

(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2017-506259

(P2017-506259A)

(43) 公表日 平成29年3月2日(2017.3.2)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	4 B 050
A61K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 B 063
A61K 31/506 (2006.01)	A 61 K 31/506	4 B 065
A61P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	4 C 084
A61P 35/02 (2006.01)	A 61 P 35/02	4 C 086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 54 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-567288 (P2016-567288)	(71) 出願人 513045677
(86) (22) 出願日	平成27年2月3日 (2015.2.3)	イッスム・リサーチ・ディベロップメント
(85) 翻訳文提出日	平成28年10月3日 (2016.10.3)	・カンパニー・オブ・ザ・ヘブルー・ユニ
(86) 國際出願番号	PCT/IL2015/050118	バーシティ・オブ・エルサレム・リミテッ
(87) 國際公開番号	W02015/114638	ド
(87) 國際公開日	平成27年8月6日 (2015.8.6)	Y I S S U M R E S E A R C H D E V
(31) 優先権主張番号	61/934, 954	E L O P M E N T C O M P A N Y O F
(32) 優先日	平成26年2月3日 (2014.2.3)	T H E H E B R E W U N I V E R S
(33) 優先権主張国	米国 (US)	I T Y O F J E R U S A L E M L T
		D.
		イスラエル国、9139002 エルサレ
		ム、ピー、オー、ボックス 39135、
		ギバット・ラム、ザ・ヘブルー・ユニバ
		シティ・オブ・エルサレム、ハイ・テク・
		パーク (番地なし)、ザ・エドモンド・ジ
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】幹細胞を枯渇させるためのカゼインキナーゼI阻害剤の使用

(57) 【要約】

対象におけるがんを治療する方法が開示される。方法は、対象に治療有効量のカゼインキナーゼI (CKI) 阻害剤を投与することを含み、がんは、大腸腺腫性ポリポーシス (APC) 変異と関連していない。CKI 阻害剤の追加の使用も開示される。

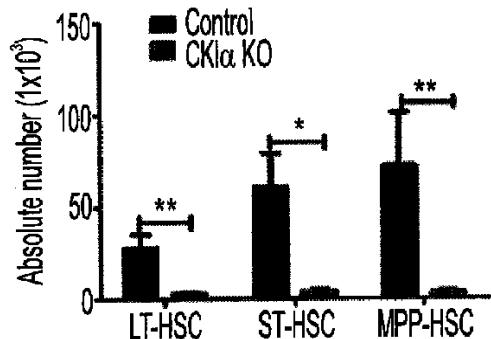


FIG. 1B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、前記対象に治療有効量のカゼインキナーゼ I (CKI) 阻害剤を投与し、それによって前記がんを治療することを含み、前記がんが大腸腺腫性ポリポーシス (APC) 変異と関連していない方法。

【請求項 2】

がんを治療するためのカゼインキナーゼ I (CKI) 阻害剤の使用であって、前記がんが大腸腺腫性ポリポーシス (APC) 変異と関連していない使用。

【請求項 3】

それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、前記対象に治療有効量の P F 6 7 0 4 6 2 を投与し、それによって前記がんを治療することを含み、前記がんが慢性リンパ球性白血病 (CLL) ではない方法。

【請求項 4】

がんを治療するための P F 6 7 0 4 6 2 の使用であって、前記がんが CLL ではない使用。

【請求項 5】

それを必要とする対象における慢性骨髄性白血病 (CML) を治療する方法であって、前記対象に治療有効量のカゼインキナーゼ I 阻害剤を投与し、それによって前記 CML を治療することを含み、前記 CML がイマチニブ抵抗性 CML、イマチニブ関連 TKI 抵抗性 CML、イマチニブ不耐性 CML、移行期 CML、およびリンパ性急性転化期 CML からなる群から選択される方法。

【請求項 6】

CML を治療するためのカゼインキナーゼ I 阻害剤の使用であって、前記 CML がイマチニブ抵抗性 CML、イマチニブ不耐性 CML、移行期 CML、およびリンパ性急性転化期 CML からなる群から選択される使用。

【請求項 7】

それを必要とする対象に細胞を移植する方法であって、
(a) 血液または骨髄からの未熟血液細胞を、p 5 3 の量および / または活性を上方制御し、かつ前記血液または骨髄中の前記未熟血液細胞を死滅させる CKI 阻害剤の量と接触させることによって、対象の血液または骨髄からの前記未熟血液細胞を枯渇させること；およびその後：

(b) 前記対象に細胞を移植することを含む方法。

【請求項 8】

対象の血液または骨髄からの未熟血液細胞を枯渇させる方法であって、幹細胞を、p 5 3 の量および / または活性を上方制御し、かつ前記血液または骨髄中の前記未熟血液細胞を死滅させる CKI 阻害剤の量と e x v i v o で接触させ、それによって前記血液または骨髄からの前記未熟血液細胞を枯渇させることを含む方法。

【請求項 9】

CKI および / または CKI よりも CKI への少なくとも 2 倍大きい阻害活性を有する小分子を含む物質の組成物。

【請求項 10】

前記枯渇させることの前に、前記骨髄から前記血液への前記未熟血液細胞の動員を誘導することをさらに含む、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 CKI 阻害剤が、p 5 3 を上方制御することにおいて CKI および の阻害剤と少なくとも同じくらい効果的である、請求項 1 または 2 に記載の方法または使用。

【請求項 12】

前記阻害剤が、CKI またはそれをコードするポリヌクレオチドに結合する、請求項 1、2、7 および 8 のいずれか一項に記載の方法または使用。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

前記阻害剤が、 C K I またはそれをコードするポリヌクレオチドに結合する、請求項 5 または 6 に記載の方法または使用。

【請求項 1 4】

前記阻害剤が D N A 損傷応答 (D D R) を活性化する、請求項 1 、 2 および 5 から 8 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 1 5】

前記 C K I 阻害剤が C K I 阻害活性を含む、請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 1 6】

前記 C K I 阻害剤が C K I および / または C K I - 阻害活性をさらに含む、請求項 1 5 に記載の方法または使用。

【請求項 1 7】

前記 C K I 阻害剤が C K I および C K I - 阻害活性を含む、請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 1 8】

前記阻害剤が小分子阻害剤である、請求項 1 、 2 および 5 から 8 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 1 9】

前記阻害剤が P F 6 7 0 4 6 2 である、請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 2 0】

前記阻害剤が R N A サイレンシング剤である、請求項 1 、 2 および 5 から 8 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 2 1】

前記サイレンシング剤が C K I を標的とする、請求項 2 0 に記載の方法または使用。

【請求項 2 2】

前記未熟血液細胞が幹細胞を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記未熟血液細胞ががん幹細胞を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記接触させることを i n v i v o で実施する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記接触させることを e x v i v o で実施する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記接触させることをアフェレーシス中に実施する、請求項 8 または 2 5 に記載の方法。

。

【請求項 2 7】

前記枯渇させることを照射も化学療法もなしで実施する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記枯渇させることを照射および / または化学療法と組み合わせて実施する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記がんが血液悪性腫瘍である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 3 0】

前記血液悪性腫瘍が、慢性骨髓性白血病 (C M L) 、 C M L 移行期、または急性転化、多発性骨髓腫、好酸球増加症候群 (H E S) 、骨髓異形成症候群 (M D S) 、急性リンパ球性白血病 (A L L) 、急性骨髓性白血病 (A M L) 、急性前骨髓球性白血病 (A P L) 、慢性好中球性白血病 (C N L) 、急性未分化型白血病 (A U L) 、未分化大細胞リンパ

10

20

30

40

50

腫（ A L C L ）、前リンパ球性白血病（ P M L ）、若年性骨髓单球性白血病（ J M M L ）、成人 T 細胞 A L L 、三血球系骨髓形成異常を伴う A M L （ A M L / T M D S ）、混合系統白血病（ M L L ）、骨髓増殖性疾患（ M P D ）、多発性骨髓腫（ M M ）および骨髓肉腫からなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の方法または使用。

【請求項 3 1】

前記血液悪性腫瘍が慢性骨髓性白血病（ C M L ）である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の方法または使用。

【請求項 3 2】

前記 C M L がイマチニブ抵抗性 C M L 、イマチニブ不耐性 C M L 、イマチニブ関連 T K I 抵抗性 C M L 、移行期 C M L 、および骨髓性またはリンパ性急性転化期 C M L からなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の方法または使用。

10

【請求項 3 3】

前記対象にイマチニブを投与することをさらに含む、請求項 3 1 に記載の方法または使用。

【請求項 3 4】

前記対象にイマチニブ、ダサチニブおよびニロチニブからなる群から選択される薬剤を投与しない、請求項 3 1 に記載の方法または使用。

【請求項 3 5】

前記がんが乳がんまたはメラノーマである、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法または使用。

20

【請求項 3 6】

前記 C K I 阻害剤が C K I または C K I よりも C K I に関する少なくとも 2 倍の阻害活性を有する、請求項 1 または 2 に記載の方法または使用。

【請求項 3 7】

幹細胞を枯渇させるのに有用な薬剤を同定するかつ任意に作製する方法であって、
(a) 候補薬剤の存在下で C K I の活性および / または発現を決定すること；
(b) 前記 C K I の活性および / または発現を下方制御し、かつ p 5 3 の活性および / または発現を上方制御する薬剤を選択し、それによって幹細胞を除去するのに有用な薬剤を同定すること

30

を含む方法。

【請求項 3 8】

前記幹細胞が造血幹細胞（ H S C ）を含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記幹細胞ががん幹細胞を含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記方法が、細胞移植前に、がんに関する治療としてのまたは前治療としての前記候補薬剤の効果を試験することをさらに含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記候補薬剤を合成することをさらに含む、請求項 3 7 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【発明の分野および背景】

【 0 0 0 1 】

本発明は、その一部の態様では、造血幹細胞およびがん幹細胞を含む幹細胞を除去する方法に関する。

【 0 0 0 2 】

W n t 経路は、虫から人間まで進化全体を通して高度に保存されており、胚発生および疾患において重要な役割を果たしている。W n t シグナル伝達は、キナーゼおよびホスファターゼのセットによって厳しく制御され、カスケードの種々の構成要素に働き、生物の生涯中に様々な細胞運命につながる。

50

【0003】

古典的 Wnt 経路の主な標的は、細胞質 - カテニンであり、これは、増殖、分化、移動および生存の遺伝子に関する転写コアクチベーターとして役立つ。シグナルの伝達は、Wnt リガンドの存在または非存在に依存する。休止組織では、Wnt リガンドの非存在下で、- カテニンは、常にリン酸化され、多タンパク質複合体によって分解され、したがって、細胞において低レベルで維持される。分裂細胞では、成体の自己再生組織においておよび胚形成全体を通して、分泌された Wnt タンパク質は、細胞膜上の Frizzled 受容体ファミリーのメンバーおよび共受容体 LRP5/6 に結合する。Wnt 結合は、ディシェベルド (Dvl) を活性化し、細胞質における - カテニン分解複合体の解離および - カテニンの安定化をもたらす。これは、核中への - カテニンのトランスロケーションおよび Tcf/Lef 依存性転写を通じたその標的遺伝子 (たとえば c-Myc 、サイクリン D1) の活性化を可能にする。古典的 Wnt シグナルの調節解除は、様々ながんにつながり、その中には、直腸結腸癌腫 (CRC) 、肝細胞癌 (HCC) およびメラノーマがある。かかるがんでは、1つ以上の Wnt 構成要素がしばしば変異され、核 - カテニンの異常な蓄積をもたらす。これは、細胞における - カテニンレベルに関する厳しい制御の要求を説明する。

【0004】

- カテニンがリン酸化され、分解される機構は、最近になってやっと明らかにされ、これは、Wnt シグナル伝達経路における重要な役者を強調している。- カテニン分解複合体は、大腸腺腫性ポリポーシス (APC) 腫瘍抑制因子、アキシン 1 またはアキシン 2 (足場機能を果たすと考えられている) 、および 4 つの N 末端 Ser/Thr 残基上で - カテニンをリン酸化する 2 つのセリン / トレオニンキナーゼ : カゼインキナーゼ I (CKI) およびグリコーゲン合成酵素キナーゼ - 3 (GSK3) からなる。この現象は、- カテニンを SCF -TrCP E3 ユビキチンリガーゼによるユビキチン化およびその後のプロテアソーム分解に関してマークする。最初のリン酸化現象は、- カテニンの Ser45 をリン酸化する CKI によって媒介されることが最近示された。これは、GSK3 に関するプライミング部位を創出し、その後、GSK3 は、Thr41 、 Ser37 および Ser33 をリン酸化する。最後の 2 つの残基は、リン酸化された場合、E3 リガーゼ TrCP に関するドッキング部位として役立ち、これは、- カテニンを分解についてマークする。

【0005】

CKI の関与は、- カテニン下方制御につながるカスケードを駆動するのに必要かつ十分であることが明らかにされた。これは、ショウジョウバエにおける Wnt 構成要素の相同体に関する研究と一致し、したがって、CKI を Wnt アンタゴニストとして指定する。他方、ツメガエルおよびシノラブディス・エレガヌス (C. elegans) における発生研究は、CKI を Wnt エフェクターとして関連づけ、CKI が二次的体軸および胚極性を促進する (Wnt 効果) ことを示した。それを支持するのは、CKI が別の Wnt エフェクターである Dvl をリン酸化かつ活性化し、それによって - カテニンレベルを増加させるという知見である。

【0006】

米国特許出願第 20050171005 号は、- カテニンリン酸化を調節する方法を教示している。

【0007】

米国特許出願第 20090005335 号は、APC 遺伝子における変異を有するがん細胞を B - カテニンを上方制御する組成物を提供することによって治療することを教示している。

【0008】

米国特許出願第 20110076683 号は、白血病の治療に関する Wnt 阻害剤を教示している。

【0009】

10

20

30

40

50

追加の背景技術は、米国特許出願第20080146555号、WO2014023271および米国特許出願第20100179154号を含む。

【発明の概要】

【0010】

本発明の一部の態様の側面によれば、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、対象に治療有効量のカゼインキナーゼI (CKI) 阻害剤を投与し、それによってがんを治療することを含み、がんが大腸腺腫性ポリポーシス (APC) 変異と関連していない方法が提供される。

【0011】

本発明の一部の態様の側面によれば、がんを治療するためのカゼインキナーゼI (CKI) 阻害剤の使用であって、がんが大腸腺腫性ポリポーシス (APC) 変異と関連していない使用が提供される。

【0012】

本発明の一部の態様の側面によれば、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、対象に治療有効量のP F 6 7 0 4 6 2 を投与し、それによってがんを治療することを含み、がんが慢性リンパ球性白血病 (CLL) ではない方法が提供される。

【0013】

本発明の一部の態様の側面によれば、がんを治療するためのP F 6 7 0 4 6 2 の使用であって、がんがCLLではない使用が提供される。

【0014】

本発明の一部の態様の側面によれば、それを必要とする対象における慢性骨髓性白血病 (CML) を治療する方法であって、対象に治療有効量のカゼインキナーゼI 阻害剤を投与し、それによってCMLを治療することを含み、CMLがイマチニブ抵抗性CML、イマチニブ関連TKI抵抗性CML (imatinib-related TKI-resistant CML) 、イマチニブ不耐性CML、移行期CML (accelerated CML) 、およびリンパ性急性転化期CML (lymphoid blast phase CML) からなる群から選択される方法が提供される。

【0015】

本発明の一部の態様の側面によれば、CMLを治療するためのカゼインキナーゼI 阻害剤の使用であって、CMLがイマチニブ抵抗性CML、イマチニブ不耐性CML、移行期CML、およびリンパ性急性転化期CMLからなる群から選択される使用が提供される。

【0016】

本発明の一部の態様の側面によれば、それを必要とする対象に細胞を移植する方法であって、

(a) 血液または骨髄からの未熟血液細胞を、p 5 3 の量および/または活性を上方制御し、かつ血液または骨髄中の未熟血液細胞を死滅させるCKI阻害剤の量と接触させることによって、対象の血液または骨髄からの未熟血液細胞を枯渇させること；およびその後

(b) 対象に細胞を移植すること

を含む方法が提供される。

【0017】

本発明の一部の態様の側面によれば、対象の血液または骨髄からの未熟血液細胞を枯渇させる方法であって、幹細胞を、p 5 3 の量および/または活性を上方制御し、かつ血液または骨髄中の未熟血液細胞を死滅させるCKI阻害剤の量とex vivoで接触させ、それによって血液または骨髄からの未熟血液細胞を枯渇させることを含む方法が提供される。

【0018】

本発明の一部の態様の側面によれば、幹細胞を枯渇させるのに有用な薬剤を同定するかつ任意に作製する方法であって、

(a) 候補薬剤の存在下でCKIの活性および/または発現を決定すること；

(b) CKIの活性および/または発現を下方制御し、かつp 5 3 の活性および/または発現を上方制御する薬剤を選択し、それによって幹細胞を除去するのに有用な薬剤を同定

10

20

30

40

50

すること

を含む方法が提供される。

【0019】

本発明の一部の態様の側面によれば、CKI および / または CKI よりも CKI への少なくとも 2 倍大きい阻害活性を有する小分子を含む物質の組成物が提供される。

【0020】

本発明の一部の態様によれば、方法は、枯渇させることの前に、骨髄から血液への未熟血液細胞の動員を誘導することをさらに含む。

【0021】

本発明の一部の態様によれば、CKI 阻害剤は、p53 を上方制御することにおいて CKI および の阻害剤と少なくとも同じくらい効果的である。

【0022】

本発明の一部の態様によれば、阻害剤は、CKI またはそれをコードするポリヌクレオチドに結合する。

【0023】

本発明の一部の態様によれば、阻害剤は、CKI またはそれをコードするポリヌクレオチドに結合する。

【0024】

本発明の一部の態様によれば、阻害剤は、DNA 損傷応答 (DDR) を活性化する。

【0025】

本発明の一部の態様によれば、CKI 阻害剤は、CKI 阻害活性を含む。

【0026】

本発明の一部の態様によれば、CKI 阻害剤は、CKI および / または CKI - 阻害活性をさらに含む。

【0027】

本発明の一部の態様によれば、CKI 阻害剤は、CKI および CKI - 阻害活性を含む。

【0028】

本発明の一部の態様によれば、阻害剤は、小分子阻害剤である。

【0029】

本発明の一部の態様によれば、阻害剤は、PF670462 である。

【0030】

本発明の一部の態様によれば、阻害剤は、RNA サイレンシング剤である。

【0031】

本発明の一部の態様によれば、サイレンシング剤は、CKI を標的とする。

【0032】

本発明の一部の態様によれば、未熟血液細胞は、幹細胞を含む。

【0033】

本発明の一部の態様によれば、未熟血液細胞は、がん幹細胞を含む。

【0034】

本発明の一部の態様によれば、接触させることを in vivo で実施する。

【0035】

本発明の一部の態様によれば、接触させることを ex vivo で実施する。

【0036】

本発明の一部の態様によれば、接触させることをアフェレーシス中に実施する。

【0037】

本発明の一部の態様によれば、枯渇させることを照射も化学療法もなしで実施する。

【0038】

本発明の一部の態様によれば、枯渇させることを照射および / または化学療法と組み合わせて実施する。

10

20

30

40

50

【0039】

本発明の一部の態様によれば、がんは、血液悪性腫瘍である。

【0040】

本発明の一部の態様によれば、血液悪性腫瘍は、慢性骨髓性白血病（CML）、CML移行期、または急性転化、多発性骨髓腫、好酸球増加症候群（HES）、骨髓異形成症候群（MDS）、急性リンパ球性白血病（ALL）、急性骨髓性白血病（AML）、急性前骨髓球性白血病（APL）、慢性好中球性白血病（CNL）、急性未分化型白血病（AUL）、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）、前リンパ球性白血病（PML）、若年性骨髓单球性白血病（JMM）¹⁰、成人T細胞ALL、三血球系骨髓形成異常（trilineage myelodysplasia）を伴うAML（AML/TMDS）、混合系統白血病（MLL）、骨髓増殖性疾患（MPD）、多発性骨髓腫（MM）および骨髓肉腫からなる群から選択される。

【0041】

本発明の一部の態様によれば、血液悪性腫瘍は、慢性骨髓性白血病（CML）である。

【0042】

本発明の一部の態様によれば、CMLは、イマチニブ抵抗性CML、イマチニブ不耐性CML、イマチニブ関連TKI抵抗性CML、移行期CML、および骨髓性またはリンパ性急性転化期CML（myeloid or lymphoid blast phase CML）からなる群から選択される。

【0043】

本発明の一部の態様によれば、方法は、対象にイマチニブを投与することをさらに含む。²⁰

【0044】

本発明の一部の態様によれば、対象にイマチニブ、ダサチニブおよびニロチニブからなる群から選択される薬剤を投与しない。

【0045】

本発明の一部の態様によれば、がんは、乳がんまたはメラノーマである。

【0046】

本発明の一部の態様によれば、CKI阻害剤は、CKIまたはCKIよりもCKIに関する少なくとも2倍の阻害活性を有する。

【0047】

本発明の一部の態様によれば、幹細胞は、造血幹細胞（HSC）を含む。³⁰

【0048】

本発明の一部の態様によれば、幹細胞は、がん幹細胞を含む。

【0049】

本発明の一部の態様によれば、方法は、細胞移植前に、がんに関する治療としてのまたは前治療（pre-treatment）としての候補薬剤の効果を試験することをさらに含む。

【0050】

本発明の一部の態様によれば、方法は、候補薬剤を合成することをさらに含む。

【0051】

他に定義されない限り、ここで使用される全ての技術的および/または科学的用語は、本発明が属する技術の当業者によって通例理解されるのと同じ意味を有する。ここで記載されたものと類似したまたは同等の方法および材料が本発明の態様の実行または試験において使用され得るけれども、典型的な方法および/または材料が以下に記載される。矛盾する場合、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法、および例は、例示的のみであり、必ずしも限定的であることは、意図されていない。⁴⁰

【図面の簡単な説明】

【0052】

本発明の一部の態様が添付の図および画像を参照して、例としてのみここで記載される。ここで、図を詳細に具体的に参照して、示された特徴は、例としておよび本発明の態様の例示的考察の目的のためであることが強調される。この点で、図と共に書かれた記述は

、本発明の態様がどのように実行されてもよいかを当業者に明らかにする。

【図1A】図1Aは、CKI消失がマウスから造血幹細胞(HSC)を枯渇させ、骨髓生着を可能にすることを例示する。A)キメラマウスを産出するスキーム。

【図1B】図1Bは、CKI消失がマウスから造血幹細胞(HSC)を枯渇させ、骨髓生着を可能にすることを例示する。B)誘導後第7日での2つの大腿骨および2つの脛骨からのLT-HSC(系統^{-c-kit⁺Sca1⁺CD34⁺FLT3⁻})、ST-HSC(系統^{-c-kit⁺Sca1⁺CD34⁺FLT3⁻})、MPP(系統^{-c-kit⁺Sca1⁺CD34⁺FLT3⁺})の絶対数。

【図1C】図1Cは、CKI消失がマウスから造血幹細胞(HSC)を枯渇させ、骨髓生着を可能にすることを例示する。C)CKI^{-/-}KO骨髓または対照マウスのいずれかを生着された致死的IRマウスの生存曲線。

【図1D】図1Dは、CKI消失がマウスから造血幹細胞(HSC)を枯渇させ、骨髓生着を可能にすることを例示する。D)CKI再構成実験のスキーム。

【図1E】図1Eは、CKI消失がマウスから造血幹細胞(HSC)を枯渇させ、骨髓生着を可能にすることを例示する。E)再構成されたまたは処置されなかったCKI^{-/-}KO誘導マウスの生存曲線。

【図1F】図1Fは、CKI消失がマウスから造血幹細胞(HSC)を枯渇させ、骨髓生着を可能にすることを例示する。F)再構成後3カ月でのWTまたはCKI^{-/-}KO誘導マウスのいずれかからのGFP+末梢血白血球の百分率。

【図2】図2は、CML急性転化のマウスモデルの産出のスキームである。

【図3A】図3Aは、どのようにCKI消失がCML発達を妨げるかを例示する。A)実験スキーム。

【図3B】図3Bは、どのようにCKI消失がCML発達を妨げるかを例示する。B)白血病を引き起こす細胞(LIC)の移植後2カ月間モニターされたGFP+末梢血白血球の百分率; CKI欠失を有さないマウス(PBS処置またはMXCre)を保有していないLICは、3週間以内に瀕死であり、屠殺された。

【図3C】図3Cは、どのようにCKI消失がCML発達を妨げるかを例示する。C)CKI欠失が誘導された(pIpc処置)または誘導されていない(PBS処置)白血病マウスからの血液塗抹標本の写真。

【図3D】図3Dは、どのようにCKI消失がCML発達を妨げるかを例示する。D)CKI欠失がpIpcで誘導されたもしくは誘導されていない(PBS処置)、または欠失に関するMXCreを有さない白血病マウスの生存)。

【図4A】図4Aは、どのようにCKI消失が正常と白血病幹細胞の両方を枯渇させ、正常骨髓再構成を可能にするかを例示する。A)実験スキーム。

【図4B】図4Bは、どのようにCKI消失が正常と白血病幹細胞の両方を枯渇させ、正常骨髓再構成を可能にするかを例示する。B)CKI欠失後ののみの正常ドナーBM再構成(CD45.1)(赤い棒)およびCKI欠失なしの白血病GFP陽性細胞の高百分率(PBS処置、黒い棒)を示す、白血病に苦しめられたBM移植12日後の末梢血白血球中のCD45.1(ドナー細胞)およびGFP+白血病細胞の百分率。

【図4C】図4Cは、どのようにCKI消失が正常と白血病幹細胞の両方を枯渇させ、正常骨髓再構成を可能にするかを例示する。C)成功的なドナー骨髓再構成による、CKI欠失(pIpc処置における)後の白血病マウスの完全な生存。

【図5A】図5Aは、CKI阻害剤PF670462が白血病細胞をin vitroで優先的に標的とすることを例示する。A)実験スキーム。

【図5B】図5Bは、CKI阻害剤PF670462が白血病細胞をin vitroで優先的に標的とすることを例示する。B)阻害剤処置におけるp53およびWnt標的の発現の用量依存的増加を例示するRT-PCR結果。

【図5C】図5Cは、CKI阻害剤PF670462が白血病細胞をin vitroで優先的に標的とすることを例示する。C)白血病細胞数は、PF670462処置後、選択的に減少する-LD50<2μMを有する用量反応曲線。

10

20

30

40

50

【図5D】図5Dは、CKI阻害剤PF670462が白血病細胞をin vitroで優先的に標的とすることを例示する。D)アポトーシス遺伝子発現は、PF670462処置後、白血病細胞において増加する。

【図6A】図6Aは、PF670462がBM中のWntとp53の両方を活性化し、移植された白血病を引き起こす細胞を除去し、CML発達をin vivoで妨げることを例示する。A)実験処置スキーム。

【図6B】図6Bは、PF670462がBM中のWntとp53の両方を活性化し、移植された白血病を引き起こす細胞を除去し、CML発達をin vivoで妨げることを例示する。B)PF670462処置における-カテニンおよびp53安定化ならびにc-Myc(Wnt標的遺伝子の例)の上昇を例示するウエスタンプロット分析。

【図6C】図6Cは、PF670462がBM中のWntとp53の両方を活性化し、移植された白血病を引き起こす細胞を除去し、CML発達をin vivoで妨げることを例示する。C)PF670462処置後のGFP+末梢血白血球の百分率は、ビヒクル処置マウスの末梢血におけるGFP+白血病細胞の急速な増殖および阻害剤処置マウスにおける増殖なしを示す。

【図6D】図6Dは、PF670462がBM中のWntとp53の両方を活性化し、移植された白血病を引き起こす細胞を除去し、CML発達をin vivoで妨げることを例示する。D)ビヒクル処置マウスにおける脊椎動物の芽細胞浸潤および完全な破壊ならびに阻害剤処置マウスにおける正常脊椎動物を示す、骨髄脊椎動物切片のH&E染色。瀕死のビヒクル処置マウスは、白血病移植12日後に屠殺された。健康な阻害剤処置マウスは、3週間後に屠殺され、それらの骨髄は、マウスを照射して、正常長期造血と白血病再発なしの両方をモニターするために移植された。

【図6E】図6Eは、PF670462がBM中のWntとp53の両方を活性化し、移植された白血病を引き起こす細胞を除去し、CML発達をin vivoで妨げることを例示する。E)死ぬ2日前のビヒクル処置マウスにおける未熟骨髄細胞および芽細胞ならびに同時の阻害剤処置マウスにおける正常末梢血写真。

【図6F】図6Fは、PF670462がBM中のWntとp53の両方を活性化し、移植された白血病を引き起こす細胞を除去し、CML発達をin vivoで妨げることを例示する。F)PF670462処置後の白血病マウスの生存。

【図7A】図7Aは、メラノーママウスマodelにおけるCKI欠失の効果を例示する写真である。図7Aは、局所的耳タモキシフェン投与前および56日後のBrafV600E;Pten二重フロックスマウス(floxed mouse)顔の耳および組織学的検査を描寫する写真である。

【図7B】図7Bは、メラノーママウスマodelにおけるCKI欠失の効果を例示する写真である。図7Bは、局所的耳タモキシフェン誘導前(左)および56日後(右)のBrafV600E;Pten;CKI三重フロックスマウスの耳を描寫する写真である。Bにおけるタモキシフェン誘導後に腫瘍は可視でなく、耳色素沈着のみであり、腫瘍変異エスケープなく、CKI欠失の強い腫瘍抑制因子効果を証明している。

【発明の具体的な態様の記述】

【0053】

本発明は、その一部の態様では、造血幹細胞およびがん幹細胞を含む幹細胞を除去する方法に関する。

【0054】

本発明に従って幹細胞を除去する方法の原理および操作は、図および付随する記述を参照してよりよく理解され得る。

【0055】

本発明の少なくとも1つの態様を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において、以下の記述において示されたまたは例によって例証された詳細に必ずしも限定されないことを理解されたい。本発明は、他の態様のまたは様々な様式で実行もしくは実施される能力がある。

10

20

30

40

50

【0056】

- カテニン分解複合体は、大腸腺腫性ポリポーシス (A P C) 腫瘍抑制因子である、アキシン 1 またはアキシン 2 (足場機能を果たすと考えられている)、および 2 つのセリノ / トレオニンキナーゼ : 4 つの N 末端 S e r / T h r 残基上で - カテニンをリン酸化する、カゼインキナーゼ I (C K I) およびグリコーゲン合成酵素キナーゼ - 3 (G S K 3) からなる。C K I と A P C の両方は、W n t シグナル伝達および紡錘体制御における役割を果たすことが注目されている。

【0057】

骨髄幹細胞、たとえば造血幹細胞 (H S C) において C K I によって果たされる役割を分析するために、本発明者らは、コンディショナル骨髄 C K I ノックアウト変異マウスを産出した。図 1 A ~ F に例示されるように、骨髄 C K I 消失は、マウスから造血幹細胞 (H S C) を枯渇させ、移植プレコンディショニングに通例使用されるさらなる手段 (たとえば、照射または化学療法) なしで骨髄生着を可能にする (図 1 A ~ F)。

10

【0058】

C M L 急性転化のマウスモデルを使用して、本発明者らは、C K I 消失が慢性骨髄性白血病 (C M L) 発達を妨げること (図 3 A ~ D) を示すことに取り掛かった。一般に C M L は、特に急性転化期は、がん幹細胞と関連していることが既知であるので、本発明者らは、C K I 阻害剤が造血幹細胞 (H S C) だけでなく、他の幹細胞、たとえばがん幹細胞も枯渇させるために使用され得ると推測する。

20

【0059】

C K I 欠失が化学療法または照射誘発骨髄破壊および白血病細胞排除に代わることができるかどうかを評価するために、白血病細胞を M x - C r e マウスでフロックスされた C K I 中に注入した。生存率データによって反映されるように (図 4 C)、ノックアウトが誘導されなかった場合、白血病細胞の非常に高い百分率が存在した一方、C K I KO では、白血病細胞は、検出不可能であった (図 4 B)。

【0060】

本発明者らは、C K I を阻害する小分子薬剤を使用してそれらの結果を確認しようと努めた。C K I の下方制御は、p 5 3 の発現を増加させることが既知であるので、本発明者らは、p 5 3 に及ぼす類似した効果を有する C K I 阻害剤を探した。C K I 阻害剤 P F 6 7 0 4 6 2 は、骨髄細胞における p 5 3 およびその標的の発現を実質的に増加させたことが図 5 B および 6 B において理解され得る。in vitro 研究では、本発明者らは、P F 6 7 0 4 6 2 が白血病細胞を優先的に枯渇させることを示した。この阻害剤の重大な効果が in vivo 研究において反映された。したがって、P F 6 7 0 4 6 2 は、移植された白血病を引き起こす細胞を除去し、C M L 発達を in vivo で妨げることが示された (図 6 C ~ F)。白血病細胞は、致死的に照射されたマウスへの阻害剤処置マウスの骨髄の移植で明らかではなく (移植後 1 ル月)、これは、阻害剤処置が白血病幹細胞を根絶した一方、正常造血幹細胞を保存したことを示している。

30

【0061】

実行するために本発明をさらにまとめる一方、本発明者らは、追加のがんに及ぼす C K I 枯渇の効果を分析し、C K I ノックアウトがメラノーマに関するマウスモデルにおいて治療効果を有することを見出した。

40

【0062】

メラノーマは、神経外胚葉の細胞に由来し、白血病細胞は、中胚葉の細胞に由来するので、本発明者らは、C K I の下方制御が、腫瘍細胞が由来する胚葉にかかわらず、無数のがんに効果的であり得ると推測する。さらに、C K I 阻害は、がん幹細胞を選択的に標的とすることが示されたので、本発明者らは、それらが関与する特定のがんにかかわらず、C K I 阻害の能力がある薬剤が一般にがん幹細胞に対して効果的であるはずであると結論づける。

【0063】

したがって、本発明の第 1 の側面によれば、それを必要とする対象におけるがんを治療

50

する方法であって、対象に治療有効量のカゼインキナーゼI 阻害剤を投与し、それによってがんを治療することを含み、がんが大腸腺腫性ポリポーシス（A P C）変異と関連していない方法が提供される。

【0064】

「がん」という用語は、ここでは、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病を含むが、これらに限定されない増殖性疾患を表す。がんは、たとえば、 固形腫瘍良性 髓膜腫、唾液腺の混合腫瘍、結腸腺腫；腺癌、たとえば小細胞肺がん、腎臓、子宮、前立腺、膀胱、卵巣、結腸、肉腫、脂肪肉腫、粘液型、滑膜肉腫、横紋筋肉腫（肺胞）、骨外性粘液型軟骨肉腫（Extraskellet myxoid chondrosarcoma）、ユーリング腫瘍であってもよく；他のものは、精巣および卵巣未分化胚細胞腫、網膜芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫、悪性メラノーマ、中皮腫、乳房、皮膚、前立腺、ならびに卵巣を含む。

10

【0065】

特定の態様によれば、がんは、メラノーマ、乳がんまたは血液悪性腫瘍である。

【0066】

「血液悪性腫瘍」という用語は、ここでは、リンパ腫、白血病、骨髄腫またはリンパ系悪性腫瘍、ならびに脾臓およびリンパ節のがんを含む。本発明の開示された抗C X C R 4抗体での治療を受け入れられる例示的なリンパ腫は、B細胞リンパ腫とT細胞リンパ腫の両方を含む。B細胞リンパ腫は、ホジキンリンパ腫と大部分の非ホジキンリンパ腫の両方を含む。B細胞リンパ腫の非限定的な例は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（D L B C L）、濾胞性リンパ腫（F L）、粘膜関連リンパ組織リンパ腫（M A L T）、小細胞リンパ球性リンパ腫（慢性リンパ球性白血病と重複する）、マントル細胞リンパ腫（M C L）、バーキットリンパ腫、縦隔大細胞型B細胞リンパ腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、節性辺縁帯B細胞リンパ腫（N M Z L）、脾臓周辺帯リンパ腫（S M Z L）、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性体液性リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症を含む。T細胞リンパ腫の非限定的な例は、節外性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、および血管免疫芽球性T細胞リンパ腫を含む。血液悪性腫瘍は、白血病、たとえば、これらに限定されないが、二次性白血病、急性骨髄性白血病（A M L；急性リンパ性白血病とも称される）、慢性骨髄性白血病（C M L）、B細胞前リンパ球性白血病（B - P L L）、急性リンパ芽球性白血病（A L L）および骨髄形成異常（M D S）も含む。血液悪性腫瘍は、骨髄腫、たとえば、これらに限定されないが、多発性骨髄腫（M M）、くすぶり型多発性骨髄腫（S M M）およびB細胞慢性リンパ球性白血病（C L L）をさらに含む。

20

【0067】

特定の態様によれば、血液悪性腫瘍は、慢性骨髄性白血病（C M L）である。C M Lという用語は、イマチニブ抵抗性C M L、第2／第3世代B c r - A b l T K I（たとえば、ダサチニブおよびニロチニブ）耐性C M L、イマチニブ不耐性C M L、移行期C M L、およびリンパ性急性転化期C M Lを含む。

30

【0068】

他の血液および/またはB細胞もしくはT細胞関連がんは、血液悪性腫瘍という用語によって包含される。たとえば、血液悪性腫瘍は、樹状細胞、血小板、赤血球、ナチュラルキラー細胞、および多形核白血球、たとえば、好塩基球、好酸球、好中球および单球を含む追加の造血細胞のがんも含む。これらの前悪性腫瘍および悪性腫瘍が分類の変化するシステムにより種々の名称をしばしば有することになり、種々の名称下で分類されたリンパ腫を有する患者も本発明の治療レジメンから利益を得ることができることが当業者に明らかである。

40

【0069】

述べたように、本発明のこの側面に関して、がんは、大腸腺腫性ポリポーシス（A P C）変異と関連しているものを含まない。

【0070】

A P C変異の例は、たとえば、A P C産物のトランケーションを引き起こすものである

50

。典型的に、変異は、コード配列の最初の半分において生じ、直腸結腸腫瘍における体細胞変異は、M C R (変異クラスター領域)と称される特定の領域においてさらにクラスター化される。ヒト疾患に関するA P C変異の一覧表は、O M I M、w o r l d w i d e w e b d o t n c b i d o t n l m d o t n i h d o t g o v / o m i mに提供されている。A P C変異と関連しているがんの例は、大腸がん、髓芽腫および肝細胞癌を含む。

【0071】

本発明の別の側面によれば、それを必要とする対象におけるC M Lを治療する方法であって、対象に治療有効量のカゼインキナーゼI阻害剤を投与することを含む方法であって、C M Lがイマチニブ抵抗性C M L、イマチニブ(またはイマチニブ関連T K I)不耐性C M L、移行期C M L、およびリンパ性急性転化期C M Lからなる群から選択される方法が提供される。

10

【0072】

本発明のさらに別の側面によれば、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、対象に治療有効量のP F 6 7 0 4 6 2を投与することを含み、がんがC L Lではない方法が提供される。

【0073】

全てのがんが本発明のこの側面に関して企図される(C L Lを除く)。本発明のこの側面の一態様によれば、がんは、A P C変異と関連しているものも含む。別の態様によれば、がんは、A P C変異と関連しているものを含まない。

20

【0074】

本発明の治療する方法は、C K Iを阻害する能力がある薬剤を接触させる/投与することによって実施される。

【0075】

C K Iは、酵母から人間まで試験された全ての生物に見出されるS e r / T h rキナーゼのよく保存されたファミリーである。哺乳動物では、C K Iファミリーは、11の選択的にスプライシングされたアイソフォームをコードする7つの遺伝子(、₁、₂、₃、₄、₅、₆、₇)からなる。C K Iファミリーのメンバーは、保存された触媒ドメインおよびA T P結合部位を共有し、これらは、それらを他のキナーゼファミリーから排他的に区別する。C K Iは、全ての細胞に見出される遍在性酵素であり、種々の細胞内局在を占有し、W n tシグナル伝達に加えて様々な細胞プロセスに関与する。

30

【0076】

好ましくは、C K I阻害剤は、p 5 3の発現および/または活性を増加させる(少なくとも2倍)かつ/またはD N A損傷応答(D D R)を活性化する。

【0077】

本発明のC K I阻害剤は、他のキナーゼ、たとえば細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼ(C D K)(たとえばC d k 2、C d k 4、C d k 6)と比較して、C K Iへの少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍の阻害剤活性を好ましくは有する。加えて、C K I阻害剤は、タンパク質キナーゼC(P K C)、P K A、h e r 2、r a f 1、M E K 1、M A Pキナーゼ、E G F受容体、P D G F受容体、I G F受容体、P I 3キナーゼ、w e e 1キナーゼ、S r c、および/またはA b lと比較して、C K Iへの少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍の阻害剤活性を有する。

40

【0078】

一部の態様では、薬剤は、C K I-阻害剤であり、すなわちそれらは、C K I-(C S N K 1 A; ゲノム、m R N Aまたはタンパク質レベルで、G e n B a n k受託番号N P_0 0 1 0 2 0 2 7 6およびN M_0 0 1 0 2 5 1 0 5およびN M_0 0 1 0 2 0 2 7 6)に選択的である。したがって、たとえば、かかるC K I阻害剤は、C K I-およびC K I-と比較して、C K I-への少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍の阻害剤活性を有する。

【0079】

好ましくは、C K I-に選択的である薬剤は、p 5 3を制御することにおいてC K I

50

および の阻害剤 (たとえば P F 6 7 0 4 6 2) と少なくとも同じくらい効果的である。好ましくは、 C K I - に選択的である薬剤は、 p 5 3 を制御することにおいて C K I および の阻害剤 (たとえば P F 6 7 0 4 6 2) より少なくとも 2 倍効果的である。

【 0 0 8 0 】

一部の態様では、薬剤は、 C K I - (C S N K 1 A ; ゲノム、 m R N A またはタンパク質レベルで、 G e n B a n k 受託番号 N P _ 0 0 1 8 8 4 . 2 、 N P _ 6 2 0 6 9 3 . 1 、 N M _ 0 0 1 8 9 3 . 3 および N M _ 1 3 9 0 6 2 . 1) および C K I - (C S N K 1 E ; N P _ 0 0 1 8 8 5 . 1 、 N P _ 6 8 9 4 0 7 . 1 、 N M _ 0 0 1 8 9 4 . 4 N M _ 1 5 2 2 2 1 . 2) を阻害する。

【 0 0 8 1 】

本発明の側面の一部の態様では、薬剤は、それらが C K I - を阻害するよりも大きい程度まで C K I - および C K I - を阻害する (たとえば、 C K I - と比較して、 C K I - および C K I - への少なくとも 2 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍の阻害剤活性)。

【 0 0 8 2 】

本発明の側面の一部の態様では、 C K I 阻害剤は、それらが C K I - 、 1 、 2 、または 3 を阻害するよりも大きい程度まで C K I - 、 1 、 2 、および アイソフォームを阻害する (たとえば、 C K I - 、 1 、 2 、または 3 のいずれかと比較して、 C K I - および C K I - への少なくとも 2 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍の阻害剤活性)。

【 0 0 8 3 】

一態様によれば、本発明の C K I 阻害剤は、 C K I (たとえば C K I - 、 C K I - および / または C K I -) またはそれをコードする遺伝子に直接結合する。

【 0 0 8 4 】

C K I - 、 C K I - および / または C K I - の下方制御は、転写および / または翻訳に干渉するいろいろな分子 (たとえば、アンチセンス、 s i R N A 、リボザイム、マイクロ R N A または D N A ザイム) を使用してゲノムおよび / または転写物レベルで、またはたとえば、アンタゴニスト、ポリペプチドなどを切断する酵素を使用してタンパク質レベルで実施され得る。

【 0 0 8 5 】

本発明の C K I を下方制御する能力がある薬剤の一例は、特定の C K I を特異的に結合する能力がある抗体または抗体断片である。好ましくは、抗体は、 C K I - 、 C K I - または C K I - の少なくとも 1 つのエピトープを特異的に結合する。

【 0 0 8 6 】

ここで使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体のパラトープが結合する抗原上の任意の抗原決定基を表す。

【 0 0 8 7 】

エピトープ決定基は、分子、たとえばアミノ酸または炭水化物側鎖の化学的に活性な表面グループ化から通常なり、特定の三次元構造特徴、および特定の電荷特徴を通常有する。

【 0 0 8 8 】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当技術分野で既知である。一般に、ヒト化抗体は、そこに導入された非ヒト供給源からの 1 つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、移入残基 (import residue) としばしば称され、これらは、移入可変ドメインから典型的に採取される。ヒト化は、ヒト抗体の相当する配列をげっ歯類 C D R または C D R 配列で置換することによって、 W i n t e r および共同研究者らの方法に従って本質的に行われ得る (J o n e s ら (1 9 8 6) ; R i e c h m a n n ら (1 9 8 8) ; および V e r h o e y e n , M. ら (1 9 8 8) . R e s h a p i n g h u m a n a n t i b o d i e s : g r a f t i n g a n a n t i l y s o z y m e a c t i v i t y . S c i e n c e 2 3 9 , 1 5 3 4 - 1 5 3 6 を参照されたい) 。したがって、かかるヒト化抗体は、キメラ抗体であり (米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号) 、

10

20

30

40

50

ここで、実質的に1つ未満のインタクトなヒト可変ドメインが非ヒト種からの相当する配列によって置換されている。実際、ヒト化抗体は、典型的に、一部のCDR残基およびおそらく一部のFR残基がげっ歯類抗体における類似の部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

【0089】

ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリー(Hoogenboom, H. R. and Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human Antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol* 227, 381-388)を含む当技術分野で既知の様々な技法を使用しても作製され得る。ColeらおよびBoernerらの技法は、ヒトモノクローナル抗体の調製にも利用可能である(Coleら(1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96; およびBoerner, P.ら(1991). Production of antigen-specific human monoclonal antibodies from in vitro-primed human splenocytes. *J Immunol* 147, 86-95)。同様に、ヒト抗体は、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されているトランスジェニック動物、たとえば、マウスへのヒト免疫グロブリン座の導入によって作られ得る。負荷時、ヒト抗体作製は、遺伝子再構成、組立、および抗体レパートリーを含む全ての点でヒトにおいて見られるものによく似ていることが観察される。この手法は、たとえば、米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; および同第5,661,016号に; および以下の科学刊行物: Marks, J. D.ら(1992). By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology* (N.Y.) 10(7), 779-783; Lonbergら, 1994. *Nature* 368: 856-859; Morrison, S. L. (1994). News and View: Success in Specification. *Nature* 368, 812-813; Fishwild, D. M.ら(1996). High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol* 14, 845-851; Neuberger, M. (1996). Generating high-avidity human Mabs in mice. *Nat Biotechnol* 14, 826; およびLonberg, N. and Huszar, D. (1995). Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol* 13, 65-93に報告されている。

【0090】

本発明のCKIを下方制御する能力がある薬剤の別の例は、RNAサイレンシング剤である。

【0091】

ここで使用される場合、「RNAサイレンシング」という用語は、相当するタンパク質コード遺伝子の発現の阻害または「サイレンシング」をもたらすRNA分子によって媒介される制御機構の群(たとえばRNA干渉(RNAi)、転写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(quelling)、相互抑制、および翻訳抑制)を表す。RNAサイレンシングは、植物、動物、および菌類を含む生物の多くの型において観察される。

【0092】

10

20

30

40

50

ここで使用される場合、「RNAサイレンシング剤」という用語は、標的遺伝子の発現を阻害するまたは「サイレンシングする」能力があるRNAを表す。いくつかの態様では、RNAサイレンシング剤は、転写後サイレンシング機構を通してmRNA分子の完全なプロセシング（たとえば、完全な翻訳および／または発現）を妨げる能力がある。RNAサイレンシング剤は、非コードRNA分子、たとえば、対になった鎖を含むRNA二本鎖、およびかかる小さい非コードRNAがそこから産出され得る前駆体RNAを含む。例示的なRNAサイレンシング剤は、dsRNA、たとえば、siRNA、miRNAおよびshRNAを含む。一態様では、RNAサイレンシング剤は、RNA干渉を誘導する能力がある。別の態様では、RNAサイレンシング剤は、翻訳抑制を媒介する能力がある。

【0093】

10

RNA干渉は、低分子干渉RNA(siRNA)によって媒介される動物における配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを表す。植物における相当するプロセスは、転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと通例称され、菌類においてクエリングとも称される。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来性遺伝子の発現を妨げるために使用される進化的に保存された細胞防御機構であると考えられ、多様な植物相および門によって通例共有されている。外来性遺伝子発現からのかかる保護は、相同一本鎖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て、ウイルス感染にまたは宿主ゲノム中へのトランスポゾンエレメントのランダムな組込みに由来する二本鎖RNA(dsRNA)の作製に応答して進化した可能性がある。

【0094】

20

細胞における長いdsRNAの存在は、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼIII酵素の活性を刺激する。ダイサーは、低分子干渉RNA(siRNA)として既知であるdsRNAの短い小片へのdsRNAのプロセシングに関与する。ダイサー活性に由来する低分子干渉RNAは、典型的に長さが約21から約23ヌクレオチドであり、約19塩基対二本鎖を含む。RNAi応答は、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と通例称されるエンドヌクレアーゼ複合体も特色とし、これは、siRNA二本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の切断は、siRNA二本鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域の中央で起こる。

【0095】

30

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の使用を企図する。

【0096】

一態様によれば、dsRNAは、30bpよりも大きい。長いdsRNA（すなわち、30bpよりも大きいdsRNA）の使用は、二本鎖RNAのこれらのより長い領域がインターフェロンおよびPKR応答の誘導をもたらすことになるという信念のために、非常に限られていた。しかしながら、長いdsRNAの使用は、細胞が最適なサイレンシング配列を選択し得、多数のsiRNAを試験する必要性を軽減するという点で多数の利点を提供し得；長いdsRNAは、サイレンシングライブラリーがsiRNAに必要であろうよりも少ない複雑さを有することを可能にすることになり；おそらく最も重要なことに、長いdsRNAは、治療法として使用された場合、ウイルスエスケープ変異を妨げ得る。

【0097】

40

様々な研究は、長いdsRNAが、ストレス応答を誘導することも、著しいオフターゲット効果を引き起こすこともなく遺伝子発現をサイレンシングするために使用され得ることを実証している-たとえば[Stratagene, Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 13 3803-3810; Bhargava AらBrain Res. Protoc. 2004; 13:115-125; Diallo M.ら、Oligonucleotides. 2003; 13:381-392; Addison P. J.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99:1443-1448; Tran N.ら、FEBS Lett. 2004; 573:127-134]を参照されたい。

50

【0098】

特に、本発明は、インターフェロン経路が活性化されていない細胞（たと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に関する長いdsRNA（30を超える塩基転写物）の導入も企図し、たとえばBililayら、PNAS 2001、Vol 98、pages 14428-14433およびDialloら、Oligonucleotide、October 1, 2003、13(5):381-392. doi: 10.1089/154545703322617069を参照されたい。

【0099】

本発明は、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具体的に設計された長いdsRNAの導入も企図する。たとえば、ShinagawaおよびIshii [Genes & Dev. 17(11):1340-1345, 2003]は、RNAポリメラーゼII (Pol II) プロモーターから長い二本鎖RNAを発現する、pDECAPと命名されたベクターを開発した。pDECAPからの転写物は、細胞質へのdsRNA搬出を促進する、5'キャップ構造と3'ポリ(A)テールの両方を欠くので、pDECAPからの長いdsRNAは、インターフェロン応答を誘導しない。

10

【0100】

哺乳動物系におけるインターフェロンおよびPKR経路を逃れる別の方法は、トランسفエクションまたは内在性発現のいずれかを介した小分子阻害性RNA (siRNA) の導入による。

20

【0101】

「siRNA」という用語は、RNA干渉 (RNAi) 経路を誘導する小分子阻害性RNA二本鎖（一般に、18~30塩基対）を表す。25~30塩基長の化学的に合成されたRNA二本鎖が、同じ位置での21塩基長と比較して、効力の100倍もの増加を有し得ることが最近報告されたけれども、典型的に、siRNAは、中心の19bp二本鎖領域および末端上の対称性の2'-塩基3'-オーバーハングを有する21塩基長として化学的に合成される。より長いRNAを使用して得られた、RNAiをトリガーすることにおける観察された増加した効力は、産物（21塩基長）の代わりに基質（27塩基長）を有するダイサーを提供することから生じ、これがRISC中へのsiRNA二本鎖の流入の速度または効率を改善すると理論化される。

30

【0102】

3'-オーバーハングの位置がsiRNAの効力に影響し、アンチセンス鎖上に3'-オーバーハングを有する非対称性二本鎖は、センス鎖上に3'-オーバーハングを有するものよりも一般に強力であることが見出された (Roseら、2005)。これは、アンチセンス転写物を標的とする場合、逆の有効性パターンが観察されるので、RISC中への非対称的鎖負荷に起因し得る。

【0103】

siRNAは、両方のタンパク質によって共有される配列を選択することによって1つを超えるCKI（たとえば、CKI-とCKI-の両方）を阻害するように設計されてもよいことが理解されよう。CKI-を下方制御する能力がある例示的なsiRNAは、配列番号1および2に示されている。CKI-を下方制御する能力がある例示的なsiRNAは、配列番号6 (5' - GAAACAUUGGUGUCCGGUUUTT - 3')に示されている。CKI-を下方制御する能力がある例示的なsiRNAは、配列番号5に示されている。CKI-とCKI-の両方を下方制御する能力がある例示的なsiRNAは、配列番号3および4に示されている。

40

【0104】

本発明のCKIに関するサイレンサーRNAは、たとえばApplied Biosystemsから市販されてもいる。

【0105】

二本鎖干渉RNA（たとえば、siRNA）の鎖は、連結されて、ヘアピンまたはステ

50

ムループ構造（たとえば、s h R N A）を形成してもよい。したがって、述べたように、本発明のR N Aサイレンシング剤はまた、低分子ヘアピン型R N A（s h R N A）であつてもよい。

【0106】

「s h R N A」という用語は、ここで使用される場合、相補的配列の第1および第2の領域を含む、ステムループ構造を有するR N A薬剤であつて、相補性の程度および領域の向きが、塩基対形成が領域間で生じるために十分であり、第1および第2の領域がループ領域によって連結されており、ループがループ領域内のヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）間の塩基対形成の欠如から生じるR N A薬剤を表す。ループにおけるヌクレオチドの数は、3～23、または5～15、または7～13、または4～9、または9～11の数である。ループにおけるヌクレオチドの一部は、ループにおける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され得るオリゴヌクレオチド配列の例は、5' - U U C A A G A G A - 3' (Brumme1kamp, T. R.ら(2002) Science 296:550) および 5' - U U U G U G U A G - 3' (Castanotto, D.ら(2002) RNA 8:1454) を含む。生じた単鎖オリゴヌクレオチドは、R N A i 機構と相互作用する能力がある二本鎖領域を含むステムループまたはヘアピン構造を形成することが当業者によって認識されることになる。

10

【0107】

別の態様によれば、R N Aサイレンシング剤は、m i R N Aであつてもよい。m i R N Aは、様々なサイズの一次転写物をコードする遺伝子から作られる低分子R N Aである。それらは、動物と植物の両方において同定された。一次転写物（「p r i - m i R N A」と名付けられた）は、様々な核酸分解工程を通してより短い前駆体m i R N A、または「p r e - m i R N A」にプロセシングされる。p r e - m i R N Aは、最終（成熟）m i R N Aが二本鎖で存在するように、折り畳まれた形態で存在し、2本の鎖は、m i R N Aと称される（最終的に標的と塩基対形成することになる鎖）。p r e - m i R N Aは、前駆体からm i R N A二本鎖を取り除くダイサーの形態に関する基質であり、この後、s i R N Aと同様に、二本鎖がR I S C複合体中に取り込まれ得る。m i R N Aは、遺伝子導入で発現され、一次形態全体ではなく、前駆体形態の発現を通して効果的であり得ることが実証された（Parizottoら(2004) Genes & Development 18:2237-2242 および Guoら(2005) Plant Cell 17:1376-1386）。

20

【0108】

s i R N Aとは異なり、m i R N Aは、部分的な相補性のみで転写物配列に結合し（Zengら, 2002, Molec. Cell 9:1327-1333）、定常状態R N Aレベルに影響を及ぼすことなく、翻訳を抑圧する（Leeら, 1993, Cell 75:843-854; Wightmanら, 1993, Cell 75:855-862）。m i R N Aとs i R N Aの両方は、ダイサーによってプロセシングされ、R N A誘導サイレンシング複合体の構成要素と会合する（Hutvagnerら, 2001, Science 293:834-838; Grishokら, 2001, Cell 106:23-34; Kettingら, 2001, Genes Dev. 15:2654-2659; Williamsら, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6889-6894; Hammondら, 2001, Science 293:1146-1150; Mourlatosら, 2002, Genes Dev. 16:720-728）。最近の報告（Hutvagnerら, 2002, Science Express 297:2056-2060）は、m i R N A経路対s i R N A経路を通した遺伝子制御は、標的転写物との相補性の程度によって単独に決定されると仮定する。m R N A標的との部分的な同一性のみを有するs i R N Aは、m i R N Aと同様に、R N A分解をトリガーするのではなく、翻訳抑制において機能することになると推測される。

40

【0109】

本発明での使用に適したR N Aサイレンシング剤の合成は、以下のように実施され得る

50

。第1に、CKI mRNA配列がAAジヌクレオチド配列に関してAUG開始コドンの下流でスキャンされる。各AAおよび3'隣接19ヌクレオチドの出現が潜在的siRNA標的部位として記録される。非翻訳領域(UTR)は、制御タンパク質結合部位に富んでいるので、好ましくは、siRNA標的部位は、オープンソリーディングフレームから選択される。UTR結合性タンパク質および/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に干渉し得る[Tuschl ChemBiochem. 2: 239-245]。しかしながら、5'UTRに向けられたsiRNAが細胞GAPDH mRNAの約90%の低下を媒介し、タンパク質レベルを完全に消滅させたGAPDHに関して実証されたように、非翻訳領域に向けられたsiRNAも効果的であり得ることが理解されよう(www.ambion.com/techlib/tn/91/912.htm)。

10

【0110】

第2に、潜在的標的部位が、任意の配列アラインメントソフトウェア、たとえば、NCBIサーバー(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)から利用可能なBLASTソフトウェアを使用して、適切なゲノムデータベース(たとえば、ヒト、マウス、ラットなど)と比較される。他のコード配列との著しい相同意を示す推定上の標的部位が分離される。

【0111】

適格な標的部位がsiRNA合成に関する鋳型として選択される。好ましい配列は、低G/C含有量を含むものであるが、なぜならこれらは、55%より高いG/C含有量を有するものと比較して、遺伝子サイレンシングを媒介することにおいてより効果的であることが分かったからである。いくつかの標的部位が評価のために標的遺伝子の長さに沿って好ましくは選択される。選択されたsiRNAのより良い評価のために、負の対照が組合せで好ましくは使用される。負の対照siRNAは、siRNAと同じヌクレオチド組成物を好ましくは含むが、ゲノムとの著しい相同意を欠く。したがって、それがあらゆる他の遺伝子とのいかなる著しい相同意も示さないという条件で、siRNAの混ぜられたヌクレオチド配列が好ましくは使用される。

20

【0112】

本発明のRNAサイレンシング剤は、RNAのみを含有する分子に限定される必要はなく、化学修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含することが理解されよう。

30

【0113】

一部の態様では、ここで提供されたRNAサイレンシング剤は、細胞透過性ペプチドと機能的に会合していてもよい。ここで使用される場合、「細胞透過性ペプチド」は、血漿および/または細胞の核膜を通過する膜透過性複合体の輸送と関連しているエネルギー非依存性(すなわち、非エンドサイトーシス)トランスロケーション性質を与える短い(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において使用される細胞透過性ペプチドは、少なくとも1つの非機能的システム残基を好ましくは含み、これは、遊離であるかまたはかかる結合のために修飾された二本鎖リボ核酸とのジスルフィド結合を形成するために誘導体化されている。かかる性質を与える代表的なアミノ酸モチーフは、その内容が参照によりここにはっきりと組み込まれている米国特許第6,348,185号に列挙されている。本発明の細胞透過性ペプチドは、これらに限定されないが、ペネトラチン、トランスポータン、pIs1、TAT(48-60)、pVEC、MTS、およびMAPを好ましくは含む。

40

【0114】

本発明のCKIを下方制御する能力がある別の薬剤は、DNAザイム分子であり、これは、CKI-、またはのmRNA転写物またはDNA配列を特異的に切断する能力がある。DNAザイムは、一本鎖と二本鎖標的配列の両方を切断する能力がある一本鎖ポリヌクレオチドである(Breaker, R.R. and Joyce, G.F. (1995). A DNA enzyme with Mg²⁺-dependent RNA phosphoesterase activity. Curr Biol 2, 65

50

5 - 660 ; Santoro, S. W. and Joyce, G. F. (1997). A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 94, 4262 - 4266). DNAザイムに関する一般的なモデル(「10-23」モデル)が提案された。「10-23」DNAザイムは、それぞれ7つから9つのデオキシリボヌクレオチドの2つの基質-認識ドメインが隣接した15デオキシリボヌクレオチドの触媒ドメインを有する。DNAザイムのこの型は、プリン:ピリミジン結合点でその基質RNAを効果的に切断し得る(Santoro and Joyce (1997)) ; DNAザイムの総説に関しては、Kachigian, L. M. (2002). DNAzymes: cutting a path to a new class of therapeutics. Curr Opin Mol Ther 4, 119 - 121を参照されたい。
10

【0115】

一本鎖および二本鎖標的切断部位を認識する、合成、操作されたDNAザイムの構築および増幅の例は、Joyceらへの米国特許第6,326,174号に開示されている。ヒトウロキナーゼ受容体に対して向けられた類似した設計のDNAザイムがin vivoでウロキナーゼ受容体発現を阻害し、結腸がん細胞転移を阻害することに成功することが最近観察された(Ittoh, T.ら, Abstract 409, American Society of Gene Therapy 5th Annual Meeting (www.asgt.org), June 5 - 9, 2002, Boston, Mass. USA.)。別の適用では、bcr-ab1癌遺伝子に相補的なDNAザイムは、慢性骨髓性白血病(CML)および急性リンパ芽球性白血病(ALL)の症例において、白血病細胞における癌遺伝子の発現を阻害すること、および自家骨髓移植における再発率を減少させることに成功した。
20

【0116】

本発明のCKIの下方制御は、CKIをコードするmRNA転写物と特異的にハイブリダイズする能力があるアンチセンスポリヌクレオチドを使用することによっても実施され得る。

【0117】

CKIを効率的に下方制御するために使用され得るアンチセンス分子の設計は、アンチセンス手法に重要な2つの側面を考慮しながら実施されなければならない。第1の側面は、適切な細胞の細胞質中へのオリゴヌクレオチドの送達である一方、第2の側面は、その翻訳を阻害するように細胞内の指定されたmRNAを特異的に結合するオリゴヌクレオチドの設計である。
30

【0118】

従来技術は、オリゴヌクレオチドを多種多様な細胞型中に効率的に送達するために使用され得るいくつかの送達戦略を教示している(たとえば: Luft, F. C. (1998). Making sense out of antisense oligodeoxy nucleotide delivery: getting there is half the fun. J Mol Med 76(2), 75 - 76 (1998); Kronenwettら(1998). Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. Blood 91, 852 - 862; Rajur, S. B. ら(1997). Covalent protein-oligonucleotide conjugates for efficient delivery of antisense molecules. Bioconjug Chem 8, 935 - 940; Lavigneら Biochem Biophys Res Commun 237: 566 - 71 (1997); およびAoki, M. ら(1997). In vivo transfer efficiency of antisense oligonucleotide 40 40 50

s into the myocardium using HVJ-liposome method. Biochem Biophys Res Commun 231, 540-545を参照されたい)。

【0119】

加えて、標的mRNAとオリゴヌクレオチドの両方における構造変化のエネルギー特性を説明する熱力学サイクルに基づいて、それらの標的mRNAへの最も高い予測される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(たとえば、Walton, S. P. ら(1999). Prediction of antisense oligonucleotide binding affinity to a structured RNA target. Biotechnol Bioeng 65, 1-9を参照されたい)。

【0120】

かかるアルゴリズムは、細胞においてアンチセンス手法を実行するために成功的に使用された。たとえば、Waltonらによって開発されたアルゴリズムは、科学者らがウサギグロビン(RBG)およびマウス腫瘍壞死因子-(TNF-)転写物に関するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することに成功することを可能にした。同じ研究グループは、動態学的PCR技法によって評価された、細胞培養における3つのモデル標的mRNA(ヒト乳酸脱水素酵素AおよびBならびにラットgp130)に対する合理的に選択されたオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性が、ホスホジエステルおよびホスホロチオエートオリゴヌクレオチド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を含むほとんど全ての事例において効果的であることが分かったことをつい最近報告した。

【0121】

加えて、*in vitro*系を使用して特定のオリゴヌクレオチドの効率を設計するかつ予測するためのいくつかの手法も公表された(Matveeva, O. ら(1998). Prediction of antisense oligonucleotide efficacy by *in vitro* methods. Nature Biotechnology 16, 1374-1375)。

【0122】

いくつかの臨床試験は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの安全性、実現可能性、および活性を実証した。たとえば、がんの治療に適したアンチセンスオリゴヌクレオチドが成り利用された(Holmund, B. P. ら(1999). Toward antisense oligonucleotide therapy for cancer: ISIS compounds in clinical development. Curr Opin Mol Ther 1, 372-385)一方、c-myb遺伝子、p53、およびBcl-2を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを介した血液悪性腫瘍の治療は、臨床試験に入り、患者に許容されることが示された(Gewirtz, A. M. (1999). Oligonucleotide therapeutics: clothing the emperor. Curr Opin Mol Ther 1, 297-306)。

【0123】

つい最近、ヒトヘパラナーゼ遺伝子発現のアンチセンス媒介抑圧は、マウスモデルにおけるヒトがん細胞の胸膜播種を阻害することが報告された(Uno, F. ら(2001). Antisense-mediated suppression of human heparanase gene expression inhibits pleural dissemination of human cancer cells. Cancer Res 61, 7855-7860)。

【0124】

したがって、現在のコンセンサスは、上記のように、高度に正確なアンチセンス設計アルゴリズムおよび多種多様なオリゴヌクレオチド送達系の産出を導いた、アンチセンス技

10

20

30

40

40

50

術の分野における最近の進展が、当業者が過度の試行錯誤実験法に頼る必要なく、既知の配列の発現を下方制御するのに適したアンチセンス手法を設計し、実行するのを可能にするということである。

【0125】

C K I を下方制御する能力がある別の薬剤は、特定の C K I をコードする m R N A 転写物を特異的に切断する能力があ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 m R N A の切断による遺伝子発現の配列特異的阻害にますます使用されている (Welch, P. J. ら (1998) . Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA levels. Curr Opin Biotechnol 9, 486 - 496)。任意の特定の標的 R N A を切断するためのリボザイムを設計する可能性により、それらは、基礎研究と治療適用の両方における貴重なツールになった。治療分野では、リボザイムは、感染症におけるウイルス R N A 、がんにおける優性癌遺伝子、および遺伝性障害における特定の体細胞変異を標的とするために活用されてきた (Welch, P. J. ら (1998) . Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. Clin Diagn Virol 10, 163 - 171)。最も注目すべきは、H I V 患者に関するいくつかのリボザイム遺伝子治療プロトコールが、すでに第 1 相試験にあることである。つい最近、リボザイムは、トランスジェニック動物研究、遺伝子標的検証、および経路解明に使用された。いくつかのリボザイムは、臨床試験の様々な段階にある。ANGIOZYME (商標) は、ヒト臨床試験において研究される初めて化学的に合成されたリボザイムであった。ANGIOZYME は、血管形成経路における重要な構成要素である V E G F R (血管内皮増殖因子受容体) の形成を特異的に阻害する。Ribozyme Pharmaceuticals, Inc. 、および他の会社は、動物モデルにおける抗血管形成治療法の重要性を実証した。C 型肝炎ウイルス (H C V) R N A を選択的に破壊するように設計されたリボザイムである H E P T A Z Y M E (商標) は、細胞培養アッセイにおいて C 型肝炎ウイルス R N A を低下させるのに効果的であることが見出された (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc. , Boulder, Colorado, USA (www.rpi.com))。

【0126】

細胞における C K I 遺伝子の発現を制御する追加の方法は、三本鎖形成性オリゴヌクレオチド (T F O) を介してである。最近の研究は、T F O が二本鎖ヘリックス D N A におけるポリプリンまたはポリピリミジン領域を配列特異的に認識し、結合するように設計され得ることを示している。これらの認識規則は、Maher III, L. J. ら (1989) . Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation. Science 245, 725 - 730; Moser, H. E. ら (1987) . Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. Science 238, 645 - 650; Beal, P. A. and Dervan, P. B. (1991) . Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation. Science 251, 1360 - 1363; Cooney, M. ら (1988) . Science 241, 456 - 459; および Hogan, M. E. ら、EP Publication 375408 に要約されている。オリゴヌクレオチドの修飾、たとえば、介入物の導入および主鎖置換、ならびに結合条件 (たとえば、p H および陽イオン濃度) の最適化は、T F O 活性への固有の障壁、たとえば電荷斥力および不安定性を克服するのを助け、合成オリゴヌクレオチドが特定の配列を標的にし得ることが最近示された (最近の総説に関して、Seidman, M. M. and Glazer, P. M. (2003) . The

10

20

30

40

50

potential for gene repair via triple helix formation J Clin Invest 112, 487-494を参照されたい)。

【0127】

一般に、三本鎖形成性オリゴヌクレオチドは、配列一致を有する：

オリゴ	3' - - A	G	G	T
二本鎖	5' - - A	G	C	T
二本鎖	3' - - T	C	G	A

しかしながら、A - A T および G - G C トリプレットが最も大きい三重のヘリックス安定性を有することが示された (Reither, S. and Jeltsch, A. (2002). Specificity of DNA triple helix formation analyzed by a FRET assay. BMC Bioc hem 3(1), 27, Epub)。同じ著者らは、A - A T および G - G C 規則に従って設計された TFO が非特異的三本鎖を形成しないことを実証し、これは、三本鎖形成が実に配列特異的であることを示している。

【0128】

したがって、三本鎖形成性配列は、CKI制御領域における任意の所与の配列に関して考案され得る。三本鎖形成性オリゴヌクレオチドは、長さが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 以上のヌクレオチド、最大 50 または 100 bp である。

【0129】

TFO での細胞のトランスフェクション (たとえば、陽イオンリポソームを介した) および標的 DNA との三重のヘリックス構造の形成は、立体的および機能的变化を誘導し、転写開始および伸長をブロックし、内在性 DNA における望ましい配列変化の導入を可能にし、遺伝子発現の特定の下方制御をもたらす。TFO で処置された細胞における遺伝子発現の抑圧の例は、哺乳動物細胞におけるエピソーム supFG1 および内在性 Hprt 遺伝子のノックアウト (Vasquez, K. M. ら (1999). Chromosomal mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mammalian cells. Nucleic Acids Res 27, 1176-1181; および Puri, N. ら (2001). Targeted Gene Knockout by 2'-O-Aminoethyl Modified Triplex Forming Oligonucleotides. J Biol Chem 276, 28991-28998) ; 前立腺がん病因学において重要である Ets2 転写因子の発現の配列および標的特異的下方制御 (Carbone, G. M. ら, Selective inhibition of transcription of the Ets2 gene in prostate cancer cells by a triplex-forming oligonucleotide. Nucleic Acids Res 31, 833-843) ; および炎症促進性 ICAM-1 遺伝子の制御 (Besch, R. ら (2003). Specific inhibition of ICAM-1 expression mediated by gene targeting with Triplex-forming oligonucleotides. J Biol Chem 277, 32473-32479) を含む。加えて、Vuyisich および Beal は、配列特異的 TFO が dsRNA に結合し、dsRNA 依存性酵素、たとえば RNA 依存性キナーゼの活性を阻害し得ることを最近示した (Vuyisich, M. and Beal, P. A. (2000). Regulation of the RNA-dependent protein kinase by triple helix formation. Nucleic Acids Res 28, 2369-2374)。

【0130】

そのうえ、上記の原理に従って設計された TFO は、DNA 修復をもたらす、したがつ

10

20

30

40

50

て、内在性遺伝子の発現の下方制御と上方制御の両方を提供する能力がある、方向付けられた突然変異誘発を誘導し得る (Seidman and Glazer (2003))。効果的なTFOの設計、合成、および投与の詳細な記述は、Froehlerらへの米国特許出願第03/017068号および同第03/0096980号ならびにEmanueleらへの同第02/0128218号および同第02/0123476号、ならびにLawenへの米国特許第5,721,138号において見出され得る。

【0131】

マイクロRNAは、当技術分野で見出されるガイドラインを使用して設計され得る。かかる分子の設計に関するアルゴリズムも利用可能である。たとえば、参照によりここに組み込まれているwww.wwmdotweigelworldddotorg/cgi-bin/mirnatooldotplを参照されたい。10

【0132】

本発明のCKIを下方制御する能力がある別の薬剤は、CKIに結合するかつ／またはこれを切断する任意の分子である。かかる分子は、たとえば、CKIアンタゴニスト、またはCKI阻害性ペプチドとすることができる。

【0133】

CKIの少なくとも触媒的または結合性部分の非機能的類似体もCKIを下方制御する薬剤として使用され得ることが理解されよう。

【0134】

小さい化学CKI阻害剤も本発明によって企図される。これらの化学薬剤は、1つの特定のCKIへの選択的阻害活性を有してもよいかまたは2つ以上のCKIへの阻害活性を含んでもよい。かかる阻害剤は、CKI-へのその阻害活性と比較して、CKI-および-への少なくとも2倍、少なくとも5倍またはさらに10倍大きい阻害活性を有してもよい。たとえば、IC261 (Santa Cruz technologyから利用可能である)は、CKI-およびCKI-の特異的阻害剤である。20

【0135】

特定の態様によれば、小さい化学CKI阻害剤は、CKI-に選択的である。かかる阻害剤は、CKI-および/またはCKI-へのその阻害活性と比較して、CKI-への少なくとも2倍、少なくとも5倍またはさらに10倍大きい阻害活性を有してもよい。30

【0136】

別の態様によれば、小さい化学CKI阻害剤は、CKI-に選択的である。かかる阻害剤は、CKI-および/またはCKI-へのその阻害活性と比較して、CKI-への少なくとも2倍、少なくとも5倍またはさらに10倍大きい阻害活性を有してもよい。

【0137】

別の態様によれば、小分子、化学薬剤（すなわち、ポリヌクレオチド薬剤ではない）は、CKI-およびCKI-へのその阻害活性と比較して、CKI-への少なくとも2倍、少なくとも5倍またはさらに10倍大きい阻害活性を有する。一態様によれば、小分子薬剤は、p53を上方制御することにおいてCKIおよびの阻害剤と少なくとも同じくらい効果的である。好ましくは、小分子薬剤は、p53を上方制御することにおいてCKIおよびの阻害剤より少なくとも2倍効果的である。40

【0138】

特定の態様によれば、これらの薬剤のいずれもカテンインおよびp53を安定化せず、DNA損傷応答を誘導もしないので、薬剤は、CKI7でも、D4476でも、IC261でもない。

【0139】

企図された小分子薬剤は、Pf670462 (CAS No: 950912-80-8)またはPf4800567 (CAS No: 1188296-52-7)を含む。

【0140】

10

20

30

40

50

CKIを下方制御するために本発明に従って使用され得る別の薬剤は、CKI活性化または基質結合を妨げる分子である。

【0141】

CKI-、またはを制御するために使用されてもよい他の薬剤は、当技術分野で既知であるスクリーニング方法を使用して見出され得るまたは(強化された選択性、特異性に関して)洗練され得る。かかるアッセイの例は、生化学的アッセイ(たとえば、in-vitroキナーゼ活性)、細胞生物学アッセイ(たとえばタンパク質局在性)および分子アッセイ(たとえば、ノーザン、ウエスタンおよびサザンプロットティング)を含む。

【0142】

以下は、本発明のCKIの1つを下方制御する能力を求めて小さい化学薬剤をスクリーニングするために使用されてもよい様々なアッセイの記述である。

【0143】

酵素阻害アッセイ:

- 組換えCKI 酵素を小分子阻害剤(SMI)で10分間インキュベートし; 基質ヒトPer2を加え、SDS-PAGE上でのタンパク質上方シフトによってSer662リン酸化を観察する(Tohら, Science 291: 1040, 2001)。
- 組換えCKI 酵素をSMIで10分間インキュベートし; 基質マウスp53を加え、Novusウサギ抗p53、ホスホ(Thr18)ポリクローナル抗体(NB100-92607)を使用したウエスタンプロット法によってThr18リン酸化を観察する。
- ヒト腫瘍細胞をSMIで1~24時間インキュベートし; 細胞を収集し、それらをInvitrogenウサギ抗-カテニン、ホスホ(Ser45)ポリクローナル抗体(44-208G)でのSer45上での-カテニンリン酸化に関して分析する(CKIのユニークな性質)。

【0144】

生物学的アッセイ

- ヒト腫瘍細胞をSMIで1~24時間インキュベートし; 細胞を収集し、それらを免疫組織化学的検査またはウエスタンプロット法によってH2A.Xおよびp53への抗体でDDRおよびp53活性化に関して分析する。
- ヒト原発腫瘍細胞および腫瘍関連線維芽細胞をSMIで24時間インキュベートし; SMIを取り除き、培地を交換し; 細胞を細胞老化関連ガラクトシダーゼアッセイ(SA--Gal)によって細胞老化に関して分析する。

【0145】

候補薬剤は、小さい化学阻害剤、抗体または様々なポリヌクレオチド薬剤、たとえばここで上に記載されたものを含んでもよい。上に列挙されたスクリーニング方法を使用した確認試験に従って、薬剤は、がん細胞における候補抗がん剤としてまたは造血幹細胞を枯渇させるための候補として試験されてもよい。薬剤活性の確認は、ここで以下に詳しく述べるように、より大きい量の薬剤およびそれを含む医薬組成物でのその調製物を合成することが後に続いててもよい。

【0146】

述べたように、本発明の阻害剤は、細胞移植手順の前に、骨髄細胞を枯渇させるための血液消失薬剤としても使用されてもよい。血液消失は、化学療法および/または照射と共に、または化学療法および/もしくは照射の非存在下で行われてもよい。

【0147】

したがって、本発明の別の側面によれば、それを必要とする対象に細胞を移植する方法であって、

(a) 血液または骨髄からの未熟血液細胞を、p53の量および/または活性を上方制御し、かつ血液または骨髄中の未熟血液細胞を死滅させるCKI阻害剤の量と接触させることによって、対象の血液または骨髄からの未熟血液細胞を枯渇させること; およびその後(b)対象に細胞を移植すること

を含む方法が提供される。

10

20

30

40

50

【0148】

本発明のこの側面によれば、対象は、細胞移植が治療的である疾患を患っている。

【0149】

かかる疾患は、血液疾患、心疾患、糖尿病、神経変性疾患、悪性疾患、免疫疾患および自己免疫疾患を含むが、これらに限定されない。疾患は、先天性でも後天性でもよい。

【0150】

本発明のこの側面の態様によれば、疾患は、悪性疾患である。特定の態様によれば、悪性疾患は、造血またはリンパ組織の悪性腫瘍である。

【0151】

対象が患っていてもよい疾患は、白血病〔たとえば、急性リンパ性、急性リンパ芽球性、急性リンパ芽球性プレB細胞、急性リンパ芽球性T細胞白血病、急性巨核芽球性、単球性、急性骨髓性、急性骨髓性、好酸球増加症を伴う急性骨髓性、B細胞、好塩基球性、慢性骨髓性、慢性、B細胞、好酸球性、フレンド、顆粒球または骨髓球性、ヘアリー細胞、リンパ球性、巨核芽球、単球性、単球性-マクロファージ、骨髓芽球性、骨髓性、骨髓単球性、形質細胞、プレB細胞、前骨髓球性、亜急性、T細胞、リンパ系新生物、骨髓性悪性腫瘍への素因、急性非リンパ球性白血病、T細胞急性リンパ球性白血病(T-ALL)およびB細胞慢性リンパ球性白血病(B-CLL)〕、リンパ腫〔たとえば、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、B細胞慢性リンパ球性白血病/リンパ腫、バーキットリンパ腫、T細胞、皮膚T細胞、前駆体T細胞白血病/リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、MALTリンパ腫、組織球性、リンパ芽球性、胸腺および菌状息肉腫〕、移植片の移植と関連している疾患(たとえば移植片拒絶、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疾患)、自己免疫疾患、たとえば1型糖尿病、アデノシンデアミナーゼ(ADA)、大理石骨病、再生不良性貧血、ゴーシェ病、地中海貧血症および他の先天性または遺伝的に決定される造血異常を含む重症複合免疫不全症候群(SCID)を含むが、これらに限定されない。〕

10

20

30

30

【0152】

本発明のこの側面に従って枯渇される未熟血液細胞は、造血幹細胞(HSC)、造血プロジェニター細胞およびがん幹細胞を含む。未熟血液細胞は、骨髓および/または循環血液に存在してもよい。

【0153】

「造血幹細胞」という用語は、骨髓(たとえば、単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球/血小板、樹状細胞)、およびリンパ系列(たとえば、T-細胞、B-細胞、NK-細胞)を含む生物の全ての血液細胞型を生じる複能性幹細胞を表す。致死的に照射された動物またはヒトに移植された場合、造血幹細胞は、赤血球、好中球-マクロファージ、巨核球およびリンパ造血細胞プールを再配置し得る。

40

【0154】

ここで使用される場合、「造血幹およびプロジェニター細胞」または「HSPC」という用語は、抗原マーカーCD34の存在および系統(lin)マーカーの非存在によって同定される細胞を表す。したがって、HSPCは、CD34⁺/lin(-)細胞、およびかかる細胞の集団として特徴付けられる。CD34⁺およびlin(-)細胞を含む細胞の集団も造血プロジェニター細胞を含み、したがって、本出願の目的で、「HSPC」という用語は、造血プロジェニター細胞を含むことが認識される。

【0155】

ここで使用される場合、枯渇させるという用語は、骨髓幹細胞の少なくとも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%、少なくとも90%、または100%を除去することを表す。

【0156】

したがって、CKI阻害剤は、骨髓破壊的または骨髓減少的(myeloreductive)用量で

50

提供されてもよい。

【0157】

ここで使用される場合、「骨髓破壊的」は、造血幹細胞移植が与えられない場合、骨髓機能不全による死亡がかなりの数のレシピエントにおいて生じることになる処置を表す。

【0158】

ここで使用される場合、「非骨髓破壊的」は、骨髓細胞を死滅させるが、かなりの数のレシピエントにおいて、骨髓機能不全が原因の死亡につながることにならない処置を表す。

【0159】

ここで使用される場合、「骨髓減少的」は、血球減少または貧血を引き起こす処置を表す。

【0160】

CKI阻害剤が骨髓減少的用量で提供される場合、追加の薬剤が完全な骨髓破壊をもたらすために使用されてもよいことが理解され、かかる薬剤は、たとえば、アルキル化剤（たとえば、ナイトロジエンマスター [たとえばメクロレタミン]、シクロホスファミド、メルファランおよびクロランプシル）、スルホン酸アルキル（たとえば、ブスルファン）、ニトロソウレア（たとえば、カルムスチン、ロムスチン、セムスチンおよびストレプトゾシン）、トリアゼン（たとえば、ダカルバジン）、代謝拮抗薬（たとえば、葉酸類似体、たとえばメトトレキサート）、ピリミジン類似体（たとえばフルオロウラシルおよびシタラビン）、プリン類似体（たとえば、フルダラビン、イダルビシン、シトシンアラビノシド、メルカプトプリンおよびチオグアニン）、ビンカアルカロイド（たとえば、ビンプラスチン、ビンクリスチンおよびビンデシン）、エピポドフィロトキシン（たとえば、エトポシドおよびテニポシド）、抗生物質（たとえば、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシンおよびマイトマイシン）、ジプロモマンニトール、デオキシスペルグアリン、ジメチルミレランおよびチオテバの1つ以上から選択される細胞減少性薬剤を含む。

【0161】

追加の骨髓減少的非骨髓破壊的薬剤は、アルキル化剤、たとえば、シクロホスファミド、またはフルダラビンまたは類似物質であるが、しかしながら、造血スペース創出抗体もしくは薬物、たとえば、細胞増殖の阻害剤、たとえば、DSG、または抗代謝剤、たとえばブレキナル、または抗T細胞抗体、たとえば、抗CD4もしくは抗CD8抗体の1つまたは両方が骨髓減少的非骨髓破壊的薬剤として使用され得る。X線照射ならびにX線照射および薬物投与の組合せも企図される。一部の態様では、骨髓消失は、転移性骨細胞を死滅させることが既知であるラジオアイソトープ、たとえば、放射性ストロンチウム、¹³⁵サマリウム、または¹⁶⁶ホルミウムの投与によって作製される（Appelbaumら, 1992, Blood 80: 1608-1613）。

【0162】

CKI阻害剤は、p53の量および/または活性を増加させる能力がある量で典型的に提供される。

【0163】

CKI阻害剤を骨髓細胞と接触させることは、in vivoまたはex vivoでたとえばアフェレーシス中に実施されてもよい。

【0164】

したがって、本発明の別の側面によれば、対象の血液または骨髓からの未熟血液細胞を枯渇させる方法であって、幹細胞を、p53の量および/または活性を上方制御し、かつ血液または骨髓中の未熟血液細胞を死滅させるCKI阻害剤の量とex vivoで接触させ、それによって血液または骨髓からの未熟血液細胞を枯渇させることを含む方法が提供される。

【0165】

本発明のこれらの側面に従って使用されてもよいCKI阻害剤は、ここで、上で記載さ

10

20

30

40

50

れている。

【0166】

移植される細胞は、単離細胞であっても（細胞移植片とも称される）または組織中に含まれていてもよい（組織移植片とも称される）。

【0167】

ここで使用される場合、「細胞または組織移植片」というフレーズは、体細胞（たとえば単一細胞または細胞の群）または組織（たとえば、完全にまたは部分的に移植されてもよい、固体組織または軟部組織）を表す。本発明の教示に従って移植されてもよい例示的な組織は、リンパ／造血組織（たとえばリンパ節、バイエル板胸腺または骨髄）を含むが、これらに限定されない。本発明の教示に従って移植されてもよい例示的な細胞は、造血幹細胞（たとえば未熟造血細胞）を含むが、これらに限定されない。特定の態様によれば、本発明の造血幹細胞は、CD34+である。

10

【0168】

骨髄幹細胞枯渇後に対象に移植される細胞の型は、治療される疾患に依存することが理解されよう。

【0169】

したがって、たとえば、対象が腎または心不全を有する場合、移植細胞は、腎臓または心臓細胞を含んでもよい。対象が肝もしくは肺不全または皮膚損傷（たとえば、火傷）を患っている場合、移植片は、肝、肺または皮膚組織を含んでもよい。対象が糖尿病を有する場合、細胞は、細胞臓臓細胞を含む。対象が血液疾患を有する場合、細胞は、未熟造血細胞を含んでよい。

20

【0170】

適用に依存して、方法は、対象と同系または非同系である細胞または組織移植片を使用して実施されてもよい。

【0171】

ここで使用される場合、「同系」という用語は、対象と本質的に遺伝的に同一である個体に由来する細胞または組織を表す。典型的に、本質的に完全に近交系の哺乳動物、哺乳動物クローン、またはホモ接合性双生児の哺乳動物は、同系である。

30

【0172】

同系細胞または組織の例は、対象（当技術分野では、「自家」とも称される）、対象のクローン、または対象のホモ接合性双生児に由来する細胞または組織を含む。

【0173】

ここで使用される場合、「非同系」という用語は、対象のリンパ球と同種または異種である個体に由来する細胞または組織を表す（当技術分野では、「非自家」とも称される）。

【0174】

ここで使用される場合、「同種」という用語は、対象と同じ種のものであるドナーに由来するが、実質的に対象と非クローン性である細胞または組織を表す。典型的に、同じ種の非近交系、非接合体双生児哺乳動物は、互いに同種である。同種ドナーは、対象に関してHLA同一またはHLA非同一であってもよいことが理解されよう。

40

【0175】

ここで使用される場合、「異種」という用語は、対象のリンパ球のかなりの割合の種に對して、異なる種の抗原を実質的に発現する細胞または組織を表す。典型的に、異なる種の非近交系哺乳動物は、互いに異種である。

【0176】

本発明は、異種細胞または組織がいろいろな種、たとえば、これらに限定されないが、ウシ類（たとえば、乳牛）、ウマ類（たとえば、ウマ）、ブタ類（たとえばブタ）、ヒツジ類（たとえば、ヤギ、ヒツジ）、ネコ類（たとえば、フェリス・ドメスティカ（Felis domesticus））、イヌ類（たとえば、カニス・ドメスティカ（Canis domesticus））、げっ歯類（たとえば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット

50

、スナネズミ、ハムスター)または靈長類(たとえば、チンパンジー、アカゲザル、マカクザル、マーモセット)に由来することを想定する。

【0177】

異種起源(たとえばブタ起源)の細胞または組織は、人畜共通感染症、たとえばブタ内在性レトロウイルスを含まないことが既知である供給源から好ましくは得られる。同様に、ヒト由来細胞または組織は、実質的に病原体を含まない供給源から好ましくは得られる。

【0178】

本発明の態様によれば、対象とドナーの両方は、ヒトである。

【0179】

適用および利用可能な供給源に依存して、本発明の細胞または組織移植片は、出生前生物、出生後生物、成体または屍体ドナーから得てもよい。さらに、必要な適用に依存して、細胞または組織は、ナイーブであってもまたは遺伝的に改変されていてもよい。かかる決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0180】

当技術分野で既知の任意の方法が細胞または組織を得るために用いられてもよい(たとえば移植のために)。

【0181】

特定の態様によれば、移植される細胞は、造血細胞 - たとえば未熟造血細胞を含む。

【0182】

ここで使用される場合、「未熟造血細胞」という用語は、完全に分化した造血細胞の1つ以上の型に分化する能力がある不完全に分化した細胞の任意の型を表す。未熟造血細胞は、限定することなく、「プロジェニター細胞」、「前駆体細胞」、「幹細胞」、「多能性細胞」、「複能性細胞」などと当技術分野で称される細胞の型を含む。

【0183】

好ましくは、未熟造血細胞は、造血幹細胞である。

【0184】

好ましくは、未熟造血細胞がヒトに由来する場合、未熟造血細胞は、CD34+細胞、たとえばCD34+CD133+細胞である。

【0185】

未熟造血細胞を含む本発明の移植片の型は、全骨髄細胞移植片(T細胞枯渇または非T細胞枯渇)、骨髄液からの未熟造血細胞の移植片、末梢血由来未熟造血細胞の移植片および臍帯由来未熟造血細胞の移植片を含む。かかる移植片を得る方法は、以下に記載されている。

【0186】

ヒト末梢血由来造血幹細胞を含む移植片は、標準的な方法に従って、たとえば、CD34+細胞をドナーのサイトカイン処置によって末梢血に動員し、動員されたCD34+細胞を、白血球アフェレーシスを介して収集することによって得られてもよい。骨髄または血液からの骨髄由来幹細胞の単離を行うための豊富なガイダンスが当技術分野の文献において提供されている(たとえば、Arai S, Klingemann H G., 2003. Arch Med Res. 34: 545-53; およびRepka T. and Weisdorf D., 1998. Curr Opin Oncol. 10: 112-7; Janssen W E. l., 1994. Cancer Control 1: 225-230; Atkinson K., 1999. Curr Top Pathol. 92: 107-36を参照されたい)。

【0187】

ヒト臍帯血由来造血幹細胞の移植片は、標準的な方法に従って得られてもよい(たとえば、Quillien K, Berkmann E M., 1996. J. Hematother. 5: 153-5を参照されたい)。

【0188】

10

20

30

40

50

本発明の造血幹細胞の移植片は、肝組織または卵黄嚢にも由来してもよい。

【0189】

造血幹細胞の必要な数は、初代造血幹細胞の *ex-vivo* 増殖によって提供され得る (Emerson, 1996, Blood 87: 3082 に概説されており、Petzler, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93: 1470; Zundstra, 1994, Biotechnology 12: 909; およびWO 9511692 により詳細に記載されている)。

【0190】

細胞または組織移植片を対象に移植することは、様々なパラメーター、たとえば、細胞または組織型；レシピエントの疾患（たとえば臓器不全）の型、段階または重症度；対象に特異的な物理的または生理的パラメーター；および／または望ましい治療成績に依存して、多数の様式で実施されてもよい。

10

【0191】

本発明の細胞または組織移植片を移植することは、細胞または組織移植片を適用に依存して様々な解剖学的位置の任意の1つに移植することによって実施されてもよい。細胞または組織移植片は、同位置の解剖学的位置（移植に関する正常解剖学的位置）に、または異所性解剖学的位置（移植に関する異常解剖学的位置）に移植されてもよい。適用に依存して、細胞または組織移植片は、副腎下に、または腎臓、精巣脂肪、皮下組織、網、門脈、肝臓、脾臓、骨、心臓腔、心臓、胸腔、肺、皮膚、脾臓および／または腹腔内スペース中に有利に埋め込まれてもよい。

20

【0192】

本発明の同系または非同系造血細胞（たとえば未熟造血細胞）は、細胞移植に関する当技術分野で既知の任意の方法、たとえば、これらに限定されないが、細胞インフュージョン（たとえばI.V.）を使用して、または腹腔内経路を介してレシピエントに移植されてもよいことが理解されよう。

【0193】

任意に、本発明の細胞または組織移植片を欠陥のある臓器／細胞を有する対象に移植する場合、移植片の最適な発達、および対象の解剖／生理機能と共にその構造的／機能的組込みを可能にするために、不全の臓器／細胞を対象から最初に少なくとも部分的に取り除くことが有利であり得る。

30

【0194】

枯渇工程の前に、骨髄から血液への未熟血液細胞の動員も本発明によって企図される。動員薬剤の例は、動員に影響を及ぼす増殖因子またはサイトカイン、たとえばコロニー刺激因子（たとえば顆粒球コロニー刺激因子、G-CSF および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、GM-CSF）および幹細胞因子、SCF を含む。ペプチド動員薬剤も、米国特許出願公開第2004/0209921号、米国特許第6,946,445号、米国特許第6,875,738号、米国特許出願公開第2005/0002939号、WO 2002/020561、WO 2004/020462 およびWO 2004/087068、WO 00/09152、US 2002/0156034、およびWO 2004/024178 およびWO 01/85196 に開示されているものを含めて、本発明によって企図される。

40

【0195】

本発明の教示による対象への細胞または組織移植片の移植後、標準的な医療行為に従つて、様々な標準的な技術技法の任意の1つに従つて臓器／細胞の増殖機能性および免疫適合性をモニターすることが賢明である。たとえば、細胞または組織の構造的発達は、コンピューター断層撮影または超音波画像診断を介してモニターされてもよい一方、非同系細胞または骨髄移植片の生着は、たとえば、キメラ現象試験によって [たとえば、ショートタンデムリピート (STR) 分析を使用したPCRに基づく手順によって] モニターされ得る。

【0196】

50

上記の C K I 阻害剤（またはポリヌクレオチド C K I 阻害剤をコードする発現ベクター）は、それ自体でまたは生理学的に許容される担体も含む医薬組成物の部分として個体に投与されてもよい。医薬組成物の目的は、生物への活性成分の投与を促進することである。

【0197】

ここで使用される場合、「医薬組成物」は、他の化学構成要素、たとえば生理的に適した担体および賦形剤を有するここで記載された活性成分の1つ以上（たとえば C K I - 阻害剤、C K I - 阻害剤および／または C K I - 阻害剤）の調製物を表す。

【0198】

ここでは、「活性成分」という用語は、生物学的効果を説明可能である薬剤（たとえば、サイレンシング分子）を表す。

【0199】

以下で、互換的に使用されてもよい、「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」というフレーズは、生物への著しい刺激作用を引き起こさず、投与される化合物の生物活性および性質を抑止しない担体または希釈剤を表す。アジュバントは、これらのフレーズ下に含まれる。

【0200】

ここでは、「賦形剤」という用語は、活性成分の投与をさらに促進するために医薬組成物に加えられる不活性物質を表す。賦形剤の例は、限定することなく、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、デンプンの様々な糖および型、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を含む。

【0201】

薬物の製剤および投与に関する技法は、参照によりここに組み込まれている“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, latest editionに見出され得る。

【0202】

投与の適した経路は、たとえば、筋肉内、皮下および髄内注入を含む、経口、直腸、直腸経粘膜、特に経鼻、腸または非経口送達、ならびにくも膜下腔内、直接的脳室内、たとえば、右または左心室腔への、通常の冠動脈への心臓内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注入を含んでもよい。

【0203】

あるいは、たとえば、患者の組織領域への直接的な医薬組成物の注入を介して、全身的ではなく、局所的に医薬組成物を投与してもよい。

【0204】

「組織」という用語は、類似した構造および／または共通の機能を有する細胞の凝集物からなる生物の部分を表す。例は、脳組織、網膜、皮膚組織、肝組織、脾臓組織、骨、軟骨、結合組織、血液組織、筋組織、心臓組織、脳組織、血管組織、腎組織、肺組織、性腺組織、造血組織を含むが、これらに限定されない。例示的な態様では、組織は、結腸がん組織である。

【0205】

本発明の医薬組成物は、当技術分野で既知のプロセスによって、たとえば、従来の混合、溶解、造粒、糖剤作製、研和、乳化、封入、捕捉または凍結乾燥プロセスを用いて製造されてもよい。

【0206】

したがって、本発明による使用のための医薬組成物は、薬学的に使用され得る調製物への活性成分のプロセシングを促進する、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る担体を使用して、従来の様式で製剤化されてもよい。適切な製剤は、選択された投与の経路に依存する。

【0207】

10

20

30

40

40

50

注入に関して、医薬組成物の活性成分は、水溶液中で、好ましくは生理的に適合性の緩衝液、たとえば、ハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理的食塩緩衝液中で製剤化されてもよい。経粘膜投与に関して、浸透されるバリアに適切な浸透剤が製剤において使用される。かかる浸透剤は、当技術分野で一般に既知である。

【0208】

経口投与に関して、医薬組成物は、活性化合物を当技術分野で既知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に製剤化され得る。かかる担体は、患者による経口摂取に関して、医薬組成物が錠剤、丸剤、糖剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして製剤化されるのを可能にする。経口使用のための薬理学的調製物は、固形賦形剤を使用して、望ましい場合、適した助剤を加えた後、生じた混合物を任意に粉碎し、顆粒の混合物をプロセシングし、錠剤または糖剤コアを得ることによって作られ得る。適した賦形剤は、特に、フィラー、たとえば、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を含む糖；セルロース調製物、たとえば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、イネデンプン、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、カルボキシメチルセルロースナトリウム；および/または生理学的に許容されるポリマー、たとえば、ポリビニルピロリドン(PVP)である。望ましい場合、崩壊剤、たとえば、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、たとえば、アルギン酸ナトリウムが加えられてもよい。

10

【0209】

糖剤コアは、適したコーティングと共に提供される。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、カーボポールゲル、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した有機溶媒または溶媒混合物を任意に含有してもよい濃縮された糖溶液が使用されてもよい。色素またはピグメントが同定のためにまたは活性化合物用量の種々の組合せを特徴付けるために錠剤または糖剤コーティングに加えられてもよい。

20

【0210】

経口で使用され得る医薬組成物は、ゼラチン製のプッシュフィットカプセル剤(push-fit capsule)ならびにゼラチンおよび可塑剤、たとえば、グリセロールまたはソルビトール製の軟、密封カプセル剤を含む。プッシュフィットカプセル剤は、活性成分をフィラー、たとえば、ラクトース、結合剤、たとえば、デンプン、滑沢剤、たとえば、タルクまたはステアリン酸マグネシウム、および任意に安定剤との混合物で含有してもよい。軟カプセル剤では、活性成分は、適した液剤、たとえば、脂肪油、流動パラフィン、または液状ポリエチレングリコールに溶解または懸濁されてもよい。加えて、安定剤が加えられてもよい。経口投与に関する全ての製剤は、投与の選択された経路に適した用量であるべきである。

30

【0211】

頬側投与に関して、組成物は、従来の様式で製剤化された錠剤またはトローチの形態であってもよい。

【0212】

経鼻吸入による投与に関して、本発明による使用のための活性成分は、適した噴霧剤、たとえば、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のエアゾールスプレー提示の形態で好都合に送達される。加圧エアロゾルの場合、用量単位は、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定されてもよい。ディスペンサーにおける使用のための、たとえばゼラチンのカプセル剤およびカートリッジは、化合物および適した粉末ベース、たとえば、ラクトースまたはデンプンの粉末混合物を含有して、製剤化されてもよい。

40

【0213】

ここで記載された医薬組成物は、たとえば、ボーラス注入または持続インフュージョン

50

による非経口投与のために製剤化されてもよい。注入用製剤は、任意に追加された防腐剤と共に単位剤形で、たとえば、アンプルでまたは複数回用量容器で提示されてもよい。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁剤、溶液またはエマルションであってもよく、製剤薬剤、たとえば、懸濁、安定および/または分散剤を含有してもよい。

【0214】

非経口投与に関する医薬組成物は、水溶性型の活性調製物の水溶液を含む。そのうえ、活性成分の懸濁剤は、適切な油性または水性注入懸濁剤として調製されてもよい。適した親油性溶媒またはビヒクルは、脂肪油、たとえば、ゴマ油、または合成脂肪酸エステル、たとえば、オレイン酸エチル、トリグリセリドまたはリポソームを含む。水性注入懸濁剤は、懸濁剤の粘度を増加させる物質、たとえば、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を含有してもよい。任意に、懸濁剤は、活性成分の溶解性を増加させて、高濃度の溶液の調製を可能にする適した安定剤または薬剤も含有してもよい。

10

【0215】

あるいは、活性成分は、使用前の適したビヒクル、たとえば、滅菌、発熱物質を含まない水性溶液での構成のための粉末形であってもよい。

【0216】

本発明の医薬組成物は、たとえば、従来の坐剤基剤、たとえば、カカオバターまたは他のグリセリドを使用して、直腸組成物、たとえば、坐剤または停留かん腸でも製剤化されてもよい。

20

【0217】

本発明の状況における使用に適した医薬組成物は、活性成分が意図された目的を達成するのに効果的な量で含有される組成物を含む。より具体的に、治療有効量は、障害の症状を妨げる、軽減する、もしくは寛解するまたは治療される対象の生存を延長するのに効果的な活性成分の量を意味する。

【0218】

治療有効量の決定は、特にここで提供された詳細な開示を考慮すると、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0219】

本発明の方法において使用される任意の調製物に関して、治療有効量または用量は、*in vitro*および細胞培養アッセイから最初に推定され得る。たとえば、用量は、望ましい濃度または力価を達成するための動物モデル（たとえば、ここで例証されたAPCモデル）において製剤化され得る。かかる情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。

30

【0220】

ここで記載された活性成分の毒性および治療有効性は、*in vitro*で、細胞培養または実験動物において標準的な製薬手順によって決定され得る。これらの*in vitro*および細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための用量の範囲を製剤化するのに使用され得る。用量は、用いられる剤形および利用される投与の経路に依存して変動してもよい。正確な製剤、投与の経路および用量は、患者の状態を考慮して、個々の医師によって選択され得る。（たとえば、“The Pharmacological Basis of Therapeutics”, Ch. 1 p. 1におけるFinglら、1975を参照されたい）。

40

【0221】

用量および間隔は、生物学的效果を誘導するまたは抑圧するのに十分である活性成分の組織レベル（最小有効濃度、MEC）を提供するために、個々に調整されてもよい。MECは、各調製物によって変動することになるが、*in vitro*データから推定され得る。MECを達成するために必要な用量は、個々の特徴および投与の経路に依存することになる。検出アッセイが血漿濃度を決定するために使用され得る。

【0222】

50

治療される状態の重症度および応答性に依存して、投薬は、数日から数週間続く処置の過程で、または治癒がもたらされるもしくは疾患状況の減少が達成されるまで、単回または複数回投与のものとすることができます。

【0223】

投与される組成物の量は、当然、治療される対象、苦痛の重症度、投与の様式、処方医師の判断などに依存することになる。

【0224】

本発明の組成物は、望ましい場合、活性成分を含有する1つ以上の単位剤形を含有してもよい、パックまたはディスペンサーデバイス、たとえば、FDA認可キットで提示されてもよい。キットは、阻害剤、たとえば、CKI-阻害剤、CKI-阻害剤およびCKI-阻害剤の組合せを含んでもよい。パックは、たとえば、金属またはプラスチックホイル、たとえば、プリスター・パックを含んでもよい。パックまたはディスペンサー・デバイスは、投与に関する説明書を伴ってもよい。パックまたはディスペンサーはまた、医薬品の製造、使用または販売を規制する行政機関によって指示された形態である容器に関連している通知によって適合されていてもよく、その通知は、組成物の形態またはヒトもしくは獣医学的投与の機関による認可を反映している。かかる通知は、たとえば、処方薬に関する米国食品医薬品局によって認可された標識または認可された製品挿入物のものであってもよい。適合性の医薬品担体で製剤化された本発明の調製物を含む組成物も、上でさらに詳しく述べたように、調製され、適切な容器に配置され、指示された状態の治療に関して標識されてもよい。

10

20

30

40

【0225】

「治療する」という用語は、病態（疾患、障害または状態）の発達を阻害する、妨げるまたは停止することおよび/または病態の減少、寛解、もしくは退行を引き起こすことを表す。当業者は、様々な手法およびアッセイが病態の発達を評価するために使用され得、同様に、様々な手法およびアッセイが病態の減少、寛解または退行を評価するために使用されてもよいことを理解することになる。

【0226】

ここで使用される場合、「妨げる」という用語は、疾患、障害または状態が、疾患のリスクがあり得るが、疾患を有するとまだ診断されていない対象において生じないようにすることを表す。

【0227】

ここで使用される場合、「対象」という用語は、病態を患有任意の年齢の哺乳動物、好ましくはヒトを含む。好ましくは、この用語は、病態を発症するリスクがある個体を包含する。

【0228】

特定の態様によれば、対象は、イマチニブ、ダサチニブまたはニロチニブで同時に治療されない。

【0229】

明瞭さのために、別々の態様の文脈で記載された本発明のいくつかの特徴は、単一の態様の組合せでも提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔さのために、単一の態様の文脈で記載された本発明の様々な特徴は、別々にまたは任意の適した部分的組合せでまたは本発明の任意の他の記載された態様に適したものとしても提供されてもよい。様々な態様の文脈で記載されたいくつかの特徴は、態様がそれらの要素がなければ作用しないというのでなければ、態様の不可欠な特徴とは考えられない。

【0230】

上で描写され、以下の特許請求の範囲の節で特許請求された本発明の様々な態様および側面は、以下の例において実験的支持を見出す。

【0231】

[実施例]

ここで、上記の記述と共に本発明の一部の態様を非限定的に例示する以下の例を参照す

50

る。

【0232】

一般に、ここで使用される学術用語および本発明において利用されるラボ手順は、分子的、生化学的、微生物学的および組換えDNA技法を含む。かかる技法は、文献において徹底的に説明されている。たとえば、“Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrookら, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubelら, “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ら, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birrenら(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; 同第4,683,202号; 同第4,801,531号; 第5,192,659号および同第5,272,057号; “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-III Coligan J. E., ed. (1994); Stitesら(eds), “Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shlissel(eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W.H. Freeman and Co., New York (1980)に示された手法を参照されたい; 利用可能なイムノアッセイは、特許および科学文献に広範に記載されており、たとえば、米国特許第3,791,932号; 同第3,839,153号; 同第3,850,752号; 同第3,850,578号; 同第3,853,987号; 同第3,867,517号; 同第3,879,262号; 同第3,901,654号; 同第3,935,074号; 同第3,984,533号; 同第3,996,345号; 同第4,034,074号; 同第4,098,876号; 同第4,879,219号; 同第5,011,771号および同第5,281,521号; “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)および“Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshakら, “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CS 10 20 30 40 50

H L Press (1 9 9 6) を参照されたい ; まるでここに完全に明記されているように、上記の全ては、参照により組み込まれている。他の一般的な参考文献は、本文書全体を通して提供されている。その中の手順は、当技術分野で既知であると信じられており、読者の便宜のために提供されている。その中に含有された全ての情報は、参照によりここに組み込まれている。

【 0 2 3 3 】

材料および方法

コンディショナル C K I K O マウス : l o x P が隣接する C S N K 1 A 1 マウス (E l y a d a ら、 2 0 1 1) を有する C 5 7 b 1 / 6 マウスを m x 1 - C r e マウス (K u h n ら、 1 9 9 5) と交雑させた。7 世代を C 5 7 b 1 / 6 マウスと戻し交配して、純粹な遺伝的背景を産出した。M x 1 - C r e 誘導を一日おきの 2 m g / m L ポリイノシン - ポリシチジン酸ナトリウム塩 (p I p C) (S i g m a P 1 5 3 0) の 1 0 u L / g マウスの 3 回の I . P . 注入によって行った。生着を新鮮単離 $5 \times 1 0^6$ 骨髄細胞の I . V . 注入によって行った。

10

【 0 2 3 4 】

B C R - A B L - 誘導性 C M L モデル : B C R - A B L - 誘導性 C M L モデルを産出するため、M x C r e - C k 1 1 f / f または M x C r e + C k 1 1 f / f からの B M 細胞を抽出し、c K i t 発現細胞 (E a s y S e p # 1 8 7 5 7) に関して濃縮し、1 5 % F C S L - グルタミン、P e n / S t r e p (B e i t H a e m e k) および幹細胞因子 (S C F) 、I L - 3 、I L - 6 および T P O (P e p r o t e c h) で補充された R P M I 中で終夜インキュベートした。次いで、培養物を、上清培地を含有する p 2 1 0 B C R - A B L - I R E S - G F P レトロウイルス構築物に 4 時間感染させ、追加の 2 4 h 間培地に戻した。次いで、培養物を、亜致死的に照射された (5 0 0 r a d) マウス中に I . V . で注入した。マウス末梢血における G F P 発現細胞の検出可能な着実な増加 (F A C S による) ならびに白血球数および未熟細胞の上昇 (ライトギムザ染色血液塗抹標本によって検出された) と同時に、マウスを屠殺し、それらの骨髄を亜致死的に照射された W T 宿主に移入した。

20

【 0 2 3 5 】

各かかる移入を疾患世代と名付けた。4 番目の移入までに、宿主を疾患移入前にもはや亜致死的に照射せず、世代間の時間は、より短かった (通常 1 0 日) 。急性転化発達は、芽細胞の高度に異常な数 (P B 中の W B C の 3 0 % を超える) および移入間の短くなっていく時間によって容易に検出可能であった。実験手順を図 3 に例示する。実験を芽細胞が容易に検出可能であり、宿主の照射が必要ではなく、世代時間が短い (最大 1 4 日) 後の世代疾患において行った。マウスを悪液質、嗜眠、およびラフコート (ruff coat) 、麻痺に関して毎日モニターし、瀕死のマウスを屠殺した。

30

【 0 2 3 6 】

C M L に及ぼす C k 1 1 K O 効果を評価するために、p I p C を骨髄移植 (B M T) 後 2 4 h から始めて一日おきに I . P . (2 0 μ g / g マウス) で投与した。

【 0 2 3 7 】

M x C r e + C k 1 1 f / f C D 4 5 . 2 疾患宿主を使用した場合、最初の p I p C 投与から第 7 日での W T 類遺伝子性 C D 4 5 . 1 ドナーからの I . V . $5 \times 1 0^6$ B M 細胞の追加で同じ手順を行った。キメラ現象を生着後 1 カ月でマウス P B 中の C D 4 5 . 1 発現白血球の分析を通して評価した。L T - H S C 生着を P B 中の骨髄とリンパの両方の成熟 C D 4 5 . 1 発現白血球の出現によって評価した。

40

【 0 2 3 8 】

P F 6 7 0 4 6 2 を 2 0 % 2 - ヒドロキシプロピル - サイクロデキストリン (ヒヒクル) に溶解し、疾患移入後 7 時間に始めて 6 0 m g / K g の毎日の I . P . によって投与した。対照マウスをヒヒクルのみで処置した。

【 0 2 3 9 】

i n v i t r o 阻害剤試験 : C M L 保有マウスからの新鮮単離骨髄を 1 : 1 比で正常

50

マウス骨髓と混合し、15% FCS L-グルタミン、Pen/Strep、ヘペス、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸で補充された RPMI (Beit Haemek) 中で増殖した。PFS 670462 阻害剤を DMSO に溶解し、指示された濃度および 0.1% DMSO で組織培地に加えた。対照に関しては、細胞をビヒクルのみで処置した。36 ~ 48 h 後、細胞を収集し、カメラおよび標準的な倒立光学顕微鏡を使用して手動で計数した。死細胞を、トリパンブルー (Sigma) を使用して除外した。正常および BC R - ABL 発現細胞の数を GFP⁺ / 7AAD⁻ 発現細胞 % の FACS 分析に従って後で推定した。アネキシン V - PE (MBL)、7AAD (Tonbo) 染色を製造者の推奨に従って FACS によって評価した。

【0240】

10

定量的 RT - PCR：細胞からの全 RNA を DirectZol RNA ミニプレップ (Zymed) を使用して抽出した。cDNA をポリ (dT) オリゴヌクレオチド (IDT) および MMLV - Reverse Transcriptase (Invitrogen) を使用して産出し、製造者の説明書に従って Platinum (登録商標) SYBR (登録商標) Green (Invitrogen) を使用して 7900 HT Real Time PCR System (Applied Biosystems) 上で増幅した。少なくとも 3 連の反応を各遺伝子に関して行った。融解曲線分析を非特異的 PCR 産物およびプライマーニ量体を制御するために各ランの後に行った。内部標準として PP1A、UBC および Hprt を使用して正規化を行った。

【0241】

20

ウェスタンプロット分析：全細胞ライセートをビヒクルまたは PFS 670462 のいずれかで処置した CML 保有マウスの骨髓からプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤の存在下で抽出した。

【0242】

SDS - PAGE によって分離され、ニトロセルロース膜上に移動されたタンパク質抽出物を - カテニン、c-Myc、p53 および HSP90 に対する抗体でプローブした。目的のタンパク質を HRP コンジュゲートロバ / ウサギ抗マウス IgG 抗体 (1:5000、GE Healthcare、Uppsala、Sweden) で検出し、提供されたプロトコールに従って、 Pierce ECL ウエスタンプロット法基質 (Thermo Scientific、Rockford、IL) で可視化した。

30

【0243】

FACS 分析：全てのアッセイを BD の：FACS caliber、FACS ARIA ソーターまたは LSR II 装置において行った。染色のために、細胞を 5 uM EDTA を有する 1% BSA / PBS 緩衝液に懸濁した。次いで、細胞を氷上で適切な抗体で 30 分間インキュベートし、洗浄し、製造者の推奨に従って適切な二次抗体でインキュベートした。CD16 および CD32 (Miltenyi Biotec) に特異的なモノクローナル抗体を染色の前に Fc 受容体の遮断のために使用した。細胞表面標識に使用される抗体をここで以下に表 1 に列挙する。

【0244】

【表1】

表1

名称	企業	カタログ	
系統カクテルービオチン (CD5、CD45R (B220)、CD11b、Gr-1 (Ly-6G/C)、7-4、およびTer-119)	Miltenyibiotec	130-092-613	10
c-Kit APC-eFluor780	eBioscience	47-1171	
Sca-1 PE-Cy7	eBioscience	25-5981	
ストレプトアビシン-percp/cy5.5	eBioscience	45-4317-82	

【0245】

例1

CKI 欠失は、骨髄再構成を可能にする正常HSC枯渇につながる

CKI^{1fl/fl}MX-Creトランスジェニックマウスを骨髄中のCKI 欠失の効果を分析するために産出した。MX-CreをBMだけでなく、肝臓および脾臓においても誘導する。観察される表現型がBM中のCKI 欠失に特異的であり、他の組織においては特異的でないことを保証するために、GFPマウスを有するCKI^{1fl/fl}MX-Creトランスジェニックの骨髄を致死的IR WTマウス中に注入した。それを行うことによって、レシピエントマウスへのpIpc注入時に、CKI 欠失がBMにおいてのみ達成され、他の組織では達成されないことを保証した。長期(LT)生着を、移植後2ヶ月で末梢血における安定したドナーGFP陽性細胞を決定することによって検証した。成功的な生着の検証時にのみ、pIpcを注入した。

【0246】

CKI KO誘導(pIpcでの)時に、マウスは、20日の生存中央値をもたらす減少したHSC数により致死的汎血球減少症を発症する(図1C)。しかしながら、pIpc処置の場合、BM CKI 欠失マウスにpIpc処置から第7日にWT骨髄を移植し、それらを救出し、高レベルのキメラ現象を示した(図1D~F)。これを3ヶ月を超えて維持し、骨髄とリンパ系列の両方を含み(示さず)、これは、長期骨髄再構成を示した。対照マウスは、pIpc誘導注射によって影響されず、生着において1%を超えるキメラ現象を示さなかった(データは示さず)。

【0247】

例2

CKI 欠失骨髄は、Bcr-Ab1 駆動白血病起源を妨げる

MX-Creを有するまたは有さないCKI のフロックス対立遺伝子を保有するマウスからの骨髄をBcr-Ab1保有レトロウイルスに感染させ、亜致死的に照射されたWTレシピエントマウス中に注入した(図2)。次に、病気のマウスからのBMを採取し、WTマウス中に生着した。この手順を、慢性白血病疾患が、BMおよび末梢血における複数の芽細胞および2~3週以内の死を有する侵襲性急性急性転化疾患に変わるまで複数回繰り返した。

【0248】

第1世代では、マウスは、約5週間後に死んだ一方、次の世代では、マウスは、より侵襲性の疾患を患っているので、それらは、移植後2週間のみ生存した。さらに、少回の移植の繰り返し後に白血病レシピエントマウスを照射するさらなる必要性はなく、これは、白血病の侵襲性の性質を証明していた。

10

20

30

40

50

【0249】

CML 発達に及ぼす CKI 消失の効果を試験するために、pIpc をレシピエントマウスに白血病 BM 生着後 24 h で注入した。この実験では、2 つの異なる対照群を使用した：第 1 の対照群では、マウスに Mx-Cre を保有する白血病細胞を注入し、マウスに PBS を注入し、第 2 の対照群では、マウスに Mx-Cre を欠く白血病細胞を注入したが、pIpc 注入を行った（図 3 A～D）。疾患進行をレシピエントマウスの末梢血中の GFP+ を計数することによって追跡した（図 3 B）。

【0250】

対照マウスでは、GFP+ 細胞は、指數関数的に増加し、これは、侵襲性疾患を示していた一方、CKI KO 群では、白血病細胞は、ほとんど検出不可能であった（図 3 B）。対照と CKI - 欠失群間の差異は、血液塗抹標本においても明らかであった。対照群では、複数の芽細胞が、CML 急性転化におけるように明らかであった一方、CKI KO 群では、末梢血塗抹標本は、芽細胞なく正常に見えた（図 3 C）。マウスを生存に關しても追跡した。両方の対照群マウスが骨髄移入後約 3 週間で死んだ一方、CKI KO 群の大多数は、生存した（図 3 D）。

【0251】

BMT の候補である CML 患者は、BMT 前に白血病幹細胞（LSC）を除去するために高用量の化学療法または IR で処置される。これらのプロセスでは、正常造血幹細胞（HSC）もまた除去される。

【0252】

CKI 欠失が化学療法または照射誘発骨髄破壊および白血病細胞排除の代わりになり得るかどうかを評価するために、白血病細胞を Mx-Cre マウスでフロックスされた CKI 中に注入した。

【0253】

このモデルでは、pIpc 注入は、レシピエントマウスの白血病と正常の両方の HSC において CKI KO を誘導した。KO 誘導後 7 日で、WT マウスからの BM を照射なしで白血病マウスに移植した（図 4 A）。ドナーとレシピエントマウス間を区別するために、CD45 の 2 つの異なる亜型を有するマウスを使用した。

【0254】

図 4 B に例示されるように、CKI KO が誘導されなかった対照群では、ドナー由来細胞は、末梢血（PB）において明らかではない一方、KO 群では、12 日後に 25 % を超える細胞がドナー由来である。

【0255】

疾患進行の分析は、生存率データによって反映されるように（図 4 C）、対照マウスにおける白血病細胞の非常に高い百分率があった一方、CKI KO では、白血病細胞は、検出不可能であったことを示した（図 4 B）。

【0256】

例 3

白血病細胞に及ぼす CKI 阻害剤 PF670462 の効果

次に、本発明者らは、CKI 阻害剤である PF670462 の効果を *in vitro* で正常 BM および白血病細胞において評価した。PF670462 は、CKI - / 特異的阻害剤であると考えられており（Long A, Zhao H, Huang X. J. Med. Chem. 2012 Jan 26; 55(2): 956-60. doi: 10.1021/jm201387s）、したがって、Wnt または p53 経路を活性化すると想定されていない（Price MA, Genes Dev. Feb 15; 20(4): 399-410）。細胞に阻害剤を *in vitro* で処置した場合、用量依存的な Wnt および p53 の上方制御が骨髄細胞分析において観察され（図 5 B）、これは、CKI 阻害活性を示していた（Elyada, Nature. 2011 Feb 17; 470(7334): 409-13. doi: 10.1038/nature09673）。注目すべきことに、阻害剤での処置後に細胞型間の有意差が観察され、正常 BM 細

10

20

30

40

50

胞数は、阻害剤の増加する濃度での処置においてわずかに減少したのみであった一方、白血病細胞数の減少は、はるかに顕著であった（図5C）。

【0257】

阻害剤が白血病細胞におけるアポトーシスを誘導したと推測され得る。これは、用量依存的な阻害剤処置下でのアポトーシス細胞割合の増加を実証した一方、WT BM細胞は、著しく影響されなかった7AAD-/アネキシン+アッセイによって確認された（図5D）。

【0258】

in vivo研究を図6Aのスキームに記載されたように行った。疾患移入後7時間で、マウスをP F 6 7 0 4 6 2 (i.p.)で毎日処置した。阻害剤処置マウスから収集された骨髄細胞のウエスタンプロット分析は、-カテニンおよびp53の安定化およびWnt標的遺伝子c-Mycの誘導を示し、P F 6 7 0 4 6 2のCKI阻害活性をここでも証明していた（図6B）。

10

【0259】

阻害剤処置マウスにおける疾患進行を、白血病を引き起こす細胞（LIC）（すなわち、がん幹細胞）レシピエントマウスの末梢血におけるGFP+を計数することによって追跡した。ビヒクルを処置したマウスの群では、GFP+細胞は、指數関数的に上昇し、これは、侵襲性疾患を示していた一方、CKI阻害剤を処置したマウスの群では、白血病細胞は、ほとんど検出不可能であった（図6C）。ビヒクル処置マウスでは、骨髄は、脊椎動物を破壊する白血病細胞によって浸潤された一方、阻害剤処置マウスは、インタクトな脊椎動物を有する正常骨髄出現を有した（図6D）。ビヒクル処置マウスとは異なり、芽細胞は、阻害剤処置マウスの末梢血において検出されなかった（図6E）。

20

【0260】

マウスの生存を追跡した場合、ビヒクル処置群が12日以内に死んだ一方、CKI阻害剤処置群は、生存したままであったことが理解され得る（図6F）。健康に見える阻害剤処置マウスを20日後に屠殺し、それらの組織を白血病の任意の兆候に関して調べ（たとえば、図6D）、それらの骨髄を致死的に照射されたマウスに移植して、任意の残留するLICが照射された宿主において生存し、増殖したかどうかおよび正常、長期再構築性造血幹細胞（LT0HSC）が阻害剤によって影響されたかどうかを決定した。今までのところ、移植後1カ月で、レシピエントマウス骨髄は、末梢血における白血病GFP+細胞の証拠なく完全に再構成されており、これは、LICの完全な除去を有するインタクトなLT-HSCを示している。

30

【0261】

例4

メラノーママウスにおけるCKI欠失の効果

B R A Fの変異性活性化は、ヒトメラノーマにおける最も早期かつ最も一般的な遺伝子変異である。Pten腫瘍抑制因子遺伝子サイレンシングと組み合わせられたB R A f v 6 0 0 Eの発現は、100%浸透率、短潜時ならびにリンパ節、腹膜腔および肺において観察される転移を有するメラノーマの発達を誘発する。これらのマウスは、長く生存するメラノーマ引き起こす細胞（MIC）の存在を有する転移のメラノーマの中核的な特徴を研究するための系を提供する。B R A Fモデルとここで称される、発癌性B R A FおよびP T E N欠失（B6.Cg-Braf^{tm1Mmc} Pten^{tm1Hwu} Tg（Tyr-c re /ERT2）13Bos/BosJ）に基づく、チロシナーゼ-C reのタモキシフェン-誘導性活性化（メラノサイトに特異的）に基づくマウスマラノーマモデルを、B R A F-CKI-KOマウスマodelとここで称されるCKI-フロックスマウス中に繁殖させた。B R A FとB R A F-CKI-KOモデルの両方をタモキシフェンの局所的耳適用によって処置した。タモキシフェン処置後56日で、B R A Fモデルマウスは、局所的かつ全身的に広がる転移性メラノーマを発症した（図7A）が、B R A F-CKI-KOモデルは、メラノーマの兆候を示さず、耳上の色素斑のみであった（図7B）。したがって、CKI消失は、この実験系においてMICを除去する。

40

50

【0262】

B R A F メラノーママウスをメラノーマのタモキシフェン誘導後 24 時間または 3 週間で開始する毎日の 60 mg / K g P F - 670462 皮下注入によって、またはビヒクル (20% 2 - ヒドロキシプロピル - サイクロデキストリン ; S i g m a) によって処置する。阻害剤の効果を観察するために、マウスをタモキシフェン誘導後 56 日で屠殺する。

【0263】

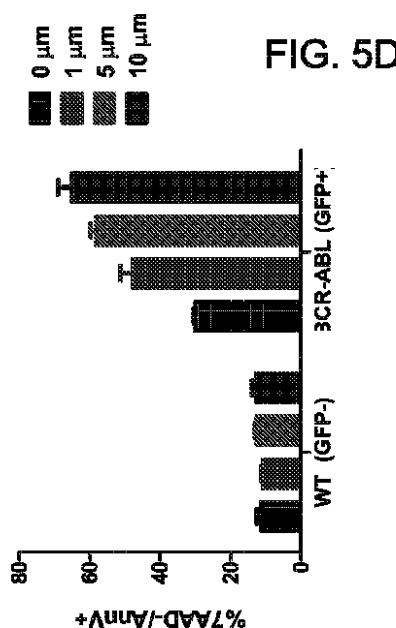
本発明は、その特定の態様と共に記載されたけれども、多くの代替物、変更形態および変形形態が当業者に明白となることが明らかである。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および広い範囲内にある、全てのかかる代替物、変更形態および変形形態を包含することが意図されている。

10

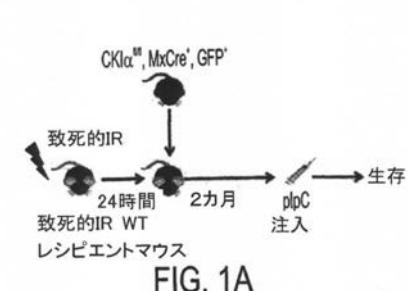
【0264】

本明細書で言及された、全ての刊行物、特許および特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が参照によりここに組み込まれていると具体的にかつ個々に示されているのと同じ程度まで、明細書中への参照によりその全体がここに組み込まれている。加えて、本出願におけるあらゆる参照の引用または同定は、かかる参照が本発明への従来技術として利用可能であるという承認と解釈されなければならない。節の見出しが使用される程度まで、それらは、必然的に限定的と解釈されるべきではない。

【図 5D】



【図 1A】



【図 1B】

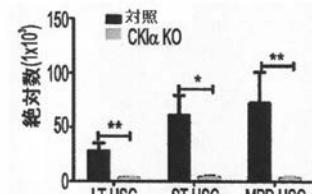


FIG. 1B

【図 1 C】

図1C

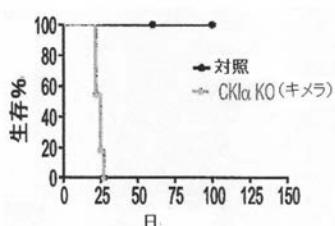


FIG. 1C

【図 1 E】

図1E

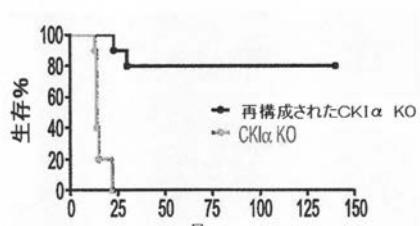


FIG. 1E

【図 1 D】

図1D

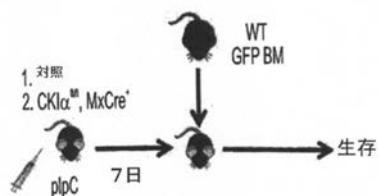


FIG. 1D

【図 1 F】

図1F

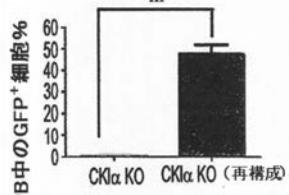
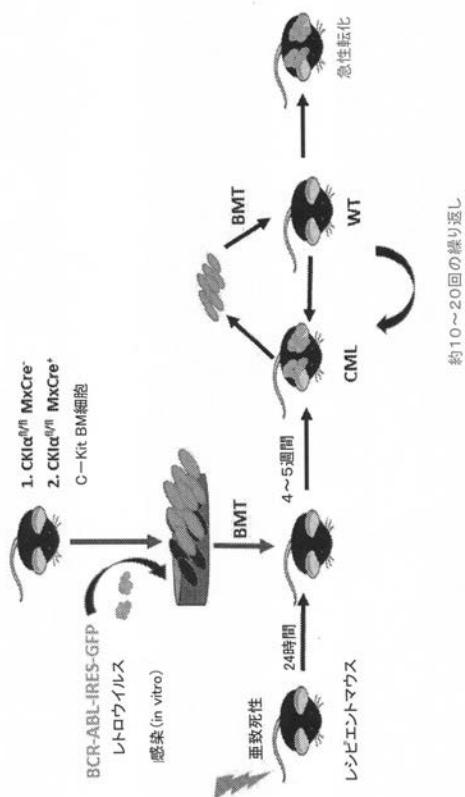


FIG. 1F

【図 2】

図2

FIG. 2



【図 3 A】

図3A

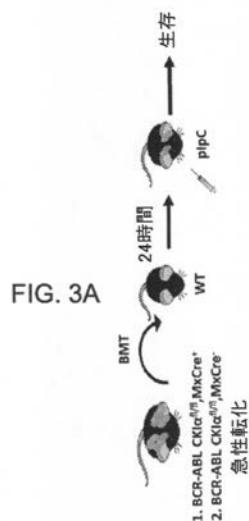
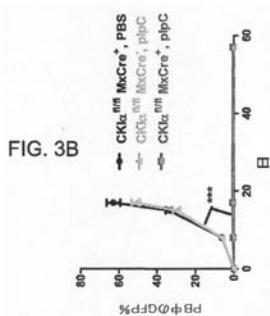


FIG. 3A

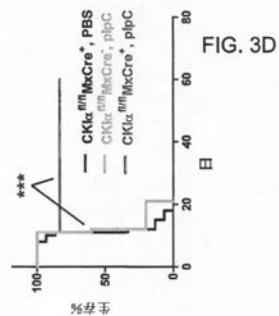
【図 3 B】

図3B



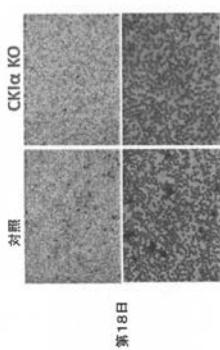
【図 3 D】

図3D



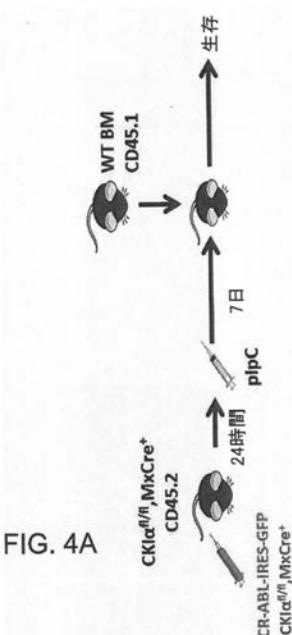
【図 3 C】

図3C



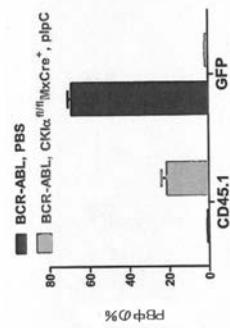
【図 4 A】

図4A



【図 4 B】

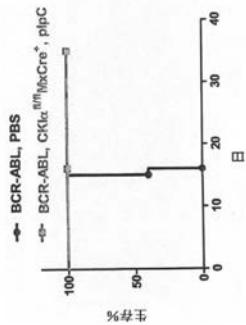
図4B



【図 4 C】

図4C

FIG. 4C



【図 5 A】

図5A

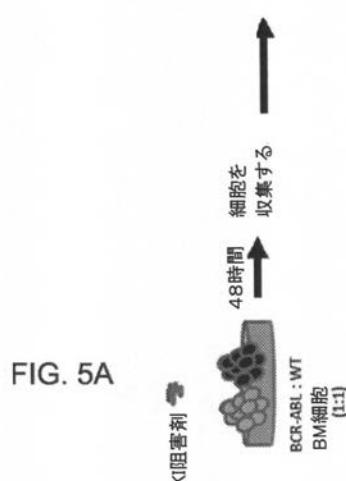


FIG. 5A

【図 5 B】

図5B

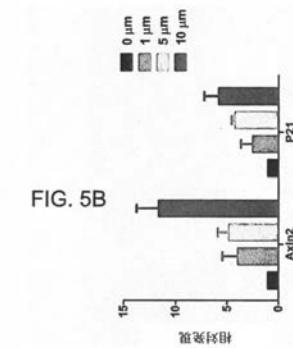
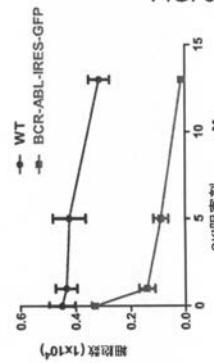


FIG. 5B

FIG. 5C

【図 5 C】

図5C



【図 6 A】

図6A

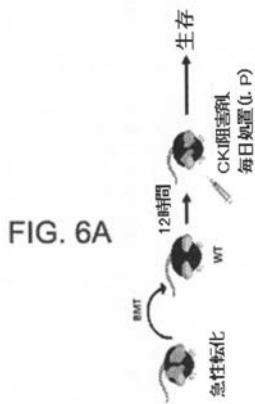


FIG. 6A

【図 6 B】

図6B

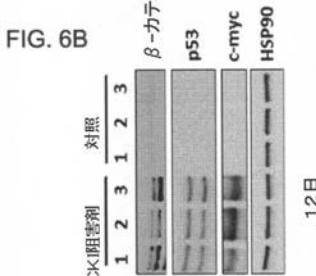


FIG. 6B

【図 6 C】

図6C

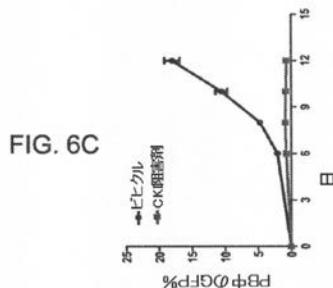


FIG. 6C

【図 6 D】

図6D



FIG. 6D

【図 6 E】

図6E

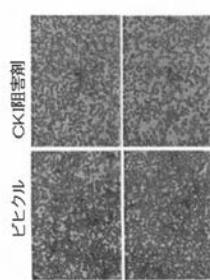


FIG. 6E

12日

【図 6 F】

図6F

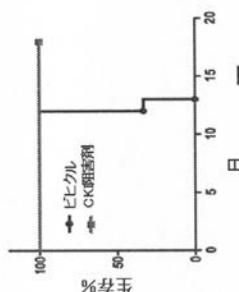


FIG. 6F

【図 7 A】

図7A



FIG. 7A

タモキシフェン前 +タモキシフェン 侵襲性メラノーマ

【図 7 B】

図7B

タモキシフェン前 +タモキシフェン



FIG. 7B

【配列表】

2017506259000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/IL2015/050118
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/00 A61K31/506 A61K35/12 C12Q1/00 A61P35/00 A61P35/02		
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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2014/023271 A1 (UNIV MASARYKOVA [CZ]) 13 February 2014 (2014-02-13) cited in the application page 1, line 22 - line 30 page 3, line 6 - page 4, line 10 page 5 - page 7 -----	1,2,5,6, 9
X	US 2010/179154 A1 (ALMARIO GARCIA ANTONIO [FR] ET AL GARCIA ANTONIO ALMARIO [FR] ET AL) 15 July 2010 (2010-07-15) cited in the application paragraph [0650] - paragraph [0651] ----- -/-	5,6,13, 14, 16-18, 29,30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 28 July 2015		Date of mailing of the international search report 03/08/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bonzano, Camilla

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2015/050118

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/144719 A2 (YISSUM RES DEV CO [IL]; BEN-NERIAH YINON [IL]; ELYADA ELA [IL]; PRIBLU) 3 December 2009 (2009-12-03) page 43; example 3 page 48; example 8 claim 1 page 5, line 8 - line 13 page 13, paragraph 1 -----	1-3,5,6, 9,29-36
X	WO 01/57189 A2 (QUARK BIOTECH INC [US]; DEISS LOUIS PAUL [US]; YEHIELY FRUMA [US]; EIN) 9 August 2001 (2001-08-09) claims 1-7 page 23, paragraph 2 claims 14,15 -----	1-4, 29-36
A,P	Y. E Greer ET AL: "Casein kinase 1 functions at the centrosome and Golgi to promote ciliogenesis", Molecular Biology of the Cell, 15 May 2014 (2014-05-15), pages 1629-1640, XP055184670, DOI: 10.1091/mbc.E13-10-0598 Retrieved from the Internet: URL: http://www.molbiolcell.org/content/25/10/1629.full.pdf abstract -----	1
X	US 2005/171005 A1 (BEN-NERIAH YINON [IL] ET AL) 4 August 2005 (2005-08-04) cited in the application examples 3,7 page 7, paragraph 121 -----	1,2,4,9, 29-36
A,P	KENSUKE OHISHI ET AL: "Ricinine: A pyridone alkaloid from Ricinus communis that activates the Wnt signaling pathway through casein kinase 1[alpha]", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 22, no. 17, 1 September 2014 (2014-09-01), pages 4597-4601, XP055184757, GB ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/j.bmc.2014.07.027 page 4597, column 1, paragraph 5 - column 2, paragraph 2 figures 4,5 -----	1
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IL2015/050118

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J K CHEONG ET AL: "IC261 induces cell cycle arrest and apoptosis of human cancer cells via CK1[delta]/ɛ and Wnt/[beta]-catenin independent inhibition of mitotic spindle formation", ONCOGENE, vol. 30, no. 22, 24 January 2011 (2011-01-24), pages 2558-2569, XP055080692, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2010.627 page 2566, column 1, paragraph 2 - paragraph 4 -----	1-4,9, 16-19
A	WADA M ET AL: "Molecular analysis of the adenomatous polyposis coli gene in sarcomas, hematological malignancies and noncolonic, neoplastic tissues", JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 1997 SPRINGER VERLAG DEU, vol. 75, no. 2, 1997, pages 139-144, XP008176272, ISSN: 0946-2716 abstract -----	1
A	MAURICIO BUDINI ET AL: "Autophosphorylation of carboxy-terminal residues inhibits the activity of protein kinase CK1[alpha]", JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 106, no. 3, 29 December 2008 (2008-12-29), pages 399-408, XP055184698, US ISSN: 0730-2312, DOI: 10.1002/jcb.22019 -----	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2015/050118

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-6, 9, 11, 13, 29-36(completely); 12, 14-21(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ IL2015/050118

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-6, 9, 11, 13, 29-36(completely); 12, 14-21(partially)

Use of casein kinase I inhibitor, more particularly a casein kinase I alpha inhibitor, more particularly PF670462, in the treatment of cancer not associated with an APC mutation, the treatment of cancer wherein the cancer is not chronic lymphocytic leukemia, the treatment of chronic myelogenous leukemia;

2. claims: 7, 8, 10, 22-28(completely); 12, 14-21(partially)

Method of transplanting cells into a subject in need thereof, depleting immature blood cells in the subject by contacting immature blood cells from blood or bone marrow, or stem cells ex vivo, with a CKI inhibitor and optionally subsequently transplanting cells into the subject.

3. claims: 37-41

Method of identification of an agent useful for depleting stem cells by determining the activity of CKI in presence of a candidate agent and selecting the agent which down-regulates the activity of CKI and upregulates p53.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IL2015/050118

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2014023271	A1	13-02-2014	CA EP WO	2876908 A1 2882437 A1 2014023271 A1		13-02-2014 17-06-2015 13-02-2014
US 2010179154	A1	15-07-2010	AR AU BR CA CN CO EA EP FR JP JP KR MA NZ PA PE TW US US UY WO	069269 A1 2008281662 A1 PI0814807 A2 2691866 A1 101765602 A 6251269 A2 201070072 A1 2170889 A2 2918061 A1 5537424 B2 2010531342 A 20100050492 A 31572 B1 582677 A 8786101 A1 05562009 A1 200911812 A 2010179154 A1 2013012516 A1 31193 A1 2009016286 A2		13-01-2010 05-02-2009 03-02-2015 05-02-2009 30-06-2010 21-02-2011 30-08-2010 07-04-2010 02-01-2009 02-07-2014 24-09-2010 13-05-2010 02-08-2010 22-12-2011 23-01-2009 01-06-2009 16-03-2009 15-07-2010 10-01-2013 30-01-2009 05-02-2009
WO 2009144719	A2	03-12-2009	US WO	2011076282 A1 2009144719 A2		31-03-2011 03-12-2009
WO 0157189	A2	09-08-2001	AU GB WO	3673301 A 2375172 A 0157189 A2		14-08-2001 06-11-2002 09-08-2001
US 2005171005	A1	04-08-2005	NONE			

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 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N 9/99	Z N A
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078	
C 1 2 N 5/095 (2010.01)	C 1 2 N 5/095	
C 1 2 N 5/0789 (2010.01)	C 1 2 N 5/0789	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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

(71)出願人 513045677

イッスム・リサーチ・ディベロップメント・カンパニー・オブ・ザ・ヘブルー・ユニバーシティ・
オブ・エルサレム・リミテッド
Y I S S U M R E S E A R C H D E V E L O P M E N T C O M P A N Y O F T H E H
E B R E W U N I V E R S I T Y O F J E R U S A L E M L T D .
イスラエル国、9139002 エルサレム、ピー.オー.ボックス 39135、ギバット・ラム、ザ・ヘブルー・ユニバーシティ・オブ・エルサレム、ハイ・テク・パーク(番地なし)、ザ・エドモンド・ジェイ・サフラ・キャンパス

(74)代理人 100108855

弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100153051

弁理士 河野 直樹

(74)代理人 100179062

弁理士 井上 正

(74)代理人 100189913

弁理士 鶴飼 健

(74)代理人 100199565

弁理士 飯野 茂

(72)発明者 ベン・ネリアー、イーノン

イスラエル国、9071923 メバッセラト・ジオン、メボ・ドゥブデバン・ストリート 5

(72)発明者 ミンゼル、ワリード

イスラエル国、1693000 クファル・カナ、クファル・カナ(番地なし)

(72)発明者 ブラチャ、グイ

イスラエル国、9254241 イエルサレム、ハバルマッチ・ストリート 32 / 6

F ターム(参考) 4B050 DD11 GG02 LL03

4B063 QA05 QA18 QA20 QQ02 QQ08 QQ27 QQ52 QQ79 QQ95 QR07

QR32 QR35 QR48 QR56 QR62 QR67 QR72 QR77 QS25 QS33
QS34 QS36 QX02
4B065 AA91X AC12 AC20 BB13 BB18 CA44 CA60
4C084 AA13 AA17 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
ZC202
4C086 AA01 AA02 BC42 BC50 EA16 GA07 GA08 GA12 MA01 MA02
MA04 NA05 NA14 ZB26 ZB27
4C087 AA01 AA02 BB34 CA04 DA14 NA14 ZB26 ZB27