

(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2016-516808

(P2016-516808A)

(43) 公表日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(51) Int.Cl.

A61K 45/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

F 1

A 61 K 45/00
A 61 P 29/00
A 61 P 19/04
A 61 P 17/02
A 61 P 11/00

テーマコード(参考)

4C084
4C086
4C206

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2016-508288 (P2016-508288)
(86) (22) 出願日 平成26年4月13日 (2014.4.13)
(85) 翻訳文提出日 平成27年12月17日 (2015.12.17)
(86) 國際出願番号 PCT/IL2014/050358
(87) 國際公開番号 WO2014/174511
(87) 國際公開日 平成26年10月30日 (2014.10.30)
(31) 優先権主張番号 61/814,286
(32) 優先日 平成25年4月21日 (2013.4.21)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 516040109

イエダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニー リミテッド
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
イスラエル国 7610002 レホヴォト, ピー. オー. ボックス 95, アット ザ ワイツマン インスティテュート オブ サイエンス
at the Weizmann Institute of Science,
P. O. Box 95, 7610002 Rehovot, Israel

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BcI-xLおよび/またはBcI-wの活性および/または量を下方制御するための薬剤

(57) 【要約】

被験体における炎症性疾患または線維性疾患の処置方法を開示する。本方法は、治療有効量の BcI-xL および / または BcI-w および / または p21 の活性および / または量を下方制御する薬剤を被験体に投与する工程を含み、但し、前記炎症性疾患が癌ではないことを条件とする。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

炎症性疾患または線維性疾患の処置を必要とする被験体における炎症性疾患または線維性疾患を処置する方法であって、治療有効量の (B c 1 - x L) および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する薬剤を前記被験体に投与し、それにより、前記炎症性疾患または線維性疾患を処置する工程を含み、ここで、前記炎症性疾患が癌ではない、方法。

【請求項 2】

前記薬剤が化学物質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記薬剤が B c 1 - x L および / または B c 1 - w をターゲティングするポリヌクレオチド薬である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記疾患が軟骨変性に関連する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記疾患が、肝臓線維症、創傷治癒、皮膚線維症、肺疾患、腎臓線維症、前立腺炎、アテローム性動脈硬化症、関節炎、および脾炎からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

(i) B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する薬剤；および

(i i) p 2 1 の活性および / または量を下方制御する薬剤を含む、製品

【請求項 7】

前記 B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する薬剤が前記 p 2 1 の活性および / または量を下方制御する薬剤と異なるパッケージングに含まれる、請求項 6 に記載の製品。

【請求項 8】

前記 B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する薬剤が前記 p 2 1 の活性および / または量を下方制御する薬剤と同一のパッケージングに含まれる、請求項 6 に記載の製品。

【請求項 9】

皮脂調節剤、抗菌薬および / または抗真菌薬、角質溶解薬および / または角質調節剤、收敛薬、抗炎症剤および / または抗刺激剤、抗酸化剤および / またはフリーラジカル消去剤、瘢痕形成剤、老化防止剤、および保湿剤からなる群から選択される少なくとも 1 つの薬剤をさらに含む、請求項 6 に記載の製品。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの薬剤が老化防止剤である、請求項 9 に記載の製品。

【請求項 11】

薬学的に許容され得るキャリアおよび活性薬剤としての以下：

(i) B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する薬剤；および

(i i) p 2 1 の活性および / または量を下方制御する薬剤を含む薬学的組成物。

【請求項 12】

局所送達のために処方された、請求項 11 に記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

炎症性疾患または線維性疾患の処置のために使用され、前記疾患が癌ではない、サイクリン依存性キナーゼインヒビター 1 (p 2 1) の活性および / または量を下方制御する薬剤。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

炎症性疾患または線維性疾患の処置で用いる B c 1 - x L を発現する内因性核酸配列を下方制御するポリヌクレオチド薬および B c 1 - w を発現する内因性核酸配列を下方制御するポリヌクレオチド薬。

【請求項 15】

前記ポリヌクレオチド薬が s i R N A 薬である、請求項 14 に記載の薬剤。

【請求項 16】

キャリア、p 2 1 の活性および / または量を下方制御する少なくとも 1 つの活性薬剤、ならびに B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する少なくとも 1 つの活性薬剤を含む組成物であって、局所投与のために処方される、組成物。 10

【請求項 17】

前記 B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する少なくとも 1 つの活性薬剤が A B T - 7 3 7 または A B T - 2 6 3 である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

皮脂調節剤、抗菌薬および / または抗真菌薬、角質溶解薬および / または角質調節剤、收敛薬、抗炎症剤および / または抗刺激剤、抗酸化剤および / またはフリーラジカル消去剤、瘢痕形成剤、老化防止剤、および保湿剤からなる群から選択される少なくとも 1 つの薬剤をさらに含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 つの薬剤が老化防止剤である、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

炎症性疾患または線維性疾患の処置を必要とする被験体における炎症性疾患または線維性疾患を処置する方法であって、治療有効量のサイクリン依存性キナーゼインヒビター 1 (p 2 1) の活性および / または量を下方制御する薬剤を前記被験体に投与し、それにより、前記炎症性疾患または線維性疾患を処置する工程を含み、ここで、前記疾患が癌ではない、方法。 20

【請求項 21】

前記薬剤が前記 p 2 1 を発現する内因性核酸配列に指向するポリヌクレオチドである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ポリヌクレオチド薬が s i R N A である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する少なくとも 1 つの薬剤を前記被験体に投与する工程をさらに含む、請求項 20 に記載の方法。 30

【請求項 24】

前記少なくとも 1 つの薬剤が、前記 B c 1 - x L および / または B c 1 - w を発現する内因性核酸配列に指向するポリヌクレオチドである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記薬剤が B c 1 - x L および / または B c 1 - w に対して指向する s i R N A である、請求項 24 に記載の方法。 40

【請求項 26】

前記少なくとも 1 つの薬剤が化学物質である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記化学物質が、A B T - 7 3 7 、 A B T - 2 6 3 、 ゴッシポール、 A T - 1 0 1 、 T W - 3 7 、 およびオバトクラックスからなる群から選択される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記疾患が軟骨変性に関連する、請求項 20 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記疾患が、肝臓線維症、創傷治癒、皮膚線維症、肺疾患、骨粗鬆症、腎臓線維症、前立

腺炎、アテローム性動脈硬化症、関節炎、および膵炎からなる群から選択される、請求項 20 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記肺疾患が慢性閉塞性肺疾患（COPD）を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記薬剤を局所組成物として処方する、請求項 20 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

炎症性疾患または線維性疾患の処置を必要とする被験体における炎症性疾患または線維性疾患を処置する方法であって、治療有効量の Bcl-xL を発現する内因性核酸配列を下方制御する少なくとも 1 つのポリヌクレオチド薬および Bcl-w を発現する内因性核酸配列を下方制御する少なくとも 1 つのポリヌクレオチド薬を前記被験体に投与し、それにより、前記炎症性疾患または線維性疾患を処置する工程を含む、方法。
10

【請求項 33】

前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチド薬が siRNA を含む、請求項 32 に記載の方法。
。

【請求項 34】

前記疾患が癌である、請求項 32 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

前記疾患が、肝臓線維症、創傷治癒、皮膚線維症、肺疾患、骨粗鬆症、腎臓線維症、前立腺炎、アテローム性動脈硬化症、関節炎、および膵炎からなる群から選択される、請求項 32 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の方法。
20

【請求項 36】

前記肺疾患が慢性閉塞性肺疾患（COPD）を含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記少なくとも 1 つの薬剤を局所組成物として処方する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 38】

前悪性病変の処置を必要とする被験体における前悪性病変を処置する方法であって、治療有効量の Bcl-xL および / または Bcl-w の活性および / または量を下方制御する薬剤を前記被験体に投与し、それにより、前記前悪性病変を処置する工程を含む、方法。
30

【請求項 39】

p21 の活性および / または量を下方制御する薬剤を前記被験体に投与する工程をさらに含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前悪性病変の処置を必要とする被験体における前悪性病変を処置する方法であって、治療有効量のサイクリン依存性キナーゼインヒビター 1 (p21) の活性および / または量を下方制御する薬剤を前記被験体に投与し、それにより、前記前悪性病変を処置する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野および背景
40

【0002】

本発明は、そのいくつかの実施形態では、加齢性障害の処置のために Bcl-2 - ファミリータンパク質および / または p21 をコードする遺伝子の下方制御によって老化細胞を死滅させる方法に関する。

【背景技術】

【0003】

細胞老化（安定な細胞周期停止形態）は、細胞の増殖能を制限する機構である。老化は、多数の細胞型において多様な細胞ストレス形態に対して応答して誘発され得る。老化は、腫瘍発生に対する強力な障壁であり、一定の抗癌剤の細胞傷害性に寄与する。老化が細胞
50

自律的様式で腫瘍発生および組織損傷を制限する一方で、老化細胞は、その存在部位において、細胞非自律的様式で炎症、組織老化、組織破壊を誘導し、腫瘍発生および転移を促進する。したがって、その排除によって腫瘍を防止し、組織老化を抑制することができる。実際、老化細胞の排除により、動物モデルにおいて組織老化が遅延されることが示された（非特許文献1）。生物は、微小環境に及ぼす悪影響を回避するために老化細胞を排除するための精巧な機構を発達させたかもしれない。しかし、組織におけるその機構の運命は十分に特徴づけられていない。一方では、良性色素細胞母斑（母斑）は、老化細胞に非常に豊富であり、さらに生涯を通じて皮膚内に存在することができ、このことは老化細胞が組織内に安定に組み込まれ得ることを意味する。他方では、先天性免疫系成分が *in vivo* で老化細胞を特異的に認識して排除し、*in vivo* で老化細胞を標的にして腫瘍の退縮および肝臓線維症の逆転を生じることが以前に示されている（非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4）。したがって、老化細胞は、*in vivo* で代謝回転し得、免疫系はこの代謝回転に寄与する。免疫系が老化細胞を認識して排除しようとすることにより、直接ではないが、老化細胞が生物にとって有害であり、排除することが有益であることが示唆される。

10

20

30

【0004】

ここ10年間で、複数の研究によって老化の誘導または老化表現型の迂回に必要な遺伝子および経路が同定されている。*p53* (*TP53*) および *p16INK4a* (*CDKN2A*) によって調節される2つの腫瘍抑制因子経路は、老化応答を制御する。*p53* は増殖を阻害する遺伝子のトランス活性化によって老化を促進する一方で、*p16INK4a* は *p53* に伴って *p21* (*CDKN1A*) をターゲティングし、サイクリン依存性キナーゼ (*CDK*) 2および4を阻害し、それにより、*pRB* リン酸化の防止および抑制性のヘテロクロマチン形成の促進が生じて増殖関連遺伝子をサイレンシングする。

30

【0005】

Bcl-2-ファミリータンパク質は、細胞死の制御において中心的役割を果たし、アポトーシス、壞死、および自食作用を含む多様な細胞死機構を制御することができる（非特許文献5；非特許文献6）。老化における最初のファミリーメンバー (*Bcl-2*) の機能については、依然として議論の余地がある。*Bcl-2* は、老化細胞を上方制御または下方制御すると提案され、これらの細胞のアポトーシスの負または正の制御のいずれかに関連していた（非特許文献7；非特許文献8）。*Bcl-2* に加えて、このファミリーは、抗アポトーシスタンパク質 *Bcl-xL*、*Bcl-w*、*Mcl-1*、および *A1* を含み、癌における薬理学的介入のための標的として集中的に研究されている（非特許文献9；非特許文献10）。

40

【0006】

特許文献1は、癌処置のための *Bcl-xL* を下方制御する化学物質を教示している。

【0007】

特許文献2は、癌処置のための *Bcl-2* ファミリーメンバーに対してターゲティングされる *dS RNA* を含む薬学的組成物を教示している。

【0008】

特許文献3は、*Bcl-xL* および *p21* が含まれる多数の遺伝子に対してターゲティングされる *sirNA* の投与を教示している。

50

【0009】

特許文献4は、癌処置のための *p21* を下方制御する化学物質の投与を教示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許出願公開第20120189539号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第20040001811号明細書

【特許文献3】米国特許出願公開第20070258952号明細書

【特許文献4】米国特許出願公開第20110301192号明細書

【非特許文献】

【0011】

- (非特許文献1) Baker et al., 2011
- (非特許文献2) Krizhanovsky et al., 2008b
- (非特許文献3) Sagiv et al., 2012
- (非特許文献4) Xue et al., 2007
- (非特許文献5) Cory et al., 2003
- (非特許文献6) Reed, 2008
- (非特許文献7) Uraoka et al., 2011
- (非特許文献8) Wang, 1995
- (非特許文献9) Azmi et al., 2011
- (非特許文献10) Zeitlin et al., 2008

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、炎症性疾患または線維性疾患の処置を必要とする被験体における炎症性疾患または線維性疾患を処置する方法であって、治療有効量のBcl-xLおよび/またはBcl-wの活性および/または量を下方制御する薬剤を前記被験体に投与し、それにより、前記炎症性疾患または線維性疾患を処置する工程を含み、但し、前記炎症性疾患が癌ではないことを条件とする、方法を提供する。本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、

20

(i) Bcl-xLおよび/またはBcl-wの活性および/または量を下方制御する薬剤；および (ii) p21の活性および/または量を下方制御する薬剤を含む製品を提供する。

20

【0013】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、薬学的に許容され得るキャリアおよび活性薬剤としての以下：

30

(i) Bcl-xLおよび/またはBcl-wの活性および/または量を下方制御する薬剤；および (ii) p21の活性および/または量を下方制御する薬剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0014】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、疾患が癌でない炎症性疾患または線維性疾患の処置で用いるサイクリン依存性キナーゼインヒビター1(p21)の活性および/または量を下方制御する薬剤を提供する。

【0015】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、炎症性疾患または線維性疾患の処置で用いるBcl-xLを発現する内因性核酸配列を下方制御するポリヌクレオチド薬およびBcl-wを発現する内因性核酸配列を下方制御するポリヌクレオチド薬を提供する。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、キャリア、p21の活性および/または量を下方制御する少なくとも1つの活性薬剤、ならびにBcl-xLおよび/またはBcl-wの活性および/または量を下方制御する少なくとも1つの活性薬剤を含む組成物であって、前記組成物が局所投与のために処方されている、組成物を提供する。

40

【0017】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、炎症性疾患または線維性疾患の処置を必要とする被験体における炎症性疾患または線維性疾患を処置する方法であって、治療有効量のサイクリン依存性キナーゼインヒビター1(p21)の活性および/または量を下方制御する薬剤を前記被験体に投与し、それにより、前記炎症性疾患または線維性疾患を処置する工程を含み、但し、前記疾患が癌ではないことを条件とする、方法を提供する。

【0018】

50

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、炎症性疾患または線維性疾患の処置を必要とする被験体における炎症性疾患または線維性疾患を処置する方法であって、治療有効量の B c 1 - x L を発現する内因性核酸配列を下方制御する少なくとも 1 つのポリヌクレオチド薬および B c 1 - w を発現する内因性核酸配列を下方制御する少なくとも 1 つのポリヌクレオチド薬を前記被験体に投与し、それにより、前記炎症性疾患または線維性疾患を処置する工程を含む、方法を提供する。

【0019】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、前悪性病変の処置を必要とする被験体における前悪性病変を処置する方法であって、治療有効量の B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する薬剤を前記被験体に投与し、それにより、前記前悪性病変を処置する工程を含む、方法を提供する。 10

【0020】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、前悪性病変の処置を必要とする被験体における前悪性病変を処置する方法であって、治療有効量のサイクリン依存性キナーゼインヒビター 1 (p 2 1) の活性および / または量を下方制御する薬剤を前記被験体に投与し、それにより、前記前悪性病変を処置する工程を含む、方法を提供する。

【0021】

本発明のいくつかの実施形態によれば、薬剤は化学物質である。

【0022】

本発明のいくつかの実施形態によれば、薬剤は、 B c 1 - x L および / または B c 1 - w に対してターゲティングされるポリヌクレオチド薬である。 20

【0023】

本発明のいくつかの実施形態によれば、疾患は軟骨変性に関連する。

【0024】

本発明のいくつかの実施形態によれば、疾患は、肝臓線維症、創傷治癒、皮膚線維症、肺疾患、骨粗鬆症、腎臓線維症、前立腺炎、アテローム性動脈硬化症、関節炎、および脾炎からなる群から選択される。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態によれば、肺疾患は慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) を含む。 30

【0026】

本発明のいくつかの実施形態によれば、 B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する薬剤は、 p 2 1 の活性および / または量を下方制御する薬剤と異なるパッケージングに含まれる。

【0027】

本発明のいくつかの実施形態によれば、 B c 1 - x L および / または B c 1 - w の活性および / または量を下方制御する薬剤は、 p 2 1 の活性および / または量を下方制御する薬剤と同一のパッケージングに含まれる。

【0028】

本発明のいくつかの実施形態によれば、製品は、皮脂調節剤、抗菌薬および / または抗真菌薬、角質溶解薬および / または角質調節剤、收敛薬、抗炎症剤および / または抗刺激剤、抗酸化剤および / またはフリー・ラジカル消去剤、瘢痕形成剤、老化防止剤、および保湿剤からなる群から選択される少なくとも 1 つの薬剤をさらに含む。 40

【0029】

本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも 1 つの薬剤は老化防止剤である。

【0030】

本発明のいくつかの実施形態によれば、薬学的組成物を局所送達のために処方する。

【0031】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド薬は s i R N A 薬である。

【0032】

本発明のいくつかの実施形態によれば、Bcl-xLおよび/またはBcl-wの活性および/または量を下方制御する少なくとも1つの活性薬剤はABT-737またはABT-263である。

【0033】

本発明のいくつかの実施形態によれば、組成物は、皮脂調節剤、抗菌薬および/または抗真菌薬、角質溶解薬および/または角質調節剤、収斂薬、抗炎症剤および/または抗刺激剤、抗酸化剤および/またはフリーラジカル消去剤、瘢痕形成剤、老化防止剤、および保湿剤からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤をさらに含む。

【0034】

本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも1つの薬剤は老化防止剤である。

10

【0035】

本発明のいくつかの実施形態によれば、薬剤は、p21を発現する内因性核酸配列に指向するポリヌクレオチドである。

【0036】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド薬はsiRNAである。

【0037】

本発明のいくつかの実施形態によれば、本方法は、Bcl-xLおよび/またはBcl-wの活性および/または量を下方制御する少なくとも1つの薬剤を被験体に投与する工程をさらに含む。

【0038】

本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも1つの薬剤は、Bcl-xLおよび/またはBcl-wを発現する内因性核酸配列に指向するポリヌクレオチドである。

20

【0039】

本発明のいくつかの実施形態によれば、薬剤は、Bcl-xLおよび/またはBcl-wに対して指向するsiRNAである。

【0040】

本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも1つの薬剤は化学物質である。

【0041】

本発明のいくつかの実施形態によれば、化学物質は、ABT-737、ABT-263、ゴッシップール、AT-101、TW-37、およびオバトクラックスからなる群から選択される。

30

【0042】

本発明のいくつかの実施形態によれば、疾患は軟骨変性に関連する。

【0043】

本発明のいくつかの実施形態によれば、疾患は、肝臓線維症、創傷治癒、皮膚線維症、肺疾患、腎臓線維症、前立腺炎、アテローム性動脈硬化症、関節炎、および膵炎からなる群から選択される。

【0044】

本発明のいくつかの実施形態によれば、薬剤を局所組成物として処方する。

【0045】

本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも1つのポリヌクレオチド薬はsiRNAを含む。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態によれば、疾患は癌である。

【0047】

本発明のいくつかの実施形態によれば、疾患は、肝臓線維症、創傷治癒、皮膚線維症、肺疾患、腎臓線維症、前立腺炎、アテローム性動脈硬化症、関節炎、および膵炎からなる群から選択される。

【0048】

本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも1つの薬剤を局所組成物として処方す

40

50

る。

【0049】

本発明のいくつかの実施形態によれば、本方法は、p21の活性および／または量を下方制御する薬剤を被験体に投与する工程をさらに含む。

【0050】

他で定義しない限り、本明細書中で使用した全ての技術用語および／または科学用語は、本発明に属する当業者によって一般的に理解されている意味を有する。本明細書中に記載の方法と材料に類似するか等価な方法と材料を本発明の実施形態の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および／または材料を以下に記載する。矛盾する場合、本明細書（定義が含まれる）に従うであろう。さらに、材料、方法、および例は、例示のみを目的とし、本発明を必然的に制限することを意図しない。

10

【0051】

本発明のいくつかの実施形態を、ほんの一例として、添付の図面および画像を参照して本明細書中に記載する。ここで詳細な図面を具体的に参照することにより、示した特徴が本発明の実施形態の例示および考察の説明を目的とすることが強調される。これに関して、図面と共に記載した説明により、本発明の実施形態をどのようにして実施することができるかが当業者に明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1A】図1Aは、老化細胞中のBcl-wタンパク質およびBcl-xLタンパク質の発現の上昇を示す。ビヒクリ処置した成長中の細胞に対応する細胞ライセート（IMR-90およびMEF）（G）、老化を誘導するためにエトポシドで処置した細胞（Eto）；空のベクターで形質導入した細胞（V）、またはH-ras^{v12}発現（H-ras^{v12}）レトロウイルスで形質導入した細胞の免疫プロット。-チューブリンをローディングコントロールとして使用した。

20

【図1B】図1Bは、老化細胞中のBcl-wタンパク質およびBcl-xLタンパク質の発現の上昇を示す。Aに記載のように処置したIMR-90細胞に対して実施したSA-gal活性染色。

【図1C】図1Cは、老化細胞中のBcl-wタンパク質およびBcl-xLタンパク質の発現の上昇を示す。Aに記載のように処置したIMR-90細胞中のBcl-2、Bcl-w、およびBcl-xLのmRNAレベルの定量的RT-PCR分析。値は平均+SEMである。

30

【図2A】図2Aは、Bcl-wおよびBcl-xLの組み合わせノックダウンによって老化細胞の死滅が誘導されることを示す。エトポシド処置した老化IMR-90細胞を、表示のsiRNAでトランスフェクトした。細胞生存度を、トランスフェクションの4日後に決定した。

【図2B】図2Bは、Bcl-wおよびBcl-xLの組み合わせノックダウンによって老化細胞の死滅が誘導されることを示す。エトポシド処置した老化細胞の表示のsiRNAでのトランスフェクションの4日後のBcl-2、Bcl-w、およびBcl-xLの発現についてのウェスタンプロット分析。-チューブリンをローディングコントロールとして使用した。

40

【図3A】図3Aは、Bcl-wおよびBcl-xLの組み合わせノックダウンが老化細胞死を誘導することを示す。エトポシド処置した老化IMR-90細胞を、表示のsiRNAでトランスフェクトした。細胞生存度を、トランスフェクションの4日後に決定した。

【図3B】図3Bは、Bcl-wおよびBcl-xLの組み合わせノックダウンが老化細胞死を誘導することを示す。エトポシド処置した老化IMR-90細胞を、表示のsiRNAでトランスフェクトした。トランスフェクションの3日後、細胞を、10µABT-199またはコントロールとしてのDMSOで24時間処置した。細胞生存度を、インキュベーション期間の終了時に決定した。

50

【図3C】図3Cは、Bcl-wおよびBcl-xLの組み合わせノックダウンが老化細胞死を誘導することを示す。成長中のビヒクル処置(G)、老化工トポシド処置(E)、空のベクターでの形質導入(V)、またはH-ras^{V12}発現(H-ras^{V12})レトロウイルスでの形質導入を行ったIMR-90細胞を、ABT-199で24時間処置した。細胞生存度を、インキュベーション期間の終了時に決定した。Bcl-2阻害に感受性を示すSH-SY5Y細胞を処置のポジティブコントロールとして使用した。

【図3D】図3Dは、Bcl-wおよびBcl-xLの組み合わせノックダウンが老化細胞死を誘導することを示す。成長中のビヒクル処置(G)、老化工トポシド処置(E)、空のベクターでの形質導入(V)、またはH-ras^{V12}発現(H-ras^{V12})レトロウイルスでの形質導入を行ったMEF細胞を、ABT-199で24時間処置した。細胞生存度を、インキュベーション期間の終了時に決定した。
10

【図4A】図4Aは、BH3模倣ABT-737が老化細胞の細胞死を誘導することを示す。成長中(G)、エトポシド処置(Eto)、空のベクターでの形質導入(V)、またはH-ras^{V12}発現(H-ras^{V12})レトロウイルスでの形質導入を行ったIMR-90細胞を、表示の用量のABT-737またはコントロールとしてのDMSOで24時間処置した。細胞生存度を、インキュベーション期間の終了時に決定した。

【図4B】図4Bは、BH3模倣ABT-737が老化細胞の細胞死を誘導することを示す。成長中(G)、エトポシド処置(Eto)、空のベクターでの形質導入(V)、またはH-ras^{V12}発現(H-ras^{V12})レトロウイルスでの形質導入を行ったMEF細胞を、表示の用量のABT-737またはコントロールとしてのDMSOで24時間処置した。細胞生存度を、インキュベーション期間の終了時に決定した。
20

【図5A】図5Aは、z-VAD-fmkの存在下または非存在下でABT-737またはコントロールとしてのDMSOで24時間処置した成長中(G)、エトポシド処置(Eto)、またはH-ras^{V12}(Ras)発現レトロウイルスでの形質導入を行ったIMR-90細胞を示す。細胞生存度を、インキュベーション期間の終了時に決定した。

【図5B】図5Bは、z-VAD-fmkの存在下または非存在下でABT-737またはコントロールとしてのDMSOで24時間処置した成長中(G)、エトポシド処置(Eto)、またはH-ras^{V12}(Ras)発現レトロウイルスでの形質導入を行ったIMR-90細胞を示す。(B)表示のようにDMSO、ABT-737、またはABT-737+z-VAD-fmkの存在下での成長中の細胞(G)、エトポシド処置細胞(Eto)、またはH-ras^{V12}(Ras)発現レトロウイルスで形質導入した細胞に対応する細胞ライセートの免疫プロットを示す。-チューブリンをローディングコントロールとして使用した。
30

【図6A】6Aは、p21が老化細胞の生存度に影響を及ぼすことを示す。成長中(G)およびエトボシド(Eto)処置した初代のヒト(IMR-90、BJ)およびマウス(MEF)の線維芽細胞ならびに肺癌細胞(H1299)を、p21に対するsiRNAまたはコントロールsiRNAでトランスフェクトした。細胞生存度を、トランスフェクションの4日後に決定した。

【図6B】6Bは、p21が老化細胞の生存度に影響を及ぼすことを示す。成長中(G)およびエトボシド(Eto)処置した初代のヒト(IMR-90、BJ)およびマウス(MEF)の線維芽細胞ならびに肺癌細胞(H1299)を、p21に対するsiRNAまたはコントロールsiRNAでトランスフェクトした。細胞生存度を、トランスフェクションの4日後に決定した。
40

【図6C】6Cは、p21が老化細胞の生存度に影響を及ぼすことを示す。成長中(G)およびエトボシド(Eto)処置した初代のヒト(IMR-90、BJ)およびマウス(MEF)の線維芽細胞ならびに肺癌細胞(H1299)を、p21に対するsiRNAまたはコントロールsiRNAでトランスフェクトした。細胞生存度を、トランスフェクションの4日後に決定した。

【図6D】6Dは、p21が老化細胞の生存度に影響を及ぼすことを示す。成長中(G)およびエトボシド(Eto)処置した初代のヒト(IMR-90、BJ)およびマウス(50

M E F) の線維芽細胞ならびに肺癌細胞 (H 1 2 9 9) を、 p 2 1 に対する s i R N A またはコントロール s i R N A でトランスフェクトした。細胞生存度を、トランスフェクションの 4 日後に決定した。

【図 6 E】図 6 E は、 p 2 1 が老化細胞の生存度に影響を及ぼすことを示す。成長中 (G) およびエトボシド (E t o) 処置した初代のヒト (I M R - 9 0 、 B J) およびマウス (M E F) の線維芽細胞ならびに肺癌細胞 (H 1 2 9 9) を、 p 2 1 に対する s i R N A またはコントロール s i R N A でトランスフェクトした。細胞生存度を、トランスフェクションの表示の時点で決定した。

【図 7 A】図 7 A は、 p 2 1 が p 5 3 および p R B に依存しない様式で老化細胞の生存度を維持することを示す。 p 2 1 の s i R N A またはコントロール s i R N A での成長中の細胞 (G) およびエトボシド処置した B J 細胞 (E t o) のトランスフェクションの 4 日後の表示のタンパク質についてのウェスタンプロット分析を示す。 - チューブリンをローディングコントロールとして使用した。

【図 7 B】図 7 B は、 p 2 1 が p 5 3 および p R B に依存しない様式で老化細胞の生存度を維持することを示す。エトボシド処置した B J 細胞を、表示の s i R N A でトランスフェクトした。細胞生存度を、トランスフェクションの 4 日後に決定した。同時に、細胞ライセートを回収し、ウェスタンプロットによって分析して表示のタンパク質の効率的なノックダウンを検証した。

【図 7 C】図 7 C は、 p 2 1 が p 5 3 および p R B に依存しない様式で老化細胞の生存度を維持することを示す。エトボシド処置した B J 細胞を、表示の s i R N A でトランスフェクトした。細胞生存度を、トランスフェクションの 4 日後に決定した。同時に、細胞ライセートを回収し、ウェスタンプロットによって分析して表示のタンパク質の効率的なノックダウンを検証した。

【図 8】図 8 は、カスパーーゼ活性の阻害が老化細胞をアポトーシスから部分的に救済することを示すグラフである。エトボシド処置した B J 細胞を、 s i p 2 1 またはコントロール s i R N A でトランスフェクトした。細胞を、 z - V A D - f m k (毎日補充する) の存在下または非存在下で 4 日間インキュベートした。細胞生存度を、インキュベーション期間の終了時に決定した。

【図 9 A】図 9 A は、 E 2 F 標的および炎症遺伝子が p 2 1 ノックダウンに応答して上方制御されることを示す。表示の遺伝子についての成長中の B J 細胞 (G) およびエトボシド (E t o) 処置した B J 細胞の m R N A レベルの定量的 R T - P C R 分析。 G A P D H m R N A を基準として使用した。データを、 3 回の独立した R T - P C R 分析の平均 + S E M として示した。

【図 9 B】図 9 B は、 E 2 F 標的および炎症遺伝子が p 2 1 ノックダウンに応答して上方制御されることを示す。表示の遺伝子についての成長中の B J 細胞 (G) およびエトボシド (E t o) 処置した B J 細胞の m R N A レベルの定量的 R T - P C R 分析。 G A P D H m R N A を基準として使用した。データを、 3 回の独立した R T - P C R 分析の平均 + S E M として示した。

【図 9 C】図 9 C は、 E 2 F 標的および炎症遺伝子が p 2 1 ノックダウンに応答して上方制御されることを示す。表示の遺伝子についての成長中の B J 細胞 (G) およびエトボシド (E t o) 処置した B J 細胞の m R N A レベルの定量的 R T - P C R 分析。 G A P D H m R N A を基準として使用した。データを、 3 回の独立した R T - P C R 分析の平均 + S E M として示した。

【図 9 D】図 9 D は、 E 2 F 標的および炎症遺伝子が p 2 1 ノックダウンに応答して上方制御されることを示す。表示の遺伝子についての成長中の B J 細胞 (G) およびエトボシド (E t o) 処置した B J 細胞の m R N A レベルの定量的 R T - P C R 分析。 G A P D H m R N A を基準として使用した。データを、 3 回の独立した R T - P C R 分析の平均 + S E M として示した。

【図 9 E】図 9 E は、 E 2 F 標的および炎症遺伝子が p 2 1 ノックダウンに応答して上方制御されることを示す。表示の遺伝子についての成長中の B J 細胞 (G) およびエトボシド (E t o) 処置した B J 細胞の m R N A レベルの定量的 R T - P C R 分析。 G A P D H m R N A を基準として使用した。データを、 3 回の独立した R T - P C R 分析の平均 + S E M として示した。

10

20

30

40

50

ド(E t o) 处置した B J 細胞の m R N A レベルの定量的 R T - P C R 分析。 G A P D H m R N A を基準として使用した。データを、3回の独立した R T - P C R 分析の平均 + S E M として示した。

【図 10】図 10 は、 p 2 1 ノックアウトマウスにおいて老化細胞および線維性瘢痕の両方の存在が減少したことを示す写真である。野生型マウスおよび p 2 1 - / - (ノックアウト) マウスを、線維症を誘導するための C C 1₄ での 6 週間の処置に供した。処置後、肝臓を、老化細胞の存在については S A - - g a 1 によって評価し、線維性瘢痕形成についてはシリウスレッド染色によって評価した。

【発明を実施するための形態】

【0 0 5 3】

発明の特定の実施形態の説明

【0 0 5 4】

本発明は、そのいくつかの実施形態では、加齢性障害の処置のための B c 1 - 2 - ファミリータンパク質および / または p 2 1 をコードする遺伝子の下方制御によって老化細胞を死滅させる方法に関する。本発明の少なくとも 1 つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明が以下の説明に記載されるか実施例によって例示される詳細な説明に必ずしも制限されないことを理解すべきである。本発明は、他の実施形態を種々の方法で実施または実行することが可能である。

【0 0 5 5】

老化細胞を、皮膚、肝臓、肺、脾臓、前立腺の線維性疾患または炎症性疾患、ならびに関節軟骨、アテローム斑、および他の年齢関連疾患で見出すことができる。さらに、老化細胞は、老化に伴って正常組織、特に皮膚に蓄積することが示されており、組織の老化に寄与することが示唆された。したがって、老化細胞の排除により、多数の組織の老化を有意に遅延させ、老化細胞が存在する病的状態を処置することができる。

【0 0 5 6】

本発明者らは、 s i R N A (図 2 A ~ B および 3 A ~ B) または B c 1 - 2 ファミリーの特異的インヒビター (A B T - 7 3 7 ; 図 4 A ~ B および 5 A ~ B) のいずれかによる B c 1 - x L および B c 1 - w の組み合わせ阻害によって老化細胞が特異的に排除されることを示した。 B c 1 - 2 自体の阻害ではこの課題を実行することはできない (図 3 C ~ D) 。したがって、本発明者らは、 B c 1 - x L および B c 1 - w の組み合わせ阻害により老化細胞の特異的排除が可能であり、この組み合わせ阻害を使用して老化細胞が存在する疾患を処置することができると提案する。

【0 0 5 7】

驚いたことに、本発明者らは、典型的には (C D K 4 および C D K 2 のインヒビターとして) 老化開始および腫瘍抑制に関連するタンパク質である p 2 1 の発現の低下 (図 6 A ~ E および図 7 A ~ C) によって老化細胞に同一の影響を及ぼすことができるこことを発見した。成長中の細胞における p 2 1 ノックダウンが細胞生存度に悪影響を及ぼさなかったのに対して、老化細胞におけるそのノックダウンにより I M R - 9 0 細胞、 B J 細胞、 H 1 2 9 9 細胞、および M E F 細胞の各々について細胞生存度が 3 0 % 、 5 0 % 、 7 5 % 、および 3 0 % 減少した (図 6 A) 。したがって、本発明者らは、 p 2 1 が老化細胞の生存度を維持するために必要であることを提案する。

【0 0 5 8】

R B タンパク質リン酸化のインヒビターとしての p 2 1 の機能から予想されるように、 p 2 1 ノックダウンに応答して細胞周期の E 2 F 媒介制御に関連する遺伝子 (例えば、サイクリン - A 2 および C D K - 1) の m R N A レベルが有意に増加した (図 9) 。さらに、予想外に、 p 2 1 ノックダウンにより I L - 8 および I L - 1 の m R N A レベルが増加することが見出され、これは老化細胞死に関与する炎症応答を示す。したがって、本発明者らは、 p 2 1 ノックダウンが老化細胞における炎症誘発性応答および細胞死を誘導すると結論づけた。このことにより、炎症性サイトカインが免疫系に動員されてノックダウン自体によって排除されなかった細胞を死滅させて、その治療能が増大し得る。

10

20

30

40

50

【0059】

したがって、本発明者らは、p 2 1 ノックダウンによって誘導される炎症誘発性応答を伴うB c l - x L およびB c l - w を下方制御する（それにより、細胞死を誘導する）薬剤による老化細胞におけるアポトーシスの直接的な誘導の組み合わせが、前悪性病変、損傷組織、および老化組織から老化細胞を有効に排除することを提案する。これにより、老化細胞が存在する種々の容態に重要な治療的影響を及ぼすであろう。

【0060】

したがって、本発明の1つの態様によれば、炎症性疾患または線維性疾患の処置を必要とする被験体における炎症性疾患または線維性疾患を処置する方法であって、治療有効量のB c l - x L および / またはB c l - w および / またはp 2 1 の活性および / または量を下方制御する薬剤を被験体に投与する工程を含む方法を提供する。
10

【0061】

用語「B c l - x L 」は、配列番号2 1 に記載の配列ならびにそのホモログおよびオルソログを有するB 細胞リンパ腫 - エクストララージとしても公知のヒトタンパク質をいう。ヒトB c l - x L のc D N A 配列を配列番号2 2 に記載する。

【0062】

用語「B c l - w 」は、配列番号2 3 に記載の配列ならびにそのホモログおよびオルソログを有するB c l - 2 様タンパク質2 としても公知のヒトタンパク質をいう。ヒトB c l - w のc D N A 配列を配列番号2 4 に記載する。

【0063】

「サイクリン依存性キナーゼインヒビター1」としても公知の用語「p 2 1 」は、配列番号2 5 に記載の配列ならびにそのホモログおよびオルソログを有するヒトタンパク質をいう。ヒトp 2 1 のc D N A 配列を配列番号2 6 に記載する。
20

【0064】

特定の実施形態によれば、本方法は、B c l - x L およびB c l - w の下方制御を含む。

【0065】

別の実施形態によれば、本方法は、B c l - x L 、B c l - w 、およびp 2 1 のそれぞれの下方制御を含む。

【0066】

さらに別の実施形態によれば、本方法は、p - 2 1 の下方制御およびB c l - x L の下方制御を含む。
30

【0067】

さらに別の実施形態によれば、本方法は、p - 2 1 の下方制御およびB c l - w の下方制御を含む。

【0068】

本明細書中で使用する場合、標的タンパク質の「活性および / または量の下方制御」という句は、少なくとも10 %、少なくとも20 %、少なくとも30 %、少なくとも40 %、少なくとも50 %、少なくとも60 %、少なくとも70 %、少なくとも80 %、またはさらに少なくとも90 %の下方制御をいう。さらに、用語「下方制御」はまた、完全な阻害をいうことができる。
40

【0069】

B c l - x L および / またはB c l - w および / またはp 2 1 の下方制御を、化学物質を使用して行うことができる。B c l - x L および / またはB c l - w の活性を減少させることができが公知の化学物質には、A B T - 7 3 7 、A B T - 2 6 3 、ゴッシポール、A T - 1 0 1 、T W - 3 7 、およびオバトクラックスが含まれる。

【0070】

特定の実施形態によれば、薬剤はA B T - 7 3 7 またはA B T - 2 6 3 である。

【0071】

A B T - 7 3 7 およびA B T - 2 6 3 (A B T - 2 6 3 は、「ノバトクラックス」(A b
50

b o t) と呼ばれる生物学的に利用可能な形態である) は、現在、多発性骨髄腫、リンパ腫、急性白血病、C L L、小細胞肺癌について第 I I 相 (フェーズ) 試験中である。

【 0 0 7 2 】

ゴッシポール (天然) は、頭頸部腫瘍、膵臓癌について第 I I / 第 I I I 相試験中である。

【 0 0 7 3 】

A T - 1 0 1 (ゴッシポール誘導体 ; A s c e n t a T h e r a p e u t i c s) は、膵臓癌、頭頸部癌、神経膠腫について第 I I / I I I 相試験中である。

【 0 0 7 4 】

T W - 3 7 (U n i M i c h i g a n) は、膵臓癌、リンパ腫について第 I I 相試験中である。 10

【 0 0 7 5 】

オバトクラックス (G X 1 5 - 0 7 0 M S ; G e m i n X 、その後セファロン、現在 T e v a) は、骨髄腫、骨髄線維症、およびマントル細胞リンパ腫について第 I I 相試験中である。

【 0 0 7 6 】

p 2 1 の活性を下方制御する化学物質の例は、米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 3 0 1 1 9 2 号明細書 (本明細書中で参照として援用される) に開示されている。 10

【 0 0 7 7 】

B c 1 - x L および / または B c 1 - w および / または p 2 1 を、転写および / または翻訳を干渉する種々の分子 (例えば、R N A サイレンシング剤、リボザイム、D N A ザイム、およびアンチセンス) を使用してゲノムおよび / または転写レベルで下方制御するか、例えば、アンタゴニストおよびポリペプチドを切断する酵素などを使用してタンパク質レベルで下方制御することもできる。 20

【 0 0 7 8 】

以下は、B c 1 - x L および / または B c 1 - w および / または p 2 1 の発現レベルおよび / または活性を下方制御することができる薬剤のリストである。

【 0 0 7 9 】

B c 1 - x L および / または B c 1 - w および / または p 2 1 を下方制御することができる薬剤の一例は、これらに特異的に結合することができる抗体または抗体フラグメントである。好ましくは、抗体は細胞によって内在化され得る。 30

【 0 0 8 0 】

用語「抗体」には、本発明で使用する場合、マクロファージに結合することができるインタクトな分子ならびにその機能的フラグメント (F a b 、 F (a b ') 2 、および F v など) が含まれる。これらの機能的抗体フラグメントを以下のように定義する： (1) F a b (抗体分子の一価の抗原結合フラグメントを含み、全抗体を酵素パパインで消化してインタクトな軽鎖および 1 つの重鎖の一部を生成することによって産生することができるフラグメント) ； (2) F a b ' (全抗体をペプシンで処理しその後に還元してインタクトな軽鎖および重鎖の一部を生成することによって得ることができる抗体分子のフラグメント ; 1 抗体分子あたり 2 つの F a b ' フラグメントが得られる) ； (3) (F a b ') 2 (全抗体を酵素ペプシンで処理しその後の還元を行わないことによって得ることができる抗体のフラグメント ; F (a b ') 2 は 2 つのジスルフィド結合によって相互に保持された 2 つの F a b ' フラグメントの二量体である) ； (4) F v (2 つの鎖として発現された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝子操作されたフラグメントとして定義される) ；および (5) 単鎖抗体 (「 S C A 」) (遺伝子融合された単鎖分子として適切なポリペプチドリンクによって連結された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝子操作された分子) 。 40

【 0 0 8 1 】

B c 1 - x L および / または B c 1 - w および / または p 2 1 を、R N A サイレンシングによって下方制御することもできる。本明細書中で使用する場合、句「 R N A サイレンシ 50

ング」は、結果的に対応するタンパク質コード遺伝子の発現が抑制または「サイレンシング」されるRNA分子によって媒介される調節機構群（例えば、RNA干渉（RNAi）、転写後遺伝子サイレンシング（TGS）、転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）、クエリング、相互抑制、および翻訳抑制）をいう。RNAサイレンシングは、多数の生物タイプ（植物、動物、および真菌が含まれる）で認められている。

【0082】

本明細書中で使用する場合、用語「RNAサイレンシング薬」は、標的遺伝子の発現を阻害または「サイレンシング」することができるRNAをいう。一定の実施形態では、RNAサイレンシング薬は、転写後サイレンシング機構によってmRNA分子の完全なプロセシング（例えば、完全な翻訳および／または発現）を防止することができる。RNAサイレンシング薬には、非コードRNA分子（例えば、対の鎖を含むRNA二重鎖）およびかかる小非コードRNAを生成することができる前駆体RNAが含まれる。例示的なRNAサイレンシング薬には、dsRNA（siRNA、miRNA、およびshRNAなど）が含まれる。1つの実施形態では、RNAサイレンシング薬はRNA干渉を誘導することができる。別の実施形態では、RNAサイレンシング薬は、翻訳抑制を媒介することができる。

10

【0083】

RNA干渉は、短干渉RNA（siRNA）によって媒介された動物における配列特異的転写後遺伝子サイレンシング過程をいう。植物における対応する過程を、一般に、転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングといい、真菌においてはクエリングともいう。転写後遺伝子サイレンシング過程は、外来遺伝子の発現を防止するために使用される進化的に保存された細胞防御機構と考えられ、一般に、多様な植物相および門で共有されている。かかる外来遺伝子発現からの防御は、相同な一本鎖RNAまたはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答を介した宿主ゲノム内へのウイルス感染またはトランスポゾンエレメントの無作為な取り込みに由来する二本鎖RNA（dsRNA）の產生に応答して進化したかもしれない。

20

【0084】

細胞内に長いdsRNAが存在することにより、ダイサーと呼ばれるリボヌクレアーゼII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNAの短干渉RNA（siRNA）として公知のdsRNAの短片へのプロセシングに関与する。ダイサー活性由来の短干渉RNAは、典型的には、約21～約23ヌクレオチド長であり、約19塩基対の二重鎖を含む。RNAi応答はまた、一般に、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）と呼ばれるエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、この複合体は、siRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAは、siRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域の中央で切断される。

30

【0085】

したがって、本発明は、mRNAからのタンパク質発現を下方制御するためのdsRNAの使用を意図する。

【0086】

1つの実施形態によれば、dsRNAは30bpを超える。長dsRNA（すなわち、30bpを超えるdsRNA）は、これらのより長い二本鎖RNA領域によってインターフェロンおよびPKR応答が誘導されると考えられており、その使用は非常に制限されてきた。しかし、長dsRNAの使用により、細胞が多数のsiRNAを試験する必要性を軽減する最適なサイレンシング配列を選択することができるという点、長dsRNAによりサイレンシングライブラリーがsiRNAにおいて必要とされるよりも複雑でないという点、および、おそらく、もっとも重要なことは、長dsRNAは治療薬として使用した場合にウイルス回避変異を防止することができるという点で多数の利点を得ることができる。

40

【0087】

種々の研究において、長dsRNAを使用してストレス応答の誘導や有意なオフターゲッ

50

ト効果を生じることなく遺伝子発現をサイレンシングすることができることが示されている（例えば、Strat et al., Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 13 3803 - 3810; Bhargava et al. Brain Res. Protoc. 2004; 13: 115 - 125; Diallo M., et al., Oligonucleotides. 2003; 13: 381 - 392; Paddison P. J., et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002; 99: 1443 - 1448; Tran N., et al., FEBS Lett. 2004; 573: 127 - 134 を参照のこと）。

【0088】

10

特に、本発明はまた、インターフェロン経路が活性化されない細胞（例えば、胚細胞および卵母細胞）における遺伝子サイレンシングのための長dsRNA（30塩基超の転写物）の誘導を意図する（例えば、Billey et al., PNAS 2001, Vol 98, pages 14428 - 14433 および Diallo et al., Oligonucleotides, October 1, 2003, 13(5): 381 - 392. doi: 10.1089/154545703322617069 を参照のこと）。

【0089】

20

本発明はまた、遺伝子発現を下方制御するためのインターフェロンおよびPKR経路を誘導しないように特異的にデザインされた長dsRNAの導入を意図する。例えば、Shinagwa and Ishii (Genes & Dev. 17(11): 1340 - 1345, 2003) は、RNAポリメラーゼII (Pol II) プロモーター由来の長二本鎖RNAを発現するためのpDECAPと呼ばれるベクターを開発した。pDECAP由来の転写物が細胞質へのdsRNA排出を容易にする5' - cap構造および3' - ポリ(A)テールの両方を欠くので、pDECAP由来の長ds-RNAはインターフェロン応答を誘導しない。

【0090】

哺乳動物系におけるインターフェロンおよびPKR経路の別の回避方法は、トランスフェクションまたは内因性発現のいずれかを介した小阻害RNA (siRNA) の導入による方法である。

30

【0091】

用語「siRNA」は、RNA干渉 (RNAi) 経路を誘導する小阻害RNA二重鎖（一般に、18 ~ 30塩基対）をいう。典型的には、siRNAは、中央の19bp二重鎖領域および末端の対称性の2塩基の3' - オーバーハングを有する21量体として化学合成されるが、25 ~ 30塩基長の化学合成されたRNA二重鎖は同一の位置の21量体と比較して効力が100倍も増加し得ることが最近記載されている。RNAi誘発においてより長いRNAを使用して得られる効力の増加は、産物（21量体）の代わりに基質（27量体）をダイサーに提供することに起因し、これによりRISC内へのsiRNA二重鎖の侵入の速度または効率が改善されると理論立てられる。

【0092】

40

3' - オーバーハングの位置がsiRNAの効力に影響を及ぼし、アンチセンス鎖上に3' - オーバーハングを有する対称性の二重鎖が一般にセンス鎖上に3' - オーバーハングを有するものより効力が高いことが見出されている (Rose et al., 2005)。反対の有効性パターンがアンチセンス転写物のターゲティング時に認められるので、これはRISC中への非対称性鎖負荷に寄与し得る。

【0093】

1つを超えるsiRNA薬を使用してBcl-xLまたはBcl-wおよび/またはp21をターゲティングすることができると認識されるであろう。したがって、本発明は、各siRNAがBcl-xL遺伝子中の異なる配列をターゲティングする、少なくとも2つのBcl-xLをターゲティングするsiRNA、少なくとも3つのBcl-xLをタ-

50

ゲティングする siRNA、または、さらに少なくとも 4 つの Bcl-xL をターゲティングする siRNA の使用を意図する。さらに、本発明は、各 siRNA が Bcl-w 遺伝子中の異なる配列をターゲティングする、少なくとも 2 つの Bcl-w をターゲティングする siRNA、少なくとも 3 つの Bcl-w をターゲティングする siRNA、または、さらに少なくとも 4 つの Bcl-w をターゲティングする siRNA の使用を意図する。さらに、本発明は、各 siRNA が p21 遺伝子中の異なる配列をターゲティングする、少なくとも 2 つの p21 をターゲティングする siRNA、少なくとも 3 つの p21 をターゲティングする siRNA、または、

さらに少なくとも 4 つの p21 をターゲティングする siRNA の使用を意図する。

【0094】

二本鎖干渉 RNA (例えば、siRNA) の鎖を連結してヘアピン構造またはステム・ループ構造 (例えば、shRNA) を形成することができる。したがって、記載のように、本発明の RNA サイレンシング薬はまた、低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) であり得る。

【0095】

用語「shRNA」は、本明細書中で使用する場合、第 1 および第 2 の相補配列領域を含むステム・ループ構造を有する RNA 薬であって、前記領域の相補度および配向が前記領域間で塩基対合が起こるのに十分であり、前記第 1 および第 2 の領域がループ領域によって連結され、前記ループが前記ループ領域内のヌクレオチド (またはヌクレオチドアナログ) の間の塩基対合の欠如に起因する、RNA 薬をいう。ループ内のヌクレオチド数は、3 ~ 23、5 ~ 15、7 ~ 13、4 ~ 9、または 9 ~ 11 の間の数およびこれらの範囲の両端の数である。ループ中のいくつかのヌクレオチドは、ループ中の他のヌクレオチドとの塩基対相互作用に関与し得る。ループを形成するために使用することができるオリゴヌクレオチド配列の例には、5' - UUCAAAGAGA - 3' (配列番号 27; Brummelkamp, T. R. et al. (2002) Science 296: 550) および 5' - UUUGUGUAU - 3' (配列番号 28; Castanotto, D. et al. (2002) RNA 8: 1454) が含まれる。得られた一本鎖オリゴヌクレオチドが RNAi 機構と相互作用することができる二本鎖領域を含むステム・ループ構造またはヘアピン構造を形成することが当業者に認識されるであろう。

【0096】

別の実施形態によれば、RNA サイレンシング薬は miRNA であり得る。miRNA は、種々のサイズの初期転写物をコードする遺伝子から作製された小 RNA である。miRNA は、動物および植物の両方で同定されている。初期転写物 (「pri-miRNA」と呼ばれる) は、種々の核酸分解工程によってより短い前駆体 miRNA、すなわち「pre-miRNA」にプロセシングされる。pre-miRNA は折りたたまれた形態で存在し、その結果最終的な (成熟) miRNA が二重鎖で存在し、この二重鎖の 2 つの鎖は miRNA (最終的に標的と塩基対を形成する鎖) と呼ばれる。pre-miRNA は、前駆体から miRNA 二重鎖を除去するダイサー形態の基質であり、その後、siRNA と同様に、二重鎖を RISC 複合体内に取り入れることができる。miRNA は遺伝子導入法によって発現することができ、完全な初期形態よりもむしろ前駆体形態の発現によって有効であり得ることが証明されている (Parizotto et al. (2004) Genes & Development 18: 2237 - 2242 および Guo et al. (2005) Plant Cell 17: 1376 - 1386)。

【0097】

siRNA と異なり、miRNA は部分的にのみ相補性を示す転写配列に結合し (Zeng et al., 2002, Molec. Cell 9: 1327 - 1333)、定常状態の RNA レベルに影響を及ぼすことなく翻訳を抑制する (Lee et al., 1993, Cell 75: 843 - 854; Wrightman et al., 1993, Cell 75: 855 - 862)。miRNA および siRNA の両方はダイサーによってプロセシングされ、RNA 誘導サイレンシング複合体の成分と会合する (Hutv

10

20

30

40

50

agner et al., 2001, Science 293: 834 - 838; Grishok et al., 2001, Cell 106: 23 - 34; Ketting et al., 2001, Genes Dev. 15: 2654 - 2659; Williams et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 6889 - 6894; Hammond et al., 2001, Science 293: 1146 - 1150; Mourlatos et al., 2002, Genes Dev. 16: 720 - 728)。最近の報告(Hutvagner et al., 2002, Science express 297: 2056 - 2060)は、siRNA経路と比較してmiRNA経路による遺伝子制御が標的転写物に対する相補度のみによって決定されることが仮説として取り上げられている。mRNA標的と部分的にのみ同一なsiRNAが、miRNAと同様に、RNA分解の誘発よりもむしろ翻訳抑制で機能すると推測されている。

10

【0098】

本発明との使用に適切なRNAサイレンシング薬を、以下のように合成することができる。第1に、Bcl-xLおよび/またはBcl-wのmRNAおよび/またはp21配列を、AAジヌクレオチド配列のAUG開始コドンを下流方向へスキャンする。各AAおよび3'隣接19ヌクレオチドの出現を、潜在的なsiRNA標的部位として記録する。非翻訳領域(UTR)が調節タンパク質結合部位でより豊富であるので、好ましくは、siRNA標的部位を読み取り枠から選択する。UTR結合タンパク質および/または翻訳開始複合体は、siRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合を干渉することができる(Tuschl ChemBiochem. 2: 239 - 245)。GAPDHについて、5'UTRに指向するsiRNAが細胞GAPDH mRNAの約90%減少を媒介し、タンパク質レベルを完全に消滅させることができるので、非翻訳領域に指向するsiRNAも有効であり得ることが認識されるであろう。

20

【0099】

第2に、潜在的な標的部位を、任意の配列アラインメントソフトウェア(NCBIサーバーから利用可能なBLASTソフトウェア(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)など)を使用して適切なゲノムデータベース(例えば、ヒト、マウス、ラットなど)と比較する。他のコード配列と有意な相同性を示す推定標的部位を除去する。

30

【0100】

適格標的配列をsiRNA合成のテンプレートとして選択する。G/C含量が55%より高い配列と比較して遺伝子サイレンシングの媒介に有効であることが証明されているので、好ましい配列はG/C含量が低い配列である。いくつかの標的部位を、評価のために標的遺伝子の長さに沿って選択することが好ましい。選択されたsiRNAのより良好な評価のために、ネガティブコントロールを併せて使用することが好ましい。ネガティブコントロールsiRNAは、好ましくは、siRNAと同一のヌクレオチド組成を含むが、ゲノムとの有意な相同性を欠く。したがって、任意の他の遺伝子といかなる有意な相同性も示さないことを条件として、siRNAのスクランブルヌクレオチド配列を使用することが好ましい。

40

【0101】

例えば、Bcl-xLを下方制御することができる適切なsiRNAは、配列番号29、30、または31のsiRNAであり得る。Bcl-wを下方制御することができる適切なsiRNAは、配列番号32、33、または34のsiRNAであり得る。p21を下方制御することができる適切なsiRNAは、配列番号35、36、または37のsiRNAであり得る。

【0102】

本発明のRNAサイレンシング薬がRNAのみを含む分子に限定される必要はないが、化学修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに含むと認識されるであろう。

【0103】

50

いくつかの実施形態では、本明細書中に提供したRNAサイレンシング薬を、細胞透過性ペプチドと機能的に会合することができる。本明細書中で使用する場合、「細胞透過性ペプチド」は、細胞の細胞質および/または核膜を通過した膜透過性複合体の輸送に関連するエネルギー非依存性（すなわち、非エンドサイトーシス）転位置性を付与する短い（約12～30残基）アミノ酸配列または機能的モチーフを含むペプチドである。本発明の膜透過性複合体で使用した細胞透過性ペプチドは、好ましくは、遊離しているか、ジスルフィド結合するように改変されている二本鎖リボ核酸とジスルフィド結合を形成するよう誘導体化された少なくとも1つの非機能的システィン残基を含む。かかる性質を付与する代表的なアミノ酸モチーフは、米国特許第6,348,185号明細書（その内容が本明細書中で参考として明確に援用される）に列挙されている。本発明の細胞透過性ペプチドには、好ましくは、ペネトラチン、トランスポーチン（transportan）、pIs1、TAT(48-60)、pVEC、MTS、およびMAPが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0104】

Bcl-xLまたはBcl-wまたはp21を下方制御することができる別の薬剤は、mRNA転写物またはそのDNA配列を特異的に切断することができるDNAザイム分子である。DNAザイムは、一本鎖および二本鎖の標的配列の両方を切断することができる一本鎖ポリヌクレオチドである（Breaker, R.R. and Joyce, G.C. Chemistry and Biology 1995; 2: 655; Santoro, S.W. & Joyce, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94(3): 4262）。DNAザイムの一般的なモデル（「10-23」モデル）が提案されている。「10-23」DNAザイムは、7～9個の各デオキシリボヌクレオチドの2つの基質認識ドメインに隣接した15個のデオキシリボヌクレオチドの触媒ドメインを有する。このDNAザイム型は、その基質RNAをプリン：ピリミジン連結部で効果的に切断することができる（Santoro, S.W. & Joyce, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; DNAザイムのrevについては、Khachigian, LM (Curr Opin Mol Ther 4: 119-21 (2002))を参照のこと）。

20

【0105】

一本鎖および二本鎖の標的切断部位を認識する操作された合成DNAザイムの構築および増幅の例は、Joyce et al. の米国特許第6,326,174号明細書に開示されている。ヒトウロキナーゼ受容体に指向する類似のデザインのDNAザイムは、ウロキナーゼ受容体発現を阻害し、結腸癌細胞転移を首尾よく阻害することが最近認められた（Itoh et al., 20002, Abstract 409, Ann Meeting Am Soc Gen Ther wwwdotasgtdotorg）。別の出願では、bcr-abl癌遺伝子に相補的なDNAザイムは、首尾よく白血病細胞における癌遺伝子発現を阻害し、CMLおよびALLの場合の自家骨髄移植における再発率を低下させた。

30

【0106】

Bcl-xLまたはBcl-wまたはp21を、Bcl-xLまたはBcl-wをコードするmRNA転写物と特異的にハイブリッド形成することができるアンチセンスポリヌクレオチドの使用によって下方制御することもできる。

40

【0107】

アンチセンスアプローチに重要な2つの態様を考慮しながらBcl-xLまたはBcl-wまたはp21を効率的に下方制御するために使用することができるアンチセンス分子をデザインしなければならない。第1の態様は適切な細胞の細胞質内へのオリゴヌクレオチドの送達であり、第2の態様は細胞内の指定したmRNAにその翻訳を阻害する方法で特異的に結合するオリゴヌクレオチドのデザインである。

【0108】

先行技術は、広範な種々の細胞型にオリゴヌクレオチドを効率的に送達させるために使用

50

することができる多数の送達ストラテジーを教示している(例えば、Luft J Mol Med 76:75-6(1998);Kronenwett et al.Blood 91:852-62(1998);Rajur et al.Bioconjug Chem 8:935-40(1997);Lavigne et al.Biochem Biophys Res Commun 237:566-71(1997)およびAoki et al.(1997)Biochem Biophys Res Commun 231:540-5(1997)を参照のこと)。

【0109】

さらに、標的mRNAおよびオリゴヌクレオチドの両方の構造変化のエネルギー論を説明する熱力学サイクルに基づいた標的mRNAに対して最も高い推定結合親和性を有する配列を同定するためのアルゴリズムも利用可能である(例えば、Walton et al.Biotechnol Bioeng 65:1-9(1999)を参照のこと)。

10

【0110】

かかるアルゴリズムは、細胞におけるアンチセンスアプローチを実行するために首尾よく使用されている。例えば、Walton et al.によって開発されたアルゴリズムにより、科学者はウサギ-グロビン(RBG)転写物およびマウス腫瘍壞死因子-(TNF)転写物のアンチセンスオリゴヌクレオチドを首尾よくデザインすることができた。この研究グループは、より最近に、動態学的PCR技術によって評価した場合の細胞培養物中の3つのモデル標的mRNA(ヒト乳酸デヒドロゲナーゼAおよびBならびにラットgpl30)に対する合理的に選択したオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性がほとんどの場合(ホスホジエステルオリゴヌクレオチドおよびホスホロチオアートオリゴヌクレオチドの化学的性質を有する2つの細胞型における3つの異なる標的に対する試験が含まれる)において有効であることが証明されたことを報告している。

20

【0111】

さらに、*in vitro*系を使用した特異的オリゴヌクレオチドのデザインおよび効率の予測のためのいくつかのアプローチも発表されている(Matveeva et al., Nature Biotechnology 16:1374-1375(1998))。

30

【0112】

Bcl-xLまたはBcl-wまたはp21を下方制御することができる別の薬剤は、Bcl-xLまたはBcl-wまたはp21をコードするmRNA転写物を特異的に切断することができるリボザイム分子である。リボザイムは、目的のタンパク質をコードするmRNAの切断による遺伝子発現の配列特異的阻害のために使用されつつある(Welch et al., Curr Opin Biotechnol. 9:486-96(1998))。任意の特異的標的RNAを切断するようにリボザイムをデザインできたことにより、リボザイムが基礎研究および治療への応用の両方における有益なツールとなっている。治療領域では、感染症におけるウイルスRNA、癌における優性癌遺伝子、および遺伝的障害における特異的体細胞変異をターゲティングするためにリボザイムが利用されている(Welch et al., Clin Diagn Virol. 10:163-71(1998))。最も注目すべきは、HIV患者のためのいくつかのリボザイム遺伝子療法プロトコールは既に第I相試験中である。より最近では、トランスジェニック動物研究、遺伝子標識の検証、および経路の解明のためにリボザイムが使用されている。いくつかのリボザイムは、臨床試験の種々の段階にある。アンギオザイムは、ヒト臨床試験で研究するために最初に化学合成されたリボザイムであった。アンギオザイムは、VEGF-r(血管内皮成長因子受容体)(血管形成経路における重要成分)の形成を特異的に阻害する。Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.および他の企業は、動物モデルにおける抗血管形成治療薬の重要性を証明してきた。ヘプタザイム(C型肝炎ウイルス(HCV)RNAを選択的に破壊するようにデザインされたリボザイム)は、細胞培養アッセイにおいてC型肝炎ウイルスRNAの減少に有効であることが見出された(Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated -

40

50

WEB ホームページ)。

【0113】

細胞内の Bcl-xL または Bcl-w または p21 の遺伝子発現のさらなる制御方法は、三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO) を介した方法である。最近の研究では、配列特異的様式で二本鎖らせんDNA中のポリプリン / ポリピリミジン (polypririmidine) 領域を認識して結合することができる TFO をデザインすることができるところが示されている。これらの認識規則は、Maher III, L.J., et al., Science, 1989; 245: 725-730; Moser, H.E., et al., Science, 1987; 238: 645-630; Beal, P.A., et al., Science, 1992; 251: 1360-1363; Cooney, M., et al., Science, 1988; 241: 456-459; および Hogan, M.E., et al., EP Publication 375408 によって概説されている。介入物の導入および骨格置換などのオリゴヌクレオチドの改変ならびに結合条件 (pH およびカチオン濃度) の至適化が TFO 活性の固有の障害 (電荷斥力および不安定性など) の克服に役立っており、合成オリゴヌクレオチドが特定の配列をターゲティングすることができることが最近示された (最近の概説については、Seidman and Glazer, J Clin Invest 2003; 112: 487-94 を参照のこと)。

【0114】

一般に、三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、以下の配列が対応する。

オリゴ	3' - - A	G	G	T
二重鎖	5' - - A	G	C	T
二重鎖	3' - - T	C	G	A

【0115】

しかし、A-A-T トリプレットおよび G-G-C トリプレットの三重らせん安定性が最も高いことが示されている (Reither and Jeltsch, BMC Biochem, 2002, Sept 12, Epub)。この著者は、A-A-T および G-G-C 規則にしたがってデザインした TFO が非特異的三重鎖を形成しないことを証明し、これは三重鎖形成が実際に配列特異的であることを示す。

【0116】

したがって、Bcl-xL または Bcl-w または p21 の調節領域の任意の所与の配列について、三重鎖形成配列を考案することができる。三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、好ましくは、少なくとも 15、より好ましくは 25、さらにより好ましくは 30、またはそれを超えるヌクレオチド長、50 bp または 100 bp までである。

【0117】

(例えば、カチオン性リポソームを介した) 細胞の TFO でのトランスフェクションおよび標的 DNA との三重らせん構造の形成によって立体および機能の変化、転写の開始および伸長の遮断が誘導され、それにより内因性 DNA 内の配列が望ましく変化して遺伝子発現が特異的に下方制御される。TFO で処置した細胞におけるかかる遺伝子発現の抑制の例には、哺乳動物細胞におけるエピゾーム superFG1 および内因性 Hprt 遺伝のノックアウト (Vasquez et al., Nucl Acids Res. 1999; 27: 1176-81 および Puris, et al., J Biol Chem, 2001; 276: 28991-98) ならびに前立腺癌の病因で重要な Ets2 転写因子 (Carbone, et al., Nucl Acid Res. 2003; 31: 833-43) および炎症促進性 ICAM-1 遺伝子 (Besch, et al., J Biol Chem, 2002; 277: 32473-79) の発現の配列および標的特異的な下方制御が含まれる。さらに、Vuyisich and Beal は、最近、配列特異的 TFO が dsRNA に結合し、dsRNA 依存性酵素 (RNA 依存性キナーゼなど) の活性を阻害することができることを示している (Vuyisich and Beal, Nucl Acids Res. 2000; 28: 2369-74)。

10

20

30

40

50

【0118】

さらに、上記原理にしたがってデザインされたTFOは、DNA修復が可能な定方向変異誘発を誘導することができ、したがって、内因性遺伝子の発現の下方制御および上方制御の両方を行うことができる(Seidman and Glazer, J Clin Invest 2003; 112: 487-94)。有効なTFOのデザイン、合成、および投与の詳細な説明を、Froehler et al. の米国特許出願公開第2003/017068号明細書および同第2003/0096980号明細書、Emanuel et al. の同第2002/0128218号明細書および同第2002/0123476号明細書、ならびにLawnの米国特許第5,721,138号明細書に見出すことができる。

10

【0119】

Bcl-xLおよび/またはBcl-wおよび/またはp21の量または活性の下方制御のためのポリヌクレオチド薬を、典型的には、発現構築物の一部として投与する。この場合、構成性様式または誘導性様式でBcl-xLおよび/またはBcl-wおよび/またはp21を下方制御することができる薬剤の発現を指示することができるシス作用性調節エレメント(例えば、プロモーター)の調節下でポリヌクレオチド薬を核酸構築物中にライゲーションする。

【0120】

核酸薬を、適切な遺伝子送達ビヒクル/方法(トランスフェクション、形質導入など)を使用して送達させることができる。任意選択的に、適切な発現系を使用する。適切な構築物の例には、pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、PzeoSv2(+/-)、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto(それぞれ、Invitrogen Co.(www.dotinvitrogendot.com)から市販されている)が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0121】

発現構築物はまた、ウイルスであり得る。ウイルス構築物の例には、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ポリオーマウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびヘルペスウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0122】

レトロウイルス構築物などのウイルス構築物は、少なくとも1つの転写プロモーター/エンハンサーもしくは遺伝子座規定エレメント、または他の手段(選択的スプライシング、核外RNA輸送、またはメッセンジャーの翻訳後修飾など)によって遺伝子発現を調節する他のエレメントを含む。かかるベクター構築物は、ウイルス構築物中に既に存在しないかぎり、パッケージングシグナル、長末端反復LTRまたはその一部、および使用したウイルスに適切なプラス鎖およびマイナス鎖のプライマー結合部位も含む。さらに、かかる構築物は、典型的には、構築物が存在する宿主細胞からのペプチドの分泌のためのシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物シグナル配列または本発明のペプチドバリアントのシグナル配列である。任意選択的に、構築物はまた、ポリアデニル化を指示するシグナルならびに1つ以上の制限部位および翻訳終結配列を含むことができる。例として、かかる構築物は、典型的には、5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第2の鎖DNA合成起源、および3'LTRまたはその一部を含むであろう。

40

【0123】

好ましくは、ウイルス感染量は、少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、またはそれを超えるpfuまたはウイルス粒子である。

【0124】

二本鎖RNAを、遺伝子セグメントの末端への2つの対立するプロモーターの付加によっ

50

て合成することができ、ここで、一方のプロモーターは遺伝子の 5' 側に隣接して配置され、逆方向プロモーターを遺伝子セグメントの 3' 側に隣接して配置する。次いで、適切なポリメラーゼを使用して dsRNA を転写することができる。

【0125】

潜在的な治療薬としての小ポリヌクレオチド薬（例えば、 siRNA）の適用には、その薬理学的性質を強化する送達アプローチが必要である。これらの送達アプローチは、以下を目的とする：（1）腎クリアランス速度の低下によって循環系中の小ポリヌクレオチド薬の保持時間を増加させること；（2）血清ヌクレアーゼから小ポリヌクレオチド薬を保護すること；（3）有効な生体内分布を確実にすること；（4）標的細胞へのターゲティングおよび標的細胞内への小ポリヌクレオチド薬の取り込みを容易にすること；および（5）細胞質への輸送および RISC 内への取り込みを促進すること。*in vivo* での小ポリヌクレオチド薬送達を促進する種々のアプローチ（カチオン性ナノ粒子、脂質、およびリポソーム、抗体（Ab）- 融合分子（Ab - プロタミンおよび Ab - ポリ - アルギニン）、ならびにコレステロール抱合薬およびアブタマー抱合薬が含まれる）が開発されている。それ自体で、 siRNA などの小ポリヌクレオチド薬は腎臓濾過のサイズ閾値を下回り、循環系から迅速にクリアランスされる。小ポリヌクレオチド薬および種々の送達試薬の複合体は循環中により長期間留まる。これは、複合体が腎クリアランスのサイズカットオフを超えるか、送達薬が血清タンパク質（例えば、血清アルブミン）との会合を促進するからである。さらに、ナノ粒子内への小ポリヌクレオチド薬のキャプシド形成（脂質またはカチオン性ポリマーをベースとした系のいずれかを使用）は、小ポリヌクレオチド薬を血清ヌクレアーゼから保護するのに役立つ。Ab - 融合分子は、静脈内注射後に裸の未修飾小ポリヌクレオチド薬を特定の細胞型に有効に送達させるために使用されている。 siRNA がこれらの組換え Ab - 融合分子表面上に露呈すると考えられるにもかかわらず、 siRNA は標的細胞に有効に送達され、これらの分子との複合体形成により核酸分解からいかに保護されることが示唆された。小ポリヌクレオチド薬のリン酸骨格、糖部分、およびヌクレオシド塩基に対する化学修飾の組込みにより、血清ヌクレアーゼによる分解に対する耐性が増大する。しかし、これらの修飾のうちのいくつかがサイレンシング効率に悪影響を及ぼす場合、小ポリヌクレオチド薬への化学修飾の組込みと小ポリヌクレオチド薬の阻害活性との間でバランスを取らなければならない。バイスタンダー細胞中の有効なサイレンシングおよびオフターゲットサイレンシングの最小化に必要な小ポリヌクレオチド薬の投薬量を減少するための魅力的なストラテジーは、小ポリヌクレオチド薬を特異的な細胞型および組織にターゲティングする送達薬の使用である。小ポリヌクレオチド薬が静電相互作用またはアブタマーもしくはリガンドの小ポリヌクレオチド薬への直接抱合によって会合することができる高正電荷のペプチドまたはタンパク質に融合される Ab またはリガンドを使用してこのストラテジーが行われている。これらの試薬（Ab、リガンド、およびアブタマー）は、細胞表面分子に高親和性で結合し、これらのマーカーを発現する細胞に小ポリヌクレオチド薬を特異的に送達させることができる。これらのターゲティング試薬のナノ粒子との組み合わせ（例えば、特異的 Ab でコーティングした脂質ナノ粒子を含む免疫リポソーム）により、小ポリヌクレオチド薬の送達量、結果として、サイレンシング効率を増加させることができる。

【0126】

したがって、本発明は、これらの薬剤の送達のための脂質ベースの系の使用を意図する。遺伝子の脂質媒介導入に有用な脂質は、例えば、 DOTMA、DOPE、および D C - C h o l である（Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14 (1) : 54 - 65 (1996)）。最近、キトサンを使用して核酸を腸細胞に送達させることができることが示されている（Chen J. (2004) World J Gastroenterol 10 (1) : 112 - 116）。本発明のこの態様にしたがって使用することができる他の非脂質ベースのベクターには、ポリリジンおよびデンドリマー、カーボンナノチューブ、ナノゲル、ポリマーベースの粒子が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0127】

本明細書中に記載の薬剤が老化細胞を死滅させることができるので、本発明者らは、これらの薬剤を使用して細胞老化に関連する疾患を有する被験体を処置することができることを提案する。

【0128】

本明細書中で使用する場合、用語「被験体」は、哺乳動物被験体、好ましくはヒトをいう。

【0129】

炎症応答に関する多数の疾患および容態を、上記の方法を使用して処置することができる。かかる疾患および容態の例を以下にまとめる。

10

【0130】

炎症性疾患 - 慢性炎症性疾患および急性炎症性疾患が含まれるが、これらに限定されない。過敏症に関する炎症性疾患

【0131】

過敏症の例には、I型過敏症、II型過敏症、III型過敏症、IV型過敏症、即時型過敏症、抗体媒介性過敏症、免疫複合体媒介性過敏症、Tリンパ球媒介性過敏症、およびDTHが含まれるが、これらに限定されない。

【0132】

I型過敏症または即時型過敏症（喘息など）。

20

【0133】

II型過敏症には、リウマチ様疾患、リウマチ様自己免疫疾患、関節リウマチ（Krenn V. et al., Histol Histopathol 2000 Jul; 15(3): 791）、脊椎炎、強直性脊椎炎（Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3(3): 189）、全身性疾患、全身性自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス（Erikson J. et al., Immunol Res 1998; 17(1-2): 49）、硬化症、全身性硬化症（Renaudineau Y. et al., Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar; 6(2): 156）；Chan OT. et al., Immunol Rev 1999 Jun; 169: 107）、腺疾患、腺自己免疫疾患、脾自己免疫疾患、糖尿病、I型糖尿病（Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct; 34 Suppl: S125）、甲状腺疾患、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病（Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun; 29(2): 339）、甲状腺炎、自発性自己免疫性甲状腺炎（Braley-Mullen H. and Yus S, J Immunol 2000 Dec 15; 165(12): 7262）、橋本甲状腺炎（Toyoda N. et al., Nippon Rinsho 1999 Aug; 57(8): 1810）、粘液水腫、特発性粘液水腫（Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug; 57(8): 1759）；自己免疫性生殖疾患、卵巣疾患、卵巣自己免疫（Garza KM. et al., J Reprod Immunol 1998 Feb; 37(2): 87）、自己免疫性抗精子不妊症（Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. 2000 Mar; 43(3): 134）、反復胎児消失（Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Suppl 2: S107-9）、神経変性疾患、神経学的疾患、神経学的自己免疫疾患、多発性硬化症（Cross AH. et al., J Neuroimmunol 2001 Jan 1; 112(1-2): 1）、アルツハイマー病（Oron L. et al., J Neural Transm Suppl. 1997; 49: 77）、重症筋無力症（Infante AJ. And Craig E, Int Rev Immunol 1999; 18(1-2): 83）、運動神経障害（Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May; 7(3): 191）、ギラン・バレー症候群、ニューロパシー、および自己免疫性二

30

30
40
50

ユーロパシー (Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr; 319(4): 234)、筋無力性疾患、ランバート・イートン筋無力症候群 (Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr; 319(4): 204)、傍腫瘍性神経学的疾患、小脳萎縮、傍腫瘍性小脳萎縮、非傍腫瘍性スティッフマン症候群、小脳萎縮、進行性小脳萎縮、脳炎、ラスマッセン脳炎、筋萎縮性側索硬化症、シデナム (Sydenham) 舞踏病、ジルドラトウレット症候群、多腺性内分泌症、自己免疫性多腺性内分泌症 (Antoine JC. and Honnorat J. Rev Neurol (Paris) 2000 Jan; 156(1): 23)；ニューロパシー、異常免疫ニューロパシー (Nobile-Orazi E. et al., Electroneurograph Clin Neurophysiol Suppl 1999; 50: 419)；神経性筋強直症、後天性神経性筋強直症、先天性多発性関節拘縮 (Vincent A. et al., Ann NY Acad Sci. 1998 May 13; 841: 482)、心血管疾患、心血管性自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症 (Matsuura E. et al., Lupus. 1998; 7 Suppl 2: S135)、心筋梗塞 (Vaarala O. Lupus. 1998; 7 Suppl 1 2: S132)、血栓症 (Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Suppl 2: S107-9)、肉芽腫症、ウェゲナー肉芽腫症、動脈炎、高安動脈炎、および川崎病 (Praprotnik S. et al., Wien Klin Wochenschr 2000 Aug 25; 112(15-16): 660)；抗VIII因子自己免疫疾患 (Lacroix-Desmazes S. et al., Semin Thromb Hemost. 2000; 26(2): 157)；脈管炎、壊死性小血管脈管炎、顕微鏡的多発血管炎、チャーグ・ストラウス症候群、糸球体腎炎、pauci-immune型巢状壊死性糸球体腎炎、半月体形成性糸球体腎炎 (Noel LH. Ann Med Interne (Paris). 2000 May; 151(3): 178)；抗リン脂質症候群 (Flamholz R. et al., J Clin Apheresis 1999; 14(4): 171)；心不全、心不全におけるアゴニスト様 - アドレノセプター抗体 (Wallukat G. et al., Am J Cardiol. 1999 Jun 17; 83(12A): 75H)、血小板減少性紫斑 (Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun; 14(2): 114)；溶血性貧血、自己免疫性溶血性貧血 (Efremov DG. et al., Leuk Lymphoma 1998 Jan; 28(3-4): 285)、胃腸疾患、胃腸管の自己免疫疾患、腸疾患、慢性炎症性腸疾患 (Garcia Herola A. et al., Gastroenterol Hepatol. 2000 Jan; 23(1): 16)、セリアック病 (Landau YE. and Schoenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16; 138(2): 122)、筋系の自己免疫疾患、筋炎、自己免疫性筋炎、シェーグレン症候群 (Feist E. et al., Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep; 123(1): 92)；平滑筋自己免疫疾患 (Zauli D. et al., Biomed Pharmacother 1999 Jun; 53(5-6): 234)、肝疾患、自己免疫性肝疾患、自己免疫性肝炎 (Manns MP. J Hepatol. 2000 Aug; 33(2): 326)、ならびに原発性胆汁性肝硬変 (Strassburg CP. et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun; 11(6): 595) が含まれるが、これらに限定されない。

【0134】

I V型過敏症またはT細胞媒介性過敏症には、リウマチ様疾患、関節リウマチ (Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci USA 1994 Jan 18; 91(2): 437)、全身性疾患、全身性自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス (Datta SK., Lupus 1998; 7(9): 591)、腺疾患、腺自己免疫疾患、脾疾患、脾自己免疫疾患、1型糖尿病 (Castano L

10

20

30

40

50

. and Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8 : 647) ; 甲状腺疾患、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病 (Sakata S. et al., Mol Cell Endocrinol 1993 Mar; 92(1) : 77) ; 卵巣疾患 (Garza KM. et al., J Reprod Immunol 1998 Feb; 37(2) : 87) 、前立腺炎、自己免疫性前立腺炎 (Alexander RB. et al., Urology 1997 Dec; 50(6) : 893) 、多腺性症候群、多腺性自己免疫症候群、多腺性自己免疫症候群I型 (Hara T. et al., Blood. 1991 Mar 1; 77(5) : 1127) 、神経学的疾患、自己免疫性神経学的疾患、多発性硬化症、神経炎、視神経炎 (Soderstrom M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May; 57(5) : 544) 、重症筋無力症 (Oshima M. et al., Eur J Immunol 1990 Dec; 20(12) : 2563) 、全身強直症候群 (Hiemstra HS. et al., Proc Natl Acad Sci USA 2001 Mar 27; 98(7) : 3988) 、心血管疾患、シヤーガス病における心自己免疫 (Cunha-Neto E. et al., J Clin Invest 1996 Oct 15; 98(8) : 1709) 、自己免疫性血小板減少性紫斑 (Semple JW. et al., Blood 1996 May 15; 87(10) : 4245) 、抗ヘルパーTリンパ球自己免疫 (Caporossi AP. et al., Viral Immunol 1998; 11(1) : 9) 、溶血性貧血 (Sallah S. et al., Ann Hematol 1997 Mar; 74(3) : 139) 、肝疾患、自己免疫性肝疾患、肝炎、慢性活動性肝炎 (Franco A. et al., Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar; 54(3) : 382) 、胆汁性肝硬変、原発性胆汁性肝硬変 (Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996 Nov; 91(5) : 551) 、腎疾患、自己免疫性腎疾患、腎炎、間質性腎炎 (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Aug; 1(2) : 140) 、結合組織病、耳疾患、自己免疫性結合組織病、自己免疫性耳疾患 (Yoo TJ. et al., Cell Immunol 1994 Aug; 157(1) : 249) 、内耳疾患 (Gloedde B. et al., Ann NY Acad Sci 1997 Dec 29; 830 : 266) 、皮膚疾患、皮膚病、真皮疾患、水疱性皮膚疾患、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および落葉状天疱瘡が含まれるが、これらに限定されない。
10
20
30

【0135】

遅延型過敏症の例には、接触皮膚炎および薬疹が含まれるが、これらに限定されない。

【0136】

過敏症を媒介するTリンパ球型の例には、ヘルパーTリンパ球および細胞傷害性Tリンパ球が含まれるが、これらに限定されない。

【0137】

ヘルパーTリンパ球媒介性過敏症の例には、Th1リンパ球媒介性過敏症およびTh2リンパ球媒介性過敏症が含まれるが、これらに限定されない。自己免疫疾患

【0138】

心血管疾患、リウマチ様疾患、腺疾患、胃腸疾患、皮膚病、肝疾患、神経学的疾患、筋疾患、腎疾患、生殖関連疾患、結合組織病、および全身性疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【0139】

自己免疫性心血管疾患の例には、アテローム性動脈硬化症 (Matsuura E. et al., Lupus. 1998; 7 Suppl 2 : S135) 、心筋梗塞 (Vaarala O. Lupus. 1998; 7 Suppl 2 : S132) 、血栓症 (Tincani A. et al., Lupus 1998; 7 Suppl 2 : S107-9) 、ウェゲナー肉芽腫症、高安動脈炎、川崎病 (Praprotnik S. et al., Wien Klin Wochenschr 2000 Aug 25; 112(15

40

50

- 16) : 660)、抗VIII因子自己免疫疾患(Lacroix-Desmazes S. et al., Semin Thromb Hemost. 2000; 26(2) : 157)、壞死性小血管脈管炎、顯微鏡的多発血管炎、チャーグ・ストラウス症候群、pauci-immune型巣状壞死性糸球体腎炎および半月体形成性糸球体腎炎(Noe LH. Ann Med Interne (Paris). 2000 May; 151(3) : 178)、抗リン脂質症候群(Flamholz R. et al., J Clin Apheresis 1999; 14(4) : 171)、抗体誘導性心不全(Wallukat G. et al., Am J Cardiol. 1999 Jun 17; 83(12A) : 75H)、血小板減少性紫斑(Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun; 14(2) : 114; Semple JW. et al., Blood 1996 May 15; 87(10) : 4245)、自己免疫性溶血性貧血(Efremov DG. et al., Leuk Lymphoma 1998 Jan; 28(3-4) : 285; Salilah S. et al., Ann Hematol 1997 Mar; 74(3) : 139)、シャーガス病における心自己免疫(Cunha-Neto E. et al., J Clin Invest 1996 Oct 15; 98(8) : 1709)、および抗ヘルパーTリンパ球自己免疫(Caporossi AP. et al., Viral Immunol 1998; 11(1) : 9)が含まれるが、これらに限定されない。

【0140】

自己免疫性リウマチ様疾患の例には、関節リウマチ(Krenn V. et al., Histol Histopathol 2000 Jul; 15(3) : 791; Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci Unit S SA 1994 Jan 18; 91(2) : 437)および強直性脊椎炎(Jan Voswinkel et al., Arthritis Res 2001; 3(3) : 189)が含まれるが、これらに限定されない。

【0141】

自己免疫性腺疾患の例には、膵疾患、I型糖尿病、甲状腺疾患、グレーブス病、甲状腺炎、自発性自己免疫性甲状腺炎、橋本甲状腺炎、特発性粘液水腫、卵巣自己免疫、自己免疫性抗精子不妊症、自己免疫性前立腺炎、および多腺性自己免疫症候群I型が含まれるが、これらに限定されない。疾患には、膵臓の自己免疫疾患、1型糖尿病(Castano Land Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8 : 647; Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct; 34 Suppl : S125)、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病(Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun; 29(2) : 339; Sakata S. et al., Mol Cell Endocrinol 1993 Mar; 92(1) : 77)、自発性自己免疫性甲状腺炎(Braleys-Mullen H. and Yu S, J Immunol 2000 Dec 15; 165(12) : 7262)、橋本甲状腺炎(Toyoda N. et al., Nippon Rinsho 1999 Aug; 57(8) : 1810)、特発性粘液水腫(Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug; 57(8) : 1759)、卵巣自己免疫(Garza KM. et al., J Reprod Immunol 1998 Feb; 37(2) : 87)、自己免疫性抗精子不妊症(Diekman AB. et al., Am J Reprod Immunol. 2000 Mar; 43(3) : 134)、自己免疫性前立腺炎(Alexander RB. et al., Urology 1997 Dec; 50(6) : 893)、および多腺性自己免疫症候群I型(Hara T. et al., Blood. 1991 Mar 1; 77(5) : 1127)が含まれるが、これらに限定されない。

【0142】

10

20

30

40

50

自己免疫性胃腸疾患の例には、慢性炎症性腸疾患 (Garcia Herola A. et al., *Gastroenterol Hepatol*. 2000 Jan; 23(1) : 16)、セリアック病 (Landau YE. and Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16; 138(2) : 122)、結腸炎、回腸炎、およびクローン病が含まれるが、これらに限定されない。

【0143】

自己免疫性皮膚病の例には、自己免疫性水疱性皮膚疾患（尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および落葉状天疱瘡などであるが、これらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない。

【0144】

自己免疫性肝疾患の例には、肝炎、自己免疫性慢性活動性肝炎 (Franco A. et al., *Clin Immunol Immunopathol* 1990 Mar; 54(3) : 382)、原発性胆汁性肝硬変 (Jones DE. *Clin Sci (Colch)* 1996 Nov; 91(5) : 551; *Strassburg CP. et al.*, *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Jun; 11(6) : 595)、および自己免疫性肝炎 (Manns MP. *J Hepatol* 2000 Aug; 33(2) : 326) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0145】

自己免疫性神経学的疾患の例には、多発性硬化症 (Cross AH. et al., *J Neuroimmunol* 2001 Jan 1; 112(1-2) : 1)、アルツハイマー病 (Oron L. et al., *J Neural Transm Suppl* 1997; 49: 77)、重症筋無力症 (Infante AJ. and Krag E, *Int Rev Immunol* 1999; 18(1-2) : 83; Oshima M. et al., *Eur J Immunol* 1990 Dec; 20(12) : 2563)、ニューロパシー、運動神経障害 (Kornberg AJ. *J Clin Neurosci*. 2000 May; 7(3) : 191)；ギラン・バレー症候群および自己免疫性ニューロパシー (Kusunoki S. *Am J Med Sci*. 2000 Apr; 319(4) : 234)、筋無力症、ランバート・イートン筋無力症候群 (Takamori M. *Am J Med Sci*. 2000 Apr; 319(4) : 204)；傍腫瘍性神経学的疾患、小脳萎縮、傍腫瘍性小脳萎縮、および全身強直症候群 (Hiemstra HS. et al., *Proc Natl Acad Sci units SA* 2001 Mar 27; 98(7) : 3988)；非傍腫瘍性ステイツマン症候群、進行性小脳萎縮、脳炎、ラスマッセン脳炎、筋萎縮性側索硬化症、シデナム (Sydeham) 舞踏病、ジルドラトゥレット症候群、および自己免疫性多腺性内分泌症 (Antoine JC. and Honnorat J. *Rev Neurol (Paris)* 2000 Jan; 156(1) : 23)；異常免疫ニューロパシー (Nobile-Orazio E. et al., *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1999; 50: 419)；後天性神経性筋強直症、先天性多発性関節拘縮 (Vincent A. et al., *Ann NY Acad Sci*. 1998 May 13; 841: 482)、神経炎、視神経炎 (Soderstrom M. et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994 May; 57(5) : 544)、ならびに神経変性疾患が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

40

50

【0146】

自己免疫性筋疾患の例には、筋炎、自己免疫性筋炎および原発性シェーグレン症候群 (Feist E. et al., *Int Arch Allergy Immunol* 2000 Sep; 123(1) : 92) ならびに平滑筋自己免疫疾患 (Zauli D. et al., *Biomed Pharmacother* 1999 Jun; 53(5-6) : 234) が含まれるが、これらに限定されない。

【0147】

自己免疫性腎疾患の例には、腎炎および自己免疫性間質性腎炎 (K e l l y C J . J Am Soc Nephrol 1990 Aug; 1(2): 140) が含まれるが、これらに限定されない。

【0148】

生殖に関連する自己免疫疾患の例には、反復胎児消失 (T i n c a n i A . e t a l . , L u p u s 1998; 7 Suppl 2: S 107-9) が含まれるが、これに限定されない。

【0149】

自己免疫性結合組織病の例には、耳疾患、自己免疫性耳疾患 (Y o o T J . e t a l . , C e l l Immunol 1994 Aug; 157(1): 249) および内耳の自己免疫疾患 (G l o d d e k B . e t a l . , Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29; 830: 266) が含まれるが、これらに限定されない。 10

【0150】

全身性自己免疫疾患の例には、全身性エリテマトーデス (E r i k s o n J . e t a l . , Immunol Res 1998; 17(1-2): 49) および全身性硬化症 (R e n a u d i n e a u Y . e t a l . , Clin Diagn Lab Immunol 1999 Mar; 6(2): 156); Chan O T . e t a l . , Immunol Rev 1999 Jun; 169: 107) が含まれるが、これらに限定されない。 20

感染症

【0151】

感染症の例には、慢性感染症、亜急性感染症、急性感染症、ウイルス性疾患、細菌性疾患、原生動物疾患、寄生虫病、真菌性疾患、マイコプラズマ性疾患、およびプリオノン病が含まれるが、これらに限定されない。

【0152】

移植片拒絶疾患

移植片の移植に関連する疾患の例には、移植片拒絶、慢性移植片拒絶、亜急性移植片拒絶、超急性移植片拒絶、急性移植片拒絶、および移植片対宿主病が含まれるが、これらに限定されない。 30

【0153】

アレルギー疾患

アレルギー疾患の例には、喘息、じんま疹、蕁麻疹、花粉アレルギー、チリダニアレルギー、毒液アレルギー、化粧品アレルギー、ラテックスアレルギー、化学物質アレルギー、薬物アレルギー、虫刺アレルギー、動物鱗屑アレルギー、有刺植物アレルギー、ツタウルシアレルギー、および食物アレルギーが含まれるが、これらに限定されない。

【0154】

特定の実施形態によれば、薬剤（およびその組み合わせ）を、前悪性病変の処置のために使用する。

【0155】

本明細書中で使用する場合、句「前悪性病変」は、悪性腫瘍に変化する可能性が高い細胞塊および／または組織をいう。前悪性病変の例には、腺腫様ポリープ、バレット食道、I P M N (腺管内乳頭粘液性 (M u c i n o s s) 新形成) 、乳房内のD C I S (腺管上皮内癌) 、白斑症、および紅板症が含まれるが、これらに限定されない。したがって、本発明のこの態様の薬剤を使用して処置される前悪性病変は、悪性の固形または非固形（例えば、血液学的悪性疾患）の癌（または腫瘍）に変化し得る。特定の実施形態によれば、本発明の薬剤を使用して処置される前悪性病変は、結腸の腺腫様ポリープ、直腸の腺腫様ポリープ、小腸の腺腫様ポリープ、およびバレット食道である。

【0156】

50

20

30

40

50

線維性疾患の例には、上皮性関門組織の疾患、皮膚、肺、または腸の疾患が含まれる。

【0157】

本明細書中に記載の薬剤を使用して処置することができる意図される線維性疾患には、好酸球性食道炎、好酸球増加症候群（H E S）、レフラー心内膜炎、心内膜心筋線維症、特発性肺線維症、および強皮症が含まれるが、これらに限定されない。

【0158】

特定の実施形態によれば、薬剤を、肝臓線維症、創傷治癒、皮膚線維症、肺疾患、腎臓線維症、前立腺炎、アテローム性動脈硬化症、関節炎、骨粗鬆症、または肺炎の処置のために使用する。

【0159】

本発明によって意図される例示的な肺疾患は、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）である。

10

【0160】

さらに（s i l l）別の実施形態によれば、疾患は軟骨変性に関連する（例えば、関節炎）。

【0161】

さらに別の実施形態によれば、疾患は骨変性に関連する（例えば、骨粗鬆症）。

【0162】

さらに別の実施形態によれば、疾患は癌ではない。

20

【0163】

本発明の薬剤（およびその組み合わせ）自体を提供するか、特定の使用を意図した組成物に処方することができる。本明細書中に記載の薬剤の組み合わせを単一の処方物で提供するか、個別の組成物で提供すると認識されるであろう。

【0164】

意図する組成物には、B c l - x L を下方制御する薬剤およびB c l - w を下方制御する薬剤（例えば、s i R N A 薬）を含む組成物が含まれる。

【0165】

別の意図する組成物は、B c l - x L を下方制御する薬剤およびB c l - w を下方制御する薬剤（例えば、s i R N A 薬）およびp 2 1 を下方制御する薬剤（例えば、s i R N A 薬）を含む組成物である。

30

【0166】

別の意図する組成物は、B c l - x L およびB c l - w を下方制御する薬剤（例えば、化学物質）およびp 2 1 を下方制御する薬剤（例えば、s i R N A 薬）を含む組成物である。

【0167】

別の意図する組成物は、B c l - x L およびB c l - w を下方制御する薬剤（例えば、化学物質）およびp 2 1 を下方制御する薬剤（例えば、化学物質）を含む組成物である。

【0168】

さらに、本発明者らは、1つの製品中に個別にパッケージングした薬剤の組み合わせを提供することを意図する。

40

【0169】

したがって、1つの意図する製品は、B c l - x L を下方制御する薬剤およびB c l - w を下方制御する薬剤（例えば、s i R N A 薬）を含む。

【0170】

別の意図する製品は、B c l - x L を下方制御する薬剤およびB c l - w を下方制御する薬剤（例えば、s i R N A 薬）およびp 2 1 を下方制御する薬剤（例えば、s i R N A 薬）を含む製品である。

【0171】

別の意図する製品は、B c l - x L およびB c l - w を下方制御する薬剤（例えば、化学物質）およびp 2 1 を下方制御する薬剤（例えば、s i R N A 薬）を含む製品である。

50

【0172】

別の意図する製品は、Bcl-xLおよびBcl-wを下方制御する薬剤（例えば、化学物質）およびp21を下方制御する薬剤（例えば、化学物質）を含む製品である。

【0173】

本発明の薬剤が老化細胞を選択的に死滅させてるので、本発明者らは、薬剤の別の用途が皮膚を若返らせるための老化防止剤としての化粧品組成物中の使用であることを意図する。したがって、本発明の薬剤を、化粧品のために処方することができる。

【0174】

かかる組成物は、典型的には、薬学的に許容され得る賦形剤、特に、外部局所適用に適切な皮膚科学的に許容され得る賦形剤を含む。

【0175】

本発明の化粧品組成物は、増粘葉、防腐剤、香料、着色剤、薬液用フィルターまたはミネラルフィルター、保湿剤、温泉水などから選択される当業者に公知の少なくとも1つの薬学的アジュバントをさらに含むことができる。

10

【0176】

組成物は、皮脂調節剤、抗菌薬、抗真菌薬、角質溶解薬、角質調節剤、収斂薬、抗炎症薬／抗刺激薬、抗酸化剤／フリー・ラジカル消去剤、瘢痕形成剤、老化防止剤、および／または保湿剤から選択される少なくとも1つの薬剤を含むことができる。

20

【0177】

用語「皮脂調節剤」は、例えば、5- -レダクターゼインヒビター、特に、Laboratories Expansion Scienceから販売されている活性薬剤5- -アボクタ（登録商標）をいう。その亜鉛塩およびグルコン酸塩、サリチル酸塩、およびピログルタミン酸も皮脂抑制活性を有する。適用12週間後に皮脂分泌速度を有意に減少させるスピロノラクトン（抗アンドロゲン且つアルドステロンアンタゴニスト）も挙げることができる。例えば、カボチャCucurbita pepoの種子、カボチャ種子油、およびキャベツ由来の他の抽出分子は、5- -レダクターゼの転写および活性の阻害によって皮脂産生を制限する。皮脂量に作用する脂質起源の他の皮脂調節剤（リノール酸など）が興味深い。

20

【0178】

用語「抗菌薬」および「抗真菌薬」は、P.acnesのような一定の細菌または一定の真菌(Malassezia furfur)などの病原性微生物の成長を制限するか破壊する分子をいう。化粧品または栄養補助食品で一般的に使用される防腐剤、抗菌活性を有する分子（偽防腐剤）（カプリル酸誘導体（カプリロイルグリシン、グリセリルカプリラートなど）、ヘキサンジオールおよびレブリン酸ナトリウム、亜鉛および銅の誘導体（グルコナートおよびPCA）、フィトスフィンゴシンおよびその誘導体、過酸化ベンゾイル、ピロクトンオラミン、ジンクピリチオン、硫化セレン、エコナゾール、ケトコナゾール、または局所抗生物質（エリスロマイシンおよびクリンダマイシンなど）など）が最も伝統的である。

30

【0179】

用語「角質調節剤」および「角質溶解薬」は、表皮の角質層の死細胞の排除を制御または補助する薬剤をいう。最も一般的に使用されている角質調節剤／角質溶解薬には以下が含まれる：果実の-ヒドロキシ酸(AHA)（クエン酸、グリコール酸、リンゴ酸、乳酸など）、AHAエステル、AHAの他の分子との組み合わせ（リンゴ酸およびアーモンドタンパク質の組み合わせ（ケラトライト（登録商標））、グリコール酸または乳酸のアルギニンとの組み合わせ、またはヒドロキシ酸の脂質分子との組み合わせ（LHA（登録商標）（リポ-ヒドロキシ酸）など）、両性ヒドロキシ酸複合体（AHCare）、柳樹皮(Salix alba樹皮抽出物）、アゼライン酸およびその塩およびエステル、サリチル酸およびその誘導体（カプリロイルサリチル酸など）、または他の分子との組み合わせ（サリチル酸およびポリサッカリド（-ヒドロキシ酸、すなわちBHA）、タザロテン、アダパレン、ならびにレチノイドファミリー分子（トレチノイン、レチンアルデヒド、イソトレチノイン、およびレチノールなど）との組み合わせなど）。

40

50

【0180】

用語「収斂薬」は、毛穴の収斂を補助する薬剤をいい、ポリフェノール、亜鉛誘導体、およびウイッチヘーゼルが最も一般的に使用されている。

【0181】

用語「抗炎症剤／抗刺激剤」は、サイトカインまたはアラキドン酸代謝媒介物質によって誘導される炎症反応を制限し、平滑化特性および抗刺激特性を有する薬剤をいう。グリシルレチニン酸(甘草誘導体)およびその塩およびエステル、-ビザボロール、イチョウ、キンセンカ、リポ酸、-カロテン、ビタミンB3(ナイアシンアミド、ニコチンアミド)、ビタミンE、ビタミンC、ビタミンB12、フラボノイド(緑茶、ケルセチンなど)、リコ펜またはルテイン、アボカド糖、アボカド油留出物、アラビノガラクタン、ルピナスペプチド、ルピナス全抽出物、キノアペプチド抽出物、シクロセラミド(登録商標)(オキサゾリン誘導体)、抗糖化剤(カルノシン、N-アセチル-システイン、イソフラボン(例えば、ゲニステイン/ゲニスチン、ダイゼイン/ダイジンなど)、湧水または温泉(オード・アベンヌ、オード・ラ・ロッシュ・ボゼ、オード・サン・ジェルベ、オード・ユリアージュ、オード・ガマルド)、クコ抽出物(ナガバクコ)、植物アミノ酸ペプチドまたは複合体、局所ダブソン、または抗炎症薬など)が最も伝統的である。10

【0182】

用語「抗酸化剤」は、他の化学物質の酸化を減少または防止する分子をいう。組み合わせて使用することができる抗酸化剤／フリー・ラジカル消去剤は、チオールおよびフェノール、甘草誘導体(グリシルレチニン酸およびその塩およびエステルなど)、-ビザボロール、イチョウ抽出物、キンセンカ抽出物、シクロセラミド(登録商標)(オキサゾリン誘導体)、アボカドペプチド、微量元素(銅、亜鉛、およびセレンなど)、リポ酸、ビタミンB12、ビタミンB3(ナイアシンアミド、ニコチンアミド)、ビタミンC、ビタミンE、補酵素Q10、オキアミ、グルタチオン、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、リコ펜またはルテイン、-カロテン、ポリフェノールファミリー(タンニン、フェノール酸、アントシアニン、フラボノイド(例えば、緑茶、レッドベリー、ココア、ブドウ、チャボトケイソウ、または柑橘類の抽出物)、またはイソフラボン(例えば、ゲニステイン/ゲニスチンおよびダイゼイン/ダイジンなど)など)から構成される群から選択されることが有益である。抗酸化剤群には、抗糖化剤(カルノシンまたは一定のペプチド、N-アセチル-システインなど)および抗酸化剤またはフリー・ラジカル捕捉酵素(スーパー・オキシドジムスター^セ(SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、チオレドキシンレダクターゼ、およびそのアゴニストなど)がさらに含まれる。20

【0183】

組み合わせて使用することができる傷を修復する／バリア機能を修復する薬剤は、ビタミンA、パンテノール(ビタミンB5)、アボカドフラン(登録商標)、アボカド糖、ルペオール、マカペプチド抽出物、キノアペプチド抽出物、アラビノガラクタン、酸化亜鉛、マグネシウム、ケイ素、マデカス酸またはアシアト酸、硫酸デキストラン、補酵素Q10、グルコサミンおよびその誘導体、コンドロイチン硫酸および他のグリコサミノグリカン(GAG)、硫酸デキストラン、セラミド、コレステロール、スクアラン、リン脂質、発酵または未発酵のダイズペプチド、植物ペプチド、海洋、植物、または生物工学的なポリサッカリド(藻類抽出物またはシダ抽出物など)、微量元素、タンニンが豊富な植物の抽出物(オーク没食子で最初に見出された没食子酸タンニンまたは加水分解性タンニンと呼ばれる没食子酸由来のタンニンなど)、およびフラバン単位(そのモデルはカテキュー(アカシアカテキュー)によって提供される)の重合に起因するカテキンタンニンであることが有利である。使用することができる微量元素は、銅、マグネシウム、マンガン、クロム、セレン、ケイ素、亜鉛、およびその混合物から構成される群から選択されることが有利である。30

【0184】

組み合わせて成熟被験体の座瘡を処置するように作用することができる老化防止剤は、抗

10

20

30

40

50

酸化剤、特に、ビタミンC、ビタミンA、レチノール、レチナール、任意の分子量のヒアルロン酸、アボカドフラン（登録商標）、ルピナスペプチド、およびマカペプチド抽出物である。

【0185】

最も一般的に使用されている保湿薬／軟化剤は、グリセリンまたはその誘導体、尿素、ピロリドンカルボン酸およびその誘導体、任意の分子量のヒアルロン酸、グリコサミノグリカンおよび海洋、植物、または生物工学的な起源の任意の他のポリサッカリド（例えば、キサンタンガム、フコゲル（登録商標）など）、一定の脂肪酸（ラウリン酸、ミリスチン酸、一価不飽和および多価不飽和の-3、-6、-7、および-9脂肪酸（リノール酸、パルミトレイン酸など）など）、ヒマワリ油留出物、アボカドペプチド、およびクプアスバターである。10

【0186】

疾患の処置のために、本発明の薬剤を薬学的組成物に処方することができる。

【0187】

本明細書中で使用する場合、「薬学的組成物」は、1つ以上の本明細書中に記載の有効成分の他の化学成分（生理学的に適切なキャリアおよび賦形剤など）との調製物をいう。薬学的組成物の目的は、生物への化合物の投与を容易にすることである。

【0188】

本明細書中の用語「有効成分」は、生物学的效果について説明することができるBc1-xL、Bc1-wおよび/p21を下方制御することができる薬剤をいう。薬学的組成物が特定の疾患の処置で有用であることが公知のさらなる活性薬剤を含むことができると認識されるであろう。したがって、例えば、皮膚線維性疾患の処置のために、本発明者らは、少なくとも1つの上記の皮脂調節剤、抗菌薬、抗真菌薬、角質溶解薬、角質調節剤、収斂薬、抗炎症剤／抗刺激剤、抗酸化剤／フリーラジカル消去剤、瘢痕形成剤、老化防止剤、および/pまたは保湿剤と共に上記の薬剤を含む薬学的組成物を意図する。20

【0189】

以後、互換的に使用することができる句「生理学的に許容され得るキャリア」および「薬学的に許容され得るキャリア」は、生物に有意に刺激を与えず、且つ投与した化合物の生物学的活性および性質を抑制しないキャリアまたは希釈剤をいう。アジュvantは、これらの句に含まれる。30

【0190】

本明細書中の用語「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために薬学的組成物に添加される不活性物質をいう。賦形剤の例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖およびデンプン型、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、およびポリエチレングリコールが含まれるが、これらに限定されない。

【0191】

本発明の薬学的組成物を、当該分野で周知の過程によって（例えば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣錠作製、湿式粉碎、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥の各過程によって）製造することができる。

【0192】

したがって、本発明で用いる薬学的組成物を、薬学的に使用することができる調製物への有効成分の加工を容易にする賦形剤および助剤を含む1つ以上の生理学的に許容され得るキャリアを使用した従来の様式で処方することができる。適切な処方は、選択される投与経路に依存する。40

【0193】

注射のために、薬学的組成物の有効成分を、水溶液、好ましくは生理学的に適合可能な緩衝液（ハンクス液、リングル液、または生理学的塩緩衝液など）に処方することができる。

【0194】

適切な投与経路には、例えば、経口経路、直腸経路、経粘膜経路、特に経鼻経路、腸経路

10

20

30

40

50

、または非経口経路（筋肉内、皮下、および髄内への注射が含まれる）、および髄腔内、直接脳室内、心臓内（右心室腔内または左心室腔内）への注射、一般的な冠状動脈内、静脈内、腹腔内（intra peritoneal）、鼻腔内、または眼内への注射が含まれ得る。

【0195】

特定の実施形態によれば、投与経路は局所送達を介した投与経路である。

【0196】

あるいは、全身様式よりもむしろ局所様式で（例えば、患者の組織領域への薬学的組成物の直接注射によって）薬学的組成物を投与することができる。

【0197】

本発明の薬学的組成物を、当該分野で周知の過程によって（例えば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣錠作製、湿式粉碎、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥の各過程によって）製造することができる。

10

【0198】

したがって、本発明で用いる薬学的組成物を、薬学的に使用することができる調製物への有効成分の加工を容易にする賦形剤および助剤を含む1つ以上の生理学的に許容され得るキャリアを使用した従来の様式で処方することができる。適切な処方は、選択される投与経路に依存する。

【0199】

注射のために、薬学的組成物の有効成分を、水溶液、好ましくは生理学的に適合可能な緩衝液（ハンクス液、リンゲル液、または生理学的塩緩衝液など）に処方することができる。経粘膜投与のために、透過すべきバリアに適切な浸透剤を処方物中で使用する。かかる浸透剤は、一般に、当該分野で公知である。

20

【0200】

経口投与のために、薬学的組成物を、活性化合物を当該分野で周知の薬学的に許容され得るキャリアと組み合わせることによって容易に処方することができる。かかるキャリアは、薬学的組成物を患者による経口摂取のための錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、および懸濁液などとして処方することができる。経口用の薬学的調製物を、固体賦形剤を使用して、任意選択的に得られた混合物を粉碎し、顆粒混合物を加工し、必要に応じて適切な助剤を添加後、錠剤または糖衣錠コアを得ることによって作製することができる。適切な賦形剤は、特に、充填剤（糖（ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールが含まれる）；セルロース調製物（例えば、メイズデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなど）；および／または生理学的に許容され得るポリマー（ポリビニルピロリドン（PVP）など）など）である。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（アルギン酸ナトリウムなど）などの崩壊剤を添加することができる。

30

【0201】

適切なコーティングを有する糖衣錠コアを提供する。この目的のために、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を任意選択的に含むことができる糖濃縮液を使用することができる。染料または色素を、識別または活性化合物の用量の異なる組み合わせを特徴づけるために錠剤または糖衣錠コーティングに添加することができる。

40

【0202】

経口で使用することができる薬学的組成物には、ゼラチンから作製した押し込み型のカプセルならびにゼラチンおよび可塑剤（グリセロールまたはソルビトールなど）から作製された密封軟カプセルが含まれる。押し込み型カプセルは、充填剤（ラクトースなど）、結合剤（デンプンなど）、潤滑剤（タルクまたはステアリン酸マグネシウムなど）、および

50

、任意選択的に、安定剤と混合して有効成分を含むことができる。軟カプセルでは、有効成分を、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体に溶解または懸濁することができる。さらに、安定剤を添加することができる。経口投与のための全ての処方物は、選択された投与経路に適切な投薬量であるべきである。

【0203】

口内投与のために、組成物は、従来の様式で処方した錠剤またはロゼンジの形態を取ることができる。

【0204】

鼻孔吸入による投与のために、本発明にしたがって使用するための有効成分を、適切な噴射剤（ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロ・テトラフルオロエタン、または二酸化炭素）を使用して加圧パックまたはネブライザーからエアロゾルスプレーを噴射する形態で送達させることができが良い。加圧エアロゾルの場合、投薬単位を、弁に一定量を送達させることによって決定することができる。化合物と適切な粉末基剤（ラクトースまたはデンプンなど）との粉末混合物を含む、例えば、ディスペンサーで用いるゼラチンのカプセルおよびカートリッジを処方することができる。

10

【0205】

本明細書中に記載の薬学的組成物を、例えば、ボーラス注射または連続注入による非経口投与のために処方することができる。注射用処方物を、単位投薬形態（例えば、任意選択的に防腐剤を添加したアンプルまたは多用量容器）中に含めることができる。組成物は、油性または水性のビヒクルの懸濁液、溶液、または乳濁液であってよく、処方剤（懸濁剤、安定剤、および／または分散剤など）を含むことができる。

20

【0206】

非経口投与のための薬学的組成物は、水溶性活性調製物の水溶液を含む。さらに、有効成分の懸濁液を、適切な油性または水ベースの注射用懸濁液として調製することができる。適切な親油性の溶媒またはビヒクルには、脂肪油（ゴマ油など）または合成脂肪酸（オレイン酸エチルなどのエステル、トリグリセリド、またはリポソームなど）が含まれる。水性注射用懸濁液は、懸濁液の粘度を増加させる物質（カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなど）を含むことができる。任意選択的に、懸濁液はまた、適切な安定剤または高濃度溶液を調製するために有効成分の溶解性を増加させる薬剤を含むことができる。

30

【0207】

あるいは、有効成分は、使用前に適切なビヒクル（例えば、滅菌された発熱物質を含まない水ベースの溶液）で再構成するための粉末形態であり得る。

【0208】

本発明の薬学的組成物を、例えば、従来の坐剤基剤（カカオバターまたは他のグリセリドなど）を使用した坐剤または停留浣腸などの直腸組成物に処方することもできる。

【0209】

本発明の文脈での使用に適切な薬学的組成物には、有効成分が意図する目的を達成するのに有効な量で含まれる組成物が含まれる。より具体的には、治療有効量は、障害（例えば、線維性疾患または炎症性疾患）の症状の防止、緩和、もしくは改善、または処置される被験体の延命に有効な有効成分（例えば、s i R N A 薬）の量を意味する。

40

【0210】

治療有効量の決定は、特に、本明細書中に提供した詳細な開示に照らして、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0211】

本発明の方法で使用した任意の調製物のために、所望の濃度または力価を達成するための治療有効量または用量を、動物モデル（例えば、C C 1₄ によって誘導された肝臓線維症のマウスモデル、セルレインによって誘導された脾炎のマウスモデル、C O P D のマウスモデル）から評価することができる。かかる情報を使用して、ヒトに有用な用量をより正確に決定することができる。

50

【0212】

本明細書中に記載の有効成分の毒性および治療有効性を、実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。これらの動物研究から得たデータを、ヒトで用いる投薬量の範囲の策定で使用することができる。投薬量は、使用した投薬形態および利用した投与経路に応じて変動し得る。正確な処方、投与経路、および投薬量を、患者の容態を考慮して各医師が選択することができる（例えば、Fingl, et al., 1975, in 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p. 1を参照のこと）。

【0213】

投薬量および間隔を、正常血糖（最小有効濃度、MEC）を誘導するのに十分な細胞数が得られるように個別に調整することができる。MECは、各調製物について変動するが、in vitroデータから推定することができる。MECを達成するために必要な投薬量は、各々の特徴および投与経路に依存するであろう。検出アッセイを使用して血漿濃度を決定することができる。

10

【0214】

勿論、組成物の投与量は、処置される被験体、苦痛の重症度、投与様式、担当医の判断などに依存するであろう。

【0215】

本発明の組成物は、必要に応じて、有効成分を含む1つ以上の単位投薬形態を含むことができるパックまたはディスペンサーデバイス（FDA認定キットなど）中に存在することができる。パックは、例えば、金属製またはプラスチック製の箱（ブリストーパックなど）を含むことができる。パックまたはディスペンサーデバイスに、投与説明書を同梱することができる。パックまたはディスペンサーに、製造、医薬品の使用または販売を規制する政府機関によって指示された形態で容器に添付された通知も同梱することができ、この通知は、組成物の形態またはヒトもしくは動物への投与についての政府機関による承認を反映している。かかる通知書は、例えば、処方薬について米国食品医薬品局によって承認されたラベルまたは承認された製品の添付文書であり得る。適合可能な薬学的キャリア中に処方された本発明の調製物を含む組成物を、上記でさらに詳述するかのように調製し、適切な容器に入れ、表示の容態の処置について表示することもできる。

20

【0216】

本出願由来の特許の存続期間中、Bcl-xLおよび/またはBcl-wおよび/またはp21を下方制御することができる多数の関連薬剤が開発され、句「下方制御することができる薬剤」の範囲が全てのかかる新規のテクノロジーを推測的に含むことを意図すると期待される。

30

【0217】

用語「comprises」、「comprising」、「includes」、「including」、「having」、およびその変化形は、「～が含まれるが、これらに限定されない」を意味する。

【0218】

用語「～からなる」は、「～を含み、且つそれに制限される」を意味する。

40

【0219】

用語「～から本質的になる」は、さらなる成分、工程、および/または部分が特許請求の範囲に記載の組成物、方法、または構造の基本的および新規の特徴を実質的に変化させない場合に限り、組成物、方法、または構造がさらなる成分、工程、および/または部分を含むことができることを意味する。

【0220】

本明細書中で使用される場合、用語「方法」は、所与の課題を実施するための様式、手段、技術、および手順（化学分野、薬理学分野、生物学分野、生化学分野、および医学分野の当業者に公知であるか、この当業者によって公知の様式、手段、技術、および手順から容易に開発される様式、手段、技術、および手順が含まれるが、これらに限定されない）

50

をいう。

【0221】

本明細書中で使用する場合、用語「処置」には、容態の抑止、実質的な阻害、容態の進行の遅延もしくは逆転、容態の臨床的もしくは審美的な症状の実質的な改善、または容態の臨床的もしくは審美的な症状の出現の実質的な防止が含まれる。

【0222】

明確にするために個別の実施形態に記載の本発明の一定の特徴を单一の実施形態で組み合わせて提供することもできると認識される。逆に、簡潔するために单一の実施形態に記載の本発明の種々の特徴を、個別に提供するか、任意の適切なサブコンビネーションで提供するか、本発明の任意の他の記載の実施形態中に適切に提供することもできる。これらの要素を含まない実施形態が無効とならない限り、種々の実施形態に記載の一定の特徴は、前記実施形態の必須の特徴と見なすべきではない。

10

【0223】

前述および以下の特許請求の範囲に記載の本発明の種々の実施形態および態様は、以下の実施例において実験的に裏付けられる。

【0224】

ここで以下の実施例に関して言及し、実施例は、上記の説明と共に、制限されない様式で本発明のいくつかの実施形態を例証する。

【0225】

一般に、本明細書中で使用した命名法および本発明で利用した実験手順には、分子的技術、生化学的技術、微生物学的技術、および組換えDNA技術が含まれる。かかる技術は、文献に十分に説明されている。例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrook et al., (1989); 「Current Protocols in Molecular Biology」Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., 「Recombinant DNA」, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) 「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号明細書；同第4,683,202号明細書；同第4,801,531号明細書；同第5,192,659号明細書；および同第5,272,057号明細書に記載の方法；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」, Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); 「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」 by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Third Edition; 「Current Protocols in Immunology」 Volumes I-II I Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), 「Basic and Clinical Immunology」 (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), 「Selected Methods in Cellular Immunology」, W.H. Freeman and Co., New York (1980)；利用可能な免疫アッセイが特許および科学文献に広く記載されており、例えば、米国特許第3,791,932号明細書；同第3,839,153号明細書；同第3,850,752号明細書；同第3,850,50

20

30

40

50

78号明細書；同第3, 853, 987号明細書；同第3, 867, 517号明細書；同第3, 879, 262号明細書；同第3, 901, 654号明細書；同第3, 935, 074号明細書；同第3, 984, 533号明細書；同第3, 996, 345号明細書；同第4, 034, 074号明細書；同第4, 098, 876号明細書；同第4, 879, 219号明細書；同第5, 011, 771号明細書；および同第5, 281, 521号明細書を参照のこと；「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M. J., ed. (1984)；「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985)；「Transcription and Translation」Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984)；「Animal Cell Culture」Freshney, R. I., ed. (1986)；「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press, (1986)；「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B., (1984) and 「Methods in Enzymology」Vol. 1 - 317, Academic Press；「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」, Academic Press, San Diego, CA (1990)；Marshak et al., 「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press (1996)（これら全てが本明細書中に完全に記載されているものとして参照して援用される）を参照のこと。他の一般的な文献が本明細書の至る所に提供されている。本明細書中の手順は、当該分野で周知であると考えられ、読み手の便宜のために提供する。本明細書中の全ての情報は、本明細書中で参考として援用される。一般的な材料と方法
10
20

【0226】

組織培養：ヒト初代線維芽細胞（IMR-90、BJ）を、ATCC MEFから入手したか、13.5日目の胚から調製した。全培養物を、10%ウシ胎児血清（Hyclone）を補足したDMEM中で維持した。エトポシド（50mM、Sigma）での処置またはIMR-90細胞への感染を使用した発癌性H-ras^{V12}の導入（Narita、2003に記載）によって老化を誘導した。
30

【0227】

免疫プロッティング：細胞をRIPA緩衝液で溶解した。等量のタンパク質を、12%SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、PVDF膜に移した。以下の抗体を使用して検出した：抗Rb(9313)、抗切断parp(9541)、抗切断カスパーゼ-3(9661)、抗ホスホ-p53(9284)、抗マウス-p53(2524)、抗ホスホ-NF-(3033)、抗Bcl-2(2870)、抗Bcl-w(2724)、および抗Bcl-xL(2764)を、Cell Signaling Technologyから購入した。抗ヒトp53(DO1およびPA61801)、抗p16(sc-759)、抗マウス-p21(sc-397)、抗NF-Bp65(sc-372)、および抗-チューブリン(sc-9104)を、Santa Cruz Biotechnologyから入手し、抗Mc1-1(1239-1)をEpitomicsから入手した。
40

【0228】

RNA単離および定量的RT-PCR：定量的RT-PCRのために、総RNAを、Nu cleoSpinキット(Macherey Nagel, Duren, Germany)を使用して単離した。1μgアリコートの総RNAを、モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素(Promega)およびランダムヘキサーブライマー(Applied Biosystems)を使用して逆転写した。ABI StepOnePlus装置(Applied Biosystems)においてPlatinum SYBR Green qPCR SuperMix(Invitrogen)を使用してリアルタイムP
50

C Rを行った。

【0229】

特異的遺伝子についての値を GAPDH に対して正規化した。プライマー配列は以下であった：(1) GAPDH 順方向、5' - GACAGTCAGCCGCATCTTC - 3' (配列番号 1)；逆方向、5' - CGTTGACTCCGACCTTCAC - 3' (配列番号 2)；(2) Bcl-2 順方向、5' - ACTGGAGAGTGTGCTGAAGATTGATG - 3' (配列番号 3)；逆方向、5' - CTACTTCCCTCTGTGATGTTGTATTTTAAG - 3' (配列番号 4)；(3) Bcl-w 順方向、5' - TGACACCTGGGTGGAAAGAG - 3' (配列番号 5)；逆方向、5' - CCACTGTTGGTCCCATCTAAG - 3' (配列番号 6)；(4) Bcl-xL 順方向、5' - CCATACTGAGGGACCAAATG - 3' (配列番号 7)；逆方向、5' - GGCTGCTCTTGTAGGAAGTG - 3' (配列番号 8)；(5) p21 順方向、5' - TGTCTTTCCCTGGCACTAACG - 3' (配列番号 9)；逆方向、5' - AACAGTCCAGGCCAGTATG - 3' (配列番号 10)；(6) IL-8 順方向、5' - GTCTGCTAGCCAGGATCCAC - 3' (配列番号 11)；逆方向、5' - GCTTCCACATGTCCTCACAA - 3' (配列番号 12)；(7) MMP-3、順方向、5' - TCTGAGGGAGAAATCCCTGA - 3' (配列番号 13)；逆方向、5' - GGAAGAGATGGCCAAAATGA - 3' (配列番号 14)；(8) サイクリンA2、順方向、5' - ATGGACCTTCACCA GACCTA - 3' (配列番号 15)；逆方向、5' - TGGGTTGAGGGAGAGAACAC - 3' (配列番号 16)；(9) CDK1 順方向、5' - AGCCGGGATCTACCATAC - 3' (配列番号 17)；逆方向、5' - TCATGGCTACCACTTGAC - 3' (配列番号 18)；(10) IL-1 順方向、5' - GCTGCTCTGGGATTCTCTTC - 3' (配列番号 19)；逆方向、5' - TGGCGAGCTCAGGTACTTC - 3' (配列番号 20)。

【0230】

生存度アッセイ：成長中の細胞および老化細胞を、12ウェルプレート中に 7.5×10^4 細胞/ウェルでプレートした。翌日、細胞をDMSOコントロール、ABT-737 (Selleckchem, USA)、またはABT-199 (Chemietek, USA)で処置し、細胞生存度を24時間後に分析した。300 μlのPrestoBlue試薬 (Invitrogen, USA) を各ウェルに添加し、プレートを37℃で20分間インキュベートした。100 μlのサンプルを96ウェルプレートに2連で取り、Tecanプレートリーダー (Infinite (登録商標) M200) を使用して540 nmのODを読み取った。100 μMのz-VAD-fmk (Santa Cruz, USA)との3時間のプレインキュベーション後に表示のABT-737を添加した。

【0231】

siRNA : p21、Bcl-2、Bcl-w、Bcl-xLをターゲティングするON-TARGET plus SMART pool低分子干渉RNAおよび非ターゲティングペル siRNA (コントロール)を、Dharmafect 1試薬を使用して細胞にトランسفェクトした (全てDharmacon, Lafayette, CO, USAから入手)。siRNAを、トランسفェクション24時間後に洗い流し、生存度を上記のように4日後に分析した。(実施例1) Bcl-wタンパク質およびBcl-xLタンパク質の発現は、老化細胞中で上昇する

【0232】

成長中および老化した正常なヒト (IMR-90) およびマウス (MEF) の二倍体線維芽細胞中のBcl-2ファミリーメンバーのタンパク質レベルを分析した。老化は、発癌性H-rasV12の発現またはDNA損傷剤エトボシドでの処置のいずれかによってこれらの細胞中で誘導された。Bcl-wレベルおよびBcl-xLレベルは、ヒトおよびマウスの両起源の老化細胞で上昇した。この効果は、老化を誘導するために使用した刺激と無関係であった (図1A)。対照的に、Mc1-1レベルおよびBcl-2レベルの変

化は、あまり顕著でないか、細胞起源および老化を誘導するために使用したストレス刺激に依存した。老化の古典的マーカー p 1 6、p 2 1、または p 5 3 のレベルを、陽性 S A - g a l 染色と共に細胞の老化表現型のポジティブコントロールとして使用する(図 1 A ~ B)。これらの遺伝子の

m R N A レベルは、成長中の細胞と老化細胞との間であまり変化せず、タンパク質レベルの増加を転写後レベルで制御することができることを示したことにも注目すべきである(図 1 C)。

(実施例 2)

B c 1 - w および B c 1 - x L の組み合わせノックダウンにより、老化細胞死が誘導される

10

【0 2 3 3】

3つのタンパク質である B c 1 - 2、B c 1 - w、および B c 1 - x L のいずれがエトポシド処置した老化 I M R - 9 0 細胞にアポトーシス耐性を付与するのかを区別するために、本発明者らは、これらの各タンパク質の個別の機能を特異的に阻害することを試みた。s i R N A を使用して B c 1 - w および B c 1 - x L をノックダウンし、s i R N A がタンパク質レベルでの B c 1 - 2 遺伝子のノックダウンで無効であるので、特異的インヒビター A B T - 1 9 9 を使用して B c 1 - 2 を遮断した(図 2 B)。老化細胞における B c 1 - w および B c 1 - x L の個別のノックダウンにより、その生存度がわずかに低下した(図 3 A)。興味深いことに、組み合わせノックダウンは相乗効果があり、50% の細胞を死滅させた。B c 1 - w および B c 1 - x L ノックダウンに加えて B c 1 - 2 阻害のさらなる寄与を評価するために、B c 1 - 2 インヒビターである A B T - 1 9 9 を使用した(図 3 B)。B c 1 - 2 の阻害は統計的に有意であるが、老化細胞生存度に及ぼす B c 1 - w および B c 1 - x L の阻害のさらなる影響は小さかった。さらに、A B T - 1 9 9 での B c 1 - 2 のみの阻害は老化細胞の生存度にほとんど影響を及ぼさず、加えて、発癌性 H - r a s V 1 2 で誘導した老化 I M R - 9 0 細胞については細胞生存度の減少が小さかった(図 3 C ~ D)。

20

(実施例 3) B H 3 模倣 A B T - 7 3 7 は老化細胞の細胞死を誘導する

【0 2 3 4】

抗アポトーシスタンパク質である B c 1 - w および B c 1 - x L のレベルの増加が独立したアプローチによって老化細胞のアポトーシス耐性を説明することができるという仮説をさらに試験するために、タンパク質の B c 1 - 2 ファミリーの薬理学的インヒビター A B T - 7 3 7 で細胞を処置した(Chauhan et al., 2007)。正常なヒト(I M R - 9 0)およびマウス(M E F)の線維芽細胞を、D N A 損傷の誘導または発癌性 H - R a s V 1 2 での形質導入によって老化するように誘導した。老化表現型を確立した後、細胞を A B T - 7 3 7 で 2 4 時間処置した。成長中の細胞、ビヒクリル処置細胞、またはベクターで形質導入した細胞を、それぞれ D N A 損傷または発癌性 H - R a s V 1 2 のコントロールとして使用した。この処置により老化細胞の生存度が 50% 減少した一方で、コントロール細胞に及ぼす影響は僅かであった(図 4 A ~ B)。したがって、B c 1 - 2 ファミリータンパク質の薬理学的阻害によって老化細胞が特異的に排除されることが示された。

30

(実施例 4) A B T - 7 3 7 はカスパーぜ依存性アポトーシスによって老化細胞を死滅させる

【0 2 3 5】

B c 1 - 2 ファミリーメンバーは、アポトーシス経路を負に制御する(A z m i et al., 2011; Cory et al., 2003; Reed, 2008)。A B T - 7 3 7 がアポトーシス経路を介して老化細胞を死滅させるかどうかを決定するために、D N A 損傷誘導性老化 I M R - 9 0 細胞、発癌性 H - R a s V 1 2 誘導性老化細胞、および成長中のコントロール細胞を、A B T - 7 3 7 のみまたは汎カスパーぜインヒビター z - V A D - f m k と組み合わせて処置した。予想通り、A B T - 7 3 7 処置後に A B T - 7 3 7 は老化細胞死を誘導する一方で、z - V A D - f m k は老化細胞死を防止した(図

40

50

5 A)。カスパーーゼ - 3 がアポトーシス機構によって切断されるので、本発明者らは、A B T - 7 3 7 のみまたは汎カスパーーゼインヒビター z - V A D - f m k との組み合わせでの処置後のカスパーーゼ - 3 の活性化切断形態の存在を試験した。A B T - 7 3 7 で処置した老化細胞のみがカスパーーゼ - 3 切断を示す(図 5 B)。z - V A D - f m k の添加により、この切断が無効にされた。A B T - 7 3 7 が老化細胞のアポトーシスを誘導すると結論付けることができる。

(実施例 5) p 2 1 (CDKN1A) は老化細胞の生存度を維持する

【0236】

CDK4 および CDK2 のインヒビターとして、p 2 1 は細胞老化の主な調節因子である (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)。p 2 1 はいくつかの環境下でアポトーシスを阻害することも示唆された (Abbas and Duttta, 2009)。老化細胞の生存度への p 2 1 の寄与を調査するために、成長中の細胞および老化細胞 (正常なヒト細胞 (IMR - 90、BJ) およびマウス (MEF) 線維芽細胞ならびに肺癌細胞 (H1299)) において siRNA を使用して p 2 1 をノックダウンした。成長中の細胞における p 2 1 ノックダウンが細胞生存度に悪影響を及ぼさなかったのに対して、老化細胞におけるそのノックダウンにより IMR - 90 細胞、BJ 細胞、H1299 細胞、および MEF 細胞の各々について細胞生存度が 30%、50%、75%、および 30% 減少した (図 6 A ~ D)。興味深いことに、p 2 1 の siRNA でトランスフェクトした老化 BJ 細胞の生存度の連続した減少が長期間認められ、p 2 1 ノックダウンの蓄積効果が示された (図 6 E)。したがって、p 2 1 は、老化細胞の生存度を維持するために必要である。
10

(実施例 6) 老化細胞の死滅は、p 5 3 および p RB に非依存性であり、カスパーーゼ - 3 活性化に関与する

【0237】

DNA 損傷応答が得られる刺激 (例えば、電離放射線およびテロメア機能不全) は、主に p 5 3 経路によって老化を誘導する (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)。活性 p 5 3 は、p 2 1 (特に、リン酸化を抑制し、それ故、p RB を不活性させるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビター) の発現の誘導により老化による成長停止を部分的に生じさせる。p RB は、E2F (細胞周期の進行に必要な遺伝子の発現を刺激する転写因子) の活性の抑制によって細胞増殖を停止させる。
30

【0238】

老化 BJ 細胞における p 2 1 のノックダウンにより、アポトーシスエフェクターであるカスパーーゼ - 3 および PARP の切断から示されるアポトーシス機構の活性化を生じるが、成長中の BJ 細胞においては生じなかつた。これは、p 5 3 レベルおよび p 5 3 活性 (p - p 5 3) の顕著な増加および p RB レベルの低下を伴っていた (図 7 A)。p 5 3 および E2F は DNA 損傷に応答してアポトーシスを誘導することが公知であるので、本発明者らは、p 2 1 ノックダウンが p 5 3 または p RB に依存する様式で老化細胞の生存度に影響を及ぼすかどうかをチェックした。

【0239】

p 2 1、p 5 3、または p RB を、エトポシド処置した BJ 細胞において個別にノックダウンするか、p 2 1 と組み合わせてノックダウンした。驚いたことに、p 5 3 ノックダウンは、老化細胞の生存度を減少させたが、p 2 1 のみと比較してその程度は低かった (図 7 B)。両遺伝子を同時にノックダウンした場合、p 2 1 ノックダウンのみと比較して p 5 3 についてさらなる影響は検出されなかつた。ウェスタンプロットから認められるように、p 5 3 ノックダウンによって p 2 1 レベルが減少した。したがって、p 2 1 レベルは p 5 3 自体よりもむしろ p 5 3 の下流で老化細胞の生存度の維持を担うと結論付けることができる。
40

【0240】

p RB の p 2 1 とのノックダウンは、p 2 1 のみのノックダウンと比較して老化細胞の生

10

20

30

40

50

存度にさらなる影響を及ぼさなかった（図7C）。驚いたことに、pRBを単独でノックダウンした場合、細胞の生存度に影響を及ぼさなかつたが、むしろp21レベルを増加させた。したがつて、p21はp53およびpRBに非依存性の様式で老化細胞の生存度を維持する。

（実施例7） p21ノックダウン後の老化細胞死は、部分的にのみカスパーぜ依存性である

【0241】

p21ノックダウンに原因する細胞死のタイプを解明するために、カスパーぜ媒介細胞死を、汎カスパーぜインヒビターであるz-VAD-fmkの添加によって評価した。z-VAD-fmkは、細胞死を20%しか救済することができなかつた（図8）。切断カスパーぜ-3バンドおよび切断PARPバンドが明白であるように、カスパーぜ-3はp21ノックダウンを行つたエトポシド処置細胞で活性化された（図8）。z-VAD-fmkがp21ノックダウンによって媒介された細胞生存度の減少を完全に救済できなかつたことを考慮すると、カスパーぜ依存性アポトーシスが認められた細胞死の一部しか担つていないと判断することができる。したがつて、壞死などの他の細胞死機構を老化細胞におけるp21のノックダウンによって誘導することができると仮定することができる。

（実施例8） E2F標的および炎症遺伝子は、p21ノックダウンに対する応答として下方制御される

【0242】

p21は、転写因子（E2F1、STAT3、およびMYCなど）の転写活性を、直接結合および転写因子のトランス活性化活性の阻害によって阻害することができる（Abbas and Dutta, 2009）。したがつて、p21ノックダウンに応答したE2F標的のmRNAレベルおよびSASP成分の変化を測定した。E2F標的であるサイクリン-A2およびCDK-1のmRNAレベルの有意な増加がp21ノックダウン後に検出された（図9A～E）。さらに、p21ノックダウンによりIL-8およびIL-1のmRNAレベルが増加し、これは老化細胞死に関与する炎症応答を示し得る。したがつて、p21ノックダウンは、老化細胞において炎症誘発性応答および細胞死を誘導する。炎症性サイトカインが免疫系に動員されてノックダウン自体によって排除されなかつた細胞を死滅させるので、このアプローチによって、このアプローチの治療可能性が増大し得る。

（実施例9） p21ノックダウンが肝臓線維症を減少させる

【0243】

線維性肝において、老化細胞は、主に活性化された肝星細胞に由来する。この肝星細胞は、肝臓損傷に応答して最初に増殖し、線維性瘢痕中に沈着する細胞外基質を生成する（Krizhanovsky et al., Cell, 2008）。肝臓線維症に及ぼすp21ノックダウンによる老化細胞の排除の影響を評価するために、本発明者らは、野生型マウスおよびp21-/マウスに線維症を誘導させた。マウスを、以前に記載のように6週間のCCl₄での処置に供して肝臓線維症を誘導させた（Krizhanovsky et al., Cell, 2008）。処置後、両遺伝子型マウス由来の肝臓を、SA-gal染色によって老化細胞の存在について試験し、シリウスレッド染色によって線維症の程度について試験した。組織培養実験と一致して、p21ノックアウトマウス由来の肝臓は、野生型と比較して含有する老化細胞が有意に少なかつた（図10）。重要なことに、この低下は、線維性瘢痕量の有意な減少を伴つていた（図10）。

【0244】

これらの所見は、in vivoでp21の非存在下において老化細胞の頻度が低下し、それにより線維症が減少することが示唆される。したがつて、本発明者らは、p21阻害による老化細胞の排除が線維症に治療効果を有し得ることを提案する。

【0245】

本発明を特定の実施形態と併せて記載しているが、多数の変形形態、修正形態、および変形形態が当業者に明らかであることが自明である。したがつて、添付の特許請求の範囲の

10

20

30

40

50

精神および範囲内にかかる変更形態、修正形態、および変形形態の全てが包含されることが意図される。

【0246】

本明細書中で言及された全ての刊行物、特許、および特許出願は、個別の刊行物、特許、または特許出願が具体的且つ個別に本明細書中で参照として援用されることを示すのと同一の範囲にその全体が本明細書中で参照として援用される。さらに、本出願中で任意の文献が引用または特定されているが、かかる文献が本発明の先行技術として利用可能であることを承認すると解釈されないものとする。使用された節の見出しの範囲に、本発明が必然的に限定されると解釈すべきではない。

【0247】

文献目録

Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9, 400-414.

Acosta, J.C., and Gil, J. (2012). Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends Cell Biol* 22, 211-219.

Adams, P.D. (2009). Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell* 36, 2-14.

Azmi, A.S., Wang, Z., Philip, P.A., Mohammad, R.M., and Sarkar, F.H. (2011). Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. Expert opinion on emerging drugs 16, 59-70.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232-236.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.

Campisi, J. (2011). Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev* 21, 107-112.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729-740.

Chan, H.M., Narita, M., Lowe, S.W., and Livingston, D.M. (2005). The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 -> p21 senescence pathway. *Genes Dev* 19, 196-201.

Chauhan, D., Velankar, M., Brahmandam, M., Hideshma, T., Podar, K., Richardson, P., Schlossman, R., Ghobrial, I., Raje, N., Munshi, N., et al. (2007). A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 26, 2374-2380.

Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223-233.

10

20

30

40

Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10, 51-57.

Cory, S., Huang, D.C., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.

Kortlever, R.M., and Bernards, R. (2006). Senescence, wound healing and cancer: the PAI-1 connection. *Cell Cycle* 5, 2697-2703.

Krizhanovsky, V., Xue, W., Zender, L., Yon, M., Hernando, E., and Lowe, S.W. (2008a). Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 513-522.

10

Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008b). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134, 657-667.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12072-12077.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peepoer, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev* 24, 2463-2479.

20

Marcotte, R., Lacelle, C., and Wang, E. (2004). Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech Ageing Dev* 125, 777-783.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peepoer, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.

Murata, Y., Wakoh, T., Uekawa, N., Sugimoto, M., Asai, A., Miyazaki, T., and Maruyama, M. (2006). Death-associated protein 3 regulates cellular senescence through oxidative stress response. *FEBS Lett* 580, 6093-6099.

30

Narita, M., Krizhanovsky, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S.A., Myers, M.P., and Lowe, S.W. (2006). A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126, 503-514.

Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.

Naylor, R.M., Baker, D.J., and van Deursen, J.M. (2013). Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clinical pharmacology and therapeutics* 93, 105-116.

Reed, J.C. (2008). Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111, 3322-3330.

10

Sagiv, A., Biran, A., Yon, M., Simon, J., Lowe, S.W., and Krizhanovsky, V. (2012). Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene* DOI:10.1038/onc.2012.206.

Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M., and Lowe, S.W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109, 335-346.

Uraoka, M., Ikeda, K., Kurimoto-Nakano, R., Nakagawa, Y., Koide, M., Akakabe, Y., Kitamura, Y., Ueyama, T., Matoba, S., Yamada, H., et al. (2011). Loss of bcl-2 during the senescence exacerbates the impaired angiogenic functions in endothelial cells by deteriorating the mitochondrial redox state. *Hypertension* 58, 254-263.

20

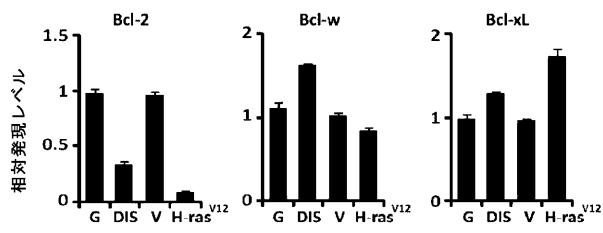
Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55, 2284-2292.

Xue, W., Zender, L., Miethling, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.

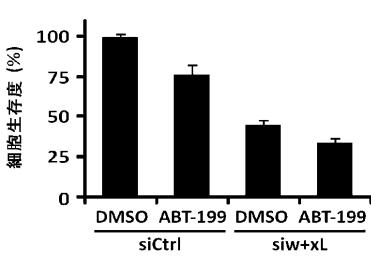
30

Zeitlin, B.D., Zeitlin, I.J., and Nor, J.E. (2008). Expanding circle of inhibition: small-molecule inhibitors of Bcl-2 as anticancer cell and antiangiogenic agents. *J Clin Oncol* 26, 4180-4188.

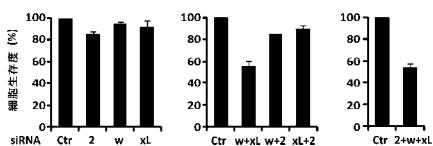
【図 1 C】



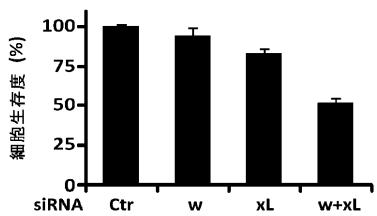
【図 3 B】



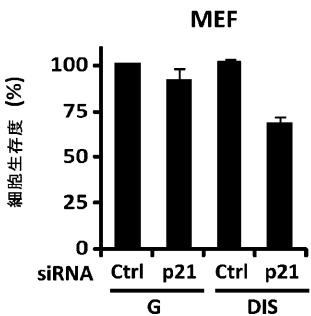
【図 2 A】



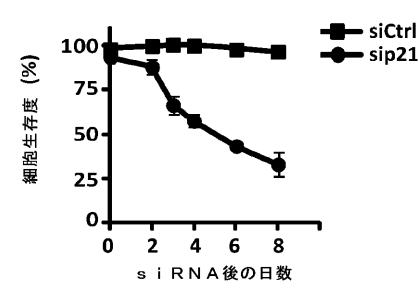
【図 3 A】



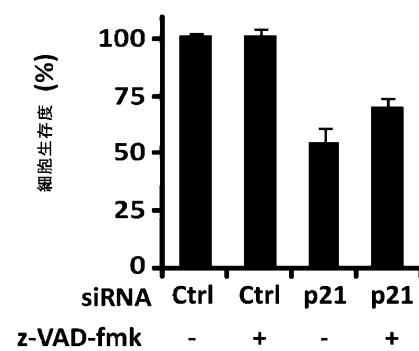
【図 6 D】



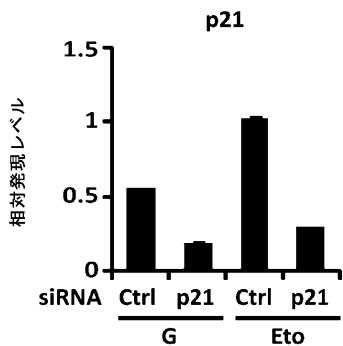
【図 6 E】



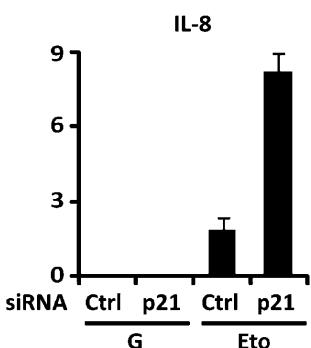
【図 8】



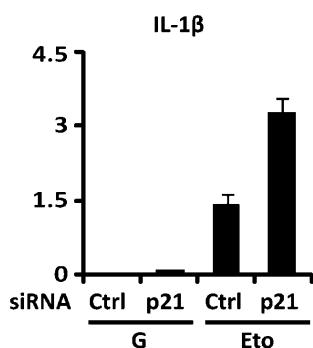
【図 9 A】



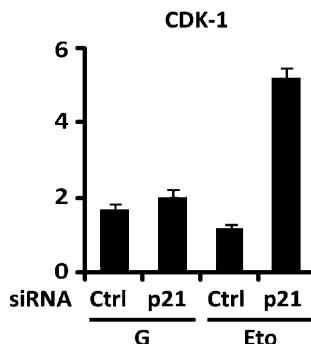
【図 9 B】



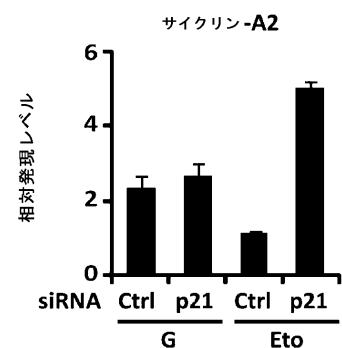
【図 9 C】



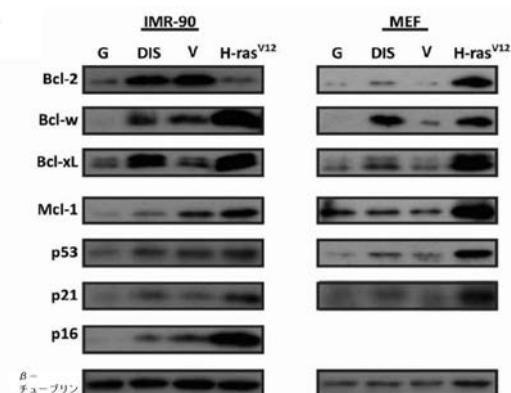
【図 9 E】



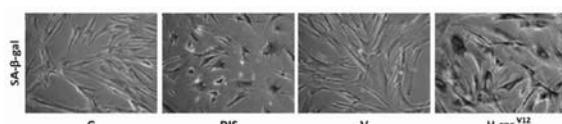
【図 9 D】



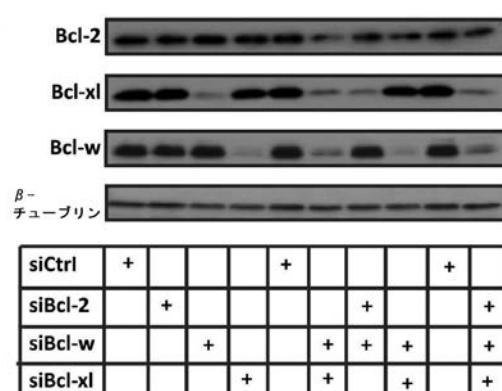
【図 1 A】



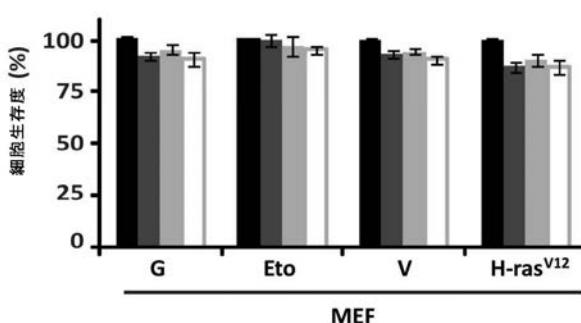
【図 1 B】



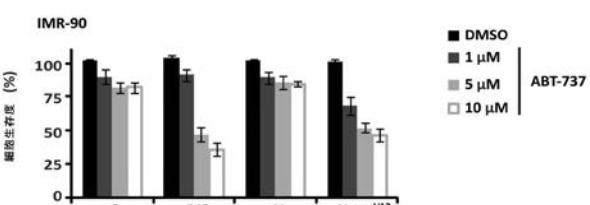
【図 2 B】



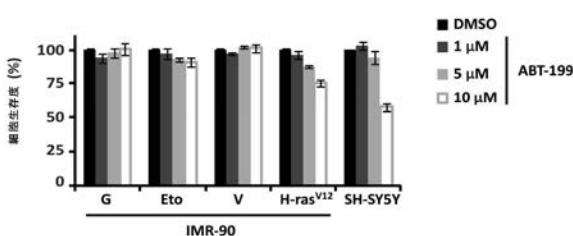
【図 3 D】



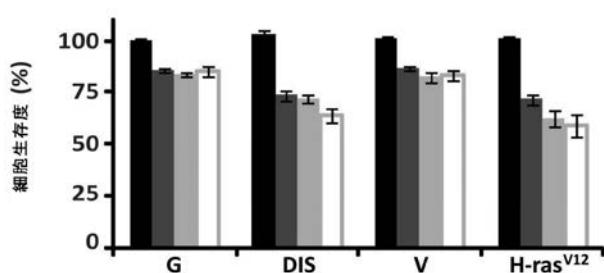
【図 4 A】



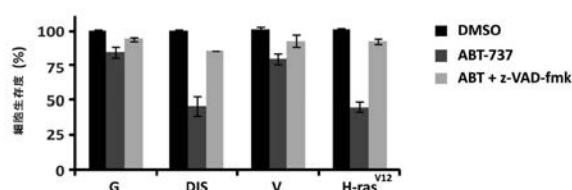
【図 3 C】



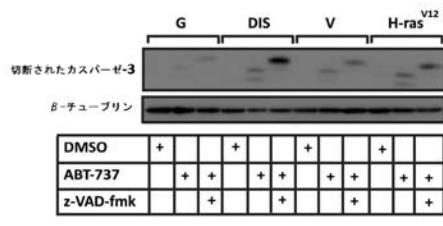
【図4B】



【図5A】

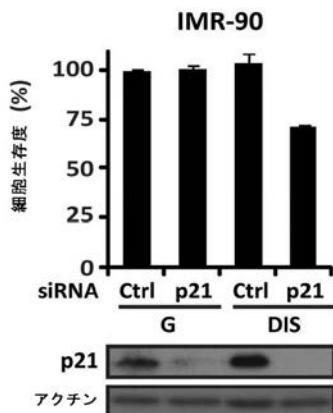


【図5B】

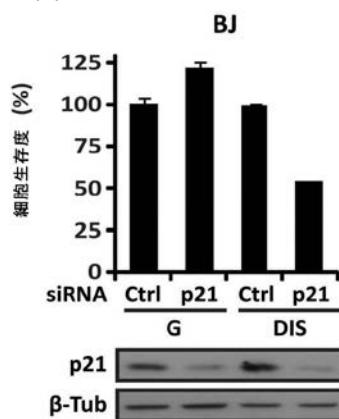


【図6A】

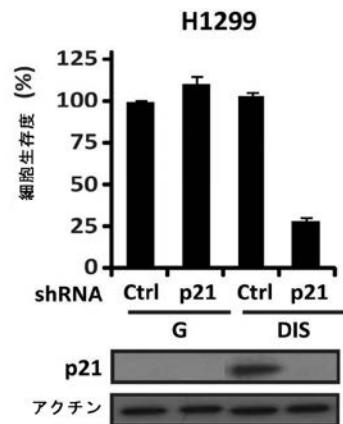
【図6A】



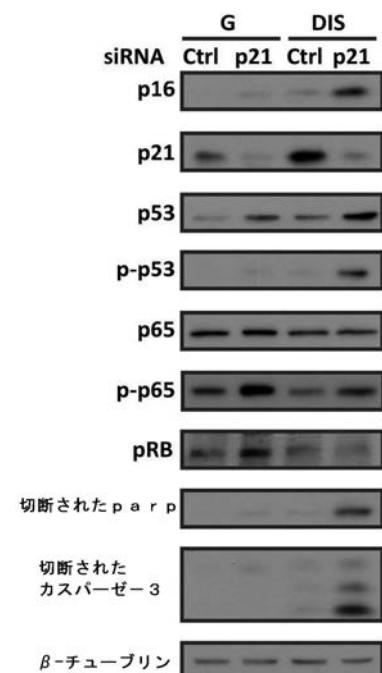
【図6B】



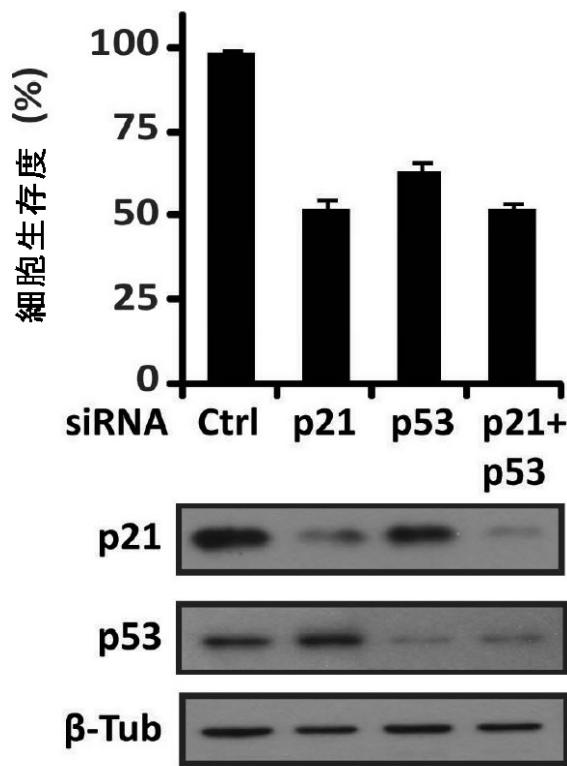
【図6C】



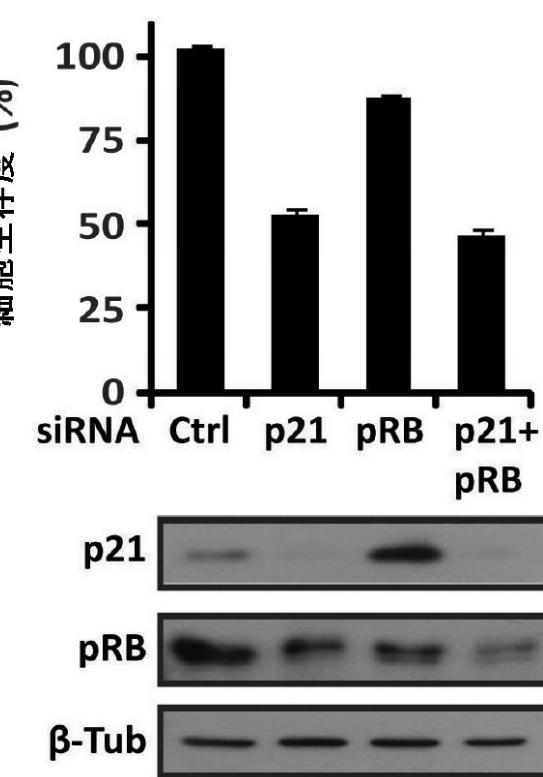
【図7A】



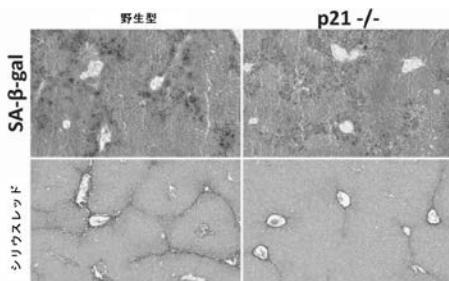
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 10】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2014/050358

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/17 A61K9/00 A61K9/06
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)
A61K

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, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/017121 A1 (INST MEDICAL W & E HALL [AU]; KILE BENJAMIN THOMAS [AU]; HUANG DAVID C) 14 February 2008 (2008-02-14) page 51, line 4 - page 52, line 25 -----	1-5
Y	-/-	6-40

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

22 August 2014

09/09/2014

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

Schifferer, Hermann

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IL2014/050358

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JINGCHUN GAO, KENJI NIWA, WIENSHU SUN, MASAO TAKEMURA, ZENGLIN LIAN, KYOKO ONOGI, MITURU SAISHIMA, HIDAKI MORI, TORUHIKO TAMAYA: "Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit cellular proliferation and upregulate cyclooxygenase-2 protein expression in endometrial cancer cells", CANCER SCI, vol. 85, no. 11, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 901-907, XP002728819, page 905, left-hand column, line 1 - page 905, left-hand column, line 22 -----	1-5
Y	VIEIRA-J-M. RODRIGUEZ-L-T. MANTOVANI-E. DELLA-H. MATTER-A-L. METHEIROS-D-M-A-C. NORONHO-L-L. FUJIHARA-C-K. ZAZ.R.: "Statin Monotherapy Attenuates Renal Injury in a Salt-Sensitive Hypertension Model of Renal Disease.", NEPHRON PHYSIOL, vol. 101, no. 4, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 82-91, XP008171430, page 86, right-hand column page 90, right-hand column, line 9 - page 90, right-hand column, line 12 -----	6-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2014/050358

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008017121 A1	14-02-2008	AU 2007283458 A1 EP 2054121 A1 US 2010292200 A1 WO 2008017121 A1	14-02-2008 06-05-2009 18-11-2010 14-02-2008

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 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/11 (2006.01)	A 6 1 K 31/11	
A 6 1 K 31/167 (2006.01)	A 6 1 K 31/167	
A 6 1 K 31/635 (2006.01)	A 6 1 K 31/635	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A	

(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,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,H,R,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 100133503

弁理士 関口 一哉

(72) 発明者 クリスハノフスキー, ヴァレリー

イスラエル国, 7 6 2 1 3 1 8 レホヴォト, ベルマン ストリート 1 2 / 1 2

(72) 発明者 ピルペル, ノアム

イスラエル国 7 6 1 0 0 1 2 レホヴォト, ピー. オー. ボックス 9 5, アットザ ワイツマン インスティテュート オブ サイエンス, c / o オブ イエダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニー リミテッド

(72) 発明者 ヨーゼフ, ロイト

イスラエル国 7 6 1 0 0 1 2 レホヴォト, ピー. オー. ボックス 9 5, アットザ ワイツマン インスティテュート オブ サイエンス, c / o オブ イエダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニー リミテッド

F ターム(参考) 4C084 AA13 AA17 AA20 NA14 ZA45 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89

ZA96 ZB11

4C086 AA01 AA02 DA20 EA16 MA01 MA02 MA03 MA04 NA14 ZA45
ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96 ZB11

4C206 AA01 AA02 CB08 GA07 GA31 MA01 NA14 ZA45 ZA59 ZA66
ZA75 ZA81 ZA89 ZA96 ZB11