えば、一つまたは複数のリン脂質および/またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約49.5mol%、約13mol%～約49.5mol%、約15mol%～約49.5mol%、約20mol%～約49.5mol%、約25mol%～約49.5mol%、約30mol%～約49.5mol%、約35mol%～約49.5mol%、または約40mol%～約49.5mol%を構成しうる。

【0105】

なお他の態様では、非陽イオン性脂質（例えば、一つまたは複数のリン脂質および/またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約45mol%、約13mol%～約45mol%、約15mol%～約45mol%、約20mol%～約45mol%、約25mol%～約45mol%、約30mol%～約45mol%、または約35mol%～約45mol%を構成しうる。

10

【0106】

なおさらに他の態様では、非陽イオン性脂質（例えば、一つまたは複数のリン脂質および/またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約40mol%、約13mol%～約40mol%、約15mol%～約40mol%、約20mol%～約40mol%、約25mol%～約40mol%、または約30mol%～約40mol%を構成しうる。

【0107】

さらなる態様では、非陽イオン性脂質（例えば、一つまたは複数のリン脂質および/またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約35mol%、約13mol%～約35mol%、約15mol%～約35mol%、約20mol%～約35mol%、または約25mol%～約35mol%を構成しうる。

20

【0108】

なおさらなる態様では、非陽イオン性脂質（例えば、一つまたは複数のリン脂質および/またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約30mol%、約13mol%～約30mol%、約15mol%～約30mol%、約20mol%～約30mol%、約10mol%～約25mol%、約13mol%～約25mol%、または約15mol%～約25mol%を構成しうる。

【0109】

追加的な態様では、非陽イオン性脂質（例えば、一つまたは複数のリン脂質および/またはコレステロール）は、粒子中に存在する総脂質の（少なくとも）約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）を構成しうる。

30

【0110】

ある好ましい態様では、非陽イオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約31.5mol%～約42.5mol%のコレステロールまたはその誘導体を含む。非限定的な例として、本発明のリン脂質不含脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約37mol%のコレステロールまたはその誘導体を含みうる。他の好ましい態様では、本発明のリン脂質不含脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約30mol%～約45mol%、約30mol%～約40mol%、約30mol%～約35mol%、約35mol%～約45mol%、約40mol%～約45mol%、約32mol%～約45mol%、約32mol%～約42mol%、約32mol%～約40mol%、約34mol%～約45mol%、約34mol%～約42mol%、約34mol%～約40mol%、または約30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、もしくは45mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）のコレステロールまたはその誘導体を含みうる。

40

【0111】

ある他の好ましい態様では、非陽イオン性脂質は、(i) 粒子中に存在する総脂質の約4mol%～約10mol%のリン脂質と；(ii) 粒子中に存在する総脂質の約30mol%～約40mol%のコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。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脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約7mol%のDPPCおよび約34mol%のコレステロールを含みうる。他の態様では、非陽イオン性脂質は、(i) 粒

50

子中に存在する総脂質の約3mol%～約15mol%、約4mol%～約15mol%、約4mol%～約12mol%、約4mol%～約10mol%、約4mol%～約8mol%、約5mol%～約12mol%、約5mol%～約9mol%、約6mol%～約12mol%、約6mol%～約10mol%、または約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）のリン脂質と、(ii) 粒子中に存在する総脂質の約25mol%～約45mol%、約30mol%～約45mol%、約25mol%～約40mol%、約30mol%～約40mol%、約25mol%～約35mol%、約30mol%～約35mol%、約35mol%～約45mol%、約40mol%～約45mol%、約28mol%～約40mol%、約28mol%～約38mol%、約30mol%～約38mol%、約32mol%～約36mol%、または約25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、もしくは45mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）のコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。

10

## 【0112】

さらに好ましい態様では、非陽イオン性脂質は、(i) 粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約30mol%のリン脂質と、(ii) 粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約30mol%のコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。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脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約20mol%のDPPCおよび約20mol%のコレステロールを含みうる。他の態様では、非陽イオン性脂質は、(i) 粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約30mol%、約10mol%～約25mol%、約10mol%～約20mol%、約15mol%～約30mol%、約20mol%～約30mol%、約15mol%～約25mol%、約12mol%～約28mol%、約14mol%～約26mol%、または約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）のリン脂質と、(ii) 粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約30mol%、約10mol%～約25mol%、約10mol%～約20mol%、約15mol%～約30mol%、約20mol%～約30mol%、約15mol%～約25mol%、約12mol%～約28mol%、約14mol%～約26mol%、または約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）のコレステロールまたはその誘導体との混合物を含む。

20

## 【0113】

本発明の脂質粒子（例えば、siRNAなどの干渉性RNAを含むSNALP）において、粒子の凝集を阻害する複合化脂質は、例えば、以下の一つまたは複数を含みうる：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、陽イオン性ポリマー-脂質コンジュゲート（CPL）、またはそれらの混合物。好ましい態様では、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。ある態様では、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CPLと一緒に使用する。粒子の凝集を阻害する複合化脂質は、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めたPEG-脂質を含みうる。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）、PEG-ジステアリルオキシプロピル（C18）、またはそれらの混合物でありうる。

30

## 【0114】

本発明に使用するために適したさらなるPEG-脂質コンジュゲートには、非限定的に、mPEG2000-1,2-ジ-0-アルキル-sn3-カルボモイルグリセリド（carbomoylglyceride）（PEG-C-DOMG）が含まれる。PEG-C-DOMGの合成は、2008年12月31日に出願されたPCT出願第PCT/US08/88676に記載されており、その出願の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。本発明に使用するために適した、なおさらなるPEG-脂質コンジュゲートには、非限定的に、1-[8'-(1,2-ジミリスチル-3-プロパノキシ)-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。2KPEG-DMGの合成は、米国特許第7,404,969号に記載され、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

40

## 【0115】

50

本明細書に記載されるPEG-脂質コンジュゲートのPEG部分は、約550ダルトン～約10,000ダルトンの範囲の平均分子量を含みうる。場合によっては、PEG部分は、約750ダルトン～約5,000ダルトン（例えば、約1,000ダルトン～約5,000ダルトン、約1,500ダルトン～約3,000ダルトン、約750ダルトン～約3,000ダルトン、約750ダルトン～約2,000ダルトンなど）の平均分子量を有する。好ましい態様では、PEG部分は、約2,000ダルトンまたは約750ダルトンの平均分子量を有する。

【0116】

いくつかの態様では、粒子の凝集を阻害する複合化脂質は、式：A-W-Y（式中、Aは脂質部分であり、Wは親水性ポリマーであり、Yはポリカチオン部分である）を有するCPLである。Wは、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、またはそれらの組合せからなる群より選択されるポリマーであってもよく、そのポリマーは、約250～約7000ダルトンの分子量を有する。いくつかの態様では、Yは、選ばれたpHで少なくとも4個の正電荷を有する。いくつかの態様では、Yは、リシン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、その誘導体、またはそれらの組合せであってもよい。

10

【0117】

場合によっては、粒子の凝集を阻害する複合化脂質（例えば、PEG-脂質コンジュゲート）は、粒子中に存在する総脂質の約0.1mol%～約2mol%、約0.5mol%～約2mol%、約1mol%～約2mol%、約0.6mol%～約1.9mol%、約0.7mol%～約1.8mol%、約0.8mol%～約1.7mol%、約1mol%～約1.8mol%、約1.2mol%～約1.8mol%、約1.2mol%～約1.7mol%、約1.3mol%～約1.6mol%、約1.4mol%～約1.5mol%、または約1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）を構成しうる。

20

【0118】

本発明の脂質粒子において、活性薬剤または治療剤は、粒子の脂質部分に完全に封入されることによって、活性薬剤または治療剤を酵素分解から保護することができる。好ましい態様では、干渉性RNA（例えばsiRNA）などの核酸を含むSNALPは、粒子の脂質部分に完全に封入されることによって、核酸をヌクレアーゼ分解から保護する。場合によっては、SNALP中の核酸は、37℃で粒子をヌクレアーゼに少なくとも約20、30、45、または60分間曝露した後に実質的に分解されない。ある他の場合には、SNALP中の核酸は、血清中で粒子を37℃で少なくとも約30、45、もしくは60分間、または少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、もしくは36時間インキュベーション後に実質的に分解されない。他の態様では、活性薬剤または治療剤（例えば、siRNAなどの核酸）は、粒子の脂質部分と複合体を形成している。本発明の製剤の利点の一つは、脂質粒子組成物が、ヒトなどの哺乳動物に実質的に無毒なことである。

30

【0119】

「完全に封入された」という用語は、脂質粒子中の活性薬剤または治療剤が、遊離のDNA、RNA、またはタンパク質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もしくはプロテアーゼアッセイの後にあまり分解されないことを示す。完全に封入されたシステムでは、普通は、遊離の活性薬剤または治療剤の100%を分解するであろう処理において、好ましくは粒子中の活性薬剤または治療剤の約25%未満が分解され、さらに好ましくは粒子中の活性薬剤または治療剤の約10%未満、最も好ましくは約5%が分解される。核酸治療剤に関連して、完全な封入は、Oligreen（登録商標）アッセイにより決定できる。Oligreen（登録商標）は、溶液中のオリゴヌクレオチドおよび一本鎖DNAまたはRNAを定量するための超高感度の蛍光核酸染色である（Invitrogen Corporation; Carlsbad, CAから入手できる）。「完全に封入された」はまた、脂質粒子が血清安定性であること、すなわち、インビボ投与したときに、脂質粒子がその構成部分に迅速に分解しないことを示す。

40

【0120】

別の局面では、本発明は、複数の脂質粒子を含む脂質粒子（例えばSNALP）組成物を提供する。好ましい態様では、脂質粒子（例えばSNALP）の約30%～約100%、約40%～約100%、約50%～約100%、約60%～約100%、約70%～約100%、約80%～約100%、約90%～約100%、約3

50

0%～約95%、約40%～約95%、約50%～約95%、約60%～約95%、%、約70%～約95%、約80%～約95%、約85%～約95%、約90%～約95%、約30%～約90%、約40%～約90%、約50%～約90%、約60%～約90%、約70%～約90%、約80%～約90%、または少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）がその中に活性薬剤または治療剤を有するように、活性薬剤または治療剤（例えば核酸）は、脂質粒子（例えばSNALP）の脂質部分に完全に封入される。

#### 【0121】

典型的には、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、約1～約100の脂質：活性薬剤（例えば脂質：核酸）比（質量/質量比）を有する。ある場合に、脂質/活性薬剤（例えば、脂質/核酸）比（質量/質量比）は、約1～約50、約2～約25、約3～約20、約4～約15、または約5～約10の範囲である。好ましい態様では、本発明の脂質粒子は、約5～約15、例えば約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）の脂質/活性薬剤（例えば脂質：核酸）比（質量/質量比）を有する。

10

#### 【0122】

典型的には、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、約40nm～約150nmの平均直径を有する。好ましい態様では、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、約40nm～約130nm、約40nm～約120nm、約40nm～約100nm、約50nm～約120nm、約50nm～約100nm、約60nm～約120nm、約60nm～約110nm、約60nm～約100nm、約60nm～約90nm、約60nm～約80nm、約70nm～約120nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約70nm～約90nm、約70nm～約80nm、または約120nm、110nm、100nm、90nm、もしくは80nm未満（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）の平均直径を有する。

20

#### 【0123】

本発明の具体的な一態様では、SNALPは、(a) 標的遺伝子の発現をサイレンシングする一つまたは複数の非改変および/または改変干渉性RNA（例えば、siRNA、aiRNA、miRNA）、(b) 粒子中に存在する総脂質の約56.5mol%～約66.5mol%を構成する陽イオン性脂質；(c) 粒子中に存在する総脂質の約31.5mol%～約42.5mol%を構成する非陽イオン性脂質；ならびに(d) 粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約2mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する複合化脂質を含む。SNALPのこの具体的な態様を、本明細書において一般に「1:62」製剤と呼ぶ。好ましい態様では、陽イオン性脂質はDLinDMAまたはDLin-K-C2-DMA（「XTC2」）であり、非陽イオン性脂質はコレステロールであり、複合化脂質はPEG-DAAコンジュゲートである。これらは、1:62製剤の好ましい態様であるが、当業者は、他の陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質（他のコレステロール誘導体を含む）、および複合化脂質を本明細書に記載の1:62製剤に使用できることを認識しているであろう。

30

#### 【0124】

本発明の別の具体的な態様では、SNALPは：(a) 標的遺伝子の発現をサイレンシングする一つまたは複数の非改変および/または改変干渉性RNA（例えば、siRNA、aiRNA、miRNA）；(b) 粒子中に存在する総脂質の約52mol%～約62mol%を構成する陽イオン性脂質；(c) 粒子中に存在する総脂質の約36mol%～約47mol%を構成する非陽イオン性脂質；ならびに(d) 粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約2mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する複合化脂質を含む。SNALPのこの具体的な態様を、本明細書において一般に、「1:57」製剤と呼ぶ。好ましい一態様では、陽イオン性脂質はDLinDMAまたはDLin-K-C2-DMA（「XTC2」）であり、非陽イオン性脂質は、リン脂質（DPPCなど）とコレステロールとの混合物であり、ここで、リン脂質は、粒子中に存在する総脂質の約5mol%～約9mol%（例えば約7.1mol%）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、粒子中に存在する総脂質の約32mol%～約37mol%（例えば約34.3mol%）を構成し、PEG-脂質は、PEG-DAA（例えばPEG-cDMA）である。別の好ましい態様では、陽イオン性脂質は、DLinDMAまたはDLin-K-C2-DMA（「XTC2」）であり、非陽イオン性脂質は、リン脂質（DPPCなど）とコレステロールとの混合物であり、ここで、リン脂質は、粒子中に存在する総脂質の約15mol%～約25mol%（例えば約20mol%）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

40

50

に存在する総脂質の約15mol%～約25mol%（例えば約20mol%）を構成し、PEG-脂質は、PEG-DAA（例えばPEG-cDMA）である。これらが1:57製剤の好ましい態様であるが、当業者は、他の陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質（他のリン脂質および他のコレステロール誘導体を含む）、および複合化脂質を、本明細書に記載の1:57製剤に使用できることを認識しているであろう。

#### 【0125】

好ましい態様では、1:62 SNALP製剤は、リン脂質を含まず、約1.5mol%のPEG-cDMA（またはPEG-cDSA）、約61.5mol%のDLinDMA（またはXTC2）、および約36.9mol%のコレステロール（またはその誘導体）を含む3成分系である。他の好ましい態様では、1:57 SNALP製剤は、約1.4mol%のPEG-cDMA（またはPEG-cDSA）、約57.1mol%のDLinDMA（またはXTC2）、約7.1mol%のDPPC、および約34.3mol%のコレステロール（またはその誘導体）を含む4成分系である。なお他の好ましい態様では、1:57 SNALP製剤は、約1.4mol%のPEG-cDMA（またはPEG-cDSA）、約57.1mol%のDLinDMA（またはXTC2）、約20mol%のDPPC、および約20mol%のコレステロール（またはその誘導体）を含む4成分系である。これらのSNALP製剤は標的製剤であること、ならびにSNALP製剤中に存在する脂質（陽イオン性および非陽イオン性の両方）の量および脂質コンジュゲートの量の変動しうることを了解すべきである。

#### 【0126】

本発明はまた、本明細書に記載の脂質粒子（例えばSNALP）および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。

#### 【0127】

さらなる局面では、本発明は、細胞に一つまたは複数の活性薬剤または治療剤（例えば核酸）を導入するための方法であって、細胞と本明細書に記載の脂質粒子（例えばSNALP）とを接触させることを含む方法を提供する。一態様では、細胞は哺乳動物中にあり、哺乳動物はヒトである。別の態様では、本発明は、一つまたは複数の活性薬剤または治療剤（例えば核酸）のインビボ送達のための方法であって、哺乳動物対象に本明細書に記載の脂質粒子（例えばSNALP）を投与することを含む方法を提供する。好ましい態様では、投与様式には、非限定的に、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、および皮内が含まれる。好ましくは、哺乳動物対象はヒトである。

#### 【0128】

一態様では、注射の約8、12、24、36、または48時間後の血漿中に、脂質粒子（例えばSNALP）の総注射用量の少なくとも約5%、10%、15%、20%、または25%が存在する。他の態様では、注射の約8、12、24、36、または48時間後の血漿中に、脂質粒子（例えばSNALP）の総注射用量の約20%、30%、40%より多い率、および約60%、70%または80%と同率が存在する。場合によっては、投与後約1時間の哺乳動物の血漿中に、複数の粒子の約10%以上が存在する。ある他の場合には、脂質粒子（例えばSNALP）の存在は、粒子の投与の少なくとも約1時間後に検出可能である。ある態様では、干渉性RNA（例えばsiRNA）などの活性薬剤または治療剤の存在は、投与の約8、12、24、36、48、60、72または96時間後に、肺、肝臓、腫瘍、または炎症部位の細胞から検出可能である。他の態様では、干渉性RNA（例えばsiRNA）などの活性薬剤または治療剤による標的配列の発現の下方調節は、投与の約8、12、24、36、48、60、72または96時間後に検出可能である。なお他の態様では、干渉性RNA（例えばsiRNA）などの活性薬剤または治療剤による標的配列の発現の下方調節は、腫瘍細胞または炎症部位の細胞に優先的に起こる。さらなる態様では、投与部位から近位もしくは遠位の部位の細胞、または肺、肝臓、もしくは腫瘍の細胞における干渉性RNA（例えばsiRNA）などの活性薬剤または治療剤の存在または効果は、投与の約12、24、48、72、もしくは96時間後、または約6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26、もしくは28日後に検出可能である。追加的な態様では、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、非経口的または腹腔内に投与される。

#### 【0129】

いくつかの態様では、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、干渉性RNA配列（例えばsiRNA）を含む一つまたは複数の核酸の治療的送達のための方法に特に有用である。特に、

関心対象の一つまたは複数の標的核酸配列または遺伝子の転写および/または翻訳を下方調節またはサイレンシングすることにより、哺乳動物（例えば、マウスなどのげっ歯類、またはヒト、チンパンジー、もしくはサルなどの霊長類）における疾患または障害を処置するためのインビトロおよびインビボ法を提供することが、本発明の目的である。非限定的な例として、本発明の方法は、哺乳動物対象の肝臓および/または腫瘍への干渉性RNA（例えばsiRNA）のインビボ送達に有用である。ある態様では、疾患または障害は、遺伝子の発現および/または過剰発現と関連し、遺伝子の発現または過剰発現は、干渉性RNA（例えばsiRNA）により減少する。ある他の態様では、治療有効量の脂質粒子（例えばSNALP）を哺乳動物に投与することができる。ある場合には、干渉性RNA（例えばsiRNA）をSNALPに製剤化し、そのような処置を必要とする患者にその粒子を投与する。他の場合には、細胞を患者から取り出し、干渉性RNA（例えばsiRNA）をインビトロ送達し（例えば、本明細書に記載のSNALPを使用して）、患者にその細胞を再注入する。

10

## 【0130】

追加的な局面では、本発明は、標的遺伝子の発現をサイレンシングする非対称干渉性RNA (aiRNA) 分子を含む脂質粒子（例えばSNALP）、および標的遺伝子の発現をサイレンシングするためにそのような粒子を使用する方法を提供する。

## 【0131】

一態様では、aiRNA分子は、約10～約25（塩基対の）ヌクレオチド長の二本鎖（二重鎖）領域を含み、ここで、aiRNA分子は、5'および3'オーバーハングを含むアンチセンス鎖を含み、ここで、aiRNA分子は、標的遺伝子の発現をサイレンシングすることができる。

20

## 【0132】

場合によっては、aiRNA分子は、約12～20、12～19、12～18、13～17、または14～17（塩基対の）ヌクレオチド長の、さらに典型的には12、13、14、15、16、17、18、19、または20（塩基対の）ヌクレオチド長の二本鎖（二重鎖）領域を含む。ある他の場合には、アンチセンス鎖の5'および3'オーバーハングは、標的RNA配列に相補的な配列を含み、場合により、さらに非ターゲティング配列を含みうる。いくつかの態様では、アンチセンス鎖の5'および3'オーバーハングのそれぞれは、1、2、3、4、5、6、7、またはそれ以上のヌクレオチドを含むか、またはそれから成る。

## 【0133】

他の態様では、aiRNA分子は、2'OMeヌクレオチド、2'Fヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-MOEヌクレオチド、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改変ヌクレオチドを含む。好ましい態様では、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から選択することができる。

30

## 【0134】

関連する局面では、本発明は、標的遺伝子の発現をサイレンシングするマイクロRNA (miRNA) 分子を含む脂質粒子（例えばSNALP）および標的遺伝子の発現をサイレンシングするためにそのような組成物を使用する方法を提供する。

## 【0135】

一態様では、miRNA分子は、約15～約60ヌクレオチド長を含み、ここで、miRNA分子は、標的遺伝子の発現をサイレンシングすることができる。

40

## 【0136】

場合によっては、miRNA分子は、約15～50、15～40、または15～30ヌクレオチド長、さらに典型的には約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。好ましい態様では、miRNA分子は、関心対象のRNA配列をターゲティングする成熟miRNA分子である。

## 【0137】

いくつかの態様では、miRNA分子は、2'OMeヌクレオチド、2'Fヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-O-MOEヌクレオチド、LNAヌクレオチド、およびそれらの混合物から

50

なる群より選択される改変ヌクレオチドを含む。好ましい態様では、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することができる。

【0138】

このように、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、循環中で安定であって、血管外部にアクセスできる薬力学的挙動に必要な大きさであって、そして標的細胞集団に到達することができることから、対象（例えばヒトなどの哺乳動物）への核酸（例えば、siRNA、aiRNA、および/またはmiRNAなどの干渉性RNA）などの活性薬剤または治療剤の投与に使用することに有利および好適である。

10

【0139】

#### IV. 活性薬剤

活性薬剤（例えば治療剤）には、細胞、組織、器官、または対象に所望の効果を発揮することのできる任意の分子または化合物が含まれる。そのような効果は、例えば、生物学的、生理学的、および/または美容のためでありうる。活性薬剤は、非限定的に、核酸、ペプチド、ポリペプチド、小分子、およびそれらの混合物を含めた任意の種類分子または化合物でありうる。核酸の非限定的な例には、干渉性RNA分子（例えば、siRNA、aiRNA、miRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド、リボザイム、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、およびそれらの混合物が含まれる。ペプチドまたはポリペプチドの例には、非限定的に、抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体断片；ヒト化抗体、組換え抗体、組換えヒト抗体、Primatized（商標）抗体）、サイトカイン、成長因子、アポトーシス因子、分化誘導因子、細胞表面受容体およびそのリガンド、ホルモン、ならびにそれらの混合物が含まれる。小分子の例には、非限定的に、当業者に公知の、任意の従来薬剤または薬物などの有機小分子または化合物が含まれる。

20

【0140】

いくつかの態様では、活性薬剤は、治療剤またはその塩もしくは誘導体である。治療剤の誘導体は、それ自体治療的に活性であってもよく、またはさらなる改変により活性になるプロドラッグであってもよい。したがって、一態様では、治療剤の誘導体は、非改変の薬剤に比べて一部または全ての治療活性を保持する一方で、別の態様では、治療剤の誘導体は、治療活性を欠如するが、さらに改変されると活性になるプロドラッグである。

30

【0141】

#### A. 核酸

ある態様では、本発明の脂質粒子は、核酸と関連し、核酸-脂質粒子（例えばSNALP）を生じる。いくつかの態様では、核酸は、脂質粒子に完全に封入されている。本明細書において使用する「核酸」という用語には、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが含まれ、最大60個のヌクレオチドを有する断片が、一般にオリゴヌクレオチドと呼ばれ、より長い断片は、ポリヌクレオチドと呼ばれる。特定の態様では、本発明のオリゴヌクレオチドは、約15～約60ヌクレオチド長である。核酸は、本発明の脂質粒子に入れて単独で、または、ペプチド、ポリペプチド、もしくは従来薬物などの小分子を含む本発明の脂質粒子と組合せて、投与（例えば同時投与）することができる。

40

【0142】

本発明の文脈で、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然塩基、糖および糖間（主鎖）結合から成るヌクレオチドまたはヌクレオシドのモノマーのポリマーまたはオリゴマーを指す。「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語には、また、非天然モノマーまたはその部分を含む、同じように機能するポリマーまたはオリゴマーが含まれる。そのような改変または置換されたオリゴヌクレオチドは、例えば、細胞取込み増強、免疫原性の低減、およびヌクレアーゼ存在下での安定性増加などの性質のせいで、多くの場合で天然型よりも好ましい。

【0143】

オリゴヌクレオチドは、一般に、デオキシリボオリゴヌクレオチドまたはリボオリゴヌ

50

クレオチドとして分類される。デオキシリボオリゴヌクレオチドは、デオキシリボースと呼ばれる五炭糖が、この糖の5'および3'の炭素で交互にリン酸に共有結合して、非分枝ポリマーを形成したものから成る。リボオリゴヌクレオチドは、五炭糖がリボースの類似の繰り返し構造から成る。

#### 【0144】

本発明の脂質-核酸粒子に存在する核酸には、公知の任意の形態の核酸が含まれる。本明細書に使用される核酸は、一本鎖DNAもしくはRNA、または二本鎖DNAもしくはRNA、またはDNA-RNAハイブリッドでありうる。二本鎖DNAの例が本明細書に記載されているが、それらには、例えば、構造遺伝子、制御領域および終止領域を含む遺伝子、およびウイルスDNAまたはプラスミドDNAなどの自己複製システムが含まれる。二本鎖RNAの例が本明細書に

10

#### 【0145】

本発明の核酸は、一般に核酸の特定の形態に応じて様々な長さでありうる。例えば、特定の態様では、プラスミドまたは遺伝子は、約1,000~約100,000ヌクレオチド残基長でありうる。特定の態様では、オリゴヌクレオチドは、約10~約100ヌクレオチド長の範囲でありうる。様々な関連する態様では、一本鎖、二本鎖、および三本鎖のいずれのオリゴヌクレオチドも、約10~約60ヌクレオチド長、約15~約60ヌクレオチド長、約20~約50ヌクレオチド長、約15~約30ヌクレオチド長、または約20~約30ヌクレオチド長の範囲であり

20

#### 【0146】

特定の態様では、本発明のオリゴヌクレオチド(またはその鎖)は、標的ポリヌクレオチド配列に、特異的にハイブリダイズするかまたは相補的である。本明細書において使用する「特異的にハイブリダイズ可能な」および「相補的」という用語は、DNAまたはRNA標的とオリゴヌクレオチドの間に安定で特異的な結合が起きるために十分な程度の相補性を示す。特異的にハイブリダイズ可能であるために、オリゴヌクレオチドがその標的核酸配列に100%相補的である必要はないことが了解されている。好ましい態様では、特異的結合が望まれる条件で、すなわちインビボアッセイもしくは治療的処置の場合に生理的条件下、またはインビトロアッセイの場合にアッセイが行われる条件で、標的配列へのオリゴヌクレオチドの結合が標的配列の正常な機能を妨害して、それからの有用性または発現を欠如させ、かつ非標的配列へのオリゴヌクレオチドの非特異的結合を避けるために十分な程度の相補性がある場合に、そのオリゴヌクレオチドは特異的にハイブリダイズ可能である。したがって、オリゴヌクレオチドは、それがターゲティングしている、またはそれが特異的にハイブリダイズする遺伝子またはmRNA配列の領域に比べて、1、2、3、またはそれ以上の塩基置換を含みうる。

30

#### 【0147】

##### 1. siRNA

本発明の核酸-脂質粒子のsiRNA構成要素は、関心対象の標的遺伝子の発現をサイレンシングすることができる。siRNA二重鎖の各鎖は、典型的には約15~約60ヌクレオチド長、好ましくは約15~約30ヌクレオチド長である。ある態様では、siRNAは、少なくとも一つの改変ヌクレオチドを含む。改変siRNAは一般に、対応する非改変siRNA配列よりも免疫刺激性が低く、関心対象の標的遺伝子に対するRNAi活性を保持する。いくつかの態様では、改変siRNAは、2'OMe-グアノシン、2'OMe-ウリジン、2'OMe-アデノシン、および/または2'OMe-シトシンヌクレオチドなどの、少なくとも1個の2'OMeプリンまたはピリミジンヌクレオチドを有する。好ましい態様では、一つまたは複数のウリジンおよび/またはグアノシンヌクレオチドが改変されている。改変ヌクレオチドは、siRNAの片方の鎖(すなわち、センスまたはアンチセンス)または両方の鎖に存在しうる。siRNA配列は、オーバーハング(例えば、Elbashir et al., Genes Dev., 15 188 (2001) またはNykanen et al., Cell, 107:309 (2001) に記載されているような3'または5'オーバーハング)を有することが

40

50

あるか、またはオーバーハングを欠如することがある（すなわち平滑末端を有する）。

【0148】

改変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%）の改変ヌクレオチドを含む。ある態様では、siRNAの二本鎖領域中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のヌクレオチドが改変ヌクレオチドを含む。

【0149】

いくつかの態様では、siRNAの二本鎖領域中のヌクレオチドの約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）が改変ヌクレオチドを含む。

10

【0150】

他の態様では、siRNAの二本鎖領域中のヌクレオチドの約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%、24%～25%等）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%、19%～20%、1%～19%、2%～19%、3%～19%、4%～19%、5%～19%、6%～19%、7%～19%、8%～19%、9%～19%、10%～19%、11%～19%、12%～19%、13%～19%、14%～19%、15%～19%、16%～19%、17%～19%、18%～19%、1%～18%、2%～18%、3%～18%、4%～18%、5%～18%、6%～18%、7%～18%、8%～18%、9%～18%、10%～18%、11%～18%、12%～18%、13%～18%、14%～18%、15%～18%、16%～18%、17%～18%、1%～17%、2%～17%、3%～17%、4%～17%、5%～17%、6%～17%、7%～17%、8%～17%、9%～17%、10%～17%、11%～17%、12%～17%、13%～17%、14%～17%、15%～17%、16%～17%、1%～16%、2%～16%、3%～16%、4%～16%、5%～16%、6%～16%、7%～16%、8%～16%、9%～16%、10%～16%、11%～16%、12%～16%、13%～16%、14%～16%、15%～16%、1%～15%、2%～15%、3%～15%、4%～15%、5%～15%、6%～15%、7%～15%、8%～15%、9%～15%、10%～15%、11%～15%、12%～15%、13%～15%、14%～15%等）が改変ヌクレオチドを含む。

20

30

【0151】

例えばsiRNAの片方または両方の鎖のウリジンおよび/またはグアノシンヌクレオチドが選択的に改変されている場合のさらなる態様では、結果として生じた改変siRNAは、約30%未満の改変ヌクレオチド（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%、または1%未満の改変ヌクレオチド）または約1%～約30%の改変ヌクレオチド（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%、または29%～30%の改変ヌクレオチド）を含みうる。

40

【0152】

a. siRNA配列の選択

適切なsiRNA配列は、当技術分野で公知の任意の手段を用いて同定することができる。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)に記載された方法を、Reynolds et al., Nature Biotech., 22(3):326-330(2004)に示された合理的設計基準と組合せる。

【0153】

一般に、ジヌクレオチド配列（例えば、AA、NA、CC、GG、またはUU、ここで、N=C、G、またはU）を求めて、関心対象の標的遺伝子からの転写物のAUG開始コドンの3'のヌクレオ

50

チド配列を入念に調べる（例えば、Elbashir et al., EMBO J., 20:6877-6888 (2001)を参照）。ジヌクレオチド配列の3'に隣接するヌクレオチドを潜在的siRNA配列（すなわ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3'に隣接する19、21、23、25、27、29、31、33、35個、またはそれ以上のヌクレオチドを潜在的siRNA配列として同定する。いくつかの態様では、ジヌクレオチド配列は、AAまたはNA配列であり、AAまたはNAジヌクレオチドの3'に隣接する19個のヌクレオチドを潜在的siRNA配列として同定する。通常は、標的遺伝子の全長に沿った異なる位置に間隔を置いてsiRNA配列を配置する。siRNA配列のサイレンシング効率をさらに高めるために、潜在的siRNA配列を分析して、例えば標的細胞または生物における他のコード配列との相同領域を有さない部位を同定することができる。例えば、約21塩基対の適切なsiRNA配列は、典型的には、標的細胞または生物におけるコード配列に相同な16~17塩基対より多い連続塩基対を有さないであろう。siRNA配列をRNA Pol IIIプロモーターから発現させるつもりならば、4個より多い連続するAまたはTを欠如したsiRNA配列を選択する。

10

20

30

40

50

#### 【0154】

いったん、潜在的siRNA配列が同定されたならば、相補的配列（すなわち、アンチセンス鎖配列）を設計することができる。潜在的siRNA配列はまた、当技術分野で公知の様々な基準を用いて分析することができる。例えば、それらのサイレンシング効率を高めるために、合理的設計アルゴリズムによりsiRNA配列を分析して、一つまたは複数の以下の特徴を有する配列を同定することができる：（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）内部繰り返し配列なし；（4）センス鎖の19位にA；（5）センス鎖の3位にA；（6）センス鎖の10位にU；（7）センス鎖の19位にG/Cなし；および（8）センス鎖の13位にGなし。これら各特徴の適切な値を割り当てる、かつsiRNAの選択に有用であるアルゴリズムを組み込んでいるsiRNAの設計ツールは、例えば、<http://boz094.ust.hk/RNAi/siRNA>に見出すことができる。当業者は、一つまたは複数の上述の特性を有する配列を潜在的siRNA配列として、さらなる分析および検査のために選択することができることを認識しているであろう。

#### 【0155】

追加的に、一つまたは複数の以下の基準を満たす潜在的siRNA配列を、siRNAとしては、多くの場合、排除することができる：（1）連続する4個またはそれ以上の同じ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（すなわち、これらのポリマーの構造的特性が原因となる、可能性のある非特異性効果を低減するため）；（3）3塩基モチーフ（例えば、GGG、CCC、AAA、またはTTT）を含む配列；（4）連続する7個またはそれ以上のG/Cのストレッチを含む配列；および（5）内部折り返し構造を生じる4個またはそれ以上の塩基の直列反復配列を候補内を含む配列。しかし、当業者は、さらなる分析および検査のために、前述の特徴の一つまたは複数を含む配列をなお潜在的siRNA配列として選択できることを認識しているであろう。

#### 【0156】

いくつかの態様では、潜在的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)に記載されたようなsiRNA二重鎖の非対称性にに基づき、さらに分析することができる。他の態様では、潜在的siRNA配列は、例えば、Luo et al., Biophys. Res. Commun., 318:303-310 (2004)に記載されたように、標的部位での二次構造に基づき、さらに分析することができる。例えば、Mfoldアルゴリズム（<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>から入手可能）を使用して標的部位での二次構造をモデル化することで、標的部位でのアクセス可能性に有利に働く、塩基対およびステム-ループの形態の二次構造がより少なく存在するsiRNA配列を選択することができる。

#### 【0157】

いったん潜在的siRNA配列が同定されたならば、例えば、インビトロサイトカインアクセイまたはインビボ動物モデルを使用して、任意の免疫刺激性の存在についてその配列を分析することができる。GU-リッチのモチーフ（例えば、5'-GU-3'、5'-UGU-3'、5'-GUGU-

3'、5'-UGUGU-3'等)などの、siRNA配列のセンスおよび/またはアンチセンス鎖のモチーフもまた、その配列が免疫刺激性でありうるかどうかの指標を提供することができる。いったんsiRNA分子が免疫刺激性と見い出されたならば、次に本明細書に記載するようにそれを改変してその免疫刺激性を減少させることができる。非限定的な例として、哺乳動物レスポナー細胞が検出可能な免疫反応を生成する条件で、その細胞とsiRNA配列を接触させて、siRNAが免疫刺激性siRNAであるか、それとも非免疫刺激性siRNAであるかを決定することができる。哺乳動物レスポナー細胞は、未処理の哺乳動物(すなわちsiRNA配列の遺伝子生成物に以前に接触していない哺乳動物)由来であってもよい。哺乳動物レスポナー細胞は、例えば、末梢血単核細胞(PBMC)、マクロファージ等であってもよい。検出可能な免疫反応は、例えば、TNF-、IFN-、IFN-、IFN-、IL-6、IL-12、またはそれらの組合せなどのサイトカインまたは成長因子の生成を含みうる。次に、センスおよび/またはアンチセンス鎖の少なくとも1個のヌクレオチドを改変ヌクレオチドと置換することにより、免疫刺激性であると同定されたsiRNA分子を改変してその免疫刺激性を減少させることができる。例えば、siRNA二重鎖の二本鎖領域中のヌクレオチドの約30%未満(例えば、約30%、25%、20%、15%、10%、または5%未満)を、2'OMeヌクレオチドなどの改変ヌクレオチドと置き換えることができる。次に、上記のように哺乳動物レスポナー細胞と改変siRNAを接触させて、その免疫刺激性が低減したことまたは抑止されたことを確認することができる。

10

#### 【0158】

免疫反応を検出するために適したインビトロアッセイには、非限定的に、Davidら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法(米国特許第4,376,110号);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., Kirkham and Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. and S. Livingstone, Edinburgh(1970));Gordonらの「ウエスタンブロット」法(米国特許第4,452,901号);標識リガンドの免疫沈降(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結合免疫吸着アッセイ(ELISA);蛍光色素の使用を含めた免疫細胞化学技法(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。上記イムノアッセイに加えて、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めた、多くの他のイムノアッセイを利用することができる。これらの参考文献の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

20

30

#### 【0159】

免疫反応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。ある態様では、アッセイは、以下のように行うことができる:(1)siRNAは、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)血液は、投与の約6時間後に心臓穿刺により採取し、サイトカイン分析用に血漿として処理することができる;(3)サイトカインは、製造業者の説明書に準じてサンドイッチELISAキットを使用して定量することができる(例えば、マウスおよびヒトIFN- (PBL Biomedical; Piscataway, NJ);ヒトIL-6およびTNF- (eBioscience, San Diego, CA);ならびにマウスIL-6、TNF-、およびIFN- (BD Biosciences; San Diego, CA))。

40

#### 【0160】

サイトカインおよび成長因子と特異的に結合するモノクローナル抗体は、多数の販売元から市販されており、及び当技術分野で公知の方法を用いて産生することができる(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)を参照)。モノクローナル抗体の産生は、これまでに記載されており、当技術分野で公知の任意の手段により達成することができる(Buhring et al., Hybridoma, Vol.10, No.1, pp.77-78(1

50

991) )。いくつかの方法では、検出を容易にするために、モノクローナル抗体を標識する(分光学的、光化学的、生化学的、電気的、光学的、または化学的手段により検出可能な任意の組成物を用いて)。

【0161】

b. siRNA分子の産生

siRNAは、いくつかの形態で、例えば、一つまたは複数の単離された低分子干渉性RNA (siRNA) 二重鎖として、より長鎖の二本鎖RNA (dsRNA) として、またはDNAプラスミド中の転写カセットから転写されたsiRNAもしくはdsRNAなどとして、提供することができる。siRNA配列は、オーバーハング(例えば、Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188(2001)またはNykanen et al., *Cell*, 107:309(2001)に記載されたような3'または5'オーバーハング)を有することがあるか、またはオーバーハングを欠如することがある(すなわち平滑末端を有する)。

10

【0162】

長鎖前駆RNAを提供するためにRNA集団を使用することができる、または選択された標的配列に実質的もしくは完全な同一性を有する長鎖前駆RNAを使用してsiRNAを製造することができる。当業者に周知の方法により、RNAを細胞もしくは組織から単離、合成、および/またはクローニングすることができる。RNAは、混合集団(細胞または組織から得られた、cDNAから転写された、サブトラクションされた、選択された等)であることができる、または単一の標的配列を表すことができる。RNAは、天然(例えば、組織または細胞試料から単離された)であることもできる、またはインビトロ合成(例えば、T7またはSP6ポリメラーゼおよびPCR生成物またはクローニングされたcDNAを使用して)もしくは化学合成されることができる。

20

【0163】

合成RNAについて長鎖dsRNAを形成させるために、相補体もまたインビトロで転写し、ハイブリダイズさせて、dsRNAを形成させる。天然RNA集団を使用する場合には、例えば、RNA集団に対応するcDNAを転写すること、またはRNAポリメラーゼを使用することによって、RNA相補体(例えば、大腸菌RNAse IIIまたはDicerによる消化用にdsRNAを形成させるための)がまた提供される。次に、前駆RNAをハイブリダイズさせて、消化用に二本鎖RNAを形成させる。dsRNAsは、対象に直接投与することができる、または投与前にインビトロ消化することができる。

30

【0164】

RNAを単離すること、RNAを合成すること、核酸をハイブリダイズすること、cDNAライブラリーを作製することおよびスクリーニングすること、ならびにPCRを実施するための方法は、当技術分野で周知であり(例えば、Gubler and Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); 前記Sambrook et al.; 前記Ausubel et al.を参照)、PCR法も同様である(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)を参照)。発現ライブラリーもまた当業者に周知である。本発明に有用な一般法を開示している追加的な基礎テキストには、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)が挙げられる。これらの参考文献の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

40

【0165】

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)に記載されたものなどの、当技術分野で公知の任意の様々な技法を用いて合成することができる。オリゴヌクレオチドの合成は、5'末端にジメトキシトリチルおよび3'末端にホスホルアミダイトなどの通常の核酸保護基およびカップリング基を利用する。非限定的な例として、Applied Biosystems

50

の合成装置で0.2  $\mu\text{mol}$ 規模のプロトコールを使用して小規模合成を行うことができる。または、0.2  $\mu\text{mol}$ 規模の合成は、Protogene (Palo Alto, CA) からの96ウェルプレート合成装置で行うことができる。しかし、大規模または小規模合成は、同様に、本発明の範囲内である。オリゴヌクレオチドの合成に適した試薬、RNAの脱保護法、およびRNAの精製法は、当業者に公知である。

#### 【0166】

siRNA分子はまた、タンデム合成技法により合成することができ、タンデム合成技法では、両方の鎖は、切断可能なリンカーで隔離された、単一の連続するオリゴヌクレオチド断片または鎖として合成され、続いてそのリンカーが切断されて別々の断片または鎖を提供し、それらがハイブリダイズしてsiRNA二重鎖を形成する。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ることができる。siRNAのタンデム合成は、マルチウェル/マルチプレート合成プラットフォームおよびバッチリアクター、合成カラムなどを用いる大規模合成プラットフォームの両方に容易に適應させることができる。または、siRNA分子は、一方のオリゴヌクレオチドがsiRNAのセンス鎖を含み、もう一本がsiRNAのアンチセンス鎖を含む、二つの異なるオリゴヌクレオチドから集合させることができる。例えば、各鎖を別々に合成して、合成および/または脱保護の後にハイブリダイゼーションまたはライゲーションにより一緒にすることができる。ある他の場合には、単一の連続オリゴヌクレオチド断片としてsiRNA分子を合成することができ、その断片では、自己相補的なセンスおよびアンチセンス領域がハイブリダイズして、ヘアピン型二次構造を有するsiRNA二重鎖を形成する。

10

20

#### 【0167】

##### c. siRNA配列の改変

ある局面では、siRNA分子は、2本の鎖および二本鎖領域に少なくとも一つの改変ヌクレオチド有する二重鎖を含み、ここで、各鎖は、約15~約60ヌクレオチド長である。好都合には、改変siRNAは、対応する非改変siRNA配列よりも免疫刺激性が低いが、標的配列の発現をサイレンシングする能力を保持する。好ましい態様では、siRNA分子に導入される化学的改変の程度は、siRNAの免疫刺激性の減少または抑止とRNAi活性の保持を比較検討する。非限定的な例として、関心対象の遺伝子をターゲティングするsiRNA分子は、siRNAにより発生する免疫反応を排除する一方で、標的遺伝子の発現をサイレンシングする能力を保持するように、siRNA二重鎖内で選択的なウリジンおよび/またはグアノシンヌクレオチドを最低限に改変することができる(例えば、約30%、25%、20%、15%、10%、または5%未満の改変)。

30

#### 【0168】

本発明に使用するために適した改変ヌクレオチドの例は、非限定的に、2'-O-メチル(2'OMe)、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'F)、2'-デオキシ-5-C-メチル、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)、4'-チオ、2'-アミノ、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。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改変ヌクレオチドもまた、siRNA分子での使用に適する。そのような改変ヌクレオチドには、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。場合によっては、本明細書に記載されるsiRNA分子には、一つまたは複数のG-クランプヌクレオチドが含まれる。G-クランプヌクレオチドは、改変シトシンアナログを指し、その改変は、二重鎖内の相補的グアニンヌクレオチドのWatson-Crick面とHoogsteen面の両方に水素結合の能力を付与する(例えば、Lin et al., J. Am. Chem. Soc., 120:8531-8532 (1998)を参照)。加えて、例えば、C-フェニル、C-ナフチル、他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、および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-ニトロインドールなどのニトロアゾール誘導体などの、ヌクレオ

40

50

チド塩基アナログを有するヌクレオチド（例えば、Loakes, Nucl. Acids Res., 29:2437-2447（2001）を参照）をsiRNA分子に組み入れることができる。

【0169】

ある態様では、siRNA分子は、末端キャップ部分、リン酸主鎖改変等の一つまたは複数の化学的改変をさらに含む。末端キャップ部分の例には、非限定的に、逆位デオキシ脱塩基残基、グリセリル改変、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、環状炭素ヌクレオチド、1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド、 $\beta$ -ヌクレオチド、改変塩基ヌクレオチド、トレオ-ペンツ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'-逆位ヌクレオチド部分、3'-3'-逆位脱塩基部分、3'-2'-逆位ヌクレオチド部分、3'-2'-逆位脱塩基部分、5'-5'-逆位ヌクレオチド部分、5'-5'-逆位脱塩基部分、3'-5'-逆位デオキシ脱塩基部分、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'-リン酸、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、および架橋または非架橋メチルホスホネートまたは5'-メルカプト部分（例えば、米国特許第5,998,203号、Beaucage et al., Tetrahedron 49 1925 (1993)を参照）が含まれる。ホスフェート主鎖改変（すなわち改変ヌクレオチド間結合を生じる）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基が含まれる（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 Oligonucleotide, in Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, 24-39 (1994)を参照）。そのような化学的改変は、siRNAのセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端および/または3'末端に起こりうる。これらの参照の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組み入れられる。

【0170】

いくつかの態様では、siRNA分子のセンスおよび/またはアンチセンス鎖は、さらに、約1~約4個の（例えば、1、2、3、または4個の）2'-デオキシリボヌクレオチドならびに/または改変および非改変ヌクレオチドの任意の組合せを有する3'末端オーバーハングを含むことがある。siRNA分子に導入できる改変ヌクレオチドおよび化学的改変の種類追加的な例は、例えば、UK特許第GB2,397,818 Bおよび米国特許出願公開第20040192626号、第20050282188号、および第20070135372号に記載されており、それらの開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組み入れられる。

【0171】

本明細書に記載されるsiRNA分子は、場合により、siRNAの一方または両方の鎖の一つまたは複数の非ヌクレオチドを含むことがある。本明細書において使用する「非ヌクレオチド」という用語は、糖および/またはリン酸置換などのように、一つまたは複数のヌクレオチドユニットの代わりに核酸鎖に組み入れることができる任意の基または化合物であって、残りの塩基にその活性を示させる基または化合物を指す。その基または化合物は、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシル、またはチミンなどの通常認識されるヌクレオチドを有さないことから、1'位に塩基を欠如する点で脱塩基性である。

【0172】

他の態様では、siRNAの化学的改変は、siRNA分子にコンジュゲートを結合させることを含む。例えば生分解性リンカーの共有結合により、siRNAのセンスおよび/またはアンチセンス鎖の5'および/または3'末端にコンジュゲートを結合させることができる。例えば、

カルバメート基または他の連結基により、siRNAにコンジュゲートを結合させることもできる（例えば、米国特許出願公開第20050074771号、第20050043219号、および第20050158727号を参照）。場合によっては、コンジュゲートは、siRNAの細胞への送達を容易にする分子である。siRNAとの結合に適したコンジュゲート分子の例には、非限定的に、コレステロールなどのステロイド、ポリエチレングリコール（PEG）などのグリコール、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、細胞の取込みを仲介できる細胞性受容体のリガンド、およびそれらの組合せが含まれる（例えば、米国特許出願公開第20030130186、20040110296号、および第20040249178号、米国特許第6,753,423号を参照）。他の例には米国特許出願公開第20050119470号および第20050107325号に記載された、親油性部分、ビタミン、ポリマー、ペプチド、タンパク質、核酸、小分子、オリゴ糖、炭水化物クラスター、インターカレーター、副溝結合剤、切断剤、および架橋剤コンジュゲート分子が含まれる。また他の例には米国特許出願公開第20050153337号に記載された、2'-O-アルキルアミン、2'-O-アルコキシアリルアミン、ポリアミン、C5-陽イオン性改変ピリミジン、陽イオン性ペプチド、グアニジウム基、アミジニウム基、陽イオン性アミノ酸コンジュゲート分子が含まれる。追加的な例には米国特許出願公開第20040167090号に記載された、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、相互作用改変因子、および立体安定剤コンジュゲート分子が含まれる。さらなる例には、米国特許出願公開第20050239739号に記載されたコンジュゲート分子が含まれる。使用されるコンジュゲートの種類およびsiRNA分子へのコンジュゲーションの程度は、RNAi活性を保持しながらのsiRNAの薬物動態プロファイル、バイオアベイラビリティ、および/または安定性の改善について評価することができる。このように、当業者は、様々な周知のインビトロ細胞培養またはインビボ動物モデルのいずれかを用いて様々なコンジュゲートが結合したsiRNA分子をスクリーニングして、改善された性質および完全なRNAi活性を有するsiRNA分子を同定することができる。上記特許文書の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

#### 【0173】

##### d. 標的遺伝子

関心対象の遺伝子の翻訳（すなわち発現）を下方調節またはサイレンシングするために、本明細書に記載された核酸-脂質粒子のsiRNA構成要素を使用することができる。関心対象の遺伝子には、非限定的に、ウイルス感染および/または生存に関連する遺伝子、代謝性疾患および障害に関連する遺伝子（例えば肝疾患および肝障害）、腫瘍形成および細胞形質転換に関連する遺伝子（例えばがん）、血管新生遺伝子、炎症反応および自己免疫反応に関連する遺伝子などの免疫調節因子遺伝子、リガンド受容体遺伝子、ならびに神経変性障害に関連する遺伝子が含まれる。

#### 【0174】

ウイルス感染および生存に関連する遺伝子には、細胞において結合、侵入、および複製するためにウイルスにより発現される遺伝子が含まれる。特に関心対象なのは、慢性ウイルス疾患に関連するウイルス配列である。特に関心対象のウイルス配列には、エボラ（Ebola）ウイルスおよびマールブルグ（Marburg）ウイルスなどのフィロ（Filoviridae）ウイルス（例えば、Geisbert et al., *J. Infect. Dis.*, 193:1650-1657 (2006)を参照）；ラッサ（Lassa）熱ウイルス、フニン（Junin）ウイルス、マチュポ（Machupo）ウイルス、グアナリト（Guanarito）ウイルス、およびサビア（Sabia）ウイルスなどのアレナ（Arenaviridae）ウイルス（Buchmeier et al., *Arenaviridae: the viruses and their replication*, *FIELD'S VIROLOGY*, Knipe et al. (eds.), 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, (2001)）；A、B、およびC型インフルエンザウイルスなどのインフルエンザウイルス（例えば、Steinhauer et al., *Annu Rev Genet.*, 36:305-332 (2002)；およびNeumann et al., *J Gen Virol.*, 83:2635-2662 (2002)を参照）；肝炎ウイルス（例えば、Hamasaki et al., *FEBS L*

10

20

30

40

50

ett., 543:51 (2003); Yokota et al., *EMBO Rep.*, 4:602 (2003); Schlomai et al., *Hepatology*, 37:764 (2003); Wilson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2783 (2003); Kapadia et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2014 (2003); および *FIELDS VIROLOGY*, Knipe et al. (eds.), 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (2001) を参照); ヒト免疫不全ウイルス (HIV) (Banerjee et al., *Mol. Ther.*, 8:62 (2003); Song et al., *J. Virol.*, 77:7174 (2003); Stephenson, *JAMA*, 289:1494 (2003); Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:183 (2003)); ヘルペスウイルス (Jia et al., *J. Virol.*, 77:3301 (2003)); および ヒトパピローマウイルス (HPV) (Hall et al., *J. Virol.*, 77:6066 (2003); Jiang et al., *Oncogene*, 21:6041 (2002)) の配列が含まれる。

10

## 【0175】

サイレンシングすることのできる例示的なフィロウイルス核酸配列には、非限定的に、構造タンパク質 (例えば、VP30、VP35、核タンパク質 (NP)、ポリメラーゼタンパク質 (L-pol)) をコードする核酸配列および膜関連タンパク質 (例えば、VP40、糖タンパク質 (GP)、VP24) をコードする核酸配列が含まれる。エボラウイルスに関する完全ゲノム配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 NC\_002549; AY769362; NC\_006432; NC\_004161; AY729654; AY354458; AY142960; AB050936; AF522874; AF499101; AF272001; および AF086833 に示される。エボラウイルス VP24 の配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 U77385 および AY058897 に示される。エボラウイルス L-pol の配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 X67110 に示される。エボラウイルス VP40 の配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 AY058896 に示される。エボラウイルス NP の配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 AY058895 に示される。エボラウイルス GP の配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 AY058898; Sanchez et al., *Virus Res.*, 29:215-240 (1993); Will et al., *J. Virol.*, 67:1203-1210 (1993); Volchkov et al., *FEBS Lett.*, 305:181-184 (1992); および 米国特許第 6,713,069 号 に示される。追加的なエボラウイルスの配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 L11365 および X61274 に示される。マールブルグウイルスに関する完全ゲノム配列は、例えば Genbankアクセッション番号 NC\_001608; AY430365; AY430366; および AY358025 に示される。マールブルグウイルス GP の配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 AF005734; AF005733; および AF005732 に示される。マールブルグウイルス VP35 の配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 AF005731 および AF005730 に示される。追加的なマールブルグウイルスの配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 X64406; Z29337; AF005735; および Z12132 に示される。エボラウイルスおよびマールブルグウイルスの核酸配列をターゲティングする siRNA 分子の非限定的な例には、米国特許出願公開第 20070135370 号 に記載された siRNA 分子が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

20

30

## 【0176】

サイレンシングすることのできる例示的なインフルエンザウイルス核酸配列には、非限定的に、核タンパク質 (NP)、マトリックスタンパク質 (M1 および M2)、非構造タンパク質 (NS1 および NS2)、RNAポリメラーゼ (PA、PB1、PB2)、ノイラミニダーゼ (NA)、および ヘマグルチニン (HA) をコードする核酸配列が含まれる。A型インフルエンザ NP の配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 NC\_004522; AY818138; AB166863; AB188817; AB189046; AB189054; AB189062; AY646169; AY646177; AY651486; AY651493; AY651494; AY651495; AY651496; AY651497; AY651498; AY651499; AY651500; AY651501; AY651502; AY651503; AY651504; AY651505; AY651506; AY651507; AY651509; AY651528; AY770996; AY790308; AY818138; および AY818140 に示される。A型インフルエンザ PA の配列は、例えば、Genbankアクセッション番号 AY818132; AY790280; AY646171; AY818132; AY818133; AY646179; AY818134; AY551934; AY651613; AY651610; AY651620; AY651617; AY651600; AY651611; AY651606; AY651618; AY651608; AY651607; AY651605; AY651609; AY651615; AY651616; AY651640; AY651614; AY651612; AY651621; AY651619; AY770995; および AY724786 に示される。インフルエンザウイルスの核酸配列をターゲティングする siRNA 分子の非限定的な例には、米国特許出願公開第 20070218122 号 に記載された

40

50

siRNA分子が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【0177】

サイレンシングすることのできる例示的な肝炎ウイルス核酸配列には、非限定的に、転写および翻訳に關与する核酸配列（例えば、En1、En2、X、P）ならびに構造タンパク質（例えば、Cタンパク質およびC関連タンパク質を含めたコアタンパク質、S、M、および/もしくはLタンパク質を含めたカプシドタンパク質およびエンベロープタンパク質、またはその断片）をコードする核酸配列（例えば、前記FIELDS VIROLOGYを参照）が含まれる。サイレンシングすることのできる例示的なC型肝炎ウイルス（HCV）の核酸配列には、非限定的に、5'非翻訳領域（5'-UTR）、3'非翻訳領域（3'-UTR）、ポリタンパク質翻訳開始コドン領域、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、ならびに/またはコアタンパク質、E1タンパク質、E2タンパク質、p7タンパク質、NS2タンパク質、NS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ、NS4Aタンパク質、NS4Bタンパク質、NS5Aタンパク質、および/もしくはNS5B RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする核酸配列が含まれる。HCVゲノム配列は、例えば、Genbankアクセッション番号NC\_004102（HCV遺伝子型1a）、AJ238799（HCV遺伝子型1b）、NC\_009823（HCV遺伝子型2）、NC\_009824（HCV遺伝子型3）、NC\_009825（HCV遺伝子型4）、NC\_009826（HCV遺伝子型5）、およびNC\_009827（HCV遺伝子型6）に示される。A型肝炎ウイルスの核酸配列は、例えば、Genbankアクセッション番号NC\_001489に示される；B型肝炎ウイルスの核酸配列は、例えば、Genbankアクセッション番号NC\_003977に示される；D型肝炎ウイルスの核酸配列は、例えば、Genbankアクセッション番号NC\_001653に示される；E型肝炎ウイルスの核酸配列は、例えば、Genbankアクセッション番号NC\_001434に示される；そしてG型肝炎ウイルスの核酸配列は、例えば、Genbankアクセッション番号NC\_001710に示される。ウイルス感染および生存に關連する遺伝子をコードする配列のサイレンシングは、好都合には、ウイルス状態を処置するために使用される従来薬剤の投与と併用することができる。肝炎ウイルスの核酸配列をターゲティングするsiRNA分子の非限定的な例には、米国特許出願公開第20060281175号、第20050058982号、および第20070149470号；米国特許第7,348,314号；および2009年3月20日に出版された米国仮特許出願第61/162,127号に記載されたsiRNA分子が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【0178】

代謝性疾患および障害（例えば、肝臓が標的の障害ならびに肝疾患および肝障害）に關連する遺伝子には、例えば、脂質代謝異常症で発現する遺伝子（例えば、LXR およびLXR（Genbankアクセッション番号NM\_007121）などの肝臓X受容体、ファルネソイドX受容体（FXR）（Genbankアクセッション番号NM\_005123）、ステロール調節エレメント結合タンパク質（SREBP）、サイト-1プロテアーゼ（S1P）、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムAレダクターゼ（HMGコエンザイムAレダクターゼ）、アポリポタンパク質B（ApoB）（Genbankアクセッション番号NM\_000384）、アポリポタンパク質CIII（ApoC3）（Genbankアクセッション番号NM\_000040およびNG\_008949 REGION 5001..8164）およびアポリポタンパク質E（ApoE）（Genbankアクセッション番号NM\_000041およびNG\_007084 REGION: 5001..8612））および糖尿病で発現する遺伝子（例えば、グルコース6-リン酸）（例えば、Forman et al., Cell, 81:687 (1995); Seol et al., Mol. Endocrinol., 9:72 (1995); Zavacki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:7909 (1997); Sakai et al., Cell, 85:1037-1046 (1996); Duncan et al., J. Biol. Chem., 272:12778-12785 (1997); Willy et al., Genes Dev., 9:1033-1045 (1995); Lehmann et al., J. Biol. Chem., 272:3137-3140 (1997); Janowski et al., Nature, 383:728-731 (1996); およびPeet et al., Cell, 93:693-704 (1998)を参照）が含まれる。当業者は、代謝性疾患および障害（例えば、肝臓が標的の疾患および障害ならびに肝疾患および肝障害）に關連する遺伝子に、肝臓自体に発現する遺伝子ならびに他の器官および組織に発現する遺伝子が含まれることを認識しているであろう。代謝性疾患および障害に關連する遺伝子をコードする配列のサイレンシングは、好都合に、その疾患または障害を処置するために使用される従来薬剤の投与

10

20

30

40

50

と併用することができる。ApoB遺伝子をターゲティングするsiRNA分子の非限定的な例には、米国特許出願公開第20060134189号に記載されたsiRNA分子が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。ApoC3遺伝子をターゲティングするsiRNA分子の非限定的な例には、2009年1月26日に出願された米国仮特許出願第61/147,235号に記載されたsiRNA分子が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【0179】

腫瘍形成および細胞形質転換（例えばがんまたは他の腫瘍）に関連する遺伝子配列の例には、Eg5（KSP、KIF11；Genbankアクセッション番号NM\_004523）などの有糸分裂キネシン、ポロ様キナーゼ1（PLK-1）（Genbankアクセッション番号NM\_005030、Barr et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5:429-440（2004））などのセリン/スレオニンキナーゼ；WEI1（Genbankアクセッション番号NM\_003390およびNM\_001143976）などのチロシンキナーゼ；XIAP（Genbankアクセッション番号NM\_001167）などのアポトーシス阻害剤；CSN1、CSN2、CSN3、CSN4、CSN5などのCOP9シグナロソームサブユニット（JAB1；Genbankアクセッション番号NM\_006837）；CSN6、CSN7A、CSN7B、およびCSN8；COP1（RFWD2；Genbankアクセッション番号NM\_022457およびNM\_001001740）などのユビキチンリガーゼ；ならびにHDAC1、HDAC2（Genbankアクセッション番号NM\_001527）、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9等のヒストンデアセチラーゼが含まれる。Eg5およびXIAP遺伝子をターゲティングするsiRNA分子の非限定的な例には、2007年5月29日に出願された米国特許出願第11/807,872号に記載されたsiRNA分子が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。PLK-1遺伝子をターゲティングするsiRNA分子の非限定的な例には、米国特許出願公開第20050107316号および第20070265438号、ならびに2008年12月23日に出願された米国特許出願第12/343,342号に記載されたsiRNA分子が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。CSN5遺伝子をターゲティングするsiRNA分子の非限定的な例には、2008年4月15日に出願された米国仮特許出願第61/045,251号に記載されたsiRNA分子が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【0180】

腫瘍形成および細胞形質転換に関連する遺伝子配列の追加的な例には、MLL融合遺伝子、BCR-ABL（Wilda et al., *Oncogene*, 21:5716（2002）；Scherr et al., *Blood*, 101:1566（2003））、TEL-AML1、EWS-FLI1、TLS-FUS、PAX3-FKHR、BCL-2、AML1-ETO、およびAML1-MTG8などの転座配列（Heidenreich et al., *Blood*, 101:3157（2003））、多剤耐性遺伝子などの過剰発現した配列（Nieth et al., *FEBS Lett.*, 545:144（2003）；Wu et al., *Cancer Res.* 63:1515（2003））、サイクリン（Li et al., *Cancer Res.* 63:3593（2003）；Zou et al., *Genes Dev.*, 16:2923（2002））、 $\beta$ -カテニン（Verma et al., *Clin Cancer Res.*, 9:1291（2003））、テロメラーゼ遺伝子（Kosciulek et al., *Mol Cancer Ther.*, 2:209（2003））、c-MYC、N-MYC、BCL-2、成長因子受容体（例えば、EGFR/ErbB1（Genbankアクセッション番号NM\_005228、NM\_201282、NM\_201283、およびNM\_201284；Nagy et al. *Exp. Cell Res.*, 285:39-49（2003）も参照、ErbB2/HER-2（Genbankアクセッション番号NM\_004448およびNM\_001005862）、ErbB3（Genbankアクセッション番号NM\_001982およびNM\_001005915）、およびErbB4（Genbankアクセッション番号NM\_005235およびNM\_001042599）；ならびにRAS（Tuschl and Borkhardt, *Mol. Interventions*, 2:158（2002）に総説）などの突然変異配列が含まれる。EGFR遺伝子をターゲティングするsiRNA分子の非限定的な例には、2007年5月29日に出願された米国特許出願第11/807,872号に記載されたsiRNA分子が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【0181】

DNA修復酵素をコードする配列のサイレンシングは、化学療法剤の投与との併用用途が見出される（Collis et al., *Cancer Res.*, 63:1550（2003））。腫瘍転移に関連するタンパク質をコードする遺伝子は、また、関心対象の標的配列、例えばインテグリン、セレク

チン、およびメタロプロテイナーゼである。以下の例は、排他的ではない。当業者は、腫瘍形成もしくは細胞形質転換、腫瘍の成長、または腫瘍転移を助長または促進する任意の全体的または部分的遺伝子配列が、テンプレート配列として含まれうることを理解しているであろう。

#### 【0182】

血管新生遺伝子は、新しい血管の形成を促進することができる。特に関心対象なのは、血管内皮成長因子(VEGF)(Reich et al., Mol. Vis., 9:210 (2003))またはVEGFRである。VEGFRをターゲティングするsiRNA配列は、例えば、GB 2396864; 米国特許出願公開20040142895号; およびCA 2456444に示され、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

10

#### 【0183】

抗血管新生遺伝子は、新血管新生を阻害することができる。これらの遺伝子は、特に、血管新生が疾患の発病に役割を果たしているがんを処置するために有用である。抗血管新生遺伝子の例には、非限定的に、エンドスタチン(例えば米国特許第6,174,861号を参照)、アンジオスタチン(例えば米国特許第5,639,725号を参照)、およびVEGFR2(例えば、Decaussin et al., J. Pathol., 188:369-377 (1999)を参照)が含まれ、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

#### 【0184】

免疫調節因子遺伝子は、一つまたは複数の免疫反応を調節する遺伝子である。免疫調節因子遺伝子の例には、非限定的に、成長因子(例えば、TGF- $\beta$ 、TGF- $\alpha$ 、EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、CGF、GM-CSF、SCF等)、インターロイキン(例えば、IL-2、IL-4、IL-12(Hill et al., J. Immunol., 171:691 (2003))、IL-15、IL-18、IL-20等)、インターフェロン(例えば、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 等)およびTNFなどのサイトカインが含まれる。FasおよびFasリガンド遺伝子もまた、関心対象の免疫調節因子標的配列である(Song et al., Nat. Med., 9:347 (2003))。造血細胞およびリンパ細胞における二次シグナル伝達分子、例えば、Bruton型チロシンキナーゼ(Btk)などのTecファミリーキナーゼをコードする遺伝子もまた、本発明に含まれる(Heinonen et al., FEBS Lett., 527:274 (2002))。

20

#### 【0185】

細胞受容体リガンドには、細胞表面受容体(例えば、インスリン受容体、EPO受容体、Gタンパク質共役受容体、チロシンキナーゼ活性を有する受容体、サイトカイン受容体、成長因子受容体等)に結合して、その受容体が関与する生理学的経路(例えばグルコースレベルの調節、血液細胞の発生、有糸分裂誘発等)を調節(例えば、阻害、活性化等)することのできるリガンドが含まれる。細胞受容体リガンドの例には、非限定的に、サイトカイン、成長因子、インターロイキン、インターフェロン、エリスロポイエチン(EPO)、インスリン、グルカゴン、Gタンパク質共役受容体のリガンド等が含まれる。トリヌクレオチド反復伸張(例えばCAGリピート)をコードするテンプレートは、球脊髄性筋萎縮症およびハンチントン病などの、トリヌクレオチド反復伸張により起きる神経変性障害での病原性配列のサイレンシングに用途が見い出される(Caplen et al., Hum. Mol. Genet., 11:175 (2002))。

30

40

#### 【0186】

上記遺伝子のいずれかの発現を治療目的でサイレンシングすることにおけるその有用性に加えて、本明細書に記載されたsiRNAは、研究開発応用および診断、予防、予後、臨床、および他の医療応用にも有用である。非限定的な例として、siRNAは、関心対象の遺伝子が治療的標的の潜在性を有するかどうかを検査することに向けた標的検証研究に使用することができる。siRNAは、また、潜在的治療標的としての遺伝子を発見することを目標とする、標的特定研究に使用することができる。

#### 【0187】

## 2. aiRNA

siRNAと同様に、非対称干渉性RNA(aiRNA)は、RNA誘導性サイレンシング複合体(RISC

50

を動員し、アンチセンス鎖の5'末端から10番目と11番目のヌクレオチドの間で標的配列の配列特異的切断を仲介することにより、哺乳動物細胞における様々な遺伝子の効果的なサイレンシングを導くことができる (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、ここで、その二重鎖は、アンチセンス鎖の3'および5'末端にオーバーハングを有する。相補的アンチセンス鎖に比べてセンス鎖は両端が短いことから、aiRNAは、一般に非対称である。いくつかの局面では、siRNA分子のために使用された条件に類似した条件で、aiRNA分子を設計、合成、およびアニールすることができる。非限定的な例として、siRNA配列を選択するための上記の方法を使用して、aiRNA配列を選択および産生することができる。

10

## 【0188】

別の態様では、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、さらに典型的には12、13、14、15、16、17、18、19、または20塩基対) のaiRNA二重鎖は、関心対象のmRNAをターゲティングするためにアンチセンス鎖の3'および5'末端にオーバーハングを付けて設計することができる。場合によっては、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、さらに典型的には12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である。ある他の場合には、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、さらに典型的には約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。

20

## 【0189】

いくつかの態様では、5'アンチセンスオーバーハングは、1、2、3、4、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) を有する。他の態様では、3'アンチセンスオーバーハングは、1、2、3、4、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) を有する。ある局面では、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オーバーハングに一つまたは複数の改変ヌクレオチドを含むことがある。非限定的な例として、aiRNA配列は、siRNA配列について上に記載された一つまたは複数の改変ヌクレオチドを含むことがある。好ましい態様では、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などの2'OMeヌクレオチドを含む。

30

## 【0190】

ある態様では、aiRNA分子は、siRNA分子のアンチセンス鎖、例えば、本明細書に記載されたsiRNA分子の一つに対応するアンチセンス鎖を含むことがある。他の態様では、aiRNA分子は、上に示された任意の標的遺伝子の発現、例えば、ウイルス感染および生存に関連する遺伝子、代謝性疾患および障害に関連する遺伝子、腫瘍形成および細胞形質転換に関連する遺伝子、血管新生遺伝子、炎症反応および自己免疫反応に関連する遺伝子などの免疫調節因子遺伝子、リガンド受容体遺伝子、ならびに神経変性障害に関連する遺伝子の発現をサイレンシングするために使用することができる。

40

## 【0191】

## 3. 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、それが転写されるDNAが由来する遺伝子によってコードされるが、miRNAは、タンパク質には翻訳されず (非コードRNA); その代わりに、各一次転写物 (プリ-miRNA) が、プレ-miRNAと呼ばれる短いステム-ループ構造に、そして最終的に機能性成熟miRNAに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) 分子に部分的または完全に相補的であり、それらの主な機能は、遺伝子発現を下方調節することである。miRNA分子の同定は、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。

50

## 【0192】

miRNAをコードする遺伝子は、プロセシングされた成熟miRNA分子よりもずっと長い。miRNAは、まずキャップおよびポリ-A尾部を有する一次転写物またはプリ-miRNAとして転写され、細胞核でプレ-miRNAとして知られる、短い、約70個のヌクレオチドのステム-ループ構造にプロセシングされる。このプロセシングは、動物において、ヌクレアーゼDroshaおよび二本鎖RNA結合タンパク質Pashaから成るマイクロプロセッサー複合体として知られているタンパク質複合体により行われる (Denli et al., Nature, 432:231-235 (2004))。次に、これらのプレ-miRNAは、エンドヌクレアーゼDicerとの相互作用により細胞質中で成熟miRNAにプロセシングされ、これはまた、RNA誘導型サイレンシング複合体 (RISC) の形成もまた開始する (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、テンプレートとして機能し、miRNAを生成することができる。

10

## 【0193】

Dicerがプレ-miRNAのステム-ループを切断したときに、二つの相補的短鎖RNA分子が形成されるが、一方だけがRISC複合体に組入れられる。この鎖は、ガイド鎖として知られており、RISC複合体中の触媒活性RNAアーゼであるアルゴノートタンパク質により5'末端の安定性に基づき選択される (Preall et al., Curr. Biol., 16:530-535 (2006))。抗ガイド鎖またはパッセンジャー鎖として知られている残りの鎖は、RISC複合体の基質として分解される (Gregory et al., Cell, 123:631-640 (2005))。活性RISC複合体への組入れ後に、miRNAはその相補的mRNA分子と塩基対を形成し、標的mRNAの分解および/または翻訳サイレンシングを誘導する。

20

## 【0194】

哺乳動物miRNA分子は、通常は、標的mRNA配列の3'UTRにある部位に相補的である。場合によっては、標的mRNAへのmiRNAのアニーリングは、タンパク質翻訳機構を遮断することによってタンパク質の翻訳を阻害する。ある他の場合には、標的mRNAへのmiRNAのアニーリングは、RNA干渉 (RNAi) に類似した過程により標的mRNAの切断および分解を容易にする。miRNAはまた、ターゲティングされたmRNAに対応するゲノム部位のメチル化をターゲティングすることができる。一般に、miRNAは、まとめてmiRNPと称されるタンパク質の相補体と関連して機能する。

## 【0195】

ある局面では、本明細書に記載される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、さらに典型的には約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。ある他の局面では、miRNA分子は、一つまたは複数の改変ヌクレオチドを含みうる。非限定的な例として、miRNA配列は、siRNA配列について上に記載された一つまたは複数の改変ヌクレオチドを含みうる。好ましい態様では、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などの2'OMeヌクレオチドを含む。

30

## 【0196】

いくつかの態様では、miRNA分子は、例えば、ウイルス感染および生存に関連する遺伝子、代謝性疾患および障害に関連する遺伝子、腫瘍形成および細胞形質転換に関連する遺伝子、血管新生遺伝子、炎症反応および自己免疫反応に関連する遺伝子などの免疫調節因子遺伝子、リガンド受容体遺伝子、ならびに神経変性障害に関連する遺伝子などの、上に示される任意の標的遺伝子の発現をサイレンシングするために使用することができる。

40

## 【0197】

他の態様では、関心対象のmRNAをターゲティングするmiRNAの活性を遮断する一つまたは複数の薬剤は、本発明の脂質粒子 (例えば核酸-脂質粒子) を用いて投与される。遮断性薬剤の例には、非限定的に、立体ブロック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。そのような遮断性薬剤は、miRNAに直接、または標的mRNAのmiRNA結合部位に結合することができる。

50

## 【0198】

## 4. アンチセンスオリゴヌクレオチド

一態様では、核酸は、標的遺伝子または関心対象の配列に向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドである。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または「アンチセンス」という用語には、ターゲティングされたポリヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドが含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、選ばれた配列に相補的なDNAまたはRNA一本鎖である。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、RNAに結合することによって相補的RNA鎖の翻訳を阻止する。アンチセンスDNAオリゴヌクレオチドは、特異的な相補的（コードまたは非コード）RNAをターゲティングするために使用することができる。結合が起こったならば、このDNA/RNAハイブリッドを酵素RNアーゼHにより分解することができる。特定の態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約10～約60個のヌクレオチド、さらに好ましくは約15～約30個のヌクレオチドを含む。この用語はまた、所望の標的遺伝子に正確には相補的でないことがあるアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含する。したがって、本発明は、標的に非特異的な活性がアンチセンスに見出された場合に、または標的配列と一つもしくは複数のミスマッチを有するアンチセンス配列が特定用途に最も好ましい場合に利用することができる。

10

## 【0199】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが、有効であることが実証されたことから、その結果、ターゲティングされたタンパク質合成阻害剤を使用して、標的遺伝子によるタンパク質合成を特異的に阻害することができる。タンパク質合成を阻害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性は、十分に確立されている。例えば、ポリガラクタウロナーゼ（polygalacturonase）およびムスカリン2型アセチルコリン受容体の合成は、それぞれのmRNA配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される（米国特許第5,739,119号および第5,759,829号を参照）。さらに、アンチセンス阻害の例は、核タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子（MDR1）、ICAM-1、E-セレクチン、STK-1、線条体GABAA受容体、およびヒトEGFで実証された（Jaskulski et al., *Science*, 240:1544-6 (1988); Vasanthakumar et al., *Cancer Commun.*, 1:225-32 (1989); Peris et al., *Brain Res Mol Brain Res.*, 15:57:310-20 (1998); および米国特許第5,801,154号; 第5,789,573号; 第5,718,709号および第5,610,288号を参照）。さらに、様々な異常細胞増殖、例えばがんを阻害し、処置することのできるアンチセンス構築物もまた記載されている（米国特許第5,747,470号; 第5,591,317号; および第5,783,683号を参照）。これらの参照の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

20

30

## 【0200】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの製造方法は、当技術分野において公知であり、任意のポリヌクレオチド配列をターゲティングするアンチセンスオリゴヌクレオチドの製造に容易に適応させることができる。所与の標的配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の選択は、選択された標的配列の分析、ならびに二次構造、 $T_m$ 、結合エネルギー、および相対安定性の決定に基づく。アンチセンスオリゴヌクレオチドが宿主細胞中の標的mRNAへの特異的結合を低減または禁止するであろう二量体、ヘアピン、または他の二次構造を相対的に形成不能であることに基づき、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドを選択することができる。mRNAの高度に好ましい標的領域には、AUG翻訳開始コドンおよびmRNAの5'領域に実質的に相補的な配列の領域またはその近くの領域が含まれる。これらの二次構造分析および標的部位の選択の考察は、例えば、OLIGOプライマー解析ソフトウェアv.4 (Molecular Biology Insights) および/またはBLASTN 2.0.5アルゴリズムソフトウェア (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997)) を使用して行うことができる。

40

## 【0201】

## 5. リボザイム

本発明の別の態様によると、核酸-脂質粒子は、リボザイムと関連する。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を保有する特異的触媒ドメインを有するRNA-タンパク質複合体

50

である (Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84:8788-92 (1987); および Forster et al., Cell, 49:211-20 (1987) を参照)。例えば、多数のリボザイムは、多くの場合にオリゴヌクレオチド基質中の数種のリン酸エステルのうち一つだけを切断する高度の特異性で、リン酸エステル転移反応を加速する (Cech et al., Cell, 27:487-96 (1981); Michel et al., J. Mol. Biol., 216:585-610 (1990); Reinhold-Hurek et al., Nature, 357:173-6 (1992) を参照)。この特異性は、化学反応の前に、基質が特異的塩基対形成相互作用によりリボザイムの内部ガイド配列 (「IGS」) に結合する必要があることが原因とされた。

#### 【0202】

少なくとも6個の基本的種類の天然酵素性RNA分子が、現在のところ公知である。それぞれは、生理的条件下でRNAホスホジエステル結合の加水分解をトランスで触媒することができる (したがって、他のRNA分子を切断することができる)。一般に、酵素的核酸は、最初に標的RNAに結合することにより作用する。そのような結合は、標的RNAを切断するように作用する分子の酵素部分に近接して保たれる、酵素的核酸の標的結合部分により起こる。したがって、酵素的核酸は、最初に標的RNAを認識し、次に相補的塩基対形成により標的RNAと結合し、いったん正確な部位に結合したならば、標的RNAを切断するように酵素的に作用する。そのような標的RNAの戦略的切断は、コードされたタンパク質をそれが直接合成する能力を損なうであろう。酵素的核酸がそのRNA標的に結合し切断した後で、酵素的核酸はそのRNAから放出され、別の標的を探し、新しい標的との結合および切断を繰り返すことができる。

#### 【0203】

酵素的核酸分子は、例えば、ハンマーヘッド、ヘアピン、型肝炎ウイルス、グループIイントロンまたはRNアーゼP RNA (RNAガイド配列と関連)、またはニューロスボラVS RNAモチーフに形成することがある。ハンマーヘッドモチーフの具体例は、例えば、Rossi et al., Nucleic Acids Res., 20:4559-65 (1992) に記載されている。ヘアピンモチーフの例は、例えば、EP 0360257、Hampel et al., Biochemistry, 28:4929-33 (1989); Hampel et al., Nucleic Acids Res., 18:299-304 (1990); および米国特許第5,631,359号に記載されている。型肝炎ウイルスモチーフの例は、例えば、Perrotta et al., Biochemistry, 31:11843-52 (1992) に記載されている。RNアーゼPモチーフの例は、例えば、Guerrier-Takada et al., Cell, 35:849-57 (1983) に記載されている。ニューロスボラVS RNAリボザイムモチーフの例は、例えば、Saville et al., Cell, 61:685-96 (1990); Saville et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8826-30 (1991); Collins et al., Biochemistry, 32:2795-9 (1993) に記載されている。グループIイントロンの例は、例えば、米国特許第4,987,071号に記載されている。本発明により使用される酵素的核酸分子の重要な特徴は、それらが、標的遺伝子の一つまたは複数のDNA領域またはRNA領域に相補的な特異的基質結合部位を有すること、およびそれらが、分子にRNA切断活性を付与するヌクレオチド配列を、基質結合部位の内部または周辺に有することである。したがって、リボザイム構築物は、本明細書に言及された特異的モチーフに限定されなくてもよい。これらの参照の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

#### 【0204】

任意のポリヌクレオチド配列にターゲティングされたリボザイムの製造方法は、当技術分野において公知である。リボザイムは、例えば、PCT公開番号第WO 93/23569およびWO 94/02595に記載されたように設計し、そこに記載されたように合成してインビトロおよび/またはインビボで検査することができる。これらのPCT公開の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

#### 【0205】

リボザイム活性は、リボザイム結合アームの長さを変化させること、または血清リボヌクレアーゼによるリボザイムの分解を阻止する改変 (例えば、酵素的RNA分子の糖部分に加えることのできる様々な化学的改変を記載しているPCT公開番号第WO 92/07065、WO 93/15187、WO 91/03162、およびWO 94/13688; EP 92110298.4; ならびに米国特許第5,334,711

号を参照されたく、これらの開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる)、細胞におけるそれらの効力を高める改変、およびRNA合成時間を短縮し化学的要件を軽減するためのステムIIの塩基の除去を有するリボザイムを化学合成することにより最適化することができる。

【0206】

#### 6. 免疫刺激性オリゴヌクレオチド

本発明の脂質粒子に関連する核酸は、免疫刺激性のことがあり、それには、ヒトなどの哺乳動物でありうる対象に投与した場合に、免疫反応を誘導することのできる免疫刺激性オリゴヌクレオチド(ISS;一本鎖または二本鎖)が含まれる。ISSには、例えば、ヘアピン二次構造に導く、ある種のパリンドローム(Yamamoto et al., J. Immunol., 148:4072-6 (1992)を参照)またはCpGモチーフと同様に、他の公知のISSの特徴(多重Gドメインなど;PCT公開番号第WO 96/11266を参照されたく、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる)が含まれる。

【0207】

免疫反応を誘起するために免疫刺激性核酸が標的配列に特異的に結合して標的配列の発現を低減する必要がないならば、その免疫刺激性核酸は、配列特異的でないとみなされる。したがって、ある免疫刺激性核酸は、天然の遺伝子またはmRNAの領域に対応する配列を含みうるが、それでも配列特異的でない免疫刺激性核酸とみなされることがある。

【0208】

一態様では、免疫刺激性核酸またはオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のCpGジヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドまたはCpGジヌクレオチドは、非メチル化またはメチル化されていてもよい。別の態様では、免疫刺激性核酸は、メチル化シトシンを有する少なくとも1個のCpGジヌクレオチドを含む。一態様では、核酸は、1個のCpGジヌクレオチドを含み、ここで、CpGジヌクレオチド中のシトシンがメチル化されている。代替の態様では、核酸は、少なくとも2個のCpGジヌクレオチドを含み、ここで、CpGジヌクレオチド中の少なくとも1個のシトシンがメチル化されている。さらなる態様では、配列中に存在するCpGジヌクレオチド中の各シトシンは、メチル化されている。別の態様では、核酸は、複数のCpGジヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1個のCpGジヌクレオチドがメチル化シトシンを含む。本発明の組成物および方法に使用するために適した免疫刺激性オリゴヌクレオチドの例は、2008年12月31日に出願されたPCT出願第PCT/US08/88676、PCT公開番号第WO 02/069369およびWO 01/15726、米国特許第6,406,705号、ならびにRaney et al., J. Pharm. Exper. Ther., 298:1185-92 (2001)に記載されており、これらの開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。ある態様では、本発明の組成物および方法に使用されるオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル(「PO」)主鎖もしくはホスホロチオエート(「PS」)主鎖、および/またはCpGモチーフ中の少なくとも1個のメチル化シトシン残基を有する。

【0209】

#### B. 他の活性薬剤

ある態様では、本発明の脂質粒子に関連する活性薬剤は、一つまたは複数の治療用タンパク質、ポリペプチド、または小型有機分子または小型有機化合物を含んでもよい。そのような治療学的に有効な薬剤または薬物の非限定的な例には、腫瘍薬(例えば、化学療法薬、ホルモン療法剤、免疫療法剤、放射線療法剤等)、脂質低下剤、抗ウイルス薬、抗炎症性化合物、抗うつ薬、刺激薬、鎮痛薬、抗生物質、避妊薬、解熱薬、血管拡張薬、血管新生阻害薬、細胞血管剤、シグナル伝達阻害薬、抗不整脈剤などの心臓血管薬、ホルモン、血管収縮薬、およびステロイドが含まれる。これらの活性薬剤は、本発明の脂質粒子に入れて単独で、または干渉性RNAなどの核酸を含む本発明の脂質粒子と組合せて投与(例えば同時投与)することができる。

【0210】

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、イプロプラチン、サトラプラチン等)、ア

10

20

30

40

50

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、ブスルファン、メルファラン、メクロレタミン、ウラムスチン、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、カペシタピン、シタラピン、フロクスウリジン、フルダラピン、ゲムシタピン、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、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル等）、トポイソメラーゼ阻害薬（例えば、イリノテカン（CPT-11、カンプトサル（Camptosar））、トポテカン、アムサクリン、エトポシド（VP16）、エトポシドホスフェート、テニポシド等）、抗腫瘍性抗生物質（例えば、ドキシルピシン、アドリアマイシン、ダウノルピシン、エピルピシン、アクチノマイシン、プレオマイシン、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薬（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（CI1033）、セマキシニブ（SU5416）、パタラニブ（PTK787/ZK222584）、ソラフェニブ（BAY43-9006）、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）、パンデタニブ（Zactima（商標））、ZD6474）等）、その薬学的に許容される塩、その立体異性体、その誘導体、そのアナログ、およびそれらの組合せが含まれる。

#### 【0211】

従来のホルモン治療剤の例には、非限定的に、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、ならびに他の性腺刺激ホルモン放出ホルモン作動薬（GnRH）が含まれる。

#### 【0212】

従来の免疫療法剤の例には、非限定的に、免疫刺激物質（例えば、カルメットとゲランの細菌（Bacillus Calmette-Guerin）（BCG）、レバミゾール、インターロイキン-2、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）、および放射免疫療法（例えば、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、または $^{131}\text{I}$ などに複合化した抗CD20モノクローナル抗体等）が含まれる。

#### 【0213】

従来の放射線療法剤には、非限定的に、場合により腫瘍抗原に対する抗体に複合化した、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{87}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、および $^{212}\text{Bi}$ などの放射性核種が含まれる。

#### 【0214】

本発明により使用することのできる追加的な腫瘍薬には、非限定的に、アルケラン、アロプリノール、アルトレタミン、アミホスチン、アナストロゾール、araC、三酸化ヒ素、ベキサロテン、bicNU、カルムスチン、CCNU、セレコキシブ、クラドリピン、シクロスポリンA、シトシンアラビノシド、シトキサン、デクスラゾキサソ、DTIC、エストラムスチン、エキセメスタン、FK506、ゲムツズマブ-オゾガマイシン、ハイドレア、ヒドロキシ尿素、イダルピシン、インターフェロン、レトロゾール、ロイスタチン、ロイプロリド、リトレチノイン（litretinoin）、メガストロール（megastrol）、L-PAM、メスナ、メトキサレン、ミトラマイシン、ナイトロジェンマスタード、パミドロネート、ペガデマーズ、ペントスタチン、ポリフィマーナトリウム、プレドニゾン、リツキサソ、ストレプトゾシン、STI-571、タキソテール、テモゾラミド（temozolamide）、VM-26、トレミフェン、トレチノイン、ATRA、バルルピシン、およびベルパンが含まれる。本発明により使用することのできる腫瘍薬の他の例は、エリプチンおよびエリプチンのアナログまたは誘導体、エポチロン、細胞内キナーゼ阻害薬、ならびにカンプトテシンである。

#### 【0215】

トリグリセリド、コレステロール、および/またはグルコースの上昇に関連する脂質疾

患または障害を処置するための脂質低下剤の非限定的な例には、スタチン、フィブラート、エゼチミブ、チアゾリジンジオン、ナイアシン、遮断薬、ニトログリセリン、カルシウム拮抗薬、魚油、およびそれらの混合物が含まれる。

#### 【0216】

抗ウイルス薬の例には、非限定的に、アバカビル、アシクロビル (aciclovir、acyclovir)、アデホビル、アマンタジン、アンブレナビル、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、シドホビル、コンビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エドクスジン、エファビレンツ、エムトリシタピン、エンフビルチド、エンテカビル、侵入阻害薬、ファミシクロビル、固定用量配合剤、ホミビルセン、ホスアンブレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、融合阻害薬、ガンシクロビル、イバシタピン、イムノビル、イドクスウリジン、イミキモド、インジナビル、イノシン、インテグラーゼ阻害薬、インターフェロンIII型 (例えば、IFN-1、IFN-2、およびIFN-3などのIFN-分子)、インターフェロンII型 (例えばIFN- )、インターフェロンI型 (例えば、PEG化IFN-などのIFN-、IFN-、IFN-、IFN-、IFN-、IFN-、IFN-、およびIFN- )、インターフェロン、ラミブジン、ロピナビル、ロビリド、MK-0518、マラビロク、モロキシジン、ネルフィナビル、ネビラピン、ネキサビル (nexavir)、ヌクレオシドアナログ、オセルタミビル、ペンシクロビル、ペラミビル、プレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害薬、逆転写酵素阻害薬、リバビリン、リマンタジン、リトナビル、サキナビル、スタブジン、相乗的増強剤、テノホビル、テノホビルジソプロキシル、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル、バルガンシクロビル、ピクリピロク、ピダラピン、ピラミジン、ピラミジン、ザルシタピン、ザナミビル、ジドブジン、その薬学的に許容される塩、その立体異性体、その誘導体、そのアナログ、およびそれらの混合物が含まれる。

10

20

#### 【0217】

#### V. 脂質粒子

本発明の脂質粒子は、典型的には、活性薬剤または治療剤、陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、および粒子の凝集を阻害する複合化脂質を含む。いくつかの態様では、脂質粒子中の活性薬剤または治療剤が、水溶液中で、例えばヌクレアーゼまたはプロテアーゼによる酵素分解に耐性になるように、活性薬剤または治療剤は、脂質粒子の脂質部分に完全に封入される。他の態様では、本明細書に記載された脂質粒子は、ヒトなどの哺乳動物に実質的に無毒である。本発明の脂質粒子は、典型的には、約40nm~約150nm、約50nm~約150nm、約60nm~約130nm、約70nm~約110nm、または約70~約90nmの平均直径を有する。

30

40

#### 【0218】

好ましい態様では、本発明の脂質粒子は、干渉性RNA (例えばsiRNA、aiRNA、および/またはmiRNA)、陽イオン性脂質 (例えば、式I、II、および/またはIIIで示される陽イオン性脂質)、非陽イオン性脂質 (例えば、コレステロール単独また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)、および粒子の凝集を阻害する複合化脂質 (例えば、一つまたは複数のPEG-脂質コンジュゲート) を含む、血清安定性の核酸-脂質粒子 (SNALP) である。SNALPは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の非改変および/または改変干渉性RNA分子を含みうる。核酸-脂質粒子およびそれらの調製方法は、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公開番号第WO 96/40964に記載されており、これらの開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

#### 【0219】

#### A. 陽イオン性脂質

任意の様々な陽イオン性脂質を、単独で、または一つもしくは複数の他の陽イオン性脂質種もしくは非陽イオン性脂質種との組合せて、本発明の脂質粒子 (例えばSNALP) に使用することができる。

#### 【0220】

50

本発明に有用な陽イオン性脂質は、生理的pHで実効正電荷を帯びる任意のいくつかの脂質種でありうる。そのような脂質には、非限定的に、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DODMA)、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(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- -オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエノキシ)プロパン(CLindMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3- -オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',1-2'-オクタデカジエノキシ)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)、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が含まれる。いくつかのこれらの脂質および関連アナログは、米国特許出願公開第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公開番号第WO 96/10390に記載されており、これらの開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。追加的に、陽イオン性脂質のいくつかの市販調製物が入手可能であり、本発明に使用することができる。これらには、例えば、LIPOFECTIN(登録商標)(GIBCO/BRL, Grand Island, New York, USAから市販されている、DOTMAおよびDOPEを含む陽イオン性リポソーム)；LIPOFECTAMINE(登録商標)(GIBCO/BRLから市販されている、DOSPAおよびDOPEを含む陽イオン性リポソーム)；およびTRANSFECTAM(登録商標)(Promega Corp., Madison, Wisconsin, USAから市販されている、DOGSを含む陽イオン性リポソーム)が含まれる。

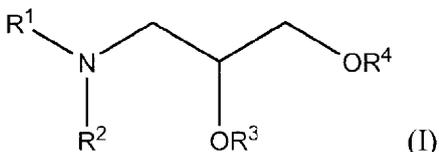
10

20

## 【0221】

追加的に、以下の構造を有する、式(I)で示される陽イオン性脂質が、本発明に有用である：

30



式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、独立して選択され、かつHまたはC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルであり、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、独立して選択され、かつ約10~約20個の炭素原子を有するアルキル基であり、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>の少なくとも一方は、少なくとも2個の不飽和部位を含む。場合によっては、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、どちらも同じであり、すなわち、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、どちらもリノレイル(C<sub>18</sub>)等である。ある他の場合には、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は異なり、すなわち、R<sup>3</sup>はテトラデカトリエニル(tetradectrienyl)(C<sub>14</sub>)であり、R<sup>4</sup>は、リノレイル(C<sub>18</sub>)である。好ましい態様では、式(I)で示される陽イオン性脂質は対称であり、すなわち、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、どちらも同じである。別の好ましい態様では、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、少なくとも2個の不飽和部位を含む。いくつかの態様では、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、独立して、ドデカジエニル、テトラデカジエニル、ヘキサデカジエニル、リノレイル、およびイコサジエニルからなる群から選択される。好ましい態様では、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、どちらもリノレイルである。いくつかの態様では、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、少なくとも3個の不飽和部位を含み、独立して、例えばドデカトリエニル、テトラデカトリエニル、ヘキサデカトリエニル、リノレニル、およびイコサトリエニルから選択される。特に好ましい態様では、式(I)で示される陽イオン性脂質は、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)または1,2-ジリノレニルオキシ-N

40

50



ノメチル-[1,3]-ジオキサラン(DLin-K-DMA)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン(DLin-DAC)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-モルホリノプロパン(DLin-MA)、1,2-ジリノレイル-3-ジメチルアミノプロパン(DLinDAP)、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-S-DMA)、1-リノレイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-2-DMAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩(DLin-TMA.Cl)、1,2-ジリノレイル-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩(DLin-TAP.Cl)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン(DLin-MPZ)、3-(N,N-ジリノレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール(DLinAP)、3-(N,N-ジオレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール(DOAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン(DLin-EG-DMA)、またはそれらの混合物である。好ましい態様では、式(III)で示される陽イオン性脂質は、DLin-K-C2-DMA(XTC2)である。

10

## 【0225】

陽イオン性脂質は、典型的には、粒子中に存在する総脂質の約50mol%～約90mol%、約50mol%～約85mol%、約50mol%～約80mol%、約50mol%～約75mol%、約50mol%～約70mol%、約50mol%～約65mol%、または約55mol%～約65mol%の総脂質を構成する。

## 【0226】

意図される粒子の使用に応じて、構成要素の比率を変動させることができ、特定の製剤の送達効率、例えば、エンドソーム放出パラメーター(ERP)アッセイを用いて測定することができることは、当業者に容易に明らかとなる。

20

## 【0227】

## B. 非陽イオン性脂質

本発明の脂質粒子(例えばSNALP)に使用される非陽イオン性脂質は、安定な複合体を生成することのできる任意の様々な中性非荷電性、双性イオン性、または陰イオン性脂質でありうる。

## 【0228】

非陽イ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、リン酸ジセチル、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)、ジオレ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-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(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、ジリノレイルホスファチジルコリン、およびそれらの混合物などのリン脂質が含まれる。他のリン脂質であるジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミンもまた使用することができる。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由来のアシル基、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、またはオレイルである。

30

40

## 【0229】

非陽イオン性脂質の追加的な例には、コレステロールのようなステロールおよびその誘導体、例えばコレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレス

50

テリル-2'-ヒドロキシエチルエーテル、コレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテル、ならびにそれらの混合物が含まれる。

【0230】

いくつかの態様では、脂質粒子（例えばSNALP）に存在する非陽イオン性脂質は、コレステロールまたはその誘導体、例えばリン脂質不含脂質粒子製剤を含むか、またはそれから成る。他の態様では、脂質粒子（例えばSNALP）中、例えば、コレステロール不含脂質粒子製剤中に存在する非陽イオン性脂質は、一つまたは複数のリン脂質を含むか、またはそれから成る。さらなる態様では、脂質粒子（例えばSNALP）に存在する非陽イオン性脂質は、一つまたは複数のリン脂質と、コレステロールまたはその誘導体との混合物を含むか、またはそれから成る。

10

【0231】

本発明における使用に適する非陽イ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、グリセロールリシンオレエート、ヘキサデシルステアレート、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リン不含脂質が含まれる。

【0232】

いくつかの態様では、非陽イオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約13mol%～約49.5mol%、約20mol%～約45mol%、約25mol%～約45mol%、約30mol%～約45mol%、約35mol%～約45mol%、約20mol%～約40mol%、約25mol%～約40mol%、または約30mol%～約40mol%を構成する。

20

【0233】

ある態様では、リン脂質不含脂質粒子に存在するコレステロールは、粒子中に存在する総脂質の約30mol%～約45mol%、約30mol%～約40mol%、約35mol%～約45mol%、または約35mol%～約40mol%を構成する。非限定的な例として、リン脂質不含脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約37mol%のコレステロールを含みうる。

【0234】

ある他の態様では、リン脂質とコレステロールとの混合物を含有する脂質粒子に存在するコレステロールは、粒子中に存在する総脂質の約30mol%～約40mol%、約30mol%～約35mol%、または約35mol%～約40mol%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脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約34mol%のコレステロールを含みうる。

30

【0235】

さらなる態様では、リン脂質とコレステロールとの混合物を含有する脂質粒子に存在するコレステロールは、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約30mol%、約15mol%～約25mol%、または約17mol%～約23mol%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脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の約20mol%のコレステロールを含みうる。

【0236】

脂質粒子がリン脂質と、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を含有する態様では、その混合物は、粒子中に存在する総脂質の最大約40、45、50、55、または60mol%を構成しうる。場合によっては、混合物中のリン脂質構成要素は、粒子中に存在する総脂質の約2mol%～約12mol%、約4mol%～約10mol%、約5mol%～約10mol%、約5mol%～約9mol%、または約6mol%～約8mol%を構成しうる。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脂質粒子は、粒子中に存在する総脂質の（例えば約34mol%のコレステロールとの混合物中に）約7mol%のDPPCまたはDSPCなどのリン脂質を含みうる。ある他の場合には、混合物中のリン脂質構成要素は、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約30mol%、約15mol%～約25mol%、または約17mol%～約23mol%を構成しうる。別の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脂質粒子は、粒子中に存在する総

40

50

脂質の（例えば約20mol%のコレステロールとの混合物中に）約20mol%のDPPCまたはDSPCなどのリン脂質を含みうる。

【0237】

### C. 脂質コンジュゲート

陽イオン性および非陽イオン性脂質に加えて、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、脂質コンジュゲートを含む。複合化脂質は、粒子の凝集を防止する点で有用である。適切な複合化脂質には、非限定的に、PEG-脂質コンジュゲート、ATTA-脂質コンジュゲート、陽イオン性ポリマー-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。ある態様では、粒子は、CPLと一緒に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。

10

【0238】

好ましい態様では、脂質コンジュゲートはPEG-脂質である。PEG-脂質の例には、非限定的に、例えば、PCT公開番号第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したPEG（PEG-DAA）、例えば、米国特許出願公開第20030077829号および第2005008689号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したPEG（PEG-DAG）、ホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質にカップリングした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複合化したPEG、コレステロールまたはその誘導体に複合化したPEG、およびそれらの混合物が含まれる。これらの特許文書の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。追加的なPEG-脂質には、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。

20

【0239】

PEGは、2個の末端ヒドロキシル基を有するエチレンPEG繰り返しユニットの直鎖水溶性ポリマーである。PEGは、その分子量により分類され；例えば、PEG2000は、約2,000ダルトンの平均分子量を有し、PEG5000は、約5,000ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、Sigma Chemical Co.および他の会社から市販されており、それには、例えば以下のものが含まれる：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-スクシニ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（tresylate）（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）。米国特許第6,774,180号および第7,053,150号に記載されたような他のPEG（例えばmPEG（20KDa）アミン）は、また、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。これらの特許の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。加えて、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めた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。

30

【0240】

本明細書に記載されたPEG-脂質コンジュゲートのPEG部分は、約550ダルトン～約10,000ダルトンの範囲の平均分子量を含みうる。場合によっては、PEG部分は、約750ダルトン～約5,000ダルトン（例えば、約1,000ダルトン～約5,000ダルトン、約1,500ダルトン～約3,000ダルトン、約750ダルトン～約3,000ダルトン、約750ダルトン～約2,000ダルトン等）の平均分子量を有する。好ましい態様では、PEG部分は、約2,000ダルトンまたは約750ダルトンの平均分子量を有する。

40

【0241】

場合によっては、PEGは、アルキル、アルコキシ、アシル、またはアリアル基により置換されていてもよいことがある。PEGは、脂質に直接複合化することができ、または、リンカー部分を介して脂質に連結してもよい。例えば、エステル不含リンカー部分およびエステル含有リンカー部分を含めた、脂質にPEGをカップリングするために適した任意のリンカー部分を使用することができる。好ましい態様では、リンカー部分は、エステル不含

50

リンカー部分である。本明細書において使用する「エステル不含リンカー部分」という用語は、カルボン酸エステル結合(-OC(O)-)を有さないリンカー部分を表す。適切なエステル不含リンカー部分には、非限定的に、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、およびそれらの組合せ(カルバメートリンカー部分とアミドリリンカー部分の両方を有するリンカーなど)が含まれる。好ましい態様では、カルバメートリンカーは、脂質にPEGをカップリングするために使用される。

【0242】

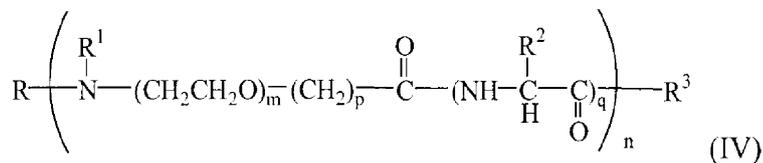
他の態様では、エステル含有リンカー部分は、脂質にPEGをカップリングするために使用される。適切なエステル含有リンカー部分には、例えば、カルボネート(-OC(O)O-)、スクシノイル、リン酸エステル(-O-(O)POH-O-)、スルホン酸エステル、およびそれらの組合せが含まれる。

【0243】

様々な鎖長および飽和度の様々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をPEGに複合化して、脂質コンジュゲートを形成させることができる。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技法を用いて単離もしくは合成することができる。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脂肪酸を有するホスファチジルエタノールアミンが好ましい。モノ-またはジ-不飽和脂肪酸を有するホスファチジルエタノールアミンおよび飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸との混合物もまた、使用することができる。適切なホスファチジルエタノールアミンには、非限定的に、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。

【0244】

「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号に記載された化合物を表し、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。これらの化合物には、下記式を有する化合物が含まれる：

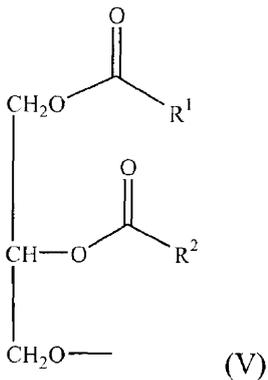


式中、Rは、水素、アルキルおよびアシルからなる群より選択される構成員であり；R<sup>1</sup>は、水素およびアルキルからなる群より選択される構成員であるか；または場合により、RおよびR<sup>1</sup>およびそれらが結合する窒素は、アジド部分を形成し；R<sup>2</sup>は、水素、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアリールおよびアミノ酸側鎖から選択される基の構成員であり；R<sup>3</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、メルカプト、ヒドラジノ、アミノおよびNR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>(ここで、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は、独立して水素またはアルキルである)からなる群より選択される構成員であり；nは、4~80であり；mは2~6であり；pは、1~4であり；qは、0または1である。本発明の化合物に他のポリアミドを使用することができることは、当業者に明らかであろう。

【0245】

「ジアシルグリセロール」という用語は、エステル結合によりグリセロールの1位および2位に結合した、どちらも独立して2~30個の炭素を有する2個の脂肪酸アシル鎖R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>を有する化合物を表す。アシル基は、飽和であるか、または、様々な不飽和度を有する。適切なアシル基には、非限定的に、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。好ましい態様で

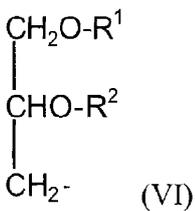
は、 $R^1$ および $R^2$ は同一であり、すなわち、 $R^1$ および $R^2$ は、どちらもミリスチル（すなわちジミリスチル）であり、 $R^1$ および $R^2$ は、どちらもステアリル（すなわちジステアリル）等である。ジアシルグリセロールは、次の一般式を有する。



10

## 【0246】

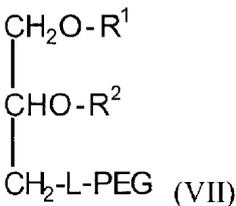
「ジアルキルオキシプロピル」という用語は、どちらも独立して2~30個の炭素を有する2個のアルキル鎖 $R^1$ および $R^2$ を有する化合物を指す。アルキル基は、飽和であるか、または様々な不飽和度を有しうる。ジアルキルオキシプロピルは、次の一般式を有する。



20

## 【0247】

好ましい態様では、PEG-脂質は、下記式を有するPEG-DAAコンジュゲートである：



30

式中、 $R^1$ および $R^2$ は、独立して選択され、かつ約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；Lは、上記のエステル不含リンカー部分またはエステル含有リンカー部分である。長鎖アルキル基は、飽和または不飽和でありうる。適切なアルキル基には、非限定的に、ラウリル（ $C_{12}$ ）、ミリスチル（ $C_{14}$ ）、パルミチル（ $C_{16}$ ）、ステアリル（ $C_{18}$ ）、およびイコシル（ $C_{20}$ ）が含まれる。好ましい態様では、 $R^1$ および $R^2$ は、同一であり、すなわち、 $R^1$ および $R^2$ は、どちらもミリスチル（すなわちジミリスチル）、 $R^1$ および $R^2$ は、どちらもステアリル（すなわちジステアリル）等である。

40

## 【0248】

上記式(VII)において、PEGは、約550ダルトン~約10,000ダルトンの範囲の平均分子量を有する。場合によっては、PEGは、約750ダルトン~約5,000ダルトン（例えば、約1,000ダルトン~約5,000ダルトン、約1,500ダルトン~約3,000ダルトン、約750ダルトン~約3,000ダルトン、約750ダルトン~約2,000ダルトン等）の平均分子量を有する。好ましい態様では、PEGは、約2,000ダルトンまたは約750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、またはアリールで置換されていてもよいことがある。ある態様では、末端ヒドロキシル基は、メトキシまたはメチル基で置換されている。

## 【0249】

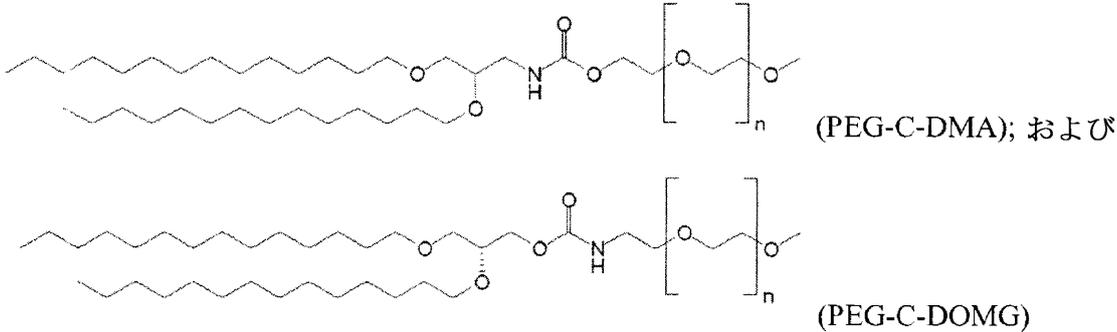
好ましい態様では、「L」は、エステル不含リンカー部分である。適切なエステル不含リンカーには、非限定的に、アミドリリンカー部分、アミノリンカー部分、カルボニルリン

50

カー部分、カルバメートリンカー部分、尿素リンカー部分、エーテルリンカー部分、ジスルフィドリンカー部分、スクシニアミジルリンカー部分、およびそれらの組合せが含まれる。好ましい態様では、エステル不含リンカー部分は、カルバメートリンカー部分である（すなわち、PEG-C-DAAコンジュゲート）。別の好ましい態様では、エステル不含リンカー部分は、アミドリンカー部分である（すなわち、PEG-A-DAAコンジュゲート）。なお別の好ましい態様では、エステル不含リンカー部分は、スクシニアミジルリンカー部分である（すなわち、PEG-S-DAAコンジュゲート）。

【0250】

特定の態様では、PEG-脂質コンジュゲートは、以下から選択される。



10

【0251】

PEG-DAAコンジュゲートは、標準技法および当業者に公知の試薬を用いて合成される。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、および尿素結合を有するであろうと認識されよう。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、容易に入手可能であることを認識しているであろう。例えば、March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY* (Wiley 1992); Larock, *COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS* (VCH 1989); および Furniss, *VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY*, 5th ed. (Longman 1989)を参照されたい。PEG-DAAコンジュゲートの合成の異なる点で、存在する任意の官能基が、保護および脱保護を必要としうることも、認識されよう。当業者は、そのような技法が周知であることを認識しているであろう。例えば、Green and Wuts, *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS* (Wiley 1991)を参照されたい。

20

30

【0252】

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<sub>12</sub>)-PEGコンジュゲート、ジミリスチルオキシプロピル(C<sub>14</sub>)-PEGコンジュゲート、ジパルミチルオキシプロピル(C<sub>16</sub>)-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<sub>18</sub>)-PEGコンジュゲートである。当業者は、本発明のPEG-DAAコンジュゲートに、他のジアルキルオキシプロピルを使用することができることを容易に認識しているであろう。

【0253】

前記に加えて、PEGの代わりに他の親水性ポリマーを使用することができることは、当業者に容易に明らかになる。PEGの代わりに使用することのできる適切なポリマーの例には、非限定的に、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、および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などの誘導体化セルロースが含まれる。

40

【0254】

前記構成要素に加えて、本発明の粒子（例えばSNALPまたはSPLP）は、さらに、陽イオン性ポリ（エチレングリコール）（PEG）脂質またはCPLを含みうる（例えば、Chen et al., *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000)を参照）。本発明に使用するために適したSPLPおよびSPLP-CPL、ならびにSPLPおよびSPLP-CPLを製造および使用する方法は、例えば、米国特許第6,852,334号およびPCT公開番号第WO 00/62813に開示されており、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

50

## 【0255】

適切なCPLには、式(VIII)で示される化合物が含まれる：



式中、A、W、およびYは、下記の通りである。

## 【0256】

式(VIII)に関して、「A」は、脂質アンカーとして作用する両親媒性脂質、中性脂質、または疎水性脂質などの脂質部分である。適切な脂質の例には、非限定的に、ジアシルグリセロイル(diacylglyceroly)、ジアルキルグリセロイル(dialkylglyceroly)、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。

10

## 【0257】

「W」は、親水性ポリマーまたはオリゴマーなどの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、または低い固有免疫原性をもつ生体適合性ポリマーである。または、親水性ポリマーは、適切なアジュバントと共に使用するならば、弱抗原性でありうる。適切な非免疫原性ポリマーには、非限定的に、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、およびそれらの組合せが含まれる。好ましい態様では、ポリマーは、約250~約7,000ダルトンの分子量を有する。

## 【0258】

「Y」は、ポリ陽イオン性部分である。ポリ陽イオン性部分という用語は、正電荷、好ましくは、選択されたpHで、好ましくは生理的pHで、少なくとも2個の正荷電を有する化合物、誘導体、または官能基を指す。適切なポリ陽イオン性部分には、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、リシン、およびヒスチジンなどの塩基性アミノ酸およびその誘導体；スベルミン；スベルミジン；陽イオン性 dendrimer；ポリアミン；ポリアミン糖；およびアミノ多糖が含まれる。ポリ陽イオン性部分は、構造が直鎖テトラリシンのような直鎖、分枝または dendrimer でありうる。ポリ陽イオン性部分は、選択されたpH値で約2~約15個の正荷電、好ましくは約2~約12個の正荷電、さらに好ましくは約2~約8個の正荷電を有する。用いるべきポリ陽イオン性部分の選択は、所望の粒子の適用の種類により決定することができる。

20

## 【0259】

ポリ陽イオン性部分の電荷は、粒子部分全体の周囲に分布することがあるか、またはその代わりに、粒子部分の特定の一領域における別個の濃度の電荷密度、例えば電荷スパイクでありうる。電荷密度が粒子上に分布している場合、電荷密度は等分布または非等分布することがある。ポリ陽イオン性部分の電荷分布の全ての変形が、本発明により包含される。

30

## 【0260】

脂質「A」および非免疫原性ポリマー「W」は、様々な方法で、好ましくは共有結合により結合させることができる。「A」と「W」を共有結合させるために、当業者に公知の方法を使用することができる。適切な結合には、非限定的に、アミド結合、アミン結合、カルボキシル結合、カルボネート結合、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。「A」および「W」は、結合を達成するために相補的官能基を有さなければならないことは、当業者に明らかであろう。一方が脂質上で、もう一方がポリマー上にあるこれらの二つの基の反応は、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、その末端ヒドロキシルを例えばNHSおよびDCCで活性化して活性エステルを形成させ、次に、アミノ基を有するポリマー、例えばポリアミドと反応させる場合(例えば、米国特許第6,320,017号および第6,586,559号参照、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる)、これら二つの基の間にアミド結合が形成するであろう。

40

## 【0261】

場合によっては、ポリ陽イオン性部分に、ターゲティングリガンドなどのリガンドまた

50

はカルシウムと錯体化するためのキレート部分を結合させることができる。好ましくは、リガンドが結合した後に陽イオン性部分は正の電荷を維持する。場合によっては、結合されるリガンドは、正電荷を有する。適切なりガンドには、非限定的に、反応性官能基を有する化合物または装置が含まれ、脂質、両親媒性脂質、担体化合物、生体親和性化合物、生体材料、生体高分子、生物医用装置、分析的に検出可能な化合物、治療活性化合物、酵素、ペプチド、タンパク質、抗体、免疫刺激剤、放射標識、蛍光発生素、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、他のターゲティング部分または毒素が含まれる。

#### 【0262】

脂質コンジュゲート（例えばPEG-脂質）は、典型的には、粒子中に存在する総脂質の約0.1mol%～約2mol%、約0.5mol%～約2mol%、約1mol%～約2mol%、約0.6mol%～約1.9mol%、約0.7mol%～約1.8mol%、約0.8mol%～約1.7mol%、約0.9mol%～約1.6mol%、約0.9mol%～約1.8mol%、約1mol%～約1.8mol%、約1mol%～約1.7mol%、約1.2mol%～約1.8mol%、約1.2mol%～約1.7mol%、約1.3mol%～約1.6mol%、または約1.4mol%～約1.5mol%を構成する。

#### 【0263】

当業者は、用いられる脂質コンジュゲートに応じて、そして核酸-脂質粒子が融合誘発性になる速度に応じて、脂質コンジュゲートの濃度が変動しうることを認識しているであろう。

#### 【0264】

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、核酸-脂質粒子からの脂質コンジュゲートの交換速度、および今度は核酸-脂質粒子が融合誘発性になる速度を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を脂質コンジュゲートとして使用する場合、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上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、核酸-脂質粒子が融合誘発性になる速度を変動させることができる。加えて、例えば、pH、温度、イオン強度を含めた他の変数を用いて、核酸-脂質粒子が融合誘発性になる速度を変動および/または制御することができる。核酸-脂質粒子が融合誘発性になる速度を制御するために用いることができる他の方法は、本開示を読むとき当業者に明らかになるであろう。

#### 【0265】

### VI. 脂質粒子の調製

干渉性RNAなどの活性薬剤または治療剤が脂質二重層に封入されて分解から保護される本発明の脂質粒子、例えばSNALPは、非限定的に、連続混合法または直接希釈工程を含めた当技術分野で公知の任意の方法により形成させることができる。

#### 【0266】

好ましい態様では、陽イオン性脂質は、式(I)、(II)、および(III)で示される脂質、またはそれらの組合せである。他の好ましい態様では、非陽イオン性脂質は、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))、18:1PE(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-ジエラドイル-ホスファチジルエタノールアミン(DEPE))、18:0-18:1PE(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))、16:0-18:1PE(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、PEG2000、PEG5000、PEG-改変ジアシルグリセロール、またはPEG-改変ジアルキルオキシプロピル）、コレステロール、またはそれらの組合せである。

## 【0267】

ある態様では、本発明は、連続混合法により、例えば干渉性RNAなどの核酸を含む水溶液を第1リザーバーに用意すること、有機脂質溶液を第2リザーバーに用意すること、および核酸（例えば干渉性RNA）を封入しているリポソームが実質的に瞬時に生成するように、有機脂質溶液が水溶液と混合するようにその有機脂質溶液とその水溶液を混合することにより、SNALPを提供する。この工程およびこの工程を支えるための装置は、米国特許出願公開第20040142025号に詳細に記載されており、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

## 【0268】

脂質および緩衝溶液を混合チャンバーのような混合環境に連続的に導入する操作は、緩衝溶液で脂質溶液を連続希釈させることによって、混合時に実質的に瞬時にリポソームを生成させる。本明細書において使用する「脂質溶液を緩衝溶液で連続的に希釈する」という語句（および変形）は、一般に、脂質溶液が水和工程において小胞発生を達成するために十分な力で十分に迅速に希釈されることを意味する。核酸を含む水溶液を有機脂質溶液と混合することにより、その有機脂質溶液は、緩衝溶液（すなわち水溶液）の存在下で連続的な段階希釈を受け、核酸-脂質粒子を生成する。

10

## 【0269】

連続混合法を用いて形成されたSNALPは、典型的には、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、または約70nm～約90nmの径を有する。そのように形成した粒子は凝集せず、所望により均一な粒子径を達成するように整粒される。

20

## 【0270】

別の態様では、本発明は、リポソーム溶液を形成させること、ならびに制御された量の希釈緩衝液が入った収集容器にリポソーム溶液を直ちに直接導入することを含む直接希釈工程により生成したSNALPを提供する。好ましい局面では、収集容器は、希釈を容易にするように収集容器の内容物を攪拌するように設計された一つまたは複数の要素を含む。一局面では、収集容器中に存在する希釈緩衝液の量は、それに導入されたりポソームの容量に実質的に等しい。非限定的な例として、リポソームの45%エタノール溶液は、等容量の希釈緩衝液が入った収集容器に導入された場合に、好都合には、より小さな粒子をもたらすであろう。

## 【0271】

なお別の態様では、本発明は、希釈緩衝液が入った第3のリザーバーを流体的に第2の混合領域と連結する直接希釈工程により生成したSNALPを提供する。この態様では、第1混合領域で形成したリポソーム溶液を、第2混合領域で希釈緩衝液と直ちに直接混合する。好ましい局面では、第2の混合領域は、リポソーム溶液および希釈緩衝液の流れが、180°対向する流れとして合流するように配置されたT-連結基を含むが、例えば約27°～約180°のより浅い角度を提供する連結器を使用することもできる。ポンプ機構は、第2の混合領域に制御可能な緩衝液流を送達する。一局面では、第2の混合領域に提供される希釈緩衝液の流速は、第1の混合領域からそこに導入されるリポソーム溶液の流速に実質的に等しいように制御される。この態様は、好都合には、第2の混合領域中でリポソーム溶液と混合する希釈緩衝液の流れ、したがって第2の混合工程の間の緩衝液中のリポソーム溶液の濃度もまたさらに制御可能にする。そのような希釈緩衝液の流速の制御により、好都合には、低濃度で小さな粒子径の形成が可能になる。

30

40

## 【0272】

これらの直接希釈工程を実施するためのこれらの工程および装置は、米国特許出願公開第20070042031号に詳細に記載されており、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

## 【0273】

直接希釈工程を用いて形成したSNALPは、典型的には、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、または約70nm～約90nmの径を有する。そのように形成した粒子は凝集せず、場合により均一な粒子径を達成するように整粒される。

50

## 【0274】

必要であれば、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、リポソームを整粒するために利用可能な任意の方法により整粒することができる。整粒は、所望の径範囲および比較的狭い粒子径分布を達成するために行うことができる。

## 【0275】

所望の径に粒子を整粒するためにいくつかの技法を利用することができる。リポソームのために使用することができ、本発明の粒子に等しく適用可能な一つの製粒方法は、米国特許第4,737,323号に記載されており、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。槽内超音波処理またはプローブ超音波処理のいずれかにより粒子懸濁液を超音波処理することにより、径が粒子径約50nm未満に漸減する。ホモジナイゼーションは、より大きな粒子をより小さな粒子に断片化する剪断エネルギーに頼る別の方法である。典型的なホモジナイゼーション手順では、選択された粒子径、典型的には約60～約80nmが観察されるまで標準的な乳剤ホモジナイゼーションにより粒子を再循環させる。両方の方法において、従来のレーザー光径判別またはQELSにより、粒子径分布をモニターすることができる。

10

## 【0276】

細孔性ポリカーボネート膜または非対称なセラミック膜を通した粒子の押出もまた、粒子径を相対的に明確な径分布に縮小させるために有効な方法である。典型的には、所望の粒子径分布が達成されるまで、膜を1回または複数回通過させて懸濁液を循環させる。漸減する孔の膜を通過させて粒子を押し出し、徐々に小さな径を達成することができる。

20

## 【0277】

いくつかの態様では、SNALP中の核酸は、例えば、米国特許出願第09/744,103号に記載されたように予め濃縮されるが、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

## 【0278】

他の態様では、その方法は、さらに、本発明の組成物を用いて細胞のリポフェクションを行うために有用な非脂質性ポリ陽イオンを添加することを含む。適切な非脂質性ポリ陽イオンの例には、臭化ヘキサジメトリン（POLYBRENE（登録商標）のブランド名でAldrich Chemical Co.（Milwaukee, Wisconsin, USA）から販売）または他のヘキサジメトリン塩が含まれる。他の適切なポリ陽イオンには、例えば、ポリ-L-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、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。これらの塩が添加されるのは、好ましくは粒子が形成した後である。

30

## 【0279】

いくつかの態様では、形成したSNALP中の核酸/脂質の比（質量/質量比）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。出発物質の比もまた、この範囲に入る。他の態様では、SNALP調製物は、総脂質10mgあたり約400 $\mu$ gの核酸、または約0.01～約0.08の、さらに好ましくは核酸50 $\mu$ gあたり1.25mgの総脂質に対応する約0.04の核酸/脂質の質量比を使用する。他の好ましい態様では、粒子は、約0.08の核酸/脂質量比を有する。

## 【0280】

他の態様では、形成したSNALP中の脂質:核酸比（質量/質量比）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)、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)である。出発物質の比もまた、この範囲に入る。

40

## 【0281】

以前に述べたように、複合化脂質は、さらにCPLを含みうる。SNALP-CPL（CPL含有SNALP）を製造するための様々な一般法を本明細書に述べる。二つの一般的な技法には、「挿入

50

後」技法、すなわち例えば予め形成したSNALPへのCPLの挿入、および例えばSNALP形成段階の間に、CPLを脂質混合物に含ませる「標準」技法が含まれる。挿入後技法は、主にSNALP二重層膜の外側にCPLを有するSNALPを生じ、一方で、標準技法は、内面および外面の両方にCPLを有するSNALPを提供する。この方法は、特に、リン脂質（コレステロールを含有する）から作られた小胞およびPEG-脂質（PEG-DAAおよびPEG-DAGなど）を含有する小胞にも有用である。SNALP-CPLの製造方法は、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；米国特許出願公開第20020072121号；ならびにPCT公開番号第WO 00/62813に教示されており、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【0282】

10

#### VII. キット

本発明は、また、キット形式の脂質粒子（例えばSNALP）を提供する。キットは、脂質粒子の様々な要素（例えば、核酸などの活性薬剤または治療剤、および粒子の個別の脂質構成要素）を保持するように区画化されている容器を含むことがある。いくつかの態様では、キットは、さらに、エンドソーム膜不安定化剤（例えばカルシウムイオン）を含むことがある。典型的には、キットには、本発明の脂質粒子組成物が好ましくは脱水された形態で再水および投与のための説明書と共に中に入っている。

【0283】

本明細書に説明するように、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、関心対象の特定の組織、器官、または腫瘍を優先的にターゲティングするように誘導することができる。場合によっては、SNALPなどの脂質粒子の優先的なターゲティングは、粒子自体の組成を制御することにより実施することができる。例えば、実施例11に示すように、肝臓外部の腫瘍を優先的にターゲティングするために、1:57 PEG-cDSA SNALP製剤を使用することができる一方で、肝臓（肝臓腫瘍を含む）を優先的にターゲティングするために、1:57 PEG-cDMA SNALP製剤を使用することができることを見出された。

20

【0284】

ある他の場合には、粒子のターゲティングをさらに高めるために、脂質粒子の表面にターゲティング部分を結合させることが望ましいことがある。ターゲティング部分（例えば、抗体、タンパク質など）を脂質（本発明の粒子に用いられるものなど）に結合させる方法は、当業者に公知である。

30

【0285】

#### VII. 脂質粒子の投与

本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、一度形成すると、細胞への活性薬剤または治療剤（例えば、干渉性RNAなどの核酸）の導入に有用である。したがって本発明は、また、核酸（例えば干渉性RNA）などの活性薬剤または治療剤を細胞に導入するための方法を提供する。この方法は、最初に上記の粒子を形成させ、次に、細胞への活性薬剤または治療剤の送達が起こるために十分な時間、細胞とその粒子を接触させることにより、インピトまたはインピボで実施される。

【0286】

本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、それらが混合または接触されるほとんどあらゆる細胞型に吸着することができる。それらの粒子は、ひとたび吸着すると細胞の一部によりエンドサイトーシスされるか、脂質を細胞膜と交換するか、または細胞と融合するかのいずれかでありうる。粒子の活性薬剤または治療剤（例えば核酸）部分の輸送または組入れは、これらの経路のいずれか一つにより実施することができる。特に、融合が起こる場合、粒子の膜は細胞膜に組入れられ、粒子の内容物は細胞内液と混和する。

40

【0287】

本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、単独で、または投与経路および標準的な薬学的診療により選択された薬学的に許容される担体（例えば、生理食塩水またはリン酸緩衝液）と混合して、投与することができる。一般に、生理緩衝食塩水（例えば135~150mM NaCl）が薬学的に許容される担体として用いられよう。他の適切な担体には、アルブミン、

50

リポタンパク質、グロブリンなどの糖タンパク質を安定性強化のために含む、例えば、水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシン等が含まれる。追加的に適切な担体は、例えば、RE MINGTON'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する「担体」には、任意および全ての溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗細菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、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、ヒトに投与したときにアレルギー性または類似の有害反応を生じない分子実体および組成物を表す。

#### 【0288】

薬学的に許容される担体は、一般に、粒子が形成した後に添加される。したがって、粒子が形成した後に、生理緩衝食塩水などの薬学的に許容される担体に粒子を希釈することができる。

10

#### 【0289】

薬学的製剤中の粒子の濃度は、広く、すなわち約0.05重量%未満から、通常は約2~5重量%で、または少なくとも約2~5重量%で、約10~90重量%と同率まで変動することがあり、選択された特定の投与様式に従って、主として流体容量、粘度などにより選択されよう。例えば、処理に関連する流体負荷を低下させるために、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するうっ血性心不全または重症高血圧症を有する患者に特に望ましいことがある。または、投与部位の炎症を和らげるために、刺激性脂質から構成される粒子を低濃度に希釈することもできる。

20

#### 【0290】

本発明の薬学的組成物は、従来の周知の滅菌技法により滅菌することができる。水溶液は、使用のためにパッケージすることができるか、または無菌条件で濾過して凍結乾燥することができる。その凍結乾燥調製物は、投与前に滅菌水溶液と混合される。この組成物は、適切な生理的条件に必要とされるような、薬学的に許容される補助物質、例えばpH調整緩衝剤、浸透圧調整剤など、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を含有することがある。追加的に、粒子懸濁液は、保存時のフリーラジカルおよび脂質の過酸化障害から脂質を守る脂質保護剤を含むことがある。-トコフェロールなどの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などの水溶性鉄特異的キレート剤が適切である。

30

#### 【0291】

##### A. インビボ投与

インビボ療法のための全身送達、例えば、循環などの身体システムを経由した遠位標的細胞への治療用核酸の送達は、PCT公開番号第WO 05/007196、WO 05/121348、WO 05/120152、およびWO 04/002453に記載された粒子のような核酸-脂質粒子を用いて達成されたが、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。本発明は、また、血清中のヌクレアーゼ分解から核酸を保護し、非免疫原性であり、径が小さく、繰り返し投薬に適した、完全封入された脂質粒子を提供する。

#### 【0292】

インビボ投与のために、投与は、当技術分野で公知の任意の方法、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ことができる。投与は、単回または分割投与により果たすことができる。薬学的組成物は、非経口的、すなわち、関節内、静脈内、腹腔内、皮下、または筋肉内に投与することができる。いくつかの態様では、薬学的組成物は、ポラス注射により静脈内または腹腔内投与される（例えば、米国特許第5,286,634号を参照）。細胞内核酸送達は、また、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)に述べられている。脂質に基づく治療薬を投与するなお他の方法は、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。脂質粒子は、疾患部位

40

50

での直接注射により、または疾患部位から遠位の部位の注射により投与することができる（例えば、Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York, pp.70-71(1994)を参照）。上記参照の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【0293】

吸入（例えば鼻腔内または気管内）により投与するために、本発明の組成物は、単独で、または他の適切な構成要素と組合せて、エアロゾル製剤に製薬することができる（すなわち、その製剤を「噴霧する」ことができる）（Brigham et al., Am. J. Sci., 298:278 (1989)を参照）。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の加圧された許容されうる噴射剤に入れることができる。

10

【0294】

ある態様では、薬学的組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および/または他のエアロゾル送達用ビヒクルにより送達することができる。核酸組成物を鼻エアロゾルスプレーにより肺に直接送達するための方法は、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用いた薬物の送達（米国特許第5,725,871号）もまた、薬学分野で周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン（polytetrafluoroethylene）支持マトリックスの形態の経粘膜薬物送達は、米国特許第5,780,045号に記載されている。上記特許の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【0295】

例えば、関節内（関節の中）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、および皮下経路などによる非経口投与に適した製剤には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌薬、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うる水性および非水性の等張滅菌注射剤、ならびに懸濁化剤、溶解補助剤、粘稠化剤、安定化剤、および保存料を含みうる水性および非水性滅菌懸濁剤が含まれる。本発明の実施において、組成物は、好ましくは、例えば静脈内注入により、経口的、局所的、腹腔内、膀胱内、または髄腔内に投与される。

20

【0296】

一般に、静脈内投与する場合、脂質粒子製剤は、適切な薬学的担体を用いて製剤化される。本発明の組成物および方法に、多数の薬学的に許容される担体を用いることができる。本発明に使用するために適した製剤は、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE S, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)に見出される。様々な水性担体、例えば、水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシンなどを使用することができる。それらの担体は、安定性を高めるためにアルブミン、リポタンパク質、グロブリン等の糖タンパク質を含みうる。一般に、生理緩衝食塩水（135~150mM NaCl）が、薬学的に許容される担体として用いられるであろうが、他の適切な担体も十分であろう。これらの組成物は、濾過などの従来のリポソーム滅菌技法により滅菌することができる。この組成物は、生理的条件に近づける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、例えばpH調整緩衝剤、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を含みうる。これらの組成物は、上に言及した技法を使用して滅菌することができるか、またはその代わりに、滅菌条件で製造することができる。結果として得られた水溶液は、使用のためにパッケージすることができるか、または無菌条件での濾過および凍結乾燥を行い、投与前に滅菌水溶液と凍結乾燥した調製物を混合することができる。

30

40

【0297】

ある適用では、本明細書に開示された脂質粒子は、個体に経口投与することにより送達することができる。粒子は、賦形剤と共に組入れて、服用可能な錠剤、パッカル錠、トローチ剤、カプセル剤、丸剤、ロゼンジ、エリキシル剤、洗口剤、懸濁剤、口腔スプレー剤、シロップ剤、ウエハースなどの形態で使用することができる（例えば、米国特許第5,641,515号、第5,580,579号、および第5,792,451を参照、その開示は、全ての目的について

50

全体として本明細書に参照により組入れられる)。これらの経口剤形は、また、以下を含有してもよい:結合剤、ゼラチン;賦形剤、滑沢剤、および/または着香料。単位剤形がカプセルの場合、それは、上記物質に加えて液体担体を含有することがある。様々な他の物質がコーティングとして、または他の場合には投薬単位の物理的形態を改変するために存在することがある。当然、任意の単位剤形を調製する際に使用される任意の物質は、薬学的に純粋で、用いられる量で実質的に無毒であるべきである。

#### 【0298】

典型的には、これらの経口製剤は、少なくとも約0.1%またはそれ以上の脂質粒子を含有することがあるが、粒子の率は、当然変動することがあり、好都合に合計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%または以上でありうる。勿論、化合物の任意の所定単位用量中に適切な薬用量が得られる方法で、治療的に有用な各組成物中の粒子の量を調製することができる。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品有効期間、および他の薬理学的考察などの要因が、そのような薬学的製剤を調製する当業者に考慮されるであろうし、そのような場合に、様々な薬用量および処置方式が望ましいことがある。

10

#### 【0299】

経口投与に適した製剤は:(a)核酸(例えば干渉性RNA)などのパッケージされた治療剤の有効量を、水、食塩水、またはPEG400などの希釈剤に懸濁したものの液剤、(b)それぞれ核酸(例えば干渉性RNA)などの治療剤の所定量を液体、固体、顆粒、またはゼラチンとして含有するカプセル剤、サシェ(sachet)、または錠剤;(c)適切な液体への懸濁剤;および(d)適切な乳剤から成ることができる。錠剤の剤形は、一つまたは複数の乳糖、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、パレイショデンプン、微結晶セルロース、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、および他の賦形剤、着色料、増量剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存料、矯味剤、色素、崩壊剤、および薬学的に適合されうる担体が含まれる。ロゼンジの剤形は、矯味剤、例えばスクロース中に核酸(例えば干渉性RNA)などの治療剤を含むことがあり、同様に、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアラビアゴム乳剤等の不活性基剤中に治療剤を含むパステル剤、ならびに治療剤に加えて当技術分野で公知の担体を含有するゲル剤等を含むことがある。

20

#### 【0300】

それらの別の使用例では、脂質粒子は、広い範囲の局所投薬剤形に組入れることができる。例えば、SNALPなどの核酸-脂質粒子を含有する懸濁剤は、ゲル剤、油剤、乳剤、局所クリーム剤、パスタ剤、軟膏、ローション剤、フォーム、ムース等として製剤化および投与することができる。

30

#### 【0301】

本発明の脂質粒子の医薬製剤を調製する場合、精製されている粒子の量を用いて、空の粒子または核酸などの治療剤が外面に付随している粒子を低減または除去することが好ましい。

#### 【0302】

本発明の方法は、様々なホストで実施することができる。好ましいホストには、霊長類(例えばヒトおよびチンパンジーと同様に他の非ヒト霊長類)、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、齧歯類(例えばラットおよびマウス)、ウサギ、およびブタなどの哺乳動物種が含まれる。

40

#### 【0303】

投与される粒子の量は、治療剤(例えば核酸)と脂質の比、使用される特定の治療剤(例えば核酸)、処置される疾患または障害、患者の年齢、体重、および状態、ならびに臨床家の判断に依存するであろうが、一般に、約0.01~約50mg、好ましくは体重1kgあたり約0.1~約5mg、または投与(例えば注射)1回あたり約 $10^8$ ~ $10^{10}$ 個の粒子であろう。

#### 【0304】

B. インビトロ投与

50

インビトロ適用のために、核酸（例えば干渉性RNA）などの治療剤の送達は、植物起原または動物起原であろうと、脊椎動物または無脊椎動物であろうと、そしていずれの組織または種類であろうと、培養物中で成長する任意の細胞に対するものでありうる。好ましい態様では、細胞は、動物細胞、さらに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。

#### 【0305】

インビトロで実施した場合に、細胞と脂質粒子の間の接触が、生物学的に適合されうる培地中で起こる。粒子の濃度は、特定の用途に応じて広く変動するが、一般に約 $1\mu\text{mol} \sim 10\text{mmol}$ である。脂質粒子による細胞の処理は、一般に、生理的温度（約 $37^\circ\text{C}$ ）で、約1～48時間、好ましくは約2～4時間実施される。

10

#### 【0306】

好ましい態様の一群では、脂質粒子懸濁物は、約 $10^3 \sim 10^5$ 個/ml、さらに好ましくは約 $2 \times 10^4$ 個/mlの細胞密度を有する、60～80%集密の平板培養された細胞に加えらる。細胞に加える懸濁物の濃度は、好ましくは約 $0.01 \sim 0.2\mu\text{g/ml}$ 、さらに好ましくは約 $0.1\mu\text{g/ml}$ である。

#### 【0307】

エンドソーム放出パラメーター（ERP）アッセイを用いて、SNALPまたは本発明の他の脂質粒子の送達効率を最適化することができる。ERPアッセイは、米国特許出願公開第20030077829号に詳細に記載されており、その開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。さらに詳細には、ERPアッセイの目的は、結合/取込みまたはエンドソーム膜との融合/その不安定化にそれらが及ぼす相対作用に基づき、SNALPの様々な陽イオン性脂質およびヘルパー脂質構成要素の作用を判別することである。このアッセイは、SNALPまたは他の脂質粒子の各構成要素が送達効率にどのように影響するかを定量的に決定することにより、SNALPまたは他の脂質粒子を最適化できるようにする。通常は、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）の発現を測定することから、場合によっては、発現プラスミドについて最適化されたSNALP製剤は、また、干渉性RNAを封入するためにも適するであろう。他の場合には、ERPアッセイは、干渉性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下方調節を測定するように適合させることができる。様々なSNALPまたは他の脂質粒子のそれぞれについてERPを比較することにより、最適化されたシステムを、例えば、細胞に最も大きく取込まれるSNALPまたは他の脂質粒子を、容易に決定することができる。

20

30

#### 【0308】

#### C. 脂質粒子を送達するための細胞

本発明の組成物および方法は、多種多様な種類の細胞をインビボおよびインビトロで処置するために使用される。適切な細胞には、例えば、造血前駆（幹）細胞、線維芽細胞、角化細胞、肝細胞、内皮細胞、骨格筋および平滑筋細胞、骨芽細胞、神経細胞、休止リンパ球、最終分化細胞、低速または細胞周期停止プライマリー細胞、実質細胞、リンパ球、上皮細胞、骨細胞等が含まれる。好ましい態様では、干渉性RNA（例えばsiRNA）などの活性薬剤または治療剤は、例えば、肺がん細胞、結腸がん細胞、直腸がん細胞、肛門がん細胞、胆管がん細胞、小腸がん細胞、胃がん細胞、食道がん細胞、胆嚢がん細胞、肝がん細胞、膵臓がん細胞、虫垂がん細胞、乳がん細胞、卵巣がん細胞、子宮頸がん細胞、前立腺がん細胞、腎がん細胞、中枢神経系のがん細胞、神経膠芽腫細胞、皮膚がん細胞、リンパ腫細胞、絨毛がん腫瘍細胞、頭頸部がん細胞、骨原性肉腫細胞、および血液がん細胞などががん細胞に送達される。

40

#### 【0309】

干渉性RNA（例えばsiRNA）を封入しているSNALPなどの脂質粒子のインビボ送達は、任意の細胞型の細胞をターゲティングするために適する。その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、齧歯類（例えばマウス、ラット、およびモルモット）、ウサギ、ブタ、および霊長類（例えばサル、チンパンジー、およびヒト）など

50

の哺乳動物を含めた、多種多様な脊椎動物の細胞に関して用いることができる。

【0310】

細胞の組織培養が必要でありうる限り、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) およびそこに引用された参照は、細胞培養への一般的な手引きを提供している。培養細胞システムは、多くの場合に、単層形態の細胞であるが、細胞懸濁物もまた使用される。

【0311】

D. 脂質粒子の検出

いくつかの態様では、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、約1、2、3、4、5、6、7、8時間またはそれ以上の時間、対象から検出可能である。他の態様では、本発明の脂質粒子（例えばSNALP）は、粒子の投与から約8、12、24、48、60、72、もしくは96時間後、または約6、8、10、12、14、16、18、19、22、24、25、もしくは28日後に対象から検出可能である。粒子の存在は、対象からの細胞、組織、または他の生物学的使用から検出することができる。粒子は、例えば、粒子の直接検出、干渉性RNA（例えばsiRNA）配列などの治療用核酸の検出、関心対象の標的配列の検出（すなわち、関心対象の配列の発現または発現減少を検出することにより）、またはそれらの組合せにより、検出することができる。

【0312】

1. 粒子の検出

SNALPなどの本発明の脂質粒子は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて検出することができる。例えば、当技術分野で周知の方法を用いて、脂質粒子の構成要素に標識を直接または間接的にカップリングすることができる。必要な感度、脂質粒子構成要素とのコンジュゲーションの容易さ、安定性の要件、ならびに利用可能な計装および廃棄の規定に応じて標識を選択して、多種多様な標識を使用することができる。適切な標識には、非限定的に、蛍光色素（例えば、フルオレセインおよび誘導体、例えばフルオレセインイソチオシアネート（FITC）およびOregon Green（商標）；ローダミンおよび誘導体、例えばテキサスレッド、テトラロジミン（tetra-rhodimine）イソチオシアネート（TRITC）等、ジゴキシゲニン、ピオチン、フィコエリトリン、AMCA、CyDye（商標）等；<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P等の放射標識；ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素；コロイド状金または色ガラスまたはポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等のプラスチックビーズなどの分光比色測定用標識が含まれる。標識は、当技術分野で公知の任意の手段を用いて検出することができる。

【0313】

2. 核酸の検出

核酸（例えば干渉性RNA）は、本明細書において当業者に周知のいくつかの任意の手段により検出および定量される。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ークロマトグラフィーなどの周知の方法により行われることがある。分光測定、ラジオグラフィー、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ー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、および高拡散（hyperdiffusion）クロマトグラフィーなどの追加的な生化学分析法もまた、用いることができる。

【0314】

核酸ハイブリダイゼーション形式の選択は、重要ではない。様々な核酸ハイブリダイゼーション形式は、当業者に公知である。例えば、よく見られる形式には、サンドイッチアッセイおよび競合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法は、一般に、例えば、"Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach," Eds. Hames and Higgins, IRL Press (1985) に記載されている。

【0315】

ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、検出途中の標的核酸を増大させる核酸増幅

10

20

30

40

50

システムの使用により高めることができる。分子プローブとして使用するための配列の増幅またはその後のサブクローニングのための核酸断片の発生に適したインビトロ増幅技法は、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<sup>-</sup>レプリカーゼ増幅および他のRNAポリメラーゼ介在技法（例えばNASBA（商標））などの、そのようなインビトロ増幅法による熟練者に指示するために十分な技法の例は、Sambrook et al., *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); Kwoh 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。インビトロ増幅した核酸をクローニングする改良法は、米国特許第5,426,039号に記載されている。当技術分野で記載されている他の方法は、核酸配列に基づく増幅（NASBA（商標）、Cangene, Mississauga, Ontario）およびQ<sup>-</sup>レプリカーゼシステムである。選択配列が存在する場合にのみ伸長または連結するようにPCRまたはLCRプライマーが設計されたこれらのシステムは、突然変異体を直接同定するために使用することができる。または、選択配列は、一般に例えば非特異的PCRプライマーを用いて増幅することができ、その後、突然変異を示す特異的配列を求めて、増幅された標的領域を探索することができる。上記参照の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

10

20

30

40

50

#### 【0316】

例えばインビトロ増幅法におけるプローブとして、遺伝子プローブとして、または阻害剤構成要素として使用するための核酸は、典型的には、Beaucage et al., *Tetrahedron Letters*, 22:1859-1862 (1981)により記載された固相ホスホルアミダイトトリエステル法により、例えば、Needham VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:6159 (1984)に記載された自動合成装置を使用して化学合成される。必要ならば、ポリヌクレオチドの精製は、典型的には未変性アクリルアミドゲル電気泳動またはPearson et al., *J. Chrom.*, 255:137-149 (1983)に記載された陰イオン交換HPLCのいずれかにより行われる。合成ポリヌクレオチドの配列は、Maxam and Gilbert (1980), Grossman and Moldave (eds.) *Academic Press*, New York, *Methods in Enzymology*, 65:499の化学分解法を用いて検証することができる。

#### 【0317】

転写物のレベルを決定するための代替手段は、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、一般に、Angerer et al., *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987)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、細胞は固体支持体、典型的にはガラス製スライドに固定される。DNAを探索するつもりならば、細胞を熱またはアルカリで変性させる。次に、中程度の温度でハイブリダイゼーション溶液と細胞を接触させ、標識された特異的プローブのアニーリングを可能にする。プローブは、好ましくは放射性同位体または蛍光レポーターで標識される。

#### 【実施例】

#### 【0318】

#### VIII. 実施例

本発明を具体例によりさらに詳細に説明する。以下の実施例を例示目的で提供するが、いかなる方法でも本発明を限定する意図はない。当業者は、本質的に同じ結果をもたらすように変更または改変することができる、様々な重大でないパラメーターを容易に認識す

るであろう。

【0319】

実施例1. 材料と方法

siRNA: これらの研究に使用される全てのsiRNA分子は、University of Calgary (Calgary, AB) またはDharmacon Inc. (Lafayette, CO) によって化学合成された。標準的な手順を用いてsiRNAを脱塩およびアニーリングした。

【0320】

siRNAの脂質封入: いくつかの態様では、以下の脂質から構成される核酸-脂質粒子にsiRNA分子を封入した: 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(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-ジミリスチルオキシプロピルアミン); 陽イオン性脂質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); 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(Sigma-Aldrich Corp.; St. Louis, MO)。言い換えると、以下の「1:57」製剤のSNALPにsiRNAを封入した: 1.4% PEG-cDMA; 57.1% DLinDMA; 7.1% DPPC; および34.3%コレステロール。他の態様では、以下の脂質から構成されるリン脂質不含SNALPにsiRNA分子を封入した: 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; 陽イオン性脂質DLinDMA; および合成コレステロール。言い換えると、以下の「1:62」製剤のリン脂質不含SNALPにsiRNAを封入した: 1.5% PEG-cDMA; 61.5% DLinDMA; および36.9%コレステロール。ビヒクル対照について、siRNAの非存在下で脂質組成が同一の空の粒子を形成させた。1:57製剤および1:62製剤が標的製剤であること、ならびに製剤中に存在する脂質(陽イオン性および非陽イオン性の両方)の量および脂質コンジュゲートの量の変動しうることを理解すべきである。典型的には1:57製剤において、陽イオン性脂質の量は57mol% ± 5mol%であり、脂質コンジュゲートの量は1.5mol% ± 0.5mol%であり、1:57製剤の均衡は、非陽イオン性脂質(例えば、リン脂質、コレステロール、またはこれら二つの混合物)で調整されるであろう。同様に、1:62製剤において、陽イオン性脂質の量は62mol% ± 5mol%であり、脂質コンジュゲートの量は1.5mol% ± 0.5mol%であり、1:62製剤の釣り合いは、非陽イオン性脂質(例えばコレステロール)で調整されるであろう。

【0321】

実施例2. 1:57 SNALPとして製剤化されたEg5 siRNAは、インビトロで細胞成長の強力な阻害剤である

Eg5をターゲティングするsiRNAを核酸構成要素として用いて、SNALP製剤を調製した。Eg5は、オルガネラ、微小管、または微小管に沿った染色体の移動に関係する機能に参与するキネシン関連タンパク質のメンバーである。これらの機能には、軸索輸送、核の融合または分裂時の微小管の滑り、ならびに減数分裂時および有糸分裂初期の染色体分離が含まれる。Eg5は、哺乳類細胞の有糸分裂に重要な役割を果たす。この研究に使用されたEg5 siRNAを表1に提供する。改変は、Eg5 2263 siRNA配列のセンスおよびアンチセンス鎖の選択された位置に2' OMe-ウリジンを導入することを伴い、ここで、そのsiRNA二重鎖は約20%未満の2' OMe-改変ヌクレオチドを有した。

【0322】

(表1) センスおよびアンチセンスEg5 RNAポリヌクレオチドを含むsiRNA二重鎖

改変	Eg5 2263のsiRNA配列	2' OMe 改変率 (%)	DS領域の 改変率 (%)
U/U	5'- <u>CUGAAGACCUGAAGACAAU</u> dTdT-3' 3'-dTdT <u>GACUUCUGGACUUCUGUUA</u> -5'	6/42 = 14.3%	6/38 = 15.8%

カラム1: 「U/U」=2' OMe-ウリジンで改変されたsiRNA二重鎖; カラム2: 2'-OMe改変ヌクレオチドを太字で下線を付けて示す。siRNA二重鎖は、代替的にまたは追加的に、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)ヌクレオチドを含みうる。「dT」=

10

20

30

40

50

デオキシチミジン。カラム3: siRNA二重鎖における2'OMe-改変ヌクレオチドの数および率を提供する。カラム4: siRNA二重鎖の二本鎖(DS)領域中の改変ヌクレオチドの数および率を提供する。

【0323】

SNALP製剤の脂質構成要素および物理的性質を表2に要約する。脂質薬物比は、核酸1mgあたりの総脂質をmg単位で記載する。平均粒子径および多分散性は、Malvern Instruments Zetasizerで測定した。核酸の封入は、本質的にHeyes et al., Journal of Controlled Release, 107:276-287 (2005)に記載されたように、Ribogreenアッセイを用いて測定した。

【0324】

(表2) この研究に使用したSNALP製剤の性質

試料番号	製剤組成、PEG(2000)-C-DMA/DLinDMA/DPPC/コレステロールのモル百分率 (%)	脂質/薬物比	完成生成物の性質		
			大きさ(nm)	多分散性	封入率 (%)
1	2   40   10   48	12.4	57	0.07	90
2	1.8   36.4   18.2   43.6	14.0	72	0.12	89
3	1.4   27.0   16.8   64.9	16.5	70	0.12	92
4	1.3   25.3   12.7   60.8	18.1	76	0.07	93
5	3.9   39.2   19.8   47.1	13.5	53	0.27	86
6	3.6   35.7   17.9   42.9	15.1	58	0.18	87
7	2.7   26.7   16.7   64.0	17.6	56	0.17	92
8	2.5   25.0   12.5   60.0	19.2	61	0.13	92
9	1.4   57.1   17.1   34.3	17.8	84	0.10	88
10	1.3   53.3   13.3   32.0	19.5	83	0.10	89
11	1.1   42.6   15.3   51.1	22.0	80	0.10	93
12	1.0   40.4   10.1   48.5	23.6	78	0.11	88
13	2.8   56.3   17.0   33.8	19.0	62	0.14	80
14	2.6   52.6   13.2   31.6	20.6	66	0.14	82
15	2.1   42.1   15.3   50.5	23.1	71	0.16	91
16	2   40   10   48	24.7	67	0.14	92

【0325】

siRNAのトランスフェクションによるEg5のサイレンシングは、哺乳動物細胞に有糸分裂停止およびアポトーシスを起こす。したがって、Eg5をターゲティングするsiRNAを含むSNALPをトランスフェクション後の細胞生存率は、インビトロトランスフェクション効率の簡単な生物学的読出しを提供する。代謝活性な細胞により蛍光発生生成物であるレゾルフィンに還元されるレサズリン色素である市販の試薬CellTiter-Blue(登録商標)(Promega Corp.; Madison, WI)を用いてインビトロ細胞培養物の細胞生存率を評価した。ヒト大腸がん細胞株HT29を標準的な組織培養技法を用いて培養した。SNALP適用の72時間後に、CellTiter-Blue(登録商標)試薬を培養物に添加して、細胞生存率の尺度である細胞の代謝活性を定量した。データは、リン酸緩衝食塩水(PBS)ビヒクルのみを与えた(「未処置」)対照細胞に対する細胞生存率(%)として示す。

【0326】

図1は、Eg5 2263 U/U siRNAを含む1:57 SNALP製剤が、試験した全てのsiRNA濃度で、腫瘍細胞の成長の最も強力な阻害剤に入ったことを示す(図1B、試料9を参照)。

【0327】

実施例3. 1:57 SNALPとして製剤化されたApoB siRNAは、インビボで強力なサイレンシング活性を有する

核酸構成要素としてアポリポタンパク質B(ApoB)をターゲティングするsiRNAを用いて、SNALP製剤を調製した。ApoBは、カイロミクロンおよび低密度リポタンパク質(LDL)の主なアポリポタンパク質である。ApoBの突然変異は、高コレステロール血症に関連する。ApoBは、器官特異的停止コドンが原因でそれぞれ腸および肝臓で合成されるApoB48およびApoB100の2個の主要形態で血漿中に存在する。この研究に使用されるApoB siRNAを表3に提供する。その改変は、ApoB siRNA配列のセンスおよびアンチセンス鎖の選択された位置

に2'OMe-ウリジンまたは2'OMe-グアノシンを導入することを伴い、ここで、siRNA二重鎖は、約20%未満の2'OMe-改変ヌクレオチドを有した。

【0328】

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

位置	改変	ApoB siRNAの配列	2'OMeの改変率 (%)	DS領域の改変率 (%)
10048	U2/2 G1/2	5'-AGUGUCAUCACACUGAAUACC-3' 3'-GUUCACAGUAGUGUGACUUAU-5'	7/42 = 16.7%	7/38 = 18.4%

カラム1: 数字は、マウスApoB mRNA配列XM\_137955に関するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位置を指す。カラム2: 数字は、各鎖の2'OMe化学的改変の分布を指す。カラム3: 2'OMe-改変ヌクレオチドを太字で下線を付けて示す。siRNA二重鎖は、代替的にまたは追加的に、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)ヌクレオチドを含みうる。カラム4: siRNA二重鎖中の2'OMe-改変ヌクレオチドの数および率を提供する。カラム5: siRNA二重鎖の二本鎖(DS)領域中の改変ヌクレオチドの数および率を提供する。

10

【0329】

製剤の脂質構成要素および物理的性質を表4に要約する。脂質薬物比は、核酸1mgあたりの総脂質をmg単位で記載する。平均粒子径および多分散性は、Malvern Instruments Zeta sizerで測定した。核酸の封入は、本質的にHeyes et al., Journal of Controlled Release, 107:276-287 (2005)に記載されたように、Ribogreenアッセイを用いて測定した。

20

【0330】

(表4) この研究に使用されたSNALP製剤の性質

群	製剤組成、脂質名 およびモル (%)	脂質/ 薬物比	完成生成物の性質		
			大きさ(nm)	多分散性	封入率 (%)
2	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 2   40   10   48	12.4	59	0.15	93
3	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   コレステロール 2.2   44.4   53.3	10.7	55	0.17	91
4	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DOPC   コレステロール 2   40   10   48	12.5	59	0.16	92
5	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DMPC   コレステロール 2   40   10   48	12.2	56	0.11	92
6	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPE   コレステロール 1.8   36.4   18.2   43.6	13.8	66	0.16	93
7	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 2   40   10   48	12.4	56	0.12	92
8	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 1.4   27.0   6.8   64.9	16.5	60	0.10	93
9	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 1.3   25.3   12.7   60.8	18.1	74	0.13	92
10	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 2.5   25.0   12.5   60.0	19.2	60	0.13	93
11	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 1.4   57.1   7.4   34.3	17.8	79	0.09	94
12	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 1.0   40.4   10.1   48.5	23.6	72	0.11	93
13	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC 2   70   28	8.7	73	0.09	87
14	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC 1.6   54.7   43.8	11.3	65	0.11	87

30

40

【0331】

BALB/cマウス(雌、少なくとも4週齢)をHarlan Labsから入手した。順応期間(少なくとも7日間)の後で、実験0日目に動物の外側尾静脈に静脈内(IV)注射によりSNALPを1日1回投与した(1匹あたり合計1用量)。投薬量は、体重1kgあたり1mgの封入されたsiRNAであり、10ml/kgに相当する(10μl単位となるように四捨五入)。陰性対照として、1群の動物にリン酸緩衝食塩水(PBS)ピヒクルのIV注射を行った。実験2日目に動物を安楽死させ、肝臓組織をRNAlater中に収集した。

50

【 0 3 3 2 】

本質的にJudge et al., Molecular Therapy, 13:494 (2006)に記載されたように、QuantiGeneアッセイ (Panomics; Fremont, CA) を用いてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) のmRNAレベルに対して基準化したApoB mRNAレベルについて肝臓組織を分析した。

【 0 3 3 3 】

図2は、ApoB 10048 U2/2 G1/2 siRNAを含む1:57 SNALP製剤が、インビボでApoB発現の減少に最も強力であったことを示す (群11を参照)。

【 0 3 3 4 】

実施例4. 1:57 SNALPとして製剤化されたApoB siRNAは、インビボで強力なサイレンシング活性を有する

10

表3に示すApoB siRNAを用いてSNALP製剤を調製した。製剤の脂質構成要素および物理的性質を表5に要約する。脂質：薬物比は、核酸1mgあたりの総脂質をmg単位で記載する。平均粒子径および多分散性は、Malvern Instruments Zetasizerで測定した。核酸の封入は、本質的にHeyes et al., Journal of Controlled Release, 107 276-287 (2005)に記載されたように、Ribogreenアッセイを用いて測定した。

【 0 3 3 5 】

(表5) この研究に使用するSNALP製剤の性質

SNALP (L:D 比)	siRNAの負荷量	粒子径 (多分散性)	封入率 (%)
2:30 (13)	ApoB-10048 U2/2 G1/2	65 nm (0.16)	88
1:57 (9)	ApoB-10048 U2/2 G1/2	74 nm (0.10)	89

20

【 0 3 3 6 】

この研究に使用した2:30 SNALP製剤は、PEG-C-DMA、DLinDMA、DSPC、およびコレステロール (その順序の) のモル百分率で記載したときに2:30:20:48の脂質組成である。この製剤は、13:1の投入脂質対薬物 (L:D) 比 (mg:mg) でシリンジプレスにより調製した。

【 0 3 3 7 】

この研究に使用した1:57 SNALP製剤は、PEG-C-DMA、DLinDMA、DPPC、およびコレステロール (その順序の) のモル百分率で記載したときに1.5:57.1:7:34.3の脂質組成である。この製剤は、9:1の投入脂質対薬物 (L:D) 比 (mg:mg) でシリンジプレスにより調製した。

30

【 0 3 3 8 】

BALB/cマウス (雌、4週齢) をHarlan Labsから入手した。順応期間 (少なくとも7日間) の後で、実験0、1、2、3および4日目に動物の外側尾静脈に静脈内 (IV) 注射によりSNALPを1日1回投与した (1匹あたり合計5用量)。1日投薬量は、体重1kgあたり1.0mg (2:30 SNALPについて) または0.1mg (1:57 SNALPについて) の封入性siRNAであり、これは10ml/kgに相当する (10µl単位となるように四捨五入)。陰性対照として、1群の動物にリン酸緩衝食塩水 (PBS) ビヒクルのIV注射を行った。実験7日目の最終処置の72時間後に動物を安楽死させ、肝臓組織をRNAlater中に収集した。

【 0 3 3 9 】

本質的にJudge et al., Molecular Therapy, 13:494 (2006)に記載されたように、QuantiGeneアッセイ (Panomics; Fremont, CA) を用いてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) のmRNAレベルに対して基準化したApoB mRNAレベルについて肝臓組織を分析した。

40

【 0 3 4 0 】

図3は、ApoB 10048 U2/2 G1/2 siRNAを含む1:57 SNALPが、10倍低い用量で、マウス肝臓におけるApoB遺伝子サイレンシングを2:30 SNALPの10倍を超えて効率的に仲介したことを示す。

【 0 3 4 1 】

実施例5. 1:57または1:62 SNALPとして製剤化されたApoB siRNAは、インビボで強力なサ

50

## イレンシング活性を有する

表3に示すApoB siRNAを有するSNALP製剤を調製した。製剤の脂質構成要素および物理的性質を表6に要約する。脂質：薬物比は、核酸1mgあたりの総脂質をmg単位で記載する。平均粒子径および多分散性は、Malvern Instruments Zetasizerで測定した。核酸の封入は、本質的にHeyes et al., Journal of Controlled Release, 107 276-287 (2005)に記載されたように、Ribogreenアッセイを用いて測定した。

## 【0342】

(表6) この研究に使用したSNALP製剤の性質

群	製剤組成、脂質名および モル百分率 (%)	脂質/ 薬物比	完成生成物の性質		
			大きさ (nm)	多分散性	封入率 (%)
2	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 1.4   57.1   7.1   34.3	8.9	76	0.06	89
3	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   コレステロール 1.5   61.5   36.9	8.1	76	0.04	86
4	PEG(2000)-C-DMA   DODMA   DPPC   コレステロール 1.4   57.1   7.1   34.3	9.0	72	0.05	95
5	PEG(5000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 1.4   57.1   7.1   34.3	9.6	52	0.16	89
6	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC   コレステロール 1.4   57.1   7.1   34.3	8.9	68	0.10	94
7	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPE   コレステロール 1.4   57.1   7.1   34.3	8.9	72	0.07	95
8	PEG(2000)-C-DMA   DLinDMA   DPPC 1.8   70.2   28.1	8.6	74	0.13	86

## 【0343】

BALB/cマウス（雌、少なくとも4週齢）をHarlan Labsから入手した。順応期間（少なくとも7日間）の後で、実験0日目に動物の外側尾静脈に静脈内（IV）注射によりSNALPを1日1回投与した（1匹あたり合計1回）。投薬量は、体重1kgあたり0.75mgの封入されたsiRNAであり、10ml/kgに相当する（10μl単位となるように四捨五入）。陰性対照として、1群の動物にリン酸緩衝食塩水（PBS）ビヒクルのIV注射を行った。実験2日目に動物を安楽死させ、肝臓組織をRNAlater中に収集した。

## 【0344】

本質的にJudge et al., Molecular Therapy, 13:494 (2006)に記載されたように、Quantigeneアッセイ（Panomics; Fremont, CA）を用いてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）のmRNAレベルに対して基準化したApoB mRNAレベルについて肝臓組織を分析した。

## 【0345】

図4は、1:57および1:62 SNALP製剤が、インビボで同程度のApoBサイレンシング活性を有したことを示す（例えば群2および3を参照）。

## 【0346】

実施例6. 1:62 SNALPとして製剤化されたApoB siRNAは、インビボで強力なサイレンシング活性を有する

表3に示すApoB siRNAを用いてSNALP製剤を調製した。製剤の脂質構成要素および物理的性質を表7に要約する。脂質：薬物比は、核酸1mgあたりの総脂質をmg単位で記載する。平均粒子径および多分散性は、Malvern Instruments Zetasizerで測定した。核酸の封入は、本質的にHeyes et al., Journal of Controlled Release, 107 276-287 (2005)に記載されたように、Ribogreenアッセイを用いて測定した。

## 【0347】

(表7) この研究に使用したSNALP製剤の性質

10

20

30

40

群	製剤組成、PEG(2000)-C-DMAIDLinDMAI コレステロールのモル百分率 (%)	脂質/ 薬物比	最終生成物の性質		
			大きさ (nm)	多分散性	封入率 (%)
2	1.5 61.5 36.9	6.1	80	0.07	92
3	1.4 54.8 43.8	6.6	74	0.05	89
4	2.0 61.2 36.7	6.2	71	0.11	91
5	1.8 54.5 43.6	6.7	67	0.09	91
6	1.3 68.1 30.6	7.4	91	0.06	89
7	1.2 61.8 37.1	8.0	87	0.10	90
8	1.7 67.8 30.5	7.6	81	0.07	91
9	1.4 56.3 42.3	8.6	75	0.11	92
10	1.9 61.3 36.8	8.2	72	0.10	91
11	1.8 56.1 42.1	8.8	70	0.10	90
12	1.3 66.7 32.0	9.5	89	0.09	89
13	1.2 61.7 37.0	10.0	87	0.10	91
14	1.7 66.4 31.9	9.6	82	0.11	90
15	1.5 61.5 36.9	10.1	79	0.10	91

10

20

30

40

## 【0348】

BALB/cマウス（雌、少なくとも4週齢）をHarlan Labsから入手した。順応期間（少なくとも7日間）の後で、実験0日目に動物の外側尾静脈に静脈内（IV）注射によりSNALPを1日1回投与した（1匹あたり合計1用量）。投薬量は、体重1kgあたり0.1mgの封入されたsiRNAであり、これは、10ml/kgに相当する（10μl単位となるように四捨五入）。陰性対照として、1群の動物にリン酸緩衝食塩水（PBS）ビヒクルのIV注射を行った。実験2日目に動物を安楽死させ、肝臓組織をRNAlater中に収集した。

## 【0349】

本質的にJudge et al., Molecular Therapy, 13:494 (2006)に記載されたように、Quantigeneアッセイ（Panomics; Fremont, CA）を用いてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）のmRNAレベルに対して基準化したApoB mRNAレベルについて肝臓組織を分析した。

## 【0350】

図5は、1:62 SNALP製剤が、二つの異なる脂質：薬物比（すなわち6.1および10.1）で、試験したリン脂質不含SNALP製剤の中で最も強力なApoB発現阻害剤の一つであったことを示す（群2および15を参照）。

## 【0351】

実施例7. シリンジプレスまたはギアポンプ工程により調製した1:57 SNALPを用いたApoB発現のインビボサイレンシング

この研究は、様々な製造工程により調製したときのApoBターゲティングsiRNAを用いた1:57 SNALP製剤の認容性および有効性の比較を例示する。特に、1:57 SNALPは、PBSまたはクエン酸緩衝液（ブレンド後希釈）のいずれかを使用したシリンジプレスまたはギアポンプ工程により調製し、マウスに静脈内投与した。

## 【0352】

## 実験計画

動物モデル：雌性BALB/cマウス、5週齢、群/ケージあたりn=4

siRNAの負荷量：ApoB 10048 U2/2 G1/2 siRNA

## 【0353】

認容性：

群	製剤	IV注射	
		siRNA mg/kg	脂質 mg/kg
1	PBS ビヒクル	標準容量10mL/kg	
2	1/57クエン酸直接希釈、シリンジプレス	7	77
3	1/57PBS直接希釈、シリンジプレス	7	96
4	1/57PBS直接希釈、ギアポンプ	7	79
5	1/57クエン酸直接希釈、シリンジプレス	9	99
6	1/57PBS直接希釈、シリンジプレス	9	123
7	1/57PBS直接希釈、ギアポンプ	9	102

## 【 0 3 5 4 】

10

有効性：

群	製剤	IV注射	
		siRNA mg/kg	脂質 mg/kg
8	PBS ビヒクル	標準容量10mL/kg	
9	1/57PBS直接希釈、シリンジプレス	0.05	0.68
10	1/57PBS直接希釈、ギアポンプ	0.05	0.57
11	1/57PBS直接希釈、シリンジプレス	0.1	1.36
12	1/57PBS直接希釈、ギアポンプ	0.1	1.13

## 【 0 3 5 5 】

20

製剤：

0.005 ~ 0.9mg siRNA/mLの製剤を提供し、0.22 μmフィルターで滅菌してクリンプトップバイアルに入れる。

## 【 0 3 5 6 】

製剤の詳細：

- 本研究に使用する脂質組成物「1|57クエン酸ブレンド」は、PEG-C-DMA、DLinDMA、DPP C、およびコレステロール（この順序の）のモル百分率で記載したときに1.4:57.1:7.1:34.3である。この製剤は、投入脂質対薬物比 8.9を有する。
- ギアポンプの設定は、0.8mmのT-コネクターおよび400mL/minの速度を含んだ。
- この研究に使用されるsiRNAは、apoB-10048 U2/2 G1/2 siRNAである。

## 【 0 3 5 7 】

30

製剤の概要：

	1:57 (9:1) + DOW siRNA	粒子径			最終L:D (mg:mg)
		平均Z (nm)	多分散性	封入率 (%)	
322-050807-1	シリンジ、PBSブレンド	79	0.12	92	13.6
322-050807-2	シリンジ、クエン酸ブレンド	86	0.11	91	11.0
322-050807-3	ギア、PBSブレンド	80	0.09	93	11.3

## 【 0 3 5 8 】

手順

処置：初回処置の直前に動物の体重を測定し、個別の動物の体重に基づき用量（10mL/kgに等しく、10 μl単位となるように四捨五入）を計算する。0日目に尾静脈からIV注射により被験物質を1回投与する（動物1匹につき合計1回）。試験期間中、体重を毎日（24時間毎に）測定する。ケージ脇の観察は、体重測定と同時に毎日、そして正当な理由のあるときに追加的に行う。

40

## 【 0 3 5 9 】

群1~7の終点：被験物質投与の24時間後の1日目に動物を屠殺する。屠殺時に心穿刺により採血する。血清のために全量をSSTマイクロテナ（microtainer）に収集する。室温で30（~60）分間凝固させ、16,000 × gおよび16 で5分間遠心分離し、逆さにして遠心分離が完全なことを確認し、4 で保存する。小動物臨床化学パネル全体にASTおよびSDHを追加したものを分析する。最優先項目：ALT、AST、SDH、ビリルビン、アルカリホスファターゼ、GGT、BUN、CPK、グルコース。二次優先項目：クレアチニン、アルブミン、グロブリン、総タンパク質。

50

## 【0360】

群8~12の終点:被験物質投与の48時間後の2日目に動物を屠殺する。心穿刺により採血し、血漿のために処理する。直ちに16,000×gで(16で)5分間遠心分離する。血漿の外観異常が観察された場合はいつでも記録する。透明な血漿上清をピペットで吸い出して清潔な微量遠心管にいれ、-80で保存する。以下の組織:肝臓および脾臓を取り出し、別々に秤量する。肝左葉の下半分(付着せず)を剥離し、5容のRNAlaterに浸漬する(2.0mL容チューブの中で<0.3gを1.5mLのRNAlaterに入れる)、4で少なくとも16時間保存してから分析し、永久保存用に-20または-80で長期保存する。製剤は認容性良好と予想される。処置に関連して苦痛の徴候を示すマウスは、動物施設職員の判断で終了させる。

## 【0361】

終了:致死用量のケタミン/キシラジンでマウスを麻酔し、次に心穿刺を行ってから頸椎脱臼させる。

## 【0362】

データ解析:動物の外観および行動ならびに体重により処置方式の認容性をモニターする。自動分析装置により血液臨床化学的性質を測定する。肝臓におけるApoBおよびGAPDHのmRNAレベルをQGアッセイにより測定する。血漿中のApoBタンパク質をELISAにより測定する。血漿中の総コレステロールを標準的な酵素/比色アッセイにより測定する。

## 【0363】

結果

1:57 SNALP製剤を投与したときに体重減少または動物の外観/行動に変化はなかった。図6は、クエン酸緩衝液により調製したSNALPの認容性が血液臨床化学パラメーターに関してPBS直接希釈と有意差がなかったことを示す。一定のsiRNA薬用量でシリンジクエン酸とシリンジPBSの間で認容性に差があったが、それは、おそらくこれらの2個の調製物の異なる最終脂質:薬物(L:D)比に依存したアーチファクトであった。

## 【0364】

図7は、ギアポンプにより調製した1:57 SNALPの有効性がシリンジプレスにより調製した同SNALPに類似したことを示す。認容性プロファイルは、ギアポンプ工程で改善し、それは、初期封入速度の増加および最終L:D比の減少が原因とすることができた。

## 【0365】

実施例8. 直接希釈またはインライン希釈工程により調製した1:57 SNALPを用いたApoB発現のインビボサイレンシング

この研究は、6:1または9:1の投入脂質対薬物比で直接希釈またはインライン希釈工程により調製したときの、ApoBターゲティングsiRNAを有する1:57 SNALP製剤の認容性および有効性の比較を例示する。

## 【0366】

実験計画

動物モデル:雌性BALB/cマウス、7週齢

siRNA負荷量:ApoB 10048 U2/2 G1/2 siRNA

## 【0367】

CBC/Diff:

群	マウスの数	被験物質	IV 薬用量	
			封入されたsiRNA	総脂質
1	3	PBS	-	-
2	3	1:57 SNALP (9:1)	7 mg/kg	71 mg/kg
3	3	1:57 SNALP (9:1)	11 mg/kg	112 mg/kg

## 【0368】

臨床化学:

10

20

30

40

群	マウスの数	被験物質	IV 薬用量	
			封入されたsiRNA	総脂質
4	4	PBS	-	-
5	4	1 57 SNALP (9:1)	9 mg/kg	92 mg/kg
6	4	1 57 SNALP (9:1)	11 mg/kg	112 mg/kg
7	4	(6:1)新しい1 57 SNALP	11 mg/kg	78 mg/kg
8	4	(6:1)新しい1 57 SNALP	13 mg/kg	93 mg/kg
9	4	(6:1)新しい1 57 SNALP	15 mg/kg	107 mg/kg
10	4	(6:1)新しい1 57 SNALP	17 mg/kg	121 mg/kg
11	4	1 57 SNALP (9:1)	11 mg/kg	112 mg/kg

10

## 【0369】

活性:

群	マウスの数	被験物質	IV 薬用量	
			封入されたsiRNA	総脂質
12	4	PBS	-	-
13	4	1 57 SNALP (9:1)	0.05 mg/kg	0.51 mg/kg
14	4	1 57 SNALP (9:1)	0.1 mg/kg	1.02 mg/kg
15	4	1 57 SNALP (9:1)	0.2 mg/kg	2.04 mg/kg
16	4	(6:1)新しい1 57 SNALP	0.05 mg/kg	0.36 mg/kg
17	4	(6:1)新しい1 57 SNALP	0.1 mg/kg	0.71 mg/kg
18	4	(6:1)新しい1 57 SNALP	0.2 mg/kg	1.42 mg/kg
19	4	(6:1)新しい1 57 SNALP	0.4 mg/kg	2.85 mg/kg

20

## 【0370】

製剤:

製剤を0.005~1.7mg siRNA/mLで提供し、0.22 $\mu$ mフィルター滅菌してクリンプトップバイアルに入れる。

## 【0371】

製剤の詳細:

- この研究に使用した「1|57 SNALP」は、PEG-C-DMA、DLinDMA、DPPC、およびコレステロールの(この順序の)モル百分率で記載したときに1.4:57.1:7.1:34.3の脂質組成物である。この製剤は、9:1(28mM脂質)または6:1(14mM脂質)の投入脂質対薬物比でギアポンプにより調製した。
- この研究に使用したsiRNAは、apoB-10048 U2/2 G1/2 siRNAである。

30

## 【0372】

製剤の概要:

	1 57 SNALP ギア、PBS、インライン	粒子径			最終 L:D (mg:mg)
		Z平均 (nm)	多分散性	封入率 (%)	
322-051407-1	投入 9:1	78	0.07	93	10.2
322-051407-2	投入 6:1	81	0.05	92	7.1

## 【0373】

手順

処置:初回処置の直前に動物の体重を測定し、個別の動物の体重に基づき用量(10mL/kgに等しく、10 $\mu$ l単位となるように四捨五入)を計算する。0日目に被験物質を尾静脈からIV注射により1回投与する(動物1匹につき合計1用量)。試験期間中、体重を毎日(24時間毎に)測定する。ケージ脇の観察は、体重測定と同時に毎日、そして正当な理由のあるときに追加的に行う。

40

## 【0374】

終点:被験物質投与の24時間後の1日目(群1~10)に、または被験物質投与の48時間後の2日目(群11~19)に、動物を屠殺する。

## 【0375】

群1~3:屠殺のときに心穿刺により採血する。全量をEDTAマイクロティナに収集し、直

50

ちに混合して凝固を防止し、CBC/Diffプロファイルの分析のために発送する。簡単な剖検を行う。

【0376】

群4~11:心穿刺により採血し、血清のためにSSTマイクロティナに収集する。室温で30 (~60)分間凝固させ、16,000×gおよび16 で5分間遠心分離し、逆さにして遠心分離が完全なことを確認し、4 で保存する。小動物臨床化学パネル全体にASTおよびSDHを追加したものを分析する。最優先項目:ALT、AST、SDH、ビリルビン、アルカリホスファターゼ、GGT、BUN、CPK、グルコース。二次優先項目:クレアチニン、アルブミン、グロブリン、総タンパク質。簡単な剖検を行う。

【0377】

群12~19:心穿刺により採血し、血漿のために処理する。直ちに16,000×gで(16 で)5分間遠心分離する。血漿の外観異常が観察された場合はいつでも記録する。透明な血漿上清をピペットで吸い出して清潔な微量遠心管にいれ、-80 で保存する。以下の組織:肝臓を取り出す。肝臓は秤量しない。肝左葉の下半分(付着せず)を剥離し、5容のRNAlaterに浸漬し(2.0mL容チューブの中で<0.3gを1.5mLのRNAlaterに入れる)、4 で少なくとも16時間保存してから分析し、-80 で長期保存する。製剤は認容性良好と予想される。処置に関連して苦痛の徴候を示すマウスは、動物施設職員の判断で終了させる。

【0378】

終了:致死用量のケタミン/キシラジンでマウスを麻酔し、次に心穿刺を行ってから頸椎脱臼させる。

【0379】

データ解析:動物の外観および行動ならびに体重により処置方式の認容性をモニターする。自動分析装置により血液臨床化学的性質およびCBC/Diffプロファイルを測定する。肝臓におけるApoBのmRNAレベルをQuant iGeneアッセイを用いて測定する。ELISAを用いて血漿ApoB-100を測定する。標準的な酵素アッセイを用いて血漿総コレステロールを測定する。

【0380】

結果

認容性:

図8は、1:57 SNALPを投与した24時間後に体重にほとんど影響がなかったことを示す。17mg/kgの最大薬物用量で3.6±0.7%の最大体重減少が観察された。また、試験した任意の薬用量で、動物の外観/行動に明らかな変化はなかった。

【0381】

図9は、血小板数に明らかな変化はなかったことを示す。身体は、処置に関連する減少の代償として新しい血小板を生成するので、血小板の減少が、平均血小板容積の増加を引き起こすことがある。この研究の条件で、SNALP処置群で平均血小板容積は変化しなかった。

【0382】

図10は、臨床的に有意な肝臓酵素の上昇(3×ULN)が、脂質:薬物(L:D)比が10の1:57 SNALPについて11mg/kgの薬用量で、およびL:D比が7の13mg/kgの薬用量で起こった。血漿総タンパク質およびグロブリンに、用量反応のわずかな上昇傾向もまた観察された。

【0383】

有効性:

図11は、肝臓mRNAのQuant iGene分析に基づき、低L:DのSNALPの効力が、被験薬の薬用量で高L:DのSNALPと同程度良好であったことを示す。実際に、ApoBのサイレンシング活性は、0.05および0.1mg/kgの薬用量で同一であった。このように、ApoB発現の減少に関して6:1の投入L:D比(最終比7:1)の1:57 SNALPの効力は、9:1の投入L:D比(最終比10:1)の1:57 SNALPの効力と同様であった。

【0384】

図12は、ApoBタンパク質および総コレステロールのレベルが、6:1の投入L:D比(最終比

10

20

30

40

50

7:1) の1:57 SNALPおよび9:1の投入L:D比 (最終比10:1) の1:57 SNALPにより同程度減少したことを示す。

【0385】

治療指数:

この研究は、6:1の投入L:D比 (最終比7:1) の1:57 SNALPおよび9:1の投入L:D比 (最終比10:1) の1:57 SNALPの両方が、0.1mg/kgの薬用量で約60%のApoB肝臓mRNAのサイレンシングを起こしたことを実証する。図10における入手可能なデータ点を内挿すると、10mg/kgで10:1の最終L:D比は、13mg/kgで7:1の最終L:D比と同程度の酵素上昇を起こしうる。これらの活性の点および毒性の点を利用すると、10:1の最終L:D比の1:57 SNALPについての治療指数は、(10mg/kg) / (0.1mg/kg) =100であり、7:1の最終L:D比の1:57 SNALPについての治療指数は、(13mg/kg) / (0.1mg/kg) =130である。このデータセットを使用して、7:1の最終L:D比の1:57 SNALPについての治療指数は、10:1の最終L:D比の1:57 SNALPについての治療指数よりも30%大きい。

10

【0386】

実施例9. 1:57 SNALPを用いたPLK-1の発現のインビボサイレンシングは、Hep3B担腫瘍マウスの生存率を増加させる

ポロ様キナーゼ1 (PLK-1) siRNA (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) を含有するSNALPがHep3B肝腫瘍を担持するCD1 nu/nuマウスの生存率に及ぼす効果について、それらを試験した。PLK-1は、2個の機能性ドメイン:(1) キナーゼドメイン;および(2) ポロ-ボックスドメインを有するセリン/トレオニンキナーゼである(例えば、Barr et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:429-440 (2004)を参照)。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は、肝がんおよび大腸がんを含めた多種のがんで過剰発現しており、PLK-1の発現は、多くの場合に患者の予後不良と相関する。PLK-1 (野生型またはキナーゼ不活性) の過剰発現は、多核形成 (遺伝的不安定性) を招く。過活性PLK-1は、DNA損傷のチェックポイントに優先する。PLK-1の構成性発現は、NIH 3T3細胞の形質転換を引き起こす。PLK-1はp53がん抑制遺伝子をリン酸化することにより、p53のアポトーシス促進作用を阻害する。この研究に使用したPLK-1 siRNAを表8に提供する。改変は、PLA-1 siRNA配列のセンスおよびアンチセンス鎖の選択された位置に2'OMe-ウリジンまたは2'OMe-グアノシンを導入することを伴い、ここで、siRNA二重鎖は、約20%未満の2'OMe-改変ヌクレオチドを有した。

20

30

【0387】

(表8) センスおよびアンチセンスPLK-1 RNAポリヌクレオチドを含むsiRNA二重鎖

siRNA	PLK-1 siRNA 配列	DS領域における改変率 (%)
PLK1424 U4/GU	5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> ANN-3' (SEQ ID NO.57) 3'-NNUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU-5' (SEQ ID NO.54)	6/38 = 15.8%
PLK1424 U4/G	5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> ANN-3' (SEQ ID NO.57) 3'-NNUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUU-5' (SEQ ID NO.56)	7/38 = 18.4%

40

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)に関してセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位置を指す。カラム2: 2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチドを太字で下線を付けて示す。siRNA二重鎖は、代替的または追加的に、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)ヌクレオチドを含みうる。N=デオキシチミジン(dT)ヌクレオチド、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相補性を有するリボヌクレオチド。カラム3: siRNA二重鎖の二本鎖(DS)領域における改変ヌクレオチドの数および率を提供する。

【0388】

実験群

50

CD1 nu/nuマウス20匹に以下のように接種した：

群	マウスの数	腫瘍の接種	SNALP	マウスの数	SNALPのIV投薬	SNALP用量	屠殺	アッセイ
A	20匹に接種	I.H.	Luc 1:57	9	11, 14, 17, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 42 日目	10 x 2 mg/kg	瀕死のとき	生存率 体重
B		1.5x10 <sup>6</sup> Hep3B	PLK 1424 1:57	9				

### 【0389】

#### 被験物質

全ての試料をフィルター滅菌してから作業濃度まで希釈した。全てのチューブに製剤日、脂質組成物、および核酸濃度のラベルを付けた。0.2mg/ml核酸でSNALP試料を用意した。研究の実施には各SNALPが最低20ml必要であった。この研究のための製剤は、以下のものを含有した：

群	被験物質の説明
A	Luc U/U SNALP 1:57 (28mM 脂質)
B	PLK1424 U4/GU SNALP 1:57 (28mM 脂質) PLK1424 U4/G SNALP 1:57 (28mM 脂質)

### 【0390】

#### 手順

##### 0日目

手術の直前に、マウスにSC注射によりAnafen (20 µl 食塩水中に100 µg) を投与する。イソフルラン (isoflourane) ガス吸入により個別のマウスを麻酔し、過度の眼乾燥を予防するために眼科用粘稠剤 (eye lube) を適用した。鼻先からのガス麻酔を維持しながら、胸骨下側に正中を横断する1.5cmの単一切開を行う。次に、オートクレーブ滅菌した綿棒を使用して肝左外側葉を露出させる。PBSに懸濁した腫瘍細胞25 µlを、Hamiltonルアーチップシリンジ (50 µl) および30G (3/8") 針を用いて、肝葉に浅い角度で注射する。細胞をゆっくりと注射し (約30秒)、針を抜去した直後の穿刺傷に綿棒を当てる。あらゆる出血が止まった後で (約1分)、筋層の5~6針の縫合および3~4個のスキנקリップで切開を閉じる。各注射の直前に細胞懸濁液を完全に混合する。紙タオルで内側を覆った清潔なケージに入れてマウスを麻酔から覚まし、2~4時間密接にモニターする。次に、動物を普通の飼育箱に戻す。

##### 1日目

イソフルランガスにより全てのマウスに軽く麻酔をかけ、縫合を調査する。次に、SC注射により動物にAnafenを投与する (20 µl 食塩水中に100 µg)。

##### 10日目

マウスを適切な処置群に無作為化する。

##### 11日目

群A、B - 11日目：外側尾静脈からのIV注射により、2mg/kgのSNALPを全ての動物に投与する。体重に応じてマウスに投与する (10ml/kg)。初期体重に基づいて投薬を連続5日間繰り返す。

##### 14~35日目

群A、B - 14、17、21、25、28、32、35日目：外側尾静脈からのIV注射により、2mg/kgのSNALPを全ての動物に再投与する。体重に応じてマウスに投与する (10ml/kg)。

体重群：5週間にわたり投薬日にマウスの体重を測定し、次に、研究が終了するまで

10

20

30

40

50

1週間に2回体重測定する。

終点:腫瘍の負荷および製剤は認容性良好と予測される。処置に関連して苦痛の徴候を示すマウスは、動物施設職員の判断で終了させる。

終了:

致死用量のケタミン/キシラジンでマウスを麻酔し、次に頸椎脱臼させる。

データ解析:

生存率および体重をアッセイする。

【0391】

結果

図13は、Hep3B肝臓内(I.H.)腫瘍モデルにおけるPLK1424 SNALPの治療的投薬時のマウスの平均体重を示す。この処置方式は、処置関連毒性の明らかな徴候を示さずに認容性良好であった。

【0392】

図14は、1:57 SNALPに製剤化したPLK1424を用いた処置が、担Hep3B腫瘍マウスの生存率を有意な増加を起こしたことを示す。このインビボ抗腫瘍効果は、任意の明らかな毒性または免疫刺激の非存在下で観察された。

【0393】

実施例10. 1:57 SNALPを用いたPLK-1発現のインビボサイレンシングは、担Hep3B腫瘍マウスにおいて腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する

この研究の目的は次の通りであった。

1. PLK1424 SNALPの単回IV投与後の樹立Hep3B肝腫瘍においてmRNAのサイレンシングのレベルを決定すること
2. RACE-PCRを用いて特異的RNA切断生成物を検出することにより、mRNAのサイレンシングメカニズムを確認すること
3. 組織病理学により腫瘍細胞のアポトーシス誘導を確認すること

【0394】

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)をこの研究に使用した。

【0395】

実験群

SCID/ベージュマウス20匹に以下のものを接種した:

群	マウスの数	腫瘍の接種	SNALP	マウスの数	SNALPのIV投薬	屠殺	アッセイ
A	20匹に接種	I.H. 1x10 <sup>6</sup> Hep3B	PBS	6	1 x 2 mg/kg 20日目	処置の 24時間後	腫瘍 QG 腫瘍 RACE-PCR 組織病理学
B			Luc 1:57	7			
C			PLK 1424 1:57	7			

【0396】

被験物質

全ての試料をフィルター滅菌してから作業濃度まで希釈した。全てのチューブに製剤日、脂質組成、および核酸濃度のラベルを付けた。0.2mg/ml核酸でSNALP試料を用意した。研究の実施には最低2mlのSNALPが必要であった。この研究のための製剤は、以下のものを含有した:

10

20

30

40

群	被験物質の説明
A	PBS
B	Luc U/U 1:57 SNALP
C	PLK1424 U4/GU 1:57 SNALP

【 0 3 9 7 】

手順

## 0日目

手術の直前に、マウスにSC注射によりAnafen (20 µl 食塩水中に100 µg) を投与する。イソフルランガス吸入により個別のマウスを麻酔し、過度の眼乾燥を予防するために眼科用粘稠剤を適用する。鼻先からのガス麻酔を維持しながら、胸骨下側に正中を横断する1.5cmの単一切開を行う。次に、オートクレーブ滅菌した綿棒を使用して肝左外側葉を露出させる。PBSに懸濁した腫瘍細胞25 µlを、Hamiltonルアーチップシリンジ (50 µl) および30G (3/8") 針を用いて、肝葉に浅い角度で注射する。細胞をゆっくりと注射し (約30秒)、針を抜去した直後の穿刺傷に綿棒を当てる。あらゆる出血が止まった後で (約1分)、筋層の5~6針の縫合で切開を閉じる。皮膚の切開部を3~4個の金属製スキנקリップで閉じる。各注射の直前に細胞懸濁液を完全に混合する。紙タオルで内側を覆った清潔なケージに入れてマウスを麻酔から覚まし、2~4時間密接にモニターする。次に、動物を普通の飼育箱に戻す。

10

20

## 1日目

イソフルランガスにより全てのマウスに軽く麻酔をかけ、縫合を調査する。次に、SC注射により動物にAnafenを投与する (20 µl 食塩水中に100 µg)。

## 7日目

マウスを適切な処置群に無作為化する。

## 20日目

群A~C: マウスの体重を測定し、次に外側尾静脈からの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、2mg/kgまたは体重に応じて相当する容量 (10ml/kg) で投与する。

30

## 21日目

群A~C: 全てのマウスの体重を測定し、次に致死性麻酔により安楽死させる。

各群の全てのマウス由来の担腫瘍肝葉を秤量し、RNA分析のためにRNALaterに収集する。

終点: 腫瘍の負荷および製剤は認容性良好と予想される。処置に関連して苦痛の徴候を示すマウスは、動物施設職員の判断で終了させる。

## 終了:

致死用量のケタミン/キシラジンでマウスを麻酔し、次に頸椎脱臼させる。

40

## データ解析:

bDNA (QG) アッセイおよびRACE-PCRによる肝腫瘍のmRNA解析。

組織病理学による腫瘍細胞のアポトーシス分析。

【 0 3 9 8 】

結果

14日目以降、体重をモニターして腫瘍の進行を評価した。20日目に、最も体重減少が激しいマウス6匹を3群のそれぞれに無作為化し、処置した。6匹のマウスは全て、屠殺時 (21日目) に実質的に大きなI.H.腫瘍を有した。したがって、残りの14匹のマウスの処置は2

50

1日目に開始した(22日目に屠殺)。14匹中10匹のマウスは実質的な腫瘍を有し;14匹中2匹のマウスは小型/推測される腫瘍を有し;14匹中2匹のマウスは視認可能な腫瘍負荷を有さなかった。

【0399】

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したQuantigeneアッセイからのデータを示す。1:57 SNALPの単回2mg/kg投与は、マウスに成長している肝臓内Hep3B腫瘍中のPLK-1 mRNAレベルを約50%減少させた。

【0400】

図16は、PLK1424 SNALPで処置されたマウスにおいて、5'RACE-PCRによりPLK-1 mRNAの特異的切断生成物が検出可能であったことを示す。PBSまたは対照(Luc)SNALPのいずれかで処置されたマウスでは、特異的PCR生成物は検出できなかった。PCR生成物のヌクレオチド配列決定から、PLK1424 siRNA介在性RNA干渉によるPLK-1 mRNA中の予測される切断部位を確認した。

【0401】

図17は、Luc SNALP(上)またはPLK1424 SNALP(下)のいずれかで処置されたマウスにおけるHep3B腫瘍の組織学的検査を示す。Luc SNALPで処置されたマウスは、正常なHep3B腫瘍の有糸分裂を示したが、PLK1424 SNALPで処置されたマウスは、Hep3B腫瘍において多数の異常有糸分裂および腫瘍細胞アポトーシスを示した。

【0402】

#### 結論

この実施例は、担Hep3B腫瘍マウスへのPLK1424の1:57 SNALPの単回投与が、PLK-1 mRNAの有意なインビボサイレンシングを誘導したことを例示する。PLK-1 mRNAのこの減少がRNA干渉により仲介されることを、5'RACE-PCR分析を用いて確認した。重要なことには、1:57 SNALP製剤によるPLK-1 mRNAのサイレンシングは、腫瘍細胞の増殖(有糸分裂)を大きく乱し、それに続いて腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こした。前実施例に実証されたように、この抗腫瘍効果は担腫瘍マウスにおいて生存期間延長に変わった。

【0403】

実施例11. 皮下Hep3B腫瘍モデルにおけるPEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含む1:57 PLK-1 SNALPの比較

この実施例は、遠位(例えば皮下)腫瘍を全身的にターゲティングするための1:57製剤中のPEG-脂質である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)の有用性を実証する。特に、この実施例では、PEG-cDMA(C<sub>14</sub>)またはPEG-cDSA(C<sub>18</sub>)のいずれかを含む1:57 PLK-1 SNALPの腫瘍ターゲティング能を比較する。読出しは、腫瘍の成長阻害およびPLK1 mRNAのサイレンシングである。使用したPLK-1 siRNAはPLK1424 U4/GUであり、その配列を表8に提供する。

【0404】

皮下(S.C.)Hep3B腫瘍をscid/ベージュマウスに樹立した。1:57 PLK-1 SNALP多回投与の抗腫瘍有効性を以下の群で評価した(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。いったん腫瘍が直径約5mm(10日目)に達したならば、6×2mg/kg siRNAの投与を開始した。10、12、14、17、19、および21日目に投薬を行った。腫瘍をノギスで1週間に2回測定した。

【0405】

図18は、PEG-cDSAを含む1:57 PLK-1 SNALPの多回投与が、樹立したHep3B S.C.腫瘍の退縮を誘導したことを示す。特に、PLK1-cDSA処置マウスにおける5個の腫瘍中5個が、平坦で、腫瘍部位の変色によってのみ測定可能な外観であった。

【0406】

図19は、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サイレンシングを示す。PLK1-cDSA SNALPで観察されたサイレンシングの程度は、図18に示す多回投与研究における抗腫瘍活性と相関した。

10

20

30

40

50

## 【0407】

次に、24日目に大型のS.C.腫瘍を発生したLuc-cDMA SNALP-処置群に、24、26、28、31、33、および35日目にPLK-cDSA SNALPを投与した。元のPLK-1 SNALP-処置群には追加投薬を行わなかった。大型の樹立腫瘍でのこのクロスオーバー投薬研究の結果を図20に提供し、これは、PLK1-cDSA SNALPが大型のS.C. Hep3B腫瘍の成長を阻害したことを示す。

## 【0408】

scid/ベージュマウスに樹立した肝臓内Hep3B腫瘍を用いて、PLK-1 mRNAのサイレンシングにPEG-cDMAおよびPEG-cDSA 1:57 SNALPが及ぼす効果の比較を行った。PEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含む1:57 PLK-1 SNALPの2mg/kgの単回投与を静脈内に行った。SNALP処置の24および96時間後に肝臓/腫瘍試料を収集した。対照=2mg/kgのLuc-cDMA SNALP (24時間目)。

10

## 【0409】

図21は、24時間後にPLK-cDMA SNALPおよびPLK-cDSA SNALPが同様のサイレンシング活性を有したが、PLK-cDSA SNALPが肝臓内腫瘍のmRNAサイレンシング期間を延長できることを示す。

## 【0410】

図22は、PEG-cDMAまたはPEG-cDSAのいずれかを含む1:57 PLK-1 SNALPの血中クリアランスプロファイルを示す。PLK-cDSA SNALPに関して観察された血中循環時間の延長は、遠位(例えば皮下)腫瘍部位での蓄積および活性増加を可能にしている。

20

## 【0411】

したがって、この研究は、1:57 PEG-cDSA SNALP製剤が肝臓外部の腫瘍を優先的にターゲティングするために使用することができ、一方で1:57 PEG-cDMA SNALPが肝臓を優先的にターゲティングするために使用することができることを示す。

## 【0412】

実施例12. コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテルの合成

段階1: コレステロール(5.0g、12.9mmol)および攪拌バーが入った250ml丸底フラスコを密封し、窒素を流した。別の100ml丸底フラスコにトルエンスルホニルクロリド(5.0g、26.2mmol)を秤量し、同じく密封し、窒素を流した。無水ピリジン(2×50ml)を各フラスコに分配した。次に、トルエンスルホニルクロリド溶液をカニューレにより250mlフラスコに移し、反応物を一晩攪拌した。ロータリーエバポレーターによりピリジンを除去し、残渣にメタノール(80ml)を添加した。次に、均一な懸濁液が得られるまでこれを1時間攪拌した。この懸濁液を濾過し、アセトニトリル(50ml)で洗浄し、減圧下で乾燥させ、コレステリルトシレート綿毛状白色固体として回収した(6.0g、86%)。

30

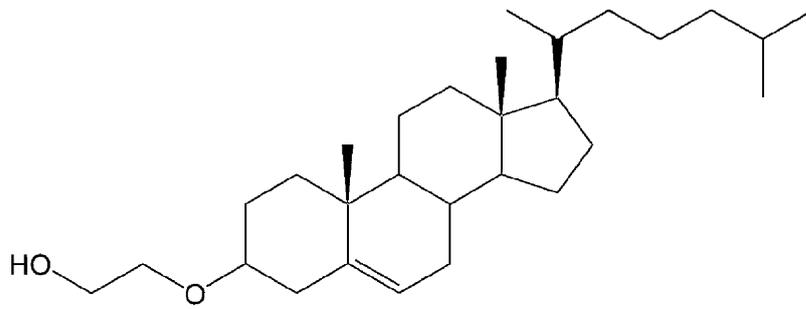
## 【0413】

段階2: 攪拌バーが入った100mlフラスコに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)を加えた。フラスコに濃縮装置を取り付け、一晩還流させた。次に、ロータリーエバポレーターによりジオキサンを除去し、反応混合物を水(100ml)に懸濁した。その溶液を分液漏斗に移し、クロロホルム(3×100ml)で抽出した。有機相を合わせ、水で洗浄し(2×150ml)、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ー(5%アセトン/ヘキサン)により生成して、生成物を白色固体として回収した(1.1g、69%)。

40

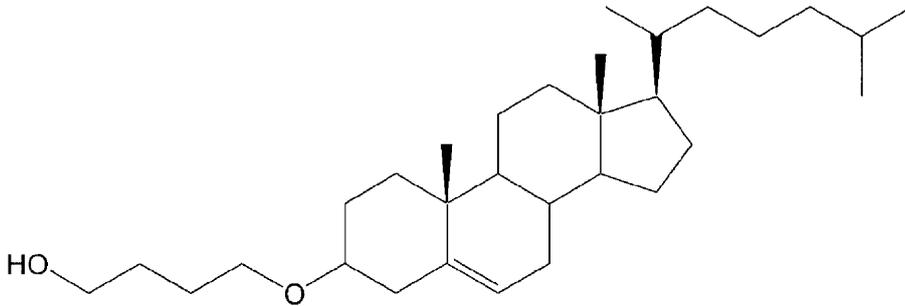
## 【0414】

コレステロール誘導体であるコレステリル-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:



コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテル

10



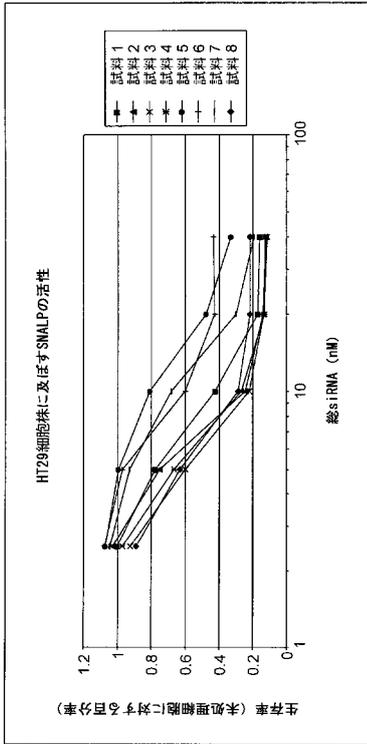
コレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテル

20

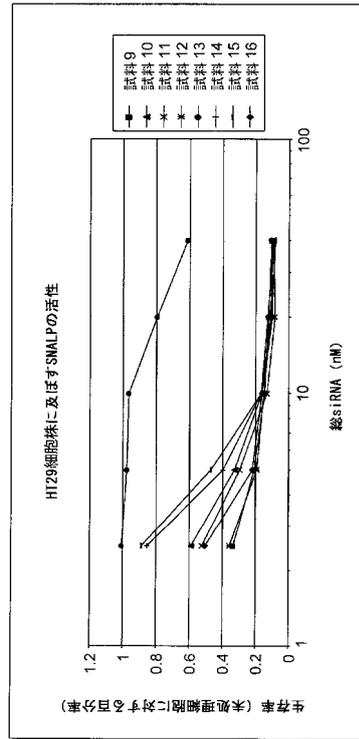
## 【 0 4 1 5 】

上記説明は、例示的であり、限定的ではないと意図されることを理解されたい。上記説明を読むとき、当業者に多数の態様が明らかとなるであろう。したがって、本発明の範囲は、上記説明を参照して決定すべきではなく、その代わりに、添付の特許請求の範囲と共にそのような特許請求の範囲に値する等価物の全範囲を参照して決定すべきである。特許出願、特許、PCT公開、およびGenbankアクセッション番号を含めた、全ての論文および参照の開示は、全ての目的について全体として本明細書に参照により組入れられる。

【 図 1 A 】

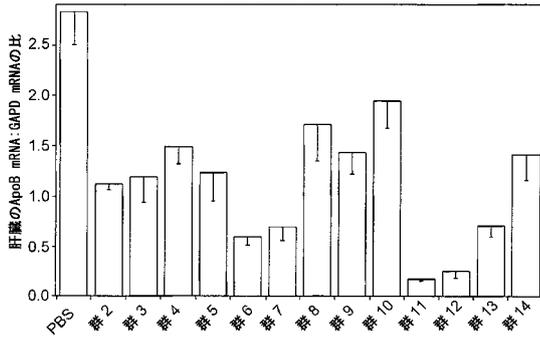


【 図 1 B 】



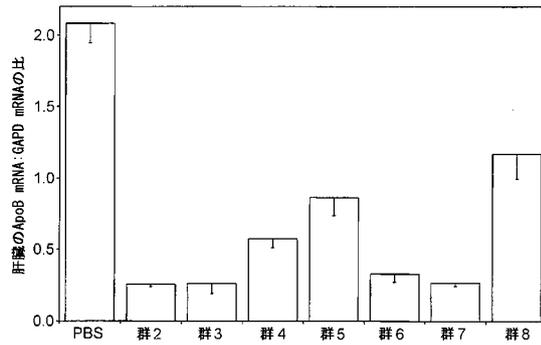
【 図 2 】

マウスに静脈内投与したときのSNALPの活性  
群平均±SD (n=4)

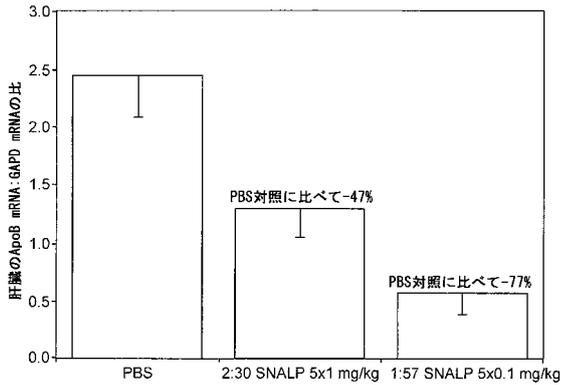


【 図 4 】

マウスに静脈内投与したときのSNALPの活性  
群平均±SD (n=4)

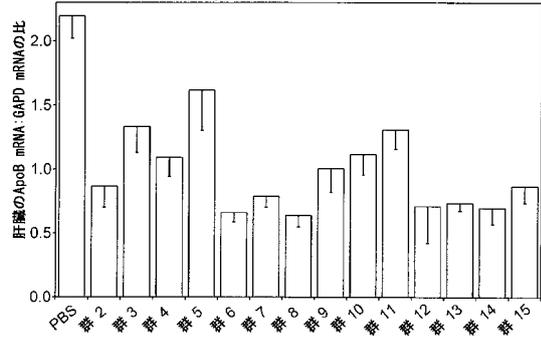


【 図 3 】

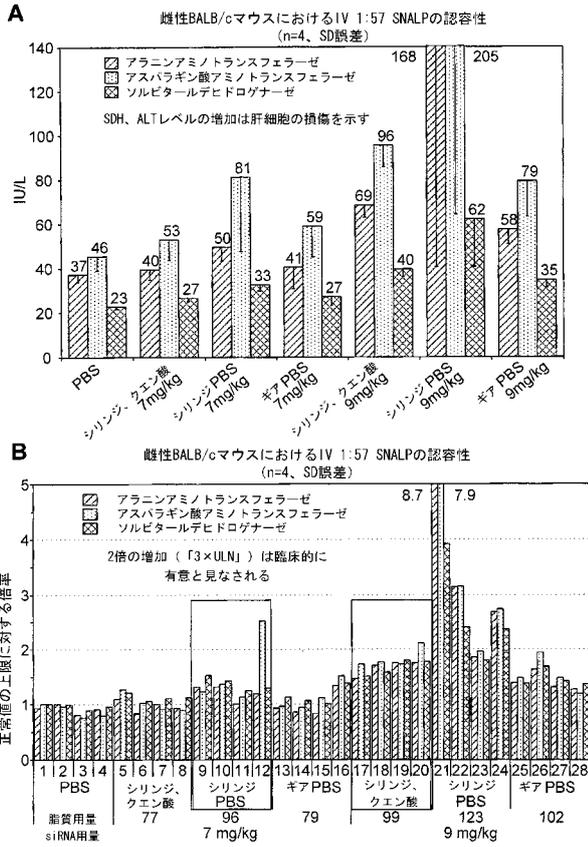


【 図 5 】

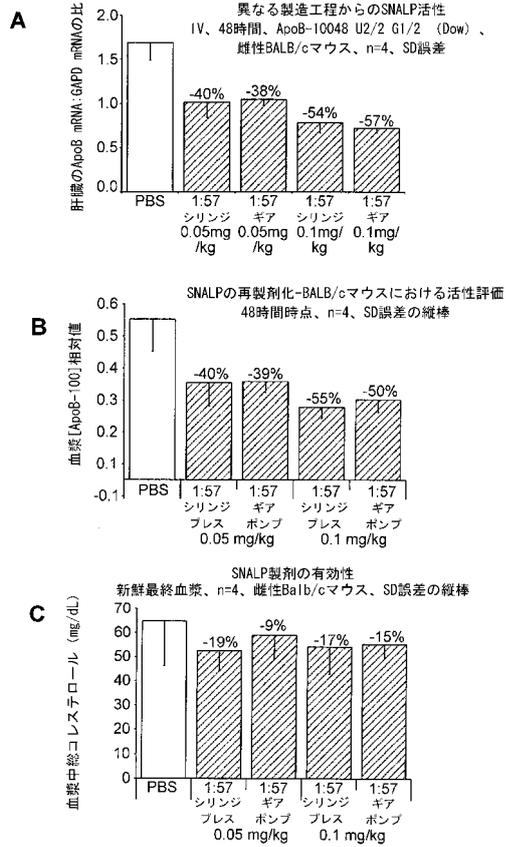
マウスに静脈内投与したときのSNALPの活性  
群平均±SD (n=4)



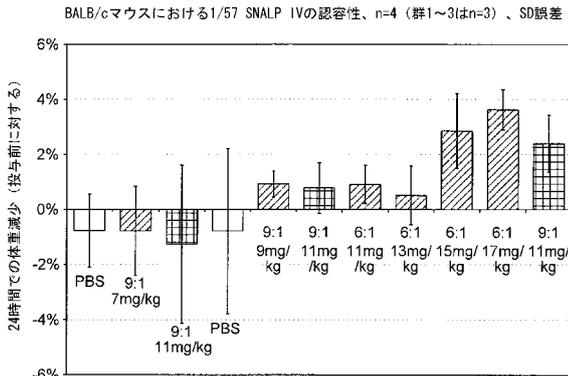
【 図 6 】



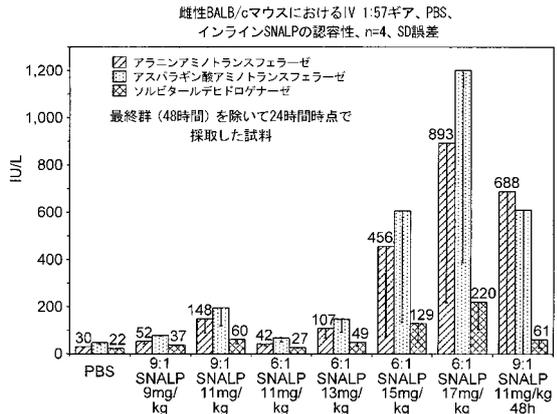
【 図 7 】



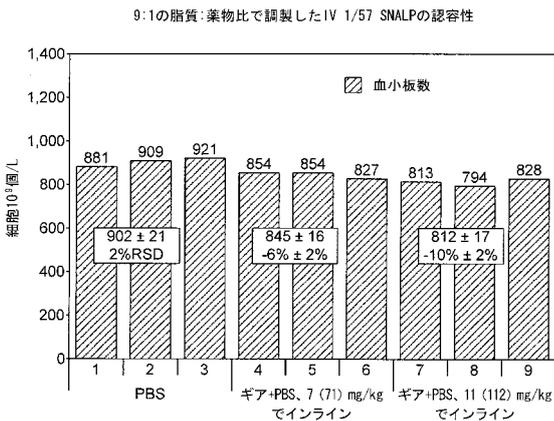
【 図 8 】



【 図 10 A 】

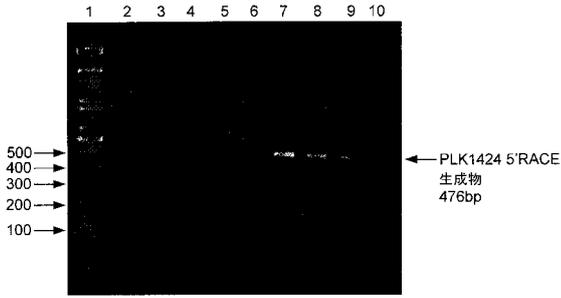


【 図 9 】

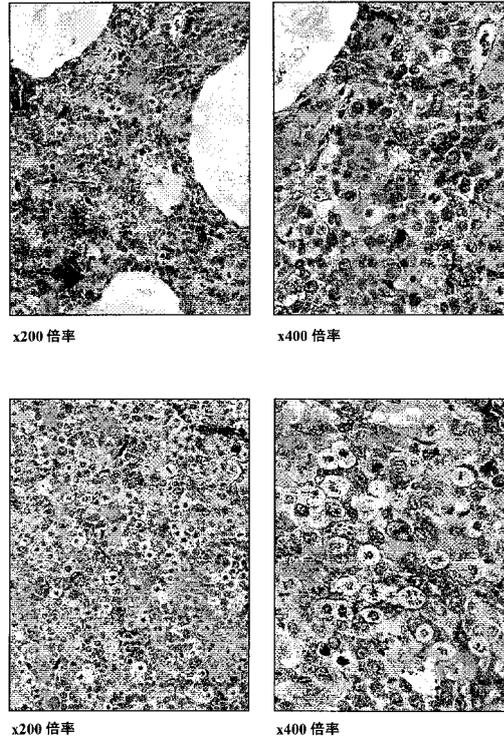




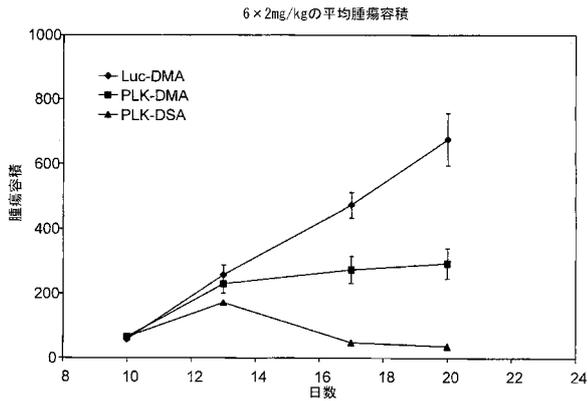
【図16】



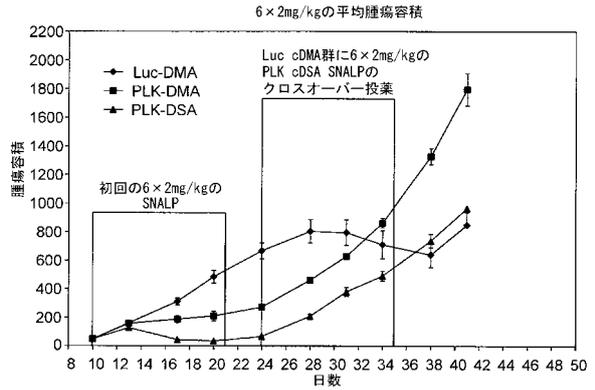
【図17】



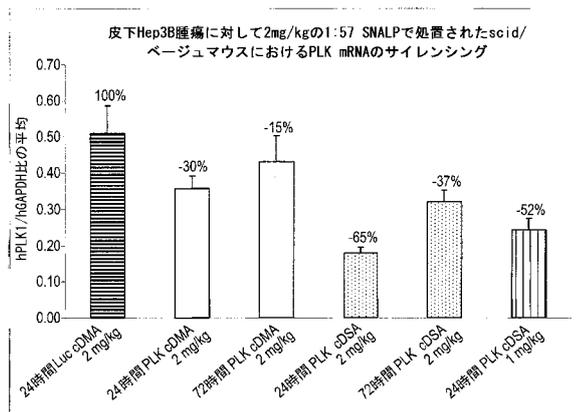
【図18】



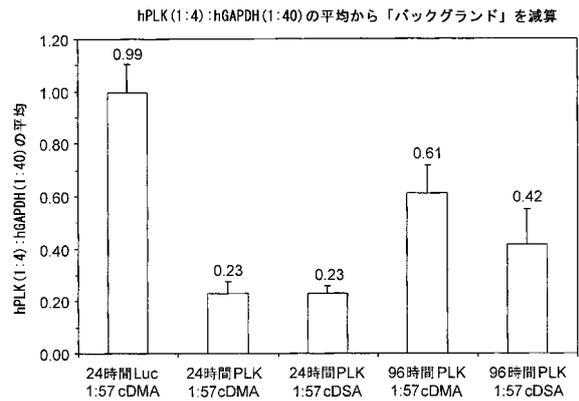
【図20】



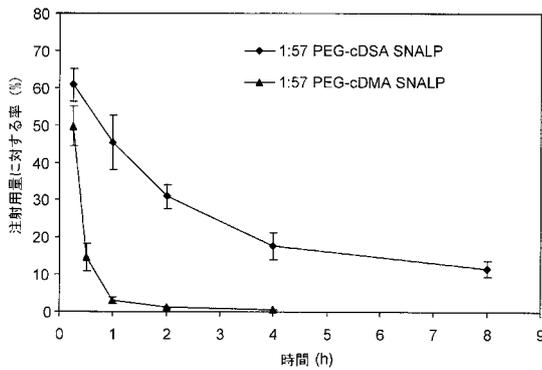
【図19】



【図21】



【 図 2 2 】



## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成23年3月8日 (2011.3.8)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0024

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0024 】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明および図面から当業者に明らかになる。

## [請求項1001]

以下を含む核酸-脂質粒子：

- (a) 核酸；
- (b) 該粒子中に存在する総脂質の約50mol%～約85mol%を構成する陽イオン性脂質；
- (c) 該粒子中に存在する総脂質の約13mol%～約49.5mol%を構成する非陽イオン性脂質；および
- (d) 該粒子中に存在する総脂質の約0.5mol%～約2mol%を構成する、粒子の凝集を阻害する複合化脂質。

## [請求項1002]

核酸が、低分子干渉性RNA ( siRNA ) を含む、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

## [請求項1003]

siRNAが、約15～約60個のヌクレオチドを含む、請求項1002記載の核酸-脂質粒子。

## [請求項1004]

siRNAが、少なくとも1個の改変ヌクレオチドを含む、請求項1002記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1005]

siRNAが、少なくとも1個の2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチドを含む、請求項1002記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1006]

陽イオン性脂質が、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)、またはそれらの混合物を含む、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1007]

陽イオン性脂質が、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキサラン(DLin-K-C2-DMA)を含む、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1008]

陽イオン性脂質が、粒子中に存在する総脂質の約56.5mol%~約66.5mol%を構成する、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1009]

陽イオン性脂質が、粒子中に存在する総脂質の約52mol%~約62mol%を構成する、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1010]

非陽イオン性脂質が、コレステロールまたはその誘導体を含む、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1011]

コレステロールまたはその誘導体が、粒子中に存在する総脂質の約31.5mol%~約42.5mol%を構成する、請求項1010記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1012]

非陽イオン性脂質が、リン脂質を含む、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1013]

非陽イオン性脂質が、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1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1014]

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)、またはそれらの混合物を含む、請求項1013記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1015]

リン脂質が、粒子中に存在する総脂質の約4mol%~約10mol%を構成し、コレステロールが、粒子中に存在する総脂質の約30mol%~約40mol%を構成する、請求項1013記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1016]

リン脂質が、粒子中に存在する総脂質の約10mol%~約30mol%を構成し、コレステロールが、粒子中に存在する総脂質の約10mol%~約30mol%を構成する、請求項1013記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1017]

粒子の凝集を阻害する複合化脂質が、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質コンジュゲートを含む、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1018]

PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-ジアシルグリセロール(PEG-DAG)コンジュゲート、PEG-ジアルキルオキシプロピル(PEG-DAA)コンジュゲート、またはそれらの混合物を含む、請求項1017記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1019]

PEG-DAAコンジュゲートが、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(PEG-DMA)コンジュゲート、PEG-ジステアリルオキシプロピル(PEG-DSA)コンジュゲート、またはそれらの混合物を含む、請求項1018記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1020]

PEGが、約2,000ダルトンの平均分子量を有する、請求項1019記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1021]

粒子の凝集を阻害する複合化脂質が、該粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約2mol%を構成する、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1022]

核酸-脂質粒子中の核酸が、血清中で37、30分間の該粒子のインキュベーション後に実質的に分解されない、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1023]

核酸が、核酸-脂質粒子に完全に封入されている、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1024]

約5～約15の脂質:核酸質量比を有する、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1025]

約40nm～約150nmの直径中央値を有する、請求項1001記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1026]

請求項1001記載の核酸-脂質粒子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

[請求項1027]

以下を含む核酸-脂質粒子:

(a) siRNA;

(b) 該粒子中に存在する総脂質の約56.5mol%～約66.5mol%を構成する陽イオン性脂質;

(c) 該粒子中に存在する総脂質の約31.5mol%～約42.5mol%を構成するコレステロールまたはその誘導体;および

(d) 該粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約2mol%を構成するPEG-脂質コンジュゲート

。

[請求項1028]

陽イオン性脂質が、DLmDMAを含む、請求項1027記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1029]

陽イオン性脂質が、DLin-K-C2-DMAを含む、請求項1027記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1030]

PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-DAAコンジュゲートを含む、請求項1027記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1031]

約61.5mol%の陽イオン性脂質、約36.9%のコレステロールまたはその誘導体、および約1.5mol%のPEG-脂質コンジュゲートを含む、請求項1027記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1032]

請求項1027記載の核酸-脂質粒子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

。

[請求項1033]

以下を含む核酸-脂質粒子:

(a) siRNA;

(b) 該粒子中に存在する総脂質の約52mol%～約62mol%を構成する陽イオン性脂質;

(c) 該粒子中に存在する総脂質の約36mol%～約47mol%を構成する、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;および

(d) 該粒子中に存在する総脂質の約1mol%～約2mol%を構成するPEG-脂質コンジュゲート

。

[請求項1034]

陽イオン性脂質が、DLinDMAを含む、請求項1033記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1035]

陽イオン性脂質が、DLin-K-C2-DMAを含む、請求項1033記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1036]

リン脂質が、DPPCを含む、請求項1033記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1037]

PEG-脂質コンジュゲートが、PEG-DAAコンジュゲートを含む、請求項1033記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1038]

約57.1mol%の陽イオン性脂質、約7.1mol%のリン脂質、約34.3mol%のコレステロールまたはその誘導体、および約1.4mol%のPEG-脂質コンジュゲートを含む、請求項1033記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1039]

約57.1mol%の陽イオン性脂質、約20mol%のリン脂質、約20mol%のコレステロールまたはその誘導体、および約1.4mol%のPEG-脂質コンジュゲートを含む、請求項1033記載の核酸-脂質粒子。

[請求項1040]

請求項1033記載の核酸-脂質粒子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

[請求項1041]

細胞に核酸を導入するための方法であって、細胞と請求項1001、1027、または1033記載の核酸-脂質粒子とを接触させることを含む、方法。

[請求項1042]

細胞が哺乳動物の中にある、請求項1041記載の方法。

[請求項1043]

核酸のインビボ送達のための方法であって、哺乳動物対象に請求項1001、1027、または1033記載の核酸-脂質粒子を投与することを含む、方法。

[請求項1044]

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、請求項1043記載の方法。

[請求項1045]

処置を必要とする哺乳動物対象における疾患または障害を処置するための方法であって、哺乳動物対象に治療有効量の請求項1001、1027、または1033記載の核酸-脂質粒子を投与することを含む、方法。

[請求項1046]

疾患または障害が、ウイルス感染、肝疾患または肝障害、およびがんからなる群より選択される、請求項1045記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0322

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0322】

(表1) センスおよびアンチセンスEg5 RNAポリヌクレオチドを含むsiRNA二重鎖

変更	Eg5 2263のsiRNA配列	SEQ ID NO:	2' OMe 変更率 (%)	DS領域の 変更率 (%)
U/U	5'-CUGAAGACCUGAAGACAAUdTdT-3' 3'-dTdTGACUUCUGGACUUCUGUUA-5'	1 2	6/42 = 14.3%	6/38 = 15.8%

カラム1: 「U/U」=2'OMe-ウリジンで変更されたsiRNA二重鎖;カラム2: 2'-OMe変更ヌクレオチドを太字で下線を付けて示す。siRNA二重鎖は、代替的にまたは追加的に、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)ヌクレオチドを含みうる。「dT」=デオキシチミジン。カラム3: siRNA二重鎖における2'OMe-変更ヌクレオチドの数および率

を提供する。カラム4: siRNA二重鎖の二本鎖 (DS) 領域中の改変ヌクレオチドの数および率を提供する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0328

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0328】

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

位置	改変	ApoB siRNAの配列	SEQ_ID NO:	2' OMeの 改変率 (%)	DS領域の 改変率 (%)
10048	U2/2 G1/2	5'-AGUG <u>UCAUCACACU</u> GAAUACC-3' 3'-GU <u>UCACAGUAGUGG</u> ACUUAU-5'	3 4	7/42 = 16.7%	7/38 = 18.4%

カラム1: 数字は、マウスApoB mRNA配列XM\_137955に関するセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位置を指す。カラム2: 数字は、各鎖の2'OMe化学的改変の分布を指す。カラム3: 2'OMe-改変ヌクレオチドを太字で下線を付けて示す。siRNA二重鎖は、代替的にまたは追加的に、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)ヌクレオチドを含みうる。カラム4: siRNA二重鎖中の2'OMe-改変ヌクレオチドの数および率を提供する。カラム5: siRNA二重鎖の二本鎖 (DS) 領域中の改変ヌクレオチドの数および率を提供する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0387

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0387】

(表8) センスおよびアンチセンスPLK-1 RNAポリヌクレオチドを含むsiRNA二重鎖

siRNA	PLK-1 siRNA 配列	SEQ_ID NO:	DS領域における 改変率 (%)
PLK1424 U4/GU	5'-AGA <u>UCACCCUCCU</u> UAAA <u>U</u> ANN-3' 3'-NNUC <u>UAGUGGGAGG</u> AAUUUUAU-5'	5 6	6/38 = 15.8%
PLK1424 U4/G	5'-AGA <u>UCACCCUCCU</u> UAAA <u>U</u> ANN-3' 3'-NNUCU <u>AGUGGGAGG</u> AAUUUUAU-5'	5 7	7/38 = 18.4%

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)に関してセンス鎖の5'塩基のヌクレオチド位置を指す。カラム2: 2'-O-メチル(2'OMe)ヌクレオチドを太字で下線を付けて示す。siRNA二重鎖は、代替的または追加的に、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)ヌクレオチドを含みうる。N=デオキシチミジン(dT)ヌクレオチド、ウリジン(U)リボヌクレオチド、または標的配列もしくははその相補鎖に相補性を有するリボヌクレオチド。カラム3: siRNA二重鎖の二本鎖(DS)領域における改変ヌクレオチドの数および率を提供する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2011516586000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2009/000496
----------------------------------------------------

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1.  Claim Nos. : 41-46  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :  
  
Claims 41-46 encompass a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search under Rule 39.1 (iv) of the PCT. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the product defined in claims 41-46.
2.  Claim Nos. :  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3.  Claim Nos. :  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

- Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.  
 The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CA2009/000496

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US 2007042031 A1	22-02-2007	AU 2006274413A1	01-02-2007
		CA 2616877A1	01-02-2007
		CN 101267805A	17-09-2008
		EP 1937213A1	02-07-2008
		JP 2009505957T	12-02-2009
		WO 2007012191A1	01-02-2007
US 2005064595 A1	24-03-2005	AU 2004257373A1	27-01-2005
		CA 2532228A1	27-01-2005
		CN 101291653A	22-10-2008
		EP 1648519A2	26-04-2006
		JP 2007528863T	18-10-2007
		KR 20060028655A	30-03-2006
		US 2006240093A1	26-10-2006
		WO 2005007196A2	27-01-2005
		WO 2005007196A3	03-01-2008
US 2006008910 A1	12-01-2006	AU 2005251403A1	22-12-2005
		AU 2005252273A1	22-12-2005
		CA 2569645A1	22-12-2005
		CA 2569664A1	22-12-2005
		CN 1981044A	13-06-2007
		CN 101163796A	16-04-2008
		EP 1766035A1	28-03-2007
		EP 1766035A4	22-04-2009
		EP 1781593A2	09-05-2007
		EP 1781593A4	22-04-2009
		JP 2008501729T	24-01-2008
		JP 2008501730T	24-01-2008
		US 2006083780A1	20-04-2006
		WO 2005120152A2	22-12-2005
		WO 2005120152A3	20-09-2007
		WO 2005121348A1	22-12-2005

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	

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

(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 マクラクラン 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 シルベスター ロード 1 3 3 3 1

(72) 発明者 ヤウォルスキ エドワード

カナダ国 プリティッシュ コロンビア州 メイプル リッジ 1 2 3 ビー アベニュー 2 3 1  
0 6

(72) 発明者 ラム キュウ

カナダ国 プリティッシュ コロンビア州 サリー 7 1 アベニュー 1 8 8 7 1

(72) 発明者 ジェフス ロイド ビー

カナダ国 プリティッシュ コロンビア州 デルタ ワルナット プレイス 5 2 1 8

(72) 発明者 パーマー ロルネ アール

カナダ国 プリティッシュ コロンビア州 バンクーバー エリオット ストリート 8 0 7 6

F ターム(参考) 4C076 AA17 AA19 AA95 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB25

CC16 CC27 CC35 DD06F DD06Q DD50F DD50Q DD58F DD58Q DD63F

DD63Q DD70A EE23F EE23Q EE51F EE51Q FF32 FF63 FF68

4C084 AA13 MA05 MA22 MA52 MA59 MA65 MA66 NA03 NA13 ZA752

ZB262 ZB332  
4C086 AA02 AA10 EA16 MA03 MA05 MA22 MA52 MA59 MA65 MA66  
NA03 NA13 ZA75 ZB26 ZB33