

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7523209号**  
**(P7523209)**

(45)発行日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(24)登録日 令和6年7月18日(2024.7.18)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K	31/404 (2006.01)	A 6 1 K	31/404
A 6 1 K	31/433 (2006.01)	A 6 1 K	31/433
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713

請求項の数 21 (全44頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-563562(P2018-563562)  
 (86)(22)出願日 平成29年6月2日(2017.6.2)  
 (65)公表番号 特表2019-521101(P2019-521101  
 A)  
 (43)公表日 令和1年7月25日(2019.7.25)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/035673  
 (87)国際公開番号 WO2017/210553  
 (87)国際公開日 平成29年12月7日(2017.12.7)  
 審査請求日 令和2年6月1日(2020.6.1)  
 審判番号 不服2022-14675(P2022-14675/J  
 1)  
 審判請求日 令和4年9月16日(2022.9.16)  
 (31)優先権主張番号 62/345,740  
 (32)優先日 平成28年6月3日(2016.6.3)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関 最終頁に続く

(73)特許権者 518423869  
 ハフ イアー インスティテュート  
 アメリカ合衆国 73112 オクラホマ  
 州, オ克拉ホマ シティ, ノースウェスト  
 フィフティーシックスス 街道 3  
 400  
 (74)代理人 100149076  
 弁理士 梅田 慎介  
 (74)代理人 100119183  
 弁理士 松任谷 優子  
 (74)代理人 100173185  
 弁理士 森田 裕  
 (74)代理人 100162503  
 弁理士 今野 智介  
 (74)代理人 100144794

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 内耳感覚有毛細胞の再生 / 置換のための併用療法

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

対象における難聴または平衡機能障害を治療するために該対象の内耳に適用されるキットであって、

治療有効量のGSK-3阻害剤を含む第1剤と、

内耳の組織におけるHes1遺伝子の発現を減少させるのに十分な量のsiRNA分子を含む第2剤と、  
 を含み、

siRNA分子を含む前記第2剤が、i) GSK-3阻害剤を適用した後に別個に適用されるか、ii) GSK-3阻害剤と同時であるが前記第1剤からのGSK-3阻害剤の放出に比して前記第2剤からのsiRNA分子の放出が遅延するように適用される、キット。

**【請求項2】**

GSK-3阻害剤が、6-ブロモインジルビン-3'-オキシム(BIMO)およびチデグルシブ(TIDE)から選択される、請求項1に記載のキット。

**【請求項3】**

siRNA分子が、配列番号1~14のうちの1つまたは複数を含む、請求項1又は2に記載のキット。

**【請求項4】**

前記第2剤が、内耳の組織におけるHes1遺伝子の発現を減少させるsiRNA分子

を含むナノ粒子を含む、請求項 1 または 2 に記載のキット。

**【請求項 5】**

ナノ粒子が、生分解性ポリマーをさらに含む、請求項 4 に記載のキット。

**【請求項 6】**

生分解性ポリマーが、ポリ(乳酸 - c o - グリコール酸) ( P L G A ) またはペグ化 P L G A ( P E G - P L G A ) である、請求項 5 に記載のキット。

**【請求項 7】**

ナノ粒子が、磁気応答性粒子をさらに含む、請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載の主ツト。

**【請求項 8】**

磁気応答性粒子が、超常磁性酸化鉄 ( S P I O N ) である、請求項 7 に記載のキット。

10

**【請求項 9】**

治療有効量の F G F 2 をさらに含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 10】**

経鼓膜投与、蝸牛内注射、蝸牛内注入、または点耳剤のために前記第 1 効果および / または前記第 2 効果が製剤化される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のキット。

**【請求項 11】**

対象の内耳における有毛細胞を置換、再生および / または保護するために該対象の内耳に適用されるキットであって、

治療有効量の G S K - 3 阻害剤を含む第 1 効果と、

20

内耳の組織における H e s 1 遺伝子の発現を減少させるのに十分な量の s i R N A 分子を含む第 2 効果と、

を含み、

s i R N A 分子を含む前記第 2 効果が、i ) G S K - 3 阻害剤を適用した後に別個に適用されるか、i i ) G S K - 3 阻害剤と同時であるが前記第 1 効果からの G S K - 3 阻害剤の放出に比して前記第 2 効果からの s i R N A 分子の放出が遅延するように適用される、キット。

**【請求項 12】**

G S K - 3 阻害剤が、6 - ブロモインジルビン - 3' - オキシム ( B I O ) およびチデグルシブ ( T I D E ) から選択される、請求項 11 に記載のキット。

30

**【請求項 13】**

F G F 2 をさらに含む、請求項 11 に記載のキット。

**【請求項 14】**

s i R N A 分子が、配列番号 1 ~ 1 4 のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 11 に記載のキット。

**【請求項 15】**

前記第 2 効果が、内耳の組織における H e s 1 遺伝子の発現を減少させる s i R N A 分子を含むナノ粒子を含む、請求項 11 に記載のキット。

**【請求項 16】**

ナノ粒子が、生分解性ポリマーをさらに含む、請求項 15 に記載のキット。

40

**【請求項 17】**

生分解性ポリマーが、ポリ(乳酸 - c o - グリコール酸) ( P L G A ) またはペグ化 P L G A ( P E G - P L G A ) である、請求項 16 に記載のキット。

**【請求項 18】**

ナノ粒子が、磁気応答性粒子をさらに含む、請求項 15 に記載のキット。

**【請求項 19】**

磁気応答性粒子が、超常磁性酸化鉄 ( S P I O N ) である、請求項 18 に記載のキット。

**【請求項 20】**

正円窓膜または卵円窓膜を横切ってナノ粒子を輸送するための磁力の使用のために前記第 2 効果が製剤化される、請求項 18 に記載のキット。

50

**【請求項 21】**

経鼓膜投与、蝸牛内注射、蝸牛内注入、または点耳剤のために前記第1剤および／または前記第2剤が製剤化される、請求項11に記載のキット。

**【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、米国特許法第119条(e)に基づき、2016年6月3日に出願された米国特許出願第62/345,740号に対する優先権を主張し、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。

10

**【背景技術】****【0002】**

難聴および平衡機能障害は一般的なヒトの障害である。多くの場合、これらの障害は、(1)蝸牛におけるコルチ器(OCT)、(2)稜(cristae)における前庭上皮、または(3)前庭器官の球形囊もしくは卵形囊における感覚有毛細胞の喪失に起因する。現在、これらの組織での感覚有毛細胞の修復によってこれらの障害を治療することができるFDAにより認可された治療は存在しない。

**【0003】**

この問題に対する現在のアプローチは、前庭器官への損傷に順応させるための前庭リハビリテーションを含む。リハビリテーションは時間がかかり、失われた機能を回復しない。感音難聴では、リハビリテーションは、補聴器または人工内耳によって実現され得る。しかしながら、これらの装置は高価であり、正常以下の音質をもたらし、部分的な機能の回復しかもたらさず、人工内耳の症例において広範囲の手術を必要とし得る。

20

**【0004】**

聽覚障害の治療における別のアプローチは、ペプチドまたは他の低分子の投与である。蝸牛で比較的高い濃度(マイクロモル濃度またはミリモル濃度)を達成されなければならないため、このような薬剤の使用では治療結果はしばしば限定される。さらに、タンパク質またはペプチド阻害剤は、血液迷路閥門および血流でのタンパク質クリアランスならびに潜在的な抗原性のため、耳を治療するために全身送達することが困難である。分子が大きいため、局所送達を使用する場合は特に、適切な濃度のペプチドおよびタンパク質を蝸牛に直接送達することに関しても困難が存在する。

30

**【0005】**

これらの従来のアプローチに対する1つの可能性がある代替方法は、内耳有毛細胞の再生および置換を引き起こす標的化遺伝子療法の使用である。例えば、有毛細胞の再生または置換は、げっ歯類において、内耳感覚上皮内にAtoh1遺伝子を導入するウイルスベクターの使用によって実現されている。しかしながら、このアプローチは、感染症、炎症性免疫反応、遺伝子の突然変異、新生物の発生などの誘発を含むウイルスベクター療法につきものの危険性を伴う。krip1p27 RNAのサイレンシングは、有毛細胞の再生を引き起こすことが示されているが、機能の回復を伴わない異所性のものである。網膜芽腫遺伝子の調節も、さらに有毛細胞を生じ得るが、がん遺伝子または発がん遺伝子の操作につきものの危険があり得る。したがって、内耳有毛細胞の再生または置換を目的とする現在の遺伝子療法は、安全かつ効果的な分子標的および送達法を特定できていない。

40

**【0006】**

1つの可能性がある遺伝子療法アプローチは、低分子干渉RNA(siRNA)の使用による。細胞内に一旦導入されると、siRNA分子は、標的遺伝子によって発現されたメッセンジャーRNA(mRNA)上の相補配列と複合体を形成する。このsiRNA/mRNA複合体の形成は、RNA干渉(RNAi)として知られている天然の細胞内過程を介してmRNAの分解を引き起こす。RNAiは、特定の細胞過程における遺伝子の機能を同定するため、および疾患モデルにおいて可能性がある治療標的を同定するための、十分に確立された手段である。RNAiは従来、細胞培養およびin vitroでの適

50

用に使用されてきたが、遺伝子療法に基づく治療法が、この過程を利用して現在研究されている。

#### 【 0 0 0 7 】

上述のように、内耳の有毛細胞の再生に関して、いくつかの遺伝子標的が研究されているがあまり成功していない。塩基性ヘリックス - ループ - ヘリックス ( b H L H ) 遺伝子 H e s 1 および H e s 5 は、耳の蝸牛および前庭構造における感覚有毛細胞の発生に関与していることが同定されている。加えて、有毛細胞の喪失を防ぐための可能性がある遺伝子標的は、プログラム細胞死またはアポトーシスに関する分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ 1 ( M A P K 1 ) である。

#### 【 0 0 0 8 】

グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 ( G S K - 3 ) は、セリンおよびトレオニンアミノ酸残基へのリン酸塩分子の付加を媒介するセリン / トレオニンプロテインキナーゼである。これは、種々の異なる経路における 4 0 を超える異なるタンパク質に対するキナーゼであり、種々の疾患に関与している。したがって、G S K - 3 阻害剤 ( G S K 3 I ) は動物モデルにおいて安全性および有効性について試験してきたが、G S K - 3 の阻害が様々なシグナル伝達カスケードにわたって果たし得る役割はまだ十分に理解されていない。

#### 【 発明の概要 】

#### 【 0 0 0 9 】

本開示は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物または薬剤と、第 2 の薬剤とを利用して有毛細胞を再生および / または修復するための組成物および方法に関する。

20

#### 【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、遺伝子は、H e s 1 、 H e s 5 または M A P K 1 である。

#### 【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物または薬剤は、s i R N A 分子を含んでもよい。いくつかの実施形態では、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物または薬剤は、遺伝子が調節される経路の阻害剤、例えば、ガンマセクレター阻害剤などの N o t c h シグナル伝達経路阻害剤を含んでもよい( 例えば、H e s 1 の転写が N o t c h シグナル伝達によって媒介されるからである )。

30

#### 【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、第 2 の薬剤はプライミング組成物である。いくつかの実施形態では、プライミング組成物は、カテニンを安定化させること、内耳における多能性細胞の数を増加させること、内耳における既存の多能性細胞の可塑性を増加させること、または内耳の細胞における分化のためのシグナルを送ることからなる群から選択される 1 つまたは複数の機能を示す。いくつかの実施形態では、この第 2 の薬剤は G S K - 3 阻害剤である。さらなる実施形態では、G S K - 3 阻害剤は、C H I R 9 9 0 2 1 、 6 - プロモインジルビン - 3 ' - オキシム ( B I O ) 、またはチデグルシブ ( T I D E ) のいずれか 1 つまたは複数である。

#### 【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物は、ナノ粒子を含んでもよく、次にナノ粒子は内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤を含んでもよい。

40

#### 【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤を封入する。

#### 【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は生分解性ポリマーを含む。さらなる実施形態では、生分解性ポリマーは、ポリ ( 乳酸 - c o - グリコール酸 ) ( P L G A ) またはペグ化 P L G A ( P E G - P L G A ) である。

#### 【 0 0 1 6 】

50

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、磁気応答性であるか、または磁気応答性粒子を含む。いくつかの実施形態では、磁気応答性粒子は超常磁性酸化鉄（S P I O N）である。

#### 【0017】

いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤と同じまたは異なるナノ粒子に含まれてもよい。

#### 【0018】

本開示の態様は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物または薬剤と、難聴を治療し、ならびに／または有毛細胞を修復および／または再生するのに十分な治療有効量の第2の薬剤とを適用する方法に関する。いくつかの実施形態では、適用するステップは同時に実施される。代替の実施形態では、適用するステップは逐次的に実施される。さらなる実施形態では、第2の薬剤は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物または薬剤が適用される前または後に適用される。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0019】

【図1-A】内耳の名称を記した図である。

【図1-B】内耳の名称を記した図である。

【図1-C】内耳の名称を記した図である。

【図1-D】内耳の名称を記した図である。

【図2】Hes1 siRNA 搀持PLGAナノ粒子（NP）処理が耳毒性傷害後に有毛細胞（HC）を再生することを実証するために使用した実験における、マウスのコルチ器（OC）の中回転からの代表的な画像を示す図である。新生児（P3）マウスOCを、オトトキシン（ototoxin）、4-ヒドロキシル-2-ノネナール（4-HNE、450 μM）に24時間曝露し、次いで未処理のままにするか、または非ターゲティングスクランブルRNA NP（scRNA NP）もしくはHes1 siRNA 搀持NP（Hes1 siRNANP）のいずれかにより処理し、7日後、組織を固定し、フルオロフォアがコンジュゲートしたファロイジンにより標識した。3列の外有毛細胞（OHC）および1列の内有毛細胞（IHC）が、未処理の培養物からのOCにおいて観察され（左上パネル）、1列のIHCおよび少数の分散したOHC（白抜き矢じり）が4-HNE処理（右上パネル）および4-HNE + scRNA NP処理したOC（左下パネル）において観察された。余分なOHC（矢印、右下パネル）およびIHC（矢じり、右下パネル）が、Hes1 siRNANP（800 μg/mL）により処理したOCにおいて観察された。

20

【図3】Hes1 siRNA NP処理に反応して、オトトキシン、4-HNEに曝露された新生児マウスOCにおいて回復されたHCの数の観察された用量依存反応を実証する図である。高用量のNP (> 400 μg/mL)による処理の結果、同様に基底回転におけるOHC数の有意な増加がもたらされた。\*\*\*および\*は、未処理の培養物と比較して、それぞれ、p < 0.001および0.05を示す。###、##および#は、4-HNEのみに曝露された群と比較して、それぞれ、p < 0.001、0.01および0.05を示す。括弧内の数字は、HCを計数したOCの数を示す。

30

【図4】以下の実験におけるOCの中回転からの代表的な画像を示す図である。新生児（P3）マウスOCを、耳毒性アミノグリコシド、ネオマイシン（NEO、0.75 mM）に24時間曝露し、次いで未処理のままにするか、または漸増用量のHes1 siRNA 搀持NPにより処理した。7日後、組織を固定し、Myo7a抗体（緑色、上パネル）およびフルオロフォアがコンジュゲートしたファロイジン（下パネル）により標識した。3列のOHCおよび1列のIHCが、未処理の培養物からのOCにおいて観察された（左上パネル）。少数の分散したOHC（白抜き矢じり）が、未処理のNEOに曝露したOC（NEOのみ）において観察された。用量依存的なHC数の増加が、漸増用量のsiHes1を封入したPLGA NPにより処理したOCにおいて観察された。示されたNPの用量当量は溶液中の全siRNA濃度に対応し、それぞれ、145、230、および385 μg/mLのsiHes1を封入したPLGA NPを表す。

40

【図5】用量依存反応が、耳毒性アミノグリコシド、ネオマイシン（NEO）に曝露し、

50

その後、漸増用量の H e s 1 s i R N A N P により処理した新生児マウス O C において回復した H C ( M y o 7 A 陽性細胞 ) の数においても観察されたことを実証する図である。 H C の計数は、 O C の中 - 頂 ( m i d - a p i c a l ) 、中 ( m i d d l e ) および中 - 基底 ( m i d - b a s a l ) 回転にわたって実施した。示した用量当量は溶液中の全 s i R N A 濃度を表し、 78 、 145 、 230 、および 385 μ g / mL の P L G A N P に対応する。 H C 数の有意な増加が観察された。 \*\*\* は、未処理の培養物と比較して  $p < 0.001$  を示す。 # # # および # # は、 N E O のみに曝露した群と比較して、それぞれ、  $p < 0.001$  および 0.01 を示す。

【図 6】 2 、 4 、 8 および 16 kHz の試験周波数での偽処置または治療用 s i H E S 1 N P で処置した耳からの生きているモルモットの騒音により損傷した蝸牛における聴性脳幹反応 ( A B R ) 閾値回復 ( 損傷後 ) の時間経過を示す図である。音響外傷を、 4 kHz を中心とする 130 dB SPL の音響過剰曝露によって 2 時間誘発した。疑非ターゲティングスクランブル RNA ( s c R N A ) 搀持 N P ( 800 μ g / mL ) または治療用 s i H E S 1 N P ( 800 μ g / mL ) のいずれかによる遅延 ( 損傷後 72 時間 ) 治療介入を、ミニ浸透圧ポンプを使用して、蝸牛の基底回転への直接的な片側注入 ( 蝸牛開窓術 ( c o c h l e o s t o m y ) ) によって行い、ミニ浸透圧ポンプを 7 日後に外科的に除去した。次いで A B R 測定を、損傷後 2 、 4 、 8 および 10 週において両方の実験コホートからの動物の間で行った。偽処置した対照と比較して、騒音に曝露された動物における s i H E S 1 N P により処置した耳は、この実験の時間経過にわたって、より大きな程度の漸進的な聴覚機能回復 ( すなわち、試験した周波数範囲にわたる A B R 閾値の低下 ) を示した。

【図 7】 図 6 に示された A B R 閾値回復の単純化された時間経過を示す図であり、急性音響外傷に曝露された、生きているモルモットにおける s i H E S 1 N P による遅延 ( 傷害後 72 時間 ) 治療介入後に達成された聴力回復のレベルが、非ターゲティング s c R N A N P により達成されたものよりも大きかったことを実証する。

【図 8】 2 、 4 、 8 および 16 kHz の試験周波数での音響過剰曝露の 1 日後と比較した、処置後 10 週での外科的に注入した耳における s c R N A N P または s i H E S 1 N P のいずれかによる i n v i v o での遅延 ( 損傷後 72 時間 ) 治療介入後の A A T 後の生きているモルモットにおける A B R 閾値回復の差を示す図である。ここで観察された A A T 後の閾値回復に対する s i H E S 1 N P 処置による特異的改善は、臨床的に有意であると予想される。

【図 9】 処置した耳からの蝸牛の基底回転から収集した画像を示す図であり、 s i H E S 1 N P 注入が、成熟色素沈着モルモットの騒音により損傷された蝸牛において H C 数の増加をもたらしたことを実証する。偽 ( s c R N A ) および治療的 ( s i H E S 1 ) 処置した耳における M y o 7 a およびファロイジンによる標識化により、 s c R N A N P を注入した耳における O H C の顕著な喪失および s i H E S 1 N P 処置した耳における O H C 数の著しい回復が明らかにされた。矢印は、 s i H E S 1 処置した耳における不動毛束 ( 矢じり ) を有する過剰の M y o 7 a 陽性 I H C の発生を示す。

【図 10】 s i H E S 1 N P 処置が、損傷を与える音響過剰曝露の後、 i n v i v o で H C 数を回復することを示す図である。 M y o 7 a により免疫標識した I H C および O H C の数を定量し、傷害後 10 週での s c R N A N P および s i H E S 1 N P により処置した耳における O C 頂からの距離のパーセント ( キロヘルツでの周波数位置 ) の関数として I H C および O H C の喪失のパーセントを示すサイトコクレオグラム ( c y t o c o c h l e o g r a m ) としてグラフ化した。データは平均 ± S E M としてプロットする。 3 つの蝸牛を各データ点について分析した。 O H C および I H C の喪失の顕著な基底から頂への勾配が、 s c R N A N P により処置した耳において観察され、これは、 O C の基底回転に沿った高周波数の周波数特定性領域を含む、 s i H E S 1 N P により処置した耳における蝸牛螺旋の全長にわたって劇的に減少した。

【図 11】 蝸牛の基底回転から収集した画像を示す図であり、 s i H E S 1 N P 注入が、有毛細胞を死滅させる大きな損傷を与える騒音に曝露した成熟マウスにおいて i n v

10

20

30

40

50

*in vivo* で HC 数を回復することを実証する。4 週齢の C 5 7 B L / 6 マウスを、116 d B SPL にて 8 ~ 16 kHz のオクターブ帯域ノイズの音響過剰曝露に 2 時間曝露した。音響外傷の 72 時間後、siHES1 NP (800 µg / mL) を、ミニ浸透圧ポンプを使用して、7 日間、後半規管に片側から注入した。騒音損傷の 8 週間後、組織を固定し、HC の Myo7a による免疫標識のために採取した。siHes1 NP 注入の結果、*in vivo* で騒音により損傷したマウスの蝸牛の構造的に正確な位置における HC 数が増加した。

【図 12】外リンパ模擬培地中の PLGA ナノ粒子からの HES1 siRNA の累積放出プロファイルのグラフである。

【図 13】コルチ器の損傷していない出生後 (P3) の器官型培養物における内および外 HC (それぞれ IHC および OHC) の数の増加に対する、単独での、または GSK-3 阻害剤である BINO の段階的 (S) または同時 (一緒、T) 適用と組み合わせた siHES1 の効果を示す図である。2 または 10 マイクロモル濃度 (段階的適用、S について) にて、ビヒクリのみ (ジメチルスルホキシド、DMSO) または GSK-3 阻害剤である BINO のいずれかを含有する培地を添加する前に、コルチ器 (OC) を培地のみで 24 時間培養した。さらに 72 時間培養した後、培地を交換し、20 nM の siHES1 トランスフェクション複合体 (JeSI 10 mM, Polyplus Transfection, Illkirch, フランス) の存在下または非存在下で、2 または 10 マイクロモル濃度 (同時適用、T について) にて、DMSO (正常対照、NC、または段階的、S、適用実験について) または BINO のいずれかを含有する培養培地と置き換えた。さらに 48 時間後、全ての培地を基礎培地と置き換え、HC の固定および抗 Myo7A による免疫標識の前にさらに 48 時間培養した。10 マイクロモル濃度の BINO を順次適用し、続いて siHES1 のトランスフェクションの結果、損傷していない OC において IHC および OHC の両方の数が最大に増加し (すなわち、より多くの de novo 有毛細胞産生)、典型的には出生後の蝸牛における新たな HC 産生に対して抵抗性である領域である OC の中 - 基底回転において最も大きな差異が観察された。

【図 14】BINO および siHes1 による併用処置の結果を示す図であり、いずれかの単一の治療剤単独による処置と比較して、オトトキシンにより除去された卵形嚢の平衡斑状外 (extrastriolar) 領域における HC の数の相乗的増加を実証する。BINO が、有害な損傷後の HC を再生する際に Hes1 siRNA の治療効果を増強することができるかどうかを評価するために、新生児のマウスの卵形嚢組織をネオマイシン (NEO) に曝露し、次いで未処理のままにするか、または治療剤の一方もしくは両方により処理した。in vitro で合計 8 日後、組織を固定し、HC マーカーである Myo7a により標識した。# # #、未処理の対照と比較した Myo7a 陽性細胞の差、 $p < 0.001$ 。\*、\*\* および \*\*\*、処理群の間の Myo7a 陽性細胞の数の有意差に対してそれぞれ、 $p < 0.05$ 、 $0.01$  および  $0.001$ 。

【図 15】図 14 の異なる実験群からの代表的な画像を示す図である。NEO 処理後、HC 数が大幅に減少する (パネル 2)。Hes1 siRNA 処理のみの結果、主に平衡斑状 (striolar) 領域内で HC 数は増加したが (パネル 4)、siHES1 および BINO による併用処理の結果、平衡斑状外領域にも及ぶ再生反応の増強がもたらされた (パネル 5)。

【図 16】BINO および siHes1 による段階的処理の結果、BINO もしくは siHES1 のみのいずれかについて、または BINO + ガンマセクレターゼ阻害剤 (GSI)、デスヒドロキシ LY 411575 (ジベンズアゼピン、5 µM) による段階的処理について観察されたものよりも、NEO により除去した卵形嚢の平衡斑状外領域において、より頑強な分化転換 (transdifferentiative) 反応が生じたことを実証する図であり、併用処理効果は卵形嚢外植片の平衡斑状領域に大部分限定された。

【図 17】図 16 の異なる実験群からの代表的な画像を示す図である。NEO 処理後、HC 数が大幅に減少する (パネル 2)。個々に、BINO、Hes1 siRNA および GSI 処理のみの結果、平衡斑状領域内の HC 数の増加が生じたが (パネル 4 および 6)、B

10

20

30

40

50

I O および s i H E S 1 による併用処理の結果、平衡斑状外領域にも及ぶ再生反応の増強が特有に生じた（パネル5）。

【図18】成熟マウスO C の全蝸牛培養モデルからの代表的な画像を示す図であり、20倍および40倍の倍率でここに示される異なる実験群の中回転を示す。H C 再生を研究するためにこの全蝸牛培養モデルを使用して、成熟マウス蝸牛（P 1 6）を採取し、培地のみで24時間インキュベートすると、この期間にわたって既存のI H C およびO H C が急速に変性し、死滅した。培養の24時間後、これらの培養物を5 μ MのB I O により72時間処理し、続いてs i H E S 1 (20 n M) をトランスフェクションし、その後、in vitroで合計9日間培養し、その時点では組織を固定し、ファロイジン（赤色）またはH C マーカーであるM y o 7 a（緑色）により標識した。B I O およびH e s 1 s i R N A による併用処理の結果、これらの条件下で感覚上皮領域内のH C 数の顕著な増加が生じた（右パネル）。10

【図19】血清飢餓M D C K 細胞におけるG S K 3 I 媒介性増殖の代表的な画像を示す図である。細胞を最初に10%ウシ胎児血清（F B S ）の存在下で培養し、次いで24時間、無血清培地に切り替え、その後、10 μ MのE d U の存在下で示した濃度にてG S K 3 I を含む0.2%血清含有培地を添加した。細胞をさらに48時間培養し、その後、固定し、銅触媒による付加環化（「クリック」反応、C l i c k - i T E d u 、L i f e T e c h n o l o g i e s ）におけるA l e x a F l u o r 4 8 8 アジドのコンジュゲーションによりE d u 陽性核（緑色）を可視化した。全核をD A P I （青色）により染色した。N C 、正常対照または未処理の細胞を、実験時間の過程全体にわたって10%F B S の存在下で培養した。G S K 3 I 、チデグルシブは試験した用量範囲にわたる持続性増殖反応を支持したが、S B - 2 1 6 7 6 3などの他のG S K 3 I によって誘導された増殖反応は漸増用量に伴って漸進的に減衰した。20

【図20】血清飢餓（すなわち、有糸分裂で抑制された）M D C K 細胞において増殖反応を誘導するためのG S K 3 阻害剤の比較結果を示す図である。図13に記載されるように培養したM D C K 細胞の画像化領域からのE d U 陽性核を、I m a g e J ソフトウェア（N I H ）を使用して定量し、各領域におけるD A P I 染色核の総数に対するE d U 陽性細胞数の平均パーセンタイルとしてグラフ化した。各実験条件について最低4つの細胞領域をこの分析に含めた。（\* および\*\* \* 、未処理の血清飢餓対照と比較してE d U 陽性核の統計的に有意な増加について、それぞれp < 0.05 および0.001）。この標的化分析において調べたG S K 3 I の中で、チデグルシブは、これらの血清制限条件下で試験したG S K 3 I 濃度範囲にて最も頑強な有糸分裂反応を支持した。30

【図21】チデグルシブ処理に反応する出生後のコルチ器における有糸分裂活性細胞のE d U 標識化を示す図である。出生後3日目のO C を採取し、24時間、in vitroで培養し、その後、0.5または2.0 μ Mの最終濃度にてビヒクリルのみ（D M S O ）またはチデグルシブ（T I D E ）のいずれかの存在下で10 μ MのE d U を含有する培養培地を添加した。器官型培養物をこれらの薬剤の存在下で72時間連続的に培養し、その後、上記のように固定し、E d U 陽性核を可視化した。各群からのO C の中回転の画像を示す。括弧は、各画像における感覚上皮領域を示す。ビヒクリルにより処理した対照と比較して、チデグルシブは、培養したコルチ器の感覚上皮領域において顕著に大きな有糸分裂反応を誘導した。40

【図22】ネオマイシン（0.7 m M ）に24時間曝露し、続いてG S K 3 阻害剤チデグルシブ（T I D E ）および/またはs i H E S 1 (20 n M) リポフェクション複合体（J e t S I 、P o l y p l u s ）の存在下または非存在下で回収した後のマウスO C の器官型培養物の中・頂および中領域から定量した有毛細胞（M y o 7 a + 細胞）を示す図である。より多くのH C 数が、T I D E およびs i H E S 1 の組合せにより処理した培養物においてO C の中・頂および中回転の両方において観察され、T I D E 、次いでs i H E S 1 の段階的適用により、H C 数の最も有意な増加が生じた。\*\* および\*\* \* 、N E O 処理のみと比較してp < 0.01 および0.001。# # 、N E O + s i H E S 1 処理と比較してp < 0.01。50

【図23】ネオマイシン(0.7 mM)に24時間曝露し、続いてGSK3阻害剤チデグルシブ(TIDE)および/またはsiHES1(20 nM)リポフェクション複合体(JetSI、Polyplus)の存在下または非存在下で回収した後のマウスOCの器官型培養物の中・頂および中領域から定量した有毛細胞(Myo7a+細胞)を示す図である。より多くのHC数が、ネオマイシンの72時間後にsiHES1により処理した培養物においてOCの中・頂および中回転の両方において観察されたが、TIDE、次いでsiHES1処理の段階的組合せは、OCの中および中・頂回転の両方においてHC数の相乗的増加を生じた。<sup>\*</sup>および<sup>\*\*</sup>、NEO処理のみと比較してp < 0.05および0.001。# # #、NEO + siHES1処理と比較してp < 0.01。

【図24】図23に記載される実験からのNEOにより損傷した器官型培養物の中で、対照および処置群からのOCの中回転のMyo7a免疫標識を示す図である。

【図25】ネオマイシン(0.7 mM)に24時間曝露し、続いてGSK3阻害剤チデグルシブ(TIDE)および/またはsiHES1(20 nM)リポフェクション複合体(JetSI、Polyplus)の存在下または非存在下で回収した後のマウスOCの器官型培養物の中・頂、中、および中・基底領域から定量した有毛細胞(Myo7a+細胞)を示す図である。1組のNEOにより除去したOCを、チデグルシブの効果を潜在的に増強する目的の培地補足物として2 ng/mLのFGF-2の存在下でTIDE、次いでsiHes1により処理した。より多くのHC数が、TIDEおよびsiHES1の段階的組合せにより処理した培養物においてOCの中・頂および中回転の両方において観察されたが、増殖培地へのFGF-2の添加は、典型的にはHC再生に対してより抵抗性である領域である、OCの中・基底回転を通して効果を増強した。<sup>\*</sup>および<sup>\*\*</sup>、NEO処理のみと比較してp < 0.05および0.001。# # #、NEO + siHES1処理と比較して、または注記したように処理群の中でp < 0.01。

【図26】図25に記載される実験からのNEOにより損傷した器官型培養物の中で、対照および処理群からのOCの中回転のMyo7a免疫標識を示す図である。

【図27】哺乳動物Hes1転写産物の間で保存された標的部位を有する2つの異なるsiHES1分子を使用して、マウス内耳細胞株(IMO-2B1)における偽処理した対照と比較したHes1ノックダウン効率の比較用量曲線分析からの逆転写-定量的ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)結果を示す図である。SiRNA分子を、市販のトランスフェクション剤(RNAiMAX、Thermo Fisher Sci.)を使用して、IMO-2B1のサブコンフルエントウェルにトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、全RNAを単離し、Hes1およびハウスキーピング遺伝子GAPDHに対するプライマーを使用して、RT-qPCR分析に供した。相対Hes1レベルを2<sup>-CT</sup>法により決定した(その全体が参照により組み込まれる、LivakおよびSchmittgen(2001年)Methods 25(4):402~408頁を参照のこと)。分子#7を使用した最適なノックダウンがわずかな程度の2 nMのsiRNA(分子#1に必要な約20 nMと比較して)を使用して観察されたので、Hes1転写レベルを枯渇させるための分子#7の見かけの効力は分子#1のものよりもかなり大きかった。

【図28】20,000(左パネル)および40,000(右パネル)倍の倍率での、siHes1 PEG-PLGA NPの代表的な走査型電子顕微鏡(SEM)画像を示す図である。

【図29】IMO-2b1内耳細胞におけるフルオロフォアがコンジュゲートしたsiRNA担持PEG-PLGA NPの用量依存的取り込みを実証するグラフを示す図である。

【図30】FAM scRNA(緑色、左上パネル)およびAF555-PLGA(赤色、右上パネル)の洗浄、固定および共焦点顕微鏡画像化の前の漸増用量(200、400、または800 µg/mL)のNPとの24時間インキュベーション後のIMO-2b1におけるDual Fluor PLGA NPの内在化および局在化を示す図である。青色標識化(左下パネル)は細胞核のDAPI染色を表す。融合画像(右下パネル)は、内在化NPからのscRNAとPLGAとの間のシグナル(黄色)の重複を示す。スケール

10

20

30

40

50

バーは 10 μm であり、全ての画像に適用される。

【図 31】図 30 からの 800 μg / mL の共焦点画像セットの拡大を示す図である。

【図 32】FAM-s c RNA（緑色、左上パネル）およびAF555-PLGA（赤色、右上パネル）の洗浄、固定および共焦点顕微鏡画像化の前の漸増用量（200、400、または 800 μg / mL）のNPとの24時間インキュベーション後のIMO-2b1細胞におけるDual Fluor PEG-PLGA NPの内在化および局在化を示す図である。青色標識（左下パネル）は細胞核のD API染色を表す。融合画像（右下パネル）は、内在化NPからのs c RNAとPEG-PLGAとの間のシグナル（黄色）の重複を示す。スケールバーは 10 μm であり、全ての画像に適用される。

【図 33】図 32 からの 800 μg / mL の共焦点画像セットの拡大を示す図である。

【図 34】内耳細胞生存率に対する新たな si Hes1 搀持 PEG - PLGA NP 製剤の用量漸増からの潜在的な細胞毒性効果の評価からの結果を示す図である。

【図 35】si Hes1 搀持 PLGA NP と比較した、新たな si Hes1 搀持 PEG - PLGA NP 製剤の用量漸増によって達成された内耳細胞における相対 Hes1 サイレンシング効率のペアワイズ比較評価からの結果を示す図である。

【図 36】並行して合成した si Hes1 搀持 PLGA NP と比較した、新たな si Hes1 搀持 PEG - PLGA NP 製剤の用量漸増によって達成された、内耳細胞のタンパク質レベルにおける相対的 Hes1 サイレンシング効率の比較評価からの結果を示す図である。

【図 37】GSK3 阻害が、オトトキシンにより除去したOCにおけるHC数を回復するように si Hes1 NP と相乗作用することを示す図である。出生後（P3）マウス（CD1）OC 外植片を、耳毒性アミノグリコシド、ネオマイシンに24時間曝露し、次いで 60 nM の si Hes1 NP のみ；GSK3 阻害剤、チデグルシブ（TIDE）のみ（2 μM）；または 60 nM の si Hes1 NP と漸増用量のチデグルシブ（0.5、2、または 10 μM）との組合せにより 6 日間処理し、その後、HC 特異的マーカーである Myo7a に対して固定し、免疫標識した。示した画像間の固定基準として中回転。

【図 38】TIDE が、オトトキシンにより除去したOCにおけるHC数を回復するように si Hes1 NP と相乗作用することを示す図である。NEOにより除去したOCを、単独で、または漸増用量の TIDE と組み合わせて、準最適な（60 nM）用量の si Hes1 NP により処理した。HC 定量により、チデグルシブおよび低用量の si Hes1 NP 処理を組み合わせた場合、OCの中および中-基底回転における HC 数の相乗的增加が明らかになった。 si Hes1 NP の持続放出プロファイルは 2 つの療法の段階的適用を模倣する。有毛細胞密度の用量依存的增加が、TIDE および si Hes1 NP による共処理の際に OC 全体を通して観察された。<sup>\*</sup> および <sup>\*\*\*</sup>、NEO 処理のみと比較して  $p < 0.05$  および  $0.001$ 。# および # # #、NEO + si Hes1 NP 処理と比較して  $p < 0.05$  および  $0.001$ 。n = 5 OC / 条件。

【図 39】騒音により聴力を失ったモルモットにおける聴覚機能の回復に対する si HES1 ナノ粒子の 1 日の注入の結果を示す図である。モルモットを、聴力を失う騒音レベル（4 kHz を中心とする 125 dB SPL オクターブ帯域ノイズ）に 3 時間曝露した。

音響外傷の 72 時間後、偽（すなわち、非ターゲティングスクランブル RNA、s c RNA）または治療用 Hes1 si RNA（si Hes1）のいずれかを担持した PLGA NP（800 μg / mL）を、24 時間（1 日注入）にわたって 1 時間当たり 1.0 μL の速度にてミニ浸透圧ポンプによって蝸牛に送達した（蝸牛開窓術）。聴性脳幹反応（ABR）測定値を処置後 3 週間にて記録し、平均 ABR 閾値回復（すなわち、音響過剩曝露の 1 日後と比較した聴力回復）を、各群について 2 ~ 16 kHz の試験周波数にわたってプロットした。損傷を与える騒音曝露は、全ての試験周波数にわたって顕著な難聴（すなわち、高 ABR 閾値シフト）を誘発したが、si Hes1 NP により処置した耳は、s c RNA NP により処置した耳と比較して、2 ~ 16 kHz 範囲全体にわたって閾値回復の有意な改善を示した（<sup>\*</sup> および <sup>\*\*\*</sup>、 $p < 0.05$  および  $0.001$ ；各群について n = 6）。

10

20

30

40

50

【図40】2、4、8および16kHzの試験周波数での音響過剰曝露の1日後と比較した、処置後9週間の外科的に注入した（1日投与）耳における、*in vivo*でのscRNA NPまたはsiHES1 NPのいずれかによる遅延（損傷後72時間）治療介入後の聴力を失った後の生きているモルモットにおけるABR閾値回復の差を示す図である。ここで観察された閾値回復に対するsiHES1 NP処置に特異的な改善の程度は、臨床的に有意であると予測される（\*p < 0.05、\*\*p < 0.01）。

【図41】siHES1 NP処置が、騒音に曝露された成熟色素沈着モルモットにおいて、処置された耳からの蝸牛の基底回転におけるHC数を回復することを実証する図である。偽（scRNA）および（siHes1）NPにより処置した耳におけるMyo7aおよびファロイジンによる標識化により、scRNA NPを注入した耳におけるOHCの明白な喪失、および騒音により除去したモルモット蝸牛の中および基底回転の両方におけるsiHes1 NPにより処置した耳におけるOHC数の顕著な回復が明らかにされた。矢印は、形態学的に成熟したHCのde novo産生と一致する、siHes1 NPにより処置した耳のIHC領域において独自に観察される不動毛束（矢じり）を有する異所性Myo7a陽性HCの発生を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0020】

###### 1. 定義

本明細書に使用される場合、「に十分な量」という用語は、意図した効果の達成を可能にする、例えば、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる量を指す。このような量は、意図した効果に基づいて、当技術分野において公知の種々のアッセイによって決定することができる。

##### 【0021】

本明細書に使用される場合、「適用すること」または「投与すること」という用語は、指定された薬剤、組成物、または力を、指定された領域または対象に導入する全ての手段を指す。「投与」または「適用」は、治療の過程を通して1回の用量で、連続的または断続的に行うことができる。最も効果的な投与手段および投与量を決定する方法は、当業者に公知であり、療法に使用される組成物、療法の目的、治療される標的細胞、および治療される対象によって異なる。単回または複数回の投与は、治療する医師によって選択される用量レベルおよびパターンにより実施され得る。適切な投薬製剤および薬剤を投与する方法は当技術分野において公知である。投与経路も決定することができ、最も効果的な投与経路を決定する方法は当業者に公知であり、治療に使用される組成物、治療の目的、治療される対象の健康状態または病期、および標的細胞または組織によって異なる。投与経路の非限定的な例には、経口投与、経鼻投与、吸入、注射、および局所適用が含まれる。投与は工業的および治療的適用における使用のためであってもよい。

##### 【0022】

本明細書に使用される場合、「生分解性」という用語は、使用中に分解することを意図される、ポリマー、組成物、および製剤などの物質を記載するために本明細書に使用される。生分解性物質はまた、「生体適合性」でもあり得、すなわち、生体組織に有害ではない。非限定的な例示的な生分解性物質には、任意選択でペグ化されている、ポリ（乳酸）（PLA）およびポリ（乳酸-コ-グリコール酸）（PLGA）が含まれる。

##### 【0023】

本明細書に使用される場合、「BIO」または「6-プロモインジルビン-3'-オキシム」という用語は、以下に示される構造を有する化合物および薬学的に許容されるその塩を指す：

##### 【0024】

10

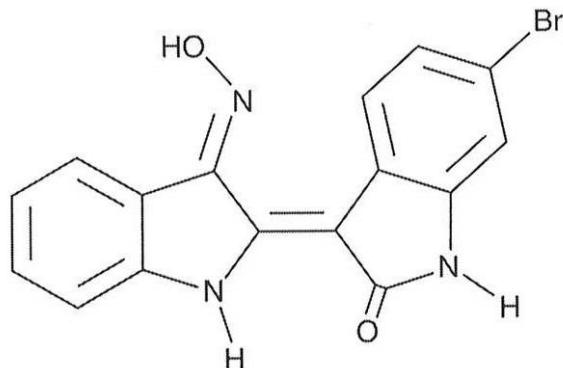
20

30

40

50

## 【化1】



10

## 【0025】

本明細書に使用される場合、「細胞」という用語は、真核細胞を指す。「有毛細胞」という用語は、顕微鏡下で微細な毛のように見える長い纖毛（例えば、不動毛および／または動毛）を有することを特徴とする感覚上皮細胞を指し；本明細書に使用される場合、有毛細胞（H C）は、それらの位置、例えば、内耳有毛細胞（I H C）または外耳有毛細胞（O H C）によって識別され得る。このような有毛細胞は、少なくとも耳のコルチ、斑、および稜の蝸牛器官に存在することが知られている。

## 【0026】

本明細書に使用される場合、「分化」という用語は、特定の成熟／特殊化した細胞型の形質と一致する、および／またはそれらを促進／維持する特定の遺伝子産物を產生する、成熟／特殊化した細胞型の細胞（例えば、有毛細胞）に細胞を発達させる特定の状態を指す。

20

## 【0027】

本明細書に使用される場合、「発現」という用語は、ポリヌクレオチドがm R N Aに転写されるプロセス、および／または転写されたm R N Aが続いてペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。遺伝子の発現レベルは細胞または組織試料中のm R N Aまたはタンパク質の量を測定することによって決定することができ、さらに、複数の遺伝子の発現レベルは特定の試料についての発現プロファイルを確立するために決定することができる。発現の文脈に使用される場合、「増加する」という用語は、転写および／または翻訳の量を増加させるのに役立つ1つまたは複数の作用を指す。同様に、「減少する」という用語は、転写および／または翻訳の量を減少させるのに役立つ1つまたは複数の作用を指す。

30

## 【0028】

本明細書に使用される場合、「遺伝子」という用語は、R N Aがコーディング（例えば、m R N A）であるか、または非コーディング（例えば、n c R N A）であるかに関わらず、R N A分子に転写される任意の核酸配列を広範に含むことを意味する。

## 【0029】

本明細書に使用される場合、「G S K - 3」という用語は、この名称に関連するタンパク質、すなわち、セリンおよびトレオニンアミノ酸残基上へのリン酸塩分子の付加を媒介するセリン／トレオニンプロテインキナーゼを指す。

40

## 【0030】

本明細書に使用される場合、「H e s 1」（H e s ファミリー B H L H 転写因子 1、クラスB 塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質39、ヘアリー様タンパク質、ヘアリーホモログ、B H L H b 39、H H L、H R Y、ヘアリー・アンド・エンハンサー・オブ・スプリット1（Hairy And Enhancer Of Split 1）、（ショウジョウウバエ）、ヘアリー・アンド・エンハンサー・オブ・スプリット1、ヘアリー・ホモログ（ショウジョウウバエ）、H E S - 1、またはH Lとしても知られている）という用語は、この名称および／またはG C I D : G C 0 3 P 1 9 4 1 3 6、H G N C : 5 1 9 2、E n t r

50

e z 遺伝子 : 3 2 8 0 、 Ensembl : E N S G 0 0 0 0 0 1 1 4 3 1 5 、 O M I M : 1 3 9 6 0 5 、 UniProtKB : Q 1 4 4 6 9 (これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み込まれる) に関連する遺伝子および結果として生じるタンパク質産物、ならびに限定されないが、ヒト、マウス、ラット、モルモット、およびチンチラを含む、特定の種におけるそれらのホモログまたはオルソログを指す。ヒト H e s 1 の非限定的な例示的なアミノ酸配列は本明細書以下に提供される (配列番号 1 3 ) :

MPADIMEKNSSSPVAATPASVNTTPDKPKTASEHRKSSKPIMEKRRRARINESLSQLKTLI  
LDALKKDSSRHSKLEKADILEMTVKHLRNLQRAQMATAALSTDPSVLGKYRAGFSEC  
VTRFLSTCEGVNTEVRTRLLGHLANCMTQINAMTYPGQPHPALQAPPPPPGPQHA  
PFAPPPLVPIPAGGAAPPPGGAPCKLGSQAGEAAKVFGGFQVVPAPDGQFAFLIPNGAFA  
HSGPVIPVYTSNSGTSVGPNAVSPSSGPSLTADSMWRPWRN

### 【 0 0 3 1 】

本明細書に使用される場合、「 H e s 5 」 ( H e s ファミリー B H L H 転写因子 5 、クラス B 塩基性ヘリックス - ループ - ヘリックスタンパク質 3 8 、ヘアリーアンドエンハンサー オブスプリット 5 、 B H L H b 3 8 、ヘアリーアンドエンハンサー オブスプリット 5 (ショウジョウバエ) としても知られている) という用語は、この名称および / または G C I D : G C 0 1 M 0 0 2 5 2 8 、 H G N C : 1 9 7 6 4 、 En t r e z 遺伝子 : 3 8 8 5 8 5 、 Ensembl : E N S G 0 0 0 0 0 1 9 7 9 2 1 、 O M I M : 6 0 7 3 4 8 、 UniProtKB : Q 5 T A 8 9 (これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み込まれる) に関連する遺伝子および結果として生じるタンパク質産物、ならびに限定されないが、ヒト、マウス、ラット、モルモット、およびチンチラを含む、特定の種におけるそれらのホモログまたはオルソログを指す。ヒト H e s 5 の非限定的な例示的なアミノ酸配列は本明細書以下に提供される (配列番号 1 4 ) :

MAPSTVAVELLSPKEKNRLRKPVVEKMRRDRINSSIEQLKLLLEQEFAHQPN  
SKLEKADILEMAVSYLKHSKAFVAAAGPKSLHQDYSEGYSWCLQEAVQFLTLHA  
ASDTQMKLLYHFQRPPAAPAAPAKEPKAPGAAPPPALS  
AKATAAAAAAHQPACGLWRPW

### 【 0 0 3 2 】

本明細書に使用される場合、「阻害剤」という用語は、分子 ( 例えば、タンパク質、核酸、または他の生物学的分子 ) が特定の反応に関与することを抑制または阻止する組成物または薬剤を指す。例えば、 G S K - 3 阻害剤は、 G S K - 3 がその生物学的機能の 1 つまたは複数に関与するのを阻止する組成物または薬剤を指すために使用され得る。非限定的な例示的な G S K - 3 阻害剤には、 B I O 、 T I D E 、カイロン ( C h i r o n ) 化合物、塩化リチウム、および S B - 2 1 6 7 6 3 が含まれる。

### 【 0 0 3 3 】

本明細書に使用される場合、「 M A P K 1 」 ( 分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ 1 、細胞外シグナル制御キナーゼ 2 、分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ 2 、 M A P キナーゼアイソフォーム P 4 2 、 M A P キナーゼ 1 、 M A P キナーゼ 2 、 E C 2 . 7 . 1 1 . 2 4 、 P 4 2 - M A P K 、 M A P K 2 、 P R K M 1 、 P R K M 2 、 E R K - 2 、 E R K 2 、 E R T 1 、プロテインチロシンキナーゼ E R K 2 、 E C 2 . 7 . 1 1 、 P 4 2 M A P K 、 P 4 1 m a p k 、 M A P K 1 、 M A P K 2 、 P 4 0 、 P 3 8 、 E R K 、 P 4 1 としても知られている) という用語は、この名称および / または G C I D : G C 2 2 M 0 2 1 7 5 4 、 H G N C : 6 8 7 1 、 En t r e z 遺伝子 : 5 5 9 4 、 Ensembl : E N S G 0 0 0 0 0 1 0 0 0 3 0 、 O M I M : 1 7 6 9 4 8 、 UniProtKB : P 2 8 4 8 2 (これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み込まれる) に関連する遺伝子および結果として生じるタンパク質産物、ならびに限定されないが、ヒト、マウス、ラット、モルモット、およびチンチラを含む、特定の種におけるそれらのホモログまたはオルソログを指す。ヒト M A P K 1 ( アイソフォーム 1 ) の非限定的な例示的なアミノ酸配列は本明細書以下に提供される (配列番号 1 5 ) :

MAAAAAGAGPEMVRGQVFDFVGPRYTNLSYIGEAYGMVCSAYDNVNKVRVAIKKISPF  
EHQTYCQRTLREIKILLRFRHENIIGINDIIRAPTIEQMKD VYIVQDLMETDLYKLLKTQHL

10

20

30

40

50

SNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLNTCDLKICDFGLARVADPDHDHT  
GFLTEYVATRWYRAPEIMLNSKGYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPIFPGKHYLDQLNHIL  
GILGSPSQEDLNCIINLKARNYLLSLPHKNKVPWNRLFPNADSKALDLDKMLTFNPHKR  
IEVEQALAHPYLEQYYDPSDEPIAEAPFKFDMELODLPKEKLKELIFEETARFQPGYRS

#### 【0034】

本明細書に使用される場合、「磁気応答性」という用語は、磁気として知られる物理現象から生じる引力または反発力に応答する粒子または作用物質の能力を指す。いくつかの実施形態では、磁気応答性であることにより、磁気勾配の適用による粒子または作用物質の制御された移動または輸送が可能となる。「磁気応答性」作用物質の非限定的な例は酸化鉄であり、ある特定の酸化鉄粒子は超常磁性であってもよい。このような超常磁性酸化鉄粒子は、マクロスケール、マイクロスケール、またはナノスケールであってもよい。ナノスケールの超常磁性酸化鉄粒子は S P I O N という省略表現で称される。

10

#### 【0035】

本明細書に使用される場合、「ミクロスフェア」という用語は、約 1 ~ 約 1 0 0 0 ミクロンの範囲のサイズを有する、例えば、対象組成物などの生体適合性ポリマーから形成される、実質的に球形のコロイド構造を含む。マイクロカプセルは一般にポリマー製剤などの、ある種の物質によって覆われているので、一般に「マイクロカプセル」はミクロスフェアと区別することができる。「微粒子」という用語は、ミクロスフェアおよびマイクロカプセル、ならびに上記の 2 つのカテゴリーのいずれかに容易に分類できない構造であり、全て平均約 1 0 0 0 ミクロン未満の寸法を有する。構造が直径約 1 ミクロン未満である場合、対応する技術分野で認識されている用語である「ナノスフェア」、「ナノカプセル」、および「ナノ粒子」を利用することができる。

20

#### 【0036】

「薬学的に許容される担体」(または「薬学的に許容される賦形剤」)という用語は、本明細書に開示される組成物に使用され得る任意の希釈剤、賦形剤、または担体を指す。薬学的に許容される担体には、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えば、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン - ポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコール、ミクロスフェア、微粒子、またはナノ粒子(例えば、ポリ(乳酸 - co - グリコール酸)などの生分解性ポリマーを含む)、および羊毛脂が含まれる。適切な医薬担体は、この分野の標準参考テキストである、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company に記載されている。それらは、意図される投与形態、すなわち、経口錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、シロップ剤などに関して選択され得、従来の薬務と両立し得る。

30

#### 【0037】

本明細書に使用される場合、「可塑性」という用語は、ある細胞(例えば、幹細胞)が別の細胞の特徴を呈する能力を指し、一般に分化の文脈に使用される。「多能性」という用語は、いくつかの異なる細胞型を生じる細胞の能力を指す。

40

#### 【0038】

本明細書に使用される場合、「ポリマー」という用語は、反復サブユニットから構成される分子を指す。一般に、ポリマーは、「低分子化合物」として分類されているこれらの分子に比べて、より大きな分子量を有する傾向がある。

#### 【0039】

本明細書に使用される場合、「置換すること」または「再生すること」という用語は、有毛細胞の再生、再成長、または回復を指す。「保護する」という用語は、有毛細胞喪失

50

の阻止または軽減を意図する。

**【0040】**

本明細書に使用される場合、診断または治療の「対象」という用語は、細胞または哺乳動物などの動物もしくはヒトである。診断または治療の対象となる非ヒト動物は、命名された疾患または状態（例えば、難聴）を患有ものまたはその動物モデル、例えば、サル、マウス、例えば、ラット、マウス、チンチラ、イヌ科、例えば、イヌ、ウサギ科、例えば、ウサギ、家畜、スポーツ動物、およびペットである。

**【0041】**

本明細書に使用される場合、「siRNA」という用語は、特定の遺伝子または転写後の遺伝子の発現を干渉する二本鎖RNA分子を意図する。いくつかの実施形態では、siRNAは、RNA干渉経路を使用して遺伝子発現を干渉または阻害するように機能する。同様の干渉または阻害効果が、ショートヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（mRNA）および/または1つもしくは複数の修飾核酸残基を含む核酸（siRNA、shRNA、またはmiRNAなど）、例えば、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、アンロックド核酸（UNA）、またはトリアゾール連結DNAのうちの1つまたは複数によって達成され得る。

10

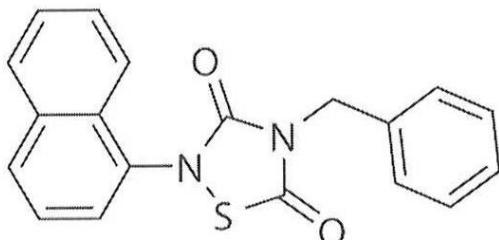
**【0042】**

本明細書に使用される場合、「TIDE」または「チデグルシブ」という用語は、以下に示される構造を有する化合物、ならびに薬学的に許容されるその塩および誘導体を指す：

20

**【0043】**

**【化2】**



**【0044】**

30

意図される誘導体の非限定的な例には、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2014/005195号に開示されているものが含まれる。そのようなTIDE誘導体はTIDEと同じ機能を有し得るが、改善された安定性、溶解性、または薬物動態のために修飾されてもよい。本明細書において意図される誘導体のさらなる非限定的な例には、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Morales-Garciaら、(2012年) ACS Chem. Neurosci. 3: 963~917頁に開示されているものが含まれる。TIDEに関連するGSK3阻害剤およびその誘導体には、GSK3阻害剤類似体のTDZDファミリーが含まれる。

**【0045】**

40

本明細書に使用される場合、「組織」という用語は、生きているもしくは死んだ生物の組織、あるいは生きているもしくは死んだ生物に由来するか、またはそれらを模倣するように設計された任意の組織を指す。

**【0046】**

本明細書に使用される場合、「治療有効量」という用語は、所望の効果を達成するのに十分な量を指す。治療的適用の文脈において、有効量は、問題となる状態の種類および重症度、ならびに全身の健康状態、年齢、性別、体重、および医薬組成物に対する耐性などの個々の対象の特徴に依存する。免疫原性組成物の文脈において、いくつかの実施形態では、有効量はバイオフィルムの分解を生じるのに十分な量である。他の実施形態では、免疫原性組成物の有効量は、抗原に対する抗体生成をもたらすのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、それを必要とする対象に対して受動免疫を与えるのに必要

50

な量である。免疫原性組成物に関して、いくつかの実施形態では、有効量は、上記の要因に加えて、意図される使用、特定の抗原化合物の免疫原性の程度、および対象の免疫系の健康／応答性に依存する。当業者は、これらおよび他の要因に応じて適切な量を決定することができる。in vitroでの適用の場合、いくつかの実施形態では、有効量は、問題になっている適用の大きさおよび性質に依存する。それはまた、in vitroでの標的的性質および感受性、ならびに使用方法に依存する。当業者は、これらおよび他の考慮に基づいて有効量を決定することができる。有効量は、実施形態に応じて、組成物の1回または複数回の投与を含んでもよい。

#### 【0047】

本明細書に使用される場合、「治療すること」または「治療」という用語は、疾患、障害または状態が、疾患、障害および／もしくは状態にかかりやすいか、またはそれらを有する対象において発生することを阻止すること；疾患、障害または状態を阻害すること、例えば、その進行を妨げること；ならびに疾患、障害または状態を軽減または好転させること、例えば、疾患、障害および／または状態の退縮を引き起こすことを含む。疾患または状態を治療することはまた、特定の疾患または状態の少なくとも1つの症状を改善することを含んでもよい。「難聴」という用語は、音を感知する能力の機能障害を指し、したがって、その治療は、音を感知する能力に対する上記に列挙した効果のいずれか1つを意味する。「感音難聴」という用語は、内耳または内耳から脳への神経経路に損傷がある特定の種類の難聴を指す。

#### 【0048】

##### 2. 本開示を実施する方法

本開示の態様は、1つまたは複数の薬剤または組成物を耳の特定の組織または領域に適用することによって、難聴、任意選択で感音難聴を治療する方法、および／または有毛細胞を置換、再生、もしくは保護する方法に関する。

#### 【0049】

本明細書に開示される方法に基づいて治療され得る耳の領域は、図1に名称を記している、その外耳、中耳、または内耳領域を含むが、これらに限定されない。

#### 【0050】

##### 組成物

本開示の態様は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物または薬剤と、第2の薬剤とに関する。

#### 【0051】

いくつかの実施形態では、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物または薬剤は、siRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）などの干渉核酸、および／または1つもしくは複数の修飾核酸残基を含む核酸である。いくつかの実施形態では、干渉核酸は、目的の組織への送達の前および／または送達の際に分解を最小化するように、（配列に基づいて）最適化されるか、または化学的に修飾される。これらの干渉核酸についての商業的に入手可能な供給源には、Thermo-Fisher Scientific/Ambion、Origene、Qiagen、Dharmacon、およびSanta Cruz Biotechnologyが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、このような最適化および／または修飾は、干渉核酸の十分なペイロードが目的の組織に送達されることを確実にするために行われ得る。他の実施形態は、発現を制限するために遺伝子のDNAに結合することによって遺伝子の発現を減少させるように設計された低分子、アブタマー、もしくはオリゴヌクレオチド、例えばアンチジーンオリゴヌクレオチドの使用、あるいは限定されないが、前記遺伝子の発現が低減されるように標的化転写産物もしくは遺伝子産物または1つもしくは複数の他のタンパク質に直接的に結合することを含む機構を介して転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）を課すように設計された低分子、アブタマー、もしくはオリゴヌクレオチドの使用、あるいは特定の遺伝子の発現を低減させる他の低分子デコイの使用を含む。いくつかの実施形態では、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物ま

10

20

30

40

50

たは薬剤は、遺伝子が調節される経路の阻害剤、例えば、ガンマセクレターゼ阻害剤などのNotchシグナル伝達経路阻害剤を含んでもよい(例えば、Hes1の転写がNotchシグナル伝達によって媒介されるからである)。

#### 【0052】

いくつかの実施形態では、遺伝子は、Hes1、Hes5、またはMAPK1である。非限定的な例示的なこれらの遺伝子の配列およびそれらに対するsiRNA配列は、例えば、米国特許第9,101,647号に提供されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。さらなる非限定的な例示的なsiRNA配列は、配列番号1～24(これらの配列における小文字は任意選択であり、配列番号1～14はHes1を対象とし、配列番号15～20はHes5を対象とし、配列番号21～24はMAPK1を対象とする)として本明細書以下に提供される。さらなる配列は、当技術分野において公知の方法、例えば、Fakhrla、(2016年)Cancer Gene Ther. 23(4):73～82頁に従って決定することができる。

#### 【0053】

##### 【表1】

マウスHes1 mRNAについてのRNAi標的配列(受託番号NM\_008235.2;ORF:235～1083)

	位置(nt#)	パッセンジャー鎖	ガイド鎖
分子1*	239～257 (ORF内) (アミノ酸2～8)	5'CAGCUGAUAAUAAUGGAGAAtt 3'	3'ttGUCGACUAUUACCUCUU 5'
分子2	371～389 (ORF内) (アミノ酸46～52)	5'GAAGGGCAAGAAUAAAUGAAtt 3'	3'ttCUUCCCGUUCUUUUACU 5'
分子3*	1363～1381 (3' UTR)	5'GAUGCCAAAGAUGUUJUGAAtt 3'	3'ttCUACGGUUUCUACAAACUU 5'

\*分子1および3は、マウス/ヒト転写産物における保存された標的配列に相補的であるガイド配列を有する;分子1についてのmRNA標的配列は、マウス、ラット、ヒト、およびモルモットHes1転写産物において保存されている。アミノ酸位置は、ガイド鎖が結合しているmRNA遺伝子座内に部分的または完全に組み込まれているコドンに対応する。

ヒトHes1 mRNAについてのRNAi標的配列(受託番号NM\_005524.3、ORF:240～1082)

	位置(nt#)	パッセンジャー鎖	ガイド鎖
分子4	302～320 (ORF内) (アミノ酸21～27)	5'CAACACGACACCGGAUAAAtt 3'	3'ttGUUGUGCUGUGGCCUAUUU 5'
分子5*	1299～1317 (3' UTR)	5'GGAUUGCGCCUUUGUAUUAtt 3'	3'ttCCUAACGC GGAAACAUAAU 5'
分子6	1323～1341 (3' UTR)	5'GCUCAGAUGACAUUUCGUUAtt 3'	3'ttCGAGUCUACUGUAAAGCAA 5'
分子7*	673～691 (ORF内) (アミノ酸145～151)	5'ACUGCAUGACCCAGAUCAA 3'	3'UGACGUACUGGGUCUAGUU 5'

\*分子5および7は、マウス/ヒト転写産物における保存された標的配列に相補的であるガイド配列を有する;分子5および7についてのmRNA標的配列は、マウス、ラット、ヒト、およびモルモットHES1転写産物において保存されている。アミノ酸位置は、ガイド鎖が結合しているmRNA遺伝子座内に部分的または完全に組み込まれているコドンに対応する。

#### 【0054】

10

20

30

40

50

## 【表 2】

マウスHes5 mRNAについてのRNAi標的配列(受託番号NM\_010419.4、ORF:74~577)

	位置(nt#)	パッセンジャー鎖	ガイド鎖
分子 8	165~183 (ORF内) (アミノ酸31~37)	5'GCAUCAACAGCAGCAUAGAtt 3'	3'ttCGUAGUUGUCGUCGUUAUCU 5'
分子 9	726~744 (3' UTR)	5'GGUCAUUCUUAGAGAAUGUtt 3'	3'ttCCAGUAAGAAUCUCUUACA 5'
分子 10	1141~1159 (3' UTR)	5'CGAUGAUCCUUAAGGAUtt 3'	3'ttGCUACUAGGAAUUUCCUAA 5'

アミノ酸位置は、ガイド鎖が結合しているmRNA遺伝子座内に部分的または完全に組み込まれているコドンに対応する。

10

マウスMAPK1 mRNAについてのRNAi標的配列(受託番号NM\_011949.3、ORF:246~1322)

	位置(nt#)	パッセンジャー鎖	ガイド鎖
分子 11*	1082~1100 (ORF内) (アミノ酸279~285)	5'UGCUGACUCCAAGCUCUGtt 3'	3'ttACGACUGAGGUUUCGAGAC 5'
分子 12	962~980 (ORF内) (アミノ酸239~245)	5'GGGUAUUCUUGGAUCUCCAtt 3'	3'GACCCAUAAGAACCUAGAGGU 5'

20

\*分子11は、マウス/ヒト転写産物における保存された標的配列に相補的であるガイド配列を有する;分子11についてのmRNA標的配列は、マウス、ヒト、およびモルモットMAPK1転写産物において保存されている。アミノ酸位置は、ガイド鎖が結合しているmRNA遺伝子座内に部分的または完全に組み込まれているコドンに対応する。

## 【0055】

いくつかの実施形態では、第2の薬剤はプライミング組成物である。いくつかの実施形態では、プライミング組成物は、カテーテンを安定化させること、内耳における多能性細胞の数を増加させること、内耳における既存の多能性細胞の可塑性を増加させること、または内耳の細胞における分化のためのシグナルを送ることからなる群から選択される1つまたは複数の機能を示す。いくつかの実施形態では、この第2の薬剤はGSK-3阻害剤である。さらなる実施形態では、GSK-3阻害剤は、6-ブロモインジルビン-3'-オキシム(BIMO)またはチデグルシブ(TIDE)のいずれかである。いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、限定されないが、GSK-3阻害剤および/または発生シグナル伝達に関する1つもしくは複数の因子(例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF2)および/またはFGF模倣物)などの1つまたは複数の成分を含んでもよく、このファミリーの非限定的な例は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、KatohおよびKatoh(2006年)Cancer Biol. Therapy 5(9):1059~1064頁に提供されている。

30

## 【0056】

## 製剤

いくつかの実施形態では、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる組成物は、製剤および/または粒子を含んでもよく、その製剤および/または粒子は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤を含んでもよい。

## 【0057】

このような製剤および/または粒子の非限定的な例には、ナノ粒子、リポフェクション、ゲルまたはヒドロゲル(例えば、Kechaisら、(2016年)J Control

40

50

Release. 226 : 248 ~ 57 頁)、ナノエマルション(例えば、米国特許出願公開第2005/0288292号)、微粒子(例えば、Yangら、(2012年)Electrophoresis. 33(21) : 3173 ~ 80 頁)、コロイド懸濁液(例えば、Arianaら、(2016年)Otolaryngol Head Neck Surg. 154(5) : 917 ~ 9 頁)、滅菌懸濁液(例えば、http://www.ciprodex.com/におけるCiprodex)、溶液(例えば、Parralá、(2002年)Antimicrob Agents Chemother. 46(3) : 859 ~ 62 頁)、エアロゾル(例えば、Liら、(2013年)IEEE Trans. Biomed. Eng. 60(9) : 2450 ~ 2460 頁)、粉剤(例えば、http://fauquierent.blogspot.com/2009/10/treatment-of-chronic-draining-ear.html#ixzz459wcRKOr)、点耳剤(例えば、Wintersteinら、(2013年)Otolaryngol Head Neck Surg. 148(2) : 277 ~ 83 頁)、ナノファイバー(例えば、Akiziyamaら、(2013年)Int J Nanomedicine. 8 : 2629 ~ 2640 頁)、またはクリーム(例えば、Quadiderm(登録商標)クリーム)が含まれる。本明細書上記に引用した全ての参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。

#### 【0058】

いくつかの実施形態では、製剤および/または粒子は、特に内耳への送達のために適合される。例えば、熱可逆性ヒドロゲル(例えば、フルロニックF-127)などのゲル製剤は、薬物が内耳に拡散または輸送され得るように、薬物が中耳に維持され、正円窓膜と接触することを可能にする。同様にコロイド懸濁液は、特に、内耳に直接的に注射するために製剤化されてもよいか、または正円窓膜を通る拡散もしくは他の輸送手段のために鼓膜を横切ってもよい。同様に、複数のナノ粒子を含むナノ粒子または製剤は、例えば、磁力による、制御された送達のために製剤化されてもよい。このような方法は、微粒子および/または別のナノスケール構造に一般化することができる。

#### 【0059】

いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤と同一または異なる製剤および/または粒子に含まれてもよい。いくつかの実施形態では、第2の薬剤は、同じもしくは異なる製剤であり、および/または標的組織へのその適用のタイミングを容易にするためであり、つまり、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤である粒子に対して同時または逐次的である。例えば、同時送達ではあるが、逐次放出の場合、第2の薬剤は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤を含む持続放出製剤および/または粒子と共に投与される溶液に含まれてもよい。同様の効果は、異なる薬剤についての異なる放出プロファイルのために製剤化された両方の薬剤を含む単一の製剤および/または粒子の使用によって達成され得る。

#### 【0060】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤を含むか、または封入する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は生分解性ポリマーを含む。さらなる実施形態では、生分解性ポリマーは、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)(PLGA)またはペグ化PLGA(PEG-PLGA)である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、限定されないが、ポリビニルアルコール(PVA)または他の公知のナノ粒子安定剤を含む、さらなる添加剤を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、磁気応答性であるか、または磁気応答性粒子を含む。いくつかの実施形態では、磁気応答性粒子は、酸化鉄、任意選択で超常磁性(supernatural magnetic)酸化鉄(SPION)である。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、溶液、懸濁液、ゲル、またはその送達に適した他の製剤にさらに含まれてもよい。

#### 【0061】

さらなる実施形態では、同じまたは異なるナノ粒子は、第2の薬剤を含んでもよいか、または封入してもよい。本明細書上記に開示されるナノ粒子は、油中水型エマルションま

たは当技術分野において公知の任意の他の技術によって形成することができる。したがって、限定されないが、デュアルコア／シェル担持（例えば、Narayananら、（2014年）Acta Biomaterialia. 2112～2124頁）、共封入（例えば、Songら、（2008年）Eur J Pharm Biopharm. 69(2) : 445～53頁）、および層ごとの堆積（例えば、Dengら、（2013年）ACS Nano. 7(11) : 9571～9584頁）などの、1種より多い薬剤を含むナノ粒子を生成するための様々な選択肢が利用可能である。本明細書上記に引用した全ての参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。

#### 【0062】

ナノ粒子は、放出のタイミングを容易にするように製剤化されてもよく、例えば、難水溶性の第2の薬剤（例えば、TIDE）が、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる親水性薬剤（例えば、siHes1）を担持したナノ粒子の有機シェルに封入されてもよい。第2の薬剤は、水により接近しやすいので、最初に放出され、続いて内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤が持続放出される。

#### 【0063】

##### 投与様式

上記に開示された薬剤、組成物、製剤および／または粒子は、内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤の前または後に投与される第2の薬剤と同時にまたは逐次的に投与されてもよい。

#### 【0064】

投与量は、当技術分野において公知の方法によって容易に決定することができる。例えば、有効なin vitro用量、例えば、約0.5から10 μMの間の第2の薬剤（例えば、TIDE）および約20から320 nMの間の内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤（例えば、siHes1）は、適切なin vivo用量にスケールアップされてもよい。内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤の非限定的な例示的なin vivo用量は、約100から300 nMの間のsiHes1である。いくつかの実施形態では、適切なin vivo用量は、約5 nMから5 mMの第2の薬剤（例えば、TIDE）および約1 nMから5 mMの間の内耳の組織における遺伝子の発現を減少させる薬剤（例えば、siHes1）の量であってもよい。適切な投与レジメン（regimen）は、各薬剤について適切な間隔で1つまたは複数の用量を必要とし得ることが意図され、これらの間隔は薬剤または適応症によって変化させてもよい。適切な投与間隔は、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、1カ月、2カ月、3カ月またはそれ以上であってもよい。

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、適用および／または投与は、例えば、指定された薬剤または組成物の直接適用、注射、または注入であってもよい。いくつかの実施形態では、指定された薬剤または組成物は、正円窓膜（RWM）を通した直接注射によって、またはRWMを通して配置された一時的もしくは永久的なカニューレを介した注入によって投与されてもよい。いくつかの実施形態では、注入または注射は、取り付けられた微量注入ポンプ、透析装置、または流体交換システムによって補助されてもよい。同様の実施形態では、注射または注入技術はまた、卵円窓、および／または卵円窓の韌帯もしくは輪に適用されてもよい。注射または注入はさらに、蝸牛開窓術または半規管の1つなどの骨迷路内への他の開口部を介して達成されてもよい。あるいは、皮質骨は迷路上で除去されてもよく、指定された薬剤または組成物は、骨内送達のために皮質除去された骨上に適用されてもよい。いくつかの実施形態では、組成物または薬剤は、静脈内または動脈内投与によって全身に送達される。

#### 【0066】

上記に列挙した投与経路は決して網羅的ではない。一般に、内耳への送達には様々な手段があるが、これらは、2つの一般的なカテゴリー、つまり、内耳への造瘻術（必要な場合、ドリル、ナイフ、またはレーザーで開口される）を介するものと、およびRWM、ア

10

20

30

40

50

アブミ骨底板の靭帯を通る、または蝸牛の領域もしくは前庭構造を通る拡散を介するもの（典型的には、骨の領域は、内耳骨内膜裏層および流体から中耳空間を分離する非常に薄い骨だけが残るような厚さまで薄くされる）とに分類される。

#### 【0067】

いくつかの実施形態では、造瘻術が使用される場合、造瘻術は機械または手動で行われる。いくつかの実施形態では、造瘻術は、アブミ骨底板を介し、蝸牛へのドリルで開けられた開口部を介し、半規管へのドリルで開けられた開口部を介し、前庭水管を介し、蝸牛開窓術を介し、RWMへの直接的な開口部を介する。いくつかの実施形態では、造瘻術は、埋め込み電極を差し込むように行われ、したがって開示される製剤および／または粒子の1つまたは複数は、1つまたは複数の薬剤または組成物を環境に溶出するように電極表面に結合され得る。いくつかの実施形態では、造瘻術を受ける1つまたは複数の開口部は、約1日から約1週間、2週間、3週間、4週間、または1ヶ月の間、例えば約1から30日の間、アクセス可能である。いくつかの実施形態では、造瘻術は、開口部がアクセス可能である期間にわたる単回注射または連続注入に適している。

10

#### 【0068】

いくつかの実施形態では、拡散が利用される場合、薬剤、組成物、製剤および／または粒子は、内耳液への特定の膜構造を横切る拡散を可能にする。非限定的な例示的な製剤には、溶液、ゲル、エマルション、または懸濁液が含まれる。例えば、ゲルまたはペレットは、本明細書上記に開示される1つまたは複数の薬剤、組成物、および／または粒子の送達に適し得る。例えば、ゲルは、送達のための表面積を増加させることによって送達を向上させるためにアブミ骨上およびRWM上および薄くなった骨の領域上に経鼓膜的に（trans tympanic ally）配置されてもよい。同様に、固体または半固体のペレットが、前記膜との薬物接触を向上させ、薬物が中耳腔から除去されないようにする手段として、アブミ骨底板、RWMまたは薄くなった骨の領域に配置されてもよい。

20

#### 【0069】

理論に束縛されるものではないが、内耳液に薬物を送達するための低侵襲性の拡散アプローチの課題の1つは、RWMの表面積が小さいこと、およびアブミ骨底板の靭帯の表面積がさらに小さいことであり得る。いくつかの実施形態では、「ブルーライニング（blue-lining）」として当技術分野において公知の手順がこの問題を解決することができる。「ブルーライニング」により、穿孔領域は極めて薄くなり、内耳の内面上の骨内膜をぎりぎり覆う。これは、吸収のための表面積を大幅に増加させることができ、蝸牛または内耳の他の領域に実際の開口部を作製するよりも侵襲性が低くなり得る。熟練した耳の外科医は、この手順を安全に実施することができるはずである。

30

#### 【0070】

いくつかの実施形態では、送達は、鼓膜を横切る単回または複数回の注射で達成され得る。いくつかの実施形態では、送達は、鼓膜に挿入されたプラスチックチューブを介した単回または複数回の注射によって達成され得る。いくつかの実施形態では、送達は、カテーテルを介した連続注入によって達成され得、その先端は拡散が起こる領域に直接配置される。

40

#### 【0071】

##### キット

本明細書に記載されるin vitroおよびin vivo法を実施するのに必要な薬剤および指示書を含むキットも特許請求される。したがって、本開示は、本明細書に開示される1つまたは複数の薬剤、組成物、製剤および／または粒子を含み得る、これらの方針を実施するためのキット、ならびに、組織を採取することおよび／またはスクリーニングを実施すること、および／または結果を分析すること、および／または本明細書に定義される有効量の干渉剤の投与などの、本明細書に開示される方法を実施するための指示書を提供する。これらは、単独で、または他の適切な治療剤と組み合わせて使用することができる。

#### 【0072】

50

## 適応症

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製剤、組成物、方法、投与様式、およびキットは、1つまたは複数の適応症の治療において使用され得る。本明細書に意図される非限定的な例示的な適応症には、大きな音、音響外傷、発破、毒素、ウイルスまたは細菌感染、加齢、感覚有毛細胞の喪失を伴う遺伝的難聴、および糖尿病または甲状腺機能低下症などの代謝状態に起因する蝸牛感覚有毛細胞の喪失をもたらす感音難聴が含まれる。さらなる非限定的な例示的な適応症には、毒素、外傷、ウイルスまたは細菌感染、加齢、遺伝的に誘導される平衡感覚有毛細胞の喪失または糖尿病もしくは甲状腺機能低下症などの代謝状態に起因する末梢前庭器官（稜または黄斑）における感覚有毛細胞の喪失または損傷に起因する平衡障害が含まれる。

10

## 【0073】

### 3. 実施例

以下の実施例は非限定的であり、本開示を実施する際の様々な場合において使用され得る手順を例示する。さらに、本明細書の以下に開示される全ての参考文献は、それらの全体が参照として組み込まれる。

## 【実施例1】

## 【0074】

### s i H e s 1 ナノ粒子の生成およびその評価

#### 担持ナノ粒子の生成

この研究のために調製される s i R N A 担持 P L G A ナノ粒子は、以前に報告されているように水中油中水型 (w 1 / o / w 2) 二重重マルション溶媒蒸発法によって製剤化した (Cunl a、(2010年) I n t l . J . P h a r m a c e u t i c s 3 9 0 : 7 0 ~ 7 5 頁; Du l a、(2013年) H e a r . R e s . 3 0 4 C : 9 1 ~ 1 1 0 頁)。簡潔に述べると、s i R N A を 5 0 μ L の T E 緩衝液 (M i l l i Q 水中の 1 0 m M T r i s - H C l および 1 m M E D T A、p H 7 . 5) に溶解し、1 0 0 m g の P L G A を含有する 1 0 0 m L のジクロロメタン (D C M) と混合し、混合物を超音波処理により一次 w 1 / o エマルションに乳化した。M i l l i Q 水中の 5 % (w / v) ポリビニルアルコール (P V A) 4 ミリリットルを一次エマルションに直接注ぎ、その後、3 0 秒 × 3 の超音波処理によってさらに乳化して、w 1 / o / w 2 二重重マルションを形成した。得られたエマルションを M i l l i Q 水中の 0 . 3 % (w / v) P V A 5 0 m L で希釈し、室温にて 2 時間磁気により攪拌して D C M を蒸発させた。P L G A ナノ粒子を、4 にて 2 0 分間、1 3 , 0 0 0 × g での超遠心分離によって回収し、M i l l i Q 水で 3 回洗浄し、5 m L の M i l l i Q 水に再懸濁し、凍結乾燥した (- 1 0 0 および 4 0 m T o r r 以下)。s i R N A 担持 N P の最適な製剤を、1 5 n m o l の s i R N A、1 0 0 m g の P L G A、および 5 % の P V A から作製した。得られた N P を、動的光散乱 (Z e t a s i z e r N a n o Z S、M a l v e r n、I n s t r u m e n t s L t d、W o r c e s t e r s h i r e、U K)、U V - V i s 分光光度計 (n a n o D r o p 2 0 0 0、T h e r m o S c i e n t i f i c、W a l t h a m、M A)、および走査型電子顕微鏡 (Z e i s s S u p r a 5 5、V P、F E - S E M、O b e r k o c h e n、ドイツ) をそれぞれ使用して、平均粒径 (P M D)、多分散指数 (P D I)、薬物封入効率パーセント (E E %)、および形態について特性付けした。合成した N P は、通常、使用時まで - 8 0 にて保存する。

20

## 【0075】

### i n v i t r o でのナノ粒子研究

新生児 (P 3) マウスのコルチ器 (O C) を、オトトキシン、4 - ヒドロキシル - 2 - ノネナール (4 - H N E、4 5 0 μ M) に 2 4 時間曝露し、次いで未処理のままにするか、または非ターゲティングスクランブル R N A N P (s c R N A N P) もしくは H e s 1 s i R N A 担持 P L G A N P (H e s 1 s i R N A N P) のいずれかで処理し、7 日後、組織を固定し、フルオロフォアがコンジュゲートしたファロイジンにより標識した (図 2)。あるいは、耳毒性アミノグリコシド、ネオマイシン (N E O、0 . 7 5 m M) を使

30

40

50

用し、その後、Hes1 siRNA 搀持 PLGA NP の治療適用、組織固定、ならびに有毛細胞マーカーであるミオシンVIIa (Myo7a) に対する抗体および蝸牛螺旋の長さに沿ったHCの免疫蛍光により媒介される定量を容易にするためにフルオロフォアがコンジュゲートしたファロイジンの両方により標識した親和性を用いて、上記と同じように実験を行った（図4）。用量依存反応を、Hes1 siRNA NP 处理に反応するオトトキシン（4-HNEまたはNEO）のいずれかに曝露した新生児マウスOCの回復したHCの数において観察した（図3および5）。

#### 【0076】

##### in vivoでのナノ粒子研究

成体色素沈着モルモット（250g、4週齢）を、130dB SPLにて2時間、4kHzを中心とする音響過剰曝露に曝露した。損傷の72時間後（すなわち、遅延処置）、800μg/mLの非ターゲティングスクランブルRNA NPまたはsiHES1 NPのいずれかを充填したミニ浸透圧ポンプを、蝸牛の基底回転に外科的に移植し（蝸牛開窓術）、擬または治療的処置を、7日間にわたって蝸牛に片側注入し、その後、ポンプを外科的に除去した。2、4、8、および16kHzでの聴性脳幹反応（ABR）測定を、音響損傷の前、ならびに損傷後24時間、2週間、4週間、8週間、および10週間で行った。最後の10週のABR記録期間の後、動物を安樂死させ、蝸牛組織を固定し、顕微解剖し、HCの可視化および定量のためのマーカーにより免疫標識した。siHES1 NPにより処置し、騒音に曝露したモルモット由来の蝸牛は、非ターゲティングscRNA NPにより処置した騒音に曝露したモルモット由来の蝸牛と比較して、内側および外側のHC数の両方の顕著な回復を示した（図9～10）。

#### 【0077】

成熟C57BL/6マウス（4週齢）を音響過剰曝露（8～16kHzオクターブバンドノイズ、116dB SPL）に2時間曝露した。損傷の72時間後、800μg/mLのsiHES1 NPを充填したミニ浸透圧ポンプを後半規管に外科的に移植し、治療的処置を7日間にわたって片側注入し、その後、ポンプを外科的に除去した。処置の8週間後、動物を安樂死させ、蝸牛組織を固定し、顕微解剖し、HCの可視化および定量のための抗Myo7aにより免疫標識した。siHES1 NPにより処置し、騒音に曝露したマウス由来の蝸牛は、騒音に曝露した対照由来の蝸牛と比較して、内側および外側のHC数（構造的に正確な位置における）の両方の顕著な回復を示した（図11）。

#### 【0078】

##### in vitroでの薬物放出研究

Hes1 siRNA 搀持 PLGA NPからのin vitroでの薬物放出研究を、Wangemann P、Schacht J、Dallolos P、Popper AN、Fay RR (Eds.)、The Cochlea、Springer、New York、1996年、130～185頁から適合した透析法を使用して3連で実施した。具体的には、Hes1 siRNAまたは封入した（遊離）Hes1 siRNAを含有する1mgの粉末PLGA NPを、タンパク質を含まない1mLの模倣外リンパ培地（SPM）を含有する内側透析バッグ（Spectra/Por Float-A-Lyzer G2、MWCO 20kDa、Spectrum Laboratories Inc.、Rancho Dominguez、CA）に懸濁した。コロイド懸濁液を含有するバッグを3mlの模倣内リンパ培地（SEM）に入れた。この系を37℃にて水平水浴（VWR Scientific Water Bath Model 1211、Sheldon Manufacturing Inc.、Cornelius、OR）に入れた。SEMの3つの10μLアリコートを特定の時間間隔で取り出し、30μLの新鮮なSEMと置き換えて、シンク条件を維持した。平均薬物放出パーセント（%±標準偏差）を、各時点の間隔（1～10日）にて計算した。

#### 【0079】

10

20

30

40

50

【表 3】

	siRNAの 担持効率 (pmol/mg NP)	接種 (pmol of siRNA)
遊離 siHES1	-	150
siHES1-NPs #1	35	35
siHES1-NPs #2	150	150

10

## 【0080】

P G L A ナノ粒子からの s i R N A の放出動態は、当技術分野において公知の以下の式を使用して決定することができる：

ゼロ次：

$$Q_t = Q_0 + K_0 t$$

(薬物放出速度は、溶解した物質のその濃度とは無関係である。)

1次：

$$\log Q_t = \log Q_0 + K t / 2.303$$

(薬物放出速度は、その濃度に依存する)

20

ヒクソン - クロウェル：

## 【0081】

## 【数1】

$$\sqrt[3]{Q_0} - \sqrt[3]{Q_t} = K_{HC} \times t$$

## 【0082】

(薬物は溶解によって放出される)

ヒグチ：

30

$$Q_t = K_H t^{1/2}$$

(薬物は拡散によって放出される)

K o r s m e y e r - P e p p a s :

$$F = (M_t / M) = K_m t^n$$

(n = 0.50 は、フィックの拡散を示し、

0.5 < n < 0.89 は、異常拡散または非フィックの拡散を示す：拡散および浸食の両方の制御された放出速度の組合せ。

n = 0.89 の場合、事例 - 2 の緩和または優れた事例の輸送 - 2 を示す：ポリマー鎖の浸食。)

## 【0083】

40

50

【表4】

	ゼロ次		1次		ヒクソン-クロウェル		ヒグチ		Korsmeyer-Peppas	
	$k_0$	$R^2$	K	$R^2$	$K_{HC}$	$R^2$	$K_H$	$R^2$	n	$R^2$
遊離 siRNA	0.077	0.97	-0.062	0.40	0.015	0.91	5.068	0.99	0.50	0.99
遊離HES1 siRNAは、その溶解した濃度に依存せず、拡散によって放出される										
NP1	0.103	0.92	-0.005	0.97	0.006	0.95	3.436	0.89	0.94	0.96
NPにおけるHES1 siRNAは、溶解およびポリマー浸食によって放出され、放出は濃度依存性である										
NP2	0.089	0.94	-0.007	0.99	0.008	0.99	3.903	0.91	0.97	0.94
NPにおけるHES1 siRNAは、溶解およびポリマー浸食によって放出され、放出は濃度依存性である										

## 【0084】

遊離 Hes1 siRNA の放出プロファイルはゼロ次モデル ( $R^2 = 0.97$ ) と十分に適合する (図12)。これは、薬物放出速度が外部模倣内リンパ培地 (SEM) 中の可溶性 siRNA の量に依存しないことを示した。したがって、模倣外リンパ培地 (SPM) 中の可溶性 siRNA の濃度に関わらず、遊離 Hes1 siRNA は半透膜を通して常に拡散した (放出速度パーセント 6.6% / 日)。最も早いサンプリング間隔での半透膜を横切る外部 SEMへの Hes1 siRNA の有意な初期移動 (20%、1日) は遊離溶質の受動拡散と矛盾しない。

## 【0085】

遊離 Hes1 siRNA と対照的に、PLGA NP 内に封入した Hes1 siRNA の放出プロファイルは、1次 ( $R^2 = 0.97$ )、ヒクソン-クロウェル ( $R^2 = 0.95$ ) および Korsmeyer-Peppas ( $R^2 = 0.96$ , n = 0.94) の式との持続放出プロファイル適合を示した (図面を参照のこと)。この拡散パターンは、放出が、NP のポリマーシェル (PLGA) の遅延した加水分解による Hes1 siRNA の溶解は PLGA のポリマー鎖の浸食を伴った。

## 【0086】

NP 懸濁液 1 (NP1) および NP 懸濁液 2 (NP2) からの siRNA の放出プロファイルのペアワイズ比較は、放出速度が NP 中の siRNA 担持量の増加と共に増加したことを示した (放出速度パーセント : それぞれ、5.9 対 6.3% / 日)。これは、薬物放出速度が外部 SEM 中の可溶性 siRNA の量に依存することを示した。両方の NP 製剤についての Hes1 siRNA の低い初期バースト放出 (約 5%、1日) は、NP の表面に吸着された siRNA の存在に起因すると解釈される。

## 【0087】

遊離 siRNA について、この薬物放出モデル系において初期担持量の 50% を放出するのに 4.2 日を必要とした。NP1 について、初期担持量の 50% を放出するのに 7.8 日を必要とした。NP2 について、初期担持量の 50% を放出するのに 6.2 日を必要とした。

## 【実施例2】

## 【0088】

BIO および Hes1 siRNA

非損傷OC

マウス蝸牛由来の器官型培養物を培養し、次いで CD1マウスから出生後 3 日目 (P3) に採取した。次いで、これらの外植片を適切な培地内で 24 時間培養した。P4 相当時に (すなわち、ex vivo で 24 時間)、培養したコルチ器 (OC、すなわち、蝸牛感覚上皮) を、DMSO (ビヒクリ) または GSK3 阻害剤、6-ブロモインジルビン -

3' - オキシム (BIO) のいずれかを含有する新鮮な培養培地に浸し、それに応じてOCを72時間培養した。P7相当時に（すなわち、ex vivoで96時間）、両方の処理群からの培養物のサブセットを、20nMのHes1 siRNAを24時間トランسفェクトする(jetSI 10mM、PolyPlus Transfection、Ilkirch、フランス）。逐次適用の効果を調べるために、siHes1を、BIOを含まない培地中でトランسفェクトした。同時適用の効果を調べるために、siHes1を、BIOを含有する培地中でトランسفェクトした。24時間のトランسفェクションインキュベーション時間の後、2つの薬剤の逐次処理の試験のために指定した培養物を、BIOを含まない培地中で培養し、一方、同時適用のために指定した培養物を、BIOの存在下でさらに48時間培養した。全ての培養物を、最後の24時間、いずれの試験薬剤も含まない培地中に維持し、その後、組織を4%パラホルムアルデヒド溶液中に固定し、有毛細胞マーカーに対する抗体、ミオシンVIIa (Myo7a)、および蝸牛螺旋の長さに沿ったHCのその後の免疫蛍光により媒介される定量のための適切な二次抗体による免疫標識に供した（図13）。

#### 【0089】

##### NEO損傷卵形囊

マウスの卵形囊斑（平衡器官感覚上皮）由来の器官型培養物を培養し、次いでCD1マウスから出生後3日目（P3）に採取した。次いでこれらの外植片を適切な培地中で24時間培養した。P4相当時に（すなわち、ex vivoで24時間）、培養した卵形囊を、耳毒性アミノグリコシドネオマイシン（NEO）を含有する新鮮な培養培地に24時間浸してHC喪失を誘導し、次いでDMSO（ビヒクリ）またはGSK3阻害剤、6-ブロモインジルビン-3'-オキシム（BIO、2.5μM）のいずれかをP5に投与した。それに応じて卵形囊を72時間培養した。P8相当時に（すなわち、ex vivoで120時間）、培養物を、治療剤を含まない新鮮な培地と置き換え、両方の処理群からの培養物のサブセットを、20nMのHes1 siRNAをトランسفェクトし（jetSI 10mM、PolyPlus Transfection、Ilkirch、フランス）、または5μMのNotch経路阻害剤、LY411575の存在下でインキュベートし、さらに72時間培養した。次いで全ての培養物を、最後の24時間、いずれの試験薬剤も含まない培地中に維持し、その後、組織を4%パラホルムアルデヒド溶液中に固定し、有毛細胞マーカーに対する抗体、ミオシンVIIa (Myo7a)、および蝸牛螺旋の長さに沿ったHCのその後の免疫蛍光により媒介される定量のための適切な二次抗体による免疫標識に供した（図14～17）。

#### 【0090】

全ての事例において、BIO/siHes1は、いずれかの薬剤単独よりも多くの数のde novo HCを生成し、逐次処理は同時処理よりも頑強な反応を誘導する。これらの結果は、特に、OCの中-基底回転および卵形囊（utricle）の平衡斑状外領域、典型的には出生後の蝸牛および卵形囊斑における新たなHC産生に対して抵抗性である領域において、逐次適用がより大きな分化転換反応（すなわち、より多くのde novo有毛細胞）を生じることと一致する（図13～18）。

#### 【実施例3】

#### 【0091】

##### TIDEおよびHes1 siRNA

##### チデグルシブの分析

チデグルシブは、Cayman Chemical Companyから入手し、一連の市販のGSK3阻害剤と並行してMadin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞を用いて血清飢餓条件下で用量曲線分析を実施して、この十分に確立された哺乳動物上皮細胞株における有糸分裂抑制条件下で、その相対増殖能を確認した。これらの実験において、MDCK細胞を血清飢餓条件下で24時間培養し、その後、細胞を、GSK3阻害剤および10μMのEdU (5-エチニル-2'-デオキシウリジン)、DNA複製を受けた細胞を永久的に標識するヌクレオシド類似体の存在下で48時間培養した。

10

20

30

40

50

**【 0 0 9 2 】**

このタイプの分析の例を図 19 に示す。試験した G S K 3 阻害剤の各々は、これらの条件下で試験した最低用量にて細胞増殖に対して明白な陽性効果を示し、用量漸増 (10 μMまで) は、観察した E d U 陽性核の数の減少をもたらした。チデグルシブは、これらの条件下で、より高い用量にて細胞増殖に対してそのプラスの効果を持続し、おそらく G S K 3 に対するこの薬理学的阻害剤のより高い特異性 (すなわち、A T P の非競合的阻害剤) を明確に示した。

**【 0 0 9 3 】**

このスクリーニングからの処理群の各々における E d U 陽性核の正規の定量を図 20 に示す。高用量にて G S K 3 阻害が十分に実証されている分子である、10 mM の L i C 1 とのインキュベーションは、非阻害性塩である塩化ナトリウムの同一の用量と比較して、E d U 陽性細胞の数の増加をもたらした。この分析において評価した薬理学的 G S K 3 I の中で、低用量 (0.1 μM) の C H I R - 9 9 0 2 1 (C A S 2 5 2 9 1 7 - 0 6 - 9) は、血清飢餓下で培養した有糸分裂活性細胞において頑強な統計的に有意な増加をもたらした。10 μMへの用量漸増は、低用量で観察した増殖に対するプラスの効果を劇的に減少させ、その結果、E d U 陽性核の数は、未処理の血清飢餓細胞と比較して統計的に有意ではなくなった。他の A T P 競合的 G S K 3 I についても同様の用量依存的な増殖効率減少の傾向が観察され、6 - ブロモインジルビン - 3' - オキシム (B I O, C A S 6 6 7 4 6 3 - 6 2 - 9) および S B - 2 1 6 7 6 3 (C A S 2 8 0 7 4 4 - 0 9 - 4) の漸増用量により、E d U 陽性核 (n u c l i e) の数が減少するような具合になっており、高用量 (10 μM) の B I O が、これらの条件下で M D C K 細胞に対して毒性 (すなわち、定量されていない) であることが証明された。E d U 陽性核の数は、試験した用量の各々にわたって未処理の血清飢餓 M D C K 細胞集団において定量したものよりも統計的に高いままであった。これらの結果は、G S K 3 に対して予測される特異性がより大きいと、増殖のための濃度範囲がより広くなる可能性があることを示唆する。

**【 0 0 9 4 】**

出生後の O C を、E d U およびチデグルシブまたはビヒクルのみのいずれかの存在下で 72 時間連続的に培養して、G S K 3 阻害剤が、O C の感覚上皮領域において有糸分裂反応を誘導することができるかどうかを評価する、標的化パイロット実験を行った。図 21 に示されるように、0.5 および 2.0 マイクロモル濃度のチデグルシブの存在下で培養した O C は、ビヒクルのみの存在下で培養した O C において観察したものよりも、聴覚感覚上皮の解剖学的位置における E d U 陽性核のより高い発生率を示した。追跡分析は、O C におけるこのチデグルシブ誘導性増殖反応が、細胞型特異的マーカーを使用して、支持細胞、有毛細胞、または両方に関与するかどうかを示す。

**【 0 0 9 5 】****非損傷および N E O 損傷 O C**

B I O についての上記のプロトコールを、B I O を 10.0 μM のチデグルシブ (T I D E) の添加に置き換えて使用する。他のプロトコールと並行して、チデグルシブが s i H E S 1 の後に培養培地中に含まれる第 3 の処理群を加える：P 4 または P 5 (有毛細胞喪失を模倣する耳毒性損傷が存在するか否かに応じて) に、対照培地を 10.0 μM の T I D E を含めまたは含めずに添加し；P 7 に、s i H e s 1 を T I D E の存在下または非存在下で添加し；P 9 に、10.0 μM のチデグルシブを培養物のサブセットのための培地に含める。P 11 に、全ての培地を、治療剤を全く含まない新鮮な培地と置き換える。P 12 に、組織を免疫標識化のために固定する。耳毒性アミノグリコシドである N E O への曝露後のこの処理パラダイムの比較分析の例を図 22 に示す。より多くの H C 数を、T I D E および s i H E S 1 の組合せにより処理した培養物中のオトトキシンに曝露した O C の中 - 頂回転において観察し、T I D E および s i H E S 1 の段階的組合せが、これらの条件下で H C 数の最も有意な増加を生じた (図 22 ~ 24)。図 22 のデータについての H C 定量結果を以下の表に示す。

**【 0 0 9 6 】**

10

20

30

40

50

【表 5】

実験群	有毛細胞数±SEM	
	中-頂回転	中回転
正常対照	57.0 ± 2.2	52.9 ± 1.6
NEOのみ	5.1 ± 1.1	2.5 ± 0.8
NEO + TIDE	9.1 ± 1.6	2.8 ± 0.8
NEO + siHES1	13.0 ± 1.7	13.9 ± 1.1
NEO+TIDE、次いでsiHES1	37.5 ± 2.5	24.9 ± 3.4
NEO+TIDEおよびsiHES1	26.0 ± 5.4	13.4 ± 2.5
NEO+siHES1、次いでTIDE	21.6 ± 2.2	13.0 ± 1.7

10

## 【0097】

実験を、上記のTIDEおよびsiHES1の段階的適用を使用して反復したが、その結果は、薬剤間の相乗作用を示す様式でTIDEの事前適用後のHC数を回復させるためのsiHES1の有効性の有意な向上を明確に示す（図23～24）。

20

## 【0098】

この実験パラダイムを再度反復し、FGF-2を、培養物のサブセットについてP5、P7、およびP9にて2ng/mLで培養培地に任意選択で含めた、さらなる処理群を加えた。より多くのHC数を、TIDEおよびsiHES1の段階的組合せにより処理した培養物中のOCの中-頂および基底回転の両方において観察したが、増殖培地へのFGF-2（この濃度ではそれ自体で治療反応を誘発しなかった）の添加は、典型的には、出生後の哺乳動物の蝸牛におけるHC再生に対してより抵抗性である領域である、OCの中-基底回転を通して、TIDE/siHES1処理の治療効果を増強した（図25～26）。

## 【実施例4】

## 【0099】

30

## さらなるナノ粒子実験

実験2および/または3のサブセットを、siHes1担持ナノ粒子・持続放出製剤-および種々の用量のTIDEを使用し、ならびにsiHes1およびTIDEの両方を含むナノ粒子を使用して反復する。

## 【0100】

このプロトコールのいくつかの反復実験において、持続放出siHes1ナノ粒子およびTIDEの同時適用を、TIDEおよびsiHes1リポフェクション複合体の段階的適用を模倣するように設計した様式で行う。模倣は、TIDE(0.5から20μm)の間の漸増用量でのいくつかの反復実験において)を加え、持続放出siHes1ナノ粒子を同時に適用して、実験2および3に記載されるネオマイシンプロトコールを使用して達成される。

40

## 【0101】

さらに、上記に参照した全ての実験を、siHes5およびsiMAPK1を用いて反復する。

## 【0102】

例示的なプロトコールは以下の通りである。

## 【0103】

出願人らは、生体適合性PLGA NPからのsiHes1の、遅延したが、持続した放出が、2つの薬物が同時投与された場合、Hes1に対するGSK3阻害剤およびsiRNAの段階的適用の治療属性を再現するという仮説を立てた。この仮説を試験するため

50

に、十分な実験マージンを有するために漸増用量(0.5、2、および10 μM)のGSK3I、チデグルシブと共にsiHes1NPの最大以下の有効用量(60 nM)を使用して、ネオマイシン(NEO)に曝露したコルチ器(OC)の器官型培養物における再生の用量反応プロファイルを評価した。このパラダイムを使用して、NEOにより除去したOCを、その後、固定および免疫組織学的分析の前に6日間にわたって、siHes1NP単独で、またはチデグルシブと組み合わせて培養した。

#### 【0104】

図37および38に示されるように、siHes1NPにより誘導される有毛細胞(HC)再生の明確な濃度依存性の増強を、OCを漸増用量のチデグルシブと組み合わせて処理した場合に観察した。しかしながら、チデグルシブ単独による処理は統計的に有意な再生反応を誘導しなかった。このことは、チデグルシブは、この状況において、HCを再生するように独立して作用するのではなく、siHes1により媒介される反応を本質的に増強するようにプライミング剤として作用する可能性があることを示唆している。

10

#### 【0105】

これらの処理群の間のHC数の定量により、臨床的に関連するGSK3阻害剤であるチデグルシブが、OCの中回転において10 μMの濃度、ならびに基底回転において2および10 μMの濃度にてsiHes1NP再生効力の統計的に有意な増加(siHes1NPのみと比較して)を促進することが明らかになった。siHes1NPの再生反応が一貫して最も高かった、中・頂領域において、処理群の間で統計的に有意な差を帰属することができなかった。チデグルシブのみによって誘導される再生反応の欠如のために、この組合せ処理ストラテジーによって誘導される増強された治療効果は、HC数の治療的増加に関して相乗的であると記載され得る。

20

#### 【実施例5】

#### 【0106】

##### さらなるナノ粒子実験

siHes1(分子#1)担持ポリ(乳酸-co-グリコール酸)(PLGA)またはポリエチレングリコール-PLGAナノ粒子(PEG-PLGA NP)を、以前に報告されているように、わずかな改変を加えた水中油中水型(w/o/w)二重エマルション溶媒蒸発法によって調製した。McCall et al. (2013年) J Vis Exp. 82: 51015頁; doi:10.3791/51015.

30

#### 【0107】

簡潔に述べると、ある体積のsiHes1水溶液(100 μL)を、PLGA NPについて100 mgのPLGA、またはPEG-PLGA NPについて50 mgのPLGAおよび50 mgのPEG-PLGAを含有する1,000 μLのジクロロメタン(DCM)に滴下した(表1)。

#### 【0108】

混合物を、超音波処理(10秒、25W)(Microsonic ultrasonic cell disruptor XL Misonix Inc.、Farmingdale、NY)により一次w/oエマルションに乳化した。PLGA NPについて、一次エマルションを4 mLの5%PVA水溶液中で希釈した。得られた二次エマルションを、Millipore( Millipore Co.、Billerica、MA)中の50 mLの0.3%(w/v)(PLGA NP)または0.125%PVA(w/v)(PEG-PLGA NP)中で希釈し、室温にて2時間磁気攪拌して(RO10、IKA-Werke GmbH & Co.、Staufen、ドイツ)、DCMを蒸発させた。PEG-PLGA NPを、10にて20分間、13,000 gでの超遠心分離(TOMY MX-201 Highspeed Refrigerated Microcentrifuge)によって回収し、Millipore水により3回洗浄して、余分な溶媒(DCM)および残留PVAを除去し、次いで滅菌ガラス容器中の5 mLのMillipore水に再懸濁し、連続して3日間、40 mTorr(Virtis Benchtop freeze-dryer、Gardiner、NY)下で-100にて凍結乾燥した。

40

50

## 【0109】

得られた粉末NPをUV下で20~30分間滅菌し、さらに使用するまで-80にて保存した。

## 【0110】

## 【表6】

表1.siHes1担持ナノ粒子の製剤パラメーター

	PLGA (mg)	PEG-PLGA (mg)	PVA (%)
siHes1-PLGA NPs	100	0	5
siHes1-PEG-PLGA NPs	50	50	0.125

10

## 【0111】

siHes1担持PEG化PLGA NP(表2)は、標準的なPLGA製剤よりも小さく(すなわち、低い平均粒径[PMD])、標準的なPLGA製剤ほど負に帯電していなかった(すなわち、高いゼータ電位[ZP])。PEG-PLGAナノ粒子製剤に担持されたsiHes1(pm mol/mg)の量は、PLGA製剤と比較したナノ担体のサイズの減少に比例して減少した。

## 【0112】

## 【表7】

20

表2.並行して合成したHes1 siRNA担持PLGAおよびPEG-PLGA NPの代表的な製剤の物理化学的特性の比較。

製剤	PMD (nm)	ZP (mV)	siHes1 搅持 (pmol/mg)
siHes1-PLGA NPs	325.4 ± 8.3	-31.9 ± 3.5	143.9 ± 1.1
siHes1-PEG-PLGA NPs	182.5 ± 19.2	-13.6 ± 3.3	82.02 ± 0.7

## 【0113】

30

それらのサイズおよび物理化学的特性に基づいて、本発明者らは、siRNA担持PEG-PLGA NPが、内耳細胞によって容易に取り込まれるという仮説を立てた。この仮説を評価し、内耳細胞におけるPLGA NPに対するsiRNA担持PEG-PLGA NPの取り込みを比較するために、フルオレセイン(FAM)がコンジュゲートした非ターゲティングsiRNA模倣物(スクランブルRNA、scRNA)二本鎖を、siHes1 NPを合成するために用いたものと同じ合成方法論を使用して、Alexa Fluor 555がコンジュゲートしたPEG-PLGAおよびPLGA NP製剤内に封入した。

合成前に、Alexa Fluor 555(AF555, MW: 1.25 kDa, Thermo Fisher, Rockford, IL)のPLGA(MW: 15 kDa)(Polymers Material Inc., Montreal, カナダ)とのコンジュゲーションを、カルボジイミドカップリング反応(Chanal, (2010年)Methods Biol. 624: 163~75頁)を使用して実施した。等モル量のPLGAおよびAF555を混合し、室温にて一晩攪拌した。未反応の成分を、室温にて3時間、脱イオン水(Direct-Q3 UVシステム、Millipore SAS, Molsheim, フランス)に対する透析(Spectrapor Float-A-Lyzer G2, MWCO 3.5~5 kDa Spectrum Laboratories Inc. Rancho Dominguez, CA)によって除去した。PLGAがコンジュゲートしたAF555を含有する精製した懸濁液を精製水中で回収し、8にて30分間、15,000 rpmで遠心分離した。

40

## 【0114】

50

合成後、得られたF A M - s c R N A 担持A l e x a F l u o r 5 5 5 P L G A またはP E G - P L G A N P (本明細書において、Dual F l u o r N P Sと称する)は、s i H e s 1 担持N Pとサイズ、電荷、および残留P V A 含有量が同等であり、それらが、s i H e s 1 ナノ担体製剤の実行可能な代用物としての役割を果たす能力があることが示された(表3)。

#### 【0115】

##### 【表8】

表3.並行して合成した二重フルオロフォアにより標識した非ターゲティングsiRNA担持PLGAおよびPEG-PLGA NPの代表的な製剤の物理化学的特性の比較

10

製剤	PMD (nm)	ゼータ電位 (mV)
Dual Fluor-PLGA NPs	267.37 ± 14.8	-36.6
Dual Fluor-PEG-PLGA NPs	184.88 ± 7.4	-11.7

#### 【0116】

D u a l F l u o r P L G A および P E G - P L G A N P の細胞取り込みを、33%、5% C O <sub>2</sub> での24時間のインキュベーション後、紫外分光測定 - 分光測定(U V - s p e c)および共焦点顕微鏡の組合せを使用してI M O - 2 b 1マウス内耳細胞において調べた。

20

#### 【0117】

U V - s p e c について、細胞を96ウェルプレートに播種し、完全増殖培地中で70%コンフルエンスに達するまで培養した。24時間後、細胞を、33%、5% C O <sub>2</sub> にて24時間、200、400、800 μ g / m L でインキュベートした。P B S 溶液による3ステップの洗浄後、細胞外蛍光を、1~5分間、0.2%のトリパンブルー50 μ l によりクエンチした(G i b c o、B R L、G r a n d I s l a n d、N Y)(H e d J . M e t h o d s f o r d i s t i n g u i s h i n g i n g e s t e d f r o m a d h e r i n g p a r t i c l e s . M e t h o d s E n z y m o l . 1 9 8 6 年; 1 3 2 : 1 9 8 ~ 2 0 4 頁)。内在化蛍光強度を、F A M s c R N A については485 ± 20 nmの発光波長および525 ± 25 nmの励起にて、ならびにA F 5 5 5 P L G A については555 ± 20 nmの発光波長および572 ± 25 nmの励起にてマイクロプレートリーダー(Beckman Coulter D T X 8 8 0 M u l t i m o d e D e t e c t o r、B r e a、C A)を使用して決定した。培地排出前のインキュベートしたN P 懸濁液の未洗浄蛍光がある陽性対照(P C)ウェルを使用して各参照基準について100%蛍光を確立した。D u a l F l u o r N P 製剤とインキュベートしなかつた細胞の正常対照(N C)ウェルをバックグラウンド対照として使用した。N P 取り込みのマイクロプレートリーダー評価により、400および800 μ g / m L の用量にて、P E G - P L G A N P がP L G A N P と比較して優れた内在化を示すことが実証された(図29、\*\*、p < 0.01)。200 μ g / m L の濃度では、内在化N P の全蛍光強度は2つの製剤の間で同様であった。

30

#### 【0118】

フルオロフォアにより標識したN Pとの24時間のインキュベーション後のI M O - 2 b 1 固定細胞の共焦点顕微鏡により、両方の製剤が用量依存的に細胞内に内在化することが確認された(図30)。s i R N A 担持P L G A N P は、I M O - 2 b 1 細胞内でヘテロ分散(h e t e r o d i s p e r s e)局在化パターンを示したが、対応するP E G - P L G A N P 製剤はP L G A N P よりも一貫した核周囲局在化を示した(図30~33)。この観察は、s i R N A により媒介される遺伝子サイレンシングに最適な細胞内領域におけるP E G - P L G A N P によって送達されるs i R N A 生体分子のより効率的

40

50

な送達および蓄積を示唆する (Chiuら、(2004年) Chem. Biol. 11(8) : 1165~75頁)。

#### 【0119】

*s i H e s 1* 搀持 P E G - P L G A N P 製剤の潜在的な細胞障害効果を評価するためには、IM O - 2 b 1 細胞を、P L G A または P E G - P L G A 製剤のいずれかと 48 時間インキュベートした後、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド (M T T) アッセイを行って、細胞生存率を評価した。M T T アッセイは、黄色テトラゾリウム色素である M T T の、その不溶性紫色生成物であるホルマザンへの還元を介して N A D ( P ) H 依存性細胞オキシドレダクターゼ活性を測定することによって細胞代謝能を客観的に定量するための比色法である。

10

#### 【0120】

このように、評価中の薬物の相対的な細胞障害効果は、試験ウェルにおいて形成されたホルマザン生成物の全量を、未処理細胞の対照ウェルにおいて形成された対応する量と比較することによって識別することができる。この方法を使用すると、*s i H e s 1* 搀持 P E G - P L G A N P の 800 μg / mL (約 66 nM の *s i R N A* 当量) までの用量漸増は、48 時間曝露後の IM O - 2 b 1 細胞によって十分に耐容された (図 34)。試験した最高濃度では、未処理対照 (U T D) と比較して、いずれの N P 製剤についても M T T アッセイを使用して、細胞生存率の統計的に有意な喪失は観察されなかった。対照的に、細胞障害レベル (2%) の非イオン性界面活性剤である Triton X-100 (T X) により処理したウェルは、このアッセイにおいて細胞生存率の顕著な喪失を示した。

20

#### 【0121】

P E G - P L G A N P 内に封入した *s i H e s 1* 生体分子 (分子 # 1) の相対サイレンシング効率を試験するために、*s i R N A* 搀持 P L G A および P E G - P L G A N P のいずれかの用量漸増を、IM O - 2 B 1 細胞のサブコンフルエントなウェルと培養し、それにより各ウェルにおける全 *s i R N A* についてペアワイス投与を制御した (28.8、57.6、115.2 nM *s i R N A* 当量)。N P 処理の開始から 72 時間後、全 R N A を単離し、H e s 1 およびハウスキーピング遺伝子 G A P D H に対するプライマーを使用して R T - q P C R 分析に供した。相対 H e s 1 レベルを 2<sup>-CT</sup> 法によって決定した。L i v a k および S c h m i t t g e n (2001 年) Methods 25(4) : 402~8 頁を参照のこと。

30

#### 【0122】

その見かけの向上した取り込み効率および機能的に最適な核周囲蓄積パターンと一致することには、*s i H e s 1* を担持した P E G - P L G A N P (分子 # 1) は、P L G A N P よりも低い用量当量にて H e s 1 発現に対してより顕著なサイレンシング効果を誘発した (図 35、# # #、示した用量での P L G A N P と比較して P E G - P L G A N P によって誘導されるサイレンシングの程度に関して p < 0.001)。

#### 【0123】

タンパク質レベル (曝露後 96 時間) での IM O - 2 b 1 における *s i H e s 1* K D 効率の標的とした比較は、転写レベル (曝露後 72 時間) での H e s 1 の測定から得られた結果を反映した (図 36)。N P インキュベーション後、細胞抽出物を、H e s 1 に対する抗体による免疫プロッティングに供し、免疫プロットにおける H e s 1 の相対レベルを、NIH Image J ソフトウェアを使用するデンシティメトリー分析によって決定した。各レーンの下の数字は、各プロットにおける未処理 (偽) 対照試料に対する各抽出物中で測定した H e s 1 タンパク質の量を表す。350 μg / mL およびそれ以上の濃度にて、H e s 1 タンパク質の顕著な減少を P E G 化 P L G A N P について観察したのに対して、P L G A N P について H e s 1 レベルの明らかな減少を 600 μg / mL およびそれ以上にて最初に観察した。

40

#### 【実施例 6】

#### 【0124】

投与実験の期間

50

s i H e s 1 N P の治療的投与期間を、投与を 1 日のみ（24 時間）に制限し、聴力を失ってから 72 時間後に開始することによって追跡実験において試験した。図 39 に見られるように、実質的な統計的に有意な聴力改善を、この代替投与パラダイムを使用して、注入後 3 週間の早さで複数の試験頻度にわたって観察した。図 40 に示されるように、実質的な聴力改善もまた、延長された 9 週間の期間にわたって観察し、高周波数の基底領域において最大の漸進的改善を観察した。これらの結果により、1 日の s i H e s 1 N P 注入が、騒音により聴力を失った動物における聴覚機能を回復させるための 10 日の注入と、見かけ上、同じくらい有効であることが明らかになった。この結果はいくぶん驚くべきものであったが、s i H e s 1 の N P により媒介される送達が、この状況において内因性多タンパク質 R N A 誘導サイレンシング複合体（R I S C）への s i R N A の効率的な担持をもたらし、このことは、一旦担持されると、非分裂細胞における単回用量投与後の時に数週間、遺伝子サイレンシングを持続することができる事を示唆する。Weilら、(2011年) Mol Pharmacol. 79 (6) : 953. PubMed PMID: 21427169; Bartlettら、(2006年) Nucleic Acids Res. 34 (1) : 322. Epub 2006/01/18. PubMed PMID: 16410612; PMCID: 1331994; Bartlettら、(2007年) Biotechnol Bioeng. 97 (4) : 909. PubMed PMID: 17154307 を参照のこと。

#### 【0125】

同様の実験を本明細書に記載される併用療法を用いて反復する。

10

20

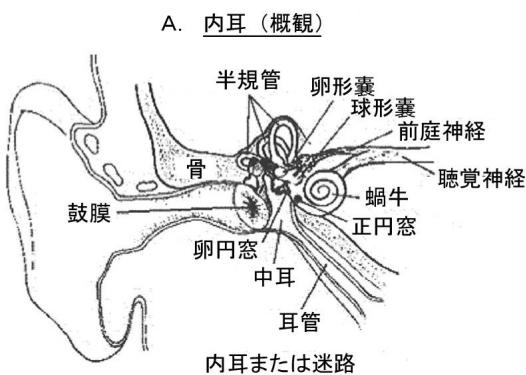
30

40

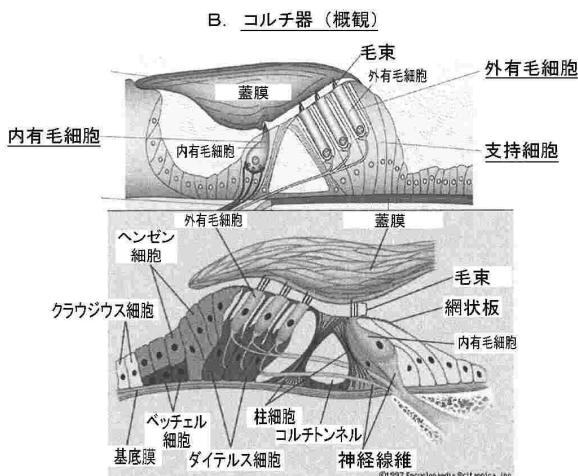
50

【四面】

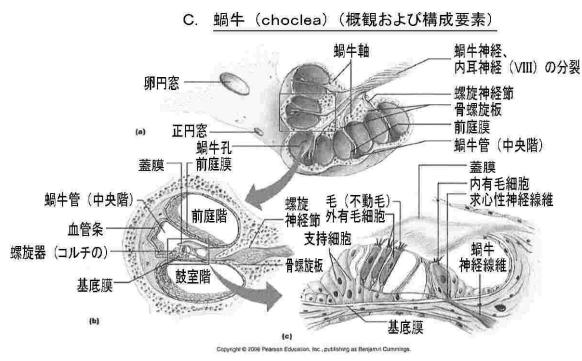
【図 1 - A】



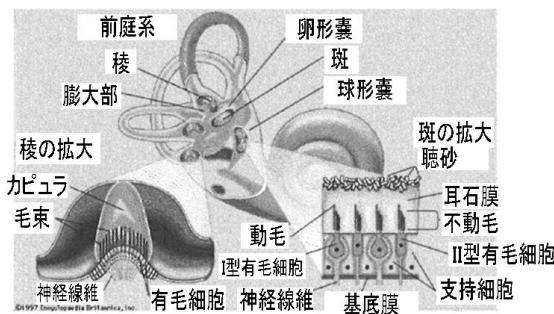
【図 1 - B】



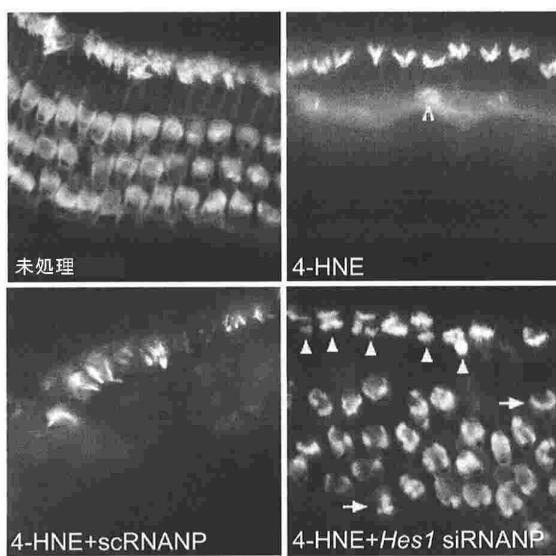
【図 1 - C】



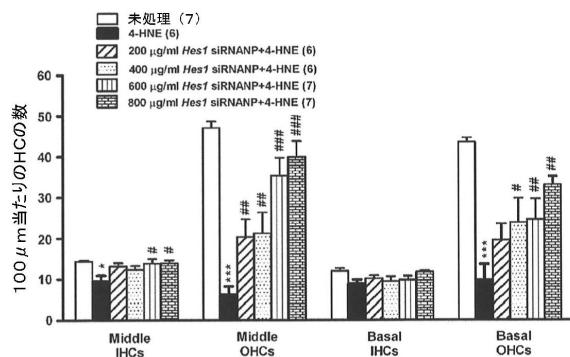
【図 1 - D】



【図2】

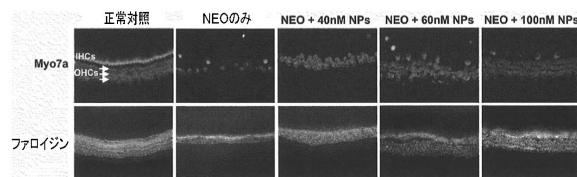


【図3】

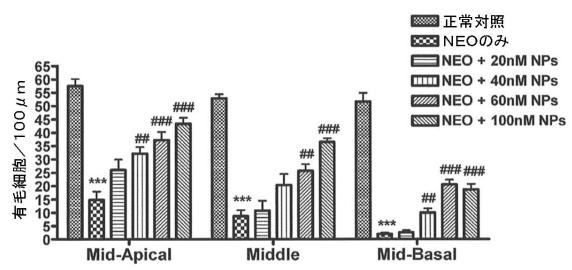


10

【図4】



【図5】



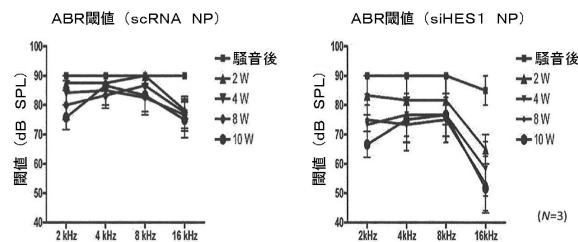
20

30

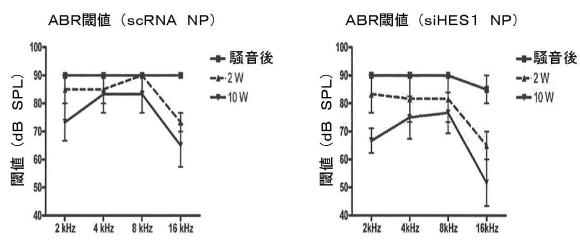
40

50

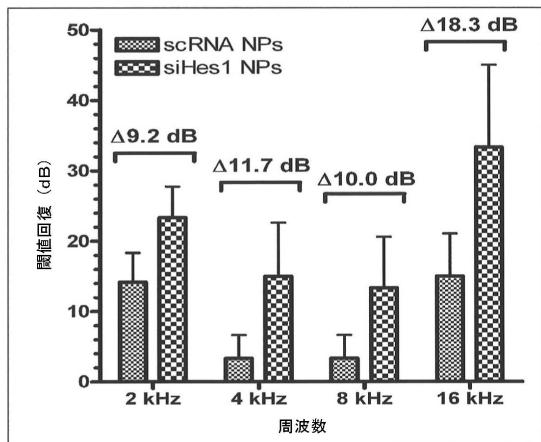
【図6】



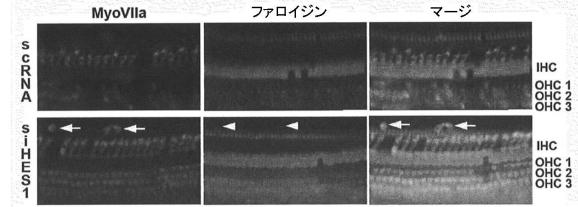
【図7】



【図8】



【図9】



10

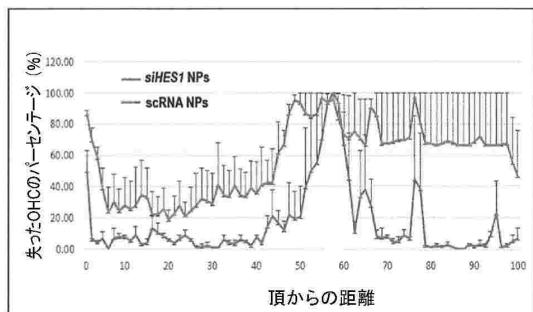
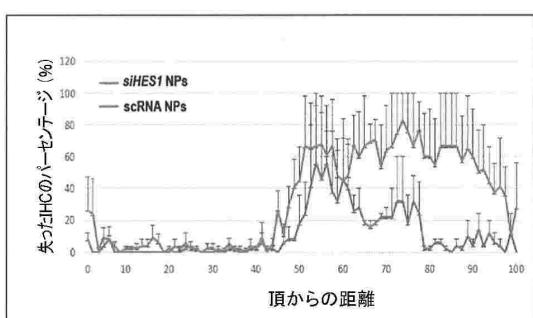
20

30

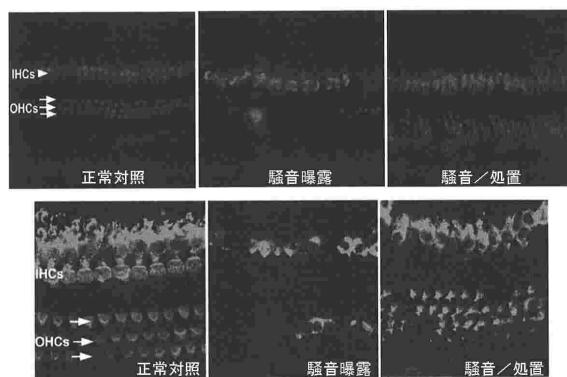
40

50

【図 1 0】



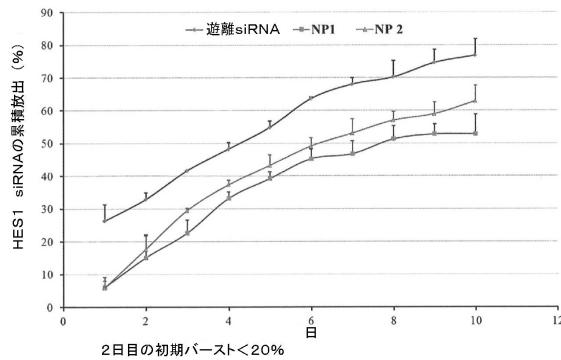
【図 1 1】



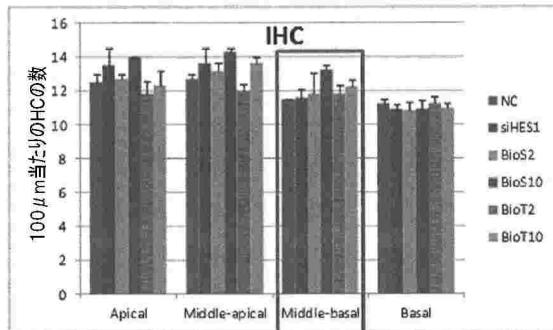
10

20

【図 1 2】

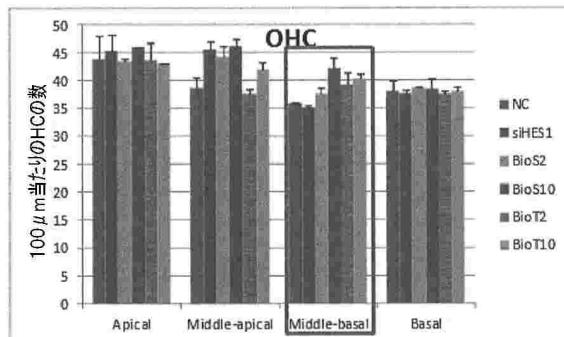


【図 1 3】



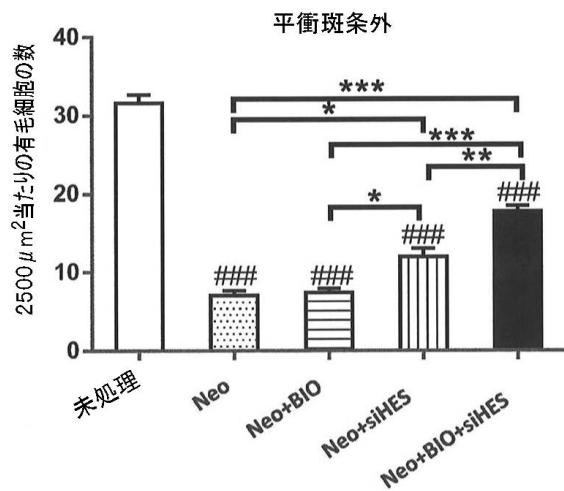
30

40

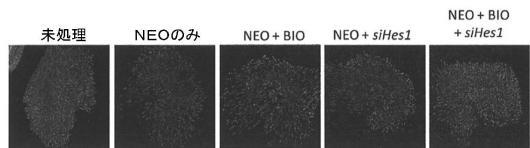


50

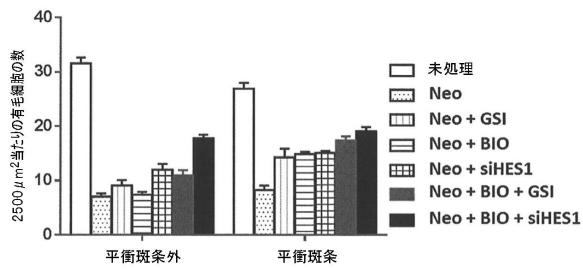
【図 14】



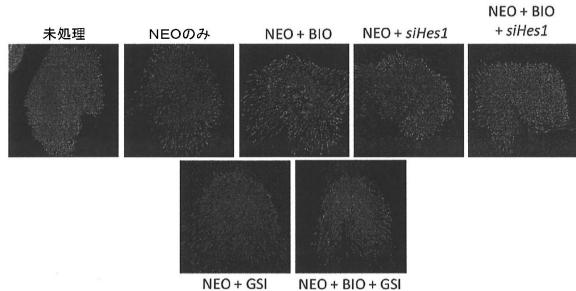
【図 15】



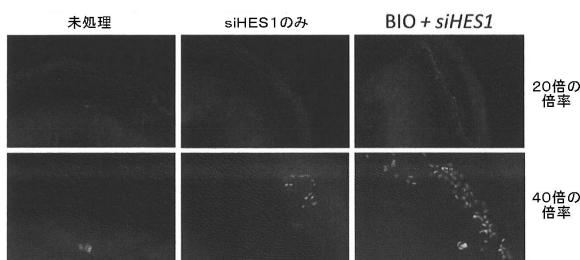
【図 16】



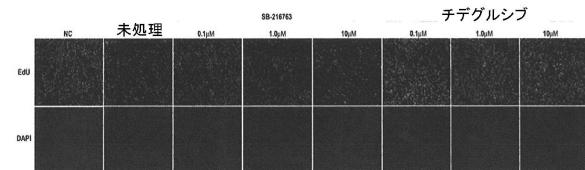
【図 17】



【図 18】



【図 19】



10

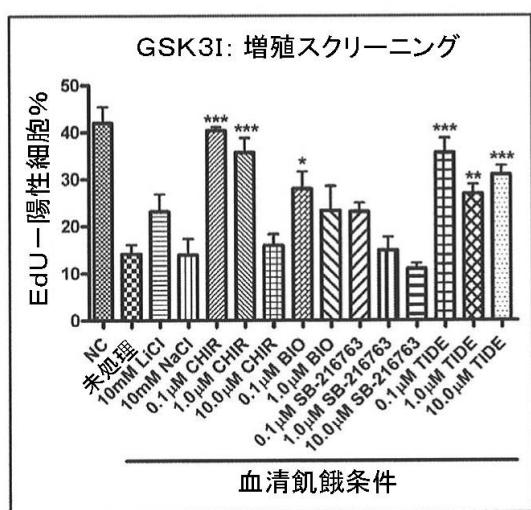
20

30

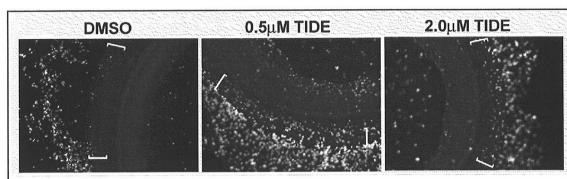
40

50

【図20】

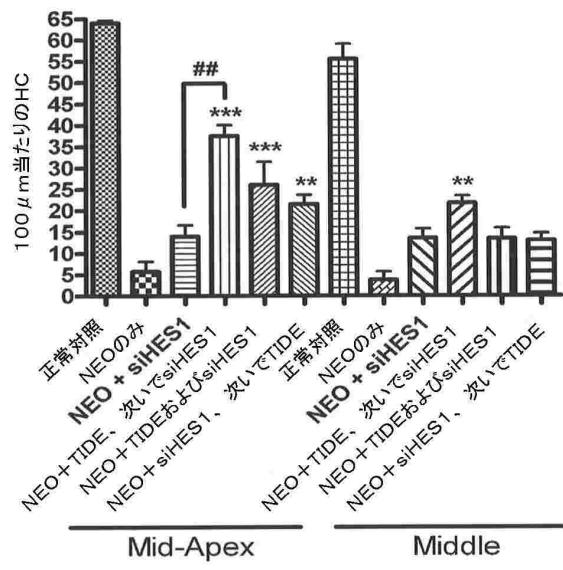


【図21】

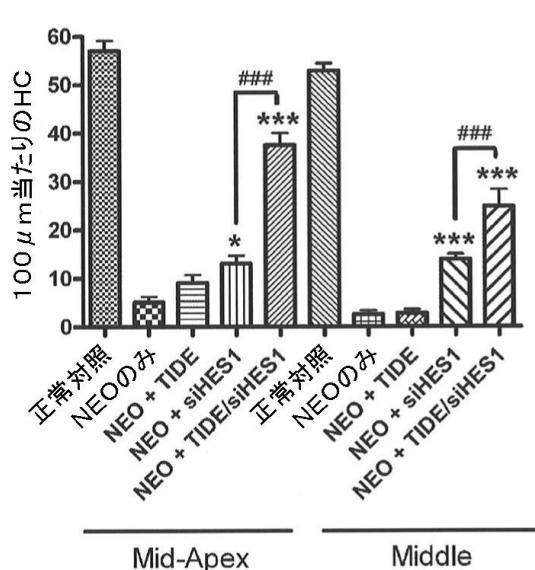


10

【図22】



【図23】



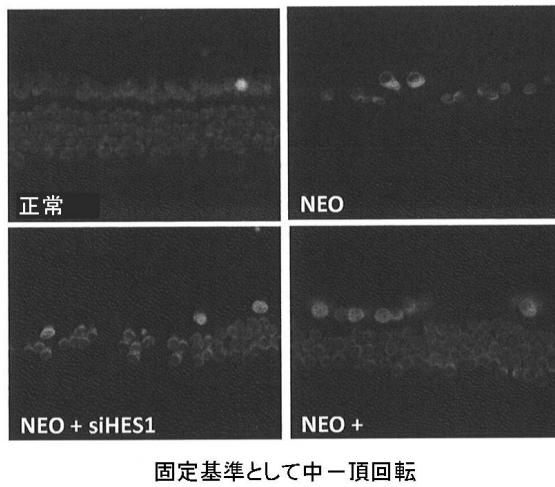
20

30

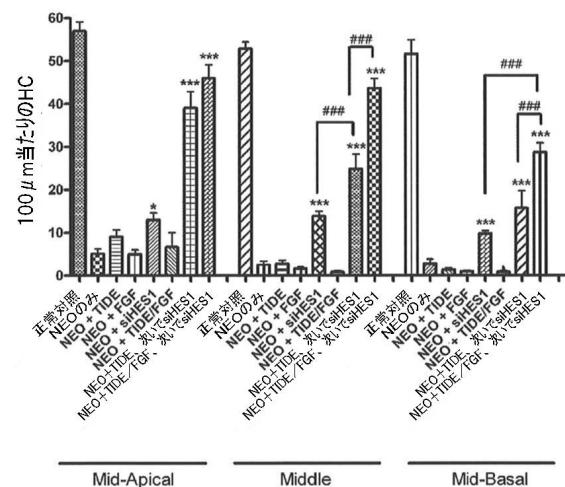
40

50

【図 2 4】

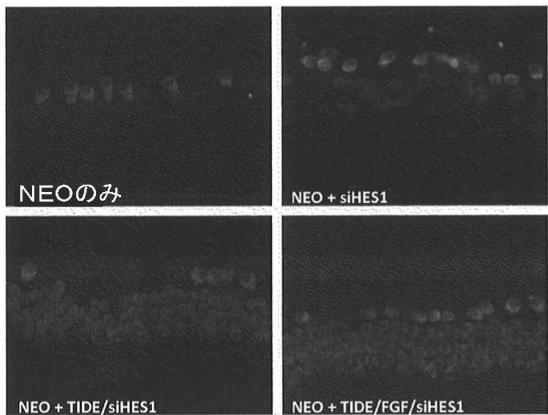


【図 2 5】

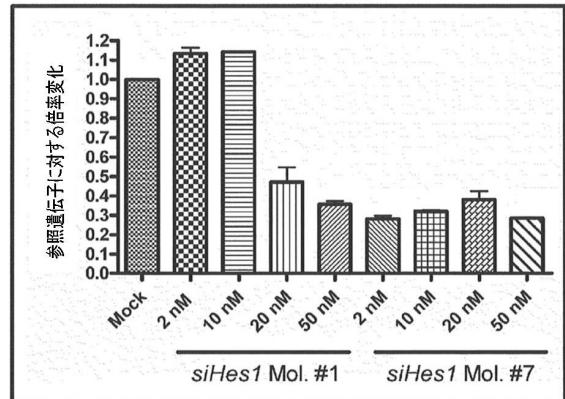


10

【図 2 6】



【図 2 7】



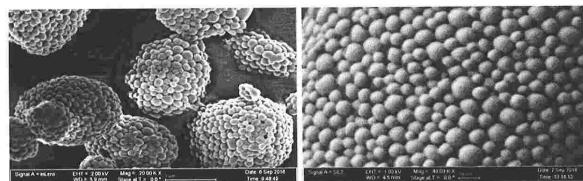
20

30

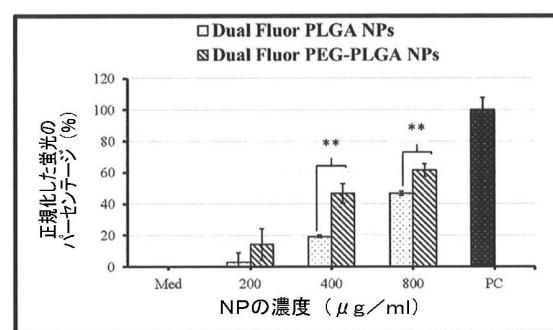
40

50

【図 28】

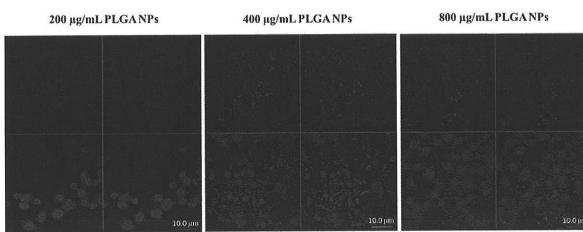


【図 29】

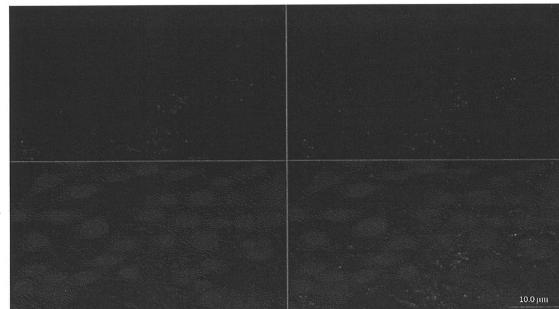


10

【図 30】

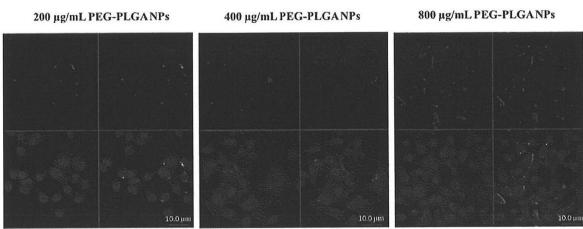


【図 31】

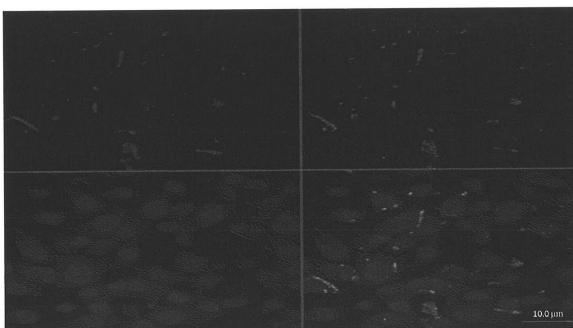


20

【図 32】



【図 33】

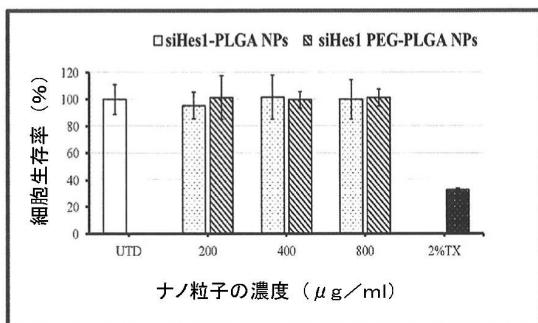


30

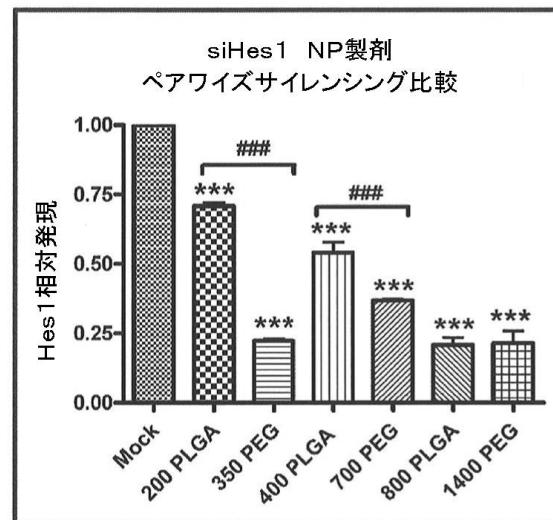
40

50

【図34】

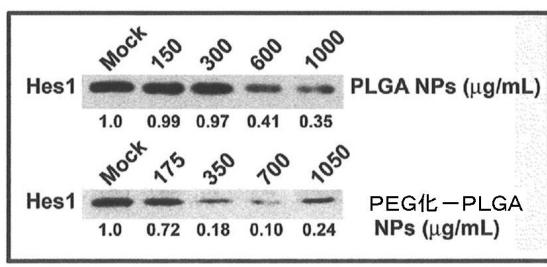


【図35】

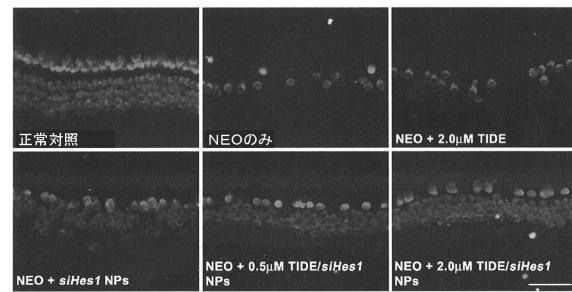


10

【図36】



【図37】



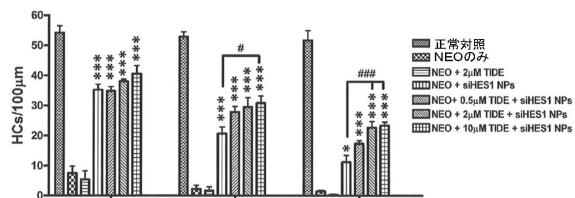
20

30

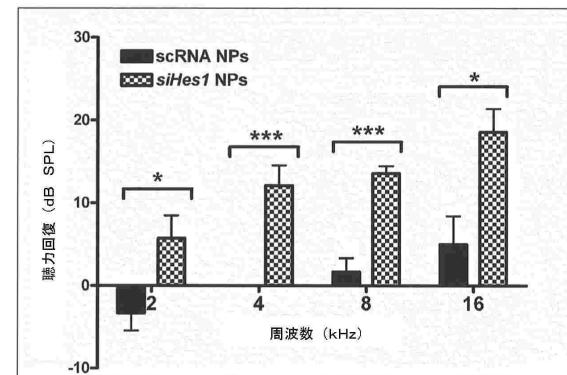
40

50

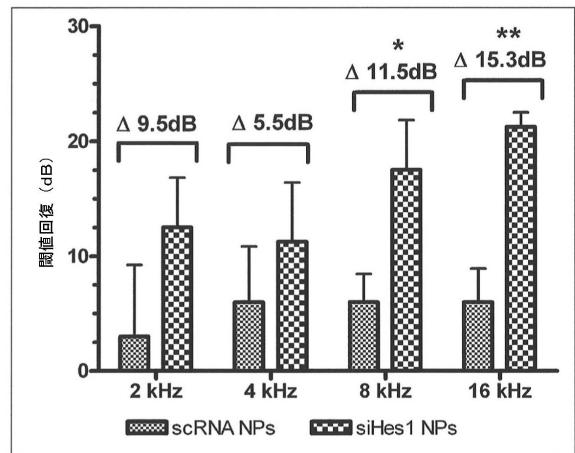
【図38】



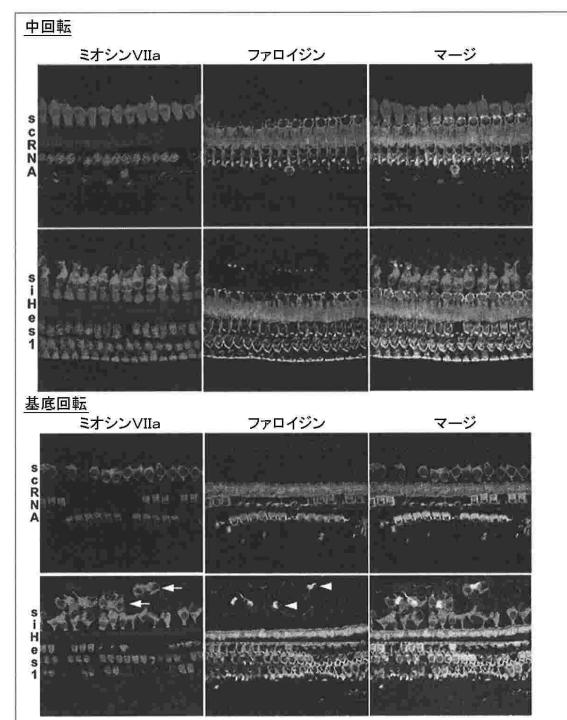
【図39】



【図40】



【図41】



【配列表】

0007523209000001.app

10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I			
A 6 1 K	38/18 (2006.01)	A 6 1 K	38/18	
A 6 1 K	45/06 (2006.01)	A 6 1 K	45/06	
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34	
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

米国(US)

弁理士 大木 信人

(72)発明者 ウエスト, マシュー ビー.

アメリカ合衆国 73020 オクラホマ州, チョクトー, ノース チョクトー ロード 3250

(72)発明者 コプケ, リチャード ディー.

アメリカ合衆国 73151 オ克拉ホマ州, オクラホマ シティ, クリーク メドー ドライヴ 1  
0301

合議体

審判長 松波 由美子

審判官 光本 美奈子

審判官 山村 祥子

(56)参考文献 特表2012-509899 (JP, A)

米国特許出願公開第2013/210889 (US, A1)

特許第6527431 (JP, B2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 45/00-45/08

A61K 38/00-38/58

A61K 39/00-39/44

A61K 48/00

CAPLUS / REGISTRY / BIOSIS / EMBASE / MEDLINE (ST  
N)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)