

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6162691号
(P6162691)

(45) 発行日 平成29年7月12日(2017.7.12)

(24) 登録日 平成29年6月23日(2017.6.23)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 31/713	(2006.01)	A 61 K 31/713	Z NA
A 61 K 45/00	(2006.01)	A 61 K 45/00	ZMD
A 61 K 47/54	(2017.01)	A 61 K 47/54	
A 61 K 47/60	(2017.01)	A 61 K 47/60	
A 61 K 47/61	(2017.01)	A 61 K 47/61	

請求項の数 12 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-513133 (P2014-513133)
(86) (22) 出願日	平成24年5月25日 (2012.5.25)
(65) 公表番号	特表2014-516977 (P2014-516977A)
(43) 公表日	平成26年7月17日 (2014.7.17)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/059799
(87) 國際公開番号	W02012/163814
(87) 國際公開日	平成24年12月6日 (2012.12.6)
審査請求日	平成27年5月8日 (2015.5.8)
(31) 優先権主張番号	11305650.1
(32) 優先日	平成23年5月27日 (2011.5.27)
(33) 優先権主張國	歐州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者	500026533 アンスティテュ・キュリ 1 N S T I T U T C U R I E フランス国 O 5 セデクス パリー リ ュ ドゥルム 2 6
(73) 特許権者	512330215 デエヌア・テラプーティック D N A T H E R A P E U T I C S フランス国、エフー 9 1 0 5 8 エヴリー ・セデックス、リュ・ピエール・フォンテ ーヌ 4、ペビニエール・ジェノポール・ アントルプリーズ
(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国

最終頁に続く

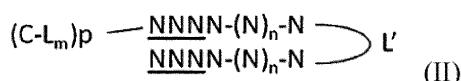
(54) 【発明の名称】二本鎖切断を模倣するDNA分子と温熱療法との組み合わせによるガンの処置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

温熱処置と組み合わせてガンを処置するための医薬の調製のための核酸分子の使用であつて、少なくとも1つの自由末端を有し、ヒトゲノムの遺伝子と60%未満の配列同一性を有する24~200bpのDNA二本鎖部分を有するヘアピン核酸であり、核酸分子が、下記式：

【化14】



10

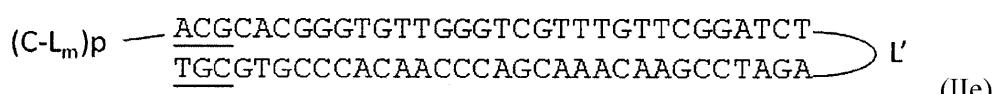
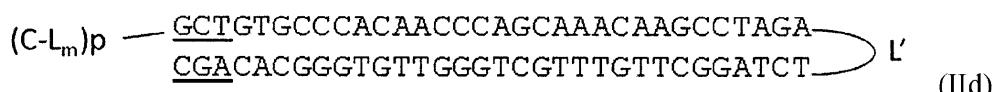
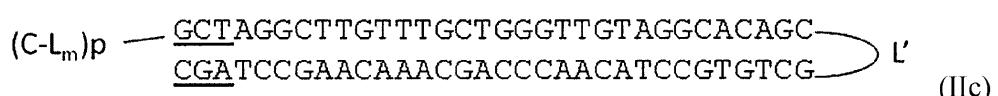
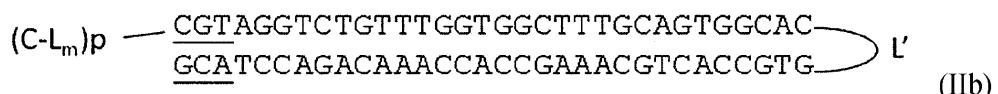
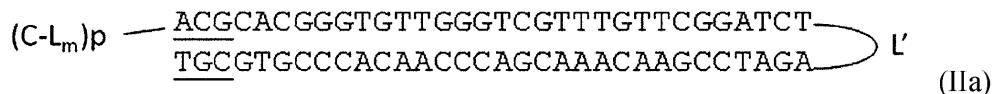
(式中、Nは、デオキシヌクレオチドであり、nは、27であり、下線部のNは、改変ホスホジエステル骨格を有するヌクレオチドを指し、L'は、リンカーであり、Cは、コレステロールであり、Lは、カルボキサミドオリゴエチレングリコールであり、m及びpは1である)

を有する、使用。

【請求項2】

核酸分子が、下記式：

【化15】



10

20

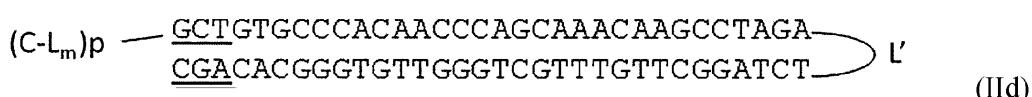
(式中、下線部のヌクレオチドは、ホスホロチオエート又はメチルホスホネート骨格を有するヌクレオチドを指し、連結された L' は、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジレート (T4) 及び 2', 19 - ビス (ホスホル) - 8 - ヒドラザ - 1 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択され；m 及び p は、1 であり、L は、カルボキサミドオリゴエチレングリコールであり、C は、コレステロールである) の1つを有する、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

核酸分子が、

【化16】

30



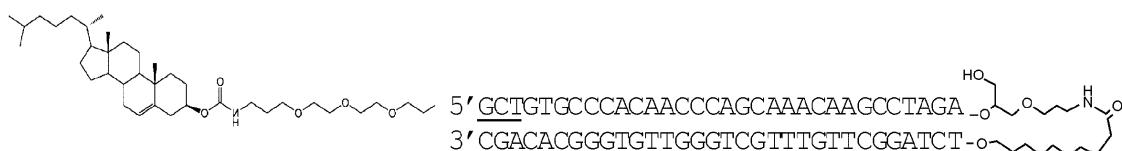
(式中、下線部のヌクレオチドは、ホスホロチオエート又はメチルホスホネート骨格を有するヌクレオチドを指し、連結された L' は、リンカーであり；m 及び p は、1 であり、L は、カルボキサミドオリゴエチレングリコールであり、C は、コレステロールである) である、請求項1に記載の使用。

【請求項4】

40

核酸分子が、

【化17】



である、請求項1に記載の使用。

【請求項5】

50

温熱処置が、少なくとも 41 の温度を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

温熱処置が、マイクロ波 (R F A)、超音波、赤外線、ナノ粒子若しくはナノチューブ、誘導加熱、磁気温熱療法、予熱された液体、例えば血液の灌流若しくは注入、腹腔内の液流の加熱又は直接加熱によって実施される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 7】

ガンが、固体ガンである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

固体ガンが、肉腫、メラノーマ、及び頭頸部、腎臓、卵巣、脾臓、前立腺、甲状腺、肺、食道、乳房、膀胱、結腸直腸、肝臓、頸部のガン、並びに子宮内膜ガン及び腹膜ガンから選択される、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

p が 1 であり、エンドソーム溶解剤と組み合わせて使用される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 10】

核酸分子が、放射線療法及び / 又は抗腫瘍化学療法と組み合わせて使用される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 11】

抗腫瘍化学療法が、直接的又は間接的な DNA 損傷抗腫瘍剤による処置である、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

DNA 損傷抗腫瘍剤が、トポイソメラーゼ I 又は II の阻害剤、DNA 架橋剤、DNA アルキル化剤、代謝拮抗剤及び有糸分裂紡錘体の阻害剤からなる群より選択される、請求項 11 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、腫瘍学の分野に関する。

【0002】

発明の背景

温熱療法は臨床応用された最古の手段の 1 つであり、様々な抗ガン療法の有効性を高める。温熱療法は、体組織を高温に曝露してガン細胞を損傷及び殺傷するか、又は放射線及びある種の抗癌薬（シクロホスファミド、ドキソルビシン、シスプラチニン、エトポシド、イホスファミド、ゲムシタビン、インターフェロン、ピンクリスチン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン . . . ）の効果に対してガン細胞をより感受性にする類の処置である。一般に、それは単独では使用されない。肉腫、メラノーマ、頭頸部、脳、肺、食道、乳房、膀胱、直腸、肝臓、頸部及び腹膜中皮を含む多くの種類のガンの処置に研究の焦点が合わせられている。しかしながら、温熱療法の正確な作用機序は、依然としてわかりにくい。

【0003】

国際公開第2010/082821号及びKrawczyk et al (2011, Proc Natl Acad Sci)には、軽度の温熱療法が相同組換え (H R) を阻害し、BRCA2 の分解を誘導することが開示されている。相同組換えは、二本鎖切断 (DSB) の修復経路の 1 つである。BRCA2 は二本鎖切断 (DSB) の組換え修復に関与していること、及びPARP 阻害剤は BRCA2 欠損乳ガン細胞を殺傷するのに有効であることが公知である。従って、これらの著者らは、温熱療法によって BRCA2 (そして相同組換え) を阻害するのと同時に、DSB を誘導する薬剤を使用してガンを処置し得ると仮定した。これらの著者らはまた、PARP 阻

10

20

30

40

50

害剤をこの組み合わせと一緒にさらに使用することを提案した。P A R P は、一本鎖DNA切断(S S B)の検出及びS S B修復に関する酵素機構へのシグナル伝達に関する。相同組換え欠損細胞(R a d 5 4 - / -)では、温熱療法による放射線療法感受性の増加が観察されなかったことから、これらの著者らは、この効果が相同組換えに特異的なものであるとの最終意見を述べた。

【0004】

たとえ温熱療法によるガンの処置が進歩しているとしても、温熱療法を使用するガンの処置方法の改善に対する強い必要性が依然としてある。

【0005】

発明の概要

驚くべきことに、本発明者らは、Krawczykらによって示されたこと、及びDNA依存性タンパク質キナーゼ(DNA-PK)について知られていることとは反対に、温熱療法の効果はDBS修復の相同組換え経路に特異的なものではないことを発見した。より具体的には、D b a i t分子と称される二本鎖切断を模倣する核酸分子は、温熱療法と組み合わせてガンを処置するのに有用であり得る。D b a i t分子は、さらなるDNA損傷を細胞に引き起こさずに、DNA二本鎖切断(DSB)修復の非相同末端結合経路に関するDNA依存性タンパク質キナーゼ(DNA-PK)の過剰活性化によって作用する(国際公開第2005/040378号;国際公開第2008/034866号;Quanz et al, 2009, Clinical Cancer Research 15:1308; Quanz et al, 2009, PLoS ONE 4:e6298; Dutreix et al, 2010, Mut. Res. 704:182)。驚くべきことに、DNA-PK阻害剤NU7026によるDNA修復の阻害は温熱療法に対して感受性ではなく、D b a i tの増感を防ぐ。従って、D b a i tの増感はDNA-PKキナーゼの活性化を必要とし、DSB DNA修復阻害とは独立して作用する。驚くべきことに、本発明者らはまた、たとえDSBを誘導する薬剤がない場合でも、D b a i t分子と温熱療法との組み合わせの抗腫瘍効果を見ることができるこことを示した。加えて、観察されたこの組み合わせの効果は相乗的かつD b a i t用量依存的な効果であるように思われる。

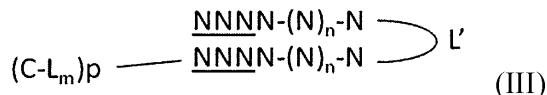
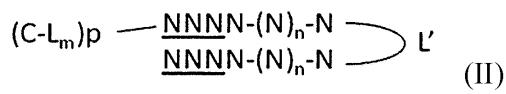
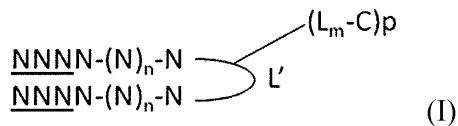
【0006】

従って、本発明は、温熱処置と組み合わせてガンを処置するのに使用するための核酸分子であって、少なくとも1つの自由末端と、ヒトゲノムの遺伝子と60%未満の配列同一性を有する24~200bpのDNA二本鎖部分とを有する核酸分子に関する。

【0007】

より好ましくは、核酸分子は、下記式:

【化1】



(式中、Nは、デオキシヌクレオチドであり、nは、15~195の整数であり、下線部のNは、改变ホスホジエステル骨格を有するか、又は有しないヌクレオチドを指し、L'は、リンカーであり、Cは、好ましくは、脂溶性分子及び細胞レセプターをターゲティングしてレセプター介在性エンドサイトーシスを可能にするリガンドから選択されるエンドサイトーシスを促進する分子であり、Lは、リンカーであり、m及びpは独立して、0又は1の整数である)の1つを有する。

10

20

30

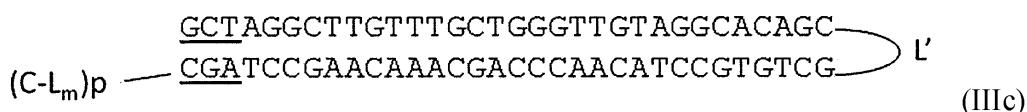
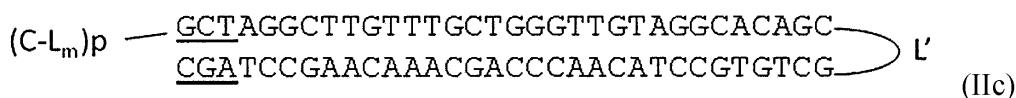
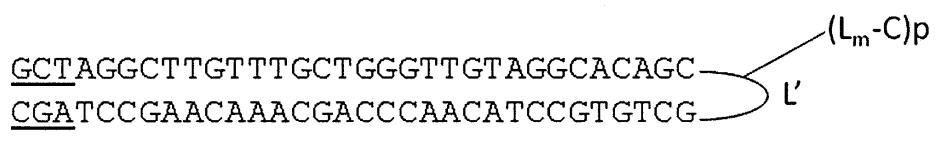
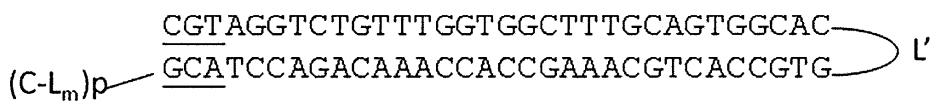
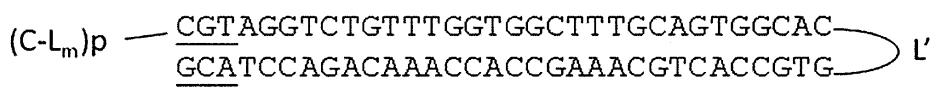
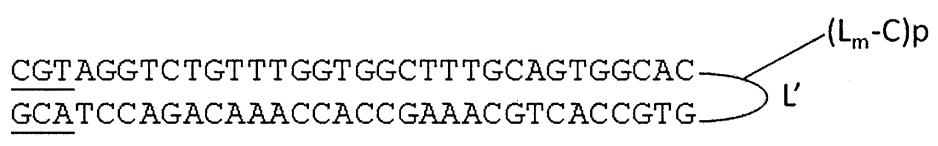
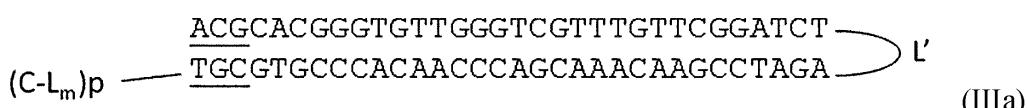
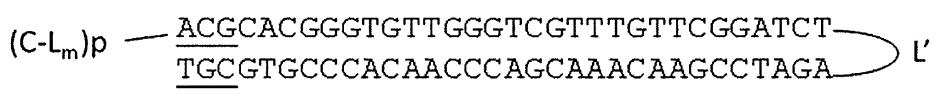
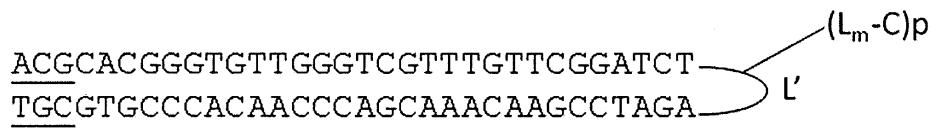
40

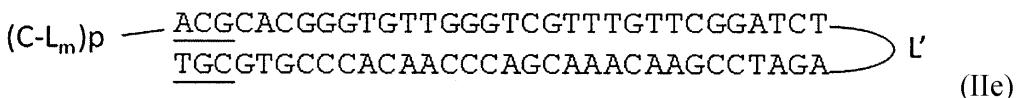
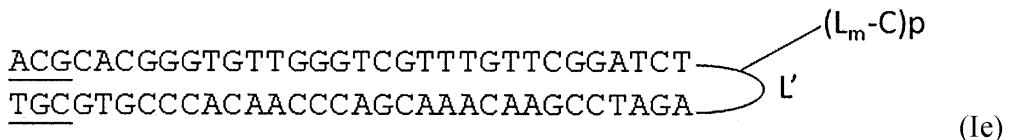
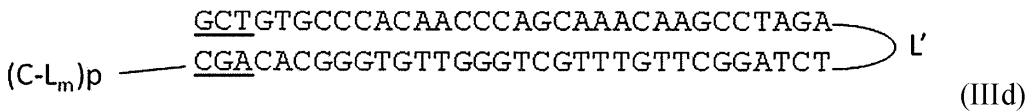
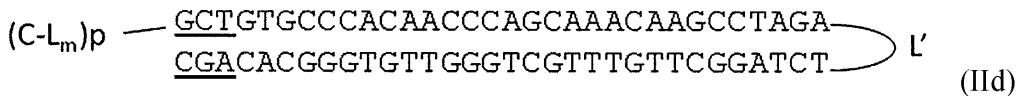
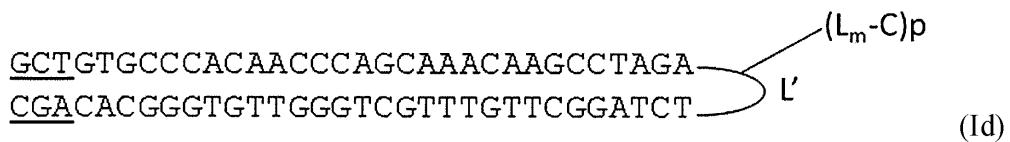
50

【0008】

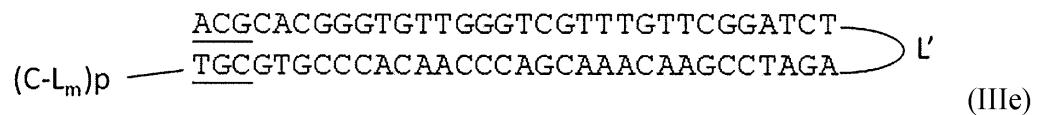
より具体的には、核酸分子は、下記式：

【化2】





及び,

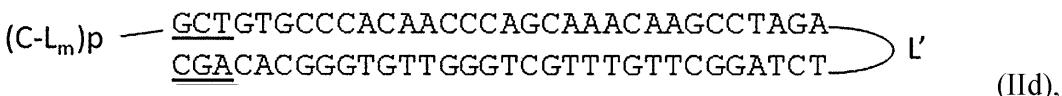
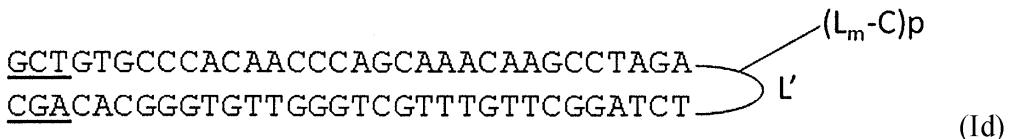


(式中、下線部のヌクレオチドは、ホスホロチオエート又はメチルホスホネート骨格を有するヌクレオチドを指し、連結されたL'は、ヘキサエチレンギリコール、テトラデオキシチミジレート(T4)及び2,19-ビス(ホスホル)-8-ヒドラザ-1-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンからなる群より選択され;mは、1であり、Lは、カルボキサミドオリゴエチレンギリコールであり、Cは、単鎖又は二本鎖脂肪酸、例えばオクタデシル及びジオレオイル、コレステロール、トコフェロール、葉酸、糖、例えばガラクトース及びマンノース及びそれらのオリゴ糖、ペプチド、例えばRGD及びボンベシン並びにタンパク質、例えばインテグリンからなる群より選択され、好ましくは、コレステロールである)の1つを有する。

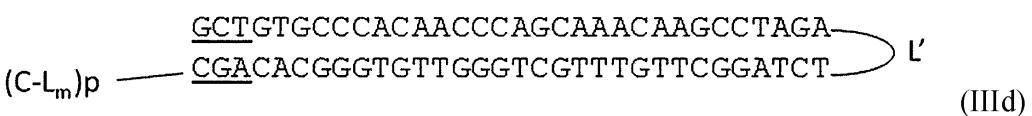
【0009】

好ましい実施態様では、核酸分子は、

【化3】



及び



10

20

30

40

50

からなる群より選択される。

【0010】

非常に具体的な実施態様では、核酸分子は、

【化4】



10

である。

【0011】

より好ましくは、エンドサイトーシスを促進する分子は、コレステロールである。

【0012】

好ましくは、温熱処置は、少なくとも41、好ましくは少なくとも42の温度を含む。場合により、温熱処置は、マイクロ波(RFA)、超音波、赤外線、ナノ粒子若しくはナノチューブ、誘導加熱、磁気温熱療法、予熱された液体、例えば血液の灌流若しくは注入、腹腔内の液流の加熱(intraperitoneal heated flow)、薬物誘導性温熱療法又は直接加熱によって実施される。

20

【0013】

好ましくは、ガンは、好ましくは、肉腫、メラノーマ、並びに頭頸部、腎臓、卵巣、膵臓、前立腺、甲状腺、肺、食道、乳房、膀胱、結腸直腸、肝臓、頸部のガン、並びに子宮内膜ガン及び腹膜ガン、より好ましくは肝臓ガン及び腹膜ガンから選択される固形ガンである。

【0014】

特定の実施態様では、pは1であり(すなわち、コンジュゲートD bait分子)、核酸分子は、エンドソーム溶解剤、好ましくはキノリンエンドソーム溶解剤、より好ましくはクロロキン又はヒドロキシクロロキンと組み合わせて使用される。さらにより好ましくは、核酸分子は、クロロキンと組み合わせて使用される。

30

【0015】

場合により、核酸分子は、放射線療法、放射性同位体療法及び/又は抗腫瘍化学療法と組み合わせて使用され得る。好ましくは、抗腫瘍化学療法は、直接的又は間接的なDNA損傷抗腫瘍剤による処置である。より好ましくは、DNA損傷抗腫瘍剤は、トポイソメラーゼI又はIIの阻害剤、DNA架橋剤、DNAアルキル化剤、代謝拮抗剤及び有糸分裂紡錘体の阻害剤からなる群より選択される。

【0016】

あるいは、核酸分子は、放射線療法、放射性同位体療法及び/又は抗腫瘍化学療法と組み合わせて使用されない。好ましくは、核酸分子は、放射線療法、放射性同位体療法及び/又はDNA損傷抗腫瘍剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせて使用されない。

40

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】D bait 32Hcは、温熱療法と結び付けた場合に相乗的な毒性を誘導する。MRC5トランスフォーメーション線維芽細胞及びHT29結腸ガン細胞は未処置か、又はDNA-PK阻害剤NU7026(50μM)の存在下若しくは非存在下でD bait 8H(1.25mg/L)若しくはD bait 32Hc(1.25mg/L)でトランスフェクションした。5時間後、細胞を43の温熱療法に1時間供した。細胞の死亡率は、48時間後にトリパンブルーアッセイによって測定した。独立した5回の実験からの細胞死の平均パーセンテージ±標準偏差を表す。**、p<0.01; ***、p<0.001(Studentのt検定)。

50

【図2A】DT01は、高周波焼灼抗腫瘍効果を増強する。NMR1ヌードマウス群には、 10^7 個の腫瘍HT29細胞を右側腹部に皮下(s.c.)移植した。マウスは、RFA(腫瘍周辺部に42で2分間)(n=13)、DT01(6mgの局所注射を4回)(n=14)、又はRFA及び4回のDT01注射の両方(n=11)で処置した。腫瘍を持つ未処置マウス(n=11)は、コントロールとしての役割を果たした。パネルAは、処置前(0日目)、そして4日後及び12日後(それぞれ4日目及び12日目)の腫瘍の様子の代表的な画像を示す。バー:1cm。パネルBは、RFA+DT01の併用処置で処置したマウスのより大きな腫瘍成長抑制を示す。マウスは、腫瘍が 2000mm^3 に達した際に屠殺するまで経過観察した。すべての実験において、腫瘍は、デジタルキャリパーで1週間に3回測定した。腫瘍容積は、下記式:長さ×幅×幅/2を使用して、立方ミリメートル単位で計算した。パネルCは、RFA+DT01の併用処置で処置したマウスの生存上昇を示す。ログランク検定:未処置対RFA(p<0.001, RR0.30); DT01+RFA対RFA(p<0.05 RR0.41)。

【図2B】DT01は、高周波焼灼抗腫瘍効果を増強する。NMR1ヌードマウス群には、 10^7 個の腫瘍HT29細胞を右側腹部に皮下(s.c.)移植した。マウスは、RFA(腫瘍周辺部に42で2分間)(n=13)、DT01(6mgの局所注射を4回)(n=14)、又はRFA及び4回のDT01注射の両方(n=11)で処置した。腫瘍を持つ未処置マウス(n=11)は、コントロールとしての役割を果たした。パネルAは、処置前(0日目)、そして4日後及び12日後(それぞれ4日目及び12日目)の腫瘍の様子の代表的な画像を示す。バー:1cm。パネルBは、RFA+DT01の併用処置で処置したマウスのより大きな腫瘍成長抑制を示す。マウスは、腫瘍が 2000mm^3 に達した際に屠殺するまで経過観察した。すべての実験において、腫瘍は、デジタルキャリパーで1週間に3回測定した。腫瘍容積は、下記式:長さ×幅×幅/2を使用して、立方ミリメートル単位で計算した。パネルCは、RFA+DT01の併用処置で処置したマウスの生存上昇を示す。ログランク検定:未処置対RFA(p<0.001, RR0.30); DT01+RFA対RFA(p<0.05 RR0.41)。

【図2C】DT01は、高周波焼灼抗腫瘍効果を増強する。NMR1ヌードマウス群には、 10^7 個の腫瘍HT29細胞を右側腹部に皮下(s.c.)移植した。マウスは、RFA(腫瘍周辺部に42で2分間)(n=13)、DT01(6mgの局所注射を4回)(n=14)、又はRFA及び4回のDT01注射の両方(n=11)で処置した。腫瘍を持つ未処置マウス(n=11)は、コントロールとしての役割を果たした。パネルAは、処置前(0日目)、そして4日後及び12日後(それぞれ4日目及び12日目)の腫瘍の様子の代表的な画像を示す。バー:1cm。パネルBは、RFA+DT01の併用処置で処置したマウスのより大きな腫瘍成長抑制を示す。マウスは、腫瘍が 2000mm^3 に達した際に屠殺するまで経過観察した。すべての実験において、腫瘍は、デジタルキャリパーで1週間に3回測定した。腫瘍容積は、下記式:長さ×幅×幅/2を使用して、立方ミリメートル単位で計算した。パネルCは、RFA+DT01の併用処置で処置したマウスの生存上昇を示す。ログランク検定:未処置対RFA(p<0.001, RR0.30); DT01+RFA対RFA(p<0.05 RR0.41)。

【図3A】処置効果の組織学的分析。NMR1ヌードマウス群(1群あたりマウス7~8匹)には、 10^7 個の腫瘍HT29細胞を右側腹部に皮下(s.c.)移植した。マウスは、RFA(腫瘍周辺部に42で2分間)、DT01(6mgの局所注射を2回)、又はRFA及びDabitの両方で処置した。腫瘍を持つ未処置マウスは、コントロールとしての役割を果たした。RFA処置72時間後にマウスを安楽死させ、組織学的分析のために腫瘍を切除した。パネルAは、4つの実験群における増殖細胞、変性細胞及び壞死細胞の細胞分布を示す。パネルBは、4つの実験群における有糸分裂の定量(5つの領域(倍率 $\times 40$)における腫瘍1個あたりの平均値)を示す。エラーバーは、SEM(平均の標準誤差)を示す。DT01と組み合わせたRFAで処置した検体は、RFA単独又はDT01単独と比較して有意に大きな壞死領域及び変性細胞領域、小さな増殖細胞領域、並びに少ない有糸分裂回数を示した。Studentのt検定:*(p<0.05); ***(p<0.01); ****(p<0.001); *****(p<0.0001)。

. 0 0 1 。

【図 3 B】処置効果の組織学的分析。N M R 1 ヌードマウス群（1群あたりマウス7～8匹）には、 10^7 個の腫瘍 H T 2 9 細胞を右側腹部に皮下（s . c .）移植した。マウスは、R F A（腫瘍周辺部に42で2分間）、D T 0 1（6mgの局所注射を2回）、又はR F A 及びD b a i t の両方で処置した。腫瘍を持つ未処置マウスは、コントロールとしての役割を果たした。R F A 処置72時間後にマウスを安樂死させ、組織学的分析のために腫瘍を切除した。パネルAは、4つの実験群における増殖細胞、変性細胞及び壞死細胞の細胞分布を示す。パネルBは、4つの実験群における有糸分裂の定量（5つの領域（倍率×40）における腫瘍1個あたりの平均値）を示す。エラーバーは、S E M（平均の標準誤差）を示す。D T 0 1と組み合わせたR F Aで処置した検体は、R F A単独又はD T 0 1単独と比較して有意に大きな壞死領域及び変性細胞領域、小さな増殖細胞領域、並びに少ない有糸分裂回数を示した。Studentのt検定：*、 $p < 0.05$ ；***、 $p < 0.001$ 。

【0 0 1 8】

表1. 生存研究及び病理学的研究のデータ。

生存研究及び病理学的研究は、材料及び方法のセクションに記載したように実施した。完全反応は、R F A 処置10日後に腫瘍が完全に退縮することとした。部分反応は、腫瘍の最長径が少なくとも30%減少することとした。病理学的研究については、結果を平均±S Dとして表す。

【0 0 1 9】

発明の詳細な説明

驚くべきことに、本発明者らは、温熱療法と組み合わせてガンを処置するのにD b a i t分子を使用することは非常に有益であることを発見した。実際、これらの結果は、D B S修復の相同組換え経路について示唆されている温熱療法の特異性の点、又は温熱療法との関連でD N A - P Kについて知られていることの点では予想外のものである。

【0 0 2 0】

実際、文献では、放射線増感におけるD N A - P Kの役割が調査された（Zeng ZC et al. World J Gastroenterol 2002; 8:797-803; Woudstra EC et al. Radiat Res. 1999, 152:214-218; Dynlacht JR et al. J Cell Physiol. 2003, 196:557-64.）。この著者らは、D N A - P K c sが、温熱療法による細胞放射線感受性の増強において重要な役割を果たしておらず、温熱療法による放射線増感は、細胞におけるK u 8 0又はD N A - P K c sの状態に関係なく得ることができると結論付けた。従って、この著者らは、K u 8 0又はD N A - P K c sそしてそれ故に非相同D S B末端結合が、温熱療法による細胞放射線感受性の増強において重要な役割を果たしていないと結論付けた。

【0 0 2 1】

驚くべきことに、本発明者らはまた、たとえD S Bを誘導する薬剤がない場合でも、D b a i t分子と温熱療法との組み合わせの抗腫瘍効果を見ることができることを示した。より具体的には、本発明者らは、in vitro及びin vivoの両方において、D b a i t分子と温熱療法との組み合わせがガンを処置するのに非常に有益であることを実証した。実際、D b a i t分子を温熱療法と組み合わせることによって、ガン細胞死に対して相乗効果が観察された。非相同末端結合修復を阻害する（Veugel et al, 2004, Oncogene, 23, 7322-7329）D N A - P Kキナーゼ活性の古典的な阻害剤、例えばN U 7 0 2 6は、温熱増感を誘導しない（図1）。温熱増感に関与するD b a i t活性はN U 7 0 2 6によって無効化されるので、D N A - P Kキナーゼ活性に厳密に依存する。温熱療法及びD b a i tの併用処置により、マウスの生存率に劇的な効果が観察された。実際、温熱療法又はD b a i t分子単独の処置では処置50日後における生存が30%未満であるのに対して、この組み合わせによって処置したプールは80%の生存を経験した（図2C）。併用処置では、腫瘍サイズの安定又は減少さえも観察された。処置3日後に切除した腫瘍の組織学分析によって、本発明者らは、この組み合わせによって処置した腫瘍が、温熱療法又はD b a i t分子単独で処置した腫瘍よりも最高の崩壊度（変性及び壞死の度合

10

20

30

40

50

い)を示したことを観察した(図3)。

【0022】

これらの観察結果に基づいて、本発明は以下に関する。

- 温熱療法と組み合わせてガンを処置するのに使用するための医薬組成物であって、以下に記載されるD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、場合により、抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷剤と、薬学的に許容しうる担体とを含む、医薬組成物；

- 温熱療法と組み合わせてガンを処置するのに使用するための医薬組成物であって、a)以下に記載されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤と、場合により、c)抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷剤と、d)薬学的に許容しうる担体とを含む、医薬組成物；

- 放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にDBSを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせずに温熱療法と組み合わせてガンを処置するのに使用するための医薬組成物であって、以下に記載されるD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、薬学的に許容しうる担体とを含む、医薬組成物；

- 放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にDBSを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせずに温熱療法と組み合わせてガンを処置するのに使用するための医薬組成物であって、a)以下に記載されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤と、c)薬学的に許容しうる担体とを含む、医薬組成物；

- 温熱療法及び場合により放射線療法又は放射性同位体療法と組み合わせてガンを処置するのに同時使用、個別使用又は逐次使用するための複合調製物としての製品又はキットであって、a)以下に開示されるD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、場合により、b)抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷剤とを含む、製品又はキット；

- 温熱療法及び場合により放射線療法又は放射性同位体療法と組み合わせてガンを処置するのに同時使用、個別使用又は逐次使用するための複合調製物としての製品又はキットであって、a)以下に開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤と、場合により、c)抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷剤とを含む、製品又はキット；

- 放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にDBSを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせずに温熱療法と組み合わせてガンを処置するのに同時使用、個別使用又は逐次使用するための複合調製物としての製品又はキットであって、a)以下に開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤とを含む、製品又はキット；

- 温熱療法並びに放射線療法、放射性同位体療法及び/又は抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤による処置と組み合わせてガンを処置するのに使用するための医薬組成物であって、以下に開示されるD b a i t分子又はヘアピン核酸分子を含む、医薬組成物；

- 温熱療法並びに放射線療法、放射性同位体療法及び/又はDNA損傷抗腫瘍剤による処置と組み合わせてガンを処置するのに使用するための医薬組成物であって、a)以下に開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤とを含む、医薬組成物；

- 温熱療法と組み合わせてガンを処置するため；又は温熱療法によるガンの処置効率を高めるため、又は温熱療法に対する腫瘍感受性を増強するための医薬品を製造するための、以下に開示されるD b a i t分子又はヘアピン核酸分子を含む医薬組成物の使用；

- 温熱療法並びに放射線療法、放射性同位体療法及び/又は抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤による処置と組み合わせてガンを処置するため；又は温熱療法並びに放射線療法、放射性同位体療法及び/又は抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤による処置によるガンの処置効率を高めるため；又は温熱療法並びに放射線療法、放射性同位体療法及び/又は抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤に対する腫瘍感受性を増強するための医薬品を製造するための、以下に開示されるD b a i t分子又はヘアピン核酸分子

10

20

30

40

50

を含む医薬組成物の使用；

- 放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にD B Sを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせずに温熱療法と組み合わせてガンを処置するため；又は放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にD B Sを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法を伴わない温熱療法によるガンの処置効率を高めるため；又は放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にD B Sを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法を伴わない温熱療法に対する腫瘍感受性を増強するための医薬品を製造するための、以下に開示されるD b a i t分子又はヘアピン核酸分子を含む医薬組成物の使用；

- 温熱療法及び以下に開示されるエンドソーム溶解剤による処置と組み合わせてガンを処置するための医薬品を製造するための、以下に開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子を含む医薬組成物の使用；

- 温熱療法並びに放射線療法、放射性同位体療法及び／又は抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤並びに以下に開示されるエンドソーム溶解剤と組み合わせてガンを処置するための医薬品を製造するための、以下に開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子を含む医薬組成物の使用；

- 放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にD B Sを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせずに以下に開示されるエンドソーム溶解剤及び温熱療法と組み合わせてガンを処置するための医薬品を製造するための、以下に開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子を含む医薬組成物の使用；

- 温熱療法と組み合わせてガンを処置するための医薬品を製造するための、a)本明細書において開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤とを含む医薬組成物の使用；

- 温熱療法並びに放射線療法、放射性同位体療法及び／又は好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせてガンを処置するための医薬品を製造するための、a)本明細書において開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤とを含む医薬組成物の使用；

- 放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にD B Sを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせずに温熱療法と組み合わせてガンを処置するための医薬品を製造するための、a)本明細書において開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤とを含む医薬組成物の使用；

- 温熱療法によるガンの処置効率を高めるため、又は温熱療法に対する腫瘍感受性を増強するための医薬品を製造するための、a)本明細書において開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤とを含む医薬組成物の使用；

- 温熱療法並びに放射線療法、放射性同位体療法及び／又は好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤による抗腫瘍化学療法によるガンの処置効率を高めるため；又は放射線療法、放射性同位体療法及び／又は好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせた温熱療法に対する腫瘍感受性を増強するための医薬品を製造するための、a)本明細書において開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤とを含む医薬組成物の使用；

- 放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にD B Sを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法を伴わない温熱療法によるガンの処置効率を高めるため；又は放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特にD B Sを誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法を伴わない温熱療法に対する腫瘍感受性を増強するための医薬品を製造するための、a)本明細書において開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤とを含む医薬組成物の使用；

- 温熱療法と組み合わせてガンを処置するための医薬品を製造するための、a)本明細書において開示されるコンジュゲートD b a i t分子又はヘアピン核酸分子と、b)以下に記載されるエンドソーム溶解剤と、c)抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤と

10

20

30

40

50

、 d) 薬学的に許容しうる担体とを含む医薬組成物の使用；

- 温熱療法並びに放射線療法、放射性同位体療法及び / 又は好ましくは D N A 損傷抗腫瘍剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせてガンを処置するための医薬品を製造するための、 a) 本明細書において開示されるコンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子と、 b) 以下に記載されるエンドソーム溶解剤と、 c) 抗腫瘍剤、好ましくは D N A 損傷抗腫瘍剤と、 d) 薬学的に許容しうる担体とを含む医薬組成物の使用；

- 放射線療法、放射性同位体療法及び抗腫瘍化学療法、特に D B S を誘導する薬剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせずに温熱療法と組み合わせてガンを処置するための医薬品を製造するための、 a) 本明細書において開示されるコンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子と、 b) 以下に記載されるエンドソーム溶解剤と、 c) 抗腫瘍剤、好ましくは D N A 損傷抗腫瘍剤と、 d) 薬学的に許容しうる担体とを含む医薬組成物の使用；

- それを必要とする被験体におけるガンを処置するための方法であって、 i) 本明細書において開示される D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子と、薬学的に許容しうる担体とを含む医薬組成物の有効量を投与すること、及び i i) 工程 i) の前に、工程 i) とともに、又は工程 i) の後に前記被験体のガン細胞を温熱療法に供し、それによりガン細胞死を誘導することを含む、方法；

- それを必要とする被験体におけるガンを処置するための方法であって、 i) 本明細書において開示される D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子と、薬学的に許容しうる担体とを含む医薬組成物の治療有効量を投与すること、及び i i) 工程 i) の前に、工程 i) とともに、又は工程 i) の後に前記被験体のガン細胞を温熱療法に供し、それによりガン細胞死を誘導することを含み；場合により、治療有効量の抗腫瘍剤、好ましくは D N A 損傷抗腫瘍剤又は放射性同位体薬剤を前記被験体に投与することをさらに含み；あるいは又は加えて、前記被験体のガン細胞を放射線療法に供することをさらに含み；あるいは、抗腫瘍薬物、特に D B S を誘導する薬剤及び放射性同位体薬剤を投与することを含まず、前記被験体のガン細胞を放射線療法に供することを含まない、方法；

- それを必要とする被験体におけるガンを処置するための方法であって、 i) a) 本明細書において開示されるコンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子と、 b) 以下に記載されるエンドソーム溶解剤と、 c) 薬学的に許容しうる担体とを含む医薬組成物の治療有効量を投与すること；及び i i) 工程 i) の前に、工程 i) とともに、又は工程 i) の後に前記被験体のガン細胞を温熱療法に供し、それによりガン細胞死を誘導することを含み；場合により、治療有効量の抗腫瘍剤、好ましくは D N A 損傷抗腫瘍剤又は放射性同位体薬剤を前記被験体に投与することをさらに含み；あるいは又は加えて、前記被験体のガン細胞を放射線療法に供することをさらに含み；あるいは、抗腫瘍薬物、特に D B S を誘導する薬剤及び放射性同位体薬剤を投与することを含まず、前記被験体のガン細胞を放射線療法に供することを含まない、方法；

- それを必要とする被験体における温熱療法によるガンの処置効率を高めるため、又は温熱療法に対する腫瘍感受性を増強するための方法であって、 i) a) 本明細書において開示されるコンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子と、 b) 薬学的に許容しうる担体とを含む医薬組成物の治療有効量を投与すること；及び i i) 工程 i) の前に、工程 i) とともに、又は工程 i) の後に前記被験体のガン細胞を温熱療法に供し、それによりガン細胞死を増加させることを含み；場合により、治療有効量の抗腫瘍剤、好ましくは D N A 損傷抗腫瘍剤又は放射性同位体薬剤を前記被験体に投与することをさらに含み；あるいは又は加えて、前記被験体のガン細胞を放射線療法に供することをさらに含み；あるいは、抗腫瘍薬物、特に D B S を誘導する薬剤及び放射性同位体薬剤を投与することを含まず、前記被験体のガン細胞を放射線療法に供することを含まない、方法；

- それを必要とする被験体における温熱療法によるガンの処置効率を高めるため、又は温熱療法に対する腫瘍感受性を増強するための方法であって、 i) a) 本明細書において開示されるコンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子と、 b) 以下に記載されるエンドソーム溶解剤と、 c) 薬学的に許容しうる担体とを含む医薬組成物の治療有効

10

20

30

40

50

量を投与すること；及び i) 工程 i) の前に、工程 i) と同時に、又は工程 i) の後に前記被験体のガン細胞を温熱療法に供し、それによりガン細胞死を増加させることを含み；場合により、治療有効量の抗腫瘍剤、好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤又は放射性同位体薬剤を前記被験体に投与することをさらに含み；あるいは又は加えて、前記被験体のガン細胞を放射線療法に供することをさらに含み；あるいは、抗腫瘍薬物、特にDBSを誘導する薬剤及び放射性同位体薬剤を投与することを含まず、前記被験体のガン細胞を放射線療法に供することを含まない、方法。

【 0 0 2 3 】

本明細書において使用される「キット」、「製品」又は「複合調製物」という用語は、上記に定義される組み合わせパートナーが独立して、又は区別される量の組み合わせパートナーを含む様々な一定の組み合わせを使用することにより投薬され得る、すなわち同時に又は異なる時点で投薬され得るという意味で、特に「パーツのキット」を定義する。次いで、パーツのキットのパーツは、例えば、同時に又は時間をずらして（すなわち、異なる時点で）、そして等しい又は異なる時間間隔で、パーツのキットの任意のパーツに関して投与され得る。投与される組み合わせパートナーの複合調製物中の総量比は、変わり得る。組み合わせパートナーは、同じ経路又は異なる経路で投与され得る。

【 0 0 2 4 】

本発明の文脈の中では、処置という用語は、治療的、対症的及び予防的な処置を意味する。本発明の医薬組成物、キット、製品及び複合調製物は、早期若しくは末期のガンの進行を含む既存のガン又は腫瘍を有するヒトにおいて使用され得る。本発明の医薬組成物、キット、製品及び複合調製物は、ガンを有する患者を必ずしも治癒するものではなく、疾患の進行を遅延させるか、若しくは遅らせるか、又は疾患のさらなる進行を予防し、それにより患者の病状を改善する。特に、本発明の医薬組成物、キット、製品及び複合調製物は、腫瘍の発生を減少させるか、腫瘍量を減少させるか、哺乳類ホストにおける腫瘍退縮を起こすか、並びに／又は転移の発生及びガンの再発を予防する。ガンの処置において、本発明の医薬組成物は、治療有効量で投与される。

【 0 0 2 5 】

「治療有効量」は、単独で又は医薬組成物、キット、製品若しくは複合調製物の他の有効成分と組み合わせて、ヒトを含む哺乳動物におけるガンの有害効果を予防、除去又は軽減する本発明の医薬組成物の量を意味する。当業者であれば、患者、病理、投与方法などに従って投与量を適合し得ると理解される。

【 0 0 2 6 】

本明細書全体において、本発明の医薬組成物に関する「ガンの処置」などが言及される場合はいつでも、以下の意味である：a) ガンを処置するための方法であって、本発明の医薬組成物を当該処置を必要とする被験体に投与することを含む、方法；b) ガンを処置するための、本発明の医薬組成物の使用；c) ガンを処置するための医薬品を製造するための、本発明の医薬組成物の使用；及び／又はd) ガンの処置に使用するための、本発明の医薬組成物。

【 0 0 2 7 】

本明細書において意図される医薬組成物は、有効成分に加えて、薬学的に許容しうる担体を含み得る。「薬学的に許容しうる担体」という用語は、有効成分の生物学的活性の効果を妨げず、それが投与されるホストに対して非毒性であるあらゆる担体（例えば、支持体、物質、溶媒など）を包含することを意味する。例えば、非経口投与の場合、有効成分は、生理食塩水、デキストロース溶液、血清アルブミン及びリンガー溶液などのビヒクルで注射用の単位剤形に製剤化され得る。

【 0 0 2 8 】

医薬組成物は、医薬適合性溶媒中で溶液として、又は適切な薬学的溶媒若しくはビヒクル中でエマルション、懸濁液若しくは分散液として、又は当技術分野において公知の方法で固体ビヒクルを含む丸剤、錠剤若しくはカプセル剤として製剤化され得る。経口投与に好適な本発明の製剤は、それぞれが所定量の有効成分を含む不連続単位（例えば、カプセ

10

20

30

40

50

ル剤、サシェ剤、錠剤又はトローチ剤)の形態;粉末若しくは顆粒の形態;水性液体若しくは非水液体の溶液若しくは懸濁液の形態;又は水中油型エマルション若しくは油中水型エマルションの形態であり得る。非経口投与に好適な製剤は、有効成分の滅菌油性又は水性調製物であって、好ましくはレシピエントの血液と等張であるものを都合よく含む。このような製剤はすべて、医薬適合性かつ非毒性である他の補助剤(例えば、安定化剤、抗酸化剤、結合剤、染料、乳化剤又は香味物質)も含み得る。本発明の製剤は、薬学的に許容しうる担体及び場合により他の治療成分と共に有効成分を含む。担体は、製剤の他の成分と適合性であるという意味で「許容されうる」ものでなければならず、そのレシピエントに有害であってはならない。医薬組成物は、有利には、適切な滅菌溶液の注射若しくは静脈内注入により、又は消化管経由の経口投与で適用される。これらの化学療法剤の大部分の安全かつ効果的な投与方法は、当業者に公知である。加えて、それらの投与は、標準的な文献に記載されている。

10

【0029】

本明細書において使用される「抗腫瘍化学療法」又は「化学療法」という用語は、化学的又は生化学的な物質を使用する、特に1つ又はいくつかの抗新生物剤を使用するガンの治療処置を指す。特に、それはまた、ホルモン療法及び免疫療法を含む。「ホルモン療法」という用語は、ホルモンを遮断、追加又は除去することが目的のガンの処置を指す。例えば、乳ガンでは、女性ホルモンのエストロゲン及びプロゲステロンは、いくつかの乳ガン細胞の成長を促進できる。従って、これらの患者では、ホルモン療法はエストロゲンを遮断するために行われるが、一般的に使用される薬物の非包括的なリストとしては、タモキシフェン、フェアストン、アリミデックス、アロマシン、フェマーラ、ゾラデックス/リュープロン、メガース及びハロテスチンが挙げられる。「免疫療法」という用語は、免疫系を使用してガンを排除するガンの治療処置を指す。この治療処置は、患者の免疫系を刺激して悪性腫瘍細胞を攻撃する。

20

【0030】

D bait 分子

D bait(Dベイト)分子は、国際公開第2005/040378号、国際公開第2008/034866号及び国際公開第2008/084087号(これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる)に詳細に記載されている。

30

【0031】

D bait分子は、それらの治療活性に必要な多数の特徴(例えば、最小長、少なくとも1つの自由末端の存在、及び二本鎖部分、好ましくはDNA二本鎖部分の存在)によって定義され得る。以下に考察されるように、D bait分子の厳密なヌクレオチド配列は、それらの活性に影響を与えないことに注意することが重要である。さらに、D bait分子は、改変された及び/又は非天然の骨格を含み得る。

【0032】

好ましくは、D bait分子は、非ヒト由来(すなわち、それらのヌクレオチド配列及び/又はコンフォメーション(例えば、ヘアピン)は、ヒト細胞などにおいて存在しない)、最も好ましくは合成起源である。D bait分子の配列は、もしあったとしても、わずかな役割しか果たしていないので、D bait分子は、好ましくは、公知の遺伝子、プロモーター、エンハンサー、5'又は3'上流配列、エクソン、イントロンなどとかなりの程度の配列相同性又は同一性を有しない。換言すれば、D bait分子は、ヒトゲノムの遺伝子と80%又は70%未満、さらに60%又は50%未満の配列同一性を有する。配列同一性を決定する方法は当技術分野において周知であり、例えば、BLASTが挙げられる。D bait分子は、ストリンジェントな条件下で、ヒトゲノムDNAとハイブリダイゼーションしない。典型的なストリンジェントな条件は、完全に相補的な核酸と部分的に相補的な核酸を区別できるようにするようなものである。

40

【0033】

加えて、周知の toll様レセプター介在性免疫学的反応を避けるために、D bait分子の配列は、好ましくは、CpGを持たない。

50

【0034】

D bait 分子の長さは、それが、Ku を含む Ku タンパク質複合体と DNA - PKcs タンパク質との適切な結合を可能にするのに十分である限り、変化し得る。当該 Ku 複合体への結合及び DNA - PKcs 活性化を確保するために、D bait 分子の長さは、20 bp よりも多く、好ましくは約 32 bp でなければならないことが示された。好ましくは、D bait 分子は、20 ~ 200 bp、より好ましくは 24 ~ 100 bp、さらにより好ましくは 26 ~ 100、最も好ましくは 24 ~ 200、25 ~ 200、26 ~ 200、27 ~ 200、28 ~ 200、30 ~ 200、32 ~ 200、24 ~ 100、25 ~ 100、26 ~ 100、27 ~ 100、28 ~ 100、30 ~ 100、32 ~ 200 又は 32 ~ 100 bp を含む。例えば、D bait 分子は、24 ~ 160、26 ~ 150、28 ~ 140、28 ~ 200、30 ~ 120、32 ~ 200 又は 32 ~ 100 bp を含む。
 「bp」は、この分子が、示される長さの二本鎖部分を含むことを意図する。

【0035】

特定の実施態様では、少なくとも 32 pb 又は約 32 bp の二本鎖部分を有する D bait 分子は、D bait 32 (配列番号 1)、D bait 32 Ha (配列番号 2)、D bait 32 Hb (配列番号 3)、D bait 32 Hc (配列番号 4) 又は D bait 32 Hd (配列番号 5) と同じヌクレオチド配列を含む。場合により、D bait 分子は、D bait 32、D bait 32 Ha、D bait 32 Hb、D bait 32 Hc 又は D bait 32 Hd と同じヌクレオチド組成を有するが、それらのヌクレオチド配列は異なる。そして、D bait 分子は、3 個の A、6 個の C、12 個の G 及び 11 個の T を有する二本鎖部分の一方の鎖を含む。好ましくは、D bait 分子の配列は、いかなる CpG ジヌクレオチドも含まない。

【0036】

あるいは、二本鎖部分は、D bait 32 (配列番号 1)、D bait 32 Ha (配列番号 2)、D bait 32 Hb (配列番号 3)、D bait 32 Hc (配列番号 4) 若しくは D bait 32 Hd (配列番号 5) の少なくとも 16 個、18 個、20 個、22 個、24 個、26 個、28 個、30 個又は 32 個の連続するヌクレオチドを含む。より特定の実施態様では、二本鎖部分は、D bait 32 (配列番号 1)、D bait 32 Ha (配列番号 2)、D bait 32 Hb (配列番号 3)、D bait 32 Hc (配列番号 4) 若しくは D bait 32 Hd (配列番号 5) の 20 個、22 個、24 個、26 個、28 個、30 個又は 32 個の連続するヌクレオチドからなる。

【0037】

D bait は、DSB の模倣物として、少なくとも 1 つの自由末端を有しなければならない。前記自由末端は、自由平滑末端又は 5' / 3' 突出末端のいずれかであり得る。本明細書において、「自由末端」は、5' 末端及び 3' 末端の両方を有するか、又は 3' 末端若しくは 5' 末端のいずれかを有する核酸分子、特に二本鎖核酸部分を指す。場合により、5' 及び 3' 末端の一方は、D bait 分子をコンジュゲーションするのに使用され得るか、又は保護基に連結され得る（例えば、a 又は 3' - 3' ヌクレオチド結合）。

【0038】

特定の実施態様では、それらは、2 つの自由末端を含み、直鎖状であり得る。従って、D bait 分子は、2 つの自由末端を有し、かつ、D bait 32 (配列番号 1)、D bait 32 Ha (配列番号 2)、D bait 32 Hb (配列番号 3)、D bait 32 Hc (配列番号 4) 又は D bait 32 Hd (配列番号 5) のヌクレオチド配列を有する二本鎖分子でもあり得る。

【0039】

別の特定の実施態様では、それらは、1 つの自由末端のみを含む。好ましくは、D bait 分子は、二本鎖 DNA ステム及びループを有するヘアピン核酸からなる。ループは、核酸若しくは当業者に公知の他の化学基又はそれらの混合物であり得る。ヌクレオチドリンカーは、2 ~ 10 個のヌクレオチド、好ましくは 3 個、4 個又は 5 個のヌクレオチドを含み得る。非ヌクレオチドリンカーとしては、包括的なものではないが、脱塩基ヌクレオ

チド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素、又は他のポリマー化合物（例えば、2～10個のエチレングリコール単位、好ましくは4個、5個、6個、7個又は8個のエチレングリコール単位を有するものなどのオリゴエチレングリコール）が挙げられる。好ましいリンカーは、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジレート（T4）及び他のリンカー（例えば、2,19-ビス（ホスホル）-8-ヒドラザ-1-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカン）からなる群より選択される。従って、特定の実施態様では、D bait 分子は、D bait 32（配列番号1）、D bait 32H a（配列番号2）、D bait 32H b（配列番号3）、D bait 32H c（配列番号4）若しくはD bait 32H d（配列番号5）の少なくとも16個、18個、20個、22個、24個、26個、28個、30個又は32個の連続するヌクレオチドを含む二本鎖部分又はステムと、ヘキサエチレングリコールリンカ、テトラデオキシチミジレートリンカ（T4）又は2,19-ビス（ホスホル）-8-ヒドラザ-1-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンであるループとを有するヘアピン分子であり得る。より特定の実施態様では、それらのD bait 分子は、D bait 32（配列番号1）、D bait 32H a（配列番号2）、D bait 32H b（配列番号3）、D bait 32H c（配列番号4）若しくはD bait 32H d（配列番号5）の20個、22個、24個、26個、28個、30個又は32個の連続するヌクレオチドからなる二本鎖部分を有し得る。
10

【0040】

D bait 分子は、好ましくは、2'デオキシヌクレオチド骨格を含み、場合により、1個若しくは数個（2個、3個、4個、5個又は6個）の改変ヌクレオチド並びに／又はアデニン、シトシン、グアニン及びチミン以外の核酸塩基を含む。従って、D bait 分子は、本質的には、DNA構造である。特に、D bait 分子の二本鎖部分又はステムは、デオキシリボヌクレオチドからなる。
20

【0041】

特に、D bait 分子を分解から保護するために、好ましいD bait 分子は、一方の又は各鎖の末端に、1個若しくは数個の化学的に改変されたヌクレオチド又は基を含む。特に好ましい実施態様では、D bait 分子の自由末端は、一方の若しくは各鎖の末端にある1個、2個又は3個の改変ホスホジエステル骨格によって保護される。好ましい化学基、特に改変ホスホジエステル骨格は、ホスホロチオエートを含む。あるいは、好ましいD bait は、3'-3'ヌクレオチド結合又はメチルホスホネート骨格を有するヌクレオチドを有する。他の改変骨格は当技術分野において周知であり、ホスホルアミデート、モルホリノ核酸、2'-0,4'-Cメチレン/エチレン架橋ロッド核酸、ペプチド核酸（PNA）、及び短鎖アルキル、又はシクロアルキル糖間結合若しくは可変長の短鎖ヘテロ原子又は複素環の糖間結合、又は当業者に公知の任意の改変ヌクレオチドを含む。第1の好ましい実施態様では、D bait 分子は、一方の若しくは各鎖の末端にある1個、2個又は3個の改変ホスホジエステル骨格によって、より好ましくは少なくとも3'末端、しかしさらにより好ましくは5'及び3'末端の両方にある3個の改変ホスホジエステル骨格（特に、ホスホロチオエート又はメチルホスホネート）によって保護された自由末端を有する。
30

【0042】

最も好ましい実施態様では、D bait 分子は、32bpのDNA二本鎖部分又はステム（例えば、配列番号1～5からなる群より選択される配列、特に配列番号4を有する）と、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジレート（T4）及び2,19-ビス（ホスホル）-8-ヒドラザ-1-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンからなる群より選択されるリンカーを含むか、若しくは当該リンカーからなる、DNA二本鎖部分又はステムの2つの鎖を連結するループとを含むヘアピン核酸分子であり、DNA二本鎖部分又はステムの自由末端（すなわち、ループの反対側）は、3個の改変ホスホジエステル骨格（特に、ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合）を有する。
40

【0043】

前記 D b a i t 分子は、化学合成、半生合成又は生合成、任意の増幅方法、続いて任意の抽出及び調製方法、そして任意の化学的改変によって作製される。リンカーは、標準的な核酸化学合成によって組み込むことができるように提供される。

【 0 0 4 4 】

より好ましくは、D b a i t 分子は、特別に設計された収束合成によって製造される：標準的な核酸化学合成によって、適切なリンカー前駆体が組み込まれた状態で 2 つの相補鎖が調製され、それらの精製後に、それらは互いに共有結合される。

【 0 0 4 5 】

場合により、D b a i t 分子は、エンドサイトーシス又は細胞取り込みを促進する分子にコンジュゲーションされ得る。

10

【 0 0 4 6 】

特に、エンドサイトーシス又は細胞取り込みを促進する分子は、脂溶性分子（例えば、コレステロール、単鎖又は二本鎖脂肪酸）、又は細胞レセプターをターゲティングしてレセプター介在性エンドサイトーシスを可能にするリガンド（例えば、葉酸及び葉酸塩誘導体又はトランスフェリン）であり得る（Goldstein et al. Ann. Rev. Cell Biol. 1985 1 :1-39; Leammon & Lowe, Proc Natl Acad Sci USA. 1991, 88: 5572-5576.）。この分子はまた、トコフェロール、糖、例えばガラクトース及びマンノース及びそれらのオリゴ糖、ペプチド、例えば R G D 及びボンベシン並びにタンパク質、例えばインテグリンであり得る。脂肪酸は、飽和又は不飽和の C₄ - C₂₈、好ましくは C₁₄ - C₂₂、さらにより好ましくは C₁₈（例えば、オレイン酸又はステアリン酸）であり得る。特に、脂肪酸は、オクタデシル又はジオレオイルであり得る。脂肪酸は、適切なリンカー（例えば、グリセロール、ホスファチジルコリン又はエタノールアミンなど）と結合したか、又は D b a i t 分子に結合させるのに使用されるリンカーによって互いに結合した二本鎖形態として見られ得る。本明細書において使用される「葉酸塩」という用語は、ブテロイン酸誘導体及び類似物を含む葉酸塩又は葉酸塩誘導体を指すことを意味する。本発明に使用するのに好適な葉酸の類似物及び誘導体としては、抗葉酸剤、ジヒドロ葉酸塩、テトラヒドロ葉酸塩、フォリン酸、ブテロポリグルタミン酸、1 - デザ、3 - デアザ、5 - デアザ、8 - デアザ、10 - デアザ、1, 5 - デアザ、5, 10ジデアザ、8, 10 - ジデアザ及び5, 8 - ジデアザ葉酸塩、抗葉酸剤並びにブテロイン酸誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる葉酸塩類似物は、米国特許出願公開第2004/242582号に記載されている。従って、エンドサイトーシスを促進する分子は、単鎖又は二本鎖脂肪酸、葉酸塩及びコレステロールからなる群より選択され得る。より好ましくは、エンドサイトーシスを促進する分子は、ジオレオイル、オクタデシル、葉酸及びコレステロールからなる群より選択される。最も好ましい実施態様では、D b a i t 分子は、コレステロールにコンジュゲーションされる。

20

【 0 0 4 7 】

エンドサイトーシスを促進する分子は、好ましくはリンカーによって D b a i t 分子にコンジュゲーションされる。当技術分野において公知の任意のリンカーが、エンドサイトーシスを促進する分子を D b a i t 分子に共有結合するのに使用され得る。例えば、国際公開第09/126933号は、便利なリンカーの広範なレビューを提供している（38 ~ 45 頁）。リンカーは、包括的なものではないが、脂肪族鎖、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素、又は、他のポリマー化合物（例えば、2 ~ 10 個のエチレングリコール単位、好ましくは 3 個、4 個、5 個、6 個、7 個又は 8 個のエチレングリコール単位、さらにより好ましくは 6 個のエチレングリコール単位を有するものなどのオリゴエチレングリコール）であり得、化学的又は酵素的な方法によって破壊され得る任意の結合（例えば、ジスルフィド結合、保護されたジスルフィド結合、酸に不安定な結合（例えば、ヒドラゾン結合）、エステル結合、オルトエステル結合、ホスホニアミド結合、バイオ開裂可能なペプチド結合、アゾ結合又はアルデヒド結合）を導入することができる。当該開裂可能なリンカーは、国際公開第2007/040469号の 12 ~ 14 頁、国際公開第2008/022309号の 22 ~ 28 頁に詳述されている。

30

40

50

【0048】

特定の実施態様では、D b a i t 分子は、1個のエンドサイトーシスを促進する分子に結合され得る。あるいは、数個のエンドサイトーシスを促進する分子（例えば、2個、3個又は4個）が、D b a i t 分子に結合され得る。

【0049】

具体的な実施態様では、エンドサイトーシスを促進する分子（特に、コレステロール）とD b a i t 分子との間のリンカーは、CO - NH - (CH₂ - CH₂ - O)_n（式中、nは、1～10の整数であり、好ましくは、nは、3、4、5及び6からなる群より選択される）である。非常に特定の実施態様では、リンカーは、CO - NH - (CH₂ - CH₂ - O)₄（カルボキサミドトリエチレングリコール）である。リンカーは、D b a i t 分子の活性を改変しない任意の都合のよい位置で、D b a i t 分子に結合され得る。特に、D b a i t 分子がヘアピンである場合、リンカーは、5'末端、3'末端又はループで結合され得る。しかしながら、ヘアピンD b a i t 分子の場合、本発明者らは、驚くべきことに、リンカーによって5'末端でD b a i t 分子に結合したコレステロールが、リンカーによってループでD b a i t 分子に結合したコレステロールよりも効率的であることを見出した。従って、好ましい実施態様では、意図されるコンジュゲートD b a i t 分子は、ヘアピン構造を有し、かつ、好ましくはリンカーによって、5'末端で、エンドサイトーシスを促進する分子にコンジュゲーションされているD b a i t 分子である。

【0050】

別の具体的な実施態様では、エンドサイトーシスを促進する分子（特に、コレステロール）とD b a i t 分子との間のリンカーは、ジアルキル-ジスルフィド{例えば、(CH₂)_r - S - S - (CH₂)_s（式中、r及びsは、1～10、好ましくは3～8の整数、例えば6である）}である。

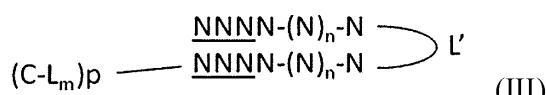
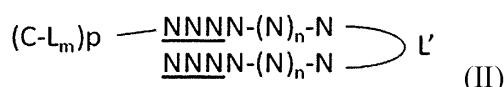
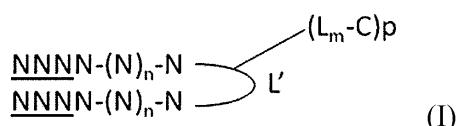
【0051】

最も好ましい実施態様では、コンジュゲートD b a i t 分子は、32bpのDNA二本鎖部分又はステム（例えば、配列番号1～5からなる群より選択される配列、特に配列番号4を有する）と、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジレート(T4)及び2,19-ビス(ホスホル)-8-ヒドラザ-1-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンからなる群より選択されるリンカーを含むか、若しくは当該リンカーからなる、DNA二本鎖部分又はステムの2つの鎖を連結するループとを含むヘアピン核酸分子であり、DNA二本鎖部分又はステムの自由末端（すなわち、ループの反対側）は、3個の改変ホスホジエステル骨格（特に、ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合）を有し、前記D b a i t 分子は、好ましくはリンカー（例えば、カルボキサミドオリゴエチレングリコール、好ましくはカルボキサミドトリエチレングリコール）によって、5'末端でコレステロールにコンジュゲーションされている。

【0052】

コンジュゲーションされているか若しくはコンジュゲーションされていないD b a i t 分子又はヘアピン核酸分子は、下記式：

【化5】



10

20

30

40

50

(式中、Nは、ヌクレオチドであり、nは、14より大きい整数であり、下線部のNは、改变ホスホジエステル骨格を有するか、又は有しないヌクレオチドを指し、L'は、リンカーホスホジエステル骨格を有する分子であり、Lは、リンカーホスホジエステル骨格を有する分子であり、m及びpは独立して、0又は1の整数である)によっても記載され得る。式(I I)及び(I I I)において、C-L_mは、それぞれ、ヌクレオチドの5'末端又は3'末端に結合されている。式(I ~ I I I)において、C-L_mは、好ましくは、ジスルフィド結合(S-S)によって、L'に結合されている。この分子がコンジュゲーションされる場合、pは1である。好ましくは、下線部のNは、改变ホスホジエステル骨格を有するヌクレオチドを指す。

【0053】

10

好ましい実施態様では、式(I)、(I I)又は(I I I)の分子は、下記特徴の1つ又はいくつかを有する：

- Nは、好ましくは、A(アデニン)、C(シトシン)、T(チミン)及びG(グアニン)からなる群より選択されるデオキシヌクレオチドであって、C p Gジヌクレオチドが存在しないように、かつ、ヒトゲノムの遺伝子と80%又は70%未満、さらに60%又は50%未満の配列同一性を有するように選択されるデオキシヌクレオチドである；及び/又は、

- nは、15~195、好ましくは19~95、より好ましくは21~95、さらにより好ましくは27~95の整数である。特に好ましい実施態様では、nは27である；及び/又は、

20

- 下線部のNは、ホスホロチオエート又はメチルホスホネート骨格、より好ましくはホスホロチオエート骨格を有するか、又は有しないヌクレオチドを指す；好ましくは、下線部のNは、改变ホスホジエステル骨格を有するヌクレオチドを指す；及び/又は、

- 連結されたL'は、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジレート(T4)及び2,19-ビス(ホスホル)-8-ヒドラザ-1-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンからなる群より選択される；及び/又は、

- mは、1であり、Lは、カルボキサミドポリエチレングリコール、より好ましくはカルボキサミドトリエチレングリコールである；及び/又は、

- Cは、コレステロール、単鎖若しくは二本鎖脂肪酸(例えば、オクタデシル、オレイン酸、ジオレオイル又はステアリン酸)、又は細胞レセプターをターゲティングするリガンド(ペプチド、タンパク質、アブタマーを含む)(例えば、葉酸、トコフェロール、糖、例えばガラクトース及びマンノース及びそれらのオリゴ糖、ペプチド、例えばRGD及びボンベシン並びにタンパク質、例えばトランスフェリン及びインテグリン)からなる群より選択され、好ましくはコレステロールである。

30

【0054】

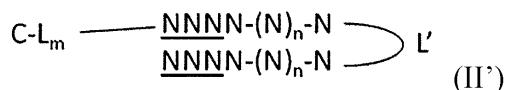
好ましくは、C-L_mは、トリエチレングリコールリンカー(10-O-[1-プロピル-3-N-カルバモイルコレステリル]-トリエチレングリコールラジカルである。

【0055】

好ましい実施態様では、コンジュゲートD bait分子又はヘアピン核酸分子は、下記式：

40

【化6】



(式中、N、N、n、L、L'、C及びmに関しては、式(I)、(I I)、(I I')及び(I I I)と同じ定義である)を有する。

【0056】

好ましい実施態様では、NNNN-(N)_n-Nは、D bait 32(配列番号1)、D bait 32 Ha(配列番号2)、D bait 32 Hb(配列番号3)、D bait 3

50

2 H c (配列番号4)若しくはD b a i t 3 2 H d (配列番号5)の少なくとも16個、18個、20個、22個、24個、26個、28個、30個又は32個の連続するヌクレオチドを含むか、又はD b a i t 3 2 (配列番号1)、D b a i t 3 2 H a (配列番号2)、D b a i t 3 2 H b (配列番号3)、D b a i t 3 2 H c (配列番号4)若しくはD b a i t 3 2 H d (配列番号5)の20個、22個、24個、26個、28個、30個又は32個の連続するヌクレオチドからなる。特定の実施態様では、N N N N - (N)_n - Nは、D b a i t 3 2 (配列番号1)、D b a i t 3 2 H a (配列番号2)、D b a i t 3 2 H b (配列番号3)、D b a i t 3 2 H c (配列番号4)又はD b a i t 3 2 H d (配列番号5)、より好ましくはD b a i t 3 2 H c (配列番号4)を含むか、又はこれからなる。

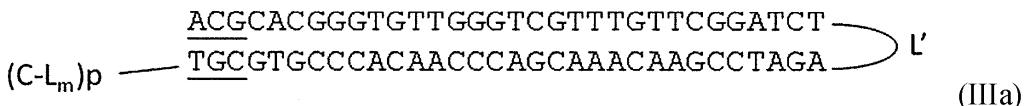
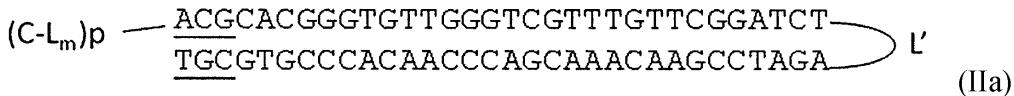
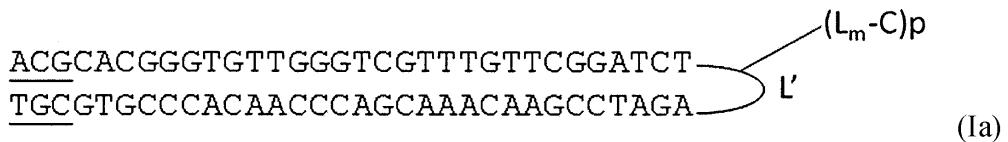
10

【0057】

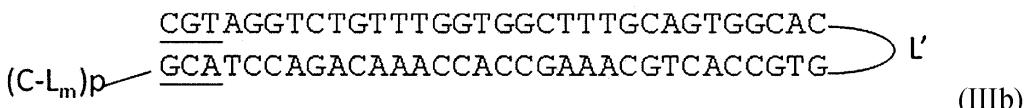
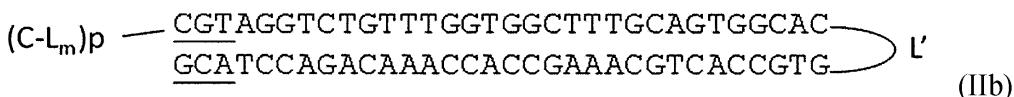
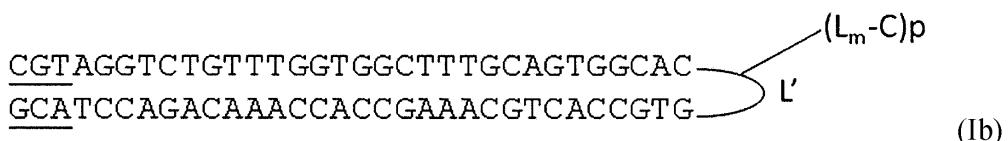
従って、コンジュゲートD b a i t 分子又はヘアピン核酸分子は、

【化7】

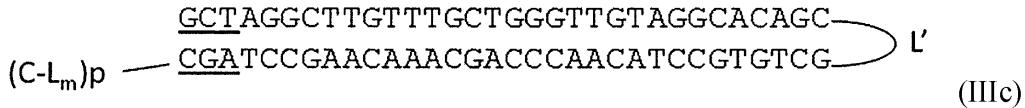
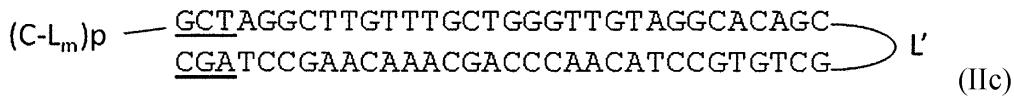
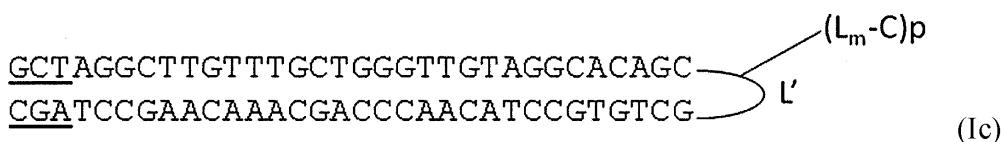
NNNN-(N)_n-N が配列番号 1 である場合



NNNN-(N)_n-N が配列番号 2 である場合



NNNN-(N)_n-N が配列番号 3 である場合



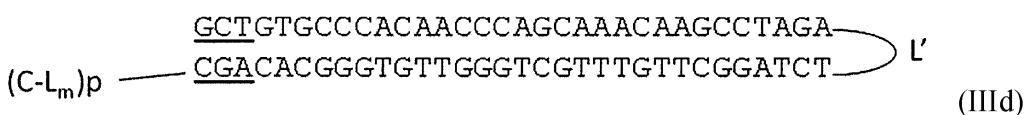
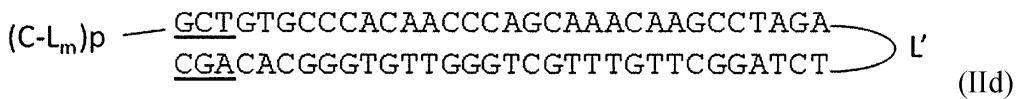
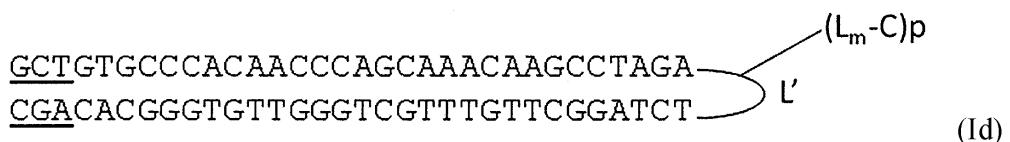
10

20

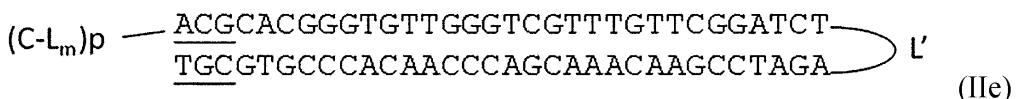
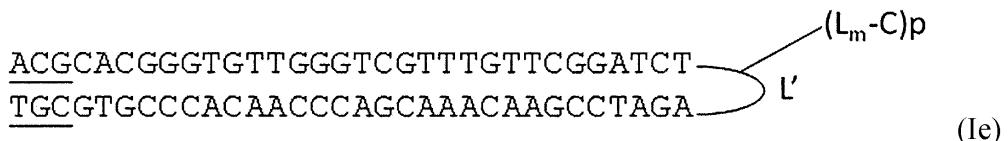
30

40

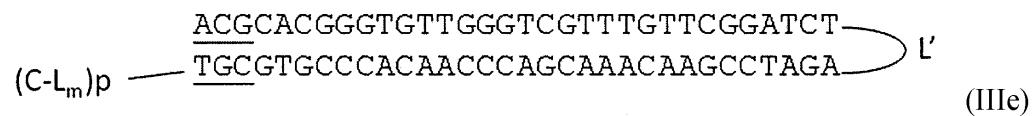
NNNN-(N)_n-N が配列番号 4 である場合



NNNN-(N)_n-N が配列番号 5 である場合



及び、



(式中、 L、 L'、 C、 p 及び m に関しては、式 (I)、 (II) 及び (III) と同じ定義である) からなる群より選択され得る。

【 0 0 5 8 】

好ましい実施態様では、式 (I a)、(I I a)、(I I I a)、(I b)、(I I b)、(I I I b)、(I c)、(I I c)、(I I I c)、(I d)、(I I d)、(I I I d)、(I e)、(I I e) 及び (I I I e)、好ましくは式 (I I)、(I I a)、(I I b)、(I I c)、(I I d) 及び (I I e) の分子は、下記特徴の 1 つ又はいくつかを有する：

- 下線部のヌクレオチドは、ホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート骨格、より好ましくはホスホロチオエート骨格を有するか、又は有しないヌクレオチドを指す；好ましくは、下線部のヌクレオチドは、ホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート骨格、より好ましくはホスホロチオエート骨格を有するヌクレオチドを指す；及び / 又は、

- 連結された L' は、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジレート (T 4) 及び 2 , 19 - ビス (ホスホル) - 8 - ヒドラザ - 1 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択される；及び / 又は、

- m は、1 であり、 L は、カルボキサミドポリエチレングリコール、より好ましくはカルボキサミドトリエチレングリコールである；及び / 又は、

- p は、1 である；及び / 又は、

- C は、コレステロール、单鎖若しくは二本鎖脂肪酸（例えば、オクタデシル、オレイン酸、ジオレオイル又はステアリン酸）、又は細胞レセプターをターゲティングするリガンド（ペプチド、タンパク質、アブタマーを含む）（例えば、葉酸、トコフェロール、

10

20

30

40

50

糖、例えばガラクトース及びマンノース及びそれらのオリゴ糖、ペプチド、例えばRGD及びボンベシン並びにタンパク質、例えばトランスフェリン及びインテグリン)からなる群より選択され、好ましくは、コレステロールである。

【 0 0 5 9 】

好ましくは、C-Lmは、トリエチレンギコールリンカー(10-O-[1-プロピル-3-N-カルバモイルコレステリル]-トリエチレンギコールラジカルである。

【 0 0 6 0 】

式(I)、(II)、(II')、(III)、(Ia)、(IIa)、(IIIA)、(Ib)、(IIb)、(IIIB)、(Ic)、(IIc)、(IIIC)、(Id)、(IID)、(IIID)、(Ie)、(IIe)及び(IIIE)、好ましくは式(I)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(Id)及び(IIe)のD bait分子又はヘアピン核酸分子の具体的な実施態様では、L'は、好ましくは、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジレート(T4)及び2,19-ビス(ホスホル)-8-ヒドラザ-1-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンからなる群より選択される。

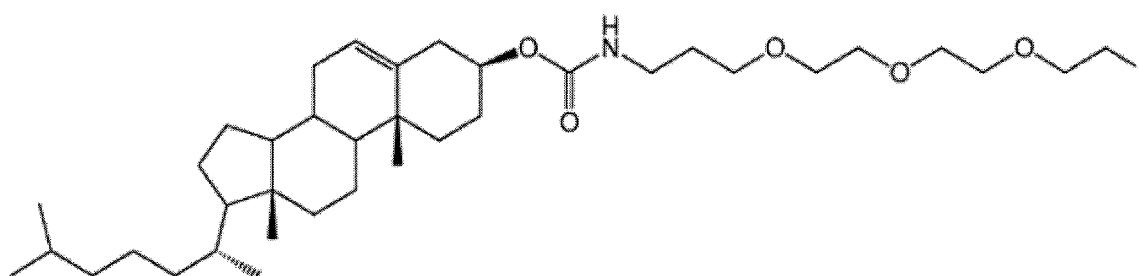
10

〔 0 0 6 1 〕

式(I)、(II)、(II')、(III)、(Ia)、(IIa)、(IIIA)、(Ib)、(IIB)、(IIIB)、(Ic)、(IIC)、(IIIC)、(Id)、(IId)、(IIId)、(Ie)、(IIe)及び(IIIE)、好ましくは式(I)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)及び(IIe)のD bait分子又はヘアピン核酸分子の具体的な実施態様では、Cがコレステロールである場合、C-L_mは、ラジカル

30

【化 8】



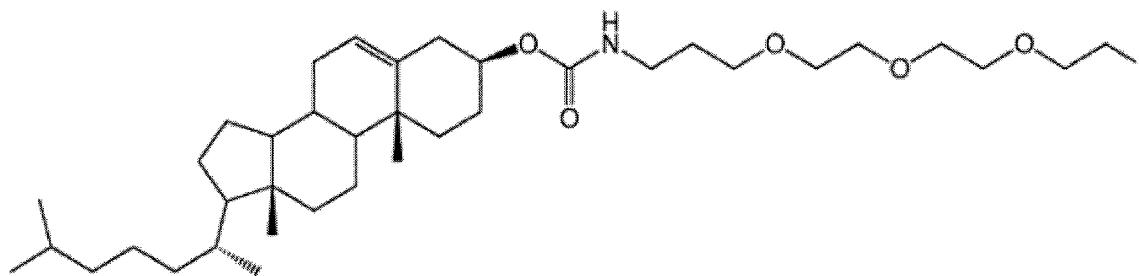
30

である。

【 0 0 6 2 】

好ましい実施態様では、コンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子は、(I I)、(I I ')、(I I a)、(I I b)、(I I c)、(I I d)及び(I I e)(式中、 C - L_m は、ラジカル

【化 9】



40

であり、

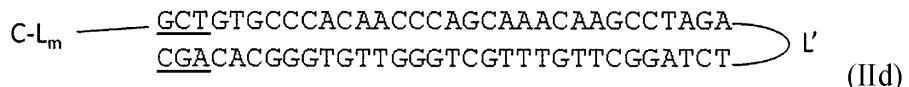
L'は、好ましくは、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジレート(T4)及び2,19-ビス(ホスホル)-8-ヒドラザ-1-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オ

50

キソ - ノナデカンからなる群より選択され、より好ましくは 2 , 19 - ビス (ホスホル) - 8 - ヒドラザ - 1 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンである) からなる群より選択される。

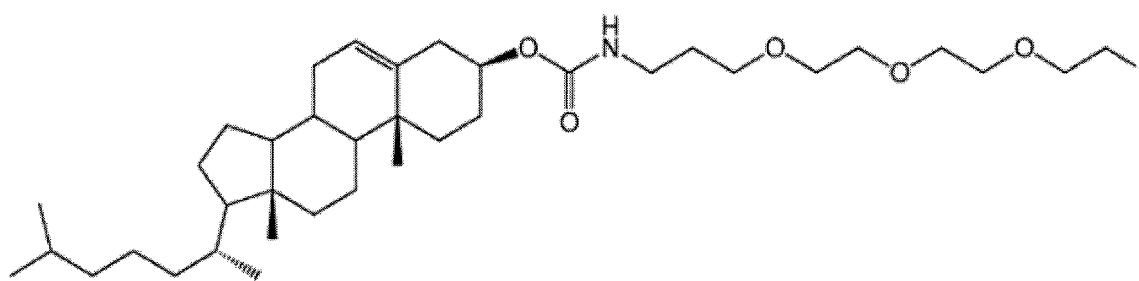
[0 0 6 3]

非常に具体的な実施態様では、D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子は、下記式【化 10】



(式中、 $C - L_m$ は、ラジカル

【化 1 1】

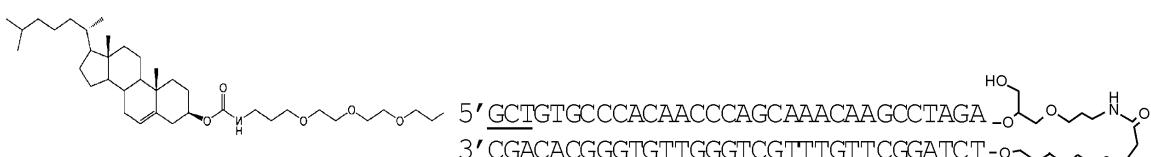


10

であり

L'は、2,19-ビス(ホスホル)-8-ヒドラザ-1-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンであり、下線部のヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格を有する)を有する。従って、この分子は下記構造を有し、それは、実施例のセクションにおいて「*c o D b a i t*」又は「*D T O 1*」と称される。

【化 1 2】



30

[0 0 6 4]

従つて、本発明はまた、以下に詳述されるように、温熱療法並びに放射線療法及び／又は放射性同位体療法及び／又は好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせてガンを処置するのに使用するための、又は放射線療法及び／又は放射性同位体療法及び／又は好ましくはDNA損傷抗腫瘍剤による抗腫瘍化学療法と組み合わせずに温熱療法と組み合わせてガンを処置するのに使用するための、上記に開示されるD bait分子、それと場合により薬学的に許容しうる担体とを含む医薬組成物の使用に関する。

[0 0 6 5]

溫熱療法

温熱療法は、体組織を高温に曝露してガン細胞を損傷及び殺傷するか、又は放射線及びある種の抗癌薬の効果に対してガン細胞をより感受性にする医療処置である。熱を送達し得る多くの技術があり、当業者に周知である。

[0 0 6 6]

温熱療法は、腫瘍に適用される局所温熱療法、組織、器官又はそれらの一部に適用される局部温熱療法、又は全身温熱療法であり得る。温熱処置は「重度」でもよいし、「軽度」でもよい。

[0 0 6 7]

「重度の温熱療法」は、腫瘍の熱焼灼を引き起すために、50~100、好ましく

50

は 60 ~ 100 の高温を腫瘍内に適用して、細胞のミトコンドリア酵素及び細胞質酵素に不可逆的損傷を誘導することを指すものである。

【 0068 】

「軽度の温熱療法」は、自然な高熱の温度と同等の温度を指すものである。軽度の温熱療法は、少なくとも 40 、好ましくは 40 ~ 42 、より好ましくは約 41 の体温そしてガン細胞の温度である。「中度の温熱療法」は、ガン細胞を少なくとも 41 、好ましくは 41 ~ 47 、より好ましくは 42 ~ 45 の範囲の温度で加熱する方法を指すものである。「高度の温熱療法」は、ガン細胞を少なくとも 50 の温度で加熱する方法を指すものである。高度の温熱療法は、局所温熱療法としてのみ適用される。

【 0069 】

温熱は、当技術分野において周知の様々な方法によって生じ得る。例えば、温熱処置は、マイクロ波 (R F A) 、超音波 (例えば、集束超音波 (F U S 又は H I F U)) 、赤外線、ナノ粒子若しくはナノチューブ、誘導加熱、磁気温熱療法、予熱された液体、例えば血液の灌流若しくは注入、腹腔内の液流の加熱、薬物誘導性温熱療法又は直接加熱によって実施され得る。

【 0070 】

局所温熱療法は、非常に狭い領域、好ましくは腫瘍を加熱することからなる。この文脈では、他の損傷を伴わずに腫瘍を殺傷することが目的である。加熱は、マイクロ波、高周波、超音波エネルギーによって、又は磁気温熱療法を使用することによって適用され得る。この文脈では、温熱療法は、中度から高度の温熱療法である。腫瘍部位に応じて、加熱は、体表面 (すなわち、表面温熱療法) に、又は注射針若しくはプローブを使用して生來の体腔又は組織の深部 (すなわち、間質温熱療法) に適用され得る。好ましい実施態様では、温熱療法は、腫瘍の高周波焼灼である。

【 0071 】

局部温熱療法は、器官、その一部、肢などの体の一部を加熱することからなる。この文脈では、器官又は肢を保護し、腫瘍細胞を弱体化させるために、温熱療法は中度の温熱療法である。局部温熱療法は、局所温熱療法と同じ方法によって弱めに又は少なめの期間実施され得る。あるいは、予熱された液体、例えば血液の灌流若しくは注入、又は腹腔内の液流の加熱が使用され得る。場合により、温熱療法を抗腫瘍化学療法と組み合わせる場合、抗腫瘍剤が予熱された液体に追加され得る。例えば、腹膜ガンを処置するために、持続温熱腹膜灌流 (C H P P) が使用され得る。

【 0072 】

全身温熱療法は、どちらかと言えば、転移性ガンを処置するために行われる。直接加熱は、患者を暖かい室内に座らせるか、又は彼を暖かい毛布に包むことによって行われ得る。薬物誘導性温熱療法は、患者が発熱するのを助けるために、薬物が被験体に投与される方法を指す。例えば、薬物は周辺の熱放散を妨げ得るか、代謝速度を増加させ得るか、細胞性免疫反応又は体液性免疫反応を惹起し得るか、内因性発熱物質を模倣し得るか、又は組織を損傷し得る。加えて、全身温熱療法は、赤外線温熱ドーム技術によって行われ得る。

【 0073 】

エンドソーム溶解剤

コンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子は、本明細書において、好ましくは、エンドソーム溶解剤 (例えば、クロロキン、融合脂質又はペプチド) と組み合わせて使用される。実際、エンドソーム溶解剤による処置は、エンドソームからのコンジュゲート D b a i t 分子の放出を促進する。特に、エンドソーム溶解剤は、pH の変化に応じてエンドソームの溶解に、そして、細胞成分又は細胞内成分に送達されるべき治療剤をパッケージ化できるカプセル化 (又はパッケージ化) 成分に影響を与えることができる。エンドソーム溶解物質としては、キノリン化合物、特に 4 - アミノキノリン及び 2 - フェニルキノリン化合物並びにそれらのアミノ、チオ、フェニル、アルキル、ビニル及びハロゲン誘導体、融合脂質、ペプチド又はタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

1 - ピロリジニル) - 2 , 5 - キシリジノキノリン、4 - [(4 - ジエチルアミノ) - 1 - メチルブチル - アミノ] - 6 - メトキシキノリン ; 4 - (4 - ヒドロキシ - , - ビス (2 - メチル - 1 - ピロリジニル) - 2 , 5 - キシリジノキノリン ; 4 - [(4 - ジエチルアミノ) - 1 - メチルブチル - アミノ] - 6 - メトキシキノリン ; 3 , 4 - ジヒドロ - 1 - (2 H) - キノリンカルボキシアルデヒド ; 1 , 1 ' - ペンタメチレンジキノリニウムジヨージド ; 8 - キノリノール硫酸塩並びにそれらのアミノ、アルデヒド、カルボキシル、ヒドロキシル、ハロゲン、ケト、スルフヒドリル及びビニル誘導体又は類似物。他の薬剤は、Naisbitt et al (1997, J Pharmacol Exp Therapy 280:884-893) 及び米国特許第5,736,557号に開示されている。より好ましい実施態様では、エンドソーム溶解剤は、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、デスマチルクロロキン、ヒドロキシクロロキンホスフェート及びデスマチルヒドロキシクロロキンからなる群より選択され得、好ましくはクロロキン又はヒドロキシクロロキンであり、より好ましくはクロロキンである。

【 0 0 7 5 】

別の実施態様では、エンドソーム溶解剤は、融合脂質、ペプチド又はタンパク質である。実際、多数の融合脂質、ペプチド又はタンパク質が、当技術分野において公知である。例えば、融合脂質、ペプチド又はタンパク質は、以下の特許出願に開示されているものである：国際公開第10057160号、米国特許出願公開2007/0293449号、米国特許出願公開2006/0051405号、国際公開第10053489号、国際公開第09126933号。特に、国際公開第09/126933号は、融合脂質、ペプチド及びタンパク質を提供する（23～29頁）。

【 0 0 7 6 】

D N A 損傷処置

D b a i t 分子がコンジュゲーションされる場合、D b a i t 分子及び温熱療法及びエンドソーム溶解剤に加えて、処置は、抗腫瘍処置、好ましくは、D N A 損傷剤又は放射線療法による処置もさらに含み得る。

【 0 0 7 7 】

D N A 損傷処置は、放射線療法若しくはD N A 損傷抗腫瘍剤による化学療法又はそれらの組み合わせであり得る。D N A 損傷処置は、ガン細胞において好ましくは比較的特異的にD N A 鎮の切断を誘導する処置を指す。

【 0 0 7 8 】

D N A 鎮切斷は、電離放射線（放射線療法）によって達成され得る。放射線療法としては、 γ 線、X線、及び／又は腫瘍細胞への放射性同位体の直接送達が挙げられるが、これらに限定されない。他の放射線療法としては、マイクロ波及びU V 照射が挙げられる。本発明では、放射線療法への他のアプローチも意図される。

【 0 0 7 9 】

D N A 鎮切斷は、放射性同位体療法によって、特に放射性同位体、好ましくはターゲティングされた放射性同位体の投与によって達成され得る。ターゲティングは、他の器官よりも1000倍良好に甲状腺によって特異的に吸収される同位体（例えば、放射性ヨウ素）の化学的特性によるものであり得る。あるいは、ターゲティングは、ターゲティング特性を有する別の分子、例えばハプテン又は抗体に放射性同位体を結合させることによって達成され得る。インジウム - 111 、ルテチウム - 171 、ビスマス - 212 、ビスマス - 213 、アスタチン - 211 、銅 - 62 、銅 - 64 、銅 - 67 、イットリウム - 90 、ヨウ素 - 125 、ヨウ素 - 131 、リン - 32 、リン - 33 、スカンジウム - 47 、銀 - 111 、ガリウム - 67 、プラセオジム - 142 、サマリウム - 153 、テルビウム - 161 、ジスプロシウム - 166 、ホルミウム - 166 、レニウム - 186 、レニウム - 188 、レニウム - 189 、鉛 - 212 、ラジウム - 223 、アクチニウム - 225 、鉄 - 59 、セレン - 75 、ヒ素 - 77 、ストロンチウム - 89 、モリブデン - 99 、ロジウム - 105 、パラジウム - 109 、プラセオジム - 143 、プロメチウム - 149 、エルビウム - 169 、イリジウム - 194 、金 - 198 、金 - 199 及び鉛 - 211 を含む多数の適切な放射性同位体のいずれかが使用され得るが、これらに限定されない。

【 0 0 8 0 】

10

20

30

40

50

DNA損傷抗腫瘍剤は、好ましくは、トポイソメラーゼI又はIIの阻害剤、DNA架橋剤、DNAアルキル化剤、代謝拮抗剤及び有糸分裂紡錘体の阻害剤からなる群より選択される。

【0081】

トポイソメラーゼI及び/又はIIの阻害剤としては、エトポシド、トポテカン、カンプトセシン、イリノテカン、アムサクリン、イントプリシン、アントラサイクリン、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン及びミトキサントロンが挙げられるが、これらに限定されない。トポイソメラーゼI及びIIの阻害剤としては、イントプリシン(intoplicin)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0082】

DNA架橋剤としては、シスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0083】

代謝拮抗剤は、核酸合成に関する酵素を遮断するか、又はDNAに組み込まれて誤った遺伝コードを生じさせ、アポトーシスを引き起こす。それらの非包括的な例としては、葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似物、プリン類似物及びアデノシンデアミナーゼ阻害剤、より具体的にはメトトレキサート、フルクスウリジン、シタラビン、6-メルカブトプリン、6-チオグアニン、フルダラビンホスフェート、ペントスタチン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン及びカペシタビンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

DNA損傷抗腫瘍剤とは、ナイトロジェンマスター、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソ尿素化合物、金属塩及びトリアゼンを含むアルキル化剤であり得るが、これらに限定されない。それらの非包括的な例としては、ウラシルマスター、クロルメチン、シクロホスファミド(CYTOXAN(R))、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシリル、ピポブロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホルアミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、フォテムスチン、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、チオテバ、ストレプトゾシン、ダカルバジン及びテモゾロミドが挙げられる。

【0085】

有糸分裂紡錘体の阻害剤としては、パクリタキセル、ドセタキセル、ビノレルビン、ラロタキセル(XRP9881とも称される; Sanofi-Aventis)、XRP6258(Sanofi-Aventis)、BMS-184476(Bristol-Meyer-Squibb)、BMS-188797(Bristol-Meyer-Squibb)、BMS-275183(Bristol-Meyer-Squibb)、オルタタキセル(IDN 5109、BAY 59-8862又はSB-T-101131とも称される; Bristol-Meyer-Squibb)、RPR 109881A(Bristol-Meyer-Squibb)、RPR 116258(Bristol-Meyer-Squibb)、NBT-287(TAPESTRY)、PG-パクリタキセル(CT-2103、PPX、パクリタキセルポリグルメックス、ポリグルタメート化パクリタキセル又はXyotax(商標)とも称される)、ABRAXANE(登録商標)(Nab-パクリタキセルとも称される; ABRAKIS BIOSCIENCE)、テセタキセル(DJ-927とも称される)、IDN 5390(INDENA)、タクサオプレキシン(ドコサヘキサエン酸-パクリタキセルとも称される; PROTARGA)、DHA-パクリタキセル(Taxoprexin(登録商標)とも称される)及びMAC-321(WYETH)が挙げられるが、これらに限定されない。Hennenfent & Govindan(2006, Annals of Oncology, 17, 735-749)のレビューも参照のこと。

【0086】

処置されるべきガン又は腫瘍

「ガン」「ガン性」又は「悪性」という用語は、典型的には無秩序な細胞成長を特徴とする哺乳動物の生理的状態を指すか、又はこれを説明するものである。ガンの例としては、例えば、白血病、リンパ腫、芽細胞腫、ガン腫及び肉腫が挙げられる。このようなガンのより具体的な例としては、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病(PHLALL)、扁平上皮細胞ガン、小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン、神経膠腫、胃腸ガン、腎ガン、卵巣ガン、肝臓ガン、直腸結腸ガ

10

20

30

40

50

ン、子宮内膜ガン、腎臓ガン、前立腺ガン、甲状腺ガン、神経芽細胞腫、膵臓ガン、多形性神経膠芽腫、子宮頸ガン、胃ガン (stomach cancer)、膀胱ガン、ヘパトーマ、乳ガン、結腸ガン、及び頭頸部ガン、胃ガン (gastric cancer)、胚細胞性腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、多発性骨髓腫、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性リンパ球性白血病、肥満細胞症、及び肥満細胞症に関連する症状が挙げられる。

【0087】

「白血病」は、造血器官の進行性悪性疾患を指し、一般的には、血液及び骨髓における白血球及びその前駆体の増殖並びに発生がゆがめられていることを特徴とする。白血病は、一般的には、(1)疾患の継続期間及び特徴 - 急性又は慢性；(2)関与する細胞の種類；骨髓（骨髓性）、リンパ（リンパ性）又は単球；及び(3)血中の異常細胞数の増加又は非増加 - 白血性又は非白血性（亜白血性）に基づいて、臨床的に分類される。白血病としては、例えば、急性非リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髓球性白血病、成人T細胞白血病、非白血性白血病、白血性白血病、好塩基球性白血病、芽細胞性白血病、ウシ白血病、慢性骨髓球性白血病、皮膚白血病、胎児性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、有毛細胞白血病、血球母細胞性白血病 (hemoblastic leukemia)、血球芽細胞性白血病 (hemocytoblastic leukemia)、組織球性白血病、幹細胞性白血病、急性単球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性 (lymphatic) 白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ性 (lymphogenous) 白血病、リンパ性 (lymphoid) 白血病、リンパ肉腫細胞性白血病、肥満細胞性白血病、巨核球性白血病、小骨髓芽球性白血病、単球性白血病、骨髓芽球性白血病、骨髓球性白血病、骨髓性顆粒球性白血病、骨髓性単球性白血病、ネーゲリ白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、前骨髓球性白血病、リーダー細胞性白血病、シリング白血病、幹細胞性白血病、亜白血性白血病、及び未分化細胞性白血病が挙げられる。ある態様では、本発明は、慢性骨髓性白血病、急性リンパ芽球性白血病及び／又はフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病 (Ph+ ALL) の処置を提供する。

【0088】

以下ものを含む様々なガンも本発明の範囲に包含されるが、これらに限定されない：膀胱（加速性及び転移性膀胱ガンを含む）、乳房、結腸（結腸直腸ガンを含む）、腎臓、肝臓、肺（小細胞肺ガン及び非小細胞肺ガン並びに肺腺ガンを含む）、卵巣、前立腺、精巣、尿路、リンパ系、直腸、喉頭、膵臓（外分泌膵臓ガンを含む）、食道、胃、胆嚢、頸部、甲状腺及び皮膚（扁平上皮細胞ガンを含む）のガンを含むガン；白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、ホジキンズリンパ腫、非ホジキンズリンパ腫、有毛細胞リンパ腫、組織球性リンパ腫及びバーケットリンパ腫を含むリンパ系の造血性腫瘍；急性及び慢性骨髓性白血病、骨髓異形性症候群、骨髓性白血病及び前骨髓球性白血病を含む骨髓系の造血性腫瘍；星細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫及びシュワン腫を含む中枢神経系及び末梢神経系の腫瘍；線維肉腫、横紋筋肉腫及び骨肉腫を含む間葉起源の腫瘍；メラノーマ、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞ガン及び奇形ガン腫を含む他の腫瘍；メラノーマ、病期ⅠⅡⅢ又はⅣの切除不能な悪性メラノーマ、扁平上皮細胞ガン、小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン、神経膠腫、胃腸ガン、腎ガン、卵巣ガン、肝臓ガン、直腸結腸ガン、子宮内膜ガン、腎臓ガン、前立腺ガン、甲状腺ガン、神経芽細胞腫、膵臓ガン、多形性神経膠芽腫、子宮頸ガン、胃ガン (stomach cancer)、膀胱ガン、ヘパトーマ、乳ガン、結腸ガン、及び頭頸部ガン、網膜芽腫、胃ガン (gastric cancer)、胚細胞性腫瘍、骨ガン、骨腫瘍、骨の成人悪性線維性組織球腫；骨の小児悪性線維性組織球腫、肉腫、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、新生物、形質細胞新生物；骨髓異形成症候群；神経芽細胞腫；精巣性胚細胞腫瘍、眼内メラノーマ、骨髓異形成症候群；骨髓異形成／骨髓増殖性疾患、滑膜肉腫。加えて、障害としては、他のガンに加えて、色素性じんま疹、肥満細胞症、例えばびまん性皮膚肥満細胞症、ヒトの孤立性肥満細胞腫、並びにイヌ肥満細胞腫、並びに水胞性、紅皮性及び毛細血管拡張性肥満細胞症のようないくつかの稀なサブタイプ、血液障害に関連する肥満細胞症、例えば骨髓増殖性若しくは骨髓異形成症候群、又は急性白血病、肥満細胞症に関連する骨髓

10

20

30

40

50

増殖性障害、肥満細胞性白血病が挙げられる。以下のものを含む他のガンも障害の範囲に含まれるが、これらに限定されない：膀胱、尿路上皮ガン、乳房、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、胰臓、胃、子宮頸部、甲状腺、精巣（特に、精巣精上皮腫）及び皮膚（扁平上皮細胞ガンを含む）のガンを含むガン；胃腸間質腫瘍（「G I S T」）；白血病、急性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞性リンパ腫、T細胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、有毛細胞リンパ腫及びバーケットリンパ腫を含むリンパ球系の造血性腫瘍；急性及び慢性骨髓性白血病並びに前骨髓球性白血病を含む骨髓系の造血性腫瘍；線維肉腫及び横紋筋肉腫を含む間葉起源の腫瘍；メラノーマ、精上皮腫、奇形ガン、神経芽細胞腫及び神経膠腫を含む他の腫瘍；星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫及びシュワン細胞腫を含む中枢神経系及び末梢神経系の腫瘍；線維肉腫、横紋筋肉腫及び骨肉腫を含む間葉起源の腫瘍；並びにメラノーマ、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞ガン、奇形ガン、化学療法不応性非精上皮腫胚細胞性腫瘍、及びカポジ肉腫を含む他の腫瘍、並びにあらゆるそれらの転移。

【0089】

本発明の好ましい実施態様では、ガンは、固体腫瘍である。ガンはまた、血液ガンであり得る。例えば、ガンは、肉腫及び骨肉腫（osteosarcoma）、例えばカポジ肉腫、エイズ関連カポジ肉腫、メラノーマ、特にブドウ膜メラノーマ（ulveal melanoma）、並びに頭頸部、腎臓、卵巣、胰臓、前立腺、甲状腺、肺、食道、乳房、膀胱、結腸直腸、肝臓及び胆道、子宮、虫垂及び頸部のガン、並びに精巣ガン、胃腸ガン、並びに子宮内膜ガン及び腹膜ガンであり得る。好ましくは、ガンは、肉腫、メラノーマ、特にブドウ膜メラノーマ（ulveal melanoma）、並びに頭頸部、腎臓、卵巣、胰臓、前立腺、甲状腺、肺、食道、乳房、膀胱、結腸直腸、肝臓、頸部のガン、並びに子宮内膜ガン及び腹膜ガンであり得る。非常に具体的な実施態様では、ガンは、腹膜ガン及び肝臓ガンであり得る。特定の実施態様では、ガンは、特に放射線焼灼（R F A）との組み合わせでは大きな肝臓癌腫及び肝転移であり得る。別の特定の実施態様では、ガンは、特に温熱腹膜化学療法（H I P E C）との組み合わせでは腹膜ガン症（peritoneal carcinomatosis）であり得る。

【0090】

本発明において記載される医薬組成物及び製品、キット又は複合調製物は、固体腫瘍の成長を阻害するために、腫瘍容積を減少させるために、腫瘍の転移拡散及び微小転移の成長又は発生を予防するために有用であり得る。本発明において記載される医薬組成物及び製品、キット又は複合調製物は、予後不良患者又は放射線療法若しくは化学療法耐性腫瘍の処置に特に好適である。

【0091】

レジメン、投与量及び投与経路

本発明の複合調製物において使用される各組み合わせパートナーの有効投与量は、使用される特定の化合物又は医薬組成物、投与方法、処置中の病状、処置中の病状の重症度に応じて変わり得る。従って、本発明の複合調製物の投与量レジメンは、投与経路及び患者の状態を含む様々な要因に従って選択される。通常の技術を有する医師、臨床医又は獣医は、病状の進行を予防、対抗又は停止するのに必要な単一有効成分の有効量を容易に決定及び規定できる。毒性を伴わずに効果をもたらす範囲内の有効成分濃度を達成する最適精度には、ターゲット部位に対する有効成分のアベイラビリティの動態に基づくレジメンを必要とする。

【0092】

温熱処置は、D bait 分子の投与前に、D bait 分子の投与と同時に、又はD bait 分子の投与後に適用され得る。より好ましくは、温熱療法は、好ましくはD bait 分子を投与した5分～24時間後、より好ましくは1～6時間後に適用される。

【0093】

D bait 分子の投与経路は、経口、非経口、静脈内、腫瘍内、皮下、頭蓋内、動脈内、局所、直腸、経皮、皮内、鼻腔内、筋肉内、腹腔内、骨内などであり得る。好ましい実施態様では、D bait 分子は、処置されるべき腫瘍部位付近に投与又は注射される。特

10

20

30

40

50

定の実施態様では、処置されるべきガンが腹膜ガン症である場合、D b a i t 分子は、カプノ腹膜 (capnoperitoneum) で送達され得る。別の特定の実施態様では、処置されるべきガンがヘパトーマである場合、D b a i t 分子は、静脈内注射、口腔注射又は動脈内注射及び塞栓によって送達され得る。さらなる特定の実施態様では、処置されるべきガンがメラノーマである場合、D b a i t 分子は、皮下注射及び静脈内注射によって送達され得る。別の好ましい投与経路は、腫瘍内注射である。

【 0 0 9 4 】

D b a i t 分子がコンジュゲーションされる場合、エンドソーム溶解剤及びコンジュゲート D b a i t 分子は、同じ経路又は 2 つの異なる経路によって投与され得る。エンドソーム溶解剤、好ましくはクロロキン又はヒドロキシクロロキン、より好ましくはクロロキンの投与経路は、経口、非経口、静脈内、腫瘍内、皮下、頭蓋内、動脈内、局所、直腸、経皮、皮内、鼻腔内、筋肉内、腹腔内、骨内などであり得る。特定の実施態様では、エンドソーム溶解剤、好ましくはクロロキン又はヒドロキシクロロキン、より好ましくはクロロキンは、経口経路又は腹腔内経路、好ましくは経口経路によって投与される。同時注射又は局所注射の利点は、血漿中の薬物動態プロファイルをマッチさせる必要がないことである。10

【 0 0 9 5 】

コンジュゲート D b a i t 分子の第 1 の好ましい実施態様では、処置レジメンは、コンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子による処置の開始前に、エンドソーム溶解剤、好ましくはクロロキンによる患者の前処置の工程を含む。例えば、エンドソーム溶解剤は、処置されるべき腫瘍部位付近に投与（例えば、局所投与）される場合、コンジュゲート D b a i t 分子若しくはヘアピン核酸分子の投与と共に、又はその少なくとも若しくは約 1、2、3、4 若しくは 5 時間前、好ましくは約 1 ~ 3 時間前、より好ましくは約 2 時間に投与され得る。あるいは、エンドソーム溶解剤は、全身投与によって投与される場合、コンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子の投与のかなり前により長期の処置によって、好ましくは、コンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子の投与の約 1 ~ 3 週間前の期間に、より好ましくは約 2 週間の期間に投与され得る。コンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子が投与されているか、又は投与されたら、エンドソーム溶解剤による処置は、コレステロールコンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子が投与される限り、継続し得る。あるいは、エンドソーム溶解剤による処置も終了し得る。2030

【 0 0 9 6 】

D N A 損傷抗腫瘍剤が、D b a i t 分子と組み合わせて使用される場合、D N A 損傷抗腫瘍剤及び D b a i t 分子は、同じ経路又は異なる経路によって投与され得る。D N A 損傷抗腫瘍剤の投与経路は、経口、非経口、静脈内、腫瘍内、皮下、頭蓋内、動脈内、局所、直腸、経皮、皮内、鼻腔内、筋肉内、骨内などであり得る。

【 0 0 9 7 】

特定の実施態様では、D N A 損傷抗腫瘍剤は、経口経路によって投与され、D b a i t 分子は、腫瘍内注射、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射又は経口経路、好ましくは腫瘍内、皮下若しくは腹腔内注射又は経口経路、さらにより好ましくは腫瘍内又は皮下によって投与され得る。40

【 0 0 9 8 】

D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子は、放射線照射及び / 若しくは D N A 損傷抗腫瘍剤の投与の前に並びに / 又はそれと同時に並びに / 又はその後に、より好ましくは、放射線照射及び / 若しくは D N A 損傷抗腫瘍剤の投与の前に並びに / 又はそれと同時に投与される。放射線照射が適用される場合、又は D N A 損傷抗腫瘍剤が腫瘍細胞に到達する場合、放射線照射及び / 又は D N A 損傷抗腫瘍剤の投与は、D b a i t 分子が腫瘍細胞で存在するように実施される。有効成分、ターゲット部位に対するそれらのアベイラビリティの動態、又は血漿中のそれらの薬物動態プロファイルに基づいて、通常の技術を有する医師、臨床医又は獣医は、レジメンを決定できる。予備的な結果は、D b a i t 分子が 1 日中50

活性であり続けることを示している。

【0099】

コンジュゲートDbait分子の具体的な好ましい実施態様では、処置レジメンは、コンジュゲートDbait分子又はヘアピン核酸分子による処置の開始前に、エンドソーム溶解剤、好ましくはクロロキン又はヒドロキシクロロキン、より好ましくはクロロキンによる患者の前処置の工程を含む。次いで、コンジュゲートDbait分子又はヘアピン核酸分子による処置の開始時に、又はコンジュゲートDbait分子又はヘアピン核酸分子による処置後に、放射線照射が適用されるか、又はDNA損傷抗腫瘍剤が投与される。例えば、コンジュゲートDbait分子による処置の開始3～24時間後に、放射線照射が適用されるか、又はDNA損傷抗腫瘍剤が投与される。DNA損傷抗腫瘍剤及びコンジュゲートDbait分子は、同時投与もされ得る。10

【0100】

放射線療法又はDNA損傷抗腫瘍剤による処置が開始すると、放射線療法又はDNA損傷抗腫瘍剤による処置が適用されるか、又は投与される限り、Dbait分子による処置は、継続し得る。あるいは、Dbait分子による処置も終了し得る。

【0101】

温熱療法と組み合わせて使用されるDbait分子の有効投与量は、投与方法、処置中の病状、処置中の病状の重症度に応じて変わり得る。従って、Dbait分子の投与量レジメンは、投与経路及び患者の状態を含む様々な要因に従って選択される。通常の技術を有する医師、臨床医又は獣医は、ガンの進行を予防、対抗又は停止するのに必要なDbait分子の有効量を容易に決定及び規定できる。20

【0102】

例えば、局所投与の場合（例えば、腫瘍内又は皮下投与が使用される場合）、Dbait分子の有効量は、少なくとも0.01mg/腫瘍1cm³、好ましくは0.1～40mg/腫瘍1cm³、最も好ましくは1～20mg/腫瘍1cm³である。有効量は、毎日処置プロトコール（例えば、5日/週を3～6週間連続、又は週3回を3～6週間連続）で投与され得る。あるいは、少なくとも0.1mg/腫瘍1cm³、好ましくは0.1～40mg/腫瘍1cm³、最も好ましくは1～20mg/腫瘍1cm³の有効量は、例えば、毎週処置プロトコールで3～6週間連続投与され得る。他の投与経路が使用される場合、当業者であれば、特に、毎日処置プロトコール又は毎週処置プロトコールで、少なくとも0.01mg/腫瘍1cm³、好ましくは0.1～40mg/腫瘍1cm³、最も好ましくは1～20mg/腫瘍1cm³の腫瘍におけるDbait分子の有効量を得るために、この量を適合できる。例えば、全身経路の場合、Dbait分子の有効量又は単位投与量は、0.1～100mg、好ましくは4～40mgであり得る。従って、全身経路の場合、Dbait分子の有効量又は単位投与量は、0.06～0.6mg/kg患者であり得る。当然ながら、当業者であれば、化学療法及び/又は放射線療法レジメンを考慮して、投与量及びレジメンを適合できる。30

【0103】

エンドソーム溶解剤、特にクロロキン又はヒドロキシクロロキン、より好ましくはクロロキンに関して、本発明の複合調製物、キット又は製品において使用されるエンドソーム溶解剤の有効投与量は、投与方法、処置中の病状、処置中の病状の重症度に応じて変わり得る。従って、エンドソーム溶解剤の投与量レジメンは、投与経路及び患者の状態を含む様々な要因に従って選択される。通常の技術を有する医師、臨床医又は獣医は、特に、コンジュゲートDbait分子及び選択されたDNA損傷処置と組み合わせて、ガンの進行を予防、対抗又は停止するのに必要なエンドソーム溶解剤の有効量を容易に決定及び規定できる。特定の実施態様では、経口経路が使用され、選択されたエンドソーム溶解剤が、マラリアを処置又は予防するのに有用であることが公知である場合、エンドソーム溶解剤、特にクロロキン又はヒドロキシクロロキン、より好ましくはクロロキンは、マラリアを処置又は予防するのと同じ用量及びレジメンで使用される。例えば、選択されたエンドソーム溶解剤が、クロロキン又はヒドロキシクロロキン、より好ましくはクロロキンである場合、クロロキン又はヒドロキシクロロキンは、100～600mg/日、好ましくは204050

0～400mg/日、より好ましくは約300mg/日で、週1回、週2回、週3回又は週4回投与され得る。特定の実施態様では、クロロキン又はヒドロキシクロロキンは、1若しくは2週間に約100mg/日で投与され得るか、又は1若しくは2週間に約300mgを週2回投与され得る。別の特定の実施態様では、局所経路、例えば皮下又は腫瘍内経路が意図される場合、エンドソーム溶解剤、特にクロロキン又はヒドロキシクロロキン、より好ましくはクロロキンは、100～300mgで使用され得る。

【0104】

放射線療法に関して、当技術分野において公知の任意の放射線療法レジメンが使用され得る（特に、定位放射線照射（例えば、15Gy）又は分割放射線照射）。分割放射線照射の使用が特に効率的であり得、例えば、放射線照射は、1、2、3、4、5又は6週間にわたって毎日又は2～5日ごとに、好ましくは3～4日ごとに適用され得る。放射線照射は、1～10Gy、好ましくは2～5Gy、特に2、3、4又は5Gyであり得る。例えば、6週間で2Gyを15回、又は2週間で5Gyを4～6回の分割放射線照射が意図され得る。好ましい実施態様では、意図される放射線療法は、2週間で5Gyの放射線照射を4回のプロトコールである。放射線照射及びD bait分子によるガンの併用処置についての様々なレジメン又は条件を試験し、D bait分子による腫瘍の放射線増感が、放射線量ではなくD bait分子の用量に依存することを実証した。

【0105】

化学療法に関して、本発明の複合調製物、キット又は製品において使用されるか、又は本発明の組成物と組み合わせて使用されるDNA損傷抗腫瘍剤の有効投与量は、使用される特定のDNA損傷抗腫瘍剤、投与方法、処置中の病状、処置中の病状の重症度に応じて変わり得る。従って、DNA損傷抗腫瘍剤の投与量レジメンは、投与経路及び患者の状態を含む様々な要因に従って選択される。通常の技術を有する医師、臨床医又は獣医は、ガンの進行を予防、対抗又は停止するのに必要なDNA損傷抗腫瘍剤の有効量を容易に決定及び規定できる。

【0106】

処置は、1サイクル又は数サイクル、例えば2～10サイクル、特に2、3、4又は5サイクルを含み得る。サイクルは連続してもよいし、分割されてもよい。例えば、各サイクルは、1～8週間、好ましくは3～4週間の期間によって分割される。

【0107】

本発明のさらなる態様及び利点を以下の実施例で説明するが、これは例示的かつ非限定的なものであるとみなされるべきである。

【0108】

実施例

結果

D bait 32Hcは、in vitroにおいて、温熱療法と結び付けた場合に相乗的な細胞毒性を示す。

最初に、本発明者らは、D bait 32Hc又はD bait 8H(DNA-PKに対する活性を有しないトランスフェクションコントロール)で処置したMRC5及びHT29細胞を試験し、次いで43の温熱療法に1時間供し、1時間後に固定した。D bait 32HcをRFAに追加することの妥当性を評価するために、本発明者らは、トリパンブルーアッセイを実施して、処置により誘導された細胞死を測定した。D bait 32Hc処置の後、MRC5及びHT29の培養液を41又は43の温熱療法に1時間供し、48時間後に細胞死を評価した(図1)。このアッセイにより、穏やかな温度変化によって細胞を処置した際に、それ自体によって細胞死は誘導されなかったことが示された。不活性なD bait分子であるD bait 8Hの追加は細胞生存を変化させなかったのに対して、温度変化前にD bait 32Hcを追加すると30%～50%の死亡率がトリガーされる。NU7026の追加により熱増感が無効化したことから、この効果はDNA-PKに厳密に依存していた。

【0109】

10

20

30

40

50

腫瘍の壊死及び有糸分裂の病理組織学的分析

H T 2 9 を側腹部に異種移植したマウスモデルを使用して、R F A、D T 0 1 及び併用処置を実施した。本研究では、R F A 処置の 2 4 時間前及び 5 時間前に、D T 0 1 の腫瘍内注射及び皮下注射を実施した。急性処置の有効性を評価するために、処置 7 2 時間後に、大きな処置腫瘍の組織学的切片化を行った。ヘマトキシリンエオシン染色を実施して、組織構造、血管新生、壊死領域及び有糸分裂指数を分析した（図 3 及び表 1）。

【0 1 1 0】

【表 1】

処置	生存研究			病理学的研究			10
	中央値 (日数)	部分反応*	完全反応*	サンプル数	有糸分裂**	生存細胞 (%)	
偽処置	28	0/11	0/11	7	19.4 ± 1.5	74 ± 3	23.7 ± 8.2
D T 0 1	37	0/14	1/14	8	16 ± 1.3	54 ± 6.1	14.25 ± 1.5
R F A	40	1/13	1/13	8	14 ± 1.5	41 ± 6.4	13.5 ± 2.6
R F A + D T 0 1	57	3/11	6/11	8	4.4 ± 1.7	21 ± 6.6	5.75 ± 1.6

* RECIST基準

** 各腫瘍サンプルについて、5つの代表的な領域（倍率×40）の平均値。

20

表 1

【0 1 1 1】

（D T 0 1 と組み合わせて、又は組み合わせずに）R F A で処置した検体は、処置領域において、過色素性の不規則な核、好酸性細胞質及び低い分裂速度を有する小さな変性異型細胞を含む凝固壊死領域、を示した（図 3）。活性増殖型の構成成分と比較したところ、これらのジストロフィー細胞の形態により類壊死の機序が示唆された。D T 0 1（それぞれ 6 mg の局所注射を 2 回）と組み合わせた R F A で処置した検体は、R F A 単独（p = 0 . 0 3）又は D T 0 1 単独（p = 0 . 0 0 0 8）と比較して有意に大きな壊死領域及び変性ジストロフィー細胞領域を示したが、未処置検体は、特により大きな腫瘍についてはわずかな自然壊死領域を示した。さらに、D T 0 1 と組み合わせた R F A で処置した検体については、主に周辺部において、生存能力のあると思われる腫瘍領域がより小さいことが認められ（p < 0 . 0 5）、有糸分裂指数がより小さかった（p < 0 . 0 5）。検体の 3 / 8 は、7 2 時間の時点で生存腫瘍を示しすらしなかった。

30

【0 1 1 2】

結論としては、図 3 に示されるように、D T 0 1 と組み合わせた R F A で処置した検体は、R F A 単独又は D T 0 1 単独と比較して有意に大きな壊死領域及び変性細胞領域、小さな増殖細胞領域、並びに少ない有糸分裂回数を示した。

【0 1 1 3】

D T 0 1 は、R F A の抗腫瘍効果及び全生存期間を増加させる

40

図 2 に示されるように、R F A 又は D T 0 1 単独による処置は、無処置と比較して適度な抗腫瘍効果をもたらした。R F A 及び D T 0 1 の併用療法は、R F A 単独又は D T 0 1 単独による処置と比較して腫瘍成長の相乗的な減少をもたらした。

【0 1 1 4】

R F A 及び D T 0 1 の併用療法群では、未処置動物、R F A 単独及び D T 0 1 単独と比較して生存が有意に高められた（図 2 C 及び表 1）。D T 0 1 - R F A の組み合わせによって処置したマウスは R F A 単独と比較して有意に長い生存期間を有しており（生存期間中央値：5 7 日間対 4 0 日間、p < 0 . 0 0 1）、コントロールと比較して R F A は単独で生存期間を改善した（生存期間中央値：4 0 日間対 2 8 日間、p < 0 . 0 0 1）。

【0 1 1 5】

50

処置の有効性を評価するために、均一サイズの（大きな）異種移植腫瘍において、処置を実施した。分子 6 mg の D T 0 1 の局所注射は、連続 4 日間にわたって 1 日に 1 回実施した（それぞれの合計は 24 mg）。R F A 処置は、3 回目の D T 0 1 の注射後に 5 時間実施した。モック又は R F A 処置後 1 日目及び 4 日目に、腫瘍の標準写真を撮影した（図 2 A）。ここで、モック処置と比較して D T 0 1 は単独で腫瘍壊死を誘導することを確認した。黒色の壊死領域によって示されるように、R F A 処置は単独で凝固壊死をトリガーした。しかしながら、R F A を単独で適用した場合、R F A 誘導性の損傷領域は限定的なものであり、腫瘍容積全体にまで拡大しなかった。一方、D T 0 1 を R F A 処置に追加することにより、凝固壊死を腫瘍容積全体にまで広げることができた。

【0116】

10

結論としては、図 2 に示されるように、R F A 前に D T 0 1 を動物に投与した場合、マウスの生存期間は増加した。

【0117】

材料及び方法

細胞培養

M R C 5 (ヒトトランスフォーメーション線維芽細胞、ATCC (Manassas, VA)) 及び H T 2 9 (ヒト結腸腺ガン、ATCC (Manassas, VA)) 細胞株を培養細胞研究に使用した。H T 2 9 細胞株は、10 % ウシ胎仔血清 (ATGC)、ストレプトマイシン (100 mg.mL^{-1} 、Invitrogen) 及びペニシリン (100 mg.mL^{-1} 、Invitrogen) を補充した完全 D M E M (G ibco) 中で成長させた。細胞は、湿度 100 % の 5 % CO₂ 霧囲気下、37 °C で維持した。

20

【0118】

D b a i t 分子

すべての D b a i t 分子は、自動固相オリゴヌクレオチド合成法 (Eurogentec) によって合成した。in vitro 研究については、P E I と複合した D b a i t 3 2 H c を使用したのに対して、P E I は生物に対して毒性が高いので、臨床前試験ではコレステロール結合型の D T 0 1 を使用したことに留意する。

【0119】

in vitro 熱ショック処置及びトリパンブルーアッセイ。

800 μL の培地 (6 ウエルプレート中) 中で、11 kDa P E I (Poly+) と複合した D b a i t 2 . 5 μg と一緒に 5 時間インキュベーションすることによって、細胞をトランスフェクションした。1 ナノモルの D b a i t 3 2 H c (分子量 20,153) は、約 20 μg の重量である。D b a i t のトランスフェクション終了時に、トランスフェクション培地を取り除き、37 °C で予熱した完全 D M E M と交換した。直後に、熱ショックを 43 °C の Fisher Scientific Isotemp 中で 1 時間実施した。次いで、細胞を通常の条件下で 48 時間インキュベーションした。細胞上清及びトリプシン処理ペレットを混合して、浮遊している死細胞をカウントした。次いで、この懸濁液をトリパンブルーと混合して、0.4 % トリパンブルー溶液を得た。Malassez チャンバーにおいて、染色細胞及び総細胞数をカウントした。計算した非染色細胞のパーセンテージは、生存細胞のパーセンテージを表す。

30

【0120】

40

動物モデル及び（腫瘍の準備）処置

6 週齢の雌性 N M R I ヌードマウスを Janvier (Le Genest St Isle, France) から入手した。この動物を研究室で少なくとも 1 週間飼育してから、実験を開始した。明暗周期 (12 時間 : 12 時間)、相対湿度 (55 %) 及び温度 (21 °C) のコントロール条件下のケージ 1 つあたりの動物は 6 匹とした。食餌及び水道水は、自由に利用可能とした。ヒト H T 2 9 結腸腺ガン腫瘍は、80 匹のマウスに 10^7 個の腫瘍細胞を右側腹部に皮下注射することによって誘導した。

【0121】

前臨床実験計画

50

H T 2 9 結腸腺ガン腫瘍を 7 5 匹の雌性成体ヌードマウスに異種移植した。腫瘍容積が 2 0 0 ~ 7 0 0 mm³ (平均容積 : 4 8 3 ± 1 4 6 mm³) に達したら、マウスを処置群又はコントロール群のうちの 1 つに振り分けた。マウスは、R F A 単独で、局所注射により D b a i t 単独で、D T 0 1 及び R F A の組み合わせによって処置したか、又は未処置であった。病理組織学的分析のために 3 1 匹のマウスを 3 日目に屠殺し、他の 4 9 匹は、腫瘍が 2 0 0 0 mm³ に達した際に屠殺するまで経過観察した。すべての実験において、腫瘍は、デジタルキャリパーで 3 日ごとに測定した。腫瘍容積は、下記式 : 長さ × 幅 × 幅 / 2 を使用して、立方ミリメートル単位で計算した。Local Committee on Ethics of Animal Experimentationは、すべての実験を承認した。

【 0 1 2 2 】

10

高周波腫瘍焼灼

R F A は、Radionics Cool-tip RF (system radiofrequency) ジェネレーターを使用してイソフルレン麻酔下で実施した。1 5 ゲージのCosman RFカニューレ電極 (Cosman Medical, inc, Burlington, USA) からなる R F A プローブを腫瘍に挿入した。電力 (ワット単位) は、ターゲット温度に達するまで手動でコントロールした。焼灼温度は、腫瘍周辺に配置した皮下熱電対によってモニタリングした。周囲温度は、4 2 ~ 4 4 に 2 分間維持した (不完全焼灼スキーム) 。D b a i t と組み合わせる場合、R F A は、処置の 3 日目に実施した。

【 0 1 2 3 】

20

D T 0 1 処置

D T 0 1 の毎日処置は、腫瘍内注射を 1 回 (2 mg / 動物) 、及び腫瘍端から 5 mm 離れた反対側の部位に皮下注射を 2 回 (それぞれ 2 mg / 動物) することによって実施した。

【 0 1 2 4 】

2 つのプロトコール計画を D T 0 1 の連続毎日処置に使用した : 病理組織学的分析のための 2 日間処置、及び生存研究のための 4 日間処置 (総用量はそれぞれ 1 2 mg 及び 2 4 mg) 。R F A と組み合わせる場合、D T 0 1 は、2 日間処置又は 4 日間処置について、それぞれ D T 0 1 処置 2 日目又は 3 日目の焼灼 5 時間前に投与した。

【 0 1 2 5 】

30

組織学的分析

R F A 処置 3 日後に動物を屠殺し、腫瘍を切除した。腫瘍は中性緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィン包埋した。7 μm の切片を切断し、ヘマトキシリソ、エオシン、サフラン (H E S) で染色した。壊死の程度 (細胞サイズの増加、不明確な細胞の境界、好酸性細胞質、核の消失若しくは凝縮、又は関連する炎症によって示される) は、壊死した分析組織切片の表面積の割合 (%) として表す。有糸分裂細胞及びアポトーシス細胞の数は、高電力で分析した約 1 , 0 0 0 個の細胞の代表的な非壊死領域から推定した。

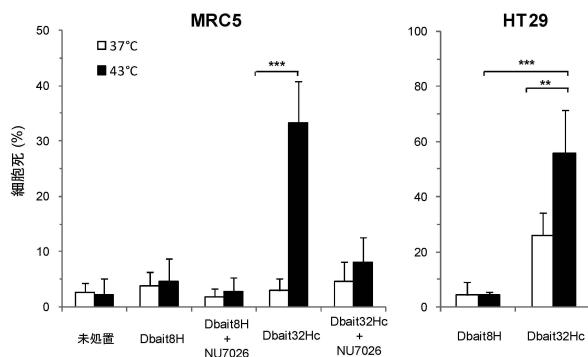
【 0 1 2 6 】

40

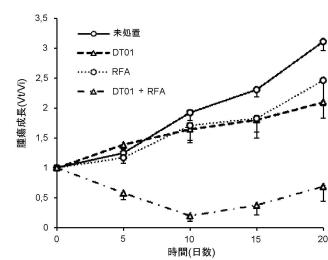
統計的分析

統計的分析は、StatELソフトウェア (ad Science) で実施した。Kaplan-Meier推定値から全生存曲線をプロットし、比較した。データが正規分布に従わなかったので、ノンパラメトリックログランク検定をこれらの比較に使用した。培養細胞の死は、Student の t 検定を使用して比較した。

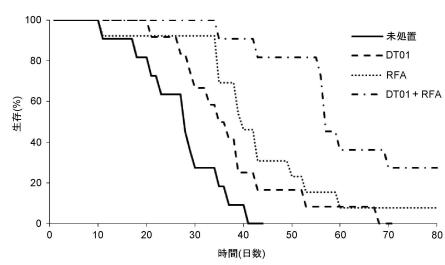
【図1】



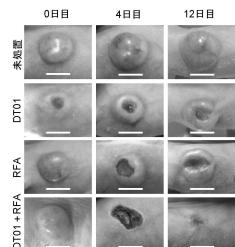
【図2 B】



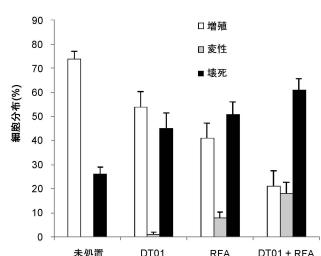
【図2 C】



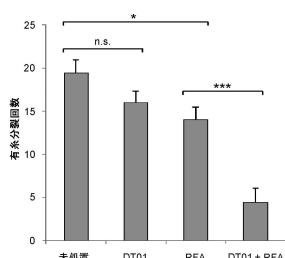
【図2 A】



【図3 A】



【図3 B】



【配列表】

0006162691000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 61 K 48/00 (2006.01) A 61 K 48/00
A 61 P 35/00 (2006.01) A 61 P 35/00

(72)発明者 デュトレックス , マリー
フランス国、エフ - 94240 ライ - レ - ローズ、リュ・ドゥ・シャレー 6

(72)発明者 スン , チエン - シエン
フランス国、エフ - 94100 サン・モール・デ・フォッセ、プラス・デュ・プレジダン・ジ・
エフ・ケネディ 24

(72)発明者 ドゥビュ , フラヴィアン
フランス国、エフ - 91400 オルセー、リュ・ドゥ・モンテリ 1

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 国際公開第2011/161075 (WO , A1)

国際公開第2009/126933 (WO , A1)

特表2010-504085 (JP , A)

国際公開第2010/082821 (WO , A1)

特表平05-505941 (JP , A)

特表2000-506504 (JP , A)

国際公開第2009/063998 (WO , A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 61 K 31 / 713

A 61 K 45 / 00

A 61 K 47 / 54

A 61 K 47 / 60

A 61 K 47 / 61

A 61 K 48 / 00

A 61 P 35 / 00

C A p l u s / R E G I S T R Y

/ M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)