

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-506923

(P2016-506923A)

(43) 公表日 平成28年3月7日 (2016. 3. 7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 9/10 (2006. 01)	A 6 1 P 9/10	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/50 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/34 (2006. 01)	A 6 1 K 9/50	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-554285 (P2015-554285)	(71) 出願人	515203044
(86) (22) 出願日	平成26年1月23日 (2014. 1. 23)		ピエール・ファール・メディカマン・エ
(85) 翻訳文提出日	平成27年9月18日 (2015. 9. 18)		ス・ア・エス
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/058500		P I E R R E F A B R E M E D I C A
(87) 国際公開番号	W02014/115103		M E N T S. A. S.
(87) 国際公開日	平成26年7月31日 (2014. 7. 31)		フランス国、エフー92654 ブローニ
(31) 優先権主張番号	13305082.3		ュ・セデックス、プラス・アベル・ガン
(32) 優先日	平成25年1月24日 (2013. 1. 24)		4 5
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人	512274953
			フンダシオ オスピタル ウニベルシタリ
			バル デブロンーインスティテュート
			デ レセルカ
			スペイン国 エー08035 バルセロ
			ナ、 パセッチ バル デブロン 119
			-129
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カプセル化アンタゴm i rを含む組成物

(57) 【要約】

本発明は、血管新生に関与するm i R N A又はその前駆体の少なくとも1つの阻害剤の有効量を含む組成物に関し、該阻害剤は、生分解性かつ生体適合性の高分子ミクロスフィアにマイクロカプセル化されている。本発明はまた、虚血によって引き起こされる心臓疾患を含む心臓疾患を予防又は治療するための該組成物の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血管新生に関与する *miRNA* 又はその前駆体の少なくとも 1 つの阻害剤の有効量を含む組成物であって、該阻害剤は、生分解性かつ生体適合性の高分子ミクロスフィアにマイクロカプセル化されている、該組成物。

【請求項 2】

該 *miRNA* が、*miR* - 92 (*miR* - 92a - 1、*miR* - 92a - 2 及び *miR* - 92b を含む)、*miR* - 17、*miR* - 503、*miR* - 16 (*miR* - 16 - 1 及び *miR* - 16 - 2 を含む)、*miR* - 374 (*miR* - 374a、*miR* - 374b 及び *miR* - 374c を含む)、*miR* - 24 (*miR* - 24 - 1 及び *miR* - 24 - 2 を含む)、*miR* - 483、*miR* - 34 (*miR* - 34a、*miR* - 34b 及び *miR* - 34c を含む)、*miR* - 20 (*miR* - 20a 及び *miR* - 20b を含む)、*miR* - 15 (*miR* - 15a 及び *miR* - 15b を含む) を含むファミリーから選択される、請求項 1 の組成物。

【請求項 3】

該 *miRNA* が、成熟した：

a) 配列番号 21、22 若しくは 23 からなる群より選択された配列、又は配列番号 21、22 若しくは 23 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 92a；

b) 配列番号 24 若しくは 25 からなる群より選択された配列、又は配列番号 24 若しくは 25 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 92b；

c) 配列番号 26 若しくは 27 からなる群より選択された配列、又は配列番号 26 若しくは 27 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 17；

d) 配列番号 28 若しくは 29 からなる群より選択された配列、又は配列番号 28 若しくは 29 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 503；

e) 配列番号 30、31 若しくは 32 からなる群より選択された配列、又は配列番号 30、31 若しくは 32 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 16；

f) 配列番号 33、34、35、36、37 若しくは 38 からなる群より選択された配列、又は配列番号 33、34、35、36、37 若しくは 38 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 374；

g) 配列番号 39、40、41 若しくは 42 からなる群より選択された配列、又は配列番号 39、40、41 若しくは 42 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 24；

h) 配列番号 43 若しくは 44 からなる群より選択された配列、又は配列番号 43 若しくは 44 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 483；

i) 配列番号 45、46、47、48、49 若しくは 50 からなる群より選択された配列、又は配列番号 45、46、47、48、49 若しくは 50 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 34；

j) 配列番号 51、52、53 若しくは 54 からなる群より選択された配列、又は配列番号 51、52、53 若しくは 54 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 20；

k) 配列番号 55、56、57 若しくは 58 からなる群より選択された配列、又は配列番号 55、56、57 若しくは 58 の 1 つに対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、*miR* - 15

からなる、請求項 1 の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 4】

該 miRNA 前駆体が、

- a) 配列番号 1 の配列又は配列番号 1 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-92a-1；
 - b) 配列番号 2 の配列又は配列番号 2 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-92a-2；
 - c) 配列番号 3 の配列又は配列番号 3 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-92b；
 - d) 配列番号 4 の配列又は配列番号 4 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-17；
 - e) 配列番号 5 の配列又は配列番号 5 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-503；
 - f) 配列番号 6 の配列又は配列番号 6 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-16-1；及び
 - g) 配列番号 7 の配列又は配列番号 7 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-16-2；
 - h) 配列番号 8 の配列又は配列番号 8 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-374a；
 - i) 配列番号 9 の配列又は配列番号 9 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-374b；
 - j) 配列番号 10 の配列又は配列番号 10 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-374c；
 - k) 配列番号 11 の配列又は配列番号 11 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-24-1；
 - l) 配列番号 12 の配列又は配列番号 12 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-24-2；
 - m) 配列番号 13 の配列又は配列番号 13 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-483；
 - n) 配列番号 14 の配列又は配列番号 14 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-34a；
 - o) 配列番号 15 の配列又は配列番号 15 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-34b；
 - p) 配列番号 16 の配列又は配列番号 16 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-34c；
 - q) 配列番号 17 の配列又は配列番号 17 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-20a；
 - r) 配列番号 18 の配列又は配列番号 18 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-20b；
 - s) 配列番号 19 の配列又は配列番号 19 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-15a；及び
 - t) 配列番号 20 の配列又は配列番号 20 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-15b
- からなる、請求項 1 の組成物。

【請求項 5】

該 miRNA 阻害剤が、該 miRNA 又はその前駆体に標的化された配列を有する 8 ~ 49 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドである、請求項 1 ~ 4 の組成物。

【請求項 6】

該オリゴヌクレオチドが、標的 miRNA 又はその前駆体の配列に対して少なくとも部分的に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 5 の組成物。

【請求項 7】

該アンチセンスオリゴヌクレオチドが、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、小分子RNA、アンタゴmir、LNA、CDNA、PNA、モルホリノオリゴヌクレオチド、又はその組合せからなる群より選択される、請求項6の組成物。

【請求項8】

該オリゴヌクレオチドがアンタゴmirからなる、請求項6の組成物。

【請求項9】

該アンタゴmirが、配列番号1～58からなる群より選択された配列のヌクレオチドに対して相補的である少なくとも16個連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、請求項8の組成物。

【請求項10】

該アンタゴmirが、配列番号59又は60の配列、及びその塩基置換を除く改変物、並びに、配列番号59又は60の少なくとも8個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントを含む、請求項9の組成物。

【請求項11】

該マイクロスフィアが25 µmを超えない直径を提示している、請求項1～10の組成物。

【請求項12】

該マイクロスフィアの少なくとも50%が、5～20 µm、優先的には5～15 µmの直径を提示している、請求項1～10の組成物。

【請求項13】

該マイクロスフィアが1%～15%w/wの阻害剤を取り込んでいる、請求項1～12の組成物。

【請求項14】

該マイクロスフィアが1%～10%w/wの阻害剤を取り込んでいる、請求項1～12の組成物。

【請求項15】

該マイクロスフィアがポリ-d, l-ラクチド(PLA)からなる高分子でできており、該高分子は1つ以上の他の高分子と場合によりブレンドされている、請求項1～14の組成物。

【請求項16】

該マイクロスフィアがポリ-d, l-ラクチド-コ-グリコリド(PLGA)からなる共重合体でできており、該高分子は1つ以上の他の高分子と場合によりブレンドされている、請求項1～14の組成物。

【請求項17】

該マイクロスフィアがポリ-d, l-ラクチド-コ-グリコリド(PLGA)及びポリ-d, l-ラクチド(PLA)からなる高分子のブレンドからできている、請求項1～14の組成物。

【請求項18】

PLGA高分子中のラクチド：グリコリドの比が50：50から95：5のモル比である、請求項16又は17の組成物。

【請求項19】

該高分子の固有粘度が0.1～0.70 dl/gである、請求項16～18の組成物。

【請求項20】

心筋梗塞の処置に使用するための請求項1～19のいずれか一項の組成物。

【請求項21】

該心筋梗塞が急性心筋梗塞からなる、請求項20の組成物。

【請求項22】

被験者に請求項1～19の一項記載の組成物の有効量を投与することを含む、それを必要とする被験者における心室リモデリングを元に戻す又は予防する方法。

【請求項23】

10

20

30

40

50

該投与が、冠内経路による投与からなる、請求項 22 の方法。

【請求項 24】

心筋梗塞の治療又は予防に使用するための生分解性かつ生体適合性のミクロスフィア集団であって、該ミクロスフィアは：

- 5 ~ 15 μ m の平均直径を有し；
- ポリ - d , l - ラクチド - コ - グリコリド (P L G A) ；ポリ - d , l - ラクチド (P L A) 又はそのブレンドからできており；
- 心室リモデリングを予防することのできる 1 % ~ 15 %w/w の治療剤を取り込んでおり、

該治療剤は、mi R - 92 (mi R - 92 a - 1、mi R - 92 a - 2 及び mi R - 92 b を含む)、mi R - 17、mi R - 503、mi R - 16 (mi R - 16 - 1 及び mi R - 16 - 2 を含む)、mi R - 374 (mi R - 374 a、mi R - 374 b 及び mi R - 374 c を含む)、mi R - 24 (mi R - 24 - 1 及び mi R - 24 - 2 を含む)、mi R - 483、mi R - 34 (mi R - 34 a、mi R - 34 b 及び mi R - 34 c を含む)、mi R - 20 (mi R - 20 a 及び mi R - 20 b を含む)、mi R - 15 (mi R - 15 a 及び mi R - 15 b を含む)、より優先的には mi R - 92 a、又はその前駆体からなる群より選択された mi R N A の阻害剤からなる、該ミクロスフィア集団。

【請求項 25】

該阻害剤がアンタゴ mi r である、請求項 24 のミクロスフィア。

【請求項 26】

少なくとも i) 請求項 1 ~ 19 記載の組成物及び / 又は請求項 24 若しくは 25 記載のミクロスフィア、並びに ii) 該組成物が配置されたシリンジ又はバイアル又はアンプルを含む、キット。

【請求項 27】

溶媒容器に配置された溶媒をさらに含む、請求項 26 のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、虚血性心疾患を含む心臓疾患を予防又は治療することを目的とした医薬製剤の分野に関する。

【0002】

発明の背景

急性心筋梗塞 (A M I) は、心筋梗塞とも呼ばれ、心臓発作としても一般的に知られているが、世界中の最も工業化された国々における大きな健康リスクであり、依然として世界中における罹患及び死亡の第一原因である。

【0003】

一般的に、A M I は、心臓組織への急激かつ持続的な血流の減少によって引き起こされ、これは通常、冠動脈の狭窄又は閉塞の結果である。適切な血液の供給がなければ、組織は虚血となり、心筋細胞 (心臓筋肉細胞) 及び血管構造は死滅する。

【0004】

最近数十年間で A M I の処置において主に冠血流再建に関して薬理的療法と併用して多くの進展が見られた。再灌流療法は、梗塞領域を減少させ、長期及び短期の罹患率及び死亡率を改善することによって、A M I の自然進行を変化させることに成功した。しかしながら、現在利用可能な 2 つの再灌流戦略の使用にはかなりの制限がある：線維素溶解により冠動脈の透過度は低くなり、初回血管形成術は、A M I の発生から最初の数時間の間には頻繁に適用できない。さらに、幾人かのカテーテル挿入患者においては、正常な心外膜流にも関わらず「再流が全く起こらない」現象又は微小血管再灌流の欠如が起こり、これにより有害な機能的転帰がもたらされる。これは、再灌流療法が、コラーゲンによる癒

10

20

30

40

50

痕形成の複雑で内因的な修復過程である、有害な心筋のリモデリング（これは心室拡張、収縮不全及びその後の心不全をもたらす）の発生を予防しなかったことを意味する。A M I の約 30%におけるその発生は、主に、より大きな梗塞サイズ、微小血管閉塞、及び依然として十分に解明されていない好ましくない修復反応に関連している。

【0005】

修復的線維化及び虚血組織の機能的回復は、酸素を含ませた血液を供給するネットワークの確立に依存しているので、損傷領域から機能的組織へのインサイツでの直接的な変換を達成するために、治療領域において血管新生を誘導することによって血管床を改善する努力がなされた。

【0006】

治療的な血管新生の誘導は、この現象の発生を減弱させることができた。それにも関わらず、静脈内血管新生促進因子を用いての数年間の臨床試験の結果は不満足なものであった。理論によって固めたくはないが、この失敗を説明する理由の1つは、静脈内経路は、標的組織に届きかつそこで有効濃度の薬物を維持して、重度に損なわれた心臓容態の下で機能的な血管ネットワークを促進及び維持することができないであろうことであり得ると考えられる。

【0007】

この問題に対処し、A M I 後の心不全を予防するために、心筋及び心血管を再生する可能性に関する研究が過去10年間以内に始まった。多能性前駆細胞を投与し、血管増殖因子を注入する初期の研究は有望な結果を示したが、臨床の場への移行は、これらの療法が、破壊された心筋の回復を可能とするために適切な方法で新生血管を再生することができないことを示した。

【0008】

今日、細胞療法を用いての損傷された心臓の血管新生及び再増殖、並びに、特定の薬物及び再同期療法は、この現象の進行を減速させ得るが、その発生の予防は依然として心臓医薬にとって懐疑的な課題である。それ故、有害な左心室リモデリングを予防する新規な処置戦略が必要とされる。

【0009】

発明の要約

本発明は、マイクロRNAの活性又は発現を調節することによって心室リモデリングを元に戻す又は予防する組成物を投与することによる、心疾患、好ましくは虚血性疾患の処置に関する。より特定すると、本発明は、血管新生に関与するマイクロRNAの阻害剤を含む組成物を提供し、該阻害剤は好ましくは、虚血標的組織に局所的に該阻害剤を放出することのできる新規な送達ビヒクルへと取り込まれている。さらに、本発明は、心室リモデリングを元に戻す又は予防する方法、及び、該方法に有用なキットを提供する。

【0010】

本発明は、血管新生に関与するmiRNA又はその前駆体の少なくとも1つの阻害剤の有効量を含む組成物に関し、該阻害剤は、生分解性かつ生体適合性の高分子ミクロスフィアにマイクロカプセル化されている。

【0011】

上記の組成物のいくつかの実施態様において、該miRNAは、miR-92(miR-92a-1、miR-92a-2及びmiR-92bを含む)、miR-17、miR-503、miR-16(miR-16-1及びmiR-16-2を含む)、miR-374(miR-374a、miR-374b及びmiR-374cを含む)、miR-24(miR-24-1及びmiR-24-2を含む)、miR-483、miR-34(miR-34a、miR-34b及びmiR-34cを含む)、miR-20(miR-20a及びmiR-20bを含む)、miR-15(miR-15a及びmiR-15bを含む)を含むファミリーから選択される。

【0012】

上記の組成物のいくつかの実施態様において、該miRNA阻害剤は、該miRNA又

10

20

30

40

50

はその前駆体に標的化された配列を有する 8 ~ 49ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドである。特定の実施態様において、該オリゴヌクレオチドは、標的miRNA又はその前駆体の配列に対して少なくとも部分的に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、小分子RNA、アンタゴmir、LNA、CDNA、PNA、モルホリノオリゴヌクレオチド、又はその組合せからなる群より選択され得る。

【0013】

上記の組成物のいくつかの実施態様において、該miRNA阻害剤はアンタゴmirからなり、好ましくは、本明細書に記載の配列番号1~58からなる群より選択された配列のヌクレオチドに対して相補的である少なくとも16個連続したヌクレオチドを含むクレオチド配列を含むアンタゴmirからなる。

10

【0014】

上記の組成物のいくつかの実施態様において、該miRNA阻害剤は、配列番号59又は60の配列、及びその塩基置換を除く改変物、並びに、配列番号59又は60の少なくとも8個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントを含む、アンタゴmirからなる。

【0015】

上記の組成物のいくつかの実施態様において、該ミクロスフィアは、25µmを超えない直径を提示し、これは、5~20µm、優先的には5~15µmの直径を有するミクロスフィアを包含する。

20

【0016】

上記の組成物のいくつかの実施態様において、該ミクロスフィアは、ポリ-d,l-ラクチド(PLA)からなる高分子から作られ、該高分子は場合により1つ以上の他の高分子とブレンドされている。

【0017】

本発明はまた、被験者に有効量の前記組成物を投与することを含む、それを必要とする被験者における心室リモデリングを元に戻す又は予防するための方法に関する。

【0018】

本発明はまた、心筋梗塞の治療又は予防に使用するための生分解性かつ生体適合性のミクロスフィア集団に関し、該ミクロスフィアは、

30

- 5~20µm、優先的には5~15µmの平均直径を有し；
- ポリ-d,l-ラクチド-コ-グリコリド(PLGA)；ポリ-d,l-ラクチド(PLA)又はそのブレンドから作られ；
- 心室リモデリングを予防することのできる1%~15%w/wの治療剤を取り込んでおり、

該治療剤は、miR-92(miR-92a-1、miR-92a-2及びmiR-92bを含む)、miR-17、miR-503、miR-16(miR-16-1及びmiR-16-2を含む)、miR-374(miR-374a、miR-374b及びmiR-374cを含む)、miR-24(miR-24-1及びmiR-24-2を含む)、miR-483、miR-34(miR-34a、miR-34b及びmiR-34cを含む)、miR-20(miR-20a及びmiR-20bを含む)、miR-15(miR-15a及びmiR-15bを含む)、より優先的にはmiR-92a、又はその前駆体からなる群より選択されたmiRNAの阻害剤からなる。

40

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、走査電子顕微鏡によって決定されたアンタゴmir-92a-PLGAミクロスフィアの形態を示す。

【図2】図2は、レーザー光散乱によって決定されたアンタゴmir-92a-PLGAミクロスフィアのサイズ分布を示す。

【図3】図3は、120mgまでのミクロスフィアの反復注射による血行動態及び左心室収

50

縮力における効果を示す。

【図 4】図 4 は、240 mg までのミクロスフィアの反復注射による血行動態及び左心室収縮力における効果を示す。

【図 5】図 5 は、本発明によるミクロスフィアの 1 回の冠内注射の分子効果の試験のプロトコールを示す。

【図 6】図 6 は、本発明によるミクロスフィアによる miR - 92 a 阻害の特異性を示す。

【図 7】図 7 は、カプセル化アンタゴ miR - 92 a が梗塞組織において血管新生を誘導することを示す。血管の総数を全梗塞面積で割って計算された、梗塞帯域における血管密度。N = 20。* P < 0.01。

【図 8】間接的な測定。カプセル化アンタゴ miR - 92 a、プラセボ又は食塩水を用いて処置されたミニブタの梗塞関連動脈における、AMI から 1 か月後に測定された基礎及び最小微小血管抵抗性指数。(a) 基礎微小血管抵抗性指数 (MRI) は、心尖部左冠動脈前下行枝 (Pd) に配置されたプレッシャワイヤを用いて評価された圧力 (mmHg) と、左冠動脈前下行枝の遠位区域に配置されたセンサーによって定量された冠動脈流速 (ml/分) を乗じることによって計算された。最小微小血管抵抗性指数 (MRI_{hyp}) は、大腿静脈 12 F シースを通して投与された 140 µg/Kg/分のアデノシンの静脈内注入により達成された最大充血において測定されたのと同じパラメータを用いて計算された。n = 12。* p < 0.01。* * p = 0.05。(b) 壊死領域における血管の総数と MRI との相関。R² 0.41、p = 0.02、n = 12。(c) 壊死領域における血管の総数と最小 MRI との相関。R² 0.27、p = 0.08、n = 12。

【図 9】直接的な測定。カプセル化アンタゴ miR - 92 a を用いて処置された又は処置されていないミニブタの梗塞関連動脈における AMI から 1 か月後に測定されたベースライン及び真の微小循環抵抗。(a) ベースライン微小循環抵抗 (ベースライン MR) は、心尖部左冠動脈前下行枝 (Pd) に配置されたプレッシャワイヤを用いて評価された圧力 (mmHg) を、左冠動脈前下行枝の遠位区域に配置されたセンサーによって定量された冠動脈流速 (ml/分) で割ることによって計算された。ベースライン MR は、対照と比べて処置群において有意により低かった (7.47 ± 1.33 対 19.62 ± 2.98、p = 0.005)。n = 13。真の微小循環抵抗 (TMR_{hyp}) は、大腿静脈 12 F シースを通して投与された 140 µg/kg/分のアデノシンの静脈内注入により達成された最大充血中ののと同じパラメータを測定して計算された。有意に低い TMR_{hyp} が、対照と比較して処置群において観察された (5.0 ± 1.15 対 14.49 ± 2.4、p = 0.006)。n = 13。(b) 全ての壊死領域における血管密度とベースライン MR との相関。R² = 0.35、P = 0.033、n = 13。(c) 全ての壊死領域における血管密度と TMR_{hyp} との相関。R² = 0.31、P = 0.047。n = 13。

【図 10】AMI から 1 か月後、心室中隔心尖部の運動障害の存在が、割り当てられた処置が分からない心エコー検査者によって評価された。処置及び非処置動物における心室中隔心尖部の運動障害を有する動物の比率が示されている (83.3% 対 16.7%、p = 0.03)。n = 20。

【図 11】インビトロにおける miR 92 a の発現に対するカプセル化アンタゴ miR 92 a 及び非カプセル化アンタゴ miR 92 a の効果の評価。

【図 12】そのそれぞれの miRNA に対するカプセル化アンタゴ miR 17 及び 20 a の効果。

【0020】

発明の詳細な説明

本発明によって包含される全ての実施態様の記載について関連したいくつかの定義が本明細書において以下に示されている。

【0021】

マイクロ RNA (miR) は、生物学的過程の重要な調節因子として出現した小さなノンコーディング RNA である。

10

20

30

40

50

【0022】

「マイクロRNA」、「miRNA」又は「miR」は、約18から約25ヌクレオチド長のノンコーディングRNAを意味する。これらのmiRは、miRNAをコードする個々の遺伝子を含む複数の起源から、タンパク質をコードする遺伝子のイントロンから、又は複数の密接に関連したマイクロRNAをしばしばコードする多シストロン性転写物から派生し得る。

【0023】

現在の知識は、miRNAが、RNAポリメラーゼII (pol II) 又はRNAポリメラーゼIII (pol III) によって転写され、一般的に数千塩基長である一次miRNA転写物 (primiRNA) と呼ばれる初期転写物から生じることを示す。primiRNAは、核においてRNase Droshaによって約70~100ヌクレオチドのヘアピン形の前駆体 (premiRNA) へとプロセッシングされる。細胞質に輸送された後、ヘアピンpremiRNAはさらにダイサーによってプロセッシングされて二本鎖マイクロRNAを生成し；鎖の1つ、いわゆる成熟マイクロRNA (時に両方の鎖が使用され得る) はその後、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に取り込まれ、そこでその標的mRNAと塩基対相補性によって会合する。miRNA塩基がメッセンジャーRNA (mRNA) 標的と完全に対を形成する比較的稀な場合において、それはmRNAの分解を促進する。より一般的には、マイクロRNAは、標的mRNAと不完全なヘテロ二本鎖を形成し、mRNAの安定性に影響を及ぼすか又はmRNAの翻訳を阻害する。

10

【0024】

「ステムループ配列」は、ヘアピン構造を有し、成熟したマイクロRNA配列を含有するRNAを意味する。premiRNA配列及びステムループ配列は重複していてもよい。ステムループ配列の例は、miRBaseとして知られるマイクロRNAデータベースに見られる。

20

【0025】

「マイクロRNA前駆体」は、ゲノムDNAを起源とし、1つ以上のマイクロRNA配列を含むノンコーディング構造のRNAを含む転写物を意味する。例えば、特定の実施態様において、マイクロRNA前駆体はpremiRNAである。特定の実施態様において、マイクロRNA前駆体はprimiRNAである。

【0026】

以下の明記は、標準的な命名体系に従い、小文字の「mir-X」はpremiRNAを指し、大文字の「MiR-X」は成熟形を指す。2つの成熟マイクロRNAが同じpremiRNAの反対のアームを起源とする場合、それらは、-3p又は-5pという接尾辞を用いて示される。相対的発現レベルが公知である場合、名称の後のアスタリスクは、ヘアピンの反対のアームのマイクロRNAと比較して低いレベルで発現されたマイクロRNAを示す。

30

【0027】

以下の明記において、特記しない限り、miR-Xという表現の使用は、-3p及び-5p (ある場合) の両方の形態を含む成熟miRNAを指す。

【0028】

疑いを避けるために、本明細書において、マイクロRNA、miRNA及びmiRという表現は、同じ産物を示す。

40

【0029】

本発明の脈絡において、血管新生に關与するマイクロRNA上の特定の焦点を結果として用いて、血管新生又は血管新生過程を調節することが目的である。従って、本発明の目的は、血管新生の調節に關与するマイクロRNAファミリーに屬する少なくとも1つのマイクロRNAを調節することである。

【0030】

「マイクロRNAファミリー」という表現によって、血管新生又は血管新生過程の調節からなる関連した機能を有するマイクロRNA群を意味する。より特定すると、制限され

50

ることなく、該マイクロRNAは、抗血管新生活性を提示するマイクロRNAからなる群より選択される。

【0031】

より特定すると、制限されることなく、このようなマイクロRNAは、miR-92 (miR-92a-1、miR-92a-2及びmiR-92bを含む)、miR-17、miR-503、miR-16 (miR-16-1及びmiR-16-2を含む)、miR-374 (miR-374a、miR-374b及びmiR-374cを含む)、miR-24 (miR-24-1及びmiR-24-2を含む)、miR-483、miR-34 (miR-34a、miR-34b及びmiR-34cを含む)、miR-20 (miR-20a及びmiR-20bを含む)、miR-15 (miR-15a及びmiR-15bを含む)、又はその前駆体からなる群より選択される。当業者には明らかであろうように、血管新生に対する調節特性、優先的にはアンタゴニスト特性を有する任意のmiRNAが、このマイクロRNAファミリーの一部と考えられるべきである。

10

【0032】

疑いを避けるために、以下の明記におけるマイクロRNAという表現は、特記しない限り、それがその前駆体から切断された後の、成熟又はプロセシングされたRNAを指す。非成熟形では、「前駆体」又は「マイクロRNA前駆体」という表現が使用される。

【0033】

以下の表1は、本明細書によって包含されるマイクロRNA前駆体の種々の配列を再編成する。

20

【0034】

【表 1】

配列番号	名称	配列
1	mir-92a-1	CUUUCUACACAGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCUGUGUUUCUGUAUGGUAUUG CACUUGUCCCCGGCCUGUUGAGUUUGG
2	mir-92a-2	UCAUCCCUGGGUGGGGAUUUGUUGCAUUAUUGUGUUCUAUAUAAAGUAUUG CACUUGUCCCCGGCCUGUGGAAGA
3	mir-92b	CGGGCCCCGGGCGGGCGGGAGGGACGGGACGCGGUGCAGUGUUGUUUUUCC CCCGCCAAUAUUGCACUCGUCCCGGCCUCCGGCCCCCGGCC
4	mir-17	GUCAGAAUAAUGUCAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGUGAUUGUGCAUCUAC UGCAGUGAAGGCACUUGUAGCAUUAUGGUGAC
5	mir-503	UGCCCUAGCAGCGGGAACAGUUCUGCAGUGAGCGAUCGGGUGCUCUGGGGUAU UGUUUCCCGUGCCAGGGUA
6	mir-16-1	GUCAGCAGUGCCUAGCAGCACGUAAAUUUGGCGUUAAGAUUCUAAAAUUA UCUCCAGUAUUAACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC
7	mir-16-2	GUUCCACUCUAGCAGCACGUAAAUUUGGCGUAGUGAAUAUAUUAUAAACA CCAAUAUUAACUGUGCUGCUUUAGUGUGAC
8	mir-374a	UACAUCGGCAUUAUAAUACAACCUGAUUAAGUGUUAUAGCACUUAUCAGAUU GUUUGUAAUUGUCUGUGUA
9	mir-374b	ACUCGGAUGGAUUAUAAUACAACCUGCUAAGUGUCCUAGCACUUAAGCAGGUUG UAUUAUCAUUGUCCGUGUCU
10	mir-374c	ACACGGACAAUGAUAAUACAACCUGCUAAGUGCUAGGACACUUAAGCAGGUUG UAUUAUAUCCAUCGAGU
11	mir-24-1	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUAUCAGUUCUCAUUUUACACACUGGCUCAGU UCAGCAGGAACAGGAG
12	mir-24-2	CUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAACACAGUUGGUUUGUGUACACUGG CUCAGUUCAGCAGGAACAGGG
13	mir-483	GAGGGGGAAGACGGGAGGAAAGAAGGGAGUGGUUCCAUCACGCCUCCUCACU CCUCUCCUCCCGUCUUCUCCUCUC
14	mir-34a	GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCAA UAGUAAGGAAGCAUACAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUG GGGCC
15	mir-34b	GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAAGCUGAUUGUACUGUGGUGGUACAA UCACUAACUCCACUGCCAUAACAAAGGCAC
16	mir-34c	AGUCUAGUUACUAGGCAGUGUAGUUAAGCUGAUUGCUAAUAGUACCAUACU AACCACACGGCCAGGUAAAAAGAUU
17	mir-20a	GUAGCACUAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAGUGUUUAGUUAUCUACUGCAUUA UGAGCACUAAAGUACUGC
18	mir-20b	AGUACCAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAGUUUUGGCAUGACUCUACUGUAGUA UGGGCACUCCAGUACU
19	mir-15a	CCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUGGAUUUUGAAAAGGUGCA GGCCAUUUUGUGCUGCCUAAAAUACAAGG
20	mir-15b	UUGAGGCCUUAAGUACUGUAGCAGCACAUCAUGGUUUACAUGCUACAGUCA AGAUGCGAAUCAUUAUUUGCUGCUCUAGAAUUUAAGGAAAUUCAU

10

20

30

表 1

【0035】

以下の表 2 は、各マイクロRNA についてのマイクロRNA の配列、及び、対応する前
駆体配列中の対応する残基を示す（表 1 参照）。

40

【0036】

【表 2】

配列番号	名称	配列	前駆体からの残基
21	miR-92a-3p	uauugcacuugucccgccugu	48-69
22	miR-92a-1-5p	agguugggaucgguugcaaugcu	11-33
23	miR-92a-2-5p	ggguugggaauuuguugcauuac	9-30
24	miR-92b-3p	uauugcacucgucccgccucc	61-82
25	miR-92b-5p	agggacgggacgcggugcagug	20-41
26	miR-17-3p	acugcagugaaggcacuuguag	51-72
27	miR-17-5p	caaagugcuuacagugcagguag	14-36
28	miR-503-3p	ggguuauuuguuuccgcugccagg	46-68
29	miR-503-5p	uagcagcggaacaguucugcag	6-28
30	miR-16-1-3p	ccaguauuaacugugcugcuga	56-77
31	miR-16-2-3p	ccaauauuacugugcugcuua	53-74
32	miR-16-5p	uagcagcacguaaaauuuggcg	14-35 (miR-16-1 について) 又は 10-31 (miR-16-2 について)
33	miR-374a-3p	cuuaucauugauuuguaauu	42-63
34	miR-374a-5p	uuauaaauacaaccugauaagug	12-33
35	miR-374b-3p	cuuagcagguuguaauuaucauu	41-62
36	miR-374-5p	auauaaauacaaccugcuaagug	11-32
37	miR-374c-3p	cacuuagcagguuguaauuauu	39-60
38	miR-374c-5p	auaaauacaaccugcuaagugcu	13-34
39	miR-24-1-3p	uggcucaguucagcaggaacag	44-65
40	miR-24-1-5p	ugccuacugagcugauaucagu	7-28
41	miR-24-2-3p	uggcucaguucagcaggaacag	50-71
42	miR-24-2-5p	ugccuacugagcugaaacacag	13-34
43	miR-483-3p	ucacuccucuccucccgucuu	48-68
44	miR-483-5p	aagacgggaggaaagaaggag	8-29
45	miR-34a-3p	caaucagcaaguauacugcccu	64-85
46	miR-34a-5p	uggcagugucuuagcugguugu	22-43
47	miR-34b-3p	caaucacuaacuccacugccau	50-71
48	miR-34b-5p	uaggcagugucauuagcugauug	13-35

10

20

30

40

49	miR-34c-3p	aaucacuaaccacacggccagg	46-67
50	miR-34c-5p	aggcaguguaguuuagcugauugc	13-35
51	miR-20a-3p	acugcauuauagagcacuuaaag	44-65
52	miR-20a-5p	uaaagugcuuauagugcagguag	8-30
53	miR-20b-3p	acuguaguauagggcacuuccag	44-65
54	miR-20b-5p	caaagugcucauagugcagguag	6-28
55	miR-15a-3p	caggccauauugugcugccuca	51-72
56	miR-15a-5p	uagcagcacauaaugguuugug	14-35
57	miR-15b-3p	cgaaucauuuuugcugcucua	58-79
58	miR-15b-5p	uagcagcacaucaugguuuaca	20-41

10

表 2

20

【 0 0 3 7 】

特記しない限り、出願書類に言及された前駆体及びマイクロRNA配列はヒト配列である。それにも関わらず、いくつかの場合において、マイクロRNAヒト配列は、他の種に由来するマイクロRNA配列に対して相同である。

【 0 0 3 8 】

一例として、ヒトmiR-92aは、他の種に由来するmiRに対して相同であると述べることができる。より特定すると、ヒトmiR-92aは、dme（キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*））、mmu（ハツカネズミ（*Mus musculus*））、rno（ドブネズミ（*Rattus norvegicus*））、dps（ウスグロショウジョウバエ（*Drosophila pseudoobscura*））、aga（ガンビアハマダラカ（*Anopheles gambiae*））、dre（ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*））、mml（アカゲザル（*Macaca mulatta*））、xtr（ゼノパス・トロピカリス（*Xenopus tropicalis*））、ame（ミツバチ（*Apis mellifera*））、odi（ワカレオタマボヤ（*Oikopleura dioica*））、cin（カタユウレイボヤ（*Ciona intestinalis*））、csa（ユウレイボヤ（*Ciona savignyi*））、cfa（イエイヌ（*Canis familiaris*））、及びブタ又はssc（イノシシ（*Sus scrofa*））に由来するmiRに対して相同である。

30

【 0 0 3 9 】

その一般的な知識に基づいて、当業者は、他のヒトマイクロRNA配列と、他の種に由来するマイクロRNA配列との間に相同性を容易に見出すだろう。

【 0 0 4 0 】

本明細書に記載の成熟マイクロRNA及びその対応するステムループ配列のヌクレオチド配列は、オンラインで探索可能なマイクロRNA配列及びアノテーションのデータベースであるmiRBaseに見られる配列である。miRBase配列データベースの項目は、マイクロRNA転写物の予測されるヘアピン部分（ステムループ）を、成熟マイクロRNA配列の位置及び配列に関する情報と共に示す。データベース中のマイクロRNAステムループ配列は、厳密には前駆体miRNA（プレmiRNA）ではなく、いくつかの場合においては、推定される一次転写物からのプレmiRNA及びいくつかのフランキング配列を含み得る。

40

【 0 0 4 1 】

従って、本発明の目的は、マイクロRNAの阻害剤、又は血管新生の生理機能を支配する種々の反応に関与するいくつかのマイクロRNA若しくはその前駆体の阻害剤の組合せ

50

を含む、AMI後の心室リモデリングの治療又は予防のための組成物を提供することである。

【0042】

しかしながら、大半の公表された研究において、静脈内経路が、動物へのマイクロRNA阻害剤の投与のために使用される。血管遺伝子発現の調節に關与するマイクロRNAの操作は、虚血疾病における新規な治療標的を示す。生物医学部門では、特定のRNA配列を阻害するように特に設計されたRNAモジュレーターの投与に關する研究が指数関数的に増加している。

【0043】

Dimmeler et alは、全身投与された特異的マイクロRNA阻害剤によるmiR-92a阻害後の左心室機能の収縮力及び回復における改善を示した。多シストロン性マイクロRNA17-92aクラスターは腫瘍発生に連関しているため、及びマイクロRNAの細胞型の遍在性のために、miR又は抗miRの反復注射による静脈内投与は安全性に關する懸念を生じる。

10

【0044】

マイクロRNAは複雑な過程を制御し、様々な細胞経路に存在するという事実のために、それらはまた、有意な副作用をトリガーするという可能性が高い。現在のとりわけ問題は、miRNA阻害剤による処置が選択的ではないことである。

【0045】

さらに、これらの分子の遍在性及び低い臓器特異性から、全身投与により、これらのmiRNAが異なる細胞特異的機能を有するか又は通常は発現されていない組織において調節機能を働かせる可能性がある。この間違った調節が副作用をトリガーしうるのである。潜在的なリスクの中で、マイクロRNA操作に關連した腫瘍発生は依然として、この療法をヒト病態に適用する場合の主な懸念の1つである。さらに、標的細胞において適切に持続された濃度を得るために、マイクロRNA阻害剤は、非常に高い用量で繰り返し注射されなければならない。制御された条件における小動物に対する実験には制約が少ないが、ヒトへの移行には、生物学的安全性に対する障壁だけでなく、実施の障害及び経済的な障害が前以て推定される。

20

【0046】

これらの問題を解決し、この新規な治療アプローチを患者に移行することを可能とするために、マイクロRNA阻害剤を輸送し、それらを標的臓器に直接放出するための放出ビヒクルを生成することが考えられる。適切なビヒクルは、マイクロRNA阻害剤をまっすぐに患部組織に指向させ、これにより、投与量の低減を可能とし、よって反復注射投与は回避され、他の臓器に対する起こり得る望ましくない生物学的作用は最小限となるものだろう。

30

【0047】

それ故、目的は、マイクロRNA阻害剤を標的組織のみに放出することにより、選択性を向上させ、これらの処置の副作用を回避することである。この問題は、本発明によると、マイクロRNA阻害剤を生分解性かつ生体適合性のマイクロスフィアにマイクロカプセル化することによって解決される。

40

【0048】

従って、本発明の目的は、血管新生の調節に關連したマイクロRNAファミリーに屬する少なくとも1つのマイクロカプセル化マイクロRNA阻害剤を含む、AMI後の心室リモデリングの治療又は予防のための組成物を提供することであり、マイクロRNAファミリーは、以下に制限されることなく、miR-92(miR-92a-1、miR-92a-2及びmiR-92bを含む)、miR-17、miR-503、miR-16(miR-16-1及びmiR-16-2を含む)、miR-374(miR-374a、miR-374b及びmiR-374cを含む)、miR-24(miR-24-1及びmiR-24-2を含む)、miR-483、miR-34(miR-34a、miR-34b及びmiR-34cを含む)、miR-20(miR-20a及びmiR-20bを

50

含む)、miR-15(miR-15a及びmiR-15bを含む)、又はその前駆体を含む。

【0049】

マイクロRNA阻害剤をミクロスフィアにマイクロカプセル化することによって、経管的血管形成術後の動脈内投与が容易となり、よってミクロスフィアは、傷害領域の微小血管(毛細血管とも呼ばれる)にのみ送達及び保持され;このようにして、カプセル化マイクロRNA阻害剤は局所的に放出され得る。

【0050】

AMIの原因動脈を通しての冠内注射は、冠内微小循環へのミクロスフィアの保持、及び、標的虚血組織への直接的なマイクロRNA阻害剤の持続的な放出を可能とする。マイクロRNA阻害剤は血管新生を誘導し、これは、傷害組織の収縮力の機能的回復、並びに、好ましい梗塞後のリモデリングを増強する。

10

【0051】

意外なことに、本明細書において、マイクロRNA阻害剤、特に血管新生の調節に関連したマイクロRNAファミリーに属するマイクロRNAの阻害剤が適切なミクロスフィアにマイクロカプセル化されると、該マイクロRNAは心筋の傷害領域に成功裡に放出され、よって、標的マイクロRNAの生物学的活性を遮断することが示されている。本明細書の実施例において示されているように、選択的な冠内経路による、生分解性かつ生体適合性の高分子ミクロスフィアにマイクロカプセル化された所与のマイクロRNA阻害剤、すなわち、非制限的な例としてのmiR-92a阻害剤の、心筋梗塞に罹った個体への投与は、心筋機能の回復をもたらす。

20

【0052】

それ故、微小循環に保持されたミクロスフィアは、標的虚血組織への直接的なマイクロRNA阻害剤の持続的な放出を可能とする。標的化マイクロRNAのマイクロRNA阻害剤の持続作用(ダウンレギュレーションとしても知られる)により、損傷から1か月後に、治癒領域において、有意な血管の増殖及び有害なリモデリングの抑制がもたらされた。

【0053】

本明細書の実施例に示されているように、有害な心室リモデリングの発生は、梗塞に関連した動脈に投与されたカプセル化された適切なマイクロRNA阻害剤による血管新生の調節に関連したマイクロRNAファミリーに属するマイクロRNAの局所的かつ持続的な阻害を通して脈管形成を誘導することによって予防され得ることが実証された。これは、急性心筋梗塞を患う患者への次世代の安全な遺伝子調節療法の転換を促進する新規な送達法を示す。

30

【0054】

これらの結果は明瞭に、血管新生の調節に関連したマイクロRNAファミリーに属するマイクロRNA、例えば、本明細書に開示されているようなmiR-92(miR-92a-1、miR-92a-2及びmiR-92bを含む)、miR-17、miR-503、miR-16(miR-16-1及びmiR-16-2を含む)、miR-374(miR-374a、miR-374b及びmiR-374cを含む)、miR-24(miR-24-1及びmiR-24-2を含む)、miR-483、miR-34(miR-34a、miR-34b及びmiR-34cを含む)、miR-20(miR-20a及びmiR-20bを含む)、miR-15(miR-15a及びmiR-15bを含む)、又はその前駆体の阻害剤を含む組成物は、治療有効量かつ治療有効放出速度で該阻害剤の効果的な局所放出を可能とすることを示す。

40

【0055】

第一の態様において、本発明は、血管新生に関与するマイクロRNA又はその前駆体の少なくとも1つの阻害剤の有効量を含む組成物に関し、該阻害剤は、生分解性かつ生体適合性の高分子ミクロスフィアにマイクロカプセル化されている。

【0056】

別の態様において、本発明は、miR-92(miR-92a-1、miR-92a-

50

2 及び mi R - 9 2 b を含む)、mi R - 1 7、mi R - 5 0 3、mi R - 1 6 (mi R - 1 6 - 1 及び mi R - 1 6 - 2 を含む)、mi R - 3 7 4 (mi R - 3 7 4 a、mi R - 3 7 4 b 及び mi R - 3 7 4 c を含む)、mi R - 2 4 (mi R - 2 4 - 1 及び mi R - 2 4 - 2 を含む)、mi R - 4 8 3、mi R - 3 4 (mi R - 3 4 a、mi R - 3 4 b 及び mi R - 3 4 c を含む)、mi R - 2 0 (mi R - 2 0 a 及び mi R - 2 0 b を含む)、mi R - 1 5 (mi R - 1 5 a 及び mi R - 1 5 b を含む)、又はその前駆体を含むファミリーから選択されたマイクロ RNA の少なくとも 1 つの阻害剤の有効量を含む組成物に関し、該阻害剤は、生分解性かつ生体適合性の高分子ミクロスフィアにマイクロカプセル化されている。

【0057】

10

本発明のさらに別の態様において、本発明は、mi R - 9 2 a 又はその前駆体の少なくとも 1 つの阻害剤の有効量を含む組成物に関し、該阻害剤は生分解性かつ生体適合性の高分子ミクロスフィアにマイクロカプセル化されている。

【0058】

「ミクロスフィア」という表現によって、1 μm から数百 μm のサイズの球状粒子と理解されなければならない。「微粒子」という表現は「ミクロスフィア」及び「マイクロカプセル」の両方を含む。本明細書において、「ミクロスフィア」という表現が使用されるが、「マイクロカプセル」という表現による置き換えが当業者によって可能でありかつ関心がある場合には、「ミクロスフィア」及び「マイクロカプセル」の使用は等価であることが理解されなければならない。

20

【0059】

「カプセル化」又は「マイクロカプセル化」という表現によって、保護のために又は改変された放出のために粒子に封入又は包埋されていると理解されなければならない。

【0060】

換言すれば、本発明は、血管新生に關与するマイクロ RNA の少なくとも 1 つの阻害剤の有効量を含む医薬組成物に関し、該マイクロ RNA 阻害剤は、好ましくは、生分解性かつ生体適合性ミクロスフィアにマイクロカプセル化された、mi R - 9 2 (mi R - 9 2 a - 1、mi R - 9 2 a - 2 及び mi R - 9 2 b を含む)、mi R - 1 7、mi R - 5 0 3、mi R - 1 6 (mi R - 1 6 - 1 及び mi R - 1 6 - 2 を含む)、mi R - 3 7 4 (mi R - 3 7 4 a、mi R - 3 7 4 b 及び mi R - 3 7 4 c を含む)、mi R - 2 4 (mi R - 2 4 - 1 及び mi R - 2 4 - 2 を含む)、mi R - 4 8 3、mi R - 3 4 (mi R - 3 4 a、mi R - 3 4 b 及び mi R - 3 4 c を含む)、mi R - 2 0 (mi R - 2 0 a 及び mi R - 2 0 b を含む)、mi R - 1 5 (mi R - 1 5 a 及び mi R - 1 5 b を含む)、又はその前駆体を含む又は代替的にはからなる群より選択される。

30

【0061】

換言すれば、本発明は、生分解性かつ生体適合性ミクロスフィアにマイクロカプセル化された、mi R - 9 2 a 又はその前駆体の少なくとも 1 つの阻害剤の有効量を含む医薬組成物に関する。

【0062】

「医薬組成物」は、医薬を含む個体への投与に適した物質の混合物を意味する。例えば、医薬組成物は、mi RNA 阻害剤及び無菌水溶液を含み得る。

40

【0063】

本発明の組成物の実施態様において、血管新生に關与する mi RNA は成熟 mi RNA からなる。

【0064】

本発明の組成物の実施態様において、該マイクロ RNA は成熟した：

a) 配列番号 2 1、2 2 若しくは 2 3 からなる群より選択された配列、又は配列番号 2 1、2 2 若しくは 2 3 の 1 つに対して少なくとも 9 0 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mi R - 9 2 a；

b) 配列番号 2 4 若しくは 2 5 からなる群より選択された配列、又は配列番号 2 4 若し

50

くは 25 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 92b ;

c) 配列番号 26 若しくは 27 からなる群より選択された配列、又は配列番号 26 若しくは 27 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 17 ;

d) 配列番号 28 若しくは 29 からなる群より選択された配列、又は配列番号 28 若しくは 29 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 503 ;

e) 配列番号 30、31 若しくは 32 からなる群より選択された配列、又は配列番号 30、31 若しくは 32 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 16 ;

f) 配列番号 33、34、35、36、37 若しくは 38 からなる群より選択された配列、又は配列番号 33、34、35、36、37 若しくは 38 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 374 ;

g) 配列番号 39、40、41 若しくは 42 からなる群より選択された配列、又は配列番号 39、40、41 若しくは 42 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 24 ;

h) 配列番号 43 若しくは 44 からなる群より選択された配列、又は配列番号 43 若しくは 44 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 483 ;

i) 配列番号 45、46、47、48、49 若しくは 50 からなる群より選択された配列、又は配列番号 45、46、47、48、49 若しくは 50 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 34 ;

j) 配列番号 51、52、53 若しくは 54 からなる群より選択された配列、又は配列番号 51、52、53 若しくは 54 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 20 ;

k) 配列番号 55、56、57 若しくは 58 からなる群より選択された配列、又は配列番号 55、56、57 若しくは 58 の 1 つに対して少なくとも 90 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR - 15

からなる。

【0065】

本発明の組成物の別の実施態様において、該 miR - 92a は、配列番号 21 の配列、又は配列番号 21 に対して少なくとも 90 %、好ましくは 95 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、成熟した miR - 92a からなる。

【0066】

本発明の組成物の別の実施態様において、該 miR - 92a は、配列番号 22 の配列、又は配列番号 22 に対して少なくとも 90 %、好ましくは 95 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、成熟した miR - 92a からなる。

【0067】

本発明の組成物の別の実施態様において、該 miR - 92a は、配列番号 23 の配列、又は配列番号 23 に対して少なくとも 90 %、好ましくは 95 % のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、成熟した miR - 92a からなる。

【0068】

本発明の意味において、2 つの核酸配列間の「同一率」は、最適なアラインメント後に得られた、比較しようとする 2 つの配列間の同一ヌクレオチド残基の比率を意味し、この比率は純粋に統計学的であり、2 つの配列間の差異はその長さに沿って無作為に分布している。2 つの核酸配列の比較は、最適に配列をアラインさせた後にそれらと比較することによって伝統的に行なわれ、該比較は、区域によって又は「アラインメントウィンドウ」を使用することによって実施され得る。比較のための配列の最適なアラインメントは、手作業による比較に加えて、Smith 及び Waterman (1981) の局所相同性アルゴリズムを用い

10

20

30

40

50

て、Neddleman及びWunsch (1970) の局所相同性アルゴリズムを用いて、Pearson及びLipman (1988)の相同性探索法を用いて、又はこれらのアルゴリズムを使用したコンピュータソフトウェア (Wisconsin Genetics Software Package のGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA、Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison, WI、又は比較ソフトウェアBLAST NR若しくはBLAST Pによる) を用いて実施され得る。

【 0 0 6 9 】

2つの核酸配列間の同一率は、2つの最適にアラインさせた配列を比較することによって決定され、2つの配列間の最適なアラインメントのために、比較しようとする核酸配列はリファレンス配列と比較して付加又は欠失を有し得る。同一率は、ヌクレオチド残基が2つの配列間で、好ましくは2つの完全な配列間で同一である位置の数を決定し、同定された位置の数をアラインメントウィンドウの位置の総数で割り、結果に100を乗じることにより、2つの配列間の同一率を得ることによって計算される。

10

【 0 0 7 0 】

本明細書に示されているように、リファレンス配列に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有するヌクレオチド配列は、該リファレンス配列に対して少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%及び99%のヌクレオチド同一性を有するものを包含する。

【 0 0 7 1 】

本発明の組成物の実施態様において、血管新生に關与する該miRNAは、マイクロRNAの前駆体からなる。

20

【 0 0 7 2 】

本発明の実施態様において、血管新生に關与する該マイクロRNA前駆体は、

a) 配列番号1の配列又は配列番号1に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-92a-1;

b) 配列番号2の配列又は配列番号2に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-92a-2;

c) 配列番号3の配列又は配列番号3に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-92b;

d) 配列番号4の配列又は配列番号4に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-17;

30

e) 配列番号5の配列又は配列番号5に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-503;

f) 配列番号6の配列又は配列番号6に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-16-1;

g) 配列番号7の配列又は配列番号7に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-16-2;

h) 配列番号8の配列又は配列番号8に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-374a;

i) 配列番号9の配列又は配列番号9に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-374b;

40

j) 配列番号10の配列又は配列番号10に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-374c;

k) 配列番号11の配列又は配列番号11に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-24-1;

l) 配列番号12の配列又は配列番号12に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-24-2;

m) 配列番号13の配列又は配列番号13に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-483;

n) 配列番号14の配列又は配列番号14に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-34a;

50

o) 配列番号 15 の配列又は配列番号 15 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-34b；
p) 配列番号 16 の配列又は配列番号 16 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-34c；
q) 配列番号 17 の配列又は配列番号 17 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-20a；
r) 配列番号 18 の配列又は配列番号 18 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-20b；
s) 配列番号 19 の配列又は配列番号 19 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-15a；
t) 配列番号 20 の配列又は配列番号 20 に対して少なくとも 90% のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-15b
からなる。

10

【0073】

一般的に言えば、阻害剤は、別の分子が反応に関与するのを抑制又は妨げる分子である。

【0074】

本明細書において使用される「miR-X 又は miR-X の阻害剤」という用語は、miR-X、又は miR-X、又は少なくとも 1 つの前駆体の発現及び / 又は活性を減少又は低減させる任意の分子又は化合物を指す。この阻害は、結果として、血管新生阻害を妨げ、すなわち、血管新生を促進し、よって、梗塞後の心筋の有害なリモデリングを予防する。

20

【0075】

本発明の 1 つの実施態様において、血管新生に関与する所与の該マイクロ RNA 阻害剤は、所与の該マイクロ RNA に標的化された配列を有する 8 ~ 49 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、該マイクロ RNA は、好ましくは、miR-92 (miR-92a-1、miR-92a-2 及び miR-92b を含む)、miR-17、miR-503、miR-16 (miR-16-1 及び miR-16-2 を含む)、miR-374 (miR-374a、miR-374b 及び miR-374c を含む)、miR-24 (miR-24-1 及び miR-24-2 を含む)、miR-483、miR-34 (miR-34a、miR-34b 及び miR-34c を含む)、miR-20 (miR-20a 及び miR-20b を含む)、miR-15 (miR-15a 及び miR-15b を含む)、又はその前駆体を含む群から選択される。

30

【0076】

別の実施態様において、該 miR-92a 阻害剤は、該 miR-92a に標的化された配列を有する 8 ~ 49 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドである。

【0077】

「に標的化された」という表現は、標的核酸にハイブリダイズして所望の効果を誘導することを可能とするヌクレオチド配列を有することを意味する。特定の実施態様において、所望の効果は、標的核酸の低減及び / 又は阻害である。

40

【0078】

「ハイブリダイズ」は、「ヌクレオチド相補性」を通して起こる相補的核酸のアニールングを意味し、すなわち、2 つのヌクレオチドが水素結合を介して非共有結合的に対を形成することができることを意味する。

【0079】

いくつかの実施態様において、miRNA 阻害剤のオリゴヌクレオチドは、8 ~ 49 ヌクレオチド長である。

【0080】

当業者は、これは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、

50

32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48若しくは49ヌクレオチド長、又はその中の任意の範囲のオリゴヌクレオチドを例示することを理解しているだろう。いくつかの実施態様において、本発明によるオリゴヌクレオチドは、10～20ヌクレオチド長である。当業者は、これは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20ヌクレオチド長、又はその中の任意の範囲のオリゴヌクレオチドを例示することを理解しているだろう。

【0081】

特定の実施態様において、該オリゴヌクレオチドは、miRNA又はその前駆体に対して相補的である配列を有する。

10

【0082】

本発明の組成物の1つの実施態様において、該オリゴヌクレオチドは、血管新生に關与する標的miRNAの配列に対して少なくとも部分的に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、該標的miRNAは、優先的には、miR-92(miR-92a-1、miR-92a-2及びmiR-92bを含む)、miR-17、miR-503、miR-16(miR-16-1及びmiR-16-2を含む)、miR-374(miR-374a、miR-374b及びmiR-374cを含む)、miR-24(miR-24-1及びmiR-24-2を含む)、miR-483、miR-34(miR-34a、miR-34b及びmiR-34cを含む)、miR-20(miR-20a及びmiR-20bを含む)、miR-15(miR-15a及びmiR-15bを含む)、又はその前駆体から選択される。

20

【0083】

本発明の組成物の別の実施態様において、該オリゴヌクレオチドは、miR-92aの配列に対して少なくとも部分的に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0084】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という表現は、特定のヌクレオチド配列(センス配列と呼ばれる)に対して相補的であるヌクレオチド配列を有し、センス配列とハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドを指す。

【0085】

「相補性」は、第一核酸と第二核酸との間にヌクレオチド対を形成することができることを意味する。

30

【0086】

特定の実施態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、マイクロRNA又はその前駆体に対して相補的であるヌクレオチド配列を有し、このことは、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、マイクロRNA又はその前駆体の相補体に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%同一であるか、或いは、2つの配列は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを意味する。従って、特定の実施態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、その標的マイクロRNA又は前駆配列に関して1つ以上のミスマッチした塩基対を有し得、その標的配列にハイブリダイズすることができる。特定の実施態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、マイクロRNA又はその前駆体に対して完全に相補的である配列を有し、このことは、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列が、マイクロRNA又はその前駆体の相補体に対して100%同一であることを意味する。

40

【0087】

本発明の脈絡において、「相補性」は、miR-92a又はその前駆体のヌクレオチド配列の相補体に対して、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48又は49ヌクレオチドの領域におよび、少なくとも60%、少な

50

くとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であるヌクレオチド配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを意味するか、或いは2つの配列がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを意味する。

【0088】

「相補率」は、核酸中の相補的ヌクレオチドの数を、核酸の長さで割ったものを意味する。特定の実施態様において、オリゴヌクレオチドの相補率は、標的核酸に対して相補的であるヌクレオチドの数を、オリゴヌクレオチドの長さで割ったものを意味する。

【0089】

10

1つの実施態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、血管新生に關与する標的マイクロRNAの配列に対して「完全に相補的」であり、優先的には、miR-92(miR-92a-1、miR-92a-2及びmiR-92bを含む)、miR-17、miR-503、miR-16(miR-16-1及びmiR-16-2を含む)、miR-374(miR-374a、miR-374b及びmiR-374cを含む)、miR-24(miR-24-1及びmiR-24-2を含む)、miR-483、miR-34(miR-34a、miR-34b及びmiR-34cを含む)、miR-20(miR-20a及びmiR-20bを含む)、miR-15(miR-15a及びmiR-15bを含む)、より優先的にはmiR-92a、又はその前駆体を含む群から選択され、これは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドが、標的マイクロRNA又はその前駆体における各々の対応する位置のヌクレオチドと対を形成できることを意味する。

20

【0090】

特定の実施態様において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

a) 配列番号21、22若しくは23からなる群より選択された配列、又は配列番号21、22若しくは23の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-92a；

b) 配列番号24若しくは25からなる群より選択された配列、又は配列番号24若しくは25の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-92b；

30

c) 配列番号26若しくは27からなる群より選択された配列、又は配列番号26若しくは27の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-17；

d) 配列番号28若しくは29からなる群より選択された配列、又は配列番号28若しくは29の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-503；

e) 配列番号30、31若しくは32からなる群より選択された配列、又は配列番号30、31若しくは32の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-16；

f) 配列番号33、34、35、36、37若しくは38からなる群より選択された配列、又は配列番号33、34、35、36、37若しくは38の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-374；

40

g) 配列番号39、40、41若しくは42からなる群より選択された配列、又は配列番号39、40、41若しくは42の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-24；

h) 配列番号43若しくは44からなる群より選択された配列、又は配列番号43若しくは44の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-483；

i) 配列番号45、46、47、48、49若しくは50からなる群より選択された配列、又は配列番号45、46、47、48、49若しくは50の1つに対して少なくとも

50

90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-34；

j) 配列番号51、52、53若しくは54からなる群より選択された配列、又は配列番号51、52、53若しくは54の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-20；

k) 配列番号55、56、57若しくは58からなる群より選択された配列、又は配列番号55、56、57若しくは58の1つに対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、miR-15

の配列に対して部分的に又は完全に相補的である配列を有する。

【0091】

特定の実施態様において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

a) 配列番号1の配列又は配列番号1に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-92a-1；

b) 配列番号2の配列又は配列番号2に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-92a-2；

c) 配列番号3の配列又は配列番号3に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-92b；

d) 配列番号4の配列又は配列番号4に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-17；

e) 配列番号5の配列又は配列番号5に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-503；

f) 配列番号6の配列又は配列番号6に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-16-1；

g) 配列番号7の配列又は配列番号7に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-16-2；

h) 配列番号8の配列又は配列番号8に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-374a；

i) 配列番号9の配列又は配列番号9に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-374b；

j) 配列番号10の配列又は配列番号10に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-374c；

k) 配列番号11の配列又は配列番号11に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-24-1；

l) 配列番号12の配列又は配列番号12に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-24-2；

m) 配列番号13の配列又は配列番号13に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-483；

n) 配列番号14の配列又は配列番号14に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-34a；

o) 配列番号15の配列又は配列番号15に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-34b；

p) 配列番号16の配列又は配列番号16に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-34c；

q) 配列番号17の配列又は配列番号17に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-20a；

r) 配列番号18の配列又は配列番号18に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-20b；

s) 配列番号19の配列又は配列番号19に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-15a；及び

t) 配列番号20の配列又は配列番号20に対して少なくとも90%のヌクレオチド同一性を有する配列を含む、mir-15b

10

20

30

40

50

の配列に対して部分的に又は完全に相補的である配列を有する。

【0092】

特定の実施態様において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、mir-92a-1（配列番号1）の配列に対して部分的に相補的である配列を有する。

【0093】

特定の実施態様において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、mir-92a-1（配列番号1）の配列に対して完全に相補的である配列を有する。

【0094】

特定の実施態様において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、mir-92a-2（配列番号2）の配列に対して部分的に相補的である配列を有する。

10

【0095】

特定の実施態様において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、mir-92a-2（配列番号2）の配列に対して完全に相補的である配列を有する。

【0096】

1つの実施態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、改変された骨格を含む。このような骨格の例は、モルホリノ骨格、カルバメート骨格、シロキサノ骨格、スルフィド、スルホキシド、及びスルホン骨格、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチル骨格、リボアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファメート、スルホネート及びスルホンアミド骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、並びにアミド骨格によって提供される。

20

【0097】

モルホリノオリゴヌクレオチドは荷電していない骨格を有し、DNAのデオキシリボース糖は6員環によって置換され、ホスホジエステル結合はホスホロジアミデート結合によって置換されている。モルホリノオリゴヌクレオチドは酵素的分解に対して抵抗性であり、リボヌクレアーゼHを活性化することではなくむしろ、翻訳を停止することによって、又はpre-mRNAスプライシングに干渉することによって、アンチセンス剤として機能するようである。

【0098】

改変された骨格は、典型的には、ヌクレアーゼ抵抗性を増加させるために好ましい。改変された骨格はまた、改変されていない骨格と比較して標的配列に対するその変化した親和性のために好ましくあり得る。改変されていない骨格はRNA又はDNAであり得る。

30

【0099】

別の適切なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、改変されたポリアミド骨格を有するペプチド核酸(PNA)を含む。PNAをベースとした分子は、塩基対認識の点で真のDNA分子模倣体である。PNAの骨格は、ペプチド結合によって連結された7'-（2'-アミノエチル）-グリシン単位から構成され、核酸塩基は、メチレンカルボニル結合によって骨格に連結されている。

【0100】

さらに適切な骨格は、モルホリノヌクレオチド類似体又は等価体を含み、リボース又はデオキシリボース糖は、6員環モルホリノ環によって置換されている。最も好ましいヌクレオチド類似体又は等価体は、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO)を含み、リボース又はデオキシリボース糖は、6員環モルホリノ環によって置換され、隣接するモルホリノ環間の陰イオン性ホスホジエステル結合は、非イオン性ホスホロジアミデート結合によって置換されている。

40

【0101】

またさらなる実施態様において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合における架橋されていない酸素の1つの置換を含む。この改変は僅かに塩基対形成を不安定化させるが、ヌクレアーゼによる分解に対して有意な抵抗性を付与する。

【0102】

50

本発明のさらに適切なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、2'、3'及び/又は5'の位置において、-OH；-F；1つ以上のヘテロ原子（O-、S-、又はN-アルキル；O-、S-、又はN-アルケニル；O-、S-、又はN-アルキニル；O-、S-、又はN-アリル；O-アルキル-O-アルキル、-メトキシ、-アミノプロポキシ；-アミノキシ；メトキシエトキシ；-ジメチルアミノオキシエトキシ；及び-ジメチルアミノエトキシエトキシ）によって割り込まれていてもよい、置換又は非置換の鎖状又は分岐状の低級（C1-C10）アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリアル、アリル、アリール、又はアラルキルなどで一置換又は二置換された1つ以上の糖部分を含む。

【0103】

糖部分は、ピラノース若しくはその誘導体、又はデオキシピラノース若しくはその誘導体、好ましくはリボース若しくはその誘導体、又はデオキシリボース若しくはその誘導体であり得る。このような好ましい誘導体化糖部分は、ロックド核酸を含む。

【0104】

LNAは改変されたRNAヌクレオチドであり、LNAヌクレオチドのリボース部分は、2'炭素と4'炭素とを接続する追加の橋を用いて改変されている。これは、塩基スタッキング及び事前構築を増強し、かつ熱に対する安定性を有意に増加させる。この橋は、リボースを3'-エンド構造コンフォメーションに「ロック」し、これはしばしばA型のDNA又はRNAで見られる。本発明に使用されるLNAヌクレオチドは、所望であればいつでもオリゴヌクレオチド中のDNA又はRNA塩基と混合させることができる。

【0105】

本発明によると、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、小分子RNA、アンタゴmir、LNA、CDNA、PNA、モルホリノオリゴヌクレオチド、又はその組合せからなる群より選択される。

【0106】

別の実施態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンタゴmirからなり得る。

【0107】

本発明の組成物の好ましい実施態様において、該オリゴヌクレオチドはアンタゴmirからなる。

【0108】

アンタゴmirは、内因性マイクロRNAをサイレンスさせるために使用される化学的に工学操作されたオリゴヌクレオチドである。アンタゴmirは、切断部位において不対合形成しているか又は切断を阻害するために何等かの塩基の修飾がなされた、特定のマイクロRNA標的に対して完全に相補的である、小分子合成RNA又はDNAである。通常、アンタゴmirは、分解に対してより抵抗性となり、細胞内部移行を促進させるために何等かの改変を有する。どのようにアンタゴmir化が作動するのか（アンタゴmirがマイクロRNA活性を阻害する過程）は不明であるが、マイクロRNAと不可逆的に結合することによって阻害すると考えられている。アンタゴmirは、特定のマイクロRNAの活性を構成的に阻害するために使用される。

【0109】

本発明の実施態様において、該アンタゴmirは、マイクロRNA又はその前駆体に対して相補的である少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、又は16個連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、該マイクロRNAは、配列番号1～58からなる群より選択された配列を有する。

【0110】

本発明の実施態様において、該アンタゴmirは、配列番号1、2又は3からなる群より選択された配列のmir-92aに対して相補的である少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15又は16個連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む。

【0111】

10

20

30

40

50

本発明の実施態様において、該アンタゴm i rは、配列番号21、22又は23からなる群より選択された配列のm i R - 92aに対して相補的である少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15又は16個連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む。

【0112】

別の実施態様において、該アンタゴm i rは、配列番号21の配列のヌクレオチドに対して相補的である少なくとも16個連続したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む。

【0113】

本発明の実施態様において、該アンタゴm i rは、DNA骨格を有する。

10

【0114】

本発明の組成物の該実施態様において、該アンタゴm i rは、配列番号59の配列、及びその塩基置換を除く改変物、並びに配列番号59の少なくとも8個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントを含む。

【0115】

本発明の別の実施態様において、該アンタゴm i rは、RNA骨格を有する。

【0116】

本発明の組成物の該実施態様において、該アンタゴm i rは、配列番号60の配列、及びその塩基置換を除く改変物、並びに配列番号60の少なくとも8個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントを含む。

20

【0117】

1つの実施態様において、本発明によるアンタゴm i rは、配列番号59又は60の少なくとも8個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントである。

【0118】

1つの実施態様において、本発明によるアンタゴm i rは、配列番号59又は60の少なくとも9個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントである。

【0119】

1つの実施態様において、本発明によるアンタゴm i rは、配列番号59又は60の少なくとも10個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントである。

【0120】

1つの実施態様において、本発明によるアンタゴm i rは、配列番号59又は60の少なくとも11個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントである。

30

【0121】

1つの実施態様において、本発明によるアンタゴm i rは、配列番号59又は60の少なくとも12個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントである。

【0122】

1つの実施態様において、本発明によるアンタゴm i rは、配列番号59又は60の少なくとも13個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントである。

【0123】

1つの実施態様において、本発明によるアンタゴm i rは、配列番号59又は60の少なくとも14個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントである。

40

【0124】

1つの実施態様において、本発明によるアンタゴm i rは、配列番号59又は60の少なくとも15個連続したそのヌクレオチドの部分配列からなるフラグメントである。

【0125】

別の実施態様において、配列番号59又は60の配列の該アンタゴm i rは、隣接ヌクレオチド間のホスホチオエート結合(群)による少なくとも1、2、3、4、5、6又は7個の改変されたヌクレオチド(群)を提示する。

【0126】

本発明の他の実施態様において、該アンタゴm i rは、2'-O-メチル修飾ヌクレオ

50

チド、コレステロール基、又は任意の類似した若しくは等価な修飾を含み得る。

【0127】

一般的に、核酸、ペプチド及びタンパク質を含有する医薬製剤が経口的に又は非経口的に投与されるならば、それは体内の酵素によって分解され、医薬製剤の効力は急速に消失する。この問題を克服するために様々な試みがなされてきた。その1つは、長時間持続放出注射液の製剤化である。

【0128】

実際には、マイクロRNAの選択的投与のためのシステムとしてのステントの使用に関する研究が行なわれている。しかしながら、ステントの急速な内皮細胞増殖は、マイクロRNAの持続的な放出に関して、特に長期の遺伝子調節を必要とする生物学的過程について10の問題を提起し得る。さらに、リボソーム及びナノ粒子が開発されインビボで使用されているが、重篤な副作用のリスクを伴う循環系への通過は回避されていない。さらに、事前の大動脈クランプを用いることなく経皮的な冠内への投与後に効力及び安全性を実証した研究は全くない。

【0129】

本発明の別の態様は、生分解性かつ生体適合性のミクロスフィアの使用に基づく。

【0130】

本発明によると、生体適合性で生分解性の高分子を用いて該オリゴヌクレオチドをマイクロカプセル化することに基づいた、心臓領域への該オリゴヌクレオチドの局所放出に適した放出システムが設計及び製造された。本発明は、高いカプセル化効率を有し、分子の20改変/分解を伴うことのない、オリゴヌクレオチドが実質的に積載されたミクロスフィアを得ることを可能とする。本発明によると、分子の純度及び品質は、安定化剤又は保持物質のいずれもを加えることなく、使用される製造条件、特に作製されたエマルションの特徴、高分子溶液の濃度、及びマイクロカプセル化過程に関与する相の容量間の関連のお蔭で保たれている。さらに、ミクロスフィアは、動脈塞栓を引き起こすことなく、かつマクロファージの食作用によって破壊されることなく、梗塞領域の微小血管に保持されることを可能とする適切な粒径分布を有する。

【0131】

本発明の目的は、短鎖デオキシリボ核酸又は短鎖リボ核酸を安定にカプセル化し、かつ長期間におよび、特定のタンパク質、特にその阻害が疾病に関連するタンパク質の発現の30阻害を阻害することのできる、持続放出ミクロスフィアを提供することである。

【0132】

一般的に言えば、「生体適合性」は、生きている細胞、組織、臓器、又は系と適合性であり、損傷、毒性、又は免疫系による拒絶のリスクを全く課さないことを意味する。生体適合性ミクロスフィアは、該ミクロスフィア、及びミクロスフィアのあらゆる分解産物が、レシピエントに対して無毒性であり、また、レシピエントの生体に対して有意な有害な又は望ましくない作用、例えば、注射部位における免疫反応を呈さないことを意味する。

【0133】

一般的に言えば、「生分解性」は、生物由来物質の作用によって分解され得ることを意味する。40

【0134】

本明細書において定義される生分解性ミクロスフィアは、ミクロスフィアがインビボにおいて分解又は腐食してより小さな化学種を形成することを意味する。分解は、例えば、酵素的、化学的、及び/又は物理学的過程によってもたらされ得る。

【0135】

適切な生体適合性で生分解性の高分子としては、例えば、ポリ(ラクチド)、ポリ(グリコリド)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)、ポリカプロラクトン、ポリカーボネート、ポリエステルアミド、ポリ酸無水物、ポリ(アミノ酸)、ポリオルトエステル、ポリアセチル、ポリシアノアクリレート、ポリエーテルエステル、ポリ(ジオキサノン)、ポリ(アルキレ50

ンアルキレート)、ポリエチレングリコールとポリオルトエステルの共重合体、生分解性ポリウレタン、そのブレンド及び共重合体が挙げられる。

【0136】

微粒子を生成するための多くの技術が先行技術に記載されている。

【0137】

微粒子の薬物放出プロファイルは、使用される高分子の物理化学的特性、高分子 - 薬物 - 賦形剤間の相互作用、並びに / 又は生じた微粒子の形態及び組成を含む、数多くの因子に依存する。

【0138】

ミクロスフィアが心筋毛細血管によって保持されるためには、一方でマクロファージによる食作用を通してのその破壊、又は他方では動脈の塞栓化が最小限となるように、それらは非常に特定のサイズ分布を有していなければならない; 生分解性で生体適合性の高分子を使用したマイクロカプセル化は、AMI後の心室リモデリングが起こる主要な期間である最初の数時間から2~3週間まで製品の制御された放出を可能とする。

【0139】

本発明の脈絡において、冠内経路が好ましいので、これらのミクロスフィアの平均サイズは、心筋毛細血管のサイズを考慮に入れ; これは、心臓領域で保持されるには5~20、優先的には5~15 µmまで変動し、動脈塞栓化を防ぐために25 µmを超える粒子は存在しない。

【0140】

本発明の1つの実施態様において、該ミクロスフィアは、25 µmを超えない直径を提示している。

【0141】

1つの実施態様において、ミクロスフィアの50~100%が、5~25 µmの範囲に含まれ、25 µmを超える粒子は存在しない。

【0142】

好ましい実施態様において、ミクロスフィアの60~100%が5~25 µmの範囲に含まれ、25 µmを超える粒子は存在しない。

【0143】

別の好ましい実施態様において、ミクロスフィアの70~100%が5~25 µmの範囲に含まれ、25 µmを超える粒子は存在しない。

【0144】

より好ましい実施態様において、ミクロスフィアの80~100%が5~25 µmの範囲に含まれ、25 µmを超える粒子は存在しない。

【0145】

本発明によると、ミクロスフィアの平均直径は、5~20 µmの範囲内である。

【0146】

本発明によると、ミクロスフィアの平均直径は、5~15 µmの範囲内である。

【0147】

代替的な実施態様において、該ミクロスフィアは、8~11 µmの平均直径を提示している。

【0148】

本発明によるミクロスフィアは、梗塞領域に薬物を持続放出するために、生分解性かつ生体適合性の高分子中に多量の該マイクロRNA阻害剤を積載している。

【0149】

積載されているマイクロRNA阻害剤は、約1~20% (w/w)、好ましくは1~15% (w/w)、より好ましくは1~10、さらにより好ましくは5~10%である。薬物の完全性は保存されている。

【0150】

1つの実施態様において、本発明によるミクロスフィアは、1%~15% w/wの阻害剤

10

20

30

40

50

を取り込んでいる。

【0151】

別の実施態様において、本発明によるマイクロスフィアは、5%～15%w/wの阻害剤を取り込んでいる。

【0152】

さらに別の実施態様において、本発明によるマイクロスフィアは、1%～10%、好ましくは5%～10%w/wの阻害剤を取り込んでいる。

【0153】

本発明の別の特徴は、マイクロスフィアの生成に使用される高分子の性質に関する。

【0154】

本発明の実施態様において、該マイクロスフィアは、ポリ-d, l-ラクチド(PLA)からなる高分子でできている。1つの実施態様において、該マイクロスフィアは、唯一の高分子としてのPLAでできている。1つの実施態様において、該マイクロスフィアは、1つ以上の他の生体適合性高分子とブレンドされたPLAでできている。

【0155】

本発明の別の実施態様において、該マイクロスフィアは、ポリ-d, l-ラクチド-コ-グリコリド(PLGA)からなる共重合体でできている。1つの実施態様において、該マイクロスフィアは、唯一の高分子としてのPLGAでできている。1つの実施態様において、該マイクロスフィアは、1つ以上の他の生体適合性高分子とブレンドされたPLGAでできている。

【0156】

さらに別の本発明の実施態様において、該マイクロスフィアは、ポリ-d, l-ラクチド-コ-グリコリド(PLGA)及びポリ-d, l-ラクチド(PLA)からなる高分子ブレンドでできている。

【0157】

「ブレンド」という表現によって、2つ以上の高分子の混合物を同じ有機溶媒に溶解する前に、該混合物が具現されると理解されなければならない。

【0158】

当業者は、PLGA共重合体とは対照的に、PLA高分子中のラクチド：グリコリドの比は、100：0のモル比であることを容易に理解するだろう。

【0159】

PLGA共重合体に関して、PLGA高分子中のラクチド：グリコリドの比は50：50から95：5のモル比である。

【0160】

好ましい実施態様において、PLGA共重合体中のラクチド：グリコリドの比は、50：50から90：10のモル比、優先的には50：50から80：20のモル比である。

【0161】

本発明の実施態様において、高分子の固有粘度は、0.1～0.7dl/gである。

【0162】

好ましい実施態様において、高分子の固有粘度は0.15～0.7dl/g、優先的には0.15～0.5dl/gである。

【0163】

この態様は、固有粘度が高分子分子量に関連し、それ故、高分子マイクロスフィアからの阻害剤の放出速度に影響を及ぼすという意味において興味深い。

【0164】

従って、本発明の目的はまた、全く補助剤を含まず、高分子組成物に関して単一の粒子集団からなる、マイクロカプセル化されたmiR-92a阻害剤を生成するための方法を提供することである。

【0165】

従って、本発明の別の態様は、(a)安定化剤を全く含まない精製水中にマイクロRN

10

20

30

40

50

A 阻害剤を溶解し、(b) 高分子を有機溶媒中に溶解し、(c) (a) を (b) に加えて第一エマルジョンを生成し、(d) 工程 (c) のエマルジョンを、界面活性剤及び浸透圧剤を含有する水溶液に加えて、第二エマルジョンを生成し、(e) 得られた工程 (d) のミクロスフィアを硬化及び収集し、並びに (f) 乾燥させることを含む、高分子ミクロスフィア中にマイクロRNA 阻害剤をマイクロカプセル化するための方法である。

【0166】

より特定すると、本発明はまた、上記のような組成物を生成するための方法に関し、それは、以下の工程：

- a) 安定化剤を全く含まない精製水中にmiRNA 阻害剤を溶解し、
 - b) 高分子を有機溶媒中に溶解し、
 - c) (a) を (b) に加えて第一エマルジョンを生成し、
 - d) 工程 (c) のエマルジョンを、界面活性剤及び浸透圧剤を含有する水溶液に加えて、第二エマルジョンを生成し、並びに
 - e) 得られた工程 (d) のミクロスフィアを硬化及び収集し、並びに
 - f) 得られたミクロスフィアを乾燥させること
- を含むことを特徴とする。

10

【0167】

本発明の別の態様は、心筋梗塞の処置における本発明による組成物の使用に関する。

【0168】

換言すれば、本発明は、マイクロRNA 又はその前駆体の少なくとも1つの阻害剤の有効量を含む組成物に関し、該阻害剤は、心筋梗塞の処置に使用するために生分解性かつ生体適合性の高分子ミクロスフィアにマイクロカプセル化されている。

20

【0169】

好ましい実施態様において、該心筋梗塞は、急性心筋梗塞からなる。

【0170】

本発明のさらに別の態様は、被験者に前記のような有効量の組成物を投与することを含む、それを必要とする被験者における心室リモデリングを元に戻す又は予防する方法に関する。

【0171】

換言すれば、本発明は、マイクロRNA 又はその前駆体の少なくとも1つの阻害剤の有効量を含む組成物に関し、該阻害剤は、それを必要とする被験者における心室リモデリングを元に戻す又は予防する方法に使用するための生分解性かつ生体適合性の高分子ミクロスフィアにマイクロカプセル化されている。

30

【0172】

すでに記載されているように、本発明による組成物は、冠内経路による投与に適している。

【0173】

冠内経路による投与のために、ミクロスフィアは、静脈内投与のために適切なビヒクルに、界面活性剤を含む又は含まない食塩水溶液(PBS)に、又は別の適切なビヒクルに懸濁されなければならない。適切な分散剤としては、例えば、界面活性剤、例えばポリソルベート80、ポリソルベート20、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、カルボキシメチルセルロース、又は多糖、例えばアルギン酸ナトリウムが挙げられ、等張化剤、例えば塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール又はグルコースを加えることも可能である。冠動脈のサイズを考慮して、血流の変化を制限しかつ動脈塞栓化のリスクを防ぐために、投与媒体中のミクロスフィアの濃度を調整する。この濃度は0.05%から1%、好ましくは0.1%から0.5%まで変動し得る。投与は単回注射又は反復注射であり得、その後、場合により食塩水を注射し得る。投与は、同じカテーテルを使用して経皮的冠動脈血管形成術後(これに制限されない)に実施され得る。

40

【0174】

本発明の方法は、該投与が冠内経路による投与からなることを特徴とする。

50

【0175】

この態様は、アンタゴm i rのようなオリゴヌクレオチドなどの化合物の直接的な静脈内投与に関するいくつかの予め推定された制約に対処するので特に興味深い。他の予め推定された制約の中には、i) m i R N Aの遍在性及び低い臓器特異性に起因する低レベルの生物学的安全性、i i) マイクロR N A阻害剤がその効果を生じるための高用量及び反復注射、並びにi i i) 計算された静脈内投与量の理論的に高い費用が言及され得る。

【0176】

驚くべきことには、以下の実施例を読んだ後には明らかであろうが、全てのこれらの問題は、本発明によって対処される。

【0177】

より特定すると、

a) 患部組織に供給している動脈にカプセル化アンタゴm i rを選択的に投与することが可能である(実施例5参照)；

b) ミクロスフィアは冠動脈に保持される(実施例6参照)、

c) ミクロスフィアの動脈内投与は腫瘍塞栓化のために使用され、場合により活性な放出物質と組み合わせて恒久的な血流の妨害及び腫瘍進行の阻止を可能とする。これらの要素を考慮して、塞栓化のリスクの存在が考えられた。この理由のために、ミクロスフィアは心筋に全く傷害を引き起こさないか、又は冠動脈流速に有意な変化を全く生じないことを確認する目的で研究が設計された(実施例7参照)、

d) ビヒクル中のマイクロR N A阻害剤の良好な安定性及びミクロスフィアからの該阻害剤の持続的な放出；これは、それが投与された10日後までマイクロR N Aを阻害するという、その生物学的効果によって実証される(実施例8)、

e) m i R N A阻害剤を含むミクロスフィアの投与は、傷害組織の収縮力の回復を促進し、かつ有害な梗塞後のリモデリングの発生を予防する(実施例9参照)、

f) ミクロスフィアが局所的に投与されるので、阻害剤の用量は1回の注射に低減させることができ、これにより起こり得る副作用の有意な低減及び費用の明らかな低減が推定されることが実証される。

【0178】

本発明によるマイクロR N A阻害剤の制御された投与、送達及び放出のための適切なビヒクル/システムを入手できることは、以下の利点を有する：

- 処置標的ではない組織及び臓器による薬物の体内分布は制限されるので、増強された生物学的安全性

- 反復静脈内注射の回避は、i) 患者の支援の質を増強させることによって、入院及び外来患者の通院を減少させ、i i) 薬物投与のために長期に静脈注射をする必要性、並びに、これから生じる潜在的なリスクを回避し、及びi i i) 製品の静脈内投与に固有のリスク(感染、局所反応など)を最小限にする

- 投与量の減量は、関連した用量依存的な有害作用の低減を可能とする

- 必要とされる投与量並びに反復注射のために必要とされる人員及び装置の低減に因る費用の低減。

【0179】

別の実施態様において、本発明は、心筋梗塞後の心室リモデリングの治療又は予防に使用するための生分解性かつ生体適合性のミクロスフィア集団に関し、該ミクロスフィアは、

- 5 ~ 15 μ mの平均直径を有し；

- ポリ - d , l - ラクチド - コ - グリコリド (P L G A) ； ポリ - d , l - ラクチド (P L A) 又はそのブレンドから作られ；

- 心室リモデリングを予防することができる1% ~ 10%w/wの治療剤を取り込んでおり、

該治療剤は、血管新生に関与するマイクロR N A、優先的には、m i R - 92 (m i R - 92 a - 1、m i R - 92 a - 2 及びm i R - 92 bを含む)、m i R - 17、m i R -

10

20

30

40

50

503、miR-16(miR-16-1及びmiR-16-2を含む)、miR-374(miR-374a、miR-374b及びmiR-374cを含む)、miR-24(miR-24-1及びmiR-24-2を含む)、miR-483、miR-34(miR-34a、miR-34b及びmiR-34cを含む)、miR-20(miR-20a及びmiR-20bを含む)、miR-15(miR-15a及びmiR-15bを含む)、より優先的にはmiR-92a、又はその前駆体からなる群より選択されたマイクロRNAの阻害剤からなり、該マイクロRNA阻害剤は優先的にはアンタゴmirである。

【0180】

本発明はまた、少なくともi)本発明による組成物及び/又はミクロスフィア、並びにii)該組成物が配置されたシリンジ又はバイアル又はアンプルを含む、キットに関する。

【0181】

1つの実施態様において、本発明のキットはさらに、溶媒容器に配置された溶媒を含む。溶媒容器は、バイアル、アンプル又はプレフィルドシリンジであり得る。

【0182】

ミクロスフィア及び溶媒は、ダブルコンパートメントのプレフィルドシリンジに配置されていてもよい。

【0183】

1つの実施態様において、本発明のキットは、バイアル中にミクロスフィア及び別のバイアル中に溶媒を含んでいてもよい。

【0184】

1つの実施態様において、本発明のキットは、バイアル中にミクロスフィア及び別のアンプル中に溶媒を含んでいてもよい。

【0185】

1つの実施態様において、本発明のキットは、バイアル中にミクロスフィア及びプレフィルドシリンジ中に溶媒を含んでいてもよい。

【0186】

1つの実施態様において、本発明のキットは、プレフィルドシリンジ中にミクロスフィア及び別のバイアル中に溶媒を含んでいてもよい。

【0187】

1つの実施態様において、本発明のキットは、プレフィルドシリンジ中にミクロスフィア及び別のアンプル中に溶媒を含んでいてもよい。

【0188】

1つの実施態様において、本発明のキットは、ダブルコンパートメントシリンジ中に別々にミクロスフィア及び溶媒を含んでいてもよい。

【0189】

本発明は、以下の実施例に関してより良く理解されるだろう。

【0190】

実施例1：アンタゴmir-92aの積載されたミクロスフィアの調製

ミクロスフィアは、遊離カルボキシル末端基を含む、約0.2dL/gの固有粘度の50:50のPLGA共重合体を使用してw/o/wエマルション/溶媒蒸発法によって調製された。塩化メチレン 3mlを、PLGA 0.6gに加えた。精製水中のアンタゴmir-92a(I-Ssc-mir-92a;分子量:5366g/mol(Daとも称される);配列:CCGGACAAGTGCAAT;DNA塩基:9;LNA塩基:7;製造者:IDT(Exiqon))の濃縮溶液(222mg/ml)0.3mlをPLGA有機溶液に加え、20秒間の超音波処理によって乳化させた。この一次エマルションを、1%(w/v)ポリビニルアルコール及び1%(w/v)塩化ナトリウムの水溶液からなる外相に加え、約10300rpmで60秒間ホモジナイズした。得られた第二エマルション(w/o/w)を、ある容量の精製水に加え、塩化メチレンを攪拌によって蒸発させた。得られたミクロスフィアを遠心分離によって回収し

10

20

30

40

50

、精製水で2回洗浄し、その後、凍結乾燥させた。ミクロスフィアの平均直径は9 μm であったが(5 ~ 25 μm が82%、25 μm を超えるのは0%)、カプセル化効率は74%であった。

【0191】

得られたミクロスフィアの写真を図1に提示する。

【0192】

図2は、ミクロスフィアのサイズ分布を示す。

【0193】

実施例2：RNAの積載されたミクロスフィアの調製

ミクロスフィアは、遊離カルボキシル末端基を含む、約0.2 dL/gの固有粘度の50 : 50のPLGA共重合体を使用してw/o/wエマルション/溶媒蒸発法によって調製された。塩化メチレン 3 mlを、PLGA 0.6 gに加えた。リボヌクレアーゼを含まない精製水中のRNA (RNA Sigma 5000-10000Da) の濃縮溶液(222 mg/ml) 0.3 mlをPLGA有機溶液に加え、20秒間の超音波処理によって乳化させた。この一次エマルションを、1% (w/v) ポリビニルアルコール及び5% (w/v) マンニトールのリボヌクレアーゼを含まない水溶液からなる外相に加え、約10300 rpmで60秒間ホモジナイズした。得られた第二エマルション(w/o/w)をリボヌクレアーゼを含まないある容量の精製水に加え、塩化メチレンを攪拌によって蒸発させた。得られたミクロスフィアを遠心分離によって回収し、リボヌクレアーゼを含まない精製水で2回洗浄し、その後、凍結乾燥させた。ミクロスフィアの平均直径は10 μm であったが(5 ~ 25 μm が86%、25 μm を超えるのは0%)、カプセル化効率は73%であった。

【0194】

実施例3：プラセボミクロスフィアの調製

ミクロスフィアは、遊離カルボキシル末端基を含む、約0.2 dL/gの固有粘度の50 : 50のPLGA共重合体を使用してw/o/wエマルション/溶媒蒸発法によって調製された。塩化メチレン 3 mlを、PLGA 0.6 gに加えた。精製水 0.3 mlをPLGA有機溶液に加え、20秒間の超音波処理によって乳化させた。この一次エマルションを、1% (w/v) ポリビニルアルコール及び1% (w/v) 塩化ナトリウムの水溶液からなる外相に加え、約10300 rpmで60秒間ホモジナイズした。得られた第二エマルション(w/o/w)をある容量の精製水に加え、塩化メチレンを攪拌によって蒸発させた。得られたミクロスフィアを遠心分離によって回収し、精製水で2回洗浄し、その後、凍結乾燥させた。ミクロスフィアの平均直径は7 μm であった(5 ~ 25 μm が84%、25 μm を超えるのは0%)。

【0195】

実施例4：アルブミンフルオレセインイソチオシアネートの積載されたミクロスフィアの調製

ミクロスフィアは、遊離カルボキシル末端基を含む、約0.2 dL/gの固有粘度の50 : 50のPLGA共重合体を使用してw/o/wエマルション/溶媒蒸発法によって調製された。塩化メチレン 1 mlを、PLGA 0.2 gに加えた。アルブミンフルオレセインイソチオシアネート水溶液(20 mg/ml) 0.1 mlをPLGA有機溶液に加え、15秒間の超音波処理によって乳化させた。この一次エマルションを、1% (w/v) ポリビニルアルコール及び1% (w/v) の水溶液からなる外相に加え、約10300 rpmで60秒間ホモジナイズした。得られた第二エマルション(w/o/w)をある容量の精製水に加え、塩化メチレンを攪拌によって蒸発させた。得られたミクロスフィアを遠心分離によって回収し、精製水で2回洗浄し、その後、凍結乾燥させた。ミクロスフィアの平均直径は9 μm であった(5 ~ 25 μm が91%、25 μm を超えるのは0%)。

【0196】

実施例5：標的組織に供給している動脈への選択的投与の試験

ラージホワイトブタにおいてAMIをトリガーした後、実施例4に示されているように調製されたフルオレセインアルブミンを含有するミクロスフィア 30 mgを、梗塞領域に

供給するAMIに關与する動脈に配置された2.5/12コアクシャルバルーンを用いて冠内経路によって投与した。ミクロスフィアを、インサイツで、Tween-80を含有する通常の食塩水溶液10mlに懸濁し、2回の5mlの連続注射、各々続いて正常食塩水溶液5mlの投与が実施された。実験は、カプセル化アンタゴmirが、患部組織に供給する動脈に選択的に投与され得ることを示した。

【0197】

実施例6：血流への流出を許容することなく、患部組織の毛細血管におけるミクロスフィアの保持の試験

ブタモデルにおいて、4回の実験が、前下行枝中間部に配置されたコアクシャルバルーンを通した冠内経路によって、実施例4に従って調製された蛍光ミクロスフィア各5mlの2回の注射を投与することによって実施された。4匹の動物を安楽死させ、前下行枝に隣接している組織、及び他の冠動脈によって灌注された対照組織の心筋試料を得た。試料を、光学顕微鏡を通して観察し、傷害された心筋の毛細血管に保持されたミクロスフィアの存在、並びに、対照組織におけるその不在が実証された。

【0198】

全身体内分布を排除するために、以前の2匹の動物において、虚血心筋組織及び対照心筋組織の他に、肺、脾臓及び肝臓から5つの同型試料を得、光Bを用いて光学顕微鏡によって可視化した。蛍光は、前壁心筋に排他的に検出された。この分析は、ミクロスフィアが、アンタゴmir92aの全身的な放出を避けて心臓に保持されることを明らかにした（副作用の低減）。

【0199】

実施例7：標的組織それ自体に傷害を及ぼすことなく、患部組織の毛細血管におけるミクロスフィアの保持の試験

潜在的な局所的毒性及び投与量の治療安全範囲を調べるために実験を実施した。心筋への局所的な虚血傷害を検出するために、虚血を検出するその能力において非常に感度の高い2対のピエゾ・エレクトリック・クリスタルを使用した。心筋組織が虚血に罹れば、残りの組織は運動障害となり肥大し；これは、残りの近接した健康組織によって生じる血圧と共に、微結晶の分離を引き起こし、互いにさらに離れる。開胸術及び心膜切除術を実施した後の2匹のブタにおいて、2対の微結晶を挿入し、1つの対照の対は側面領域に、1つの対は、前下行枝（これを通してミクロスフィアを投与した）によって供給される前側領域にであった。各対の媒体結晶についての、心周期の間の2点におけるそれらの間の距離を測定した：拡張終期（EDL）及び収縮末期（ESL）。EDLとESLとの間の関連は、パラメーターSS（収縮期短縮）： $(EDL - ESL) / EDL$ によって表現される。左心室収縮が完全に消失すれば、 $EDL = ESL$ 及び $SS = 0$ である。正常値は 0.2 ± 0.1 の範囲である。添付されている図解に示されているように、数秒間続く各注射後の最小かつ一過性の周期的変動が、1回目及び2回目の注射に相当する試験投与量を用いて誘導された。さらにかつ驚くべきことに、実施例4に従って調製された蛍光ミクロスフィアの、14回の試験投与量に達する反復冠内注射により局所的な副作用は全く観察されなかった。限界最大用量には、不可逆的な虚血傷害、血行動態の反動、又は不整脈を全く伴わなかった。

【0200】

さらに、冠血流の変化を検出するために、フローセンサを、冠血流を測定する左前下行枝の中間部に配置した。冠内注射後に冠血流の有意な変化は全く観察されなかった。

【0201】

結果は図3（ミクロスフィア120mgを注射した）及び図4（ミクロスフィア240mgを注射した）によって示される。

【0202】

実施例8：少量のアンタゴmir投与量を含むミクロスフィアの1回の冠内注射の分子効果の試験

少量の投与量のマイクロカプセル化アンタゴmirが分子応答を生じ得るかを実証する

ために、虚血組織及び対照組織におけるインビボでのmiR-92aの発現を、カプセル化アンタゴmiR-92aの冠内投与後に測定した。3匹のブタにおいて、実施例1に従って調製されたアンタゴmiR-92aを含有するマイクロスフィア(0.1mg/Kg)60mgを左冠動脈前下行枝に送達した。動物を、処置から1日目、3日目及び10日目に安楽死させ、miR-92a及び対照としての内因性マイクロRNA(miR-123、203及び126)の発現を、2つの同型梗塞試料及び対照試料において、全RNA単離及び特異的プライマーを使用したリアルタイム定量RT-PCRによって定量した(図5参照)。

【0203】

梗塞組織においては、miR-92aの発現は、対照組織と比較して8倍ダウンレギュレートされたが、内因性miRの発現は処置によって影響を受けなかった。阻害は、早くも1日目に存在し始め、10日目にも依然として存在し、対照領域よりも5倍低い発現レベルであった。

【0204】

内因性miRの有意な調節は検出されなかった。これらの結果は、ビヒクル/システムが、アンタゴmiR-92aの制御された送達及び放出を可能とするに適切な条件を提供し、これにより、1回の冠内投与によりマイクロRNA-92aの持続した阻害が生じることを明らかとする。

【0205】

図6に示されたこれらの結果はまた、アンタゴmiRがマイクロスフィア製造過程に分解しないことを確認する。

【0206】

実施例9：低い投与量のアンタゴmiRを含有するマイクロスフィアの1回の冠内注射の生物学的効果の試験

マイクロスフィアにより輸送されたアンタゴmiR-92aの分子効果が生物学的効果を伴うかどうかを実証するために、前臨床試験が26匹の成体ミニブタを用いて実施された。この試験の目的は、カプセル化アンタゴmiR-92aの選択的な冠内投与によるmiR-92aの阻害により、梗塞領域において血管新生の増強がもたらされ、従って、心室リモデリングの発生を予防するかどうかを調べることであった。

【0207】

3つの製剤が投与された：

- 食塩水溶液(対照製剤)
- 実施例3に従って調製されたプラセボマイクロスフィア
- 1匹のミニブタあたり3mgという1つのアンタゴmiR用量の、実施例1に従って調製されたアンタゴmiR-92aマイクロスフィア。

【0208】

処置から4週間後、壊死領域における有意により高い血管密度が、対照と比較して、カプセル化アンタゴmiR-92aを受けた動物において検出され、これにより、以前の研究ii)血管密度(図7参照)において観察されたアンタゴmiR-92aの血管新生促進活性(161.57±58.71、対、プラセボ群における68.49±23.56、対、食塩水群における73.91±24.97、 $p=0.001$)が確認された。

【0209】

微小血管は、梗塞帯域及び梗塞周囲の周縁部の両方において増加した。そのような処置された動物における低い微小血管抵抗性指数が一貫して実証され(200.67±104.46、対、対照における511.73±202.1、 $p=0.007$)、それは血管密度と有意に相関していた($R^2=0.41$ 、 $p=0.02$)(図8参照)。

【0210】

ベースライン微小循環抵抗(ベースラインMR)及び真の微小循環抵抗(TM R(hyp))は、対照と比較して処置群において有意により低かった(それぞれ7.47±1.33対19.62±2.98、 $p=0.005$ 及び5.0±1.15対14.49±2.98、 $p=0.005$)。

10

20

30

40

50

4、 $p = 0.006$)。ベースライン及び真の微小循環抵抗は、血管密度と有意に相関していた (それぞれ $R^2 0.35$ 、 $p = 0.033$ 及び $R^2 0.31$ 、 $p = 0.047$ 、図 9 参照)

【0211】

これらのデータは、カプセル化アンタゴミル-92a が持続した血管新生をインビボにおいて誘導することを示す。

【0212】

増殖血管を見出したので、それ故、AMI 後に起こる治癒過程におけるその潜在的な利点をさらに調べた。心室リモデリングに対するカプセル化アンタゴミル-92a の効果を決定するために、処置群及び非処置群における、エクスビボにおける磁気共鳴画像法 (CMR) による形態学的及び構造学的パラメータ、並びに血管内心エコー (IVE) によって分析される機能的パラメータを比較した。処置動物と比較して対照において IVE では、前側及び心室中隔心尖部運動障害を有する有意により高い比率の動物が存在し ($p = 0.03$) (特に図 10 参照)、また、エクスビボ CMR では左心室において損傷された心室壁の有意により高度な菲薄化、及び有害なりモデリング形態計測変化が認められた (表 3)。

10

【0213】

より特定すると、図 10 は、血管内心エコー (IVE) による局所壁運動機能障害の分析の結果を示す。IVE は、Vivid Q 超音波造影機器 (GE Healthcare, Belford, UK) 及び右心室の心尖部に配置された AcuNav 10F 超音波カテーテル (Siemens) を使用することによって実施された。

20

【0214】

試験の結果は、アンタゴミル-92a ミクロスフィアの投与が、急性心筋梗塞後の有害リモデリングの統計学的に有意な減少に関連することを示す。

【0215】

【表 3】

表 3: CMR における左心室リモデリングのパラメータ

	食塩水 (N=6)	マイクロ カプセル化 プラセボ (N=5)	マイクロ カプセル化 アンタゴ mir-92a (N=6)	P
CMR の梗塞薄片の数	4.8±0.3	4.8±0.4	5.3±0.2	0.38
T _{最大梗塞壁} , mm	6.07±0.9	5.61±0.5	9.01±0.6	0.006
T _{正常後壁} , mm	13.23±0.5	13.52±1.8	11.82±0.7	0.49
最小菲薄化の比率, %	54.79±4.9	56.74±4.1	22.71±5.5	0.000
T _{最小梗塞壁} , mm	3.17±0.4	4.02±0.9	4.35±0.5	0.33
最大菲薄化の比率, %	76.40±2.1 8	69.86±4.72	62.54±4.19	0.05
菲薄化壁の長さ, mm	32.2±1.8	31.7±4	20.5±3.6	0.03
D _R /D _N	1.93±0.2	2.02±0.2	1.29±0.1	0.03
D _N , mm	14.88±0.6 8	13.78±1.59	17.5±1.37	0.12
有害なリモデリング% (数)	83.3 (5)	80 (4)	16.7 (1)	0.03

【 0 2 1 6 】

カプセル化アンタゴ mir - 9 2 a は、急性心筋梗塞後から 1 か月後の有害な左心室リモデリングを予防する。各ミニプタにおけるエクスピボ CMR の全ての梗塞薄片において計算された種々のリモデリングパラメータが決定された。4 匹のミニプタの代表的な L 2 薄片（L 1 は心尖部である）が示されている。T_{最大梗塞壁} = 各薄片における最大梗塞壁

10

20

30

40

50

厚の Σ を罹患薄片の数で割ったものとして計算された最大梗塞壁厚平均値； $T_{\text{正常な後壁}}$ = 各々の罹患薄片における後壁厚の Σ を罹患薄片の数で割ったものとして計算された後乳頭筋の挿入にちょうど沿って測定された正常な後壁厚平均値； $[100 - (T_{\text{最大梗塞壁}} / T_{\text{正常な後壁}} \times 100)]$ として計算された最小菲薄化の平均比率； $T_{\text{最小梗塞壁}}$ = 各々の罹患薄片における最小梗塞壁厚の Σ を罹患薄片の数で割ったものとして計算された最小梗塞壁厚平均値； $[100 - (T_{\text{最小梗塞壁}} / T_{\text{正常な後壁}} \times 100)]$ として計算された最大菲薄化の平均比率； D_R ：各々の梗塞薄片における梗塞壁間の最大直径の Σ を罹患薄片の数で割ったものとして計算された梗塞壁と反対側の正常壁との間の最大直径平均値； D_N ：各々の梗塞薄片における正常な壁間の最大直径の Σ を罹患薄片の数で割ったものとして計算された、 D_R と直角を形成し心室腔の中心に最も近く描かれた正常な壁間の最大直径平均値； D_R / D_N ：各々の梗塞薄片の D_R / D_N の Σ を罹患薄片の数で割ったものとして計算された真球度指数の平均値。表のデータは、平均値 $\pm$ 標準誤差として表現される。

10

【0217】

代表的なCMRの結果は以下を示す：

A：14匹のミニプタの心臓NMR及びIVE（AMI誘発直後の死滅）：AMI直後の死滅の発生のために、リモデリング過程がトリガーされる十分な時間がなかった。これは、求心性左心室が全ての区域において類似の寸法を有することが見られた理由である。

B：AMIの20～30日後のミニプタの心臓NMR及びIVE：有害な心室リモデリングのエビデンス：AMIから1か月後、CMRで前部及び中隔区画に極度のいそうが観察されだけでなく、IVEでもAMI後の有害なりモデリングの典型である運動障害と共に動脈瘤の形成が観察された。

20

C：AMIの22～30日後のミニプタの心臓NMR及びIVE：心室リモデリングは皆無：AMIから1か月後、前部及び中隔領域における壁側領域の僅かな減少が、IVEにおいて動脈瘤を形成することなく、運動障害を伴うことなく観察された。これは、AMI後の好ましい修復反応の典型的な症例である。

【0218】

実施例10：カプセル化アンタゴmir-92aの血管腫瘍誘導又は短期死亡率における効果の試験

全ての動物に対して実施された部検において血管腫瘍は全く観察されず、これにより、遠い場所にある他の臓器におけるマイクロRNA-92aの異所的全身的な抑制は存在しないことが示唆された。試験の死亡率は23%であった。短期死亡率には差異は全く観察されなかった。カプセル化アンタゴmir92aに割り当てられた唯1匹のミニプタが死滅した（ $p = 0.39$ ）。

30

【0219】

【表4】

表4

N= 26	食塩水 (n=9)	マイクロカプセル化 プラセボ (n=9)	マイクロカプセル化 アンタゴmir-92a (n=8)
1か月間の 経過観察	6	7	7
死滅	3	2	1

40

【0220】

実施例11：カプセル化アンタゴmir-92aの不整脈誘発プロファイルの試験

50

カプセル化アンタゴm i r - 9 2 aの不整脈発生能を知るために、手順の最中の全ての不整脈イベントを記録し、Collect 5Sソフトウェア（G E）によって分析した。さらに、この問題に対処するために、挿入可能なループレコーダーを26中10匹の試験ミニブタに無作為に埋め込み、屠殺するまで、梗塞及び処置から1か月後に、起こり得る不整脈の発症を検出した。対照と比較して処置群においては多数の悪性な頻脈性不整脈も徐脈性不整脈も観察されず、このことは、冠内カプセル化アンタゴm i r - 9 2 aは不整脈誘発作用を発揮しないことを示す。

【 0 2 2 1 】

【表 5】

表 5: 試験中に検出された不整脈

	食塩水 (n=9)	マイクロ カプセル化 プラセボ (n=9)	マイクロ カプセル化 アンタゴ mir- 92a (n=8)	p
虚血相 (n= 26)				
不整脈なしの数 (%)	2 (22.2)	0	1 (12.5)	0.37
不整脈の数 (%)	7 (77.8)	(100)	7 (87.5)	
PVC の数	5	7	5	
	0	1	1	
NSVT の数	3	3	3	
心室細動の数				
再灌流相 (n=26)				
不整脈なしの数 (%)	5 (55.6)	3 (33.3)	3 (37.5)	0.6
不整脈の数 (%)	4 (44.4)	6 (66.7)	5 (62.5)	
洞停止の数	1	1	0	
	1	0	0	
結節調律の数	0	2	1	
IVR の数	4	3	3	
	0	0	1	
PVC の数				
NSVT の数				
AMI から 30 日後までの間 (n=10)				
埋め込み可能なループレコーダー	n=4	n=3	n=3	0.88
不整脈なしの数 (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.38
不整脈の数 (%)	2 (50)	3 (100)	3 (100)	
洞性頻脈	2	3	3	
	0	1	0	
洞停止	0	0	1	
PVC 又は PSVC	2 (50)	0	0	
評価不可能				

【 0 2 2 2 】

PVC : 心室性期外収縮、NSVT : 非持続性心室頻拍、IVR : 固有心室調律、PSVC : 上室性期外収縮、AMI : 急性心筋梗塞

【 0 2 2 3 】

実施例 12 : インビトロにおける miR92a の発現に対する、カプセル化アンタゴ miR92a 及び非カプセル化アンタゴ miR92a の効果の評価

10

20

30

40

50

12.1: 材料及び方法

a. 細胞

初代ヒト臍静脈細胞を肺細胞 A549 (ATCC (登録商標) CRL-2922 (商標)) のチオグアニン耐性クローンと融合させることによって確立された、ヒト臍静脈細胞株 EA.hy926 を使用した。

【0224】

b. 処置

約 50000 個の EA.hy926 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、標準的な条件下で (37、5% CO₂)、10% ウシ胎児血清 (FBS) 及び 2mM L-グルタミン (Sigma, L'Isle d'abeau, France) の補充された RPMI 1640 中でインキュベートした。その後、培地を、それぞれのアンタゴミル及びそのそれぞれの対照 (PBS 又は ミクロスフィア) を含有する新たな完全 RPMI 培地と交換した。EA.hy926 細胞を、10 及び 150nM のアンタゴミル 92a (遊離アンタゴミル 92a 及び 3 つのバッチのアンタゴミル 92a ミクロスフィア)、カプセル化アンタゴミル 17 又はカプセル化アンタゴミル 20 のいずれかを用いて処置した。細胞をさらに 24 時間インキュベートし、その後、RNA の抽出のために収集した。全 RNA を抽出し、miRNA の発現を定量 RT-PCR により定量した。

10

【0225】

c. RNA 抽出

miRNA を、EA.hy926 細胞及びミニブタ組織から、Qiagen RNeasy mini-prep (参照番号 74106) 及び RNeasy+ universal kit (参照番号 73404) をそれぞれ使用して製造業者の説明書 (Qiagen, Courtaboeuf, France) に従って単離した。抽出された RNA の量及び純度は、NanoDrop ND 1000 分光光度計 (Labtech International, Paris, France) を使用して評価された。

20

【0226】

d. miRNA の逆転写

miRNA を、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, ref. 4366596) を使用して、全 RNA 5ng 及び特異的 miRNA プローブを含有する最終容量 15 µl 中で逆転写した。試料を 16 で 30 分間、42 で 30 分間インキュベートし、逆転写酵素を、85 で 5 分間加熱し、ずっと 4 で冷却することによって不活化させた。

30

【0227】

e. リアルタイム RT-PCR

理論的基礎。定量値は、PCR 産物の指数関数的増殖に関連したシグナルの増加が検出され始める (QuantStudio 6 及び 7 Flex ソフトウェアを使用して、製造業者のマニュアルに従って) Ct 数から得られる。出発物質の量の差を制御するために、データを、その発現レベルが処置の関数として変化しないことが経験的に示されている 2 つの内因性対照 (miRNA 103 及び miRNA 191) の幾何平均に対して標準化した。標的 miRNA の値を続いて、対照における標的 miRNA の数値が 1 の数値に等しくなるように標準化した。結果は、 $\Delta\Delta Ct$ 計算法 (RQ 分析ソフトウェア、Applied Biosystems (登録商標)) を使用して表現された。

40

【0228】

PCR 増幅。全ての PCR 反応は、QuantStudio (商標) 6 Flex リアルタイム PCR システム及び TaqMan プローブ (Applied Biosystems (登録商標)) を使用して実施された。熱サイクル条件は、95 で 10 分間の初回変性工程、並びに 95 で 15 秒間及び 65 で 1 分間の 45 サイクルを含んでいた。サンプルは二重試験とした。

【0229】

12.1: 結果

miR-92a の発現は、10nM の遊離アンタゴミル-92a 及びカプセル化アンタゴミル-92a の両方によって約 90% の低減率で阻害される。

50

【0230】

miR-92aの発現は、150nMの遊離アンタゴmir-92a及びカプセル化アンタゴmir-92aの両方の後に検出不可能である。

【0231】

miR-17の発現もmiR-20aの発現も、アンタゴmir-92aによる処置によって有意に減少しなかった。

【0232】

これらのデータは図11に要約されている。

【0233】

実施例13：miRのそれぞれの発現に対する、3つのカプセル化アンタゴmir（アンタゴmir17、20a及び92a）の効果のインビトロにおける評価

10

13.1 アンタゴmir-17の積載されたマイクロスフィアの調製

マイクロスフィアは、50：50PLGA共重合体（固有粘度0.2dL/g）を使用してエマルション/溶媒蒸発法によって調製された。アンタゴmir-17溶液（HSA-miR-17-5p；分子量：5305Da；配列：CTGCACTGTAAGCACT；Exiqon製）をPLGA有機溶液中で乳化させた。得られたエマルションを続いて分散性水相に取り込み、ホモジナイズして、所望の粒径を得た。最後に、溶媒蒸発後、得られたマイクロスフィアを凍結乾燥させた。マイクロスフィアの平均直径は10μmであり、アンタゴmir-17含量は7.3%であった。

【0234】

20

13.2 アンタゴmir-20aの積載されたマイクロスフィアの調製

マイクロスフィアを、50：50PLGA共重合体（固有粘度0.2dL/g）を使用してエマルション/溶媒蒸発法によって調製した。アンタゴmir-20a溶液（HSA-miR-20a；分子量：5289Da；配列：CTGCACTATAAGCACT；Exiqon製）をPLGA有機溶液中で乳化させた。得られたエマルションを続いて分散性水相に取り込み、ホモジナイズして、所望の粒径を得た。最後に、溶媒蒸発後、得られたマイクロスフィアを凍結乾燥させた。マイクロスフィアの平均直径は10μmであり、アンタゴmir-20a含量は6.8%であった。

【0235】

13.3 結果

30

材料及び方法は、実施例12と同じである。

- miR-17は、10nMのカプセル化アンタゴmir-17によって76%阻害される。miR17の発現は、150nMのカプセル化アンタゴmir-17による処置によって完全に消失する。

- miR-20aは、10nMのカプセル化アンタゴmir-20aによる処置によって7%阻害され、150nMのカプセル化アンタゴmir-20aによる処置によって87%阻害される。結果を図12に示す。

【0236】

実施例14：積載、サイズ、及びラクチド/グリコリドの比の特徴と共に、3つのバッチのアンタゴmir92aマイクロスフィアのインビトロにおける評価

40

14.1 少量のアンタゴmir-92aの積載されたマイクロスフィアの調製（L13250：ポリマー：RESOMER RG502H）

マイクロスフィアは、実施例1に記載のように50：50PLGA共重合体（固有粘度0.2dL/g）を使用して、しかし、より少ない初期量の薬物及びより高い攪拌速度を使用してエマルション/溶媒蒸発法によって調製され、低いアンタゴmir-92a含量を有するより小さなマイクロスフィアが調製された。マイクロスフィアの平均直径は7μmであり、アンタゴmir-92a含量は1.5%であった。

【0237】

14.2 多量のアンタゴmir-92aの積載されたマイクロスフィアの調製（L13262：ポリマー：RESOMER RG502H）

50

ミクロスフィアは、実施例 1 に記載のように 50 : 50 PLGA 共重合体 (固有粘度 0 . 2 dL/g) を使用して、しかし、より多い初期量の薬物及びより低い攪拌速度を使用してエマルション / 溶媒蒸発法によって調製され、高いアンタゴmir - 92a 含量を有するより大きなミクロスフィアが調製された。ミクロスフィアの平均直径は 15 . 6 μ m であり、アンタゴmir - 92a 含量は 9 . 8 % であった。

【0238】

14 . 3 長時間持続性ポリマーを使用したアンタゴmir - 92a の積載されたミクロスフィアの調製 (L13230 : ポリマー : LACTEL B6006)

ミクロスフィアは、実施例 1 に記載のように、しかし緩徐な薬物放出を目的とした、高い分子量を有する 85 : 15 の PLGA 共重合体 (固有粘度 0 . 64 dL/g) を使用してエマルション / 溶媒蒸発法によって調製された。ミクロスフィアの平均直径は 12 μ m であり、アンタゴ - mir92a 含量は 3 . 1 % であった。

10

【0239】

14 . 4 結果

3 つのバッチのアンタゴmir - 92a ミクロスフィアが、積載、サイズ及びラクトド / グリコリドの比の特徴と共に試験された。

【0240】

ミクロスフィア含量に従って、L13250 を 2 及び 30 nM で、L13262 を 14 及び 210 nM で、L13230 を 4 及び 66 nM で試験した。

20

【0241】

L13250、L13262 及び L13230 は miR92a の発現を完全に消失させた。

【図 1】

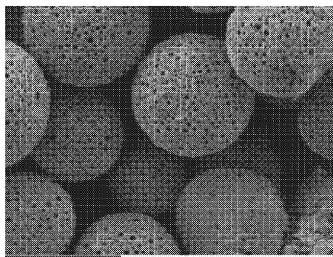
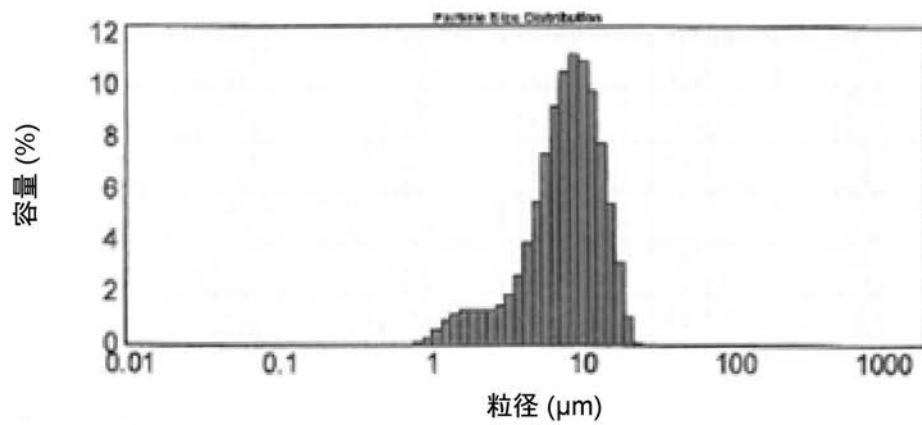


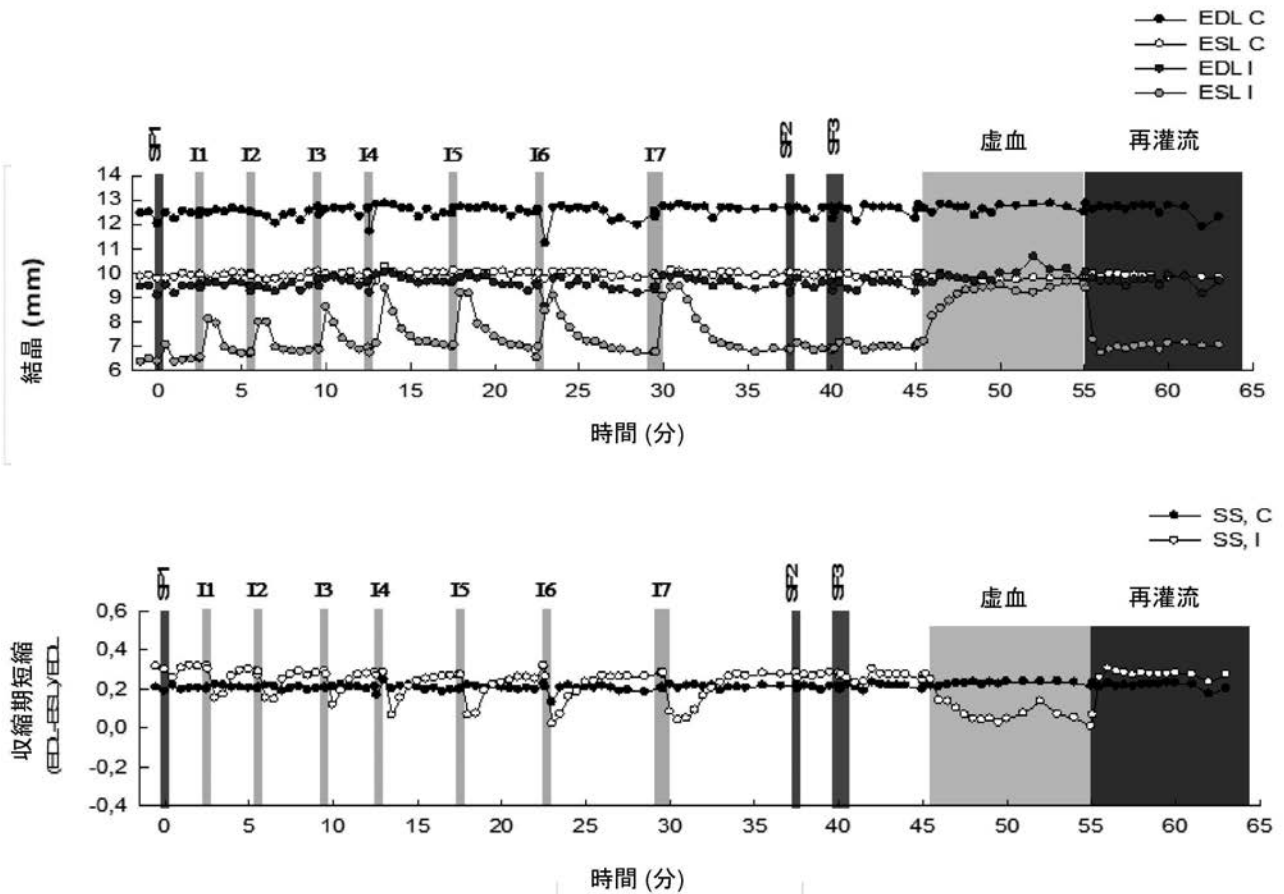
Figure 1

【図 2】

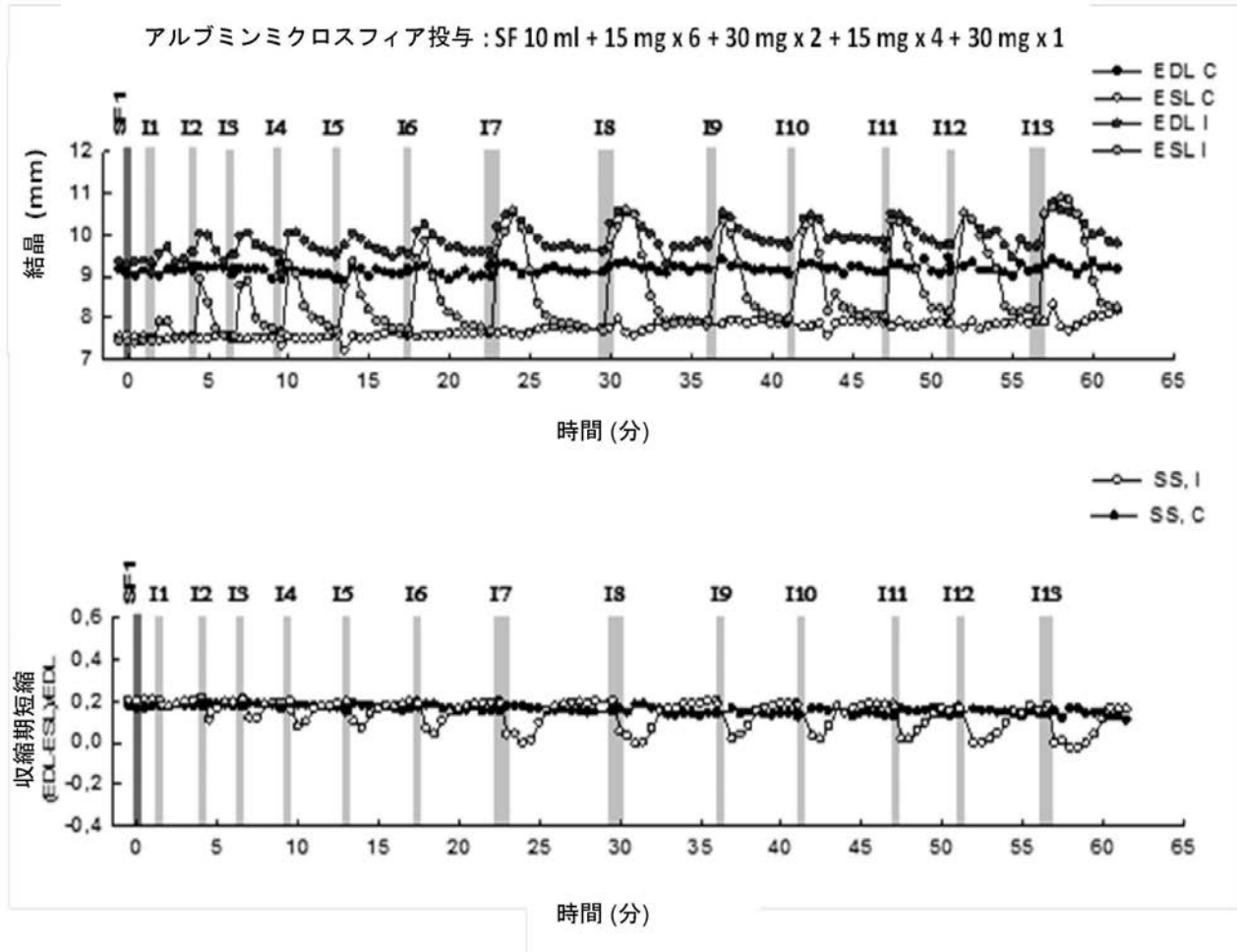


【図 3】

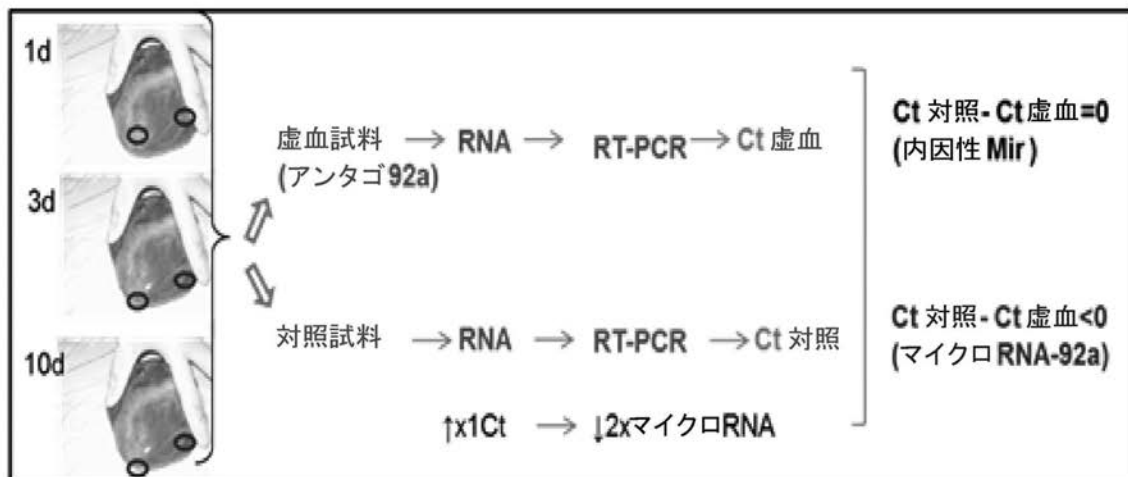
アルブミンミクロスフィア投与 : 15 mg x 6 + 30 mg x 1 + SF 10 ml + SF 20 ml + 虚血 5 分間 / 再灌流 10 分間



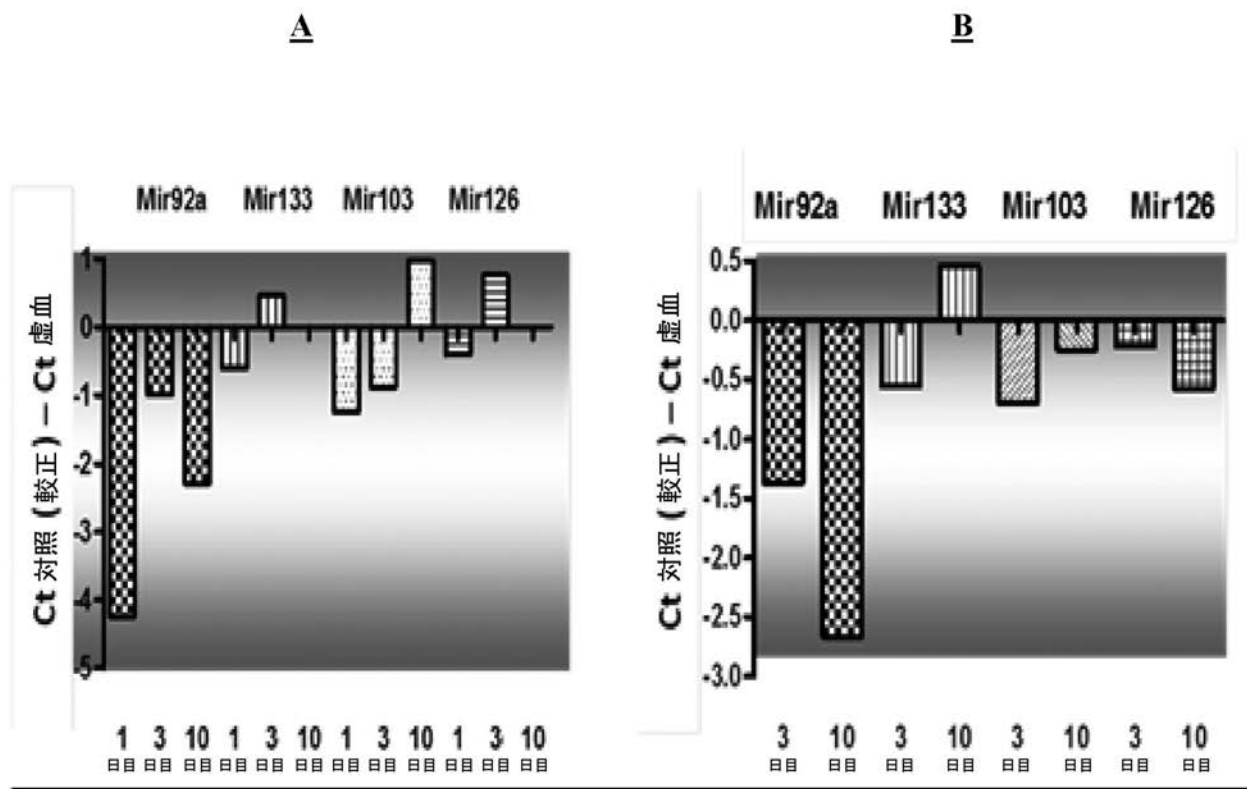
【 図 4 】



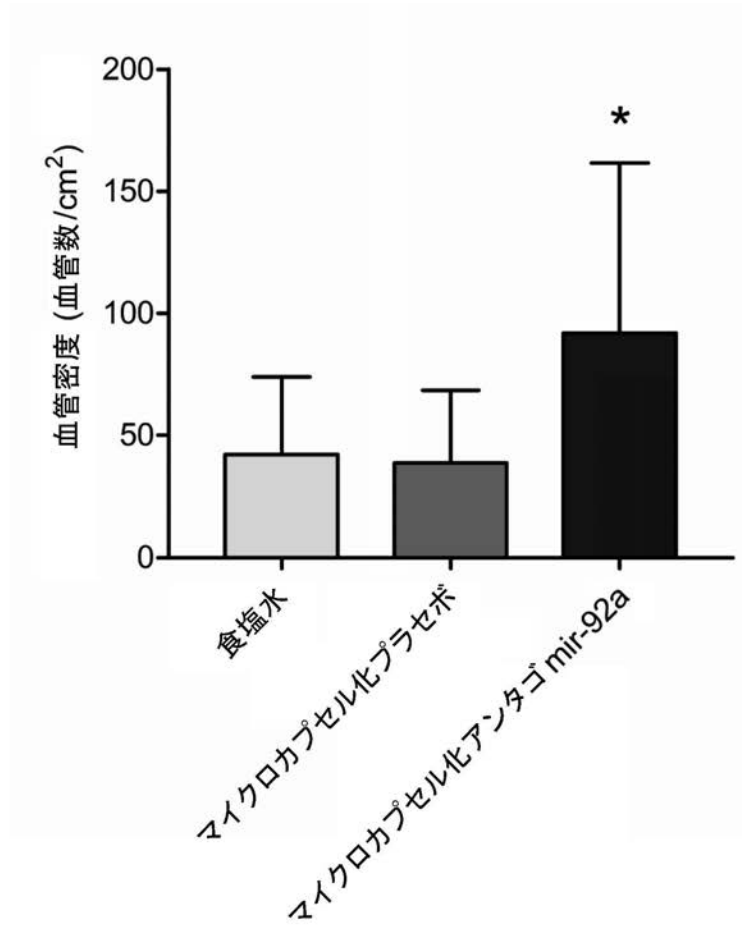
【 図 5 】



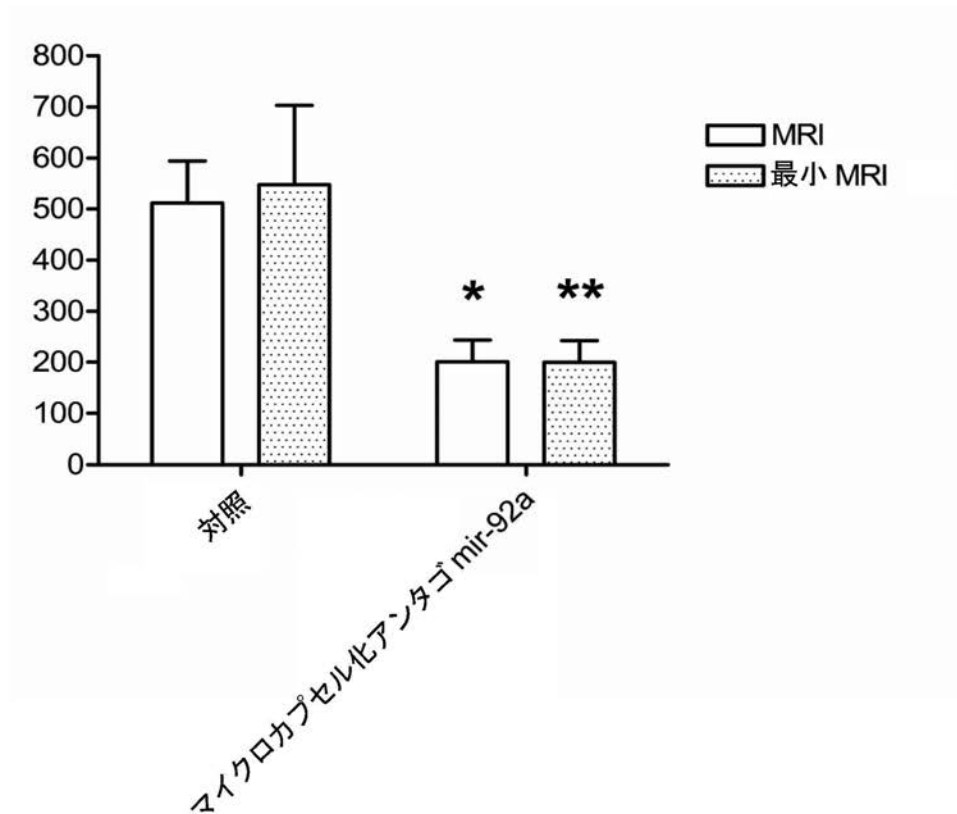
【 図 6 】



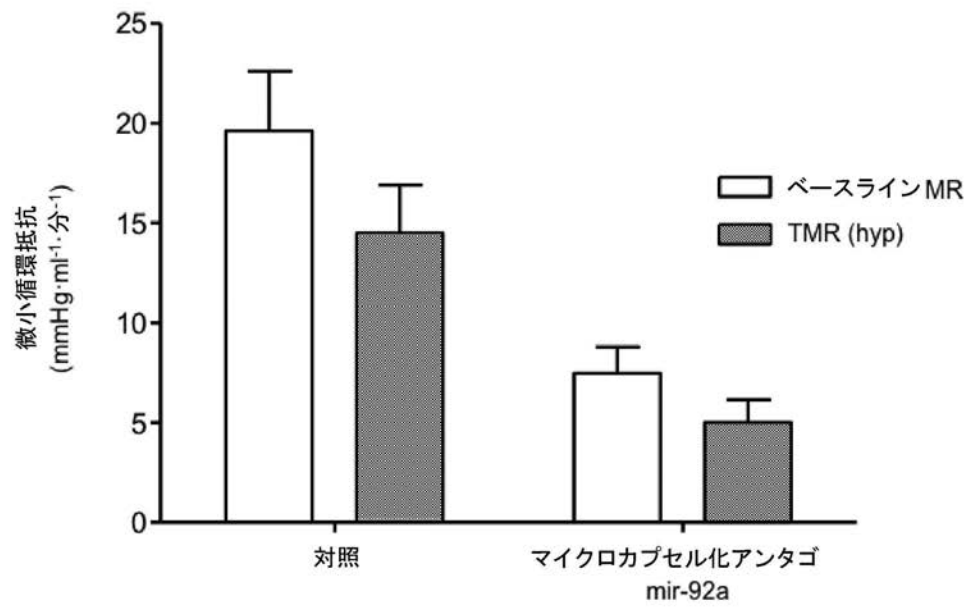
【 図 7 】



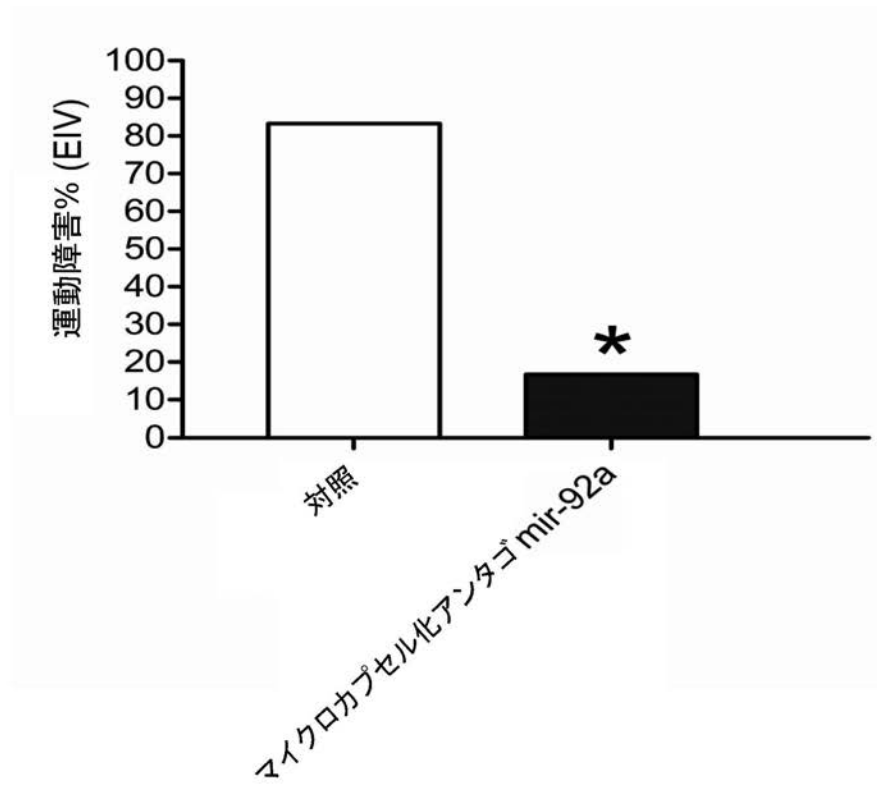
【 図 8 】



【 図 9 】

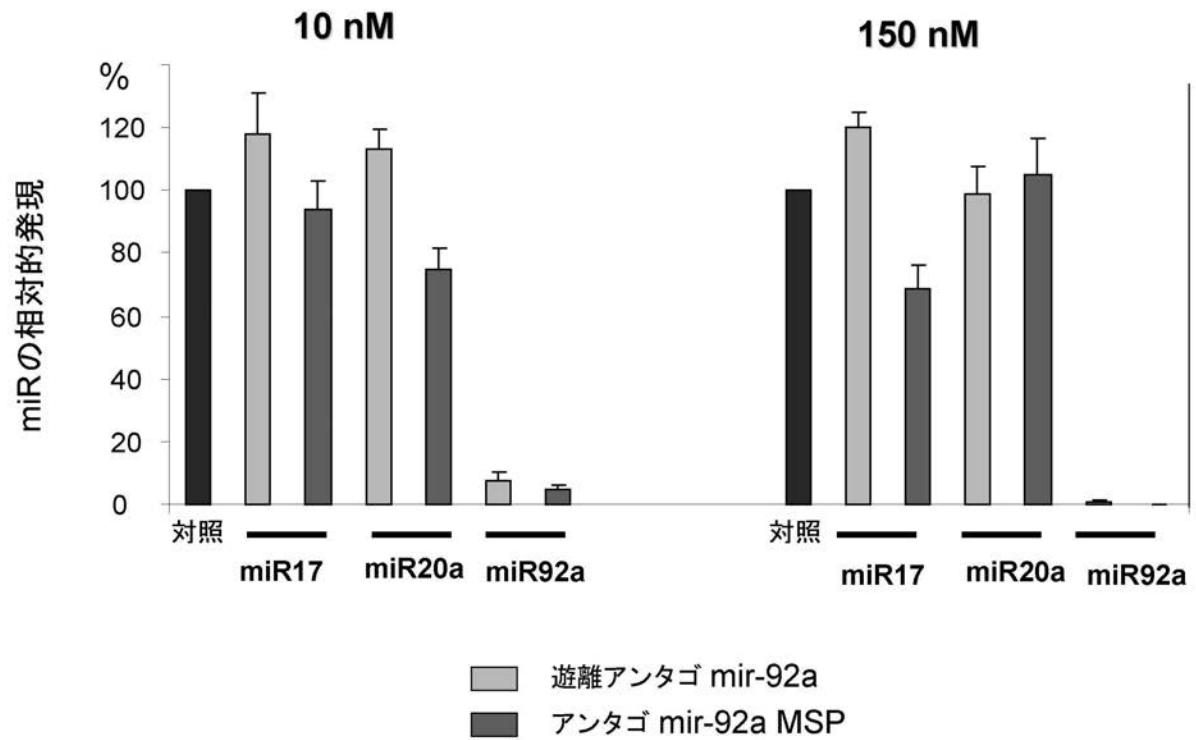


【 図 10 】

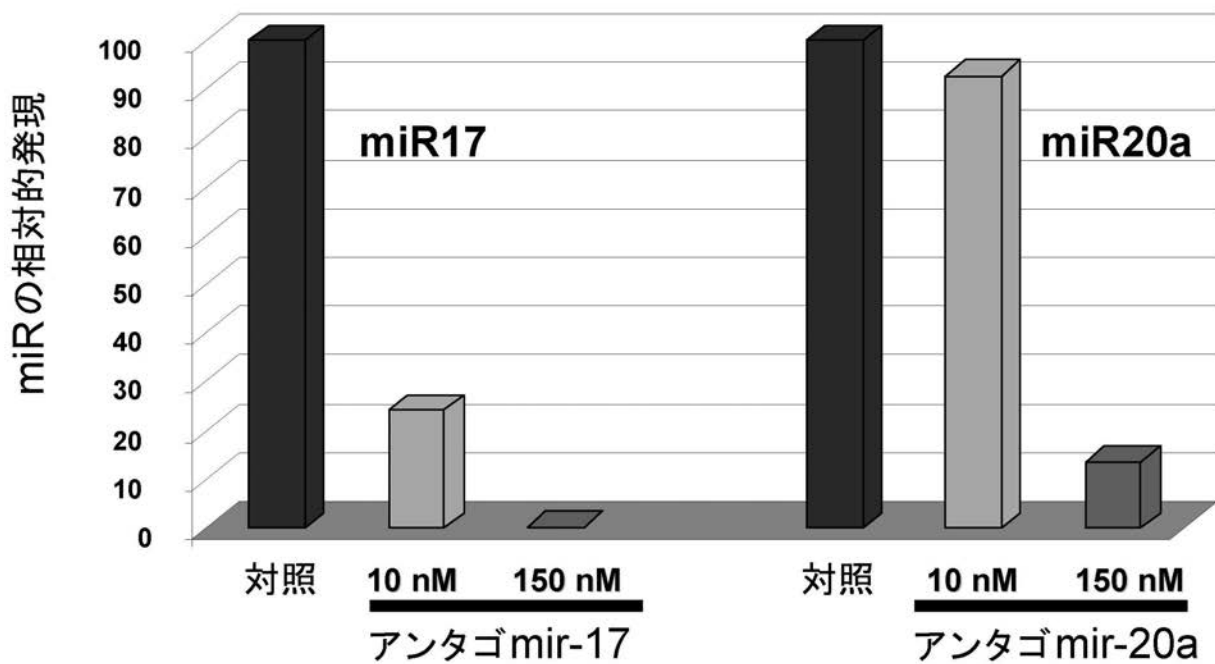


【図 1 1】

アンタゴ mir 92a による処置



【図 1 2】



【配列表】

2016506923000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2014/058500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/113 A61K31/712 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2011 (2011-11), FUJITA MASANORI ET AL: "Inhibition of MicroRNA-92a Enhances Angiogenesis and Cardiomyocyte Regeneration Through Integrin α 5-Dependent Accumulation of Stem Cells Into the Infarcted Myocardium", XP055116076, Database accession no. PREV201200224175 abstract -/--	1-10, 20, 21
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 April 2014		12/05/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Romano, Alper

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/058500

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	& CIRCULATION, vol. 124, no. 21, Suppl. S, November 2011 (2011-11), page A12590, SCIENTIFIC SESSIONS OF THE AMERICAN-HEART-ASSOCIATION/RESUSCITATION SCIENCE SYMPOSIUM; ORLANDO, FL, USA; NOVEMBER 12 -16, 2011 ISSN: 0009-7322(print) ----- K Ablasser ET AL: "Cardiovascular biology 1053 P5665 BENCH Static, but not cyclic tensional forces on the heart increase anti-angiogenic sFlt-1 expression in endothelial cells and inhibit VEGFR-2 activation P5666 BENCH Intracoronary injection of encapsulated antagomir-92a promotes angiogenesis and prevents adverse", 1 August 2013 (2013-08-01), XP055116081, Retrieved from the Internet: URL:http://eurheartj.oxfordjournals.org/co ntent/34/suppl_1/P5666.full.pdf [retrieved on 2014-04-30] abstract	1-14,16, 20-25
Y	----- BONAUER ANGELIKA ET AL: "MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 324, no. 5935, 26 June 2009 (2009-06-26), pages 1710-1713, XP002575234, ISSN: 0036-8075 the whole document	11-27
Y	----- D'ANGELO IVANA ET AL: "Improved delivery of angiogenesis inhibitors from PLGA:poloxamer blend micro- and nanoparticles.", JOURNAL OF MICROENCAPSULATION 2010, vol. 27, no. 1, 2010, pages 57-66, XP002700281, ISSN: 1464-5246 table 2 ----- -/--	11-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/058500

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PANYAM J ET AL: "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 55, no. 3, 24 February 2003 (2003-02-24), pages 329-347, XP008096954, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00228-4 the whole document	1-27
A	----- CLAUDIO IACONETTI ET AL: "Inhibition of miR-92a increases endothelial proliferation and migration in vitro as well as reduces neointimal proliferation in vivo after vascular injury", BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY, STEINKOPFF-VERLAG, DA, vol. 107, no. 5, 14 August 2012 (2012-08-14), pages 1-14, XP035112376, ISSN: 1435-1803, DOI: 10.1007/S00395-012-0296-Y the whole document	1-27
A	----- JAGAT R KANWAR ET AL: "Antiangiogenic therapy using nanotechnological-based delivery system", DRUG DISCOVERY TODAY, vol. 16, no. 5, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 188-202, XP028162998, ISSN: 1359-6446, DOI: 10.1016/J.DRUDIS.2011.01.007 [retrieved on 2011-01-22] the whole document	1-27

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/113 (2010.01) A 6 1 K 47/34
 C 1 2 N 15/00 Z N A G

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

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 アシン, ミゲル - アンヘル

スペイン国、エー - 0 8 2 9 0 セルダニョーラ・デル・ヴァリュス、カレテラ・バルセロナ
 1 0 3 - 1 0 7 2 ° - 2 アー

(72)発明者 フェレ, エウラリア

スペイン国、エー - 0 8 8 2 0 アル・プラ・ダ・リョブレガート、セーノフラケ 1 6

(72)発明者 ペレス, アマデオ

スペイン国、エー - 0 8 0 2 8 バルセロナ、セーノポブラ・デ・リリエト 1 6 4 ° - 4 ア
 -

(72)発明者 ゴタルダ, ネウス・ベレラ

スペイン国、エー - 0 8 0 2 7 バルセロナ、アベニュー・メリディアナ 3 2 6 1 1 エー 4 ア
 -、デーエネイー・4 3 4 4 5 4 2 0 エフェ

(72)発明者 ロドリゲス・シノバス, アントニオ

スペイン国、エー - 0 8 0 1 5 バルセロナ、セーノフルリダップランカ 5 5 - 5 7 4 ° 3 ア
 -、デーエネイー・3 6 9 8 4 9 7 4 ペー

(72)発明者 ヴェール, イグナシ・バルバ

スペイン国、エー - 0 8 2 2 5 タラサ、パッセイジ・デ・ラ・リエトレス 1 2 1 ° 4 アー、
 デーエネイー・4 5 4 6 1 1 1 8 ペー

(72)発明者 ガルシア - ドラド・ガルシア, アントニオ・ダビド

スペイン国、エー - 0 8 0 1 8 バルセロナ、アベニュー・バイピドレラ 1 8、1 エーエレ、デ
 -エネイー・1 3 9 7 7 9 1 エネ

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 CA11 DA02 GA11 HA17

4C076 AA61 AA64 CC11 DD23 EE06 EE24

4C084 AA17 MA38 MA66 NA10 ZA40

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA38 MA66 NA10 ZA40