

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6333739号
(P6333739)

(45) 発行日 平成30年5月30日 (2018. 5. 30)

(24) 登録日 平成30年5月11日 (2018. 5. 11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7105 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 31/711 (2006. 01)

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 31/712 (2006. 01)

A 6 1 K 31/712

請求項の数 15 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-558247 (P2014-558247)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月21日 (2013. 2. 21)
 (65) 公表番号 特表2015-513398 (P2015-513398A)
 (43) 公表日 平成27年5月14日 (2015. 5. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/051410
 (87) 国際公開番号 W02013/124807
 (87) 国際公開日 平成25年8月29日 (2013. 8. 29)
 審査請求日 平成27年12月8日 (2015. 12. 8)
 (31) 優先権主張番号 M12012A000275
 (32) 優先日 平成24年2月24日 (2012. 2. 24)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(73) 特許権者 514215088
 ビオジェネラ ソチエタ ペル アツィオ
 ニ
 イタリア国、イー・４〇〇４６ ボッレッタ
 テルメ (ボローニャ)、ピア マルコー
 ニ ４６
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子発現を調節するためのオリゴヌクレオチド及びこれの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的遺伝子のアンチセンス DNA 鎖に相補的な一本鎖アンチジーンオリゴヌクレオチドであって、6 ～ 30 ヌクレオチドを含み、前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 2、4、5、6、46、68 ～ 84 から選択される、オリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

前記オリゴヌクレオチドが、12 ～ 24 ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、

配列番号 2、4、5、6、68 及び 69 が、MYCN 遺伝子に対するものであり；

配列番号 70 ～ 74 が、MYC 遺伝子に対するものであり；

配列番号 75 及び 76 が、BIRC5 遺伝子に対するものであり；

配列番号 77 ～ 79 が、ALK 遺伝子に対するものであり；

配列番号 80 ～ 82 が、BCL2 遺伝子に対するものであり；及び、

配列番号 83 及び 84 が、PLK4 遺伝子に対するものである、

前記オリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

前記オリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドの 3' 及び / 又は 5' 末端において、担体配列と結合している、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド

。

【請求項 5】

前記担体配列が、配列番号 47～56 からなる群から選択される、請求項 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドが、天然の核酸、化学的に修飾された天然の核酸、合成核酸、化学的に修飾された合成核酸、又はそれらの組み合わせ、からなる分子である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

前記天然の核酸又は化学的に修飾された天然の核酸が、DNA 又は RNA から選択され、前記合成核酸又は前記化学的に修飾された合成核酸が、PNA、LNA 又はモルホリノから選択される、請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 8】

1) 前記 DNA 分子が、少なくとも 1 つの LNA、メチルホスホネート-LNA、BNA、RNG、DNG、GNA、UNA、ENA、ANA、F-ANA、PNA、G-PNA 若しくはモルホリノヌクレオチドを含むか；又は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル若しくは 2'-フルオロ RNA ヌクレオチドを含む；あるいは、

2) 前記少なくとも 1 つの RNA 分子が、2'-O-エチルヌクレオチド、2'-O-メトキシエチルヌクレオチド、2'-フルオロヌクレオチドの中から選択される前記少なくとも 1 つの RNA ヌクレオチド；又は、LNA、メチルホスホネート LNA、BNA、RNG、DNG、GNA、UNA、ENA、ANA、F-ANA、PNA、G-PNA 若しくはモルホリノの中から選択される核酸の少なくとも 1 つのヌクレオチドを含む、請求項 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 9】

前記 DNA 分子又は前記 RNA 分子は、そのホスホジエステル結合が、ホスホロチオエート結合として修飾された少なくとも 1 つのヌクレオチドを含む、請求項 7 又は 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

前記 PNA が、修飾された主鎖を有し、炭素が、置換基としてアルギニン又はリジンの側鎖を有する、請求項 7～9 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 11】

請求項 1～10 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチド、及び少なくとも 1 つの医薬的に許容される賦形剤を含む組成物。

【請求項 12】

薬理作用を有する、NGF、ソマトスタチン、レチノイン酸、アクチノマイシン D、アスパラギナーゼ、ブレオマイシン、ブスルファン、カペシタビン、カルボプラチン、シクロホスファミド、シクロスポリン、シスプラチン、シタラビン、クロラムブシル (clorambucil)、ダカルバジン、ダウノルビシン、ドセタキセル、塩酸ドキシソルビシン、塩酸エピルビシン、エトポシド、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、塩酸イダルビシン、ヒドロキシ尿素、イソホスファミド (ifosphamide)、塩酸イリノテカン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、プロカルバジン、ラルチトレキセド、ストレプトゾシン、テガフルウラシル、テモゾロミド、チオグアニン、チオテパ (thiotepa)、トポテカン、ビンブラスチン、硫酸ピンクリスチン、ビンデシン及びビノレルビンからなる群から選択された化合物と組み合わせた、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含む、組成物。

40

【請求項 13】

配列番号 1、及びカルボプラチン又はエトポシド又はシスプラチン又はピンクリスチンとの組み合わせ；あるいは、

配列番号 5、及びカルボプラチン又はエトポシド又はシスプラチン又はピンクリスチン

50

との組み合わせを含む、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

医薬としての使用のための、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

腫瘍の治療に使用するための組成物であって、

前記腫瘍が、成人又は小児の腫瘍であり、ここで前記腫瘍が、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、髄芽細胞腫、上衣腫、褐色細胞腫、胚性癌、胚細胞腫瘍、肺胞横紋筋肉腫、胚性横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、腎臓の明細胞肉腫、滑膜肉腫、肝芽細胞腫、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ芽球性白血病、パーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性巨核芽球性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病、T細胞白血病、リンパ腫、小細胞肺癌（小細胞癌（microcytoma））、肺腺癌、扁平細胞肺癌、定型及び非定型原発性肺癌、大細胞肺癌、大細胞神経内分泌性肺癌、神経膠芽細胞腫、肝細胞癌、基底細胞癌、卵巣腫瘍、乳房腫瘍及び結腸癌からなる群から選択される、

請求項 1 4 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子の発現を調節するための、特に、遺伝、腫瘍又はウイルス起源の病理に起因する遺伝子の発現を調節するためのオリゴヌクレオチドに関する。

【0002】

さらに、本発明は、前記疾患の治療及び/又は診断のための、場合により化学的に修飾された、前記オリゴヌクレオチドの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

オリゴヌクレオチドは、天然RNA若しくはDNA核酸又は合成核酸、例えばPNA（ペプチド核酸）、LNA（ロックド核酸（Locked Nucleic Acid））及びモルホリノの短い配列である。

【0004】

オリゴヌクレオチドは、転写及び翻訳の双方のレベルにおいて遺伝子の発現を調節するのに大変に有効的であることが、実験的に実証されている。この能力のために、オリゴヌクレオチドは、遺伝、腫瘍、又はウイルス起源の特定の疾患における多数の病理を治療するために有効な手段を代表する。

【0005】

遺伝子の発現の調節とは、その阻害又は活性化を意味し得る。

【0006】

例えば、遺伝子のアンチセンス鎖と相補的結合を形成することにより（Helene C, Biochem Biophys Acta 1990, 109 (2): 99-125）、あるいは目的の遺伝子の制御領域においてクロマチンの状態を改変することにより（Rossi JJ, Nat Chem Biol 2007, 3(3): 136-7）、遺伝子の転写を阻害することができるオリゴヌクレオチドが、知られている。他のオリゴヌクレオチドは、例えば標的メッセンジャーRNA（mRNA）との相補的結合により、遺伝子転写を阻害することができる。一本鎖オリゴヌクレオチドの場合では、この結合は、RNase H複合体によるmRNAの酵素的分解を引き起す。オリゴヌクレオチドが二本鎖「干渉」RNA分子である場合では、オリゴヌクレオチドの標的mRNAとの相補的結合は、RISC複合体の「スライサー」酵素によりメッセンジャーの分解を引き起す。後者の場合、オリゴヌクレオチドは、不完全な相補性の効力により、ブロックされるそのmRNAの翻訳を引き起す標的mRNAの3'UTR領域（3'非翻訳領域）と結合することができる内因性マイクロRNAと同等のオリゴヌクレオチドであり得る。

【0007】

オリゴヌクレオチドは、例えば、長いアンチセンス非コーディングRNAとの相補的結

10

20

30

40

50

合を介して (Morris KV, Epigenetics, 2009, 4(5): 296-301)、あるいは相補的マイクロRNAを阻害することにより、遺伝子の活性化又はこれの転写の増加を誘導し得、結果としてマイクロRNAの標的mRNAの翻訳が増加する。

【0008】

オリゴヌクレオチドは、治療及び/又は診断期間において、これらの有効性を増加させるために化学的に修飾され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、その特異性及び/又は相補的配列と対になる強さを改善するために修飾され得、あるいはオリゴヌクレオチドは、酵素消化を受けにくくするために、その薬物動態学/薬力学的プロファイルを改善するために、又はその細胞膜の透過を容易にするために修飾され得る。

【0009】

天然の核酸のオリゴヌクレオチド(即ち、DNA及び/又はRNAの短い配列)に加えて、合成核酸のオリゴヌクレオチド、例えばペプチド核酸(PNA)及びロックド核酸(LNA)が存在し、とりわけアンチジーン戦略(即ち遺伝子を直接攻撃するために設計される)により遺伝子の発現を調節するために、大変に研究され、特徴付けられている。PNA及びLNAオリゴヌクレオチド、全て修飾されたようなオリゴヌクレオチドは、一般的に、DNA又はRNAオリゴヌクレオチドよりも化学的に安定している。これらの安定性は、キメラオリゴヌクレオチドを合成することによりさらに改善され得る。キメラオリゴヌクレオチドは、典型的なモノマー(デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド)及び合成核酸塩基(モノマー)、例えばLNAモノマーの双方が挿入されるオリゴヌクレオチド配列である。

【0010】

LNAは、標的遺伝子の転写を阻害することにより遺伝子をサイレンシングする、アンチセンス戦略に用いられる(Braasch DA, Nucl Acids Res, 2002, 30 (23): 5160-7)。あるいは、LNAオリゴヌクレオチドはまた、「Z型」構造(「ゾロ」オリゴヌクレオチドとして定義される)を形成するための、「鎖侵入」機構により核酸の双方の鎖上で相互作用することができるような方法で、オリゴヌクレオチド配列を設計したSmithと同僚により行なわれたように、アンチジーン戦略に用いられ得る(Ge R, Faseb J, 2007, 1902-14)。

【0011】

PNAオリゴヌクレオチドは、他のオリゴヌクレオチド構造と比較した場合、酵素的により安定的である。PNAは、「鎖侵入」を介して二本鎖DNA(DNA ds)と結合し得、あるいは相補的な態様において、一本鎖DNAの分子(DNA ss)と対になり得、さもなければ、これらは、ホモデュプレックス(Homoduplex)構造(例えば、DNA/DNA二本鎖)と比較して熱力学的に大変に安定であるハイブリッドダブルヘリックスPNA/DNA又はPNA/RNA構造を生じるRNAの鎖と結合し得る。

【0012】

PNAは、とりわけアンチジーン戦略を用いた遺伝子の発現を調節するための非常に有利なシステムを表す。実際、PNAは、標的配列について高い特異性を示し、これによりタンパク質の発現が有効的な態様において阻害されることを可能にすること示した。

【0013】

それ故、PNAは、遺伝子又はウイルス疾患の治療のための有望な治療的アプローチを示す。

【0014】

PNAの唯一の不都合な点は、これらは、細胞膜を透過する限定された能力を有するという事実である。しかしながら、この限定は、一般的にオリゴヌクレオチド、特に細胞膜透過をより有効的にすることができる分子(担体)をPNAと結合させることにより解決される。

【0015】

実際、オリゴヌクレオチド及びPNAは、具体的には、一般的に、それらと結合される担体(又は「タグ」)、例えば、1~30個のアミノ酸の様々な長さを有するペプチド配

10

20

30

40

50

列を用いて投与され得る。

【0016】

オリゴヌクレオチドのある特定の適用は、腫瘍を活性化又は抑制する遺伝子の発現を調節することに関する。

【0017】

腫瘍は、様々な遺伝子の調節不全により引き起こされることがよく知られている。通常、損傷は、腫瘍において活性化又は過剰発現するMYC遺伝子（tra cui MYC、MYCN、MYCL1）、サバイピン（BIRC5）、BCL2、PLK4、ALK及びPKM2のような原癌遺伝子（又は単に癌遺伝子）に影響を及ぼす。さらに、腫瘍において、抗腫瘍又は癌抑制遺伝子、例えばカスパーゼ-8及びRASSF1はまた、通常不活性である。

10

【0018】

特に、MYCファミリーの癌遺伝子は、多数のヒト腫瘍の発達に関与しており、なかでも新生物の発症及び進行の最も原因となる遺伝子である。これらの遺伝子の増幅及び/又は過剰発現は、殆どの場合、小児型（例えば、神経芽細胞腫、髄芽細胞腫及び横紋筋肉腫）及び成人型（例えば、小細胞肺癌又は神経膠芽細胞腫）の双方の腫瘍と関連している（Pession A, Cur Cancer Drug Target, 2005, 5 (4) : 273-83）。実際、これらは、腫瘍増殖、例えば細胞増殖の誘導、アポトーシス抵抗性、転移の形成、及び化学療法薬抵抗性の基本である機構により作用する。

【0019】

抗腫瘍効果を有する多数のオリゴヌクレオチドは、文献において知られている。

20

【0020】

例えば、アンチセンス戦略において、MYC、MYCN、BCL2、BIRC5遺伝子に対するオリゴヌクレオチド（EV Prochownik, Exp Rev Antic Ther 2004, 4(2):289-302; Felsher DW, Drug News Persp, 2003, 16(6):370-4; CF Bennet, Exp Opin Investig Drugs, 1999, 8(3):237-53）、又はアンチジーン戦略において、MYCN及びMYCに対するオリゴヌクレオチド（LC Boffa, Oligonucleotides 2005, 15(2):85-93）が存在する。

【0021】

DNA型ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、神経芽腫細胞中のMYCN遺伝子の翻訳を阻害するために生成され（Burkhart CA, JNCI, 2003, 95 (18) : 1394-403）、そしてアンチセンスオリゴヌクレオチドは、神経芽腫細胞中のMYCN遺伝子の翻訳を阻害するために、「低分子干渉RNA（siRNA）」を介して生成される（Kang JH, Bioch Bioph Res Com, 2006, 351 (1) : 192-197）。

30

【0022】

しかしながら、強力な治療的及び/又は抗腫瘍効果を有し得るような、非常に特異的且つ選択的な態様において、遺伝子の発現を調節することができる更なるオリゴヌクレオチドを同定する強い需要が未だ存在する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0023】

治療的及び/又は診断的手段として利用可能なオリゴヌクレオチドを得るために、標的遺伝子又は標的メッセンジャーRNA、及び/又は転写及び/又は翻訳の双方の期間において、遺伝子それ自身の発現に関する著しく且つ選択的な調節効果を決定することができるこれらのそれぞれの制御配列を同定することが必要である。

【0024】

従って、遺伝子の配列、メッセンジャーRNAの配列、これらの制御配列の中から、遺伝子自体の転写/翻訳を調節するために最も有望であるオリゴヌクレオチド配列を同定する方法を支配する一般的な法則を定義する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 2 5 】

上述のように、この節における必要性は、本発明により満たされ、第一の態様によれば、これは、遺伝子の発現を調節するためのオリゴヌクレオチドであって、6～30ヌクレオチド（モノマー）、好ましくは12～24ヌクレオチドを含み、前記オリゴヌクレオチドは、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも2つの連続するグアニンの少なくとも1つの群を含む配列により特徴付けられる、オリゴヌクレオチドに関する。配列番号1を有するオリゴヌクレオチドは、単に与えられる定義から排除されるものとして理解される。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 6 】

10

天然の核酸（DNA及びRNA）の場合、各モノマー（ヌクレオチド）は、窒素塩基、糖及び三リン酸からなる。該塩基は、アデニン、グアニン、チミン、シトシン及び（RNAにおいてのみ）ウラシルの中から選択される。糖は、DNAの場合においてデオキシリボースであり、RNAの場合においてリボースである。モノマーは、ホスホジエステル結合により、連結されてポリマーとなる。

【 0 0 2 7 】

好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも3つの連続するグアニンの少なくとも1つの群を含む配列を含む。配列番号1を有するオリゴヌクレオチドは、この定義から排除されるものとして理解される。

【 0 0 2 8 】

20

より好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも4つの連続するグアニンの少なくとも1つの群を含む配列を含む。

【 0 0 2 9 】

さらに好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも5つの連続するグアニンの少なくとも1つの群を含む配列を含む。

【 0 0 3 0 】

少なくとも6つの連続するグアニンの少なくとも1つの群を含む配列を含むオリゴヌクレオチドは、本発明の目的に特に好ましい。

【 0 0 3 1 】

本発明の実施形態によっては、該オリゴヌクレオチドは、2～6つの連続するグアニンからなる少なくとも1つの群を含む配列を含む。

30

【 0 0 3 2 】

更なる実施形態によれば、少なくとも1つのグアニンの群は、好ましくは、少なくとも2つの連続するグアニンの少なくとも2つの群を含む。

【 0 0 3 3 】

あるいは、少なくとも1つのグアニンの群は、好ましくは、少なくとも2つの連続するグアニンの少なくとも1つの群、及び少なくとも3つの連続するグアニンの少なくとも1つの群を含む。

【 0 0 3 4 】

更なる実施形態によれば、少なくとも1つのグアニンの群は、好ましくは、少なくとも2つの連続するグアニンの少なくとも3つの群を含む。

40

【 0 0 3 5 】

更なる実施形態によれば、少なくとも1つのグアニンの群は、好ましくは、少なくとも2つの連続するグアニンの少なくとも4、5又は6つの群を含む。

【 0 0 3 6 】

あるいは、少なくとも1つのグアニンの群は、好ましくは、少なくとも2つの連続するグアニンの少なくとも1つの群、及び少なくとも3つの連続するグアニンの少なくとも2つの群を含む。

【 0 0 3 7 】

あるいは、少なくとも1つのグアニンの群は、好ましくは、少なくとも3つの連続する

50

グアニンの少なくとも1つの群、及び少なくとも2つの連続するグアニンの少なくとも2つの群を含む。

【0038】

あるいは、少なくとも1つのグアニンの群は、好ましくは、少なくとも2つの連続するグアニンの少なくとも1つの群、少なくとも3つの連続するグアニンの少なくとも1つの群、及び/又は少なくとも6つの連続するグアニンの少なくとも1つの群を含む。

【0039】

一般的に、本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくは標的配列に完全に相補的であり、好ましくは連続するグアニンの群は、例えば2つの連続するグアニンの3つの群は、6つの連続するグアニンの群であるように、互いに連続し得る。あるいは、連続するグアニンの群は、少なくとも1つのヌクレオチドにより隔てられ得る。

10

【0040】

一般的に、本発明の少なくとも2つの連続するグアニンの少なくとも1つの群は、オリゴヌクレオチドの5'端の近くに、あるいはオリゴヌクレオチドの3'端の近くに、さもないとオリゴヌクレオチド配列の中央に位置し得る。

【0041】

本発明の好ましい実施形態によれば、前記オリゴヌクレオチドは、好ましくはその3'及び/又は5'末端において、好ましくは短いアミノ酸配列である担体配列と結合される。

【0042】

20

前記の短いアミノ酸配列(担体)は、好ましくは、1~30、好ましくは1~10、さらにより好ましくは1~7個の数のアミノ酸からなる。該アミノ酸は、L又はD体、好ましくはD体であり得る。

【0043】

本発明の目的に好ましい担体は、配列番号47(PKKKRKV);配列番号48(VKKRKKKP);配列番号49(KKKKKK);配列番号50(PKKRKRKV);配列番号51(KRKRKRK);配列番号52(KKKRKV);配列番号53(PKKKRK);配列番号54(KKKRK);配列番号55(RRRR)及び配列番号56(PKKKRKVHHHH)からなる群から選択される。

【0044】

30

本発明の目的に特に好ましい担体は、配列番号47を有するペプチドである。

【0045】

本発明の文脈において、「担体」とは、薬物動態学的及び/若しくは又は薬力学的プロファイル並びに/又はオリゴヌクレオチドの細胞及び/若しくは核透過を好ましく改変することができるペプチドを意味する。

【0046】

本発明の文脈において、「遺伝子の発現を調節する」とは、遺伝子の発現を阻害又は活性化(増加)させることを意味する。遺伝子発現の前記阻害又は活性化(増加)は、転写又は翻訳レベルで生じ得る。

【0047】

40

遺伝子発現の阻害又は活性化は、アンチジーン機構(又はアンチジーンオリゴヌクレオチド、即ち遺伝子のアンチセンス鎖に対する、即ちアンチジーン戦略)により作用するオリゴヌクレオチドにより転写レベルにおいて達成され得る。あるいは、遺伝子発現の阻害は、アンチセンス機構(又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、即ちメッセンジャーに対する、即ちアンチセンス戦略)を介して作用するオリゴヌクレオチドを用いて翻訳レベルにおいて達成され得る一方で、翻訳レベルに関する発現の増加は、メッセンジャーRNAを分解するマイクロRNAを阻害することにより達成され得る。

【0048】

オリゴヌクレオチドが、出願人により同定され、且つ上述される遺伝子の発現を有効的に調節するために満たすべきパラメータ、又は法則、又は必要条件は、何であれ遺伝子に

50

より変更され、従って、例えば、遺伝子及び／若しくはウイルス起源の疾患の原因である遺伝子、又は腫瘍病理の発症に関与する遺伝子の発現を調節することができるオリゴヌクレオチドの配列を同定するために、適用される。

【0049】

このように同定されたオリゴヌクレオチドは、特定の遺伝子、ウイルス、又は腫瘍性疾患の治療のための治療的アプローチにおいて、好ましくは薬物として用いられ得る。

【0050】

あるいは、該オリゴヌクレオチドは、診断目的のために用いられ得る。

【0051】

実際、本発明の主題は、治療及び／又は診断目的のための、場合により修飾された本発明のオリゴヌクレオチドの使用にさらに関する。

10

【0052】

本発明のオリゴヌクレオチドは、6～30、好ましくは12～24残基（ヌクレオチド又はモノマー）の短いオリゴヌクレオチドである。該オリゴヌクレオチドは、天然の核酸塩基、例えばDNA若しくはRNA、又は合成核酸塩基、例えばPNA、LNA若しくはモルホリノからなってもよい。あるいは、該オリゴヌクレオチドは、DNA、RNA及び／又は合成核酸、好ましくはPNA又はLNA（ハイブリッド又はキメラオリゴヌクレオチド）の組み合わせを含み得る。さらに、該オリゴヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖であり得る。

【0053】

20

本発明の実施形態によっては、該オリゴヌクレオチドは、例えば、これらの治療及び／又は診断的有効性を改善するために、化学的に修飾され得る。

【0054】

本発明の好ましい実施形態によれば、該オリゴヌクレオチドは、 α 位の炭素（ C_{α} ）が、グリシンの典型的な水素原子以外の置換基と結合している主鎖を有するPNA分子でもあり得る。例えば、グリシンの側鎖の代わりに、好ましくはアルギニン、リジン、ヒスチジン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、アスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、バリン、アラニン、システイン、メチオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、トリプトファン、及びオルニチンからなる群から選択される天然若しくは合成起源の別のアミノ酸の側鎖が用いられ得る。前記アミノ酸は、右旋性配置（D）又は左旋性配置（L）であってもよい。

30

【0055】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、該オリゴヌクレオチドは、相互に相補的な一本鎖又は二本鎖RNA分子である（相互に相補的二本鎖RNA分子は、「低分子干渉（small interfering）RNA」の頭文字siRNAとして定義される）。

【0056】

他の実施形態によれば、前記「低分子干渉RNA」は、RNAモノマー（リボヌクレオチド）及び少なくとも1つのリボースの2'位において修飾されたモノマー、好ましくは2'-O-メトキシエチル、2'-O-メチル若しくは2'-フルオロモノマーを含み；あるいは前記「低分子干渉RNA」は、RNAモノマー（リボヌクレオチド）並びに少なくとも1つの合成核酸のモノマーは、好ましくは、メチルホスホネートLNA、BNA（架橋型核酸）、UNA（アンロックド（unlocked）核酸）、ENA（エチレン架橋型核酸）、ANA（アラビノース核酸）及びF-ANA（フルオロ-アラビノシド核酸）の中から選択される。

40

【0057】

好ましい実施形態によれば、前記「低分子干渉RNA」は、相補的二本鎖の末端において、二本鎖の1つのみが、少なくとも1つ、少なくとも2つの突出した、即ち対にならない天然若しくは合成核酸のモノマーを有するように設計される。更なる実施形態によれば、天然又は合成の突出した核酸は、好ましくは、2'-O-メトキシエチル、2'-O-メチル及び2'-フルオロモノマー、あるいはLNA、メチルホスホネートLNA、BN

50

A、UNA（アンロックド核酸）、ENA（エチレン架橋化核酸）、ANA（アラビノース核酸）及びF-ANA（フルオロ-アラビノシド核酸）のモノマーの中から選択される。

【0058】

更なる実施形態によれば、該オリゴヌクレオチドは、ハイブリッド又はキメラとして定義され、好ましくはRNAモノマー（リボヌクレオチド）及びLNAモノマーを含む一本鎖又は二本鎖である（このオリゴヌクレオチドは、RNA/LNAとして表される）。あるいは、該ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNAモノマー（リボヌクレオチド）並びに2'-O-メトキシエチル（MOE）モノマー、2'-O-メチルモノマー及び2'-フルオロモノマーの中から選択される少なくとも1つのRNAモノマーを含み；あるいは該ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNAモノマー（リボヌクレオチド）並びに好ましくは、LNA、メチルホスホネートLNA、UNA（アンロックド核酸）、BNA、ENA（エチレン核酸）、ANA（アラビノース核酸）及びF-ANA（フルオロ-アラビノシド核酸）の中から選択される合成核酸の少なくとも1つのモノマーを含み得る。

【0059】

更なる実施形態によれば、一本鎖又は二本鎖RNA型オリゴヌクレオチドは、典型的な（即ち、化学的に修飾されていない）リボヌクレオチド、及びホスホジエステル結合、例えばホスホロチオエート結合のレベルにおいて修飾されたりボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチド、又はDNG（デオキシリボ核酸グアニジン）、RNG（リボ核酸グアニジン）、GNA（グリセロール核酸）、G-PNA（ガンマ-PNA）又はPMO（モルホリノ）を含み得る。

【0060】

本発明の好ましい実施形態によれば、該オリゴヌクレオチドは、DNAモノマー（デオキシリボヌクレオチド）及びLNAモノマーを含むキメラ一本鎖配列である。

【0061】

転写レベルにおける遺伝子発現の調節を意味するアンチジーン戦略のために、好ましくは、以下の1つ：

- ・任意で、好ましくは3'末端及び/又は5'末端において、担体（一般的に1~30残基からなる）と結合したPNA型オリゴヌクレオチド；又は

- ・PNA型オリゴヌクレオチドであって、前記PNAは標準的なグリシンのH原子以外の置換基を有する少なくとも1つの炭素（C-）の主鎖を含む、PNA型オリゴヌクレオチド；又は

- ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）及び任意で少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド（モノマー）（例えば2'-O-メチルRNAモノマー、2'-フルオロRNAモノマー）、又はLNA、メチルホスホネートLNA、BNA、UNA、GNA、ANA、FANA、ENA、DNG及びRNGの中から選択される核酸の少なくとも1つのモノマー、又はホスホジエステル結合のレベルにおいて修飾されたりボヌクレオチドを含む一本鎖オリゴヌクレオチド；又は

- ・相互に相補的な二本鎖RNA型オリゴヌクレオチド（siRNA）；又は

- ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）及び少なくとも1つのLNAモノマーを含む部分的に相補的な二本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は

- ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）及び少なくとも1つの2'-O-（2-メトキシエチル）RNAモノマーを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は

- ・DNAモノマー（典型的なデオキシリボヌクレオチド）及び少なくとも1つのLNAモノマーを含む一本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は

- ・DNAモノマー（典型的なデオキシリボヌクレオチド）並びに少なくとも1つの2'-フルオロRNAモノマー、又はLNA、メチルホスホネートLNA、BNA、UNA、GNA、ENA、ANA、FANA、DNG及びRNGの中から選択される核酸の少なくとも1つのモノマーを含むオリゴヌクレオチド；

を用いることができる。

【 0 0 6 2 】

翻訳レベルにおける遺伝子発現の調節を意味するアンチセンス戦略のために、好ましくは、以下の1つ：

- ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）を含む相互に相補的な二本鎖オリゴヌクレオチド（siRNA）；又は
 - ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）並びにリボースレベル及び／又はホスホジエステル結合のレベルにおいて修飾される少なくとも1つのRNAモノマーを含む一本鎖オリゴヌクレオチド；又は
 - ・DNAモノマー（典型的なデオキシヌクレオチド）及び少なくとも1つのホスホロチオエートDNAモノマーを含む一本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は
 - ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）及び少なくとも1つの2' - O - （2 - メトキシエチル）RNAモノマーを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は
 - ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）及び少なくとも1つの2' - O - メチル化RNAモノマーを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は
 - ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）及び少なくとも1つの2' - フルオロRNAモノマーを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は
 - ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）及び少なくとも1つのLNAモノマーを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は
 - ・RNAモノマー（典型的なリボヌクレオチド）及び少なくとも1つのアラビノシドRNAモノマーを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は
 - ・DNAモノマー（典型的なデオキシヌクレオチド）及び少なくとも1つのLNAモノマーを含む一本鎖キメラオリゴヌクレオチド；又は
 - ・モルホリノモノマーを含む一本鎖オリゴヌクレオチド；又は
 - ・PNA型オリゴヌクレオチドであって、前記PNAは標準的なグリシンのH原子以外の置換基を有する、少なくとも1つの炭素（C - ）の主鎖を含み、好ましくは該置換基はアルギニン又はリジンの側鎖である、PNA型オリゴヌクレオチド；又は
 - ・DNAモノマー（典型的なデオキシヌクレオチド）並びにPNA、LNA、LNAメチルホスホネート、BNA、UNA、GNA、ENA、DNG及びRNGの中から選択される核酸の少なくとも1つのモノマーを含むオリゴヌクレオチド；
- を用いることができる。

【 0 0 6 3 】

好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、遺伝子及び／若しくはウイルス起源の疾患又は腫瘍の進行に関与する遺伝子に対する。前記遺伝子は、好ましくは、MYCファミリーの遺伝子（好ましくはMYC、MYCN、MYCL1）、サバイピン遺伝子（BIRC5）、BCL2、PLK4、ALK、PKM2、カスパーゼ - 8 及びRASSF1からなる群から選択される。

【 0 0 6 4 】

特に、本発明のオリゴヌクレオチドは、MYCファミリーの遺伝子、好ましくはMYCNに対する。

【 0 0 6 5 】

前記オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号2～15、66～84、配列番号24、25、31及び32、並びに配列番号26及び57を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号27及び58を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号28及び59を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号29及び60を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号30及び61を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号33及び62を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号34及び63を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号35及び64を有する相補的オリゴヌクレオチド対、並びに配列番号36及び65を有する相補的オリゴヌクレオチド対からなる群から選択される。

【 0 0 6 6 】

他の実施形態によれば、前記オリゴヌクレオチドは、PNAオリゴヌクレオチドであり、好ましくは前記PNAは、MYCNに対する。

【0067】

好ましい実施形態では、PNAは、配列番号2～15からなる群から選択される。

【0068】

さらに好ましい実施形態では、PNAは、配列番号66～84からなる群から選択される。

【0069】

さらに好ましい実施形態では、PNAは、配列番号2～15、66～84からなる群から選択される。

【0070】

好ましくは、PNAオリゴヌクレオチドは、配列番号2～13、より好ましくは配列番号2～8、さらにより好ましくは配列番号2～6からなる群から選択される。本発明の目的に特に好ましいPNAオリゴヌクレオチドは、配列番号5である。

【0071】

好ましくは、配列番号5は、5'又は3'末端において、配列番号47と結合する。より好ましくは、配列番号47は、D体のアミノ酸からなる。

【0072】

配列番号2～15のPNAは、好ましくはMYCNに対し、より好ましくは、これらは、アンチジーン戦略を用いてMYCNの発現を調節する。

【0073】

配列番号66～69のPNAはまた、好ましくはMYCNに対し、より好ましくは、これらは、アンチジーン戦略を用いてMYCNの発現を調節する。

【0074】

配列番号70～74のPNAは、好ましくはMYCに対し、より好ましくは、これらは、アンチジーン戦略を用いてMYCの発現を調節する。

【0075】

配列番号75、76のPNAは、好ましくはBIRC5に対し、より好ましくは、これらは、アンチジーン戦略を用いてBIRC5の発現を調節する。

【0076】

配列番号77～79のPNAは、好ましくはALKに対し、より好ましくは、これらは、アンチジーン戦略を用いてALKの発現を調節する。

【0077】

配列番号80～82のPNAは、好ましくはBCL2に対し、より好ましくは、これらは、アンチジーン戦略を用いてBCL2の発現を調節する。

【0078】

配列番号83、84のPNAは、好ましくはPLK4に対し、より好ましくは、これらは、アンチジーン戦略を用いてPLK4の発現を調節する。

【0079】

更なる実施形態によれば、前記オリゴヌクレオチドは、二本鎖であり、好ましくはRNAモノマーを含む。好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは、MYCNに対する。

【0080】

あるいは、前記二本鎖RNAオリゴヌクレオチドは、配列番号26及び57を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号27及び58を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号28及び59を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号29及び60を有する相補的オリゴヌクレオチド対、配列番号30及び61を有する相補的オリゴヌクレオチド対からなる群から選択される。前記オリゴヌクレオチドは、好ましくは、MYCNに対する。より好ましくは、これらは、アンチセンス戦略を介して、遺伝子の発現を調節する。

【0081】

10

20

30

40

50

更なる実施形態によれば、前記オリゴヌクレオチドは、DNA-LNAキメラオリゴヌクレオチドであり、好ましくは前記オリゴヌクレオチドは、MYCNに対する。

【0082】

好ましい実施形態によれば、前記DNA-LNAキメラオリゴヌクレオチドは、配列番号24及び25からなる群から選択される。

【0083】

配列番号24及び25は、好ましくはMYCN遺伝子に対する。

【0084】

配列番号24及び25は、好ましくはアンチジーン戦略を介して遺伝子の発現を調節する。

10

【0085】

更なる実施形態によれば、前記オリゴヌクレオチドは、DNAモノマー及び/又は少なくとも1つのホスホロチオエートDNAモノマーを含む一本鎖キメラオリゴヌクレオチドである。前記オリゴヌクレオチドは、好ましくはMYCNに対する。

【0086】

配列番号31及び32からなる群から選択されるメラオリゴヌクレオチドは、特に、本発明の目的に好ましい。配列番号31及び32は、好ましくは、MYCN遺伝子に対する。配列番号31及び32は、好ましくは、アンチセンス戦略を介してMYCNの発現を調節する。

【0087】

20

更なる実施形態によれば、前記オリゴヌクレオチドは、RNAモノマー及び少なくとも1つのモノマー、好ましくは2'-O-(2-メトキシエチル)又は2'-メチルRNAを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチドである。

【0088】

前記オリゴヌクレオチドは、好ましくは、MYCNに対する。配列番号33及び62を有する相補的キメラオリゴヌクレオチド対は、本発明の目的に特に好ましい。前記オリゴヌクレオチド対は、好ましくは、アンチセンス機構を介する遺伝子の発現を調節する。

【0089】

更なる実施形態によれば、前記オリゴヌクレオチドは、RNAモノマー及び好ましくは2'-フルオロRNAの少なくとも1つのモノマーを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチドである。好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは、MYCNに対する。

30

【0090】

配列番号34及び63を有する相補的キメラオリゴヌクレオチド対は、本発明のために特に好ましい。前記オリゴヌクレオチド対は、好ましくは、アンチセンス機構を介して遺伝子の発現を調節する。

【0091】

更なる実施形態によれば、前記オリゴヌクレオチドは、RNAモノマー及び少なくとも1つのLNAモノマーを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチドである。

【0092】

前記オリゴヌクレオチドは、好ましくは、MYCNに対する。配列番号35及び64を有する相補的キメラオリゴヌクレオチド対は、本発明のために特に好ましい。前記オリゴヌクレオチド対は、好ましくは、アンチセンス機構を介して遺伝子の発現を調節する。

40

【0093】

更なる実施形態によれば、前記オリゴヌクレオチドは、RNAモノマー及び少なくとも1つのアラビノシドRNAモノマーを含む二本鎖キメラオリゴヌクレオチドである。

【0094】

好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは、MYCNに対する。配列番号36及び65を有する相補的キメラオリゴヌクレオチド対は、本発明のために特に好ましい。前記オリゴヌクレオチド対は、好ましくは、アンチセンス機構を介して遺伝子の発現を調節する。

【0095】

50

本発明の更なる態様は、治療及び／又は診断目的のための上述のオリゴヌクレオチドの使用に関する。

【0096】

特に、該オリゴヌクレオチドは、遺伝子及び／又はウイルス起源の疾患の治療のために、特に、遺伝子の過剰発現又は阻害のいずれかにより引き起される遺伝子疾患、即ち、過剰発現又は阻害される遺伝子の発現の調節を要求する遺伝子疾患の治療のために、独立して、あるいは組み合わせて用いることができる。

【0097】

本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくはゴリン症候群、ダウン症候群、ファインゴールド症候群、ヒルシュスブルグ病、フォンヒッペル・リンダウ症候群、血管拡張性失調症、リー・フラウメニ症候群、ターコット症候群、家族性腫瘍及びパーキンソン病からなる群から選択される遺伝子疾患の治療的処置のために用いられる。

10

【0098】

さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、子供又は大人において腫瘍性病理の治療的処置に用いられる。特に、参照される腫瘍は、好ましくは、MYC、MYCN、MYCL1、サバイピン(BIRC5)、BCL2、PLK4、ALK及びPKM2からなる群から選択される遺伝子又は癌遺伝子の過剰発現により引き起こされる。あるいは、腫瘍は、好ましくは、好ましくはカスパーゼ-8及びRASSF1からなる群から選択される、癌抑制遺伝子又は抗腫瘍遺伝子の阻害(不活性化)により引き起される。

【0099】

20

参照される腫瘍は、好ましくは、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、髄芽細胞腫、上衣腫、褐色細胞腫、胚性癌、胚細胞腫瘍、肺胞横紋筋肉腫、胚性横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、腎臓の明細胞肉腫、滑膜肉腫、肝芽細胞腫、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ芽球性白血病、パーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性巨核芽球性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病、T細胞白血病、リンパ腫、小細胞肺癌(小細胞癌(microcytoma))、肺腺癌、扁平細胞肺癌、定型及び非定型原発性肺癌、大細胞肺癌、大細胞神経内分泌性肺癌、神経膠芽細胞腫、肝細胞癌、基底細胞癌、卵巣腫瘍、乳房腫瘍及び結腸癌からなる群から選択される。

【0100】

神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、髄芽細胞腫、小細胞肺癌及び基底細胞癌からなる群から選択される腫瘍は、本発明の目的に特に好ましい。

30

【0101】

本発明の主題は、本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチド及び少なくとも1つの医薬的に許容される賦形剤を含む組成物にさらに関する。好ましくは、前記少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、Aであり、好ましくは配列番号2~15、66~84、好ましくは配列番号2~13、より好ましくは配列番号2~8、さらにより好ましくは配列番号2~6からなる群から選択される。特に好ましいオリゴヌクレオチドは、配列番号5である。好ましくは、配列番号5は、5'又は3'末端において、配列番号47と結合する。より好ましくは、配列番号47は、D体のアミノ酸からなる。

【0102】

40

前記PNAは、好ましくは、配列番号47~56からなる群から選択される担体と、好ましくは5'又は3'末端において結合する。

【0103】

本発明の主題は、配列番号1を有するオリゴヌクレオチドを含む本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、少なくとも1つの化合物、好ましくは少なくとも1つの薬理効果を有する化合物、より好ましくは化学療法薬、及び任意で少なくとも1つの医薬的に許容される賦形剤を含む組み合わせにさらに関する。

【0104】

好ましい実施形態では、前記少なくとも1つの化合物は、少なくとも1つの更なるアンチジェン及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は少なくとも1つの薬剤、又は

50

生物学的若しくは生物工学的起源若しくは化学合成に由来する少なくとも1つの化合物、又はこれらの組み合わせである。生物学的若しくは生物工学的起源若しくは化学合成に由来する前記化合物は、好ましくは、モノクローナル抗体、化学療法薬、免疫調製剤、増殖因子、サイトカイン、ペプチド、血管新生阻害剤、腫瘍成長阻害剤、ステロイドホルモン及び/又は非ステロイドホルモン及びビタミンからなる群から選択される。

【0105】

本発明のために特に好ましい化合物の例は、神経成長因子（NGF）、ソマトスタチン、レチノイン酸、アクチノマイシンD、アスパラギナーゼ、プレオマイシン、ブスルファン、カペシタピン、カルボプラチン、シクロホスファミド、シクロスポリン、シスプラチン、シタラピン、クロラムブシル（clorambucil）、ダカルバジン、ダウノルビシン、ドセタキセル、塩酸ドキソルビシン、塩酸エピルビシン、エトポシド、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、塩酸イダルビシン、ヒドロキシ尿素、イソホスファミド（ifosphamide）、塩酸イリノテカン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトキサントロン、ヌトリン（nutline）、オキサリプラチン、パクリタキセル、プロカルバジン、ラルチトレキセド、ストレプトゾシン、テガフル、ウラシル、テモゾロミド、チオグアニン、チオテパ（thiotepa）、トポテカン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン及びビノレルビン及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

10

【0106】

より好ましくは、前記化合物は、カルボプラチン、シスプラチン、エトポシド、ビンクリスチン、シクロホスファミド及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

20

【0107】

出願人は、少なくとも1つの化合物、好ましくは少なくとも1つの上述の化学療法薬と組み合わせた、本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドの投与は、投与される前記化合物の濃度を減少させることを可能にする一方で、同時に治療的有効性の増加及び低い毒性を保證することを発見した。

【0108】

出願人は、これらの条件下で、前記化合物の濃度の減少は、特に病理に依存し；特に化学療法化合物の濃度は、腫瘍の種類に依存することを発見した。腫瘍、例えば：神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、髄芽細胞腫、小細胞肺癌、ウィルムス腫瘍、肺胞横紋筋肉腫及び胚性横紋筋肉腫によつては、本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドと組み合わせて投与される少なくとも1つの化学療法薬の濃度は、最大10倍まで減少させることができる一方で、化学療法薬の通常の用量と同様の治療的効果を保證する。

30

【0109】

本発明の少なくとも1つのPNA、好ましくは配列番号1～15、66～84、好ましくは配列番号1～13、より好ましくは配列番号1～8、より好ましくは配列番号1～6、さらにより好ましくは配列番号1及び/又は5からなる群から選択される少なくとも1つのPNA、並びに好ましくは化学療法薬、より好ましくは、エトポシド（VP16）、カルボプラチン、シスプラチン又はビンクリスチン、シクロホスファミド及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの化合物の組み合わせは医薬的組み合わせとして、（改善された治療効果の点から）特に有効的である。

40

【0110】

配列番号1及びカルボプラチン若しくはエトポシド若しくはシスプラチン若しくはビンクリスチン；又は配列番号5及びカルボプラチン若しくはエトポシド若しくはシスプラチン若しくはビンクリスチンの中から選択される組み合わせは、本発明のために特に好ましい。

【0111】

前記PNAは、その3'及び/又は5'末端において、好ましくは配列番号47～56からなる群から選択される担体と結合する。

【0112】

50

改善された効果は、好ましくは、組み合わせが同時に投与された場合、そして前記少なくとも1つの化合物が連続した時間において、好ましくは時間において、より好ましくは、3時間、6時間、12時間、24時間、48時間、又は72時間の一定間隔で投与される場合の双方において、見出される。

【0113】

他の好ましい実施形態では、配列番号1を有するオリゴヌクレオチドを含む本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、好ましくは、少なくとも1つの媒体粒子、少なくとも1つの媒体ポリマー又は少なくとも1つの自己組織化媒体オリゴヌクレオチド（アプタマーとしても知られる）と、結合又は複合体化させて投与され得る。

【0114】

さらに好ましい実施形態では、配列番号1を有するオリゴヌクレオチドを含む本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、例えば標的組織の好ましい透過のために、少なくとも1つのリポソームミセル、少なくとも1つのマイクロ粒子又は少なくとも1つのナノ粒子と、結合又は複合体化され、そして投与され得る。

【0115】

前記粒子は、通常球状であり、そして特定の送達的手段として用いられる前記粒子は、多くの異なる化合物で製剤化され得る。例えば、前記粒子は、ポリマー化合物、例えばキトサン、ヒアルロン酸、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチレンイミン（PEI）、ポリ乳酸（PLA）、乳酸-グリコール酸共重合体ポリ（PLGA）、ヒドロキシアパタイト（HAP）、多価不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸、陽イオン性脂質、HAP-PLA、HAP-PLA/PGA及びこれらの誘導体を製剤化又は共製剤化され得る。さらに好ましい実施形態では、本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、好ましくは、前述の種類の少なくとも1つの粒子、及び化学又は生物学的起源のいずれかの標的細胞（例えば、GD2、葉酸、TRAIL、NGF）の特定の受容体に対する少なくとも1つのリガンド又は少なくとも1つのリガンドの部分と結合又は複合体化させて投与され得、標的細胞における本発明の前記オリゴヌクレオチドの内在化を好むのに有用であるアジュバントとしてポリマー膜に存在し得る。

【0116】

さらに好ましい実施形態では、本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの標的細胞の受容体に特異的なリガンド又はリガンドの部分（例えば、GD2（ガングリオシドGD2）、葉酸、TRAIL（TNF関連アポトーシス誘導リガンド）、NGF（神経成長因子））と結合し得る。

【0117】

さらに好ましい実施形態では、配列番号1を有するオリゴヌクレオチドを含む本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、好ましくは標的細胞及び/又は組織の透過を容易にすることにより、これらの有効性を増大させるために、少なくとも1つの更なる医薬用途に関連して、それ自体又は組み合わせて投与され得る。

【0118】

前記医療用途は、好ましくは、酸素療法、磁気療法、温熱療法、電気刺激、超音波、放射線療法、化学療法及び光線療法からなる群から選択される。

【実施例】

【0119】

実施例1

オリゴヌクレオチドの化学合成

オリゴヌクレオチドの化学合成は、保護基である5'-OH上の4'-ジメトキシトリチル（DMTr）、及び3'-リン酸基上の-シアノエチルで修飾されたDNAヌクレオシドホスホロアミダイトの使用に基づき；保護基はまた、さもなければ反応性が高すぎる第一級アミン（核塩基複素環）のために用いられる。

【0120】

DNAオリゴヌクレオチドの化学合成は、3'-5'方向で行なわれる。第1のヌクレ

10

20

30

40

50

オチド塩基で機能化されたCPG（制御孔ガラス（controlled pore glass）の頭文字）樹脂又はポリスチレン支持体を使用される。合成は、ジクロロメタン（DCM）中3%トリクロロ酢酸（TCA）の溶液を用いて、5'-ジメトキシトリチル基を脱保護する工程で開始される。エチルチオテトラゾール（ETT）又はベンジルチオテトラゾール（BT T）0.3Mを用いた、配列に挿入される第二の塩基に対応するホスホロアミダイトの活性化が続き、これは先に脱保護された5'-OHと結合し、これによりホスホジエステル結合を形成する。

【0121】

次の工程は、反応していない5'-OH基のアセチル化を果たす「キャッピング」である。キャッピングは、テトラヒドロフラン（THF）/ルチジン/無水酢酸（8:1:1）を含むものとTHF中メチルイミダゾールの10%溶液を含むもの2つの溶液を用いて行なわれる。亜リン酸トリエステルの不安定な三価の結合は、これを5価のホスホジエステルに酸化するTHF/ピリジン溶液中ヨウ素により安定化される。

10

【0122】

酸化後、導入等される第二の単位の脱トリチルで開始するサイクルは繰り返される。このサイクルは、配列に挿入されることが必要な塩基の数に応じて、必要な回数繰り返される。最終的に、最後の5'-DMTr基は室温において酸での処理により除去される。

【0123】

塩基上に存在する保護基に応じて（同様に選択された塩基、PTO、2'-OMe等の化学的特性に応じて）、シアノエチル基の-脱離によるリンの脱保護及び核塩基複素環上の保護基の除去のために、55で16時間水酸化ナトリウムと、あるいは55で35分間水酸化アンモニウム/メチルアミン（AMA）溶液と放置し得る。

20

【0124】

あるいは、5'-DMTr基は、最終生成物を副産物からより精製し、そして最終的に酢酸での処理により除去するために、分析（HPLC、MS）及び分取クロマトグラフィーの期間を通して維持され得る。

【0125】

RNAオリゴヌクレオチドの化学合成は、リボース上に存在する2'-OH基、及びこれによる各ホスホロアミダイトについてのさらなる保護基の存在により、DNAオリゴヌクレオチドの化学的合成と異なる。

30

【0126】

結果として、RNAオリゴヌクレオチドの合成は、長いカップリング時間、及びその基を脱保護する更なる工程を要求する。

【0127】

上述のように同様のプロトコールは、化学的に修飾されたモノマーを含むオリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオエート（PTO）、2'-O-メチル（2'-OMe）、2'-フルオロ（2'-F）、アラビノシド核酸（ANA）、及びロックド核酸（LNA）の合成についても用いられる。

【0128】

各修飾された塩基についての特定の技術の詳細は、企業により提供され、該モノマー分子は、（Link Technologies Ltd.）から購入される。

40

【0129】

モルホリノは、製造者（Gene Tools, LLC）から購入される。

【0130】

PNAオリゴヌクレオチドの合成は、10 μmolスケールで行なわれ、精製及び特性決定工程を含んだ。

【0131】

分子の合成を、Rink Amide-Chemmatrix（登録商標）樹脂及びSyro自動合成装置（Multi SynTech）を用いて、固相で行なった。合成の第一のモノマーは、手動で樹脂と結合される。自動合成サイクルは、3つの工程に分けられる。第1の工程は、DMF（ジメチルホ

50

ルムアミド) 中 20% ピペリジンの溶液を用いて行なわれる脱保護である。

【0132】

第二の工程は、モノマーの導入と鎖伸長の間のカップリング反応である。この反応は、2, 6-ルチジンの8%溶液及びDMF中DIEA(N, N-ジイソプロピルエチルアミン)を含むアルカリ環境中で、NMP(N-メチルピロリドン)中50.22M等量(eq)のモノマー(FMOC-PNA-G(Bhoc)-OH、FMOC-PNA-(Bhoc)-OH、FMOC-PNA-C(Bhoc)-OH、FMOC-PNA-T-OH)、及び4.50.32M eqのDMF中活性化剤(この場合HATU)を添加することにより行なわれる。カップリング反応は、ペプチド鎖からPNAの1つまでの経路において、予めロードされた樹脂上で、及び最後のモノマー上で、1番目のモノマーと2番目のモノマーとの結合の点において、二重に繰り返される。

10

【0133】

第3の工程は、カップリング工程の間、反応しない部位をアセチル化により妨害するのに役立つ「キャッピング」反応である。該反応は、DMF中6% 2, 6-ルチジン及び5% 無水酢酸を含む溶液を用いることにより、達成される。合成が完了すると、該分子は、固体支持体から除去される。

【0134】

この反応は、4:1の比におけるTFA(トリフルオロ酢酸)とメタクレゾールの溶液で得られる。

【0135】

20

このようにして得られる分子は、ジエチルエーテル中での沈殿により回収される。

【0136】

一度水中で回収され、それはHPLCで精製される。精製のために用いられるカラムは、C18 300Å 5µ Jupiter((著作権)Phenomenex、Inc.)である。精製は、30分、100%A(水95%;アセトニトリル5%;0.1%TFA)-0%B(水60%;アセトニトリル40%;0.1%TFA)から60%A-40%Bまでの線形勾配を用いておこなった。用いられる完全な勾配は、0~5分 0%B; 5~35分 40%B; 35~37 100%B; 37~42 100%B; 42~44 0%Bである。

【0137】

30

最終的に、精製産物は、ESI質量分析計((著作権)Waters)により分析される。

【0138】

遺伝子転写を妨害するためのアンチジーンオリゴヌクレオチド

本発明に記載されるパラメータに従って選択及び設計された本発明のオリゴヌクレオチドが、遺伝子の転写を選択的に妨害するために機能することを実証するために、MYCN遺伝子に対するPNA型オリゴヌクレオチドを設計及び合成した; これらを表1に示す。

【0139】

【表 1 - 1】

表 1

配列番号	PNA 配列	% GC	mRNA 阻害 (%)	細胞増殖 (%)	Phoenix 増殖 (%)	NIH-3T3 増殖 (%)
配列 番号 1	<u>ATGCCGGGCATGATCT</u>	56.3	42	70	100	100
配列 番号 2	<u>GGGTGGATGCGGGGGG</u>	81.3	75	32	100	100
配列 番号 3	<u>GATGCGGGGGGCTCCT</u>	75	68	41	100	100
配列 番号 4	<u>GTCGGCGGGAGGTAAG</u>	68.8	65	48	100	100
配列 番号 5	<u>GCTGGGTGGATGCGGG</u>	75	62	53	100	100
配列 番号 6	<u>TGGACGCGCTGGGTGG</u>	75	60	54	100	100
配列 番号 7	<u>CGCGCTGGGTGGATGC</u>	75	58	57	100	100
配列 番号 8	<u>GTCTGGACGCGCTGGG</u>	75	54	59	100	100
配列 番号 9	<u>CCCTGCAGTCGGCGGG</u>	81.3	51	64	100	100
配列 番号10	<u>CGGCCGCGGGCCGCCA</u>	93.8	51	65	100	100

10

20

30

【表 1 - 2】

配列 番号11	<u>GGG</u> AACTGTGT <u>TGG</u> AG	56.3	48	68	100	100
配列 番号12	TGTCT <u>GGA</u> CGCGCT <u>GG</u>	68.8	47	69	100	100
配列 番号13	ACGCTCAG <u>GG</u> ACCACG	68.8	48	66	100	100
配列 番号14	CCC <u>GGA</u> CGAAGATGAC	62.5	40	70	100	100
配列 番号15	ACTGTGT <u>TGG</u> AGCCGA	56.3	37	77	100	100
配列 番号16	CCTGTCGTTAGACAGCT	56.3	14	90	100	100
配列 番号17	TGTGACAGTCATCTGT	56.3	10	98	100	100
配列 番号18	GTGACAGTCATCTGTC	50	10	98	100	100
配列 番号19	GACAGTCATCTGTCTG	50	5	100	100	100
配列 番号20	CGTCGATTTCTTCCTC	50	5	100	100	100
配列 番号21	CTCGAGTTTGA <u>CT</u> CGC	56.3	1	100	100	100
配列 番号22	GCGCCTCC <u>CT</u> GATTT	62.5	2	100	100	100
配列 番号23	ATATCCCCGAGCTTC	56.3	2	100	100	100

【0140】

PNAオリゴヌクレオチドは、個別に、そして細胞膜透過を好適にする目的のために、3'及び/又は5'末端において担体と結合させて試験される。特に、オリゴヌクレオチドは、3'のカルボキシル末端において、配列番号43のアミノ酸、即ち、プロリン-リジン-リジン-リジン-アルギニン-リジン-バリンと結合した。

【0141】

配列番号1を有するオリゴヌクレオチドは、欧州特許第1618195号の主題であった配列であり、対照配列、及び比較のために用いられる配列を表す。

【0142】

配列番号2～15を有するオリゴヌクレオチドは、2つの連続するグアニンの1つの群（配列番号14、15）、又は3つの連続するグアニンの1つの群（配列番号13）、又は2つの連続するグアニンの2つの群（配列番号12）、又は2グアニンの1つの群及び3つの連続するグアニンの1つの群（配列番号11、10、9、8及び7）、又は2つの連続するグアニンの2つの群及び3つの連続するグアニンの1つの群（配列番号6及び4）、又は2つの連続するグアニンの1つの群及び3つの連続するグアニンの2つの群（配

列番号 5)、又は 6 つの連続するグアニンの 1 つの群 (配列番号 3)、又は 6 つの連続するグアニンの 1 つの群、3 つの連続するグアニンの 1 つの群及び 2 つの連続するグアニンの 1 つの群 (配列番号 2) を含む。

【0143】

連続するグアニンの群を、表 1 に下線で示す。

【0144】

配列番号 16 ~ 23 を有するオリゴヌクレオチドは、連続するグアニンの群を有さない陰性対照である。

【0145】

さらに、遺伝子の転写を選択的に調節するために、配列番号 24 ~ 25 を有するオリゴヌクレオチドを設計及び合成した；これらを表 2 に示す。

【0146】

【表 2】

表 2

配列番号24	DNA- <u>LNA</u> 25-1	<u>ATGCCGGGCATGATC</u> T
配列番号25	DNA- <u>LNA</u> 25-2	<u>ATGCCGGGCATGATC</u> <u>T</u>

20

【0147】

特に、DNA モノマー及び LNA モノマー (配列番号 24 及び 25) を含む一本鎖キメラオリゴヌクレオチドは、設計及び合成された。

【0148】

オリゴヌクレオチド配列中の DNA 塩基は、太字で塩基として示される一方で、LNA モノマーは下線が引かれる。文献 (Koch T, Biochem J 2001, 354 (Pt 3):481-4; Koji Nagahama, Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19 (10): 2707-9) に報告されるように、内因性ヌクレアーゼにより迅速に分解されることを避けるために、各キメラオリゴヌクレオチド分子は、1、2 又は 3 DNA 塩基の間隔を空けられた LNA モノマーを挿入することにより設計及び合成された。

30

【0149】

遺伝子翻訳を妨害するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明に記載されるパラメータに従って選択及び設計された本発明のオリゴヌクレオチドが、標的遺伝子の翻訳を選択的に妨害するために機能することを実証するために、MYCN 遺伝子に対する配列番号 26 ~ 36 を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、合成し、そして実験的にインビトロで分析した。これらを表 3 に示す。

【0150】

【表 3】

表 3

配列 番号		センス配列		アンチセンス 配列
配列 番号26	siMYCN (795)	UGAAGAUGAUGAAGAGGAA	配列 番号57	UUCCUCUUCUACAUC UUCA
配列 番号27	siMYCN (799)	GAUGAUGAAGAGGAAGAUG	配列 番号58	CAUCUCCUCUUCU CAUC
配列 番号28	siMYCN (801)	UGAUGAAGAGGAAGAUGAA	配列 番号59	UUCAUCUCCUCUUC AUCA
配列 番号29	siMYCN (808)	GAGGAAGAUGAAGAGGAAG	配列 番号60	CUUCCUCUUCUUCU CCUC
配列 番号30	siMYCN (810)	GGAAGAUGAAGAGGAAGAA	配列 番号61	UUCUCCUCUUCUAC UUCC
配列 番号31	MYCN- PTO (1) as			CGTGGAGCAGCTCGG CAT
配列 番号32	MYCN- PTO (763) as			CAGGGTGTCTCTCC GGA
配列 番号33	siRNA- 2'- OMe- RNA 808	GAGGAAGAUGAAGAGGAAG TT	配列 番号62	CUUCCUCUUCUUCU CCUCTT
配列 番号34	siRNA- 2'-F- RNA 808	CAGGAAGAUGAAGAGGAAG UU	配列 番号63	GUUCCUCUUCUUCU CCUCUU
配列 番号35	siRNA- LNA 808	GAGGAAGAUGAAGAGGAAG TT	配列 番号64	CUUCCUCUUCUUCU CCUCTT
配列 番号36	siRNA- ANA 808	CAGGAAGAUGAAGAGGAAG AA	配列 番号65	GUUCCUCUUCUUCU CCUCAA

【0151】

RNA（低分子干渉RNA（siRNA）（配列番号26～30）に基づく相補的二本鎖オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子であるMYCNの翻訳を選択的に調節するために生産された。

【0152】

さらに、ホスホジエステル結合がホスホロチオエートに改変されたDNA型オリゴヌクレオチドである配列番号31及び32が生産された。

【0153】

10

20

30

40

50

二本鎖キメラオリゴヌクレオチド：RNAモノマー及びモノマー 2' - O - メチル（配列番号 33）に基づくもの；RNAモノマー及び 2' - フルオロモノマー（配列番号 34）に基づくもの；RNAモノマー及び LNAモノマー（配列番号 35）に基づくもの並びに RNAモノマー及びアラビノシド RNAモノマー（配列番号 36）に基づくものも生産された。配列番号 33 ~ 36 のオリゴヌクレオチド配列では、2' - O - メチル、2' - フルオロ、LNA 及びアラビノシド（ANA）モノマーが太字で表される一方で、少なくとも 2 つの連続するグアニンの各群は、下線が引かれる。

【0154】

オリゴヌクレオチドの siRNA は二本鎖であるので、キメラは、3' 及び 5' の双方において相補鎖と対にならない 2 つの 2' - Me モノマー、又は 2 つの 2' - フルオロモノマー、又は 2 つの LNA モノマー、又は 2 つの RNA アラビノシドモノマーを残すような態様において設計及び合成され、これにより細胞酵素により迅速に分解されるのを回避した。

10

【0155】

オリゴヌクレオチドを用いた処理 - Q T - P C R

本発明のオリゴヌクレオチドの標的遺伝子の発現を調節する能力を評価するために、メッセンジャー RNA の量を減少させるこれらの能力を、リアルタイム P C R 技術を用いて分析した。

【0156】

この目的のために、24 ウェルプレートが用いられ、ウェルあたり、0.3 ml の O P T I - M E M（GIBCO BRL）培地、4 % F B S 及び 2 mM L - グルタミンとともに 5×10^4 細胞を播種した（三重に実験を行なった）。

20

【0157】

細胞を、5 % C O₂ を含む雰囲気下で、37 °C で 24 時間インキュベートし、ウェルの塩基を付着させた。

【0158】

PNA オリゴヌクレオチドを除いて、分析される各オリゴヌクレオチドを予め、2 µl のリポフェクトアミン 2000（Invitrogen）、0.3 mL の無血清 O P T I - M E M（GIBCO BRL）培地とインキュベートした。

【0159】

各ウェルについて、以下の最終濃度において、オリゴヌクレオチドを分析した。

30

- ・アンチセンスオリゴヌクレオチド siRNA 及び siRNA ギャップマー（即ち、3' 又は 5' 末端において化学的に修飾された核酸の 1 又は複数のモノマーを含むオリゴヌクレオチドである一方で、中央の部分において、これらが、修飾されていない、又はホスホロチオエート結合としてホスホジエステル結合のレベルにおいて修飾される核酸のモノマーを有する）を 200 nM において用い；

- ・ホスホロチオエート DNA モノマー、RNA アンチジーンオリゴヌクレオチド（agRNA）を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、並びに DNA モノマー及び LNA モノマーを含むオリゴヌクレオチドを 10 µM において用い；

- ・モルホリノオリゴヌクレオチドを 1 µM の濃度において投与し；そして

40

- ・PNA オリゴヌクレオチドを 1 µM の濃度において投与した。

【0160】

細胞をオリゴヌクレオチドで処理し、その投与の 6 時間後、最大 4 % の F B S を添加した。24 時間後、合計の RNA を各ウェルから抽出し、RNeasy Mini Kit（QIAGEN）を用いて精製した。

【0161】

アッセイを MYCN 発現と相関する 5 つの異なるヒト腫瘍から得られた 8 細胞株に関して行なった。即ち、

- ・神経芽細胞モデルとして、細胞株 Kelly、IMR - 32（MYCN 遺伝子を増幅及び過剰発現する）並びに SKNB E2c 及び LAN1（MYCN 遺伝子を増幅及び過剰

50

発現し、そして p 5 3 遺伝子は突然変異誘導される)を使用し；

・横紋筋肉腫 (rabdomiosarcoma) モデルとして、M Y C N 遺伝子を増幅及び過剰発現する細胞株 R H 3 0 を使用し；

・ウィルムス腫瘍 (rabdomiosarcoma) モデルとして、M Y C N 遺伝子を増幅及び過剰発現する細胞株 W i T 4 9 を使用し；

・網膜芽細胞腫 (rabdomiosarcoma) モデルとして、M Y C N 遺伝子を増幅及び過剰発現する細胞株 Y 7 9 を使用し；

・小細胞肺癌のモデルとして、M Y C N 遺伝子を増幅及び過剰発現する細胞株 H 6 9 を使用した。

【 0 1 6 2 】

対照として、オリゴヌクレオチドの代わりに滅菌水で処理した上述の同じ細胞株を使用した。各 R N A サンプルを NanoDrop ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies) を用いて (二重に) 定量した。c D N A の第一の鎖を cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche) を用いて生産した。c D N A 反応については、合計 1 μ g の R N A を用いた。リアルタイム P C R については、2 0 μ l の最終容量中 1 0 n g の c D N A を SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems) とともに用いた (3 つの同一の実験を三重に行なった)。リアルタイム P C R を実行するために用いられるプライマーの配列及び濃度を表 4 に示す。2 つのハウスキーピング遺伝子；G A P D H 及び - アクチン (A C T B) を陽性対照として用いた。

【 0 1 6 3 】

Q T - P C R 反応の条件は、9 5 1 0 分、9 5 2 0 秒、そして 6 0 3 0 秒の 5 0 サイクルであった。

【 0 1 6 4 】

【表 4】

表 4

プライマー	配列	濃度	配列番号
MYCN センス	CGACCACAAGGCCCTCAGT	300 nM	配列番号 37
MYCN アンチセンス	TGACCACGTCGATTTCTTCCT	300 nM	配列番号 38
ACTB センス	GAGCACAGAGCCTCGCCTTTG	300 nM	配列番号 39
ACTB アンチセンス	ACCATCACGCCCTGGTGCCTG	300 nM	配列番号 40
GAPDH センス	CCAATATGATTCCACCCATGGC	300 nM	配列番号 41
GAPDH アンチセンス	CTTGATTTTGGAGGGATCTCGC	300 nM	配列番号 42

【 0 1 6 5 】

オリゴヌクレオチドによる処理 - 細胞増殖アッセイ

本発明のオリゴヌクレオチドの遺伝子調節能力を評価するために、細胞生存率に関するこれらの投与の効果を測定した。

【 0 1 6 6 】

この目的のために、ウェル当たり、4 % F B S 及び 2 m M の L - グルタミンを含む 1 0

0 μ l の OPTI-MEM (GIBCO BRL) 培地とともに 5×10^3 細胞を 96 ウェル細胞培養プレートに播種した (実験は三重に行なわれた)。

【0167】

用量効果関係を観察するために、PNA オリゴヌクレオチドを様々な濃度 (1 μ - 2.5 μ - 5 μ - 10 μ) において投与した。

【0168】

全て及び他のオリゴヌクレオチドに関して、これらが投与される濃度は、オリゴヌクレオチドでの処理 - QT-PCR の段落に記載する。

【0169】

処理される細胞の生存率を、処理の 48、72、96 及び 168 時間後に測定した。

10

【0170】

細胞生存率を、ATP-Lite assay (Luminescence ATP Detection Assay System、PerkinElmer) により評価し、未処理の対照細胞のウェルの平均値と比較した、処理されたウェルの平均シグナルとの割合として報告する。細胞を、キットにより提供される使用説明書に従って処理した。

【0171】

MYCN 遺伝子メッセンジャーのレベルを決定するのに用いられる、オリゴヌクレオチドでの処理 - QT-PCR の段落に記載されるのと同様の細胞株に関して、アッセイを行った。

【0172】

20

結果

PNA オリゴヌクレオチドに関する限り、MYCN 遺伝子の転写を阻害するこれらの能力及び Kelly 細胞の増殖に関する結果を表 1 に示す。表 6 は、分析される PNA の様々な濃度において増殖する Kelly 細胞の値 (パーセンテージの形態) を示す。

【0173】

【表 5】

表 5

配列 番号	配列	細胞 増殖 (%) 1 μ M 72h	細胞 増殖 (%) 2, 5 μ M 72h	細胞 増殖 (%) 5 μ M 72h	細胞 増殖 (%) 10 μ M 72h
配列 番号 1	<u>ATGCCGGGCATGAT</u> CT	89	66	50	24
配列 番号 2	<u>GGGTGGATGCGGGG</u> GG	74	32	12	2
配列 番号 3	<u>GATGCGGGGGGCTC</u> CT	78	41	19	3
配列 番号 4	<u>GTCGGCGGGAGGTA</u> AG	78	48	21	3
配列 番号 5	<u>GCTGGGTGGATGCG</u> GG	79	53	27	5
配列 番号 6	<u>TGGACGCGCTGGGT</u> GG	82	59	35	13
配列 番号 7	<u>CGCGCTGGGTGGAT</u> GC	80	54	31	8
配列 番号 8	<u>GTCTGGACGCGCTG</u> GG	80	57	32	11
配列 番号 9	<u>CCCTGCAGTCGGCG</u> GG	86	64	42	20
配列 番号 12	<u>TGTCTGGACGCGCT</u> GG	84	60	40	16

【 0 1 7 4 】

結果は、標的遺伝子の翻訳されたタンパク質に関するこれらの PNA の阻害効果が、大
変選択的、且つ特異的であることを実証する。さらに、アンチジーン PNA の投与後、モ
デルとして用いられる腫瘍細胞の増殖の停止 (MYCN 遺伝子の増幅により特徴付けられ
る) に続いて、直接的にアポトーシスが起こることが観察された。

【 0 1 7 5 】

一般的に、配列番号 2 ~ 配列番号 13 (1 つ又は複数の G の群を含む) を有する PNA
アンチジーンオリゴヌクレオチドは、G の群を欠く PNA オリゴヌクレオチド (配列番号
16 ~ 配列番号 23) と比較して、優れたアンチジーン効果 (即ち、MYCN mRNA 及
び MYCN 発現に伴う腫瘍細胞の増殖の阻害) を有する。

【 0 1 7 6 】

特に、表 1 及び表 5 に示される結果は、配列番号 2 ~ 配列番号 13 の配列が、欧州特許
第 1618195 号の主題である配列番号 1 の配列よりも優れたアンチジーン効果を有す
ることを実証する。

【 0 1 7 7 】

配列番号 7 ~ 配列番号 12 (2 又は 3 つの連続する G の 2 つの群を含む) の配列は、配
列番号 1 の配列、及び配列番号 13 ~ 配列番号 15 の配列 (2 又は 3 の連続する G の 1 つ

の群のみを含む)よりも優れたアンチジーン効果を有することを示す。

【0178】

配列番号4～配列番号6(2又は3つの連続するGの3つの群を含む)の配列は、配列番号7～配列番号12の配列(2又は3つの連続するGの2つの群を含む)よりも優れたアンチジーン効果を有することを示す。

【0179】

6つの連続するGの1つの群を含む配列番号3は、配列番号1の配列、及びGの1、2又は3つの群を含む配列番号4～配列番号12の配列(各群は、最大2又は3つの連続するGからなる)よりも優れたアンチジーン効果を有することを示す。

【0180】

2又は3つの連続するGの2つの群に加えて、連続するGの3つの群を含み、6つの連続するGの1つの群もまた含む配列番号2は、6つのGの1つの群のみを含む配列番号3、及び配列番号1の配列、及びGの1又は2又は3の群を含む配列番号4～配列番号12の配列(各群は、最大2又は3つの連続するGからなる)の両者よりも優れたアンチジーン効果を有することを示す。

【0181】

さらに、配列番号1～23を有するオリゴヌクレオチドを、一連の線維芽細胞(NIH-3T3及びPhoenix)に投与し、結果を表1に示す(最後の2列)。

【0182】

結果は、分析されたオリゴヌクレオチドが、これらの細胞(即ち、標的遺伝子、この場合MYCNを発現しない細胞)に関して特別に有効的でなく、毒性を有しないことを明確に実証する。

【0183】

実際、非腫瘍性の線維芽細胞のこれらの2つの株における細胞増殖において変化は観察されず、そしてこの結果は、PNAオリゴヌクレオチドが、MYCNの発現を阻害する特異的な効果をもって作用する一方で、これらは、MYCNを発現しない細胞において、非特異的な毒性効果を有さないことを意味する。

【0184】

それ故、本発明に記載されるパラメータに基づいて設計されたPNAオリゴヌクレオチドが、標的遺伝子に関して、そしてこの遺伝子を発現/過剰発現する細胞に関して、特異的且つ有効的に作用することが推定され得る。

【0185】

配列番号1～12を有するPNAはまた、MYCNを過剰発現する様々な細胞株(Kelly、SKNB2c、RH30、WIT49、WERI-Rb11及びH69)に関する試験された。結果を表6に示し、MYCN遺伝子のタンパク質翻訳の生産物に関してPNAの阻害効果の選択性及び特異性を確認する。

【0186】

10

20

30

【表 6】

表 6

配列番号	配列番号 1	配列番号 2	配列番号 3	配列番号 4	配列番号 5	配列番号 6	配列番号 7	配列番号 8	配列番号 9	配列番号 10	配列番号 11	配列番号 12
Kelly %mRNA	48	75	68	65	62	60	58	54	51	51	50	50
Kelly %細胞増殖	66	32	41	48	53	54	57	59	60	64	64	65
SKNBE2c %mRNA	41	75	68	60	59	62	60	62	58	41	40	40
SKNBE2c %細胞増殖	72	52	53	59	64	57	58	56	64	70	71	71
RH30 %mRNA	39	74	65	57	56	56	55	58	50	29	31	32
RH30 %細胞増殖	76	56	59	62	64	64	63	60	71	80	78	77
WiT49 %mRNA	62	78	75	73	69	68	70	72	66	60	60	62
WiT49 %細胞増殖	74	54	57	60	63	65	60	62	68	70	72	73
WERI-Rb1 %mRNA	31	46	43	41	38	37	38	40	36	30	30	30
WERI-Rb1 %細胞増殖	82	79	78	79	80	80	79	78	79	85	84	84
H69 %mRNA	40	58	55	55	54	55	55	56	50	41	41	40
H69 %細胞増殖	77	61	63	66	68	69	67	66	70	79	78	78

【 0 1 8 7 】

配列番号 5 を有するアンチジーン P N A オリゴヌクレオチドは、より詳細な態様において分析された。

【 0 1 8 8 】

特に、グアニンの連続を中断するために、配列中に存在する連続するグアニンの群が修飾された、修飾されたオリゴヌクレオチド（連続するグアニンの群は下線を引かれる一方

10

20

30

40

50

で、修飾されたグアニンの群は、太字で記載される)を合成し、そしてK e l l y細胞 (M Y C Nを発現する)に関してインビトロで分析した。

【 0 1 8 9 】

結果(表7に要約される)は、グアニンの連続が、遺伝子の発現を調節する活性のために非常に重要であるという事実を明確に実証する。実際、配列番号5を有するP N Aの連続するグアニンの全ての群に突然変異が誘発された配列番号43を有するP N AはP N Aの阻害活性の喪失を引き起す一方で、連続するグアニンの3つの群のうち1つ又は2つの変異は、著しく損なわせるが、分子の阻害活性を完全に抑制しない。

【 0 1 9 0 】

【表7】

10

表7

配列番号	配列	mRNA 阻害 (%) (Kelly)	(Kelly) 細胞 増殖%
配列番号5	GCTGGGTGCATGCGGG	62	53
配列番号43	GCTGAGTCGATGCGTG	0	100
配列番号44	GCTGAGTGGATGCGTG	25	89
配列番号45	GCTGGGTCGATGCGGG	47	69
配列番号46	GTTGGGTGGATGTGGG	58	60

20

【 0 1 9 1 】

D N Aモノマー及びL N Aモノマーを含み、そしてこれらの標的としてM Y C N遺伝子を有するキメラオリゴヌクレオチドを横紋筋肉腫細胞(alveolar rabdomyosarcoma)(R H 3 0)に関してインビトロで試験した。結果を表8に要約し、これらのオリゴヌクレオチドが、強く、特異的なアンチジーン活性を有することを実証する。

30

【 0 1 9 2 】

【表8】

表8

配列 番号	名称	配列	mRNA 阻害 (%)	細胞 増殖 (%)
配列 番号24	DNA-LNA 25-1	ATGCCGGGCATGA TCT	23	75
配列 番号25	DNA-LNA 25-2	ATGCCGGGCATGA TCT	24	78

40

【 0 1 9 3 】

本発明に記載されるパラメータに従って、出願人により設計及び合成されるアンチセンスオリゴヌクレオチドを、横紋筋肉腫細胞(alveolar rabdomyosarcoma)(R H 3 0)に関してインビトロで分析した。結果を表9に要約し、オリゴヌクレオチドが、特定の且つ有効的な態様において、M Y C N転写を阻害することができることを示し;さらに、これ

50

らは、また、MYCN遺伝子について現在入手可能である標準的なアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも、より有効的な態様において、腫瘍細胞増殖を選択的に阻害することができる（Chung DH, Bioch Bioph Res Commun, 2006, 351 (1): 192-7）。特に、表11に記載され、出願人により同定され、且つMYCN mRNAに対する siRNA は、最低70%～最大85%の範囲でMYCN mRNAを阻害するアンチセンス活性を発揮する。

【0194】

【表9】

表9

配列番号		配列センス	配列アンチセンス	mRNA阻害 (%)	細胞増殖 (%)
配列番号26	siMYCN (795)	UGAAGAUGAU GAAGAGGAA	UUCCUCUUCA UCAUCUUCA	82	28
配列番号27	siMYCN (799)	GAUGAUGAAG AGGAAGAUG	CAUCUCCUC UUCAUCAUC	70	43
配列番号28	siMYCN (801)	UGAUGAAGAG GAAGAUGAA	UUCAUCUCC UCUUCAUCA	78	35
配列番号29	siMYCN (808)	GAGGAAGAUG AAGAGGAAG	CUUCCUCUUC AUCUCCUC	85	28
配列番号30	siMYCN (810)	GGAAGAUGAA GAGGAAGAA	UUCUCCUCU UCAUCUCC	81	30
配列番号31	MYCN-PTO (1) as		CGTGGAGCAG CTCGGCAT	34	73
配列番号32	MYCN-PTO (763) as		CAGGGTGTCC TCTCCGA	45	65
配列番号33	siRNA-2'-OMe-RNA 808	GAGGAAGAUG AAGAGGAAGT T	CUUCCUCUUC AUCUCCUCT T	13	85
配列番号34	siRNA-2'-F-RNA 808	CAGGAAGAUG AAGAGGAAGU U	GUUCCUCUUC AUCUCCUCU U	59	52
配列番号35	siRNA-LNA 808	GAGGAAGAUG AAGAGGAAGT T	CUUCCUCUUC AUCUCCUCT T	34	68
配列番号36	siRNA-ANA 808	CAGGAAGAUG AAGAGGAAGA A	GUUCCUCUUC AUCUCCUCA A	69	35

10

20

30

40

50

【 0 1 9 5 】

本発明のオリゴヌクレオチドが、癌に対する治療プロトコールにおいて現在用いられる化学療法薬の濃度を低下させることができるか否かを確かめるために、それらを化学療法薬と同時に投与した。

【 0 1 9 6 】

研究は、様々なヒト及びマウス神経線維芽腫瘍細胞株（SMS-KAN、LAN 1、IMR-32、SMS-KCN、Kelly、NH02A、SKNB2c）に関してPNAと化学療法薬（カルボプラチン、エトポシド（VP16）、シスプラチン及びビンクリスチン）間の関連する効果に関して行なわれた。

【 0 1 9 7 】

実行される治療において用いられる治療スケジュールは、PNAで処理される細胞に提供され、そして、その後予め見積もられた時間（6又は12時間であり得る）において、化学療法薬が投与された。

【 0 1 9 8 】

結果は、これらの化合物と本発明のオリゴヌクレオチドとの関連は、特定の濃度範囲において、同様の化合物を用いた個別の処理よりも優れた治療効果を示したことを実証する。

【 0 1 9 9 】

特に、本発明のオリゴヌクレオチド及び薬理効果を有する他の化合物からなる組み合わせでの、同時（concomitant）及び同時（simultaneous）又は異なる時間間隔（3時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間等）における処置が、所望の治療効果を増強するのに役立つことが観察され得る。

【 0 2 0 0 】

それ故、出願人により同定される1又は複数のオリゴヌクレオチドと化学療法薬との組み合わせは、同様の効果を与える一方で、現在の標準的な治療濃度と比較して、10倍も化学療法薬の濃度を減少させることが可能となる。

【 0 2 0 1 】

特に、この研究の結果は、配列番号1が、オリゴヌクレオチド又はそれ自身に関する前述の化学療法薬による処置において得られる効果と比べて、ビンクリスチン、又はエトポシド、又はカルボプラチン、又はシスプラチンとの組み合わせで投与される場合、細胞増殖の阻害の観点から、相乗効果を有することを実証する。

【 0 2 0 2 】

実施例 2

本発明をサポートするために、表10に要約されるオリゴヌクレオチドも合成した。特に、表10は、オリゴヌクレオチド配列、配列番号、（G+C）含量のパーセンテージ値及び遺伝子を示し、合成されたオリゴヌクレオチドに対する。オリゴヌクレオチドの合成は、実施例1のように達成された。

【 0 2 0 3 】

10

20

30

【表 10】

表10

	配列番号	% GC
MYCN	配列番号66	TCGGGAGCAGTGGGCA
	配列番号67	GCGGGTCGCGGGCACG
	配列番号68	TGGAGGTCGGCGCCGG
	配列番号69	TCGGCGGGAGGTAAGG
MYC	配列番号70	CTCAGAGGCTTGGCGG
	配列番号71	GCGGCCGGCTAGGGTG
	配列番号72	CGGCCGGCTAGGGTGG
	配列番号73	CGACGGCGGTGGCGGG
	配列番号74	GGACGGGGGCGGTGGA
BIRC5	配列番号75	GCGGCGGCATGGGTGC
	配列番号76	GGCGGCGGCATGGGTG
ALK	配列番号77	GCAGGAGAGGACGGTA
	配列番号78	CAGGAGAGGACGGTAC
	配列番号79	GGCAGGAGAGGACGGT
BCL2	配列番号80	GGATGGCGCACGCTGG
	配列番号81	GGGAAGGATGGCGCAC
	配列番号82	CCACGGTGGTGGAGGA
PLK4	配列番号83	ACGGCAAGCGGCGGGA
	配列番号84	GGACGGCAAGCGGCGG

10

20

30

【0204】

特に、MYCNに対して配列番号66～69、MYCに対して配列番号70～74、BIRC5に対して配列番号75、76、ALKに対して配列番号77～79、BCL2に対して配列番号80～82、及びPLK4に対して配列番号83、84が合成された。

【0205】

オリゴヌクレオチドを、目的の遺伝子が過剰発現する細胞モデルにおける遺伝子メッセンジャーのレベルを測定することにより、それらに対する遺伝子の転写を阻害するそれらの能力を決定するために、インピトロで（2.5 μ の濃度において）試験した。用いられる方法は、実施例1に記載したものである。

【0206】

特に、配列番号66～69（MYCNに対する）をKelly及びH69細胞株においてインピトロで試験し；配列番号70～74（MYCに対する）をH82及びRD細胞株においてインピトロで試験し；配列番号75、76（BIRC5に対する）をKelly細胞株においてインピトロで試験し；配列番号77～79（ALKに対する）をKelly細胞株においてインピトロで試験し；配列番号80～82（BCL2に対する）をKelly細胞株においてインピトロで試験し；そして配列番号83、84（PLK4に対する）をKelly細胞株においてインピトロで試験した。

【0207】

試験されるオリゴヌクレオチドの目的の遺伝子のメッセンジャーを阻害する能力を測定し、オリゴヌクレオチドの投与後の細胞の増殖能力も評価した。結果を表11に要約する

40

50

。【0208】

データは、オリゴヌクレオチドの配列中に存在するGの群の数の増加に伴って上昇する標的遺伝子のmRNAに対する有力な阻害活性及び細胞増殖の阻害を示す。

【0209】

【表11-1】

表11

	配列番号		mRna 阻害 (%)	細胞 増殖 (%)
MYCN Kelly	配列番号66	TCGGGAGCAGTGGGC A	57	60
	配列番号67	GCGGGTCGCGGGCAC G	60	56
	配列番号68	TGGAGGTGCGGCCCG G	74	35
	配列番号69	TCGGCGGGAGGTAAG G	76	30
MYCN H69	配列番号66	TCGGGAGCAGTGGGC A	41	73
	配列番号67	GCGGGTCGCGGGCAC G	42	71
	配列番号68	TGGAGGTGCGGCCCG G	62	49
	配列番号69	TCGGCGGGAGGTAAG G	67	45
MYC H82	配列番号70	CTCAGAGGCTTGGCG G	43	79
	配列番号71	GCGGCCGGCTAGGGT G	46	75
	配列番号72	CGGCCGGCTAGGGTG G	52	64
	配列番号73	CGACGGCGGTGGCGG G	56	65
	配列番号74	GGACGGGGCGGTGG A	61	61

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

MYC RD	配列番号70	CTCAGAGGCTTGGCG G	34	73
	配列番号71	GCGGCCGGCTAGGGT G	42	65
	配列番号72	CGGCCGGCTAGGGTG G	58	53
	配列番号73	CGACGGCGGTGGCGG G	59	51
	配列番号74	GGACGGGGGCGGTGG A	64	47
BIRC5 Kelly	配列番号75	GCGGCGGCATGGGTG C	69	43
	配列番号76	GGCGGCGGCATGGGT G	78	35
ALK Kelly	配列番号77	GCAGGAGAGGACGGT A	57	55
	配列番号78	CAGGAGAGGACGGTA C	68	46
	配列番号79	GGCAGGAGAGGACGG T	79	39
BCL2 Kelly	配列番号80	GGATGGCGCACGCTG G	59	62
	配列番号81	GGGAAGGATGGCGCA C	62	58
	配列番号82	CCACGGTGGTGGAGG A	68	55
PLK4 Kelly	配列番号83	ACGGCAAGCGGCGGG A	62	59
	配列番号84	GGACGGCAAGCGGCG G	74	49

【0210】

最終的に、配列番号66～84を有するオリゴヌクレオチドを、線維芽細胞型（Phoenix及びNIH-3T3）の細胞株に投与した。これらの細胞において、試験されるオリゴヌクレオチドは、毒性を示さなかった。

【0211】

これらの結果は、PNAオリゴヌクレオチドが、目的の遺伝子の発現に関する特定の阻害効果を介して作用する一方で、これらは、遺伝子を発現しない細胞において、何らかの非特定の毒性効果を有さなかったことを示す。

【0212】

本発明に記載されたパラメータに基づいて設計されるPNAオリゴヌクレオチドは、目

10

20

30

40

50

的遺伝子、及びこの遺伝子を発現 / 過剰発現する細胞に関して特異的に且つ有効的に作用することが推測され得る。

【配列表】

0006333739000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)		A 6 1 K 31/7125
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100195486
弁理士 千野 櫻子

(72)発明者 ロベルト トネッリ
イタリア国, イ - 4 0 0 5 7 グラナロロ エミリア (ボローニャ), ピア デッロ スポルト
1 9

(72)発明者 レオナルド ベントウレツリ
イタリア国, イ - 4 0 0 1 2 カルデラーラ ディ レーノ (ボローニャ), ピア グランシ 2
9

(72)発明者 アンドレア トルトリ
イタリア国, イ - 0 6 0 1 0 チテルナ (ペルージャ), ピア デイ カルペンティエーリ 4

(72)発明者 ルカ モンテムッロ
イタリア国, イ - 4 0 1 3 3 ボローニャ, ピア ポッティチェッリ 1

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 特表2006-525010(JP, A)
Biochemistry, 1998年, Vol. 37, p. 2299-2304
Nat. Chem. Biol., 2005年, Vol. 1, No. 4, p. 210-215
Nucleic Acids Res., 2006年, Vol. 34, No. 2, p. 734-744
Biochemistry, 2000年, Vol. 39, p. 5126-5138
Nucleic Acids Res., 1995年, Vol. 23, No. 17, p. 3594-3599
Nature Biotech., 2000年, Vol. 18, p. 300-303

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
WPIDS/WPIX(STN)