

(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2013-530160

(P2013-530160A)

(43) 公表日 平成25年7月25日 (2013.7.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 7/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-512611 (P2013-512611)	(71) 出願人	500039463
(86) (22) 出願日	平成23年1月20日 (2011.1.20)		ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ
(85) 翻訳文提出日	平成24年9月19日 (2012.9.19)		ーシテイ・オブ・テキサス・システム
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/021886		アメリカ合衆国、テキサス・78701、
(87) 国際公開番号	W02012/148373		オースティン、ウエスト・セブンス・スト
(87) 国際公開日	平成24年11月1日 (2012.11.1)		リート・201
(31) 優先権主張番号	61/296, 783	(74) 代理人	100079108
(32) 優先日	平成22年1月20日 (2010.1.20)		弁理士 稲葉 良幸
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100109346
(31) 優先権主張番号	61/282, 546		弁理士 大貫 敏史
(32) 優先日	平成22年2月26日 (2010.2.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 赤血球増加症治療用 a n t i m i R - 4 5 1

## (57) 【要約】

本発明は、異常赤血球生成に関連する疾患及び障害を治療する方法を提供する。具体的には、本発明は、m i R - 4 5 1 の阻害薬を投与することによる対象における赤血球増加症の治療方法を提供する。m i R - 4 5 1 ミメティックを投与することにより対象において赤血球数を増加させる方法及び貧血症を治療する方法も開示する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

必要がある対象における赤血球増加症の治療方法であって、前記対象に m i R - 4 5 1 の阻害薬を投与する工程を含む方法。

**【請求項 2】**

前記 m i R - 4 5 1 の阻害薬の投与後に前記対象の赤血球数が減少する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記 m i R - 4 5 1 の阻害薬が、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、成熟 m i R - 4 5 1 配列と少なくとも部分的に相補的な配列を含む、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 3 の配列と少なくとも部分的に相補的な配列を含む、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つの糖修飾及び / 又は骨格修飾を含む、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記糖修飾が、2'-O-メチル修飾又はロックド核酸修飾である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記骨格修飾が、ホスホロチオエート修飾である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、約 8 ~ 約 1 8 ヌクレオチド長である、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 1 0】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、及び配列番号 2 0 からなる群から選択される配列を有する、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 1 1】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、静脈内投与経路又は皮下投与経路により投与される、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 1 2】**

前記対象が、真性赤血球増加症、原発性家族性先天性赤血球増加症、又は赤血球増加症に関連する疾患と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがある、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 1 3】**

前記赤血球増加症に関連する疾患が、気腫、慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D )、うっ血性心不全、睡眠時無呼吸、多発性骨髄腫、又は肺高血圧症である、請求項 1 2 に記載の方法。

**【請求項 1 4】**

対象における赤血球前駆体に対する成熟赤血球の比を調節する方法であって、m i R - 4 5 1 活性又は発現の調節薬を前記対象に投与する工程を含む方法。

**【請求項 1 5】**

前記成熟赤血球が C D 7 1 陰性及び T E R 1 1 9 陽性である、請求項 1 4 に記載の方法。

**【請求項 1 6】**

前記 mi R - 4 5 1 活性又は発現の調節薬が、mi R - 4 5 1 阻害薬である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記赤血球前駆体に対する成熟赤血球の比が、前記 mi R - 4 5 1 阻害薬の投与後に前記対象において低下する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 mi R - 4 5 1 阻害薬が、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、成熟 mi R - 4 5 1 配列と少なくとも部分的に相補的な配列を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 3 の配列と少なくとも部分的に相補的な配列を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つの糖修飾及び / 又は骨格修飾を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記糖修飾が、2'-O-メチル修飾又はロックド核酸修飾である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記骨格修飾が、ホスホロチオエート修飾である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 mi R - 4 5 1 活性又は発現の調節薬が mi R - 4 5 1 ミメティックである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記赤血球前駆体に対する成熟赤血球の比が、前記 mi R - 4 5 1 ミメティックの投与後に前記対象において増加する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 mi R - 4 5 1 ミメティックが、成熟 mi R - 4 5 1 配列を含むポリヌクレオチドである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 3 の配列を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記ポリヌクレオチドが、ベクターから発現される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

必要がある対象において赤血球数を増加させる方法であって、前記対象に mi R - 4 5 1 ミメティックを投与する工程を含む方法。

【請求項 3 1】

前記対象が、再生不良性貧血又は赤血球無形成症と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがある、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 mi R - 4 5 1 ミメティックが、成熟 mi R - 4 5 1 配列を含むポリヌクレオチドである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 3 の配列を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記ポリヌクレオチドが、ベクターから発現される、請求項 3 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 35】

前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 36】

必要がある対象における骨髓増殖性疾患の治療方法であって、前記対象に miR - 451 の阻害薬を投与する工程を含む方法。

## 【請求項 37】

前記骨髓増殖性疾患が、真性赤血球増加症、本態性血小板血症、骨髓線維症、又は白血病である、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

前記白血病が慢性骨髓性白血病 (CML) 又は急性骨髓性白血病 (AML) である、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 39】

前記 miR - 451 阻害薬が、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 40】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、約 8 ~ 約 30 ヌクレオチド長であり、かつ成熟 miR - 451 配列と少なくとも部分的に相補的な配列を含む、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 41】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 3 の配列と少なくとも部分的に相補的な配列を含む、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、及び配列番号 20 からなる群から選択される配列を有する、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 43】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つの糖修飾及び / 又は骨格修飾を含む、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 44】

前記糖修飾が、2' - O - メチル修飾又はロックド核酸修飾である、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 45】

前記骨格修飾が、ホスホロチオエート修飾である、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 46】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、静脈内投与経路又は皮下投与経路により投与される、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 47】

成熟 miR - 451 配列と少なくとも部分的に相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効量を含む医薬組成物であって、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つの糖修飾及び / 又は骨格修飾と薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

## 【請求項 48】

前記少なくとも 1 つの糖修飾が、二環状糖ヌクレオシド修飾又は 2' - O - メチル修飾である、請求項 47 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 49】

前記少なくとも 1 つの骨格修飾が、ホスホロチオエート修飾である、請求項 47 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 50】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、約 8 ~ 約 18 ヌクレオチド長である、請求項

10

20

30

40

50

47に記載の医薬組成物。

【請求項51】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号4、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、及び配列番号20からなる群から選択される配列を有する、請求項47に記載の医薬組成物。

【請求項52】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの前記有効量が、約1mg/kg～約100mg/kgである、請求項47に記載の医薬組成物。

【請求項53】

前記組成物が、静脈内投与又は皮下投与用に製剤化される、請求項47に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2010年1月20日に提出された米国仮特許出願第61/296,783号、及び2010年2月26日に提出された米国仮特許出願第61/282,546号の利益を主張し、これらの仮出願は全体として参照により本明細書に援用される。

【0002】

連邦政府の支援に関する記載

本発明は、アメリカ国立衛生研究所(National Institute of Health)により交付された助成金番号第HL093039号に基づく連邦政府の支援を受けて行われた。連邦政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

電子的に提出されたテキストファイルに関する記載事項

本明細書と共に電子的に提出されたテキストファイルの内容は、全体として参照により本明細書に援用される：配列表のコンピュータ可読フォーマットコピー(ファイル名:MI RG\_021\_01WO\_SeqList\_ST25.txt、記録日:2011年1月20日、ファイルサイズ6キロバイト)。

【0004】

本発明は、マイクロRNA(miRNA)の活性又は発現を制御することによる、異常赤血球生成に関連する障害及び疾患の治療に関する。特に、本発明は、miR-451の発現を制御することにより赤血球増加症又は貧血症を治療することに関する。

【背景技術】

【0005】

赤血球増加症、すなわち赤血球量の不適切な増加は、先天性又は後天性のいずれもあり得る。真性赤血球増加症(PV)としても知られる原発性赤血球増加症は、JAK2-V617F突然変異を獲得した骨髓系前駆細胞のクローン性増殖から生じる後天性疾患である。PV症例の95%に認められるこの突然変異は、赤血球前駆細胞の過剰な成熟を引き起こし、循環成熟赤血球が過剰となる。約10万人に2人がPVを有し、その有病率は女性より男性の方が高い。脳血管事象、心筋梗塞、深部静脈血栓症、及び肺塞栓症を含め、赤血球量の増加に直接起因する高い罹患率及び死亡率が認められる。診断時からの生存期間中央値は約13年であり、死亡のうち40%超は血栓事象によるものである。現在、この疾患の一次療法は静脈切開術による赤血球量の調節である。適切なPV治療には、重大な毒性なしに赤血球量を直接下げる治療化合物が開発されなければならない。

【0006】

貧血症は、正常な赤血球数が減少し、又は正常な血中ヘモグロビン値が低下するもので、最も一般的な血液障害であり、過剰な失血(例えば、出血)、過剰な血球破壊(例えば、溶血)、及び赤血球産生の不足(例えば、赤血球生成不全)を含む様々な要因によって

10

20

30

40

50

引き起こされ得る。現行の貧血症治療は、多くの場合に根底にある原因によって決まり、鉄補給、外因性エリスロポエチン、及び輸血が含まれる。特に、再生不良性貧血は、骨髓が十分な量の血球を産生できないことによって起こる。再生不良性貧血は、典型的には従来の抗貧血治療に反応せず、病態を寛解させるには骨髓移植が必要となり得る。従って、貧血症のためのさらなる治療、特に血球産生を増加させるように作用する治療が、常に必要とされている。

#### 【 0 0 0 7 】

最近になって *miRNA* が、とりわけ発生タイミングの制御、アポトーシス、脂肪代謝、及び造血細胞分化を含め、多くの生物学的過程と関連付けられるようになっている。*miRNA* は約 18 ~ 約 25 ヌクレオチド長の小型の非タンパク質コード RNA であり、個々の *miRNA* 遺伝子から得られるか、タンパク質コード遺伝子のイントロンから得られるか、又は複数の近縁の *miRNA* をコードすることが多いポリシストロン性転写物から得られる。Carrington et al. (Science, Vol. 301(5631):336-338, 2003) によるレビューを参照のこと。*miRNA* は、標的 mRNA の抑制因子として、その配列が完全に相補的であるときはその分解を促進することにより働き、又はその配列がミスマッチを含むときは翻訳を阻害することにより働く。多くの *miRNA* が組織特異的であり、そのため遍在的に発現した遺伝子を組織特異的な形で制御することが可能である。これらの特性から、*miRNA* を制御すれば、複合的な疾患状態に対して組織特異的な形で治療上の影響を与え得るものと考えられる。

10

#### 【 発明の概要 】

20

#### 【 課題を解決するための手段 】

#### 【 0 0 0 8 】

本発明は、一部には、正常な赤血球生成に *miR-451* が必要であり、*miR-451* 発現量が低下すると成熟赤血球が著しく減少するという発見に基づく。従って、*miR-451* 発現の調節は、赤血球増加症及び貧血症などの、異常赤血球生成に関連する障害及び疾患を処置する治療手法を提供する。従って、一実施形態において本発明は、ヒトを含む、必要がある対象において、*miR-451* の阻害薬を対象に投与することにより赤血球増加症を治療する方法を提供する。特定の実施形態では、*miR-451* 阻害薬は、成熟 *miR-451* 配列の全て又は一部と少なくとも部分的に相補的な配列を含む修飾又は非修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、*miR-451* 阻害薬の投与後、対象の赤血球数は減少する。対象は、真性赤血球増加症、原発性家族性先天性赤血球増加症、又は赤血球増加症に関連する疾患と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがあり得る。

30

#### 【 0 0 0 9 】

本発明はまた、対象において赤血球数を増加させる方法も含む。一実施形態では、この方法は、対象に *miR-451* ミメティック (mimetic) を投与する工程を含む。*miR-451* ミメティックは、成熟 *miR-451* 配列、前駆 *miR-451* 配列、又は一次 *miR-451* 配列を含むポリヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、*miR-451* 配列を含むポリヌクレオチドはベクターから発現される。対象は、赤血球無形成症又は貧血症の一種、例えば再生不良性貧血と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがあり得る。

40

#### 【 0 0 1 0 】

本発明はまた、対象における赤血球前駆体に対する成熟赤血球の比を調節する方法も提供する。一実施形態では、この方法は、*miR-451* 活性又は発現の調節薬を対象に投与する工程を含む。赤血球前駆体に対する成熟赤血球の比の低下は、本発明の *miR-451* 阻害薬を投与することにより達成することができる。赤血球前駆体に対する成熟赤血球の比の増加は、本発明の *miR-451* ミメティックを投与することにより達成することができる。一部の実施形態では、成熟赤血球は CD71 陰性及び TER119 陽性である。

#### 【 図面の簡単な説明 】

50

## 【 0 0 1 1 】

【図 1】野生型マウスから単離した示される組織における *miR-451* 発現のノーザンブロット分析。BM、骨髓；Lg、肺；Sp、脾臓；K、腎臓；H、心臓；SkM、骨格筋；Bl、膀胱；Lv、肝臓。

【図 2】A．野生型 (WT; *miR-451* + / +) 動物、ヘテロ接合体 (Het; *miR-451* + / -) 動物、及び *miR-451* ノックアウト (KO; *miR-451* - / -) 動物から単離した骨髓組織における *miR-451* 発現のノーザンブロット (左側のパネル) 及び定量的リアルタイム RT-PCR 分析 (右側のパネル)。RNU6B 発現を負荷対照として使用した。B．8 週齢の野生型マウス (WT; *miR-451* + / +) 及び *miR-451* 対立遺伝子が双方とも欠損したマウス (KO; *miR-451* - / -) におけるヘマトクリット値。

【図 3】E14.5 における全載 (whole mount) 野生型 (*miR-451* + / +) 胚又は *miR-451* ノックアウト (*miR-451* - / -) 胚。矢印は胎児肝を示す。*miR-451* ノックアウト胚は蒼白及び胎児肝のサイズ縮小を呈する。

【図 4】A．交配後 14.5 日目及び 16.5 日目の野生型 (*miR-451* + / +) 動物、*miR-451* ヘテロ接合体 (*miR-451* + / -) 動物、及び *miR-451* ノックアウト (*miR-451* - / -) 動物から単離した赤血球のフローサイトメトリー分析。CD71+ 細胞を y 軸上に示し、TER119+ 細胞を x 軸上に示す。B．交配後 16.5 日目の WT (*miR-451* + / +) 動物、*miR-451* Het (*miR-451* + / -) 動物、及び *miR-451* KO (*miR-451* - / -) 動物からそれぞれ得られた未熟赤血球及び成熟赤血球に相当する領域 III 及び領域 IV における赤血球の割合。

【図 5】5 倍 (左側のパネル) 又は 40 倍 (右側のパネル) に拡大した、成体の野生型 (*miR-451* + / +) マウス又は *miR-451* ノックアウト (*miR-451* - / -) マウスから単離した脾臓の組織切片。切片はヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。*miR-451* ノックアウトの脾臓は赤血球前駆体の著しい膨張を示す。

【図 6】A．成体の野生型 (*miR-451* + / +) 動物、*miR-451* ヘテロ接合体 (*miR-451* + / -) 動物、及び *miR-451* ノックアウト (*miR-451* - / -) 動物から単離した骨髓のフローサイトメトリー分析。CD71+ 細胞を y 軸上に示し、TER119+ 細胞を x 軸上に示す。B．野生型 (*miR-451* + / +) 動物、*miR-451* ヘテロ接合体 (*miR-451* + / -) 動物、及び *miR-451* ノックアウト (*miR-451* - / -) 動物からの骨髓組織中の CD71- / TER119+ 成熟赤血球 (領域 IV) の割合。

【図 7】フェニルヒドラジン (PHZ) 溶血ストレス試験後の *miR-451* 野生型 (WT) 動物及びノックアウト (KO) 動物のヘマトクリット。*miR-451* 動物は、高い赤血球形成速度が十分には生じないことを示す。

【図 8】A．YWHAZ の *miR-451* (配列番号 3) についての、異なる種 (配列番号 11 ~ 14) の間で保存された 3' - UTR 結合部位を示す概略図。*miR-451* シード領域を赤色で強調表示している。B．リアルタイム RT-PCR 分析は、*miR-451* ノックアウト (KO) 動物では、野生型 (WT) 動物と比較して、YWHAZ 転写物の著しいアップレギュレーションがあり、14-3-3 タンパク質をコードする他の転写物において著しい変化はないことを示す。

【図 9】*miR-451* による赤血球分化の可能な制御経路の概略図。*miR-451* は、シャペロン分子 14-3-3 をコードする遺伝子である YWHAZ の発現を阻害し、それにより成長因子受容体からの下流シグナル伝達を妨げ得る。

【図 10】A．ミスマッチを有する対照アンチセンスオリゴヌクレオチド (mm-451) 又は成熟 *miR-451* と相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド (抗 451) を静脈内注射したマウスから単離した骨髓からのノーザンブロット分析。B．ミスマッチを有する対照アンチセンスオリゴヌクレオチド (mm-451) 又は *miR-451* を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド (抗 451) を注射した、骨髓を単離

10

20

30

40

50

した動物のフローサイトメトリー分析。CD71+細胞をy軸上に示し、Ter119+細胞をx軸上に示す。C.それぞれ未熟赤血球及び終末分化した赤血球に相当する領域I及び領域IVにおける赤血球の割合。

【図11】anti-miR-451は生体内でのmiR-451発現を抑制する。生理食塩水、25mg/kg mismatches、又は25mg/kgのanti-miR-451のいずれかで処置した動物の骨髓から回収したRNAのノーザンブロット分析から、anti-miR治療群においてのみ成熟miR-451が抑制されることが分かる。全RNAを示す臭化エチジウム染色アクリルアミドゲルを負荷対照 (loading control) として示す。各レーンが個々の動物に相当する。

【図12】anti-miR-451はPVの異種移植モデルにおいてヘマトクリットを低下させる。anti-miR-451 (anti-miR) 又は mismatches anti-miR (mismatches) のいずれかで処理した野生型ヒトJAK2キナーゼ (WT) 又は構成的活性型JAK2-V617F (VF) のいずれかに感染させた幹細胞を移植したマウスのヘマトクリット分析から、VF-anti-miR群においてのみヘマトクリットが低下することが分かる。WT-mismatches、WT-anti-miR、及びVF-mismatchesについてはn=1。VF-anti-miRについてはn=4。

【図13】anti-miR-451はヒトCD34陽性造血細胞における赤血球系分化を減弱させる。ヒトCD34+幹細胞にanti-miR-451又は mismatches anti-miRのいずれかをヌクレオフェクト (nucleofect) した。これらの細胞を10日間自発的に分化させた時点で、フローサイトメトリーにより赤血球分化を分析した。赤血球マーカーCD71及びTer119について細胞を染色した。最も分化した赤血球が領域4 (R4) にある一方、分化が少ない赤血球系細胞が領域2 (R2) にある。各領域においてゲーティングされた (gated) 割合をそれぞれのゲート内に記載する。これらの細胞にanti-miR-451をヌクレオフェクトすると、 mismatches anti-miRをヌクレオフェクトした細胞と比較して赤血球系分化が低下することは明白である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、一部には、哺乳動物の赤血球成熟にmiR-451が必要であるという発見に基づく。miR-451対立遺伝子双方が欠損したマウスは成熟赤血球のほぼ完全な消失を示し、一方、ヘテロ接合体動物は正常値の約半分の成熟赤血球を有する。従って、miR-451発現の調節を用いて成熟赤血球 (erythrocyte) 又は赤血球 (red blood cell) 産生を制御することができる。従って、本発明は、赤血球増加症及び貧血症などの、異常な成熟赤血球値に関連した疾患及び障害を治療する方法を提供する。

【0013】

ヒトでは、miR-451は、17番染色体の遺伝子間領域からのmiR-144と共に発現する。ヒト及びマウスのmiR-451の配列をコードするpre-miRNAを、以下にそれぞれ配列番号1及び配列番号2として示す。成熟miR-451配列を配列番号3に提供する。マウスのpri-miR-144/451配列を配列番号15に提供する。予測されるpri-miR-144/451配列位置は17番染色体上のゲノム座標24212513~24212762である (Saini et al. (2008) BMC Genomics, Vol 9: 564、これは参照により本明細書に援用される)。本発明はまた、ヒトpri-miR-144/451配列の使用も含む。

ヒトpre-miR-451 (配列番号1)

5' - CUUGGGA AUG GCAAGGA AAC CGUUA CCAUU ACUG  
AGUUUA GUAAUGGUA A UGGUUCUCUU GCUAUACCCA  
GA - 3'

マウスpre-miR-451 (配列番号2)

5' - CUUGGGA AUG GCGAGGA AAC CGUUA CCAUU ACUG  
AGUUUA GUAAUGGUA A CGGUUCUCUU GCUGCUCCCA  
CA - 3'

10

20

30

40

50



成熟 mi R - 4 5 1 ( 配列番号 3 )

5' - A A A C C G U U A C C A U U A C U G A G U U - 3'

マウス pri - mi R - 1 4 4 / 4 5 1 ( 配列番号 1 5 )

5' - C A G G C T C T C C C T G T G C A G A G G A T T C C C T G G A C G A G G C  
T C C A G C T C C A C T C C A G C T C C A G G T A A G C A G T C C T T G G A G T  
G G C T G T C A G C C T G C T T A T A G G T C T G C C C A G A G G G A A G C T C  
C T G C C T C A C A A C T T C G T T T C T G C C T G T A A C T C T G G A T C C C  
T A A G A G A C C C G A G T A G A C C T T A G C T T C C T T C T C T A A G C C A  
C C T G G G G T T A T C C T G G A C C A C A G G A T C A G G G A G A T G C T G C  
T C T G G G A G G G A A G T G G A G G A G C A G A G G T A G G G A C T T A G G T  
G T C C C T G A C T G A C C C T G A G C C A A T C C C C T G G C T C A C T C C A  
G G C C T G C T G C T C A C C T C C T C C T C C A G G A C C T T G G C T G G G A  
T A T C A T C A T A T A C T G T A A G T T T G T G A T G A G A C A C T A C A G T  
A T A G A T G A T G T A C T A G T C T G G G T A C C C C A C C T C C A G A G C C  
T G C C T G G T T T G C A G C A G A G A T G C A G A A G T A C A C G G G C T C A  
C T G C T C G G C C T A A T C A A G C C T G C T G A C A G C T G T G G C A C T T  
G G G A A T G G C G A G G A A A C C G T T A C C A T T A C T G A G T T T A G T A  
A T G G T A A C G G T T C T C T T G C T G C T C C C A C A A A C T G T G C C A A  
G A A G A G C T C A T G A C C C T G G A G C A G A C T G C T G G A A G A A A A G  
G A C A C C C A G G C T G A C A A G A G A A T G G G G T T G G G G G A A A G G G  
T A C A T T T T C C T C T T C A C T G T G C C A A A G A A A T A A A A G A T A A  
G A A T A A G A G C A C T T G T C A T T T A A C T T T A T T A G C A T C C G A G  
G C T G G G T G G T T G G A T G - 3'

10

20

【 0 0 1 4 】

本明細書に開示される RNA 配列がデオキシリボヌクレオチドを必要とする実施形態で使用される場合、ウリジン残基の代わりにチミジン残基が用いられることが理解される。同様に、本明細書に開示される DNA 配列がリボヌクレオチドを必要とする実施形態で使用される場合、チミジン残基の代わりにウリジン残基が用いられる。

【 0 0 1 5 】

一実施形態では、本発明は、mi R - 4 5 1 活性又は発現の阻害薬を投与することにより、必要がある対象において赤血球増加症を治療する方法を提供する。本明細書で使用される時、用語「対象」又は「患者」は、限定なしに、ヒト及び他の霊長類（例えば、チンパンジー並びに他の類人猿及びサル種）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ及びウマ）、家庭内飼育哺乳動物（例えば、イヌ及びネコ）、実験動物（例えば、マウス、ラット、及びモルモットなどのげっ歯類）、及び鳥類（例えば、家庭内飼育鳥、野鳥及び狩猟鳥、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ及び他の家禽、アヒル、ガチョウなど）を含め、任意の脊椎動物を指す。一部の実施形態では、対象は哺乳動物である。他の実施形態では、対象はヒトである。

30

【 0 0 1 6 】

赤血球増加症は、赤血球量の増加を特徴とする骨髓増殖性疾患である。原発性赤血球増加症又は真性赤血球増加症は、過剰な赤血球産生をもたらす骨髓の異常により引き起こされると考えられている。本発明の方法は、必要がある対象にmi R - 4 5 1 阻害薬を投与し、それにより成熟赤血球（erythrocyte）又は赤血球（red blood cell）の数を減少させることによる赤血球増加症の治療を提供する。一実施形態では、対象の赤血球数は、mi R - 4 5 1 の阻害薬の投与後に、mi R - 4 5 1 阻害薬の投与を受けていない対象と比較して減少する。例えば対象の赤血球数は、mi R - 4 5 1 阻害薬の投与後に、mi R - 4 5 1 阻害薬の投与を受けていない対象と比較して約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、又は約 4 0 % 減少し得る。別の実施形態では、対象の赤血球数は正常な赤血球数値の範囲内になるまで減少する。正常赤血球数は、女性について約 4 2 0 ~ 約 5 4 0 万細胞 /  $\mu$  L、男性について約 4 7 0 ~ 約 6 1 0 万細胞 /  $\mu$  L、及び小児について約 4 6 0 ~ 約 4 8 0 万細胞 /

40

50

μLである。特定の実施形態では、対象は、真性赤血球増加症、原発性家族性先天性赤血球増加症、又は赤血球増加症に関連する疾患と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがある。赤血球増加症に関連する疾患には、限定はされないが、気腫、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、うっ血性心不全、睡眠時無呼吸、多発性骨髄腫、又は肺高血圧症が含まれる。従って、本発明はまた、miR-451阻害薬を投与することにより赤血球増加症に関連する疾患を治療する方法も包含する。

#### 【0017】

別の実施形態では、本発明は、miR-451阻害薬を投与することにより対象において他の骨髄増殖性疾患を治療又は予防する方法を含む。例えば、一実施形態では、本発明は、必要がある対象において本態性血小板血症（essential thrombocythemia）（本態性血小板増加症（essential thrombocytosis）とも称される）を治療する方法を提供し、この方法は、対象にmiR-451阻害薬を投与する工程を含む。本態性血小板血症は、血小板の過剰産生を特徴とする疾患である。一部の実施形態では、対象の血小板数は、miR-451阻害薬の投与後に、miR-451阻害薬の投与を受けていない対象の血小板数と比較して減少する。他の実施形態では、対象においてmiR-451阻害薬の投与後に、miR-451阻害薬の投与を受けていない対象と比較して脾臓肥大の縮小が起こる。

10

#### 【0018】

別の実施形態では、本発明は、必要がある対象において骨髄線維症を治療又は予防する方法を提供し、この方法は、対象にmiR-451阻害薬を投与する工程を含む。原発性又は特発性骨髄線維症に罹患している患者の骨髄は膠質性の結合組織線維に置き換わり、進行性汎血球減少症が引き起こされる。特定の実施形態では、対象の骨髄の線維含有量が、miR-451阻害薬の投与後に、miR-451阻害薬の投与を受けていない対象と比較して減少する。他の実施形態では、対象の赤血球、白血球、及び/又は血小板数が、miR-451阻害薬の投与後に、miR-451阻害薬の投与を受けていない対象と比較して増加する。

20

#### 【0019】

さらに別の実施形態では、本発明は、miR-451阻害薬を投与することにより、対象において白血病を予防又は治療する方法を提供する。一部の実施形態では、対象は、真性赤血球増加症と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがあり、白血病を発症するリスクがある。特定の実施形態では、白血病は急性リンパ性白血病（ALL）である。他の実施形態では、白血病は慢性骨髄性白血病（CML）である。さらに他の実施形態では、白血病は慢性リンパ性白血病（CLL）又は急性骨髄性白血病（AML）である。

30

#### 【0020】

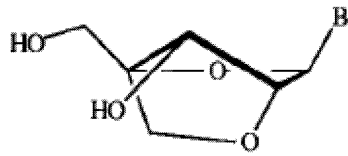
miR-451活性又は発現の阻害薬は、成熟miR-451配列の全て又は一部を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを含み得る。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも1つの化学修飾（例えば、糖修飾又は骨格修飾）を含む。例えば、好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の「コンフォメーションが制限された」又は二環状糖ヌクレオシド修飾（BSN）から構成されてもよく、これはBSNを含むオリゴヌクレオチドとその相補的マイクロRNA標的鎖との間に形成される複合体に熱安定性の向上をもたらす。例えば、一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも1つの「ロックド（locked）核酸」を含む。ロックド核酸（LNA）は、リボース糖部分が「ロックされた」構造である2'-O, 4'-C-メチレンリボヌクレオシド（構造A）を含む。別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの2', 4'-Cで架橋された2'デオキシリボヌクレオシド（CDNA、構造B）を含む。例えば、米国特許第6,403,566号及びWang et al. (1999) Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, Vol. 9: 1147-1150（双方とも全体として参照により本明細書に援用される）を参照のこと

40

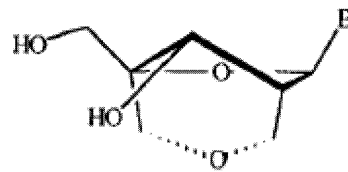
50

。さらに別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、構造Cに示される構造を有する少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含む。miR-451を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、BSN(LNA、CDNAなど)又は他の修飾ヌクレオチドと、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドとの組み合わせを含むことができる。

【化1】

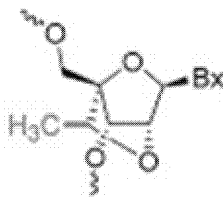


A



B

10



C

20

【0021】

或いは、アンチセンスオリゴヌクレオチドはペプチド核酸(PNA)を含むことができ、これは糖リン酸骨格ではなく、ペプチドベースの骨格を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する他の修飾糖又はリン酸ジエステル修飾も企図される。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドが含み得る他の化学修飾には、限定はされないが、2'-O-アルキル(例えば2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル)修飾、2'-フルオロ修飾、及び4'チオ修飾などの糖修飾、並びに1つ又は複数のホスホロチオエート結合、モルホリノ結合、又はホスホノカルボキシレート結合などの骨格修飾が含まれる(例えば、全体として参照により本明細書に援用される米国特許第6,693,187号及び同第7,067,641号を参照のこと)。一実施形態では、miR-451を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、各塩基に2'-O-メチル糖修飾を含み、ホスホロチオエート結合によって連結される。アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に長さがより短いもの(例えば15ヌクレオチド未満)は、1つ又は複数の親和性を増強する修飾、例えば、限定はされないが、LNA修飾、二環状ヌクレオシド修飾、ホスホノホルメート修飾、2'-O-アルキル修飾などを含み得る。一部の実施形態では、好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'末端及び3'末端の双方に2'-O-メトキシエチルで修飾されたりリボヌクレオチドを含み、少なくとも10個のデオキシリボヌクレオチドが中心にある2'-O-メトキシエチル「ギャップマー」である。このような「ギャップマー」は、RNA標的のRNアーゼH依存性の分解機構を引き起こす能力を有する。安定性を亢進し、かつ効力を向上させるアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の修飾、例えば全体として参照により本明細書に援用される米国特許第6,838,283号に記載される修飾が、当該技術分野において公知であり、本発明の方法での使用に好適である。例えば、生体内での送達及び安定を促進するため、アンチセンスオリゴヌクレオチドがその3'末端で、コレステロール部分などのステロイド、ビタミン、脂肪酸、炭水化物若しくはグリコシド、ペプチド、又は他の小分子リガンドに連結されてもよい。

30

40

【0022】

miRNAの活性の阻害に有用な好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドは、約5～

50

約 25ヌクレオチド長、約 10～約 30ヌクレオチド長、又は約 20～約 25ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、miR-451を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、約 8～約 18ヌクレオチド長、及び他の実施形態では約 12～約 16ヌクレオチド長である。miR-451に相補的な任意の 8mer 又はそれ以上、すなわち、miRNA の 5' 末端に相補的であり、miRNA の完全相補配列にわたって至る任意の anti-miR が用いられ得る。例えば、一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは 5'-AACUCAGUAAUGGUAAACGGUUU-3' (配列番号 4) の配列を有する。別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは 5'-AACGGUUU-3' (配列番号 6) の配列を有する。別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは 5'-GUAAACGGUUU-3' (配列番号 7) の配列を有する。別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは 5'-UGGUAAACGGUUU-3' (配列番号 8) の配列を有する。さらに別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは 5'-AAUGGUAAACGGUUU-3' (配列番号 9) の配列を有する。さらに別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは 5'-GUAAUGGUAAACGGUUU-3' (配列番号 10) の配列を有する。miR-451の他の好適な阻害薬は、5'-AGUAAUGGUAAACGGUU-3' (配列番号 16)、5'-GUAAUGGUAAACGGUU-3' (配列番号 17)、5'-UAAUGGUAAACGGUUU-3' (配列番号 18)、5'-UAAUGGUAAACGGUU-3' (配列番号 19)、及び 5'-UAAACGGUU-3' (配列番号 20) からなる群から選択される配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、成熟 miR-451 配列の全て又は一部と少なくとも部分的に相補的な、例えば成熟 miR-451 配列の全て又は一部と少なくとも約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 相補的な配列を含み得る。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、成熟 miR-451 配列の全て又は一部と実質的に相補的な、すなわち標的ポリヌクレオチド配列と少なくとも約 90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 相補的であり得る。一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、成熟 miR-451 配列の全て又は一部と 100% 相補的な配列を含む。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号 3 と少なくとも部分的に相補的である。

#### 【0023】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、miR-451の前駆体 miRNA 配列 (pre-miRNA) の全て又は一部と少なくとも部分的に相補的な、例えば pre-miR-451 配列の全て又は一部と少なくとも約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 相補的な配列を含み得る。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、pre-miR-451のステム-ループ領域の外側に位置する配列と少なくとも部分的に相補的な配列を含む。一実施形態では、miR-451阻害薬は、配列番号 1 又は配列番号 2 の pre-miR-451 配列の全て又は一部と少なくとも部分的に相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、miR-451の一次 miRNA 配列 (pri-miRNA) の全て又は一部と少なくとも部分的に相補的な配列を含み得る。例えば、詳細な一実施形態では、miR-451の阻害薬は、配列番号 15 の pri-miR-451 配列又は対応するヒト pri-miR-451 配列の全て又は一部と少なくとも部分的に相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

#### 【0024】

本明細書に記載される miR-451 阻害薬は、赤血球増加症 (例えば、真性赤血球増加症) 及び他の骨髄増殖性疾患、例えば、本態性血小板血症、骨髄線維症、及び骨髄性白血病の治療に使用される他の治療剤と共に投与されてもよい。例えば miR-451 は、限定はされないが、血液希釈剤 (例えばアスピリン)、インターフェロン、アナグレリド、ヒドロキシウレア、化学療法剤、ダサチニブ (スプリセル (Sprycel))、INC B-18424、レスタウルチニブ (CEP-701)、ギビノスタット (givinostat) (

I T F - 2 3 5 7 )、X L - 0 1 9、M K - 0 6 8 3、ペグ化インターフェロン 2 a ( ペガシス (Pegasys) )、T A K - 9 0 1、及びエルロチニブを含む治療剤と同時投与されてもよい。mi R - 4 5 1 阻害薬は他の治療剤の投与前又は投与後に投与され得る。一部の実施形態では、mi R - 4 5 1 阻害薬は他の治療剤と同時に投与される。特定の実施形態では、mi R - 4 5 1 阻害薬は、骨髄増殖性疾患を寛解させるために用いられる手技、例えば、静脈切開術、血小板アフェレーシス、及び骨髄移植の前又は後に投与される。

#### 【0025】

本発明はまた、必要がある対象において赤血球数を増加させる方法も含む。一実施形態では、この方法は、対象にmi R - 4 5 1 ミメティックを投与する工程を含む。本明細書で使用されるとき、「mi R - 4 5 1 ミメティック」は、mi R - 4 5 1 がもたらす生物学的作用を生じる薬剤である。mi R - 4 5 1 ミメティックは、mi R - 4 5 1 発現又は活性の作動薬である薬剤、又はmi R - 4 5 1 機能を高める薬剤を含むことができる。特定の実施形態では、対象は、貧血症、例えばある種の小球性貧血、大球性貧血、又は正球性貧血と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがある。一実施形態では、対象は、再生不良性貧血又は赤血球無形成症と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがある。別の実施形態では、対象は、栄養素欠乏症、例えば、鉄欠乏症、ビタミンB 1 2 欠乏症、又は葉酸欠乏症と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがある。さらに別の実施形態では、対象は、溶血性貧血と診断されるか、それに罹患しているか、又はそれを発症するリスクがある。

#### 【0026】

mi R - 4 5 1 ミメティックは、赤血球数を増加させるための、又は様々な種類の貧血症を治療するための他の公知の治療剤と共に投与されてもよい。例えば、mi R - 4 5 1 ミメティックは、エリスロポエチン、経口鉄補給 (例えば、硫酸第一鉄、フマル酸第一鉄、又はグルコン酸第一鉄)、葉酸、ビタミンB 1 2、又はエポエチンアルファと共に投与されてもよい。mi R - 4 5 1 ミメティック治療はまた、貧血症を治療するための他の手技、例えば輸血又は骨髄移植と共に行われてもよい。例えば、一実施形態では、本発明のmi R - 4 5 1 ミメティックは、被骨髄移植者に移植する前に、血液骨髄提供者又は血液骨髄被移植者自身から得られる造血前駆細胞に送達され得る。

#### 【0027】

一部の実施形態では、mi R - 4 5 1 ミメティック又は作動薬は、成熟mi R - 4 5 1 配列 (配列番号3) をコードするポリヌクレオチドである。別の実施形態では、mi R - 4 5 1 ミメティック又は作動薬は、mi R - 4 5 1 のpri - mi RNA 配列 (例えば、配列番号15) を含むポリヌクレオチドであってもよい。さらに別の実施形態では、mi R - 4 5 1 ミメティック又は作動薬は、mi R - 4 5 1 のpre - mi RNA 配列を含むポリヌクレオチドであってもよい。例えば、ポリヌクレオチドは配列番号1又は配列番号2の配列を含み得る。かかるポリヌクレオチドは約18 ~ 約2000ヌクレオチド長、約70 ~ 約200ヌクレオチド長、約20 ~ 約50ヌクレオチド長、又は約18 ~ 約25ヌクレオチド長であり得る。成熟mi R - 4 5 1、pre - mi R - 4 5 1、又はpri - mi R - 4 5 1 配列を含むポリヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドは、1つ又は複数の化学修飾、例えば、ロックド核酸、ペプチド核酸、糖修飾、例えば、2' - O - アルキル (例えば、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル) 修飾、2' - フルオロ修飾、及び4' チオ修飾など、並びに骨格修飾、例えば、1つ又は複数のホスホロチオエート結合、モルホリノ結合、又はホスホノカルボキシレート結合などを含み得る。一実施形態では、mi R - 4 5 1 配列を含むポリヌクレオチドは、コレステロールなどのステロイド、ビタミン、脂肪酸、炭水化物若しくはグリコシド、ペプチド、又は別の小分子リガンドにコンジュゲートされる。

#### 【0028】

特定の実施形態では、成熟mi R - 4 5 1、pre - mi R - 4 5 1、又はpri - mi R - 4 5 1 配列を含むポリヌクレオチドは、発現ベクターから発現されてもよい。加えて、本明細書に記載される任意のmi R - 4 5 1 阻害薬は、mi R - 4 5 1 阻害薬をコー

10

20

30

40

50

ドする発現ベクターを投与することによって対象に送達することができる。「ベクター」は、目的の核酸を細胞内部に送達するために使用することのできる組成物 (composition of matter) である。数多くのベクターが当該技術分野において公知であり、そのようなベクターには、限定はされないが、直鎖状ポリヌクレオチド、イオン化合物又は両親媒性化合物と結合したポリヌクレオチド、プラスミド、及びウイルスが含まれる。従って用語「ベクター」は、自己複製プラスミド又はウイルスを含む。一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターの例には、限定はされないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが含まれる。発現構築物は生細胞内で複製することができ、又はそれは合成的に作製することができる。本願の目的上、用語「発現構築物」、「発現ベクター」、及び「ベクター」は、本発明の適用を一般的かつ説明的意味で示すために同義的に使用され、本発明を限定することは意図されない。

#### 【0029】

一実施形態では、miR-451配列を含むポリヌクレオチドを発現するための発現ベクターは、成熟miR-451配列 (例えば、配列番号3)、pre-miR-451配列 (例えば、配列番号1又は配列番号2)、又はpri-miR-451配列 (例えば、配列番号15) を含むポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。別の実施形態では、本発明のmiR-451阻害薬を発現するための発現ベクターは、アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含み、ここで、発現したアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、miR-451の成熟配列 (例えば、配列番号3) と部分的に又は完全に相補的である。語句「作動可能に連結された」又は「転写調節下にある」は、本明細書で使用されるとき、RNAポリメラーゼによる転写の開始及びポリヌクレオチドの発現を調節するためにプロモーターがポリヌクレオチドに対して正しい位置及び向きにあることを意味する。本明細書で使用されるとき、「プロモーター」は、遺伝子の特定の転写を開始するために必要な、細胞の合成機構により認識されるDNA配列、又は導入された合成機構を指す。好適なプロモーターには、限定はされないが、RNA pol I、pol II、pol III、及びウイルスプロモーター (例えばヒトサイトメガロウイルス (CMV) 前初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、及びラウス肉腫ウイルス長末端反復) が含まれる。一実施形態では、プロモーターは組織特異的プロモーターである。特に興味深いのは、赤血球前駆細胞プロモーター、及びより詳細には、赤血球特異的プロモーター、例えば、HK1 (de Vooght et al. (2009) Haematologica, Vol. 94: 1203-1210)、GATA1、GATA2、CEBP $\gamma$ 、PU.1、及びSTAT5プロモーターである。特定の実施形態では、miR-451をコードするポリヌクレオチド又はmiR-451阻害薬に作動可能に連結されたプロモーターは、誘導性プロモーターであってもよい。誘導性プロモーターは当該技術分野において公知であり、限定はされないが、テトラサイクリンプロモーター、メタロチオネインIIAプロモーター、熱ショックプロモーター、ステロイド/甲状腺ホルモン/レチノイン酸応答エレメント、アデノウイルス後期プロモーター、及び誘導性マウス乳腺腫瘍ウイルスLTRが含まれる。

#### 【0030】

本発明はまた、対象における赤血球前駆体に対する成熟赤血球の比を調節する方法も提供する。一実施形態では、この方法は、miR-451活性又は発現の調節薬を対象に投与する工程を含む。「miR-451活性又は発現の調節薬」は、miR-451の活性又は発現を阻害し、又は低下させる薬剤、例えば本明細書に記載されるとおりのmiR-451阻害薬を含む。miR-451活性又は発現の調節薬はまた、miR-451作動薬又はミメティック、例えば、miR-451配列 (例えば、成熟miR-451、pre-miR-451、又はpri-miR-451) を含むポリヌクレオチド、又はmiR-451発現を増加させる薬剤、例えば転写因子又は成長因子も含む。

#### 【0031】

本明細書で使用されるとき、「成熟赤血球」は終末分化した赤血球を指す。一部の実施

形態では、成熟赤血球はCD71陰性及びTER 119陽性である。「赤血球前駆体」は、BFU-E及びCFU-Eを含む、網赤血球及び成熟赤血球を生成する前駆細胞を指す。赤血球前駆体は、典型的にはCD71、エリスロポエチン受容体、及びc-kitについて陽性である。一実施形態では、調節薬はmiR-451阻害薬であり、miR-451阻害薬の投与後に対象において赤血球前駆体に対する成熟赤血球の比が低下する。本明細書に記載される任意のmiR-451阻害薬、例えばmiR-451配列の全て又は一部と少なくとも部分的に相補的な配列を含む修飾又は非修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドなどが、本方法での使用に好適である。

#### 【0032】

別の実施形態では、調節薬はmiR-451ミメティックであり、miR-451ミメティックの投与後に対象において赤血球前駆体に対する成熟赤血球の比が増加する。一実施形態では、miR-451ミメティックは、成熟miR-451配列を含むポリヌクレオチドである。本明細書には他の好適なmiR-451ミメティックが記載され、それにはmiR-451配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが含まれる。

10

#### 【0033】

本発明はまた、治療後におけるmiR-451阻害薬の除去又は排除方法も包含する。この方法は、miR-451ミメティック又はmiR-451阻害薬に対する結合部位を含むポリヌクレオチドを投与する工程を含み得る。別の実施形態では、本発明は、治療後におけるmiR-451ミメティックの除去又は排除方法を提供する。例えば、miR-451阻害薬又はmiR-451標的由来の結合領域を含むポリヌクレオチドが投与されることで、miR-451ミメティックが除去され得る。結合部位領域は、好ましくは、miR-451のシード領域と相補的な配列を含む。シード領域は、成熟miRNAの塩基2~8にわたるmiRNAの5'部分であり、これは標的認識に重要である。一部の実施形態では、結合部位領域は、YWHAZ(14-3-3)、CAB39、VAPA、又はCUGBP2などの、miR-451の1つ又は複数の標的の3'UTR由来の配列を含み得る。

20

#### 【0034】

本発明はまた、細胞におけるYWHAZ(14-3-3)、CAB39、VAPA、又はCUGBP2の発現を制御する方法も含み、この方法は、細胞をmiR-451調節薬と接触させる工程を含む。一実施形態では、YWHAZ(14-3-3)、CAB39、VAPA、又はCUGBP2の発現は、miR-451ミメティックの投与後に細胞において低下する。別の実施形態では、YWHAZ(14-3-3)、CAB39、VAPA、又はCUGBP2の発現は、miR-451阻害薬の投与後に細胞において増加する。細胞はインビトロであっても、又はインビボであってもよい。一実施形態では、細胞は赤血球前駆体、網赤血球、又は赤血球である。

30

#### 【0035】

本発明はまた、miR-451の阻害薬又はミメティックと薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物も包含する。臨床適用が企図される場合、医薬組成物は、目的の適用に適切な形態で調製され得る。概してこれは、発熱性物質、並びにヒト又は動物に有害であり得る他の不純物を本質的に含まない組成物を調製することを伴い得る。

40

#### 【0036】

一実施形態では、医薬組成物は有効用量のmiR-451阻害薬を含む。例えば、医薬組成物は、本明細書に記載されるようなmiR-451を標的とする修飾又は非修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドの有効用量を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、配列番号4、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、及び配列番号20からなる群から選択される配列を有する修飾又は非修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。別の実施形態では、医薬組成物は、有効用量のmiR-451ミメティック又はmiR-451作動薬を含む。「有効用量」は、有益な又は所望される臨床結果を達成するのに十分な量である。本発明のmiRNA阻害薬又はmiRNA作動薬/ミメティックの有効用量は、約

50

1 mg / kg ~ 約 100 mg / kg、約 2.5 mg / kg ~ 約 50 mg / kg、又は約 5 mg / kg ~ 約 25 mg / kg であり得る。何が有効用量と見なされ得るかについての正確な決定は、体格、年齢、治療される障害の種類（例えば赤血球増加症又は特定の種類の貧血症）、及び阻害薬又は作動薬の性質（例えば発現構築物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド二重鎖等）を含め、各患者の個別的な要因に基づき得る。従って、投薬量は、当業者が本開示及び当該技術分野における知識から容易に確定することができる。一部の実施形態では、特定の治療期間にわたって複数用量が対象に投与される。例えば、ある用量の miR - 451 阻害薬又は miR - 451 ミメティック / 作動薬が、1 日 1 回、週 1 回、月 1 回、2 ヶ月に 1 回、3 ヶ月に 1 回、又は半年に 1 回、対象に投与され得る。特定の実施形態では、対象は最初の時間点において初回用量の投与を受け、これは、1 つ又は複数の後続の用量又は維持用量より高い用量である。

10

#### 【0037】

コロイド分散系、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、並びに水中油乳剤、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質ベース系が、miRNA 機能のオリゴヌクレオチド阻害薬、miRNA 作動薬をコードするポリヌクレオチド、又は特定の miRNA 阻害薬若しくは作動薬を発現する構築物の送達媒体として使用され得る。本発明の核酸を対象に送達するのに好適な市販の脂肪乳剤には、イントラリピッド (Intralipid) (登録商標)、リポシン (Liposyn) (登録商標)、リポシン (Liposyn) (登録商標) II、リポシン (Liposyn) (登録商標) III、ニュートリリピッド (Nutrilipid)、及び他の同様の脂質乳剤が含まれる。生体内での送達媒体としての使用に好ましいコロイド系は、リポソーム（すなわち人工膜小胞）である。かかる系の調製及び使用は当該技術分野において公知である。例示的製剤は、米国特許第 5,981,505 号；米国特許第 6,217,900 号；米国特許第 6,383,512 号；米国特許第 5,783,565 号；米国特許第 7,202,227 号；米国特許第 6,379,965 号；米国特許第 6,127,170 号；米国特許第 5,837,533 号；米国特許第 6,747,014 号；及び国際公開第 03/093449 号（これらは全体として参照により本明細書に援用される）にも開示されている。

20

#### 【0038】

概して、送達媒体を安定にし、かつ標的細胞によって取り込ませるのに適切な塩及び緩衝液を用いることが望ましい。本発明の水性組成物は、薬学的に許容可能な担体又は水性媒体中に溶解又は分散した阻害薬ポリヌクレオチド又は miRNA ポリヌクレオチド配列（例えばリポソーム若しくは他の複合体又は発現ベクター）を含む有効量の送達媒体を含む。語句「薬学的に許容可能な」又は「薬理学的に許容可能な」は、動物又はヒトに投与したとき有害反応、アレルギー反応、又は他の不都合な反応を生じない分子実体及び組成物を指す。本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容可能な担体」は、医薬品、例えばヒトへの投与に好適な医薬品の製剤化における使用に許容される溶媒、緩衝剤、溶液、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体及び剤の使用は、当該技術分野において公知である。任意の従来の媒体又は薬剤が本発明の活性成分と適合しない場合を除き、治療組成物におけるその使用が企図される。補足的な活性成分も、それらが組成物のベクター又はポリヌクレオチドを不活性化しないことを条件に、組成物に組み込まれ得る。

30

40

#### 【0039】

本発明の活性組成物は従来の医薬製剤を含み得る。本発明に係るこれらの組成物の投与は、経路によって標的組織が利用可能となる限り、任意の一般的な経路によることができる。これには、経口、経鼻、又は口腔内が含まれる。或いは、投与は、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内又は静脈内注射によってもよい。特定の実施形態では、本発明の医薬組成物は、静脈内投与又は皮下投与用に製剤化される。かかる組成物は、通常は本明細書に記載されるとおりの薬学的に許容可能な組成物として投与され得る。

#### 【0040】

活性化合物はまた、非経口投与又は腹腔内投与されてもよい。例示として、遊離塩基又

50



は薬理学的に許容可能な塩としての活性化化合物の溶液を、好適にはヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と混合して水中に調製することができる。分散体もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物中に、及び油中に調製することができる。通常の保存及び使用条件下において、これらの製剤は概して防腐剤を含み、微生物の増殖を防止する。

#### 【0041】

注射用途に好適な医薬品形態には、例えば、滅菌水溶液又は分散液、及び滅菌注射用溶液又は分散液の即時調製用の滅菌粉末が含まれる。概してこれらの製剤は無菌で、かつ注射がし易い程度に流動性である。製剤は製造及び保存条件下で安定していなければならない。適切な溶媒又は分散媒は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、その好適な混合物、及び植物油を含有し得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散体の場合には要求される粒度を維持することにより、及び界面活性剤の使用により維持することができる。微生物作用の防止は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによりもたすことができる。多くの場合、等張剤、例えば糖又は塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中に使用することによってもたらされ得る。

10

20

#### 【0042】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて任意の他の成分（例えば上記に列挙するとおり）と共に、溶媒中に活性化化合物を適切な量で組み込み、次にろ過滅菌することにより調製され得る。概して分散体は、様々な無菌活性成分を、基本分散媒と、例えば上記に列挙するとおりの所望の他の成分とを含む無菌媒体に組み込むことにより調製される。滅菌注射用溶液の調製用滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥及び凍結乾燥技法を含み、この技法は1つ又は複数の活性成分＋任意のさらなる所望の成分の粉末を、予め滅菌ろ過されたその溶液から得るものである。

#### 【0043】

本発明の組成物は、概して中性形態又は塩形態で製剤化され得る。薬学的に許容可能な塩には、例えば、無機酸（例えば、塩酸又はリン酸）から、又は有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸）から誘導される酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基と形成される）などが含まれる。タンパク質の遊離カルボキシル基と形成される塩もまた、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は水酸化第二鉄）から、又は有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン）から誘導することができる。

30

#### 【0044】

製剤化後、溶液は好ましくは、投薬製剤に適合する方法で、かつ治療上有効な量で投与される。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセルなどの様々な剤形で容易に投与され得る。例えば水溶液での非経口投与については、概して溶液が好適に緩衝され、初めに希釈液が、例えば十分な量の生理食塩水又はグルコースで等張性にされる。かかる水溶液が、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与及び腹腔内投与に使用され得る。好ましくは、当業者に公知のとおり、特に本開示をふまえて、滅菌水性媒体が用いられる。例示として、単一用量を1mlの等張性NaCl溶液に溶解し、1000mlの皮下注入液に添加するか、或いは計画された注入部位に注射してもよい（例えば、“Remington’s Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580を参照のこと）。治療される対象の条件に応じて、投薬量がいくらか異なることが必然的に生じ得る。いずれにしても、投与責任者が個々の対象に適切な用量を決定し得る。さらに、ヒトへの投与では、製剤は、アメリカ食品医薬局生物製剤部（FDA Office of Biologics）による基準が要件とするとおりの無菌性、発熱原性、一般安全性、及び純度の基準を満たさなければならない。

40

50

## 【 0 0 4 5 】

本発明は以下のさらなる例によりさらに説明され、これらの例は、限定するものとして解釈されてはならない。当業者は、本開示をふまえて、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく開示される具体的な実施形態に多くの変更を加えることができ、それでもなお同様の又は類似した結果を達成し得ることを理解しなければならない。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 4 6 】

実施例 1 . m i R - 4 5 1 ノックアウトマウスは赤血球成熟の不全を示す

m i R - 4 5 1 発現を野生型マウスの様々な組織においてノーザンブロット分析により評価し、脾臓及び骨髓を含む造血組織で高度に発現することが見出された ( 図 1 ) 。かかる組織における m i R - 4 5 1 の機能をさらに調べるため、m i R - 4 5 1 ノックアウトマウスを作成した。m i R - 4 5 1 を標的とするベクターを生成するため、m i R - 1 4 4 と m i R - 4 5 1 との p r e - m i R 配列間に位置する保存性が低い D N A エLEMENT の上流に延在する 4 . 3 k b 断片 ( 5 ' アーム ) を S a c I I 及び N o t I で消化し、p G K n e o F 2 L 2 d t a を標的とするプラスミドに、l o x P 部位及び F r t に隣接するネオマイシンカセットの上流でライゲートした。保存性が低い領域から下流に m i R - 4 5 1 p r e - m i R の外側へ延在する 3 . 2 k b 断片 ( 3 ' アーム ) を S a l I 及び H i n d I I I で消化し、ネオマイシン耐性カセットと D t a ネガティブ選択カセットとの間でベクターにライゲートした。5 ' 及び 3 ' プローブによるサザンブロット分析により、破壊された対立遺伝子を有する標的 E S 細胞を同定した。m i R - 4 5 1 を標的とする 3 つの E S クローンが同定され、胚盤胞注入に使用した。得られたキメラマウスを C 5 7 B L / 6 と交配させて、突然変異体対立遺伝子の生殖細胞系列伝達を達成した。m i R - 4 5 1 n e o / n e o マウスを、遍在的に発現した C A G - c r e 導入遺伝子を有する C 5 7 B L / 6 マウスと交配させることにより、m i R - 4 5 1 完全突然変異マウスを生成した。

## 【 0 0 4 7 】

m i R - 4 5 1 の標的化された欠失から、m i R - 4 5 1 ヘテロ接合体動物の骨髓におけるハプロ不全レベルの m i R - 4 5 1 、及び m i R - 4 5 1 ノックアウト ( K O ) 動物における成熟 m i R - 4 5 1 の完全な欠損が明らかとなった ( 図 2 A ) 。m i R - 4 5 1 K O 動物はメンデル比で生まれた ( 表 1 ) 。しかしながら、成体ノックアウト動物 ( 8 週齢 ) のヘマトクリットは野生型同腹仔と比較して著しく低下した ( 図 2 B ) 。加えて、全載分析により明らかとなっており、m i R - 4 5 1 K O 動物は胎生期 E 1 4 . 5 日目に胎児貧血を示した ( 図 3 ) 。

## 【 0 0 4 8 】

## 【 表 1 】

表 1. miR-451 ヘテロ接合体交雑から生じた子孫の分布

miR-451 遺伝子型 (14 匹の動物)	野生型	ヘテロ接合体	ノックアウト
予測値	3.5 (25%)	7 (50%)	3.5 (25%)
実測値	2 (14%)	9 (64%)	3 (22%)

## 【 0 0 4 9 】

m i R - 4 5 1 対立遺伝子の一方又は双方が欠損した動物は、赤血球成熟不全を示した。m i R - 4 5 1 野生型、ヘテロ接合体、及びノックアウトマウスから単離した骨髓細胞及び胎児肝細胞を D M E M / 1 0 % F B S 中に再懸濁した。新鮮に単離した骨髓細胞及び胎児肝細胞を、マウス I g G ( 2 0 0 μ g / m L 、 B D P h a r m i n g e n , S a n D i e g o , C A ) の存在下に P B S / 2 % F B S 中 4 で免疫染色して、F c 受容体をブロックした。細胞を P

E コンジュゲート抗 T e r 1 1 9 抗体 ( 1  $\mu$  g / m L BD Pharmingen, San Diego, CA )、F I T C コンジュゲート抗 C D 7 1 抗体 ( EBiosciences、1  $\mu$  g / m L、City ) と共に 1 5 分間インキュベートし、次に A P C コンジュゲートアネキシン V と共に 1 5 分間インキュベートした。Becton Dickinson FACSCalibur ( Franklin Lakes, NJ ) でフローサイトメトリーを実施した。胎生期 E 1 6 . 5 日目、フローサイトメトリーにより評価したとき、ヘテロ接合動物において成熟 C D 7 1 <sup>+</sup> / T E R 1 1 9 <sup>+</sup> 赤血球集団が著しく減少し、ノックアウト動物で過度の減少があった ( 図 4 A 及び図 4 B )。成体脾臓の組織学的分析から、野生型同腹仔と比較したときの m i R - 4 5 1 ノックアウトマウスにおける赤血球前駆体の増加が明らかとなった ( 図 5 )。成体骨髄のフローサイトメトリー分析から、ヘテロ接合動物における成熟 C D 7 1 <sup>+</sup> / T E R 1 1 9 <sup>+</sup> 赤血球集団の減少及びノックアウトにおける過度の減少を含む同様の赤血球分化不全が明らかとなった ( 図 6 A 及び図 6 B )。

10

#### 【 0 0 5 0 】

m i R - 4 5 1 ノックアウト動物における赤血球生成を評価するため、野生型動物及び m i R - 4 5 1 ノックアウト動物の双方を溶血剤フェニルヒドラジンで刺激した。フェニルヒドラジンを先述のとおり 4 0 m g / k g の用量で皮下注射した ( Socolovsky et al. (2001) Blood, Vol. 98: 3261-3273 )。フェニルヒドラジン注射後 3 日目、6 日目、及び 9 日目に、処置した動物においてヘマトクリットを計測した。図 7 に示すとおり、m i R - 4 5 1 ノックアウト動物はフェニルヒドラジン刺激後にヘマトクリットの著しい不足を示したことから、m i R - 4 5 1 ノックアウト動物は高い赤血球形成速度を達成できないことが示唆される。

20

#### 【 0 0 5 1 】

これらのデータは、m i R - 4 5 1 が赤血球分化の過程を決定的に制御することを示している。m i R - 4 5 1 が赤血球分化を制御する機構についてさらに解明するため、標的予測ソフトウェアを使用して m i R - 4 5 1 の標的候補を同定した。この分析に基づけば、m i R - 4 5 1 はシャペロン / 足場分子の Y W H A Z ( 1 4 - 3 - 3 ) の発現を阻害することによって赤血球分化を制御し得る。Y W H A Z ( 1 4 - 3 - 3 ) はその 3 ' U T R に保存された m i R - 4 5 1 結合部位を含み ( 図 8 A )、このタンパク質の発現は m i R - 4 5 1 ノックアウト動物において著しくアップレギュレートされる ( 図 8 B )。Y W H A Z ( 1 4 - 3 - 3 ) は造血細胞中で高度に濃縮されることが示されており、エリスロポエチン ( E P O ) 受容体などの成長因子受容体の下流のシグナルを調節することによって R B C の分化に影響を及ぼすものと思われる ( 図 9 ) ( Barry et al. (2009) J. Biol. Chem., Vol. 284: 12080-12090 )。

30

#### 【 0 0 5 2 】

実施例 2 . m i R - 4 5 1 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは生体内での m i R - 4 5 1 発現を消失させ、成熟赤血球数を低下させる。

異常赤血球生成に関連する障害における m i R - 4 5 1 ノックダウンの治療可能性を調べるため、m i R - 4 5 1 の分解を特異的に誘導するようにアンチセンスオリゴヌクレオチド ( 抗 4 5 1 ) を設計した。アンチセンスオリゴヌクレオチドは成熟 m i R - 4 5 1 配列と相補的であり、5 ' - A A C U C A G U A A U G G U A A C G G U U U - 3 ' ( 配列番号 4 ) の配列を有した。ミスマッチを有する配列 5 ' - A A C A G U A A U G G U A A C G G U U U - 3 ' ( 配列番号 5 ) を対照として使用した。抗 m i R - 4 5 1 及びミスマッチを有する対照 ( m m - 4 5 1 ) における全てのヌクレオチドを 2 ' - O M e 修飾し、5 ' 末端の 2 塩基及び 3 ' 末端の 4 塩基がホスホロチオエートインターヌクレオチド ( internucleoside ) を含んだ。パッセンジャー鎖の 3 ' 末端にヒドロキシプロリノール又は炭化水素 ( C 4 ~ C 8 ) リンカーを介してコレステロールを結合した。野生型 C 5 7 B L / 6 マウスに、生理食塩水、8 0 m g / k g の抗 4 5 1、又は 8 0 m g / k g のミスマッチを有する対照を 2 回静脈内注射した。2 つの注射は 2 4 時間空けた。2 回目の注射の 4 8 時間後、発現及び F A C s 分析のため動物から骨髄を回収した。m i R - 4 5 1 についての骨髄のノーザンブロット分析から、抗 4 5 1 が生体内で m i R - 4 5 1 レベルを有効

40

50

に低下させた一方、ミスマッチを有する対照が効果を有しなかったことが実証された（図 10A）。処置した動物から単離した骨髓のフローサイトメトリー分析から、ミスマッチを有する対照の投与を受けた動物と比較したとき、抗 *miR* - 451 オリゴヌクレオチドで処置した動物では成熟 CD71 - / TER119 + 赤血球の数が減少し、それに対応して未熟赤血球の数が増加したことが明らかとなった（図 10B 及び図 10C）。

#### 【0053】

これらの結果は、*miR* - 451 発現が生体内で効率的に調節され得ること、及び *miR* - 451 阻害薬が、異常赤血球生成に関連する障害、例えば赤血球増加症の治療における新規な治療手段を提供することを示唆している。

#### 【0054】

10

実施例 3．切断型（truncated）阻害薬によるアンチセンスオリゴヌクレオチド治療は生体内で *miR* - 451 レベルを低下させ、赤血球数を変化させる。

マイクロRNAのシード領域を標的化し、かつマイクロRNAのより 3' 末端側に体系的に拡張するように、8 ~ 16 ヌクレオチドの範囲の長さの、成熟 *miR* - 451 配列を標的とする合成オリゴヌクレオチドの別の系列を設計した。これらのオリゴヌクレオチドは 1 つ又は複数の二環状ヌクレオシド（例えば、LNA）を含んだ。その配列を以下に掲載する：

8 nt オリゴ：5' - AACGGUUU - 3'（配列番号 6）

10 nt オリゴ：5' - GUAAACGGUUU - 3'（配列番号 7）

12 nt オリゴ：5' - UGGUAAACGGUUU - 3'（配列番号 8）

20

14 nt オリゴ：5' - AAUGGUAAACGGUUU - 3'（配列番号 9）

16 nt オリゴ：5' - GUAAUGGUAAACGGUUU - 3'（配列番号 10）

#### 【0055】

上記に掲載した 5 つのオリゴヌクレオチドに加え、14 ~ 22 ヌクレオチド長の範囲の、成熟 *miR* - 451 配列と相補的な配列を有する抗 *miR* - 451 オリゴヌクレオチドも設計した。これらの抗 *miR* - 451 オリゴヌクレオチドにおける全てのヌクレオシドは 2' - OMe 修飾され、全ての塩基を連結するホスホロチオエートインターヌクレオシドを含んだ。

#### 【0056】

上記に記載する抗 *miR* - 451 オリゴヌクレオチドのうちの 1 つをマウスに静脈内注射し、処置の 2 日後に様々な組織を採取する。*miR* - 451 についてのノーザンブロット分析を行い、*miR* - 451 発現の抑制における抗 *miR* - 451 オリゴヌクレオチドの各々の有効性を決定する。加えて、FACS 分析及びヘマトクリットの決定のため、処置したマウスから骨髓試料及び血液試料を得る。結果は、抗 *miR* - 451 オリゴヌクレオチドが生体内で *miR* - 451 発現を有効に抑制し得ることを示すものと予想され、*miR* - 451 発現の低下は、ヘマトクリット及び成熟 CD71 - / TER119 + 赤血球数の低下と相関する。

30

#### 【0057】

実施例 4．*anti miR* - 451 は真性赤血球増加症の異種移植モデルにおいてヘマトクリットを低下させる

40

生体内での *miR* - 451 の発現に対する *anti miR* - 451 及びミスマッチ対照 *anti miR* オリゴヌクレオチドの効果を調べるため、C57BL/6 マウスを、生理食塩水、25 mg / kg のミスマッチオリゴヌクレオチド、又は 25 mg / kg の *anti miR* - 451 のいずれかにより 2 日連続で処置した。*anti miR* - 451 オリゴヌクレオチドは成熟 *miR* - 451 の 16 ヌクレオチドと相補的であり、5' - AGTAATGGTAACGGTT - 3'（配列番号 21）の配列を有した。ミスマッチを有する対照 *anti miR* は、哺乳動物では発現しない *C. elegans* (*C. elegans*) *miRNA* に特異的であり、5' - TCC TAGAAGAGTAGA - 3'（配列番号 22）の配列を有した。*anti miR* - 451 及びミスマッチを有する対照 *anti miR* の双方とも、デオキシリボヌクレオチド（DNA）とロックド核酸（LNA）ヌクレ

50

オシドとの組み合わせ（9個のLNA及び7個のDNA）を含み、かつ完全にホスホロチオレート化された骨格を含んだ。

【0058】

雄C57BL/6マウス（8～10週齢）に、生理食塩水、25mg/kgのanti-miR-451、又は25mg/kgのミスマッチ対照anti-miRを2回注射した。注射は24時間おいて実施した。2回目の注射の48時間後、マウスを犠牲にし、大腿骨及び脛骨をDMEM+10%ウシ胎仔血清でフラッシュすることにより骨髓を回収した。骨髓からRNAを回収し、マイクロRNAのノーザンブロットを実施した。ノーザンブロット分析は、anti-miR-451治療群に成熟miR-451が存在しないことを示すが、ミスマッチ治療群又は生理食塩水治療群はいずれも、miR-451レベルに影響はなかった（図11）。

10

【0059】

真性赤血球増加症（PV）の血液学的パラメータに対するanti-miR-451の効果を調べるため、本発明者らはPVのマウス異種移植モデルを利用した（Wernig et al. (2006) Blood, Vol. 107(11): 4274-4281）。このモデルはヒトPVのパラメータの多くを忠実に反復し、この疾患の広く認められたマウスモデルである。成体類似遺伝子型BALB/C動物をCharles River Laboratoriesから購入した。初めにドナーマウスに5-フルオロウラシルを注射して未分化造血幹細胞の分裂を刺激した。4日後、それらの動物から骨髓を回収し、赤血球を選択的に溶解し、それらの細胞を、成長を補助し、かつウイルス認識タンパク質の発現を刺激するように設計されたサイトカインのカクテルを含む培地中で培養した。翌日、それらの細胞を、JAK2-V617F突然変異体ヒトキナーゼ又は対照としての野生型ヒトJAK2キナーゼのいずれかを発現するレトロウイルスに感染させた。双方のウイルス構築物とも、内部リボソーム侵入部位からGFPを発現した。それらの細胞を再び一晚培養することにより、ウイルスゲノムを挿入し、それぞれのJAK2アイソフォームを発現させた。感染の翌日、感染手順を繰り返し、細胞を静脈注射に好適な媒体中に懸濁した。

20

【0060】

レシピエント動物に900cGyを照射し、約4～10×10<sup>5</sup>個の再懸濁細胞をレシピエント動物に静脈内注射した。次にこれらの動物を、抗生物質を投与して無菌環境に收容した。次に動物を7日間毎に瀉血させた。この間、GFP陽性細胞の割合をフローサイトメトリーによりモニタし、Hemavet 850（Drew Scientific, Dusseldorf Germany）を利用して血液学的パラメータを計測した。GFP陽性の割合は、形質導入された移植細胞の割合に相当する。移植後2～3週間で移植及び血液学的修飾が顕著となった。移植後5週間で移植が完了し、それらのパラメータの変化が定常状態となった。野生型ヒトJAK2キナーゼの発現は血液学的パラメータに効果を有しないため、従って好適な対照である。

30

【0061】

移植後5週間目、負荷用量25mg/kgのanti-miR-451（配列番号21）又はミスマッチ対照（配列番号22）オリゴヌクレオチドのいずれかを、PV動物及び対照動物の双方に2日連続で2回静脈内注射した。次にこれらの動物に、より低用量（10mg/kg）を3日毎に静脈内注射して、miR-451の十分なノックダウンを維持した。7日毎にHemavet 850（Drew Scientific, Dusseldorf Germany）を使用して血液学的パラメータを計測した。注射及び血液学的パラメータのモニタリングは、初回の注射後6～8週間継続した。興味深いことに、本発明者らは、PVマウスにおけるanti-miR-451療法の開始から4週間後にヘマトクリットの低下を観察した（図12）。この低下は、anti-miR-451で処置したPVマウスにのみ観察され、ミスマッチ対照オリゴヌクレオチドで処置したPVマウスでは観察されなかった。

40

【0062】

これらの実験の結果は、miR-451成熟配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドが、生体内でmiR-451発現を有効に抑制すること、及びPVのマウスモデルにおいて、anti-miR-451オリゴヌクレオチドによる処置によりヘマトクリッ

50

トが低下することを示す。従ってmiR-451は、骨髓増殖性疾患、例えば赤血球増加症の治療についての新規治療標的に相当する。

【0063】

実施例5. anti-miR-451はヒトCD34陽性造血細胞における赤血球系分化を減弱させる。

miR-451のマウス突然変異体は、胚及び成体の双方の赤血球分化不全を示す（実施例1を参照のこと）。anti-miR-451がヒト造血幹細胞の分化パターンに影響を及ぼす能力を調べるため、本発明者らはヒトCD34陽性細胞を購入し、Amaxa Human CD34<sup>+</sup> Cell Nucleofector Kit (Lonza, USA) を使用してanti-miR-451（配列番号21）又はミスマッチ対照（配列番号22）のいずれかのヌクレオフェクションを実施した。凍結された精製CD34<sup>+</sup>ヒト細胞を解凍し、ヌクレオフェクション前に1～2時間培養した。1×10<sup>6</sup>細胞を12ウェルプレートの単一のウェルに播いた。細胞を200×gで回転させ、ヌクレオフェクション溶液（Nucleofection Solution）（Lonza, USA）に再懸濁した。次に、100μLの細胞懸濁液をanti-miR-451又はミスマッチanti-miRのいずれかに添加して（アンチセンスオリゴヌクレオチドの説明については実施例4を参照のこと）、100nMの最終濃度のanti-miR-451又はミスマッチ対照を含む溶液を得た。この溶液をキュベットに移した。ヌクレオフェクター（Nucleofector）装置（Lonza, USA）のU-008プログラムでヌクレオフェクションを実施した。プログラムが終了したところで、細胞を500μLの培養培地と組み合わせた。次に培地を2～3日おきに10日間にわたり交換した。

10

20

【0064】

ヌクレオフェクション後、細胞を培養培地中で10日間インキュベートし、自発的に分化させた。これらの細胞は全ての造血細胞系譜に自発的に分化する。10日目、細胞を赤血球系マーカーCD71及びTer119について染色し、フローサイトメトリーにより分化を分析した。細胞をマウスIgG（200μg/mL、BD Pharmingen）の存在下にPBS/2%FBS中4℃で免疫染色して、Fc受容体をブロックした。細胞をPEコンジュゲート抗Ter119抗体（1μg/mL、BD Pharmingen）、FITCコンジュゲート抗CD71抗体（EBiosciences、1μg/mL）と共に15分間インキュベートした。Becton Dickinson FACSCalibur（Franklin Lakes, NJ）でフローサイトメトリーを実行した。

30

【0065】

最も分化した赤血球は領域4（R4）にあり、一方、分化が低い赤血球系細胞は領域2（R2）にある（図13を参照のこと）。各領域にゲーティングされた割合を、図13のそれぞれのゲート内に掲載する。興味深いことに、anti-miR-451をヌクレオフェクトした細胞は、ミスマッチをヌクレオフェクトした細胞と比較したとき赤血球系成熟の減弱を示した（図13）。これらのデータから、anti-miR-451によるmiR-451の障害が、miR-451突然変異体マウスに認められるものと同様のヒト赤血球成熟の妨害をもたらすことが示唆される。

【0066】

本明細書において考察され、及び引用される全ての刊行物、特許及び特許出願は、全体として参照により本明細書に援用される。記載される特定の方法論、プロトコル及び材料は異なってもよいが、開示される本発明がそれらに限定されないことが理解される。また、本明細書で使用される用語法は、あくまでも特定の実施形態を記載することを目的としているに過ぎず、本発明の範囲を限定する意図はないことも理解され、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるものとする。

40

【0067】

当業者は、本明細書に記載される発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識し、又はルーチン程度の実験を用いて確かめることが可能であろう。かかる均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

【 図 1 】

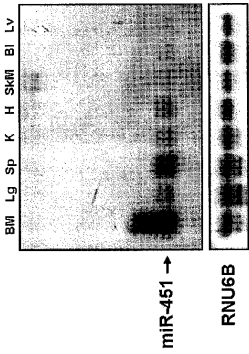
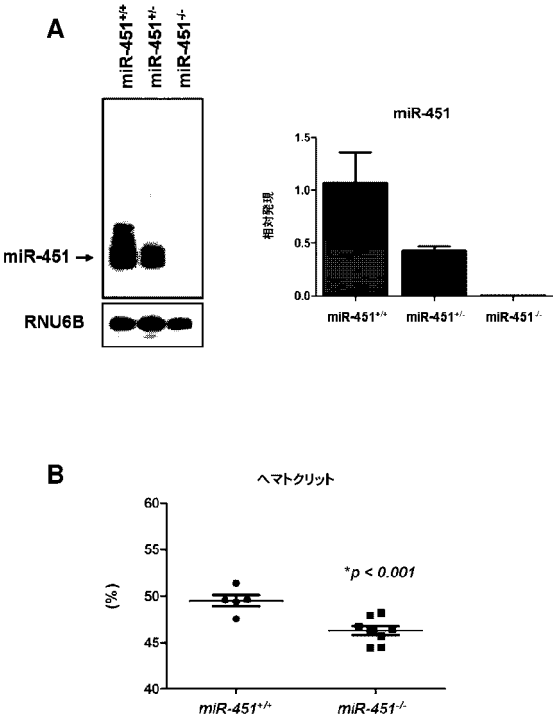


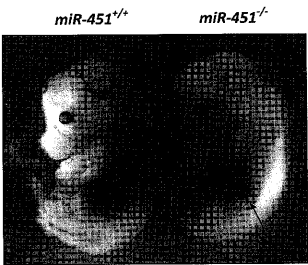
FIGURE 1

【 図 2 】

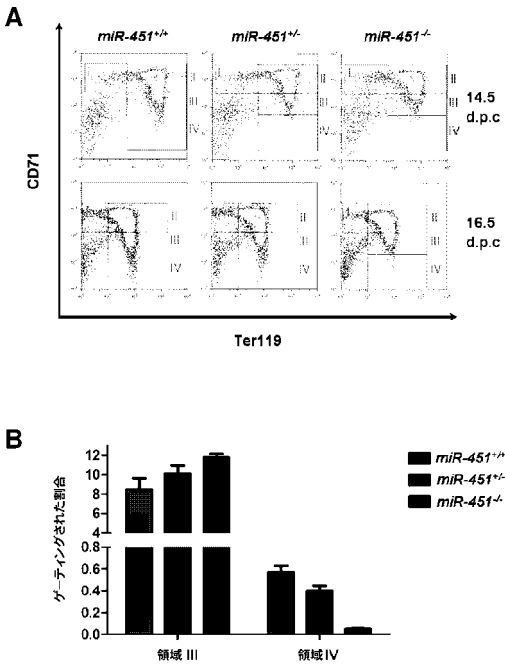


【 図 3 】

FIGURE 3

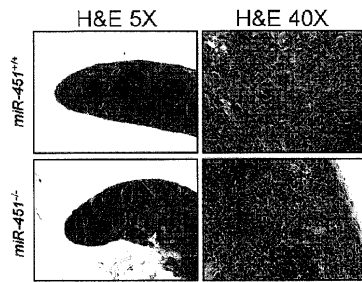


【 図 4 】

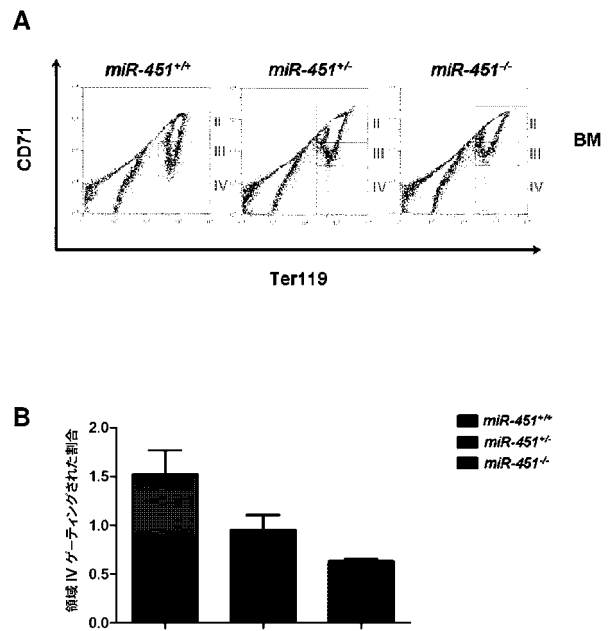


【 図 5 】

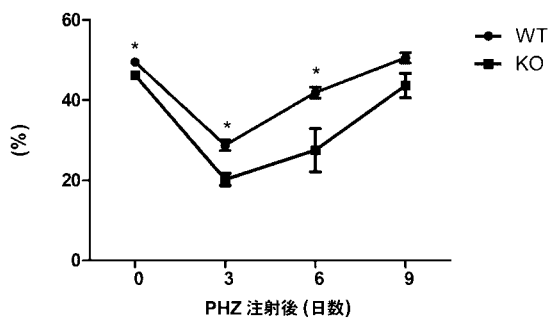
FIGURE 5



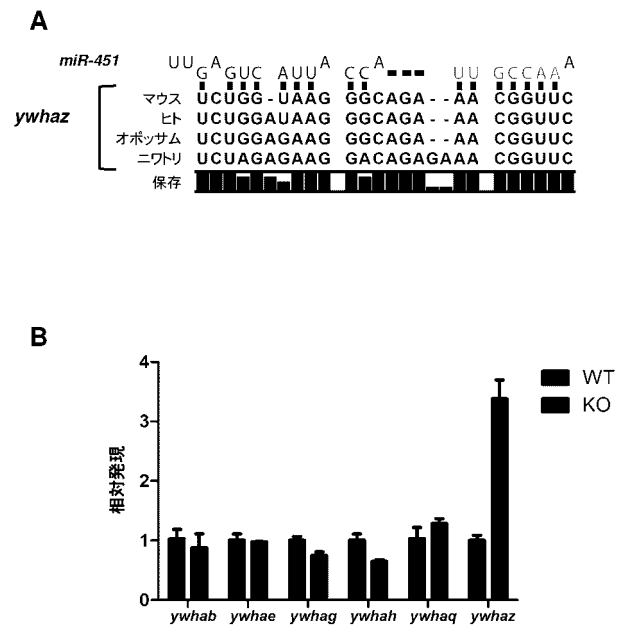
【 図 6 】



【 図 7 】

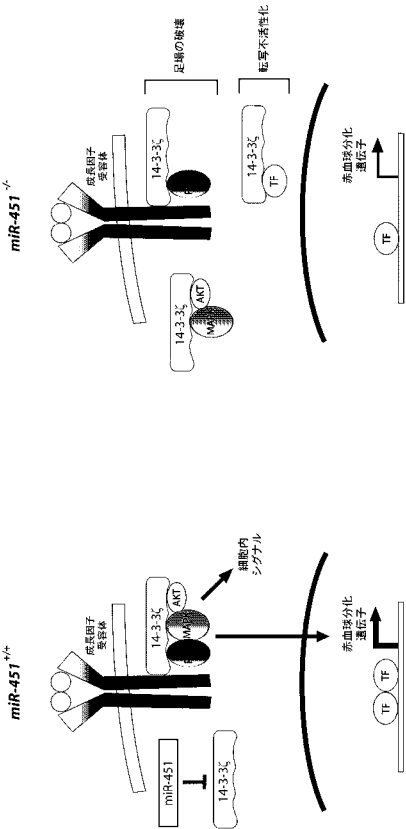


【 図 8 】

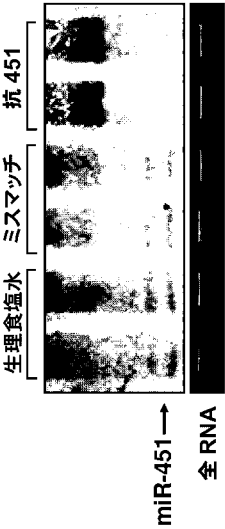




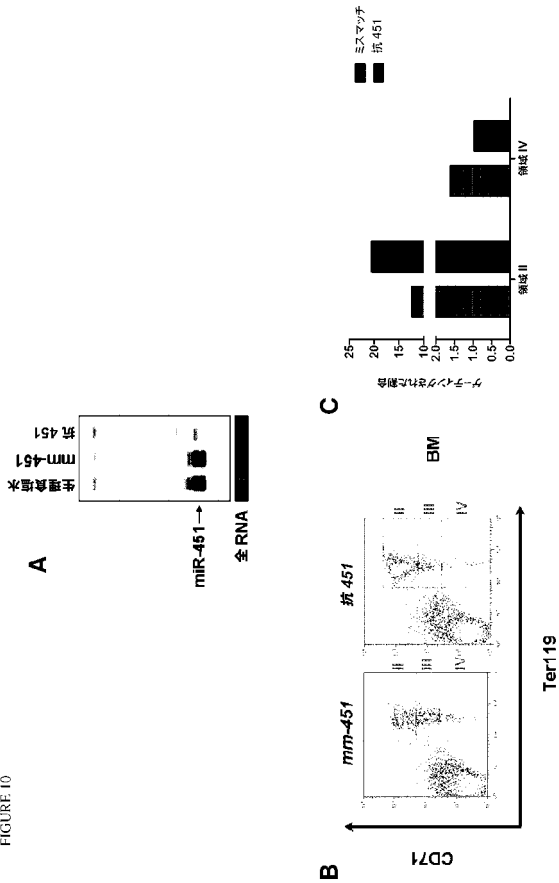
【 図 9 】



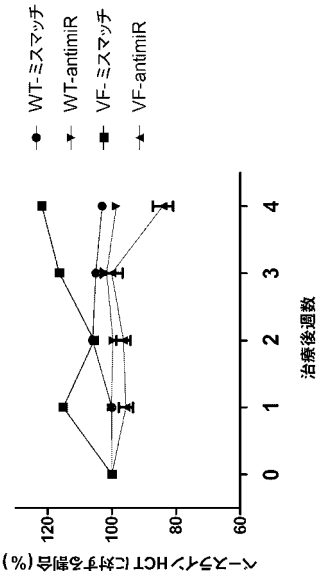
【 図 1 1 】



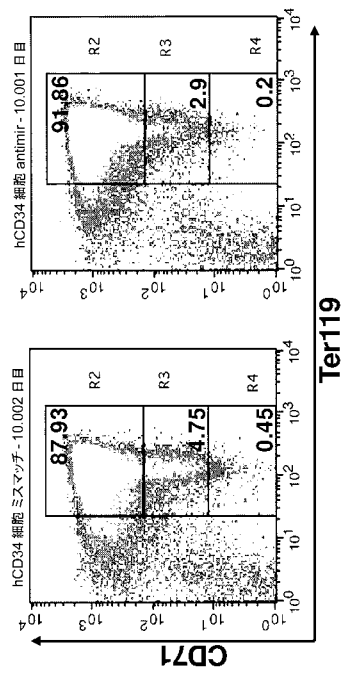
【 図 1 0 】



【 図 1 2 】



【図 13】



【配列表】

2013530160000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US 11/21886
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 48/00; C07H 21/02 (2011.01) USPC - 514/44A, 536/24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 514/44A, 536/24.5  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 514/44, 536/24.5, 23.1. IPC: C12N 15/11 (text search)  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (EPAB, PGPB, UPST, JPAB); Google Scholar; GenCore sequence search (NT) Search terms: microRNA, miR-451, antagomir, antisense oligonucleotide, erythropoiesis, erythroid differentiation, polycythemia vera (PV)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2007/112754 A2 (ELMEN et al.). 11 October 2007 (11.10.2007). Especially pg 3 in 30, pg 5 in 25-28, pg 6 in 1-4, pg 9 in 7-8, pg 99 table 2, SEQ ID NO: 240.	47-50,52,53 1-29, 36-46,51
X — Y	ZHAN et al. MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. Exp Haematol July 2007 Vol 35 No 7 Pages 1015-1025. Pg 4 para 1, pg 17 fig 5, pg 18 fig 6.	30,32 1-29, 31,33-46
Y	DORE et al. A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. Proc Nat Acad Sci 4 March 2008 Vol 105 No 9 Pages 3333-3338. Especially pg 3335 left col para 1.	31
Y	US 2009/0281167 A1 (SHEN et al.). 12 November 2009 (12.11.2009). Especially SEQ ID NO: 57.	10,27,33,42,51
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 doubts 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 "I" 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 24 March 2011 (24.03.2011)		Date of mailing of the international search report <b>13 APR 2011</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/21886

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DICKINS et al. Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. Nature Genetics November 2005 Vol 37 No 11 Pages :1289-1295. Especially abstract, pg 1290 fig 1.	28,29,34,35
Y	BRUCHOVA et al. The Regulated Expression of miRNAs in Normal and Polycythemia Vera Erythropoiesis. Exp Hematol November 2007 Vol 35 No 11 Pages 1657-1667. Especially pg 4 para 6.	1-13,36-46
Y	NAND et al. Leukemic transformation in polycythemia vera: analysis of risk factors. Am J Hematol May 1990, No. 34 Vol 1 Pages 32-35. abstract only.	38

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)		A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)		A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)		A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)		A 6 1 K 35/76	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)		C 1 2 N 15/00	G

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 オルソン, エリック エヌ.

アメリカ合衆国, テキサス州 7 8 7 0 1, オースティン, ウェスト セブンス ストリート 2  
0 1, ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス・システム内

(72)発明者 パトリック, デヴィッド エム.

アメリカ合衆国, テキサス州 7 8 7 0 1, オースティン, ウェスト セブンス ストリート 2  
0 1, ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス・システム内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA11 DA03 EA02 HA17  
4C084 AA13 AA17 MA16 MA66 NA13 NA14 ZA362 ZA422 ZA512 ZA552  
ZA592 ZB262 ZB272 ZC202  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA16 MA66 NA13 NA14 ZA36  
ZA42 ZA51 ZA55 ZA59 ZB26 ZB27 ZC20  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA16 MA66 NA13 NA14 ZA36 ZA42  
ZA51 ZA55 ZA59 ZB26 ZB27 ZC20