(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2013-534410
(P2013-534410A)
(43)公表日　平成25年9月5日(2013.9.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	ZNAG	4B024
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4B063
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4C084
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4C086
A61K 31/711	(2006.01)	A61K	31/711		4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 75 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-510459 (P2013-510459)
(86)(22)出願日　平成23年5月18日 (2011.5.18)
(85)翻訳文提出日　平成25年1月21日 (2013.1.21)
(86)国際出願番号　PCT/CA2011/000591
(87)国際公開番号　WO2011/143762
(87)国際公開日　平成23年11月24日 (2011.11.24)
(31)優先権主張番号　61/345,751
(32)優先日　平成22年5月18日 (2010.5.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)

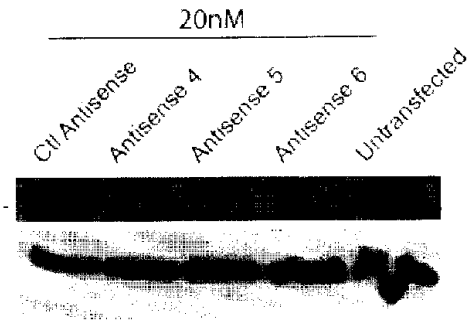
(71)出願人　512154747
ザ　ロイヤル　インスティチューション　フォー　ザ　アドバンスメント　オブ　ラーニング／マクギル　ユニバーシティ
カナダ国　ケベック州　モントリオール　シャーブルック　ストリート　ウェスト　８４５
(74)代理人　100092093
弁理士　辻居　幸一
(74)代理人　100082005
弁理士　熊倉　禎男
(74)代理人　100084663
弁理士　箱田　篤
(74)代理人　100093300
弁理士　浅井　賢治

最終頁に続く

(54)【発明の名称】悪性神経膠腫においてdownregulatedinrenalcellcarcinomaの発現を減少させる方法

(57)【要約】
本発明は、癌、特に悪性神経膠腫の治療のための新規組成物および治療的方法に関する。組成物は、腫瘍細胞におけるdown regulated in renal cell carcinoma（DRR）の発現を減少させ、悪性神経膠腫細胞浸潤を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはそれらをコードするRNAもしくはベクターを含む。
【選択図】図１７

FIGURE 17



【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号：２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６の配列またはその断片もしくは誘導体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを腫瘍細胞に提供し、アンチセンスオリゴヌクレオチドが腫瘍細胞におけるｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｉｎ ｒｅｎａｌ ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ（ＤＲＲ）の発現を減少させることを含む、腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させる方法。
【請求項２】
配列番号：２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６の配列またはその断片もしくは誘導体を含む、腫瘍細胞におけるｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｉｎ ｒｅｎａｌ ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ（ＤＲＲ）の発現を減少させるためのアンチセンスオリゴヌクレオチド。
【請求項３】
配列番号：２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６の配列またはその断片もしくは誘導体をコードする配列、または腫瘍細胞におけるｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｉｎ ｒｅｎａｌ ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ（ＤＲＲ）の発現を減少させるのに好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするＤＮＡを含むＤＮＡ分子を腫瘍細胞に提供することを含む、腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させる方法。
【請求項４】
前記ＤＮＡ分子がアンチセンスオリゴヌクレオチドの産生に適している発現ベクター中に挿入される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
配列番号：２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６の配列またはその断片もしくは誘導体をコードする配列を含む発現ベクター。
【請求項６】
請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするベクターをそれを必要とする被験体に投与することを含む、癌を治療する方法。
【請求項７】
請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするベクターをそれを必要とする被験体に投与することを含む、癌の進行を遅らせる方法。
【請求項８】
前記アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび／またはベクターが、外科的切除、化学療法、放射線療法、免疫療法および遺伝子療法からなる群から選択される１つまたは複数の癌療法と組み合わせて使用される、請求項６または７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記腫瘍細胞が神経膠腫細胞である、請求項１、３、４および６～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記神経膠腫細胞が神経膠芽腫細胞である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記腫瘍細胞が神経膠腫細胞である、請求項２に記載のアンチセンスＲＮＡ。
【請求項１２】
前記神経膠腫細胞が神経膠芽腫細胞である、請求項１１に記載のアンチセンスＲＮＡ。
【請求項１３】
請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするベクターおよび薬学的に許容されるキャリアーを含む、癌の治療のための医薬組成物。
【請求項１４】

前記癌が神経膠腫である、請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記神経膠腫が悪性神経膠芽腫である、請求項１４に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
請求項１３～１５のいずれか一項に記載の医薬組成物およびその使用説明書を含むキット。
【請求項１７】
被験体に対する同時投与、分離投与または連続投与のための、神経膠腫の治療および／またはその進行の遅延に好適な第２の活性化合物をさらに含む請求項１６に記載のキット。
【請求項１８】
請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするベクターをそれを必要とする被験体に投与すること、および癌療法を同時に、分離して、または連続して投与し、該癌療法が外科的切除、化学療法、放射線療法、免疫療法および遺伝子療法からなる群から選択されることを含む、神経膠腫の治療のための該癌療法の効能を増進する方法。
【請求項１９】
前記神経膠腫が悪性神経膠芽腫である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
配列番号：２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５または１６の配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその断片もしくは誘導体を腫瘍細胞に提供し、アンチセンスオリゴヌクレオチドが腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させることを含む、それを必要とする被験体における悪性神経膠細胞浸潤を阻害する方法。
【請求項２１】
配列番号：２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６の配列またはその断片もしくは誘導体、または腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させるのに好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするＤＮＡを含むＤＮＡ分子を腫瘍細胞に提供することを含む、それを必要とする被験体における悪性神経膠細胞浸潤を阻害する方法。
【請求項２２】
請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは請求項２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするベクターを被験体に投与することを含む、それを必要とする被験体における悪性膠細胞浸潤を阻害する方法。
【請求項２３】
被験体の神経膠腫細胞におけるＤＲＲ発現を測定して、ＤＲＲ発現が細胞の浸潤性を示すことを含む、被験体における神経膠腫の診断または予後診断のための方法。
【請求項２４】
ＤＲＲタンパク質またはｍＲＮＡを特異的に結合する分子と神経膠腫細胞を接触させること、および細胞におけるＤＲＲタンパク質またはｍＲＮＡレベルを測定して、ＤＲＲを発現する細胞が浸潤性であることを含む、被験体における浸潤性神経膠腫細胞を可視化する方法。
【請求項２５】
ＤＲＲ　ＲＮＡまたはタンパク質について特異的である検出可能に標識されたプローブ、ＤＲＲ　ＲＮＡまたはタンパク質へのプローブの結合を検出するためのレポーター手段、およびその使用説明書を含む、被験体における浸潤性神経膠腫の診断または予後診断のためのキット。
【請求項２６】
ＤＲＲの発現を減少させる治療用核酸分子または治療用核酸分子をコードするＤＮＡもしくはベクターをそれを必要とする被験体に投与することを含む、癌を治療する方法。
【請求項２７】
前記癌の進行が遅延される、請求項２７に記載の方法。

【請求項２８】
悪性細胞浸潤が阻害される、請求項２６または２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
悪性神経膠細胞浸潤が阻害される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記癌が神経膠腫、好ましくは悪性神経膠腫、およびより好ましくは神経膠芽腫である、請求項２６～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記治療用核酸分子がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項２６～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記治療用核酸分子が、ＤＲＲ　ｍＲＮＡまたはその断片もしくは誘導体に相補的であるかまたは特異的にハイブリダイズする、請求項２６～３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
ＤＲＲ　ｍＲＮＡに相補的であるかまたは特異的にハイブリダイズする治療用核酸分子を腫瘍細胞に提供し、治療用核酸分子が腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させることを含む、腫瘍細胞におけるｄｏｗｎ　ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｉｎ　ｒｅｎａｌ　ｃｅｌｌ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ（ＤＲＲ）の発現を減少させる方法。
【請求項３４】
前記治療用核酸分子がアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記治療用核酸分子がアルティマーおよびギャップマーの構造を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド含みならびに／または修飾されたヌクレオシドもしくはヌクレオチドを含むか、または前記治療用核酸分子がアプタマーを含む、請求項３３または３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記修飾されたヌクレオシドまたはヌクレオチドがＦＡＮＡである、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
配列番号：２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５または１６において記載される配列を有するオリゴヌクレオチド。
【請求項３８】
配列番号：２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５または１６において記載される配列を有するオリゴヌクレオチドをコードするＤＮＡ。
【請求項３９】
配列番号：２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５または１６において記載される核酸の配列を有するＲＮＡ。
【請求項４０】
請求項３７～３９のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡおよび薬学的に許容されるキャリアーを含む医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
［関連出願の相互参照］
本出願は、２０１０年５月１８日に出願された米国仮出願第６１／３４５，７５１号に基づく優先権を主張し、その全体は参照として本明細書に援用される。
【０００２】
［技術分野］

本発明は悪性神経膠腫を治療するための新規医薬組成物および方法に関する。

【背景技術】

【０００３】

神経膠腫は神経膠と呼ばれる脳の支持細胞から生じる。これらの細胞は星状細胞、上衣細胞および希突起神経膠細胞へと細分される。神経膠腫は最も一般的な原発性脳腫瘍であり、ヒト悪性腫瘍の中で最も破壊的なものである。腫瘍は最低グレード１から最高グレード４に類別され、多形神経膠芽腫（ＧＢＭ）は神経膠腫の最高グレードであり、最も致命的なタイプである。高グレードの神経膠腫またはＧＢＭはすべての原発性脳腫瘍のうちの１９パーセントを占めており、最も破壊的なものであると同時に最も一般的な原発性悪性脳腫瘍である。

【０００４】

毛様細胞性星状細胞腫として知られている良性の神経膠腫は、小児において見られ、外科的完全切除によって非常によく治療されて患者は典型的には完全に平均寿命を全うする。これとは対照的に、星状細胞腫、乏突起膠腫または神経膠芽腫として公知の高グレードまたは悪性の神経膠腫は、脳浸潤を特徴とする成体腫瘍である。良性の神経膠腫（それは正常脳に浸潤しない）とは異なり、悪性神経膠腫は非常に浸潤性である。概して、高グレードの神経膠腫は、完全な外科的削除後でさえほとんど常に再び増殖する。

【０００５】

悪性神経膠腫は、低グレードおよび高グレードへとさらに分けることができる。低グレードの悪性神経膠腫は非常に浸潤性であるが、増殖速度は低く、大抵の場合臨床症状の前に複数の脳葉に浸潤している。時間と共に、低グレードの悪性神経膠腫は増殖速度を増大し、より高いグレードに転換する遺伝的変化を受け得る（Ｌｏｕｉｓ，Ｄ．Ｎ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ １：１２５－１２８，２００２）。

【０００６】

高グレードの神経膠腫を持つ患者の予後は一般的には不良である。悪性神経膠腫は侵攻性の増加および拡張によってだけではなく、離れた脳組織の侵攻性浸潤によっても特徴づけられるので、治療の成功がすべての癌の中でも最も難しいものである。悪性神経膠腫と診断された毎年約１０，０００人の米国人のうちの約２分の１は診断の１年後、および２５％は２年後に生存する。未分化星状細胞腫に罹患した者は約３年生存する。多形膠芽腫は診断後１２か月未満生存というより悪い予後である。標準的な治療は、外科的切除に続いて化学療法および放射線療法を含んでいる。残念なことに、この多重モードのアプローチは、今もなお１２～１４か月の平均生存に変わっただけである。神経膠腫は治癒させることができない。

【０００７】

この破壊的な癌の管理に対する所望される１つのアプローチは悪性神経膠細胞（ＭＧＣ）の浸潤を阻害することである。局所的環境でＭＧＣを維持することにより、さらなる治療選択肢が可能になる。しかしながら、脳腫瘍浸潤の阻害に利用可能な治療方針は現在ない。

【０００８】

多くの分子が悪性神経膠腫浸潤に関与するが、プロセスの根底にある分子メカニズムはよく理解されていない。細胞浸潤の現在の理解は、異なる細胞タイプおよび環境の研究に由来したものの混合物である。細胞浸潤は、細胞の突起の伸長、接着斑（ＦＡ）形成を介する接着、移動細胞を収容する空間を生ずる細胞外マトリックスの破壊、細胞本体の前方への移行、および細胞後部へのＦＡの放出を含む（Ｆｒｉｅｄｌ ａｎｄ Ｗｏｌｆ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ ３：３６２－７４，２００３）。この多段階のプロセスは、細胞表面受容体、シグナル伝達経路、細胞骨格要素およびＦＡ構成要素および細胞外マトリックス分解酵素の調和的な作用を必要とする（Ｂｕｒｒｉｄｇｅ ａｎｄ Ｃｈｒｚａｎｏｗｓｋａ－Ｗｏｄｎｉｃｋａ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｃｅｌｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．１２：４６３－５１９，１９９６；Ｌａｕｆｆｅｎｂｕｒｇｅｒ ａｎｄ Ｈｏｒｗｉｔｚ，Ｃｅｌｌ ８４：３５９－３６９，１９９６；Ｒｉｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ

ｅｎｃｅ　３０２：１７０４－９，２００３）。このスキーム内で、最近の研究は、細胞前部膜突出および細胞後部引き込みの両者におけるアクチン／微小管（ＭＴ）ダイナミックスの重要性を示した（Ｐａｌａｚｚｏ　ａｎｄ　Ｇｕｎｄｅｒｓｅｎ，Ｓｃｉ．ＳＴＫＥ　２００２：ＰＥ３１，２００２；Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　７：５９９－６０９．２００３）。細胞後部引き込みは調節されたＦＡ脱集合を必要とし、アクチン／ＭＴシステムはこのプロセスに重要な役割を果たす。

【０００９】

正常な生理的な条件における細胞移動と癌における細胞移動との間には多くの類似性があるが、ＭＧＣは追加または代替のメカニズムを利用すると考えられる（Ｂｅａｄｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　Ｃｅｌｌ．１９：３３５７－６８．２００８）。最近の研究から、神経前駆細胞の移動に類似する細胞移動の様式を使用して、ＭＧＣが脳の稠密な物質に浸潤することが示唆されている。

【００１０】

「ｄｏｗｎ　ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｉｎ　ｒｅｎａｌ　ｃｅｌｌ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ（ＤＲＲ１）」遺伝子（ＴＵ３Ａとしても公知であり、ＤＲＲ、ＤＲＲ－１およびＤＲＲ１として本明細書において互換的に称される）は、もともと腎細胞癌を持つ患者からの染色体３の短腕からクローン化された（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ　＆　Ｃａｎｃｅｒ　２７：１－１０，２０００）。Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．は、原発性腫瘍に加えて腎細胞癌（ＲＣＣ）細胞株におけるこの遺伝子の発現が有意に喪失することを示し、ＤＲＲの陰性の細胞株の中への遺伝子のトランスフェクションが増殖抑制をもたらすことを報告し、ＤＲＲの腫瘍抑制因子としての役割を示唆した。ＤＲＲ遺伝子産物の機能は知られていない。遺伝子配列から核移行シグナルおよびコイルドドメインを持つ１４４のアミノ酸のタンパク質が予測される。びまん性星状細胞腫と比較して、ＤＲＲ１遺伝子発現が神経膠芽腫において減少していることが報告され、神経膠腫進行におけるＤＲＲ１遺伝子発現のダウンレギュレーションについての推定上の役割もｖａｎ　ｄｅｎ　Ｂｏｏｍ　ｅｔ　ａｌ．（ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｂｏｏｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　１１９：２３３０－２３３８，２００６）によって示唆されている。

【００１１】

脳腫瘍浸潤の阻害因子および神経膠腫の治療のための新規治療的アプローチに加えてＤＲＲの阻害因子の必要性がある。

【発明の概要】

【００１２】

脳腫瘍の治療のための新規治療法標的として、タンパク質「ｄｏｗｎ　ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｉｎ　ｒｅｎａｌ　ｃｅｌｌ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ」または「ＤＲＲ」の同定を本明細書において報告する。ＤＲＲが脳腫瘍浸潤の新規調節因子であることを本明細書において示す。ＤＲＲはインビトロおよびインビボの浸潤アッセイにおいてＭＧＣの浸潤を駆動し、アクチンおよび微小管（ＭＴ）とのＤＲＲの相互作用は接着斑（ＦＡ）脱集合および細胞浸潤にとって必須である。さらに、ＤＲＲは正常なヒト脳神経膠において発現されないが、悪性神経膠腫の浸潤性構成要素において高く発現され、悪性神経膠腫におけるＤＲＲ発現と浸潤との間の強い相関性を示す。これらの研究結果は、特にＤＲＲの役割を腫瘍抑制因子として同定する従来の報告の見地からは目新しく予想外である（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ　＆　Ｃａｎｃｅｒ　２７：１－１０，２０００；ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｂｏｏｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　１１９：２３３０－２３３８，２００６）。

【００１３】

総合すれば、これらの研究結果から、ＤＲＲは脳腫瘍浸潤の新規調節因子および神経膠腫の治療における治療的介入のための標的として同定される。

【００１４】

したがって、腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現の減少に効果的な核酸分子を含む神経膠腫の治療のための組成物および方法が本明細書において提供される。本発明の核酸分子は例えば治療用ＲＮＡまたは治療用オリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスＲＮＡ、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはアンチセンスＲＮＡをコードするベクター等）を含む。

【００１５】

一実施形態において、配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６の配列またはその断片もしくは誘導体を含む治療用アンチセンス分子を腫瘍細胞に提供し、アンチセンス分子が腫瘍細胞におけるｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｉｎ ｒｅｎａｌ ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ（ＤＲＲ）の発現を減少させることを含む、腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させる方法が本明細書において提供される。

【００１６】

別の実施形態において、配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６の配列またはその断片もしくは誘導体を含む、腫瘍細胞におけるｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｉｎ ｒｅｎａｌ ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ（ＤＲＲ）の発現を減少させるためのアンチセンス分子が提供される。

【００１７】

さらに他の実施形態において、腫瘍細胞におけるｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｉｎ ｒｅｎａｌ ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ（ＤＲＲ）の発現の減少に好適な配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６の配列またはその断片もしくは誘導体をコードする配列を含むＤＮＡ分子を腫瘍細胞に提供することを含む、腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させる方法が提供される。いくつかの実施形態において、ＤＮＡ分子は、本発明の治療用分子（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはＲＮＡ）の産生に適している発現ベクター中に挿入される。発現ベクターは、例えば、配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６の配列またはその断片もしくは誘導体をコードする配列を含むことができる。

【００１８】

本明細書において記載されたアンチセンス分子またはそれらをコードするベクターをそれを必要とする被験体に投与することを含む、癌を治療する方法も本明細書において提供される。本明細書において記載されたアンチセンス分子またはそれらをコードするベクターをそれを必要とする被験体に投与することを含む、癌の進行を遅らせる方法も提供される。

【００１９】

いくつかの実施形態において、本明細書において記載されたアンチセンス分子および／またはベクターは、外科的切除、化学療法、放射線療法、免疫療法および遺伝子療法からなる群から選択される１つまたは複数の癌療法と組み合わせて使用することができる。

【００２０】

特定の実施形態において、腫瘍細胞は神経膠腫細胞（悪性神経膠腫細胞または神経膠芽腫細胞等）である。

【００２１】

一実施形態において、本発明のアンチセンス分子または本発明のアンチセンス分子をコードするベクターおよび薬学的に許容されるキャリアーを含む、癌の治療のための医薬組成物が提供される。一実施形態において、癌は神経膠腫、特に悪性神経膠芽腫である。

【００２２】

別の実施形態において、本発明の医薬組成物およびその使用説明書を含むキットが提供される。本明細書において提供されたキットは、被験体に対する同時投与、分離投与または連続投与のための、神経膠腫の治療および／またはその進行の遅延に好適な第２の活性化合物をさらに含むことができる。

【００２３】

本発明は、本発明のアンチセンス分子またはアンチセンス分子をコードするベクターを

それを必要とする被験体に投与すること、および第２の癌療法を同時に、分離して、または連続して投与することを含む、神経膠腫の治療のための癌療法の効能を増進する方法も提供する。第２の癌療法は例えば外科的切除、化学療法、放射線療法、免疫療法、および／または遺伝子療法であり得る。

【００２４】

本発明のアンチセンス分子またはその断片もしくは誘導体を腫瘍細胞に提供し、アンチセンス分子が腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させることを含む、それを必要とする被験体における悪性神経膠細胞浸潤を阻害する方法が本明細書においてさらに提供される。一実施形態において、悪性神経膠細胞浸潤は、配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６またはその断片もしくは誘導体をコードする配列を含むＤＮＡ分子を腫瘍細胞に提供し、ＤＮＡが腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させるのに好適なアンチセンス分子をコードすることにより、被験体において阻害される。

【００２５】

一実施形態において、被験体の神経膠腫細胞におけるＤＲＲ発現を測定してＤＲＲ発現が細胞の浸潤性を示すことを含む、被験体における神経膠腫の診断または予後診断のための方法が提供される。別の実施形態において、ＤＲＲタンパク質またはｍＲＮＡを特異的に結合する分子と神経膠腫細胞を接触させることおよび細胞におけるＤＲＲタンパク質またはｍＲＮＡレベルを測定してＤＲＲを発現する細胞が浸潤性であることを含む、被験体における浸潤性神経膠腫細胞を可視化する方法が提供される。

【００２６】

さらに他の実施形態において、ＤＲＲ　ＲＮＡまたはタンパク質について特異的である検出可能に標識されたプローブ、ＤＲＲ　ＲＮＡまたはタンパク質へのプローブの結合を検出するためのレポーター手段、およびその使用説明書を含む、被験体における浸潤性神経膠腫の診断または予後診断のためのキットが提供される。

【００２７】

一実施形態において、治療用核酸（例えばＤＲＲの発現を減少させるアンチセンス分子）または治療用分子をコードするベクターをそれを必要とする被験体に投与することを含む、癌を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、癌の進行は遅延され、悪性細胞浸潤は阻害され、および／または悪性神経膠細胞浸潤は阻害される。一実施形態において、癌は神経膠腫、好ましくは悪性神経膠腫、およびより好ましくは神経膠芽腫である。一実施形態において、ＤＲＲの発現を減少させる治療用オリゴヌクレオチド（複数可）は、ＤＲＲ　ｍＲＮＡまたはその断片もしくは誘導体に相補的であるかまたは特異的にハイブリダイズする。

【００２８】

本発明は、本明細書において列挙された特異的な治療用核酸に限定されることを意味するものでなく、むしろ、ＤＲＲの発現を減少させるように機能する任意の核酸の本発明の組成物および方法における使用を意図することを理解すべきである。特に、ＤＲＲの領域（例えばＤＲＲ　ｍＲＮＡの領域、断片、部分または誘導体）に相補的であるかまたは特異的にハイブリダイズし、ＤＲＲの発現を減少させる治療用オリゴヌクレオチド（例えばアンチセンスＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマーまたはリボザイム）が包含される。本発明の治療用オリゴヌクレオチドをコードするＤＮＡまたはベクターも本明細書において包含される。核酸アプタマー（タンパク質－核酸相互作用を通してＤＲＲを認識する（ＤＲＲに結合する）ユニークな三次元構造をとる配列）も、本明細書において包含される。

【００２９】

以上で本発明の性質を一般的に記載してきたが、ここでその実施形態（複数可）が例示として示される添付の図面が参照される。

【図面の簡単な説明】

【００３０】

【図１】浸潤の調節因子としてのＤＲＲの検証を示した図である。（Ａ）は機能的遺伝的

スクリーニングアッセイのアウトラインを示す。（Ｂ）はＷＴ神経膠細胞（ｃｙｔｏｔｒａｃｋｅｒ、赤色標識）およびＤＲＲ過剰発現細胞（ＤＲＲ$^{+}$、透明）を含有する混合腫瘍スフェロイドを示し、ＤＲＲ$^{+}$細胞の過浸潤を示す。実線の円はＷＴ細胞の浸潤前部の境界を示し、点線の円はＤＲＲ$^{+}$細胞の浸潤前部の境界を示す。（Ｃ）はＷＴのｃｙｔｏｔｒａｃｋｅｒの赤色標識した細胞およびＷＴ非標識細胞の浸潤が等しいことを示す対照の混合腫瘍スフェロイドを示し、ｃｙｔｏｔｒａｃｋｅｒの赤色標識は浸潤に影響を及ぼさないことを証明する。（Ｄ）は浸潤の定量的分析を示す。（Ｅ）はＷＴ細胞（赤色棒）およびＤＲＲ$^{+}$細胞（中空の棒）の最大の浸潤の定量化を示す。データは平均±標準誤差である（各々の細胞株についてｎ＝１４）；星印、Ｐ＜０．００１。（Ｆ）はＤＲＲ$^{-}$細胞から生成された腫瘍スフェロイドを示し、円は浸潤前部の境界を示す。（Ｇ）はＷＴ細胞から生成された腫瘍スフェロイドを示し、円は浸潤前部の境界を示す。（Ｈ）は（Ｆ）中の挿入図の高拡大画像を示し、ＤＲＲ$^{-}$細胞が丸い細胞形状を有することを示す。（Ｉ）は（Ｇ）中の挿入図の高拡大画像を示し、ＷＴ細胞が細長い細胞形状を有することを示す。（Ｊ）はＤＲＲ$^{-}$細胞およびＷＴ細胞を比較する細胞浸潤の定量化を示す。４００μｍを超える浸潤細胞をカウントした。データは平均±標準誤差である（各々の細胞株についてｎ＝８）；星印、Ｐ＜０．００１。（Ｋ）は細胞形状に対するＤＲＲ発現の効果の定量化を示す。ＤＲＲ発現は細長い細胞形状を促進することを示す。（Ｌ）はマウス脳の中へ移植されたＤＲＲ$^{+}$細胞を示し、細長い細胞形状および脳梁（ｃｃ）の中への浸潤を示す。矢印は脳梁に浸潤したＭＧＣを示し、矢頭は腫瘍境界を示し、挿入図中の矢印は腫瘍移植部位を示す（バー＝１００μｍ）。（Ｍ）はマウス脳の中へ移植されたＤＲＲ$^{-}$細胞が丸い細胞形状を示すことおよび脳梁に向かう浸潤の証拠がないことを示す。矢頭は腫瘍境界を示し、挿入図中の矢印は腫瘍移植部位を示す（バー＝１００μｍ）。（Ｎ）はＤＲＲ$^{+}$細胞、ＷＴ細胞およびＤＲＲ$^{-}$細胞における細胞増加の定量化を示す。

【図２】ＤＲＲはニューロンおよびヒト神経膠腫において発現されるが、正常な神経膠においては発現されないことを示した図である。低倍率（ＡおよびＢ）および高倍率（ＣおよびＤ）での正常なヒト脳のＤＲＲ免疫標識により、ＤＲＲは皮質内に見出されるが、白質（ｗｍ）においては見出されないことが示される。神経膠のマーカーＧＦＡＰの発現はＤＲＲと重複しない（Ａ～Ｄ）。ＤＲＲは皮質の非神経性の分子層（ｍｌ）において発現されない（Ｃ）。高拡大画像から、ＤＲＲはニューロンにおいて高発現されるが（Ｅ）、白質においては発現されない（Ｆ）ことが示される。ラット脳培養により、ＤＲＲ発現はニューロン中のニューロンのマーカーＭＡＰ２と重複するが（Ｇ～Ｉ）、神経膠中の神経膠のマーカーＧＦＡＰとは重複しない（Ｊ～Ｌ）ことが同様に示される。（Ｍ）において、各々のグレードの８つの悪性神経膠腫におけるＤＲＲ発現を査定した。グレード２およびグレード３の神経膠腫の両方（左側パネル、上部および下部）は一様に高レベルＤＲＲを発現する。これとは対照的に、グレード４の神経膠腫の浸潤性の末梢の腫瘍（ＰＴ）部分のみが一様にＤＲＲを発現する（右側パネル、下部）。中心部の腫瘍（ＣＴ）部分は可変的なＤＲＲ発現（５腫瘍において陰性、３腫瘍において陽性）を示す（右側パネル、上部および中央）。Ｈ＆Ｅ：ヘマトキシリン－エオジン、Ｋｉ－６７：中心部腫瘍領域における高レベル増加を示す細胞分裂のマーカー。

【図３】ＤＲＲはアクチン細胞骨格と会合し、ＬＣ２と相互作用することを示した図である。（Ａ）はトランスフェクションされたＤＲＲがアクチンストレスファイバーおよび接着斑に沿って局在することを示す。矢印はＦＡ部位での発現を示す。アクチンはファロイジンにより標識される。非アクチン結合ＤＲＲ$^{\Delta PEPE}$および非ＬＣ２結合ＤＲＲ$^{\Delta HRE}$は細胞質中に広がって発現される。それらはアクチンまたはＦＡに局在しない。ＤＲＲ$^{\Delta HRE}$は核においても見出すことができる。（Ｂ）はアクチンストレスファイバー、葉状仮足および膜ラッフルに沿ったＦＬＡＧ－ＤＲＲおよびＭＹＣ－ＬＣ２の共局在性を示す。（Ｃ）は神経膠細胞からのヘテロに発現されたＦＬＡＧ－ＤＲＲおよびＭＹＣ－ＬＣ２の共免疫沈降を示す。ＭＹＣ－ＬＣ２はＦＬＡＧ－ＤＲＲおよびＦＬＡＧ－ＤＲＲ$^{\Delta PEPE}$と共に共免疫沈降されるが、保存されたＮ末端ＨＲＥ配列（ＤＲＲ$^{\Delta HRE}$）を突然変異させた場合は共免疫沈降されない。

【図４】アクチンおよびＬＣ２とのＤＲＲの会合が細胞浸潤に必要とされることを示した図である。（Ａ）は３次元コラーゲン基質における、ＷＴ、ＤＲＲ$^{+}$、ＤＲＲ$^{\Delta PEPE}$およびＤＲＲ$^{\Delta HRE}$の３次元浸潤アッセイを示す。（Ｂ）は細胞浸潤を示すスフェロイド端のより接近した概観を示す。星印はＤＲＲ$^{\Delta PEPE}$細胞におけるスフェロイド縁部を示す。（Ｃ）２４、４８および７２時間後の細胞浸潤の定量的分析。

【図５】ＤＲＲが接着斑ダイナミックスを促進することを示した図である。ＤＲＲ$^{+}$細胞およびＷＴ細胞はＧＦＰ－パキシリンによりトランスフェクションされ、共焦点ビデオ顕微鏡を１分間隔で１７０分間使用して画像化された。（Ａ）はＧＦＰ－パキシリンによりトランスフェクションされたＤＲＲ$^{+}$細胞を示す。代表的な細胞は動的な膜突出ならびにＦＡの集合および脱集合を示す。矢印は強固なＦＡの集合および脱集合の領域を示す。ボックス（ｂおよびｃ）は（Ｂ）および（Ｃ）中に示される高拡大領域を表わす。（Ｄ）はＧＦＰ－パキシリンによりトランスフェクションされたＷＴ細胞を示す。代表的な細胞は膜突出の欠如および安定したＦＡを示す。画像間隔にわたって集合または脱集合したＦＡは同定されなかった。

【図６】ＤＲＲが接着斑脱集合を促進することを示した図である。ＤＲＲ$^{-}$、ＤＲＲ$^{+}$（Ａ）およびＤＲＲ$^{\Delta PEPE}$（Ｂ）を２４時間飢餓状態にし、無処理のまま放置するか、または１０μＭノコダゾールにより４時間処理した。次いでＭＴ脱重合剤を示された時刻で洗浄した。ＤＲＲ発現はＦＡ脱集合を促進するが、ＤＲＲ欠損は多くの安定したＦＡを引き起こす。

【図７】ＤＲＲがアクチンおよび微小管細胞骨格を組織化することを示した図である。ＤＲＲ$^{+}$細胞（Ａ）およびＤＲＲ$^{-}$細胞（Ｂ）を４８時間ＦＮ（１０μｇ／ｍｌ）上で増殖させ、その後固定した。次いで細胞はＭＴ（緑色）、アクチン（赤色）およびビンキュリン（青色）について標識した。挿入図は示されたボックスで囲んだもののより高倍率を表わす。矢印はＭＴがＤＲＲ$^{+}$細胞においてＦＡに標的化されることを示すが、ＭＴはＤＲＲ$^{-}$細胞においてＦＡに到達しない。バー＝２０μｍ。（Ｃ）細胞骨格形成および浸潤におけるＤＲＲの役割を要約する作業モデル。ＤＲＲが、ＬＣ２と共に、アクチン－ＭＴ架橋物質として作用することを提唱する。ＤＲＲはＦＡにＭＴを標的化し、ＦＡの脱集合、細胞後部引き込み、および細胞浸潤を促進する。

【図８】ＤＲＲ$^{-}$およびＤＲＲ$^{+}$の安定した細胞株におけるＤＲＲタンパク質発現を示した図である。（Ａ）は野生型細胞と比較して、ＤＲＲ$^{+}$細胞株におけるＤＲＲ発現の増加およびＤＲＲ$^{-}$細胞株におけるＤＲＲ発現の減少を示すタンパク質ブロッティングを示す。（Ｂ）はマウス脳の中へ移植されたＤＲＲ$^{+}$細胞を示し、細長い細胞形状および脳梁（ｃｃ）の中への浸潤を示す。矢印は脳梁に浸潤したＭＧＣを示す。（Ｃ）はマウス脳の中へ移植されたＤＲＲ$^{-}$細胞が丸い細胞形状を示すことおよび脳梁に向かう浸潤の証拠がないことを示す。矢頭は腫瘍境界を示す。バー＝１００μｍ。

【図９】ＤＲＲが遊走細胞の形態を調節することを示した図である。遊走中のＤＲＲ$^{+}$、ＷＴおよびＤＲＲ$^{-}$細胞の形態を２Ｄ遊走アッセイにおいて査定した。１０時間の間隔にわたって捕捉された代表的な画像により、ＤＲＲ$^{+}$細胞は長い細い突出を伸長するが、ＷＴ細胞およびＤＲＲ$^{-}$細胞は幅の広いラメラを使用して移動することが示される。

【図１０】ヒト皮質におけるＤＲＲ発現を示した図である。（Ａ）における高倍率での正常なヒト大脳皮質のＤＲＲ免疫標識は、ＤＲＲが非神経性分子層（ｍｌ）において発現されないことを示す。（Ｂ）における隣接する切片のＧＦＡＰ免疫標識は、ＤＲＲ陰性の分子層における星状細胞の存在（矢印）を示す。

【図１１】ＤＲＲが複数の神経膠腫細胞株において接着斑ダイナミックスおよび浸潤を調節することを示した図である。対照Ｕ３４３細胞またはＵ３４３－ＤＲＲ$^{-}$細胞（Ａ）および対照Ｃ６細胞またはＣ６－ＤＲＲ$^{-}$細胞（Ｂ）をアクチン（ファロイジン）およびＦＡ（ビンキュリン）で共標識した。対照細胞は小さなＦＡを含有するが、ＤＲＲ発現が減少した細胞は大きなＦＡを含有する。バー＝２０μｍ。Ｕ３４３（Ｃ）、Ｃ６（Ｄ）およびＵ８７（Ｅ）神経膠腫細胞におけるＤＲＲ発現の減少は、３次元浸潤アッセイにおいて浸潤性の有意な低下を引き起こす。

【図１２】悪性神経膠細胞における内在性ＤＲＲの局在性を示した図である。抗ＤＲＲ抗体による野生型Ｕ２５１細胞の免疫標識は、アクチンストレスファイバー、ＦＡ、膜ラッフルに沿った局在、および核中の局在を示す。

【図１３】ＤＲＲ－アクチン会合のために種にわたって必要とされる領域内のアミノ酸配列の比較を示した図である。

【図１４】ストレスファイバー局在のために必要とされるＤＲＲ領域を同定する短縮分析を示した図である。ｄｓＲｅｄをＤＲＲの全長および短縮型バージョンのＣ末端に融合した。ＤＲＲ－ｄｓＲＥＤ融合タンパク質をＷＴ　Ｕ２５１において発現させ、ストレスファイバー局在についてアッセイした。これらのデータからアミノ酸６２～１００および１０８～１２０がストレスファイバー局在のために必要なことが示される。

【図１５】ＲＮＡ干渉を使用するＤＲＲ減少が接着斑ダイナミックスに対する特異的な的確な効果を引き起こすことを示した図である。（Ａ）はＤＲＲを標的化するＧＦＰ－ＲＮＡｉを発現するＵ２５１細胞を示し、（Ｂ）は免疫標識ＤＲＲによって同定されるＤＲＲを一過性に発現するＤＲＲ救助細胞を示し（矢印）、（Ｃ）においてＦＡは免疫を標識するビンキュリンによって可視化された。ＤＲＲ$^{+}$ＦＡ表現型（ＦＡサイズの減少およびＦＡ数の増加）は、ＤＲＲ$^{-}$細胞におけるＤＲＲの発現により救助することができる。

【図１６】ＤＲＲ発現の減少がヒト神経膠腫浸潤を阻害することを示した図である。ヒトの高グレードの神経膠腫を外科的に切除し、直ちに培養中に置いた。２週間後に、この神経膠腫は対照ＧＦＰベクターまたはＤＲＲ－ＲＮＡｉ（ベクターはＧＦＰも含有する）によりトランスフェクションされた。腫瘍スフェロイドはこれらの細胞から生成され、コラーゲン基質の中へ移植された。明視野（上部レーン）および蛍光画像（下部レーン）を移植１～１４日後で捕捉した。非トランスフェクション腫瘍（Ａ）および対照のＧＦＰトランスフェクション腫瘍（Ｂ）は容易に浸潤するが、ＤＲＲ－ＲＮＡｉトランスフェクション腫瘍（Ｃ）は浸潤しない。（Ｄ）は、スフェロイド縁部からの浸潤距離の定量化を示し、そこでＤは日を示し、ＧＦＰは緑色蛍光タンパク質であり、ＧＢＭは神経膠芽腫（高グレードの神経膠腫）である。

【図１７】ＤＲＲ発現の減少における異なるＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドの効能の比較を示した図である。ＤＲＲ$^{+}$細胞は、示されたＤＲＲアンチセンス（アンチセンス４（配列番号：１４）、アンチセンス５（配列番号：１５）またはアンチセンス６（配列番号：１６）；非標的化対照アンチセンス（Ｃｔｌアンチセンス））によりトランスフェクションされたか；またはトランスフェクションされないまま（非トランスフェクションさ）ままであった。７２時間の後トランスフェクション、細胞を溶解し、１２％のＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して分析した。ＤＲＲ発現量は抗ＤＲＲの抗体を使用して検出した。チューブリンのウエスタンブロットはローディング対照として含まれる。

【図１８】ＤＲＲ発現を減少させた場合のアクチン細胞骨格および接着斑における変化を示した図である。ＤＲＲ$^{+}$細胞は、非標的化対照アンチセンス（ｃｔｌアンチセンス）、示されたＤＲＲアンチセンス（アンチセンスＧ４（配列番号：１４）、アンチセンスＧ５（配列番号：１５）またはアンチセンスＧ６（配列番号：１６））によりトランスフェクションされたか、またはトランスフェクションされないまま（非トランスフェクション）であった。７２時間で、細胞を固定し、対比染色し、共焦点顕微鏡によって分析してビンキュリン（左側カラム；緑色）およびアクチン（右側カラム；赤色）を可視化した。

【図１９】インビトロのスクラッチアッセイを使用する、ＤＲＲ発現の減少後のＤＲＲ$^{+}$細胞遊走の程度を示した図である。ＤＲＲ$^{+}$細胞は、トランスフェクションされなかった（ＣＴＬ）か、または非標的化対照アンチセンス（Ｃｔｌアンチセンス）によりトランスフェクションされたか、または示されたアンチセンス（アンチセンスＧ４（配列番号：１４）、アンチセンスＧ５（配列番号：１５）またはアンチセンスＧ６（配列番号：１６））によりトランスフェクションされた。（Ａ）：スクラッチから画像を０、２４時間および４８時間で捕捉した。（Ｂ）：細胞遊走の定量的分析を示す。ＤＲＲＣＴＬ１およびＤＲＲＣＴＬ２は非トランスフェクション対照（ＤＲＲ$^{+}$対照）を表わす。緑色バー（上部バー）：４８時間；赤色バー（中央バー）：２４時間；青色バー（下部バー）：０時間

【図２０】インビトロの３次元浸潤アッセイを使用する、ＤＲＲ発現の減少後のＤＲＲ$^{+}$細胞浸潤の分析を示した図である。ＤＲＲ$^{+}$細胞は、トランスフェクションされなかった（ＣＴＬ）か、または示されたアンチセンスＧ６（配列番号：１６）によりトランスフェクションされた。（Ａ）：細胞浸潤の画像を０、２４、４８、７２および９６時間で捕捉し、Ｇ６（スフェア番号１）およびＧ６ｂ（スフェア番号２）はアンチセンスＧ６により処理された２つの個別の腫瘍である。（Ｂ）：浸潤の定量的分析を示し、緑色バー（各々の組のバーの左手バー）はＣＴＬ（対照）を示し、赤色バー（各々の組のバーの右手バー）はアンチセンスＧ６（配列番号：１６）を示す。

【図２１】ＤＲＲ発現の減少後のヒト神経膠芽腫細胞におけるアクチン細胞骨格および接着斑の変化を示した図である。ＧＢＭ６細胞は、示されたアンチセンス（非トランスフェクション；Ｃｔｌアンチセンス；またはアンチセンスＧ６（配列番号：１６））によりＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００試薬を使用してトランスフェクションされた。７２時間で、細胞を固定し、対比染色し、共焦点顕微鏡によって分析してビンキュリン（緑色；左側カラム）およびアクチン（赤色；右側カラム）を可視化した。

【図２２】インビトロのスクラッチアッセイを使用する、ＤＲＲ発現の減少後のヒト神経膠芽腫細胞遊走の程度を示した図である。ＧＢＭ６細胞は、示されたアンチセンス（アンチセンスＧ４（配列番号：１４）、アンチセンスＧ５（配列番号：１５）またはアンチセンスＧ６（配列番号：１６））または非標的化対照アンチセンス（ＣＴＬアンチセンス（アンチセンスＧ１／配列番号：１１））によりトランスフェクションされた。スクラッチの画像を０および２４時間で捕捉した。

【発明を実施するための形態】

【００３１】

本発明は、脳腫瘍浸潤の新規調節因子および神経膠腫（特に悪性神経膠芽腫）の治療における治療的介入のための標的としてのｄｏｗｎ　ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｉｎ　ｒｅｎａｌ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ（本明細書においてＤＲＲ、ＤＲＲ１またはＤＲＲ－１と称される）の同定に関する。特に、神経膠腫腫瘍細胞におけるＤＲＲの発現を減少させる分子を含む、神経膠腫を治療するおよび／または神経膠腫腫瘍細胞浸潤を阻害するための新規化合物、医薬組成物および方法が本明細書において提供される。

【００３２】

本発明は、したがってＤＲＲをコードする核酸分子の機能または効果の修飾における使用のための化合物（特にオリゴヌクレオチドおよび類似種）を提供する。いくつかの実施形態において、これは、ＤＲＲをコードする１つまたは複数の核酸分子と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの提供によって遂行される。その標的核酸とハイブリダイズする本発明の化合物は、概して「アンチセンス」と称され、したがってＤＲＲの阻害のメカニズムは「アンチセンス阻害」と称される。典型的にはかかるアンチセンス阻害は、標的ＲＮＡ分子が切断されるか、分解されるか、さもなくば操作不可能にされるようなオリゴヌクレオチドストランドまたはセグメントの水素結合に基づくハイブリダイゼーションに基づく。本発明は、ＤＲＲまたはその部分をコードする標的化特異的核酸分子（ＤＲＲをコードするｍＲＮＡ等）を考慮する。

【００３３】

本明細書において使用される時「ハイブリダイゼーション」は、オリゴマー化合物の相補的ストランドの対合を指す。本発明において、対合の好ましいメカニズムは、相補的なヌクレオシドまたはオリゴマー化合物のストランドのヌクレオチド塩基（核酸塩基）の間の、水素結合（Ｗａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ水素結合、Ｈｏｏｇｓｔｅｅｎ水素結合または逆Ｈｏｏｇｓｔｅｅｎ水素結合であり得る）を含む。例えば、アデニンおよびチミンは水素結合の形成を通して対合する相補的な核酸塩基である。ハイブリダイゼーションは変動的な状況下で起こり得る。本明細書において使用される時「相補的な」は、オリゴマー化合物の２つの核酸塩基との間の正確な対合についての能力を指す。例えば、オリゴヌクレオチド（オリゴマー化合物）の特定の位置の核酸塩基が、標的核酸の特定の位置の核酸塩基と水素結合することが可能であり、該標的核酸がＤＮＡ、ＲＮＡまたはオリゴヌクレオ

チド分子であるならば、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間の水素結合の位置は相補的な位置であると判断される。各々の分子中の十分な数の相補的な位置が互いに水素結合できる核酸塩基によって占められる場合、オリゴヌクレオチドとさらなるＤＮＡ、ＲＮＡまたはオリゴヌクレオチド分子は、互いに相補的である。したがって、「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」は、安定的で特異的な結合がオリゴヌクレオチドと標的核酸との間に起こるような十分な数の核酸塩基にわたる十分な程度の正確な対合または相補性を示すために使用される用語である。

【００３４】

アンチセンス化合物の標的核酸（例えばＤＲＲ　ｍＲＮＡ）への結合が標的核酸の正常な機能を妨害して活性の喪失を引き起こす場合、この化合物は特異的にハイブリダイズ可能であり、特異的結合が所望される条件下（すなわち、インビボのアッセイまたは治療的処理の事例で生理的状態下、およびインビトロアッセイの事例でアッセイが実行される条件下）で、アンチセンス化合物の非標的核酸配列への非特異的結合を回避するような、十分な程度の相補性がある。

【００３５】

アンチセンス化合物の配列が、特異的にハイブリダイズ可能なその標的核酸の配列に対して必ずしも１００％相補的である必要がないことは当該技術分野において理解される。さらに、介在するセグメントまたは隣接するセグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しないように（例えばループ構造またはヘアピン構造）、オリゴヌクレオチドは１つまたは複数のセグメントにわたってハイブリダイズすることができる。本発明のアンチセンス化合物は、標的核酸内の標的部位に対して少なくとも７０％の配列相補性を含むことが好ましく、より好ましくはそれらは標的核酸配列に対して少なくとも８０％の配列相補性、少なくとも８５％の配列相補性、少なくとも９０％の配列相補性、または少なくとも９５％の配列相補性を含む。例えば、アンチセンス化合物の２０の核酸塩基のうちの１８が標的部位に対して相補的でありそれゆえ特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物は、９０パーセントの相補性を表わす。この例において、残りの非相補的な核酸塩基はクラスター化されるかまたは相補的な核酸塩基により散在させられ、互いにまたは相補的な核酸塩基に隣接している必要はない。それゆえ、標的核酸と完全な相補性の２つの領域が隣接する、４つの非相補的な核酸塩基を有する１８の核酸塩基長のアンチセンス化合物は、標的核酸と７７．８％の全体的な相補性を有し、したがって本発明の範囲内に分類されるだろう。標的核酸の領域とのアンチセンス化合物のパーセント相補性は、当該技術分野において公知のＢＬＡＳＴプログラム（ｂａｓｉｃ　ｌｏｃａｌ　ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　ｓｅａｒｃｈ　ｔｏｏｌｓ）およびＰｏｗｅｒＢＬＡＳＴプログラムを使用してルーチンに決定することができる（Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０，１９９０；Ｚｈａｎｇ　ａｎｄ　Ｍａｄｄｅｎ，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．７：６４９－６５６，１９９７）。

【００３６】

本発明において、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」というフレーズは、本発明の化合物がその標的配列へハイブリダイズするが他の配列には最小数でハイブリダイズする条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、異なる環境および本発明の文脈において異なり、オリゴマー化合物が標的配列へハイブリダイズする「ストリンジェントな条件」は、オリゴマー化合物の性質および組成ならびにそれらが調べられているアッセイによって決定される。ハイブリダイゼーション条件の非限定例は、５０％ホルムアミド、０．５％ドデシル硫酸ナトリウムおよびブロッキング試薬を含有する、６×ＳＳＣ緩衝液（ｐＨ７．０の９０ｍＭクエン酸ナトリウムを含有する９００ｍＭ塩化ナトリウム）中で４２℃で１６時間行なわれるハイブリダイゼーションである。次いで室温の０．１％ＳＤＳ含有１×ＳＳＣにより２回、次いで室温の０．１％ＳＤＳ含有０．１×ＳＳＣ、および最終的に４２℃の０．５％ＳＤＳ含有０．１×ＳＳＣにより膜を洗浄する。

【００３７】

アンチセンス薬物は、薬物特性を良好に操作するために化学的に修飾される典型的には小さな（例えば１２～２１のヌクレオチド、または１５～３０のヌクレオチド）ＤＮＡ片またはＲＮＡ片である。アンチセンス薬物は標的ＲＮＡへの結合（ハイブリダイズ）および二重らせんの形成後に働く。この二重らせん（すなわち２ストランドの分子）の形成は、ＲＮＡが正常に機能および／またはタンパク質を生ずることを阻止する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＲＮａｓｅＨ動員を介する標的ｍＲＮＡの破壊、ＲＮＡプロセッシングまたは翻訳の干渉、核外輸送、折り畳みまたはリボソームスキャニングを含む多数の代替メカニズムを介してｍＲＮＡ翻訳を阻害する。一旦アンチセンス薬物がその標的ＲＮＡに結合すれば、利用することができる少なくとも１ダースの公知のアンチセンスメカニズムがある。例えば、治療用分子は細胞内のタンパク質産生の調節に関与する非コードＲＮＡ（ｍｉｃｒｏＲＮＡ等）を標的化することができる。ｍｉｃｒｏＲＮＡは、細胞の内部で生成され、遺伝子発現を制御するプロセスまたは経路において重要な機能を有すると思われる小さな天然に存在するＲＮＡ分子である。ヒトゲノムにおいて同定された約７００のｍｉｃｒｏＲＮＡがあり、これらはすべてのヒト遺伝子のうちのおよそ３分の１の発現を調節すると考えられる。他のアンチセンス薬物は、例えば１つのタンパク質ｖｓ別のタンパク質の産生を支援するようにスプライシングを制御することができる。

【００３８】

様々なタイプのアンチセンスオリゴヌクレオチドは公知であり、本発明の組成物および方法において使用することができる。公知のアンチセンス技術のいずれかを使用して、ＤＲＲを標的化しＤＲＲ発現を減少させ得ることが意図される。例えば、糖修飾ヌクレオシド（例えば２’－Ｏ－修飾リボヌクレオシドまたはアラビノヌクレオシド）および２’－デオキシヌクレオシドの互い違いのセグメントを有するオリゴヌクレオシド、ならびに／または糖修飾ヌクレオチドおよび２’－デオキシヌクレオチドの互い違いのセグメントを有するオリゴヌクレオチドは、「アルティマー（ａｌｔｉｍｅｒ）」として公知であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製物のために使用することができる。

【００３９】

アルティマーは例えばＰＣＴ公開番号ＷＯ／２００３／０６４４４１中で記載され、その内容は参照として本明細書に援用される。一実施形態において、本発明の治療用分子は、糖修飾ヌクレオシドおよび２’－デオキシヌクレオシドのセグメントを互い違いに含むオリゴヌクレオシドを含むアンチセンスであり、そこでセグメントまたはユニットの各々は独立して少なくとも１つの糖修飾ヌクレオシドまたは２’－デオキシヌクレオシドをそれぞれ含む。例えば、オリゴヌクレオシドは第１のセグメントおよび第２のセグメントを互い違いに含み、そこで第１のセグメントは少なくとも１つの糖修飾ヌクレオシドを含み、第２のセグメントは少なくとも１つの２’－デオキシヌクレオシドを含む。複数の実施形態において、オリゴヌクレオシドは、第１のセグメントおよび第２のセグメントを各々少なくとも２つ含み、その結果として少なくとも４つの互い違いのセグメントを含む。

【００４０】

一実施形態において、オリゴヌクレオシドはリン酸塩を含むヌクレオシド間リンケージを含み、その結果としてオリゴヌクレオチドである。複数の実施形態において、糖修飾ヌクレオシドおよび／または２’－デオキシヌクレオシドはリン酸塩を含み、その結果として糖修飾ヌクレオチドおよび／または２’－デオキシヌクレオチドである。したがって、一実施形態において、本発明は、アラビノヌクレオチドおよび２’－デオキシヌクレオチドのセグメントまたはユニットを互い違いに含むオリゴヌクレオチドを提供し、そこで該セグメントまたはユニットの各々は独立して少なくとも１つのアラビノヌクレオチドまたは２’－デオキシヌクレオチドをそれぞれ含む。一実施形態において、オリゴヌクレオチドは少なくとも２つのアラビノヌクレオチドセグメントおよび少なくとも２つの２’－デオキシヌクレオチドセグメントを含み、その結果として少なくとも４つの互い違いのユニットを有する。

【００４１】

一実施形態において、糖修飾オリゴヌクレオチドはＤＮＡ様立体配座を取り入れること

ができる。一実施形態において、糖修飾ヌクレオチドは、アラビノヌクレオチド、α－Ｌ－ロックされた核酸、シクロヘキセン核酸、および負の電荷を持つ２’－酸素原子を欠損するリボヌクレオチドからなる群から選択される。一実施形態において、負の電荷を持つ２’－酸素原子を欠損するリボヌクレオチドは、２’－アルキル－Ｄ－リボースおよび２’－ＳＣＨ$_3$－Ｄ－リボースからなる群から選択される。

【００４２】

一実施形態において、セグメントは各々独立して約１～約６のアラビノヌクレオチドまたは２’－デオキシヌクレオチドを含む。さらなる実施形態において、セグメントは各々独立して約２～約５または約３～約４のアラビノヌクレオチドまたは２’－デオキシヌクレオチドを含む。さらなる実施形態において、セグメントは各々独立して約３のアラビノヌクレオチドまたは２’－デオキシヌクレオチドを含む。

【００４３】

一実施形態において、上述のオリゴヌクレオチドは以下のものからなる群から構造を選択する。

ａ）　$(A_x-D_y)_n$　　Ｉ

ｂ）　$(D_y-A_x)_n$　　ＩＩ

ｃ）　$(A_x-D_y)_m-A_x-D_y-A_x$　　ＩＩＩ

ｄ）　$(D_y-A_x)_m-D_y-A_x-D_y$　　ＩＶ

式中、各々のｍ、ｘおよびｙは各々独立して１以上の整数であり、ｎは２以上の整数であり、Ａは糖修飾ヌクレオチドであり、Ｄは２’－デオキシリボヌクレオチドである。

【００４４】

一実施形態において、上述の糖修飾ヌクレオチドはフッ素、ヒドロキシル基、アミノ基、シアン基、アジド基、－ＣＨ＝ＣＨ$_2$，－Ｃ≡ＣＨ基、アルキル基、官能基化されたアルキル基、アルコキシ基および官能基化されたアルコキシ基からなる群から選択される２’置換基を含む。一実施形態において、アルキル基は低級アルキル基である。一実施形態において、低級アルキル基は、メチル基、エチル基およびプロピル基からなる群から選択される。一実施形態において、官能基化されたアルキル基は、メチルアミノ基、エチルアミノ基およびプロピルアミノ基からなる群から選択される。一実施形態において、アルコキシ基は、メトキシ基、エトキシ基およびプロポキシ基からなる群から選択される。一実施形態において、官能基化されたアルコキシ基は－Ｏ（CH_2）$_q$－Ｒであり、式中、ｑ＝２、３または４であり、－Ｒは－ＮＨ$_2$基，－ＯＣＨ$_3$基および－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_3$基からなる群から選択される。

【００４５】

一実施形態において、糖修飾ヌクレオチドはアラビノヌクレオチドである。さらなる実施形態において、２’置換基はフッ素であり、アラビノヌクレオチドは２’－フルオロアラビノヌクレオチド（２’Ｆ－ＡＮＡ；「ＦＡＮＡ」とも略される）である。

【００４６】

一実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは以下のものからなる群から選択される１つまたは複数のヌクレオチド間のリンケージを含む。ａ）ホスホジエステル；ｂ）ホスホトリエステル；ｃ）ホスホロチオエート；ｄ）ホスホロジチオエート；ｅ）Ｒｐ－ホスホロチオエート；ｆ）Ｓｐ－ホスホロチオエート；ｇ）ボラノホスフェート；ｈ）メチレン（メチルイミノ）（３’CH_2－Ｎ（CH_3）－Ｏ５’）；ｉ）３’－チオホルムアセタール（３’Ｓ－CH_2－Ｏ５’）；ｊ）アミド（３’CH_2－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－５’）；ｋ）メチルホスホネート；ｌ）ホスホロアミダート（３’－ＯＰ（O_2）－Ｎ５’）；およびｍ）（ａ）～（ｌ）の任意の組み合わせ。

【００４７】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは約３０以下のヌクレオチド、さらなる実施形態において、約８～約２５のヌクレオチド、およびなおさらなる実施形態において、約１８のヌクレオチドからなる。一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは約１２のヌクレオチド、約１５のヌクレオチド、約１８のヌクレオチド、約

２０のヌクレオチド、約２５のヌクレオチド、または約３０のヌクレオチドを有する。別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは約１２～約３０のヌクレオチド長である。

【００４８】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは構造Ｉ（式中、ｘ＝１、ｙ＝１およびｎ＝９）を有し、その結果として以下の構造を有する。Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ。一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは構造ＩＩ（式中、ｘ＝１、ｙ＝１およびｎ＝９）を有し、その結果として以下の構造を有する。Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ－Ｄ－Ａ。一実施形態において、上述のオリゴヌクレオチドは構造ＩＩＩ（式中、ｘ＝２、ｙ＝２およびｍ＝３）を有し、その結果として以下の構造を有する。Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ。一実施形態において、上述のオリゴヌクレオチドは構造ＩＶ（式中、ｘ＝２、ｙ＝２およびｍ＝３）を有し、その結果として以下の構造を有する。Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ。一実施形態において、上述のオリゴヌクレオチドは構造Ｉ（式中、ｘ＝３、ｙ＝３およびｎ＝３）を有し、その結果として以下の構造を有する。Ａ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ｄ。一実施形態において、上述のオリゴヌクレオチドは構造ＩＩ（式中、ｘ＝３、ｙ＝３およびｎ＝３）を有し、その結果として以下の構造を有する。Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ａ。一実施形態において、上述のオリゴヌクレオチドは構造ＩＩＩ（式中、ｘ＝４、ｙ＝３およびｍ＝１）を有し、その結果として以下の構造を有する。Ａ－Ａ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ａ－Ａ。一実施形態において、上述のオリゴヌクレオチドは前記構造ＩＶ（式中、ｘ＝４、ｙ＝３およびｍ＝１）を有し、その結果として以下の構造を有する。Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ａ－Ａ－Ａ－Ｄ－Ｄ－Ｄ－Ｄ。

【００４９】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオシドは、修飾ヌクレオシドを含む第３のセグメントをさらに含み、そこで該第３のセグメントは、（ａ）前記互い違いの第１のセグメントおよび第２のセグメントの５’末端、（ｂ）前記互い違いの第１のセグメントおよび第２のセグメントの３’末端、または（ｃ）（ａ）および（ｂ）の両方、に隣接する。

【００５０】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドを含む第３のセグメントをさらに含み、そこで該第３のセグメントは、（ａ）前記互い違いの第１のセグメントおよび第２のセグメントの５’末端、（ｂ）前記互い違いの第１セグメントおよび第２のセグメントの３’末端、または（ｃ）（ａ）および（ｂ）の両方、に隣接する。一実施形態において、修飾ヌクレオチドは修飾リボヌクレオチドである。一実施形態において、修飾リボヌクレオチドはその２’位での修飾を含む。一実施形態において、２’修飾は、メトキシ基、メトキシエチル基、フルオロ基およびプロピルアミノ基からなる群から選択される。

【００５１】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、２’Ｆ－ＡＮＡ（またはＦＡＮＡ）等のアラビノヌクレオチド（ＡＮＡ）およびＤＮＡの互い違いのセグメントを含むアルティマーである。本明細書において使用される時「アラビノヌクレオチド」は、アラビノフラノース糖を含むヌクレオチドを指す。

【００５２】

好ましくは、アンチセンス分子において、特異的結合が所望される条件下（インビボのアッセイまたは治療的処理の事例で生理的条件下、またはインビトロのアッセイの事例でアッセイが行われる条件下等）で、アンチセンス分子の非標的配列への非特異的結合を回避するような、標的ＲＮＡ（例えばＤＲＲ）に対する十分な程度の相補性がある。アンチ

センス結合のための標的ＲＮＡは、タンパク質をコードする情報だけでなく、関連するリボヌクレオチド（例えば、５’非翻訳領域、３’非翻訳領域、５’キャップ領域およびイントロン／エクソンジャンクションリボヌクレオチドを形成する）も含むことができる。

【００５３】

本発明のアンチセンス分子（オリゴヌクレオシドまたはオリゴヌクレオチド）は、糖間骨格リンケージ（ホスホトリエステル、メチルホスホナート、３’－チオホルムアセタール、アミド、短鎖のアルキルもしくはシクロアルキル糖間リンケージまたは短鎖のヘテロ原子もしくはヘテロ環の糖間リンケージ、ホスホロチオエート等）を含有するもの、ならびにCH_2－－ＮＨ－－Ｏ－－CH_2骨格、CH_2－－Ｎ（CH_3）－－Ｏ－－CH_2骨格（メチレン（メチルイミノ）またはＭＭＩの骨格として公知）、CH_2－－Ｏ－－Ｎ（CH_3）－－CH_2骨格、CH_2－－Ｎ（CH_3）－－Ｎ（CH_3）－－CH_2骨格ならびにＯ－－Ｎ（CH_3）－－CH_2－－CH_2骨格（式中ホスホジエステルはＯ－Ｐ（Ｏ）$_2$－－Ｏ－－CH_2である）を持つものを含み得る。代替の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ペプチド核酸（ＰＮＡ、時には「タンパク質」核酸または「ペプチド」核酸と称される）骨格を有することができ、その中のオリゴヌクレオチドのホスホジエステル骨格は、ヌクレオシド塩基がポリアミド骨格中のアザ窒素原子またはメチレン基に直接または間接的に結合されるポリアミド骨格に置き換えることができる（例えばＮｉｅｌｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９１，２５４：１４９７および米国特許第５，５３９，０８２号を参照されたい）。リン酸ジエステル結合は、キラルな構造およびエナンチオマー特異的な構造に置換することができる。

【００５４】

上で指摘されるように、オリゴヌクレオチドはさらに少なくとも１つの修飾ヌクレオチド塩基を含む種を含むことができる。

【００５５】

したがって、通常は天然で見出されるもの以外のプリンおよびピリミジンを使用することができる。上で指摘されるように、糖修飾ヌクレオチドセグメント（例えばＡＮＡセグメント）のヌクレオチドは、そのペントフラノシル部分上での修飾を含むことができる。

【００５６】

かかる修飾の例は、２’－Ｏ－アルキル－置換ヌクレオチドおよび２’－ハロゲン－置換ヌクレオチドである。本発明において有用な糖モイエティの２’位の修飾のいくつかの具体的な例は、ＯＨ、ＳＨ、SCH_3、Ｆ、ＯＣＮ、Ｏ（CH_2）$_n$、NH_2またはＯ（CH_2）$_n$ CH_3（式中、ｎは１～約１０である）；Ｃ１～Ｃ１０の低級アルキル、置換された低級アルキル、アルカリールまたはアラルキル；Ｃｌ；Ｂｒ；ＣＮ；CF_3；OCF_3；Ｏ－アルキル、Ｓ－アルキル、またはＮ－アルキル；Ｏ－アルケニル、Ｓ－アルケニル、またはＮ－アルケニル；$SOCH_3$、SO_2CH_3；ONO_2；NO_2；N_3；NH_2；ヘテロシクロアルキル；ヘテロシクロアルカリール；アミノアルキルアミノ；ポリアルキルアミノ；置換されたシリル；ＲＮＡ切断基；レポーター基；インターカレーター；オリゴヌクレオチドの薬物速度論的特性を改善するための基；またはオリゴヌクレオチドの薬物動態学的特性を改善するための基および類似の特性を有する他の置換基である。糖修飾ヌクレオチドセグメントのヌクレオチドの１つまたは複数のペントフラノシル基は、他の糖、糖模倣体（シクロブチル等）、または糖に代わる他のモイエティによって置き換えることができる。

【００５７】

「ヌクレオシド」は、糖（例えば［デオキシ］リボース、アラビノースおよび誘導体）と組み合わされた塩基（例えばプリン［例えばＡおよびＧ］またはピリミジン［例えばＣ、５－メチルＣ、ＴおよびＵ］）を指す。「ヌクレオチド」は、その糖モイエティへリン酸基が付加されたヌクレオシドを指す。複数の実施形態において、これらの構造は、例えば塩基モイエティ、糖モイエティおよび／またはリン酸塩モイエティのいずれかにおける様々な修飾を含むことができる。本明細書において使用される時「修飾ヌクレオチド／修飾ヌクレオシド」は、定義された生来の形態とは異なり、したがってこの形態を除外した

ヌクレオチド／ヌクレオシドを指す。

【００５８】

本明細書において使用される時「オリゴヌクレオチド」は、ともに連結された複数のヌクレオチドを含む配列を指す。オリゴヌクレオチドは、その骨格構造中におよび／または１つまたは複数のその構成要素ヌクレオチド中に修飾構造を含むことができる。複数の実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは約１～２００塩基長、さらなる実施形態において約５～約５０塩基、約８～約４０塩基、およびなおさらなる実施形態において、約１２～約２５塩基長である。

【００５９】

当業者によって理解されるように、「ＲＮＡ」という用語は糖としてリボースを持つ核酸を指すために特別に使用されるが、「オリゴヌクレオチド」はＲＮＡ、ＤＮＡ、修飾ヌクレオシド、修飾ヌクレオチド、ＦＡＮＡなどをカバーする幅広い用語である。

【００６０】

一実施形態において、本発明の治療用分子は「ギャップマー」を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。「ギャップマー」（「キメラのアンチセンス」オリゴとしても公知）は例えばＰＣＴ国際公開第ＷＯ／２００２／２０７７３号中に記載され、その内容は参照として本明細書に援用される。

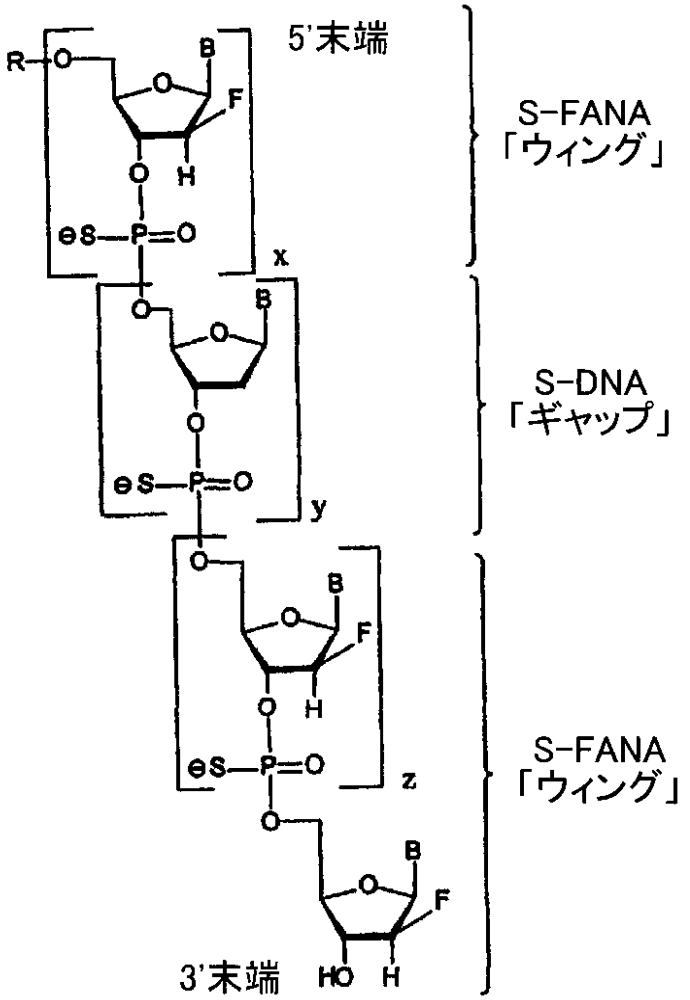
【００６１】

例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その標的ＲＮＡ配列と二重らせんを形成する、可変的な長さの１シリーズのデオキシリボースヌクレオチド残基が隣接するアラビノヌクレオチドまたは修飾アラビノヌクレオチド残基から構築されたキメラであり得る。かかる結果のアンチセンスオリゴヌクレオチド／ＲＮＡ二重らせんは、ＲＮａｓｅＨ（この二重らせんを認識し、ＲＮＡ標的部分を分解する酵素）のための基質である。ＲＮＡ標的のＲＮａｓｅＨを媒介とした切断はアンチセンスオリゴヌクレオチドの主要な作用メカニズムであると判断される。

【００６２】

一実施形態において、治療用オリゴヌクレオチドは、ｓ－Ｄ－２’－デオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）から構築された定義された配列が隣接する、２’－デオキシ－２’－フルオロ－ｓ－Ｄ－アラビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）から構築されたアンチセンスハイブリッドキメラである。一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、修飾アラビノースおよび２’－デオキシ糖のキメラを含む。かかるオリゴヌクレオチドには「［ＦＡＮＡウィング］－［ＤＮＡギャップ］－［ＦＡＮＡウィング］」または５’ＲＯ（ＦＡＮＡ－ｐ）ｘ－（ＤＮＡ－ｐ）ｙ－（ＦＡＮＡ－ｐ）ｚ－（ＦＡＮＡ）３’ＯＨの一般的な骨格組成を有し、より正確には以下の一般構造を有する。

【化１】

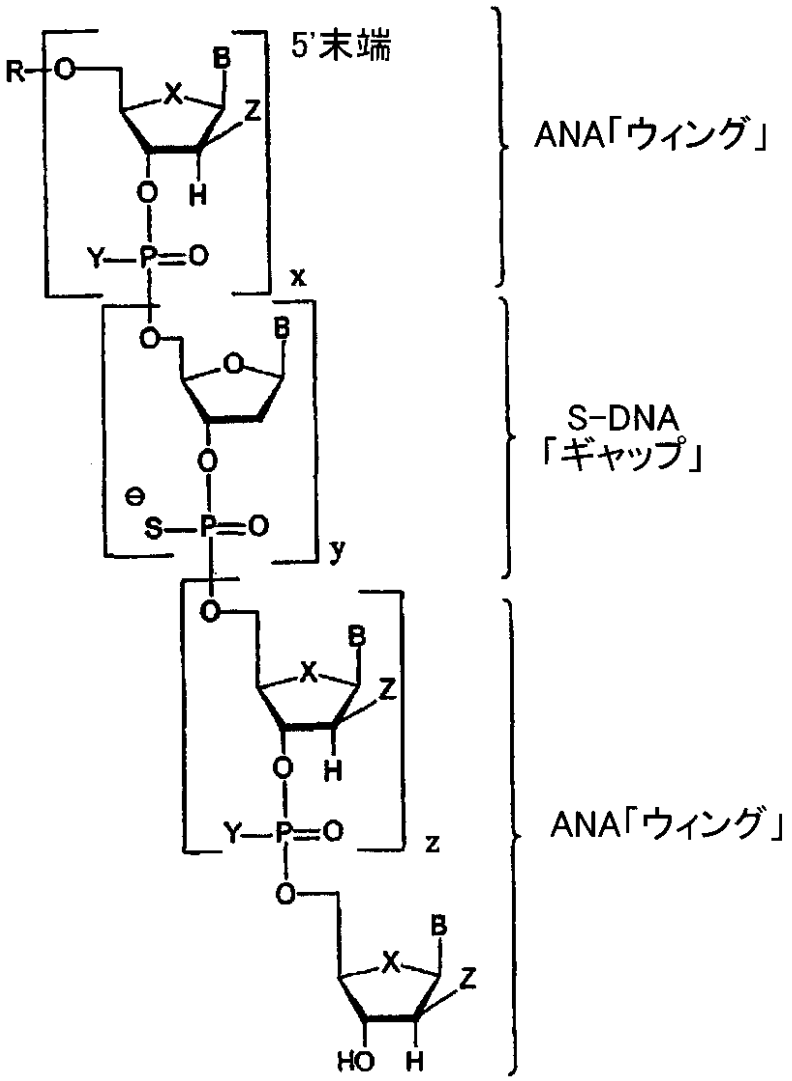


式中、ｘ≧１、ｙ≧１およびｚ≧０であり、Ｒは、水素、チオリン酸塩、およびかかるオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増進するリンカーモイエティからなる群から選択される。

【００６３】

本発明の別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは以下の式を有する。

【化２】

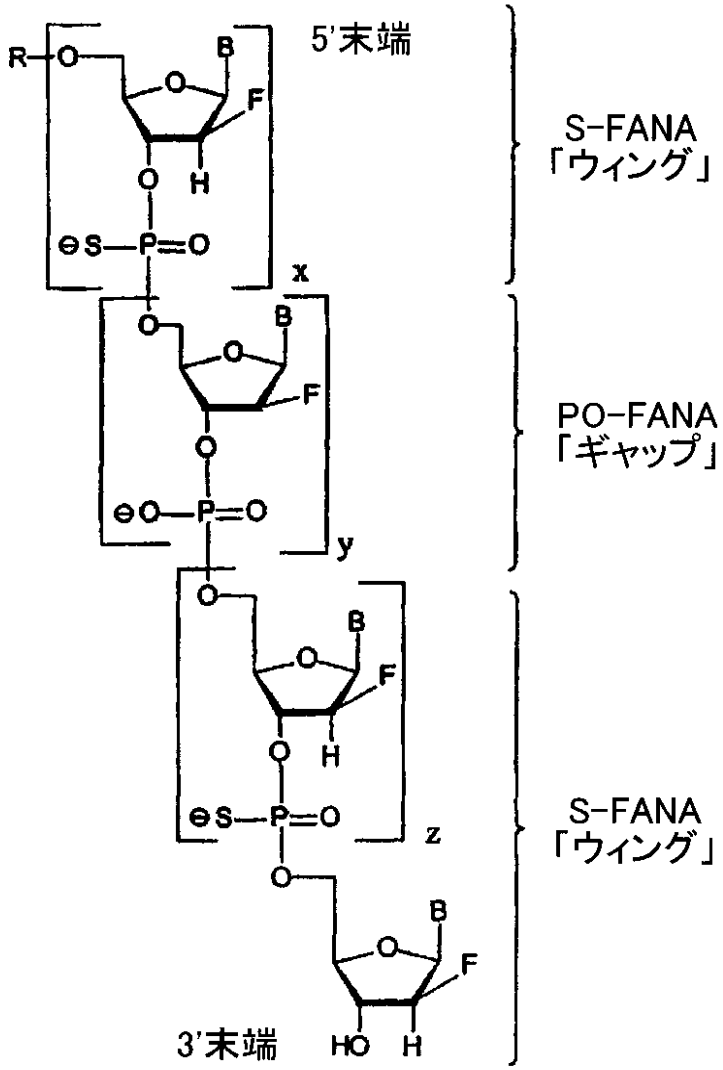


式中、ｘ≧１、ｙ≧１およびｚ≧０であり；Ｒは、水素、チオリン酸塩、およびかかるオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増進するリンカーモイエティからなる群から選択され；Ｂは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシンおよび５－メチルシトシンからなる群から選択され；ヌクレオチド間のリン酸塩結合でのＹは、硫黄、酸素、メチル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ（１～約２０の炭素原子を有するアルキル基）、メトキシおよびエトキシからなる群から選択され；フラノース環でのＸ（４’位）は、酸素、硫黄およびメチレン（CH_2）の群から選択され；糖環の２’位のＺは、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CH_2F）、アリル、アミノ、アリール、アルコキシ、およびアジドからなる群から選択される。

【００６４】

本発明の別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは以下の式を有する。

【化３】

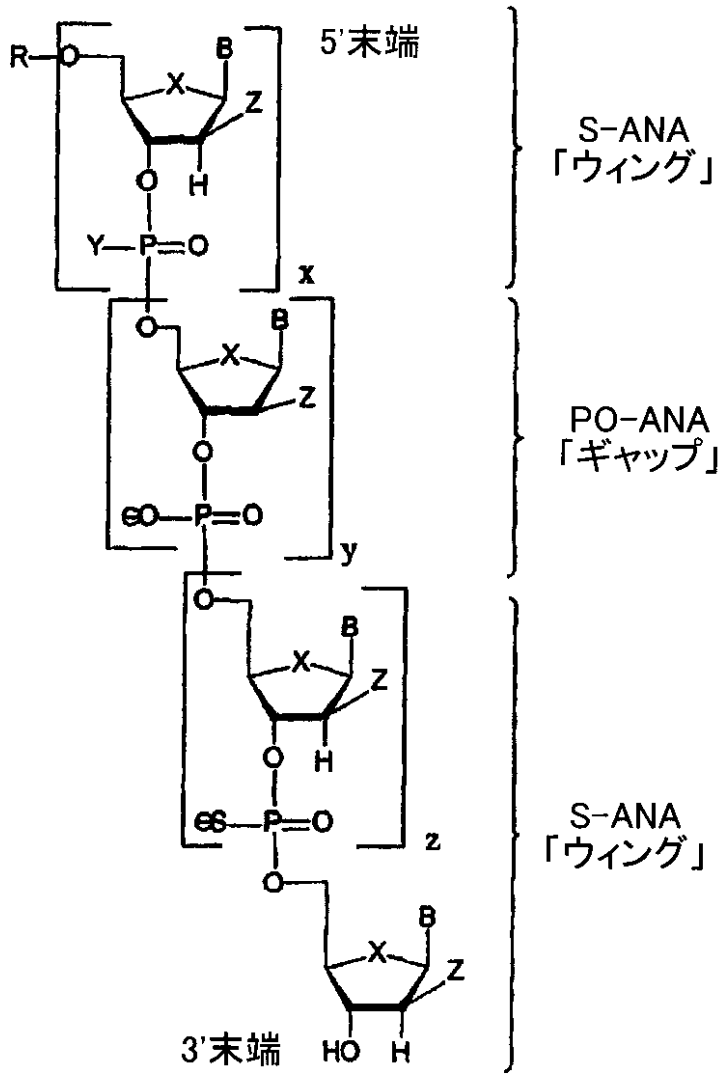


式中、ｘ≧１、ｙ≧１およびｚ≧０であり；Ｒは、水素、チオリン酸塩、およびかかるオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増進するリンカーモイエティからなる群から選択され；Ｂは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシンおよび５－メチルシトシンからなる群から選択される。

【００６５】

本発明の他の実施形態によれば、以下の式を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド標的化ＤＲＲが提供される。

【化４】



式中、ｘ≧１、ｙ≧１およびｚ≧０であり；Ｒは、水素、チオリン酸塩、およびかかるオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増進するリンカーモイエティからなる群から選択され；Ｂは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシンおよび５－メチルシトシンからなる群から選択され；ヌクレオチド間のリン酸塩結合でのＹは、硫黄、酸素、メチル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ（１～約２０の炭素原子を有するアルキル基）、メトキシおよびエトキシからなる群から選択され；フラノース環でのＸ（４’位）は、酸素、硫黄およびメチレン（CH_2）の群から選択され；糖環の２’位のＺは、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、ヒドロキシル、アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば－CH_2F）、アリル、アミノ、アリール、アルコキシおよびアジドからなる群から選択される。特定の実施形態において、Ｒはチオリン酸塩であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドはホスホロチオエートである。

【００６６】

他の実施形態において、ＷＯ／１９９９／６７３７８中に記載されるように、ＦＡＮＡユニットから完全に構成されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明の組成物および方法において使用される。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９９／６７３７８号中で記載されたもの等のＰ－Ｄ－アラビノヌクレオチド（すなわちＡＮＡオリゴマー）および２’－デオキシ－２’－フルオロ－ｓ－Ｄ－アラビノヌクレオシド（すなわち２’Ｆ－ＡＮＡオリゴマー）からなる糖修飾オリゴマーを含むことができる。

【００６７】

さらに他の実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、Ｇ－テトラッドまたは
ＤＲＲを結合するユニークな３次元構造を形成することができ、少なくとも１つのアラビ
ノース修飾ヌクレオチドを含むことができる核酸リガンド（または「アプタマー」）であ
り得る。例えば、アラビノース修飾ヌクレオチドは２’－デオキシ－２’－フルオロアラ
ビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）であり得る。アラビノース修飾ヌクレオチドは、Ｇ－テト
ラッドのループまたは代わりにＧ－テトラッドのグアノシン残基において存在することが
できる。

【００６８】

一実施形態において、アプタマーは、アラビノヌクレオチドに完全に置換される。例え
ば、５’－ＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ－３’である。別の実施形態において、アン
チセンスＲＮＡは２’－デオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）および２’－デオキシ－２
’－フルオロアラビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）から構築されたキメラである。本発明の
他の実施形態において、本発明のアンチセンスＲＮＡは、アラビノースヌクレオチドおよ
びデオキシリボースヌクレオチドの任意の組み合わせから選択される糖－リン酸塩骨格組
成物を有するアプタマーである。特定の実施形態において、アラビノースヌクレオチドは
２’－デオキシ－２’－フルオロアラビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）である。本発明の他
の実施形態において、アラビノヌクレオチドは、フッ素基、ヒドロキシル基、アミノ基、
アジド基、アルキル基、アルコキシ基およびアルコキシアルキル基からなる群から選択さ
れる２’置換基を含む。本発明のさらなる実施形態において、アルキル基は、メチル基、
エチル基、プロピル基、ブチル基、および官能基化されたアルキル基（エチルアミノ基、
プロピルアミノ基およびブチルアミノ基等）からなる群から選択される。複数の実施形態
において、アルコキシ基は、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基および－Ｏ（CH_2）$_q$－Ｒ（式中、ｑ＝２～４であり、－Ｒは－NH_2基、－OCH_3基または－OCH_2CH_3基である）等の官能基化されたアルコキシ基からなる群から選択される。複数の実施形態において、アルコキシアルキル基はメトキシエチルおよびエトキシエチルからなる群から選択される。複数の実施形態において、２’置換基はフッ素であり、アラビノヌクレオチドは２’－フルオロアラビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）である。一実施形態において、ＦＡＮＡヌクレオチドはアラＦ－Ｎ（式中、Ｎ＝Ｕ、Ｔ、Ｃ、ＧまたはＡ）になり得る。

【００６９】

本発明の他の実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは以下のものからなる群
から選択される１つまたは複数のヌクレオチド間のリンケージを含むアプタマーである。
ａ）ホスホジエステル；ｂ）ホスホトリエステル；ｃ）ホスホロチオエート；ｄ）メチル
ホスホネート；ｅ）ボラノホスフェート；およびｆ）（ａ）～（ｅ）の任意の組み合わせ
。

【００７０】

さらに他の実施形態において、ＰＣＴ国際公開第ＷＯ／２００７／０３８８６９号中で
記載されたもの等のオリゴヌクレオチドは本発明の組成物および方法において使用される
。かかるオリゴヌクレオチドは、Ｇ－テトラッドまたはＤＲＲを結合する他のユニークな
３次元構造を形成することができ、少なくとも１つのアラビノース修飾ヌクレオチドを含
むことができる核酸リガンド（またはアプタマー）であり得る。一実施形態において、ア
ラビノース修飾ヌクレオチドは２’－デオキシ－２’－フルオロアラビノヌクレオチド（
ＦＡＮＡ）である。

【００７１】

一実施形態において、アプタマーは、アプタマー中の任意の場所でアラビノヌクレオチ
ドの任意の数を有することができ、例えば以下の通りである。
５’－ＡＤＡＤＡＤＡＤＡＤＡＤＡ－３’；５’－ＡＡＤＡＤＤＡＤＤＤＡＡＤＡＤ
－３’；５’－ＡＡＡＡＤＡＡＡＤＡＤＤＤＡＤ－３’；など
（式中、Ａはアラビノヌクレオチドであり、Ｄは２’－デオキシリボヌクレオチドである
）。

【００７２】

本発明の他の実施形態において、アプタマーはアラビノヌクレオチドにより完全に置換される。例えば以下の通りである。５’－ＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ－３’。

【００７３】

本発明の他の実施形態において、ＤＲＲを選択的に結合する可能な２’－デオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）および２－デオキシ－２’－フルオロアラビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）から構築されたキメラが提供される。

【００７４】

他の実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、アラビノースおよびデオキシリボースのヌクレオチドの任意の組み合わせから選択される糖－リン酸塩骨格組成物を有する配列のいずれか１つのアプタマーである。アラビノースヌクレオチドは２’－デオキシ－２’－フルオロアラビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）であり得る。

【００７５】

本発明の他の実施形態において、アラビノヌクレオチドは、フッ素基、ヒドロキシル基、アミノ基、アジド基、アルキル基、アルコキシ基、およびアルコキシアルキル基からなる群から選択される２’置換基を含む。本発明のさらなる実施形態において、アルキル基は、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、および官能基化されたアルキル基（エチルアミノ基、プロピルアミノ基およびブチルアミノ基）からなる群から選択される。複数の実施形態において、アルコキシ基は、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基および－Ｏ（CH_2）$_q$－Ｒ（式中、ｑ＝２～４であり、－Ｒは－NH_2基、－OCH_3基または－OCH_2CH_3基である）等の官能基化されたアルコキシ基からなる群から選択される。複数の実施形態において、アルコキシアルキル基はメトキシエチルおよびエトキシエチルからなる群から選択される。複数の実施形態において、２’置換基はフッ素であり、アラビノヌクレオチドは２’－フルオロアラビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）である。一実施形態において、ＦＡＮＡヌクレオチドは、アラＦ－Ｇ、アラＦ－Ｔ、アラＦ－Ｃ、アラＦ－ＡまたはアラＦ－Ｕである。

【００７６】

本発明の他の実施形態において、アプタマーは以下のものからなる群から選択される１つまたは複数のヌクレオチド間のリンケージを含む。ａ）ホスホジエステル；ｂ）ホスホトリエステル；ｃ）ホスホロチオエート；ｄ）メチルホスホネート；ｅ）ボラノホスフェート；およびｆ）（ａ）～（ｅ）の任意の組み合わせ。

【００７７】

別の実施形態において、アプタマーは、好ましくはＧ－テトラッドを形成するアプタマーのループ、またはＤＲＲを結合するユニークな３次元構造において、アプタマーのうちの少なくとも１つのヌクレオチドがアラビノース修飾ヌクレオチド、好ましくは２’－デオキシ－２’－フルオロアラビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）により置き換えられる。

【００７８】

他の実施形態において、ＷＯ／２００３／０３７９０９中で記載されたもの等のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明の方法および組成物において使用することができる。簡潔には、かかるオリゴヌクレオチドは以下の構造を有する。［Ｒ’－ＸＪ$_a$－R^2］ａ

式中、ａは１以上であり；式中、各々のR^1およびR^2は独立して少なくとも１つのヌクレオチドであり；式中、Ｘは非環状リンカーである。一実施形態において、オリゴヌクレオチドは少なくとも１つの修飾デオキシリボヌクレオチドを含む（すなわち、R^1、R^2または両方のいずれかは少なくとも１つの修飾デオキシリボヌクレオチドを含むことができる）。一実施形態において、修飾デオキシリボヌクレオチドは、ＡＮＡ、ＰＳ－ＡＮＡ、ＰＳ－ＤＮＡ、ＲＮＡ－ＤＮＡおよびＤＮＡ－ＲＮＡのキメラ、ＰＳ－［ＲＮＡ－ＤＮＡ］およびＰＳ－［ＤＮＡ－ＲＮＡ］のキメラ、ＰＳ－［ＡＮＡ－ＤＮＡ］およびＰＳ－［ＤＮＡ－ＡＮＡ］のキメラ、ＲＮＡ、ＰＳ－ＲＮＡ、ＰＤＥ－ＲＮＡまたはＰＳ－ＲＮＡのアナログ、ロックされた核酸（ＬＮＡ）、ホスホロジアミダートモルホリノ核酸、Ｎ３’－Ｐ５’ホスホロアミダートＤＮＡ、シクロヘキセン核酸、α－Ｌ－ＬＮＡ、ボラノホスフェートＤＮＡ、メチルホスホネートＤＮＡ、およびその組み合わせからなる群から選択

される。一実施形態において、ＡＮＡはＦＡＮＡ（例えばＰＤＥ－ＦＡＮＡまたはＰＳ－ＦＡＮＡ）である。

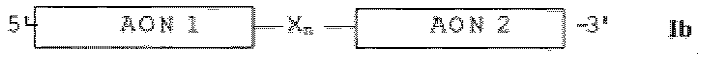
【００７９】

一実施形態において、上述のＰＤＥ－ＲＮＡまたはＰＳ－ＲＮＡアナログは、２’位で修飾されるＲＮＡ（そこで２’－置換基は、アルキル、アルコキシ、アルキルアルコキシ、Ｆおよびその組み合わせからなる群から選択される）からなる群から選択される。一実施形態において、非環状リンカーは非環状ヌクレオシドおよび非ヌクレオチド性リンカーからなる群から選択される。複数の実施形態において、非環状ヌクレオシドはプリンセコヌクレオシドおよびピリミジンセコヌクレオシドからなる群から選択される。複数の実施形態において、プリンセコヌクレオシドはセコアデノシンおよびセコグアノシンからなる群から選択される。複数の実施形態において、ピリミジンセコヌクレオシドはセコチミジン、セコシチジンおよびセコウリジンからなる群から選択される。一実施形態において、非ヌクレオチド性リンカーはアミノ酸およびアミノ酸誘導体からなる群から選択されるリンカーを含む。複数の実施形態において、アミノ酸誘導体は（ａ）ヘテロ環塩基がメチレンカルボニルリンカーを介して付加されるＮ－（２－アミノエチル）グリシンユニット（ＰＮＡモノマー）および（ｂ）Ｏ－ＰＮＡユニットからなる群から選択される。

【００８０】

本発明のさらなる態様によれば、以下の一般構造Ｉｂのアンチセンスオリゴヌクレオチドキメラが提供される。

【化５】



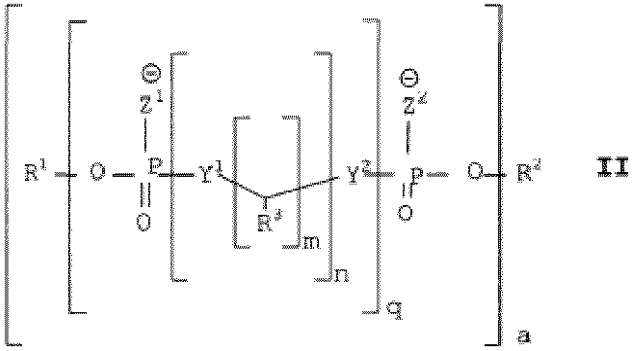
Ib

式中、ｎは１以上である。上記の構造Ｉｂを参照して、「ＡＯＮ１」はオリゴヌクレオチド鎖であり、それは複数の実施形態において、ＡＮＡ（例えばＦＡＮＡ）、ＤＮＡ、ＰＳ－ＤＮＡ、５’－ＲＮＡ－ＤＮＡ－３’キメラに加えて、他のＲＮａｓｅのＨの作用可能なオリゴヌクレオチド、例えばアラビノ核酸（２’－ＯＨ置換ＡＮＡ）（Ｄａｍｈａ，Ｍ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１９９８，１２０，１２９７６）、シクロヘキセン核酸（Ｗａｎｇ　Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０００，１２２，８５９５）、ボラノホスフェートをリンクしたＤＮＡ（Ｒａｉｔ，Ｖ．Ｋ．ｅｔ　ａｌ．Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｖ．１９９９，９，５３）、およびα－Ｌ－ロックされた核酸（Ｓｏｒｅｎｓｅｎ，Ｍ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２００２，１２４，２１６４）またはその組み合わせからなる群から選択され；および「ＡＯＮ２」はオリゴヌクレオチド鎖であり、それは複数の実施形態において、ＦＡＮＡ、ＤＮＡ、ＰＳ－ＤＮＡ、５’－ＤＮＡ－ＲＮＡ－３’キメラに加えて、上記のもの等の他のＲＮａｓｅのＨの作用可能なオリゴヌクレオチドまたはその組み合わせからなる群から選択される。ＡＯＮ１およびＡＯＮ２のヌクレオチド間のリンケージは、ホスホジエステル基、ホスホトリエステル基、ホスホロチオエート基、メチルホスホネート基、および／またはホスホロアミダート（５’Ｎ－３’Ｐおよび５’Ｐ－３’Ｎ）基を含むが、必ずしもこれらに限定されない。ＡＮＡ－Ｘ－ＡＮＡキメラコンストラクト中のアラビノース糖のＣ２’原子へ直接付加された置換基は、フッ素基、ヒドロキシル基、アミノ基、アジド基、アルキル（例えば２’－メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）基、およびアルコキシ基（例えば２’－ＯＭｅ、２’－ＯＥｔ、２’－ＯＰｒ、２’－ＯＢｕ、２’－OCH_2CH_2OMeなど）を含むが、これらに限定されない。

【００８１】

他の実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは以下の構造を有する。

【化６】



式中、各々のｍ、ｎ、ｑおよびａは独立して１以上の整数であり；式中、各々のＲおよびＲ[2]は独立して少なくとも１つのヌクレオチドであり、式中、各々のＺ[1]およびＺ[2]は、酸素原子、硫黄原子、アミノ基およびアルキルアミノ基からなる群から独立して選択され；式中、各々のＹ[1]およびＹ[2]は、酸素、硫黄およびＮＨからなる群から独立して選択され；式中、Ｒ[3]は、Ｈ、アルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、プリン、ピリミジンおよびその組み合わせからなる群から選択される。複数の実施形態において、Ｒ[3]はアデニンもしくはグアニンまたはその誘導体である。複数の実施形態において、Ｒ[3]は、チミン、シトシン、５－メチルシトシン、ウラシルまたはその誘導体である。複数の実施形態において、上で言及された各々のＲ[1]およびＲ[2]は、ＡＮＡ、ＰＳ－ＡＮＡ、ＰＳ－ＤＮＡ、ＲＮＡ－ＤＮＡおよびＤＮＡ－ＲＮＡのキメラ、ＰＳ－［ＲＮＡ－ＤＮＡ］およびＰＳ－［ＤＮＡ－ＲＮＡ］のキメラ、ＰＳ－［ＡＮＡ－ＤＮＡ］およびＰＳ－［ＤＮＡ－ＡＮＡ］のキメラ、α－Ｌ－ＬＮＡ、シクロヘキセン核酸、ＲＮＡ、ＰＳ－ＲＮＡ、ＰＤＥ－ＲＮＡまたはＰＳ－ＲＮＡアナログ、ロックされた核酸（ＬＮＡ）、ホスホロジアミダートモルホリノ核酸、Ｎ３’－Ｐ５’ホスホロアミダートＤＮＡ、メチルホスホネートＤＮＡ、およびその組み合わせからなる群から独立して選択される。

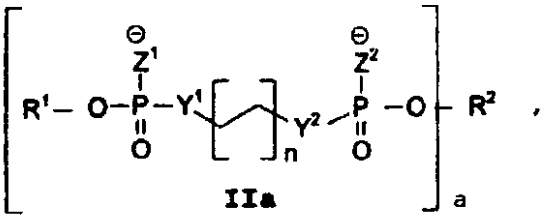
【００８２】

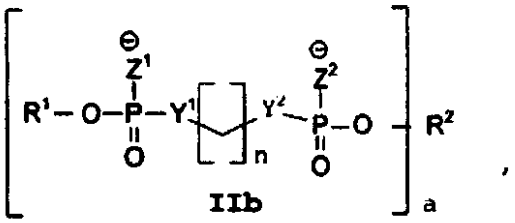
複数の実施形態において、上で言及された各々のＲ[1]およびＲ[2]は、ヌクレオチド間のリンケージを介して接続している少なくとも２つのヌクレオチドを独立して含むことができ、該ヌクレオチド間のリンケージは、ホスホジエステル基、ホスホトリエステル基、ホスホロチオエート基、メチルホスホネート基、ホスホロアミダート（５’Ｎ－３’Ｐおよび５’Ｐ－３’Ｎ）基およびその組み合わせからなる群から選択される。他の実施形態において、上で言及された各々のＲ[1]およびＲ[2]は独立してＡＮＡを含む。複数の実施形態において、上で言及されたＡＮＡは、フッ素基、ヒドロキシル基、アミノ基、アジド基、アルキル（例えばメチル、エチル、プロピルおよびブチル）基およびアルコキシ（例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシおよびメトキシエトキシ）基からなる群から選択される２’－置換基を含む。一実施形態において、２’－置換基はフッ素であり、前記ＡＮＡはＦＡＮＡである。複数の実施形態において、アルキル基は、メチル基、エチル基、プロピル基およびブチル基からなる群から選択される。複数の実施形態において、アルコキシ基は、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基およびメトキシエトキシ基からなる群から選択される。

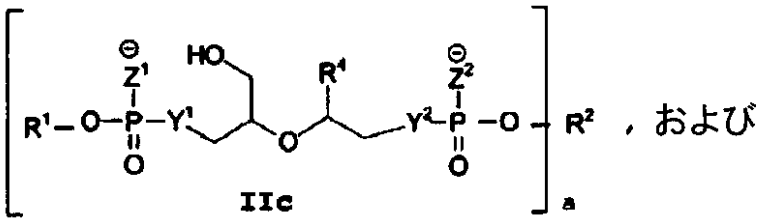
【００８３】

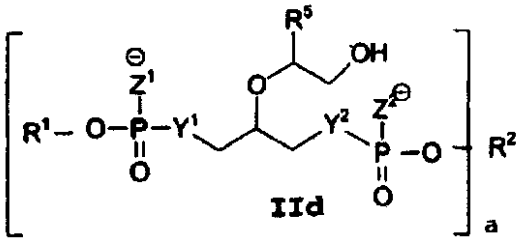
他の実施形態において、ＤＲＲを標的化する本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下からなる群から選択される。

【化７】









式中、R^1、R^2、ｎ、ａ、Z^1、Z^2、Y^1およびY^2は上で定義された通りであり、各々のR^4およびR^5はプリン（例えばアデニンおよびグアニン、またはその誘導体）およびピリミジン（例えばチミン、シトシン、ウラシルまたはその誘導体）からなる群から独立して選択される。一実施形態において、R^1およびR^2はＰＤＥ－ＦＡＮＡであり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1およびR^2はＰＳ－ＦＡＮＡであり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1は［ＦＡＮＡ－ＤＮＡ］であり；R^2は［ＤＮＡ－ＦＡＮＡ］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1は［ＦＡＮＡ－ＤＮＡ］であり；R^2はＦＡＮＡであり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＦＡＮＡであり；R^2は［ＤＮＡ－ＦＡＮＡ］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1およびR^2はＰＳ－ＤＮＡであり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＰＤＥ－［ＲＮＡ－ＤＮＡ］であり、R^2はＰＤＥ－［ＤＮＡ－ＲＮＡ］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＲＮＡであり；R^2は［ＤＮＡ－ＲＮＡ］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＳ－［（２’Ｏ－アルキル）ＲＮＡ－ＤＮＡ］であり；R^2はＳ－［ＤＮＡ－（２Ｏ－アルキル）ＲＮＡ］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＳ－［（２’Ｏ－アルキル）ＲＮＡ－ＤＮＡ］であり；R^2はＳ－［（２’０－アルキル）ＲＮＡ］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＳ－［（２’Ｏ－アルキル）ＲＮＡ］であり；R^2はＳ－［ＤＮＡ－（２’Ｏ－アルキル）ＲＮＡ］であり；ａである＝１。一実施形態において、R^1はＳ－［（２’Ｏ－アルコキシアルキル）ＲＮＡ－ＤＮＡ］であり；R^2はＳ－［ＤＮＡ－（２’Ｏ－アルコキシアルキル）ＲＮＡ］であり；ａ＝１であり。一実施形態において、R^1はＳ－［（２’Ｏ－アルコキシアルキル）ＲＮＡ－ＤＮＡ］で

あり；R^2はＳ－［（２’Ｏ－アルコキシアルキル）ＲＮＡ］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＳ－［（２’Ｏ－アルコキシアルキル）ＲＮＡ］であり；R^2はＳ－［ＤＮＡ－（２’Ｏ－アルコキシアルキル）ＲＮＡ］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＰＤＥ－［（２’Ｏ－アルキル－ＲＮＡ）－ＤＮＡ］であり；R^2はＰＤＥ－［ＤＮＡ－（２’Ｏ－アルキルＲＮＡ）］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＰＳ－［（２’Ｏ－アルキル－ＲＮＡ）－ＤＮＡ］であり；R^2はＰＳ－［ＤＮＡ－（２’Ｏ－アルキルＲＮＡ）］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1はＰＤＥ－［（２’Ｏ－アルコキシアルキル－ＲＮＡ）－ＤＮＡ］であり；R^2はＰＤＥ－［ＤＮＡ－（２’Ｏ－アルコキシアルキルＲＮＡ）］であり；ａ＝１である。

【００８４】

一実施形態において、R^1はＰＳ－［（２’Ｏ－アルコキシアルキル－ＲＮＡ）－ＤＮＡ］であり；R^2はＰＳ－［ＤＮＡ－（２’Ｏ－アルコキシアルキルＲＮＡ）］であり；ａ＝１である。一実施形態において、R^1およびR^2はＰＤＥ－［ＦＡＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｂを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方であり、ｎ＝４である。一実施形態において、R^1はＰＳ－［ＦＡＮＡ］であり；R^2はＰＤＥ－［ＦＡＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｂを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方であり、ｎ＝４である。一実施形態において、R^1はＦＡＮＡであり；R^2はＰＳ－ＦＡＮＡであり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｂを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり、ａ＝４である。一実施形態において、R^1およびR^2はＰＳ－［ＦＡＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｂを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方であり、ｎ＝４である。一実施形態において、R^1はＰＳ－［ＤＮＡ］であり；R^2はＰＤＥ－［ＤＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｂを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方であり、ｎ＝４である。一実施形態において、R^1はＰＤＥ－［ＤＮＡ］であり；R^2はＰＳ－［ＤＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｂを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方であり、ｎ＝　である。一実施形態において、R^1およびR^2はＰＳ－［ＤＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｂを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方であり、ｎ＝４である。一実施形態において、R^1およびR^2はＰＤＥ－［ＦＡＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｅを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方である。一実施形態において、R^1はＰＳ－［ＦＡＮＡ］であり；R^2はＰＤＥ－［ＦＡＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｅを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方である。一実施形態において、R^1はＰＤＥ－［ＦＡＮＡ］であり；R^2はＰＳ－［ＦＡＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｂを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方であり、ｎ＝４である。

【００８５】

一実施形態において、R^1およびR^2はＰＳ－［ＦＡＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｅを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方である。一実施形態において、R^1はＰＳ－［ＤＮＡ］であり；R^2はＰＤＥ－［ＤＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｅを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方である。一実施形態において、R^1はＤＮＡであり；R^2はＰＳ－ＤＮＡであり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｈｅを有する。一実施形態において、R^1およびR^2はＰＳ－［ＤＮＡ］であり；ａ＝１であり；オリゴヌクレオチドは構造Ｉｉｅを有し、その中でY^1、Y^2は酸素であり；Z^1、Z^2は酸素または硫黄の両方である。一実施形態において、ａ＝２であり各々のR^1およびR^2は独立して少なくとも３つのヌクレオチドからなり、さらなる実施形態において、３～８のヌクレオチドからなる。一実施形態において、ａ＝３であり各々のR^1および

R^2は独立して少なくとも２つのヌクレオチドからなり、さらなる実施形態において、各々のR^1およびR^2は独立して２～６のヌクレオチドからなる。一実施形態において、オリゴヌクレオチドは標的ＲＮＡに対するアンチセンスである。

【００８６】

本文脈において、「治療用分子」という用語はＤＲＲ発現の減少または阻害における使用のための核酸分子を指す。治療用分子は例えば治療用オリゴヌクレオチドまたは治療用ＲＮＡであり得る。治療用分子の非限定例は、当該技術分野において標的ＲＮＡの発現を減少させることが公知であるような、アンチセンスＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー、リボザイムおよび他の核酸分子などを含む。一実施形態において、標的ＲＮＡはＤＲＲ　ｍＲＮＡもしくは断片またはその部分である。治療用分子は本明細書において「治療用核酸分子」とも称され、この用語は互換的に使用される。いくつかの実施形態において、治療用分子またはオリゴヌクレオチドは、ＤＲＲもしくは部分またはその断片をコードする１つまたは複数の核酸分子と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを包含する。他の実施形態において、配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６またはその断片もしくは誘導体の配列を含むオリゴヌクレオチドが包含される。

【００８７】

一実施形態において、本発明の治療用分子（例えば治療用ＲＮＡまたは治療用オリゴヌクレオチド）は、ＤＲＲ　ｍＲＮＡの断片または部分に相補的であるかまたは特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。治療用分子が相補的であるかまたは特異的にハイブリダイズするＤＲＲ　ｍＲＮＡの断片または部分の非限定例は、以下のものを含む。ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド１７０～１９０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド１７５～１９５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド１８０～２００；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド１８５～２０５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド１９０～２１０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド１９５～２１５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２００～２２０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２０５～２２５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２１０～２３０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２１５～２３５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２２０～２４０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２２５～２４５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２３０～２５０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２３５～２５５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２４０～２６０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２４５～２６５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２５０～２７０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２５５～２７５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２６０～２８０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２６５～２８５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２７０～２９０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２７５～２９５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２８０～３００；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２８５～３０５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２９０～３１０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド２９５～３１５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３００～３２０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３０５～３２５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３１０～３３０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３１５～３３５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３２０～３４０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３２５～３４５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３３０～３５０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３３５～３５５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３４０～３６０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３４５～３６５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３５０～３７０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３５５～３７５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３６０～３８０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３６５～３８５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３７０～３９０；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３７５～３９５；ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド３８０～４００；またはその断片、部分もしくは誘導体。

【００８８】

他の実施形態において、治療用核酸分子は、ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド４２５～４３９に相補的であるか、もしくは特異的にヌクレオチドにハイブリダイズする配列、ま

たはＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド４２０～４４４に相補的であるか、もしくは特異的にヌクレオチドにハイブリダイズする配列、またはＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド４１５～４３９に相補的であるか、もしくは特異的にヌクレオチドにハイブリダイズする配列、またはＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド４２４～４３９に相補的であるか、もしくは特異的にヌクレオチドにハイブリダイズする配列、ＤＲＲ　ｍＲＮＡの４２３～４３９、４２２～４３９、４２１～４３９、もしくは４２０～４３９、または４２０～４３４の配列；またはその断片、部分もしくは誘導体を有する。

【００８９】

いずれか末端での追加の１～３ヌクレオチド、またはより小さな断片、または列挙された配列および領域の誘導体にハイブリダイズする核酸も包含されることが理解されるべきである。加えて、核酸配列は治療用分子の機能のために必要とされる特別のヌクレオチドを含むことができる。

【００９０】

さらに他の実施形態において、本発明の治療用分子は、アルティマー、ギャップマー、および／もしくははは１つまたは複数の修飾ヌクレオチド（２’－デオキシ－２’－フルオロアラビノヌクレオチド（ＦＡＮＡ）等）を含むものの構造を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドであるか、または本明細書において記載されるようなアプタマーである。

核酸分子および発現コンストラクト

【００９１】

本発明は、一態様において、腫瘍細胞（例えば神経膠腫細胞）において標的遺伝子（例えばＤＲＲ）の発現を減少させるのに好適なアンチセンス分子を調製するための、核酸配列（例えば治療用核酸分子、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、それをコードするＤＮＡ、それを生ずるベクター）の使用に関する。

【００９２】

本明細書において使用される時「標的遺伝子の発現を減少させること」という用語は、特異的かつ転写後様式で標的遺伝子の発現を遮断する、本治療用分子または治療用オリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンス、または他の治療用分子（例えばアプタマー））の能力を指す。

【００９３】

一実施形態において、本発明は、本明細書において定義されるような治療用分子を調製するための、ＲＮＡ配列またはオリゴヌクレオチド配列の使用に関する。治療用分子は、一実施形態において以下の基準のうちの１つまたは複数、および一実施形態において以下の基準のすべてによって特徴づけられる。標的ｍＲＮＡと少なくとも５０％の配列同一性、もしくは少なくとも７０％の配列同一性、もしくは少なくとも８０％の配列同一性、もしくは少なくとも９０％の配列同一性を有すること；標的遺伝子のエクソン領域を標的化する配列を有すること；および／または標的遺伝子の５’末端の標的化ではなく標的遺伝子の３’末端の標的化についての優先性を示すこと。いくつかの実施形態において、標的遺伝子はＤＲＲまたはＤＲＲをコードする遺伝子の断片である。

【００９４】

さらなる実施形態において、治療用分子は、以下の基準のうちの１つまたは複数、またはすべてによってさらに特徴づけることができる。１５～２５ヌクレオチドの間の、または１８～２２ヌクレオチドの間の、または１９ヌクレオチドの、または１９～３３ヌクレオチドの間の、２１～３１ヌクレオチド、または２９のヌクレオチドの核酸長を有すること；または３０～５０％の間のＧＣ含量を含む１３～１７ヌクレオチド；その３’末端でＴＴ（Ｔ）配列を示すこと；二重鎖形態を採用する場合に二次構造を示さないこと；２０℃未満のＴｍ値（融解温度）を有すること；または配列番号：１、２、５～１０または１４～１６において示されたヌクレオチド（ヌクレオチド配列は表１中で与えられる；「ｎｔ」はヌクレオチドを表わす）を有すること。一実施形態において、治療用分子は１５ヌクレオチドの核酸長を有する。

【００９５】

別の実施形態において、治療用分子またはオリゴヌクレオチドは治療用核酸としての機能を改善するのに必要な付加ヌクレオチドを備えたＤＲＲ　ｍＲＮＡに相補的な１５ヌクレオチドを含む。さらに他の実施形態において、治療用核酸分子は配列番号：１または２の配列を有する。別の実施形態において、治療用核酸分子は、ＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド４２５～４３９に相補的であるか、もしくは特異的にヌクレオチドにハイブリダイズする配列、またはＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド４２０～４４４に相補的であるか、もしくはヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする配列またはその断片もしくは誘導体、またはＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド４１５～４３９に相補的であるか、もしくはヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする配列またはその断片もしくは誘導体、またはＤＲＲ　ｍＲＮＡのヌクレオチド４２４～４３９に相補的であるか、もしくはヌクレオチドに特異的ハイブリダイズする配列、ＤＲＲ　ｍＲＮＡの４２３～４３９、４２２～４３９、４２１～４３９もしくは４２０～４３９または４２０～４３４を有する。いずれか末端での追加の１～３ヌクレオチド、またはより小さな断片、または列挙された配列の誘導体にハイブリダイズする核酸も包含されることが理解されるべきである。加えて、核酸配列は治療用分子の機能のために必要とされる特別のヌクレオチドを含むことができる。

【００９６】

一実施形態において、本発明の治療用分子またはオリゴヌクレオチドは、本明細書において提供された配列（例えば配列番号：１、２、５～１０または１４～１６）を含む。別の実施形態において、本発明の治療用分子またはオリゴヌクレオチドは、本明細書において提供された配列（例えば配列番号：１、２、５～１０または１４～１６）からなる。

【００９７】

別の実施形態において、本発明の治療用分子またはオリゴヌクレオチドには配列番号：１４、１５または１６の配列を有する。

表１　例示的な核酸配列

【表１】

配列(5'→3')	配列番号:	簡潔な記述
5' GCTCTCTCTCTTCGCCGGCCAATGCGGCA	1	RNAiプライマー配列(29r.t)
5' GCTCTCTCTCTTCGC	2	アンチセンスnt配列
5' GCGAAGAGAGAGAGC	3	配列番号:2に相補的なセンス配列(DRR mRNAのnt425～439)
5' atgtactcgg agatccagag ggagcgggca gacattgggg gcctgatggc ccggccagaa tacagagagt ggaatccgga gctcatcaag cccaagaagc tgctgaaccc cgtgaaggcc tctcggagtc accaggagct ccaccgggag ctgctcatga accacagaag gggccttggt gtggacagca agccagagct gcagcgtgtc ctagagcacc gccggcggaa ccagctcatc aagaagaaga aggaggagct ggaagccaag cggctgcagt gccccttga gcaggagctg ctgagacggc agcagaggct gaaccagctg gaaaaaccac cagagaagga agaggatcac gccccgagt ttattaaagt cagggaaaac ctgcggagaa ttgccacact gaccagcgaa gagagagagc tttaa	4	DRR mRNA配列
5' GCTCTCTCTCTTCGCT	5	アンチセンスnt配列
5' GCTCTCTCTCTTCGCTG	6	アンチセンスnt配列
5' GCTCTCTCTCTTCGCTGG	7	アンチセンスnt配列
5' GCTCTCTCTCTTCGCTGGT	8	アンチセンスnt配列
5' GCTCTCTCTCTTCGCTGGTC	9	アンチセンスnt配列
5' CTCTCTTCGCTGGTC	10	アンチセンスnt配列
5' **T-T-C**-C-T-T-**G-G-T**-C-G-A-**G-T-A**-G-T-T-**C-T-T**	11[a]	アンチセンスnt配列
5' **T-T-C-C-T-T**-G-G-T-C-G-A-G-T-A-**G-T-T-C-T-T**	12[a]	アンチセンスnt配列
5' **A-T-A-T-C-C**-T-T-G-T-C-G-**T-A-T-C-C-C**	13[a]	アンチセンスnt配列
5' **A-A-T**-G-T-C-**T-G-C**-C-C-G-**C-T-C**- C-C-T-**C-T** 3'	14[a]	アンチセンスnt配列
5' **A-A-T-G-T-C**-T-G-C-C-C-G-C-T-C-**C-C-T-C-T** 3'	15[a]	アンチセンスnt配列
5' A-A-T-G-T-C-T-G-C-C-C-G-C-T-C-C-C-T-C-T 3'	16[a]	アンチセンスnt配列

[a]太字および下線で示されるヌクレオチドはＦＡＮＡヌクレオチドであり；他のヌクレオチドはＤＮＡであり；「－」ホスホロチオエート（ＰＳ）リンケージを示す。

【００９８】

別の実施形態において、本発明は、神経膠腫細胞中のＤＲＲの発現を減少させるのに好適な治療用分子（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）を調製するための、以下の配

列、配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５もしくは１６、またはその断片もしくは誘導体のいずれかを含有する核酸配列の使用に関する。

【００９９】

本発明の文脈において、「断片」および「誘導体」という用語は、もしもたらされる分子の機能（すなわち標的遺伝子のダウンレギュレーション）が消失または阻害されなければ、５’末端もしくは３’末端のいずれか、両末端、または内部で伸長もしくは短縮されるか、または１つの端部で伸長されおよび他の端部で短縮されるという点で、もとの核酸とは異なり得る核酸を指す。「断片」および「誘導体」という用語は、もしもたらされる分子の機能が消失または阻害されなければ、他のヌクレオチドによってもとの配列のうちの１つまたは複数のヌクレオチドが置換される、および／または当業者に利用可能な方法によって（化学的に）修飾されるという点で、もとの核酸とは異なり得る核酸も指す。「断片」および「誘導体」は、典型的にはもとの核酸に少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％の配列同一性を示すことができる。２つのヌクレオチド配列の間の配列同一性は、該配列をアライメントさせること、およびアライメントにおいて２つの配列が同じ核酸塩基を含有する位置の数ｖｓアライメントにおける位置の総数を決定することによって計算することができる。

【０１００】

ＤＲＲ発現を減少または低下させる能力を保持する、表１中の核酸配列の断片および誘導体が包含されることを理解すべきである。例えば、表１中で与えられた配列からの約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８または約１９の連続したヌクレオチドを含み、ＤＲＲ発現を減少／低下させる能力を保持する核酸配列が包含される。

【０１０１】

上で与えられた配列またはその相補配列のいずれかを使用して、治療用分子（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば二本鎖ＲＮＡ分子）を調製できることは当業者に明らかである。当業者は上で開示される核酸（特にＲＮＡ）が提供される場合アンチセンスオリゴヌクレオチドを調製する方法を熟知していている。簡潔には、必要とされる核酸は、任意の利用可能な方法および必要に応じて適切な条件下でアニールされたストランドによって合成することができる。アニール条件（例えば温度およびインキュベーション期間）はそれぞれの核酸配列に従って合わせることができる。

【０１０２】

特定の実施形態において、本発明は、治療用分子（アンチセンスオリゴヌクレオチド等）を調製するための、配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５または１６、その断片または誘導体の配列を含有する核酸配列の使用に関する。

【０１０３】

別の実施形態において、本発明は、アンチセンス分子を調製するための、配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５または１６、その断片または誘導体の配列を含有するＲＮＡ配列の使用に関する。

【０１０４】

所望される機能（すなわち、神経膠腫細胞中のＤＲＲの発現の減少）を発揮するために、上で定義されるような本発明のリボ核酸から調製された本発明に記載の治療用分子（アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスＲＮＡ、アプタマー、リボザイムなど）は、標的細胞（好ましくはヒトＧＢＭ細胞）の中へ送達される。

【０１０５】

動物細胞の中へ（リボ）核酸を導入する複数の周知の方法があり、そのいずれかを本発明において使用することができ、宿主に依存する。最も単純なもので、核酸は標的細胞／標的組織の中へ直接注入することができる。他の方法は、核酸を含有する細菌のプロトプラストによる受容細胞の融合、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、塩化リチウム、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥデキストラン、陽イオン性脂質もしくはリポソームのような組成物の使用、または受容体媒介性エンドサイトーシス、微粒子銃の粒子砲撃（「遺伝子銃」法）、ウイルスベクターによる感染、電気穿孔および同種のもののような方法を含む。治療

用分子を送達するのに好適な他の技法または方法は当該技術分野において公知である。安定化した分子の対流強化送達（Ｋａｗａｋａｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ　１０１：１００４－１０１１，２００４によって詳しく述べられたように）も使用することができる。他の可能性は、Ｍｅｎｅｉ　ａｎｄ　Ｂｅｎｏｉｔ，Ａｃｔａ　Ｎｅｕｒｏｃｈｉｒ　８８：５１－５５，２００３によって概説されたもののような、移植可能な薬物放出生体分解性マイクロスフェアの使用である。異なる上述の送達モードまたは方法の組み合わせも使用できることは明らかである。他のアプローチは、Ｏｍｍａｙａリザーバー（マイクロポンプ）で送達する核酸分子ｖｓ生体分解性マイクロスフェア中のカプセル化された核酸分子のいずれか、または両方のアプローチを同時に使用するものである。

【０１０６】

治療用分子（アンチセンス技術）によるインビボの遺伝子サイレンシングの達成の主な障害は、送達である。熱的安定性とヌクレアーゼ消化への抵抗性を改善するために、および核酸の細胞取り込みを増進するために、様々なアプローチが当該技術分野において試験された。これらは、ロックされた核酸のような化学物質修飾、ホスホロチオエート置換、２’－フルオロ置換、２’－Ｏメチル置換、様々なタイプのリポソーム中での核酸分子のカプセル化（イムノリポソーム、ＰＥＧ化（イムノ）リポソーム）、陽イオン性脂質およびポリマー、ナノ粒子またはデンドリマー、乳酸－グリコール酸コポリマーのポリマー性マイクロスフェア、移植可能な薬物を放出する生体分解性マイクロスフェア、保護剤をともなう核酸分子の共注入などを含む。これらの方法および当該技術分野において公知の他のものを本発明の方法において使用できることを理解すべきである。

【０１０７】

一態様において、任意で安定化、カプセル化、またはさもなくば上記のように修飾された本発明の核酸分子は、腫瘍の部位（例えば原発性腫瘍および／または転移）に送達される。局所的な送達を達成する様式は別記されるようなＯｍｍａｙａリザーバーの使用である。腫瘍細胞に本核酸分子を標的化する他の方法は、抗体指向性の細胞タイプ特異的送達を使用することである。例えば、いくつかの核酸は、Ｆａｂプロタミン複合体（Ｓｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２３：７０９－７１７，２００５）等の特異的に腫瘍細胞を認識するＦａｂと複合体化、またはイムノリポソーム中にカプセル化することができる。かかる抗体標的化核酸分子（例えばナノ粒子の形態で）は、全身投与（静脈注射、皮下注射、筋肉注射、経口投与、鼻孔吸入など）または局所投与（例えば、Ｏｍｍａｙａリザーバーを使用して）等の様々な手段によって投与することができる。特に、隔たった日または外科手術時に注射と共に対流送達を使用することができる。本核酸分子の吸入投与（例えば鼻内スプレーまたはエアゾール混合物の形態で）も用いることができる。他のオプションは送達のためのナノテクノロジーの使用である。

【０１０８】

核酸分子のインビボの送達、例えばむき出しの核酸分子または脂質カプセル化核酸分子の静脈内投与、大脳室内投与または鼻腔内投与が記載されている。イムノリポソームまたはウイルス粒子中にカプセル化されたベクターの静脈内投与も記載されており、当該技術分野において公知である。

【０１０９】

例えば上記されるように分子が細胞に直接適用される場合、治療用核酸分子の効果（すなわち標的遺伝子の発現の減少）は、一過性のみかもしれない。いくつかの事例において、それぞれの核酸分子をコードする核酸が発現ベクター中に組込まれるならば、有利であろう。好適なエレメントが提供されれば、以下に記載されるように、ＤＮＡは所望されるアンチセンス分子を形成できる対応するＲＮＡへと転写される。

【０１１０】

したがって、本発明のさらなる態様によれば、発現コンストラクトは、本発明に記載の治療用分子をコードするヌクレオチド配列の宿主細胞の中への導入の促進、および／または発現の促進および／または維持の促進に提供される。発現コンストラクトはプラスミド

、ウイルスまたはベクターの中へ挿入することができ、それは商業的に入手可能だろう。別の実施形態において、本発明は、それゆえ、本明細書において定義されるようなＲＮＡ分子を調製するための、ＤＮＡ配列の使用に関する。例えば、ＤＮＡ配列は、配列番号：１、２、５、６、７、８、９、１０、１４、１５または１６において示されたＲＮＡ配列に対応またはコードするＤＮＡ配列、リンカー、およびＤＮＡに相補的な配列を含むことができる。好ましくはリンカーは４～１５ヌクレオチド長、より好ましくはリンカーは４～１０ヌクレオチド長、最も好ましくは４～８ヌクレオチド長である。リンカーは任意の好適なヌクレオチド配列からなることができる。一実施形態において、４～１５ヌクレオチドリンカーによって分離されるＤＮＡ配列は、ＤＲＲ遺伝子に由来する１５ヌクレオチド配列、同じ１５ヌクレオチド配列の逆の相補配列、およびその３’末端で示されるｔｔ（ｔ）配列からなる。別の実施形態において、ＤＮＡ配列は、本明細書において提供された方法における使用に適している発現ベクターの中へ挿入される。

【０１１１】

本明細書において定義されるような治療用核酸を形成する転写物を生ずることができる発現ベクターは、例えばクローニングベクター、バイナリーベクターまたは組込みベクターでありえる。本発明は、したがって本明細書において記載されたＤＮＡ配列のいずれかを含むベクターにも関する。発現ベクターは、好ましくは真核細胞発現ベクターもしくはレトロウイルスベクター、プラスミド、バクテリオファージまたは生物工学分野において典型的には使用される他のベクターである。かかるベクターは当業者に公知である。必要であるかまたは所望されるならば、ＤＮＡ核酸は、真核細胞中のｍＲＮＡの合成を指令する調節エレメントに作動可能にリンクさせることができる。

【０１１２】

ＲＮＡの発現を駆動するために、これらのベクターは、通常ＲＮＡポリメラーゼＩプロモーター、ＲＮＡポリメラーゼＩＩプロモーター、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーター、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターまたはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含み、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩが哺乳類細胞において比較的多量の低分子ＲＮＡを発現し、一続きの３～６のウリジンを取り込むことで転写を終了するので、好ましくはＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーター（Ｈ１プロモーターまたはＵ６プロモーター等）を含む。タイプＩＩＩプロモーターは転写されている配列の完全に上流の位置し、そのため治療用分子中にプロモーター配列を含むいかなる必要性も排除する。任意で、１つまたは複数の転写終結配列も発現ベクターにおいて取り込まれ得る。「転写終結配列」という用語は転写ユニットの末端の制御配列を包含し、それは一次転写産物の３’プロセッシングおよびポリアデニル化ならびに転写の終了を示す。追加の調節エレメント（転写エンハンサーまたは翻訳エンハンサー）は発現コンストラクト中に取り込まれ得る。

【０１１３】

治療目的のために、レトロウイルスベクターの使用は、いくつかの事例において、標的細胞の中へ所望される核酸を送達するのに最も適切であることが証明された。多くが当該技術分野において公知であるレトロウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターも、本明細書において提供されたベクター、組成物および方法において使用できることを理解すべきである。上記の送達方法のいずれかまたはさもなくば当該技術分野において公知の方法によって、標的細胞の中へ本発明のＤＮＡ配列を含む発現ベクターを導入できることも理解すべきである。

【０１１４】

使用、組成物およびキット

本発明に記載の治療用分子および／またはベクターは、癌、好ましくは神経膠腫、より好ましくは神経膠芽腫の治療のための薬剤として、または癌、好ましくは神経膠腫、より好ましくは神経膠芽腫を治療するための薬剤の製造のために使用することができる。本発明に記載の治療用分子および／またはベクターは、癌、例えば神経膠腫（神経膠芽腫等）の進行を遅延させるための薬剤としても使用することができる。本明細書において使用される時「癌の進行を遅延させること」という用語は、３０％以上、５０％以上、もしくは

７０％以上まで癌再増殖を遅延させることおよび／または影響を受けた被験体の生存時期を増加させることを指す。一実施形態において、本発明に記載の治療用分子および／またはベクターを使用して、脳腫瘍浸潤（例えば悪性神経膠細胞（ＭＧＣ）浸潤）を阻害することができる。

【０１１５】

本発明に記載の治療用分子および／またはベクターは、単独でまたは他の癌療法と組み合わせて使用することができる。他の癌療法の非限定例は、癌の切除、化学療法、放射線療法、免疫療法、および／または遺伝子に基づく治療法を含む。「切除」という用語は、腫瘍の一部またはすべての外科的な除去または削除を指す。「放射線療法」という用語は、放射線を使用する癌の治療を指す。「化学療法」という用語は、化学物質、いわゆる化学療法剤による癌の治療を指す。「免疫療法」という用語は、本明細書において使用される時、免疫療法剤の使用による癌細胞の排除に向けた免疫系の反応性の刺激を指す。「遺伝子に基づく治療法」という用語は、遺伝物質（ＤＮＡ、または場合によってはＲＮＡ）の個人の中への移行に基づく癌の治療を指す。他のかかる癌療法の例は以下のものを含む。テモゾロマイド、ビンクリスチン、ビノレルビン、プロカルバジン、カルマスティン、ロムスチン、タキソル、タキソテール、タモキシフェン、レチノイン酸、５－フルオロウラシル、シクロフォスファミドおよびサリドマイドを含むが、これらに限定されない化学療法剤；活性化Ｔ細胞およびパルス樹状細胞であるが、これらに限定されない免疫療法剤；本明細書において定義されるようなＲＮＡ分子の送達と併用して、神経膠腫細胞中のＣＤ３、ＣＤ７およびＣＤ４５の遺伝子導入。

【０１１６】

本発明に記載の治療用分子および／またはベクターは、単独でまたは１つまたは複数の追加の癌療法と組み合わせて投与することができる。後者は、治療用分子および／または発現ベクターの投与よりも前、後または同時に投与することができる。

【０１１７】

本発明のさらなる目的は、治療用分子（例えば本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび／または発現ベクター）の治療法上効果的な量および薬学的に許容されるキャリアーを含む医薬調製物である。「治療法上効果的な量」という用語は、本明細書において使用される時、研究者、獣医師、医師または他の臨床医によって探索されている組織、システム、動物またはヒトにおいて生物学的または医薬的な応答を誘発する、治療用分子（複数可）および／または発現ベクター（複数可）の量を意味する。

【０１１８】

別の実施形態において、それゆえ本発明は、本発明に記載の治療用分子および／または発現ベクターを含む、癌、好ましくは神経膠腫およびより好ましくは神経膠芽腫の治療のための医薬組成物および薬学的に許容されるキャリアーに関する。さらに他の実施形態において、本発明は、本発明に記載の治療用分子および／または発現ベクターを含む、癌、好ましくは神経膠腫およびより好ましくは神経膠芽腫の進行の遅延のための医薬組成物および薬学的に許容されるキャリアーに関する。さらなる実施形態において、本発明は、本発明に記載の治療用分子および／または発現ベクターを含む、癌浸潤、好ましくは神経膠腫およびより好ましくは神経膠芽腫の阻害のための医薬組成物および薬学的に許容されるキャリアーに関する。一実施形態において、本発明は、悪性神経膠細胞（ＭＧＣ）浸潤の阻害のための医薬組成物に関する。

【０１１９】

上で論じられるように、本発明に記載の医薬組成物はさらに少なくとも１つの追加の癌療法を含むことができる。

【０１２０】

本発明に記載の医薬組成物は、例えば、丸薬、錠剤、ラッカー錠剤、糖衣錠、顆粒、ハードゼラチンカプセルおよびソフトゼラチンカプセル、水溶液、アルコール性溶液もしくは油性溶液、シロップ、乳化物または懸濁物の形態で経口投与、または例えば坐薬の形態で経直腸投与することができる。投与は、注射または点滴のための溶液の形態で非経口で

、例えば皮下、筋肉内または静脈内でも実行することができる。他の好適な投与形態は、例えば経皮投与もしくは局所投与（例えば軟膏、チンキ、スプレーまたは経皮療法システムの形態で）または鼻内スプレーもしくはエアゾール混合物の形態での吸入投与、または、例えばマイクロカプセル、移植物もしくはウエハである。

【０１２１】

当該技術分野において公知のように医薬組成物の調製を実行することができる。例えば治療用分子および／または活性化合物は、１つまたは複数の固体または液体の医薬キャリアー物質および／または添加物（または補助物質）と共に、および所望されるならば治療的作用または予防的作用を有する薬学的に活性のある他の化合物と組み合わせて、次いでヒト医学において医薬品として使用できる好適な投与形態または投与量形態へと導かれる。医薬調製物は、多くが当該技術分野において公知の添加物、例えば充填剤、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、湿潤剤、安定剤、乳化剤、分散剤、防腐剤、甘味剤、着色剤、着香剤、芳香剤、増粘剤、希釈液、緩衝液物質、溶媒、溶解剤、デポー作用を達成するための薬剤、浸透圧を変化させるための塩、コーティング剤または抗酸化剤も含むことができる。

【０１２２】

本明細書において使用される時「薬学的に許容されるキャリアー」または「賦形剤」は、溶媒、分散媒質、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、ならびに生理的に適合性がある同種のもののいずれかおよびすべてを含む。一実施形態において、キャリアーは非経口投与に適している。あるいは、キャリアーは、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与および舌下投与または経口投与に適しているだろう。薬学的に許容されるキャリアーは、滅菌された注射可能な溶液または分散物の即時調製のための滅菌された水溶液または分散物および滅菌粉末を含む。薬学的に活性のある物質のためのかかる媒質および薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。任意の慣習的な媒質または薬剤が活性化合物と非混合性でない限りは、本発明の医薬組成物におけるその使用が意図される。補足の活性化合物も組成物の中へ取り込むことができる。

【０１２３】

治療用組成物は典型的には製造および保存の条件下で滅菌されて安定していなくてはならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソームまたは高薬物濃度に適する他の秩序構造として処方することができる。キャリアーは、例えば、水、エタノール、多価アルコール（例えばグリセリン、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールおよび同種のもの）およびその好適な混合物を含む、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えばレシチン等のコーティングの使用によって、分散物の事例において必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの事例において、組成物中に等張剤（例えば糖、多価アルコール（マンニトール、ソルビトール等）または塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注射可能な組成物の吸収延長は、吸収を遅延させる薬剤（例えばモノステアリン酸塩およびゼラチン）を組成物中に含むことによって引き起こすことができる。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、緩慢放出ポリマーを含む組成物において徐放性処方で例えば投与することができる。修飾オリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドを急速な放出から保護するキャリアー（移植物およびマイクロカプセル化された送達システムを含む、制御放出処方等）により調製することができる。生物分解性の生体適合性ポリマー（エチレンビニルアセタート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸および乳酸－グリコール酸コポリマー（ＰＬＧ）等）を使用することができる。

【０１２４】

多くのかかる処方の調製のための方法は、特許取得されているか、または概して当業者に公知である。滅菌された注射可能な溶液は、上で列挙された成分の１つのまたは組み合わせと共に適切な溶媒中で必要とされる量で活性化合物（本発明の治療用分子）を取り込み、必要に応じて続いてろ過滅菌することによって調製できる。概して、分散物は、基本的な分散媒および上で列挙されたものからの必要とされる他の成分を含む滅菌されたベヒクルの中へ活性化合物を取り込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液の調製のた

めの滅菌粉末の事例において、調製の好ましい方法は、活性成分＋任意の追加の所望される成分の事前に滅菌ろ過されたその溶液から粉末を産出する真空乾燥および凍結乾燥である。本発明の治療用分子はそれらの可溶性を増進する１つまたは複数の追加の化合物と共に処方することもできる。

【０１２５】

使用される治療用分子および／または発現ベクターの投与量または量は、単独でまたは投与される１つまたは複数の活性化合物と組み合わせて、個々の事例に依存し、習慣に従って、最適の作用を達成するように個々の環境に適合される。したがって、それは、治療される障害の性質および重症度に、およびさらに治療されるヒトまたは動物の性別、年齢、体重および個々の反応性に、使用される化合物の作用の効能および継続期間に、治療法が急性もしくは慢性もしくは予防的であるかどうかに、または治療用分子および／または発現ベクターに加えて他の活性化合物が投与されるかどうかに依存する。投薬および投与のレジメンが当業者の理解範囲内にあることを理解すべきである。

【０１２６】

別の実施形態において、本発明は、ＲＮＡ治療用ベクターもしくは発現ベクターまたは本発明に記載の医薬組成物、およびその使用説明書を含むキットを提供する。

【０１２７】

治療的方法

理論により限定されるものではないが、ノックダウンしそれにより有意に腫瘍細胞におけるＤＲＲ発現を減少させる治療的利益が、隣接する健康な組織（例えば神経膠腫の事例における脳）の中への癌浸潤を減少または遅延させるように、脳の中への腫瘍の浸潤を阻害することによって（例えば悪性神経膠細胞（ＭＧＣ）浸潤の阻害によって）媒介され得ることを本発明者は意図するが、これは、ＤＲＲが悪性神経膠腫の浸潤性構成要素において高く発現され、インビボおよびインビトロの浸潤アッセイにおいてＭＧＣの浸潤を駆動するという本発明者の新規で予想外の所見に基づいている。

【０１２８】

細胞浸潤は、ＦＡの連続的な形成および脱集合と共にアクチン細胞骨格およびＭＴの両方を利用する事象の周期を必要とする。ＦＡターンオーバーにおけるＭＴの役割はよく確立されており、蓄積された証拠から、Ｆ－アクチンによって調整される突起中でＦＡに向けてＭＴが成長することが示唆される。正常な神経膠細胞および神経膠腫におけるＦＡの組成についてはあまり知られておらず、正常な神経膠細胞および神経膠腫におけるＦＡターンオーバーを調節する分子メカニズムは記載されていない。

【０１２９】

本明細書において報告された結果から、浸潤性ＭＧＣで観察されたＤＲＲのデノボ発現は多くの急速なＦＡ脱集合およびそれによる浸潤を引き起こすことが示唆される。ＤＲＲ－アクチン会合が消失する場合に、ＭＧＣが腫瘍塊から分離する能力が無くなることには、臨床的な意味合いがある。実際、ＣＤ１５１特異的で転移を遮断する単クローン抗体は、細胞後部引き込みならびにそれによる細胞離脱および原発性腫瘍塊からの遊走の阻止によって、転移を阻害することが示されている（Ｚｉｊｌｓｔｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ １３：２２１－３４．２００８）。

【０１３０】

悪性神経膠腫浸潤は脳腫瘍治療失敗の根本原因である。新規機能的スクリーニング戦略の開発および浸潤の調節因子としてｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｉｎ ｒｅｎａｌ ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ（ＤＲＲ）の同定を本明細書において報告する。以下のことを本明細書において示す。ＤＲＲは浸潤をインビトロおよびインビボで駆動する；ＤＲＲは正常な神経膠細胞において発現されないが、神経膠腫の浸潤性構成要素において高く発現される；ＤＲＲはアクチンおよび微小管細胞骨格と会合し組織化する；ならびに、アクチンおよび微小管細胞骨格とのＤＲＲのこれらの会合は接着斑（ＦＡ）脱集合および細胞浸潤にとって必須である。本結果は、ＭＴがＦＡ脱集合を促進し、この正常な生理的なプロセスにおいてＤＲＲを新規演者として同定するという考え方をサポートする証拠を提供

する。ＤＲＲがＦＡ脱集合を調節する新規のアクチン／ＭＴ架橋物質であることを示した。これをサポートして、ＤＲＲがアクチン細胞骨格およびＦＡに局在しＬＣ２サブユニットＭＡＰ１Ａと相互作用することを示す。ＭＴがＦＡに接近しそれらの脱集合を促進するように、ＤＲＲ発現がアクチンおよびＭＴの両方の細胞骨格を組織化することを示す。ＤＲＲ欠損またはＤＲＲ－アクチン会合もしくはＤＲＲ－ＬＣ２会合の消失によるこの複合体の破壊は、ＭＴがＦＡに到達する能力が無くなることに加えてアクチンとＭＴとの間の調整の喪失も引き起こす。これらの所見から、ＤＲＲは、ＦＡダイナミックスおよび細胞移動を調節する新規細胞骨格の架橋物質として同定される。

【０１３１】

上記の見解において、本発明は、本発明の治療用分子、ベクターまたは本明細書において記載されるような医薬組成物をそれを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体において神経膠腫等の癌（例えば神経膠芽腫）を治療する方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、治療用分子、ベクターまたは本明細書において提供されるような組成物をそれを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体において神経膠腫等の癌（例えば神経膠芽腫）の進行を遅延させる方法に関する。「被験体」という用語は、本明細書において使用される時、好ましくはヒトを指すが、獣医学的適用は、例えば家畜、実験動物またはペット動物を標的とする本発明の範囲内でもある。本発明は、ＤＲＲ発現をダウンレギュレートする、例えば５０％以上まで、７０％以上まで、または９０％以上までＤＲＲ発現を低下させる方法をさらに提供する。一実施形態において、ＤＲＲ発現は約５０％、約６０％、約７０％、約８０％または約９０％まで低下または減少される。別の実施形態において、本発明は、それを必要とする被験体に治療用分子、ベクターまたは本発明の組成物を投与することを含む、腫瘍細胞、好ましくは神経膠腫（神経膠芽腫等）の細胞の移動または浸潤を阻害または減少させる方法に関する。

【０１３２】

本発明は、癌、特に神経膠腫（好ましくは神経膠芽腫）の治療のための、切除、化学療法、放射線療法、免疫療法、および／または遺伝子療法を含む群から選択される癌療法の効能を増進する方法であって、治療用分子、ベクターまたは本明細書において定義されるような組成物を投与し、および同時に、分離してまたは連続して該癌療法を投与することを含む方法をさらに提供する。「癌療法の効能を増進する」という用語は、本明細書において使用される時、慣習的癌治療の改良を指し、慣習的癌治療の間に適用される抗癌組成物の量、例えば放射線療法における放射線の量、化学療法における化学療法剤の量、免疫療法における免疫療法剤の量または遺伝子に基づく治療法におけるベクターの量の減少を含み、および／または慣習的癌療法の間に慣習的用量または量で適用された場合に慣習的療法および抗癌組成物の効能の増加を指す。一実施形態において、癌療法の効能の増進は治療法を受ける被験体の生存率の延長を指す。

【０１３３】

浸潤性脳腫瘍細胞のためのバイオマーカーとしてのＤＲＲの使用も本明細書において提供される。ＤＲＲ発現上昇の検出は、浸潤性腫瘍細胞の同定、ならびにＤＲＲ発現に基づいた腫瘍の診断および／または予後に使用することができる。したがって、悪性神経膠腫の診断および予後診断のための方法は、浸潤性についてのバイオマーカーとしてのＤＲＲの使用と共に提供される。

【０１３４】

診断および予後への適用で使用されるキットも提供される。かかるキットは、１つまたは複数の容器（ガラス瓶、チューブおよび同種のもの等）を収容する仕切られたキャリアー、パッケージまたは容器を含むことができ、各々の容器（複数可）は方法において使用される個別のエレメントの１つを含む。例えば、容器（複数可）は検出可能に標識されたプローブまたは検出可能に標識できるプローブを含むことができる。プローブは、例えばＤＲＲバイオマーカーについて特異的な抗体またはＤＲＲに特異的にハイブリダイズするＲＮＡでありえる。キットは、検出可能な標識（例えば酵素標識、蛍光標識または放射性同位体標識）に結合されたビオチン結合タンパク質（例えばアビジンまたはストレプトア

ビジン）等のレポーター手段を含む容器も含み得る。キットは、バイオマーカータンパク質のアミノ酸配列のすべてもしくは一部、またはかかるアミノ酸配列をコードする核酸分子、またはＤＲＲバイオマーカーのｍＲＮＡに結合する核酸分子、またはＤＲＲバイオマーカーのｍＲＮＡに結合する核酸分子をコードする核酸分子を含み得る。

【０１３５】

本発明のキットは、典型的には、上記の容器、および緩衝液、希釈液、フィルター、針、注射器を含む商業的見地および使用者の見地から所望される材料を含む１つまたは複数の他の容器、ならびに使用のための説明書と共にパッケージ添付文書を含むだろう。加えて、組成物が特異的な適用のために使用されることを示すために容器上にラベルが提供され得る。指示または他の情報もキットと共に含まれている添付文書に含むことができる。

【０１３６】

一実施形態において、本発明は、ＤＲＲタンパク質またはＤＲＲ　ｍＲＮＡを結合する、少なくとも１つの薬剤；および被験体における脳腫瘍細胞の浸潤性を決定するための少なくとも１つの薬剤の使用説明書を含むキットを提供する。

【０１３７】

要約すると、本発明は悪性神経膠腫を治療する抗ＤＲＲ治療的アプローチの使用に関する。本治療的アプローチは、ヒト腫瘍細胞におけるＤＲＲ発現のノックダウンを目的とするアンチセンスアプローチ、ウイルスベクターアプローチ、または他の関連するアプローチに関連する、抗ＤＲＲの分子の使用に基づく。本アプローチの技術的可能性は、以下の非限定例を用いてさらに説明される。

【実施例】

【０１３８】

本発明は以下の実施例を参照することによってより容易に理解され、この実施例は本発明を説明するために提供され、いかなる様式でもその範囲を限定するようには解釈されない。

【０１３９】

特別に定義されない限りまたは文脈が明らかに規定しない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本発明の実行または試験において本明細書において記載されるものと類似または等価である任意の方法および材料を使用できることを理解すべきである。

【０１４０】

材料および方法

機能的スクリーニングアッセイ

正常なヒト成熟脳ｃＤＮＡライブラリー（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）をｐＬｉｂレトロウイルスベクター（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）の中へサブクローン化し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＰＬＵＳ試薬（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を使用するＰＴ６７パッケージング細胞株のトランスフェクションに使用した。分泌性複製欠損性のレトロウイルスをトランスフェクション後２４～７２時間の上清から採取し、７２時間の時間経過にわたり連続的に使用してＷＴ－Ｕ２５１神経膠細胞株を形質導入した（図１Ａ）。

【０１４１】

ヒト神経膠腫分析

ヒト神経膠腫サンプルは、ｔｈｅ　Ｂｒａｉｎ　Ｔｕｍｏｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｒｅ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｂａｎｋ　ａｔ　ｔｈｅ　Ｍｏｎｔｒｅａｌ　Ｎｅｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ａｎｄ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ（Ｍｏｎｔｒｅａｌ、Ｑｕｅｂｅｃ、カナダ）から得た。書面による承諾をすべての患者から得て、プロジェクトはｔｈｅ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ｅｔｈｉｃｓ　Ｂｏａｒｄ　ａｔ　ｔｈｅ　Ｍｏｎｔｒｅａｌ　Ｎｅｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ａｎｄ　Ｈｏｓｐｉｔａｌによって承認された。

【０１４２】

細胞

Ｕ２５１ヒト乏突起膠腫細胞株（ＷＴ）、ヒト神経膠腫細胞株（Ｕ３４３ＭＧ）、ラット星状細胞腫細胞株（Ｃ６）、ＤＲＲ$^{-}$細胞およびＤＲＲ$^{+}$細胞を、１０％ＦＢＳおよびペニシリン－ストレプトマイシン抗生物質混合物を補足したＤＭＥＭ（高グルコース）中で培養した。ヒト神経膠芽腫細胞株（Ｕ８７ＭＧ）（Ｃａｖａｎｅｅ研究室、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ ａｔ Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ）を、１０％不活性化ＦＢＳおよびペニシリン－ストレプトマイシン抗生物質混合物を補足したＤＭＥＭ（高グルコース）中で増殖させた。

【０１４３】

抗体および試薬

アミノ酸６７～９２に対して向けられた親和性精製ウサギポリクローナル抗ＤＲＲ抗体は、Ｃｏｖａｎｃｅによって生成された。マウス抗ビンキュリン抗体およびマウス抗チューブリン抗体、ノコダゾールならびにＧ４１８はＳｉｇｍａから購入された。ラット抗チューブリン抗体およびマウス抗ＧＦＡＰ抗体はＣｈｅｍｉｃｏｎから購入された。ローダミン－ファロイジン、ウサギ抗ＦＡＫｐＹ３９７抗体ならびにＡｌｅｘａ４８８コンジュゲート二次抗体、Ａｌｅｘａ６９４コンジュゲート二次抗体およびＡｌｅｘａ６４７コンジュゲート二次抗体、ならびにＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから購入した。トリ抗ＭＡＰ２抗体はＥｎｃｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｃから購入した。ＧＦＰ－パキシリンｃＤＮＡプラスミドはＩ．Ｒ．Ｎａｂｉ博士（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｃｏｌｕｍｂｉａ）からの寄贈であった。

【０１４４】

ヒト神経膠腫免疫標識

固定したパラフィン包埋組織を５μｍで切片にし、マウントした。スライドは、クエン酸緩衝液（ｐＨ６．０、Ｌａｂ Ｖｉｓｉｏｎ）中で熱誘導性エピトープ回復を高圧下で１２０℃１０分間行った。標識はすべてＬａｂ Ｖｉｓｉｏｎ ３６０ Ａｕｔｏｓｔａｉｎｅｒ上で室温で実行した。抗体結合はストレプトアビジンまたはＨＲＰにコンジュゲートしたＬＶポリマーを使用して増幅し、ＡＥＣクロモゲン（Ｌａｂ Ｖｉｓｉｏｎ）を使用して可視化した。切片はすべてＳｕｒｇｉｐａｔｈ ５６０ヘマトキシロンで対比染色し、Ａｑｕａｔｅｘでマウントした。ＤＲＲ抗体対照は、抗原ペプチド競合、免疫前血清による免疫標識、および二次抗体単独の免疫標識を含む。

【０１４５】

細胞

ＤＲＲ$^{-}$細胞株は短いヘアピン型ＲＮＡ（Ｐａｄｄｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００２）およびレトロウイルス形質導入を使用して生成された。遠位のＣ末端配列（ＧＣＴＣＴＣＴＣＴＣＴＴＣＧＣＣＧＧＣＣＡＡＴＧＣＧＧＣＡ）を使用して、短いヘアピンループを生成する。ＲＴ－ＰＣＲを使用してＤＲＲ ｍＲＮＡレベルの減少を確認し、ウエスタンブロットを使用してタンパク質レベルの減少を実証した。ＤＲＲ$^{\Delta PEPE}$およびＤＲＲ$^{\Delta HRE}$コンストラクトはＳｔｒａｔａｇｅｎｅ ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓキットを使用して生成した。ＤＲＲ$^{+}$、ＤＲＲ$^{\Delta PEPE}$およびＤＲＲ$^{\Delta HRE}$の安定した細胞株は、メーカーのプロトコルに従って、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００を使用して、ＤＲＲ、ＤＲＲ$^{\Delta PEPE}$またはＤＲＲ$^{\Delta HRE}$発現ベクターによりＷＴ－Ｕ２５１細胞をトランスフェクションすることによって生成した。トランスフェクションの７２時間後、細胞を拡張し、０．６ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を補足したＤＭＥＭ中で２数週間選択した。耐性コロニーをトリプシン処理し、選択培地中で拡張した。胎生１８～１９日目のラット海馬ニューロンはＰ．ＭｃＰｈｅｒｓｏｎ博士（ＭｃＧｉｌｌ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）からの寄贈であった。Ｂ－２７、Ｎ－２、ｌ－グルタミン（５００μＭ）およびペニシリン／ストレプトマイシン（１００ユニット／ｍｌ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を補足したＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地を、細胞に７日ごとに与えた。

【０１４６】

細胞増加、遊走および浸潤のアッセイ

細胞をトリプシン処理し、Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｚ　Ｓｅｒｉｅｓカウンター（Ｂｅｃｋｍａｎ－Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を使用してカウントした。同じ細胞株の２つのサンプルについて２回測定し、平均化した。細胞を６ウェルプレート中にプレーティングし、２４、４８、７２および９６時間後にカウントした。２Ｄ細胞遊走を査定するために、密集するまで細胞を増殖させ、ピペットチップを使用してスクラッチを生成した。スクラッチ後１～１１時間で規則的な間隔で画像を捕捉した。以前に記載されるように、腫瘍スフェロイドはハンギングドロップ法を使用して生成し、Ｉ型コラーゲンマトリックス中に移植した（Ｗｅｒｂｏｗｅｔｓｋｉ－Ｏｇｉｌｖｉｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　６６：１４６４－１４７２，２００６）。移植されたスフェロイドは、以下の時間ポイント（０、２４、４８および７２時間）後に画像化された。浸潤領域は、４つの異なる角度で極端な直径を計算し、時刻０でスフェロイドの極端な直径を引くことによって測定された。実験はすべて三重で実行され、それらは３つの独立した実験からのものである。

【０１４７】

図２２中に示されるスクラッチアッセイのために、以下の手技を使用した。トランスフェクション後７２時間で、細胞は単層に達した。２００μｌピペットを使用してスクラッチを実行する。細胞をＰＢＳにより３回リンスし、新鮮な培地を細胞に加えた。画像は、スクラッチの開始時ならびに２４時間および４８時間で５×対物レンズにより捕捉した。各々の画像について、スクラッチの１つの側面と他の側面との間の距離を測定した。細胞遊走の距離（μｍ）は、各々の時間間隔でスクラッチの距離を測定し、時刻０でのスクラッチの距離からそれを引くことによって定量した。

【０１４８】

マウス脳腫瘍移植

マウスを定位フレーム（Ｋｏｐｆ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）に固定し、頭皮において小さな切開を中線で行った。ブレグマから０．５ｍｍ前方、２ｍｍ側方に穿頭孔を作成した。マイクロリットル注射器（Ｈａｍｉｌｔｏｎ　Ｃｏｍｐａｎｙ）を穿頭孔を通して４．４ｍｍの深さまで徐々に降ろし、３μｌのＰＢＳ中に2×10^{5}細胞を含む細胞懸濁物を１２分にわたって注入した。動物を注射１か月後に安楽死させて腫瘍増殖および浸潤を査定した。

【０１４９】

ウエスタンブロットおよび免疫沈降

ＷＴ細胞、DRR^{-}細胞およびDRR^{+}細胞におけるＤＲＲ発現量を決定するために、８０％の密集度まで細胞を増殖させ、冷ＰＢＳ中で洗浄し、ＲＩＰＡ緩衝液または２％熱ＳＤＳにより溶解した。溶解物（３０μｇ）を１２％ポリアクリルアミドゲル上で分離し、ニトロセルロース膜へ転写した。膜をウサギ抗ＤＲＲ抗体およびマウス抗チューブリン抗体、続いて適切なＨＲＰコンジュゲート二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）によりプロービングした。ＥＣＬ　ｐｌｕｓ（商標）試薬検出キットを使用した（Ｐｉｅｒｃｅ）。免疫沈降実験を以前に記載されるようにＨＥＫ－２９３細胞において実行した（Ａｎｇｅｒｓ－Ｌｏｕｓｔａｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２：５９５－６０５，２００４）。

【０１５０】

マウス脳内腫瘍移植

動物実験はすべて施設の動物ケア委員会によって承認され、Ｃａｎａｄｉａｎ　Ｃｏｕｎｃｉｌ　ｏｆ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅのガイドラインに準拠していた。６週間齢のＣＤ１　ｎｕ／ｎｕの無胸腺のマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ，Ｃａｎａｄａ）をケタミン、キシラジンおよびアセプロマジンを含む腹腔内投与によって麻酔をかけた。

【０１５１】

酵母２－ハイブリッドスクリーニング

酵母２－ハイブリッドスクリーンをＭａｔｃｈｍａｋｅｒ（商標）Ｔｗｏ－Ｈｙｂｒｉ

ｄ　Ｓｙｓｔｅｍ　３（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を使用して実行した。全長ＤＲＲをベイトとして使用してヒト脳ｃＤＮＡライブラリー（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）をスクリーニングした。

【０１５２】

免疫細胞化学

細胞をガラスのカバーグラスまたはフィブロネクチン（１０μｇ／ｍｌ）をコートしたカバーグラス上で増殖させ、４％ＰＦＡにより固定し、０．５％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００により透過性にし、その後免疫標識した。以前に記載されたようにＦＡ脱集合アッセイを実行した（Ｅｚｒａｔｔｙ　ＥＪ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．７：５８１－５９０，２００５）。簡潔には、細胞を無血清培地中で２４時間インキュベーションし、その後ノコダゾール（１０μＭ；４時間）により処理した。無血清培地を使用して、可変的な時間経過（５、１５、３０および６０分）に沿って薬物を洗浄した。蛍光標識された細胞をＺｅｉｓｓ　５１０共焦点顕微鏡（６３×対物レンズ）により可視化した。ビンキュリンに染色された接着斑の数および表面積をＩｍａｇｅ　Ｊソフトウェアを使用して定量した。３つの独立した実験から少なくとも１０の視野を定量した。

【０１５３】

免疫蛍光研究のために、上記のように、細胞を４％ＰＦＡにより固定し、０．５％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００により透過性にし、その後免疫染色のために加工した。細胞をマウス抗ビンキュリンにより標識して接着斑を可視化し、ローダミン－ファロイジンを使用してアクチンをした。蛍光標識された細胞を、６３×対物レンズを使用してＺｅｉｓｓ　５１０共焦点顕微鏡により可視化した。

【０１５４】

共焦点ビデオ顕微鏡検

ＷＴ細胞またはＤＲＲ$^{+}$細胞を３５ｍｍのガラス底培養用ディッシュ（ＭａｔＴｅｋ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）上で播種し、その後ＧＦＰ－パキシリンによりトランスフェクションした。トランスフェクション後２４～４８時間に、Ｚｅｉｓｓ　５１０共焦点顕微鏡（６３×対物レンズ）を使用して１分ごとに１７０分間画像を捕捉した。５つのＤＲＲ$^{+}$細胞および５つの対照（ＷＴ）細胞を分析し、合計１７のＦＡをＤＲＲ$^{+}$細胞について分析した。ＦＡの中へのＧＦＰ－パキシリンの取り込みおよびＦＡからのその脱集合についての見かけの速度定数は、Ｗｅｂｂ　ｅｔ　ａｌ．，２００４中に記載された技法を使用して定量した。測定は５つの細胞、５～１０のＦＡ／細胞から得られた。対照細胞において、１７０分の画像間隔内で集合または脱集合したＦＡは同定されなかった。データは平均±標準誤差として示される。

【０１５５】

ヒト神経膠腫の初代培養

外科的切除から得られた組織を１×リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で２回リンスし、その後細胞培養ディッシュに移した。壊死組織および血管を腫瘍から分離した。次いで組織を切断し、１．２５％のトリプシン－ＥＤＴＡの５ｍｌにより３７℃で３０分間インキュベーションし、その後、７．５ｍｌの細胞培養培地（２０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、２５０Ｕ／ｍＬペニシリンＧ、２５０μｇ／ｍＬ硫酸ストレプトマイシンおよび４．４μｇ／ｍＬアンフォテリシンＢ（Ｆｕｎｇｉｚｏｎｅ）を補足したダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ））を、サンプルに加えて、トリプシン－ＥＤＴＡを中和した。次いでサンプルを細胞こし器へ移した。５ｍｌの細胞培養培地を細胞こし器へ添加し、プロセスを３回反復した。次いで懸濁液を４℃で２０分間１０００ｒｐｍで遠心分離して細胞をペレットにする。上清を廃棄し、細胞ペレットは、３ｍｌの赤血球溶解緩衝液（１５５ｍＭ　NH_4Cl／５．７ｍＭ　K_2HPO_4／０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ＝７．３）で再懸濁した。細胞を室温で１５分間インキュベーションし、次いで１５ｍｌの培養培地をサンプルへ添加し、完全に混合し、１０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞を培養培地中で再懸濁した。その後、使用前に２０％ＦＢＳ、および２×抗生物質を補足したＤＭＥＭ中で最低２週間細胞を増殖させた。２週間後に、細胞を１０％ＦＢＳおよび２×抗生物質を補足したＤＭＥＭ中で培養した。培養は５％CO_2の加湿雰囲気におい

て３７℃で維持した。細胞が密集に達したと同時に、０．０５％トリプシン－ＥＤＴＡを使用してトリプシン処理した。

【０１５６】

細胞トランスフェクションおよび３次元浸潤アッセイ

５００００細胞を６ウェルディッシュ中に一晩プレーティングし、翌日、製造者の使用説明書に記載のＧｅｎｅＪｕｉｃｅ（商標）（Ｎｏｖａｇｅｎ）を使用して（２．５μｇＤＮＡ；１００μｌのＯｐｔｉＭＥＭ中の４μｌのＧｅｎｅＪｕｉｃｅ（商標））、ＧＦＰを単独でまたはＤＲＲアンチセンス発現するプラスミドベクターにより、この細胞をトランスフェクションした。トランスフェクション後７２時間で、細胞は、０．０５％トリプシン－ＥＤＴＡを０．５ｍｌウェルへ添加し、３７℃で３０秒間インキュベーションすることによって剥がした。次いで１ｍｌの培養培地により細胞を中和し、１５ｍｌのチューブへ移し、カウントした。

【０１５７】

腫瘍スフェロイドを生成するために、２５０００細胞を含む細胞培養培地のドロップ（２０μｌ）を、逆さにしたペトリディッシュの蓋から懸濁した。ドロップの蒸発を阻止するために、５ｍｌのＰＢＳをディッシュの底に添加した。細胞凝集を形成するために、ハンギングドロップを３７℃で７２時間インキュベーションした。凝集は、１０ｍｌの培養培地を含む２％アガー／ＰＢＳ（ｐＨ７．４）をコートしたペトリディッシュへ移し、さらに４８時間の期間３７℃でインキュベーションして凝集をスフェロイドのように丸くさせた。次いで、スフェロイドを、液体のＩ型コラーゲン溶液（２．５ｍｇ／ｍｌ　０．０１２Ｎ　ＨＣＬ）（（８：１：１）の比で１０×ＤＭＥＭおよび０．１ｍＭ　ＮａＯＨと混合した）の中へ移植した。コラーゲン含有スフェロイドを３７℃で３０分間凝固させ、その後０．５ｍｌの組織培養培地を各々のウェルへ添加した。移植されたスフェロイドを、０、２４、４８、７２および９６時間の時間ポイント後に画像化した。浸潤領域は、４つの異なる角度で極端な直径を計算し、時刻０でのスフェロイドの極端な直径を引くことによって測定された。

【０１５８】

図１７～２２における実験については、トランスフェクションは以下のように行った。トランスフェクション前日、トランスフェクション時に７５％の密集度に到達するように細胞をプレーティングした。細胞培地はトランスフェクション前に新鮮培地と置き換えた。ＤＲＲオリゴマーとＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の複合体は製造者の使用説明書に従って調製した。簡潔には、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅをｏｐｔｉ－ＭＥＭ中で穏やかに混合し、５分間室温で放置した。ＤＲＲオリゴマーをｏｐｔｉ－ＭＥＭと最初に混合し（細胞へ添加する最終的な濃度が２０ｎＭであるように）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅと穏やかに混合した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ－ＤＲＲオリゴマー複合体を室温で２０分間インキュベーションし、その後細胞へ添加した。トランスフェクションの翌日、新鮮な細胞培地をトランスフェクションした細胞へ添加した。細胞はトランスフェクション後７２時間で固定または溶解した。

【０１５９】

アンチセンスオリゴヌクレオチド合成

標準的なホスホアミダイト固相法条件を、すべての修飾オリゴヌクレオチドおよび非修飾オリゴヌクレオチドの合成のために使用した（Ｄａｍｈａ　ａｎｄ　Ｏｇｉｌｖｉｅ，１９９３、Ａｇｒａｗａｌ，Ｓ．（編）、Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｆｏｒ　Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ　ａｎｄ　Ａｎａｌｏｇｓ：Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２０、Ｔｈｅ　Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ　Ｉｎｃ．、Ｔｏｔｏｗａ、ＮＪ、ｐｐ／８１－１１４）。合成は、Ｕｎｙｌｉｎｋ　ＣＰＧサポート（ＣｈｅｍＧｅｎｅｓ）を使用して、１μｍｏｌスケールでＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　３４００　ＤＮＡ合成装置上で実行された。ＤＮＡ（０．１Ｍとして調製）以外のホスホアミダイトはすべてアセトニトリル（ＡＣＮ）で０．１５Ｍ溶液として調製された。５－エチルチオテトラゾ

ール（ＡＣＮ中で０．２５Ｍ）を使用してカップリングのためのホスホアミダイトを活性化した。脱トリチル化は１１０秒間のCH_2Cl_2中の３％のトリクロロ酢酸により遂行された。失敗配列（ｆａｉｌｕｒｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）のキャッピングは、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）中の無水酢酸およびＴＨＦ中の１６％のＮ－メチルイミダゾールにより達成された。硫黄化は１：１ｖ／ｖピリジン／ＡＣＮ中のキサンタンヒドリドの０．１Ｍ溶液を使用して遂行された。カップリング時間は、ＤＮＡアミダイトについて１１０秒（グアノシンについて２７０秒）、および２’Ｆ－ＡＮＡホスホアミダイトについて６００秒であり、例外的にはグアノシンホスホアミダイトは９００秒間カップルさせた。脱保護はオンカラム脱シアノエチル化工程により遂行され、３回の１５分の無水の２：３　ＴＥＡ：ＡＣＮ洗浄続いて１回のＡＣＮ洗浄を使用した。固体支持体からの脱保護および切断は、室温（ＲＴ）で４８時間の３：１　ＮＨ４ＯＨ：ＥｔＯＨ、または６５℃で１０分間の４０％メチルアミンのいずれかにより遂行された（Ｂｅｌｌｏｎ，Ｌ．，２０００，Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｃｈｅｍ．，３．６．１－３．６．１３）。

【０１６０】

粗製オリゴヌクレオチドの精製は、２４％アクリルアミドゲルを使用する分取変性ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動（ＰＡＧＥ）、またはＶａｒｉａｎ　Ｐｕｒｓｕｉｔ　５逆相Ｃ１８カラム（５％のＡＣＮを含む水中の１００ｍｍｏｌトリエチルアンモニウムアセタートの静止相、およびＨＰＬＣグレードのアセトニトリルの移動相）を使用するＷａｔｅｒｓ　１５２５　ＨＰＬＣ上の逆相ＨＰＬＣのいずれかによって、行われた。ゲルバンドをＤＥＰＣ処理したオートクレーブ滅菌Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ水中で一晩抽出し、凍結乾燥した。精製されたオリゴヌクレオチドはすべてＧＥ　ＨｅａｌｔｈｃａｒｅからのＮａｐ－２５　Ｓｅｐｈａｄｅｘカラムで脱塩した。配列は分析用変性ＰＡＧＥおよび／またはＥＳＩ－ＬＣＭＳによって確認した。

【０１６１】

ＤＲＲ　ｍＲＮＡを標的化する配列は、ＮＣＢＩウェブサイト上で利用可能な出版済みのｍＲＮＡ配列を使用してデザインした。ＤＲＲを標的化する効果的なアンチセンス配列は、ＩＤＴ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｄｔｄｎａ．ｃｏｍ／Ｓｃｉｔｏｏｌｓ／Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ／ＡｎｔｉＳｅｎｓｅ／Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ．ａｓｐｘ？ｓｏｕｒｃｅ＝ｍｅｎｕ）から利用可能なアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）配列選択ツールを使用してデザインした。予測したアンチセンス配列はＢＬＡＳＴアライメントツール（ＮＣＢＩ）を使用してチェックし、的外れのヒットがないことをチェックした。加えて、ＤＲＲ　ｍＲＮＡのセクションのｍＲＮＡ二次構造を、ＭＦＯＬＤツール（ｈｔｔｐ：／／ｍｆｏｌｄ．ｒｎａ．ａｌｂａｎｙ．ｅｄｕ／？ｑ＝ｍｆｏｌｄ／ＲＮＡ－Ｆｏｌｄｉｎｇ－Ｆｏｒｍ）を使用して予測して、ＡＯＮ結合のためのｍＲＮＡ接近容易性について調査した。ＤＲＲを標的化するＡＯＮを表１中に示す（Ｇ４（配列番号：１４）、Ｇ５（配列番号：１５）およびＧ６（配列番号：１６））、ＤＲＲを標的化しない対照ＡＯＮも対照実験のために調製した（Ｇ１（配列番号：１１）、Ｇ２（配列番号：１２）、Ｇ３（配列番号：１３））。本明細書において提供されたＤＲＲを標的化するＡＯＮ配列（例えば表１中）に加えて、これらの方法を使用して他のＤＲＲ　ｍＲＮＡ領域への相補的な配列を選択することによって、他のＤＲＲを標的化するＡＯＮ配列を選択することができるが、他のｍＲＮＡ配列ではなくＤＲＲ　ｍＲＮＡについての特異性を確認しなくてはならない。ＤＲＲを標的化し、ＤＲＲ発現を減少または低下させる任意のアンチセンス分子（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）も包含されることを理解すべきである。

【０１６２】

結果

機能的スクリーニングアッセイによりＤＲＲは浸潤のプロモーターとして同定される

ＭＧＣの浸潤性は３次元浸潤モデルを使用してアッセイすることができる（Ｄｅｌ　Ｄｕｃａ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｎｅｕｒｏｏｎｃｏｌｏｇｙ　６７：２９５－３０３，２００４）。出発点としてこのモデルを使用して、脳ｃＤＮＡライブ

ラリー全体を発現させるためにＭＧＣ（Ｕ２５１神経膠腫細胞株）をレトロウイルスで形質導入することによる、新規の機能的スクリーニングアッセイを開発した。浸潤を促進する遺伝子を細胞にヘテロに発現させることができたならば、過浸潤性細胞として他の細胞から区別できるだろうと推論した。形質導入したＭＧＣから腫瘍スフェロイドを生成し、それらの浸潤性を３次元浸潤モデルにおいて査定した。次いで、識別可能な過浸潤性細胞を捕捉し、培養において拡張し、もともと形質導入した遺伝子を同定した（図１Ａ）。ＤＲＲはこの順遺伝学的アプローチを使用して、浸潤の強いプロモーターとして同定された。

【０１６３】

ＤＲＲがＭＧＣの浸潤のエフェクターとして作用するか否かを試験するために、ＤＲＲを過剰発現するＭＧＣ（ＤＲＲ$^{+}$、図８）および野生型（ＷＴ）ＭＧＣの両方から構成された混合腫瘍スフェロイドを生成し、各々の細胞株の浸潤パラメータを研究した（図１Ｂ～Ｅ）。ＭＧＣは内因的にＤＲＲを発現するが、ＤＲＲ$^{+}$細胞はＷＴ細胞よりも２４０％遠くに浸潤する。これとは対照的に、ＲＮＡ干渉を使用してＭＧＣ中のＤＲＲ発現を減少させること（ＤＲＲ$^{-}$、図８）は、浸潤の有意な低下を引き起こす（図１Ｆ、Ｇ　およびＪ）。ＤＲＲ発現を減少させることが他の神経膠細胞株において浸潤を低下させるかを試験するために、Ｕ３４３－ＤＲＲ$^{-}$、Ｃ６－ＤＲＲ$^{-}$およびＵ８７ＭＧ－ＤＲＲ$^{-}$ならびに安定した細胞株を開発し、それらの浸潤性を試験した。内在性ＤＲＲを発現する野生型対応細胞に比較して、ＤＲＲ$^{-}$細胞株はすべて浸潤性の有意な低下を示した（図１１Ｃ～Ｅ）。興味深いことには、ＤＲＲ発現は細胞形態の重大な変化も引き起こし、ＤＲＲ$^{+}$細胞は細長い紡錘体形状であったが、ＤＲＲ$^{-}$細胞は丸かった（図１Ｈ、ＩおよびＫ）。２Ｄ遊走アッセイにおける実験も、細胞が移動する時の細胞形態の差異を示す。ＤＲＲ$^{+}$細胞は長い細い突出により移動するが、ＷＴ細胞およびＤＲＲ$^{-}$細胞は一様な幅の広いラメラにより移動する（図９）。細長い紡錘状の細胞形状は、脳を介するＭＧＣの移動の好ましい様式であることが示されている（Ｂｅａｄｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　Ｃｅｌｌ．１９：３３５７－６８，２００８）。

【０１６４】

次いでマウスモデルにおいてＤＲＲの浸潤プロモーターとしての役割を調べた。ＤＲＲ$^{+}$腫瘍およびＤＲＲ$^{-}$腫瘍をマウスの梁下／尾状領域の中へ移植し、浸潤を査定した（図１ＬおよびＭ）。ＤＲＲ$^{-}$腫瘍は隣接する柔組織の中へ浸潤することなくよく限局された塊として増殖し、これらの細胞は丸い形態を有する。反対にＤＲＲ$^{+}$腫瘍は高度に浸潤性である。これらの侵入性細胞（大きく過色素性の細長い核によって区別される）は細長い形状を有し、腫瘍塊から分離し、柔組織を浸潤し、重要なことには脳梁に向かってその中へ移動する。白質路（脳梁等）の中への浸潤はヒト悪性神経膠腫によって使用される好ましい浸潤パラダイムである（Ｐｅｄｅｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，６２：７６７－７１，１９９５）。さらに、ＤＲＲ$^{+}$腫瘍はＤＲＲ$^{-}$腫瘍よりも小さく（図８Ｂ、Ｃ）、以前に記載されるように細胞増加の低下が示唆される（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ　Ｃａｎｃｅｒ　２７：１－１０，２０００）。細胞分裂におけるＤＲＲの役割を査定し、細胞分裂がＤＲＲ発現と逆に相関していることも見出した（図１Ｎ）。ＭＧＣの浸潤および増加が時間的に排反事象であるという概念が記載されている（Ｇｉｅｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ　６７：２７５－２８２．１９９６）。

【０１６５】

したがって、ＤＲＲを細胞移動の調節因子として同定し、細胞浸潤の駆動力として同定した。インビトロおよびインビボの浸潤アッセイにおけるこの所見を検証し、細胞浸潤についてＤＲＲの重要性を確認した。

【０１６６】

ＤＲＲは正常な神経膠においてではなく、ニューロンおよびヒト神経膠腫において発現される

インビトロおよびインビボの所見を臨床的に検証するために、正常なヒト脳および悪性

神経膠腫におけるＤＲＲの発現パターンを決定した。正常なヒト脳において、ＤＲＲは星状細胞またはオリゴデンドロサイトにおいてではなく、ニューロンにおいて強く発現されることが見出された（図２Ａ～Ｆ、高拡大画像については図１０を参照されたい）。培養されたラット胚ニューロンおよび神経膠のニューロンおよび神経膠のマーカーによる共標識からも、ＤＲＲが神経膠細胞においてではなくニューロンにおいて発現されることが示される（図２Ｇ～Ｌ）。抗原ペプチド競合、免疫前血清による免疫標識、および二次抗体単独の免疫標識を含むＤＲＲ抗体対照は陰性だった。各グレードの８例の悪性神経膠腫におけるＤＲＲ発現の分析は、ＤＲＲがすべての悪性神経膠腫において高く発現されているが一様にではないことを示す（図２Ｍ）。グレード２および３神経膠腫（低増殖速度の高浸潤性腫瘍）は、一様にＤＲＲを発現する。これとは対照的に、グレード４神経膠腫（高浸潤性かつ高増殖性）は、示唆的なパターンでＤＲＲを発現する。浸潤性の末梢の腫瘍細胞は一様にＤＲＲを発現するが、中心部の増殖性腫瘍領域のＤＲＲ発現は変動を示した。８つのグレード４の神経膠腫のうちの５つの神経膠腫では中心部の腫瘍のＤＲＲ発現はほとんどまたはまったく示されなかったが、８つの腫瘍のうちの３つの腫瘍では中心部腫瘍はＤＲＲ陽性だった。総合すれば、これらのデータから、ＤＲＲは正常な神経膠細胞において発現されないが、悪性神経膠腫において着実で差異的な発現パターンを有することが示される。

【０１６７】

ＤＲＲは細胞骨格と会合する

細胞移動を駆動するのにＤＲＲはどのように機能するかを解明するために、細胞以下のレベルでのＤＲＲを局在を調べた。内在性またはヘテロに発現されたＤＲＲは、主にアクチンストレスファイバー、ＦＡおよび膜ラッフルに沿って局在する（図３Ａ）。従来の報告（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ　Ｃａｎｃｅｒ　２７：１－１０，２０００）に一致して、ＤＲＲは核においても見出すことができる（図１２）。これらの結果は、ＤＲＲが細胞骨格装置に対する直接的影響を通して、または核における調節性役割を通して、浸潤を促進し得ることを示唆する。

【０１６８】

この問題に取り組むために、アクチン会合のために必要とされる最小領域の同定によってアクチン細胞骨格からＤＲＲを切りはなした。ヒトＤＲＲの連続するＮ－末端短縮コンストラクトおよびＣ－末端短縮コンストラクトを生成し、蛍光タグを使用して局在についてアッセイした。アクチン会合を可能にする２つの最小領域が同定され、アミノ酸６２～１００および１０８～１２０であった（図１４）。アクチン会合に必要とされるドメインが種にわたって保存されることが決定された。ヒト、マウス、ラットおよびゼブラフィッシュのＤＲＲにわたって保存される６２～１００領域および１０８～１２０領域内のアミノ酸を同定し突然変異させた（図１３）。両方のセグメント（$DRR^{\Delta PEPE}$）中の保存されたプロリン－グルタミン酸塩（ＰＥ）モチーフのアラニンへの組み合わせ突然変異は、アクチン細胞骨格の有意な動揺を引き起こし、残りのストレスファイバーとのアクチン会合を消失させる（図３Ａ）。これらの所見はＤＲＲの細胞骨格会合が種にわたって保存されることを示す。

【０１６９】

細胞骨格とＤＲＲの会合において役割を果たす分子を同定するために、正常脳ライブラリーの酵母２－ハイブリッドスクリーニングを使用してＤＲＲ結合パートナーを同定した。このアッセイを使用して、ＭＡＰ１Ａの軽鎖（ＬＣ２）サブユニットが候補ＤＲＲ結合タンパク質として同定された。ＤＲＲおよびＬＣ２がアクチンストレスファイバーおよび膜ラッフルに沿って共局在し、ヘテロに発現された場合共免疫沈降させることができることも示され（図３ＢおよびＣ）、これらのタンパク質が会合することと一致している。興味深いことには、ＤＲＲアクチン結合部位の突然変異は、ＬＣ２とＤＲＲ会合を増加させるように思われる（図３Ｂ）。いくつかの細胞において、ＤＲＲの非アクチン結合形態（$DRR^{\Delta PEPE}$）が微小管に局在できることも見出された（データ不掲載）。

【０１７０】

次いで、短縮およびアミノ酸突然変異分析を使用して、ＤＲＲの非ＬＣ２結合形態を開発した。最小Ｎ末端ヒスチジン－グルタミン酸アルギニン（ＨＲＥ）配列はＬＣ２結合のために必要とされることが見出された（図３Ｂ）。この領域が突然変異された（$DRR^{\Delta HRE}$）場合、アクチン細胞骨格およびＤＲＲ変化の局在パターンの有意な動揺がある。核局在および拡散した細胞質内局在においてＤＲＲ発現の増加がある（図３Ａ）。わずかなアクチン会合も観察された。

【０１７１】

要約すると、これらのデータは、ＤＲＲがアクチン細胞骨格、ＦＡおよび核に局在することを示す。アクチン会合に必要とされる最小領域（$DRR^{\Delta PEPE}$）が定義された。ＭＡＰ１ＡのＬＣ２サブユニットはＤＲＲ会合タンパク質として同定され、この会合はアミノ末端ＨＲＥ領域の突然変異（$DRR^{\Delta HRE}$）によって破壊することができる。

【０１７２】

細胞骨格とＤＲＲの会合は細胞移動のために必要とされる

ＤＲＲ－アクチンの会合およびＤＲＲ－ＬＣ２の会合を破壊する能力は、細胞骨格とＤＲＲの会合が細胞移動の駆動に必要とされるかどうか決定する２つのアプローチを提供した。$DRR^{\Delta PEPE}$または$DRR^{\Delta HRE}$を発現する安定した細胞株を生成し、３次元浸潤アッセイにおいて浸潤性について試験した。ＤＲＲアクチン会合の喪失はＷＴ細胞に比較して浸潤の～３倍の減少を引き起こすことが見出され、ＤＲＲのこの変異型が機能的ドミナントネガティブとして作用していると示唆する（図４）。ＤＲＲ－ＬＣ２の相互作用が破壊される場合も類似の所見が見られる（図４）。これらのデータすべてから、細胞浸潤の駆動にアクチンおよびＬＣ２とＤＲＲの会合が必要とされることを示す。

【０１７３】

ＤＲＲは接着斑ダイナミックスを調節する

細胞移動のプロセスは調節されたＦＡダイナミックスを必要とする（Ｌａｕｆｆｅｎｂｕｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ８４：３５９－３６９，１９９６；Ｆｒｉｅｄｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ ３：３６２－７４，２００３）。ＤＲＲ発現がＦＡに影響を与えるかどうか決定するために、ＧＦＰ－パキシリン融合タンパク質を発現し、共焦点ビデオ顕微鏡検査を使用して、ＦＡダイナミックスに対するＤＲＲ発現の効果を研究した（図５）。非極性DRR^{+}細胞において、ＦＡの形成および脱集合にかかる合計時間が４０．０５±３．００分であることが見出された（図５Ａ～Ｃ）。ＦＡの中へのＧＦＰ－パキシリン取り込みについての速度定数は（６．２±０．９）×10^{-3}／分であり、ＧＦＰ－パキシリン脱集合について速度定数は（８．６±０．７）×10^{-3}／分であった。反対に、ＦＡはＷＴ対照細胞において動的ではなかった。１７０分の画像間隔内で形成または脱集合されたＦＡを検出することはできなかった（図５Ｄ）。これらのデータは、ＦＡダイナミックスの増進によってＤＲＲが細胞浸潤を駆動するメカニズムを強く支持する。

【０１７４】

ＦＡ脱集合は重合された微小管（ＭＴ）を必要とすることが立証されている（Ｋａｖｅｒｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１４２：１８１－１９０，１９９８；Ｋａｖｅｒｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１４６：１０３３－１０４４，１９９９；Ｋｒｙｌｙｓｈｋｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１５６：３４９－３５９，２００２；Ｋｒｙｌｙｓｈｋｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１６１：８５３－８５９，２００３；Ｅｚｒａｔｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．７：５８１－５９０，２００５）。ＤＲＲはＭＡＰ１ＡのＬＣ２サブユニットと相互作用することおよびＤＲＲ過剰発現はＦＡの不安定化を引き起こすことが示されたので、ＤＲＲがＦＡ脱集合を促進するかどうかを直接検査した。

【０１７５】

ＦＡ脱集合のＭＴ対照は、微小管を脱集合する微小管の脱重合剤ノコダゾールを使用して検討することができる。ノコダゾール適用後には、脱集合に利用可能な微小管がないのでＦＡのサイズは増加する。ノコダゾールをウォッシュアウトすると、微小管は重合し、

接着斑は脱集合する（Ｅｚｒａｔｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．７：５８１－５９０，２００５）。細胞外マトリックス構成要素のフィブロネクチン上にプレーティングしたＤＲＲ$^{+}$およびＤＲＲ$^{-}$細胞を使用して、この実験を実行した。印象的な２つの観察があった。第一に、ノコダゾール適用およびＭＴ脱重合に際して、ＤＲＲ$^{+}$細胞は処理していない細胞と比較して、より多くより大きな接着斑を発達させる（図６Ａ）。これとは対照的に、ノコダゾール処理した細胞ｖｓ処理していないＤＲＲ$^{-}$細胞（図６Ａ）またはＷＴ細胞（データ不掲載）におけるＦＡ数およびサイズの差異は観察されず、ＤＲＲ欠損は大きく成熟したＦＡを引き起こすことが示唆される。第二に、ＤＲＲを過剰発現する細胞においてＭＴが再重合する場合、ＦＡは５分内に脱集合し始めるが、ＤＲＲ$^{-}$細胞（またはＷＴ細胞、データ不掲載）におけるＦＡは１５分後にのみ脱集合し始め、完全に脱集合しない（図６Ａ）。同じ実験がＤＲＲの非アクチン結合形態（ＤＲＲ$^{\Delta PEPE}$）またはＤＲＲの非ＬＣ２形態（ＤＲＲ$^{\Delta HRE}$）により実行された場合、ＦＡ脱集合動態はＤＲＲ欠損条件に類似した（図６Ｂ、ＤＲＲ$^{\Delta HRE}$についてはデータ不掲載）。ＤＲＲ発現はＦＡ脱集合を促進するが、ＤＲＲ欠損は安定的な成熟ＦＡを引き起こすという所見は、ＦＡダイナミックスの新規の調節因子としてＤＲＲを指し示す。

【０１７６】

ＤＲＲはアクチンおよび微小管の細胞骨格を組織化する

ＦＡ脱集合アッセイからの結果は、アクチン細胞骨格およびＭＡＰ１ＡのＬＣ２サブユニットの両方とのＤＲＲの会合はＦＡ脱集合のために必要とされることを示唆する（図６）。ＤＲＲがこの結果をもたらし得る１つのメカニズムは、ＦＡの近辺においてＭＴを配置することによってＭＴダイナミックスを変化させることである（Ｋａｖｅｒｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１４６：１０３３－１０４４，１９９９）。この仮説を試験し、ＤＲＲがＭＴおよびアクチンの両方の細胞骨格を調節することを見出した。ＤＲＲ発現は、アクチン細胞骨格の局在パターンに強く類似する高度に組織化されたＭＴシステムを引き起こす（図７Ａ）。これとは対照的に、ＤＲＲ欠損は、アクチン細胞骨格に類似しない不規則であまり組織化されないＭＴ細胞骨格を引き起こす（図７Ｂ）。ＤＲＲ欠損は、ストレスファイバー形成の喪失および外側のアクチンシステムの促進をともなうアクチン細胞骨格における重大な変化も引き起こす（図７ＡおよびＢ）。ストレスファイバーアクチンシステムの促進はアクトミオシン収縮およびしたがって細胞後部引き込みを可能にする（Ｖｅｒｋｈｏｖｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１３１：９８９－１００２，１９９５）。重要なことには、ＭＴがＦＡに到達するためにＤＲＲ発現が必要とされることも見出された。ＤＲＲ欠損細胞においてＭＴはＦＡに接近しない（図７Ｂ）。これとは対照的に、ＤＲＲ発現はＭＴとＦＡとの間の接近した会合を引き起こす（図７Ａ）。これらのデータすべてから、ＤＲＲがアクチンおよびＭＴの両方の細胞骨格の制御によるＦＡダイナミックスの新規の調節因子であることが強く示唆される（図７Ｃ）。

【０１７７】

ＤＲＲ発現の減少はヒト神経膠腫浸潤を阻害する

ヒトの高グレードの神経膠腫を外科的に切除し、培養中に直ちに置いた。２週間後に、これらの細胞は、対照ＧＦＰベクターまたはＤＲＲ－ＲＮＡｉ（配列番号：１）（ベクターはＧＦＰも含む）によりトランスフェクションされた。腫瘍スフェロイドはこれらの細胞から生成され、コラーゲンマトリックスの中へ移植された。明視野（上部レーン）および蛍光画像（下部レーン）を移植後１～１４日で捕捉した（図１６）。トランスフェクションしていない腫瘍（図１６Ａ）および対照のＧＦＰをトランスフェクションした腫瘍（図１６Ｂ）は容易に浸潤するが、ＤＲＲ－ＲＮＡｉをトランスフェクションした腫瘍（図１６Ｃ）は浸潤しない。図１６Ｄは、スフェロイド縁部からの浸潤距離の定量化を示す。

【０１７８】

これらの結果は、ＤＲＲ発現の減少がヒト神経膠腫浸潤を阻害することを示し、原発性脳腫瘍に罹患した被験体においてヒト脳腫瘍浸潤を阻害する治療用標的としてのＤＲＲの第１の実証を表わす。

【０１７９】
複数のタイプのＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドはＤＲＲ発現を減少させる
ＤＲＲ発現の減少において異なるＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドの効能を比較した。アルティマーオリゴヌクレオチド（互い違いのユニットを備えたオリゴヌクレオチド；かかるオリゴは例えばＰＣＴ公開第ＷＯ／２００３／０６４４４１号中に記載される）およびギャップマーオリゴヌクレオチド（キメラのアンチセンスオリゴヌクレオチド；かかるオリゴは例えばＰＣＴ公開第ＷＯ／２００２／２０７７３中に記載される）を、対応する非ＤＲＲ標的化対照と共に試験した。
【０１８０】
ＤＲＲ$^{+}$細胞は、示されたＤＲＲアンチセンス（アンチセンスＧ４（配列番号：１４；アルティマー）、アンチセンスＧ５（配列番号：１５；ギャップマー）またはアンチセンスＧ６（配列番号：１６；ギャップマー））；非標的化対照アンチセンス（Ｃｔｌアンチセンス）によりトランスフェクションされるか；またはトランスフェクションされないまま（非トランスフェクション）だった。オリゴヌクレオチドＧ１（配列番号：１１）は非標的化アルティマー対照であり、オリゴヌクレオチドＧ２（配列番号：１２）およびＧ３（配列番号：１３）は非標的化ギャップマー対照である。
【０１８１】
トランスフェクション後７２時間でＤＲＲ発現量をウエスタンブロットを使用して決定した（図１７）。結果は、異なるアンチセンスオリゴヌクレオチドがＤＲＲ発現を減少させることに効果的であることを示す。
【０１８２】
次いで異なるＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによるトランスフェクション後のＤＲＲを過剰発現する細胞における細胞骨格アクチンおよび接着斑の変化を調査した（図１８）。結果は、ＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理によるＤＲＲ発現の減少が、細長い紡錘体形態から丸い形態への細胞のシフトを誘導したことを示す。ＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理が大きな接着斑を引き起こすことも見出された。
【０１８３】
ＤＲＲ$^{+}$細胞の遊走に対する異なるＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果はインビトロのスクラッチアッセイを使用して分析された（図１９）。結果は、時刻０での条件はすべて類似することを示すが、４８時間内に対照ＤＲＲ$^{+}$細胞におけるスクラッチはもはやはっきり表れない。これとは対照的に、ＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理は、ギャップの閉鎖を阻止する。これらの結果は、ＤＲＲ発現を減少させることが細胞の遊走を阻止することを実証する。
【０１８４】
ＤＲＲ$^{+}$細胞浸潤をインビトロの３次元浸潤アッセイも使用して分析した（図２０）。対照ＤＲＲ$^{+}$腫瘍スフェロイドは高浸潤性であるが、ＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理は腫瘍スフェロイドの浸潤を減じることが理解できた。浸潤の定量化から、ＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理が浸潤の有意な低下に引き起こすと明らかにされる（図２０Ｂ）。
【０１８５】
次いで異なるＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによるトランスフェクション後のヒト神経膠芽腫細胞の細胞骨格アクチンおよび接着斑の変化を可視化した（図２１）。ＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理によるＤＲＲ発現の減少は、細長い紡錘体形態から丸い形態への細胞のシフトを誘導することが見出された。ＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理は大きな接着斑を引き起こすことが見出された。
【０１８６】
ヒト神経膠芽腫細胞の遊走をインビトロのスクラッチアッセイを使用して分析した（図２２）。結果は、２４時間内に対照神経膠芽腫細胞においてスクラッチがほぼ閉鎖されているが、ＤＲＲアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理はギャップの閉鎖を阻止する

こと示す。これらの結果から、ＤＲＲ発現の減少が神経膠芽腫遊走を阻止することが実証される。

【０１８７】

要約すると、浸潤のプロモーターを同定する新規の機能的スクリーニングアッセイが本明細書において実証され、このアッセイを使用してＤＲＲが浸潤のプロモーターとして同定された。ＤＲＲがインビトロの３次元培養および浸潤のマウスモデルにおいてＭＧＣの浸潤を促進することが本明細書において示される。正常なヒト脳および神経膠腫におけるＤＲＲ発現の特徴づけから、正常脳においてＤＲＲは神経膠においてではなくニューロンにおいて多く発現されることが明らかにされる。これとは対照的に、ＤＲＲは低グレードおよび高グレードの神経膠腫の浸潤性領域において一様に高度に発現されるが、高グレードの神経膠腫の中心部増殖性領域における発現は可変的である。ＤＲＲ発現の減少がヒト神経膠腫浸潤を阻害することも実証される。

【０１８８】

これらのすべての所見は、ＤＲＲが神経膠腫浸潤の重要な調節因子および神経膠腫の治療的処理のための標的であることを示す。加えて、ＤＲＲは浸潤性領域を示し、悪性神経膠腫をグレーディングする、有用なバイオマーカーである。

【０１８９】

他のグループによる最近の研究は、ＤＲＲおよび悪性神経膠腫をリンクさせ、ＤＲＲ発現は低グレード神経膠腫に比較して高グレードの神経膠腫において減少していることを報告しているが、正常脳における発現は記載していなかった（ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｂｏｏｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　１１９：２３３０－２３３８，２００６）。ＤＲＲの抗増殖機能も他のグループによって報告された（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ　＆　Ｃａｎｃｅｒ　２７：１－１０，２０００）。腫瘍抑制因子としてのＤＲＲの役割のこれらの報告とは対照的に、本明細書において、ＤＲＲが腫瘍細胞における浸潤の駆動力としての作用し、悪性神経膠腫の浸潤性領域において高度に発現されるという驚くべき予想外の所見を報告する。ＤＲＲ発現が神経膠腫細胞における浸潤性表現型と関連し、ＤＲＲ発現の減少がヒト神経膠腫浸潤を阻害することを初めて示す。したがって、本結果は、細胞増加の調節因子に加えて、細胞浸潤の駆動力としての、神経膠腫生物学におけるＤＲＲについて中心的な役割を初めて示唆する。したがって、本結果は、細胞増加の調節因子に加えて、細胞浸潤の駆動力として、神経膠腫生物学におけるＤＲＲの中心的な役割を初めて示唆する。

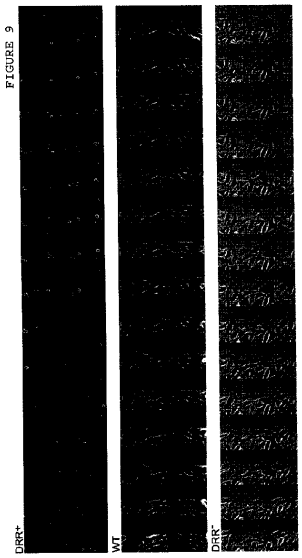
【０１９０】

本明細書において引用されたすべての文書および参照文献の内容の全体は、参照として本明細書に援用される。

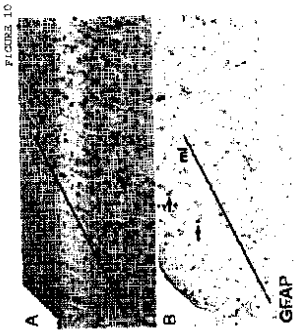
【０１９１】

本発明はその具体的な実施形態と関連して記載されているが、さらなる修飾が可能であり、本出願は一般に本発明の原則に従って本発明のいかなる変形、使用または改造をカバーすることを意図し、本発明が属する当該技術分野内で公知または慣習的な実施の範囲内に生ずるような、および上文に記載される本質的特徴に適用され得るような、ならびに添付の請求項の範囲に従うような、本開示からのかかる逸脱を含むことが理解されよう。

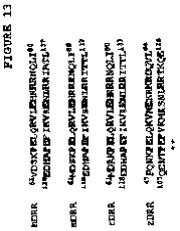
【図９】



【図１０】

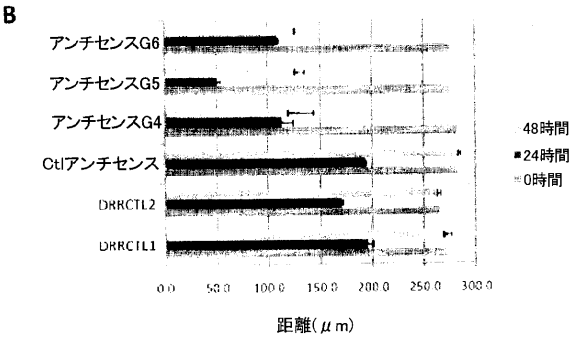


【図１３】



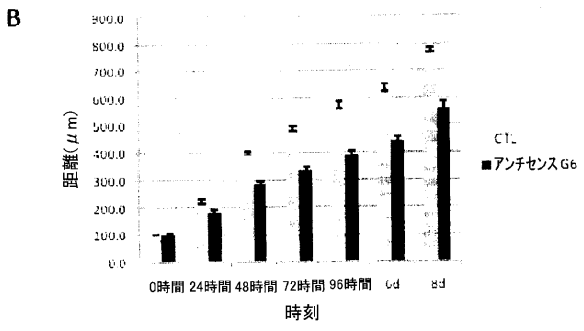
【図１９Ｂ】

FIGURE 19B



【図２０Ｂ】

FIGURE 20B



【図１】

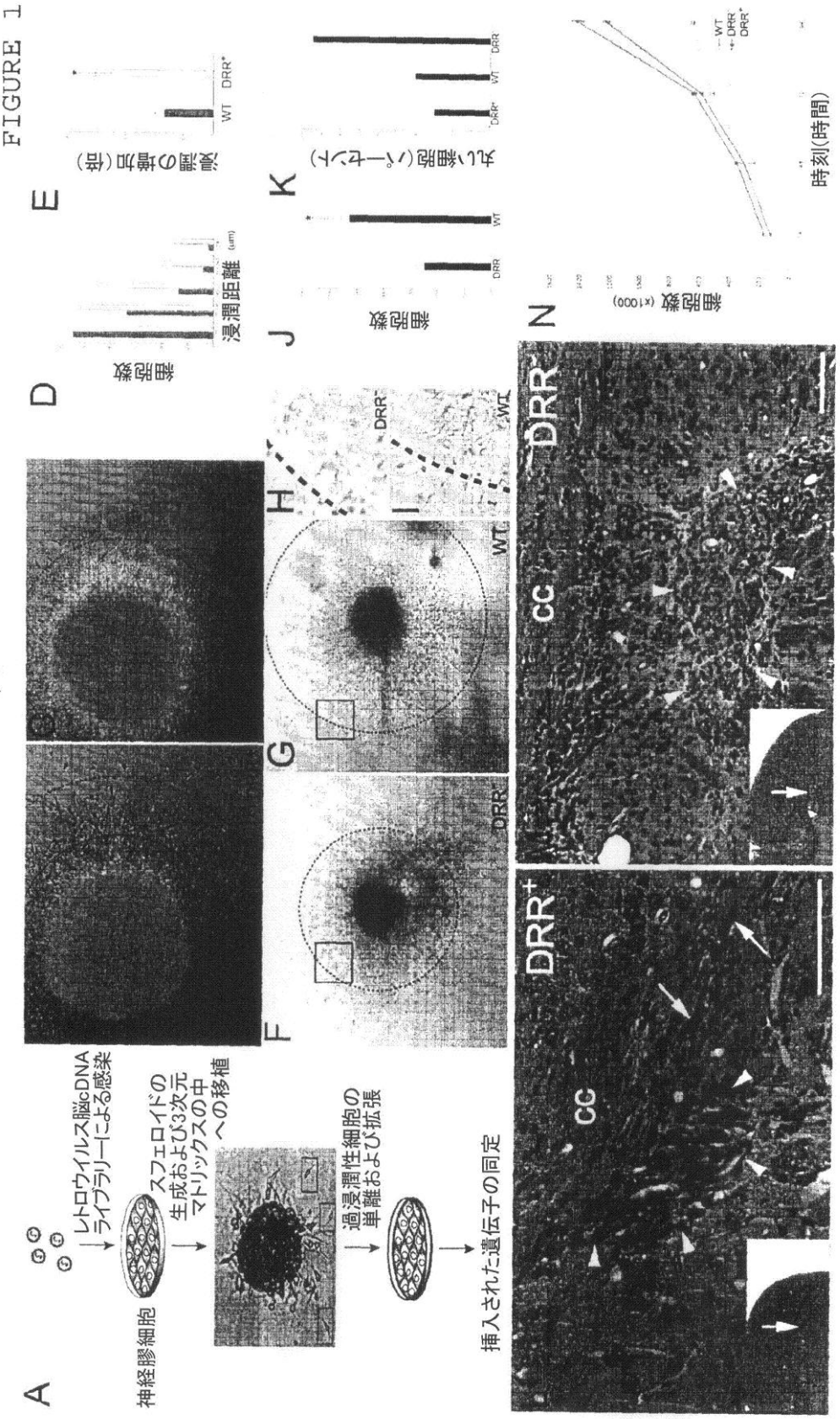


FIGURE 1
A
レトロウイルス脳cDNAライブラリーによる感染
神経膠細胞
スフェロイドの生成および3次元マトリックスの中への移植
過浸潤性細胞の単離および拡張
挿入された遺伝子の同定
B
C
D
細胞数
浸潤距離 (μm)
E
浸潤の増加（倍）
WT
DRR+
F
DRR+
G
WT
H
DRR+
I
WT
J
細胞数
DRR
WT
K
大きい細胞（パーセント）
DRR+
WT
DRR
N
細胞数 (x1000)
時刻(時間)
WT
DRR
DRR+
DRR+
CC
DRR-
CC

【図２】

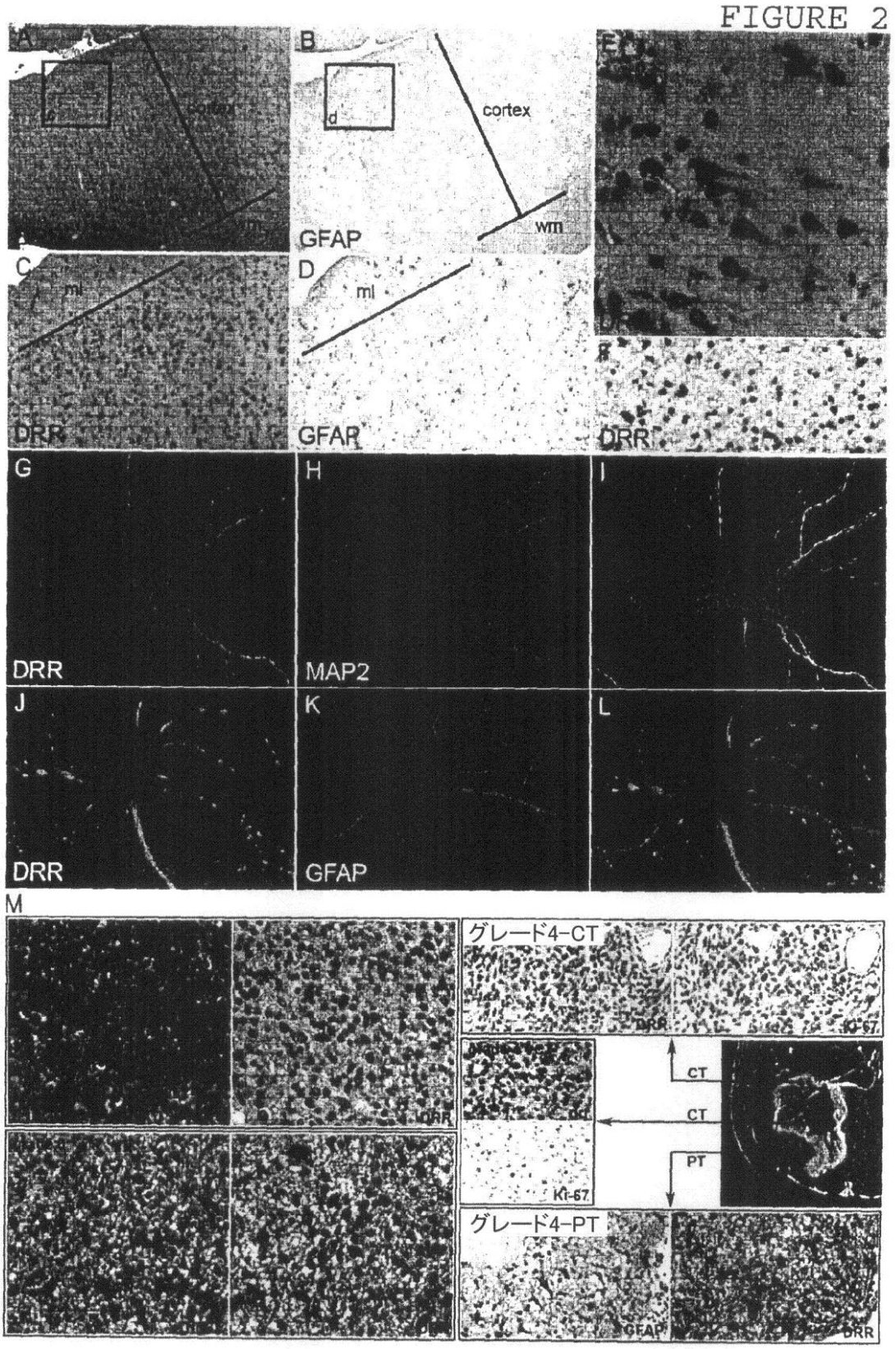
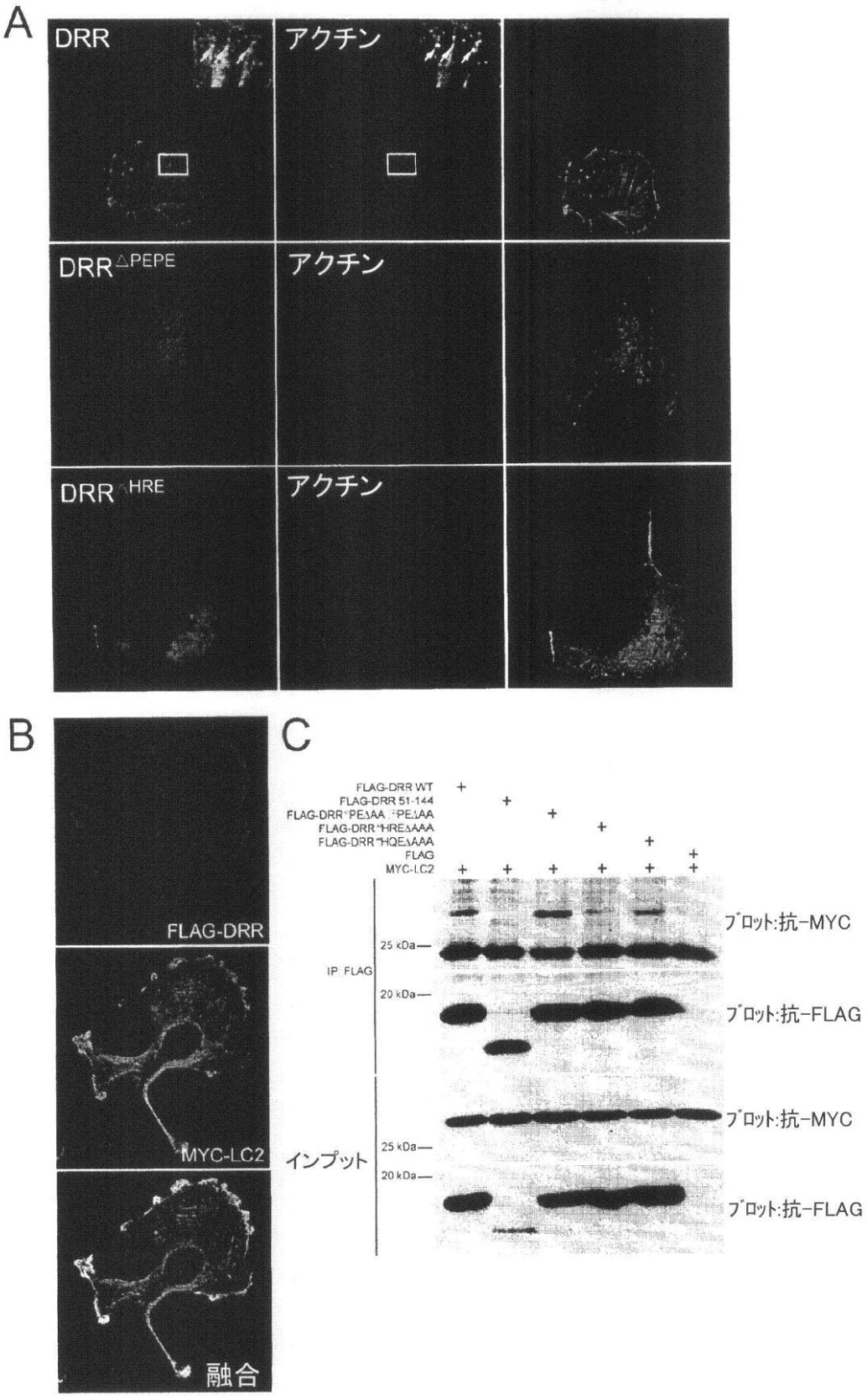


FIGURE 2
A
cortex
B
d
cortex
GFAP
wm
C
ml
DRR
D
ml
GFAP
E
DRR
F
DRR
G
DRR
H
MAP2
I
J
DRR
K
GFAP
L
M
グレード4-CT
DRR
Ki-67
CT
CT
PT
Ki-67
グレード4-PT
GFAP
DRR

【図３】

FIGURE 3


A
DRR
アクチン
DRR△PEPE
アクチン
DRR△HRE
アクチン
B
FLAG-DRR
MYC-LC2
融合
C
FLAG-DRR WT
FLAG-DRR 51-144
FLAG-DRR△PE△AA
FLAG-DRR△PE△AA
FLAG-DRR△HRE△AAA
FLAG-DRR△HQE△AAA
FLAG
MYC-LC2
IP: FLAG
25 kDa
20 kDa
インプット
25 kDa
20 kDa
ブロット:抗-MYC
ブロット:抗-FLAG
ブロット:抗-MYC
ブロット:抗-FLAG

【図４】

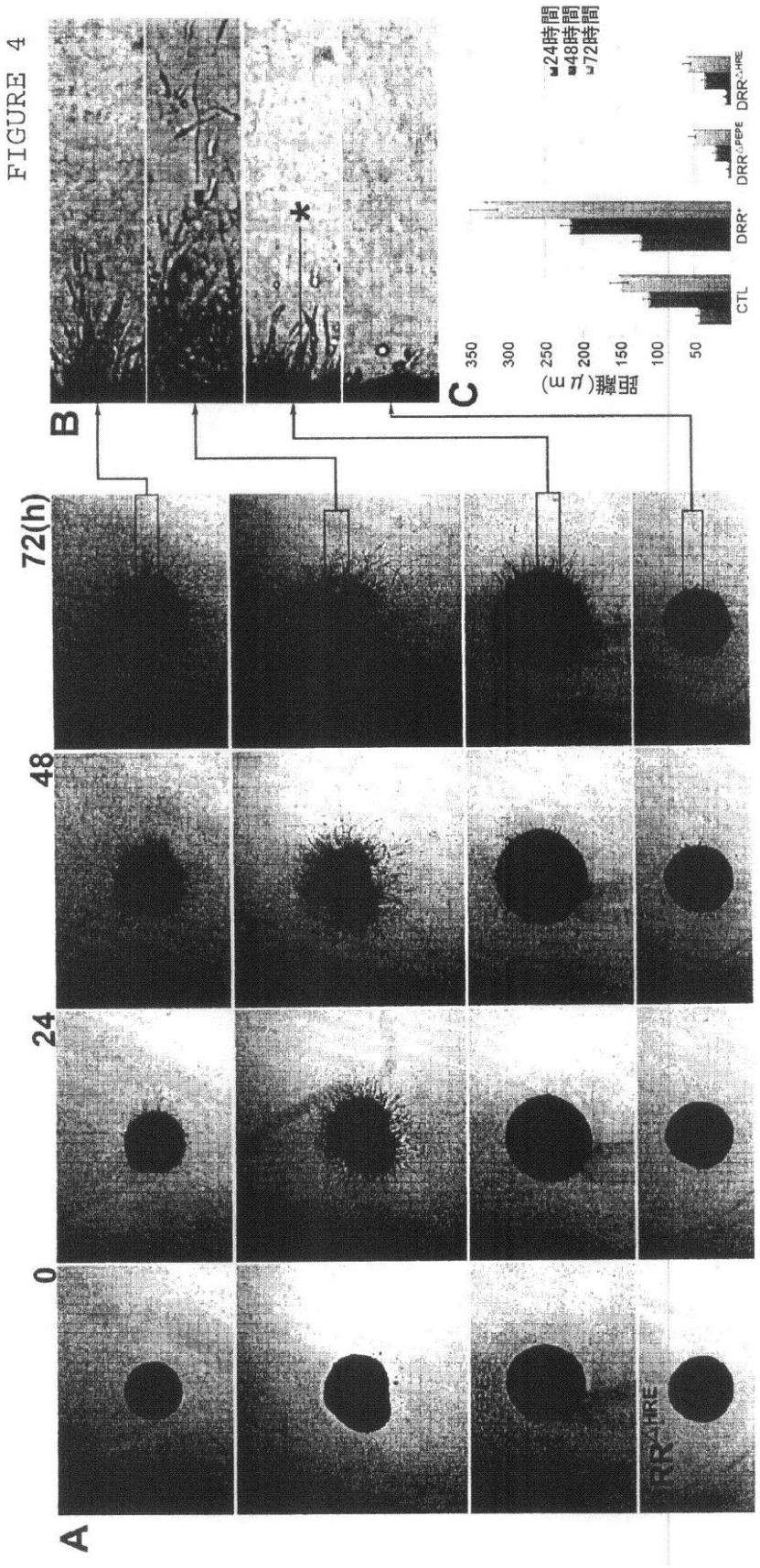
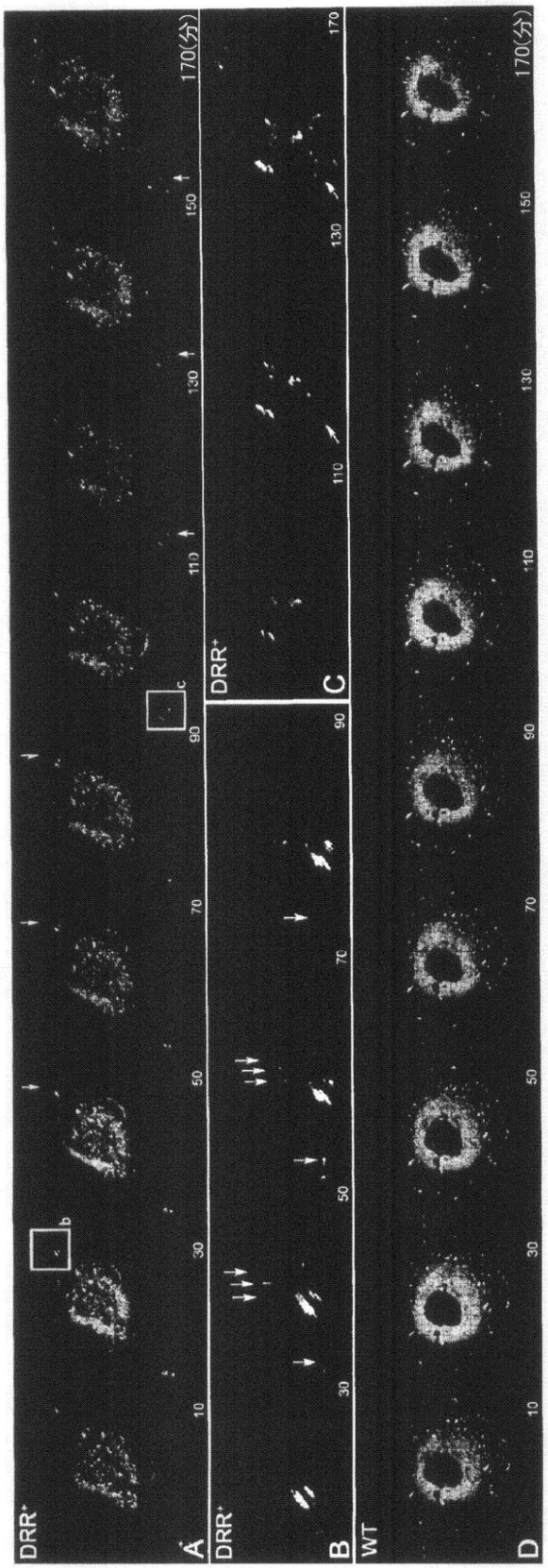


FIGURE 4
A
B
C
0
24
48
72(h)
DRR+
DRR△HRE
24時間
48時間
72時間
距離(μm)
CTL
DRR+
DRR△PEPE
DRR△HRE

【図５】

FIGURE 5



【図６】

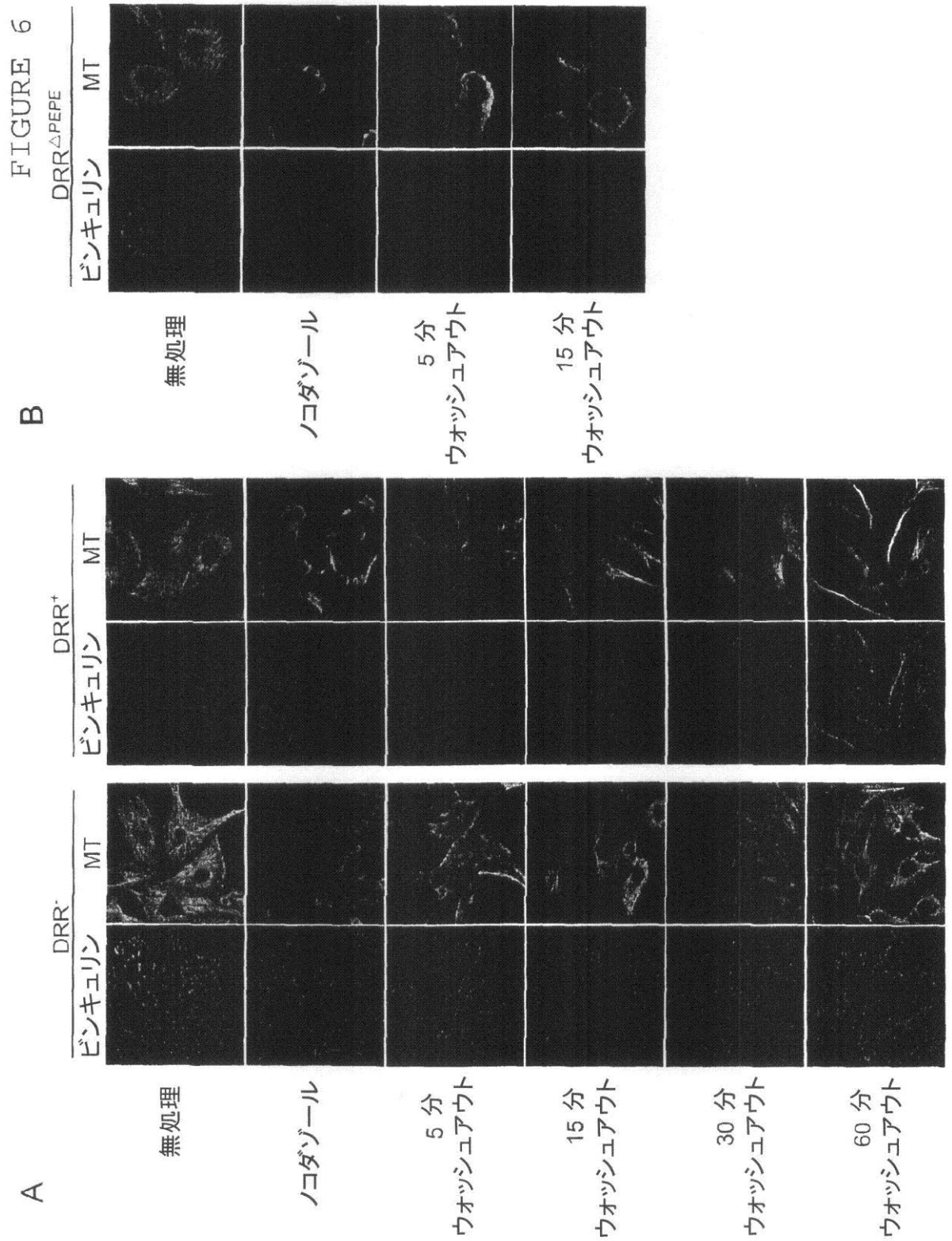
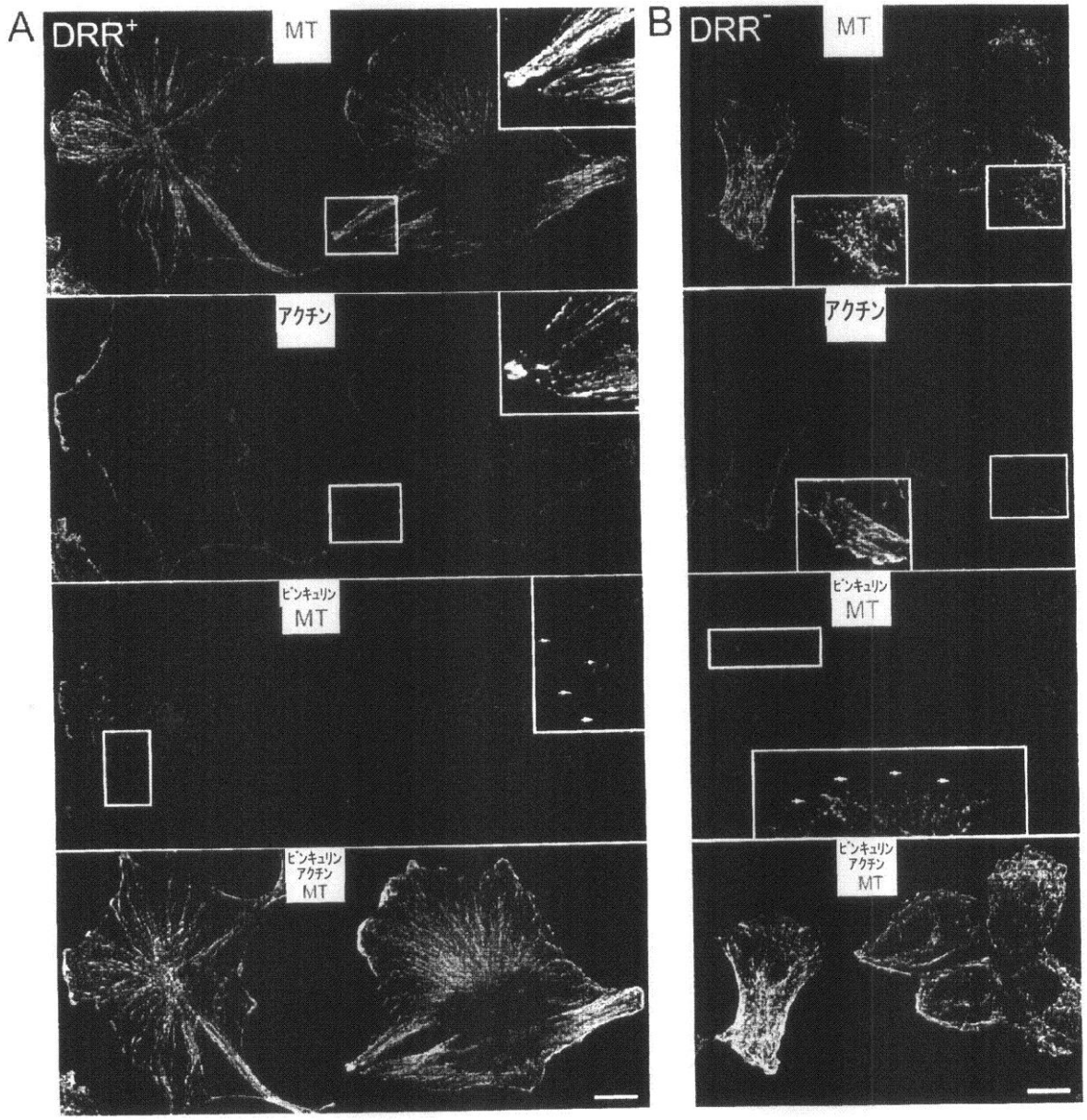
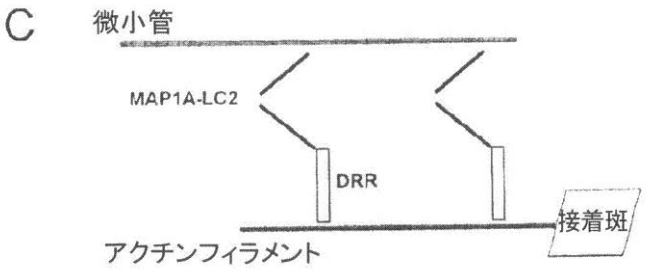


FIGURE 6
A
DRR-
ビンキュリン
MT
DRR+
ビンキュリン
MT
無処理
ノコダゾール
5 分
ウォッシュアウト
15 分
ウォッシュアウト
30 分
ウォッシュアウト
60 分
ウォッシュアウト
B
DRR△PEPE
ビンキュリン
MT
無処理
ノコダゾール
5 分
ウォッシュアウト
15 分
ウォッシュアウト

【図７】

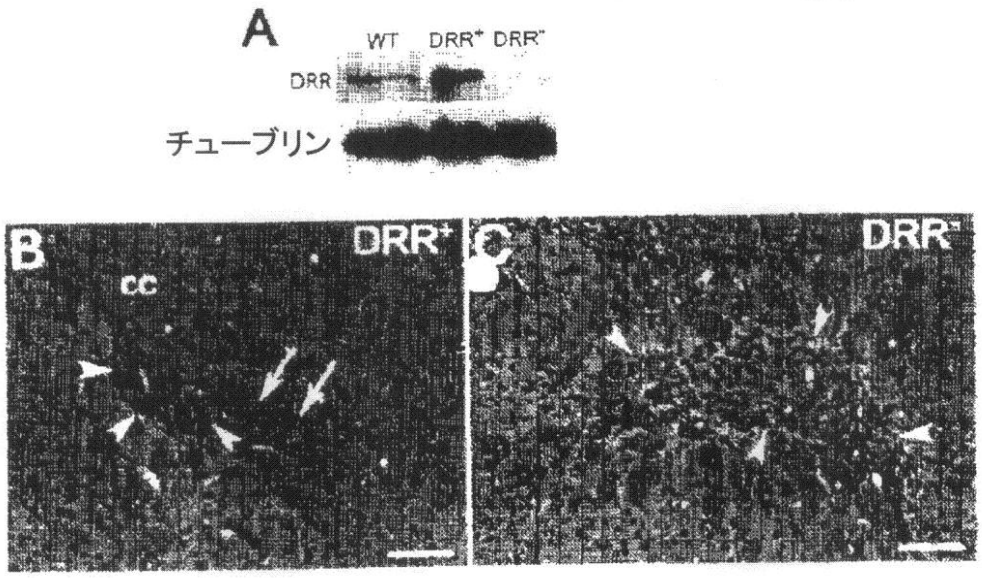
FIGURE 7


A
DRR+
MT
アクチン
ビンキュリン
MT
ビンキュリン
アクチン
MT
B
DRR-
MT
アクチン
ビンキュリン
MT
ビンキュリン
アクチン
MT


C
微小管
MAP1A-LC2
DRR
接着斑
アクチンフィラメント

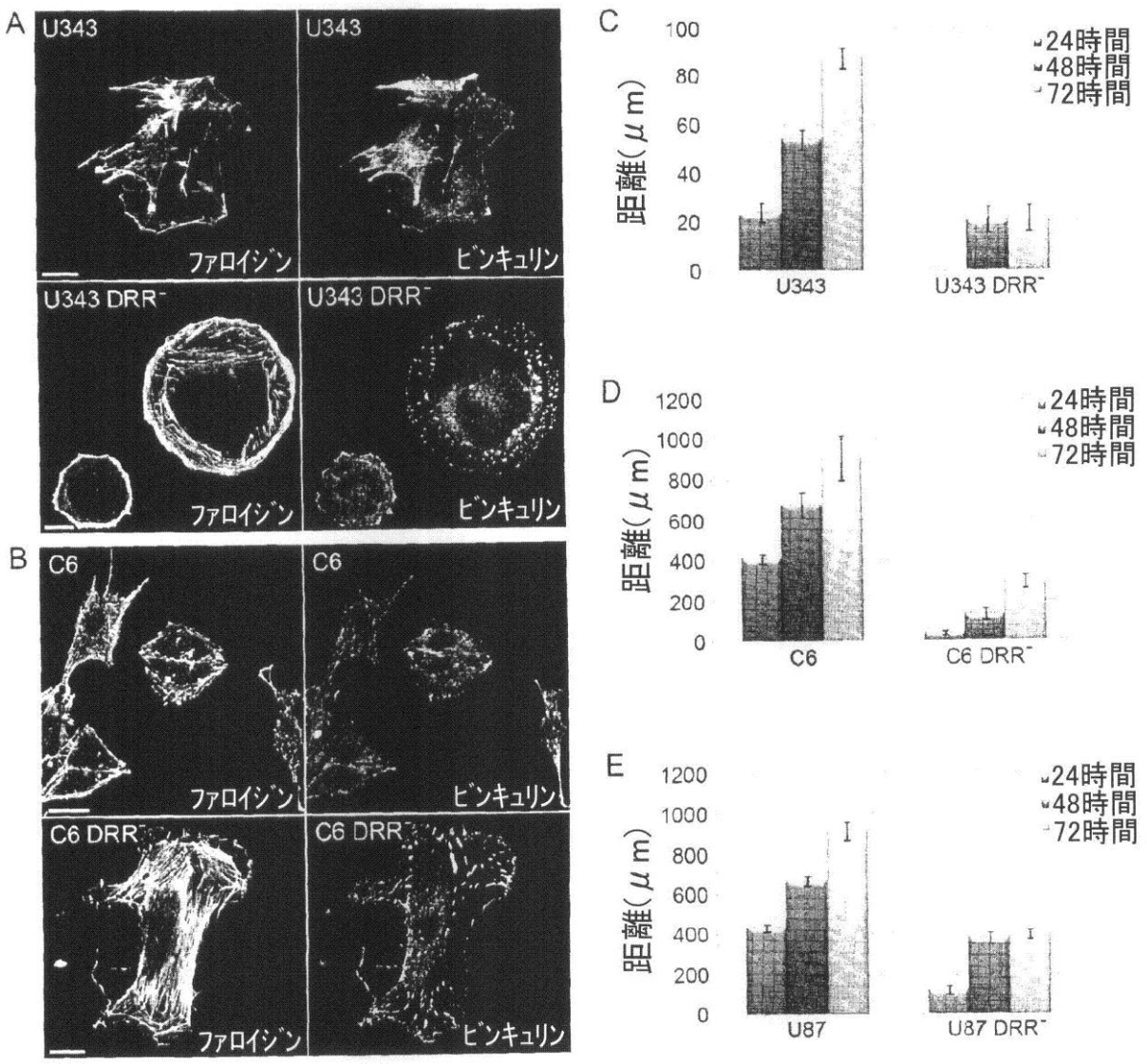
【図８】

FIGURE 8



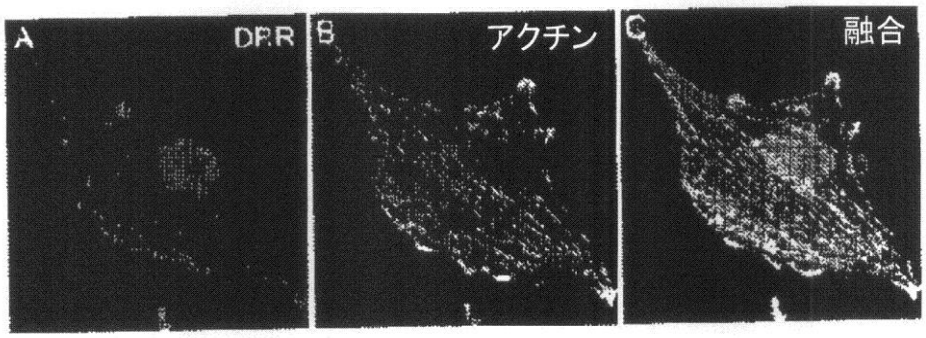
【図１１】

FIGURE 11



【図１２】

FIGURE 12



【図１４】

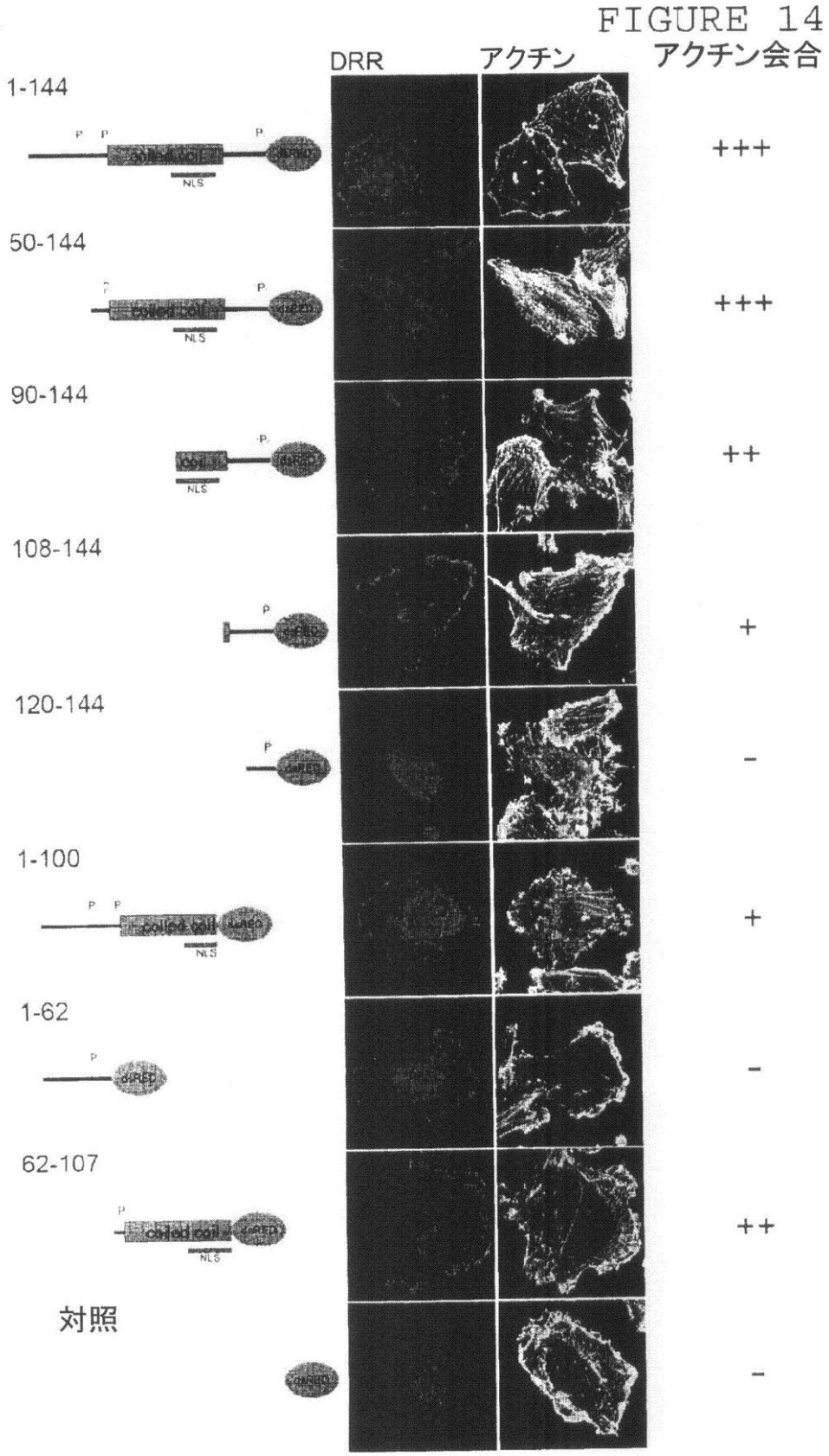
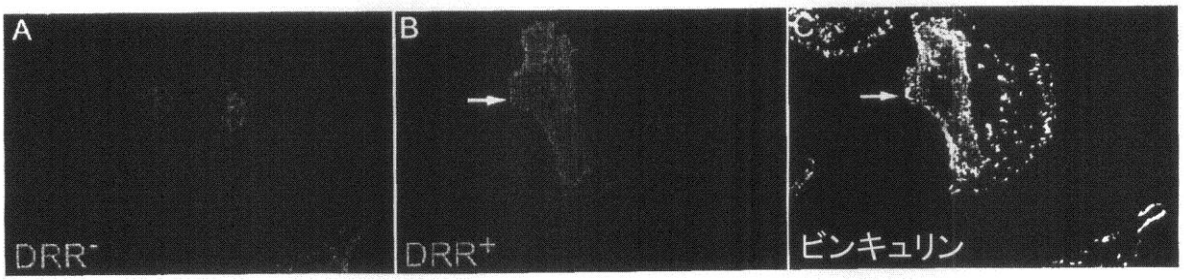


FIGURE 14
DRR
アクチン
アクチン会合
1-144
+++
50-144
+++
90-144
++
108-144
+
120-144
-
1-100
+
1-62
-
62-107
++
対照
-
coiled coil
NLS

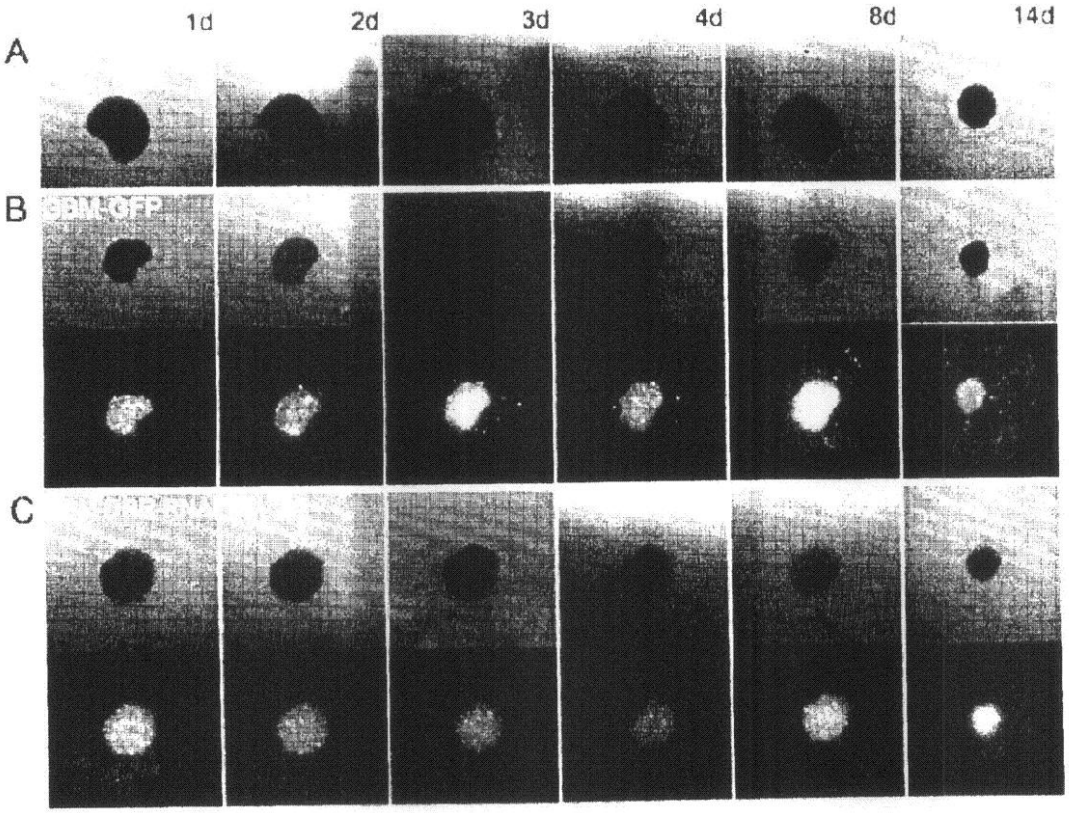
【図１５】

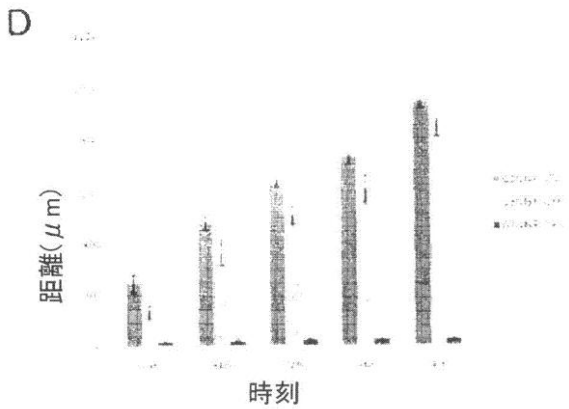
FIGURE 15



【図１６】

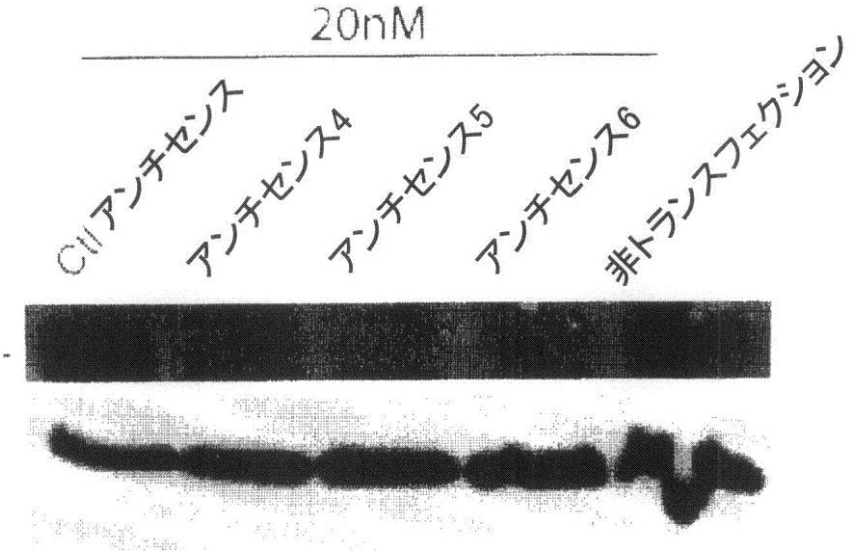
FIGURE 16





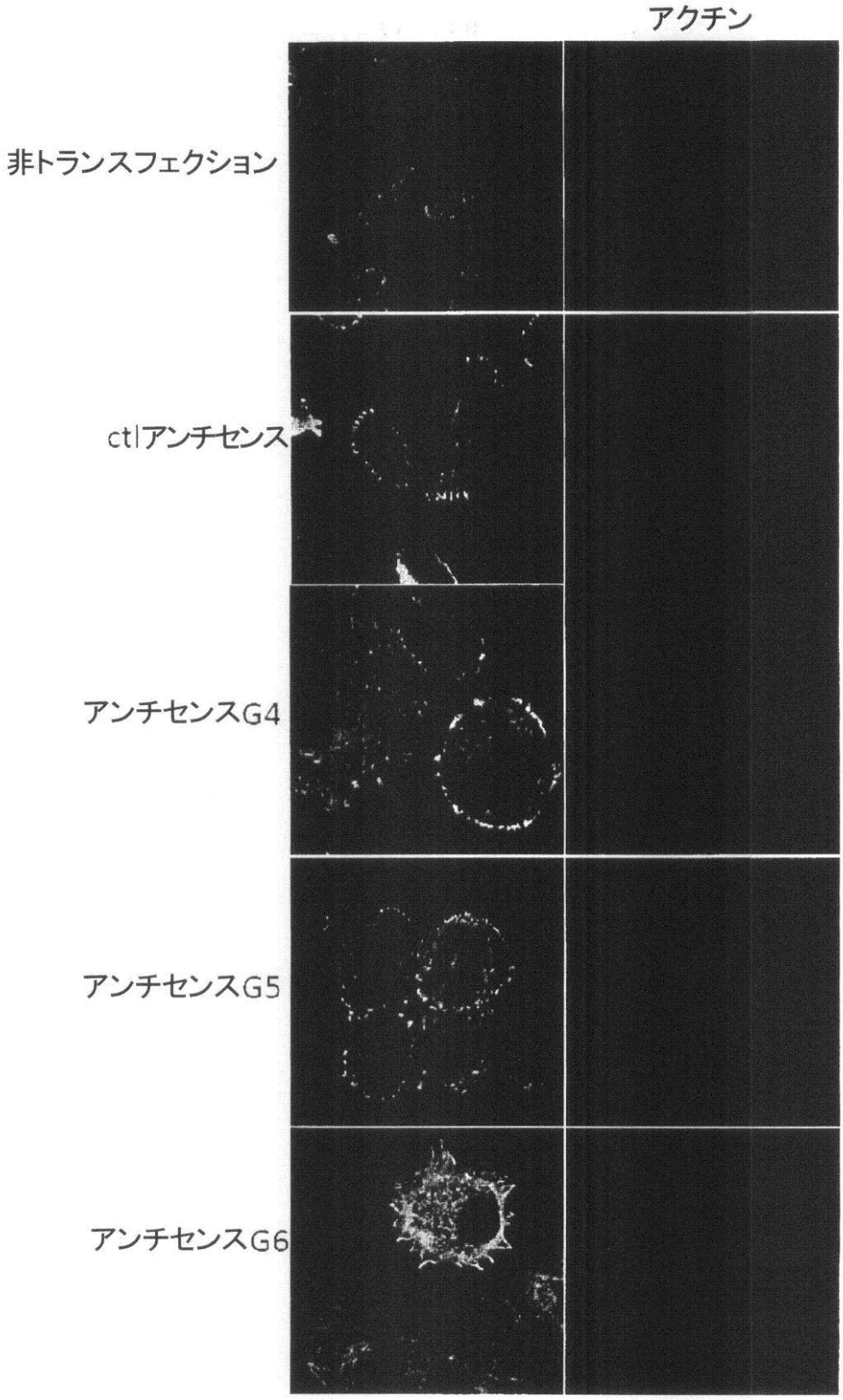
【図１７】

FIGURE 17



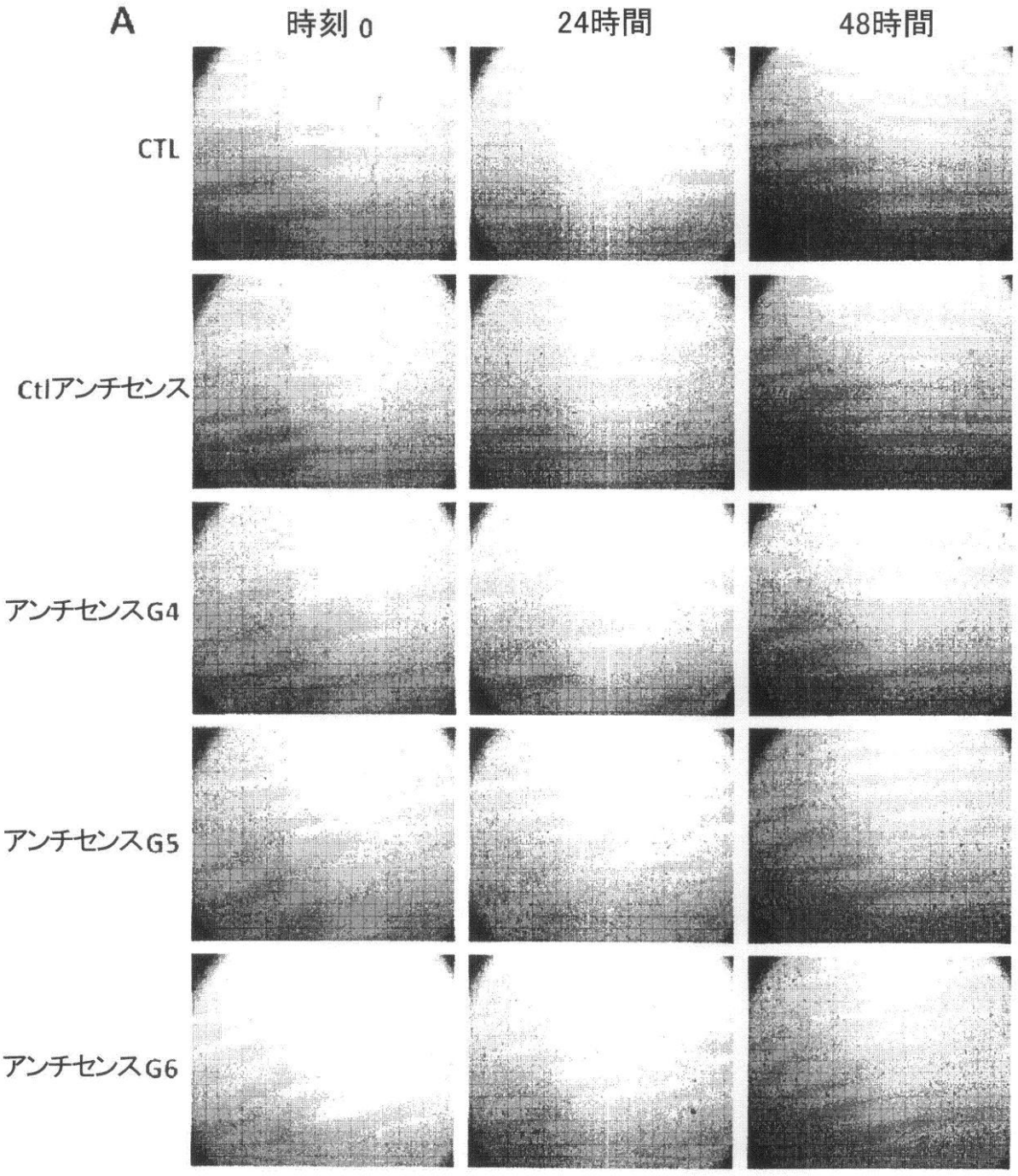
【図１８】

FIGURE 18



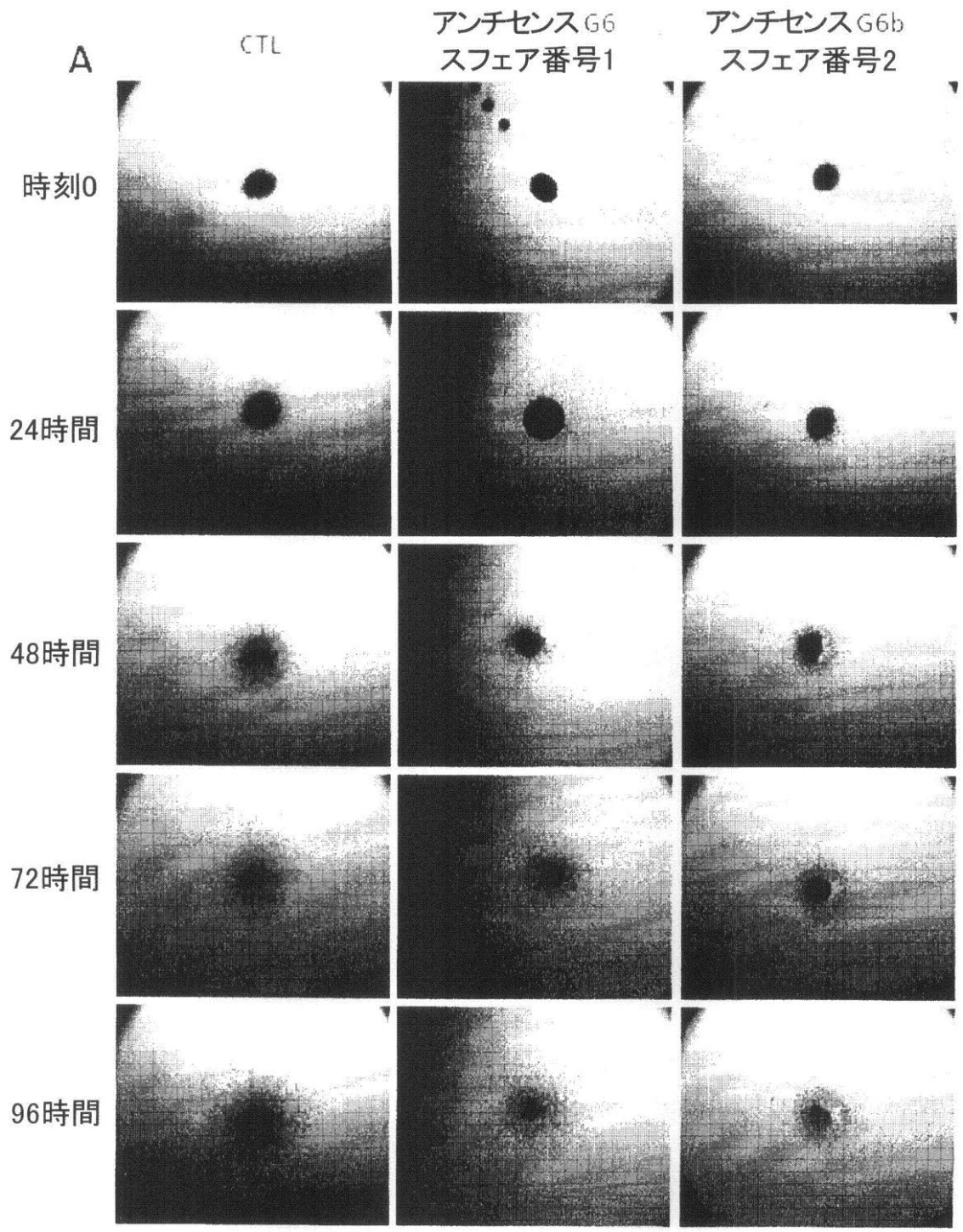
【図１９Ａ】

FIGURE 19A



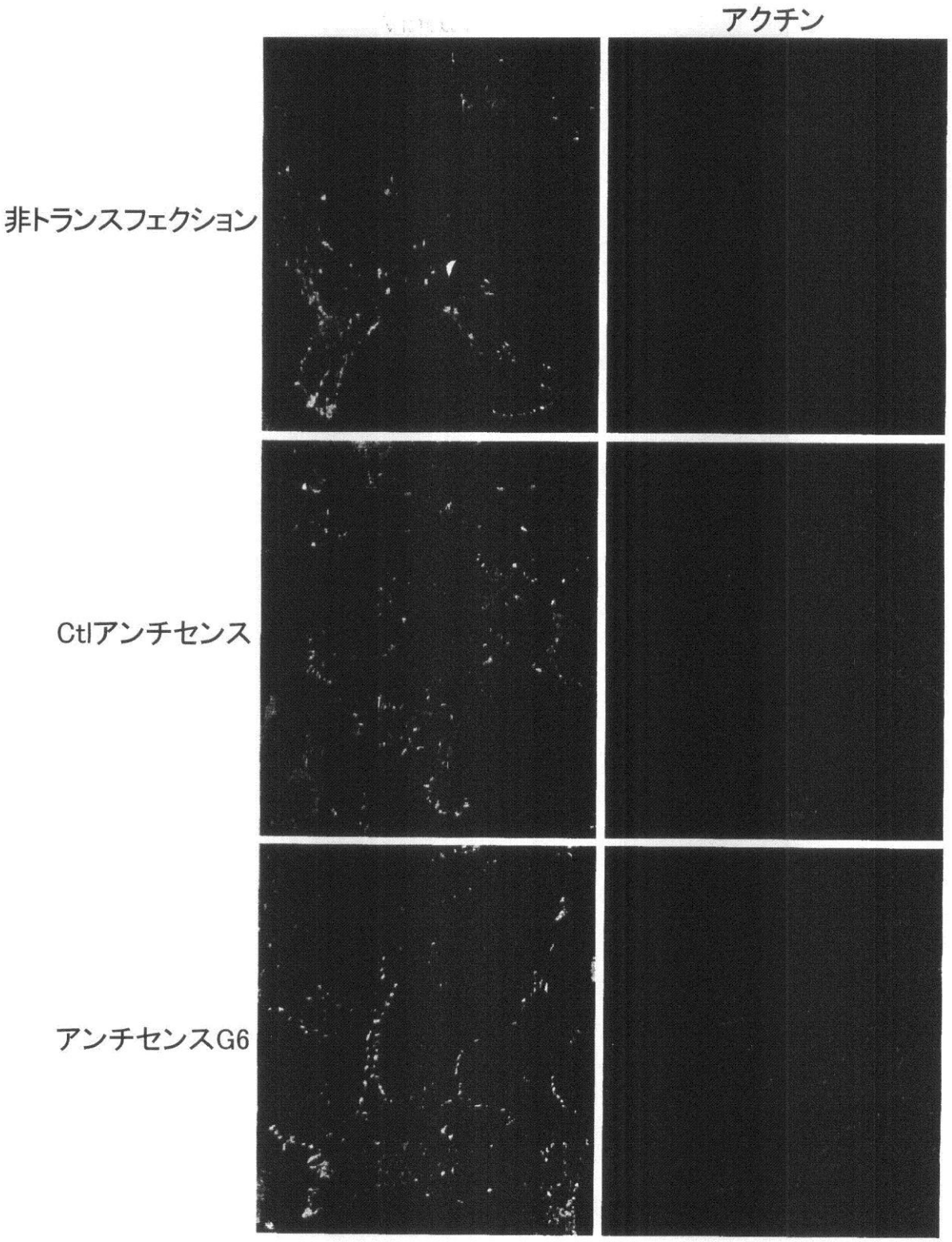
【図２０Ａ】

FIGURE 20A



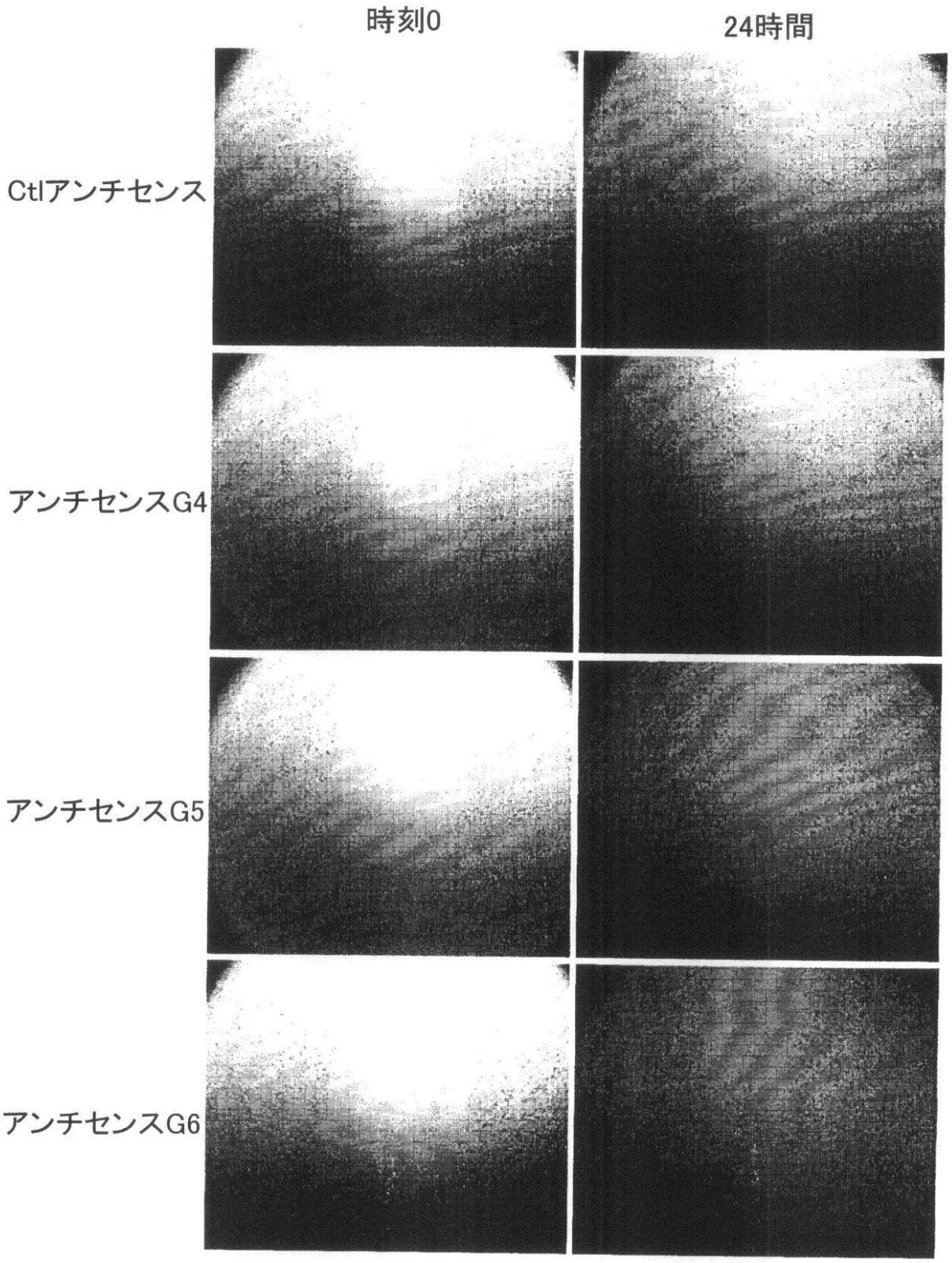
【図２１】

FIGURE 21



【図２２】

FIGURE 22



【配列表】
2013534410000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2011/000591

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: ***C12N 15/113*** (2010.01), ***A61K 31/7088*** (2006.01), ***A61P 35/00*** (2006.01), ***C12N 15/85*** (2006.01)
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)
IPC: ***C12N 15/113*** (2010.01), ***A61K 31/7088*** (2006.01), ***A61P 35/00*** (2006.01), ***C12N 15/85*** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)
STN (CAPlus, Biosis, Medline), TotalPatent, Canadian Patent Database, NCBI, Esp@cenet and GenomeQuest; Authors: Petrecca K, Damha M and Deleavey G; Key words: DRR, TU3A, glioma, brain and cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	LE, P. U. et al. DRR drives brain cancer invasion by regulating cytoskeletal-focal adhesion dynamics. Oncogene. 14 June 2010, Vol. 29, No. 33, pages 4636-4647, ISSN 1476-5594. *see entire document*	2, 5, 11-17, 23-25 and 37-40
X	WANG, L. et al. Loss of expression of the *DRR 1* gene at chromosomal segment 3p21.1 in renal cell carcinoma. Genes, Chromosomes & Cancer. January 2000, Vol. 27, No. 1, pages 1-10, ISSN 1098-2264. *see entire document*	5, 13-17, 25, 39 and 40
X	US 2005/0244851 A1 (BLUME, J. E. and WILLIAMS, A. J.) 3 November 2005 (03-11-2005). *see entire document*	2, 5, 11-17, 25 and 37-40

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 August 2011 (08-08-2011)	2 September 2011 (02-09-2011)

Name and mailing address of the ISA/CA	Authorized officer
Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Sudeep Acharya (819) 994-4241

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2011/000591

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   b. (time)

   [X] in the international application as filed

   [X] together with the international application in electronic form

   [ ] subsequently to this Authority for the purposes of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments :

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2011/000591

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. [X] Claim Nos. : 1, 3, 4, 6-10, 18-22 and 26-36
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Methods of medical treatment. Claims 1, 3, 4, 6-10, 18-22 and 26-36 are directed to methods of medical treatment which the Authority is not required to search under Rule 39.1 (iv) of the PCT. Nevertheless, this Authority has established a search report based on the alleged therapeutic effect derived from the use of the products defined.

2. [ ] Claim 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. [ ] Claim 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 :

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 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 claim 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 claim Nos. :

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 SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2011/000591

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAN DEN BOOM, J. et al. Identification of novel genes associated with astrocytoma progression using suppression subtractive hybridization and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Int. J. Cancer. 15 November 2006, Vol. 119, No. 10, pages 2330-2338, ISSN 1097-0215. *see entire document*	2, 5, 11-17, 23-25 and 37-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2011/000591

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2005244851A1	03 November 2005 (03-11-2005)	None	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/7105*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ｇ０１Ｎ	*33/574*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/574	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
(74)代理人 100136249
弁理士 星野 貴光
(72)発明者 ペトレッカ ケヴィン
カナダ エイチ３イー ２エイ２ ケベック ベルダン オレ デュ ボワ エスト ２３
(72)発明者 ダムハ マサド
カナダ ジェイ３ワイ ８エヌ９ ケベック サン－エルベール ピエール トマ ユルトー ３１６６
(72)発明者 デリーヴィー グレン
カナダ エイチ２エックス ２ジー２ ケベック モントリオール ハッチソン ストリート ３４４５ ＃９０５

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 CA20 DA02 EA02 EA04 FA10 GA13 HA12 HA14
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ53 QS25
4C084 AA13 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28 MA31 MA32 MA35 MA37 MA41 MA52 MA59 MA60 MA63 MA66 MA67 NA14 ZB26
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28 MA31 MA32 MA35 MA37 MA41 MA52 MA59 MA60 MA63 MA66 MA67 NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28 MA31 MA32 MA35 MA37 MA41 MA52 MA59 MA60 MA63 MA66 MA67 NA14 ZB26