(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 8 月 10 日(10.08.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/135311 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/787 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/003623

(22) 国際出願日: 2017 年 2 月 1 日(01.02.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-016951 2016 年 2 月 1 日(01.02.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人千葉大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町１－３３ Chiba (JP).

(72) 発明者: 金田 篤志(KANEDA Atsushi); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻１－８－１ 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内 Chiba (JP). 篠原 憲一(SHINOHARA Ken-ichi); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻１－８－１ 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内 Chiba (JP). 根本 哲宏(NEMOTO Tetsuhiro); 〒2608675 千葉県千葉市中央区亥鼻１－８－１ 国立大学法人千葉大学 大学院薬学研究院内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目６番５号 丸の内北口ビル２１階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: TARGET GENE TRANSCRIPTIONAL REPRESSION INHIBITOR THAT CAN BE DESIGNED IN A SEQUENCE-SPECIFIC MANNER, COMPOSITION CONTAINING SAME, AND USE THEREOF.

(54) 発明の名称 : 配列特異的で設計可能な標的遺伝子の転写抑制阻害剤およびこれを含む組成物並びにその使用

(57) **Abstract**: The present invention provides: a target gene transcriptional repression inhibitor that can be designed in a sequence-specific manner; a composition containing same; and use thereof. More specifically, the present invention provides a composition which is used for inhibiting expressional repression of a gene due to methylation of DNA in vivo, which contains a pyrrole imidazole polyamide or a conjugate of the pyrrole imidazole polyamide and a histone modification enzyme inhibitor, wherein the pyrrole imidazole polyamide or the conjugate of the pyrrole imidazole polyamide and the histone modification enzyme inhibitor is designed to sequence-specifically bind to a minor group of DNA in the promoter region of the gene.

(57) 要約: 本発明は、配列特異的で設計可能な標的遺伝子の転写抑制阻害剤およびこれを含む組成物並びにその使用を提供する。より具体的には、本発明は、生体においてＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制を阻害することに用いるための組成物であって、ピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含み、ピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートは、前記遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合するように設計されたものである、組成物を提供する。

WO 2017/135311 A1

明　細　書

発明の名称 ：

配列特異的で設計可能な標的遺伝子の転写抑制阻害剤およびこれを含む組成物並びにその使用

関連出願の参照

[0001] 本願は、日本国特許出願（特願２０１６－０１６９５１；出願日：２０１６年２月１日）に基づく優先権を主張する出願であり、引用することによりその内容の全てが本願明細書に取り込まれる。

技術分野

[0002] 本発明は、配列特異的で設計可能な標的遺伝子の転写抑制阻害剤およびこれを含む組成物並びにその使用に関する。

背景技術

[0003] ＤＮＡの異常な高メチル化は、特に遺伝子の発現調節部位であるプロモータ領域において生じると、遺伝子の転写抑制を引き起こす。そして、癌抑制遺伝子のプロモータ領域におけるＤＮＡの異常な高メチル化は、大腸癌など多くの癌において発癌の重要な原因となっている。

[0004] 癌の治療戦略として、癌抑制遺伝子の発現を向上させるために、高メチル化された遺伝子領域のメチル化を低下させる手法が採用されている。例えば、５－アザ－２’－デオキシシチジンおよび５－アザシチジンは、ＤＮＡの脱メチル化剤として機能するために投与される抗癌剤としても知られる。しかしながら、これらのＤＮＡの脱メチル化剤は、生体においてはゲノムＤＮＡ全体を非特異的に脱メチル化するため（非特許文献１および２）、それによる副作用は不可避である。

[0005] ピロールイミダゾールポリアミドは、ＤＮＡに配列特異的に結合するように設計可能なＤＮＡ結合分子である（非特許文献３）。ピロールイミダゾールポリアミドとＤＮＡの脱メチル化剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤との融合薬剤を用いて、配列特異的にエピジェネティックな修飾を改変する手

法が様々に報告され始めた（非特許文献４）。また、ピロールイミダゾールポリアミドにより配列特異的にプラスミドＤＮＡのメチル化を阻害する手法が報告されている（非特許文献５）。非特許文献５は、ピロールイミダゾールポリアミドはＤＮＡメチル転移酵素（ＤＮＭＴ）の結合に競合して直接的に阻害すると結論付け、ピロールイミダゾールポリアミドとＤＮＡメチル転移酵素との競合という概念を提示するものである。非特許文献５で検証されたのは、ピロールイミダゾールポリアミドは、これが結合する数塩基長の結合配列内に存在するＣ残基のメチル化を阻害できることのみであり、ＤＮＭＴとの競合をメカニズムとして提唱していることを考慮すると、この配列の周囲のＣ残基への影響はないと推測される。その一方で、遺伝子抑制はプロモータ領域全域にわたる高メチル化に起因するから、非特許文献５によれば、遺伝子の発現抑制に対する影響は無いかごくわずかでしかあり得ず、ピロールイミダゾールポリアミドは単独では生体内で遺伝子の発現抑制の阻害を引き起こすには明らかに適さない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Patai AV et al, PLoS One, 20, 10(8):e0133836, 2015

非特許文献2：Taylor SM et al, Cell, 17(4):771-779, 1979

非特許文献3：White, S et al., Nature, 391, 468, 1998

非特許文献4：Pandian GN et al, Sci. Rep., 24(4), 3843, 2014

非特許文献5：JeenJoo SK et al., JACS, 136, 3687-3694, 2015

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、配列特異的で設計可能な標的遺伝子の転写抑制阻害剤およびこれを含む組成物並びにその使用を提供する。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、ピロールイミダゾールポリアミド（ＰＩＰ）が細胞内にお

いて核内に濃縮されて分布できること、細胞内における標的部位のメチル化を抑制することができること、さらには、標的部位周辺のＤＮＡ領域のメチル化の抑制が可能であることを見出した。発明者らは特に、標的部位周辺のＤＮＡ領域のメチル化の抑制のためにはＰＩＰは４つの単量体単位を有すれば十分であることを見出した。本発明者らはまた、これによりメチル化による遺伝子の転写抑制を阻害することができることを明らかにした。本発明者らはさらに、ＤＮＡの脱メチル化処理と好ましくはヒストンの脱アセチル化阻害処理とをした後に、ピロールイミダゾールポリアミド処理をすることにより、遺伝子の転写抑制を効果的に阻害できることを見出した。本発明者らはさらにまた、ピロールイミダゾールポリアミドにヒストン修飾酵素阻害剤などの化合物をコンジュゲートすることにより、化合物を配列依存的にゲノムＤＮＡにデリバリーできることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいてなされた発明である。

[0009] すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

（１）生体においてＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制を阻害することに用いるための組成物であって、ピロールイミダゾールポリアミドを含み、ピロールイミダゾールポリアミドは、前記遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合するように設計されたものである、組成物。

（２）生体においてＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制を阻害することに用いるための組成物であって、ピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含み、コンジュゲート中のピロールイミダゾールポリアミドは、前記遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合するように設計されたものである、組成物。

（３）ＤＮＡのメチル化が、ＤＮＡの脱メチル化処理後に細胞内で生じるＤＮＡメチル化である、上記（１）または（２）に記載の組成物。

（４）ＤＮＡのメチル化が、ＤＮＡの脱メチル化処理とヒストンの脱アセチ

ル化阻害処理後に細胞内で生じるＤＮＡメチル化である、上記（３）に記載の組成物。

（５）ＤＮＡの脱メチル化処理が、５－アザ－２’－デオキシシチジン（ＡＺＡ）処理により行われる、上記（４）または（４）に記載の組成物。

（６）ヒストンの脱アセチル化阻害処理が、トリコスタチンＡ処理により行われる、上記（４）または（５）に記載の組成物。

（７）遺伝子が、癌抑制遺伝子である、上記（１）～（６）のいずれかに記載の組成物。

（８）遺伝子が、ＭＬＨ１遺伝子である、上記（７）に記載の組成物。

（９）癌の対象において癌を処置するための医薬組成物であって、上記（７）または（８）に記載の組成物を含み、これにより癌抑制遺伝子の転写抑制を阻害することができる、医薬組成物。

（１０）癌が大腸癌、胃癌、胃小窩型胃癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌および直腸結腸癌から選択される癌であり、プロモータ領域のＤＮＡがメチル化された癌抑制遺伝子がＭＬＨ１遺伝子である、上記（９）に記載の医薬組成物。

（１１）ＤＮＡの脱メチル化剤とヒストンの脱アセチル化阻害剤と併用するための、上記（９）または（１０）に記載の医薬組成物。

（１２）ＭＬＨ１遺伝子のメチル化が亢進した対象において、癌の発症を予防することに用いるための、または癌の発症リスクを低減することに用いるための医薬組成物であって、上記（８）に記載の組成物を含む、医薬組成物。

（１３）生体において標的ＤＮＡまたはその近傍におけるＤＮＡメチル化を阻害することに用いるためのＤＮＡメチル化阻害剤であって、ピロールイミダゾールポリアミドを含み、ピロールイミダゾールポリアミドは、標的ＤＮＡに配列特異的に結合するように設計された、ＤＮＡメチル化阻害剤。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、一例としてＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域の－１９～－１３

領域に対して配列特異的に結合するピロールイミダゾールポリアミド（ＰＩＰ１）を設計した図を示す。図中、ＴＳＳは、転写開始部位（転写開始点）を示す。

[図2]図２は、設計されたＰＩＰ１の試験管内での結合特性（図２Ａ）および細胞内での分布（図２Ｂ）を示す。

[図3]図３は、ＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域を含むＤＮＡ領域を組込んだプラスミド（図３Ａ）、該ＤＮＡ領域上でメチル化レベルを確認した部位の相対的位置（図３Ｂ）、およびＰＩＰ１によるＤＮＡのメチル化レベルの抑制（図３Ｃ）を示す。

[図4]図４Ａは、５－アザ－２’－デオキシシチジン（ＡＺＡ）または５－アザ－２’－デオキシシチジンとトリコスタチンＡ（ＡＺＡ＋ＴＳＡ）で処理した細胞におけるＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域のメチル化レベルを示す。図４Ｂは、上記処理によるＭＬＨ１遺伝子の発現量の変化を示す。

[図5]図５は、上記処理後、低酸素条件下で培養した細胞の上記領域のメチル化レベルの変化（図５Ａ）とＭＬＨ１遺伝子の発現量の変化（図５Ｂ）を示す。

[図6]図６は、ＰＩＰ１がメチル化レベルの上昇を阻害できること（図６ＡおよびＢ）、ＭＬＨ１遺伝子の発現抑制を解除できること（図６ＣおよびＤ）、および、ＰＩＰ１の結合部位から離れたプロモータ領域の部位に対してもメチル化抑制の効果を奏すること（図６Ｅ）を示す。

[図7]図７は、４塩基認識型ＰＩＰの模式図を示す。これらはＤＮＡ配列上ではホモダイマーを形成する。

[図8]図８は、Ｉｍ０またはＩｍ３によるゲノムワイドのメチル化解析の結果および転写開始領域±１ｋｂの領域のメチル化解析の結果を示す。

[図9]図９は、ＤＭＳＯ、阻害剤（ＮＣＤ３８）またはＩｍ３－Ｎで処理した細胞における遺伝子発現の変化を示す。

[図10]図１０は、Ｉｍ０－ＮまたはＩｍ３－Ｎ処理後のヒストンのアセチル化をＣｈＩＰシーケンス法により同定した結果を示す。グラフの横軸は、ヒ

ストンアセチル化領域におけるWWWW配列の数（Ｉｍ０－Ｎ処理）またはＷＣＧW配列の数（Ｉｍ３－Ｎ処理）をカウントした結果を示す。グラフの縦軸は、各カウントが生じる割合を示す。

[図11]図１１は、図１０の結果をさらに分析して得られた結果を示す。図１１の円グラフ（左から２つ）は、阻害剤ＮＣＤ３８単独処理によるWWWW配列のカウントで３６以上（ｒｉｃｈ）と１２以下（ｐｏｏｒ）とに分類し、それぞれについてＩｍ０－ＮまたはＩｍ３－Ｎで処理するとｒｉｃｈ部分は確かにＩｍ０－Ｎで活性化され、Ｉｍ３－Ｎではあまり活性化されないことを示す。図１１の円グラフ（右から２つ）は、ＷＣＧW配列のカウントで５以上（ｒｉｃｈ）と３以下（ｐｏｏｒ）とに分類し、それぞれについてＩｍ０－ＮまたはＩｍ３－Ｎで処理するとｒｉｃｈ部分は確かにＩｍ３－Ｎで活性化され、Ｉｍ３－０ではあまり活性化されないことを示す。

発明の具体的な説明

[0011] 本明細書では、「生体」とは、動植物の生きた身体、および生体から分離されたか否かを問わず細胞または細胞集団を意味する。動植物は、例えば、動物であり、例えば、脊椎動物であり、例えば、哺乳動物であり、例えば、霊長類であり、例えばヒトである。

[0012] 本明細書では、「対象」とは、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。本明細書では、癌に罹患した対象を癌の対象ということがある。本明細書では、対象がヒトである場合、対象は患者ということがある。

[0013] 本明細書では、「ＤＮＡのメチル化」とは、ＤＮＡ分子に対するメチル化を意味する。例えば、ＤＮＡのメチル化としては、シトシンのピリミジン環の５位の炭素原子に対するメチル化が知られる。ＤＮＡのメチル化は、ＤＮＡ分子上のＣｐＧジヌクレオチド部位において起こる。ＤＮＡのメチル化は、近傍の遺伝子の発現を低下させることが知られており、ほとんど全ての種類の癌の発達において重要な役割を果たしていることが分かっている。例えば、ＤＮＡの過剰なメチル化が癌抑制遺伝子のプロモータ領域において生じ、癌抑制遺伝子の転写を抑制することにより癌の原因となることが知られて

いる。遺伝子プロモータ領域のメチル化により遺伝子発現が抑制される例としては、例えば、ヒトの大腸癌におけるＣＤＫＮ２Ａ遺伝子の発現抑制、および脳腫瘍におけるＭＧＭＴ遺伝子の発現抑制が挙げられる。

[0014] 本明細書では、「プロモータ」とは、遺伝子の転写調節領域を意味する。プロモータは、転写開始部位を＋１とした場合に、遺伝子の上流側－２００～－１の領域、特に－１００～－１の領域に存在することで知られる。例えば、真核生物では、プロモータにはＴＡＴＡボックスと呼ばれるＴＡＴＡ配列が－２５領域から上流側に存在する。また、－１００～－６０の領域にはＣＡＡＴボックス、－６０～－４０の領域にはＧＣボックスが存在する。これらの配列は、遺伝子の転写調節に関係することでよく知られている。本明細書では、上記のように、プロモータ領域中でのＤＮＡの位置を表すために数字を用い、転写開始点（部位）を＋１とし、上流に１塩基移動する毎に数字を－１し、下流に１塩基移動する毎に＋１する方式で転写開始部位からの相対的位置により特定のＤＮＡの箇所を数字で特定する。

[0015] 本明細書では、「遺伝子の発現」とは、ＤＮＡからのＲＮＡへの転写を意味する。ＲＮＡとしてはメッセンジャーＲＮＡ（以下、「ｍＲＮＡ」という）が挙げられ、遺伝子の発現を低下させるとは、ｍＲＮＡへの転写量を低下させるということを意味する。

[0016] 本明細書では、「ピロールイミダゾールポリアミド」とは、Ｎ－メチルピロール単位（以下、「Ｐｙ」と略す）とＮ－メチルイミダゾール単位（以下、「Ｉｍ」と略す）とが連結してなる直鎖状の分子であり、分子内のＰｙ単位および／またはＩｍ単位との間にリンカー（例えば、γアミノ酪酸）が介在し、これにより分子がヘアピン構造を取る、高分子を言う。本明細書では、特に言及の無い限り、ピロールイミダゾールポリアミドは、ヒストン脱アセチル化阻害剤などのヒストンタンパク質の修飾やＤＮＡメチル化阻害剤などのＤＮＡ修飾に対する薬剤（促進剤および阻害剤）と融合した形態ではない。

[0017] ピロールイミダゾールポリアミドは、ＤＮＡのマイナーグルーブに入り込

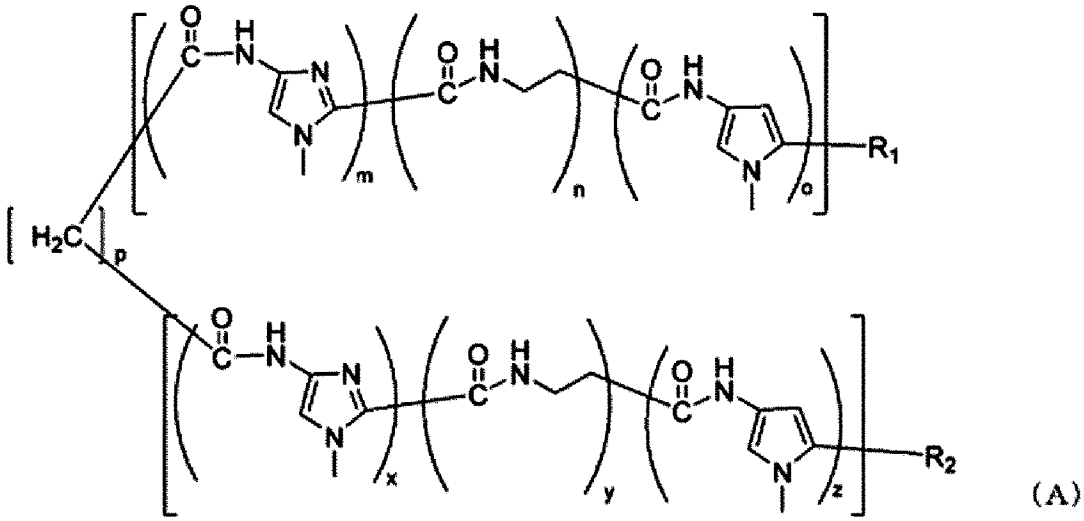
むことができ、そこで、Ｇ－Ｃ塩基対に対してＩｍ／Ｐｙが結合し、Ｃ－Ｇ塩基対に対しては、Ｐｙ／Ｉｍが結合し、Ａ－Ｔ塩基対またはＴ－Ａ塩基対に対してはＰｙ／Ｐｙが結合することが知られており、特にＧとＰｙとの相互作用が強く、これによりピロールイミダゾールポリアミドは、ＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合する。Ｉｍ単位は、例えば、β－アラニン単位に変更することが可能である。β－アラニン単位は、Ｐｙ単位またはＩｍ単位の３～４単位につき１単位含ませることができる。

[0018] 従って、上記の関係性が技術的に確立していることから、標的ＤＮＡに対して配列特異的に結合するピロールイミダゾールポリアミドは、標的ＤＮＡの配列を元に当業者であれば容易に設計することができる。

[0019] なお、Ｐｙ／Ｉｍと表記する場合には、ＰｙとＩｍは分子中でのＰｙ単位およびＩｍ単位の並び順においては離れた位置に存在するにも関わらず、分子が折れ曲がることによりヘアピン構造を取る場合には近接して位置することを意味する。

[0020] ピロールイミダゾールポリアミドは、一般式（Ａ）により表される：

[化1]



(A)

{式中、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｘ、ｙ、およびｚは、それぞれ独立して自然数であり、R_1およびR_2は、それぞれ独立して保護基である。}

[0021] 上記一般式（Ａ）を慣例に従って簡略化して記載すれば、R_2－［（Ｐｙ）

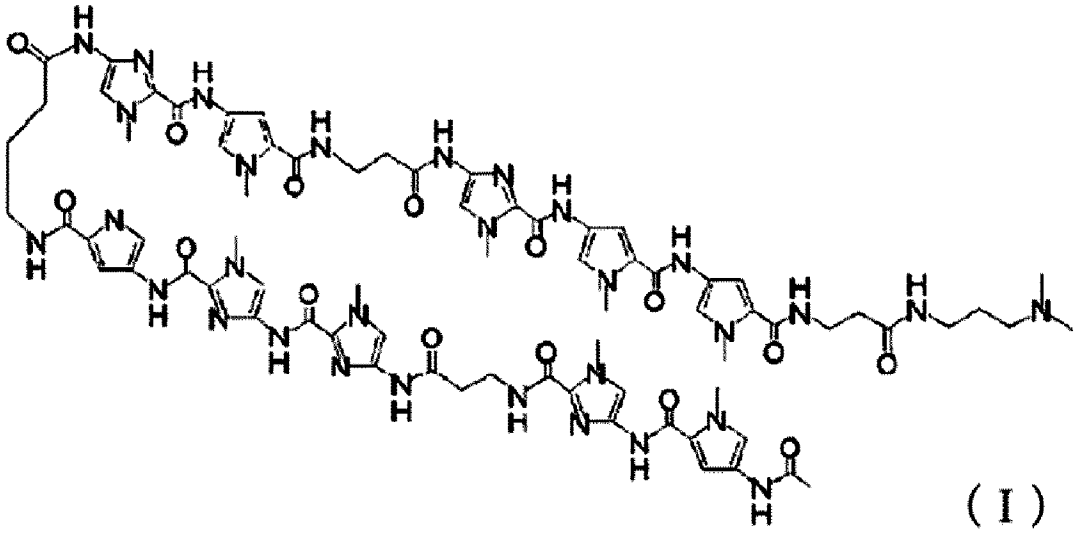
$_{z}$－β$_{y}$－（Ｉｍ）$_{x}$］－（ＣＨ$_{2}$）$_{p}$－（Ｉｍ）$_{m}$－β$_{n}$－（Ｐｙ）$_{o}$］－Ｒ$_{1}$｛式中、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｘ、ｙ、およびｚは、それぞれ独立して自然数であり、Ｒ$_{1}$およびＲ$_{2}$は、それぞれ独立して保護基である。｝

となる。

[0022] 上記一般式（Ａ）においては、各単位は図中では便宜的に同種の単位をひとまとまりに記載しているが、実際には、Ｐｙ単位とＩｍ単位とβ－アラニン単位は、上述のルールに従って結合対象となるＤＮＡの配列に対応する並び順で並べ替えられる。一般式（Ａ）ににおいて、Ｒ$_{1}$基は、例えば、－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｎ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$とすることができる。Ｒ$_{2}$基は、例えば、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ$_{3}$とすることができる。一般式（Ａ）において、ｐは、２～４の自然数、例えば３とすることができ、ｍ＋ｎ＋ｏおよびｘ＋ｙ＋ｚは、結合対象となるＤＮＡの長さに対応させて５～２０、７～１５、または７～１０とすることができる。

[0023] 式（Ｉ）の化合物は、ピロールイミダゾールポリアミドの例であるが、Ｐｙ単位とＩｍ単位とが－ＣＯ－ＮＨ－により連結してなる分子であり、分子内のＰｙ単位とＩｍ単位との間にリンカーとしてγ－アミノ酪酸が介在し、リンカー部分で分子が折れ曲がって分子全体がヘアピン構造を取っている。ピロールイミダゾールポリアミドは、ＤＮＡのマイナーグルーブではヘアピン構造を取り、ＤＮＡの塩基とＰｙ単位またはＩｍ単位とで相互作用して結合を安定化させる。この式（Ｉ）の化合物は、ＭＬＨ１遺伝子の転写開始部位から－１９～－１３の７塩基長の領域に配列特異的に結合できる。

[化2]



（Ｉ）

[0024] なお、上記式（Ｉ）の化合物は、下記に示されるようにＰｙ単位とＩｍ単位の配列順序がＤＮＡとの配列特異的結合において技術的意義を有するので、慣例に従い、以下のように略して表記されることがある。以下の表記では直線上に配列が記載されているが、ＤＮＡとの結合は「γ」部分でヘアピン構造を形成して行われる。本明細書では、この配列を一次構造ということがある。

[化3]

Ac-Py-Im-β-Im-Im-Py-γ-Im-Py-β-Im-Py-Py-β-Dp

{式中、Ａｃはアセチル基を表し、βはβ－アラニンを表し、γはγ－アミノ酪酸を表し、Ｄｐはジアミノプロパンを表す。}

[0025] 本明細書では、「配列特異的」とは、ピロールイミダゾールポリアミドとＤＮＡとが配列依存的に結合することから、標的配列に対して設計通りに結合する、または標的配列に対して他の配列よりもより強く結合するという意味で用いられる。ピロールイミダゾールポリアミドとＤＮＡとの相互作用の配列特異性を高めるためには、標的ＤＮＡ配列を長くすることが好ましく、例えば、４塩基以上、５塩基対以上、６塩基対以上、７塩基対以上、８塩基対以上、９塩基対以上、１０塩基対以上、またはそれ以上とすることができ

る。

[0026] 本明細書では、「脱メチル化処理」とは、シトシンのピリミジン環の５位の炭素原子に対するメチル化を外す処理を意味する。

[0027] 本明細書では、「脱アセチル化阻害処理」とは、ヒストンに対する脱アセチル化を阻害する処理を意味する。例えば、脱アセチル化処理は、ヒストン脱アセチル化酵素（ＨＤＡＣ）を阻害することにより行われる。

[0028] 本明細書では、「処置」とは、治療および予防の両方を含む意味で用いられる。

[0029] 本発明者らは、プロモータ領域上のわずか４塩基対（例えば、７塩基対）を標的配列としたピロールイミダゾールポリアミドにより、該プロモータ上のＤＮＡのメチル化が、標的部位周辺において広く抑制されること、並びにこれにより該プロモータにより駆動される遺伝子の転写抑制が解除されることを見出した。このためには、特別なＤＮＡメチル化阻害剤は必要ない。これは、生体内においてピロールイミダゾールポリアミドがプロモータ領域に結合することにより、ＤＮＡのコンフォメーションが広く変化し、ＤＮＡのメチル化反応や転写反応に広く影響を与えると考えられる。

[0030] 従って、本発明では、生体においてＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制を阻害することに用いるための組成物（または、遺伝子の転写抑制阻害剤）であって、ピロールイミダゾールポリアミドを含み、ピロールイミダゾールポリアミドは、前記遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合するように設計されたものである、組成物が提供される。ある態様では、前記組成物は、ピロールイミダゾールポリアミド以外のＤＮＡのメチル化阻害剤を含まない。

[0031] ピロールイミダゾールポリアミドとしては、Ｎ－メチルピロール単位（以下、Ｐｙという）とＮ－メチルイミダゾール単位（以下、Ｉｍという）とがアミド結合を介して連結し、かつ、Ｐｙ単位および／またはＩｍ単位との間に１つのリンカー１および１つ以上のリンカー２を含み、ＤＮＡのマイナーグルーブ内でリンカー１の部位において折りたたまれたヘアピン構造をとり

、ＤＮＡのＧ－Ｃ塩基対に対してＩｍ／Ｐｙが結合し、Ｃ－Ｇ塩基対に対してＰｙ／Ｉｍが結合し、Ａ－Ｔ塩基対またはＴ－Ａ塩基対に対してはＰｙ／Ｐｙが結合し、Ｐｙはβ－アラニンで置き換えられてもよく、リンカー１は、γ－アミノ酪酸である、ピロールイミダゾールポリアミドを用いることができる。前記のβ－アラニンによるＰｙの置き換えは、構成単位３～４つに１つの割合で行うことができる。結合させたい標的ＤＮＡ配列が分かれば、配列特異的に該標的ＤＮＡに結合するピロールイミダゾールポリアミドを設計できることは、上述の通りである。ピロールイミダゾールポリアミドの化学構造から明らかであるように、この分子は、当業者に周知のＢｏｃ法またはＦｍｏｃ法により固相合成することが可能であり、市販の自動合成機等を用いて合成できることが知られている。

[0032] 本発明者らは、メチル化が促進される環境化でピロールイミダゾールポリアミドにより好適にＤＮＡのメチル化が阻害されることを見出した。本発明者らはまた、ＤＮＡの脱メチル化処理後、およびＤＮＡの脱メチル化処理とヒストンの脱メチル化処理後に、例えば、低酸素条件下で培養すると、細胞は自前のＤＮＡメチル転移酵素の働きによりＤＮＡのメチル化を亢進させるが（例えば、Lu, Y. et al., Cell Reports, 8:501-513, 2014参照）、この際にピロールイミダゾールポリアミドにより好適にＤＮＡのメチル化が阻害されることを見出した。従って、本発明の組成物は、ＤＮＡの脱メチル化処理後またはＤＮＡの脱メチル化処理とヒストンの脱メチル化処理後に用いるためのものであり得る。本発明の組成物はまた、例えば、低酸素条件下で誘導されるＤＮＡメチル化を阻害することに用いることができ、例えば、ＤＮＡの脱メチル化処理後またはＤＮＡの脱メチル化処理とヒストンの脱メチル化処理後に低酸素条件下で誘導されるＤＮＡメチル化を阻害することに用いることができる。低酸素以外にも生体内でＤＮＡメチル化が促進される環境として、ピロリ菌感染などが原因で起きる慢性炎症が知られる（例えば、Matsusaka, K. et al., World J. Gastroenterol., 20 (14): 3916-3926, 2014参照）。またＥｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス感染など一部の病原体の感

染はＤＮＡメチル化を促進する（例えば、上記Matsusaka, K. et al., 2014参照）。そしてＤＮＡメチル基転移酵素（ＤＮＭＴ）の発現上昇や、ＩＤＨ遺伝子変異、ＴＥＴ２酵素の活性低下など、生体細胞自身の異常によってもＤＮＡメチル化は促進しうる（例えば、Figueroa, ME. et al., Cancer Cell, 18: 553-567, 2010およびTurcan S., Nature, 483:479-483参照）。

[0033] また、特にＤＮＡの脱メチル化処理とヒストンの脱メチル化処理後には、その後のプロモータ領域のＤＮＡのメチル化による遺伝子の転写抑制を少なくとも部分的に解除し、転写を維持できることも見出した。従って、本発明の組成物は、ＤＮＡの脱メチル化処理とヒストンの脱アセチル化阻害処理後に用いるためのものであり得る。

[0034] ＤＮＡのメチル化処理は、例えば、ＤＮＡのメチル化阻害剤を用いて行うことができる。ＤＮＡのメチル化阻害剤としては、ＤＮＡメチル化転移酵素阻害剤が挙げられる。本発明では、ＤＮＡのメチル化阻害剤として、ＤＮＡのメチル化を阻害できる限り特に限定されないが、例えば、５－アザ－２’－デオキシシチジンおよび５－アザシチジンなどの抗癌剤が挙げられ、本発明で用いることができる。

[0035] ヒストンの脱アセチル化阻害処理は、例えば、ＨＤＡＣ阻害剤を用いて行うことができる。ＨＤＡＣ阻害剤としては、特に限定されないが例えば、トリコスタチンＡ、ｎ－酪酸、アピシジンボリノスタット（ＳＡＨＡ）、およびバルプロ酸が挙げられ、本発明で用いることができる。

[0036] 本発明において、ＤＮＡのメチル化による発現抑制を阻害する遺伝子（標的遺伝子）は、例えば、プロモータ領域のＤＮＡがメチル化された遺伝子である。プロモータ領域のＤＮＡがメチル化された遺伝子としては、例えば、プロモータ領域のＤＮＡがメチル化された癌抑制遺伝子が挙げられ、このような遺伝子は当業者に周知である。プロモータ領域のＤＮＡがメチル化された遺伝子または癌抑制遺伝子としては、例えば、ＭＬＨ遺伝子、ＢＲＣＡ１遺伝子、エストロゲン受容体遺伝子、ＣＤＫＮ２Ａ遺伝子、ＭＧＭＴ遺伝子、ＣＤＨ１遺伝子、ＲＵＮＸ３遺伝子、ＲＡＳＳＦ１Ａ遺伝子、およびＳＦ

ＲＰ１遺伝子が挙げられる。

[0037] ピロールイミダゾールポリアミドは、これらの標的遺伝子のプロモータ領域（例えば、±１ｋｂの領域、－２００～－１の領域、好ましくは－１００～－１の領域）の一部のＤＮＡに配列特異的に結合するように設計することができる。例えば、ＭＬＨ１遺伝子の－２００～－１の領域、好ましくは－１００～－１の領域、より好ましくは、－５０～－１の領域の一部（上述のように５塩基以上の長さの領域）に対して配列特異的に結合するように設計することができる。

[0038] ＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域のメチル化を阻害するピロールイミダゾールポリアミドとしては、ＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域に配列特異的に結合できるピロールイミダゾールポリアミド、例えば、式（Ｉ）で表される化合物を用いることができる。ＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域のメチル化を阻害するピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートには、上記ピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを用いることができる。

[0039] 本発明のある側面では、ピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートが提供される。コンジュゲート中のピロールイミダゾールポリアミドは、前述の通り、標的ＤＮＡ配列の長さは、例えば、４塩基以上、５塩基対以上、６塩基対以上、７塩基対以上、８塩基対以上、９塩基対以上、１０塩基対以上、またはそれ以上とすることができる。コンジュゲート中のピロールイミダゾールポリアミドの標的ＤＮＡ配列の長さは、７塩基対以下、６塩基対以下、５塩基対以下、または４塩基対とすることができる。本発明のある態様では、ヒストン修飾酵素阻害剤は、ヒストンメチル化酵素に対する阻害剤、ヒストンアセチル転移酵素活性化剤（ＨＡＴ活性化剤）またはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（ＨＤＡＣ阻害剤）であり得る。本発明のある特定の態様では、ヒストン修飾酵素阻害剤は、リジン特異的脱メチル化酵素であるＬＳＤ１に対する阻害剤である。ＬＳＤ１に対する阻害剤としては、ＮＣＤ３８、ＧＳＫ－ＬＳＤ１が挙げられ、本発明で

用いることができる。本発明のある特定の態様では、ＨＤＡＣ阻害剤としては、トリコスタチンＡ（ＴＳＡ）、酪酸、アピシジン、バルプロ酸、ＬＢＨ５８９およびスベロイルアニリドヒドロキサム酸（ＳＡＨＡ）が挙げられる。本発明のある特定の態様では、ＨＡＴ活性化剤は、Ｎ－（４－クロロ－３－トリフルオロメチルフェニル）－２－エトキシ－６－ペンタデシルベンズアミド（ＣＴＢＰ）またはその誘導体、例えば、Ｎ－（４－クロロ－３－トリフルオロメチルフェニル）－２－エトキシ－ベンズアミド（ＣＴＢ）が挙げられる。

[0040] 本発明のある側面では、ピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含む、ＤＮＡのメチル化を低下させるための組成物が提供される。本発明のある側面では、標的遺伝子のプロモータ領域（例えば、±１ｋｂの領域、－２００～－１の領域、好ましくは－１００～－１の領域）の一部のＤＮＡに配列特異的に結合するように設計されたピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含む、前記標的遺伝子の発現レベルを向上させることに用いるための組成物が提供される。

[0041] 本発明の別の側面では、癌の対象において癌を処置するための医薬組成物が提供される。プロモータ領域のＤＮＡがメチル化された癌抑制遺伝子は、その転写が抑制されているため、癌抑制遺伝子の遺伝子産物の産生量が低下しており、癌の原因となる。従って、本発明の癌患者において癌を処置するための医薬組成物は、プロモータ領域のＤＮＡがメチル化された癌抑制遺伝子のプロモータ領域に配列特異的に結合するピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含む。本発明の医薬組成物は、該癌抑制遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのメチル化を阻害し、これにより癌抑制遺伝子の転写抑制を抑制することができ、癌を処置することが可能となる。

[0042] 癌抑制遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡがメチル化されていることがほぼ全ての癌において知られ、その原因となる。また、例えば、ＭＬＨ１遺伝子

においては、大腸癌（結腸直腸癌）、胃癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌、肺癌、膵癌、肝癌、胆管癌、血液腫瘍、乳癌、子宮体癌、卵巣癌、脳腫瘍、および軟部肉腫では、癌抑制遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡがメチル化されていることが原因の一つとなっている。従って、本発明の医薬組成物は、大腸癌（結腸直腸癌）、胃癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌、肺癌、膵癌、肝癌、胆管癌、血液腫瘍、乳癌、子宮体癌、卵巣癌、脳腫瘍、および軟部肉腫を処置することに用いることができる。また、これらの癌ではＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡがメチル化されていることが原因として知られる。従って、本発明の医薬組成物においてピロールイミダゾールポリアミドの標的遺伝子は、ＭＬＨ１遺伝子であり得る。

[0043] 癌患者においては、上記癌抑制遺伝子のプロモータ領域では、ＤＮＡメチル化が亢進しており、癌の発症または進行と共にＤＮＡメチル化の程度が高まることが知られている。そして、本発明者らによれば、ピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートは、ＤＮＡの脱メチル化処理後、またはＤＮＡの脱メチル化処理とヒストンの脱アセチル化阻害処理後に、特にＤＮＡのメチル化の進行を抑制できた。従って、本発明の医薬組成物は、ＤＮＡの脱メチル化剤またはＤＮＡの脱メチル化剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の組合せ（以下、「併用剤」ということがある）と併用することができる。あるいは、本発明の医薬組成物は、ＤＮＡの脱メチル化剤またはＤＮＡの脱メチル化剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の組合せによる治療を受けた対象を投与対象とし得る。

[0044] 本発明の医薬組成物と併用するＤＮＡの脱メチル化剤としては、特に限定されないが例えば、アザシチジンおよびデシタビンなどの抗癌剤を用いることができる。本発明の医薬組成物と併用するヒストン脱アセチル化阻害剤としては、トリコスタチンＡ、ｎ－酪酸、アピシジンおよびバルプロ酸などを用いることができる。

[0045] 本発明の医薬組成物と、ＤＮＡの脱メチル化剤またはＤＮＡの脱メチル化

剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の組合せとの投与の順番は、特に限定されないが例えば、ＤＮＡの脱メチル化剤またはＤＮＡの脱メチル化剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の組合せを投与した後に、本発明の医薬組成物を投与することができる。

[0046] また、本発明の医薬組成物は、ＤＮＡの脱メチル化剤またはＤＮＡの脱メチル化剤とヒストン脱アセチル化阻害剤による抗癌剤治療を受けている患者に対して投与することができる。本発明の医薬組成物は、ＤＮＡのメチル化を抑制することができるので、このようにすることで、ＤＮＡの脱メチル化剤またはＤＮＡの脱メチル化剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の投与量や投与間隔を低減させることが可能であり、これら薬剤により引き起こされることで知られる生体毒性を緩和することができる。従って、例えば、本発明の医薬組成物は、癌患者に対して、併用剤を投与し、その後、本発明の医薬組成物を投与するサイクルを複数回行う投与計画により投与することができる。

[0047] 本発明によれば、ＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡに配列特異的に結合するピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを用いると、ＭＬＨ１遺伝子の転写抑制を解除する、またはＭＬＨ１遺伝子の遺伝子発現を少なくとも部分的に維持することができる。従って、本発明では、ＭＬＨ１遺伝子のメチル化が亢進した対象において、癌の発症を予防することに用いるための、または癌の発症リスクを低減することに用いるための医薬組成物であって、ＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡに配列特異的に結合するピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含む、医薬組成物が提供される。この医薬組成物も、上記併用剤と併用することができる。

[0048] ＭＬＨ１遺伝子のメチル化が亢進した対象としては、大腸鋸歯状腺腫が挙げられる。大腸鋸歯状腺腫の対象は、放置しておくとＭＬＨ１遺伝子のメチル化が亢進することにより、ＭＬＨ１遺伝子の転写抑制が生じ、これにより

大腸癌を発症する。従って、このような対象に本発明の医薬組成物を投与することにより、大腸癌の発症を予防する、または大腸癌の発症リスクを低減することができる。

[0049] 本発明によれば、生体においてＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制を阻害する方法であって、

生体にピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを接触させる、または生体にピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを投与することを含み、

前記ピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートは、前記遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合するように設計されたものである、方法が提供される。この方法は、生体にＤＮＡ脱メチル化剤を接触させる、または生体にＤＮＡ脱メチル化剤を投与することをさらに含んでいてもよいし、あるいは、生体にＤＮＡ脱メチル化剤を接触させる、または生体にＤＮＡ脱メチル化剤を投与することと、生体にＨＤＡＣ阻害剤を接触させる、または生体にＨＤＡＣ阻害剤を投与することとをさらに含んでいてもよい。

[0050] 本発明の方法によれば、癌の対象において癌を処置する方法であって、

本発明の医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法

が提供される。

[0051] 本発明によれば、ＭＬＨ１遺伝子のメチル化が亢進した対象において、癌の発症を予防する方法、または癌の発症リスクを低減する方法であって、本発明の医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法

が提供される。

[0052] 本発明によれば、本発明の医薬組成物を製造するための、癌抑制遺伝子のプロモータ領域に結合するように設計されたピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコ

ンジュゲートの使用が提供される。

[0053] 本発明の組成物または医薬組成物は、標的遺伝子のプロモータ領域の１部位に配列特異的に結合するピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含んでいてもよく、異なる複数部位にそれぞれ配列特異的に結合する複数の異なるピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含んでいてもよい。本発明の組成物または医薬組成物は、ピロールイミダゾールポリアミドとしてＤＮＡメチル化阻害剤またはＨＤＡＣ阻害剤などのヒストン修飾酵素阻害剤とリンカーを介して連結したコンジュゲートを含んでいてもよい。

[0054] 本発明の医薬組成物は、賦形剤を含んでいてもよい。本発明の医薬組成物は、例えば、局所投与（例えば、腫瘍内投与）、静脈投与、および経皮投与により投与することができる。賦形剤は、当業者であれば適宜選択することができ、本発明の医薬組成物は、適宜製剤化することができる。

[0055] 以下、実施例に基づいて発明を説明するが、本発明は以下の具体的内容により限定されるものではない。本発明は特許請求の範囲により特定される発明である。

実施例

[0056] 実施例１：ＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域に対するピロールイミダゾールポリアミドの設計と調製

ＭＬＨ１遺伝子は、遺伝子プロモータ領域のＣｐＧアイランドがメチル化を受け、これによりＭＬＨ１遺伝子の転写が不活性化することが知られる癌抑制遺伝子である。本実施例では、ＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域に対するピロールイミダゾールポリアミドを設計して調製した。

[0057] ピロールイミダゾールポリアミドは、Ｎ－メチルピロール単位（Ｐｙと表記する）とＮ－メチルイミダゾール単位（Ｉｍと表記する）が重合した高分子化合物であり、通常はγ－アミノ酪酸単位（γと表記する）の部位で折りたたまれてＵ字型のコンフォメーションを取ってＤＮＡのマイナーグルーブ

に結合する。ＩｍがＧ塩基と強く結合し、ＰｙがＣ塩基、Ａ塩基およびＴ塩基と結合することから、ＰｙとＩｍとをＤＮＡ配列に対応するように適切に並べると、標的ＤＮＡの配列に特異的に結合するピロールイミダゾールポリアミドを設計することができる。Ｐｙはβアラニンと置換可能であり、βアラニンを適宜（例えば、３、４塩基対毎に）導入することでＤＮＡのピッチとピロールイミダゾールポリアミドのピッチとを合わせることができる。

[0058] 今回は、ＭＬＨ１遺伝子の－１９～－１３の７塩基に対して特異的なピロールイミダゾールポリアミドを合成した（図１および式（Ｉ）の化合物参照）（以下、このピロールイミダゾールポリアミドをＰＩＰ１という）。ここで上記数字は転写開始部位を＋１として上流に１塩基移動すると－１される方式により示される遺伝子上の位置を示す（以下同様）。

[0059] ピロールイミダゾールポリアミドは、Ｂｏｃ法やＦｍｏｃ法などの固相合成法により容易に合成することが可能であり、市販の自動合成機等を用いても合成することができる。本実施例では、ＰＩＰ１は、設計したピロールイミダゾールポリアミドを提示してHipep Laboratories (Kyoto, Japan)に合成させて得た。陰性対照として、ＭＬＨ１遺伝子上には結合部位を有しないＰＩＰ２（図１および式（ＩＩ）の化合物参照）を用いた。ピロールイミダゾールポリアミドは、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）中で２０ｍＭの濃度で保管した。

[化4]

PIP2: Ac-Im-Py-β-Im-Py-Py-γ-Im-Py-Py-β-Im-Py-β-Dp （ＩＩ）

{式中の記号は上で定義した通り。}

[0060] ゲルシフトアッセイにより、ＰＩＰ１が標的配列に結合することを確認した。ＭＬＨ１遺伝子の－２２～－８領域を含む１５塩基対のＦＡＭ標識二本鎖オリゴＤＮＡ（配列番号２および３をアニーリングして得た二本鎖オリゴＤＮＡ）を作製し（図２Ａ下部）、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）および１０％ＤＭＳＯを含む１０μＬの反応溶液に溶かしたＰＩＰ１またはＰＩＰ２と１μＭの二本鎖オリゴＤＮＡを表示した最終濃度となるよう

に混合して３７℃で１時間インキュベートした。得られた反応物を２０％ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ゲル上の二本鎖ＤＮＡをLAS-3000 (Fujifilm, Japan)を用いて可視化した。

[0061] 結果は、図２Ａに示される通りであった。ＰＩＰ１を添加した場合にのみ二本鎖ＤＮＡのバンドが上方にシフトし、これにより、ＰＩＰ１が標的の二本鎖ＤＮＡに結合したことが確認できた。

[0062] 実施例２：ＰＩＰ１の細胞内局在

本実施例では、ＰＩＰ１の細胞内局在を確認した。本実施例では、大腸癌細胞株ＲＫＯ内での細胞内局在を確認した。

[0063] １．０×１０^{5}細胞のＲＫＯ細胞を３５ｍｍディッシュに播種し、２ｍＬの培地（10% ウシ胎児血清, 100 単位/mL ペニシリン, および 100 μg/mL ストレプトマイシンを付加したEagle's MEM培地）中で培養した。２４時間後、細胞をＦＡＭ標識した１μＭのＰＩＰ１（ＦＡＭ－β－Ｐｙ－Ｉｍ－β－Ｉｍ－Ｉｍ－Ｐｙ－γ－Ｉｍ－Ｐｙ－β－Ｉｍ－Ｐｙ－Ｐｙ－β－Ｄｐ）と混合して２４時間インキュベートし、１０％ホルムアルデヒド中で氷上で２時間固定した。固定された細胞をＰＢＳで洗浄し、１μｇ／ｍＬの4', 6－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）で核染色して、その後、蛍光顕微鏡BZ-X710 (KEYENCE, Osaka, Japan)を用いて観察した。

[0064] 結果は、図２Ｂに示される通りであった。図２Ｂに示されるように、ＰＩＰ１の局在が核と完全に一致した。このことからＰＩＰ１は、培地中から細胞膜を透過して細胞内に侵入する上に、核内に濃縮されて分布することが明らかとなった。

[0065] 実施例３：ＰＩＰ１とＤＮＡのメチル化

本実施例では、ＭＬＨ１遺伝子のメチル化に対するＰＩＰ１の影響を調べた。

[0066] ＲＫＯ細胞のゲノムＤＮＡからＭＬＨ１の－７８０～＋４８３領域（配列番号１）をＰＣＲ法により配列番号６および７のプライマーを用いて増幅してＤＮＡ断片を得て、pGEM-T Easy vector (Promega, Fitchburg, USA)に製

造者マニュアルに従って組込んだ（図３Ａ参照）。得られたプラスミド１μｇを各種濃度のＰＩＰ１かあるいは４０μＭのＰＩＰ２と１×ＮＥＢ緩衝液２(New England Biolabs, Ipswich, USA)中で２５℃で１２時間インキュベートしてピロールイミダゾールポリアミドをＤＮＡに結合させた。陰性対照としてＤＭＳＯをプラスミドに添加してインキュベートした。

[0067] Ｓ－アデノシルメチオニン(New England Biolabs)３２０μｇとＣｐＧメチル転移酵素Ｍ．ＳｓｓＩ(New England Biolabs)４ユニットをサンプルに添加して５％ＤＭＳＯを添加して２０μＬとした。３７℃で２時間インキュベートした後に、６５℃で２０分インキュベートして反応を停止させた。ＤＮＡをエタノール沈殿により精製して１００μＬの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣＩ（ｐＨ８．０）に溶解した。その後、パイロシーケンス法によりＭＬＨ１遺伝子の様々な箇所におけるＤＮＡのメチル化の程度を調べた。用いたプライマーは以下の表の通りであった。

[0068] [表1]

プライマー名および配列	配列番号
-27～-1領域の増幅用フォワードプライマー: 5′- GGTATTTTTGTTTTTATTGGTTGGATATT-3′	配列番号８
-27～-1領域の増幅用リバースプライマー: 5′-[B]AATACCAATCAAATTTCTCAACTCTAT-3′	配列番号９
-27～+1領域のシークエンス用プライマー: 5′- GTAAGAGTATATTTTTTTAGGT-3′	配列番号１０
-70～-63領域の増幅用フォワードプライマー: 5′- GGTATTTTTGTTTTTATTGGTTGGATATT-3′	配列番号１１
-70～-63領域の増幅用リバースプライマー: 5′-[B]AATACCAATCAAATTTCTCAACTCTAT-3′	配列番号１２
-70～-63領域のシーケンス用プライマー: 5′-TTTTAAAAAAGAATTAATAGGAAGA-3′	配列番号１３
+157～+172領域の増幅用フォワードプライマー: 5′-AGGTGATTGGTTGAAGGTATTT-3′	配列番号１４
+157～+172領域の増幅用リバースプライマー: 5′-[B]CCAATTCTCAATCATCTCTTTAATAACAT-3′	配列番号１５
+157～+172領域のシーケンス用プライマー: 5′-GATTGGTTGAAGGTATTTT-3′	配列番号１６

※表中「Ｂ」はビオチン化修飾を示す。

[0069] 結果は、図３Ｃに示される通りであった。図３Ｃに示されるように、ＰＩＰ１は、ＭＬＨ１遺伝子の－２７～－１の領域において濃度依存的にＤＮＡのメチル化を阻害した。

[0070] 実施例４：ＲＫＯ細胞内のＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域のメチル化に対するＰＩＰ１の影響

本実施例では、細胞を用いてＰＩＰ１のメチル化抑制効果を調べた。

[0071] ＲＫＯ細胞を６ｃｍディッシュに１．０×10^5細胞播種して、翌日から７日間にわたり５．０μＭの５－アザ－２’－デオキシシチジン（ＡＺＡ）を含む培地で処理した。培地は２４時間毎に新鮮な培地に交換した。７日目に１０ｎＭのトリコスタチンＡ（ＴＳＡ）を含む培地で処理し、８日目に細胞を回収した。

[0072] 実施例３と同様にパイロシーケンス法によりＭＬＨ１遺伝子のプロモータ領域－２７～－１のメチル化の程度を確認した。結果は図４Ａに示される通りであった。図４に示されるように、ＡＺＡのみで処理した場合も、ＡＺＡに加えてＴＳＡで処理した場合もメチル化の程度はこの領域で低下した。次に、ＭＬＨ１遺伝子のｍＲＮＡの発現をＲＴ－ＰＣＲ（プライマー配列は、配列番号２および３）により確認するとＡＺＡ処理とＡＺＡおよびＴＳＡ処理の場合に発現が回復した（図４Ｂ参照）。対照としてはＧＡＰＤＨの発現をＲＴ-ＰＣＲ（プライマー配列は、配列番号４および５）により確認した。

[0073] ８日目の細胞を１％O_2および５％CO_2の低酸素条件下で培養した。５μＭのＰＩＰ１またはＰＩＰ２を含む０．１％ＤＭＳＯで細胞を処理して、０日目（Ｒ０）、２０日目（Ｒ２０）および３０日目（Ｒ３０）に細胞を回収してＭＬＨ１遺伝子の－２７～－１領域のメチル化の程度をパイロシーケンス法により調べた。ＰＩＰによる処理中は、ＰＩＰ１またはＰＩＰ２を含む培地は、５日おきに交換し、細胞はコンフルエントになったときに継代した。

[0074] 結果は、図５および６に示される通りであった。図５に示されるように、ＰＩＰ処理をしない場合には、メチル化レベルは時間と共に回復すること、

およびＭＬＨ１遺伝子の発現も時間と共に低下することが分かる。また、図６ＡおよびＢに示されるように、ＰＩＰ未処理群では、Ｒ２０およびＲ３０において全体的にＤＮＡのメチル化の程度が向上したが、これに対してＰＩＰ１処理した細胞では、メチル化の程度の上昇は抑制された。また、図６ＣおよびＤに示されるように、ＡＺＡ＋ＴＳＡ処理した細胞では、ＰＩＰ１処理により、メチル化と共に低下するＭＬＨ１遺伝子のｍＲＮＡの発現が維持された。さらに、ＭＬＨ１遺伝子の－７０～＋１７１の領域におけるメチル化の程度を確認したところ、図６Ｅに示されるように、ＰＩＰ１の標的部位からかなり離れた部位である－７０領域、－６３領域、＋１５６領域、および＋１７１領域においてＰＩＰ１によるメチル化の抑制が確認された。

[0075] このように、ＰＩＰ１は、細胞内において核内に濃縮されて分布できること、細胞内における標的部位のメチル化を抑制することができること、さらには、意外にも標的部位周辺のＤＮＡ領域のメチル化の抑制が可能であることが明らかとなった。また、これによりメチル化による遺伝子の転写抑制を解除することができることが明らかになった。癌抑制遺伝子の転写抑制を解除することにより癌の処置にＰＩＰを用いることができると考えられる。

[0076] また、ＡＺＡやＴＳＡは、生体への毒性が高く、治療におけるこれらの薬剤への依存度は高めることができない。本発明によれば、ＡＺＡおよび／またはＴＳＡ処理後にＰＩＰを投与することにより、ＡＺＡやＴＳＡ処理の効果を持続させることが可能であり、生体への負担が低減された処置法が提供されると考えられる。

[0077] 実施例５Ｂ：４塩基認識型ＰＩＰによるメチル化阻害

本実施例では、４塩基認識型ＰＩＰによるメチル化阻害効果を確認した。

[0078] 図７に示されるように、Ｗ（すなわち、ＡまたはＴ）認識、Ｃ認識、またはＧ認識のモチーフを組み合わせてＰＩＰを合成した。具体的には、Ｉｍ０として、Ｍｅ－Ｐｙ－Ｐｙ－Ｐｙ－Ｐｙ－β－Ｄｐを合成し、Ｉｍ３として、Ｍｅ－Ｐｙ－Ｐｙ－Ｉｍ－Ｐｙ－β－Ｄｐを合成した(J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 6141参照）{ここで、βはβアラニンを表し、Ｍｅはメチル基を

表し、Ｄｐはジメチルアミノプロピルアミドを意味する}。ＩｍＯは、ＤＮＡ配列上でホモダイマーを形成し、Ａ／Ｔ配列（すなわち、５’－ＷＷＷＷ－３’）を認識し、ＣｐＧ部位を認識せず、Ｉｍ３は、ＤＮＡ配列上でホモダイマーを形成し、ＣｐＧ部位（すなわち、５’－ＷＣＧＷ－３’）を認識する。

[0079] 大腸がん細胞株ＲＫＯ細胞を６ｃｍディッシュに１×１０^{5}細胞の密度で播種し、２４時間インキュベートした。次いで、培養液を０．５μＭ　５－アザ－２’－デオキシシチジン（ＡＺＡ）を含む培養液に入れ替え、培養細胞をＡＺＡに２４時間にわたって暴露した。細胞は、１０日目に回収されるか、または後述するように低酸素条件下で培養された。

[0080] 低酸素条件で細胞を培養するために、O_2センサーとＭＣＯ－１８Ｍ　ｒｅｇｕｌａｔｏｒ（Sanyo, Osaka, Japan）を備えたインキュベータ中で、９４％N_2、５％CO_2および１％O_2を含む加湿された空気の連続通気条件下で細胞を８日間培養した。CO_2濃度は、内部のCO_2濃度制御機構により維持した。次いで、ＡＺＡで処理した細胞を１０μＭのＩｍＯまたはＩｍ３を含む０．１％ＤＭＳＯで７５日間処理した。この間、ＰＩＰを含む培地は、５日毎に交換した。細胞は、ほぼコンフルエントになったときに６ｃｍディッシュに２×１０^{5}細胞の密度で継代した。細胞は、０日目（Ｈ０、低酸素処理前）および７５日目（Ｈ７５）で回収した。

[0081] ゲノムワイドのＤＮＡメチル化解析は以下の通り行った。まず、Zymo EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA)を用いて、各試料から得られた５００ｎｇのゲノムＤＮＡをバイサルファイト処理した。全ゲノム増幅、標識化、ハイブリダイゼーションおよびスキャンは製造者マニュアルに従って行った。

メチル化解析は、ゲノム全体または各遺伝子の転写開始領域（ＴＳＳ）の±１ｋｂの領域において、Infinium Human Methylation450 BeadChip (Illumina)を用いて行った。具体的には、メチル化配列に対するプローブおよび非メチル化配列に対するプローブの合計に対するメチル化配列に対するプロー

ブの比（本明細書では「β値」という）を求めた。β値は、全てのＣｐＧ部位においてメチル化が見出されない場合に０．００であり、全てのＣｐＧ部位がメチル化されている場合に１．００となる。

[0082] まず、ネガティブコントロールであるＲＫＯ細胞においてβ値＞０．８である遺伝子を選択した。選択された遺伝子から、Ｈ０においてβ値＜０．５であり、かつ、Ｈ７５において０．１％ＤＭＳＯで処理した場合にβ値＞０．８である遺伝子をさらに選択した。

[0083] Ｉｍ０により選択的にメチル化レベルが低下する遺伝子

その上で、Ｉｍ０で処理したＨ７５の細胞においてβ値＜０．６５であり、かつ、Ｉｍ３で処理したＨ７５の細胞においてβ値＞０．８である遺伝子を、Ｉｍ０により選択的にメチル化が低下する遺伝子として選択した。全ゲノムで６０９９プローブがこれに該当し、ＴＳＳ±１ｋｂ領域では１１１０遺伝子（２１３５プローブ）がこれに該当した。

Ｉｍ３により選択的にメチル化レベルが低下する遺伝子

また、Ｉｍ３で処理したＨ７５の細胞においてβ値＜０．６５であり、かつ、Ｉｍ－０Ｎで処理したＨ７５の細胞においてβ値＞０．８である遺伝子を、Ｉｍ３により選択的にメチル化が低下する遺伝子として選択した。全ゲノムで１１７１プローブがこれに該当し、ＴＳＳ±１ｋｂ領域では２５４遺伝子（４５０プローブ）がこれに該当した。

Ｉｍ０およびＩｍ３により共通してメチル化レベルが低下する遺伝子

Ｉｍ０で処理したＨ７５の細胞においてβ値＜０．６５であり、かつ、Ｉｍ３で処理したＨ７５の細胞においてβ値＜０．６５である遺伝子を、Ｉｍ０およびＩｍ３により共通してメチル化レベルが低下する遺伝子として選択した。全ゲノムで１９プローブがこれに該当し、ＴＳＳ±１ｋｂ領域では９遺伝子（１９プローブ）がこれに該当した。

[0084] 結果は、図８に示される通りであった。

[0085] 図８に示されるように、ＡＺＡ処理によりＤＮＡはゲノムワイドで脱メチル化される。これに対して低酸素条件で培養すると、ゲノムワイドでメチル

化が誘導される。これに対してＩｍ０処理した細胞のゲノムでは、一部の遺伝子のメチル化レベルが大幅に低下した。また、Ｉｍ３で処理した細胞のゲノムでは、全体的に遺伝子のメチル化レベルが大幅に低下した。

[0086] 次に、特定遺伝子の発現レベルを分析した。TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina)を用いて製造者マニュアルに従ってＲＮＡライブラリを調製した。Illumina HiSeq 1500またはNextSeq 500 platformを用いてディープシーケンシングを行った。ＴｏｐＨａｔを用いてＦＡＳＴＱリードをマップし、Ｃｕｆｆｌｉｎｋｓを用いて転写産物をアッセンブルした。遺伝子発現は、FPKM (fragments per kilobase of exon per million reads mapped）として表現した。結果は、図８の右グラフに示される通りであった。

[0087] 図８の右グラフに示されるように、ＮＯＳＴＲＩＮ、ＤＳＣＲ９、ＳＬＣ２２Ａ２５、ＯＲ３Ａ４ＰおよびＣ１ＷＴＮＦ６は、Ｉｍ３に選択的に遺伝子発現が維持された。また、ＴＣＰ１１、ＬＹＰＤ５、ＳＴＡＲ、ＬＯＣ２５３５７３およびＬＯＣ１００５０７５７３は、ＩｍＯおよびＩｍ３によって遺伝子発現が維持された。このように、ＩｍＯやＩｍ３は、配列特異的に遺伝子のメチル化レベルを低下させることができ、かつ、細胞における通常の遺伝子発現レベルを維持させることができた。このことから、４つの単量体単位を含むＰＩＰは、ゲノムワイドで遺伝子の発現レベルおよびメチル化レベルを顕著に制御した。

[0088] 実施例６Ｂ：ヒストン修飾酵素阻害剤とＰＩＰとのコンジュゲートの創製

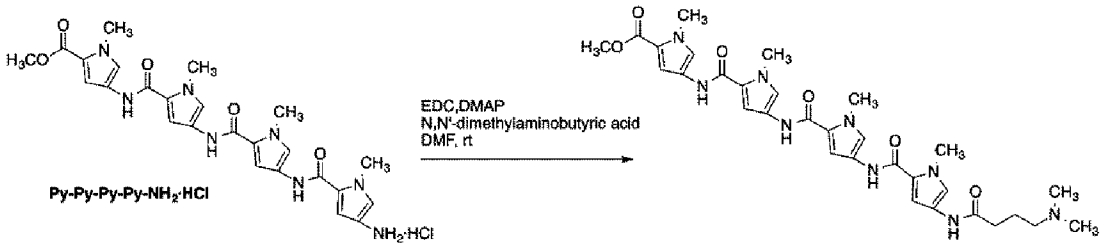
本実施例では、ヒストン修飾酵素阻害剤単独では活性化されない遺伝子発現を、４つの単量体単位を含むＰＩＰと阻害剤とのコンジュゲートを用いて活性化することができるかを調べた。

[0089] ヒストン修飾酵素阻害剤とＰＩＰとのコンジュゲートは、下記化合物４をＩｍＯまたはＩｍ３のアミノ末端のアミノ基に連結させて得た。このようにして得られた、ＩｍＯとＬＳＤ１阻害剤とのコンジュゲートをＩｍＯ－Ｎといい、Ｉｍ３とＬＳＤ１阻害剤とのコンジュゲートをＩｍ３－Ｎという。なお、化合物４は、ＮＣＤ３８の類似体であり、ＰＩＰとの融合とＬＳＤ１阻

害活性の維持に最適化させた化合物である。

[0090] [化5]

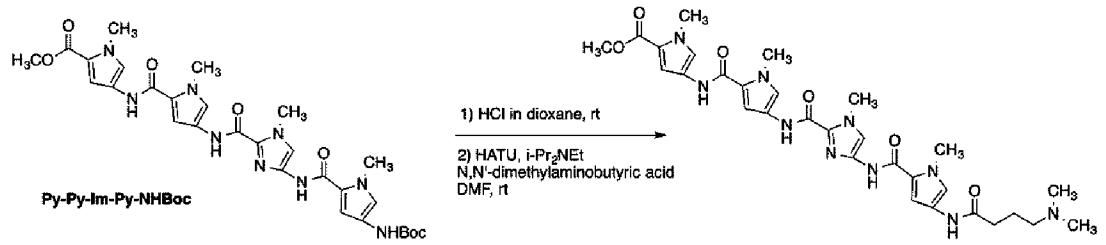
Py-Py-Py-Py-GABA



[0091] 既存の合成手法(J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 6141.)をもとに合成したPy-Py-Py-Py-NH_2・HCl (27.8 mg, 0.05 mmol)、4-dimethylaminobutyric acid (16.8 mg, 0.1 mmol), DMAP (12.2 mg, 0.1 mmol)のDMF (0.1 mL) 溶液に対して、EDC・HCl (19.1 mg, 0.1 mmol) を添加し、室温にて12時間撹拌した。反応液に$CHCl_3$/i-PrOH(1/1)溶液を添加し、飽和重曹水で洗浄後、Na_2SO_4にて乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHROMATOREX NH-DM1020, $CHCl_3$/MeOH = 50/1 to 30/1)にて精製し目的物を17.0 mg (54% yield)得た。

[0092] [化6]

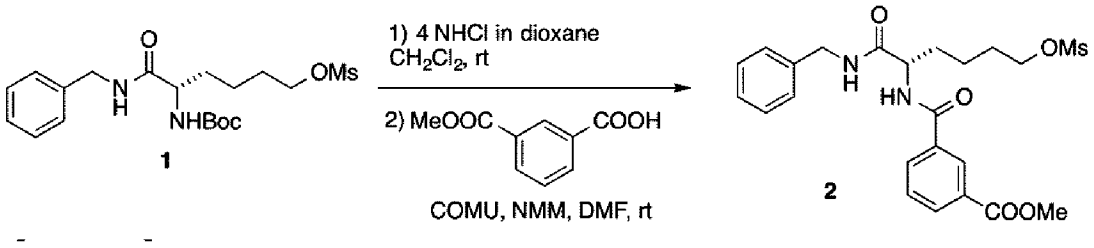
Py-Py-Im-Py-GABA



[0093] 既存の合成手法(J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 6141.)をもとに合成したPy-Py-Im-Py-NHBoc (90 mg, 0.145 mmol)に対し、4N HCl in dioxane溶液 (0.48 mL) を添加し室温にて５時間撹拌した。溶媒を減圧留去したのち、残渣をヘキサンにて洗浄することでアミン体塩酸塩を80.3 mg (99% yield) 得た。4-dimethylaminobutyric acid (16.8 mg, 0.1 mmol), HATU (38 mg, 0.1 mmol), diisopropylethylamine (51 μL, 0.3 mmol) をDMF (0.25 mL)に溶解し

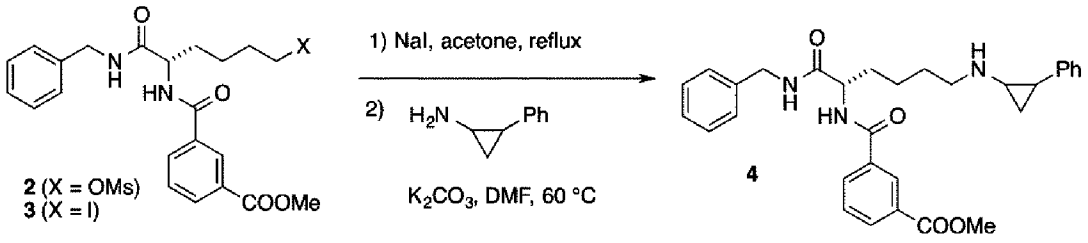
たのち、室温にて30分撹拌した。撹拌溶液に対し、上記アミン塩酸塩（27.9 mg, 0.05 mmol）のDMF(0.25 mL)溶液を室温にて添加し、そのまま１６時間撹拌した。１M $KHSO_4$水溶液を添加し、反応液を$CHCl_3$/i-PrOH(1/1)溶液にて抽出した。有機相を水、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、Na_2SO_4にて乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHROMATOREX NH-DM1020, $CHCl_3$/MeOH = 50/1)にて精製し目的物を10.4 mg (33% yield)得た。

[0094] [化7]



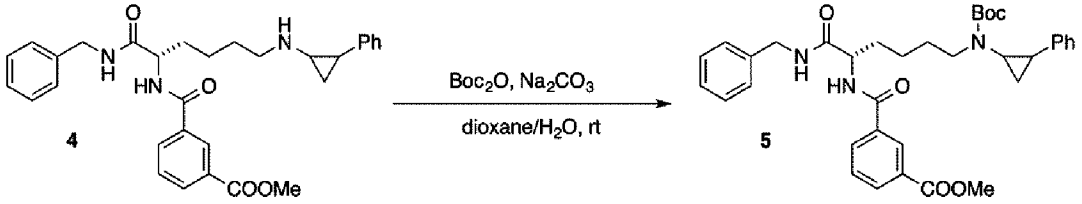
[0095] 既知の手法(Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 8620.)により合成した化合物1（649.7 mg, 1.55 mmol）のCH_2Cl_2（6.2 mL）溶液に対し、4N HCl in dioxane(3.9 mL)を0℃にて添加した。反応溶液を室温にて1時間撹拌し、溶媒を減圧留去し対応する塩酸塩を得た。3-(methoxycarbonyl)benzoic acid（279 mg 1.55 mmol)とCOMU(633.8 mg, 1.55 mmol)、N-methylmorpholine（0.68 mL, 6.2 mmol)のDMF溶液（5 mL）に対し、得られた塩酸塩のDMF溶液（2.8 mL）を0℃にて添加した。12時間後、飽和塩化アンモニウム水溶液にて反応を止め、酢酸エチルを添加した。混合液を１N塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、有機相を硫酸ナトリウムにて乾燥させた。減圧留去後、再結晶（酢酸エチル／ヘキサン）により化合物2（480.9 mg, 65% yield）を得た。

[0096] [化8]



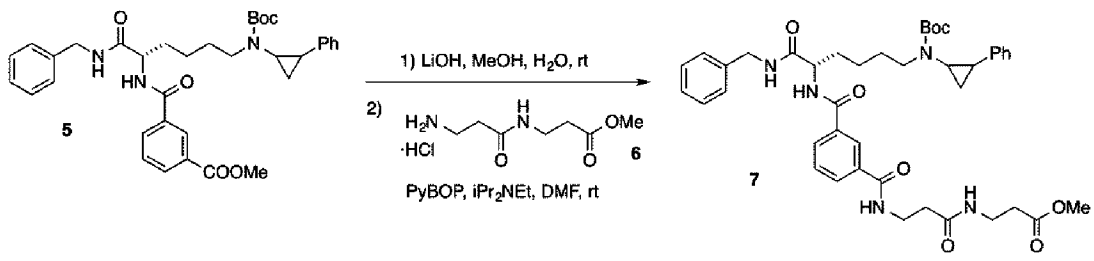
[0097] 化合物2（206.7 mg, 0.43 mmol）とヨウ化ナトリウム（1.2 g, 8 mmol）のアセトン懸濁液を18時間加熱還流した。反応液を室温としたのち、酢酸エチルを添加、反応液を飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムにより乾燥後、溶媒を減圧留去することで化合物3を得た。このものを直接次の反応へと利用した。化合物3とPCPA・塩酸塩(218.1 mg, 1.29 mmol)、炭酸カリウム（355.8 mg, 2.58 mmol）のDMF（0.86 mL）懸濁液を60℃にて48時間撹拌した。反応液を室温としたのち、酢酸エチルを添加、混合液を飽和重曹水、飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(SiO_2, AcOEt,then $CHCl_3$/MeOH = 20/1 to 10/1)にて精製し化合物4を191.5 mg (86% yield)得た。

[0098] [化9]



[0099] 化合物4（144.3 mg, 0.28 mmol）をdioxane（1.1 mL)と10% 炭酸ナトリウム水溶液（0.3 mL）の混合溶媒中で撹拌し、Boc_2O(368.3 mg, 1.68 mmol)を室温にて添加した。2.5時間撹拌後、酢酸エチルを添加、溶液を飽和食塩水にて洗浄後、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(SiO_2, hexane/AcOEt = 2/1 to 0/1)にて精製し化合物5を91.6 mg (53% yield)得た。

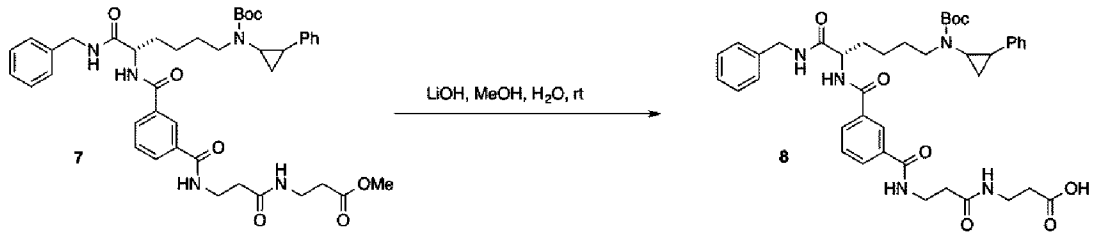
[0100] [化10]



[0101] 化合物5（91.6 mg, 0.15 mmol）のメタノール（0.75 mL）溶液に対して、1

M LiOH水溶液(0.3 mL)を0℃にて添加した。12時間後、酢酸エチルを添加し10%クエン酸水溶液にて反応液を酸性とした。クロロホルムにて抽出後、溶液を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣を次の反応に用いた。得られた残渣とPyBOP(135.2 mg, 0.26 mmol),既知の化合物6 (Chem. Eur. J. 2013, 19, 15822.) (55.6 mg, 0.26 mmol) のDMF (0.65 mL) 溶液に対して0℃にてiPr_2NEt (0.09 mL, 0.52 mmol) を添加した。室温にて4時間撹拌後、酢酸エチルを添加した。1N塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水にて順次洗浄後、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(SiO_2, $CHCl_3$/MeOH = 20/1 to 10/1)にて精製し化合物7を95.6 mg (84% yield)得た。

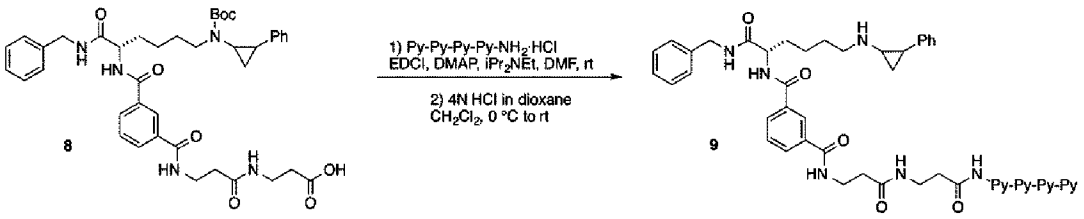
[0102] [化11]



7 8

[0103] 化合物7 (52.5 mg, 0.0695 mmol) のメタノール(0.7 mL)溶液に対して、0度にて1M LiOH水溶液(0.14 mL)を添加した。室温にて12時間撹拌後、酢酸エチルにて逆抽出、水相を10%クエン酸水溶液にて酸性としたのち、クロロホルムにて抽出。有機相を硫酸ナトリウムにより乾燥後、溶媒を減圧留去、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(SiO_2, $CHCl_3$/MeOH = 10/1 to 0/1)にて精製し化合物8を24.5 mg (48% yield)得た。

[0104] [化12]

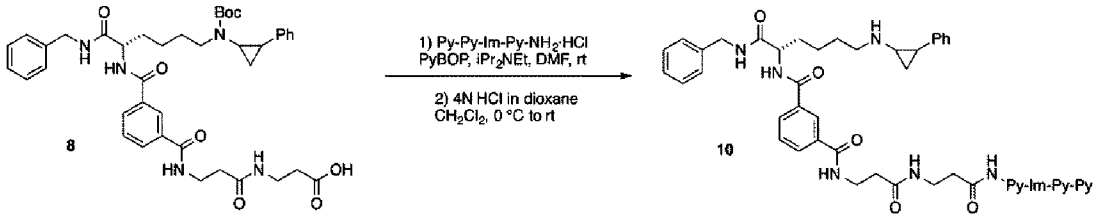


8 9

[0105] 化合物8 (35.2 mg, 0.0048 mmol) 、DMAP (12 mg, 0.096 mmol)、EDCI (18.4 mg, 0.096 mmol)のDMF(0.96 mL)溶液に対して、0度にてPy-Py-Py-Py-NH_2・

HCl(26.7 mg, 0.048 mmol)とiPr$_2$NEt(32 μL, 0.192 mmol)を添加した。室温にて15時間撹拌後、酢酸エチルを添加し、１N塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水にて順次洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムにより乾燥後、溶媒を減圧留去、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHROMATOREX NH-DM1020, CHCl$_3$/MeOH = 20/1)にて精製し縮合体の粗生成物を15.7mg得た。得られた粗生成物15.7 mgを塩化メチレン(1.2 mL)に溶解し、0度にて4N HCl in dioxane(0.12 mL)を添加した。室温にて2時間撹拌後、水を添加し塩化メチレンにて逆抽出、得られた水相を1M LiOH溶液にて塩基性としたのち、クロロホルムにて抽出した。有機相を硫酸ナトリウムにより乾燥後、溶媒を減圧留去、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHROMATOREX NH-DM1020, CHCl$_3$/MeOH = 20/1 to 10/1)にて精製して生成物9（すなわち、ＩｍＯ－Ｎ）を1.8 mg(3% yield)得た。

[0106] [化13]



[0107] 化合物8 (19.5 mg, 0.026 mmol) 、PyBOP (19.5 mg, 0.039 mmol)のDMF(0.52 mL)溶液に対して、0度にてPy-Py-Im-Py-NH$_2$・HCl(14.7 mg, 0.026 mmol)とiPr$_2$NEt(18 μL, 0.104 mmol)を添加した。室温にて15時間撹拌後、酢酸エチルを添加し、１N硫酸水素カリウム水溶液、飽和重曹水、飽和食塩水にて順次洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムにより乾燥後、溶媒を減圧留去、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHROMATOREX NH-DM1020, CHCl$_3$/MeOH = 20/1)にて精製し縮合体の粗生成物を26.5mg得た。得られた粗生成物26.5 mgを塩化メチレン(0.42 mL)に溶解し、0度にて4N HCl in dioxane(0.05 mL)を添加した。室温にて4時間撹拌後、水を添加し塩化メチレンにて逆抽出、得られた水相を1M LiOH溶液にて塩基性としたのち、クロロホルムにて抽出した。有機相を硫酸ナトリウムにより乾燥後、溶媒を減圧留去、残渣をシリカゲル

カラムクロマトグラフィー(CHROMATOREX NH-DM1020, $CHCl_3$/MeOH = 20/1)にて精製して生成物１０（すなわち、Ｉｍ３－Ｎ）を4.9 mg(16% yield)得た。

[0108] 大腸がん細胞株ＲＫＯ細胞を６ｃｍディッシュに１×１０^{5}細胞の密度で播種し、２４時間インキュベートした。次いで、培養液を２μＭのＮＣＤ３８およびＩｍ０－Ｎ、Ｉｍ３－Ｎを含む培養液に入れ替え、培養細胞を薬剤へ３０日間にわたって暴露した。この間、化合物を含む培地は、５日毎に交換した。細胞は、ほぼコンフルエントになったときに６ｃｍディッシュに２×１０^{5}細胞の密度で継代した。細胞は３０日目で回収した。

[0109] 次に、回収した細胞を1%のホルムアルデヒドで固定した後、超音波破砕によって断片化させたクロマチンDNAを作成した。断片化クロマチンに対して、ヒストンメチル化抗体(H3K4me3)を用いたChIP-Seq法によって、遺伝子活性化マーカーの１つであるヒストンメチル化が亢進している領域を同定した。その結果、図９に示されるように、阻害剤処理ではヒストンメチル化に大きな変動が認められなかった複数の遺伝子プロモータ領域が、Ｉｍ３－Ｎ処理においてはヒストンメチル化が亢進する現象が認められた。このことから、ＰＩＰ－ＬＳＤ１阻害剤は、ヒストン活性化を選択的に誘導することが示唆された。

[0110] ＰＩＰによるヒストン修飾酵素阻害剤のゲノム上へのデリバリーの配列特異性を、別のヒストン活性化マーカーであるヒストンアセチル化変化の観点から確認した。実施例５Ｂに記載の方法により、細胞をＩｍ０－ＮまたはＩｍ３－Ｎで処理し、ヒストンアセチル化抗体（H3K27Ac）を用いたChIP-Seq法により、ヒストン活性化領域を同定した。結果は、図１０および１１に示される通りであった。図１０および１１に示されるように、ＮＣＤ３８単体処理系と比較して、Ｉｍ０－Ｎによって活性化されたヒストン領域では、WWWWを有する標的配列数が有意かつ顕著に多く認められた。また、Ｉｍ３－Ｎによって活性化されたヒストン領域において、ＷＣＧＷを有する標的配列数が有意に多く認められた。

[0111] 上述の通り、ＰＩＰは、少なくとも４つの単量体単位を含めば、ゲノムＤ

ＮＡへの配列依存的な結合に十分であることが明らかとなった。また、ＰＩＰは、連結した他の分子をゲノムＤＮＡへの配列依存的にデリバリーできることも明らかとなった。

請求の範囲

[請求項1] 生体においてＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制を阻害することに用いるための組成物であって、ピロールイミダゾールポリアミドを含み、ピロールイミダゾールポリアミドは、前記遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合するように設計されたものである、組成物。

[請求項2] 生体においてＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制を阻害することに用いるための組成物であって、ピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含み、コンジュゲート中のピロールイミダゾールポリアミドは、前記遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合するように設計されたものである、組成物。

[請求項3] ＤＮＡのメチル化が、ＤＮＡの脱メチル化処理後に細胞内で生じるＤＮＡメチル化である、請求項１または２に記載の組成物。

[請求項4] ＤＮＡのメチル化が、ＤＮＡの脱メチル化処理とヒストンの脱アセチル化阻害処理後に細胞内で生じるＤＮＡメチル化である、請求項３に記載の組成物。

[請求項5] ＤＮＡの脱メチル化処理が、５－アザ－２’－デオキシシチジン（ＡＺＡ）処理により行われる、請求項３または４に記載の組成物。

[請求項6] ヒストンの脱アセチル化阻害処理が、トリコスタチンＡ処理により行われる、請求項４または５に記載の組成物。

[請求項7] 遺伝子が、癌抑制遺伝子である、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項8] 遺伝子が、ＭＬＨ１遺伝子である、請求項７に記載の組成物。

[請求項9] 癌の対象において癌を処置するための医薬組成物であって、請求項７または８に記載の組成物を含み、これにより癌抑制遺伝子の転写抑制を阻害することができる、医薬組成物。

[請求項10] 癌が大腸癌、胃癌、胃小窩型胃癌、食道癌、頭頸部扁平上皮癌、非

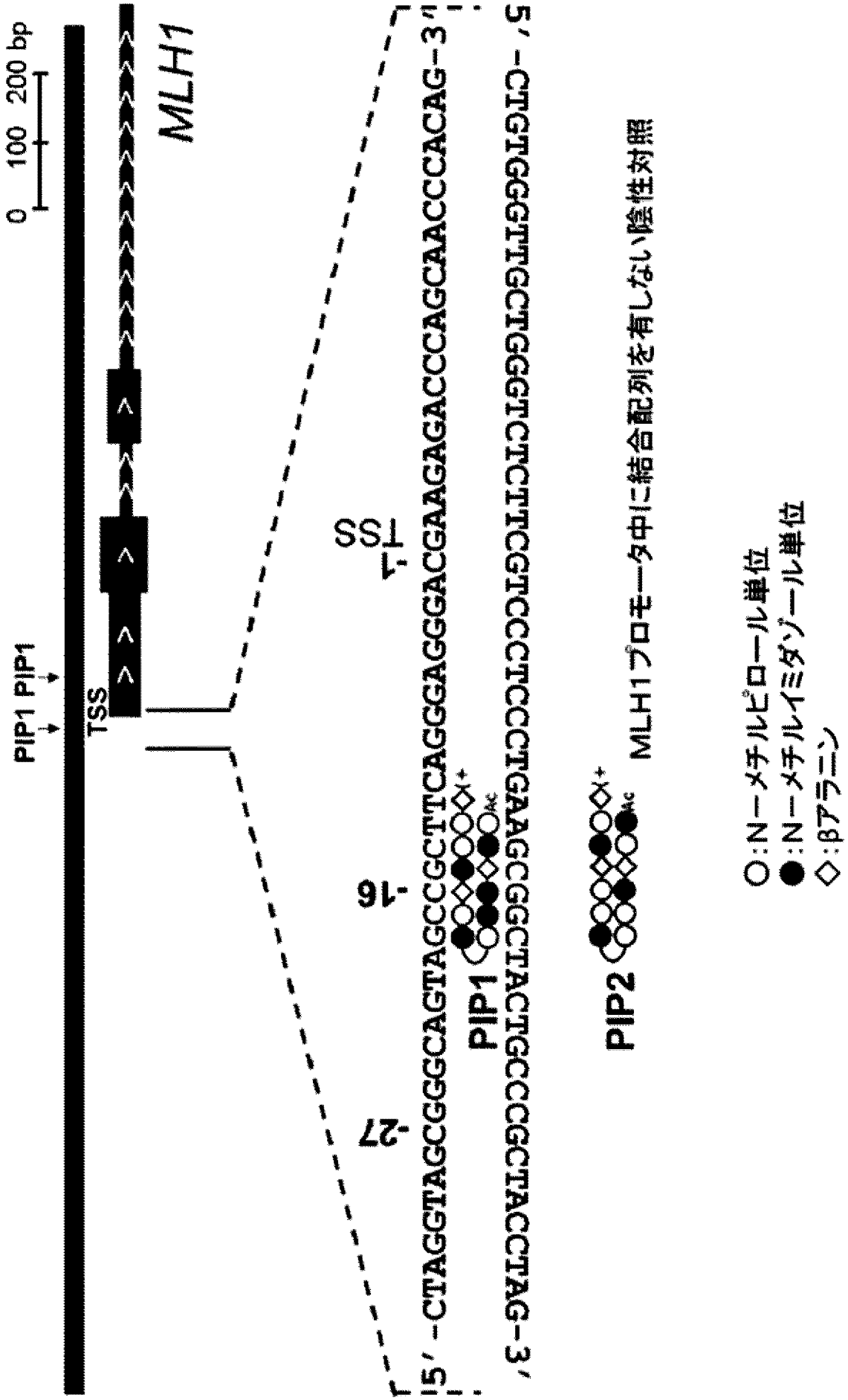
小細胞肺癌および直腸結腸癌から選択される癌であり、プロモータ領域のＤＮＡがメチル化された癌抑制遺伝子がＭＬＨ１遺伝子である、請求項９に記載の医薬組成物。

[請求項11] ＤＮＡの脱メチル化剤とヒストンの脱アセチル化阻害剤と併用するための、請求項９または１０に記載の医薬組成物。

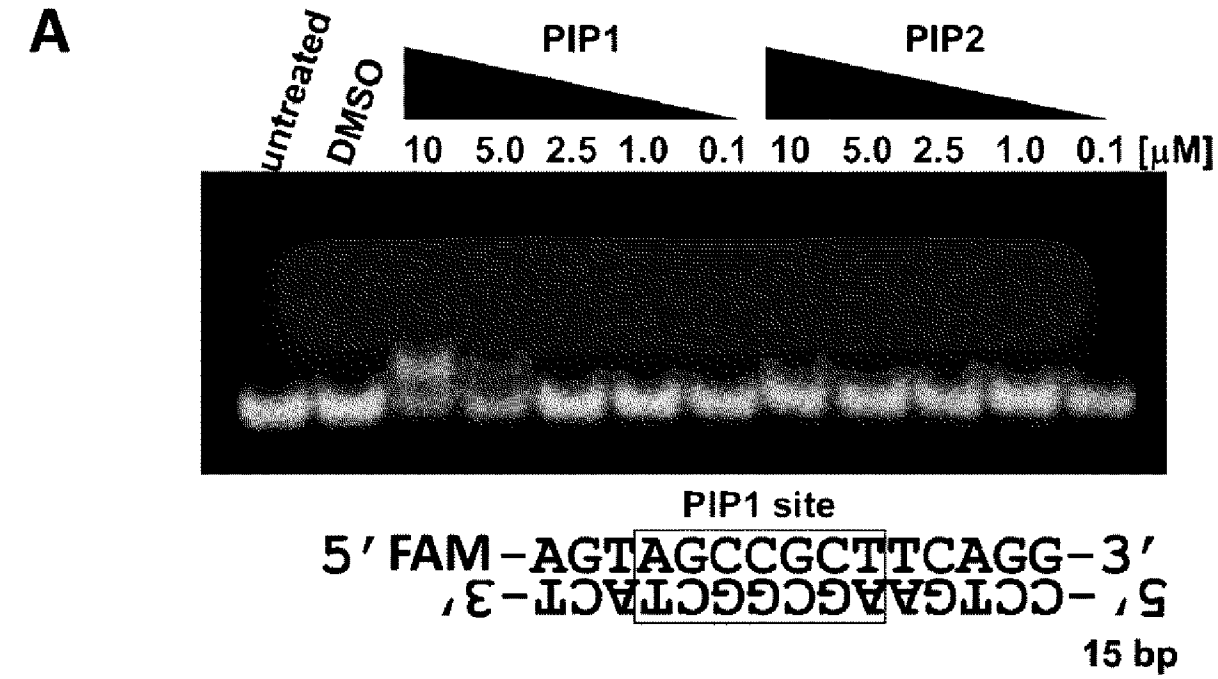
[請求項12] ＭＬＨ１遺伝子のメチル化が亢進した対象において、癌の発症を予防することに用いるための、または癌の発症リスクを低減することに用いるための医薬組成物であって、請求項８に記載の組成物を含む、医薬組成物。

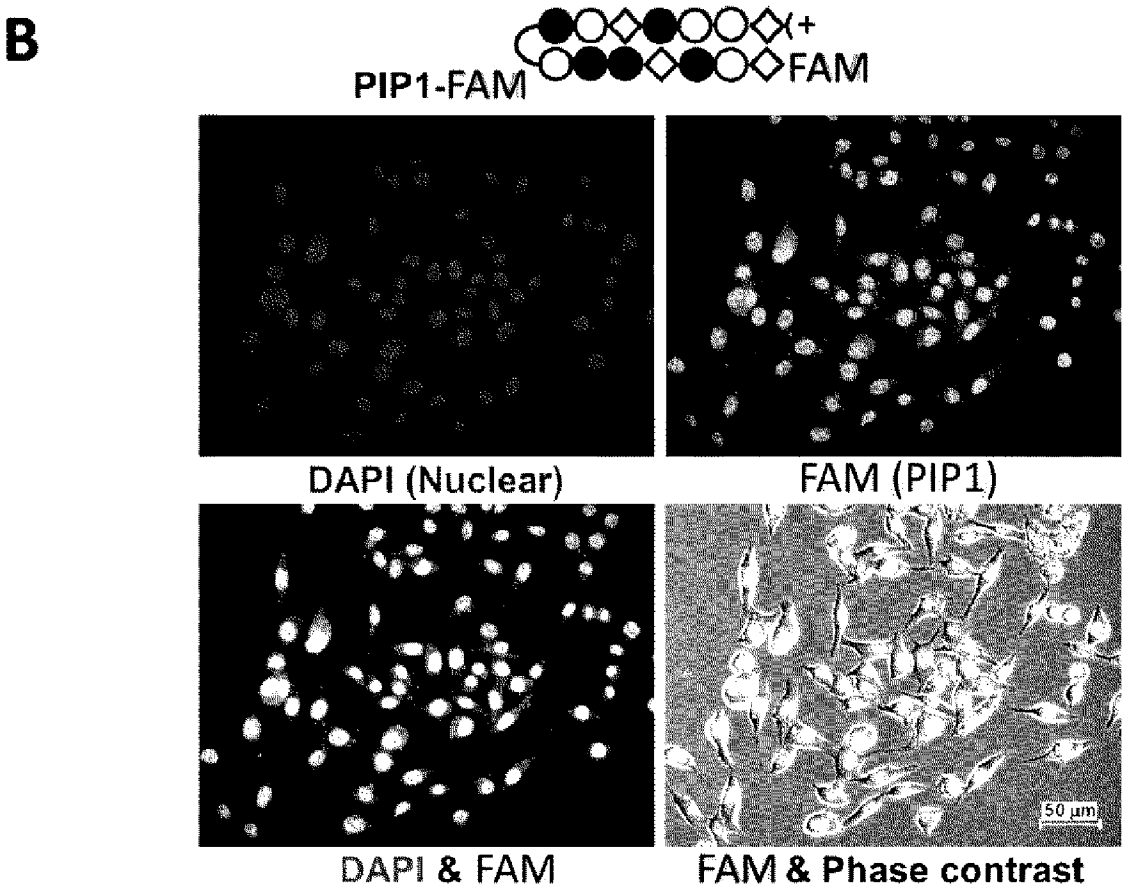
[請求項13] 生体において標的ＤＮＡまたはその近傍におけるＤＮＡメチル化を阻害することに用いるためのＤＮＡメチル化阻害剤であって、ピロールイミダゾールポリアミドまたはピロールイミダゾールポリアミドとヒストン修飾酵素阻害剤とのコンジュゲートを含み、ピロールイミダゾールポリアミドは、標的ＤＮＡに配列特異的に結合するように設計された、ＤＮＡメチル化阻害剤。

[図1]

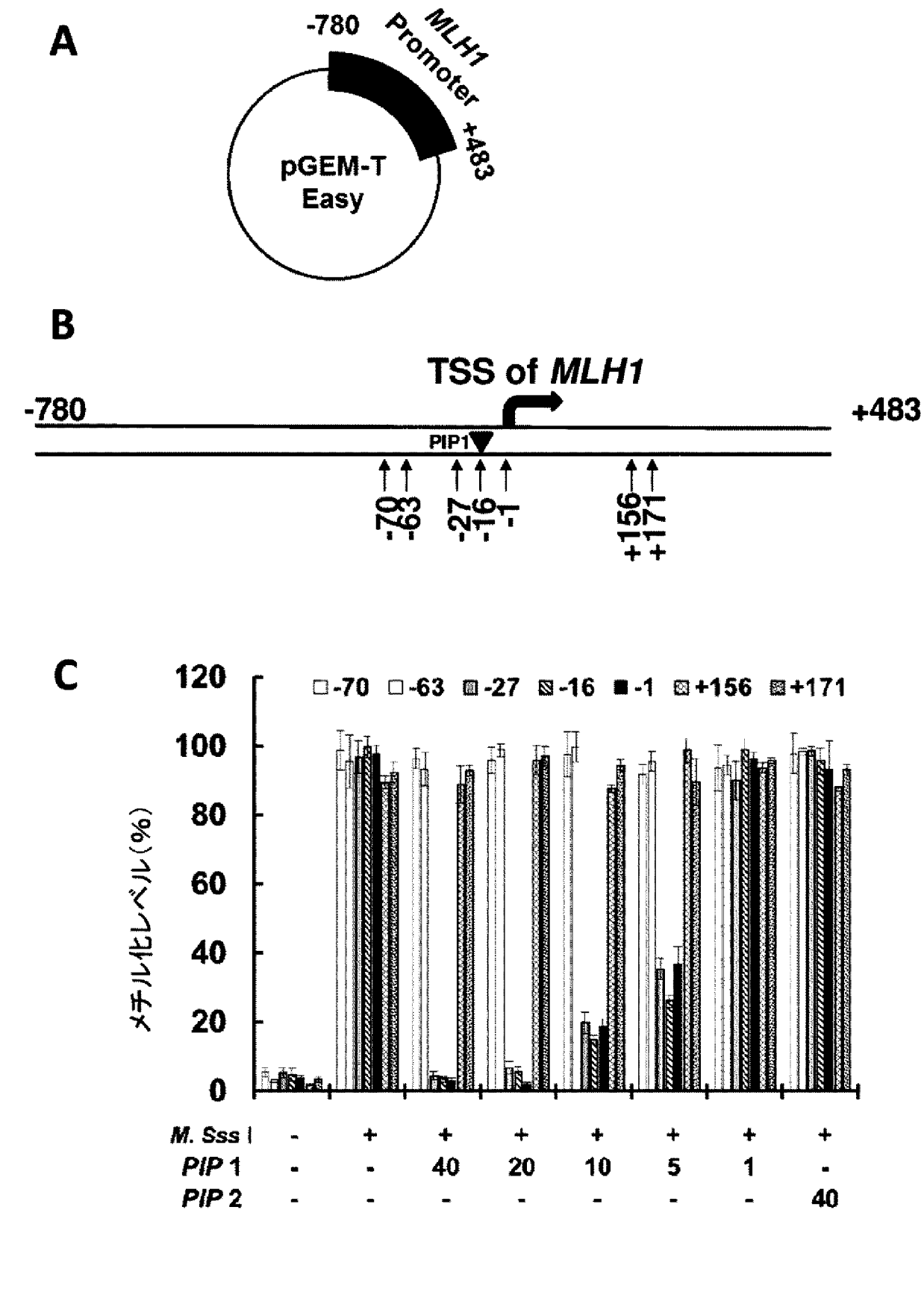

0 100 200 bp
MLH1
PIP1 PIP1
TSS
-1
-16
-27
5′-CTAGGTAGCGGGCAGTAGCCGCTTCAGGGAGGGACGAAGAGACCCAGCAACCCACAG-3′
5′-CTGTGGGTTGCTGGGTCTCTTCGTCCCTCCCTGAAGCGGCTACTGCCCCGCTACCTAG-3′
PIP1
PIP2
MLH1プロモーター中に結合配列を有しない陰性対照
○:N－メチルピロール単位
●:N－メチルイミダゾール単位
◇:βアラニン

[図2]

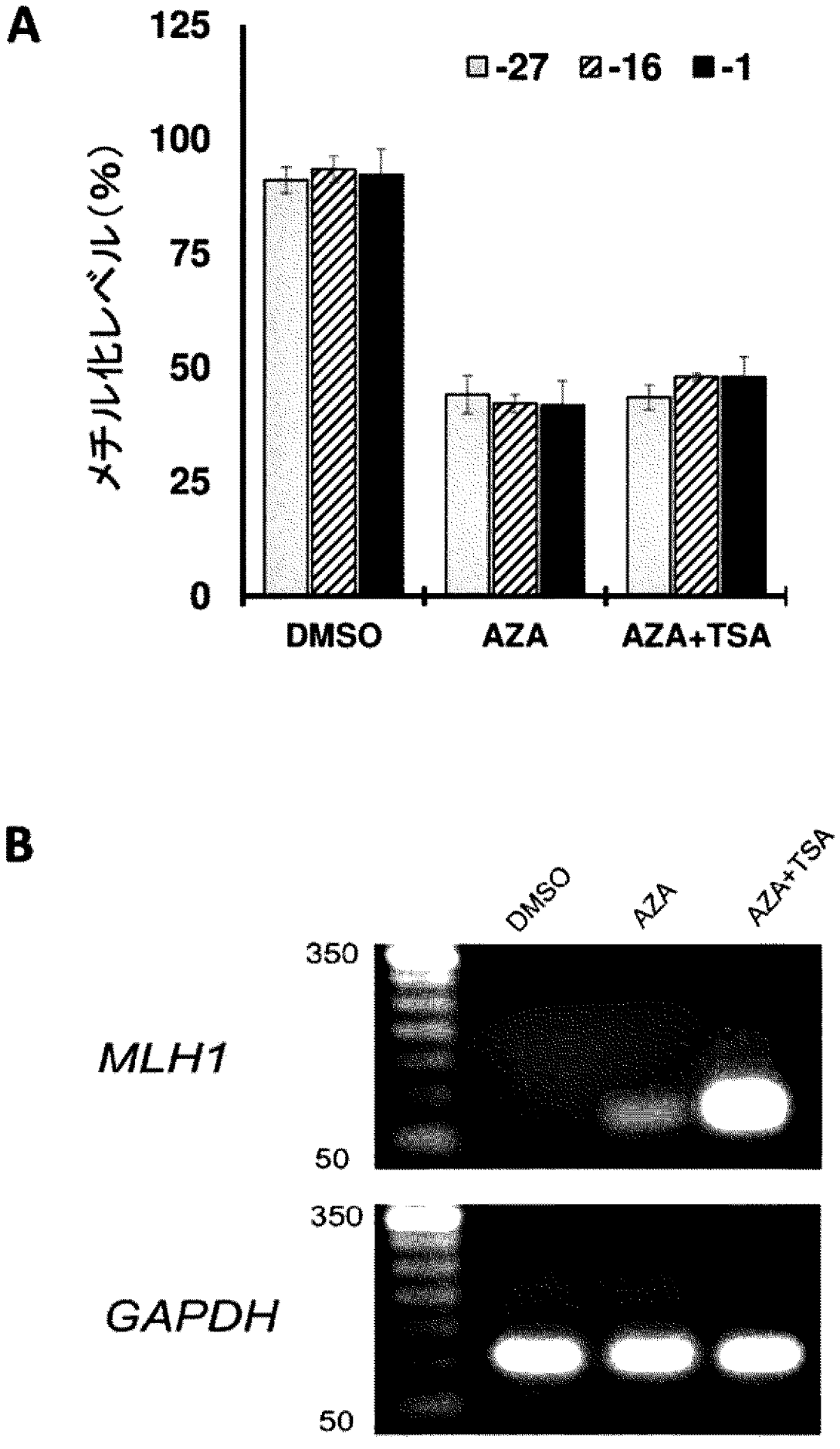

A
untreated
DMSO
PIP1
PIP2
10 5.0 2.5 1.0 0.1 10 5.0 2.5 1.0 0.1 [μM]
PIP1 site
5′ FAM-AGTAGCCGCTTCAGG-3′
5′-CCTGAAGCGGCTTACT-3′
15 bp


B
PIP1-FAM
(+
FAM
DAPI (Nuclear)
FAM (PIP1)
DAPI & FAM
FAM & Phase contrast
50 μm

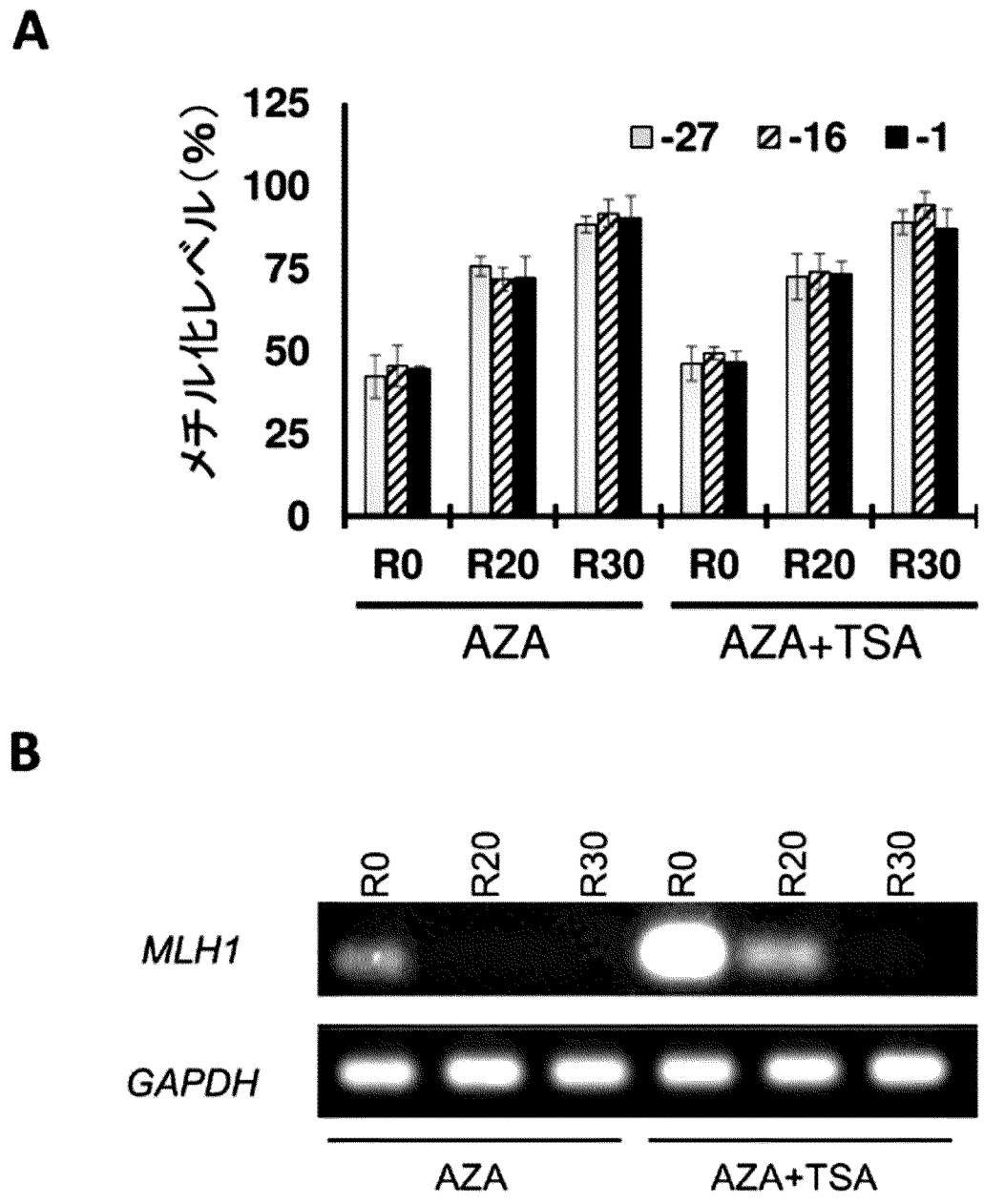
[図3]


A
-780
MLH1 Promoter
+483
pGEM-T Easy
B
TSS of MLH1
-780
+483
PIP1
-70
-63
-27
-16
-1
+156
+171
C
-70 -63 -27 -16 -1 +156 +171
メチル化レベル(%)
120
100
80
60
40
20
0
M. SssI - + + + + + + +
PIP 1 - - 40 20 10 5 1 -
PIP 2 - - - - - - - 40

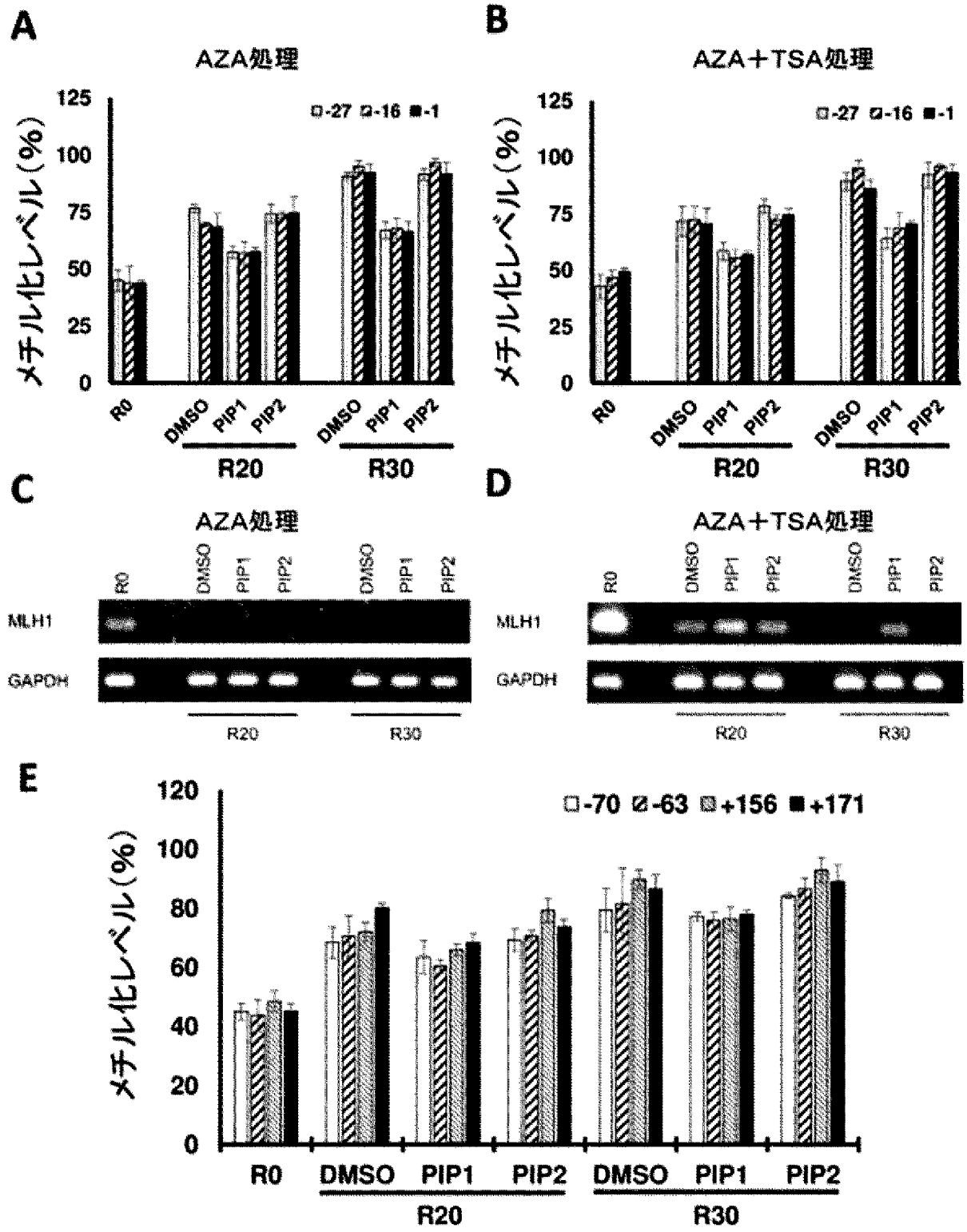
[図4]


A
125
100
75
50
25
0
メチル化レベル(%)
-27
-16
-1
DMSO
AZA
AZA+TSA
B
DMSO
AZA
AZA+TSA
350
50
MLH1
350
50
GAPDH

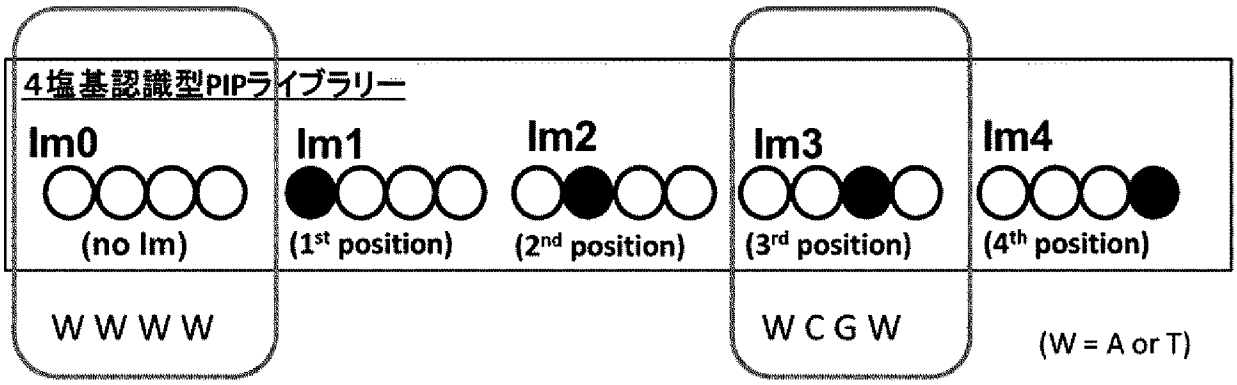
[図5]

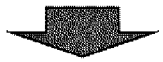

A
メチル化レベル(%)
125
100
75
50
25
0
-27
-16
-1
R0
R20
R30
R0
R20
R30
AZA
AZA+TSA
B
R0
R20
R30
R0
R20
R30
MLH1
GAPDH
AZA
AZA+TSA

[図6]


A
AZA処理
メチル化レベル(%)
125
100
75
50
25
0
-27 -16 -1
R0
DMSO
PIP1
PIP2
DMSO
PIP1
PIP2
R20
R30
B
AZA+TSA処理
メチル化レベル(%)
125
100
75
50
25
0
-27 -16 -1
R0
DMSO
PIP1
PIP2
DMSO
PIP1
PIP2
R20
R30
C
AZA処理
R0
DMSO
PIP1
PIP2
DMSO
PIP1
PIP2
MLH1
GAPDH
R20
R30
D
AZA+TSA処理
R0
DMSO
PIP1
PIP2
DMSO
PIP1
PIP2
MLH1
GAPDH
R20
R30
E
メチル化レベル(%)
120
100
80
60
40
20
0
-70 -63 +156 +171
R0
DMSO
PIP1
PIP2
DMSO
PIP1
PIP2
R20
R30

[図7]



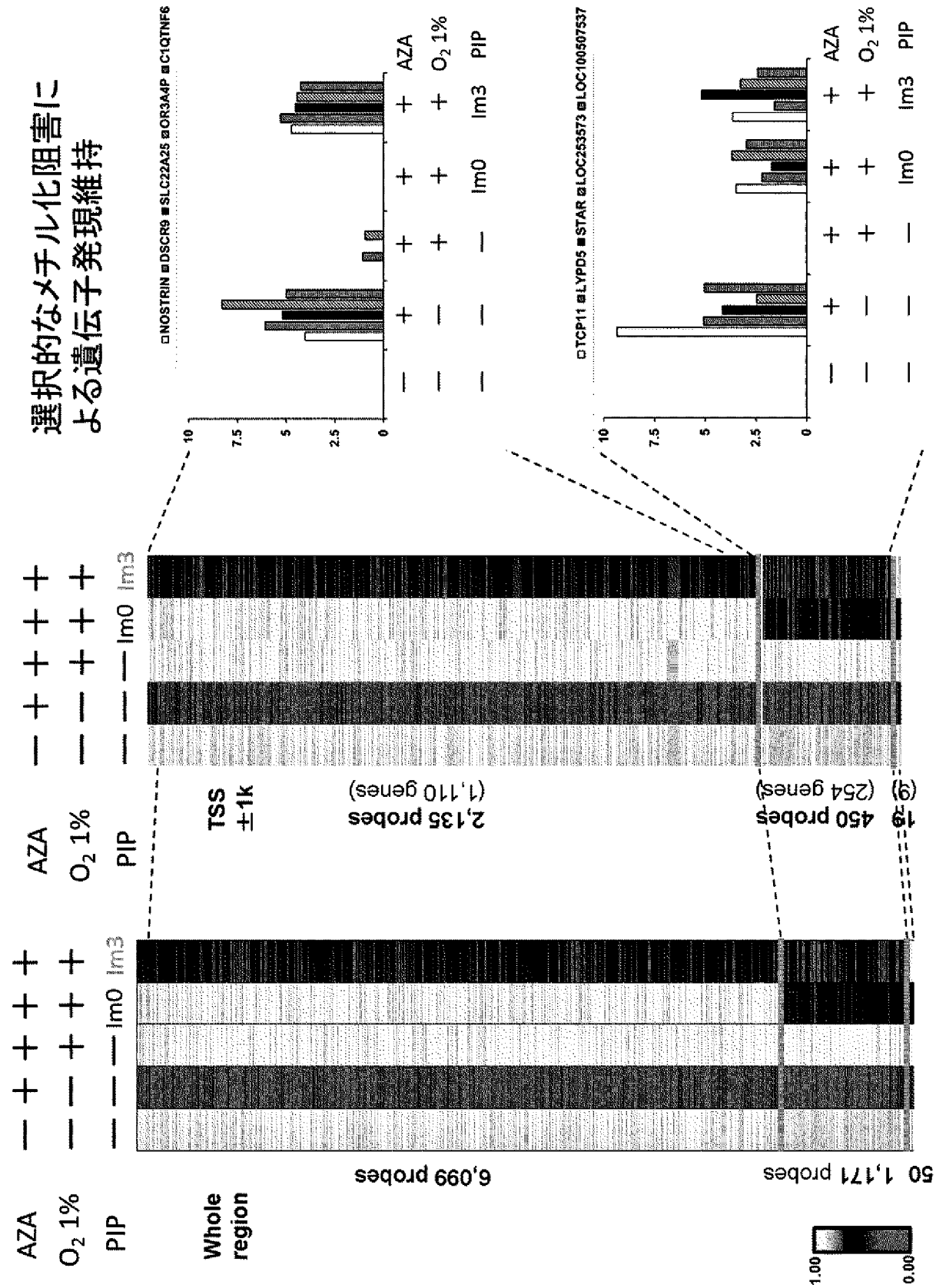


in cellulo DNAメチル化誘導系へ投与

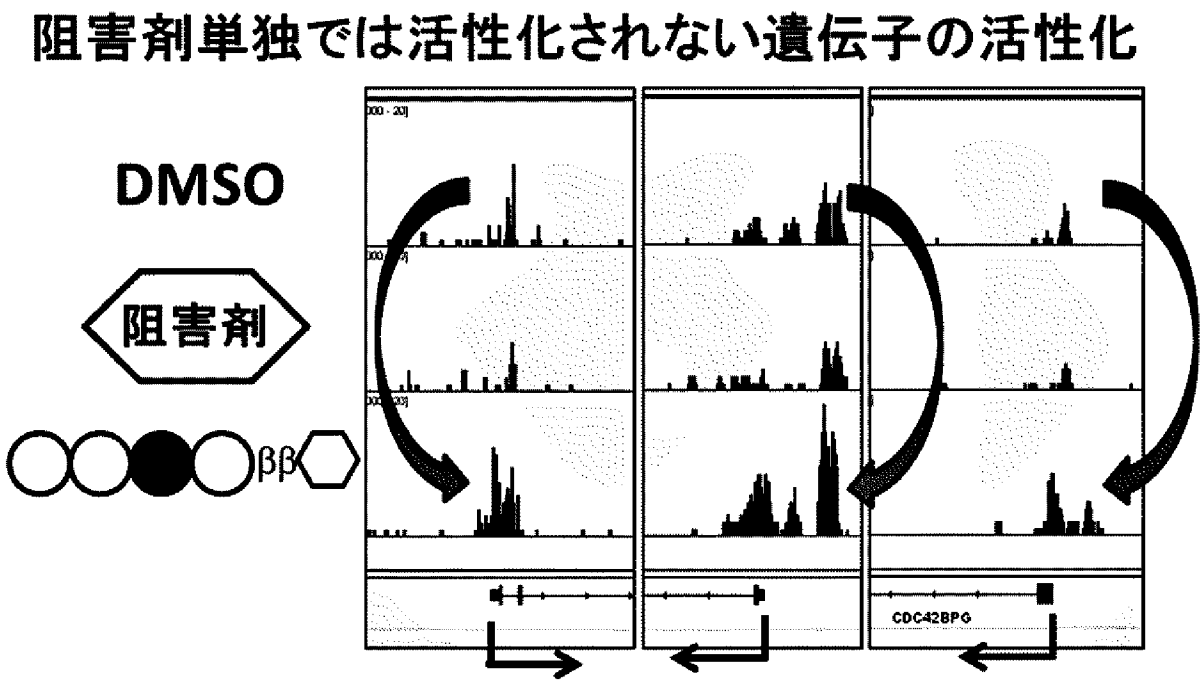


Infiniumビーズアレイを用いてCpG部位メチル化を解析

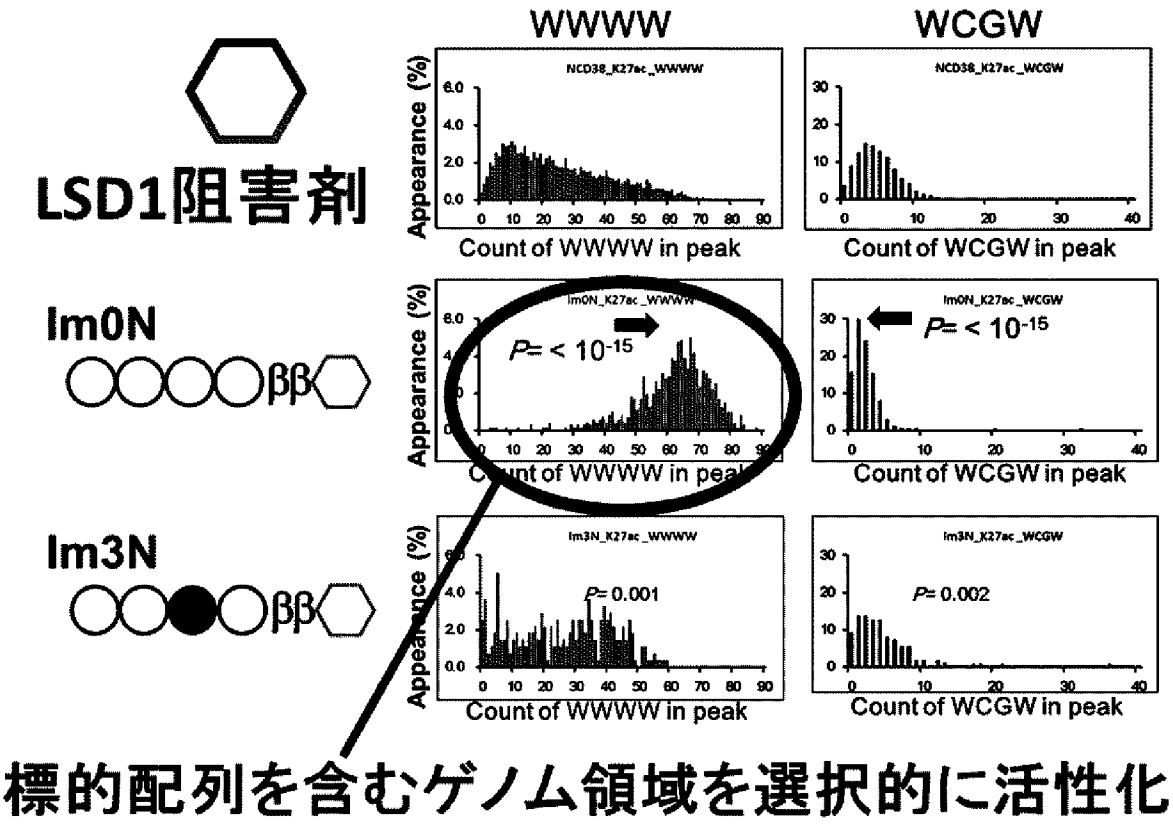
[図8]


選択的なメチル化阻害による遺伝子発現維持
NOSTRIN DSCR9 SLC22A25 OR3A4P C1QTNF6
TCP11 LYPD5 STAR LOC253573 LOC100507537
AZA
O2 1%
PIP
Im0
Im3
Whole region
6,099 probes
1,171 probes
TSS ±1k
2,135 probes (1,110 genes)
450 probes (254 genes)
1.00
0.00

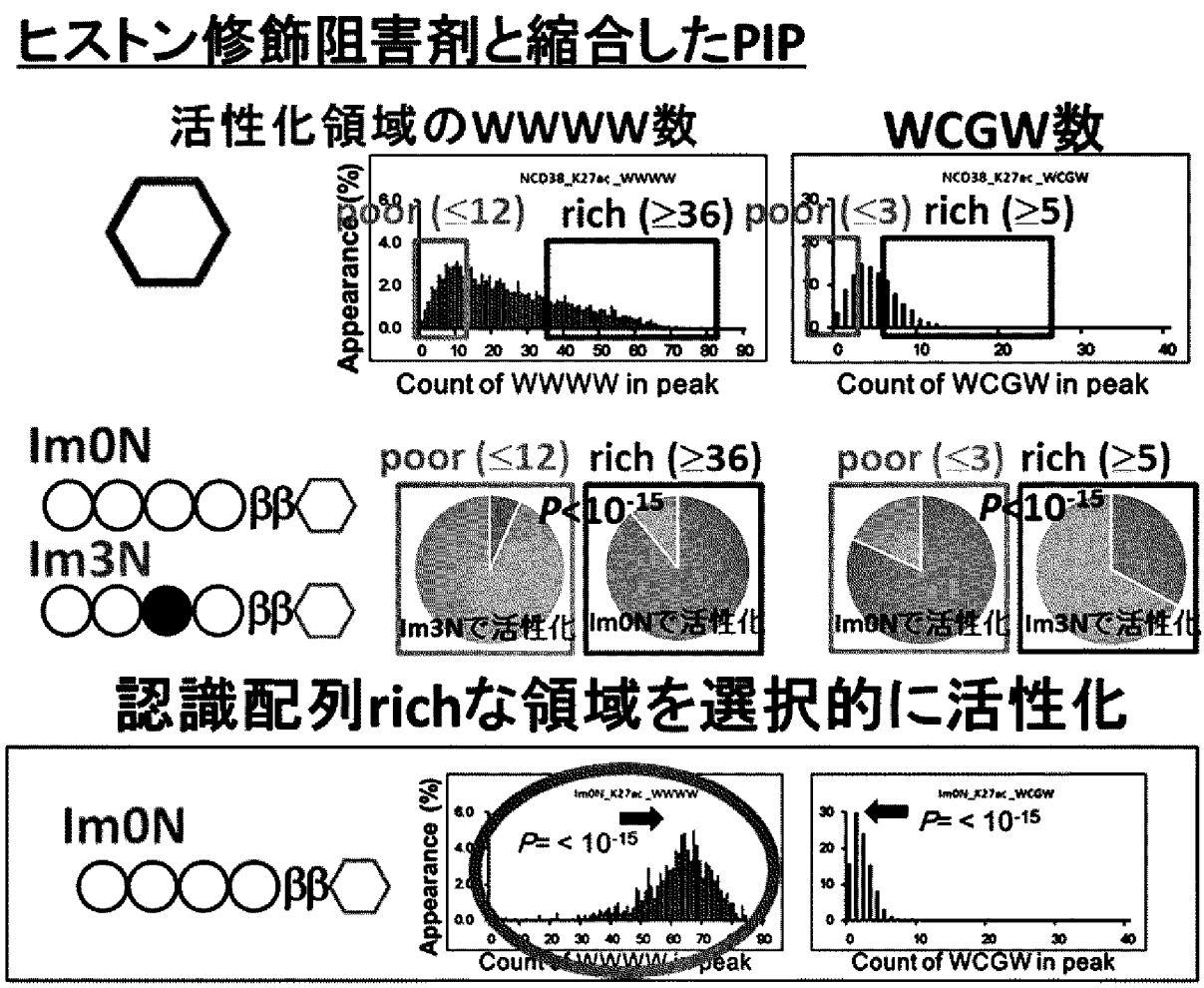
[図9]


阻害剤単独では活性化されない遺伝子の活性化
DMSO
阻害剤
ββ
CDC42BPG

[図10]


ヒストン修飾阻害剤と縮合したPIP
WWWW
WCGW
LSD1阻害剤
Im0N
Im3N
ββ
Appearance (%)
Count of WWWW in peak
Count of WCGW in peak
NCD38_K27ac_WWWW
NCD38_K27ac_WCGW
Im0N_K27ac_WWWW
Im0N_K27ac_WCGW
Im3N_K27ac_WWWW
Im3N_K27ac_WCGW
P= < 10-15
P= 0.001
P= 0.002
標的配列を含むゲノム領域を選択的に活性化

[図11]


ヒストン修飾阻害剤と縮合したPIP
活性化領域のWWWW数
WCGW数
NCD38_K27ac_WWWW
NCD38_K27ac_WCGW
poor (≤12)
rich (≥36)
poor (≤3)
rich (≥5)
Appearance (%)
Count of WWWW in peak
Count of WCGW in peak
Im0N
Im3N
P<10-15
Im3Nで活性化
Im0Nで活性化
認識配列richな領域を選択的に活性化
Im0N_K27ac_WWWW
Im0N_K27ac_WCGW
P= < 10-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/003623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K31/787(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61K47/50*(2017.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i

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)
A61K31/787, A61K45/00, A61K47/50, A61P35/00, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2010/001933 A1 (Nihon University), 07 January 2010 (07.01.2010), claims; paragraphs [0021] to [0024], [0052] to [0053], [0069]; examples (example 1) & US 2011/0160399 A1 claims; paragraphs [0048] to [0051], [0082] to [0084], [0104]; examples (example 1)	2-13 1
A	KANG S.JeenJoo et al., Design of Sequence-Specific DNA Binding Molecules for DNA Methyltransferase Inhibition, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2014, Vol.136, 3687-3694 page 3687, left column, last paragraph	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
16 March 2017 (16.03.17)	11 April 2017 (11.04.17)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/003623

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/066774 A1 (Nihon University), 28 May 2009 (28.05.2009), claims; paragraphs [0010] to [0013] (Family: none)	1-13
A	DERVAN B. Peter, Molecular Recognition of DNA by Small Molecules, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, Vol.9, 2215-2235 figures (for example, fig. 15)	1-13
A	WO 2015/053413 A1 (Chiba-Ken et al.), 16 April 2015 (16.04.2015), entire text & US 2016/0310605 A1	1-13
P,X	SHINOHAR Ken-ichi et al., Inhibition of DNA Methylation at the MLH1 Promotor Region Using Pyrrole-Imidazole Polyamide, ACS Omega, 2016.12.09, Vol.1, p.1164-1172 entire text	1-13

The invention described in claim 1 relates to "a composition for use in the inhibition of the suppression of the expression of a gene caused by the methylation of DNA *in vivo*, which contains a pyrrole-imidazole polyamide, wherein the pyrrole-imidazole polyamide is designed so as to bind to a DNA miner groove in a promoter region of the gene in a sequence-specific manner". With respect to the structure of the pyrrole-imidazole polyamide and the types of the gene of which the suppression of expression caused by methylation is to be inhibited, various compounds and genes are included. However, only the inhibition of the suppression of the expression of MLH1 using a pyrrole-imidazole polyamide represented by formula (I) mentioned in paragraph [0023] in the description of the present application is disclosed in the meaning within PCT Article 5. Therefore, this invention is not supported in the meaning within PCT Article 6.

(Even if specific pyrrole-imidazole polyamides can be designed so as to specifically bind to a specific region, it cannot be considered that all of the compounds bound to the region can contribute to the inhibition of the suppression of the expression of the gene caused by methylation of DNA.)

Also the parts of claims 3-12 referring to claim 1 and claim 13 are same as said above.

As stated above, this international search has covered only the following range.

·An embodiment according to a part of the invention described in claim 1, wherein the pyrrole-imidazole polyamide is a compound represented by formula (I) mentioned in paragraph [0023] in the description of the present application and the gene of which the suppression of expression caused by methylation is to be inhibited is MLH1.

(Also the parts of claims 3-12 referring to claim 1 are same as said above.)

·An embodiment according to a part of the invention described in claim 13, wherein a pyrrole-imidazole polyamide is used as an active component, the pyrrole-imidazole polyamide is a compound represented by formula (I) mentioned in paragraph [0023] in the description of the present application and the target DNA is DNA of MLH1.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／００３６２３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/787(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K47/50(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/787, A61K45/00, A61K47/50, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2010/001933 A1（学校法人日本大学）2010.01.07, 特許請求の範囲,段落［００２１］－［００２４］,［００５２］－［００５３］,［００６９］、実施例（実施例１等）, & US 2011/0160399 A1（特許請求の範囲,段落［００４８］－［００５１］,［００８２］－［００８４］,［０１０４］、実施例（実施例１等））	2-13
A		1

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１６．０３．２０１７	１１．０４．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　４４３２
磯部　洋一郎
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	KANG S. JeenJoo et al., Design of Sequence-Specific DNA Binding Molecules for DNA Methyltransferase Inhibition, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2014, Vol.136, 3687-3694 第3687頁左欄最終段落	1-13
A	WO 2009/066774 A1（学校法人日本大学）2009.05.28, 特許請求の範囲,段落［００１０］－［００１３］（ファミリーなし）	1-13
A	DERVAN B. Peter, Molecular Recognition of DNA by Small Molecules, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, Vol.9, 2215-2235 図(例えば、図１５など)	1-13
A	WO 2015/053413 A1（千葉県ら）2015.04.16, 全文 & US 2016/0310605 A1	1-13
ＰＸ	SHINOHAR Ken-ichi et al., Inhibition of DNA Methylation at the MLH1 Promotor Region Using Pyrrole-Imidazole Polyamide, ACS Omega, 2016.12.09, Vol.1, p.1164-1172 全文	1-13

請求項１に係る発明は、「生体においてＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制を阻害することに用いるための組成物であって、ピロールイミダゾールポリアミドを含み、ピロールイミダゾールポリアミドは、前記遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合するように設計されたものである、組成物。」に関するものであり、ピロールイミダゾールポリアミドの構造や、メチル化による発現の抑制を阻害する対象となる遺伝子の種類について、種々の化合物及び遺伝子を包含するものであるが、PCT 第５条の意味において開示されているといえるのは、本願明細書の段落［００２３］の式（Ｉ）で示されるピロールイミダゾールポリアミドをＭＬＨ１の発現抑制の阻害についてのみであり、PCT 第６条の意味での裏付けを欠いている。（特定ピロールイミダゾールポリアミドを所定の領域に特異的に結合するように設計できたとしても、結合したものが全てＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制の阻害に寄与できるとまでは認められない。）

請求項３－１２のうち、請求項１を引用する部分、及び、請求項１３についても同様である。

上述のとおりであるので、国際調査は下記の範囲についてのみ行った。

・請求項１に係る発明のうち、ピロールイミダゾールポリアミドが本願明細書の段落［００２３］の式（Ｉ）で示される化合物であり、メチル化による発現の抑制を阻害する対象となる遺伝子がＭＬＨ１である態様について。（請求項３－１２のうち、請求項１を引用する部分についても同様。）

・請求項１３に係る発明のなかでピロールイミダゾールポリアミドを活性成分とする態様のうち、ピロールイミダゾールポリアミドが本願明細書の段落［００２３］の式（Ｉ）で示される化合物であり、標的ＤＮＡがＭＬＨ１のＤＮＡである態様について。

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／００３６２３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/787(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K47/50(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/787, A61K45/00, A61K47/50, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2010/001933 A1（学校法人日本大学）2010.01.07, 特許請求の範囲,段落［００２１］－［００２４］,［００５２］－［００５３］,［００６９］、実施例（実施例１等）, & US 2011/0160399 A1（特許請求の範囲,段落［００４８］－［００５１］,［００８２］－［００８４］,［０１０４］、実施例（実施例１等））	2-13
A		1

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１６．０３．２０１７	１１．０４．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　４４３２
磯部　洋一郎
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ａ	KANG S. JeenJoo et al., Design of Sequence-Specific DNA Binding Molecules for DNA Methyltransferase Inhibition, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2014, Vol.136, 3687-3694 第3687頁左欄最終段落	1-13
Ａ	WO 2009/066774 A1（学校法人日本大学）2009.05.28, 特許請求の範囲,段落［００１０］－［００１３］（ファミリーなし）	1-13
Ａ	DERVAN B. Peter, Molecular Recognition of DNA by Small Molecules, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, Vol.9, 2215-2235 図(例えば、図１５など)	1-13
Ａ	WO 2015/053413 A1（千葉県ら）2015.04.16, 全文 & US 2016/0310605 A1	1-13
ＰＸ	SHINOHAR Ken-ichi et al., Inhibition of DNA Methylation at the MLH1 Promotor Region Using Pyrrole-Imidazole Polyamide, ACS Omega, 2016.12.09, Vol.1, p.1164-1172 全文	1-13

請求項１に係る発明は、「生体においてＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制を阻害することに用いるための組成物であって、ピロールイミダゾールポリアミドを含み、ピロールイミダゾールポリアミドは、前記遺伝子のプロモータ領域のＤＮＡのマイナーグルーブに配列特異的に結合するように設計されたものである、組成物。」に関するものであり、ピロールイミダゾールポリアミドの構造や、メチル化による発現の抑制を阻害する対象となる遺伝子の種類について、種々の化合物及び遺伝子を包含するものであるが、PCT 第５条の意味において開示されているといえるのは、本願明細書の段落［００２３］の式（Ｉ）で示されるピロールイミダゾールポリアミドをＭＬＨ１の発現抑制の阻害についてのみであり、PCT 第６条の意味での裏付けを欠いている。（特定ピロールイミダゾールポリアミドを所定の領域に特異的に結合するように設計できたとしても、結合したものが全てＤＮＡのメチル化による遺伝子の発現抑制の阻害に寄与できるとまでは認められない。）

請求項３－１２のうち、請求項１を引用する部分、及び、請求項１３についても同様である。

上述のとおりであるので、国際調査は下記の範囲についてのみ行った。

・請求項１に係る発明のうち、ピロールイミダゾールポリアミドが本願明細書の段落［００２３］の式（Ｉ）で示される化合物であり、メチル化による発現の抑制を阻害する対象となる遺伝子がＭＬＨ１である態様について。（請求項３－１２のうち、請求項１を引用する部分についても同様。）

・請求項１３に係る発明のなかでピロールイミダゾールポリアミドを活性成分とする態様のうち、ピロールイミダゾールポリアミドが本願明細書の段落［００２３］の式（Ｉ）で示される化合物であり、標的ＤＮＡがＭＬＨ１のＤＮＡである態様について。