

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4843177号
(P4843177)

(45) 発行日 平成23年12月21日(2011.12.21)

(24) 登録日 平成23年10月14日(2011.10.14)

(51) Int. Cl.	F 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	A
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	

請求項の数 7 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-566709 (P2001-566709)	(73) 特許権者	500563979
(86) (22) 出願日	平成13年3月10日 (2001.3.10)		バイオグノスティック ゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2003-526684 (P2003-526684A)		フュア バイオモレキュラー ダイアグノ
(43) 公表日	平成15年9月9日 (2003.9.9)		スティック ミット ベシユレンクテル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/002694		ハフツング
(87) 国際公開番号	W02001/068146		ドイツ連邦国、ゲッチンゲン D-370
(87) 国際公開日	平成13年9月20日 (2001.9.20)		79、ゲルハルト-ゲルデス-シュトラ-
審査請求日	平成20年3月7日 (2008.3.7)		セ 19
(31) 優先権主張番号	00105190.3	(74) 代理人	110000109
(32) 優先日	平成12年3月11日 (2000.3.11)		特許業務法人特許事務所サイクス
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	シュリンゲンジーベン カルル ヘルマン
			ドイツ連邦共和国 37120 ボヴェン
			デン レングレルン パッベルヴェーク
			3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の阻害剤またはサプレッサーおよびその遺伝子の発現産物に結合する分子を含有する混合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子発現の少なくとも 1 種類の阻害剤またはサプレッサーと、前記遺伝子の発現産物の機能活性を抑制する少なくとも 1 種類の分子と、を含有する薬剤組成物であって、

前記少なくとも 1 種類の阻害剤またはサプレッサーがアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

遺伝子の発現産物の機能活性を抑制する前記少なくとも 1 種類の分子が抗体であり、

前記遺伝子が、T G F - 1、T G F - 2 及び c - e r b B - 2 からなる群から選択され、かつ

該薬剤組成物は、腫瘍若しくは免疫不全の治療、或いは臓器若しくは細胞移植又は細胞増殖の改善に用いるための薬剤組成物である、上記薬剤組成物。

10

【請求項 2】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、アニオン脂質、カチオン脂質、非カチオン脂質およびそれらの混合物の群から選択される脂質と共にウイルスペクターおよび/または非ウイルスペクターを含む DNA デリバリーシステムに組み込まれる、請求項 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 3】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、糖部位、塩基および/またはヌクレオチド間結合のうちの 1 つまたは複数において、かつ/あるいは取り込み活性および/または阻害活性のエンハンサーにアンチセンスオリゴヌクレオチドを結合させることによって修飾さ

20

れる、請求項 2 に記載の薬剤組成物。

【請求項 4】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 1 ~ 6 のヌクレオチド配列のいずれか 1 つを有する、請求項 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 5】

前記抗体が、抗体ライブラリーをスクリーニングし、かつ遺伝子発現産物への結合について発現産物を試験することによって得られる、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の薬剤組成物。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の薬剤組成物を製造するための、遺伝子発現の少なくとも 1 種類の阻害剤またはサプレッサーと、前記遺伝子の発現産物の機能活性を抑制する少なくとも 1 種類の分子と、を含有する混合物の使用であって、

前記少なくとも 1 種類の阻害剤またはサプレッサーがアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

遺伝子の発現産物の機能活性を抑制する前記少なくとも 1 種類の分子が抗体であり、かつ

前記遺伝子が、TGF- α 、TGF- β 及び c-erbB-2 からなる群から選択される、上記使用。

【請求項 7】

遺伝子発現の少なくとも 1 種類の阻害剤またはサプレッサーと、前記遺伝子の発現産物の機能活性を抑制する少なくとも 1 種類の分子とを用いて、生物学的システムを同時にまたは連続的に処置することを含む、生物学的システムにおいて遺伝子産物の機能活性を低減する方法であって、

前記少なくとも 1 種類の阻害剤またはサプレッサーがアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

遺伝子の発現産物の機能活性を抑制する前記少なくとも 1 種類の分子が抗体であり、

前記遺伝子が、TGF- α 、TGF- β 及び c-erbB-2 からなる群から選択され、かつ

前記生物学的システムが細胞培養物、ヒトにおける細胞を除く細胞、ヒトにおける臓器を除く臓器、又はヒトを除く生物体である、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

古典的に、遺伝子産物およびそれらの誘導体 例えはグリコシル化、リン酸化遺伝子産物もしくは他の修飾遺伝子産物の生物学的機能を調節するために使用される薬物を含む分子は、遺伝子産物および/またはそれらの誘導体を刺激するか、または抑制している。刺激または抑制は、例えは、低分子量分子、ペプチド、抗体等を含むアゴニストまたはアンタゴニストを使用することによって達成された。よく知られる例としては、H₂拮抗薬および遮断薬、またはHER2タンパク質にもしくは免疫調節受容体に結合する抗体、ならびにホルモン受容体結合分子が挙げられる。

【0002】

結合は、アプタマーおよびスピーゲルマー(Spiegelmer)などの核酸誘導体によって達成することもできる。

【0003】

さらに最近では、アンチセンス、リボザイム、三重らせんバインダー等の発現を抑制することによる、遺伝子産物の抑制も用いられた。その例は、脳における神経伝達物質受容体の発現の抑制、または細胞成長調節タンパク質、サイトカインおよび成長因子の抑制である。

【0004】

多種多様な遺伝子産物およびそれらの誘導体に対して、両方のアプローチ、遺伝子産物およびそれらの誘導体への分子の結合による遺伝子産物の抑制、またはその代わりに発現の

10

20

30

40

50

抑制のいずれかが用いられてきた。

【0005】

本発明は、遺伝子発現の少なくとも1種類の阻害剤またはサプレッサー、および前記遺伝子の発現産物に結合する少なくとも1種類の分子に関する。その少なくとも1種類の分子は、発現産物の機能活性を抑制することが好ましい。

【0006】

驚くべきことに、この組み合わせは相乗作用を示す。「相乗」とは、混合物の単一化合物の作用合計を少なくとも20%を超える、好ましくは50%を超える、さらに好ましくは100%を超える、混合物の有効性として定義される。これは、a)それぞれの遺伝子を発現し、b)その遺伝子の発現がその系で測定可能な作用を有する、生体外(in vitro)系または生体内(in vivo)系のいずれでも試験することが可能である。

10

【0007】

この利点は、個々のアプローチと比較して用量が低く、かつ/または効率が高いことである。

【0008】

米国特許第5,891,858号(ルーベンステイン(Rubenstein))には、トランスフォーミング成長因子(TGF)およびヒト上皮成長因子(EGF)の受容体に対するアンチセンスポリヌクレオチドが開示されている。それには、EGFに対するアンチセンスポリヌクレオチドと、EGFに対する抗体(抗EGF)との組み合わせが開示されているが、抗EGFは、EGF受容体の活性を抑制することができない。対照的に、抗EGFは、その受容体の刺激物質である。

20

【0009】

その少なくとも1種類の阻害剤またはサプレッサーは、核酸分子またはその誘導体であることが好ましい。その少なくとも1種類の核酸分子は、病態生理学的現象において役割を果たす、遺伝子発現を抑制するかまたは遺伝子発現を妨げるオリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび/またはリボザイムであることが好ましい。

【0010】

遺伝子産物の誘導体は、例えば転写後もしくは翻訳後に修飾された遺伝子産物、例えばメチル化、リン酸化、グリコシル化等により受けたエディティングまたは化学修飾を有するRNAまたはタンパク質である。

30

【0011】

本発明によれば、アンチセンスおよび/またはリボザイム分子をDNAデリバリーシステムに組み込むことは有用である可能性がある。DNAデリバリーシステムは、ウイルスもしくは非ウイルスベクターまたはその両方、さらにアニオン脂質、カチオン脂質、非カチオン脂質またはそれらの混合物を含む。

【0012】

アンチセンスおよび/またはリボザイム分子は、糖部位、塩基および/ヌクレオチド間の結合、例えばリン酸エステル結合のうちの1つまたは複数にて修飾されることが好ましい。例えば、オリゴヌクレオチド、リボザイムおよび/または核酸の修飾は、ホスホロチオエート(SODN)ヌクレオチド間結合、メチルホスホネートヌクレオチド間結合、ホスホラミデート(phosphoramidate)結合、ペプチド結合の修飾、糖の2'-Oアルキル修飾、特にメチル、エチル、プロピル、ブチル等、糖の2'-メトキシエトキシ修飾および/または塩基の修飾などの修飾を含む。様々な修飾をオリゴもしくはポリヌクレオチドにおいて組み合わせることができる。

40

【0013】

アンチセンスおよび/またはリボザイム分子を、取り込み活性および/または阻害活性のエンハンサーにそれを結合させることによって修飾することもできる。

【0014】

本発明のさらに好ましい実施形態では、葉酸、ホルモン、ステロイドホルモン、例えばエストロゲン、プロゲステロン、コルチコステロイド、鉱質コルチコイド、ペプチド、プロ

50

テオグリカン、糖脂質、リン脂質およびそれらの誘導体に、核酸分子を結合させるか、またはそれらと混合する。

【 0 0 1 5 】

非常に好ましい実施形態において、核酸分子は、以下のヌクレオチド配列の1通りまたは複数通りを含む核酸分子から選択する：

GTA GTA CAC GAT GG	(配列番号1)	
CTG ATG TGT TGA AGA ACA	(配列番号2)	
CTC TGA TGT GTT GAA G	(配列番号3)	
CGG CAT GTC TAT TTT GTA	(配列番号4)	
GCT TTC ACC AAA TTG GAA GC	(配列番号5)	10
CTG GCT TTT GGG TT	(配列番号6)	
GCT GTT GAC TGC CC	(配列番号7)	
CCC AGT ATT ACT GC	(配列番号8)	
GGT TGA AGC CAT TG	(配列番号9)	
GCC GCT CAA TCT TCA TC	(配列番号10)	
GAA CAG TTC GTC CAT G	(配列番号11)	
CCA GAG TTT CGG TTC	(配列番号12)	
CTA GGA CTG GGA CAG	(配列番号13)	
CAT CTT CTG CCA TTC	(配列番号14)	
CGT AGG TGG TGC TG	(配列番号15)	20
GTG TTT TCC CAC CAG	(配列番号16)	
GGT TTT GGT TCA CTA G	(配列番号17)	

【 0 0 1 6 】

さらに適切な核酸配列は、当業者には公知である。さらなる配列およびかかる配列を選択する方法は、例えばWO 9 4 / 2 5 5 8 8またはWO 9 8 / 3 3 9 0 4に記載されている。

【 0 0 1 7 】

他の実施形態では、阻害剤またはサプレッサーは、遺伝子をコードするDNAもしくはRNAに結合することが可能であり、したがって遺伝子の発現を阻害または抑制する、ペプチド、タンパク質および/または低分子量物質である。適切なタンパク質は、抗体および抗体フラグメントもまた含む。

【 0 0 1 8 】

本発明の混合物は、遺伝子の発現産物に結合する少なくとも1つの分子として、F_{ab}フラグメント、一本鎖抗体などの抗体、抗体フラグメント、またはそれらの組み合わせを含むことが好ましい。F_{ab}フラグメント、一本鎖抗体などの抗体、抗体フラグメント、またはそれらの組み合わせは、例えば、抗体ライブラリーをスクリーニングし、かつ遺伝子の発現産物への結合について発現産物を試験することによって、得ることが可能である。

【 0 0 1 9 】

他の実施形態では、遺伝子の発現産物に結合する少なくとも1種類の分子が、ペプチドおよび/またはタンパク質であることが好ましい。そのペプチドおよび/またはタンパク質は、例えば、発現ライブラリーをスクリーニングし、かつ遺伝子の発現産物への結合について発現産物を試験することによって、得ることが可能である。

【 0 0 2 0 】

合成ペプチドおよび/タンパク質は、ランダムに合成したペプチドおよび/ポリペプチドを遺伝子の発現産物への結合についてスクリーニングすることによってもまた得ることが可能である。発現産物に結合するペプチドは、例えばEMBO J. 20(2001) 340-349に開示されている。そのペプチドは、MIA(黒色腫阻害活性)に結合し、したがってMIAの機能活性を抑制する。適切なペプチド(配列番号18~41)は例えば、

V P H I P P N

10

20

30

40

50

M P P T Q V S
 Q M H P W P P
 Q P P F W Q F
 T P P Q G L A
 I P P Y N T L
 A V R P A P L
 G A K P H P Q
 Q Q L S P L P
 G P P P S P V
 L P L T P L P

10

Q L N V N H Q A R A D Q
 T S A S T R P E L H Y P
 T F L P H Q M H P W P P
 V P H I P P N S M A L T
 R L T L L V L I M P A P
 R K L P P R P R R
 V L A S Q I A T T P S P
 T P L T K L P S V N H P
 P P N S F S S A G G Q R T
 E Q D S R Q G Q E L T K K G L
 E T T I V I T W T P A P R
 T S L L I S W D A P A V T
 N S L L V S W Q P P R A R

20

である。

【0021】

他の実施形態において、本発明の混合物は、遺伝子発現産物に結合する低分子量分子を含有する。特に、その低分子量分子は、コンビナトリアル・ケミストリーを用い、かつ遺伝子発現産物への結合について産物を試験することによって得ることができる。

【0022】

本明細書において使用する低分子量分子（小分子）は、N、S、O、P等の他の原子と組み合わせて100個までの炭素原子を有する分子である。発現産物に結合する適切な化合物が、図2に記載されており、すべてがMIAに結合する。

30

【0023】

遺伝子発現産物に結合する分子または因子は、遺伝子発現産物に結合する、DNAもしくはRNA分子、またはアプタマーおよび/もしくはSpiegelmerを含むそれらの誘導体であることも可能である。

【0024】

本発明の好ましい実施形態では、その遺伝子は、TGF β 、erbB2、MIA、cjun、junB、c-fos、VCAM、NF κ B β 、NF κ B α 、ICAM、VEGFおよびNF κ B β からなる群から選択される。

40

【0025】

本発明は、配列番号1～17の配列を有するオリゴヌクレオチドにもまた関する。

【0026】

本発明の混合物を含有する薬物もまた、本発明の主題である。

【0027】

本発明はさらに、遺伝子発現の少なくとも1種類のサプレッサーまたは阻害剤と、腫瘍、免疫不全を治療するための、または造血幹細胞、および赤血球、白血球、血小板、栓球およびそれらの前駆細胞を含むそれらの誘導体の移植が含まれる臓器もしくは細胞移植を改善するための、前記遺伝子の発現産物に結合する少なくとも1種類の分子または因子と、を含む混合物を使用する方法に関する。臓器移植には、肝臓、腎臓、心臓、肺、胃腸器官、

50

骨、すい臓、軟骨、神経細胞、島細胞、およびこれらの臓器をそれから誘導または再構成することができる幹細胞の移植が含まれる。

【0028】

本発明はさらに、腫瘍、免疫不全を治療する方法、または遺伝子の発現を抑制もしくは阻害する少なくとも1種類の分子または因子と、前記遺伝子の発現産物に結合する少なくとも1種類の因子との組み合わせを有効量投与することによって臓器もしくは細胞移植を改善する方法に関するものであり、それによって、造血幹細胞、および赤血球、白血球、血小板、栓球およびそれらの前駆細胞を含むそれらの誘導体の移植を含む、腫瘍増殖抑制、臓器もしくは細胞移植の改善、免疫応答の増強もしくは抑制が、相乗作用的手法で高められる。臓器移植には、肝臓、腎臓、心臓、肺、胃腸器官、骨、すい臓、軟骨、神経細胞、島細胞、およびこれらの臓器をそれから誘導または再構成することができる幹細胞の移植が含まれる。

10

【0029】

本発明の混合物は、薬物標的のバリデーションにおいて、つまり細胞系および生体に対する本発明の混合物の効果を試験することによって、特定の病理学的状態に関連する遺伝子を同定するのにもまた有用である。

【0030】

他の実施形態では、本発明は、遺伝子の発現の少なくとも1種類の阻害剤またはサプレッサーと、前記遺伝子の発現産物の機能活性を抑制する少なくとも1種類の分子とを用いて、生物学的システムを同時にもしくは連続的に処置することを含む、生物学的システムにおいて遺伝子の機能活性を低減する方法に関する。生物学的システムは、細胞、細胞培養、臓器または生物体であることが可能である。

20

【0031】

実施例

実施例 1

腫瘍細胞上の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)およびリンフォカイン活性化キラー細胞(LAK細胞)の免疫応答活性に対する、遺伝子産物の阻害剤としてのTGF β 2に対する中和抗体、遺伝子発現の阻害剤としてのTGF β 2に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびその2つの組み合わせの効果を研究するために、CARE-LASSアッセイが用いられている(ヒテンフェルス(Lichtenfels), R., ビディソン(Biddison), W.E.1 シュルツ(Schulz), H.1 ボイト(Voyt), A.B. およびマーティン(Martin). CARE-LASS (calcein-release assay), an improved fluorescence based test system to measure cytotoxic lymphocyte activity. J. Immunol. Meth., 172: 227-239,1994)。

30

【0032】

LAK細胞およびCTLの産生

先に記述されているように、標準フィコール-ハイパック比重遠心法によって、健常ドナーの静脈血から、末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。簡単に説明すると、等量の完全培地(10%(v/v)ウシ胎児血清および1mM L-グルタミンで懸濁したRMP I 1640培地)とヘパリン血を混合し、フィコール-ハイパック(Pharmacia社、スウェーデン、ウプサラ)勾配上に層状に重ねた。400gで室温にて30分間遠心分離した後、プラズマ フィコール界面でバンド形成したPBMCを除去し、3回洗浄し、完全培地中に再懸濁した。トリパンブルー排除によって決定した細胞生死判別は、>97%であった。10U/mlのIL-1、100U/mlのIL-2で処理することによって、リンパ球を活性化した。

40

【0033】

アッセイ当日に、神経膠腫細胞を収集し、5%FCS/PBS溶液中で2回洗浄し、5%FCS/PBS中で10Mio細胞/mlにて懸濁した。Calcein-AM(Molecular Probes社、米国)を最終濃度25 μ Mに添加した。その細胞を37 $^{\circ}$ Cで30分間標識し、次いで5%FCS/PBS中で2回洗浄し、1Mio細胞/mlに調節し、最終濃度0.1Mio/100 μ L/1ウェルで96ウェルU字型マイクロタイ

50

タープレート (N u n c 社、デンマーク) に添加した。

【 0 0 3 4 】

- アンチセンスホスホロチオネート T G F 2 オリゴヌクレオチド (f . c . 2 ~ 5 μ M)、または
- T G F 2 に対する中和抗体 (f . c . 1 0 0 m g / m l)、または
- その 2 つの組み合わせ

のいずれかを図に示すように添加するか、あるいは

- その 2 つのどちらも添加しなかった。

【 0 0 3 5 】

標的細胞 (T) に対する効果細胞 (E) の細胞障害活性の測定 :

10

効果細胞の細胞障害活性を測定するために、 C T L および L A K 細胞 (E) 1 0 0 μ M をウェルに添加して、所望の E : T 比 1 : 2 0 とした。

【 0 0 3 6 】

カルセインの自発的放出

カルセインの自発的放出および全放出を測定するために、 5 % F C S / P B S 1 0 0 μ l または溶解バッファー 1 0 0 μ L (5 0 n M ホウ酸ナトリウム、 0 . 1 % トリトン x 1 0 0、 p H 9 . 0) それぞれを、ウェルに予め添加した。そのプレートを 3 7 ° C で 4 時間インキュベートした後、上清 (5 0 μ L) を新しいウェルに移し、自動蛍光スキャナー (T i t e r t e k F l u o r o s k a n I I、ドイツ) を用いて測定した。その細胞毒性を以下の等式から決定した :

20

【 数 1 】

F / C T L アッセイ - F 自発的放出

$$\frac{\text{F 全溶解} - \text{F 自発的放出}}{\text{F 全溶解} - \text{F 自発的放出}} \times 100 = \text{細胞毒性 \%}$$

F 全溶解 - F 自発的放出

【 0 0 3 7 】

実施例 2

一日量 1 0 μ g / k g / 日 で r h G M - C S F を 5 日間投与して骨髄から、または臍帯血 (臍帯血幹細胞) から動員し、免疫精製で得た C D 3 4 + 細胞を濃縮した後に、造血幹細胞をアフエレーシスにより回収した。

【 0 0 3 8 】

30

骨髄由来幹細胞および臍帯血由来幹細胞のどちらの多分化能前駆体画分も、臨床用途に重大な関連性がある。現在の幹細胞移植の問題は、最適化されたサイトカインカクテルによって産生された幹細胞数が少ないことである。さらに、長期的な成功に対する重要な問題は、サイトカインカクテルでの現在の処置による多分化能前駆体画分の休止および成熟である。

【 0 0 3 9 】

T G F 1 不活化抗体または T G F 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理することによって、細胞の数および骨髄幹細胞の増殖能力のどちらも改善することができる。

【 0 0 4 0 】

驚くべきことに、 T G F 1 不活化抗体および T G F 1 アンチセンスオリゴヌクレオチド、両方の組み合わせが、強い相乗作用を有した。

40

【 0 0 4 1 】

- アンチセンス T G F 1 オリゴヌクレオチド、または
- T G F 1 に対する中和抗体、または
- その 2 つの組み合わせ

のいずれかで骨髄由来幹細胞および臍帯血由来幹細胞を処理したか、あるいは

- その 2 つのどちらでも処理しなかった (対照) 。

【 0 0 4 2 】

T G F 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理することによって、多分化能増殖性前駆細胞の数は、対照と比較して 8 5 % 増大した。

50

【 0 0 4 3 】

T G F 1 中和抗体で処理することによって、多分化能増殖性前駆細胞の数は、対照と比較して63%増大した。

【 0 0 4 4 】

T G F 1 不活化抗体および T G F 1 アンチセンスオリゴヌクレオチド両方の組み合わせで処理することによって、多分化能増殖性前駆細胞の数は、対照と比較して350%を超えて増大した。

【 0 0 4 5 】

実施例 3

T G F 1 結合ペプチドおよび T G F 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドの両方の組み合わせは、多分化能増殖性造血前駆細胞の増殖に対して同様の強い相乗作用を有した。

10

【 0 0 4 6 】

多分化能増殖性前駆細胞の数は、T G F 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理することによって、対照と比較して85%増大した。

【 0 0 4 7 】

多分化能増殖性前駆細胞の数は、T G F 1 結合ペプチドで処理することによって、対照と比較して57%増大した。

【 0 0 4 8 】

多分化能増殖性前駆細胞の数は、T G F 1 結合ペプチドおよび T G F 1 アンチセンスオリゴヌクレオチド両方の組み合わせで処理することによって、対照と比較して3倍を超えて増大した。

20

【 0 0 4 9 】

実施例 4

c e r b B 2 遺伝子 (p 1 8 5、H E R 2 または n e u と呼ばれる) は、ヒト乳癌の30~45%において、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、非小細胞肺癌、口腔扁平上皮癌の50%までにおいて、増幅および/または過剰発現する。

【 0 0 5 0 】

商品名ハーセプチンを有する、c e r b B 2 または H E R 2 に対する不活性化抗体が、乳癌患者の治療に使用されている。臨床研究では当初、優れた治療可能性が示されたが、現在の臨床研究では議論の余地のある結果が示されている。本発明者らは、c e r b B 2 遺伝子発現の阻害剤と、c e r b B 2 遺伝子産物に結合する分子との組み合わせによって、各分子単の効果が増強されることを見出した。

30

【 0 0 5 1 】

- アンチセンス c e r b B 2 オリゴヌクレオチド、または
- c e r b B 2 に対する中和抗体、または
- その2つの組み合わせ
のいずれかで、卵巣癌細胞および膵臓癌細胞を処理するか、あるいはその2つのいずれでも処理しなかった。

【 0 0 5 2 】

腫瘍細胞増殖の抑制は、アンチセンス c e r b B 2 オリゴヌクレオチドでは18%~31%であり、抗体では13~34%であったが、その2つの組み合わせでは85%を超えた。

40

【 0 0 5 3 】

実施例 5

ヒト M I A 分泌黒色腫ならびに乳癌細胞株において、以下のアンチセンス配列：

G G C A G G G C C A G C G G T A G G C T G A G C T C A C T G G C A G T A G A A A
T C C C A T T T G T C T G T C T T C A C A T C G A C T T T G C C A G G T T T C A
G G G T C T G G T C C T C T C G G A C A A T G C T A C T G G G G A A A T A G C C
C A G G C G A G C A G C C A G A T C T C C A T A G T A A T C T C C C T G A A C G

50

CTGCCTCCCCAGAAAGAGCCGCCACGGCCCTTCAGCTTGG
 AGAAGACATACACCACTTGGCCCCGGTGAATGGTCAGGA
 TCGGCAGTCGGGGGCCATGTAGTCCCTGAAGGGCCACAGCC
 ATGGAGATAGGGTGGCTGCCTCCTGGTCCGCACACAGCT
 TCCGGTCAAGCCAGCTTGGGCATAGGACCACCCCTGACACC
 AGGTCCGGAGAAAGGCAGACAGCAAGATGATGACACCAAGG
 CACACCAGGGACC GGCCATCGTGGACTGTGAGCAAGAGA
 GTGAGCAAGGGGGGTGCTGG

または、この配列の一部を発現する移入ベクターによる、内因性MIA合成の抑制は、それらの移動活性を低減しただけではなく、基質に対するそれらの接着を増大した。この両方により、MIA阻害剤および腫瘍浸潤および転移の強い抑制作用が示唆されている。

10

【0054】

移動活性の低減、ならびに基質に対する接着の増大での相乗作用は、MIA結合ペプチドと、上記のアンチセンス配列を発現する移入ベクターとの組み合わせによって達成された。

【0055】

実施例6

相乗的な抑制は、受容体、酵素、転写因子、細胞接着分子、サイトカイン、または成長因子、例えばTGF、MIA、VCAM、ICAM、c-jun、junB、NF- κ B、VEGFもしくはインテグリン遺伝子の制御配列に結合する転写因子またはその結合ドメインを、受容体、酵素、転写因子、細胞接着分子、サイトカインまたは成長因子、例えばTGF、MIA、VCAM、ICAM、c-jun、junB、NF- κ B、VEGFもしくはインテグリンに結合する、例えばコンビナトリアル・ケミストリーによって得られる低分子量分子と組み合わせることによってもまた達成することができる。

20

【0056】

実施例7

相乗的な抑制は、受容体、酵素、転写因子、細胞接着分子、サイトカイン、または成長因子、例えばTGF、MIA、VCAM、ICAM、c-jun、junB、NF- κ B、VEGFもしくはインテグリン遺伝子から転写されたmRNAに結合する、ペプチドまたはタンパク質を、受容体、酵素、転写因子、細胞接着分子、サイトカインまたは成長因子、例えばTGF、MIA、VCAM、ICAM、c-jun、junB、NF- κ B、VEGFもしくはインテグリンに結合する小分子と組み合わせることによってもまた達成することができる。

30

【0057】

実施例8

相乗的な抑制は、受容体、酵素、転写因子、細胞接着分子、サイトカイン成長因子、例えばTGF、MIA、VCAM、ICAM、c-jun、junB、NF- κ B、VEGFもしくはインテグリン遺伝子の制御配列に結合する、ペプチド、タンパク質、例えば転写因子またはその結合ドメインを、受容体、酵素、転写因子、細胞接着分子、サイトカインまたは成長因子、例えばTGF、MIA、VCAM、ICAM、c-jun、junB、NF- κ B、VEGFもしくはインテグリンに結合するSpiegelmerと組み合わせることによってもまた達成することができる。

40

【0058】

実施例9

相乗的な抑制は、受容体、酵素、転写因子、細胞接着分子、サイトカインまたは成長因子、例えばTGF、MIA、VCAM、ICAM、c-jun、junB、NF- κ B、VEGFもしくはインテグリン遺伝子の制御配列に結合する、転写因子またはその結合ドメインを、受容体、酵素、転写因子、細胞接着分子、サイトカインまたは成長因子、例えばTGF、MIA、VCAM、ICAM、c-jun、junB、NF- κ B

50

ッパーB、VEGFもしくはインテグリンに結合するペプチドと組み合わせることによってもまた達成することができる。

【0059】

実施例6~9の混合物は、神経細胞の幹細胞増殖に特に有用である。

【0060】

実施例10

cjun発現の阻害剤を、cjun遺伝子産物またはその誘導体に結合する分子と組み合わせることによって、相乗作用を達成することもできる。かかる混合物は、虚血、低酸素、変性または過剰刺激に対して神経細胞を保護するのに有用である。

【0061】

10

実施例11

HPPQアッセイ

ヒト造血幹細胞に対する、アンチセンスTGFβ1オリゴヌクレオチドおよび抗TGFβ1抗体の組み合わせの効果を調べた。この理由で、末梢血から精製したヒトCD34陽性細胞を最初に、オリゴヌクレオチドなしで、またはアンチセンスTGFβ1オリゴヌクレオチドもしくはミスセンス対照の存在下にて、サイトカイン(IL3、IL6、GM-CSF、G-CSF、SCF)を含有する培地中で72時間培養した。続いて、HPPQアッセイ(高増殖可能性の休止細胞アッセイ)において、抗TGFβ1抗体と共に、または抗TGFβ1抗体を用いることなく、細胞をさらに培養した。

【0062】

20

そのHPPQアッセイによって、サイトカイン(IL3、IL6、IL11、G-CSF、GM-CSF、SCFおよびEpo)を含有する対照培地中で培養した細胞を、抗TGFβ1阻止抗体の存在下にて、同一のサイトカインを含有する培地中で培養した細胞と比較する。その対照は、サイトカイン応答性前駆体を示し、阻止TGFβ1抗体を添加することによって、休止前駆体が誘導される。

【0063】

製造元(StemBio Research社、フランス、ヴィルジュイフ)により説明されているように、HPPQアッセイを行った。簡単に説明すると、1.6x10⁴培養細胞を、35mm組織シャーレ中にアリコート1mlで各培地に対して3通りにプレートングした。18日後、コロニー数(CFU=得られた最も未成熟な細胞)をカウントした。

30

【0064】

表1に、アンチセンスTGFβ1によって、リンパ腫患者由来のCD34陽性細胞に対する抗TGFβ1抗体(TGFβ1AB)の効果が2倍を超えて増大することが示されている。つまり、アンチセンスTGFβ1の存在下では、細胞数が、抗体のみと比較して2倍を超える数となる。

【0065】

【表1】

	CFU コロニー数
対照+TGF-β1 AB	17,66±2,49
アンチセンスTGF-β1+ TGF-β1AB	41,33±2,49

40

【0066】

表2には、リンパ腫患者2名および骨髄腫患者1名からのCD34陽性細胞に対するアンチセンスTGFβ1の効果が、抗体によって増幅することもまた示されている：TGFβ1抗体もまた添加した場合、アンチセンスTGFβ1のみで得られた細胞数は、ほぼ

50

3 倍増大する。

【 0 0 6 7 】

【表 2】

CFU コロニー数		
	アンチセンスTGF-β1	アンチセンスTGF-β1+TGF-β1AB
リンパ腫 1	19,00 ± 1,41	37,00 ± 6,48
リンパ腫 2	24,00 ± 2,34	63,33 ± 5,31
骨髄腫	23,33 ± 5,13	60,00 ± 3,45

10

【 0 0 6 8 】

このように、アンチセンスTGF-β1および抗TGF-β1抗体の組み合わせは、アンチセンスまたは抗体のみと比較して、細胞数の増大が2倍を超える結果となる。

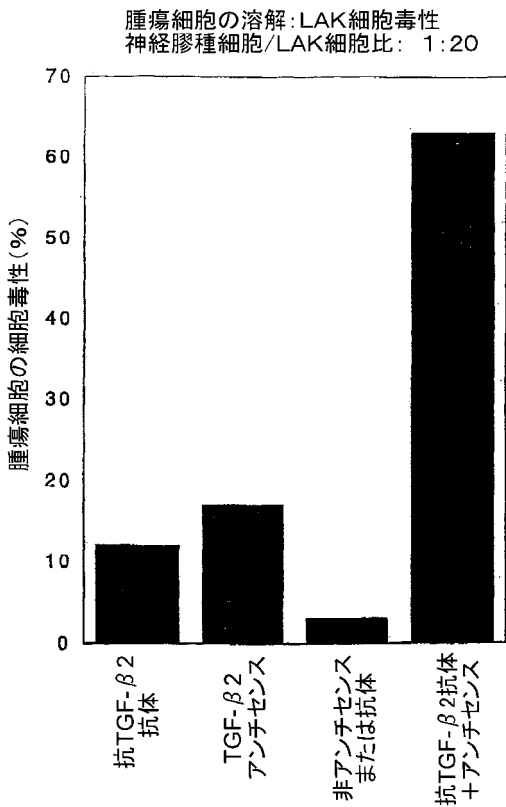
【図面の簡単な説明】

【図 1】 中和抗体と組み合わせたアンチセンス分子を用いた、遺伝子の遮断両方の組み合わせの強い相乗作用を示す図である。

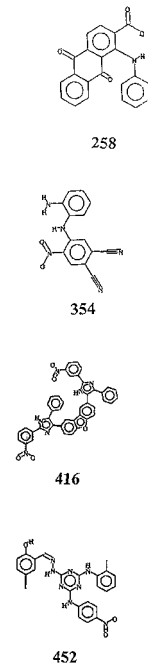
【図 2】 遺伝子産物MIAを抑制することが可能な小分子を開示する図である。

20

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 43/00 1 2 1

(72)発明者 シュリンゲンジーベン ライマー
ドイツ連邦共和国 3 7 0 8 3 ゲッティンゲン ツール シャルフミューレ 3 4

審査官 松波 由美子

(56)参考文献 米国特許第 0 5 8 9 1 8 5 8 (U S , A)
国際公開第 0 0 / 0 0 1 4 1 0 (W O , A 1)
The Journal of Clinical Investigation , 1 9 9 9 年 , Vol.103 , p.1641-1650
American Journal of Pathology , 1 9 9 9 年 , Vol.154 , No.6 , p.1867-1876

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A61K 48/00
A61K 31/7088
A61K 38/00
A61K 39/395
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)