

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6949859号  
(P6949859)

(45) 発行日 令和3年10月13日 (2021. 10. 13)

(24) 登録日 令和3年9月27日 (2021. 9. 27)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/713 (2006. 01)  
 A 6 1 K 33/243 (2019. 01)  
 A 6 1 P 35/00 (2006. 01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006. 01)  
 A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 31/713 Z N A  
 A 6 1 K 33/243  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 43/00 1 2 1  
 A 6 1 K 45/00

請求項の数 9 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-545659 (P2018-545659)  
 (86) (22) 出願日 平成29年3月1日 (2017. 3. 1)  
 (65) 公表番号 特表2019-507763 (P2019-507763A)  
 (43) 公表日 平成31年3月22日 (2019. 3. 22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/054702  
 (87) 国際公開番号 W02017/148976  
 (87) 国際公開日 平成29年9月8日 (2017. 9. 8)  
 審査請求日 令和2年1月21日 (2020. 1. 21)  
 (31) 優先権主張番号 16305234. 3  
 (32) 優先日 平成28年3月1日 (2016. 3. 1)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 317016006  
 オンクセオ  
 O N X E O  
 フランス国、7 5 0 1 5 パリ、ブールヴ  
 ァール・デュ・ジェネラル・マルシアル・  
 ヴァラン 4 9  
 (73) 特許権者 500026533  
 アンスティテュ・キュリ  
 I N S T I T U T C U R I E  
 フランス国 0 5 セデクス パリー リ  
 ュ ドゥルム 2 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DBA I T分子の全身投与によるガンの処置

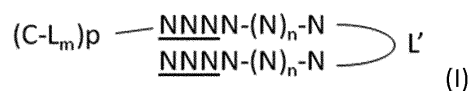
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸分子を含む、トリプルネガティブ乳ガン ( T N B C ) を処置するのに使用するための医薬組成物であって、

該核酸分子は、下記式：

【化 1 8】



[ 式中、

N は、デオキシヌクレオチドであり、n は、1 5 ~ 1 9 5 の整数であり、下線を引いた N は、改変ホスホジエステル骨格を有し又は有さないヌクレオチドを意味し、L' は、リンカーであり、C は、脂溶性分子又はレセプター媒介性エンドサイトーシスを可能にする細胞レセプターをターゲットにするリガンドから選択されるエンドサイトーシスを促進する分子であり、L は、リンカーであり、m は、0 又は 1 である整数であり、p は、1 である]

で示されるものを有し、

ここで、該核酸分子は、キノリンエンドソーム分解剤の投与を何ら組み合わせることなく使用され、

ここで、該核酸分子は、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与される、  
医薬組成物。

【請求項 2】

式 (I) で示される核酸分子が、1 つ又は複数の下記特徴：

- N が、A (アデニン)、C (シトシン)、T (チミン) 及び G (グアニン) からなる群より選択され、C p G ジヌクレオチドの発生を避け、ヒトゲノムにおける任意の遺伝子に対する 80 % 未満の配列同一性を有するように選択されるデオキシヌクレオチドであり；及び / 又は

- リンカー L' が、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート (T4) 及び 1, 19 - ビス (ホスホ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択され；及び / 又は

- m が、1 であり、L が、カルボキサミドポリエチレングリコール、より好ましくは、カルボキサミドトリエチレン又はテトラエチレングリコールであり；及び / 又は

- C が、コレステロール、一本鎖もしくは二本鎖脂肪酸、例えば、オクタデシル、オレイン酸、ジオレイルもしくはステアリン酸、又は細胞レセプターをターゲットにするリガンド (ペプチド、タンパク質、アプタマーを含む)、例えば、葉酸、トコフェロール、糖、例えば、ガラクトース及びマンノース並びにそのオリゴ糖、ペプチド、例えば、RGD 及びボンベシン、並びにタンパク質、例えば、トランスフェリン及びインテグリンからなる群より選択され、好ましくは、コレステロール又はトコフェロール、更により好ましくは、コレステロールであり；及び / 又は

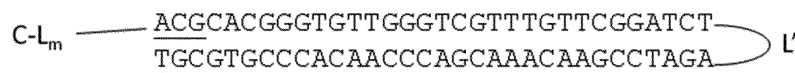
- C - L<sub>m</sub> が、10 - O - [1 - プロピル - 3 - N - カルバモイルコレステリル] - トリエチレングリコール基又は 13 - O - [1 - プロピル - 3 - N - カルバモイルコレステリル] - テトラエチレングリコール基である

を有する、請求項 1 記載の医薬組成物。

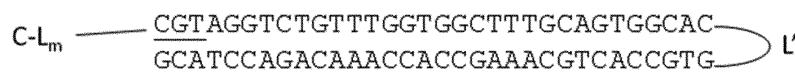
【請求項 3】

該核酸分子が、下記式：

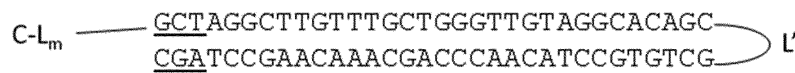
【化 19】



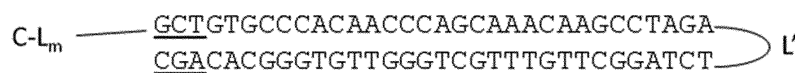
(la), 配列番号: 6;



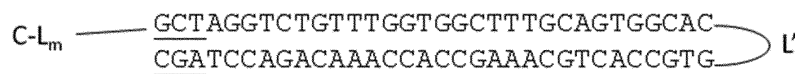
(lb), 配列番号: 7;



(lc), 配列番号: 8;



(ld), 配列番号: 9 及び



(le), 配列番号: 10

[ 式中、

下線を引いたヌクレオチドが、ホスホロチオアート又はメチルホスホナート骨格を有し又は有さないヌクレオチドを意味し、リンカー L' が、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート (T4) 及び 1, 19 - ビス (ホスホ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択され、m が、1 であ

10

20

30

40

50

り、Lが、カルボキサミドオリゴエチレングリコールであり、及びCが、ジオレイル、オクタデシル、葉酸、トコフェロール及びコレステロールからなる群より選択されるか又はC-Lmが、10-O-[1-プロピル-3-N-カルバモイルコレステリル]-トリエチレングリコール基又は13-O-[1-プロピル-3-N-カルバモイルコレステリル]-テトラエチレングリコール基である]

で示されるものを有し、

ここで、該核酸分子は、エンドソーム分解剤、特にクロロキンの投与を何ら組み合わせることなく使用され、

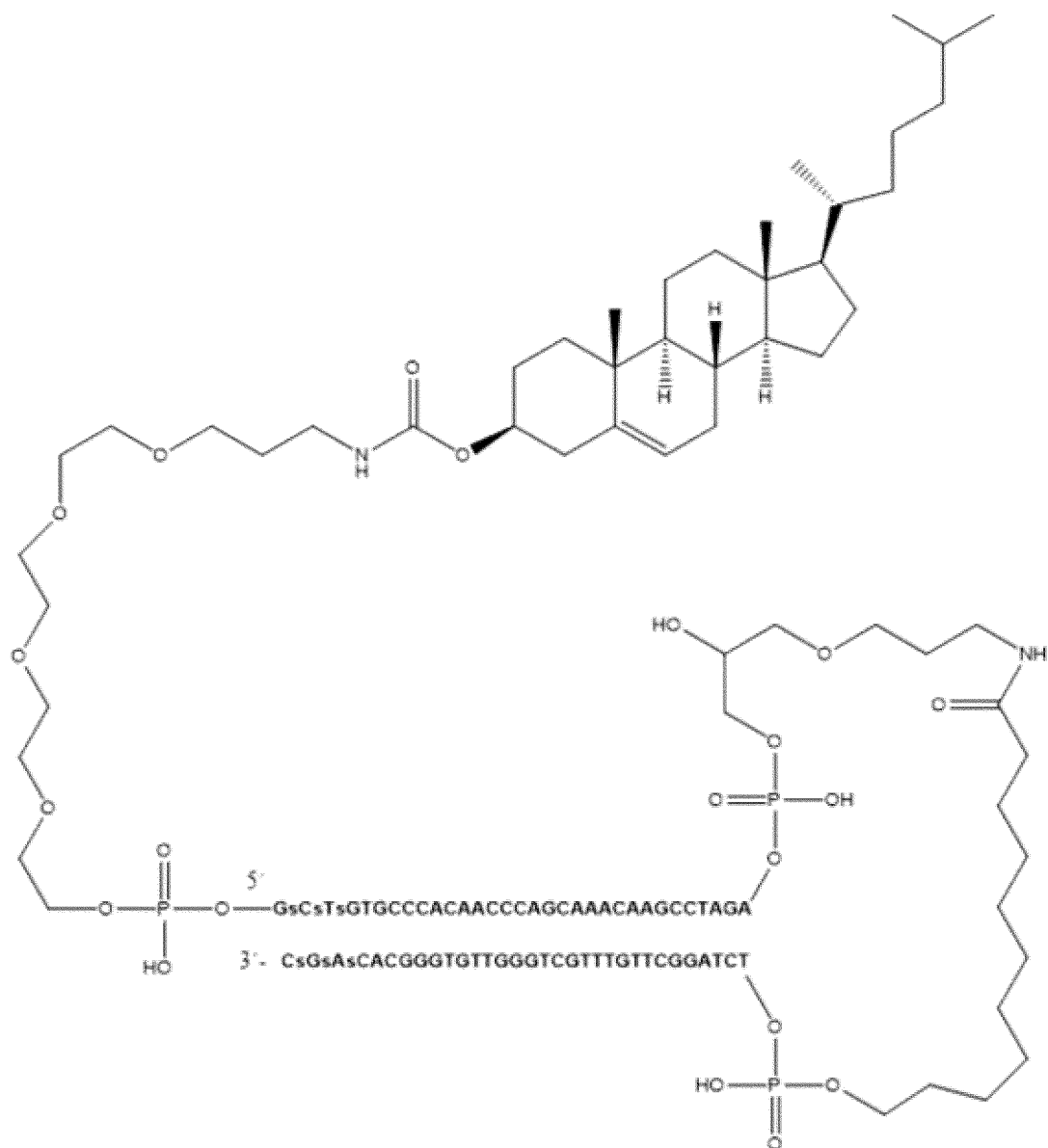
ここで、該核酸分子は、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与される、

請求項1又は2記載の医薬組成物。

【請求項4】

該核酸分子が、

【化20】



である、請求項1～3のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項5】

該核酸分子が、静脈内経路により投与される、請求項1～4のいずれか一項記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

n が、27 である、請求項 7 記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

該核酸分子が、放射線療法及び/又は化学療法との組み合わせで使用される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の医薬組成物。

## 【請求項 8】

該核酸分子が、DNA 傷害剤との組み合わせで使用される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

該 DNA 傷害剤が、オキサリプラチン、カルボプラチン及びシスプラチンからなる群より選択される、請求項 8 記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、腫瘍学の分野に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

乳ガンは、最も一般的な女性の悪性腫瘍であり、毎年世界中で 170 万人超の新たな症例が診断されている (Torre, Siegel, Ward, & Jemal, 2015)。分子分類から、乳ガンは、3つの主なサブグループ: Luminal A/B、HER2<sup>+</sup> 及び基底細胞様/トリプルネガティブ乳ガン (TNBC) に分けられる (Vuong, Simpson, Green, Cummings, & Lakhani, 2014)。トリプルネガティブ乳ガン (TNBC) は、処置の選択肢が限られており、標準的な化学療法計画後の進行により非常に乏しい予後となる、侵襲性の組織学的亜型である。現在の標準的な治療、例えば、アントラサイクリン又はタキサンに対する抵抗性により、転移性 TNBC を有する先に処置された患者に利用できる選択肢は、少数の非交差抵抗性計画に限られ、現在、好ましい標準的な化学療法は存在していない。プラチナ系計画は、BRCA1 変異を有する TNBC 患者についての新たな選択肢である。

## 【0003】

化学療法抵抗性は、ガン処置の有効性に対する主な障害を引き起こす。DNA 修復が、化学療法剤により染色体上に引き起こされる傷害を除去することによる化学療法抵抗性において重要な役割を果たし、DNA 修復経路の阻害剤は、これらの処置に対する腫瘍感受性を回復させるための新たな機会を提供する可能性がある。

## 【0004】

Dbait 分子は、ガン細胞において誤った DNA 傷害シグナル伝達をトリガーする新たな分類の DNA 修復阻害剤である。これらの分子は、遊離した二本鎖平滑末端を有する短い二本鎖 DNA であり、重要な傷害シグナルトランスデューサー、例えば、DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) 及びポリ-ADP-リボ-ポリメラーゼをターゲットにし、その活性化をトリガーし、誤った傷害シグナル伝達を増幅させる。その結果として、下流の DNA 修復酵素のリクルートメントが損なわれ、複数の DNA 修復経路、例えば、相同性組換え、非相同性末端結合、塩基除去修復及び一本鎖切断修復を阻害し、細胞死を引き起こす未修復障害の蓄積をもたらす。

## 【0005】

Dbait 分子は、in vitro 及び in vivo の両方において、複数の放射線抵抗性腫瘍における放射線療法との組み合わせにおいて有効であることが示されてきた。細胞取込み効率を向上させるために、Dbait 分子は、コレステロール部分を 5'-端に共有結合させることにより改変された (DT01) (WO 第 2011/161075 号; Berthault et al, 2011, Cancer gene therapy, 18, 695-706)。放射線療法と関連付けられた腫瘍内投与による DT01 の局所投与により、異種移植されたヒトメラノーマモデルの生存が向上することが証明されている (Biau et al, 2014, Neoplasia, 16, 835-844)。しかしながら、今日、単独又は化学療法との組み合わせでの DT01 の全身投与

10

20

30

40

50

の有効性は調査されていない。

【 0 0 0 6 】

しかしながら、補助療法としての D T 0 1 により、ウサギの V X 2 肝臓腫瘍モデルにおいて、経動脈的化学塞栓療法 ( T A C E ) の治療有効性が向上されることが示されている ( Devun et al, Journal of Vascular and Interventional Radiology, 2013, 24, 1080 ) が、 T A C E におけるその有益な効果は、2つの主なメカニズムによりもたらされる。第一に、肝臓内のほとんどの腫瘍は、適切な肝動脈により供給されるため、動脈塞栓療法は、優先的に、腫瘍への血液供給を中断させ、血管新生まで成長を停止させる。第二にかつ最も重要に、化学療法の集中投与により、組織へのより高用量の送達が可能となる一方で、同時に全身暴露を減少させることができる。同減少は、典型的には、用量制限要因である。

10

【 0 0 0 7 】

更に、D T 0 1 分子は、エンドソーム分解剤、例えば、クロロキンとの組み合わせで使用されるのに設計された。クロロキンは、エンドソームから細胞質への c o D b a i t の放出を促進し、必須であると記載されている。このため、c o D b a i t がクロロキンの存在下で皮下及び腫瘍内注射により投与されたこと、及び、c o D b a i t 取込み及び有効性を向上させ、c o D b a i t による異種移植された腫瘍の放射線感受性を向上させるために、同時クロロキン処置がプロトコルに加えられたことが示された ( Schlegel et al, 2012, Molecular Therapy-Nucleic Acids, 1, e33 ) 。

20

【 0 0 0 8 】

一部のガン、特に、放射線抵抗性又は化学療法抵抗性ガン、例えば、トリプルネガティブ乳ガン ( T N B C ) は、処置するのが困難なままであり、それらの処置における何らかの改善が重要であることが、更に注目されるべきである。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

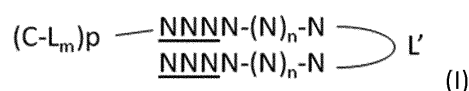
驚くべきことに、本発明者らは、D b a i t 分子、特に、コレステロールにコンジュゲートさせた c o D B a i t と呼ばれる分子を、全身投与、特に、腹腔内及び静脈内投与により、キノリンエンドソーム分解剤、特に、クロロキンを何ら使用することなく、ガン、抵抗性ガンをも処置するのに効率的に使用することができることを観察した。実際に、これらの投与経路によるのと同じ有効性は、2 ~ 5 倍高い用量でのみ得ることができ、コン

30

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明は、ガンを処置するのに使用するための核酸分子であって、  
該核酸分子は、下記式：

【 化 1 】



40

[ 式中、

N は、デオキシヌクレオチドであり、n は、15 ~ 195 の整数であり、下線を引いた N は、改変ホスホジエステル骨格を有し又は有さないヌクレオチドを意味し、L' は、リンカーであり、C は、脂溶性分子又はレセプター媒介性エンドサイトーシスを可能にする細胞レセプターをターゲットにするリガンドから選択されるエンドサイトーシスを促進する分子であり、L は、リンカーであり、m は、0 又は 1 である整数であり、p は、1 である ]

で示されるものを有し、

ここで、該核酸は、エンドソーム分解剤の投与を何ら組み合わせることなく使用され、  
ここで、該核酸は、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与さ

50

れる、  
核酸分子に関する。

【 0 0 1 1 】

好ましくは、式 ( I ) で示される核酸は、 1 つ又は複数の下記特徴：

- N が、 A ( アデニン )、 C ( シトシン )、 T ( チミン ) 及び G ( グアニン ) からなる群より選択され、 C p G ジヌクレオチドの発生を避け、ヒトゲノムにおける任意の遺伝子に対する 8 0 % 未満の配列同一性を有するように選択されるデオキシヌクレオチドであり、及び / 又は

- 連結している L ' が、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート ( T 4 ) 及び 1 , 1 9 - ビス ( ホスホ ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択され、及び / 又は

- m が、 1 であり、 L が、カルボキサミドポリエチレングリコール、より好ましくは、カルボキサミドトリエチレン又はテトラエチレングリコールであり、及び / 又は

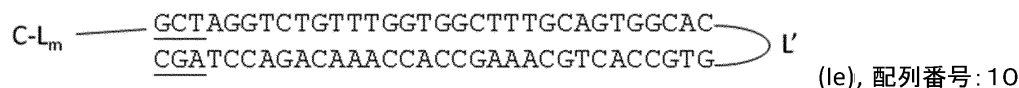
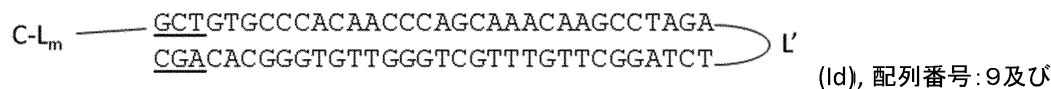
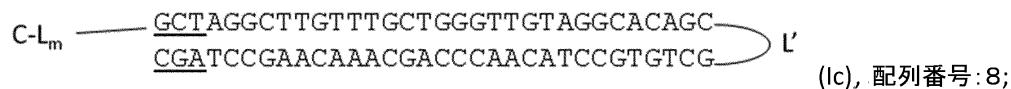
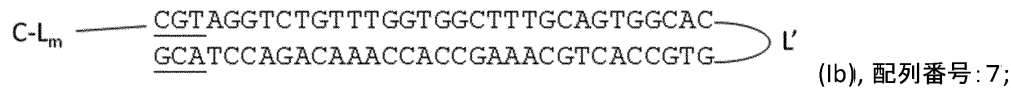
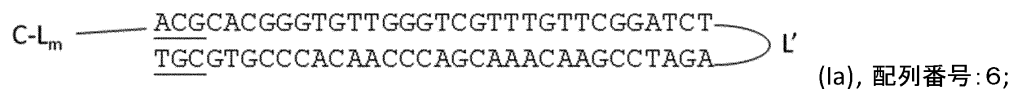
- C が、コレステロール、一本鎖もしくは二本鎖脂肪酸、例えば、オクタデシル、オレイン酸、ジオレイルもしくはステアリン酸、又は細胞レセプターをターゲットにするリガンド ( ペプチド、タンパク質、アプタマーを含む )、例えば、葉酸、トコフェロール、糖、例えば、ガラクトース及びマンノース並びにそのオリゴ糖、ペプチド、例えば、 R G D 及びボンベシン、並びにタンパク質、例えば、トランスフェリン及びインテグリンからなる群より選択され、好ましくは、コレステロール又はトコフェロール、更により好ましくは、コレステロールである

を有する。

【 0 0 1 2 】

より好ましくは、該核酸分子は、下記式：

【 化 2 】



[ 式中、

下線を引いたヌクレオチドが、ホスホロチオアート又はメチルホスホナート骨格を有し又は有さないヌクレオチドを意味し、連結している L ' が、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート ( T 4 ) 及び 1 , 1 9 - ビス ( ホスホ ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択され、 m が、 1 であり、 L が、カルボキサミドオリゴエチレングリコールであり、 C が、ジオレイル、オクタデシル、葉酸、トコフェロール及びコレステロールからなる群より選択される ] で示されるものを有し、

ここで、該核酸が、エンドソーム分解剤、特に、クロロキンの投与を何ら組み合わせる

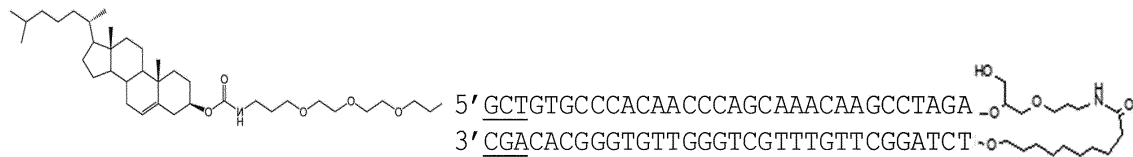
ことなく使用され、

ここで、該核酸が、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与される。

【 0 0 1 3 】

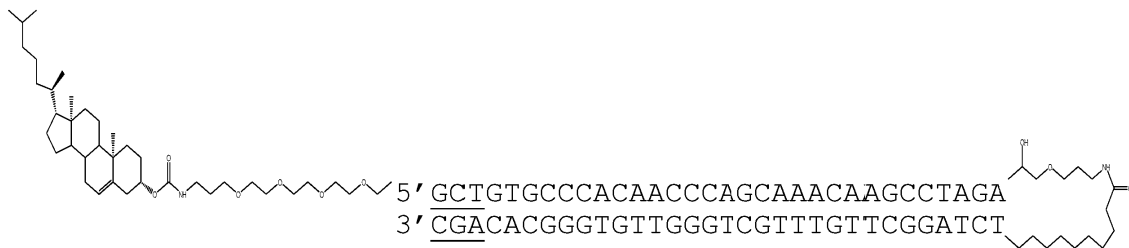
更により好ましくは、該核酸は、

【 化 3 】



10

又は



20

[ 式中、下線を引いたヌクレオチドは、ホスホロチオアート骨格を有するヌクレオチドを意味する ]

である。

【 0 0 1 4 】

好ましくは、該核酸は、静脈内経路により投与され、例えば、注射、静脈点滴、ポース又はポンプにより投与される。

【 0 0 1 5 】

好ましくは、ガンは、放射線抵抗性又は化学療法抵抗性ガンである。より好ましくは、ガンは、トリプルネガティブ乳ガン ( T N B C ) 、化学療法抵抗性肝細胞ガン ( H C C ) 、化学療法抵抗性卵巣ガン、化学療法抵抗性肺ガン及び転移性肝臓ガンからなる群より選択される。特定の実施態様では、ガンは、ドキソルピシン - 抵抗性肝細胞ガン ( H C C ) 、プラチナ抵抗性卵巣ガン、プラチナ抵抗性トリプルネガティブ乳ガン及び直腸結腸肝臓転移からなる群より選択される。

30

【 0 0 1 6 】

好ましくは、該核酸は、放射線療法及び / 又は化学療法との組み合わせで使用される。一実施態様において、該核酸は、DNA 傷害剤との組み合わせで使用される。好ましくは、DNA 傷害剤は、トポイソメラーゼ I 又は II 阻害剤、DNA 架橋剤、DNA アルキル化剤、代謝拮抗剤及び紡錘体阻害剤からなる群より選択される。より好ましくは、該核酸は、ドキソルピシン、オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン及び 5 - F U からなる群より選択される化学療法との組み合わせで使用される。

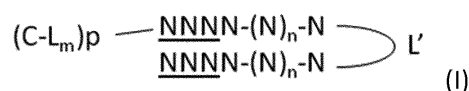
40

【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

本発明は、ガンを処置するのに使用するための核酸分子 ( c o D B a i t ) であって、該核酸分子は、下記式：

【 化 4 】



[ 式中、

50

Nは、デオキシヌクレオチドであり、nは、1～195の整数であり、下線を引いたNは、改変ホスホジエステル骨格を有し又は有さないヌクレオチドを意味し、L'は、リンカーであり、Cは、脂溶性分子又はレセプター媒介性エンドサイトーシスを可能にする細胞レセプターをターゲットにするリガンドから選択されるエンドサイトーシスを促進する分子であり、Lは、リンカーであり、mは、0又は1である整数であり、pは、1である

」  
で示されるものを有し、

ここで、該核酸は、エンドソーム分解剤の投与を組み合わせることなく使用され、

ここで、該核酸は、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与される、

核酸分子に関する。

【0018】

キノリンエンドソーム分解剤の不存在が本明細書において言及される場合、キノリンエンドソーム分解剤は、WO第2011/161075号の第26～28頁（参照により本明細書に組み入れられる）で定義されたエンドソーム分解剤を意味する。特に、キノリンエンドソーム分解剤は、クロロキンである。特に、本明細書に記載された核酸は、任意のエンドソーム分解剤との同時、別々又は連続的使用のためのものではない。

【0019】

本発明は、

- 特に、キノリンエンドソーム分解剤の投与を組み合わせることなく、ガン処置に使用するための、本明細書で定義された核酸分子又はそれと場合により薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物（ここで、該医薬組成物は、場合により、放射線療法及び/又はDNA傷害性抗腫瘍剤との組み合わせで、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与される）、

- ガンを処置するための医薬を製造するための、本明細書で定義された核酸分子又はそれを含む医薬組成物の使用（ここで、該医薬は、任意のキノリンエンドソーム分解剤との組み合わせでは使用されず、場合により、放射線療法及び/又はDNA傷害性抗腫瘍剤との組み合わせで、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与される）

、  
- 対象におけるガンを処置するための方法であって、治療上有効量の本明細書で定義された核酸分子又はそれを含む医薬組成物を、キノリンエンドソーム分解剤を何ら投与することなく、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与することを含む、方法、

- 特に、キノリンエンドソーム分解剤の投与を組み合わせることなく、ガン処置に使用するための、本明細書で定義された核酸分子、DNA傷害性抗腫瘍剤及び薬学的に許容し得る担体を含む医薬組成物（ここで、該医薬組成物は、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与される）、

- ガンを処置するための医薬を製造するための、本明細書で定義された核酸分子及びDNA傷害性抗腫瘍剤を含む医薬組成物（ここで、該医薬は、任意のキノリンエンドソーム分解剤との組み合わせでは使用されず、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により投与される）、

- 対象におけるガンを処置するための方法であって、治療上有効量の、本明細書で定義された核酸分子及びDNA傷害性抗腫瘍剤を含む医薬組成物を、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により、キノリンエンドソーム分解剤を何ら投与することなく、場合により、放射線療法及び/又はDNA傷害性抗腫瘍剤との組み合わせで投与することを含む、方法、

- 特に、キノリンエンドソーム分解剤の投与と組み合わせることなく、ガン処置における同時、別々又は連続的な使用のための組み合わせ製剤としての、（a）本明細書で定義された核酸分子と、場合により、（b）DNA傷害性抗腫瘍剤とを含有する、製品又はキット（ここで、該医薬組成物は、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路によ

10

20

30

40

50



り投与される)、

- ガンの処置を必要とする対象におけるガンを処置するための方法であって、腹腔内及び静脈内経路から選択される非経口全身経路により、キノリンエンドソーム分解剤を何ら投与することなく、有効量の、本明細書で定義された核酸分子を含む医薬組成物と、有効量の、DNA傷害性抗腫瘍剤を含む医薬組成物とを投与することを含む、方法に関する。

#### 【0020】

本明細書で使用する場合、「キット」、「製品」又は「組み合わせ製剤」という用語は、特に、上記定義された組み合わせパートナーを、独立して、又は、該組み合わせパートナーの区別された量との種々の固定された組み合わせの使用により、すなわち、同時又は異なる時点で投与することができるという意味での「部品キット」を定義する。ついで、該部品キットの部品は、例えば、該部品キットの任意の部品について、同時に又は経時的に重ねて、すなわち、異なる時点及び等しい又は異なる時間間隔で投与することができる。組み合わせ製剤において投与される組み合わせパートナーの総量の比は変動させることができる。組み合わせパートナーは、同じ経路又は異なる経路により投与することができる。

10

#### 【0021】

本発明の文脈内において、処置という用語は、治癒的、症候的及び予防的処置を指す。本発明の医薬組成物、キット、製品及び組み合わせ製剤は、既存のガン又は腫瘍（初期又は後期段階の進行のガンを含む）を有するヒトに使用することができる。本発明の医薬組成物、キット、製品及び組み合わせ製剤は、ガンを有する患者を必ずしも治癒する必要はないであろうが、疾患の進行を遅延させもしくは遅くし、又は、疾患の更なる進行を予防し、それにより、患者の症状を改善するであろう。特に、本発明の医薬組成物、キット、製品及び組み合わせ製剤は、腫瘍の進行を減少させ、腫瘍量を減少させ、哺乳類ホストにおける腫瘍退縮を生じさせ、及び/又は、転移の発生及びガンの再発を予防する。ガンの処置において、本発明の医薬組成物は、治療上有効量で投与される。

20

#### 【0022】

「治療上有効量」は、単独又は医薬組成物、キット、製品又は組み合わせ製剤の他の有効成分との組み合わせで、ヒトを含む哺乳類におけるガンの有害作用を予防し、除去し、又は減少させる本発明の医薬組成物の量を意味する。投与される用量は、単独又はここで記載された組み合わせ以外の他の処置との組み合わせにおいて使用される各化合物について定義する「治療上有効量」に対して、該組成物における各化合物について少なくすることができると理解される。該組成物の「治療上有効量」は、患者、病理、投与モード等に従って、当業者により採用されるであろう。

30

#### 【0023】

本明細書全体を通して、「ガンの処置」等は、本発明の医薬組成物を関して言及され、a) ガンを処置するための方法であって、前記方法は、このような処置を必要とする対象に、本発明の医薬組成物を投与することを含む、方法；b) ガンを処置するための本発明の医薬組成物の使用；c) ガンを処置するための医薬の製造のための本発明の医薬組成物の使用及び/又はd) ガンの処置に使用するための本発明の医薬組成物を意味する。

40

#### 【0024】

本明細書において企図される医薬組成物は、有効成分に加えて、薬学的に許容し得る担体を含むことができる。「薬学的に許容し得る担体」という用語は、有効成分の生体活性の有効性と干渉せず、投与されるホストに対して毒性でない、任意の担体（例えば、支持体、物質、溶媒等）を包含するのを意味する。例えば、非経口投与のために、有効成分は、媒体、例えば、生理食塩水、デキストロース溶液、血清アルブミン及びリンゲル液中に、注射用の単位投与形態に配合することができる。

#### 【0025】

該医薬組成物は、薬学的に適合し得る溶媒中の液剤として、又は、適切な薬学的溶媒もしくは媒体中の乳剤、懸濁剤もしくは分散剤として、当技術分野において公知の方法で配

50

合することができる。非経口投与に適した製剤は、都合良く、好ましくは、レシピエントの血液と等張性の、有効成分の無菌の油性又は水性製剤を含む。このような製剤は全て、他の薬学的に適合し得る非毒性の補助剤、例えば、安定剤、酸化防止剤、バインダー、染料、乳化剤又は着香物質も含有することができる。本発明の製剤は、有効成分を薬学的に許容し得る担体、したがって、場合により、他の治療成分との関連付けにおいて含む。担体は、該製剤の他の成分と適合性であり、かつ、そのレシピエントに対して有害で無いという意味において「許容し得る」必要がある。該医薬組成物は、適切な無菌溶液の注射又は静脈内注入により有利に適用される。これらの化学療法剤のほとんどの安全で効果的に投与するための方法は、当業者に公知である。加えて、その投与は、標準的な文献に記載されている。

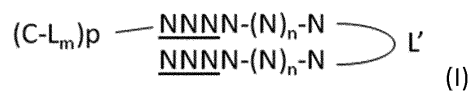
10

## 【 0 0 2 6 】

c o D B a i t と呼ばれるコンジュゲート D b a i t 分子

本発明に使用するための D b a i t 分子は、下記式：

## 【 化 5 】



[ 式中、Nは、ヌクレオチドであり、nは、少なくとも1の整数であり、下線を引いたNは、改変ホスホジエステル骨格を有し又は有さないヌクレオチドを意味し、L'は、リンカーであり、Cは、エンドサイトーシスを促進する分子であり、Lは、リンカーであり、mは、0又は1である整数であり、pは、1であり、好ましくは、下線を引いたNは、改変ホスホジエステル骨格を有するヌクレオチドを意味する ]

20

により記載することができる。

## 【 0 0 2 7 】

好ましい実施態様では、式 ( I ) で示される分子は、1つ又は複数の下記特徴：

- Nは、好ましくは、A ( アデニン )、C ( シトシン )、T ( チミン ) 及び G ( グアニン ) からなる群より選択され、C p Gジヌクレオチドの発生を避け、ヒトゲノムにおける任意の遺伝子に対する80%又は70%未満、更に60%又は50%未満の配列同一性を有するように選択されるデオキシヌクレオチドであり、及び/又は

30

- nは、15 ~ 195、15 ~ 95、19 ~ 95、21 ~ 95、27 ~ 95、15 ~ 45、19 ~ 45、21 ~ 45又は27 ~ 45の整数であり、特に好ましい実施態様では、nは、27であり、及び/又は

- 下線を引いたNは、ホスホロチオアート又はメチルホスホナート骨格、より好ましくは、ホスホロチオアート骨格を有し又は有さないヌクレオチドを意味し、好ましくは、下線を引いたNは、改変ホスホジエステル骨格を有するヌクレオチドを意味し、及び/又は

- 連結しているL'は、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート ( T 4 ) 及び1, 19 - ビス ( ホスホ ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択され、及び/又は

- mは、1であり、Lは、カルボキサミドポリエチレングリコール、より好ましくは、カルボキサミドトリエチレン又はテトラエチレングリコールであり、及び/又は

40

- Cは、コレステロール、一本鎖もしくは二本鎖脂肪酸、例えば、オクタデシル、オレイン酸、ジオレイルもしくはステアリン酸、又は細胞レセプターをターゲットにするリガンド ( ペプチド、タンパク質、アプタマーを含む )、例えば、葉酸、トコフェロール、糖、例えば、ガラクトース及びマンノース並びにそのオリゴ糖、ペプチド、例えば、RGD及びボンベシン、並びにタンパク質、例えば、トランスフェリン及びインテグリンからなる群より選択され、好ましくは、コレステロール又はトコフェロール、更により好ましくは、コレステロールである

を有する。

## 【 0 0 2 8 】

50

好ましくは、C - L mは、トリエチレングリコールリンカー（10 - O - [ 1 - プロピル - 3 - N - カルバモイルコレステリル ] - トリエチレングリコール基である。代替的に、C - L mは、テトラエチレングリコールリンカー（13 - O - [ 1 - プロピル - 3 - N - カルバモイルコレステリル ] - テトラエチレングリコール基である。

#### 【0029】

特定の実施態様では、該核酸分子は、D b a i t分子、例えば、WO第2005/040378号、同第2008/034866号及び同第2008/084087号に広く記載されたものであることができる。同文献の開示は、参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0030】

D b a i t分子は、その治療活性に必要な数多くの特徴、例えば、その最短長、少なくとも1つの遊離端の存在及び二本鎖部分、好ましくは、DNA二本鎖部分の存在により定義することができる。以下で検討されるであろうように、同特徴は、D b a i t分子の正確なヌクレオチド配列がその活性に影響を及ぼさないことに言及するのに重要である。更に、D b a i t分子は、改変及び/又は非天然骨格を含有することができる。

#### 【0031】

好ましくは、D b a i t分子は、非ヒト起源のものであり（すなわち、そのヌクレオチド配列及び/又はコンホメーション（例えば、ヘアピン）がヒト細胞には存在しない）、最も好ましくは、合成起源のものである。D b a i t分子の配列がほとんど役割を果たさないとするなら、D b a i t分子は、好ましくは、公知の遺伝子、プロモーター、エンハンサー、5' - 又は3' - 上流配列、エキソン、イントロン等に対する相当な度合いの配列相同性又は同一性を有さない。すなわち、D b a i t分子は、ヒトゲノムにおける任意の遺伝子に対する80%又は70%未満、更に60%又は50%未満の配列同一性を有する。配列同一性を決定する方法は、当技術分野において周知であり、例えば、Blastを含む。D b a i t分子は、ストリンジェントな条件下では、ヒトゲノムDNAとハイブリダイズしない。典型的なストリンジェントな条件は、それらが、部分的に相補な核酸から、完全に相補な核酸の識別を可能にする。

#### 【0032】

加えて、D b a i t分子の配列は、周知のT o l l様レセプター媒介性免疫反応を避けるために、好ましくは、C p Gを避ける。

#### 【0033】

D b a i t分子の長さは、K u及びDNA - P K c sタンパク質を含むK uタンパク質複合体の適切な結合を可能にするのに十分である限り変動させることができる。D b a i t分子の長さは、このようなK u複合体に結合し、DNA - P K c sを活性化させるのを確保するために、20bp超、好ましくは、約32bpであるべきであることが示されている。好ましくは、D b a i t分子は、20～200bp、より好ましくは、24～100bp、更により好ましくは、26～100、及び最も好ましくは、24～200、25～200、26～200、27～200、28～200、30～200、32～200、24～100、25～100、26～100、27～100、28～100、30～100、32～200又は32～100bpを含む。例えば、D b a i t分子は、24～160、26～150、28～140、28～200、30～120、32～200又は32～100bpを含む。「bp」は、分子が示された長さの二本鎖部分を含むことを意図している。

#### 【0034】

特定の実施態様では、少なくとも32bp又は約32bpの二本鎖部分を有するD b a i t分子は、D b a i t 32（配列番号：1）、D b a i t 32 H a（配列番号：2）、D b a i t 32 H b（配列番号：3）、D b a i t 32 H c（配列番号：4）又はD b a i t 32 H d（配列番号：5）と同じヌクレオチド配列を含む。場合により、D b a i t分子は、D b a i t 32、D b a i t 32 H a、D b a i t 32 H b、D b a i t 32 H c又はD b a i t 32 H dと同じヌクレオチド組成を有するが、そのヌクレオチド配列は異なる。ついで、D b a i t分子は、3A、6C、12G及び11Tを有する二本鎖部分の一

10

20

30

40

50

方の鎖を含む。好ましくは、D b a i t 分子の配列は、C p G ジヌクレオチドを何ら含有しない。

【 0 0 3 5 】

代替的には、二本鎖部分は、D b a i t 3 2 (配列番号：1)、D b a i t 3 2 H a (配列番号：2)、D b a i t 3 2 H b (配列番号：3)、D b a i t 3 2 H c (配列番号：4)又はD b a i t 3 2 H d (配列番号：5)の少なくとも16、18、20、22、24、26、28、30又は32個の連続的なヌクレオチドを含む。より特定の実施態様では、二本鎖部分は、D b a i t 3 2 (配列番号：1)、D b a i t 3 2 H a (配列番号：2)、D b a i t 3 2 H b (配列番号：3)、D b a i t 3 2 H c (配列番号：4)又はD b a i t 3 2 H d (配列番号：5)の20、22、24、26、28、30又は32個の連続的なヌクレオチドからなる。

10

【 0 0 3 6 】

本明細書で開示された核酸は、D S B の模倣として、少なくとも1つの遊離端を有する必要がある。

【 0 0 3 7 】

特定の実施態様では、それらは、1つのみの自由端を含有する。好ましくは、D b a i t 分子は、二本鎖DNAステム及びループを有するヘアピン核酸で構成される。ループは、当業者に公知の核酸もしくは他の化学基又はそれらの混合物であり得る。ヌクレオチドリinkerは、2～10個のヌクレオチド、好ましくは、3、4又は5個のヌクレオチドを含むことができる。非ヌクレオチドリinkerは、非排他的に、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素又は他のポリマー化合物(例えば、オリゴエチレングリコール、例えば、2～10個のエチレングリコール単位、好ましくは、4、5、6、7又は8個のエチレングリコール単位を有するもの)を含む。好ましいリinkerは、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート(T4)及び他のリinker、例えば、1,19-ビス(ホスホ)-8-ヒドラザ-2-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンからなる群より選択される。したがって、特定の実施態様では、D b a i t 分子は、D b a i t 3 2 (配列番号：1)、D b a i t 3 2 H a (配列番号：2)、D b a i t 3 2 H b (配列番号：3)、D b a i t 3 2 H c (配列番号：4)又はD b a i t 3 2 H d (配列番号：5)の少なくとも16、18、20、22、24、26、28、30又は32個の連続的なヌクレオチドを含む二本鎖部分又はステムと、ヘキサエチレングリコールリinker、テトラデオキシチミジラートリinker(T4)又は1,19-ビス(ホスホ)-8-ヒドラザ-2-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンであるループとを有するヘアピン分子であることができる。より特定の実施態様では、そのようなD b a i t 分子は、D b a i t 3 2 (配列番号：1)、D b a i t 3 2 H a (配列番号：2)、D b a i t 3 2 H b (配列番号：3)、D b a i t 3 2 H c (配列番号：4)又はD b a i t 3 2 H d (配列番号：5)の20、22、24、26、28、30又は32個の連続的なヌクレオチドからなる二本鎖部分を有することができる。

20

30

【 0 0 3 8 】

D b a i t 分子は、好ましくは、2'-デオキシヌクレオチド骨格を含み、場合により、1つ又は複数の(2、3、4、5又は6個の)改変ヌクレオチド並びに/又はアデニン、シトシン、グアニン及びチミン以外の核酸塩基を含む。したがって、D b a i t 分子は、本質的に、DNA構造である。特に、D b a i t 分子の二本鎖部分又はステムは、デオキシリボヌクレオチドで構成される。

40

【 0 0 3 9 】

好ましいD b a i t 分子は、特に、それらを分解から保護するために、1つ又は複数の化学改変ヌクレオチド又は基を、一方の鎖又は両鎖の端部に含む。特定の好ましい実施態様では、D b a i t 分子の遊離端は、一方の鎖又は両鎖の端部における1つ、2つ又は3つの改変ホスホジエステル骨格により保護される。好ましい化学基、特に、改変ホスホジエステル骨格は、ホスホロチオアートを含む。代替的に、好ましいD b a i t は、3'-

50

3'ヌクレオチド結合又はメチルホスホナート骨格を有するヌクレオチドを有する。他の改変骨格は、当技術分野において周知であり、ホスホラミダート、モルホリノ核酸、2'-O, 4'-C-メチレン/エチレン架橋ロックド核酸、ペプチド核酸(PNA)及び可変長の短鎖アルキルもしくはシクロアルキル糖間結合又は短鎖ヘテロ原子もしくは複素環糖間結合、又は当業者に公知の任意の改変ヌクレオチドを含む。第1の好ましい実施態様では、Dbait分子は、一方の鎖又は両鎖の端部における1つ、2つ、又は3つの改変ホスホジエステル骨格により、より好ましくは、少なくとも3'端、更により好ましくは、5'端及び3'端の両方における3つの改変ホスホジエステル骨格(特に、ホスホロチオアート又はメチルホスホナート)により保護された遊離端を有する。

#### 【0040】

10

最も好ましい実施態様では、Dbait分子は、32bpのDNA二本鎖部分又はステム(例えば、配列番号:1~5、特に、配列番号:4からなる群より選択される配列を有する)と、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート(T4)及び1,19-ビス(ホスホ)-8-ヒドラザ-2-ヒドロキシ-4-オキサ-9-オキソ-ノナデカンからなる群より選択されるリンカーを含み又はからなる、DNA二本鎖部分又はステムの2つの鎖を連結しているループと、3つの改変ホスホジエステル骨格(特に、ホスホロチオアートヌクレオチド間結合)を有するDNA二本鎖部分又はステムの遊離端(すなわち、ループの反対側)とを含むヘアピン核酸分子である。

#### 【0041】

前記核酸分子は、化学合成、半生合成又は生合成、任意の増幅法、続けて、任意の抽出及び前調製法及び任意の化学改変により調製される。リンカーは、標準的な核酸化学合成により組み込み可能なように提供される。

20

#### 【0042】

より好ましくは、核酸分子は、特別に設計された収束合成により製造される。2つの相補鎖が適切なリンカー前駆体の組み込みを伴い、それらの精製後に、それらは互いに共有結合される標準的な核酸化学合成により調製される。

#### 【0043】

エンドサイトーシスを促進する分子は、Dbait分子に、好ましくは、リンカーを介してコンジュゲートされる。当技術分野において公知の任意のリンカーが、エンドサイトーシスを促進する分子をDbait分子に共有結合させるのに使用することができる。例えば、WO第09/126933号の第38~45頁には、都合の良いリンカーの広いレビューが提供されている。リンカーは、非排他的に、脂肪族鎖、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素又は他のポリマー化合物(例えば、オリゴエチレングリコール、例えば、2~10個のエチレングリコール単位、好ましくは、3、4、5、6、7又は8個のエチレングリコール単位、更により好ましくは、6個のエチレングリコール単位を有するもの)であることができ、かつ、化学的又は酵素的方法により切断することができる任意の結合、例えば、ジスルフィド結合、保護されたジスルフィド結合、酸不安定性結合(例えば、ヒドラゾン結合)、エステル結合、オルトエステル結合、ホスホンアミド結合、生体開裂性ペプチド結合、アゾ結合又はアルデヒド結合を組み込むことができる。このような開裂性リンカーは、WO第2007/040469号の第12~14頁、同第2008/022309号の第22~28頁に詳述されている。

30

40

#### 【0044】

特定の実施態様では、該核酸分子は、1つのエンドサイトーシスを促進する分子に連結することができる。代替的に、複数のエンドサイトーシスを促進する分子(例えば、2、3又は4つ)を、1つの核酸分子に取り付けることができる。

#### 【0045】

具体的な実施態様では、エンドサイトーシスを促進する分子、特に、コレステロールと核酸分子との間のリンカーは、 $\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n$ (式中、 $n$ は、1~10の整数であり、好ましくは、 $n$ は、3、4、5及び6からなる群より選択される)

50

である。非常に特定の実施態様では、リンカーは、 $\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_4$  (カルボキサミドテトラエチレングリコール) 又は  $\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_3$  (カルボキサミドトリエチレングリコール) である。リンカーは、核酸分子に、該核酸分子の活性を改変させない任意の都合の良い位置に連結することができる。特に、リンカーは、5' 端に連結させることができる。したがって、好ましい実施態様では、企図されるコンジュゲート *D b a i t* 分子は、ヘアピン構造を有し、エンドサイトーシスを促進する分子に、好ましくは、リンカーを介して、その 5' 端においてコンジュゲートしている *D b a i t* 分子である。

#### 【0046】

別の具体的な実施態様では、エンドサイトーシスを促進する分子、特に、コレステロールと核酸分子との間のリンカーは、ジアルキル-ジスルフィド {例えば、 $(\text{CH}_2)_r-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_s$  (ここで、 $r$  及び  $s$  は、1 ~ 10、好ましくは、3 ~ 8、例えば、6 の整数である) } である。

#### 【0047】

最も好ましい実施態様では、コンジュゲート *D b a i t* 分子は、32 bp の DNA 二本鎖部分又はステム (例えば、配列番号：1 ~ 5、特に、配列番号：4 からなる群より選択される配列を有する) と、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート (T4) 及び 1, 19-ビス (ホスホ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択されるリンカーを含む又はからなる DNA 二本鎖部分又はステムの 2 つの鎖を連結しているループと、3 つの改変ホスホジエステル骨格 (特に、ホスホロチオアートヌクレオチド間連結) を有する DNA 二本鎖部分又はステムの遊離端 (すなわち、ループの反対側) とを含むヘアピン核酸分子であり、前記 *D b a i t* 分子は、コレステロールにその 5' 端において、好ましくは、リンカー (例えば、カルボキサミドオリゴエチレングリコール、好ましくは、カルボキサミドトリエチレン又はテトラエチレングリコール) を介してコンジュゲートしている。

#### 【0048】

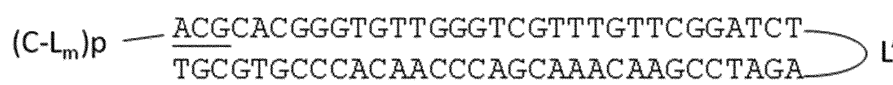
好ましい実施態様では、 $\text{NNNN}-(\text{N})_n-\text{N}$  は、*D b a i t* 32 (配列番号：1)、*D b a i t* 32 Ha (配列番号：2)、*D b a i t* 32 Hb (配列番号：3)、*D b a i t* 32 Hc (配列番号：4) もしくは *D b a i t* 32 Hd (配列番号：5) の少なくとも 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30 もしくは 32 個の連続的なヌクレオチドを含むか、又は、*D b a i t* 32 (配列番号：1)、*D b a i t* 32 Ha (配列番号：2)、*D b a i t* 32 Hb (配列番号：3)、*D b a i t* 32 Hc (配列番号：4) もしくは *D b a i t* 32 Hd (配列番号：5) の 20、22、24、26、28、30 もしくは 32 個の連続的なヌクレオチドからなる。特定の実施態様では、 $\text{NNNN}-(\text{N})_n-\text{N}$  は、*D b a i t* 32 (配列番号：1)、*D b a i t* 32 Ha (配列番号：2)、*D b a i t* 32 Hb (配列番号：3)、*D b a i t* 32 Hc (配列番号：4) もしくは *D b a i t* 32 Hd (配列番号：5)、より好ましくは、*D b a i t* 32 Hc (配列番号：4) を含むか、又は、これらからなる。

#### 【0049】

したがって、コンジュゲート *D b a i t* 分子又はヘアピン核酸分子は、

$\text{NNNN}-(\text{N})_n-\text{N}$  が配列番号：1 である場合、

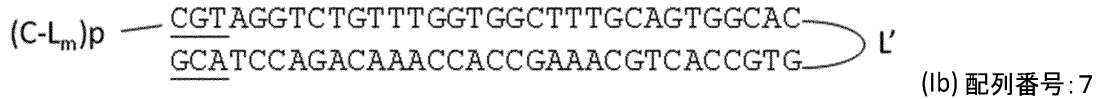
#### 【化 6】



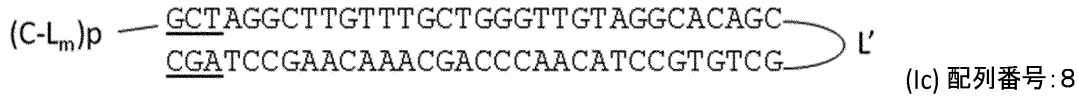
(Ia) 配列番号：6

$\text{NNNN}-(\text{N})_n-\text{N}$  が配列番号：2 である場合、

## 【化 7】

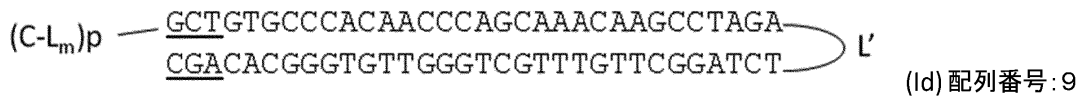


$\text{NNNN} - (N)_n - N$  が配列番号: 3 である場合、  
【化 8】

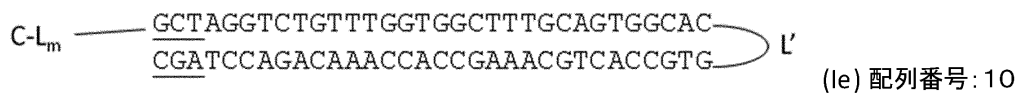


10

$\text{NNNN} - (N)_n - N$  が配列番号: 4 である場合、  
【化 9】



$\text{NNNN} - (N)_n - N$  が配列番号: 5 である場合、  
【化 10】



20

[ L、L'、C、p 及び m については、式 (I) と同じ定義を有する ]  
からなる群より選択することができる。

## 【0050】

好ましい実施態様では、式 (Ia)、(Ib)、(Ic)、(Id) 及び (Ie) で示される分子は、1 つ又は複数の下記特徴:

- 下線を引いたヌクレオチドが、ホスホロチオアート又はメチルホスホナート骨格、より好ましくは、ホスホロチオアート骨格を有し又は有さないヌクレオチドを意味し、好ましくは、下線を引いたヌクレオチドが、ホスホロチオアート又はメチルホスホナート骨格、より好ましくは、ホスホロチオアート骨格を有するヌクレオチドを意味し、及び/又は
- 連結している L' が、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート (T4) 及び 1, 19 - ビス (ホスホ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択され、及び/又は

30

- m が、1 であり、L が、カルボキサミドポリエチレングリコール、より好ましくは、カルボキサミドポリエチレン又はテトラエチレングリコールであり、及び/又は

- p が、1 であり、及び/又は

- C が、コレステロール、一本鎖もしくは二本鎖脂肪酸、例えば、オクタデシル、オレイン酸、ジオレイルもしくはステアリン酸、又は細胞レセプターをターゲットにするリガンド (ペプチド、タンパク質、アプタマーを含む)、例えば、葉酸、トコフェロール、糖、例えば、ガラクトース及びマンノース並びにそのオリゴ糖、ペプチド、例えば、RGD 及びボンベシン、並びにタンパク質、例えば、トランスフェリン及びインテグリンからなる群より選択され、好ましくは、コレステロールである

を有する。

40

## 【0051】

好ましくは、C - L<sub>m</sub> は、ポリエチレングリコールリンカー (10 - O - [1 - プロピル - 3 - N - カルバモイルコレステリル] - トリエチレングリコール基) 又はテトラエチレングリコールリンカー (13 - O - [1 - プロピル - 3 - N - カルバモイルコレステリル] - テトラエチレングリコール基) である。

50

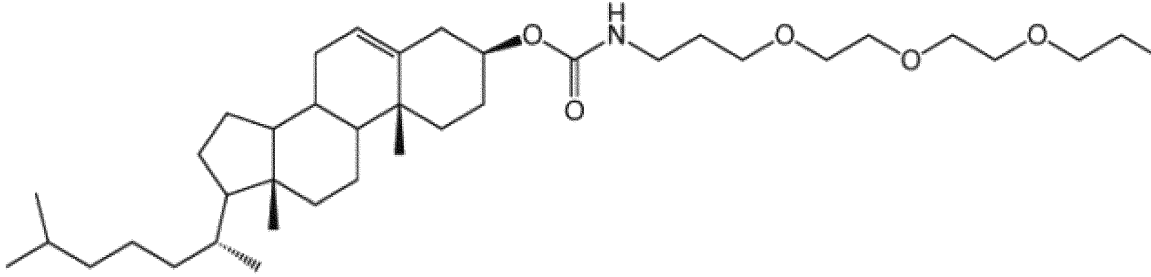
## 【 0 0 5 2 】

式 ( I )、( I a )、( I b )、( I c )、( I d ) 及び ( I e ) で示される D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子の具体的な実施態様では、L' は、好ましくは、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート ( T 4 ) 及び 1 , 1 9 - ビス ( ホスホ ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択される。

## 【 0 0 5 3 】

式 ( I )、( I a )、( I b )、( I c )、( I d ) 及び ( I e ) で示される D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子の具体的な実施態様では、C が、コレステロールである場合、C - L<sub>m</sub> は、基

## 【 化 1 1 】

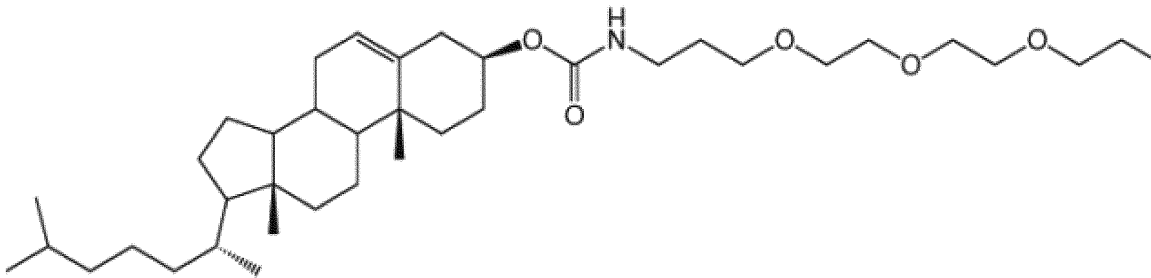


である。

## 【 0 0 5 4 】

好ましい実施態様では、コンジュゲート D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子は、( I )、( I a )、( I b )、( I c )、( I d ) 及び ( I e ) [ 式中、C - L<sub>m</sub> が、基

## 【 化 1 2 】



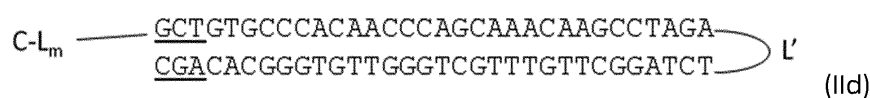
であり、ここで、L' が、好ましくは、ヘキサエチレングリコール、テトラデオキシチミジラート ( T 4 ) 及び 1 , 1 9 - ビス ( ホスホ ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカン、より好ましくは、1 , 1 9 - ビス ( ホスホ ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンからなる群より選択される]

からなる群より選される。

## 【 0 0 5 5 】

非常に具体的な実施態様では、D b a i t 分子又はヘアピン核酸分子は、下記式

## 【 化 1 3 】



[ 式中、

C - L<sub>m</sub> が、テトラエチレングリコールリンカー ( 1 3 - O - [ 1 - プロピル - 3 - N - カルバモイルコレステリル ] - テトラエチレングリコール基 ) であり、L' が、1 , 1 9

10

20

30

40

50

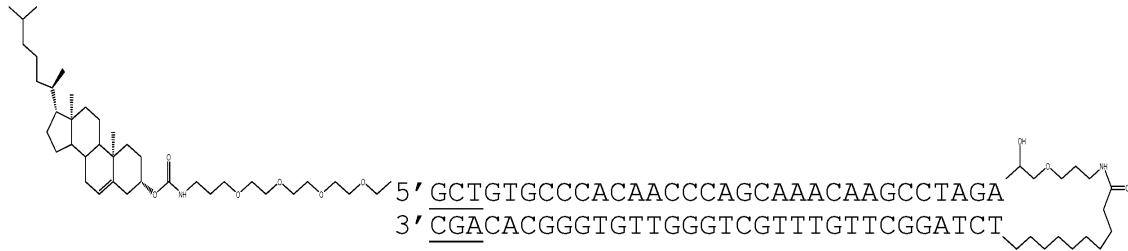


- ビス(ホスホ) - 8 - ヒドラザ - 2 - ヒドロキシ - 4 - オキサ - 9 - オキソ - ノナデカンであり、ここで、下線を引いたヌクレオチドが、ホスホロチオアート骨格を有する]を有する。

【0056】

したがって、該分子は、下記構造を有し、実施例セクションにおいて、「c o D b a i t」又は「D T 0 1」と呼ばれる。

【化14】

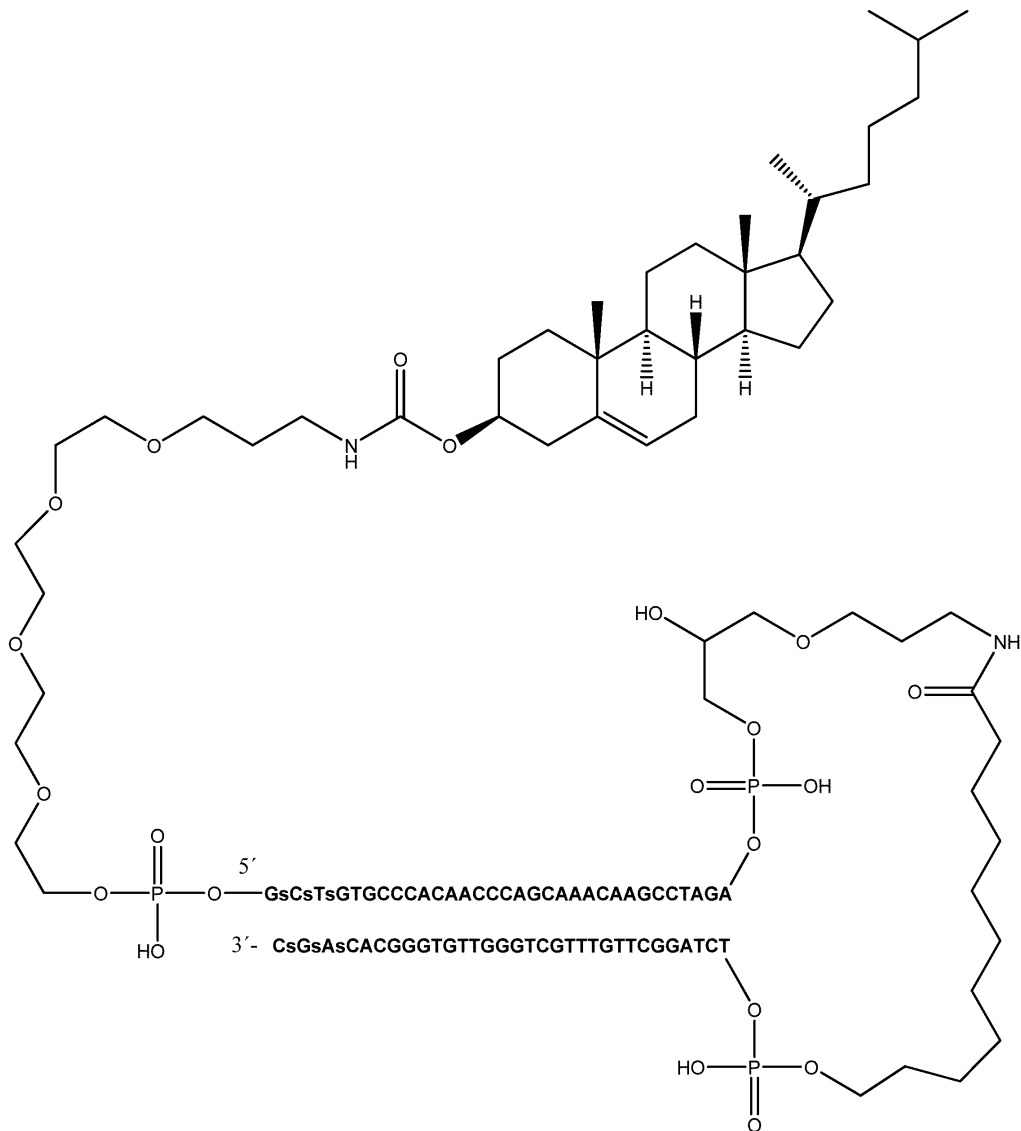


配列番号:11

【0057】

この分子の別の表現は、以下：

【化15】

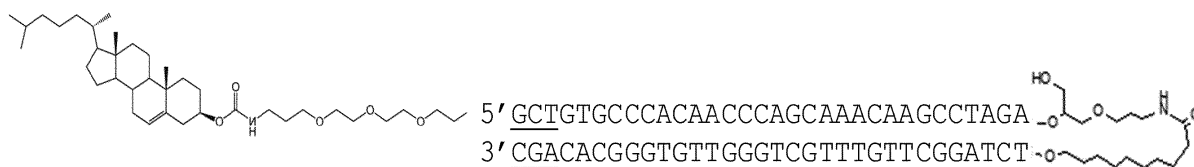


に示される。

## 【 0 0 5 8 】

代替的な分子は、下記：

## 【 化 1 6 】



配列番号:9

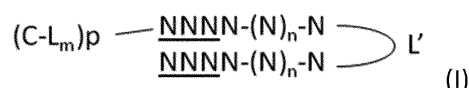
10

である。

## 【 0 0 5 9 】

別の好ましい実施態様では、該核酸分子は、下記式

## 【 化 1 7 】



[ 式中、Nは、デオキシヌクレオチドであり、nは、1～195の整数であり、下線を引いたNは、改変ホスホジエステル骨格を有し又は有さないヌクレオチドを意味し、L'は、リンカーであり、Cは、コレステロールであり、Lは、リンカーであり、mは、0又は1である整数であり、pは、1である ]

20

のものを有する。好ましくは、下線を引いたNは、改変ホスホジエステル骨格を有するヌクレオチドを意味する。

## 【 0 0 6 0 】

DNA 傷害処置

コンジュゲートD b a i t分子に加えて、処置は、抗腫瘍処置、好ましくは、DNA 傷害剤又は放射線療法による処置を更に含むこともできる。DNA 傷害処置は、放射線療法もしくはDNA - 傷害性抗腫瘍剤による化学療法又はそれらの組み合わせであることができる。

30

## 【 0 0 6 1 】

DNA 鎖開裂は、電離放射線により達成することができる（放射線療法）。放射線療法は、 $\alpha$ -線、X-線及び $\gamma$ 又は腫瘍細胞への放射性同位体の指向性を有する送達を含むが、これらに限定されない。他の放射線療法は、マイクロ波及びUV照射を含む。放射線療法への他のアプローチも、本発明において企図される。

## 【 0 0 6 2 】

DNA - 傷害性抗腫瘍剤は、好ましくは、トポイソメラーゼI又はII阻害剤、DNA 架橋剤、DNA アルキル化剤、代謝拮抗剤及び紡錘体阻害剤からなる群より選択される。

## 【 0 0 6 3 】

トポイソメラーゼI又はII阻害剤は、エトポシド、トポテカン、カンプトテシン、イリノテカン、アムサクリン、イントプリシン、アントラサイクリン、例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、イダヌルビシン及びミトキサントロンを含むが、これらに限定されない。トポイソメラーゼI又はII阻害剤は、イントプレシンを含むが、これに限定されない。好ましい実施態様では、DNA - 傷害性抗腫瘍剤は、ドキソルビシンである。

40

## 【 0 0 6 4 】

DNA 架橋剤は、シスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチンを含むが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、DNA - 傷害性抗腫瘍剤は、カルボプラチン及びオキサリプラチンからなる群より選択される。

## 【 0 0 6 5 】

50

代謝拮抗剤は、核酸合成を担う酵素を遮断し、又は、DNAに組み込まれる。同組み込みにより、不適切な遺伝子コードが生じ、アポトーシスがもたらされる。その非排他的な例は、葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似物、プリン類似物及びアデニンデアミナーゼ阻害剤、とりわけ、メトトレキサート、フロキシウリジン、シタラビン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、フルダラビンホスファート、ペントスタチン、5-フルオロフラシル(5-FU)、ゲムシタピシン及びカペシタピシンを含むが、これらに限定されない。

#### 【0066】

DNA-傷害性抗腫瘍剤は、アルキル化剤であることができる。同アルキル化剤は、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホナート、ニトロソウレア、金属塩及びトリアゼンを含むが、これらに限定されない。その非排他的な例は、ウラシルマスタード、クロルメチン、シクロホスファミド(CYTOXAN(登録商標))、イフォスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ビボプロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ホテムスチン、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、チオテパ、ストレプトゾシン、ダカルバジン及びテモゾロミドを含む。

#### 【0067】

紡錘体阻害剤は、パクリタキセル、ドセタキセル、ビノレルビン、ラロラキセル(XRP9881とも呼ばれる; Sanofi-Aventis)、XRP6258(Sanofi-Aventis)、BMS-184476(Bristol-Meyer-Squibb)、BMS-188797(Bristol-Meyer-Squibb)、BMS-275183(Bristol-Meyer-Squibb)、オルタタキセル(IDN5109、BAY59-8862又はSB-T-101131とも呼ばれる; Bristol-Meyer-Squibb)、RPR109881A(Bristol-Meyer-Squibb)、RPR116258(Bristol-Meyer-Squibb)、NBT-287(TAPESTRY)、PG-パクリタキセル(CT-2103、PPX、パクリタキセルポリグルマックス、パクリタキセルポリグルタマート又はXyotax(商標)とも呼ばれる)、ABRAXANE(登録商標)(Nab-パクリタキセルとも呼ばれる; ABRAXIS BIOSCIENCE)、テセタキセル(DJ-927とも呼ばれる)、IDN5390(INDENA)、タキソプレキシン(ドコサヘキサエン酸-パクリタキセルとも呼ばれる; PROTARGA)、DHA-パクリタキセル(Taxoprexin(登録商標)とも呼ばれる)及びMAC-321(WYETH)を含むが、これらに限定されない。Hennenfent & Govindanのレビュー(2006, Annals of Oncology, 17, 735-749)も参照のこと。

#### 【0068】

好ましくは、DNA-傷害性抗腫瘍剤は、トポイソメラーゼI及び/もしくはII阻害剤、DNA架橋剤、代謝拮抗剤又はそれらの組み合わせである。好ましい実施態様では、DNA-傷害性抗腫瘍剤は、ドキソルピシン、5-FU、カルボプラチン及びオキサリプラチン又はそれらの組み合わせからなる群より選択される。最も好ましい実施態様では、コンジュゲートDBaitは、DT01であり、DNA-傷害性抗腫瘍剤は、ドキソルピシン、カルボプラチン、5-FU及びオキサリプラチンからなる群より選択される。

#### 【0069】

処置されるガン又は腫瘍

本発明で記載された医薬組成物及び製品、キット、又は組み合わせ製剤は、対象におけるガンを処置するのに使用することができる。

#### 【0070】

「ガン」、「ガン性」又は「悪性腫瘍」という用語は、典型的には、制限されていない細胞増殖により特徴付けられる哺乳類における生理状態を意味し又は説明する。ガンの例は、例えば、白血病、リンパ腫、芽腫、ガン腫及び肉腫を含む。このようなガンのより特定の例は、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病(Ph+ ALL)、扁平細胞ガン腫、小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン、グリオーマ、胃腸ガン、腎臓ガン、卵巣ガン、肝臓ガン、直腸結腸ガン、子宮内膜ガン、腎臓ガン、前立腺ガン、甲状腺ガン、神経芽腫、脾臓ガン、多形神経膠芽腫、子宮

10

20

30

40

50

頸ガン、胃ガン、膀胱ガン、肝細胞ガン、乳ガン、結腸ガン及び頸椎部ガン、胃ガン、生殖細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病、マスト細胞症及びマスト細胞症に関連する任意の症候を含む。

#### 【0071】

「白血病」は、血液形成臓器の侵襲性の悪性疾患を意味し、一般的には、血中の白血球及びその前駆体並びに骨髄の歪められた増殖及び発展により特徴付けられる。白血病は、一般的には、（１）疾患の期間及び特徴 - 急性又は慢性；（２）関与する細胞の種類；骨髄（骨髄性）、リンパ球（リンパ球性）又は単球性；並びに（３）血中の異常な細胞数の増大又は非増大 - 白血球又は無白血球性（亜白血球性）に基づいて臨床的に分類される。白血病は、例えば、急性非リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T - 細胞白血病、無白血球性白血病、白血球血症性白血病、好塩基求性白血病、芽細胞白血病、ウシ白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚白血病、胎生細胞性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、ヘアリー細胞白血病、血芽球性白血病、血球芽細胞性白血病、組織球性白血病、幹細胞白血病、急性単球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ性白血病、リンパ様白血病、リンパ性肉腫細胞白血病、マスト細胞白血病、巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、単球性白血病、骨髄芽性白血病、骨髄球性白血病、骨髄顆粒球性白血病、骨髄単球性白血病、ネーグリー型白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、前骨髄球性白血病、リーダー細胞白血病、シリング型白血病、幹細胞白血病、亜白血球性白血病及び未分化細胞白血病を含む。特定の態様では、本発明は、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病及び／又はフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病（Ph + ALL）についての処置を提供する。

#### 【0072】

種々のガンも、本発明の範囲に包含される。同ガンは、下記：膀胱（亢進性及び転移性膀胱ガンを含む）、乳房、結腸（直腸結腸ガンを含む）、腎臓、肝臓、肺（小細胞及び非小細胞肺ガン並びに肺腺ガンを含む）、卵巣、前立腺、精巣、尿生殖管、リンパ系、直腸、咽頭、膵臓（外分泌膵臓ガン腫を含む）、食道、胃、胆嚢、子宮頸管、甲状腺及び皮膚（扁平細胞ガン腫を含む）のガン腫を含むガン腫；リンパ球系統の造血性腫瘍（白血病、急性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B - 細胞リンパ腫、T - 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ヘアリー細胞リンパ腫、組織細胞性リンパ腫及びパーキットリンパ腫を含む）；骨髄系統の造血性腫瘍（急性及び慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病並びに前骨髄球性白血病を含む）；中枢神経系及び抹消神経系の腫瘍（星状細胞腫、神経芽腫、グリオーマ及びシュワン細胞腫を含む）；間葉系起源の腫瘍（線維肉腫、横紋筋肉芽腫及び骨肉腫を含む）；他の腫瘍（メラノーマ、色素性乾皮症、ケラトアkantoma、セミノーマ、甲状腺濾胞ガン及び奇形ガン腫を含む）；メラノーマ、切除不能なステージIII又はIVの悪性メラノーマ、扁平細胞ガン腫、小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン、グリオーマ、胃腸ガン、腎臓ガン、卵巣ガン、肝臓ガン、直腸結腸ガン、子宮内膜ガン、腎臓ガン、前立腺ガン、甲状腺ガン、神経芽腫、膵臓ガン、多形神経膠芽腫、子宮頸ガン、胃ガン、膀胱ガン、肝細胞ガン、乳ガン、結腸ガン及び頸椎部ガン、網膜芽腫、胃ガン、生殖細胞腫瘍、骨ガン、骨腫瘍、骨の成人悪性線維性組織細胞腫；骨の小児悪性線維性組織細胞腫、肉腫、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、新生物、形質細胞新生物；骨髄異形成症候群；神経芽腫；精巣生殖細胞腫瘍、眼内メラノーマ、骨髄異形成症候群；骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、滑膜肉腫を含むが、これらに限定されない。加えて、障害は、色素性蕁麻疹、マスト細胞症、例えば、びまん性皮膚マスト細胞症、ヒトにおける単発性マスト細胞腫及びイヌのマスト細胞腫並びに一部の稀な亜型、例えば、水疱性紅皮症性及び末梢血管拡張性マスト細胞症、血液障害に関連するマスト細胞症、例えば、骨髄増殖又は骨髄異形成症候群又は急性白血病、マスト細胞症に関連する骨髄増殖性障害、マスト細胞白血球を、他のガンに加えて含む。他のガンも、障害の範囲内に含まれる。同ガンは、下記：膀胱、尿路上皮ガン腫、乳房、結腸、腎臓、肝臓、

10

20

30

40

50

肺、卵巣、膵臓、胃、子宮頸管、甲状腺、精巣、特に、卵巣セミノーマ及び皮膚（扁平細胞ガン腫を含む）のガン腫を含むガン腫；消化管間質性腫瘍（「GIST」）；リンパ系の造血性腫瘍（白血病、急性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B - 細胞リンパ腫、T - 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ヘアリー細胞リンパ腫及びバーキットリンパ腫を含む）；骨髄系の造血性腫瘍（急性及び慢性骨髄性白血病並びに前骨髄細胞性白血病を含む）；間葉系起源の腫瘍（線維肉腫及び横紋筋芽肉腫を含む）；他の腫瘍（メラノーマ、セミノーマ、奇形ガン腫、神経芽腫及びグリオーマを含む）；中枢神経系及び抹消神経系の腫瘍（星状細胞腫、神経芽腫、グリオーマ及びシュワン細胞腫を含む）；間葉系起源の腫瘍（線維肉腫、横紋筋肉芽腫及び骨肉腫を含む）；並びに他の腫瘍（メラノーマ、色素性乾皮症、ケラトアkantoma、セミノーマ、甲状腺濾胞ガン、奇形ガン腫、化学療法難治性非セミノーマ性生殖細胞腫瘍及びカポジ肉腫を含む）並びにそれらの任意の転移を含むが、これらに限定されない。

10

#### 【0073】

本発明の好ましい実施態様では、ガンは、固体腫瘍である。「固体腫瘍」という用語は、特に、乳ガン、卵巣ガン、結腸ガン及び、一般的には、GI（消化管）管、子宮頸ガン、肺ガン、特に、小細胞肺ガン及び非小細胞肺ガン、頸椎部ガン、膀胱ガン、前立腺ガン又はカポジ肉腫を意味する。

#### 【0074】

本発明で記載された医薬組成物及び製品、キット又は組み合わせ製剤は、固体腫瘍の成長を阻害し、腫瘍体積を減少させ、腫瘍の転移性拡散及び微小転移の成長又は進行を予防するのに有用であることができる。本発明で記載された医薬組成物及び製品、キット又は組み合わせ製剤は、乏しい予後の患者又は放射線もしくは化学療法抵抗性腫瘍の処置に特に適している。

20

#### 【0075】

一実施態様において、ガンは、メラノーマ、グリオブラストーマ、乳ガン、結腸ガン、肺ガン、胃腸ガン、肝臓ガン及び頸椎部ガンから選択することができる。

#### 【0076】

好ましい実施態様では、ガンは、放射線抵抗性又は化学療法抵抗性ガンである。とりわけ、ガンは、放射線抵抗性メラノーマ、トリプルネガティブ乳ガン（TNBC）、化学療法抵抗性肝細胞ガン（HCC）、化学療法抵抗性肺ガン、化学療法抵抗性卵巣ガン及び転移性肝臓ガンからなる群より選択される。より具体的には、ガンは、ドキソルビシン - 抵抗性肝細胞ガン（HCC）、プラチナ抵抗性トリプルネガティブ乳ガン、プラチナ抵抗性卵巣ガン及び直腸結腸肝臓転移からなる群より選択される。

30

#### 【0077】

具体的な実施態様では、本発明は、オキサリプラチン及び5 - FUとの組み合わせにおける直腸結腸ガン腫の処置のための、コンジュゲートDbait分子の使用に関する。好ましくは、直腸結腸ガン腫は、転移性であり、より好ましくは、肝臓及び/又は腹膜における転移を有する。

#### 【0078】

非常に具体的な実施態様では、本発明は、腹腔内に位置していない放射線抵抗性又は化学療法抵抗性ガンの処置のための、コンジュゲートDbait分子の使用に関する。したがって、このようなガンは、直腸結腸ガン腫（例えば、肝臓及び腹膜のCRC転移）を含まない。とりわけ、ガンは、TNBC及び化学療法抵抗性卵巣ガンからなる群より選択される。より具体的には、ガンは、プラチナ抵抗性TNBC及びプラチナ抵抗性卵巣ガンからなる群より選択される。

40

#### 【0079】

更なる実施態様では、本発明は、トリプルネガティブ乳ガンの処置のための、コンジュゲートDbait分子の使用に関する。より具体的には、コンジュゲートDbait分子は、特に、シスプラチン、オキサリプラチン及びカルボプラチンから選択されるプラチナ含有抗ガン剤との組み合わせで使用される。具体的な実施態様では、本発明は、カルボプ

50

ラチンとの組み合わせでのトリプルネガティブ乳ガン ( T N B C ) の処置のための、コンジュゲート D b a i t 分子の使用に関する。場合により、この処置は、放射線療法と組み合わせることができる。

#### 【 0 0 8 0 】

計画、用量及び投与経路

本発明の組み合わせ製剤に利用される組み合わせパートナーそれぞれの有効用量は、利用される特定の化合物又は医薬組成物、投与モード、処置される症状、処置される症状の重症度に応じて変更することができる。このため、本発明の組み合わせ製剤の投与計画は、各種の要因に従って選択される。同要因は、投与経路及び患者の状態を含む。通常、技能を有する内科医、臨床医又は獣医であれば、症状を予防し、同症状に対向し、又は、同症状の進行を停止させるのに必要とされる 1 つの有効成分の有効量を容易に判断し、処方することができる。毒性なしに有効性が得られる範囲内での有効成分の濃度を達成するのに最適な精度は、ターゲット部位への有効成分の利用能の動態に基づく計画を必要とする。

10

#### 【 0 0 8 1 】

D N A - 傷害性抗腫瘍剤がコンジュゲート D b a i t 分子との組み合わせで使用される場合、D N A - 傷害性抗腫瘍剤及びコンジュゲート D b a i t 分子は、同じ経路により又は別個の経路により投与することができる。D N A - 傷害性抗腫瘍剤用の投与経路は、経口、非経口、静脈内、腫瘍内、皮下、頭蓋内、動脈内、局所、直腸、経皮、皮内、鼻、筋肉内、骨内等であることができる。

20

#### 【 0 0 8 2 】

コンジュゲート D b a i t 分子は、照射及び / 又は D N A - 傷害性抗腫瘍剤の投与前及び / 又はこれらと同時及び / 又はこれらの後に、より好ましくは、照射及び / 又は D N A - 傷害性抗腫瘍剤の投与前及び / 又はこれらと同時に投与される。照射及び / 又は D N A - 傷害性抗腫瘍剤の投与は、照射が適用される際又は D N A - 傷害性抗腫瘍剤が腫瘍細胞に達する際に、コンジュゲート D b a i t 分子が腫瘍細胞に存在するように行われる。通常、技能を有する内科医、臨床医又は獣医であれば、有効成分、ターゲット部位への利用能のその動態又は血漿におけるその薬物動態プロファイルに基づいて計画を決定することができる。予備的な結果から、コンジュゲート D b a i t 分子は、1 日の間活性な状態にあることが示されている。第 1 の好ましい実施態様では、コンジュゲート D b a i t 分子による処置の開始時に、又は、コンジュゲート D b a i t 分子により処置後に、照射が適用され、又は、D N A - 傷害性抗腫瘍剤が投与される。例えば、コンジュゲート D b a i t 分子による処置の開始後 3 ~ 2 4 時間で、照射が適用され、又は、D N A - 傷害性抗腫瘍剤が投与される。D N A - 傷害性抗腫瘍剤及びコンジュゲート D b a i t 分子は、同時に投与することができる。

30

#### 【 0 0 8 3 】

放射線療法又は D N A - 傷害性抗腫瘍剤による処置が開始されると、コンジュゲート D b a i t 分子による処置は、放射線療法又は D N A - 傷害性抗腫瘍剤による処置が適用され又は投与される限りにおいて継続させることができる。代替的に、コンジュゲート D b a i t 分子による処置を終了させることもできる。

40

#### 【 0 0 8 4 】

コンジュゲート D b a i t 分子について、本発明の組み合わせ製剤、キット又は製品に利用される D N A - 傷害性抗腫瘍剤の有効用量は、投与モード、処置される症状、処置される症状の重症度に応じて変動させることができる。このため、コンジュゲート D b a i t 分子の投与計画は、各種の要因に従って選択される。同要因は、投与経路及び患者の状態を含む。通常、技能を有する内科医、臨床医又は獣医であれば、特に、選択された D N A 傷害処置との特定の組み合わせにおいて、ガンを予防し、同ガンに対向し、又は、同ガンの進行を停止させるのに必要とされるコンジュゲート D b a i t 分子の有効量を容易に判断し、処方することができる。

#### 【 0 0 8 5 】

50

当業者であれば、特に、毎日処置プロトコル又は毎週処置プロトコルにおいて、腫瘍  $1\text{ cm}^3$  当たりになくとも  $0.01\text{ mg}$ 、好ましくは、腫瘍  $1\text{ cm}^3$  当たりになくとも  $0.1 \sim 40\text{ mg}$ 、最も好ましくは、腫瘍  $1\text{ cm}^3$  当たりになくとも  $1 \sim 20\text{ mg}$  の、腫瘍中の有効量のコンジュゲート  $\text{Dbait}$  分子を得るための量に適合させることができる。例えば、静脈内又は腹腔内経路について、コンジュゲート  $\text{Dbait}$  分子の有効量又は単位用量は、 $0.1 \sim 100\text{ mg}$ 、好ましくは、 $4 \sim 40\text{ mg}$  であることができる。したがって、コンジュゲート  $\text{Dbait}$  分子の有効量又は単位用量は、 $0.06 \sim 0.6\text{ mg/kg}$  患者であることができる。当然、用量及び計画は、当業者であれば、化学療法及び/又は放射線療法計画を考慮して適合させることができる。

#### 【0086】

放射線療法について、当技術分野において公知の任意の放射線療法計画、特に、定位照射（例えば、 $15\text{ Gy}$ ）又は分割照射を使用することができる。分割照射の使用が、特に効率的であることができ、例えば、照射は、毎日又は  $2 \sim 5$  日毎、好ましくは、 $3 \sim 4$  日毎に、 $1, 2, 3, 4, 5$  又は  $6$  週の期間適用することができる。照射は、 $1 \sim 10\text{ Gy}$ 、好ましくは、 $2 \sim 5\text{ Gy}$ 、特に、 $2, 3, 4$  又は  $5\text{ Gy}$  であることができる。例えば、 $6$  週間における  $15 \times 2\text{ Gy}$  又は  $2$  週間における  $4 \sim 6 \times 5\text{ Gy}$  の分割照射を企図することができる。好ましい実施態様では、企図される放射線療法は、 $2$  週間での  $5\text{ Gy}$  の  $4$  回の照射によるプロトコルである。照射及び  $\text{Dbait}$  分子によるガンの組み合わせ処置における異なる計画又は条件が試験され、 $\text{Dbait}$  分子による腫瘍の放射線感受性が  $\text{Dbait}$  分子の用量に依存するが、照射線量には依存しないことを証明することができた。

#### 【0087】

化学療法について、本発明の組み合わせ製剤、キット又は製品又は本発明の組成物との組み合わせで利用される  $\text{DNA}$ -傷害性抗腫瘍剤の有効用量は、利用される特定の  $\text{DNA}$ -傷害性抗腫瘍剤、投与モード、処置される症状、処置される症状の重症度に応じて変更することができる。このため、 $\text{DNA}$ -傷害性抗腫瘍剤の投与計画は、投与経路及び患者の状態を含む各種の要因に従って選択される。通常の技能を有する内科医、臨床医又は獣医であれば、ガンを予防し、同ガンに対向し、又は、同ガンの進行を停止させるのに必要とされる  $\text{DNA}$ -傷害性抗腫瘍剤の有効量を容易に判断し、処方することができる。

#### 【0088】

処置は、 $1$  回又は複数回のサイクル、例えば、 $2 \sim 10$  回のサイクル、特に、 $2, 3, 4$  又は  $5$  回のサイクルを含むことができる。該サイクルは、連続させ又は分離することができる。例えば、各サイクルは、 $1 \sim 8$  週、好ましくは、 $3 \sim 4$  週の期間により分離される。

#### 【0089】

本発明の更なる態様及び利点は、下記実験セクションに開示されるであろう、同実験セクションは、例証であり、本願の範囲を限定しないとみなされるべきである。数多くの参考文献が、本明細書において引用されており、これらの引用文献はそれぞれ、参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0090】

【図1】  $\text{DT01}$  により、 $\text{CRC}(\text{HT29})$  肝臓転移モデルにおいて  $\text{CT}$  に対する感受性が有意に向上する。肝臓内腫瘍を有する  $\text{NMR1}^{\text{NU}}/\text{NU}$  マウスを材料及び方法に記載されたように処置し、処置後  $22$  日で殺処分した。肝臓を肉眼観察検査及び顕微鏡検査用に採取した。(A)  $\text{DT01}$  及び  $\text{CT}$  治療の配列。  $\text{CT}$  を  $\text{DT01}$  処置後  $2$  又は  $4$  時間で行った。(B) 各処置群における平均肝臓腫瘍体積 ( $\text{mm}^3$ )。 (C) 各群における肝臓腫瘍の代表的な肉眼観察及び  $\text{HES}$  切片。(D) 腫瘍壊死成分を  $\text{HES}$  染色により評価した。分析された組織切片の総腫瘍表面の割合 (%) として壊死を表現する。(E~F) 免疫組織化学。生きている腫瘍成分の増殖及び平均微小血管密度を  $\text{Ki67}$  (D) 及び  $\text{CD31}$  (E) 染色それぞれにより決定した。結果を平均  $\pm \text{SEM}$  として表現する。

【図2】  $\text{DT01}$  と  $\text{CT}$  との関連付けにより、腹膜腫瘍体積が有意に減少する。肝臓内腫

10

20

30

40

50

瘍を有する N M R I<sup>N U</sup> / N<sup>U</sup> マウスを図 4 に記載されたように処置し、処置後 22 日で殺処分した。腹膜転移の存在を処置の期間中に視覚的にモニタリングし、殺処分時に測定した。(A) 各処置群における平均腹膜腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>)。 (B) 各群における腹膜腫瘍の代表的な肉眼観察画像。結果を平均 ± S E M として表現する。

【図 3】 2 つの T N B C 異種移植モデルにおける全身投与と局所投与との比較。脂肪パッドに T N B C 細胞系統を移植された N M R I<sup>N U</sup> / N<sup>U</sup> マウスを D b a i t の S C 又は I P 注射により、1 回のサイクル (左パネル) 又は、処置を行わない 2 週間でそれぞれを分離した 3 回のサイクル (右パネル) について 5 連続日の間に処置した。各 D b a i t 注射の用量を凡例に示す。データは、処置開始後の種々の時点での平均相対腫瘍体積 (V t / V i) を表わす。

10

【図 4】 カルボプラチンとの D T 0 1 の関連付けにより、T N B C モデルにおける腫瘍成長が有意に低下する。処置群当たりの中央腫瘍体積 (D T 0 1 処置群及び D T 0 1 + カルボプラチン群におけるエラーバーは、平均の標準誤差 S E M を示す)。

【図 5】 カルボプラチンとの D T 0 1 の関連付けにより、T N B C モデルにおける生存が有意に向上する。M D A - M B - 2 3 1 モデルにおける動物生存のカプラン - マイヤー表現。

【図 6】 図 4 及び 5 における処置スキーム。

【実施例】

【0091】

実施例 1: 直腸結腸肝臓転移の化学療法感受性のための新規な治療戦略としての D T 0 1

20

直腸結腸ガン (C R C) からの転移性肝臓疾患は、著しい臨床的問題である。これは、主に、多くの場合、利用可能な化学療法に対する低い感受性を表わし、一部の D N A 修復機能の過剰活性化により部分的に薬剤抵抗性に発展する切除不可能な転移が原因である。組み合わせ治療により、幾らかの疾患抑制が示されたが、C R C 肝臓転移の根絶を達成するためのより効率的な化学療法についての必要性が未だに存在する。

【0092】

本発明者らは、従来の化学療法との関連付けにおける D b a i t の許容範囲及び有効性を調査した。I n v i t r o において、D b a i t 処置により、H T 2 9 及び H C T 1 1 6 C R C 細胞系統の感受性が向上する。I n v i v o において、D b a i t のコレステロールコンジュゲート臨床形態である D T 0 1 の薬物動態、生体分布及び有効性を評価した。C R C 肝臓転移用のモデルとして使用した肝臓内 H T 2 9 異種移植マウスにおいて、D T 0 1 の化学療法感受性能をオキサリプラチン及び 5 - フルオロウラシルとの関連付けにおいて評価した。D T 0 1 の高い取込みから、肝臓が特異的なターゲットであることが示される。本発明者らは、オキサリプラチン及び 5 - フルオロウラシルとの組み合わせにおける D T 0 1 処置による、化学療法単独と比較した肝臓転移モデルにおける有意な抗腫瘍効果を証明した (平均: 501 v s 872 mm<sup>2</sup>, p = 0.02)。腫瘍体積の減少は、壊死、増殖、血管新生及びアポトーシスにおける顕著な組織学的変化と更に関連付けられる。D T 0 1 の繰返しサイクルにより、化学療法の毒性は増大しない。D T 0 1 を従来の化学療法と組み合わせることは、転移性肝臓ガンの処置における安全で効果的な治療戦略であると、証明することができる。

30

40

【0093】

この研究の目的は、第一に、i n v i t r o における D T 0 1 の有効性を証明し、第二に、肝臓における D T 0 1 の薬物動態及び分布を評価し、第三に、C R C 転移性肝臓腫瘍モデルにおける従来の化学療法 (オキサリプラチン及び 5' - フルオロウラシル) との組み合わせにおける D T 0 1 の全身投与の併用効果を証明することであった。

【0094】

結果

D b a i t 処置により、結腸ガン細胞系統の化学療法に対する感受性が向上する

本発明者らは、D b a i t が D N A - P K キナーゼを活性化することにより作用することを以前に示した。同 D N A - P K キナーゼは、ヒストン変異 H 2 A X を含む数多くのタ

50



ーゲットをリン酸化する。本発明者らは、まず、2つのCRC細胞系統(HCT116及びHT29)におけるDbaitの活性を、H2AXのパン-核リン酸化をモニタリングすることにより確認した。

#### 【0095】

まず、化学療法に対する細胞生存におけるDbaitの効果を調査するために、本発明者らは、Dbait又はオキサリプラチン(OXA)及び5-フルオロウラシル(5-FU)又はDbaitと化学療法(CT)との組み合わせによる処置後の種々の時点において、生きている細胞数を測定した(図1B)。線維芽細胞において既に観察されたように(Quanz, 2009, PloS one, 4, e6298)、Dbait単独では、両細胞系統における細胞増殖に影響を有さないようである。OXA及び5-FUによる処置により、細胞増殖の減少がもたらされた。一方、増殖レベルが、HCT116及びHT29の両細胞系統において、化学療法処置前にDbaitによりトランスフェクションされた細胞では、化学療法単独と比較して9日目までに有意に低下した(それぞれ $p < 0.001$ 及び $p < 0.02$ )。これらの差異は、より遅い時点(処置後5日以降)において特に明らかとなる。このことは、Dbaitによる有効性の向上は、ゆっくり進行する場合があることを示す。

#### 【0096】

OXA及び5-FUとの組み合わせにおけるDbaitの化学療法感受性効果を確認するために、クローン原性生存アッセイをHCT116及びHT29に行った。HCT116細胞は、Dbait単独処置後に約30%( $p < 0.01$ )の死亡率を示した。このことは、生存のための修復活性におけるその依存性を証明している。一方、有意な効果は、HT29において示されなかった。Dbaitに対するHCT116の感受性は増殖の最初の8日間では検出されなかったため、この結果から、Dbaitを含んで増殖する細胞は、その生存を後になって損なう致死性病変を蓄積することが示唆される。化学療法単独(OXA/5-FU)による処置により、HCT116の生存における有意な減少がもたらされ( $p < 0.001$ )、一方で、HT29細胞系統では、傾向のみが観察された( $p = 0.08$ )。一方、Dbaitと化学療法との組み合わせにより、両細胞系統における生存の有意な減少がもたらされた( $p = 0.05$ )。HCT116とHT29とは、それらのP53ステータス(HCT116は能力があり、一方、HT29は変化している)を含む多くのパラメータにより異なる。この例では、Dbaitの単独処置に対するそれらの感受性における幾らかの差異に関わらず、両細胞系統は、CTとDbaitとの組み合わせに対して、等しく感受性であった。

#### 【0097】

##### DT01の腹腔内vs静脈内投与の薬物動態及び生体分布分析

トランスフェクタントアジュバント毒性を避けるために、全てのin vivo研究をDT01により行った。Dbait-コレステロールコンジュゲートは、更なる毒性なしに、これらの分子の細胞取込みを促進する。DT01マウスの全身投与に最良な経路を決定するために、マウスを用量5mg DT01の1回の腹腔内(IP)又は静脈内(IV)投与のいずれかにより処置した。IP投与により、578 µg/mlの $C_{max}$ 、1時間の $T_{max}$ 及び799のAUC<sub>0-6</sub>がもたらされ、一方、IVにより、1,917 µg/mlの $C_{max}$ 、0.08時間の $T_{max}$ 及び799のAUC<sub>0-6</sub>がもたらされた。薬物動態分析から、IP注射により、DT01の血漿暴露がIV投与によるAUCの約70%に対応するAUCを有するIVボラス注入の血漿暴露より長かったことが証明された。

#### 【0098】

本発明者らは、蛍光ラベルされたcy5-DT01分子を使用して、切除された臓器全体における生体分布をモニタリングした。cy5-DT01及びDT01は両方とも、薬物動態及びDNA-PK活性化に関して類似する特性を有する。DT01の最大蛍光が、両経路による肝臓、腸及び腎臓において観察された。ここで、最大強度が、IP投与後の肝臓及び腸において観察された。マウスにおいて観察された腎臓及び尿により発せられた高い蛍光から、DT01は、腎臓により優先的に排出されることが示唆される。血中には測定可能なDT01が、注射後6時間では存在しなかったが、相当な量のDT01が、未

だに肝臓において検出可能であった。このことは、この臓器における特異的な保持を示している。

#### 【0099】

*in vitro*で既に証明されたように、組織におけるDNA-PKのDT01活性化は、ヒストンH2AXのリン酸化により証明することができる。本発明者らは、HT29移植腫瘍を有する肝臓におけるH2AXリン酸化の分布を分析することにより、DT01活性をモニタリングした。興味深いことに、高レベルのH2AXが、腫瘍において特異的に観察されたが、周囲の正常な組織では観察されなかった。このことは、肝臓の腫瘍細胞におけるDT01分子の優先的な取込み又は活性を示している。

#### 【0100】

DT01により、*in vivo*においてOXA及び5-FUに対する感受性が有意に向上する

DT01を転移性CRCのための第一線の処置と関連付ける関心を調査するために、本発明者らは、HT29異種移植肝臓腫瘍モデルを使用した。以前の報告及び*in vitro*データから、この系統が、主にV600EBRAF変異により、非常に化学療法抵抗性であることが証明されているためである。この動物を、生体分布データに基づく2つの異なるスケジュールを使用して、患者に対する伝統的なFOLFOXプロトコールに近い処置である、OXA及び5-FUにより処置した(図1A)。2つのスケジュールは、2回の処置間の2又は4時間の間隔のいずれかからなる。肝臓において最大レベルのDT01が、処置後1時間及び3時間で観察された。

#### 【0101】

*in vitro*において以前観察されたように、腫瘍は、CT単独に対して非常に抵抗性であり、DT01は、単独で投与された場合には、中程度の効果のみを有した(図1B、1C)。興味深いことに、OXA及び5-FUに対するDT01の関連付けにより、肝臓腫瘍サイズが、両方の組み合わせ処置群において、CT単独と比較して、CT前の2時間(平均体積:  $525.80 \text{ vs } 872.01 \text{ mm}^3$ ,  $p = 0.03$ )及び4時間(平均体積:  $501.05 \text{ vs } 872.01 \text{ mm}^3$ ,  $p = 0.02$ )で投与された場合、有意に減少した(図1B、1C)。この効果は、DT01を1つの化学療法剤であるOXA又は5-FUのいずれかと関連付けた場合には観察されなかった。生きている腫瘍面積、壊死及びアポトーシスの測定を含む詳細な盲検組織学分析をヘマトキシリン-エオシン-サフラン(HES)染色切片において、熟練の病理医により評価した。DT01とCTとの組み合わせ処置による両群は、1つの処置を受けた群より高い処置の有効性を示した。CTとDT01との間を2時間間隔で処置した群( $p < 0.01$ )より、4時間間隔で処置した群( $p < 0.0001$ )における壊死が、CT単独と比較して顕著に増大した(図1D)。更に、高いアポトーシスインデックスが、DT01及びCTにより処置された両群において明らかとなった。他の組織学パラメータと同様に、アポトーシスの度合いは、4時間遅らせて処置された動物において上昇した( $p < 0.0001$ )。これらの組織学的知見は、DT01又は化学療法単独での処置群では見られなかった。

#### 【0102】

多くの固体腫瘍について、増殖及び微小血管形成は、腫瘍進行及び転移に必須である。これらのパラメータを更に調査するために、それぞれ細胞増殖及び血管新生のマーカーであるKi67及びCD31についての免疫染色を生きている腫瘍成分において行った(図1E、1F)。Ki67免疫応答性から、DT01又は化学療法単独のいずれかで処置された腫瘍は、高度の増殖により密に詰まっていたことが示された。DT01とCTとの間の2時間間隔での処置により、細胞増殖における中程度の減少がもたらされた( $p = 0.02$ )(図1E)。きわだって、Ki67の免疫応答性は、DT01とCTとの間を4時間間隔で処置された群において10倍低下した( $p < 0.0001$ )(図1E)。この群では、免疫反応性が、腫瘍の中心コア領域で観察された高度の壊死のために、腫瘍の縁においてのみ検出された。加えて、それにも関わらず、腫瘍内血管の減少が、DT01及びCTの組み合わせで処置された群において、CT単独と比較して検出された(図1F)。一

10

20

30

40

50

方、平均微小血管密度も、2時間間隔 ( $p = 0.02$ ) と比較して、4時間間隔 ( $p < 0.001$ ) で処置された群において、より顕著に低下した。2時間及び4時間処置スケジュールの両方での腫瘍成長における抗腫瘍効果の類似性にも関わらず、組織学的には、有効性は、壊死、アポトーシス、増殖及び血管新生に関して、4時間間隔において、有意により顕著であった。

#### 【0103】

予期しなかったことに、DT01とCTとの間の4時間の遅延により処置され、処置後22日で採取された腫瘍は、一定割合の腫瘍内で溶解された肝細胞及び隣接する非悪性肝臓における僅かな浮腫を有するのを、毒性の更なる臨床的サイン、例えば、体重減少を伴わずに表わした。組織学的分析から、他の群における毒性の形態学的サインは明らかとならなかった(図1)。加えて、肝臓酵素試験から、対照群と組み合わせ処置群との間での有意差は明らかとならなかった。

10

#### 【0104】

興味深いことに、同じ処置を受けた動物を30~65日の間で殺処分した際に、更なる浮腫は観察されなかった。このことは、22日目に観察された浮腫が経時的に可逆性であることを示唆している。有意な腫瘍効果が処置後22日で観察されたにも関わらず、この時点後にモニタリングされた腫瘍は、進行を再開した。組織学的分析から、増殖性成分は、処置後30~45日において、約50%に達し、非処置腫瘍において観察されたレベルをわずかに下回ったのみであった。

#### 【0105】

20

組み合わせ処置が肝臓に対する更なる毒性を誘引しないことを確認するために、本発明者らは、OXA又は5-FUに関連付けられたDT01の許容範囲を、延長した処置サイクルについて分析した。本発明者らは、50匹のマウスのコホートにおけるOXA又は5-FUに関連付けられた2回のサイクル(処置サイクル当たり5×DT01の投与)についての全身投与後に、上昇する用量のDT01(総用量30、50又は80mg)の毒性を決定した。体重減少は、処置中又は同処置後の動物において観察されなかった。同様に、毒性の他の臨床的サイン、例えば、下痢又は挙動変化は、これらのマウスにおいて示されなかった。2回目のサイクルの処置後6週間での検死解剖において、全ての腹部臓器、胸腔及び内容物は正常に見えた。肝臓の重量又は組織学の大きな変化は、媒体群と組み合わせ処置群との間で観察されなかった。

30

#### 【0106】

これらの結果から、肝臓腫瘍を有する動物において組み合わせ処置後に検出された可逆性の浮腫は、おそらく、効率的な組み合わせ処置に対する腫瘍応答に対する急性反応であろう。

#### 【0107】

##### 腹膜転移処置

CRCは、多くの場合、肝臓及び腹膜に転移する。興味深いことに、CRC腫瘍を肝臓内に異種移植したマウスの90%が、腹膜転移に進行した。この特性により、本発明者らは、DT01の効果は、肝臓腫瘍だけでなく、腹膜転移をもモニタリングすることが可能となった。DT01と化学療法との組み合わせを受けた動物は、化学療法単独と比較した場合、2時間間隔(平均体積:  $300.31 \text{ vs } 867.20 \text{ mm}^3$ 、それぞれ  $p < 0.01$ )及び4時間間隔(平均体積:  $259.51 \text{ vs } 867.20 \text{ mm}^3$ 、それぞれ  $p < 0.01$ )の両方において、有意に減少した腹膜腫瘍体積を示した(図2A、2B)。腫瘍体積のわずかな減少がDT01単独により処置された群において観察されたが、これは、統計学的な有意差に達しなかった。

40

#### 【0108】

##### 議論

CRCを有する患者の約50%が、肝臓及び/又は腹膜転移のいずれかを表し、又は、一連のそれらの疾患に進行するであろう。CRC肝臓転移を有する患者の大部分は、切除不能な疾患を表わし、全身性の化学療法が、唯一の治療形態でないにしても、主なものを

50

表わす。しかしながら、化学療法の治療ウィンドウは、腫瘍の抵抗性及び非ターゲット組織に対する高い毒性により限られる。このような臨床的状況において、侵襲性の化学療法計画単独では、生存を改善できないおそれがあるだけでなく、クオリティ・オブ・ライフに有害に影響を及ぼすおそれもある。その結果として、これらの患者の死亡率は高いままである。したがって、化学療法抵抗性を包囲し、正常な組織には控えるように、DNA修復を特異的にターゲットする新たな作用剤の開発が、これらのガンの処置に必須である。DT01は、DNA修復におけるその中心的役割に基づいて、魅力的な薬剤候補である。

#### 【0109】

本研究において、本発明者らは、全身性DT01処置により、CRC細胞が従来の化学療法に対して増感することを、*in vitro*及び*in vivo*アッセイにより初めて示した。CRC転移性モデルにおいて、本発明者らは、OXA及び5-FUとの組み合わせにおけるDT01処置による（末期症状とみなされた）肝臓及び腹膜における有意な抗腫瘍効果を証明した。有意な抗腫瘍効果が、1つの作用剤による化学療法ではなく、OXA及び5-FUの両方に関連付けられたDT01に限られたことが興味深い。これにより、従来の臨床環境と一致して、DT01との組み合わせは、CRC転移の処置において、1つの作用剤による化学療法ではなく、二重の化学療法に関連付けられる必要があることが証明される。この研究では、DT01と組み合わせられた二重の化学療法を受けた腫瘍が、増殖を再開し、後の時点（22日より後）で再成長したことが更に強調されている。したがって、処置の繰返しサイクルが、現在の従来の化学療法プロトコールと同様に、長期の疾患抑制を達成するのに必要であろう。これは、DT01単独又はOXAもしくは5-FUとの組み合わせにおいて、追加的な毒性が観察されなかったため可能であろう。

#### 【0110】

DT01は、優先的に、全身注射後に肝臓及び腸に蓄積する。Cy5-DT01注射後に肝臓全体が均一に蛍光を示したが、H2AXのリン酸化により証明されたDNA-PKの活性化は、専ら腫瘍細胞において観察され、この腫瘍の周囲の正常な組成では観察されなかった。この観察から、DT01は非腫瘍細胞には入らない、及び/又は、DT01は正常な肝臓組織では活性ではないことのいずれかが示される。第一にバイオアベイラビリティを向上させ、第二にガン細胞と正常細胞との間での基質取込みにおける差異を果たすために、DT01を、コレステロールコンジュゲートにより特別に設計した。低密度リポタンパク質（LDL）は、コレステロール経路の主な成分である。悪性細胞によるLDLの高い要求、及びこのため、その結果としてのLDLレセプターの過剰発現が、DT01の腫瘍細胞特異的ターゲットを生成する多くの種類のガン細胞において示された。加えて、免疫組織化学による正常なヒト組織及びガン性のヒト組織の広範な分析から、DNA-PKcs又はKu80のいずれかが、肝臓及び乳房の上皮において一致して存在しなかったこと、特異的な転写後レギュレーションが他の組織及びほとんどの腫瘍で見出されなかったことが証明された。まとめると、これらのデータから、DT01がおそらく肝臓ガンの処置に効率的な薬剤であろうことが強調される。

#### 【0111】

まとめると、乏しい予後及び驚くべき死亡率を有する急速な侵襲性疾患である二次肝臓悪性腫瘍をターゲットにする新たな処置選択肢の喫緊の必要性が存在する。本研究により、DT01の全身投与を従来の化学療法と組み合わせることは、肝臓及び腹膜のCRC転移の処置における安全で効果的な治療戦略であることができることが証明された。

#### 【0112】

材料及び方法

細胞培養、構築物、Dbait分子、免疫蛍光及びウェスタンブロット

CRC細胞系統；HT29（変異型p53、ATCC：HTB-38）及びHCT116（野生型p53、ATCC：CCL-247）をATCCから直接購入した。これらの細胞は、Promega PowerPlex（登録商標）システムを使用して、複数のSTR遺伝子座及び（性別判定のための）アメロゲニンを同時に増幅させることにより、ヒトショートタンデムリピートプロファイルを生成することによって、ATCCにより認証された。これら

の細胞を、本研究を行った際に、購入日から6ヶ月未満で研究室において、10% ウシ胎児血清、1% ピルビン酸ナトリウム、100 mg/ml ストレプトマイシン及び100 mg/ml ペニシリンを添加したDMEM培地 (Invitrogen, Carlsbad CA) 中で培養した。ルシフェラーゼを安定して発現しているHT29細胞系統は、pGL4.5ルシフェラーゼレポーターベクター (Luc2 / CMV / Hygro) (Promega) を使用して社内で確立された。HT29ルシフェラーゼ細胞に、200 µg/ml ヒグロマイシンBを添加した。全ての細胞系統をマイコプラズマ検査に社内で更に供し、マイコプラズマ汚染を含まなかった (Biovalley, France)。

#### 【0113】

細胞を2.5 µg Dbait (5' -GCTGTGCCCAACAACCCAGCAAACAAGCCTAGA-(H) TCTAGGCTTGTTTGCTGGGTGTGGGCACAGC-3' 配列番号: 9) (Eurogentec, Belgium) によりトランスフェクションした。同配列中、Hは、ヘキサエチレングリコールリンカーであり、下線を引いたヌクレオチドは、ホスホロチオアートである。細胞を以前に記載された (Quantz et al, 2009, PLoS one, 4, e6298)、11 kDa ポリエチレニミン (PEI) と複合体化させた8bp オリゴヌクレオチド対照 (8H) によりシャムトランスフェクションした。

#### 【0114】

H2AX免疫蛍光を以前に記載されたようにモノクローナル抗ホスホヒストンH2A.X (Ser139) 抗体クローンJBW301 (1:500希釈; 05-636, Millipore, USA) (9) を使用して行った。

#### 【0115】

In vitro 増殖アッセイ

細胞を $3 \times 10^4$  個 / 60 mm ディッシュの密度で播種し、Dbaitによりトランスフェクションした。処置後に、細胞を洗浄し、処置せず又は5 µM オキサリプラチン (OXA, Sigma) 及び2.5 µM 5-フルオロウラシル (5-FU, Sigma) の組み合わせにより処置し、生きている細胞のカウントを1、3、5、6、7及び9日目に行った。

#### 【0116】

クローン原性アッセイ

細胞をDbaitによりトランスフェクションし、処置しないまま又は5 µM OXA及び2.5 µM 5-FUにより1時間処置した。細胞を希釈し、14日間増殖させ、クローンをクリスタルバイオレットにより染色し、カウントした。

#### 【0117】

In vivo 実験

本研究をEuropean Union guidelines for animal careに準拠して厳密に行った。全ての動物実験は、Institut Curie and the French ministryの倫理委員会の承認を受けた。外科手術は、苦痛を最少化するために、局所無痛による麻酔下で行った。

#### 【0118】

動物

体重20~22 gの、6週齢のメスのNMRI<sup>N<sup>U</sup></sup> / <sup>N<sup>U</sup></sup> マウス (Janvier, France) を特定の病原体を含まない環境に12時間明及び12時間暗スケジュールで収容し、食餌及び水を自由に与えた。6匹以上の動物をケージには収容せず、in vivo 研究を開始する前に少なくとも1週間慣れさせた。

#### 【0119】

肝臓内HT29L移植

HT29ルシフェラーゼ (HT29L) 細胞を、左葉の上側表面上に細胞懸濁液 ( $1 \times 10^6$  個 / 10 µL PBS) の直接注入により移植した。腫瘍成長を生体発光分析 (IVIS, Caliper sciences) によりモニタリングした。

#### 【0120】

DT01分子

in vivo 研究のために、DT01 (5' 端に包含させたコレステロールテトラエチレングリコールを有するDbait) を使用した (Agilent technologies, Boulder, C

10

20

30

40

50

0)。

#### 【0121】

##### DT01の薬物動態

HT29L移植マウスを5mg DT01の1回の腹腔内(IP、n=4)又は静脈内(IV、n=3)注射により処置した。血液サンプルを処置前並びに処置後1、5、10、30分、1時間、2時間、4時間及び6時間で収集した。血漿を遠心分離により回収し、ELISAによりアッセイした。

#### 【0122】

##### 臓器の蛍光測定

ELISA技術による組織における信頼性のある定量を生成することができなかったため、本発明者らは、分子分布を評価するのに信頼性のある技術である蛍光撮像を使用した(15)。NMRI<sup>N<sup>U</sup>/N<sup>U</sup></sup>マウスに、1mg DT01蛍光分子(DT01-Cy5)を、IP(n=3)又はIV(n=3)投与により注射した。蛍光DT01(DT01-Cy5)は、シアニン5をリンカーの直後に位置するチミジンにおいて包含している。注射の6時間後、蛍光撮像を、Typhoonスキャナ(GE Helathcare)を使用して行った。

#### 【0123】

##### DT01及び化学療法処置

HT29L移植動物(n=49)を処置群に割り当て、1回のサイクルの処置を投与した。DT01をIP注射により、0日目(D0)から開始する5mg/日の用量で5連続日間、全身に投与した。OXA(6mg/kg、サイクルあたりに1回、1日目)及び5-FU(25mg/kg、サイクルあたりに3回、1~3日目)をDT01処置後2又は4時間で投与した。これらのマウスを処置後22日で殺処分した。

#### 【0124】

DT01及びOXA/5-FUにより4時間間隔で処置された更なる群(n=10)を処置後、終了ガイドラインが一致するまで維持して、処置の有効性の持続を評価した。

#### 【0125】

##### 肝機能評価

処置後0日目、4日目及び18日目において、血液サンプルを顎下出血によりリチウムヘパリン管(Sarstedt)に得た。血漿アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)、アミラーゼ(AMYL)及び総ビリルビン(TBIL)を、MS-Scan II(Melet Schloesing Laboratories, France)を使用して測定した。

#### 【0126】

##### 毒性アッセイ

NMRI<sup>N<sup>U</sup>/N<sup>U</sup></sup>マウス(n=50)を2回のサイクルのDT01により、IP注射による3mg/日(合計30mg)、5mg/日(合計50mg)又は8mg/日(合計80mg)の増加する用量で、OXA又は5'-FUとの組み合わせにおいて処置した。OXA及び5'-FUを全身IP注射により、それぞれ1×6mg/kg又は3×25mg/kgの用量でDT01処置後4時間に投与した。動物を任意の有害作用について定期的に観察した。

#### 【0127】

##### 組織学

ヘマトキシリン、エオシン及びサフラン(HES)染色腫瘍切片を熟練の病理医(Dr. Huerre, Institut Curie)により盲検様式で評価した。生きている成分及び壊死性成分(大きくなった細胞サイズ、区別できない細胞境界、好酸球性細胞質、核の喪失もしくは濃縮又は関連する炎症を示す)を総腫瘍表面の割合(%)として表現した。アポトーシスを代表的な非壊死視野から高倍率において推測した(弱<5%、中程度5~10%、顕著10~20%及び非常に顕著20~50%)。

#### 【0128】

デジタル化及び画像キャプチャを、全スライドスキャンシステム(Philips digital pa

10

20

30

40

50

thology solutions) を使用して行った。

#### 【0129】

Ki67及びCD31により免疫組織化学

免疫組織化学を、ウサギ抗Ki67(ab28364、1/500; Abcam, UK)及びウサギ抗CD31(ab15580、1/500; Abcam, UK)抗体を使用して行った。これに続けて、二次ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体(BA-1000; Vector, USA)及びウサギ特異的HRP/DAB(ABC)検出キットを使用して明らかにした。画像を、蛍光顕微鏡(Eclipse 90i, Nikon)を使用してキャプチャした。平均Ki67インデックスを、切片あたりに5つのランダムに選択した顕微鏡観察視野において、Ki67+veと-ve細胞との間の比を確立することによりスコアした。平均微小血管密度をCD31染色により決定した。CD31陽性血管を切片あたりに5つのランダムに選択した顕微鏡観察視野においてカウントした。

10

#### 【0130】

統計学的分析

In vitro実験を最低でも2回の独立した実験により行った。対応のない両側t検定を細胞の死亡及び生存の比較に使用した。クラスカル・ウォリス検定を、腫瘍体積及び組織学データを比較するのに使用した。エラーバーは、特別に示された場合を除いて、平均の標準誤差(SEM)を示す。全ての統計学的分析を、StatELソフトウェア(adScience, France)を使用して行い、0.05のP値を、統計学的に有意であると考えた。

#### 【0131】

実施例2：トリプルネガティブ乳ガン(TNBC)のモデルにおけるDT01及びカルボプラチンとの共処置における増強効果

TNBCモデルにおけるDT01単独での効果

本研究の目的は、乳ガンモデル、特に、トリプルネガティブ乳ガンモデルにおけるDT01単独での全身効果を証明することであった。動物モデルは、移植後45日のマウスである。マウスの乳房脂肪パッドに、MDA-MB-231腫瘍細胞を皮下移植した。

#### 【0132】

以前の実験において、本発明者らは、DT01により腫瘍成長を、全ての試験したトリプルネガティブ乳ガンモデル(BC227、BC173、MDA-MB-468及びMDA-MB-231細胞系統を移植されたマウス)において、局所投与により効果的に抑制できたことを証明した。

20

30

#### 【0133】

図3に示されたように、本発明者らは、2つのTNBC異種移植モデルにおいて、腹腔内投与と局所投与(腫瘍内及び腫瘍周囲の皮下)とを比較した。本発明者らは、驚くべきことに、局所投与と同様の有効性のために、3~5倍以上のDT01が必要であることを観察した。

#### 【0134】

投与経路を、ヒトにおける静脈内かん流投与をマウスにおいて模倣する腹腔内投与とした。DT01の用量レベルを5mg/動物/日とした。DT01の腹腔内投与を、各サイクル間で1週間処置を行わない5連続日の3回のセッションで行った。13匹のマウスを含めた。そのうちの7匹にDT01を受けさせた。対照群には、0.9% NaClの媒体単独を受けさせた。

40

#### 【0135】

毒性は観察されなかった。DT01の腹腔内投与は十分許容された。

#### 【0136】

DT01処置により、処置群より顕著に良好な腫瘍成長抑制及び動物生存が示された。

#### 【0137】

MDA-MB-231トリプルネガティブ乳ガンモデルを選択した。同モデルは、以前の実験において、腫瘍内及び腫瘍周辺皮下投与を使用したDT01処置に対して最も抵抗性であったためである。

50

## 【 0 1 3 8 】

この実験から、D T 0 1 の単独投与により、乳ガン腫瘍における腫瘍成長が遅延したことが確認される。

## 【 0 1 3 9 】

T N B C モデルにおける D T 0 1 とカルボプラチンとの組み合わせの効果

図 6 に示されたように、各処置サイクルに、5 mg/動物/日の用量レベルでの 5 日連続の D T 0 1 による投与を含ませた。処置を単独又はカルボプラチンとの関連付けのいずれかにおいて、サイクル間に 2 週間の間隔を空けて 3 回のサイクルで投与した。1 つの用量のカルボプラチンのみを D T 0 1 処置サイクル当たりに注射した（各サイクルの 2 日目）。カルボプラチンの用量をサイクル当たりに 5 0 mg/kg とした。処置を 7 週にわたって行った（3 サイクルの処置）。

10

## 【 0 1 4 0 】

実験中に、毒性は観察されない。毒性のサイン、例えば、体重減少は、D T 0 1 処置群において見られなかった。D T 0 1 + カルボプラチン処置群における体重減少又は毒性の増大は、カルボプラチン群と比較して観察されなかった。

## 【 0 1 4 1 】

1 7 7 日の実験の間に、カルボプラチン単独処置群における 1 匹を除いて、異常な死は起きなかった。

## 【 0 1 4 2 】

D T 0 1 の腹腔内投与は十分許容される。

20

## 【 0 1 4 3 】

抗腫瘍活性を、処置中及び同処置後に腫瘍体積を測定することにより評価した。5 日処置の 3 回のセッション（各セッション間に 2 週間の休薬を伴う）間に、D T 0 1 を腹腔内に投与した。カルボプラチンを各 D T 0 1 処置サイクルの 2 日目において、1 週間に 1 回投与した。

## 【 0 1 4 4 】

D T 0 1 + カルボプラチンの組み合わせ処置により、D T 0 1 単独処置と比較して、より良好な腫瘍成長抑制が示された（図 4）。曲線は、各群における最初の死亡の日数において中断されている。加えて、D T 0 1 + カルボプラチンの組み合わせは、生存も向上させる。

30

## 【 0 1 4 5 】

この研究において、カルボプラチンとの D T 0 1 の組み合わせ処置は効率的であり、単独の処置より良好な腫瘍成長の遅延をもたらす。

## 【 0 1 4 6 】

材料及び方法

D T 0 1 分子

コレステロール テトラエチレングリコール包含型の D b a i t である D T 0 1 を、自動固相オリゴヌクレオチド合成（Agilent technologies, USA）により合成した。

## 【 0 1 4 7 】

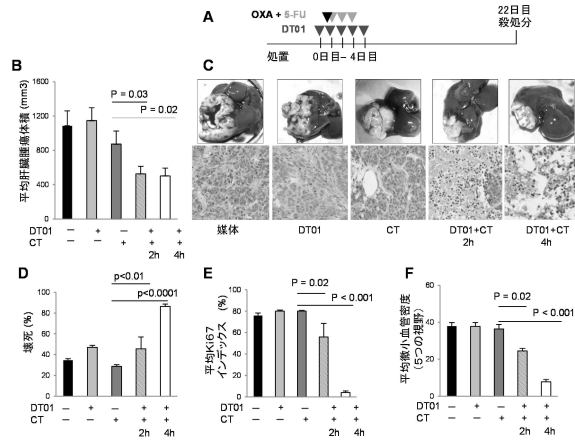
細胞及び動物

40

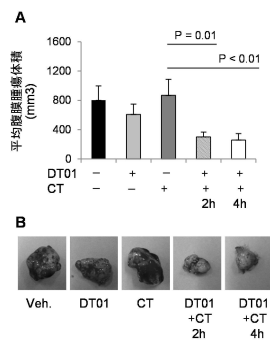
M D A - M B 2 3 1 細胞系統は、ヒト乳房腺ガンから得られるものであり、A T C C に注文することができる。M D A - M B 2 3 1 細胞を乳房の脂肪パッドに、添加剤を含まない D M E M 0 . 1 ml に再懸濁させた  $1.0 \times 10^6$  個細胞で移植した。胸腺欠損ヌードマウスは免疫不全であるため、異種移植及びヒト腫瘍の成長が可能である。



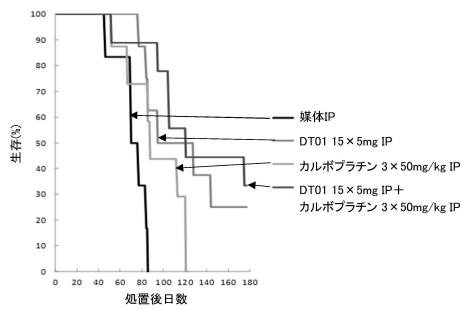
【図 1】



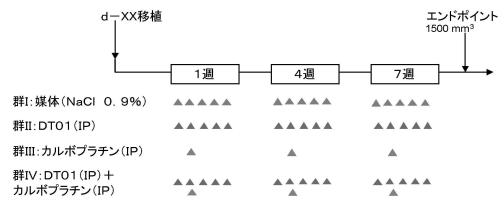
【図 2】



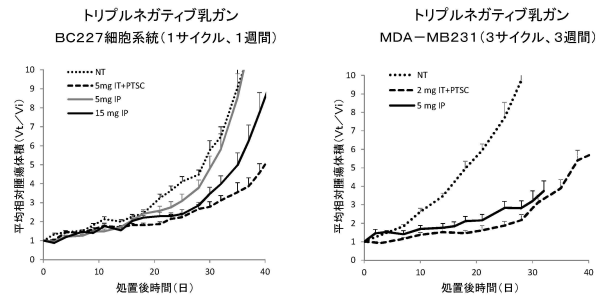
【図 5】



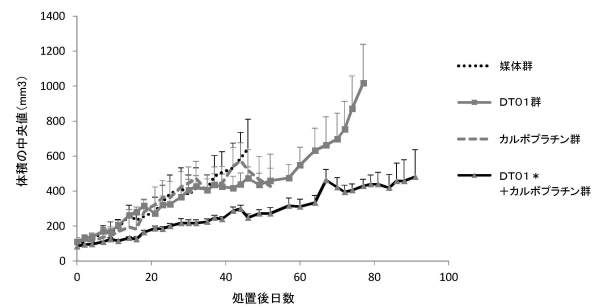
【図 6】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0006949859000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 15/113	(2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 0 7 H 21/04	(2006.01)	C 0 7 H 21/04	C S P B

(73)特許権者 595040744

サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・シャンティフィク  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
フランス国、75016 パリ、リュ・ミシェル・アンジュ 3

(73)特許権者 591100596

アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル  
フランス国、エフ - 75013 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 101

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 デュトレックス, マリー

フランス国、94240 ライ - レ - ローズ、リュ・ドゥ・シャレー 62

(72)発明者 ベルトー, ナタリー

フランス国、91470 プレ - レ - トルー、リュ・デュ・タルトレ 35

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 特表2014 - 516977 (JP, A)

特表2010 - 504085 (JP, A)

Molecular Cancer Therapeutics, 2016年01月, Vol.15, No.1, p.15-22

Int. J. Mol. Sci., 2012年, Vol.13, p.14898-14916

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31 / 713

A 6 1 K 48 / 00

CAplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)