

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6224455号
(P6224455)

(45) 発行日 平成29年11月1日(2017.11.1)

(24) 登録日 平成29年10月13日(2017.10.13)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 P 9/14 (2006.01)

A 6 1 P 9/14

請求項の数 8 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2013-501865 (P2013-501865)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月1日 (2011.4.1)
 (65) 公表番号 特表2013-523696 (P2013-523696A)
 (43) 公表日 平成25年6月17日 (2013.6.17)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2011/055122
 (87) 國際公開番号 WO2011/121120
 (87) 國際公開日 平成23年10月6日 (2011.10.6)
 審査請求日 平成26年3月10日 (2014.3.10)
 審判番号 不服2016-4424 (P2016-4424/J1)
 審判請求日 平成28年3月24日 (2016.3.24)
 (31) 優先権主張番号 10003675.5
 (32) 優先日 平成22年4月1日 (2010.4.1)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 507038825
 ヨハン ウォルfgang ゲーテーウニペ
 ルジテート フランクフルト アム マイ
 ン
 ドイツ, 60323 フランクフルト
 アム マイン, テオドール-ヴェー.
 -アドルノ-プラツツ 1
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (72) 発明者 ザイハ-, アンドレアス
 ドイツ, 60594 フランクフルト, ド
 イチュヘルンウーファー 47
 (72) 発明者 ディメラー, ステファニー
 ドイツ, 60594 フランクフルト, ド
 イチュヘルンウーファー 47
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 m i R N A - 2 9 発現のアンタゴニスト、並びに大動脈瘤の予防及び治療におけるその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物における大動脈瘤形成の予防及び / 又は治療のための薬剤であって、m i R N A - 2 9 b に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、薬剤。

【請求項 2】

大動脈瘤が腹部大動脈瘤 (A A A) 及び / 又は年齢依存性の大動脈瘤である、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 3】

大動脈瘤形成が、動脈血管の脆弱化及び / 又は大動脈破裂を更に伴う、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 4】

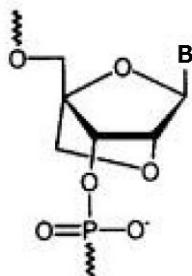
大動脈瘤が、C O L 1 A 1 、 C O L 1 A 2 、 C O L 1 A 3 、 E L N 及び / 又は F B N 1 の遺伝子、または動脈組織における、コラーゲン、フィブリリン又はエラスチンの遺伝子を含む細胞外マトリクスタンパク質の遺伝子の下方調節を更に伴う、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項 5】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが、アンチセンス D N A オリゴヌクレオチド及び / 又はアンチセンス R N A オリゴヌクレオチド、アンチセンス 2 ' - O - メチルオリゴリボヌクレオチド、ホスホロチオエート結合を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、L N A (商標) 塩基を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、モルホリノアンチセンスオ

リゴヌクレオチド、アンタゴm i r、並びにそれらの混合物から選択されるものであって、L N A(商標)塩基は以下の化学構造式で表される(式中、Bは塩基を意味する)、請求項1~4のいずれか一項に記載の薬剤。

【化1】



10

【請求項6】

薬剤が薬物溶出ステントにより又はバルーンにより動脈組織に投与されるものである、請求項1~5のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項7】

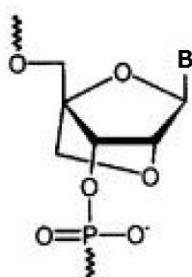
m i R N A - 2 9 bに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、哺乳動物における大動脈瘤形成の予防及び/又は治療のための医薬組成物。

【請求項8】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが、アンチセンスDNAオリゴヌクレオチド及び/又はアンチセンスRNAオリゴヌクレオチド、アンチセンス2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド、ホスホロチオエート結合を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、L N A(商標)塩基を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、モルホリノアンチセンスオリゴ、アンタゴm i r、並びにそれらの混合物から選択されるものであって、L N A(商標)塩基は以下の化学構造式で表される(式中、Bは塩基を意味する)、請求項7に記載の医薬組成物。

20

【化2】



30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、大動脈瘤の予防及び/又は治療において使用される、マイクロRNA(m i RNA-29)の発現及び/又は機能のアンタゴニストに関する。m i RNA-29アンタゴニストを特定する方法と、上記m i RNA-29アンタゴニストを含む医薬組成物と、かかる治療を必要とする被験体における年齢に関連する大動脈瘤形成を予防及び治療する方法とが更に開示される。

【背景技術】

【0002】

50

今日における人間の長寿化には、加齢に伴う心臓血管疾患の有病率の増大という代償が伴う(非特許文献1)。死亡率の高い特定の病態の1つが、大動脈瘤形成、及びそれに続く大動脈血管の破裂である。大動脈瘤(AA)は、高齢の男性のおよそ9%が罹患し、か

なりの数の死をもたらす典型的な年齢に伴う疾患である（非特許文献2）。

【0003】

A Aの発生率は依然として増大しており、このことは例えば血圧を標的とすることによる現在の一次予防的な健康管理戦略はA Aを低減する効果が十分ではないことを示している。手術が現在のところ、現行の技術水準の治療であるが、この外科的介入は、かなりの罹患率及び死亡率を伴い、例えば術前死亡率及び術後死亡率が大きいために、患者の10%～25%しか破裂から生存しない。機構的レベルでの人間の病理切片の解析により、A Aの形成及び破裂は血管壁の薄層化を特徴とすることが明らかになった。細胞外マトリクスの形成の低減又は破壊が、血管壁の薄層化に至る重要な病態生理学的プロセスであると考えられる（非特許文献3）。

10

【0004】

マイクロRNA（miRNA）は、一部の（病態）生理学的プロセスの重要な調節因子として近年明らかになっている。miRNAは、標的となるmRNAの分解を誘導することにより、又はタンパク質の翻訳を阻止することにより転写後にタンパク質発現を調節する短い非コードRNAである。miRNAはシステム・ループ構造へと折り畳まれる転写産物前駆体として発現される。続いてmiRNA前駆体はDroshaヌクレアーゼ及びDicerヌクレアーゼにより消化され、成熟miRNA二本鎖を生じ、それからこれがmiRNA関連のRNA誘導型サイレンシング複合体（RISC）に導入される。しかしながら、成熟miRNAの一方の鎖だけが複合体中に保持され、標的となるmRNAとの結合をもたらす。サイレンシングした（silenced）遺伝子転写産物内の標的配列領域は多くの場合、各mRNAの非翻訳領域に見られ、miRNAは好ましくはそれらの標的mRNAの3'非翻訳領域で結合し、翻訳阻害又はmRNA分解を促進する。

20

【0005】

様々な研究により、特定のmiRNAが血管成長及び心臓機能を制御することが示されたが（非特許文献4）、A A形成及びアテローム性動脈硬化粥腫の破裂におけるmiRNAの関与、並びに血管miRNAの発現に対する年齢の影響は未だに知られていない。

【0006】

miRNA-29周辺のマイクロRNAファミリーが、心組織における線維化の重要な調節因子として知られている。特許文献1は、miRNA-29ファミリーの成員であるmiRNA-29a、miRNA-29b及びmiRNA-29cがストレスに応じて心臓組織で下方調節され、ストレス及び線維化の両方に耐性があるマウスの心臓組織で上方調節されることを示している。しかしながら、大動脈瘤形成は特許文献1には開示されていない。

30

【0007】

同様に、特許文献2は、心臓の疾患におけるmiRNA発現の治療的影響を開示している。心筋細胞におけるmiRNA発現の変化が心不全における様々な遺伝子の転写に対して広範な効果を誘発することが見出された。例えば、miR-1はカルモジュリン発現レベルを調節する。予測されるmiR-1標的には、心不全発病に寄与し得る幾つかのものが含まれ、それらの中でも、心臓における主要なカルモジュリンアイソフォームはCalm1及びCalm2である。この出願は、治療標的として罹患した心臓組織で特異的に発現するmiRNAを使用することを示唆している。

40

【0008】

特許文献1は、血管系において軟性粥腫を線維性組織へと変形させ、心筋梗塞症を予防する線維化促進剤（profibrotic agents）としてのmiR-29aアンタゴニスト～miR-29cアンタゴニストの使用を開示している。

【0009】

幾つかの他のマイクロRNAは心臓病の発症における重要な調節因子である。Silvestri et al.は、MiR-29が心筋梗塞症後の線維化反応に関与し、miR-21が血管形成術後の再狭窄において基本的な役割を果たし得ると述べている。MiR-208は心不全における収縮性タンパク質での胎児性遺伝子の発現パターンへの移行に関与する。Mi

50

R - 1 は、心筋梗塞症後の心不整脈に対する感受性に影響を与える（非特許文献 5）。

【0010】

心筋梗塞症におけるm i R N A - 2 9 の発現は、心筋虚血 - 再灌流傷害に対するピオグリタゾン（P P A R - アゴニスト）の予防効果に関する研究の出発点である。m i R N A - 2 9 a 及びm i R N A - 2 9 c の発現はラットへのピオグリタゾン投与後にかなり弱くなった。興味深いことに、m i R N A - 2 9 a 及びm i R N A - 2 9 c のアンタゴm i r は、I R 傷害に罹った心臓において心筋梗塞のサイズ及びアポトーシスを大幅に低減した。これは、心臓における抗アポトーシス因子（M c l - 2 ）の発現の増大によるものであると考えられた（非特許文献 6）。さらに、非特許文献 7 は、オステオポンチンがヒトの腹部大動脈瘤（A A A ）に関連すること、及びi n v i t r oでの研究により、このサイトカインがペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（P P A R ）のライゲーションにより下方調節されることが示唆されることを開示している。同様に、非特許文献 8 は、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 - アゴニストであるロシグリタゾンが動脈瘤の拡大又は破裂を低減することを開示している。ロシグリタゾンによる前処理又は後処理はマウスモデルにおける大動脈瘤の拡大及び破裂を低減した。ロシグリタゾンで前処理した動物における病変の低減は炎症性メディエータの発現の低減と同時に起こる。正確な機構を解明するために必要とされる更なる研究が述べられている。それにもかかわらず、これらの刊行物では、リガンド又はロシグリタゾン又はピオグリタゾンの効果は本発明に関わる機構とは完全に独立している。

【0011】

大動脈瘤形成の治療のための薬物治療は全く認可されておらず、また利用することができないが、危険因子の変更、並びにスタチン及びA C E 阻害剤を用いた予防的治療法により、ここ15年間のアテローム性動脈硬化症による死亡率が低減している。しかしながら最も重要なことに、平均余命の増大及び集団全体の年齢の増大により、動脈瘤の形成のような年齢に伴う疾患が、時間が経つにつれて更に増大することが予測される。そのため、有効な治療が強く必要とされている。異常な血管リモデリングを治療により妨げようとする現在の試みは、血管壁構造の変化に関連する炎症反応を抑えることだけに焦点を絞っている。しかしながら、血管壁の構造的脆弱性を変更するための治療選択肢は1つも存在していない。コラーゲンを分解するプロテイナーゼを阻止する特定の治療介入、又は炎症細胞の動員の抗体介在性の阻害は失敗に終わってきた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献 1】国際公開第2009/018493号

【特許文献 2】国際公開第2008/042231号

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献 1】Lakatta E C. Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons. Heart Fail Rev. 2002;7:29-49

【非特許文献 2】Singh K, Bonaa KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S. Prevalence of and Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysms in a Population-based Study: The Tromso Study. Am J Epidemiol. 2001; 154:236-244

【非特許文献 3】Guo DC, Papke CL, Hc R, Milewicz DM. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. Ann N Y Acad Sci. 2006;1085:339-352

【非特許文献 4】Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases; inflammation, and angiogenesis. Cardiovasc Res. 2008;79:581-588

【非特許文献 5】Silvestri P et al., MicroRNAs and ischemic heart disease: toward a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic targets. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2009 Jun;4(2):109-18

【非特許文献 6】Ye Y, et al., Down-regulation of microRNA-29 by antisense inhibi 50

tors and a PPAR-{gamma} agonist protects against myocardial ischemia-reperfusion injury, *Cardiovasc Res.* 2010 Feb 17

【非特許文献 7】Golledge et al. (in Golledge J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands reduce aortic dilatation in a mouse model of aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2010 May;210(1):51-6. Epub 2009 Oct 29.)

【非特許文献 8】Jones et al. (in Jones A, et al. Rosiglitazone reduces the development and rupture of experimental aorticaneurysms. *Circulation.* 2009 Jun 23;119(24):3125-32. Epub 2009 Jun 8.)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0014】

上記の従来技術、及び大動脈瘤に現在利用可能な予防的又は治癒的な戦略の制限を鑑みると、本発明の目的は、高齢者で診断されることの多い大動脈瘤形成の予防及び／又は治療のための新規な診断戦略及び治療戦略を提供することであった。

【課題を解決するための手段】

【0015】

第1の態様では、上記の課題は、哺乳動物、好ましくはヒトにおける大動脈瘤形成の予防及び／又は治療に使用される、m i R N A - 2 9 の発現及び／又は機能のアンタゴニストにより解決される。生物情報学的なアプローチを用いることにより、本発明者らは驚くべきことに、m i r - 2 9 ファミリー (m i r - 2 9 a, m i r - 2 9 b 及びm i r - 2 9 c) が、本発明に関して研究されるような 2 0 個の調節されるm i R N A の中で、若齢マウスと比較して老齢マウスの大動脈におけるm R N A レベルに機能的に影響を与える唯一のものであることを見出した。

20

【0016】

大動脈瘤形成は、コラーゲン、フィブリリンの破壊、血管平滑筋細胞のアポトーシス、及び炎症細胞の動員により引き起こされる。

【0017】

本明細書に記載される本発明のアンタゴニストは、急性心筋梗塞症、不安定狭心症、末梢動脈閉塞性疾患、虚血性脳卒中、大動脈瘤形成及び大動脈破裂等の動脈血管の脆弱化を伴う疾患及び事象の予防に特に有用である。好ましくは、本発明のアンタゴニストは、i) アテローム性動脈硬化症による大動脈における動脈瘤の形成、ii) 遺伝的要因による、例えはマルファン症候群での大動脈における動脈瘤の形成、iii) 大動脈二尖弁が形成した患者における動脈瘤の形成、及びiv) 年齢依存性の大動脈瘤形成を含む病態の予防及び／又は治療に用いられる。このため、1つの実施の形態では、上記の大動脈瘤形成が高齢の哺乳動物で起こり、そのため年齢に関連する場合がある。別の実施の形態では、上記の大動脈瘤形成が遺伝的状態が原因で起こる場合があり、かつ／又は疾患に関連する。両方の実施の形態が同時に起こる場合もある。

30

【0018】

本発明との関連では、「大動脈破裂」という用語は、身体における最も大きい動脈である大動脈が、拡張の結果として、特に大動脈瘤形成の影響で、又はアテローム性動脈硬化粥腫の形成の結果として引き裂かれた又は破裂した状態に関する。

40

【0019】

本発明との関連では「予防」という用語は、多くの場合で、疾患を有する患者の病態の悪化、又は健常な及び／若しくは病気の被験体の傷害若しくは死に至る負の事象の発生を避けることを目的とする医学的介入と理解される。

【0020】

1つの実施の形態では、m i R N A - 2 9 の発現及び／又は機能のアンタゴニストは、血管壁の薄層化による大動脈の局所的拡張を特徴とする大動脈瘤 (A A) に使用される。

【0021】

そのため、別の実施の形態では、本発明によるアンタゴニストは、年齢に関連する大動

50

脈瘤の予防及び／又は治療に使用され、上記大動脈瘤、好ましくは年齢に関連する大動脈瘤は、COL1 A1、COL1 A2、COL1 A3、ELN及び／又はFBN1等の大動脈組織における細胞外マトリクスタンパク質、例えばコラーゲン、フィブリリン又はエラスチン等に関する遺伝子の下方調節を更に伴う。

【0022】

また本発明の更なる実施の形態では、mRNA-29の発現及び／又は機能のアンタゴニストは、mRNA-29a、mRNA-29b及びmRNA-29cの発現及び／又は機能のアンタゴニストから選択され、特にmRNA-29bの発現及び／又は機能のアンタゴニストである。

【0023】

更なる実施の形態では、本発明によるアンタゴニストは、アンチセンスDNAオリゴヌクレオチド及び／又はアンチセンスRNAオリゴヌクレオチド、アンチセンス2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド、ホスホロチオエート(phosphorothioate)結合を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、ロックド核酸LNA(商標)塩基を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、モルホリノアンチセンスオリゴ、PPAR-アゴニスト、アンタゴm i r、並びにそれらの混合物から選択されるアンタゴニストである。

【0024】

mRNAがワトソン・クリック塩基対合によりそれらのmRNAを標的としているため、mRNA-29のアンタゴニストが、内因性mRNA標的と競合する、mRNA及びmRNAを有する塩基対に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドであることが好ましい。本発明のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、mRNA-29(a～c)及び／又はその種配列の相補体に対して50%同一であり、好ましくはmRNA-29(a～c)及び／又はその種配列の相補体に対して60%、70%、80%、90%又は95%、最も好ましくは100%同一である。その上、アンチセンスオリゴヌクレオチドとmRNAとの二本鎖の熱安定性を改善するように化学修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドが特に好ましい。好ましい化学修飾体は例えば、糖-リン酸骨格におけるフラノース環が、2'-O, 4'-C-メチレン架橋の導入によりRNAを模倣するN型立体配座に化学的に固定された二環式の高親和性のRNA類似体(LNA(商標)-antimicroRNA)を含む。他の好ましい化学修飾したオリゴヌクレオチドには、モルホリノ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチルオリゴヌクレオチド、及びコレステロール抱合型の2'-O-メチル修飾オリゴヌクレオチド(アンタゴm i r)が含まれる。

【0025】

本発明との関連ではアンタゴニストはまた、マイクロRNAの発現を阻害することにより、又はマイクロRNAのサイレンシング機能を阻害することによりmRNA-29を阻害することが可能な任意の物質も含む。このため、例えばPashaタンパク質、Drosophilaタンパク質、Dicerタンパク質、又はArgonautファミリータンパク質の機能を阻害することによりマイクロRNA経路を妨げる任意の化合物が、本発明によるアンタゴニストであり得る。さらに、mRNA-29のマイクロRNA前駆体の発現を阻害する任意の化合物、例えばポリメラーゼII又はポリメラーゼIIIの阻害剤等が、mRNA-29発現の候補アンタゴニストである。成熟mRNAはmRNA-29機能の阻害剤の設計のための標的としても働く。マイクロRNAとの完全な又はミスマッチした相補性(complementarity)を有する核酸を、内因性mRNA-29とその標的mRNAとの結合を阻害する、又はその結合と競合させるのに使用することができる。このようなmRNA阻害剤の設計法は当該技術分野で既知である。

【0026】

更なる実施の形態では、本発明のアンタゴニストを薬物溶出ステントにより又はバルーンにより動脈組織へと投与する。好ましくは薬物溶出ステント又はバルーンは生体吸収性材料でできている。薬物の血管内部への局所送達に好適な任意のデバイスを本発明との関連で使用することができることが理解される。

【0027】

別の態様では、本発明の目的は、miRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴニストを特定する方法であって、

(a) 細胞を候補化合物に接触させることと、

(b) miRNA-29a～miRNA-29cの活性又は発現を評価することと、

(c) 工程(b)における活性又は発現を、候補化合物の非存在下でのmiRNA-29a～miRNA-29cの活性又は発現と比較することと、

を含み、工程(c)におけるmiRNA-29a～miRNA-29cの測定された活性又は発現と比較した場合の工程(b)におけるmiRNA-29a～miRNA-29cの測定された活性又は発現の低減が、候補化合物がmiRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴニストであることを示す、miRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴニストを特定する方法により解決される。
10

【0028】

好適な細胞は、血管壁細胞、大動脈起源の細胞、又は哺乳動物の血管由来の他の細胞、例えば好ましくは内皮細胞(EC)及び/又は平滑筋細胞(SMC)等から選択することができ、これらは更なる好ましい実施の形態では、COL1A1、COL1A2、COL1A3、ELN及び/又はFBN1等のマトリクス遺伝子、例えばコラーゲン、フィブリリン又はエラスチンに関する遺伝子等を組換えにより若しくは本質的に発現する、又は好ましくは過剰発現する。

【0029】

20

更なる実施の形態では、本発明の方法は、細胞を *in vitro* 及び/又は *in vivo* で候補化合物に接触させることを含む。

【0030】

それから、また別の実施の形態は、候補化合物がタンパク質、ペプチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又は小分子である、本発明の方法に関する。

【0031】

更なる実施の形態では、miRNA-29a～miRNA-29cの発現を評価することは、ノーザンプロット法又はRT-PCRを含む。しかしながら、現行の技術水準で知られる、マイクロRNAの同定及び定量のための技法が複数存在する。ノーザンプロット法及びRT-PCRの他に、マイクロRNA発現の評価を、マイクロRNA発現アレイ、蛍光核酸プローブ、例えば膜又はビーズに連結した蛍光核酸プローブ、及び抗体ベースの検出システムにより行うことができる。間接的なアプローチでは、マイクロRNAの活性を、*in vitro* 又は *in vivo* でのレポーターアッセイにより更に測定する。例えば、当業者は、本発明の技術を利用することなく、miRNA-29ファミリーの種配列に基づいたレポーターアッセイを設計することができ、これにより候補miRNA-29アンタゴニストの容易なスクリーニングが可能になる。このようなアプローチでは、miRNAの標的配列を最適なレポータ遺伝子の3'非翻訳領域又は5'非翻訳領域に導入することができる。それから、このmiR感受性構築物を好適な細胞発現系へと形質転換し、続いてこれを候補化合物に接触させる。対照試料におけるレポータ遺伝子の活性と比較した、化合物に接触させた試料におけるレポータ遺伝子の活性により、試験化合物の阻害効果についての情報が与えられる。
30

【0032】

更に別の実施の形態では、miRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴニストを特定する本発明の方法は、COL1A1、COL1A2、COL1A3、ELN及び/又はFBN1等のmiRNA-29a～miRNA-29cにより調節される遺伝子、例えばコラーゲン、フィブリリン又はエラスチンに関する遺伝子等の発現又は活性を評価することを含む。

【0033】

本発明の別の態様では、上記課題は、miRNA-29、特にmiRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴニストを含む医薬組成物により解決される。好ましい実施の
40

50

形態では、本発明の医薬組成物は、アンチセンスDNAオリゴヌクレオチド及び／又はアンチセンスRNAオリゴヌクレオチド、アンチセンス2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド、ホスホロチオエート結合を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、ロックド核酸LNA(商標)塩基を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、モルホリノアンチセンスオリゴ、PPAR-アゴニスト、アンタゴmir、並びにそれらの混合物から選択され、特にmiRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴmirである、miRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴニストを含む。特定の好ましい実施の形態では、miRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴニストは、miRNA-29a、miRNA-29b、miRNA-29c、又はそれらの組合せの成熟配列に相補的な配列を含む。

【0034】

10

治療法における使用のために、miRNA-29a～miRNA-29cの発現及び／又は機能のアンタゴニストを未処理の化学物質として投与することができると考えられるが、医薬組成物として活性成分を与えることが好ましい。したがって更なる態様では、本発明は、薬学的に許容可能な担体及び／又は賦形剤と結び付いた、miRNA-29a～miRNA-29cの発現及び／若しくは機能のアンタゴニストを含む医薬組成物、又はその薬学的に許容可能な誘導体を提供する。担体及び／又は賦形剤は、配合物の他の成分と相溶性であり、そのレシピエントに対して有害ではないという意味で「許容可能」でなければいけない。

【0035】

20

更に別の態様では、本発明の目的は、
 (a) 大動脈瘤形成を有する被験体を特定する工程と、
 (b) 上記被験体に、miRNA-29の発現又は機能のアンタゴニストを投与する工程と、
 を含む、それを必要とする被験体において大動脈瘤形成を予防及び／又は治療する方法により解決される。

【0036】

30

大動脈瘤形成の予防及び／又は治療を必要とする被験体は、本発明との関連では大動脈において動脈瘤を有すると診断された被験体、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。大動脈瘤を発生する危険性が増大した被験体、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトが更に含まれる。

【0037】

1つの実施の形態では、miRNA-29のアンタゴニストが、アンチセンスDNAオリゴヌクレオチド及び／又はアンチセンスRNAオリゴヌクレオチド、アンチセンス2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド、ホスホロチオエート結合を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、ロックド核酸LNA(商標)塩基を含有するアンチセンスオリゴ、PPAR-アゴニスト、アンタゴmir、並びにそれらの混合物から選択され、特にmiRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴmirである、本明細書の上記で開示された方法が好ましい。特定の好ましい実施の形態では、miRNA-29a～miRNA-29cのアンタゴニストが、miRNA-29a、miRNA-29b、miRNA-29c、又はそれらの組合せの成熟配列に相補的な配列を含む。

40

【0038】

次の実施の形態では、miRNA-29のアンタゴニストが非経口投与又は動脈組織への直接注射により投与される、それを必要とする被験体において大動脈瘤形成を予防及び／又は治療する方法が好ましい。アンタゴニストのこののような投与は好ましくは、経口投与、経皮投与、持続放出性投与、制御放出性投与、遅延放出性投与、坐剤投与、カテーテル投与、薬物溶出ステント投与、バルーン投与、又は舌下投与を含む。

【0039】

50

更なる実施の形態では、本発明による大動脈瘤形成を予防及び／又は治療する方法は、上記被験体に二次療法を施すことを含む。好ましくは上記二次療法は、ステント又はバル

ーンの導入からなる群から選択される。上記二次療法がm i R N A - 2 9 のアンタゴニストと同時に施されるか、又は上記二次療法がm i R N A - 2 9 のアンタゴニストの前又は後のいずれかで施されるのが最も好ましい。

【 0 0 4 0 】

血管壁の薄層化、及び／又は細胞外マトリクスタンパク質の形成の低減若しくは破壊の内の1つ又は複数の症状が、m i R N A - 2 9 のアンタゴニストの投与後に被験体で改善される、本発明による年齢に関連する大動脈瘤形成を予防及び／又は治療する方法の更なる実施の形態が好ましい。

【 0 0 4 1 】

以下の図面及び実施例は、本発明を単に説明するものにすぎず、本発明の範囲を実施例に記載の本発明の特定の実施形態に限定するものとは解釈されないものとする。本発明のために、引用される全ての参考文献はその全体が参照により本明細書中に援用される。

10

【 0 0 4 2 】

本発明の実施例は添付の図面に言及する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 3 】

【図1A】m R N A 発現を標的とするm i R N A を同定するためのm i R N A 及びm R N A 発現の生物情報学的解析を示す図である。6ヌクレオチド長のワードを用いたS y 1 a m e r ランドスケープ。最大のピークを有する「ワード」はm i R N A - 2 9 種配列に対応する。

20

【図1B】m R N A 発現を標的とするm i R N A を同定するためのm i R N A 及びm R N A 発現の生物情報学的解析を示す図である。m i R N A スコアのヒストグラム。スコアは以下のとおりであった：

【表A】

Mir	score	p-value
mmu-miR-29c	26.84	2.2e-12
mmu-miR-29b	26.11	4.5e-12
mmu-miR-29a	23.95	3.9e-11
mmu-miR-186	13.42	1.4e-06
mmu-miR-758	10.75	2.1e-05
mmu-miR-183	10.1	4.0e-05
mmu-miR-182	9.84	5.3e-05
mmu-miR-140	9.55	7.0e-05
mmu-miR-190	9.45	7.8e-05
mmu-miR-98	8.13	0.00029

30

【図2】大動脈における年齢により調節されたm i R N A の確認を示す図である。m i R N A を若齢（6週齢）マウス（n = 4）及び高齢（18ヶ月齢）マウス（n = 4）においてT a q M a n R T - P C R により検出した。（＊＊）は若齢マウスと老齢マウスとの間の有意差を示す。

40

【図3】老齢マウスの大動脈対若齢マウスの大動脈におけるm i R N A - 2 9 標的遺伝子の発現（増加倍数又は減少倍数単位で）を示す図である。

【図4】s n o 2 0 2 に対して正規化した、A n g I I が注入されたマウスの大動脈におけるm i R N A - 2 9 ファミリー成員の発現を示す図である。（a）m i R N A - 2 9 b、（b）m i R N A - 2 9 a、（c）m i R N A - 2 9 c。1群当たりn = 6。（＊＊）は、対照試料とアンギオテンシン処理試料との間の有意差を示す。

50

【図5】Ang II処理SMCにおける相対的なMiR-29発現(変化倍数)を示す図である。(A)miRNA-29b、(b)miRNA-29a。

【図6】対照大動脈と比較した、正常な大動脈三尖弁を有する患者、又は異常な大動脈二尖弁を有する患者のいずれかのヒト大動脈瘤の組織切片におけるmiRNA-29a、miRNA-29b及びmiRNA-29cの相対的な発現(変化倍数単位で)を示す図である。(**)は発現の有意差を示す。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0044】

実施例1：大動脈におけるmiRNAの年齢に関連する調節

10

miRNA発現に対する年齢の影響を決定するために、本発明者らは、老齢の雄マウス(18ヶ月齢)と、若齢の雄マウス(6週齢)とを比較する、miRNA及びmRNAのマイクロアレイ発現プロファイルを作製した。大動脈において年齢により調節される20個のmiRNA(増加/減少の倍数 >1.5 及び $p < 0.01$)をこのアプローチにより同定した(表1)。

【0045】

またこれらのmiRNAの中でどのmiRNAが加齢における生物学的影響を示すかを確定するために、miRNAによる推定調節を特定するためにmRNA発現データを使用する、2つの異なる不偏バイオインフォマティクスツールを適用した。これらのツール、Sylamer(van Dongen S et al., Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. Nat Meth. 2008;5:1023-1025)及びMirExTra(<http://diana.csail.mit.edu/hexamers>)の両方によって、20個の調節されるmiRNAの中で、mRNAレベルに機能的に影響を与える唯一のものとしてmir-29ファミリー(mir-29a、mir-29b及びmir-29c)が特定された(図1)。年齢によるmir-29ファミリー(miRNA-29a及びmiRNA-29b)の上方調節をリアルタイムPCRにより確認した(図2)。心臓では、miRNA-29ファミリー(miRNA-29a、miRNA-29b及びmiRNA-29cを含む)が、細胞外マトリクスタンパク質、例えばコラーゲン、フィブリリン及びエラスチンを標的とすることにより、急性心筋梗塞症後の組織線維化を制御することが分かっている(van Rooij E et al., Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miRNA-29 in cardiac fibrosis. PNAS.2008;105:13027-13032)。実際、mir-29のこれらの既知の標的は全て、大動脈において年齢により下方調節された(図3)。

20

【0046】

表1：上方調節及び下方調節されたmiRNA

【表B】

Gene Name 遺伝子名	fold 倍数	FDR-p
mmu-miR-129-3p	5.45	0.00002
mmu-miR-129-5p	5.37	0.00004
mmu-miR-146a	2.02	0.00671
mmu-miR-142-3p	1.63	0.00599
mmu-miR-29b	1.61	0.00381
mmu-miR-223	1.58	0.00649

40

【0047】

表1-22：下方調節されたmiRNA

50

【表C】

Gene Name	遺伝子名	Fold 倍数	FDR-p
mmu-miR-299*		-2.21	0.00032
mmu-miR-181c		-2.14	0.00028
mmu-miR-127		-2.10	0.00013
mmu-miR-154		-1.95	0.00145
mmu-miR-337-5p		-1.86	0.00163
mmu-miR-379		-1.76	0.00150
mmu-miR-136		-1.71	0.00244
mmu-miR-329		-1.70	0.00017
mmu-miR-31		-1.67	0.00246
mmu-miR-322		-1.67	0.00675
mmu-miR-377		-1.63	0.00359
mmu-miR-434-3p		-1.61	0.00325
mmu-miR-411		-1.54	0.00052
mmu-miR-181d		-1.51	0.00237

10

20

【0048】

実施例2：アンギオテンシンIIはin vitro及びin vivoにおいてmiRNA-29発現を誘導する

ApoE-/-マウスにおけるアンギオテンシン(Ang)II注入は、マウスにおけるAA形成の確立されたモデルとして用いられる。そのため、Ang IIを4週間マウスに連続適用した。Ang II処理マウスの大動脈では、miRNA-29bが有意に上方調節された(図4a)。しかしながら、miRNA-29ファミリーの他の成員、miRNA-29aは調節されなかった(図4b)。これらのin vivoデータは、平滑筋細胞のAng II処理がmiRNA-29b発現を刺激したが、miRNA-29aに影響を与えたことを示すin vitro研究により確認された(図5)。これらのデータにより、マウスにおけるAA形成の原型的な誘導因子としてAng IIがmiRNA-29b発現を誘導することが実証される。

30

【0049】

実施例3：miRNA-29bはヒトの動脈瘤の病理切片において特異的に増大する

ヒトにおけるこれらの実験による発見の妥当性を検証するために、大動脈二尖弁疾患の患者の病理切片におけるmiRNA-29ファミリー成員の発現を測定した。この実験設計では、対照の大動脈(n=30)と比較して患者の切片(n=77)においてmiRNA-29bが有意に増大したが、miRNA-29a及びmiRNA-29cは有意に増大しなかった(図6)。それにもかかわらず、理論に束縛されることを望むものではないが、各マウスモデルで見出されたように、より高齢の被験体/患者では、miRNA-29a及びmiRNA-29cの調節も変化することが推測される。

40

【0050】

本研究のデータにより、年齢が大動脈におけるmiRNA-29ファミリーの発現の増大に関連することが示される。miRNA-29ファミリー成員の発現の増大と一致して、miRNA-29が標的とする細胞外マトリクスタンパク質のレベルが顕著に低減する。年齢がAAの発生の主要な危険因子を含むため、続いて本発明者らは、Ang II注入マウスの大動脈におけるmiRNA-29の調節を決定した。Ang IIはマウスにおいてAAの発生率を増大させる因子の1つである。加齢と同様に、Ang II注入は

50

m i R N A - 2 9 b の発現を高める。しかしながら、加齢とは異なり、m i R N A - 2 9 ファミリーの他の成員はA n g I I 注入では調節されなかった。同様に、i n v i t r o での S M C の A n g I I 処理もm i R N A - 2 9 b 発現を優先的に増大させた。ヒトにおける推測による妥当性を決定するために、本発明者らは更に、ヒトの病理切片におけるm i R N A - 2 9 ファミリー成員の発現を測定した。刺激因子としてA n g I I を用いた実験による発見と一致して、m i R N A - 2 9 b はヒト大動脈の対照切片に対して病変切片で選択的に及び有意に上方調節された。まとめると、これらのデータにより、m i R N A - 2 9 b が実験モデル及びヒトにおいて年齢により及びA A を刺激する因子により増大することが実証される。m i R N A - 2 9 b が細胞外マトリクスタンパク質を標的とするため、m i R N A - 2 9 b の発現の増大が細胞外マトリクスの破壊及び血管壁の薄層化に寄与し得るという仮説を立てることができる。10

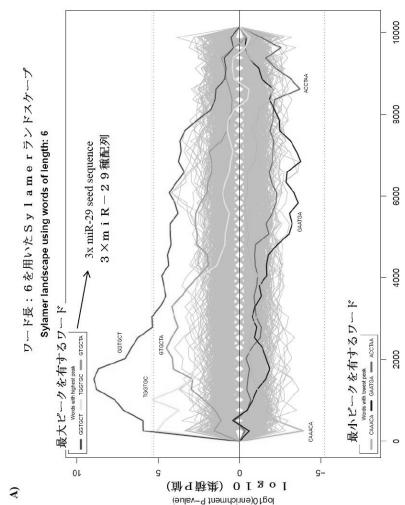
【 0 0 5 1 】

M i R - 2 9 は更に、抗アポトーシス性のB c l - 2 ファミリー成員であるM c l - 1 を標的とすることにより (Mott JL et al., mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. Oncogene. 2007; 26:6133-6140) 、及びp 5 3 レベルを高めることにより (Park SY et al., miRNA-29 miRNAs activate p53 by targeting p85[alpha] and CDC42. Nat Struct Mol Biol. 2009; 16:23-29) 、がん細胞においてアポトーシスを誘導することが示された。平滑筋細胞のアポトーシスが、粥腫破裂に寄与すると考えられ、またA A にも関与し得る (Clarke MCH et al., Chronic Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Accelerates Atherosclerosis and Promotes Calcification and Medial Degeneration, Circ Res. 2008;102:1529-1538) 。またm i R N A - 2 9 のこれらのアポトーシス促進効果が平滑筋細胞で起こることは依然として実証されていないが、m i R N A - 2 9 による平滑筋細胞のアポトーシスの誘導は更に粥腫の不安定化を引き起こし得る。このため、m i R N A - 2 9 b は、アテローム性動脈硬化粥腫の薄層化及び不安定化を妨げるのに非常に魅力的な標的であり得る。20

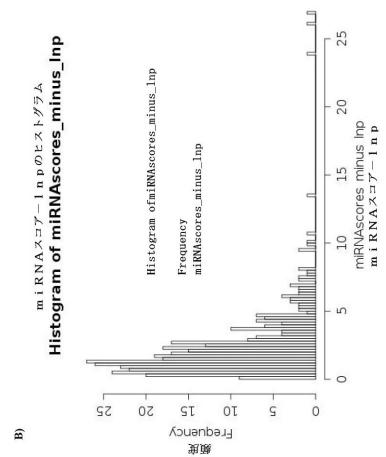
【 0 0 5 2 】

手術がA A に現在利用可能な唯一の治療であることから、新規な薬理学的介入はA A の治療法における大きな進歩を与えるであろう。m i R N A 阻害剤、いわゆるアンタゴm i r 又はa n t i m i R を用いて、マウスモデル及び非ヒト靈長類においてm i R N A 発現を低減することに成功している (Bonauer A et al., MicroRNA-92a Controls Angiogenesis and Functional Recovery of ischemic Tissues in Mice. Science. 2009;324:1710-1713、Lanford RE et al., Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection. Science. 2010;327:198-201) 。薬物溶出ステントによる又はバルーンを介したアンタゴm i r の局所送達は、標的組織におけるm i R N A の効率的な局所抑制を与え、他の器官に対して推測される副作用を制限するのに有用であり得る。30

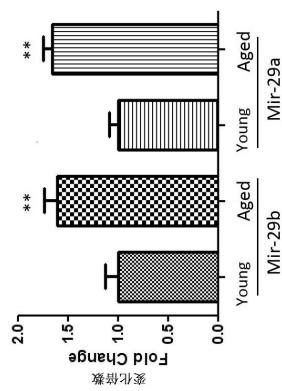
【図 1 A】



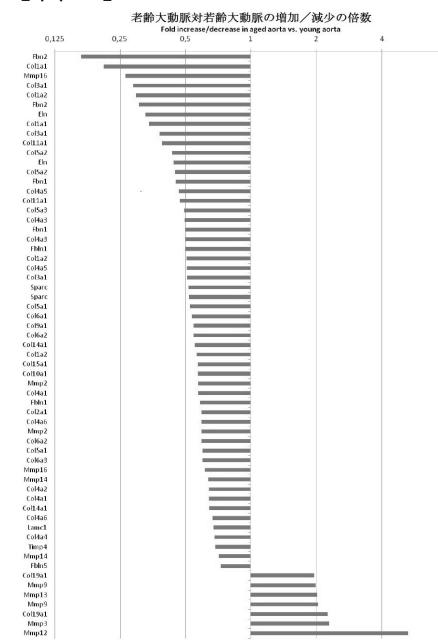
【図1B】



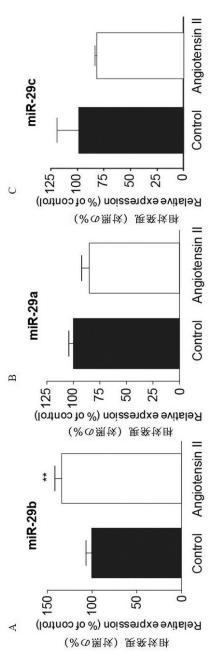
【図2】



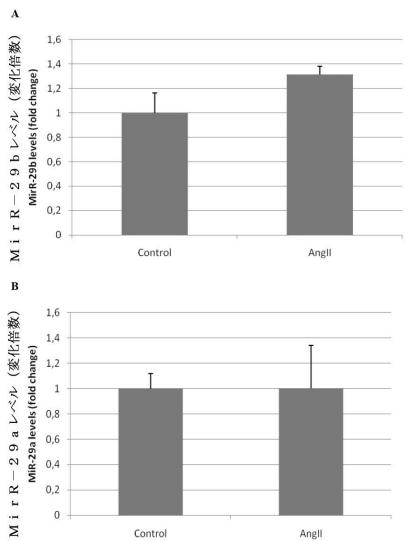
【図3】



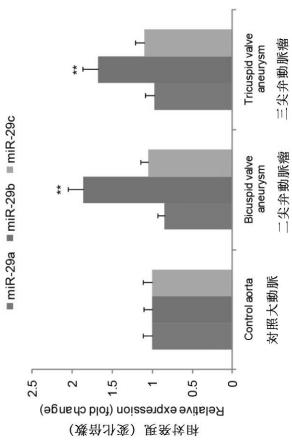
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 ブーン , レイニー

ドイツ , 60596 フランクフルト , カール - フォン - ノオルデン - ブラツツ 18

合議体

審判長 關 政立

審判官 大久保 元浩

審判官 渡邊 潤也

(56)参考文献 國際公開第2009/018493 (WO , A1)

Atherosclerosis , (2009.10.29) 210 p. 51 - 56

Circulation , (2009) 119 p. 3125 - 3132

Cardiovascular Research , (2010.02.17) 87 p. 5
35 - 544

HEART VIEW , (2008) 12(1) p. 70 - 75

Tetrahedron , (1998) 54 p. 3607 - 3630

Biochemistry , (2004.10.26) 43(42) p. 13233 - 13
241

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A61K 31/00-48/00

CAPplus / MEDLINE / BIOSIS / EMBASE / (STN)

JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)