

(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2014-525749
(P2014-525749A)

(43) 公表日 平成26年10月2日(2014.10.2)

(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
C 12 N 15/113 (2010.01)	C 12 N 15/00	G		4 B 0 1 8
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	Z N A		4 B 0 2 4
A 23 L 1/30 (2006.01)	A 23 L 1/30	Z		4 B 0 6 5
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A		4 C 0 7 6
A 61 P 1/04 (2006.01)	A 61 P 1/04			4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 25 頁)	最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2014-524381 (P2014-524381)	(71) 出願人	514035383 ヴェストファーレン ヴィルヘルム-ウニ ヴェルジテート ミュンスター ドイツ連邦共和国 4 8 1 4 9 ミュンス ター シュロスプラッツ 2	
(86) (22) 出願日	平成24年8月9日 (2012.8.9)	(74) 代理人	100092093 弁理士 辻居 幸一	
(85) 翻訳文提出日	平成26年2月10日 (2014.2.10)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 賢男	
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/065568	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤	
(87) 國際公開番号	W02013/023982	(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治	
(87) 國際公開日	平成25年2月21日 (2013.2.21)	(74) 代理人	100119013 弁理士 山崎 一夫	
(31) 優先権主張番号	11006650.3	最終頁に続く		
(32) 優先日	平成23年8月12日 (2011.8.12)			
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)			
(31) 優先権主張番号	11185604.3			
(32) 優先日	平成23年10月18日 (2011.10.18)			
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)			

(54) 【発明の名称】 炎症性腸疾患の治療のための新規化合物

(57) 【要約】

本発明は、医薬として使用するための、(a)配列が、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに50%～100%相補的である第1部分；(b)第1部分と第3部分との間にループを形成することができる第2部分；および(c)配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含むかまたはそれからなる第3部分を5'から3'まで連続して含む150ヌクレオチドまでの核酸分子に関する。本発明はさらに、医薬として使用するための、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む25ヌクレオチドまでの核酸分子に関する。他の側面において、本発明は、医薬として使用するための、hsa-miR-320a、ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320およびmmi-miR-320ならびに/またはそれらの1以上のmir-RNA前駆体(単数または複数)からなる群から選択される少なくとも1つの成熟miRNAを含む組成物に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

医薬として使用するための、

- (a)配列が、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに50%～100%相補的である第1部分；
- (b)第1部分と第3部分との間にループを形成することができる第2部分；および
- (c)配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含むかまたはそれからなる第3部分

を5'から3'まで連続して含む150ヌクレオチドまでの核酸分子。

【請求項 2】

前記第1部分が、配列GCCUUCUCUUCGGUUCUCCCG(5'から3'まで)の少なくとも4連続ヌクレオチドを含む、請求項1に記載の核酸分子。

10

【請求項 3】

医薬として使用するための、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む25ヌクレオチドまでの核酸分子。

【請求項 4】

医薬として使用するための、請求項1～3に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 5】

前記宿主細胞がプロバイオティクス菌である、請求項4に記載の使用。

【請求項 6】

前記プロバイオティクス菌が、E.コリ・ニッスル1917またはE.コリ・8178 DSM21844である、請求項5に記載の使用。

20

【請求項 7】

医薬として使用するための、請求項1～3に記載の核酸分子でコーティングされたミクロ粒子。

【請求項 8】

炎症性腸疾患(IBD)の治療に使用するための、請求項1～7のいずれか1項に記載の医薬および／または使用。

【請求項 9】

前記IBDが潰瘍性大腸炎、コーン病、コラーゲン性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病または不確定大腸炎である、請求項8に記載の医薬および／または使用。

30

【請求項 10】

経口投与用である、請求項1～9のいずれか1項に記載の医薬および／または使用。

【請求項 11】

請求項1～10のいずれか1項に記載の核酸分子、宿主細胞、および／またはミクロ粒子を含む食品。

【請求項 12】

対象の消化管の健康を促進または維持するための、請求項1～11のいずれか1項に記載の核酸分子、宿主細胞および／またはミクロ粒子の使用であって、前記対象が正常な健常対象であり、好ましくは正常な健常ヒトである前記使用。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】**【0 0 0 1】**

本発明は、医薬として使用するための、(a)配列が、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに50%～100%相補的である第1部分；(b)第1部分と第3部分との間にループを形成することができる第2部分；および(c)配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含むかまたはそれからなる第3部分を5'から3'まで連続して含む150ヌクレオチドまでの(好ましくは単離された)核酸分子に関する。本発明はさらに、医薬として使用するための、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む25ヌクレオチドまでの核酸分子に関する。他の側面において、本発明は、医薬として使用するための、hsa-miR-320a、ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320およびmmi-miR-320ならびに／またはそれらの1以上のmir-RN

50

A前駆体(単数または複数)からなる群から選択される少なくとも1つの成熟miRNAを含む組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

腸粘膜は、消化管の管腔側の最初の上皮層である。この層は、腸に住む微生物と直接接觸し、従って、外部環境に対して最大かつ最も重要なバリアを構成する。腸粘膜は、栄養素、電解質および水の吸収を可能にするが、管腔内の毒素、抗原および腸内細菌叢に対する効果的な防御を維持する選択透過性バリアとして機能する。

【0003】

上皮は、隣接細胞を機械的に連結し、細胞間隙を密閉する複雑なタンパク質-タンパク質ネットワークであるいわゆるタイトジャンクション(tight junction)の形成によってその選択的バリア機能を維持する。タイトジャンクションは、閉鎖帶とも呼ばれ、体の種々の器官におけるほとんどのタイプの上皮細胞において見られる特殊な細胞-細胞相互作用である。タイトジャンクションは、2つの隣接細胞が密接に結合している部位であり、それらの膜は連結されて消化管内容物に対する事実上の不透過性バリアを形成する。タイトジャンクションは、2つの隣接細胞の膜間の接触を提供する高密度に詰め込まれたタンパク質複合体を含む。タイトジャンクションの機能の1つは、細胞間隙を介した分子およびイオンの通過の制御である。タイトジャンクションはまた、傍細胞輸送、すなわち上皮細胞間の細胞間隙を介した輸送の主要なバリアとなり、このような分子およびイオンの通過を予防することができる。その結果として、物質は、該組織を通過するためには、例えば拡散または能動輸送によって上皮細胞に入り込まなければならない。これは経細胞輸送と呼ばれ、このような輸送は、例えばどのような物質が腸粘膜の通過が可能であるかに関する制御を行う。上皮は、細胞間隙を介した水および溶質の移動を抑制する能力に応じて'タイト(tight)'または'漏出性(leaky)'と分類される。

10

20

30

【0004】

腸の重要な仕事の1つは、外部環境からの傷害性物質の吸収を抑制するための防御バリアを形成することである。この防御機能は、主に腸粘膜のバリア特性に依存する。腸粘膜の透過性は、少なくとも部分的に、腸上皮細胞のタイトジャンクションの強度によって決定される。

【0005】

個体によって、グルテンおよびカゼインなどの食物成分を含む、タイトジャンクションに影響を及ぼす可能性のある多くの因子が存在する。しかしながら、E.コリ(E. coli)の特定の病原性株、サルモネラ(Salmonella)およびC.ディフィシル(C. difficile)などの感染性生物もまた、上皮細胞間のタイトジャンクションタンパク質複合体を破壊し、感染を引き起こす能力を有する。タイトジャンクションの破壊によって、腸粘膜上皮のバリア特性が低下し、漏出性消化管が生じる可能性がある。

40

【0006】

ストレスの多い状況および/または免疫抑制におけるタイトジャンクションの破壊による、魚を含む動物が遭遇する腸粘膜の消化管バリアの機能障害は、敗血症および/または毒血症を引き起こし、動物における飼料効率の低下またはヒトにおける食物摂取の低下を引き起こす可能性がある。

【0007】

現在、家畜栄養において、消化管バリア特性には注意がほとんど向けられていない。粘膜完全性を改善するための治療または栄養補給は十分には知られていない。しかしながら、特定の栄養素、例えばアミノ酸のグルタミンが消化管透過性の低下に役立ち、粘膜バリアの機能の改善をもたらすことができることを示唆する散発的な報告がなされている。

50

【発明の概要】

【0008】

本発明の基礎をなす技術的課題は、腸粘膜の経上皮電気抵抗を増加させるのに役立つ手段および方法を提供することである。

50

【0009】

本発明はこの必要性に取り組む。従って、本発明は、前記技術的課題に対する解決策として、医薬として使用するための、好ましくは単離された、配列AAAAGCUGGUUGAGAGGGCGA(5'から3'まで)からなるかまたはそれを含む核酸分子を提供する。本明細書において、用語"医薬"は用語"医薬組成物"と等価である。

【0010】

本発明のさらなる実施形態が明らかにされ、本明細書に開示され、添付の特許請求の範囲にも反映される。

【0011】

本明細書において、単数形"ある(a)"、"ある(an)"および"その(the)"は、文脈によって明確に否定されない限り、複数指示を含む事に注意しなければならない。従って、例えば、"ある試薬(a reagent)"とは、このような種々の試薬の1以上を含み、"その方法(the method)"とは、本明細書に記載の方法に修飾しうるかまたはそれに代わりうる当業者に公知の等価なステップまたは方法を含む。特記しない限り、一連の要素に先行する用語"少なくとも"は、一連の要素のいずれをも指すものと解されるべきである。少なくとも1つは、例えば、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つを含み、またはそれ以上をも含む。

10

【0012】

本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物は、当業者には明らかであるか、あるいは以下のルーチン試験を用いて確かめることができるであろう。このような等価物は本発明に含まれるものとする。本明細書およびそれに続く特許請求の範囲を通じて、特記しない限り、語"含む(comprise)"ならびにその語尾変化形、例えば"含む(comprises)"および"含んでいる(comprising)"は、記載された整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を包含するが、任意の他の整数もしくは段階または整数もしくは段階の群を除外しないことを意味すると解される。

20

【0013】

本明細書が所定の核酸配列のことを言う場合には、前記配列はその5'から3'方向に示される(テキストに別途記載のない限り)。

【0014】

本明細書のテキストを通じて多くの文書が引用されている。本明細書に引用された文書(すべての特許、特許出願、科学出版物、製造業者の仕様書、使用説明書などを含む)のそれぞれは、上記下記にかかわらず、参照によりその全体が本願に組み込まれる。これらのいずれも、先行発明によってこのような開示に本発明が先行しないと認めるものとして解釈してはならない。

30

【0015】

マイクロRNA(miRNA)は、植物および動物のゲノムにおいてコードされる小さなRNA分子である。これらの高度に保存された21~27マーRNAは、特定のmRNAの3'非翻訳領域(3'-UTR)に結合することによって遺伝子の発現を制御する。miRNAが、初期発生、細胞増殖および細胞死、アポトーシスおよび脂肪代謝ならびに細胞分化のように多様なプロセスの重要な調節因子として作用することができるという根拠を多くの研究グループが示している。高等真核生物において、遺伝子発現の制御におけるmiRNAの役割は、転写因子の役割と同じくらい重要でありうるという推測もある。タイトジャンクションタンパク質の制御におけるmiRNAの役割は、本明細書に至るまでは研究されなかった。

40

【0016】

miRNA 320aによって、上皮細胞の経上皮電気抵抗(TER)に良い影響を与えることができる事が本発明者らによって見いだされた。細胞バリアモデル(極性T84細胞-ATCC番号CCL-248)を用い、本発明者らによって、このmiRNAが、腸病原性E.コリ(EPEC)原型株E2348/69のバリア破壊効果を予防することができ、さらに、EPEC E2348/69による破壊後に上皮バリアの完全性を復帰させることができることが明らかになった。このことは、バリア完全性のパラメータである経上皮電気抵抗を観察することによって例証することができる(さらなる例示のために、図2および3を参照のこと)。

50

【0017】

EPEC株E2348/69によって発揮される上皮バリアの完全性への悪影響は、本願に記載のmiRNAを用い、EPEC細菌との共インキュベーション後に対応するmiRNAでT84細胞をトランسفェクトすることによって排除することができた（図2参照）。

【0018】

従って、第1の側面において、本発明は、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA(5'から3'まで)からなるかまたはそれを含む核酸分子を含む医薬に関する。

【0019】

配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAは、成熟マイクロRNA(miRNA)と等しく、これは限定するものではない以下の名称:hsa-miR-320a(アクセッション番号MIMAT0000510)、ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320および／またはmml-miR-320でそれぞれのデータベース(例えばwww.mirbase.org)において見出すことができる。これらに関して、起源の種は3文字の識別コードで指定され、例えば、hsa-miR-320aはヒト(ホモ・サピエンス(Homo sapiens))由来であり、mmu-miR-320aはマウス(ムス・ムスカルス(Mus musculus))miRNAである。他の成熟miRNAも将来明らかとなる可能性もあり、それらが配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAからなる場合は、すべてのこれらのmiRNAもまた本発明の範囲内である。本明細書で使用する配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAは、当然、hsa-miR-320a、ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320および／またはmml-miR-320(または他の種由来のもしくはゲノムにおける種々の部位由来の将来のmiRNA)からなる群から選択される任意のmiRNA配列で置き換えることができるということになる。

10

20

30

【0020】

しかしながら、miRNAの命名法にかかわらず、単離された配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA(合成的に製造されたかまたは天然にプロセシングされた)および前記配列の任意の前駆体(その前駆体が、細胞内に、好ましくは真核細胞内に、より好ましくは哺乳動物細胞内に、最も好ましくはヒト細胞内に、単離された配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの発現または提供をもたらす限りは)からなるすべての核酸配列を本発明が含むことは明らかであろう。miRNA遺伝子は、通例、RNAポリメラーゼIIによって転写される。一次miRNA(pri-miRNA)と呼ばれるこの産物は、数百または数千のヌクレオチド長であることができ、一般的には、1以上のmiRNAステムループを含む。現在、マイクロRNAのプロセシングにはPasha(DGCR8とも呼ばれる)が必要であることが認められている。これは、RNアーゼIII酵素Droshaに結合して、マイクロプロセッサー複合体を形成し、これはpri-miRNAをpre-miRNAの特徴的なステムループ構造に切断し、次いでこれは酵素DicerによってmiRNA断片にさらにプロセシングされ、続いて、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれる。pre-miRNAは、しばしば、その3'末端における2ヌクレオチドのオーバーハングならびに3'ヒドロキル基および5'リン酸基を特徴とする。

40

【0021】

従って、本発明の”前駆体”は、細胞内(好ましくは哺乳動物細胞内、より好ましくはヒト細胞内)でのプロセシングで成熟miRNA核酸配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを生じるpri-miRNAおよびpre-miRNAを含む。

40

【0022】

しかしながら、人工前駆体もまた、これらの人工前駆体が細胞内(好ましくは哺乳動物細胞内、より好ましくはヒト細胞内)で核酸配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAにプロセシングされうる限り、本発明の範囲内である。所定の前駆体が配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAにプロセシングされうるかどうかについて試験する手段および方法は、当業者の手段および専門的知識の範囲内である。このために、例えば、プロセシングされた標的配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを特異的に捕捉し、かつ／または標準PCR増幅技術によってそれぞれの配列を増幅することによって、前駆体が実際に前記標的配列にプロセシングされるかどうかを評価することが可能である。この点に関して、市販アッセイを用いることが可能であり、これらのアッセイは、Qiagen社を含む多くの会社によって提供されている。

50

【0023】

従って、本明細書に記載の”プロセシング可能な前駆体”または”プロセシングされうる前駆体”などは、それぞれのmiRNA処理段階のすべてまたは選択されたものによって細胞内でプロセシングされ、所望のmiRNA(配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに対する等価物)を生じる天然および/または人工(合成)前駆体分子を含む。これらの限定するものではないmiRNA処理段階は特に、RNAポリメラーゼIIによるmiRNA遺伝子の転写；Pasha/DGCR8およびRNアーゼIII酵素Droshaによるプロセシング(マイクロプロセッサー複合体を形成し、これはpri-miRNAをpre-miRNAの特徴的なステムループ構造に切断する)(次いでこれは酵素DicerによってmiRNA断片にさらにプロセシングされ、続いて、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれる)を含むことができる。例えば、Qiagen社によって提供されているmiScript miRNA Mimicは、Pasha、Droshaおよび/またはDicerによるプロセシングを必要とせず、単にRISC複合体と相互作用して機能性成熟miRNAとなる。すなわち、これらの人工前駆体は、単にRISC複合体への組み込み段階を必要とするだけである。すなわち前記前駆体は、細胞がこれらの人工前駆体を成熟miRNAにプロセシングすることができるため、”プロセシング可能”である。

10

【0024】

プロセシング可能な前駆体は、好ましくは、以下の構造的および機能的特徴の1以上を特徴とする：

- (a)該前駆体は、ステムループ(末端が不対ループの二重らせん-これは、同じ鎖の2つの領域(反対方向に読まれるとき、通例少なくとも一部分においてヌクレオチド配列が相補的である)が塩基対を形成して末端が不対ループの二重らせんを形成するときに生じる)を形成することができる；
- (b)該前駆体は、Dicerによってプロセシング可能(切断可能)である；
- (c)該前駆体は、少なくとも一部分において二本鎖である；
- (d)該前駆体は、成熟miRNA(配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに対する等価物)と同一である部分(第3部分)および少なくとも部分的にそれに相補的であるさらなる部分(第1部分)を含む；
- (e)第3部分と第1部分((d)参照)が第2部分によって離れて配置される；
- (f)該前駆体の少なくとも第1部分および第3部分((d)参照)はヌクレオチドでできている；
- (g)(f)で述べた前記ヌクレオチドの一部または全部は修飾ができる(このような修飾は、例えば、WO2006/137941に詳述されているもの、好ましくは48および49ページで述べられているものを含む-用語”修飾”は、本明細書の他の部分でもさらに詳細に説明される)；
- (h)該前駆体は、Droshaによって切断ができる；かつ/または
- (i)該前駆体は、カリオフェリン、好ましくはエクスポート5(Exportin-5)によって核膜を横切って輸送ができる。

20

30

30

【0025】

少なくとも前記の特徴(c)または(d)を特徴とする前駆体が好ましい。少なくとも前記の特徴(d)および(c)を特徴とする前駆体がより好ましい。少なくとも前記の特徴(d)および(c)および(f)を特徴とする前駆体がよりさらに好ましい。

40

【0026】

所望の配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAにプロセシングができる人工前駆体分子は、例えば、Qiagen社(miScript miRNA Mimic)または他の公知の会社によって提供され、構築されている人工前駆体もまた考えられる。すべてのこれらの人工前駆体は細胞内でプロセシング可能であり、本明細書に記載の成熟miRNA hsa-miRNA-320aまたは他の成熟miRNAに等価な単離された配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAをもたらす。

【0027】

従って、”プロセシング可能”は、本質的に、本明細書に記載のすべての前駆体が細胞内で単離された配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAにプロセシングができるることを意味する。前記のように、前記核酸分子は、好ましくは哺乳動物細胞によってプロセシング

50

可能であり、最も好ましくはヒト細胞によってプロセシング可能である。

【0028】

本発明のすべての実施形態の文脈において、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA(または本明細書に開示された任意の他の配列)の1以上のまたはさらにはすべてのヌクレオチド(単数または複数)"U"はヌクレオチド"T"によって置き換えることができる考えられる。

【0029】

本発明の医薬は、好ましくは、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および/もしくは改善または予防に用いられる。腸粘膜の透過性は、少なくとも一部分において腸上皮細胞のタイトジャンクションの強度によって決定され、従って、本明細書に記載の疾患は、腸粘膜の上皮細胞間のタイトジャンクションタンパク質複合体の破壊、減少または低下を特徴とする。タイトジャンクションの破壊、減少または低下は、特に、腸粘膜上皮のバリア機能の減少または低下を特徴とし、いわゆる"漏出性消化管"をもたらす腸透過性亢進を引き起こす恐れがある。

10

【0030】

好都合には、*in vivo*透過性は、粘膜を経由したD-キシロース、マンニトール、ラムノースまたはラクチュロースなどの糖の浸透を測定し、尿における回収を検出することによって評価することができる。糖吸收/透過性試験の一部として、D-キシロース、マンニトールおよびラクチュロースなどの種々のマーカーを用いた多くの研究において、異常に低い腸管吸収が明らかにされた。

20

【0031】

従って、当業者には、腸バリア機能の減少または低下の試験法は公知である(例えば、商用試験を提供しているBioHealth Diagnostics(サンディエゴ、米国)を参照のこと)。すなわち、当業者は、ある疾患が、腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患であるかどうかを容易に決定することができる。

【0032】

本発明の文脈において、(治療的または予防的に)治療、改善または予防される好ましい疾患は、炎症性腸疾患(IBD)という総称で包含することができる疾患から選択されるが、潰瘍性大腸炎およびクローン病が特に好ましい。

30

【0033】

本明細書で使用する用語"炎症性腸疾患"または"IBD"は、消化管の炎症性疾患を説明する総称であり、その最も一般的なものは潰瘍性大腸炎およびクローン病である。本発明は、任意の病因のIBDの治療のための医薬組成物および方法を提供する。特定の実施形態において、本発明は、潰瘍性大腸炎、クローン病、空置大腸炎、虚血性大腸炎、感染性大腸炎、薬剤性大腸炎、顕微鏡的大腸炎(コラーゲン性大腸炎およびリンパ球性大腸炎を含む)、非定型大腸炎、偽膜性大腸炎、劇症大腸炎、自閉症腸炎、不確定大腸炎、ベーチェット病、胃十二指腸CD、空回腸炎、回腸炎、回結腸炎、クローン(肉芽種性)大腸炎、過敏性腸症候群、粘膜炎、放射線誘発腸炎、短腸症候群、胃潰瘍、憩室炎、囊炎、直腸炎および慢性下痢を治療するための方法を提供する。本明細書を通じて、IBDとは、本明細書において例示的に胃腸の炎症状態をいう場合があるが、それに限定するものではない。

40

【0034】

当然のことながら、本発明の化合物および組成物は、特定の病状(本明細書に開示された)の治療に使用するためのものである。本発明はまた、それを必要とする対象に、一般的には本明細書に記載の疾患を患っている対象に、本発明の化合物、核酸分子、ベクターおよび/または宿主細胞を(単独あるいは混合物で)投与するステップを含む治療法に関する。"対象"は、一般的には哺乳動物を含み、特にヒト、ネコ、イヌ、ラクダ、ウマ、ヒツジ、ウシ、類人猿、ブタ、モルモット、ヤギなどを含むが、ヒトが好ましい。

【0035】

本発明の核酸分子、ベクター、宿主細胞および/または組成物は、治療および予防の医療現場において用いることができる。

50

【0036】

従って、特定の実施形態において、本発明は、医薬として使用するための、特に、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および/もしくは改善または予防に使用するための、

- (a)配列が、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに50%~100%相補的である第1部分；
- (b)場合により、前記第1部分および第3部分を連結する第2部分；および
- (c)配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む第3部分；

を5'から3'まで連続して含む150ヌクレオチドまでの核酸分子に関する。前記核酸分子は、本発明の一部の前駆体を特徴づける。

【0037】

第1部分は、前記配列の全長(すなわち22ヌクレオチド)にわたって配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに50%~100%相補的な核酸配列を含むかまたはそれからなる。好ましい実施形態において、前記第1部分は、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに相補的ではない4、5、6または7ヌクレオチドと、それに相補的な残りの18、17、16または15ヌクレオチド(約68~約82%の相補配列が生じる)とを特徴とする核酸配列からなるかまたはそれを含む。

10

【0038】

さらに好ましい実施形態において、前記第1部分は、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの7つの強調表示された(太字およびイタリック体)部分に対するミスマッチを含むが、残りのヌクレオチドはそれに相補的である。さらに好ましい実施形態において、前記第1部分は、一部分において配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに相補的な配列GCCUUCUCUUCCCGGUUCUUCCCG(5'から3'まで)の少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24連続ヌクレオチドを含む。第2部分に隣接した第1部分の最後のヌクレオチドが"G"であることもまた考えられる。

20

【0039】

他の実施形態において、前記第1部分は、第3部分に50~100%相補的である(前記第3部分の全長にわたって)。

【0040】

第1部分は約24~75ヌクレオチド長であることが好ましく、約24~50ヌクレオチド長であることがより好ましく、約24~40ヌクレオチド長であることがより好ましい。長さ39ヌクレオチドが特に好ましい。なぜなら、それはpre-miRNA前駆体hsa-miR-320a(アクセシジョン番号MI0000542)における第1部分に類似するからである。

30

【0041】

任意の第2部分が第1部分と第3部分を連結する。しかしながら、第1部分と第3部分の連結部分は必須ではないことは明らかであろう。例えば、Qiagen社によって提供されるmiScript miRNA Mimicを参照のこと。これらの構築物は第1部分と第3部分との間にリンカーを有さない。

【0042】

任意の第2部分は、好ましくは、第1部分と第3部分との間にループを形成することができる。好ましい実施形態において、前記第2部分は、約3~30ヌクレオチド長の核酸配列であるかまたはそれを含むが、好ましくは4ヌクレオチド長である。第2部分の前記ヌクレオチドは対を形成せず、それによってループ構造を形成する。好ましい実施形態において、前記第2部分ヌクレオチド配列はヌクレオチド配列(5'~3')GAGUからなるかまたはそれを含む。

40

【0043】

第2部分は、全部または一部が化学リンカーによって置き換えられることも考えられる。2つの核酸配列を連結することができるこのようなリンカーは当業者に公知である。

【0044】

第3部分は配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含むかまたはそれからなる。第3部分は約22~75ヌクレオチド長であることが好ましく、約22~50ヌクレオチド長であることがより好ましく、約22~40ヌクレオチド長であることがより好ましい。39ヌクレオチドの長さが特に

50

好ましい。なぜなら、それはpre-miRNA前駆体hsa-miR-320a(アクセッショング番号M10000542)における第3部分に類似するからである。好ましい実施形態において、前記第3部分は、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの上流に配列CGGGをさらに含み、さらに好ましい実施形態において、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの直接上流にそれを含む。すなわち、その場合、第3部分は配列CGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む。前記のCGGGにおける”C”は、第3部分の最後のヌクレオチドであり、第2部分に隣接していることもまた考えられる。

【0045】

用語”150ヌクレオチドまでの”は、約150ヌクレオチド以下の全長、例えば145、140、135、130、125、120、115、110、105、100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、70、65、60、55、50、45、40またはさらにはそれ以下の全長を有する核酸分子を含む。

【0046】

約90ヌクレオチド以下の長さが好ましく、82ヌクレオチドの長さがより好ましい。なぜなら、それはpre-miRNA前駆体hsa-miR-320a(アクセッショング番号M10000542)の長さに類似するからである。他のさらに好ましい実施形態において、前記核酸分子は、cfa-mir-320(アクセッショング番号M10008063)の長さである54ヌクレオチドまでである。従って、本発明の核酸分子は、54~82ヌクレオチド長であることもまた考えられる。

【0047】

他の実施形態において、150ヌクレオチドまでの前記核酸分子は、hsa-miR-320a、ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320および/またはmml-miR-320の前駆体である。本明細書の他の部分で説明するように、miRNAが、ヘアピンまたはステムループ構造を有する約75~90ヌクレオチド長の内因的に産生されたpre-miRNA(前駆体)由来であることは公知である。従って、本発明は、miRNA配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの内因的に産生された前駆体のすべてを含む。特に、前駆体hsa-miR-320a、ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320および/またはmml-miR-320が考えられる。大文字にされていない”mir-”は、それによってpre-miRNAのことを言い、一方で、大文字にされている”miR-”は成熟型のことを言う。

【0048】

従って、他の実施形態において、本発明は、医薬として使用するための、特に、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および/もしくは改善または予防に使用するための、hsa-miR-320a、ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320およびmml-miR-320ならびに/またはそれらの1以上のmiR-RNA前駆体(単数または複数)からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAを含む組成物に関する。

【0049】

本発明の150ヌクレオチドまでの核酸分子の他の実施形態において、前記核酸分子は、配列GCCUUCUCUCCGGUUCUUCGGAGUCGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む。

【0050】

他の実施形態において、本発明は、医薬として使用するための、特に、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および/もしくは改善または予防に使用するための、以下の配列：GCUUCGCUCCCCUCCGCCUUCUUCGGGUUCUUCGGAGUCGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUGAGG(ptr-miR-320a)；GCUUCGCUCCCCUCCGCCUUCUUCGGGUUCUUCGGAGUCGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUGAGGU(ppy-miR-320a)；AAAAACGAAAAAGAGGCCUUCUUCGGGUUCUUCGGAGUCGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAAGAGGG(bta-miR-320)；GCCUUCUCUUCGGGUUCUUCGGAGUCGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA(cfa-miR-320)；

10

20

30

40

50

GCCUCGCGCCUCCGCCUUCUUCUCCGGUUCUUCCCGGAGUCGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUGUG
 GG (mmu-mir-320) ;
 GCCUCGCGUCCUCCGCCUUCUUCUCCGGUUCUUCCCGGAGUCGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUG
 GG (rno-mir-320) ; および
 GCUUCGCUCCCCUCCGCCUUCUUCUCCGGUUCUUCCCGGAGUCGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUGAG
 G (mml-mir-320)

のいずれか1つを含むかまたはそれからなる核酸配列を特徴とする150ヌクレオチドまでの核酸分子に関する。前記の配列は、上記の核酸配列と比較して、交換がヌクレオチド配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの外側に位置する限り、10ヌクレオチドまでの交換(置換、欠失、挿入、好ましくは置換)を含むことが考えられる。“10までの交換”は、これらの交換が、ヌクレオチド配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの外側、より好ましくはヌクレオチド配列CGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの外側、よりさらに好ましくはヌクレオチド配列CGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの外側に位置する限り、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10の欠失、置換または挿入を含む。

10

【0051】

hsa-miR-320a、ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320および/またはmml-miR-320に相補的な配列にストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸分子もまた考えられる。当然のことながら、これらのハイブリダイズする核酸分子は配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む。よりさらなる実施形態において、これらの核酸分子は22、23、24、25、または26までのヌクレオチド長を含み、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む。前述のハイブリダイズする核酸分子は、医薬として使用するための、特に、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および/もしくは改善または予防に使用するためのものであるものとする。

20

【0052】

hsa-miR-320a/ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320および/またはmml-miR-320に相補的な配列にストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸分子もまた考えられる。当然のことながら、これらのハイブリダイズする核酸分子は配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA-を含む。これらのハイブリダイズする核酸分子は、好ましくは“プロセシング可能な前駆体”(本明細書の他の部分で説明した)であり、従って、さらに以下の構造的および機能的特徴の1以上を特徴とすることができる：

30

(a)該前駆体は、ステムループ(末端が不対ループの二重らせん-これは、同じ鎖の2つの領域(反対方向に読まれるとき、通例少なくとも一部分においてヌクレオチド配列が相補的である)が塩基対を形成して末端が不対ループの二重らせんを形成するときに生じる)を形成することができる；

(b)該前駆体は、Dicerによってプロセシング可能(切断可能)である；

(c)該前駆体は、少なくとも一部分において二本鎖である；

(d)該前駆体は、成熟miRNA(配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに対する等価物)と同一である部分(第3部分)および少なくとも部分的にそれに相補的であるさらなる部分(第1部分)を含む；

40

(e)第3部分と第1部分((d)参照)が第2部分によって離れて配置される；

(f)該前駆体の少なくとも第1部分および第3部分((d)参照)はヌクレオチドでできている；

(g)(f)で述べた前記ヌクレオチドの一部または全部は修飾されることができる(このような修飾は、例えば、WO2006/137941に詳述されているもの、好ましくは48および49ページで述べられているものを含む-用語“修飾”は、本明細書の他の部分でもさらに詳細に説明される)；

(h)該前駆体は、Droshaによって切断されることができる；

(i)該前駆体はRISC複合体に組み込まれることができる。

50

好ましい実施形態において、前記の核酸分子はストリンジェントな条件下でhsa-mir-320aにハイブリダイズすることができる。

【0053】

少なくとも前記の特徴(d)を特徴とする核酸分子が好ましい。少なくとも前記の特徴(d)および(c)を特徴とする核酸分子がより好ましい。少なくともthe前記の特徴(d)および(c)および(f)を特徴とする核酸分子がよりさらに好ましい。前述のハイブリダイズする核酸分子は、すべて、医薬として使用するための、特に、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および／もしくは改善または予防に使用するためのものであるものとする。

【0054】

本明細書において、用語”ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする”は、少なくとも50%互いに相同なヌクレオチド配列が一般的に互いにハイブリダイズしたままであるハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を説明するものとする。該条件は、互いに少なくとも約65%、少なくとも約70%もしくは少なくとも約75%または少なくとも約85%もしくは少なくとも約95%またはそれ以上相同な配列が一般的に互いにハイブリダイズしたままであるような条件であることができる。このようなストリンジェントな条件は当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6. 3.1-6.3.6において見出すことができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、約45°での6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中のハイブリダイゼーションおよびそれに続く50~65°での0.2X SSC、0.1%SDSによる1回以上の洗浄である。

10

20

30

【0055】

さらなる実施形態において、hsa-miR-320a(好ましい)、hsa-mir-320a(同様に好ましい)、ptr-miR-320a、ptr-mir-320a、ppy-miR-320a、ppy-mir-320a、bta-miR-320、bta-mir-320、cfa-miR-320、cfa-mir-320、mmu-miR-320、mmu-mir-320、rno-miR-320、rno-mir-320および／またはmmu-miR-320にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる前記核酸分子は、さらに以下のように特徴づけることができる：

(i)該核酸分子は配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの上流(5'末端方向)に配列GAGUを含む；かつ／または

(ii)該核酸分子は配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの上流(5'末端方向)に配列CGGGを含む；かつ／または

(iii)該核酸分子は5'から3'方向に配列GAGU、CGGGおよびAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む；かつ／または

(iv)該核酸分子は配列GCCUUCUCUUCCCGGUUCUUCCCG(AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAの上流に)を含む；かつ／または

(v)該核酸分子は配列GCCUUCUCUUCCCGGUUCUUCCCGGAGUCGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む。

【0056】

他の実施形態において、前記ハイブリダイズする核酸分子は150までのヌクレオチド長である。

【0057】

よりさらなる実施形態において、本発明は、医薬として使用するための、特に、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および／もしくは改善または予防に使用するための、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む22、23、24、25または26までのヌクレオチド長の核酸分子に関する。

40

【0058】

本発明はまた、医薬として使用するための、特に、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および／もしくは改善または予防に使用するための、本発明の核酸分子、配列、前駆体または断片(特に配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAからなるかまたはそれを含む核酸分子)を含むベクターに関する。

【0059】

50

本明細書において、"ベクター"は、*in vitro*、*in vivo*または*ex-vivo*のいずれかで標的細胞に送達することができる異種核酸配列を含む組換えDNAまたはRNAプラスミドまたはウイルスのことを言う。該核酸配列はプロモーターまたはエンハンサーなどの他の核酸配列に作動可能に連結することができ、対象とする核酸配列の転写を調節することができる。本明細書において、ベクターは、最終の標的細胞または対象において複製されることができる必要はない。用語ベクターは発現ベクターおよびクローニングベクターを含むことができる。"発現ベクター"とは、適切な宿主細胞に導入されたとき、挿入されたDNAの発現をもたらすプラスミド、ファージ、組換えウイルスまたは他のベクターなどの組換えDNAまたはRNA構築物のことを言う。適切な発現ベクターは、真核細胞および/または原核細胞において複製可能であり、エピソームにとどまるかまたは宿主細胞ゲノムに組み込まれるものも含む。

10

【0060】

従って、本明細書で用いられる用語"ベクター"または"発現ベクター"は、本発明の核酸分子(特に配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAからなるかまたはそれを含む核酸分子)を宿主細胞に導入し、そこで発現させるためのビヒクルとして本発明に従って用いられる核酸ベースのベクターを意味する。当業者に公知のように、このようなベクターはプラスミド、ファージ、ウイルスおよびレトロウイルスからなる群から容易に選択することができる。一般に、本発明に適合するベクターは、選択マーカー、所望の遺伝子のクローニングを容易にする適切な制限部位および、真核または原核細胞内に入り、かつ/またはそこで複製することができることを含む。シグナル配列、スプライスシグナルならびに転写プロモーター、エンハンサーおよび終結シグナルなどのさらなるエレメントもまたベクターに含まれることができる。適切なベクターの例は、限定するものではないが、プラスミドpCDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF 1/His、pEMD/GS、pRC/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1およびpZeoSV2(Invitrogen社(サンディエゴ、カリフォルニア州)から入手できる)ならびにプラスミドpCI(Promega社(マディソン、ウィスコンシン州)から入手できる)を含む。

20

【0061】

本発明の核酸分子は主としてRNAから製造されることが考えられるが、いくつかの実施形態において、本発明の核酸分子はRNA、ヌクレオチドアナログ、DNA又はDNA、RNA、ヌクレオチドアナログおよびPNAの任意の組み合わせであることができる。

30

【0062】

"活性"miRNAとして配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAからなるかまたはそれを含む本発明の核酸分子の活性を最大にするためには、翻訳のレベルで遺伝子発現を制御するmiRNAタンパク質複合体による活性鎖(第3部分および特に配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA)の取り込みを最大化し、相補鎖(第1部分)の取り込みを最小化する必要がある。最適のmiRNA活性を提供する分子設計は、相補鎖への修飾を含む。第1の修飾は、その5'末端においてリン酸またはヒドロキシル以外の化学基を有する相補鎖(好ましくはRNA)の作成を含む。5'の修飾の存在によって、しばしば相補鎖の取り込みが排除され、続いてmiRNAタンパク質複合体による活性鎖の取り込みが有利となる。5'の修飾はNH2、NHCOCH3、ビオチンなどを含む種々の分子のいずれかであることができる。miRNA経路による相補鎖の取り込みを顕著に低下させる第2の化学修飾戦略は、相補鎖の最初の2~6ヌクレオチドにおいて糖修飾を有するヌクレオチドの組み込みである。合成miRNA活性をさらに高めるために、第2の設計戦略に整合する糖修飾は、第1の設計戦略に整合する5'末端修飾とを組み合わせることができることに留意すべきである。第3の合成miRNA設計は、相補鎖の3'末端における、活性鎖に相補的でないヌクレオチドの組み込みを含む。このような修飾および修飾戦略は公知であり、例えばWO2006/137941において説明されており、本発明の実施形態に具体的に含まれる。

40

【0063】

本発明の核酸分子における天然ホスホジエステル骨格結合が好ましいが、他の骨格結合、例えばリン原子を含む骨格結合を含むことができる。その中にリン原子を含む修飾オリ

50

ゴヌクレオチド骨格は、例えば、ホスホロチオアート、キラルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホナート、5'-アルキレンホスホナートおよびキラルホスホナートを含むメチルおよび他のアルキルホスホナート、ホスフィナート、3'-アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダートを含むホスホルアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、通常の3'-5'結合を有するセレノホスファートおよびボラノホスファート、2'-5'結合したこれらのアナログならびに1以上のヌクレオチド間結合が3'-3'結合、5'-5'結合または2'-2'結合である逆の極性を有するものを含む。

【0064】

10

本発明の核酸分子は、天然に存在する塩基(天然に存在する塩基は、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルおよびイノシンを含む)を含むことが同様に好ましいが、これらの塩基は修飾されることができる。修飾は、1以上の原子もしくは基の置換または付加によるものであることができる。塩基部位が修飾されたヌクレオチドを含むことができる修飾のタイプのいくつかの例は、限定するものではないが、アルキル化、ハロゲン化、チオール化、アミノ化、アミド化またはアセチル化塩基を個々にまたは組み合わせで含む。さらなる具体例は、例えば、5-プロピニルウリジン、5-プロピニルシチジン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、N,N,-ジメチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-プロピルグアニン、2-アミノアデニン、1-メチルイノシン、3-メチルウリジン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジンおよび5位に修飾を有する他のヌクレオチド、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ハロシチジン、5-ハロウリジン、4-アセチルシチジン、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、3-メチルシチジン、6-メチルウリジン、2-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2,2-ジメチルグアノシン、5-メチルアミノエチルウリジン、5-メチルオキシウリジン、7-デアザ-アデノシンなどのデアザヌクレオチド、6-アゾウリジン、6-アゾシチジン、6-アゾチミジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジンおよび4-チオウリジンおよび2-チオシチジンなどの他のチオ塩基、ジヒドロウリジン、ブソイドウリジン、クオイオシン、アルカエオシン、ナフチルおよび置換ナフチル基、N6-メチルアデノシン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オンなどの任意の0-およびN-アルキル化プリンおよびピリミジン、アミノフェノールまたは2,4,6-トリメトキシベンゼンなどのフェニルおよび修飾フェニル基、G-clampヌクレオチドとして機能する修飾シトシン、8-置換アデニンおよびグアニン、5-置換ウラシルおよびチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチドならびにアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドを含む。

20

【0065】

30

従って、本発明は、前記で述べた修飾から選択される1以上の修飾を含む本発明の核酸分子に関する。

【0066】

40

他の実施形態において、本発明の核酸分子は、少なくとも1つの検出可能な標識、例えば放射性もしくは蛍光性部分またはヌクレオチドに結合した質量標識などを含む。

【0067】

50

他の実施形態において、本発明は、本発明の核酸分子および/またはベクターを含む宿主細胞に関する。用語”宿主細胞”は、特に、細菌(好ましくはプロバイオティクス菌)を含み、好ましくはグラム陰性細菌を含み、より好ましくは腸内細菌科に属する細菌を含み、よりさらに好ましくはエシェリキア(Escherichia)属のメンバーを含む。本発明の他の好ましい実施形態において、前記宿主細胞はプロバイオティクス菌である。プロバイオティクス菌は、WHOによる定義によれば、ヒトおよび動物への有益な効果と関連する細菌である。用語”プロバイオティクス”は、さらに、宿主に健康利益を与えることができ、少なくとも消化管に健康利益を与えることができる、生きた非病原性微生物(好ましくは細菌)を含む。有用なプロバイオティクス宿主細胞は、限定するものではないが、バチル

ス・コアギュランス (*Bacillus coagulans*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス亜種ラクティス (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*)、ビフィドバクテリウム・ブレヴェ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、エシェリキア・コリM-17 (*Escherichia coli* M-17)、エシェリキア・コリ・ニッスル1917 (*Escherichia coli* Nissle 1917)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチルス・フォルティス (*Lactobacillus fortis*)、ラクトバチルス・ジョンソニー (*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、特にブランディ (*boulardii*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、それらの混合物、および/または上記の属の他の細菌を含む。

10

【0068】

特に好ましい実施形態において、前記プロバイオティクス宿主細胞はE.コリ・ニッスル1917 (*E. coli* Nissle 1917)またはE.コリ・8178 DSM21844 (*E. coli* 8178 DSM21844 (WO2010/034479に開示されている)から選択される。エシェリキア・コリ株ニッスル1917は最もよく研究されたプロバイオティクス株の1つである。この株は登録商標'Mutaflor'としてARD EYPHARM社(ヘルデッケ、ドイツ)によって市販されている。この特別なE.コリ株は、感染性胃腸炎を予防するその能力に基づいて1917年にAlfred Nissleによって単離された。ニッスル1917株は、効率的な腸生存およびコロニー形成とビルレンスの欠如とを兼備することが示されている。これによって、この株が、特に慢性炎症性腸疾患ばかりでなく、幼児における下痢性疾患の治療における安全で有効な候補となっている。

20

【0069】

好ましい実施形態において、本発明の宿主細胞は、医薬として使用するための、特に、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および/もしくは改善または予防に使用するためのものである。本発明の宿主細胞および核酸分子および/またはベクターは、本発明の医薬組成物と共に存させることができることも考えられる。

30

【0070】

他の実施形態において、本発明は、本発明の核酸分子およびプロバイオティクス菌を含む組成物(好ましくは医薬組成物)であって、前記プロバイオティクス菌が細胞内に本発明の核酸分子もベクターも含まない前記組成物に関する。

【0071】

本発明の医薬組成物は、活性成分として本発明の核酸分子および/またはベクターおよび/または宿主細胞を含む。本発明の医薬組成物はさらに、薬学的に許容される担体を含むことができる。“薬学的に許容される担体”とは、医薬製剤における、対象に毒性のない活性成分以外の成分のことを言う。薬学的に許容される担体は、限定するものではないが、緩衝液(好ましくは人工緩衝液)、賦形剤、安定剤、および/または防腐薬を含む。潰瘍性大腸炎の治療に関しては、本発明の医薬組成物が緩衝液を含むことが特に好ましい。さらに、本発明の医薬組成物は、他の薬剤または医薬剤、アジュバントなどを含むことができる。例示的な非経口投与形は滅菌水溶液での活性化合物(単数または複数)の溶液または懸濁液、例えば水性プロビレングリコール溶液またはデキストロース溶液を含む。必要に応じて、このような剤形を適切に緩衝剤で処理することができる。適切な医薬担体は、不活性希釈剤または充填剤、水および種々の有機溶媒を含む。医薬組成物は、必要に応じ

40

50

て、風味剤、バインダー、賦形剤などの追加の成分を含むことができる。従って、経口投与のためには、クエン酸などの種々の賦形剤を含む錠剤は、デンプン、アルギン酸および特定の複合ケイ酸塩などの種々の崩壊剤と共にショ糖、ゼラチンおよびアカシアゴムなどの結合剤を加えて用いることができる。さらに、錠剤目的には、多くの場合、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクなどの滑沢剤が有用である。軟および硬充填ゼラチンカプセルにおいても、同様なタイプの固体組成物を用いることができる。従って、好ましい材料は、ラクトースまたは乳糖および高分子量ポリエチレングリコールを含む。経口投与のために水性懸濁液またはエリキシル剤が望ましい場合、それに含まれる活性化合物は、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリンまたはそれらの組み合わせなどの希釀剤と共に、種々の甘味剤もしくは風味剤、着色剤または色素および、必要に応じて、乳化剤または懸濁化剤と混合することができる。特定の量の活性化合物を含む種々の医薬組成物の調製方法は当業者に公知であるか、あるいは明らかであろう。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Ester, P a., 15.sup.th Edition (1975) を参照のこと。しかしながら、本発明の組成物はさらに他の成分を含むことができることは明らかであろう。

10

【0072】

(医薬)組成物は、例えば、錠剤、カプセル、ピル、粉末、持続放出製剤、溶液、懸濁液のような経口投与に適した剤型、滅菌溶液、懸濁液または乳剤のような注射剤に適した剤型、あるいは座剤のような直腸投与に適した剤型であることができる。経口投与が好ましく、潰瘍性大腸炎の治療に関しては、経口投与が特に好ましい。医薬組成物は、正確な用量の単回投与に適した単位剤形であることができる。

20

【0073】

本発明の核酸分子および/またはベクターは、遊離形で提供されることもできるし、核酸分子(本発明のベクターを含む)の送達に有用と考えられるリポソーム、ナノトランスポーター、複合物、金属錯体、ヒドロキシアパタイトなどのポリマーもしくは生体高分子、ナノ粒子、ミクロ粒子または任意の他のビヒクルなどの固体担体に結合され(例えば共有結合で)、かつ/または含まれることもまた考えられる。本発明の核酸分子および/またはベクターを含む固体担体は、好ましくは、医薬として使用するための、特に、腸粘膜によって媒介される腸バリア機能の減少または低下を特徴とする疾患の治療および/もしくは改善または予防に使用するためのものである。核酸と複合体を形成し、核酸を細胞の表面に送達し、エンドソームへの取り込みおよびそれからの放出を容易にする種々の化合物が開発されている。とりわけ、(1)DOTAP(または他のカチオン性脂質)、DDAB、DHDEAB、およびDOPEなどの種々の脂質ならびに(2)ポリエチレンイミン、ポリアミドアミンならびにこれらおよび他のポリマーのデンドリマーなどの非脂質ベースポリマーがある。これらの実施形態のいくつかにおいて、DOTAPおよびコレステロールまたはコレステロール誘導体などの脂質の組み合わせが用いられる(米国特許第6,770,291号(参照により本願に組み込まれる))。これらの試薬のいくつかは、動物における核酸の取り込みを容易にすることが示されており、これらの化合物または類似の作用機序(すなわち、細胞、好ましくはヒト細胞への核酸分子の取り込みを容易にする)を有する化合物のすべてが本発明の実施形態に含まれる。

30

【0074】

細胞膜を経由した核酸分子の取り込み/輸送を容易にするために、核酸分子の末端に種々の化合物が結合されている。HIV TAT、HSV VP22、Drosophila antennapediaおよび他のタンパク質において見出された短いシグナルペプチドが、膜を経由した生体分子の迅速な移行を可能にすることが見出された(Schwarze (2000) によって概説されている)。タンパク質導入ドメイン(PTD)と呼ばれるこれらのシグナルペプチドが、オリゴヌクレオチドの培養細胞への送達を容易にするためにオリゴヌクレオチドに結合された。動物細胞へのオリゴヌクレオチドの取り込みを改善するために、コレステロールがオリゴヌクレオチドに結合された(MacKellar (1992))。末端コレステロール基は、細胞表面の受容体または脂質と相互作用し、修飾オリゴヌクレオチドの内在化を容易にすると推定される。同様に、

40

50

負の正味電荷を減少させ、細胞への取り込みを改善するために、ポリ-1-リジンがオリゴヌクレオチドに結合された(Leonetti (1990))。核酸分子/ベクターの取り込みを容易にするすべてのこれらの実体もまた本発明の範囲内である。

【0075】

一実施形態において、本発明の組成物および/または核酸分子および/またはベクターおよび/または宿主細胞(好ましくはプロバイオティクス宿主細胞)は、ヒトの食用の摂取可能な担体材料に加えて与えられる。例示的な摂取可能な担体材料は、穀類ベースの食品、餅、大豆ケーキ、フードバー製品、冷製フードバーを含む。本明細書に記載の組成物および/または核酸分子および/またはベクターおよび/または宿主細胞(好ましくはプロバイオティクス宿主細胞)は、例えばダイエタリー・サプリメント、食品および飲料添加剤、食品および飲料成分として提供することができる。

10

【0076】

上記の食物または飲料製品は、健常対象、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを対象とすることもまた考えられる。従って、本発明はまた、健常対象の補給のための、かつ/または対象、好ましくはヒト対象の消化管の健康もしくは福祉の促進もしくは維持のための、本明細書に記載の(個々のまたは混合した)核酸分子および/またはベクターおよび/または宿主細胞および/または食物もしくは飲料製品に関する。

【0077】

他の実施形態において、本発明は、本発明の(個々のまたは混合した)核酸分子、ベクター、宿主細胞および/または組成物の食物または飲料製品への製剤化のステップを含む、食物または飲料製品の製造方法に関する。

20

【0078】

本発明はまた、以下の項目を特徴とする:

項目1. 医薬として使用するための、

- (a) 配列が、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに50%~100%相補的である第1部分;
- (b) 第1部分と第3部分との間にループを形成することができる第2部分; および
- (c) 配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含むかまたはそれからなる第3部分を5'から3'まで連続して含む150ヌクレオチドまでの核酸分子。

項目2. 核酸分子の第2部分が約3~30ヌクレオチド長の核酸配列であり、好ましくは4ヌクレオチド長である、項目1に記載の使用。

30

項目3. 核酸分子が85ヌクレオチド長である、項目1または2に記載の使用。

項目4. 核酸分子の第1部分が、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAに少なくとも80%相補的である、前記項目のいずれか1つに記載の使用。

項目5. 前記核酸分子がステムループ(末端が不対ループの二重らせん)を形成することができる、前記項目のいずれか1つに記載の使用。

項目6. 核酸分子が、配列GCUUCGCUCCCCUCCGCCUUCUCUUCCCGGUUCUUCCCGGAGUCGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUGAGGU(hsa-mir-320a)を含むかまたはそれからなる、前記項目のいずれか1つに記載の使用。

項目7. 前記核酸分子が、哺乳動物細胞(好ましくはヒト細胞)によって成熟miRNA AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAにプロセシング可能である、前記項目のいずれか1つに記載の使用。

40

項目8. 医薬として使用するための、配列AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAを含む25ヌクレオチドまでの核酸分子。

項目9. 前記核酸分子がRNAである、前記項目のいずれかに記載の使用。

項目10. 医薬として使用するための、hsa-miR-320a、ptr-miR-320a、ppy-miR-320a、bta-miR-320、cfa-miR-320、mmu-miR-320、rno-miR-320およびmml-miR-320ならびに/またはそれらの1以上のmiR-RNA前駆体(単数または複数)からなる群から選択される少なくとも1つの成熟miRNAを含む組成物。

項目11. 前記核酸分子および/または成熟miRNAが1以上の修飾を含む、項目1~10のいずれか1つに記載の使用。

項目12. 医薬として使用するための、項目1~11のいずれか1つに記載の核酸分子および/

50

または成熟miRNAを含むベクター。

項目13. 前記ベクターが発現ベクターである、項目12に記載の使用。

項目14. 医薬として使用するための、前記項目のいずれか1つに記載の核酸分子、成熟miRNAおよび／またはベクターを含む宿主細胞。

項目15. 前記宿主細胞が細菌であり、好ましくはグラム陰性細菌であり、より好ましくは腸内細菌科に属する細菌である、項目14に記載の使用。

項目16. 前記細菌がプロバイオティクス菌である、項目15に記載の使用。

項目17. 前記プロバイオティクス菌がE.コリ・ニッスル1917またはE.コリ・8178 DSM21844である、項目16に記載の使用。

項目18. 前記請求項のいずれか1つに記載の核酸分子および／または成熟miRNならびに項目17に記載のプロバイオティクス菌を含む組成物。 10

項目19. E.コリ・ニッスル1917および／またはE.コリ・8178またはそのフラクションをさらに含む、項目18に記載の組成物。

項目20. 医薬として使用するための、項目18または19に記載の組成物。

項目21. 医薬として使用するための、前記項目のいずれか1つに記載の核酸分子、成熟miRNAおよび／またはベクターでコーティングされたミクロ粒子。

項目22. 炎症性腸疾患(IBD)の治療に使用するための、前記項目のいずれか1つに記載の医薬。

項目23. 炎症性腸疾患(IBD)の治療のための、前記項目のいずれか1つに記載の使用。

項目24. 前記IBDが潰瘍性大腸炎、コーン病(Cohn's disease)、コラーゲン性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病または不確定大腸炎である、項目22または23に記載のIBD。 20

項目25. 経口投与用である前記項目のいずれか1つに記載の医薬および／または使用。

項目26. 前記項目のいずれか1つに記載の核酸分子、成熟miRNA、ベクター、宿主細胞および／またはミクロ粒子を含む食品。

項目27. 対象の消化管の健康または福祉の促進のための、前記項目のいずれか1つに記載の核酸分子、成熟miRNA、ベクター、宿主細胞、および／またはミクロ粒子の使用。

項目28. 前記対象が正常な健常対象であり、好ましくは正常な健常ヒトである、項目27に記載の使用。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】miRNAの生合成および機能を示す図である。

【図2】経上皮電気抵抗(TER)のモニタリングを示す図である。トランスウェルフィルター上でT84細胞を8～10日間集密度100%まで増殖させた。集密に達した後、KarczewskiらおよびRempeら[45、46]に従って、最近開発されたリアルタイムオンラインTERモニタリング(NanoAnalytics社、ミュンスター、ドイツ)のためのcellZscopeユニットの適切なウェルにフィルターを挿入した。cellZscopeは、研究中の細胞バリアに影響を与えることなく、生理的条件下で経上皮インピーダンス(オーム抵抗および容量)をモニターする。上皮細胞をDMEM Ham's F12 plus FCS中で細菌(MOI 100)に感染させ、37℃/5%CO2でインキュベートした。TERの変化をオンラインで40時間までモニターした。 40

【図3】TER測定の原理を示す図である。

【実施例】

【0080】

以下の実施例によって本発明を説明する。これらの実施例を、本発明の範囲を限定するものと解釈してはならない。以下の実施例は説明のために含まれるものであって、本発明はその特許請求の範囲によってのみ限定される。

【0081】

【実施例1】

T84細胞のEPEC株E2348/69およびEPEC+hsa mir-320aとの共インキュベーション(図3もまた参照のこと)

10

20

30

40

50

5%CO₂、37℃でT84腸上皮細胞(ATCC CCL 248、10~25回継代)を増殖させた。10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 μg/mlペニシリン/ストレプトマイシン)を補ったDMEM Ham's F-12(PAA社、ケルベ、ドイツ)中で、コラーゲンコートされたフラスコおよび組織培養プレートにおいて細胞を培養した。経上皮抵抗(TER)をモニターするために、トランスウェルフィルター(直径6.5mm、孔径0.4 μm、Costar社、コーニング、ニューヨーク州)上でT84細胞を培養した。

【0082】

T84細胞をE.コリと共にインキュベートし、非感染細胞(対照)および感染細胞のTERを測定した:T84を細菌なしでインキュベートし;T84をEPECと共にインキュベートし、T84をEPEC+has mir-320aと共にインキュベートした。CellZscope技術[NanoAnalytics社、ミュンスター、ドイツ]を用いてオンラインモニタリングを行った。

10

【0083】

TERの分析は、バリアに関連した変化の、迅速でオンラインで測定可能な指標として役に立つ。単層のオーム抵抗および誘導抵抗のパラレル検出によって、このシステムは、従来の測定方法よりも質の良い信頼性のある読み出しを提供する(Rempeら(2011))。

【0084】

単層の経上皮電気抵抗(TER)および容量(C_{c1})は、周波数依存性インピーダンス(Z)をモニタリングすることによって検出される(ここで等価電子回路(nanoAnalytics社、ミュンスター)によって示される)。

20

【0085】

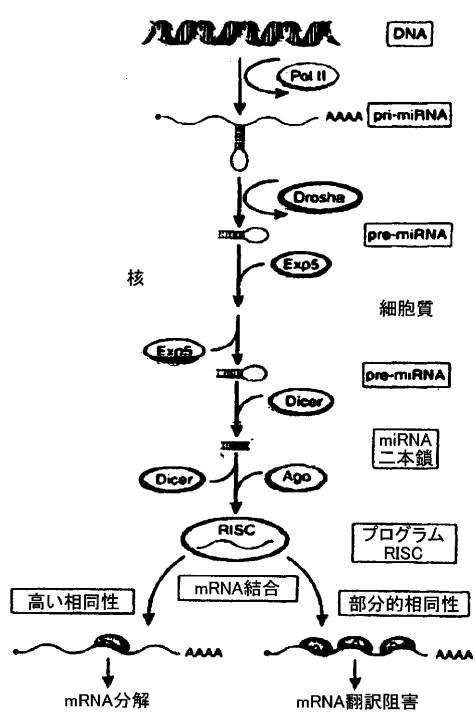
本発明は、前述の説明および実施例において具体的に説明されたもの以外にも実施可能であることは明らかであろう。上記の教示を考慮すれば、多数の修飾および変形が可能であり、従ってそれらは添付の特許請求の範囲内である。

【0086】

背景技術および実施例において引用した各文書(特許、特許出願、学術雑誌記事、要約、実験マニュアル、書籍または他の開示を含む)の全開示は、これによって参照により本願に組み込まれる。

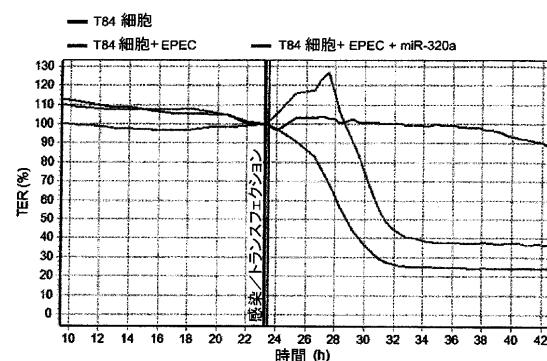
【図1】

Figure 1



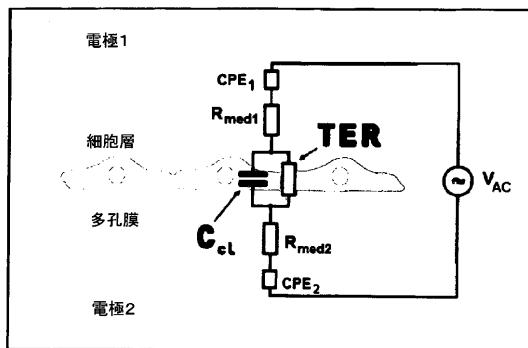
【図2】

Figure 2



【図3】

Figure 3



【配列表】

2014525749000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2012/065568
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:		
a. (means)		
<input type="checkbox"/>	on paper	
<input type="checkbox"/>	in electronic form	
b. (time)		
<input checked="" type="checkbox"/>	in the international application as filed	
<input type="checkbox"/>	together with the international application in electronic form	
<input type="checkbox"/>	subsequently to this Authority for the purpose of search	
2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.		
3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/065568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61K31/713
ADD. A61P1/00

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)
A61K 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)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, FSTA, WPI Data, COMPENDEX, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/082817 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC [CA]; MACLACHLAN IAN [CA]; JUDGE ADAM [CA]) 9 July 2009 (2009-07-09) page 154; example 18; table 9; sequence 350 ----- X CHEN L ET AL: "The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma", JOURNAL OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, vol. 50, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 358-369, XP025949528, ISSN: 0168-8278, DOI: 10.1016/J.JHEP.2008.09.015 [retrieved on 2008-11-21] the whole document ----- - / --	1-12
X		1-12

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 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

"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
15 October 2012	22/10/2012
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 Piret, Bernard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/065568

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHAAR D G ET AL: "miR-320 targets transferrin receptor 1 (CD71) and inhibits cell proliferation", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, ELSEVIER INC, US, vol. 37, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 245-255, XP025995244, ISSN: 0301-472X, DOI: 10.1016/J.EXPHEM.2008.10.002 [retrieved on 2009-01-09] the whole document -----	1-12
A	WO 2009/120877 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; KWON JOHN H [US]; WU FENG [US]) 1 October 2009 (2009-10-01) -----	1-12
A	ZHOU QIQI ET AL: "miRNA-based therapies for the irritable bowel syndrome", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, INFORMA HEALTHCARE, UK, vol. 11, no. 8, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 991-995, XP008149380, ISSN: 1744-7682, DOI: 10.1517/14712598.2011.577060 -----	1-12
A	SHAO-YIN CHEN ET AL: "The Genomic Analysis of Erythrocyte microRNA Expression in Sickle Cell Diseases", PLOS ONE, vol. 3, no. 6, 1 January 2008 (2008-01-01), page E2360, XP055020244, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0002360 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/065568

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2009082817	A1 09-07-2009	AU 2008342535	A1	09-07-2009
		CA 2710713	A1	09-07-2009
		EP 2238251	A1	13-10-2010
		JP 2011507534	A	10-03-2011
		US 2009291131	A1	26-11-2009
		WO 2009082817	A1	09-07-2009
<hr/>				
WO 2009120877	A2 01-10-2009	US 2011117111	A1	19-05-2011
		WO 2009120877	A2	01-10-2009

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 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74	A
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	

(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,R,S,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,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,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,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100183379

弁理士 藤代 昌彦

(72)発明者 シュミット アレクサンダー

ドイツ連邦共和国 4 8 3 2 9 ハヴィックベック ピーパーフェルトヴェーク 1 1 6

(72)発明者 フェルトマン カタリーナ

ドイツ連邦共和国 4 8 1 5 9 ミュンスター ヤニングスヴェーク 6 4

(72)発明者 チチヨン クリストフ

ドイツ連邦共和国 4 8 3 5 1 エヴェルスヴィンケル ローゼンシュトラーセ 3 3

F ターム(参考) 4B018 LB01 LB08 LB10 MD44 MD85 ME11 MF14

4B024 AA01 AA05 BA80 CA11 DA06 EA04 HA17

4B065 AA26X AA99Y AB01 AC20 BA02 CA23 CA41 CA44

4C076 AA31 BB01 CC16

4C084 AA13 MA41 MA52 NA14 ZA682

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA41 MA52 NA14 ZA68

4C087 AA01 AA02 BB63 BC34 MA41 MA52 NA14 ZA68