

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5559159号

(P5559159)

(45) 発行日 平成26年7月23日 (2014. 7. 23)

(24) 登録日 平成26年6月13日 (2014. 6. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)

C 1 2 N 15/00 G

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088

請求項の数 17 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-512892 (P2011-512892)  
 (86) (22) 出願日 平成21年6月10日 (2009. 6. 10)  
 (65) 公表番号 特表2011-524745 (P2011-524745A)  
 (43) 公表日 平成23年9月8日 (2011. 9. 8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/004186  
 (87) 国際公開番号 W02009/149921  
 (87) 国際公開日 平成21年12月17日 (2009. 12. 17)  
 審査請求日 平成24年5月21日 (2012. 5. 21)  
 (31) 優先権主張番号 61/060, 571  
 (32) 優先日 平成20年6月11日 (2008. 6. 11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510328386  
 バイオニュークレオン ソチエタ・レスポ  
 ンサビリタ・リミタータ  
 Bionucleon S. r. l.  
 イタリア国 (トリノ) コッレレット  
 ジャコーザ ヴィア リベス 5  
 Via Ribes 5, 1-1001  
 O Colletterto Giacosa  
 a (TO), Italy  
 (74) 代理人 100099483  
 弁理士 久野 琢也  
 (74) 代理人 100061815  
 弁理士 矢野 敏雄  
 (74) 代理人 100112793  
 弁理士 高橋 佳大

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾オリゴヌクレオチドを使用するHRP-3の阻害

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列

【化 1】

5'-(X<sup>1</sup>)<sub>n</sub>-TAC AAC ACC CAC AAA-B-TTT GTG GGT GTT GTA-(X<sup>2</sup>)<sub>m</sub>-3'

[ 式中、A、C、T 及び G はヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ構成ブロックを示す

、  
 X<sup>1</sup> 及び X<sup>2</sup> は独立してポリ (アルキレングリコール) 単位を含む基から選択される、  
 n 及び m は独立して 0 又は 1 を示し、その際 n 及び m の少なくとも 1 つは 1 である、かつ  
 B は架橋基を示す ]

を含む単鎖オリゴヌクレオチド分子。

【請求項 2】

ヌクレオチド又はヌクレオチドアナログが、デオキシリボヌクレオチド構成ブロック、  
 修飾したデオキシリボヌクレオチド構成ブロック、リボヌクレオチド構成ブロック、修飾  
 したリボヌクレオチド構成ブロック、ヌクレオチドアナログ構成ブロック又はモルホリノ  
 構成ブロック又はこの組み合わせから選択される請求項 1 記載のオリゴヌクレオチド分子

。

【請求項 3】

ヌクレオチドアナログ構成ブロックが、PNA、LNA又はO-メチルRNAである、請求項2記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項4】

$X^1$ 及び $X^2$ が、200～100000Daの範囲内にある分子量を有する線状又は分枝鎖状のポリ(エチレングリコール)単位を含む基から選択される請求項1から3までのいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項5】

Bが、相補ヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ構成ブロックを連結でき、かつ、塩基対の形成を支持できる20個までの構成ブロックのスペーサー配列である請求項1から4までのいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項6】

Bが、

(i) 少なくとも3つの対となっていないヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ構成ブロックのヌクレオチド性スペーサー配列、又は

(ii) 非ヌクレオチド性スペーサー配列

を含む結合基である請求項1から5までのいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項7】

(ii) 非ヌクレオチド性スペーサー配列が、少なくとも5つのエチレングリコール単位のポリ(エチレングリコール)スペーサー配列である、請求項6記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項8】

PWWPドメインタンパク質を阻害するための請求項1から7までのいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項9】

PWWPドメインタンパク質が、HDGF、HRP-1、HRP-2、HRP-3、HRP-4及び/又はLEDGFである、請求項8記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項10】

PWWPドメインタンパク質に少なくとも10 $\mu$ Mの親和性で結合する請求項1から9までのいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項11】

親和性が少なくとも100 $\mu$ Mである請求項10記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項12】

血管形成に関連した疾病の診断及び治療における使用のための、請求項1から11までのいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項13】

血管形成に関連した疾病が、癌である、請求項12記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項14】

癌が、神経芽腫、メラノーマ、結腸直腸癌、膵癌、胃癌、肝細胞癌又は肺癌である、請求項13記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項15】

更なる療法と組み合わせた使用のための請求項12から14のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項16】

更なる療法が、放射線、手術及び/又は更なる医薬の投与である、請求項15記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項17】

薬剤スクリーニングにおける使用のための請求項1から11までのいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 1 】

発明の詳細な説明

本発明はPWWPドメインを有するタンパク質の活性を調節するための剤に関する。

## 【 0 0 0 2 】

PWWPドメインは、「HDGFファミリー」として知られるタンパク質のファミリー  
 中に見出される保存された構造モチーフである。このファミリーは6つのタンパク質を包  
 含する：原型タンパク質、HDGF；HRP-1、HRP-2、HRP-3、HRP-4  
 （HRP=HDGF関連タンパク質（HDGF Related Protein））；  
 及びLEDGF。図1は、この6つのタンパク質のアラインメント及びこのPWWPドメ  
 インの構造的保存を示し、これは常に全てのファミリーメンバーのN末端に存在する。更  
 に、PWWPドメインと2つの非関連タンパク質のオリゴヌクレオチド結合ドメインとの  
 間の構造的相同性も強調されている；この相同性はオリゴヌクレオチド結合において推定  
 上保存される役割を指し示す。この結論は最近になって、HRP-3のPWWPドメイン  
 と二重鎖DNAとの間での複合体の構造のNMRの解明により支持され、これは、マイク  
 ロモーラー（ $\mu M$ ）の親和性で少なくとも1のds DNAで結合するPWWPドメイン  
 の能力を確認した。PWWPドメインが、オリゴヌクレオチドと結合できるという事実は  
 、治療的及び診断的使用のための短鎖オリゴヌクレオチドによるHDGFファミリー中の  
 タンパク質のターゲティングの道をひらく。

10

## 【 0 0 0 3 】

本発明者らは、PWWPドメインタンパク質の新規生物学的活性を同定した。特に、H  
 R P - 3は、NIH 3 T 3細胞の移動、増殖及び/又は足場形成独立成長を阻害するこ  
 とができることが見出された。更に、HRP-3は、H U V E C細胞に対する血管形成促  
 進剤として作用することが見出された。更に、HRP-3は、神経腫瘍中で、特に神経芽  
 腫細胞中で過剰発現することが見出された。最後に、本発明者らは、高い親和性でもって  
 PWWPドメインに結合でき、このようにしてPWWPドメインタンパク質の活性を阻害  
 できる新規の単鎖オリゴヌクレオチド分子を同定した。

20

## 【 0 0 0 4 】

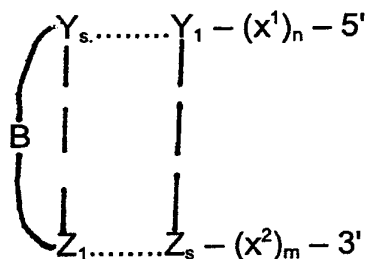
本発明の第1の観点は、PWWPドメインタンパク質に結合でき、かつ、PWWPドメ  
 インタンパク質、例えばHRP-3及びHDGFにより誘発される生物学的作用を阻害及  
 び/又は遮断できる単鎖オリゴヌクレオチド分子に関する。

30

## 【 0 0 0 5 】

本発明の主題は、配列

## 【 化 1 】



40

[ 式中、Y及びZはヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ構成ブロックを示す、  
 その際、それぞれのY及びZは互いと一緒に塩基対、特にワトソン-クリック塩基対を形  
 成し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は独立してポリ（アルキレングリコール）単位を含む基から選択される  
 、

n及びmは独立して0又は1を示し、その際n及びmの少なくとも1つは1である、

sは1～20、有利には5～18の整数である、

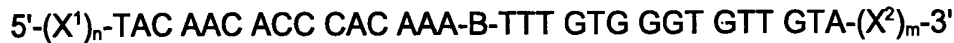
Bは架橋基である ]

を含む単鎖オリゴヌクレオチド分子である。

## 【 0 0 0 6 】

50

有利には、本発明は、配列  
【化 2】



[ 式中、A、C、T 及び G はヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ構成ブロックを示す、  
X<sup>1</sup> 及び X<sup>2</sup> は独立してポリ（アルキレングリコール）単位を含む基から選択される、  
n 及び m は独立して 0 又は 1 を示し、その際 n 及び m の少なくとも 1 つは 1 である、かつ  
B は架橋基を示す ]  
を含む単鎖オリゴヌクレオチド分子に関する。

10

【 0 0 0 7 】

このオリゴヌクレオチド分子は、互いと一緒に塩基対、特にワトソンクリック塩基対を形成できるヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ構成ブロックを含む。有利にはこの構成ブロックは、「A」、「C」、「T」及び「G」から選択される。この「A」構成ブロックは、核酸塩基アデニン又はそのアナログであって相補性核酸塩基「T」と塩基対を形成できるものを含む構成ブロックから選択される。この「C」構成ブロックは、核酸塩基シチジン又はそのアナログであって相補性核酸塩基「G」と塩基対を形成できるものを含む構成ブロックから選択される。この「T」構成ブロックは、核酸塩基チミン又はそのアナログであって相補性核酸塩基「A」と塩基対を形成できるもの、例えば核酸塩基ウラシル（代わりに「U」構成ブロックとしても同定される）を、そしてこの「G」構成ブロックは核酸塩基グアニン又はそのアナログであって相補性核酸塩基「C」と塩基対を形成できるものを含む。

20

【 0 0 0 8 】

構成ブロック A、C、T 及び G は有利には、デオキシリボヌクレオチド構成ブロック、修飾デオキシリボヌクレオチド構成ブロック、リボヌクレオチド構成ブロック、修飾リボヌクレオチド構成ブロック、ヌクレオチドアナログ構成ブロック、特に PNA、LNA 又はモルホリノ構成ブロック又はその組み合わせから選択される。修飾デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド構成ブロックの例はヌクレオチドであって、このリボース糖の 2' - C 原子がハロゲン、例えば F、Cl、Br 又は I、シアノ、アルキル、例えば C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> - アルキル、アルケニル、例えば C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> - アルケニル、アルキニル、例えば C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> - アルキニル、アミノ、モノ - 又はジ - アルキル置換アミノ、例えば C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> - アルキルアミノ、アルコキシ、例えば C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> - アルコキシで置換されたものであり、この場合にアルキル、アルケニル及びアルキニル基は非置換であるか又はハロゲン、ヒドロキシ - 又はアルコキシ基により - 又は多置換されていてよい。構成ブロックの更なる例は、糖 - リン酸骨格のリン原子で生じる修飾を有するオリゴヌクレオチドアナログであり、これは例えばホスホロチオアート、メチルホスホナート、ホスホロアミダート及びホスホトリエステルである（例えば、Cohen, J. S., ed. Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression, (CRC Press, Inc., Boca Raton Fla., 1989)。有利な例は、ペプチド核酸、（PNA）、ヒドロキシプロリンペプチド核酸（HyPNA）、セリンペプチド核酸（SerNA）を含む（例えば WO 2001/068673 - オリゴヌクレオチドアナログ、その合成方法及び使用方法）。モルホリノ及び複素環式アナログ、2' - 修飾ヌクレオシド、例えば 2' - F RNA 又は 2' - OMe RNA、コンフォメーションが制限されたヌクレオチド、二、三又は多環式ヌクレオシドアナログ、例えば a - ビシクロ - DNA、8 - ビシクロ DNA 5', 6' - ビシクロ - DNA、ロクトヌクレオシドアナログ（LNA）、及び、スピロ基を含むアナログ（cf. Velazquez S, San Felix A, Perez-Perez MJ, Balzarini J, De Clercq E, Camarasa MJ. Int Conf AIDS. 1992 Jul 19-24; 8: スペインにより説明されたとおり）、熱不安定性保護基、例えばプロドラッグとしての 4 - メチルチオ - 1 - プチル基を有するオリゴヌクレオチド性アナログ（cf. Beaucage SL, Curr Protoc Nucleic Acid Chem. 2004 年 12 月; 第 3 章: 3.11 セクションにより説明されたとお

30

40

50

り)、2 - 5 連結したオリゴヌクレオチド、又は5 - 5 又は3 - 3 連結を有するオリゴヌクレオチド(逆転アミダイト(reversed amidite)の使用による連結逆位(linkage inversion))。

【0009】

極めて有利な構成ブロックA、C、T及びGはデオキシリボヌクレオチド構成ブロック、リボヌクレオチド構成ブロック、修飾リボヌクレオチド構成ブロック、有利には2 - OMeリボヌクレオチド構成ブロック及び逆転リボヌクレオチド構成ブロックであって3 - 3 連結逆位を形成するものから選択される。

【0010】

本発明の単鎖オリゴヌクレオチド分子は、この分子の5 - 及び3 - 末端に存在する基 $X^1$ 及び/又は基 $X^2$ をそれぞれ含む。一実施態様において、オリゴヌクレオチド分子は $X^1$ 及び $X^2$ 基の両者を含む。更なる一実施態様において、この分子は $X^1$ 基だけを含み、また更なる実施態様において $X^2$ 基だけを含む。

10

【0011】

この基 $X^1$ 及び $X^2$ は、オリゴヌクレオチド分子を安定化できる基から選択される。有利には、 $X^1$ 及び $X^2$ は、線状又は分枝鎖状ポリ( $C_2 \sim C_3$ -アルキレングリコール)単位、特にポリ(エチレングリコール)単位を含む基から選択される。これら単位は有利には、200~10000Da、特に有利に300~5000Daの範囲内の分子量を有する。特に有利な一実施態様において、このポリ(エチレングリコール)単位は、分枝鎖状ポリ(エチレングリコール)単位であってそれぞれ20kDaの2個のポリ(エチレングリコール)鎖を有するものであり、すなわち、分子量40000Daを有する分枝鎖状ポリ(エチレングリコール)(PEG(40kDa))である。

20

【0012】

更に、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、架橋単位Bを含み、これは組立場(scaffold)を提供し、これによりこの分子内での5 - 及び3 - 自己相補的オリゴヌクレオチド間での二重鎖ステム構造の形成が可能になる。架橋単位の長さは有利には1~20ヌクレオチド性又は非ヌクレオチド性構成ブロックである。有利にはこの架橋単位は、(i)少なくとも3つの対になっていないヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ構成ブロックのヌクレオチド性スペーサー配列、又は、(ii)非ヌクレオチド性スペーサー配列、例えば少なくとも3つのエチレングリシド単位の、有利には少なくとも5つのエチレングリコール単位のポリ(エチレングリコール)スペーサー配列を含む。

30

【0013】

より有利には、この架橋単位は、3つの「A」構成ブロック、例えばデオキシリボヌクレオチド配列AAA又はポリ(エチレングリコール)スペーサー配列であって3~10、有利には5~10、例えば3、5、7又は10つのエチレングリコール単位を含むものを含む。より有利には、この架橋単位の3つの「A」構成ブロックは、2 - OMe修飾リボヌクレオチド構成ブロック、例えば修飾リボヌクレオチド配列AAA(2 - OMe)を含む。

【0014】

本発明のオリゴヌクレオチド分子は、有利には、PWWPドメインタンパク質、例えばHDGF、HDGF-2、HRP-1、HRP-2、HRP-3、HRP-4及び/又はLEDGF、特にHRP-3及び/又はHDGFを阻害できる。有利にはPWWPドメインは、Prosite PS50821、Pfam PF00855又はInterPRO IPR000313で定義されているとおりである。

40

【0015】

PWWPドメインタンパク質は有利には、哺乳類タンパク質、より有利にはヒトタンパク質、例えばヒトHDGF(Swiss Prot. No. P51858/Q7Z4S4/Q7Z4S5)、ヒトHDGF-2(Swiss Prot. No. Q7Z4V5)、ヒトHRP-3(Swiss Prot. No. Q9Y3E1)、及び/又はヒトLEDGF(Swiss Prot. No. 075475)である。本発明のオリゴヌクレオチド分子は有利には、PWWPドメインの生物学的活性、例えば血管形成促進性活性を阻害でき

50

る。

【0016】

有利な一実施態様において、このオリゴヌクレオチドは、少なくとも10 μM、有利には少なくとも100 μM、特に有利には少なくとも1000 μMの親和性でPWWPドメインタンパク質に結合する。更なる有利な一実施態様において、このオリゴヌクレオチドは、少なくとも10 nM、有利には少なくとも100 nM、特に有利には少なくとも1000 nMの親和性でPWWPドメインタンパク質に結合するタンパク質へのこのオリゴヌクレオチドの結合は、ピアコア (Biacore) システム、円二色性又は電気泳動技術、例えばキャピラリー電気泳動によって決定されてよい。

【0017】

本発明のオリゴヌクレオチド分子は、医薬において、例えばヒト又は獣医学的医薬において、診断及び/又は治療適用のために使用されてよい。例えば、このオリゴヌクレオチド分子は、PWWPドメインタンパク質機能障害、特にPWWPドメインタンパク質過剰発現及び/又は過剰活性に関連、付随する、かつ/又はこれにより引き起こされる状態又は疾病の診断及び治療において使用されてよい。

【0018】

より有利には、このオリゴヌクレオチド分子は、血管形成に関連した疾病、例えば癌、例えば神経癌、例えば神経芽腫、メラノーマ、結腸直腸癌、膵癌、胃癌、肝細胞癌及び肺癌の診断及び治療における使用のためである。特に有利な一実施態様において、このオリゴヌクレオチド分子は、例えば、神経癌、例えば神経芽腫におけるHRP-3の生物学的活性の阻害及び/又は遮断における使用のためである。

【0019】

本発明のオリゴヌクレオチドは、これを必要とする被験体に、活性剤及び医薬的に許容可能な担体、希釈剤及び/又は助剤を含んでよい医薬組成物として投与されてよい。この医薬組成物は、任意の適した形態にあってよく、例えば腸管外、局所的、肺の投与その他のためであってよい。有利には、この医薬組成物は、例えば注射又は輸液による腸管外投与のために適している。

【0020】

医薬組成物は、これを必要とする被験体に、疾病の種類及び深刻度及び投与経路に依存して、治療的有效用量、例えば、一日あたり0.001~1000 mg以上で投与される。

【0021】

本発明のオリゴヌクレオチド分子は単独療法として又は更なる療法、例えば放射線、手術及び/又は更なる医薬、例えば抗癌医薬、例えば化学療法剤及び/又は抗腫瘍抗体の投与と組み合わせて投与されてよい。化学療法剤の有利な例は、チューブリン安定化剤、チューブリン脱安定化剤、代謝拮抗剤、プリン合成阻害剤、ヌクレオシドアナログ、DNAアルキル化剤、DNA修飾剤、及び血管破砕剤である。化学療法剤の特定の例は、アミノグルテチミド、アミノプテリン、アナストロゾール、アンシタピン、ピモラン、5-ブロモウラシル、カンプトテシン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、クロロメチン、シスプラチン、クロドロン酸二ナトリウム、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドキシソルピシン、エチルイミナム (ethyliminum)、エトポシド、フロクスウリジン、5-フルオロウラシル、フルタミド、フトラフ-ル (ftorafur)、ヒドロキシ尿素、イソホスファミド、イオムスチン、メルカプトプリン、メトトレキセート、マイトマイシン、ニトロカファン、ポリアクチンA、タモキシフェン、チオ-TEPA、カリケアマイシン、タキソール、ゲムシタピン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ダウノルビシン、ドセタキセル、イリノテカン、エポチロンB、及びエポチロンDである。抗腫瘍抗体の有利な例は、抗VEGFR抗体、例えばAvastin<sup>(R)</sup>、又は他の抗体、例えばHerceptin<sup>(R)</sup>、Rituxan<sup>(R)</sup>、Mylotarg<sup>(R)</sup>、及びCampath<sup>(R)</sup>である。

【0022】

本発明の特に有利な一観点によれば、オリゴヌクレオチド分子は、更なる化学療法医薬と組み合わせて投与されてよく、特に有利にはビンクリスチンと組み合わせて投与されてよい。

【0023】

更に、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、薬剤スクリーニングのために、例えば、このオリゴヌクレオチド分子及びその標的タンパク質の相互作用を調節する、すなわち、刺激又は阻害する化合物の同定のために使用されてよい。

【0024】

本発明の更なる一観点は、医薬における使用のための、例えば診断及び/又は治療適用のための、HRP-3ポリペプチド、有利には哺乳類HRP-3ポリペプチド、より有利にはヒトHRP-3ポリペプチド、又は、これをコードする核酸分子に関する。この観点は、HRP-3が、哺乳類細胞、特に哺乳類繊維芽細胞、例えばNIH 3T3細胞（つまり、3T3プロトコルにより培養された初代マウス胚性繊維芽細胞）の細胞移動、増殖及び/又は足場独立成長の有力な細胞外阻害剤であるとの知見を基礎とする。

【0025】

この実施態様において、このHRP-3ポリペプチドは、これを必要とする被験体、例えばヒト患者に直接的に投与されてよい。又は、HRP-3ポリペプチドをコードする核酸分子はこの分野で知られている非ウィルス性又はウィルス性ベクター系を使用して投与されてよい。HRP-3ポリペプチド又はこれをコードする核酸が、この活性剤の細胞外提示を可能にするプロトコルにより投与されることが有利である。

【0026】

本発明のまた更なる一実施態様は、医薬における使用のための、例えば診断及び/又は治療的適用のための、HRP-3アンタゴニストに関する。この実施態様は、HRP-3がHUVEC細胞中で有力な血管形成促進性活性を有するとの知見に基づく。

【0027】

HRP-3ポリペプチドアンタゴニストは、HRP-3に対して指向されている抗体又は抗体断片、例えばモノクローナル、キメラヒト化、ヒト又は組み換え抗体又はこの抗原結合断片であってよい。又は、このアンタゴニストは、核酸エフェクター分子、例えばアンチセンス分子、リボザイム、RNA干渉剤、例えばsiRNA分子であってHRP-3発現を阻害及び/又は遮断できるもの、又は、上述のとおり単鎖オリゴヌクレオチド分子であってよい。又は、このアンタゴニストは、アプタマー、例えば核酸分子であってHRP-タンパク質に結合し、その活性を阻害又は遮断するために選択されたものであってよい。

【0028】

HRP-3アンタゴニストは、活性剤を治療的有效量で含有する医薬組成物の形でこれを必要とする被験体に投与される。抗体、核酸エフェクター分子及びアプタマーを投与するためのプロトコルはこの分野で知られている。

【0029】

本発明の剤は、上述のとおり、血管形成の阻害のために、特に血管形成に関連した状態又は疾病の診断及び/又は治療において、及び/又は過剰増殖症状又は疾病の診断及び治療において特に有用である。更に特に、本発明の剤は、血管形成関連病理学、例えば癌、特に神経癌、例えば神経芽腫、肝癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、又は神経学癌における診断及び治療に有用である。使用の更なる有利な分野は、眼科学、疼痛、心臓血管疾病、皮膚科学、感染疾病、例えばウィルス疾病、炎症及び自己免疫疾病、及び呼吸疾病を含む。

【0030】

更に、本発明は以下の図面及び実施例によりより詳細に説明される。

【0031】

図面の簡単な説明：

図1は、HDGFファミリーの6部分のアラインメント及びPWWPドメインの構造的保

10

20

30

40

50

存を示し、これは常に全てのファミリーメンバーのN末端に存在する。

図2は、HRP-3によるNIH-3T3移動に対する阻害作用を示す。

図3及び4は、刺激24時間後のHRP-3により誘発される用量依存性HUVEC発芽を示す。

図5及び6は、HUVEC細胞株中でのHRP-3刺激あり及びなしでのVEGFR-2 mRNA発現及びVEGF mRNA発現をそれぞれ示す。

図7は、HUVEC細胞株中でのVEGF刺激あり及びなしでのHRP-3 mRNA発現を示す。

図8は、抗VEGF抗体Avastin及びHRP-3ありでのHUVEC細胞の発芽試験を示す。

図9は、増加する量のHRP-3タンパク質の存在下でのHUVEC細胞移動アッセイを示す。

図10は、様々な正常及び腫瘍性のヒト細胞株中でのHRP-3発現レベルを示す。RNAを細胞から抽出し、DNアーゼ処理、レトロ転写及びリアルタイムPCR分析した。18S RNAレベルを試料標準化のために使用した。HRP-3タンパク質がヒト神経芽腫細胞株により高度にかつ選択的に発現されていることが見出された。

図11はウェスタンブロットアッセイを示し、この場合にHRP-3タンパク質がSHSY条件培地中で見出された。

図12は、設計された二重鎖DNAの配列を示し、二重鎖2、3及び4には赤で下線を引いた塩基があり、Lukasik et al.の二重鎖で導入した変化を強調する(二重鎖1)。

図13は、図12のDNA二重鎖1(DNA1)を用いた3T3移動in vitroアッセイを示す。

図14-A)は、神経芽腫及び非神経芽腫細胞株のHRP-3転写産物レベルを示す。RNAを細胞から抽出し、DNアーゼ処理、レトロ転写及びリアルタイムPCR分析した。18S RNAレベルを試料標準化のために使用した。平均発現値に応じて細胞株を上から下に配置した。神経芽腫細胞株は灰色で印をしてある。

図14-B)は、神経芽腫及び非神経芽腫細胞によるHRP-3の発現及び分泌を示す。タンパク質を細胞ライセートから抽出するか又は濃縮し、この条件培地から沈殿させ、SDS-PAGEゲルで分画し、HRP-3についてイムノブロットした。GADPHレベルを試料標準について測定した。このバンドの相対強度をImageJ softwareを用いて計算した。

図14-C)は、SH-SH5Y、GL-L1-N及びHTLA230神経芽腫異種移植片のHRP-3タンパク質レベルを示す。異種移植片腫瘍組織又は正常マウス組織から抽出したタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、HRP-3についてイムノブロットした。精製したHRP-3タンパク質をポジティブコントロールとして使用した。GAPDHのタンパク質レベルを試料標準化のために使用した。バンドの定量化をImageJ softwareを用いて実施した。

図15は、37で0~25時間のマウス血清中でのインキュベーション後の配列番号4、5、6及び7の本発明によるオリゴヌクレオチド分子(それぞれ化合物BN203、BN204、BN205及びBN206として示す)のゲル電気泳動分析を示す。

図16は、配列 配列番号11(化合物BN210として示す)のオリゴヌクレオチド分子の細胞毒性アッセイを示す。MTT試験を、BN210又はコントロール試験物質を用いた24、48及び72時間のインキュベーション後のHepG2及び神経芽腫細胞株GL-L1-N、SH-SY及びIMR32に対して実施した。ポジティブ及びネガティブコントロールを、それぞれ10%又は0%のウシ血清を含有する細胞培地を用いて実施した。

図17は、ビンクリスチン(VIN)単独又は配列 配列番号11(BN210)のオリゴヌクレオチド分子と組み合わせた場合のin vitro細胞毒性を示す。GL-L1-N神経芽腫細胞を0.15~5nMの範囲の濃度でのビンクリスチンで、単独で用いて又は250nMのBN210と組み合わせて処理した。48時間後にMTT試験を実施し

10

20

30

40

50



た。

図 18 は、甲状腺刺激性の神経芽腫異種移植片に対する、化学療法剤ビンクリスチン (VCR) と組み合わせた配列 配列番号 11 (BN210) の本発明によるオリゴヌクレオチド分子の *in vivo* 活性の結果を示す。

図 19 は、配列番号 1 のオリゴヌクレオチドが HRP-3 誘発した HUVEC の発芽を遮断できることを示す。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図 1】図 1 は、HDGF ファミリーの 6 部分のアラインメント及び PWWP ドメインの構造的保存を示す図である。

10

【図 2】図 2 は、HRP-3 による NIH-3T3 移動に対する阻害作用を示す図である。

【図 3】図 3 は、刺激 24 時間後の HRP-3 により誘発される用量依存性 HUVEC 発芽を示す図である。

【図 4】図 4 は、刺激 24 時間後の HRP-3 により誘発される用量依存性 HUVEC 発芽を示す図である。

【図 5】図 5 は、HUVEC 細胞株中での HRP-3 刺激あり及びなしでの VEGFR-2 mRNA 発現を示す図である。

【図 6】図 6 は、HUVEC 細胞株中での HRP-3 刺激あり及びなしでの VEGF mRNA 発現を示す図である。

20

【図 7】図 7 は、HUVEC 細胞株中での VEGF 刺激あり及びなしでの HRP-3 mRNA 発現を示す図である。

【図 8】図 8 は、抗 VEGF 抗体 Avastin 及び HRP-3 ありでの HUVEC 細胞の発芽試験を示す。

【図 9】図 9 は、増加する量の HRP-3 タンパク質の存在下での HUVEC 細胞移動アッセイを示す図である。

【図 10】図 10 は、様々な正常及び腫瘍性のヒト細胞株中での HRP-3 発現レベルを示す図である。

【図 11】図 11 はウェスタンブロットアッセイを示す図である。

【図 12】図 12 は、設計された二重鎖 DNA の配列を示す図である。

30

【図 13】図 13 は、図 12 の DNA 二重鎖 1 (DNA1) を用いた 3T3 移動 *in vitro* アッセイを示す図である。

【図 14】図 14 は、神経芽腫及び非神経芽腫細胞株の HRP-3 転写産物レベルを示す (A)、神経芽腫及び非神経芽腫細胞による HRP-3 の発現及び分泌を示す (B)、SH-SH5Y、GL-L1-N 及び HTLA230 神経芽腫異種移植片の HRP-3 タンパク質レベルを示す (C) 図である。

【図 15】図 15 は、37 で 0 ~ 25 時間のマウス血清中でのインキュベーション後の配列番号 4、5、6 及び 7 の本発明によるオリゴヌクレオチド分子 (それぞれ化合物 BN203、BN204、BN205 及び BN206 として示す) のゲル電気泳動分析を示す図である。

40

【図 16】配列 配列番号 11 (化合物 BN210 として示す) のオリゴヌクレオチド分子の細胞毒性アッセイを示す図である。

【図 17】図 17 は、ビンクリスチン (VIN) 単独又は配列 配列番号 11 (BN210) のオリゴヌクレオチド分子と組み合わせた場合の *in vitro* 細胞毒性を示す図である。

【図 18】図 18 は、甲状腺刺激性の神経芽腫異種移植片に対する、化学療法剤ビンクリスチン (VCR) と組み合わせた配列 配列番号 11 (BN210) の本発明によるオリゴヌクレオチド分子の *in vivo* 活性の結果を示す図である。

【図 19】図 19 は、配列番号 1 のオリゴヌクレオチドが HRP-3 誘発した HUVEC の発芽を遮断できることを示す図である。

50

## 【 0 0 3 3 】

## 実施例

## 材料と方法

## H R P - 3 タンパク質供給源

このタンパク質を G S T コンジュゲートとして市販の供給源から最初に獲得した。同時に、この c D N A を R T - P C R によりヒト細胞から獲得した。この H R P - 3 コード領域を、制限部位として E c o R I 及び N d e I を使用して p E T 3 0 ベクター中にクローニングした。この組み換えタンパク質を大腸菌 ( E . C o l i ) T O P F 1 0 及び 1 2 中で生産しポジティブクローンを獲得した。2つのポジティブクローンを配列決定して、その正確さを確かめ、両者ともに正確である。したがって、このタンパク質発現工程のために我々のポジティブクローンを大腸菌 B L 2 1 中に形質転換した。異なる条件の温度及び時間における我々のクローンのいくつかの発現アッセイ後に、H R P - 3 を第 1 の工程のために H P L C を用いてカチオン交換により、そして第 2 の工程のために疎水性精製を用いて精製した。組み換えタンパク質が完全に精製した後に、L A L 試験を実施し、エンドトキシンの非存在を確かめ、次いでこれを定量化した。

10

## 【 0 0 3 4 】

## 実施例 1

## N I H 3 T 3 繊維芽細胞のための抗移動剤としての H R P - 3

N I H 3 T 3 繊維芽細胞に対する報告された H D G F 活性と類似して、P W W P ドメインに結合できるリガンドによるいかなる干渉活性も報告できる試験を開発すべく、これら細胞に対する H R P - 3 活性を試験することに決めた。増加する量のタンパク質の存在下での 3 T 3 細胞の移動及び増殖アッセイを実施した。これらアッセイは、H R P - 3 タンパク質の強力な抗移動作用の定義を可能にし、これは 3 0 n g / m L で 5 % の F B S により 2 4 時間で誘発される 3 T 3 移動の 5 0 % を妨げることができる。この試験はバリデーションされ、今や良好に再現可能である、図 2。

20

## 【 0 0 3 5 】

更に、H R P - 3 が 3 T 3 増殖及び足場依存性成長を 0 . 1 n g / m L で遮断することが見出された。これら全てのデータは、3 T 3 細胞の強力な増殖及び移動を誘発する、H D G F の作用とは対照的な H R P - 3 の作用を示す。

## 【 0 0 3 6 】

## 実施例 2

## H U V E C 細胞のための血管形成剤としての H R P - 3

H D G F が、様々な種類の腫瘍において血管形成に関連することが見出され、この理由のために、我々は B A E C 及び H U V E C としての内皮初代細胞株に対する H R P - 3 の活性を試験した。B A E C 及び H U V E C 細胞に対する増殖に対する作用が見出されなかった一方で、H R P - 3 は、24時間の刺激後に H U V E C 発芽を誘発できる。図 3 及び 4 に示されるとおり、H R P - 3 は、用量依存的に H U V E C 細胞において発芽を誘発できる。図 4 には、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールを 6 0 n g / m L で V E G F を用いて示している。このデータからは、1 0 0 n g / m L を超える濃度で H U V E C 細胞に対する発芽を H R P - 3 が刺激することを実証した。我々の結果を確かめるために、実験を盲目的にも実施している。

30

40

## 【 0 0 3 7 】

内皮細胞機能性の他の重要な観点は新規血管を形成できる能力であり、したがってマトリゲル ( Matrigel ) 中で管形成アッセイを実施した；予備試験によれば、H R P - 3 は、24時間後に H U V E C の血管様網目を維持することができる ( 示さず ) 。

## 【 0 0 3 8 】

この刺激の分子的基盤を理解するために、リアルタイム P C R により H U V E C 細胞株中で H R P - 3 の m R N A 発現を研究した。興味深いことに、このタンパク質は高レベルで発現していることが見出された。V E G F 又は V E G F R - 2 が H R P - 3 誘発機構に関連しているかどうかを理解するために、我々の H R P - 3 でもって H U V E C 細胞を刺

50

激し、VEGF、VEGFR-2、HRP-3及びHDGFのmRNAレベルを検査した。これら遺伝子の発現はHRP-3により変化しなかった。図5及び6。

【0039】

HRP-3がVEGFによりその上で制御されているかどうかを理解するために、HUVEC細胞を60ng/mLのVEGFで処理し、次いでHRP-3 mRNAレベルを測定した：ネガティブコントロールと処理細胞との間には有意差は存在しなかった(図7)。

【0040】

この最後のデータからはHRP-3血管形成促進性活性がVEGFとは独立していることを認めることができる。

10

【0041】

この証明は、治療的使用のために血管形成を遮断するために極めて重要である。

【0042】

更に、VEGF独立性血管形成活性を確かめるために、我々はAvastin、抗VEGF抗体を用いてVEGF及び我々のタンパク質の存在下で別の発芽試験を実施した。Avastinは、HUVEC発芽をVEGF媒介的に遮断できるが、HRP-3媒介的でない、図8。

【0043】

増加する量のこのタンパク質の存在下でのHUVECの移動アッセイを実施した(図9)。これらアッセイにより、用量依存的にヒトの内皮細胞に対するタンパク質の抗移動作用の定義が可能になり、これは100ng/mLで5%FBSにより5及び16時間で誘発された移動の約80%を妨げることができる。

20

【0044】

実施例3

神経腫瘍中でのHRP-3発現レベル

以前の刊行物から、HDGF発現が様々なヒトの癌中でメラノーマ、結腸直腸、膵臓、胃、肝細胞及び肺の癌腫として増加することを我々は知っている。このため、ヒトの腫瘍細胞株中のHDGFタンパク質の特異的過剰発現をリアルタイムPCRによりスクリーニングすることが決定され、そして、我々はこの基本のmRNAレベルが全ての細胞株に対してHRP-3よりも高いことを認め、そして、これまでにはHDGFが乳癌、神経芽腫、骨肉腫、リンパ腫、膵臓及び子宮のアデノカルシノーマ中で過剰発現することが見出されているが、しかしこの最大の過剰発現はヒトの肝臓細胞であるChang細胞株中で見出された。

30

【0045】

HRP3が、PWWP結合オリゴヌクレオチドを開発するためのモデルとして使用すべきPWWP含有タンパク質としてだけ意図されるにもかかわらず、我々は、タンパク質が過剰発現している既知の病理学が存在するかどうかを知りたいと思った。アレイデータのバイオインフォマティクスのスクリーニングは、攻撃的なグレードのヒトのグリオーマ、子供の希有致死性腫瘍、中で特異的な高レベルの発現を示した。この過剰発現は、HRP-3の提案された増殖性機能に関係しているかもしれず、したがって、我々はリアルタイムPCRによりCNS腫瘍細胞株中のこのタンパク質の特異的過剰発現についてスクリーニングを開始した。興味深いことに、このタンパク質は、SH-SY5神経芽腫中で、そしてNSC34、アミノプテリン感受性神経芽腫N18TG2と運動ニューロン富化した胚性の12~14日の脊髄細胞の融合により生産されたマウス-マウスの神経ハイブリッド細胞株のサブクローン中で過剰発現していることが見出された(図10)。

40

【0046】

この発現レベルは特異的であり、というのも他の脳の腫瘍株、例えば神経芽腫Neuro2A細胞株、又は他の組織由来の細胞は高レベルでこのタンパク質を発現しなかったからである。SH-SY5細胞は4歳の子供の骨髄に住み着く攻撃性の神経芽腫の二次転移から獲得した。神経芽腫は希少疾患(orphaned ref. ORPHA635)であり、このin vi

50

t r oモデルは現在ではS H - S Y細胞により提示されている。

【 0 0 4 7 】

最近の知見は、正常の神経外胚葉由来の組織の発達を駆動する分子経路が、神経芽腫成熟化にも関連していてよいことを示唆している。血管形成は神経分化の間に鍵となる役割を果たし、神経及びグリアの両者に栄養活性を発揮している。血管内皮成長因子 ( V E G F ) を含む、N B sにおける血管形成の誘発における重要な役割を果たすためにこれまでに種々の血管形成因子が同定されている。増加する量のタンパク質の存在下でのS H - S Y 5及びN C S - 3 4細胞の増殖アッセイを実施した。これらアッセイにより、S H S Yに対してだけこのタンパク質の抗増殖性作用の定義が可能になり、これは1 0 0 n g / m Lで5 %のF B Sにより2 4及び4 8 hで誘発されたS H - S Y 5増殖の2 5 %を妨げる

10

【 0 0 4 8 】

神経芽腫の内部では、神経芽腫細胞が、内皮細胞中で新規の血管形成プロセスを助けることができる溶解性H R P - 3を産生すると我々は推測する。この理論を支持する結果、我々はH R P 3タンパク質をS H S Y条件培地中でウェスタンブロットアッセイにより見出す、図1 1。これは、H D G F及びH R P - 3の両者がS H S Y細胞において高度に発現するが、H R P - 3だけが培地中に存在することを確認する。

【 0 0 4 9 】

我々の理論を更に支持するために、様々な神経芽腫細胞株を選択し、このH R P - 3 m R N A及びタンパク質発現レベルを分析した。図1 4 Aに示されるとおり、H R P - 3タンパク質が神経芽腫細胞株中に、検査した他の腫瘍細胞及び正常細胞株に比較してより高レベルで存在することが見出された。

20

【 0 0 5 0 】

次の工程として、H R P - 3が神経芽腫細胞により細胞外区画中に放出されるかどうかを分析した。1 0つの神経芽腫細胞株の条件培地を濃縮し、タンパク質を沈殿させ、ウェスタンブロット分析によりH R P - 3の存在について分析した。図1 4 - Bに示されるとおり、G 1 - L 1 - N、N X S 2、I M R 3 2、H T L A 2 3 0、L A N 5及びS K N B E 2細胞を含む大抵の神経芽腫細胞株は、H R P - 3をその培養培地中に分泌する。

【 0 0 5 1 】

更に、我々は2つの以前に説明されているマウスモデルの神経芽腫、同所 ( orthotopic ) 異種移植片モデル及び偽転移性異種移植片モデル由来の腫瘍組織中のH R P - 3発現を分析した ( Pastorino et al., 2003; Marimpietri et al., 2007 )。副腎中へのG 1 - L 1 - N細胞の同所注射が局所的な腫瘍の発達を生じた一方で、偽転移性モデル中へのH T L A 2 3 0細胞の静脈内注射は腎臓中での転移発達を生じた。両者の腫瘍中のH R P - 3タンパク質のレベルをウェスタンブロット分析により分析し、未処理の健康なマウスの腎臓及び副腎中のH R P - 3発現と比較した。図1 4 Cに示されるとおり、H R P - 3は、副腎及び脳組織中で発現することが見出され、その一方で腎臓及び肝臓組織は極めて低いレベルのH R P - 3を含有した。重要なことに、H T L A 2 3 0及びG 1 - L 1 - N腫瘍組織中のH R P - 3タンパク質レベルはそれぞれの宿主組織中のレベルを超えた。

30

【 0 0 5 2 】

したがって、神経芽腫組織によるH R P - 3発現及び分泌が異常なまでに高いH R P - 3レベルを細胞外腫瘍環境において生じることを結論付けることができる。

40

【 0 0 5 3 】

#### 実施例 4

#### オリゴヌクレオチドによるH R P - 3ターゲッティング

二重鎖D N Aとの複合体にあるP W W Pドメインの利用可能な構造を基礎として、短い ( 1 5 b p ) 二重鎖D N A及び3つの派生D N A二重鎖をH R P 3をターゲッティングするために設計した ( 図1 2 )。この設計したD N Aの配列は図面中で左側に示され、Luka sik et alの二重鎖 ( 二重鎖1 ) で導入された変化を強調して赤及び下線を引いた塩基を有する。この二重鎖は様々な分子形状を試験するために ( 二重鎖3 )、そして、この結合

50

のためにいかにこの配列が重要であるかを理解するために設計されている（二重鎖 2 及び 4）。

【0054】

4つの全てのDNA二重鎖を、これらがそのPWWPドメインに結合することによりHRP-3機能を妨げることができるかどうかを確認するために、我々の3T3移動*in vitro*アッセイにおいて試験した（図13）。図13では、この左から最初の欄がFBSを用いたコントロールの移動を、そして、この左から二番目の欄がFBSなしのコントロールの移動を示す。この左から三番目の欄はネガティブコントロールである。この左から四番目の欄はHRP-3の存在における移動障害を示す。この左から五番目の欄は1000nMの濃度での二重鎖（DNA1）はFBSを用いたコントロールと比較して移動に対するいかなる影響をも有さないことを示す。この更なるデータはDNA1がHRP-3の抗移動作用を濃度依存的に阻害することを示す。特に、DNA1の250nMの濃度では、3T3細胞の移動がFBSを用いたコントロールと匹敵する。このように、二重鎖1は、HRP-3のタンパク質作用を消滅させることができる。この作用は用量依存的であり、かつ、特異的にその構造に関連し、というのも単鎖はいかなる活性をも示さないからである。

10

【0055】

我々は二重鎖2のわずかな活性だけを見出し、二重鎖3及び4の活性は見出さなかった。これらの最後のデータは特に興味深いものであり、というのもこれらはこの結合が主としてこのオリゴの構造・特異的活性で当然であることを確認するからである。

20

【0056】

更に、これはHUVEC細胞に対して活性があるので、我々は移動アッセイを実施し、この場合に二重鎖1は50nMの濃度でHRP-3の完全に抗移動性の活性を回復できる（データ示さず）。

【0057】

修飾した単鎖オリゴヌクレオチドを用いてヒトの内皮細胞発芽に対するこのタンパク質の作用を遮断することを2回試みた。組み換えタンパク質、及び合成オリゴ、配列番号1、2及び3を用いる試料においては、この発芽した球状体の数は組み換えタンパク質を用いた試料に比較して減少している（図19）。

【0058】

この結果から出発して、我々は、マウス血清中で改善された耐性を有する、本発明によるヘアピン構造を有するオリゴヌクレオチド配列を獲得した（図15）。化学修飾の導入により、例えば、2'-OMe、2'-F又は逆転した極性の導入により、より良好なファーマコキネティック特性を有する本発明による分子配列を我々は設計した。これら配列は有利には線状及び分枝鎖状PEGでもってコンジュゲートされていてよい。

30

【0059】

以下の本発明による配列においては、下線を引いたか又は星印を付したモノマーが修飾ヌクレオチド構成ブロックである：この下線を引いたモノマーは合成の2'-OMe RNA構成ブロックであり、かつ、星印を付したモノマーは末端基NH<sub>2</sub>を5'（5'-アミノ基）に有するヌクレオチド構成ブロックであり、これはPEG単位とアミド結合を形成できる。モノマー「iA」は、逆転した極性を指し、すなわち、3'-3'の逆位連結を有する構成ブロックである。

40

【0060】

配列

SEQ. ID N°:1) 5'-TAC AAC ACC CAC AAA AAA TTT GTG GGT GTT GTA 3'

SEQ. ID N°:2) 5'-UAC AAC ACC CAC AAA AAA UUU GUG GGU GUU GUA 3' (2'-OMe)

SEQ. ID N°:3) 5'-TAC AAC ACC CAC AAA - [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>5</sub> - TTT GTG GGT GTT GTA - [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>5</sub>H - 3'

SEQ ID N°: 4) 5'-TAC AAC ACC CAC AAA - [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>3</sub> - TTT GTG GGT GTT GTA - [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>3</sub>H - 3'.

SEQ ID N°: 5) 5' - UAC AAC ACC CAC AAA AAA TTT GTG GGT GTT GUA 3'

SEQ ID N°: 6) 5' - UAC AAC ACC CAC AAA AAA TTT GTG GGT GTT GUA - 3'

SEQ ID N°: 7) 5' - UAC AAC ACC CAC AAA AAA UTT GTG GGT GTT GUA 3'

SEQ ID N°: 8) 5' -(NH)-T\*AC AAC ACC CAC AAA AAA UTT GTG GGT GTT GTA3'

SEQ ID N°: 9) 5' PEG-(NH)-T\*AC AAC ACC CAC AAA AAA UTT GTG GGT GTT GT<sub>A</sub>3'

SEQ ID N°: 10) 5'-(NH)-T\*AC AAC ACC CAC AAA AAA UTT GTG GGT GTT GT<sub>iA</sub>-3'

SEQ ID N°: 11) 5' - PEG (40 KD<sub>a</sub>)-(NH)-T\*AC AAC ACC CAC AAA AAA UTT GTG GGT GTT GT<sub>iA</sub>-3'

10

#### 【 0 0 6 1 】

##### 実施例 5

##### 細胞毒性試験

結合 (ref. Lukasik et al., 2006)、及び、*in vitro*での溶解性 HRP - 3 の血管形成促進性作用の遮断 (データ示さず) のためのこれら配列の能力から出発して、我々は、図 16 で示されるように、様々な細胞株中での上記段落 [ 0 0 6 0 ] における配列番号 11 (化合物名 BN 2 1 0 で同定) の細胞毒性、及び *in vivo*でのその急性毒性を試験することを決定した。

20

#### 【 0 0 6 2 】

我々は BN 2 1 0 の急性毒性を *in vivo*で評価した。21.8 ~ 22.9 g の重さの 30 匹の CD - 1 雌マウス (Charles River Italia s.r.l., Via Indipendenza, 11 23885 CALCO (Lecco)) を 5 匹の動物毎の、6 つの群にわけ、マクロロンケージ (タイプ III) 中で室温 22 ± 3 °C 及び相対湿度 55 ± 15 % で飼育した。空気交換は 180 ~ 220 / 時間である。リン酸緩衝食塩水中に溶解した BN 2 1 0 の 3 つの用量を試験した : 3、10 及び 30 mg / kg を静脈内に (i.v., 尾静脈を介して) 又は腹腔内に (i.p.) 投与した。BN 2 1 0 濃度はこの処方物中でそれぞれ 0.155、0.517 及び 1.551 mg / ml であった。マウスを、薬物投与後 14 日間にわたり毒性徴候の外観について毎日、2 回 / 日観察した。アーヴィン試験 (Irvin test) において普通チェックするパラメーターを考慮した。この観察期間を通じて臨床的又は挙動変化の徴候は i.v. 又は i.p. のいずれかで投与されたこの全ての 3 つの用量で検出されなかった。観察 14 日後に全てのマウスを屠殺し、明白な病理学的検査のために解剖した。この剖検の間の全ての徴候又は病理学的変化が精査の対象であった。巨視的徴候又は病理学的変化はこの剖検検査の間に検出されなかった。

30

#### 【 0 0 6 3 】

BN 2 1 0 が、ピンクリスチン、臨床使用において最も有力な化学療法剤の 1 つ、との相乗作用を有する可能性を更に試験した。このために、250 nM の BN 2 1 0 単独で、又は様々な濃度のピンクリスチンと組み合わせて、G1 - L - 1 N 神経芽腫細胞で MTT 試験を実施した。図 4 に示されるように、ピンクリスチンが 2.5 ~ 5 nM の濃度で G1 - L - 1 - N 細胞の増殖を阻害することができた一方で、250 nM の BN 2 1 0 の添加はピンクリスチン処理の作用を促進も阻害もしなかった。更に、BN 2 1 0 単独、又は PEG 後端部単独、は、G1 - L - 1 - N 細胞に対していかなる細胞毒性作用も示さなかった。

40

#### 【 0 0 6 4 】

##### 実施例 6

##### *in vivo*モデル

50

以前の実験において、BN210は、*in vitro*で抗血管形成作用を有することが示されている（データ示さず）。したがって、腫瘍血管形成のモデルにおいて*in vivo*でBN210の効力を試験した。神経芽腫を腫瘍モデルとして選択し、というのもHRP-3は原則的にマウス中の神経系で発現するからであり、そして以前の実験はHRP-3が、様々なヒトの神経芽腫細胞株の条件培地中に存在し、かつ、過剰発現することを示している。HRP-3は試験した細胞株のいずれの増殖にも作用しないので、細胞毒性剤、ビンクリスチンと組み合わせてBN210を使用することが適当であることが見出された。

#### 【0065】

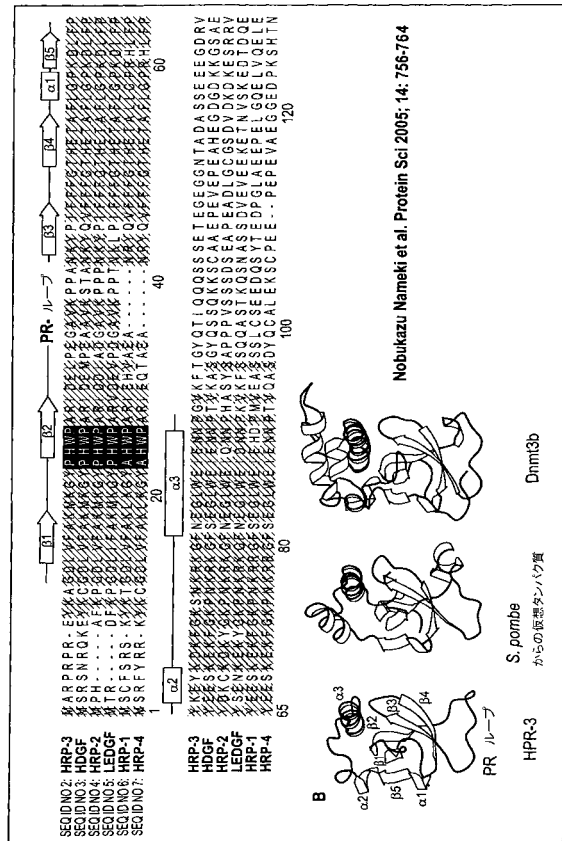
マウスを特定の病原体フリーの条件下で飼育した。この*in vivo*実験を5週齢の雌の無胸腺（ヌードnu）マウスを使用して実施した。マウスをキシラジン（10mg/kg）及びケタミン（90mg/kg）の混合物で麻酔処理し（Imalgene 1000, Merial Italia S.p.A., Milan, イタリア）、開腹手術し、神経芽腫（NB）細胞株、G1-L1-N（10 $\mu$ lの食塩水溶液/マウス中1.5 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞）で、左の副腎の包中に同所的に注射した、これは以前に報告されているとおりである（Pastorino F. et al., Cancer Res 63, 2003; Pastorino F. et al., Clin Cancer Res 2008）。腫瘍細胞移植後に死亡率は観察されなかった。NB腫瘍を22日間にわたりこの注射した細胞から成長させ、次いで動物をランダムに3つの群に分けた。1つの群は5週間にわたり週に一回ビンクリスチン1mg/kgを用いて、*i.v.*処理した（VCR、全部で5投与）。第2の群の動物をVCR（1mg/kgの*i.v.*注射、5週間にわたり週に1回、全部で5投与）、及び、BN210（7mg/kgの*i.p.*注射、5日/週、全部で20投与）の組み合わせで処理した。ネガティブコントロールマウスをHEPES緩衝食塩水で処理した。生存実験における実験群（n=8マウス/群）の間での差異の有意性を、カイ二乗ログランク試験を使用してカプラン・マイヤー曲線により決定した。これら知見はP値が<0.05である場合に有意であるとみなされた。

#### 【0066】

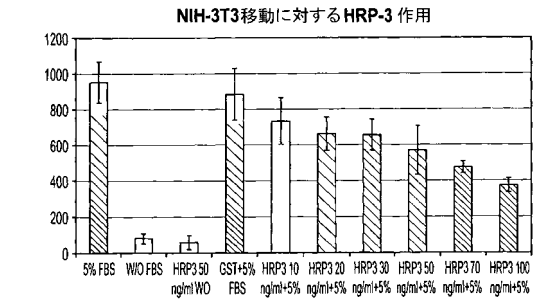
同所性神経芽腫（NB）異種移植片に対するビンクリスチン（VCR）と組み合わせた配列 配列番号11（BN210）の*in vivo*抗腫瘍活性

VCR単独投与と比較して、BN210がNB異種移植片中でVCRの治療作用を改善するために使用できるかどうかを決定するために、G1-L1-N細胞をヌードマウスの左の副腎中に注入し、約200mm<sup>3</sup>mpサイズに達するまで成長させた（22日）。NB腫瘍を有するマウスを次いで、上で報告されているとおり、週毎の間隔で薬剤で処理した。図18に示されているとおり、VCR単独で処理した（1mg/kg *i.v.*、この実験において治療量以下の用量）NBを有するマウスは、ネガティブコントロールマウスに比較してその寿命のいかなる増加も示さなかった。対照的に、VCR+BN210の組み合わせで処理したマウスは、ネガティブコントロール及びVCR処理群に比較してその寿命の統計学的に有意な増加を有した（p=0.0058）（図18）。

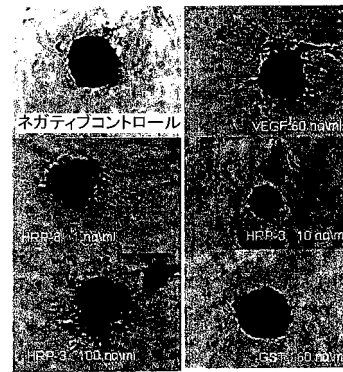
【図 1】



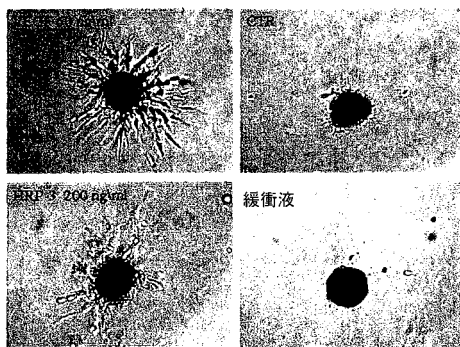
【図 2】



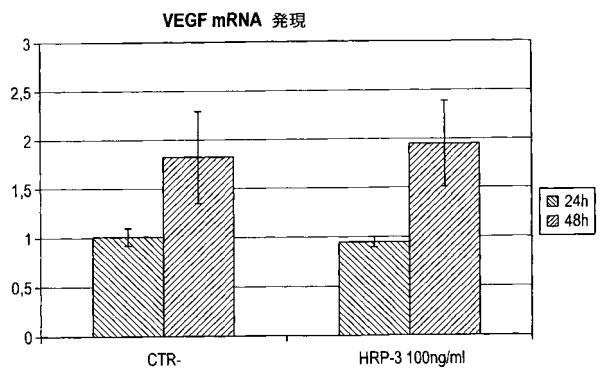
【図 3】



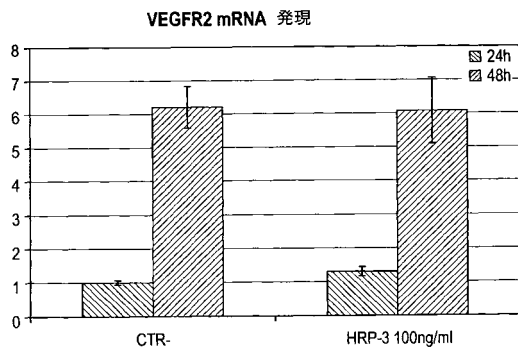
【図 4】



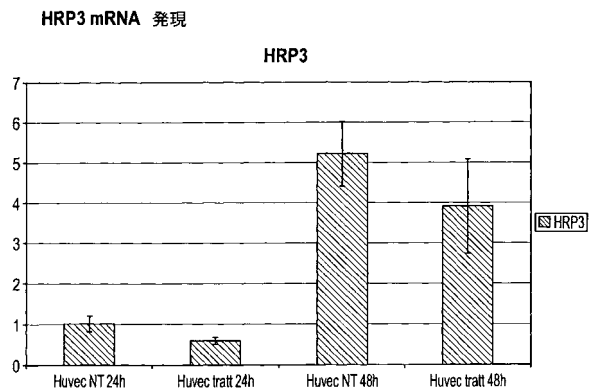
【図 6】



【図 5】



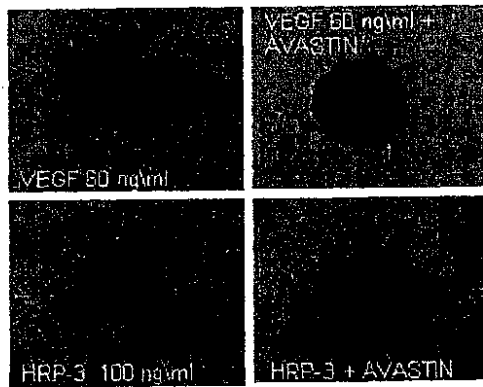
【図 7】



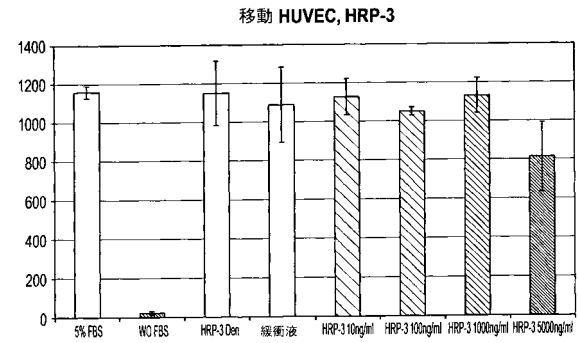


【図 8】

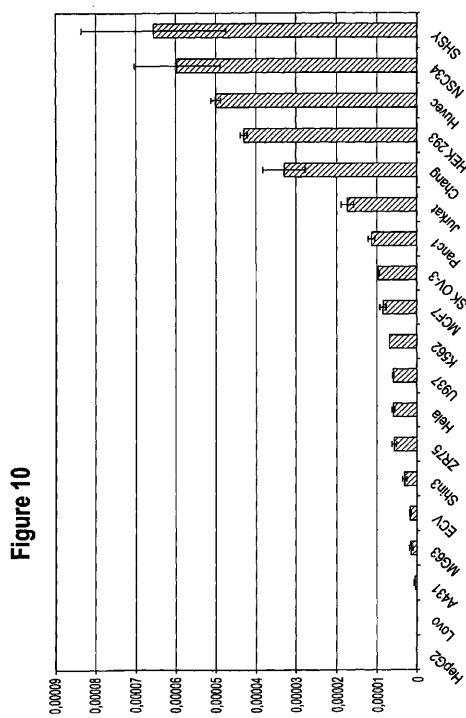
Figure 8



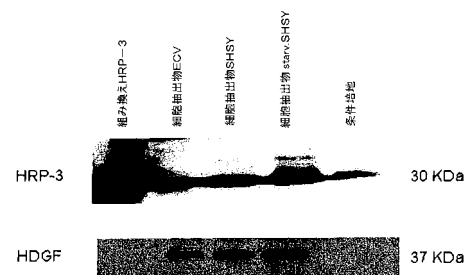
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【図 12】

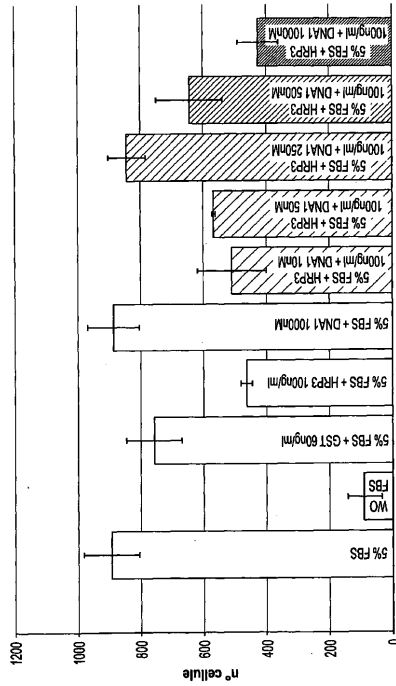
二重鎖 1  
 配列番号 8 5'-TAC AAC ACC CAC AAA-3'  
 配列番号 9 3'-ATG TTG TGG GTG TTT-5'

二重鎖 2  
 配列番号 10 5'-TAC AAC AII CAC AAA-3'  
 配列番号 11 3'-ATG TTG TAA GTG TTT-5'

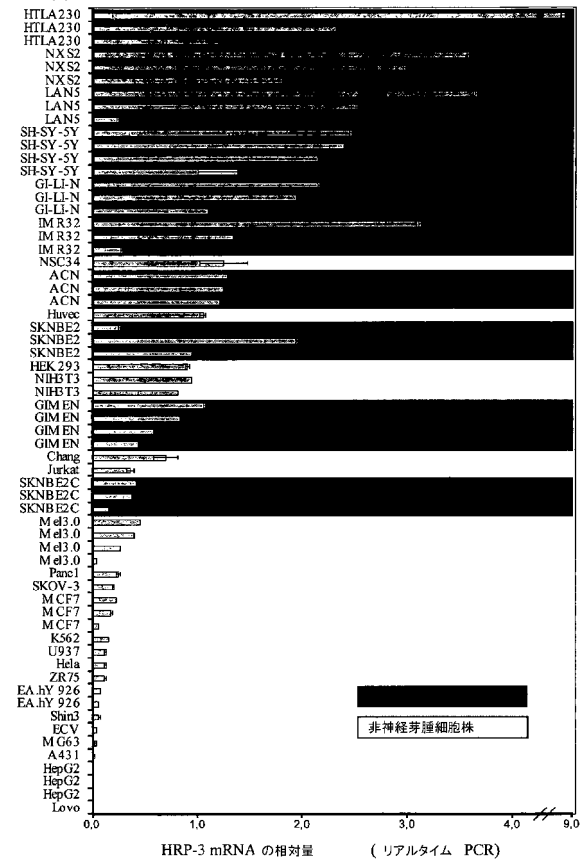
二重鎖 3  
 配列番号 12 5'-TAC AAC AA ACC CAC AAA-3'  
 配列番号 13 3'-ATG TTG . TGG GTG TTT-5'

二重鎖 4  
 配列番号 14 5'-CAC ACA CAC ACA CAC-3'  
 配列番号 15 3'-GTG TGT GTG TGT GTG-5'

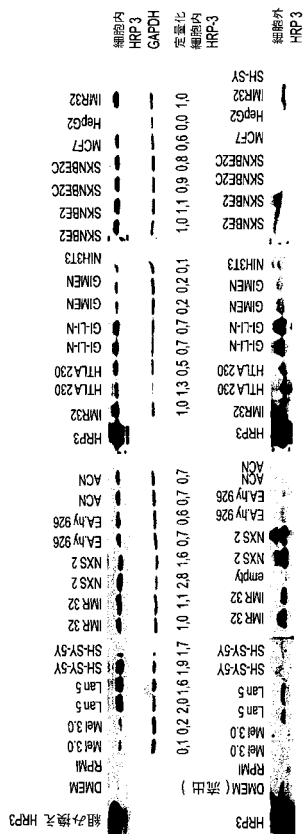
### Figure 13



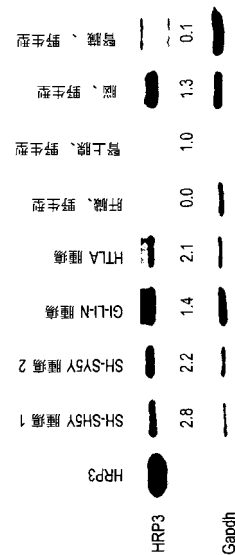
A



B



C



【図 15】

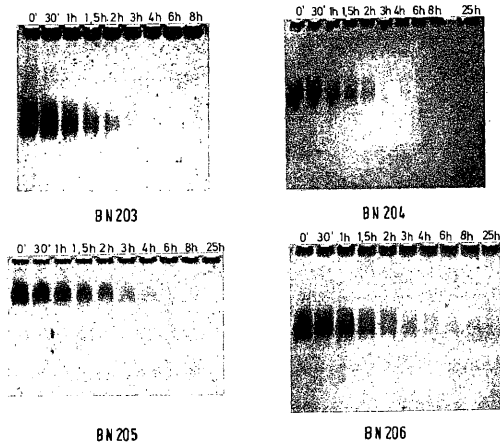
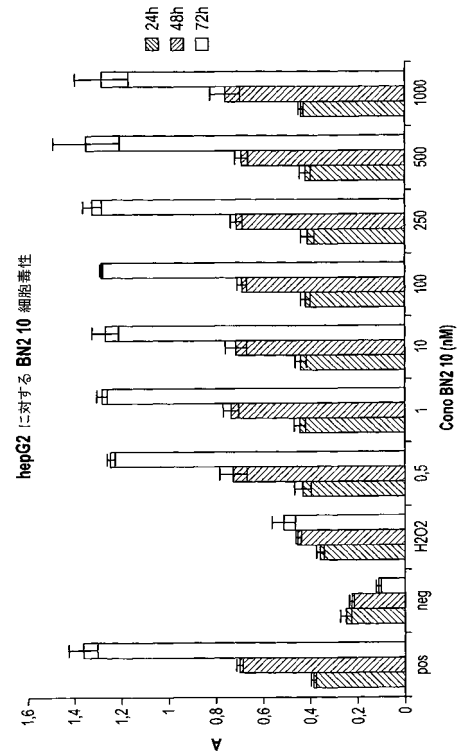
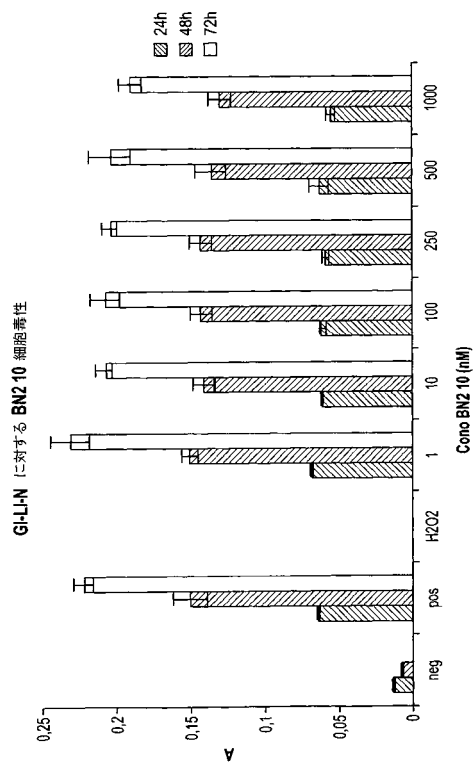


Figure 15

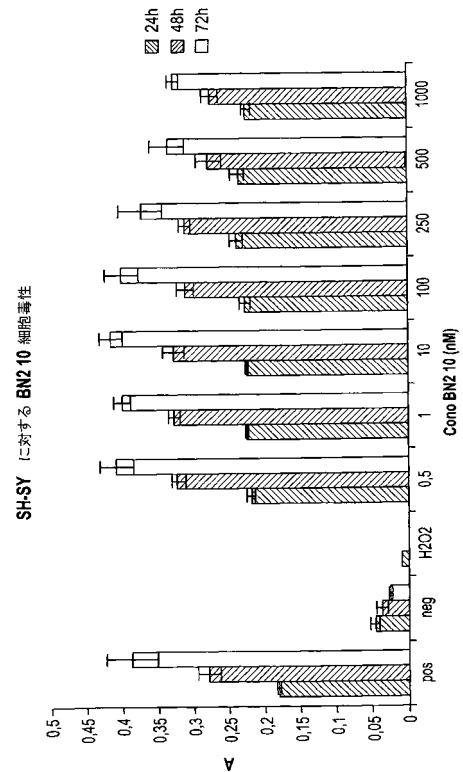
【図 16 - 1】



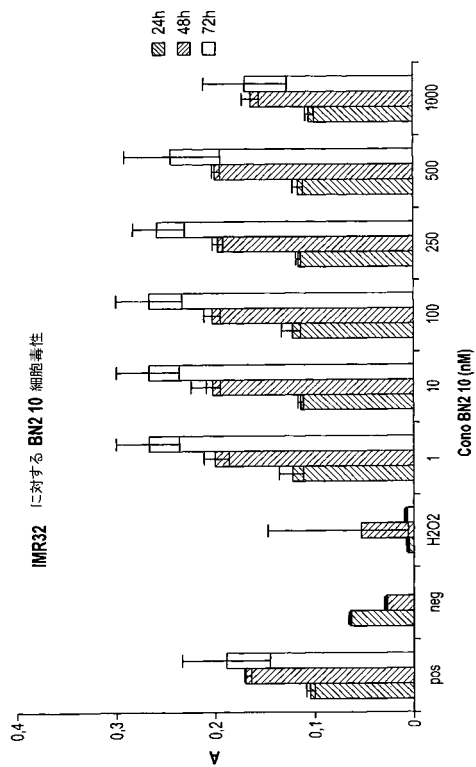
【図 16 - 2】



【図 16 - 3】

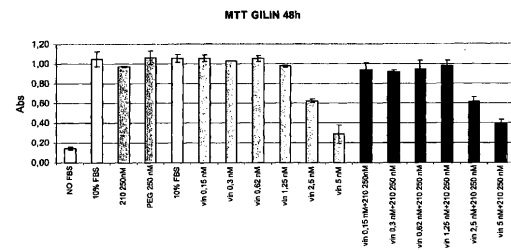


【図 16 - 4】

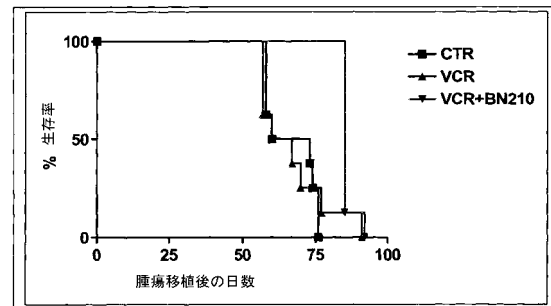


【図 17】

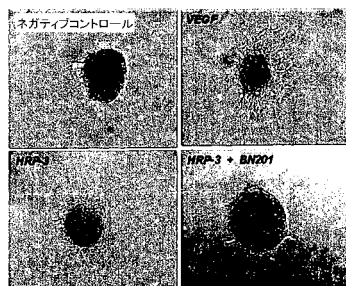
Figure 17



【図 18】



【図 19】



【配列表】

0005559159000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 1/18	(2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 K 31/7105	(2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

(74)代理人 100128679

弁理士 星 公弘

(74)代理人 100135633

弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100156812

弁理士 篠 良一

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(72)発明者 ヴァレンチナ アンロ

イタリア国 モンタルト ドラ ストラータ カンピアス 4 1

(72)発明者 サラ デウィルデ

イタリア国 (トリノ) レッソロ ヴィア チェザーレ バッティスティ 9

(72)発明者 ドメニコ パローネ

イタリア国 (トリノ) トリノ コルソ ロッセリ 6 6

(72)発明者 ニコレッタ ミナリ

イタリア国 (ピエツラ) ピエツラ ヴィア ガルランダ 4

(72)発明者 エンリコ エンメ . ブッチ

イタリア国 イヴレア ピアッツァ ジオベルティ ヌメロ 1 5

(72)発明者 ロベルト サピオ

イタリア国 ベリッツィ ヴィア ベネヴェント ヌメロ 2

(72)発明者 マルゲリータ ヴァレンテ

イタリア国 フォルミア ヴィア フォッソ デグリ ウリヴィ エッセエンネチ

(72)発明者 サラ トスティ

イタリア国 カンブルツァーノ ヴィア モリーノ ヌメロ 4 6

(72)発明者 ラウラ リッチ

イタリア国 ブロロ ヴィア ヌオヴァ ヌメロ 2 9

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 1 5 0 7 5 (WO , A 1 )

NAR, Vol. 22, No. 22 (1994) p. 4810-4817

Protein Sci., Vol. 15 (2006) p. 314-323

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/68

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 / W P I D S  
/ W P I X ( S T N )