

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6340366号  
(P6340366)

(45) 発行日 平成30年6月6日(2018.6.6)

(24) 登録日 平成30年5月18日(2018.5.18)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/496	(2006.01)
A 61 K 45/00	(2006.01)
A 61 K 31/428	(2006.01)
A 61 P 25/02	(2006.01)
A 61 P 25/00	(2006.01)
	A 61 K 31/496
	A 61 K 45/00
	A 61 K 31/428
	A 61 P 25/02
	A 61 P 25/00

請求項の数 12 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-524902 (P2015-524902)
(86) (22) 出願日	平成25年7月31日 (2013.7.31)
(65) 公表番号	特表2015-523410 (P2015-523410A)
(43) 公表日	平成27年8月13日 (2015.8.13)
(86) 國際出願番号	PCT/IL2013/050655
(87) 國際公開番号	W02014/020608
(87) 國際公開日	平成26年2月6日 (2014.2.6)
審査請求日	平成28年5月6日 (2016.5.6)
(31) 優先権主張番号	61/677,494
(32) 優先日	平成24年7月31日 (2012.7.31)
(33) 優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	502379147 イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド イスラエル国 76100 レホヴォト ピー. オー. ボックス 95 アット ザ ワインツマン インスティチュート オブ サイエンス
(74) 代理人	100105050 弁理士 鷺田 公一
(72) 発明者	ホーンシュタイン エラン イスラエル国 7630243 レホヴォト ハナッシー ハリション ストリート 54

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】運動ニューロン疾患を診断および処置する方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

運動ニューロン疾患(MND)の処置を必要としている対象の前記MNDの処置に使用するための、エノキサシンを有効成分として含むダイサー活性化剤。

## 【請求項 2】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の処置を必要としている対象の前記ALSの処置に使用するための、エノキサシンを有効成分として含むダイサー活性化剤および抗ALS剤を含む、医薬組成物。

## 【請求項 3】

前記抗ALS剤がリルゾールを包含する、請求項2に記載の医薬組成物。 10

## 【請求項 4】

前記MNDが、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮、仮性球麻痺、進行性球麻痺、下位運動ニューロン疾患および脊髄性筋萎縮症からなる群から選択される、請求項1に記載のダイサー活性化剤。

## 【請求項 5】

前記ALSが、RNA代謝不良に関連する変異を有する遺伝子に関連する、または遺伝性ALSである、または孤発性ALSである、請求項2に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

前記ALSが、RNA代謝不良に関連する変異を有する遺伝子に関連する、または遺伝性ALSである、または孤発性ALSである、請求項4に記載のダイサー活性化剤。 20

**【請求項 7】**

有効成分としてのエノキサシン、抗ALS剤、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、ALSの処置に使用するための医薬組成物。

**【請求項 8】**

パッケージング材料にパッケージされ、前記パッケージング材料内または前記パッケージング材料上のALS処置における使用に関する印刷により識別される、エノキサシンおよび抗ALS剤を含む、ALSの処置に使用するための製品。

**【請求項 9】**

MNDを検出する方法であって、

前記MNDの診断を必要としている対象の試料において、

10

(i) 全mRの発現、および任意選択により

(ii) 全プレmRの発現

を分析するステップを含み、

所定の閾値を超える前記(i)または(ii)/(ii)の下方制御が前記MNDの指標となる、方法。

**【請求項 10】**

前記MNDが、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮、仮性球麻痺、進行性球麻痺、下位運動ニューロン疾患および脊髄性筋萎縮症からなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

**【請求項 11】**

20

前記ALSが、RNA代謝不良に関連する変異を有する遺伝子に関連する、または遺伝性ALSである、または孤発性ALSである、請求項10に記載の方法。

**【請求項 12】**

MNDを処置するための薬剤を同定する方法であって、

(a) ALS患者またはALSモデルの運動ニューロンを、候補化合物と接触させるステップと、

(b) ステップ(a)の前およびステップ(a)の後に、

(i) 前記運動ニューロンにおける全mRの発現、および、任意選択により

(ii) 前記運動ニューロンにおける全プレmRの発現

を分析するステップとを含み、

30

ステップ(a)の前と比較してステップ(a)の後の、所定の閾値を超える前記(i)または(ii)/(ii)の上方制御が、前記候補化合物がMNDを処置するための治療剤であることの指標となる、方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、本発明のいくつかの実施形態において、運動ニューロン疾患を診断および処置する方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

40

運動ニューロン疾患(MND)および前頭側頭認知症は、中枢神経系の運動ニューロンの破壊および運動ニューロン経路の退行性変化に起因する神経障害の群に属する。このような疾患は、運動ニューロン以外のニューロンの破壊によって引き起こされる、パーキンソン病、アルツハイマー病、オリーブ橋小脳萎縮症等を含む他の神経変性疾患とは異なっている。典型的に、MNDは進行性の変性疾患であり、上位および下位運動ニューロンを侵し、連続的な全体的筋肉の除神経をもたらす。一般にMNDは、中年で発症するが、広い年齢範囲で症候的疾患の発症が観測される場合があり、既に研究されているいくつかの変異体については18~85歳にわたる。症状には、つかえ感、四肢脱力、不明瞭発語、歩行不良、顔面脱力およびこむら返りが含まれ得る。疾患の末期では、運動ニューロンの死滅に起因して、呼吸器筋系がその神経支配を喪失し、通常これがALS患者の死亡の最

50

終的な原因となる。ほとんどのMNDの原因は知られていないが、環境的、毒性、ウイルス性または遺伝的要因のすべてが疑わしい。

#### 【0003】

上位運動ニューロンおよび下位運動ニューロンを含む運動ニューロンは、随意筋に影響を及ぼし、随意筋に収縮するように刺激を与える。上位運動ニューロンは、大脳皮質に始まり、脳幹および脊髄まで線維を送り、下位運動ニューロンの調節に関与する。下位運動ニューロンは、脳幹および脊髄に位置し、それから線維を筋肉に送っている。下位運動ニューロン疾患は、下位運動ニューロン変性を伴う疾患である。下位運動ニューロンが変性すると、その下位運動ニューロンが正常に活性化する筋線維が連絡切断され、収縮しなくなるため、筋力低下および反射減少が引き起こされる。いずれかのタイプのニューロンの喪失は、脱力感を生じさせ、筋萎縮（消耗）および無痛性脱力感は、MNDの臨床的に顕著な特徴である（さらなる臨床的定義については、非特許文献1を参照されたい）。 10

#### 【0004】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、大脳運動皮質内の錐体細胞（すなわちベツツ巨細胞）、前脊髄運動ニューロンおよび脳幹運動ニューロンの喪失、ならびにそれらの錐体細胞への変性を特徴とする、致命的な運動ニューロン疾患である。ALSは、臨床面から見ると、上位運動ニューロンおよび下位運動ニューロンの両方の徴候を示し、疾患の発症後に急速な臨床的悪化を示すため、数年以内に死に至る。

#### 【0005】

多くの他の運動ニューロン疾患と同様に、ごくわずかな割合（約10%～20%）のALSは、遺伝性である。ALSの遺伝的疫学により、疾患の遺伝について説明できる少なくとも12の染色体位置が明らかになっている（ALS1～ALS12）。これらの中でも、いくつかの遺伝子が同定されている。最初の遺伝子は、ALSの常染色体優性形態の20%を占める細胞質基質Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ（SOD-1）遺伝子として1993年に同定された（非特許文献2）。 20

#### 【0006】

前頭側頭認知症は、ALSと共にTDP-43およびFUSなどの遺伝子の変異を含む病因病理学的な（etiopathological）遺伝的原因を共有する、ヒトの神経変性疾患である。さらに患者集団の一部は、前頭側頭認知症およびALSの両方に罹患している。したがってこれらの疾患は、1つの分子および臨床スペクトルで生じる。 30

#### 【0007】

リルゾールは、米国および日本でALSに対して承認されている唯一の薬物である。リルゾールは、元々、グルタミン酸放出を阻害する抗けいれん剤として開発されたものであり、いくつかの臨床試験では、ALS患者の生存に対してごくわずかに有効性を呈することが報告されている（非特許文献3および非特許文献4）。

#### 【0008】

マイクロRNA（miRNAとしても知られる）は、非コード低分子RNAファミリーの20～24ヌクレオチド（nt）RNA分子メンバーである。マイクロRNAは、哺乳動物、虫、ショウジョウバエおよび植物において同定されており、組織および細胞型に特異的な方式でそれらの標的メッセンジャーRNA（mRNA）転写物の安定性を調節すると考えられている。主に、マイクロRNAは、標的mRNAの3'-非翻訳領域（3'-UTR）に結合し、それにより翻訳を抑制することによって、またはsiRNAと同様に配列依存的に標的転写物に結合し、それを破壊することによって、RNAの安定性を調節する。 40

#### 【0009】

マイクロRNAは、ALS、脆弱X症候群、脊髄性筋萎縮症（SMA）、早期発症型パーキンソニズム（Waisman症候群）およびX連鎖精神遅滞（MRX3）などの様々な神経学的疾患に関与するとされている。

#### 【0010】

特許文献1は、ALSを含む運動ニューロン疾患（MND）を処置するための医薬の調 50

製における、m i R N A - 9 またはm i R N A - 9 \* の活性または量を上方制御する薬剤を使用することを教示している。

**【0011】**

特許文献2は、A L Sを含むM N Dを処置するために100を超えるm i R N Aを投与することを教示している。

**【0012】**

特許文献3は、A L Sを含むM N Dを処置するためにm i R - 2 0 6 および / またはm i R - 1 を投与することを教示している。

**【0013】**

関連する追加の背景技術として、特許文献4が挙げられる。

10

**【0014】**

興味深いことに、T D P - 4 3 およびF U SなどのR N A結合タンパク質をコードする遺伝子の特異的変異<sup>1</sup>、<sup>2</sup>は、A L Sの病因に関連するとされている<sup>3</sup>～<sup>6</sup>。

**【0015】**

非特許文献5は、R N A代謝におけるT D P - 4 3 およびF U S / T L Sの役割を記載している。これらのタンパク質の誤った局在化は、一般的なm i R N A細胞集団および選択されたメンバーの両方に関して、ドローシャプロセシング酵素の機能を変えるおそれがある。

**【0016】**

非特許文献6は、T D P - 4 3 が、選択されたm i R N Aレベルに影響を及ぼすことを示している。

20

**【0017】**

非特許文献7は、細胞質T D P - 4 3 が、ダイサー複合体と相互作用し、末端ループと結合して、選択されたm i R N A集団のプロセシングを促進することを示している。

**【0018】**

神経細胞の細胞質タンパク質凝集およびR N A代謝不全は、A L S（および恐らく他の神経変性障害）に関する共通の病原性機構であることが示唆された。さらに、多型m i R N A媒介による遺伝子調節は、特に、運動ニューロン疾患を含む神経変性の機序として示唆されている<sup>7</sup>～<sup>10</sup>。さらに近年、ダイサー-1の不活化によるm i R N Aバイオプロセシングの喪失は、脊髄運動ニューロン変性を引き起こすのに十分であることが証明された<sup>11</sup>。

30

**【0019】**

関連背景技術

特許文献5は、細胞において対象となるポリヌクレオチドのサイレンシングをモジュレートする化合物を含む方法および組成物を開示している。かかる化合物は、適切なサイレンシング因子と組み合わせると、サイレンシング因子の標的ポリヌクレオチドのレベルをモジュレート（増大または低減）するために使用することができる。遺伝子発現のR N A i媒介による抑制を伴う治療、ならびに、対象ポリヌクレオチドの発現のモジュレーションの標的化を可能とするインビトロ法の両方で、かかる組成物を使用する方法が提供されている。このような化合物およびサイレンシング因子を含む医薬用または化粧用組成物も開示されている。異種サイレンシング因子の活性をモジュレートする能力について対象となる化合物をスクリーニングする方法も提供されている。追加の背景関連技術：特許文献6。

40

**【先行技術文献】**

**【特許文献】**

**【0020】**

**【特許文献1】**国際公開第2010/06424号

**【特許文献2】**米国特許出願公開第2006/0247193号明細書

**【特許文献3】**米国特許出願公開第2009/0246136号明細書

**【特許文献4】**米国特許出願公開第2008/0176766号明細書

50

- 【特許文献 5】米国特許出願公開第 2012 / 0071539 号明細書  
 【特許文献 6】米国特許第 6,756,369 号明細書  
 【特許文献 7】米国特許出願公開第 2009 / 0306035 号明細書  
 【特許文献 8】米国特許第 4,666,828 号明細書  
 【特許文献 9】米国特許第 4,683,202 号明細書  
 【特許文献 10】米国特許第 4,801,531 号明細書  
 【特許文献 11】米国特許第 5,192,659 号明細書  
 【特許文献 12】米国特許第 5,272,057 号明細書  
 【特許文献 13】米国特許第 3,791,932 号明細書  
 【特許文献 14】米国特許第 3,839,153 号明細書  
 【特許文献 15】米国特許第 3,850,752 号明細書  
 【特許文献 16】米国特許第 3,850,578 号明細書  
 【特許文献 17】米国特許第 3,853,987 号明細書  
 【特許文献 18】米国特許第 3,867,517 号明細書  
 【特許文献 19】米国特許第 3,879,262 号明細書  
 【特許文献 20】米国特許第 3,901,654 号明細書  
 【特許文献 21】米国特許第 3,935,074 号明細書  
 【特許文献 22】米国特許第 3,984,533 号明細書  
 【特許文献 23】米国特許第 3,996,345 号明細書  
 【特許文献 24】米国特許第 4,034,074 号明細書  
 【特許文献 25】米国特許第 4,098,876 号明細書  
 【特許文献 26】米国特許第 4,879,219 号明細書  
 【特許文献 27】米国特許第 5,011,771 号明細書  
 【特許文献 28】米国特許第 5,281,521 号明細書  
 【非特許文献】  
 【0021】  
 【非特許文献 1】Online Mendelian Inheritance in Man(R)  
 【非特許文献 2】Rosen et al., 1993, Nature, 1993 Mar 4;362(6415):59-62  
 【非特許文献 3】Rowland L P and Shneider N A, 2001, N Engl J Med, 344, 1688-1700  
 【非特許文献 4】Turner M R and Parton M J, 2001, Semin Neurol 21: 167-175  
 【非特許文献 5】Buratti et al. 2010 (RNA Biology 7:4(420-429))  
 【非特許文献 6】Buratti et al. 2010 FEBS J. 2268-2281  
 【非特許文献 7】Kawahara et al. 2012 PNAS 109(9):3347-3352  
 【非特許文献 8】Ge Shan et al. 2008 Nature Biotechnology 26(8):933  
 【非特許文献 9】Li Y. et al., Cell Metab. 2012 Jun 6;15(6):895-904  
 【非特許文献 10】「Remington's Pharmaceutical Sciences」, Mack Publishing Co.,  
 Easton, PA, latest edition  
 【非特許文献 11】Pioro Clin Neurosci. 1995-1996;3(6):375-85  
 【非特許文献 12】Talan Neurology Today: 19 November 2009 - Volume 9 - Issue 22  
 - p 10-11  
 【非特許文献 13】Wegorzewska, 2009 PNAS 106, p. 18809-14  
 【非特許文献 14】Gurney, 1994, Science 264 p.1772-5  
 【非特許文献 15】Enoxacin pharmacokinetics and efficacy in CF-1 mice, Chartand  
 S.A. et al., Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1987) 19, 221-224  
 【非特許文献 16】Wise R, Lockley R, Webberly M, Adhami ZN. The pharmacokinetics  
 and tissue penetration of enoxacin and norfloxacin. J Antimicrob Chemother. 198  
 4 Sep;14 Suppl C:75-81. PubMed PMID: 6238932  
 【非特許文献 17】Wolf R, Eberl R, Dunky A, Mertz N, Chang T, Goulet JR, Latts J.  
 The clinical pharmacokinetics and tolerance of enoxacin in healthy volunteers.  
 J Antimicrob Chemother. 1984 Sep;14 Suppl C:63-9. PubMed PMID: 6389476  
 10  
 20  
 30  
 40  
 50

- 【非特許文献 18】Fingl et al., 1975, in 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p.1
- 【非特許文献 19】Smirnova IV Spine (Phila Pa 1976). 1998 Jan 15;23(2):151-8
- 【非特許文献 20】Wichterle, H., et al.[Cell 110, 385-97 (2002)]
- 【非特許文献 21】「Molecular Cloning: A laboratory Manual」 Sambrook et al., (1989)
- 【非特許文献 22】「Current Protocols in Molecular Biology」 Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994)
- 【非特許文献 23】Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) 10
- 【非特許文献 24】Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」, John Wiley & Sons, New York (1988)
- 【非特許文献 25】Watson et al., 「Recombinant DNA」, Scientific American Books, New York
- 【非特許文献 26】Birren et al. (eds) 「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)
- 【非特許文献 27】「Cell Biology: A Laboratory Handbook」, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994)
- 【非特許文献 28】「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」 by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition 20
- 【非特許文献 29】「Current Protocols in Immunology」 Volumes I-III Coligan J. E. ., ed. (1994)
- 【非特許文献 30】Stites et al. (eds), 「Basic and Clinical Immunology」 (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)
- 【非特許文献 31】Mishell and Shiigi (eds), 「Selected Methods in Cellular Immunology」, W. H. Freeman and Co., New York (1980)
- 【非特許文献 32】「Oligonucleotide Synthesis」 Gait, M. J., ed. (1984)
- 【非特許文献 33】「Nucleic Acid Hybridization」 Hames, B. D., and Higgins S. J. , eds. (1985)
- 【非特許文献 34】「Transcription and Translation」 Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984) 30
- 【非特許文献 35】「Animal Cell Culture」 Freshney, R. I., ed. (1986)
- 【非特許文献 36】「Immobilized Cells and Enzymes」 IRL Press, (1986)
- 【非特許文献 37】「A Practical Guide to Molecular Cloning」 Perbal, B., (1984)
- 【非特許文献 38】「Methods in Enzymology」 Vol. 1-317, Academic Press
- 【非特許文献 39】「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」, Academic Press, San Diego, CA (1990)
- 【非特許文献 40】Marshak et al., 「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」 CSHL Press (1996)
- 【非特許文献 41】Alves CJ et al. [Alves CJ et al., Brain Res. (2011) Jun 7; 139 4:90-104] 40
- 【非特許文献 42】Campos-Melo D. et al. Mol Brain. (2013) 6:26
- 【発明の概要】
- 【課題を解決するための手段】
- 【0022】
- 本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、運動ニューロン疾患（MND）の処置を必要としている対象の運動ニューロン疾患（MND）を処置する方法であって、対象にプレミRNAのプロセシングを増強することができる治療有効量の薬剤を投与し、それによって対象の運動ニューロン疾患（MND）を処置するステップを含む方法を提供する。

**【0023】**

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、運動ニューロン疾患（MND）の処置を必要としている対象の運動ニューロン疾患（MND）の処置に使用するための、プレmRNAのプロセシングを増強することができる薬剤を提供する。

**【0024】**

本発明のいくつかの実施形態によれば、プレmRNAのプロセシングを増強することができる薬剤は、核プロセシングエンハンサー、核外輸送エンハンサーおよび細胞質プロセシングエンハンサーからなる群から選択される。

**【0025】**

本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞質プロセシングエンハンサーは、ダイサー 10 エンハンサーを含む。

**【0026】**

本発明のいくつかの実施形態によれば、ダイサーエンハンサーは、キノロンを含む。

**【0027】**

本発明のいくつかの実施形態によれば、ダイサーエンハンサーは、エノキサシン、シブロフロキサシンおよびオフロキサシンからなる群から選択される。

**【0028】**

本発明のいくつかの実施形態によれば、キノロンは、エノキサシンを含む。

**【0029】**

本発明のいくつかの実施形態によれば、MNDは、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を含む。 20

**【0030】**

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の処置を必要としている対象のALSを処置する方法であって、プレmRNAのプロセシングを増強することができる治療有効量の薬剤および抗ALS剤を対象に投与し、それによって対象のALSを処置するステップを含む方法を提供する。

**【0031】**

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の処置を必要としている対象のALSの処置に使用するための、プレmRNAのプロセシングを増強することができる薬剤および抗ALS剤を提供する。 30

**【0032】**

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗ALS剤は、リルゾールを含む。

**【0033】**

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、有効成分としてのプレmRNAのプロセシングを増強することができる薬剤、抗ALS剤、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。

**【0034】**

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、パッケージング材料にパッケージされ、パッケージング材料内または上にあるALS処置における使用に関する印刷により識別される、プレmRNAのプロセシングを増強することができる薬剤および抗ALS剤を含む製品を提供する。 40

**【0035】**

本発明のいくつかの実施形態によれば、プレmRNAのプロセシングを増強することができる薬剤は、キノロンを含む。

**【0036】**

本発明のいくつかの実施形態によれば、キノロンは、エノキサシンを含む。

**【0037】**

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、MNDを診断する方法であって、前記方法が、MNDの診断を必要としている対象の試料において、

(i) 全mRNAの発現、および任意選択により

( i i ) 全プレm i R の発現  
を分析することを含み、

所定の閾値を超える ( i ) または ( i ) / ( i i ) の下方制御がM N D の指標となる、方法を提供する。

【 0 0 3 8 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、M N D を診断する方法であって、前記方法が、M N D の診断を必要としている対象の試料において、

( i ) m i R の発現、および  
( i i ) m i R の前駆体の発現  
を分析するステップを含み、

所定の閾値を超える ( i ) / ( i i ) の下方制御がM N D の指標となる、方法を提供する。

【 0 0 3 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、m i R は、m i R - 9 である。

【 0 0 4 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M N D は、A L S 、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮、仮性球麻痺、進行性球麻痺、下位運動ニューロン疾患および脊髄性筋萎縮症からなる群から選択される。

【 0 0 4 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、運動ニューロン疾患は、筋萎縮性側索硬化症 ( A L S ) を含む。

【 0 0 4 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、A L S は、R N A 代謝不良に関連する変異を有する遺伝子に関連している。

【 0 0 4 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、遺伝子は、T D P - 4 3 およびF U S からなる群から選択される。

【 0 0 4 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、A L S は、遺伝性A L S である。

【 0 0 4 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、A L S は、孤発性A L S である。

【 0 0 4 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、試料は、脳脊髄液 ( C S F ) 試料または血液試料を含む。

【 0 0 4 7 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、M N D を処置するための薬剤を同定する方法であって、

( a ) A L S 患者またはA L S モデルの運動ニューロンを、候補薬剤と接触させるステップと、

( b ) ステップ ( a ) の前およびステップ ( a ) の後に、

( i ) 運動ニューロンにおける全m i R の発現、および任意選択により

( i i ) 運動ニューロンにおける全プレm i R の発現  
を分析するステップとを含み、

ステップ ( a ) の前と比較してステップ ( a ) の後の、所定の閾値を超える ( i ) または ( i ) / ( i i ) の上方制御が、候補化合物がM N D を処置するための治療剤であるとの指標となる、方法を提供する。

【 0 0 4 8 】

別段定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および / または科学用語は、本発明が関与する分野の当業者に共通に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似のまたは等価な方法および材料は、本発明の実施形態の実施

10

20

30

40

50

または試験に使用することができるが、例示的な方法および／または材料を以下に記載する。矛盾が生じた場合、定義を含む本明細書が優先する。さらに、材料、方法および実施例は、単に例示的なものであり、必ずしも制限することを企図されない。

#### 【0049】

特許または特許出願ファイルは、色付きで作成された少なくとも1つの図を含有する。色付き図面を伴うこの特許または特許出願刊行物の複写は、要求および必要な料金の支払いに応じて庁から提供される。

#### 【0050】

本発明のいくつかの実施形態を、添付の図を参照することによって本明細書に单なる例として記載する。ここで、特に図を詳細に参照するが、示されている詳細は例示的であり、本発明の実施形態を例示的に議論する目的のものであることを強調しておく。これに関して、図を伴ってなされる説明により、本発明の実施形態を実施し得る方法が当業者に明らかとなる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0051】

【図1A】m i R N A が孤発性 A L S 患者の運動ニューロンにおいて全体的に低減することを示す図であって、非神経変性（対照）および A L S 運動ニューロン（患者）における m i R - 9 の代表的な蛍光性 *in situ* ハイブリダイゼーション顕微鏡写真である。スケールバーは 10 μM を示す。

【図1B】m i R N A が孤発性 A L S 患者の運動ニューロンにおいて全体的に低減することを示す図であって、2人のA L S 患者および2人の非A L S 対照から得た試料により *in situ* で実施した後の、300の異なる運動ニューロンにおいて定量化した m i R - 9 の信号強度を示す棒グラフである。任意単位は、低分子 R N A U 6 の発現信号に対して正規化したものである。

【図1C】m i R N A が孤発性 A L S 患者の運動ニューロンにおいて全体的に低減することを示す図であって、2人のA L S 患者および2人の非A L S 対照から得た試料により *in situ* で実施した後の、300の異なる運動ニューロンにおいて定量化した m i R - 12 4 の信号強度を示す棒グラフである。任意単位は、低分子 R N A U 6 の発現信号に対して正規化したものである。

【図2】A L S を引き起こす T D P - 4 3 または F U S 変異体の発現時の m i R N A プロセシングの不良が、エノキサシンによって救済され得ることを示す図である。A L S を引き起こす T D P - 4 3 A 3 1 5 T (図2A)、T D P - 4 3 M 3 3 7 V (図2B)、F U S 4 9 5 X (図2C)、または F U S R 5 2 1 G (図2D) 変異体のドキシサイクリン誘発性形態を N S C - 3 4 細胞にトランスフェクトすることにより、成熟 m i R N A が下方制御される一方、プレ m i R N A レベルは、それに応じて上方制御される。棒グラフ表示は、G F P をトランスフェクトし、ドキシサイクリンで処置した細胞における相対的な m i R N A 発現レベルを、低分子 R N A U 6 または 5 S の発現と比較して 1 o g<sub>2</sub> 尺度で示している。100 μM エノキサシンを導入すると、A L S を引き起こす変異体：T D P - 4 3 A 3 1 5 T (図2E) または F U S 4 9 5 X (図2F) をトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞における成熟 m i R N A の発現の下方制御が回復し、T D P - 4 3 A 3 1 5 T (図2G) または F U S 4 9 5 X (図2H) によるプレ m i R N A の上方制御が逆転する。データは、G F P をトランスフェクトし、ドキシサイクリンで処置した培養物における m i R N A レベルに対して正規化し、低分子 R N A U 6 または 5 S の発現に対して正規化したものである。プレ m i R N A 発現は、ベータアクチンに対して正規化した。両側スチュードント t 試験を使用して、事後 Benjamin-Hochberg 補正を用いて統計を実施した。 \* p 値 < 0.05 ; \*\* p 値 < 0.005 。

【図3】A L S を引き起こす T D P - 4 3 または F U S 変異体の発現時の m i R N A プロセシングの不良が、エノキサシンによって救済され得ることを示す図である。F U S 4 9 5 X の影響を、プレ m i R N A および成熟 m i R N A のディープシークエンシングによって全体的に研究すると、ダイサーの活性および m i R N A の成熟化が広範に抑制されるこ

10

20

30

40

50

とが明らかになった。

【図4】疾患の進行に対するエノキサシンの影響を示す図である。SOD1 G93Aマウスの飲料水にエノキサシンを連続的に投与すると、全般的な生涯期間に対してはわずかな効果しかなかったが(図4A)、神経学的スコア(図4B)、ハングワイヤー試験における全体強度、および(図4D)コンピューター化cat-walkアッセイにおける全般的な運動機能に対して(図4C)、有益な影響を呈した。

【図5】m i R - 発現が、SOD1変異体ALSの家族性形態において変化し、エノキサシンによってインビトロで正常化され得ることを示す図である。100 μMエノキサシンを導入すると、ALSを引き起こす変異体:SOD1 G93A(図5A)をトランスフェクトしたHEK293細胞における成熟m i RNAの発現の下方制御が回復し、Sod1 G93A(図5B)によるプレm i RNAの上方制御が逆転する。データは、GFPをトランスフェクトし、ドキシサイクリンで処置した培養物におけるm i RNAレベルに対して正規化し、低分子RNA 5Sの発現に対して正規化したものである。プレm i RNA発現は、ベータアクチンに対して正規化した。両側スチューデントt試験を使用して、事後Benjamini-Hochberg補正を用いて統計を実施した。<sup>\*</sup> p値 < 0.05 ; <sup>\*\*</sup> p値 < 0.005。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0052】

本発明は、本発明のいくつかの実施形態において、運動ニューロン疾患を診断および処置する方法に関する。

##### 【0053】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、以下の説明に記載され、または実施例によって例示されている詳細にその適用を必ずしも制限されないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態を含むことができ、または様々な方式で実施もしくは実行することができる。

##### 【0054】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、ヒトの運動系の神経変性疾患である。近年、ALSを引き起こす変異が、RNA結合タンパク質をコードする遺伝子において発見され、RNA代謝の調節異常(主にALS対象のm i RNAレベルの下方制御)に関連するとされた。

##### 【0055】

本発明者らは本発明を着想しながら、運動ニューロン疾患(MND)では一般的(非特異的)なマイクロRNA(m i RNA)の代謝が変化するので、この代謝変化の逆転は、このような疾患の処置の新規な治療様式として使用できると仮定した。

##### 【0056】

本発明者らは、マイクロRNAがALS運動ニューロンにおいて広範に下方制御される一方(図1A～Cおよび図2A～D)、それらの前駆体は高レベルで存在すること(図2A～Dおよび図3)を示すことによって、この仮定を確認した。さらに本発明者らは、RNA結合タンパク質におけるALSを引き起こす変異が、マイクロRNA前駆体のダイシングを妨げること、およびこの活性が、ALSを引き起こす変異の遺伝的背景に応じてフルオロキノロン、エノキサシンによって修復されることを示し(TDP-43、FUSおよびSOD1、図2E～Hおよび図5C～D参照)、様々な疾患を引き起こす変異体の存在下で観測されたm i RNAの調節異常の全体的性質を示唆した。さらに本発明者らは、ALSマウスモデルにおいて、神経学的スコア(図4b)、ハングワイヤー試験(図4c)および自動化cat-walk研究(図4d)によってアッセイした場合、マウスの神経筋機能の悪化がエノキサシンによる処置で緩慢になったことを示した。したがって、マイクロRNAの調節異常により、ALS病変形成の新しい機構についての見識および治療上の潜在的手掛かりが得られる。さらに、m i RNA発現プロファイルは、一般にMND、特にALSの診断で使用することができる。

##### 【0057】

10

20

30

40

50

したがって本発明の一態様によれば、運動ニューロン疾患（MND）の処置を必要としている対象における運動ニューロン疾患（MND）を処置する方法であって、対象にプレm i RNAのプロセシングを増強することができる治療有効量の薬剤を投与し、それによって対象の運動ニューロン疾患（MND）を処置するステップを含む方法を提供する。

#### 【0058】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」は、状態の進行を阻止し、実質的に阻害し、緩徐し、もしくは逆転し、状態の臨床的もしくは審美的症状を実質的に寛解させ、または状態の臨床的もしくは審美的症状の出現を実質的に防止することを含む。

#### 【0059】

用語「運動ニューロン疾患（MND）」は、本明細書で使用される場合、運動ニューロンを選択的に破壊する神経学的障害を指す。したがって、ハンチントン舞蹈病などの疾患は、MNDには分類されない。

#### 【0060】

本発明のさらなる一態様によれば、対象は、前頭側頭認知症に罹患している。

#### 【0061】

運動ニューロン疾患の例として、ルーゲーリッギ疾患としても知られる筋萎縮性側索硬化症（ALS）、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮、仮性球麻痺、進行性球麻痺、下位運動ニューロン疾患および脊髄性筋萎縮症1（SMA1、ウェルドニッヒ-ホフマン疾患）、脊髄性筋萎縮症タイプ2（SMA2）および脊髄性筋萎縮症タイプ3（SMA3、クーゲルベルク-ヴェランダー疾患）ならびにシャルコー-マリー-トゥース障害が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0062】

具体的な一実施形態によれば、MNDは、筋萎縮性側索硬化症（ALS）である。

#### 【0063】

さらに具体的な実施形態によれば、対象は、RNA代謝の変化が報告されているかまたは本発明の教示に従って決定され得るMNDまたはALSに罹患している。RNA代謝の変化に関連する変異の例として、TDP-43、FUS、ANGおよびSETXの変異が挙げられるが、それらに限定されない（Chen et al., 2004; Greenway et al., 2006; Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Kwiatkowski et al., 2009; Lagier-Turenne and Cleveland, 2009; Vance et al., 2009）。

#### 【0064】

本明細書で使用される場合、用語「対象」または「運動ニューロン疾患（MND）の処置を必要としている対象」は、MNDと診断された任意の性別または年齢の哺乳動物、例えばヒトを指す。疾患（例えばALS）は、家族性（遺伝性）または孤発性であり得る。

#### 【0065】

さらなる一実施形態によれば、対象は、クラミジア感染症に罹患していない。

#### 【0066】

本明細書で使用される場合、「プレm i RNAのプロセシングを増強することができる薬剤」は、m i RNAプロセシング経路の任意の一部を上方制御または活性化する分子または組成物を指す。典型的に、この薬剤は、プレm i RNA産生の下流経路を上方制御または活性化する。これは本発明者らが、ALS派生細胞においてプレm i Rが正常に形成され、さらには上方制御されることを示したことによる。この薬剤は、「RNAiエンハンサー」と呼ぶことができる。

#### 【0067】

以下は、m i RNAプロセシング経路のいくつかの非常に重要な構成成分であり、これらのそれぞれは、本発明の教示に従って上方制御または活性化することができる。

#### 【0068】

##### 核プロセシング

単一のpri-miRNAは、1~6種のm i RNA前駆体を含有し得る。これらのヘアピンループ構造は、それぞれ約70のヌクレオチドから構成される。各ヘアピンは、効

10

20

30

40

50

率的なプロセシングに必要な配列に隣接している。pri-miRNAにおけるヘアピンの二本鎖RNA構造は、DiGeorge症候群に関連して命名されたDiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8または無脊椎動物の「Pasha」)として知られる核タンパク質によって認識される。DGCR8は、RNAを切断して「マイクロプロセッサ」複合体を形成するタンパク質である酵素ドローシャに関連している。この複合体において、DGCR8により、ドローシャの触媒RNase IIIドメインは、ヘアピン塩基から約11ヌクレオチド離れたRNAを切断することによってpri-miRNAからヘアピンを遊離するように方向付けられる(2つのらせん状RNAがステムに変わる)。得られた産物は、その3'末端に2つのヌクレオチドオーバーハングを有し、当該オーバーハングは、3'ヒドロキシル基および5'リン酸基を有している。これは、プレmiRNA(前駆体miRNA)と呼ばれることが多い。10

#### 【0069】

##### 核外輸送

プレmiRNAヘアピンは、核細胞質間シャトルエクスポート - 5を伴うプロセスで核から輸出される。カリオフェリンファミリーのメンバーであるこのタンパク質は、プレmiRNAヘアピンの3'末端においてRNase III酵素ドローシャによって残された2つのヌクレオチドオーバーハングを認識する。細胞質へのエクスポート - 5媒介性輸送は、エネルギー依存性であり、Ranタンパク質に結合したGTPを使用する。

#### 【0070】

##### 細胞質プロセシング

20

細胞質では、プレmiRNAヘアピンは、RNase III酵素ダイサーによって切断される。このエンドリボヌクレアーゼは、ヘアピンの3'末端と相互作用し、3'および5'アームをつなぐループを切り取り、長さ約22のヌクレオチドの不完全なmiRNA:miRNA\*二本鎖を生じる。全般的なヘアピンの長さおよびループの大きさは、ダイサープロセシング効率に影響を及ぼし、miRNA:miRNA\*対合の不完全な性質も、切断に影響を及ぼす。二本鎖のいずれかの鎖は、機能的miRNAとして潜在的に作用することができるが、通常は一方の鎖だけがRNA誘発型サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれ、そこでmiRNAとそのmRNA標的が相互作用する。

#### 【0071】

したがって本発明の実施形態によれば、プレmiRNAのプロセシングを増強することができる薬剤は、核プロセシングエンハンサー、核外輸送エンハンサーおよび細胞質プロセシングエンハンサーからなる群から選択される。30

#### 【0072】

本発明の具体的な実施形態によれば、薬剤は、MNDに罹患している対象(例えばMNDを引き起こす変異を担持している細胞)の未処理試料におけるプレmiRNAプロセシングと比較して、プレmiRNAのプロセシングを、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%(例えば、50%以上)またはそれを超えて上方制御する。

#### 【0073】

miRNAプロセシングを評価する方法は、当技術分野で周知である。例えば、全miRNAのレベルをプレmiRNAと比較する分析を、miRNAプロセシングの強力な指標として使用することができ、以下の実施例に例示する。40

#### 【0074】

具体的な一実施形態によれば、薬剤は、核プロセシングエンハンサー、核外輸送エンハンサーおよび細胞質プロセシングエンハンサーからなる群から選択される。

#### 【0075】

さらなる一実施形態によれば、細胞質プロセシングエンハンサーは、ダイサーエンハンサーを含む(すなわち、ダイサーの働きを上方制御または活性化する)。

#### 【0076】

非特許文献8は、RNAi経路のモジュレーターを同定する方法を教示している。この50

ような方法は、本発明の教示に沿って使用できるさらなる薬剤を同定するために実行することができる。

【0077】

特許文献7は、RNAiエンハンサーとしてのキノロンを教示しており、この特許文書はその全体が参照によって本明細書に援用される。

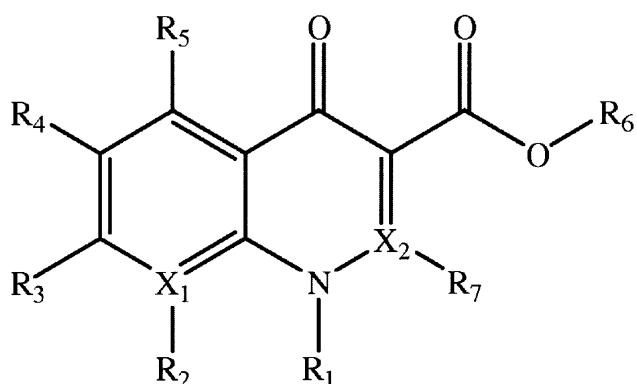
【0078】

キノロン（またはキノロン）化合物は、広域抗生物質の一クラスを形成する。キノロンは、細菌のDNAジャイレースおよび／またはトポイソメラーゼIV酵素を阻害することによって作用すると考えられている。キノロンは、このようにしてDNA複製を阻害し、殺菌作用がある。したがってキノロンは、細菌の遺伝的複製を妨害することによって細菌細胞の複製を阻害するので、真の抗生物質ではなく化学剤とみなされる。代表的な非限定的なキノロン系抗生物質は、特許文献7の表1に提示されており、そのいくつかを以下に提示する。

【0079】

キノロン系抗生物質に共通のファルマコフォアを、式(a)に提示する。

【化1】



[式中、

X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>は、それぞれ独立に、炭素または窒素であり、

R<sub>1</sub>は、H、アルキル、置換アルキル、アルキルアミノ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、および置換アリールからなる群から選択され、

R<sub>2</sub>は、存在してもしなくてもよく、存在する場合、H、ハロ、アルキル、置換アルキル、およびアルコキシルからなる群から選択され、または

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、一緒になって、4～6員の複素環構造の一部を形成し、ここで4～6員の複素環構造は、炭素、窒素、酸素、硫黄、およびその組合せからなる群から選択される原子を含み、

R<sub>3</sub>は、H、ハロ、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアリール、および置換ヘテロアリールからなる群から選択され、

R<sub>4</sub>は、ハロであり、

R<sub>5</sub>は、H、アルキル、置換アルキル、アミノ、アルコキシル、ヒドロキシル、およびハロからなる群から選択され、

R<sub>6</sub>は、H、アルキル、および置換アルキルからなる群から選択され、

R<sub>7</sub>は、存在してもしなくてもよく、存在する場合、H、アルキル、置換アルキル、アミノ、アルコキシル、ヒドロキシル、およびハロからなる群から選択され、または

R<sub>1</sub>およびR<sub>7</sub>は、一緒になって、4～6員の複素環構造の一部を形成し、ここで4～6員の複素環構造は、炭素、窒素、酸素、硫黄、およびその組合せからなる群から選択される原子を含む]、または

薬学的もしくは化粧用として許容されるその塩。

【0080】

10

20

30

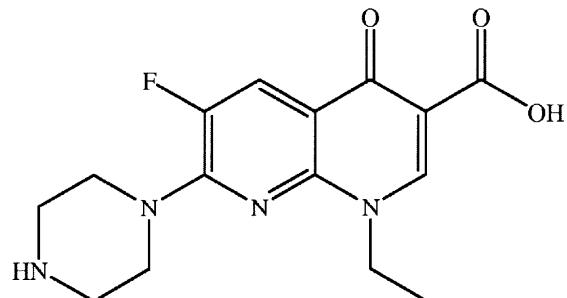
40

50

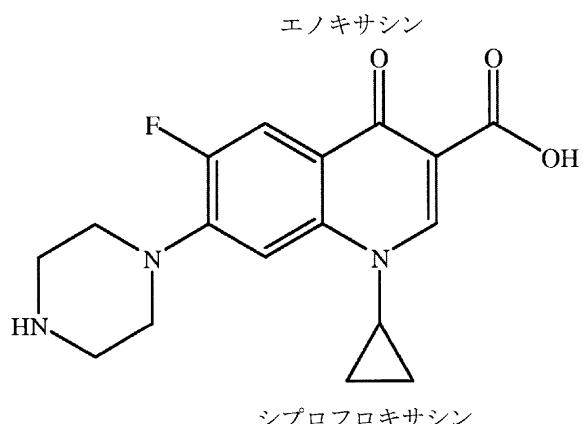
いくつかの実施形態では、式(a)のキノロン化合物は、エノキサシン、シプロフロキサシン、およびオフロキサシンからなる群から選択され、それらの構造をスキームIに提示する。

## 【0081】

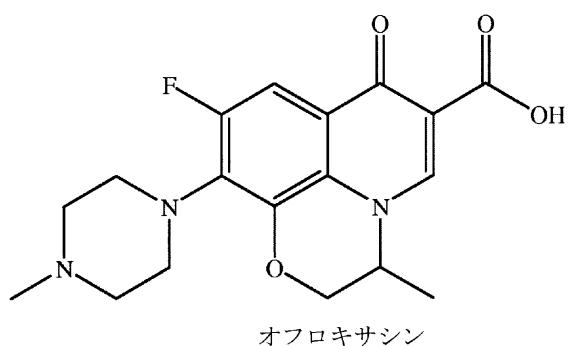
スキームI. エノキサシン、シプロフロキサシン、およびオフロキサシンの化学構造  
【化2】



10



20



30

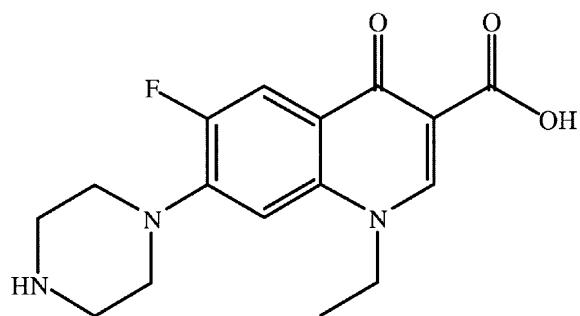
エノキサシン、シプロフロキサシン、およびオフロキサシンは、一般に、「第2世代」キノロンに分類される。また第2世代キノロンとして、フレロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、ナジフロキサシン、ノルフロキサシン、ペフロキサシン、ルフロキサシン、およびトスフロキサシンが挙げられるが、それらに限定されない。これらの化学構造を、スキームIIに提示する。

40

## 【0082】

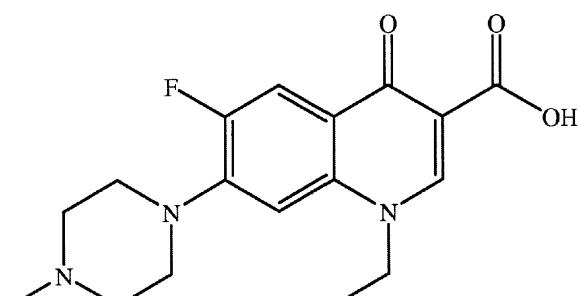
スキームII. 第2世代キノロンの化学構造

【化3】



10

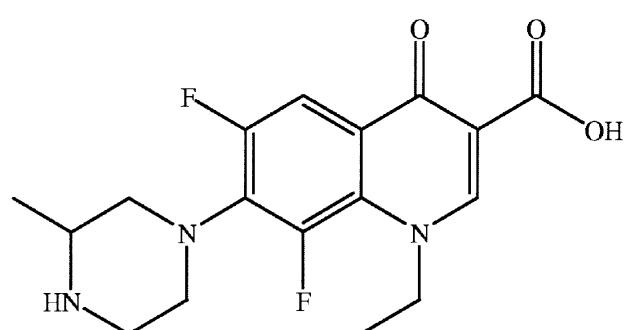
ノルフロキサシン



20

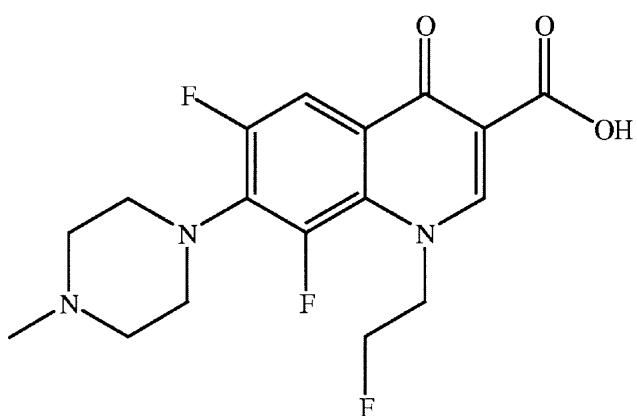
ペフロキサシン

【化4】



30

ロメフロキサシン

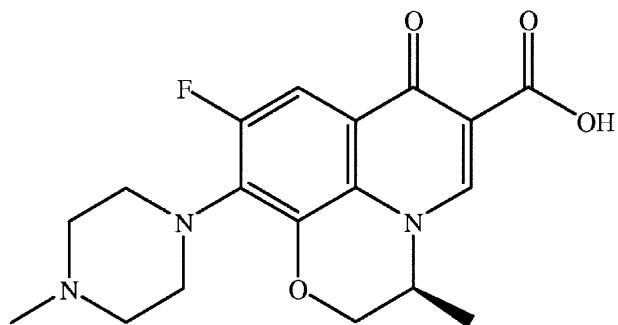


40

フレロキサシン

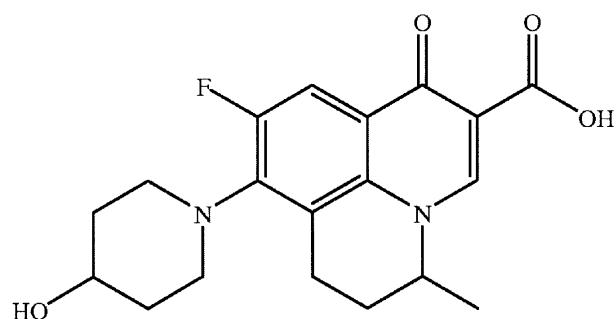
50

【化5】



10

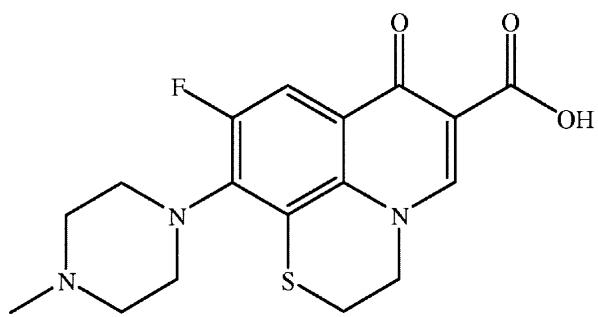
レボフロキサシン



20

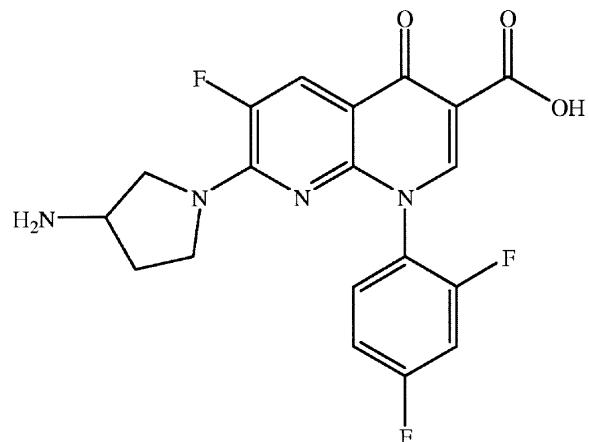
ナジフロキサシン

【化6】



10

ルフロキサシン



20

トスフロキサシン

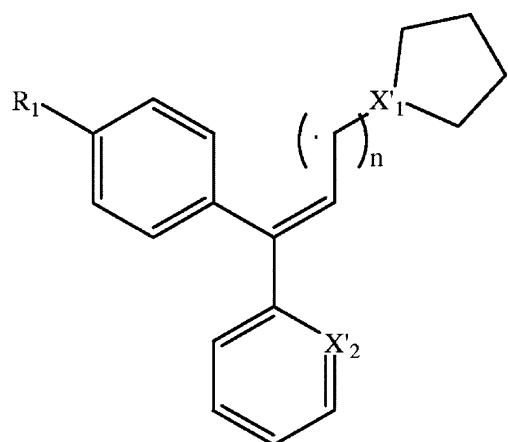
【0083】

特許文献5は、RNAiのさらなるエンハンサーを教示している。

30

(a)トリプロリジン、その誘導体および類似体(式b):

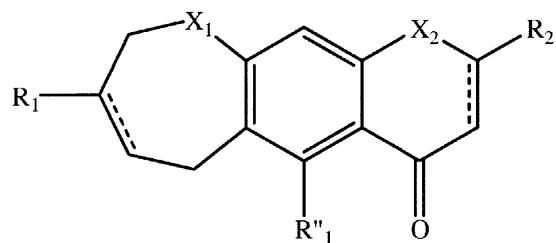
【化7】



40

(b)ジヒドロプロテロキシリソ、その誘導体および類似体(式c):

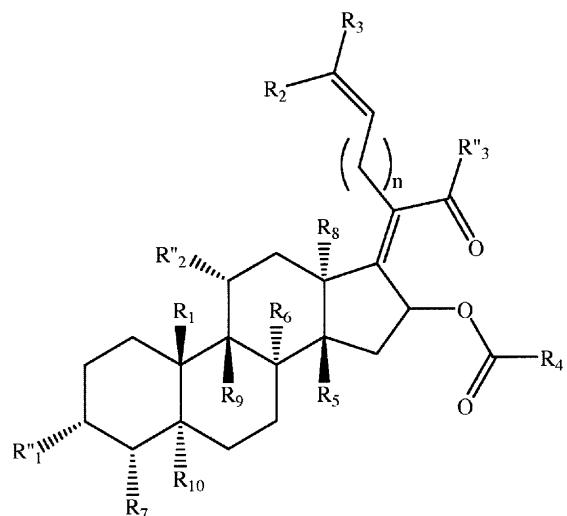
【化 8】



(c) フシジン酸、その誘導体および類似体(式d):

【化 9】

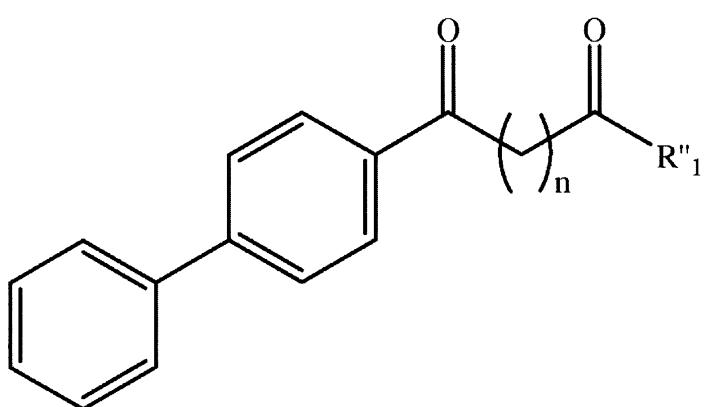
10



20

(d) フエンブフェン、その誘導体および類似体(式e):

【化 10】

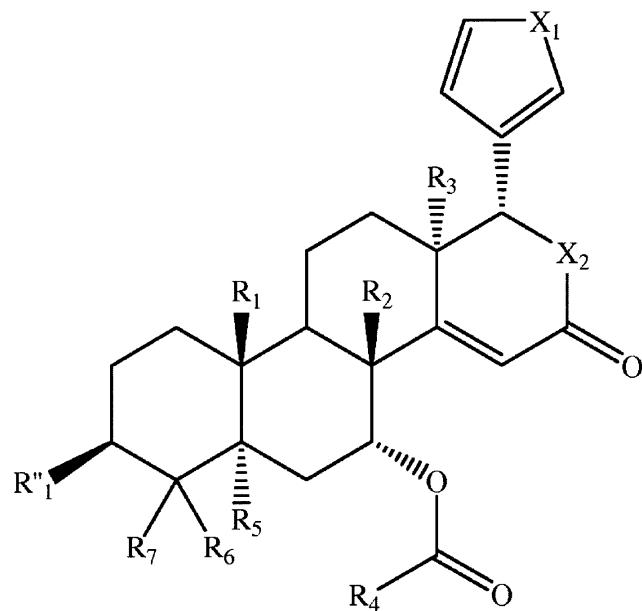


30

(e) 3 - ベータ - ヒドロキシデオキシオジヒドロデオキシゲデュニン(hydroxydeoxyodihydrodeoxygedunin)、その誘導体および類似体(式f):

40

【化11】

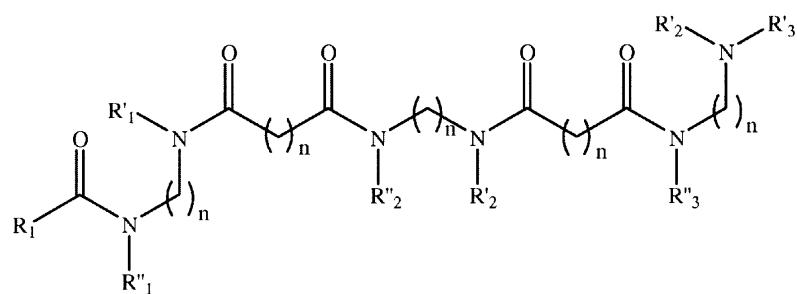


10

(f) デフェロキサミン、その誘導体および類似体(式g) :

【化12】

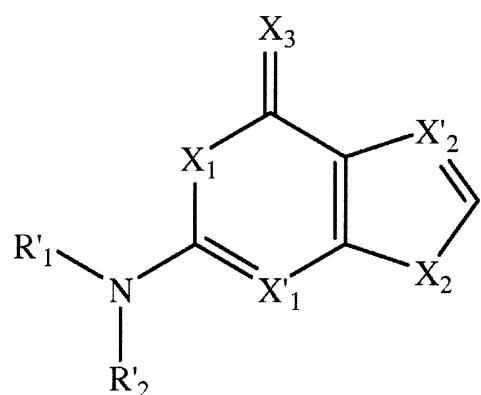
20



(g) チオグアニン、その誘導体および類似体(式h) :

【化13】

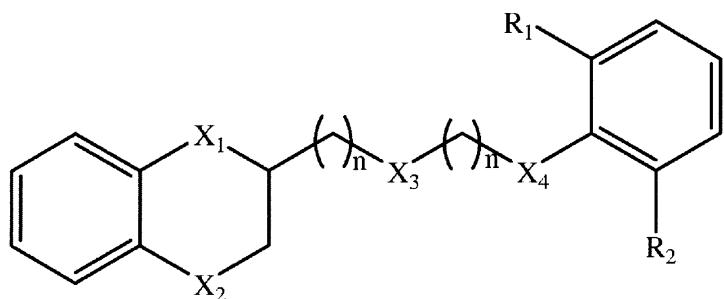
30



40

(h) 2 - アミノメチル - 1 , 4 - ベンゾジオキサン、その誘導体および類似体(式i) :

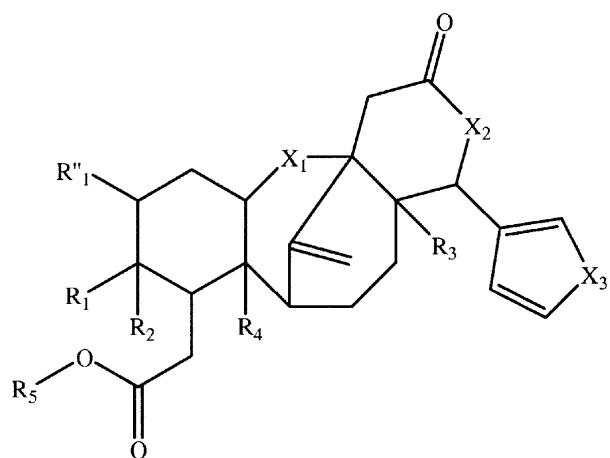
【化14】



10

(i) 3 - アルファ - ヒドロキシ - 3 - デオキシアンゴレンス酸メチルエステル、その誘導体および類似体(式j)：

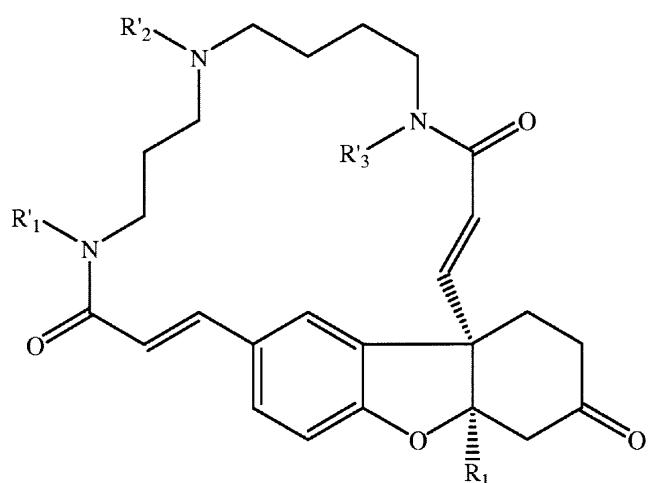
【化15】



20

(j) ルナリン(lunarine)、その誘導体および類似体(式k)：ならびに

【化16】

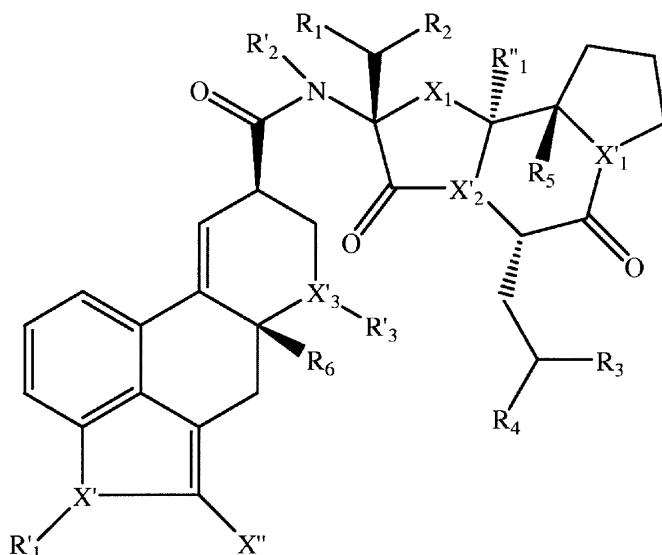


30

(k) プロモクリプチン、その誘導体および類似体(式l)：

40

## 【化17】



10

[各nは、独立に、1~20の整数であり、

環式環構造の破線は、結合を表し、この結合は、環に存在してもしなくてもよく、

各R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub>、およびR<sub>10</sub>は、独立に 20  
H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、および置換アリールからなる群から選択され、

各R'<sub>1</sub>、R'<sub>2</sub>、およびR'<sub>3</sub>は、独立に、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヒドロキシリル、およびアルコキシリルからなる群から選択され、

各R''<sub>1</sub>、R''<sub>2</sub>、およびR''<sub>3</sub>は、独立に、-OR<sub>11</sub>および-O(C.d b d . O)-R<sub>12</sub>からなる群から選択され、R<sub>11</sub>およびR<sub>12</sub>は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、および置換アリールからなる群から選択され、

各X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、およびX<sub>4</sub>は、独立に、CH<sub>2</sub>、O、S、およびNR'<sub>4</sub>からなる群から選択され、R'<sub>4</sub>は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、ヒドロキシリル、およびアルコキシリルからなる群から選択され、 30

各X'<sub>1</sub>、X'<sub>2</sub>、およびX'<sub>3</sub>は、独立に、NまたはCHであり、

各X''は、独立に、ハロゲンである]、ならびに

薬学的および化粧用として許容されるその塩。

## 【0084】

いくつかの実施形態では、RNAiエンハンサーは、トリプロリジン、ジヒドロブテロキシリル、フシジン酸、フェンブフェン、3-ベータ-ヒドロキシデオキソジヒドロデオキシゲデュニン(hydroxydeoxodihydrodeoxygedunin)、デフェロキサミン、チオグアニン、2-アミノメチル-1,4-ベンゾジオキサン、3-アルファ-ヒドロキシ-3-デオキシアンゴレンス酸メチルエステル、ルナリン、プロモクリプチン、ならびに薬学的および化粧用として許容されるその塩からなる群から選択される。 40

## 【0085】

具体的な一実施形態によれば、RNAiエンハンサーは、エノキサシンである。

## 【0086】

エノキサシンは、以下の商標Almitil、Bactidan、Bactidron、Comprecin、Enoksetin、Enoxen、Enroxil、Enoxin、Enoxor、Flumark、Penetrex、Gyramid、Vinoneで販売されている。化合物は、尿路感染症および淋病の処置に使用される経口用の広範

40

50

なフルオロキノロン抗菌剤である。

**【0087】**

以下の用語は、当業者に十分に理解されていると思われるが、本開示の主題の説明を容易にするために、以下の定義を記載する。

**【0088】**

用語「独立に選択される」が使用される場合、言及される置換基（例えばR基、例えば基R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>等、または基X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>）は、同じでも異なっていてもよい。例えば、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>の両方は、置換アルキルであってもよく、またはR<sub>1</sub>は水素であってもよく、R<sub>2</sub>は置換アルキル等であってもよい。

**【0089】**

命名された「R」または「X」基は、一般に、本明細書で別段特定されない限り、その名称を有する基に対応するものとして当技術分野で認識されている構造を有する。前述の特定の代表的な「R」および「X」基を、例示目的で以下に定義する。これらの定義は、本開示に照らして当業者に明らかになるはずである定義を排除することなく補足し、例示するためのものである。

**【0090】**

本明細書で使用される場合、用語「アルキル」は、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、オクチル、エテニル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、オクテニル、ブタジエニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、およびアルケニル基を含む、両端を含みC<sub>1</sub>～20の線形（すなわち「直鎖」）、分岐、または環式の飽和の、少なくとも部分的に不飽和の、およびある場合には完全に不飽和の（すなわち、アルケニルおよびアルキニル）炭化水素鎖を指す。「分岐」は、メチル、エチルまたはプロピルなどの低級アルキル基が、線形アルキル鎖に付着しているアルキル基を指す。「低級アルキル」は、1～約8個の炭素原子を有するアルキル基（すなわちC<sub>1</sub>～8アルキル）、例えば1、2、3、4、5、6、7または8個の炭素原子を有するアルキル基を指す。「高級アルキル」は、約10～約20個の炭素原子、例えば10、11、12、13、14、15、16、17、18、19個または炭素原子を有するアルキル基を指す。特定の実施形態では、「アルキル」は、特にC<sub>1</sub>～8直鎖アルキルを指す。他の実施形態では、「アルキル」は、特にC<sub>1</sub>～8分岐鎖アルキルを指す。

**【0091】**

アルキル基は、同じでも異なっていてもよい1つまたは複数のアルキル基置換基で任意選択により置換されていてもよい（「置換アルキル」）。用語「アルキル基置換基」として、アルキル、置換アルキル、ハロ、アリールアミノ、アシリル、ヒドロキシル、アリールオキシル、アルコキシル、アルキルチオ、アリールチオ、アラルキルオキシ、アラルキルチオ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、オキソ、およびシクロアルキルが挙げられるが、それらに限定されない。任意選択により、アルキル鎖に沿って1つまたは複数の酸素、硫黄、または置換もしくは非置換窒素原子が挿入されていてもよく、ここで窒素置換基は、水素、低級アルキル（本明細書では「アルキルアミノアルキル」とも呼ばれる）、またはアリールである。

**【0092】**

したがって、本明細書で使用される場合、用語「置換アルキル」には、アルキル基の1つまたは複数の原子または官能基が、例えばアルキル、置換アルキル、ハロゲン、アリール、置換アリール、アルコキシル、ヒドロキシル、ニトロ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、サルファート、およびメルカプトを含む別の原子または官能基で置き換えられている、本明細書で定義のアルキル基が含まれる。

**【0093】**

「環式」および「シクロアルキル」は、約3～約10個の炭素原子、例えば3、4、5、6、7、8、9、または10個の炭素原子の非芳香族の単環式または多環式環系を指す。シクロアルキル基は、任意選択により部分的に不飽和であってもよい。シクロアルキル

10

20

30

40

50

基は、本明細書で定義のアリル基置換基、オキソおよび／またはアルキレンで任意選択により置換されていてもよい。任意選択により、環式アルキル鎖に沿って1つまたは複数の酸素、硫黄、または置換もしくは非置換窒素原子が挿入されていてもよく、ここで窒素置換基は、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、または置換アリールであり、したがって複素環式基をもたらす。代表的な単環式シクロアルキル環として、シクロペンチル、シクロヘキシル、およびシクロヘプチルが挙げられる。多環式シクロアルキル環として、アダマンチル、オクタヒドロナフチル、デカリン、カンファー、カンファン、およびノルアダマンチルが挙げられる。

#### 【0094】

用語「シクロアルキルアルキル」は、本明細書で使用される場合、やはり先に定義のアルキル基を介して親分子部分に付着している、本明細書に定義のシクロアルキル基を指す。  
10 シクロアルキルアルキル基の例として、シクロプロピルメチルおよびシクロペンチルエチルが挙げられる。

#### 【0095】

用語「シクロヘテロアルキル」または「ヘテロシクロアルキル」は、同じでも異なっていてもよくN、O、およびSからなる群から選択される1つまたは複数のヘテロ原子を含む、3～7員の置換または非置換シクロアルキル環系などの非芳香族環系を指し、任意選択により1つまたは複数の二重結合を含むことができる。シクロヘテロアルキル環は、任意選択により他のシクロヘテロアルキル環および／または非芳香族炭化水素環に縮合してもよく、またはその他の方式で付着していてもよい。代表的なシクロヘテロアルキル環系として、ピロリジニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペリジル、ピペラジニル、インドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チアジアジナニル、テトラヒドロフラニル等が挙げられるが、それらに限定されない。  
20

#### 【0096】

用語「アルケニル」は、本明細書で使用される場合、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含有する、設計された数の炭素原子の直鎖または分岐炭化水素を指す。「アルケニル」の例として、ビニル、アリル、2-メチル-3-ヘプテン等が挙げられる。

#### 【0097】

用語「シクロアルケニル」は、本明細書で使用される場合、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含有する環式炭化水素を指す。シクロアルケニル基の例として、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロペンタジエン、シクロヘキセニル、1,3-シクロヘキサジエン、シクロヘプテニル、シクロヘプタトリエニル、およびシクロオクテニルが挙げられる。  
30

#### 【0098】

用語「アルキニル」は、本明細書で使用される場合、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含有する、設計された数の炭素原子の直鎖または分岐炭化水素を指す。「アルキニル」の例として、プロパルギル、プロピン、および3-ヘキシンが挙げられる。

#### 【0099】

「アルキレン」は、1～約20個の炭素原子、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の炭素原子を有する直鎖または分岐の二価の脂肪族炭化水素基を指す。アルキレン基は、直鎖、分岐または環式であってもよい。またアルキレン基は、任意選択により不飽和であってもよく、かつ／または1つもしくは複数の「アルキル基置換基」で置換されていてもよい。任意選択により、アルキレン基に沿って1つまたは複数の酸素、硫黄、または置換もしくは非置換窒素原子が挿入されていてもよく（本明細書では「アルキルアミノアルキル」とも呼ばれる）、ここで窒素置換基は、前述のアルキルである。  
40

#### 【0100】

アルキレン基は、約2～約3個の炭素原子を有することができ、さらに6～20個の炭素を有することができる。

10

20

30

40

50

## 【0101】

用語「アリール」は、本明細書では、単一の芳香族環または複数の芳香族環であり得る芳香族置換基を指すために使用され、この複数の芳香族環は、一緒になって縮合しており、共有結合によって連結しており、または限定されるものではないがメチレンもしくはエチレン部分などの共通の基に連結している。また共通の連結基は、ベンゾフェノンにあるようなカルボニルであってもよく、またはジフェニルエーテルにあるような酸素であってもよく、またはジフェニルアミンにあるような窒素であってもよい。用語「アリール」は、特に複素環式芳香族化合物を包含する。芳香族環は、中でもフェニル、ナフチル、ビフェニル、ジフェニルエーテル、ジフェニルアミンおよびベンゾフェノンを含むことができる。特定の実施形態では、用語「アリール」は、約5～約10個の炭素原子、例えば5、6、7、8、9または10個の炭素原子を含み、5員および6員の炭化水素および複素環式芳香族環を含む環式芳香族を意味する。10

## 【0102】

アリール基は、同じでも異なっていてもよい1つまたは複数のアリール基置換基で任意選択により置換されていてもよく（「置換アリール」）、ここで「アリール基置換基」として、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、ヒドロキシリ、アルコキシリ、アリールオキシリ、アラルキルオキシリ、カルボキシリ、アシル、ハロ、ニトロ、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、アラルコキシカルボニル、アシルオキシリ、アシルアミノ、アロイルアミノ、カルバモイル、アルキルカルバモイル、ジアルキルカルバモイル、アリールチオ、アルキルチオ、アルキレン、および- - N R ' R '' (式中、R ' およびR '' は、それぞれ独立に、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、およびアラルキルであってもよい)が挙げられる。20

## 【0103】

したがって、本明細書で使用される場合、用語「置換アリール」は、アリール基の1つまたは複数の原子または官能基が、例えば、アルキル、置換アルキル、ハロゲン、アリール、置換アリール、アルコキシリ、ヒドロキシリ、ニトロ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、サルファート、およびメルカプトを含む別の原子または官能基で置き換えられている、本明細書で定義のアリール基を含む。

## 【0104】

アリール基の具体例として、シクロペンタジエニル、フェニル、フラン、チオフェン、ピロール、ピラン、ピリジン、イミダゾール、ベンズイミダゾール、イソチアゾール、イソオキサゾール、ピラゾール、ピラジン、トリアジン、ピリミジン、キノリン、イソキノリン、インドール、カルバゾール等が挙げられるが、それらに限定されない。30

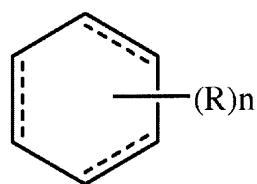
## 【0105】

用語「ヘテロアリール」は、同じでも異なっていてもよくN、OおよびSからなる群から選択される1つまたは複数のヘテロ原子を含む、限定されるものではないが5員または6員環系などの芳香族環系を指す。ヘテロアリール環は、1つまたは複数のヘテロアリール環、芳香族もしくは非芳香族炭化水素環、またはヘテロシクロアルキル環に縮合してもよく、またはその他の方式で付着してもよい。代表的なヘテロアリール環系として、ピリジル、ピリミジル、ピロリル、ピラゾリル、アゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、イミダゾリル、フラニル、チエニル、キノリニル、イソキノリニル、インドリニル、インドリル、ベンゾチエニル、ベンゾチアゾリル、エンゾフラニル、ベンズイミダゾリル、ベンズイソキサゾリル、ベンゾピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル等が挙げられるが、それらに限定されない。40

## 【0106】

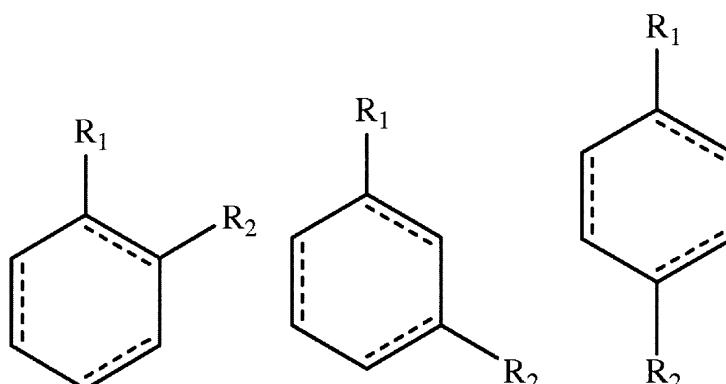
環構造が芳香族または非芳香族であってもよい、一般に次式によって表される構造

## 【化18】



は、本明細書で使用される場合、置換基 R 基（R 基は、存在してもしなくてよく、存在する場合、1つまたは複数の R 基は、環構造の1つまたは複数の利用可能な炭素原子上でそれぞれ置換されていてもよい）を含む、本明細書に定義の飽和環構造、部分的に飽和の環構造、および不飽和環構造を含む環構造、例えば限定されるものではないが、3個の炭素、4個の炭素、5個の炭素、6個の炭素等の脂肪族および／または芳香族環式化合物を指す。R 基が存在するかしないか、および R 基の数は、整数 n の値によって決定される。各 R 基は、2つ以上存在する場合、もう1つの R 基上ではなく環構造の利用可能な炭素上で置換されている。例えば、n が 0 ~ 2 である先の構造は、

## 【化19】



等を含む化合物基を含むことができるが、それらに限定されない。

## 【0107】

環式環構造において結合を表す破線は、その結合が環中に存在してもしなくてよいことを示す。すなわち、環式環構造において結合を表す破線は、その環構造が、飽和環構造、部分的に飽和の環構造、および不飽和環構造からなる群から選択されることを示す。

## 【0108】

芳香族環または複素環式芳香族環の命名された原子が、「存在しない」と定義される場合、命名された原子は、直接結合によって置き換えられている。

## 【0109】

本明細書で使用される場合、用語「アシル」は、カルボキシル基の - - O H が別の置換基で置き換えられている有機酸基を指す（すなわち、R C O - - によって表され、R は、本明細書で定義のアルキルまたはアリール基である）。したがって、用語「アシル」は、特にアリールアシル基、例えばアセチルフランおよびフェナシル基を含む。アシル基の具体例として、アセチルおよびベンゾイルが挙げられる。

## 【0110】

「アルコキシル」は、アルキルが前述の通りであるアルキル - O - - 基を指す。用語「アルコキシル」は、本明細書で使用される場合、例えば、メトキシル、エトキシル、プロポキシル、イソプロポキシル、ブトキシル、t - ブトキシル、およびペントキシルを含む、両端を含み C<sub>1</sub> ~ C<sub>20</sub> の線形、分岐、または環式の飽和または不飽和のオキソ炭化水素鎖を指すことができる。

## 【0111】

用語「アルコキシアルキル」は、本明細書で使用される場合、アルキル - O - アルキル

10

20

30

40

50

エーテル、例えばメトキシエチルまたはエトキシメチル基を指す。

【0112】

「アリールオキシル」は、アリール基が、置換アリールを含めて前述の通りであるアリール-O--基を指す。用語「アリールオキシル」は、本明細書で使用される場合、フェニルオキシルもしくはヘキシルオキシル、およびアルキル、置換アルキル、ハロ、またはアルコキシル置換フェニルオキシルもしくはヘキシルオキシルを指すことができる。

【0113】

用語「アルキル-チオ-アルキル」は、本明細書で使用される場合、アルキル-5-アルキルチオエーテル、例えばメチルチオメチルまたはメチルチオエチル基を指す。

【0114】

「アラルキル」は、アリールおよびアルキルが、置換アリールおよび置換アルキルを含めて前述の通りであるアリール-アルキル基を指す。例示的なアラルキル基として、ベンジル、フェニルエチル、およびナフチルメチルが挙げられる。

【0115】

「アラルキルオキシル」は、アラルキル基が前述の通りであるアラルキル-O--基を指す。例示的なアラルキルオキシル基は、ベンジルオキシルである。

【0116】

「アルコキシカルボニル」は、アルキル-O--CO--基を指す。例示的なアルコキシカルボニル基として、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、ブチルオキシカルボニル、およびt-ブチルオキシカルボニルが挙げられる。「アリールオキシカルボニル」は、アリール-O--CO--基を指す。例示的なアリールオキシカルボニル基として、フェノキシ-およびナフトキシ-カルボニルが挙げられる。「アラルコキシカルボニル」は、アラルキル-O--CO--基を指す。例示的なアラルコキシカルボニル基は、ベンジルオキシカルボニルである。

【0117】

「カルバモイル」は、H<sub>2</sub>N--CO--基を指す。「アルキルカルバモイル」は、RおよびR'の一方が水素であり、RおよびR'の他方が、前述のアルキルおよび/または置換アルキルであるR'R N--CO--基を指す。「ジアルキルカルバモイル」は、RおよびR'のそれぞれが、独立に、前述のアルキルおよび/または置換アリルである、R'R N--CO--基を指す。

【0118】

「アシルオキシル」は、アシルが前述の通りであるアシル-O--基を指す。

【0119】

用語「アミノ」は、--NH<sub>2</sub>基を指し、また有機ラジカルによって1つまたは複数の水素ラジカルが置き換えられることによってアンモニアから誘導された、当技術分野で周知の窒素含有基を指す。例えば、用語「アシルアミノ」および「アルキルアミノ」は、それぞれアシル置換基およびアルキル置換基を有する特定のN置換有機ラジカルを指す。

【0120】

用語「アルキルアミノ」は、Rが前述のアルキル基および/または置換アルキル基である--NHR基を指す。例示的なアルキルアミノ基として、メチルアミノ、エチルアミノ等が挙げられる。

【0121】

「ジアルキルアミノ」は、RおよびR'のそれぞれが、独立に、前述のアルキル基および/または置換アルキル基である--NRR'基を指す。例示的なジアルキルアミノ基として、エチルメチルアミノ、ジメチルアミノ、およびジエチルアミノが挙げられる。

【0122】

「アシルアミノ」は、アシルが前述の通りであるアシル-NH--基を指す。「アロイルアミノ」は、アロイルが前述の通りであるアロイル-NH--基を指す。

【0123】

用語「カルボニル」は、--(C=O)--基を指す。

10

20

30

40

50

## 【0124】

用語「カルボキシル」は、 $\text{---COOH}$ 基を指す。

## 【0125】

用語「ハロ」、「ハロゲン化物」または「ハロゲン」は、本明細書で使用される場合、フルオロ、クロロ、ブロモおよびヨード基を指す。

## 【0126】

用語「ヒドロキシル」は、 $\text{---OH}$ 基を指す。

## 【0127】

用語「ヒドロキシアルキル」は、 $\text{---OH}$ 基で置換されているアルキル基を指す。

## 【0128】

用語「メルカプト」は、 $\text{---SH}$ 基を指す。

## 【0129】

用語「オキソ」は、炭素原子が酸素原子によって置き換えられている、本明細書で既に説明した化合物を指す。

## 【0130】

用語「ニトロ」は、 $\text{---NO}_2$ 基を指す。

## 【0131】

用語「チオ」は、炭素または酸素原子が硫黄原子によって置き換えられている、本明細書で既に説明した化合物を指す。

## 【0132】

用語「サルファート」は、 $\text{---SO}_4$ 基を指す。

## 【0133】

いくつかの実施形態では、RNAiエンハンサーは、pre-miRNAのプロセシングに関与するタンパク質を含む。

## 【0134】

いくつかの実施形態では、RNAiエンハンサーは、タンパク質ダイサー（例えばダイサー1）を含む。

## 【0135】

いくつかの実施形態では、RNAiエンハンサーは、二本鎖RNA(dsRNA)結合タンパク質、例えばPKRのタンパク質活性化因子(PACT)および/もしくはトランス活性化応答RNA結合タンパク質(TRBP)、またはアルゴノート(Argo)タンパク質ファミリーのメンバー、またはそれらの機能亢進性変異体型を含む。

## 【0136】

いくつかの実施形態では、RNAiエンハンサーは、ポリ(C)-結合タンパク質を含む[例えば、非特許文献9によって教示されているポリ(C)-結合タンパク質2]。

## 【0137】

具体的な一実施形態によれば、RNAiエンハンサーは、前述のタンパク質のいずれかの過剰発現を含む。

## 【0138】

前述の通り、本発明の方法は、ALSを処置するために使用することができる。

40

## 【0139】

一実施形態によれば、該方法は、対象にpre-miRNAのプロセシングを増強することができる治療有効量の薬剤および抗ALS剤を投与し、それによって対象のALSを処置するステップを含む。

## 【0140】

ALS疾患の進行を軽減、処置または緩徐することができる任意の抗ALS剤は、本発明の教示に従って使用することができる。

## 【0141】

本発明の教示に従って使用できる例示的な抗ALS剤は、リルゾール（例えばRiluzole（登録商標））である。

50

**【 0 1 4 2 】**

具体的な一実施形態によれば、該方法は、対象にキノロン（例えば、エノキサシン）および抗 A L S 剤（例えば、リルゾール）を投与するステップを含む。

**【 0 1 4 3 】**

2つ以上の薬剤が対象に投与される場合、それらの薬剤は、同時にまたは別々の時間に（例えば互いに数分、数時間、数日、数週または数ヶ月以内に）投与できることを理解されよう。

**【 0 1 4 4 】**

本発明のいくつかの実施形態の薬剤は、それ自体で、またはそれが適切な担体もしくは賦形剤と混合された医薬組成物により、対象に投与することができる。

10

**【 0 1 4 5 】**

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」は、本明細書に記載の有効成分の1つまたは複数と、生理的に適切な担体および賦形剤などの他の化学的構成成分の調製物を指す。医薬組成物の目的は、生物への化合物の投与を容易にすることである。

**【 0 1 4 6 】**

本明細書では、用語「有効成分」は、生物学的效果に寄与する薬剤を指す。

**【 0 1 4 7 】**

以下、用語「生理的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」は、交換可能に使用することができ、生物に著しい刺激作用を生じず、投与された化合物の生物学的活性および特性を阻止しない担体または希釈剤を指す。アジュバントは、これらの用語に含まれる。

20

**【 0 1 4 8 】**

本明細書では、用語「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を指す。賦形剤の例として、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖、ならびに様々なタイプのデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが挙げられるが、それらに限定されない。

**【 0 1 4 9 】**

薬物の製剤化および投与の技術は、参照によって本明細書に援用される非特許文献10に見出され得る。

**【 0 1 5 0 】**

30

適切な投与経路として、例えば経口、直腸、経粘膜、特に経鼻、腸管、または筋肉内、皮下および髄内注射を含む非経口送達、ならびに髄腔内、直接脳室内、心臓内、例えば右もしくは左室内腔内、総冠動脈、静脈内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注射を挙げることができる。

**【 0 1 5 1 】**

中枢神経系（C N S）への従来の薬物送達手法として、神経外科的戦略（例えば、脳内注射または脳室内注入）；B B B の内因性輸送経路の1つを活用するための、薬剤の分子操作（例えば、内皮細胞表面分子に対して親和性を有する輸送ペプチドを、それ自体B B B を通過することができない薬剤を組み合わせて含むキメラ融合タンパク質の生成）；薬剤の脂溶性を増大するように設計された薬理学的戦略（例えば、水溶性薬剤と脂質またはコレステロール担体とのコンジュゲーション）；および高浸透圧性攪乱によるB B B の完全性の一過性攪乱（頸動脈へのマンニトール溶液の注入またはアンギオテンシンペプチドなどの生物学的活性剤の使用から生じる）が挙げられる。しかし、これらの戦略のそれには、侵襲的な外科手技に関連する固有の危険性、内因性輸送系に固有の制限によって課せられるサイズの制限、C N S の外側で活性になり得る担体モチーフから構成されたキメラ分子の全身投与に関連する潜在的に望ましくない生物学的副作用、およびB B B が攪乱される、脳領域内で生じる可能性がある脳損傷の危険性などの制限があり、それによって、各戦略は最適以下の送達方法になってしまう。

40

**【 0 1 5 2 】**

特に、エノキサシンなどの小分子は、さらなる化学修飾なしに血液脳関門を通過できる

50

ことが知られている。

【0153】

あるいは、例えば医薬組成物を患者の組織領域（例えば、脳または脊髄）に直接注射することによって、全身的ではなく局所的に医薬組成物を投与することもできる。

【0154】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物は、当技術分野で周知のプロセスによって、例えば従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠製造、研和（levigating）、乳化、被包、封入または凍結乾燥プロセスを用いることによって製造することができる。

【0155】

医薬組成物は、長期間（例えば、経口で長期間）使用することができる。

10

【0156】

あるいは、医薬組成物は、急性期治療用とすることもできる。

【0157】

したがって、本発明のいくつかの実施形態に従って使用される医薬組成物は、有効成分を薬学的に使用できる調製物に処理するのを容易にする賦形剤および助剤を含む1つまたは複数の生理的に許容される担体を使用して、従来の方式で製剤化することができる。適切な製剤は、選択された投与経路に応じて変わる。

【0158】

注射では、医薬組成物の有効成分は、水溶液、好ましくは生理的に適合性のある緩衝液、例えばハンクス溶液、リングル溶液、または生理食塩水緩衝液で製剤化することができる。経粘膜投与では、障壁を透過させるのに適した浸透剤が、製剤に使用される。このような浸透剤は、当技術分野で一般に周知である。

20

【0159】

経口投与では、医薬組成物は、活性な化合物を、当技術分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に製剤化することができる。このような担体によって、医薬組成物を、患者の経口摂取のために、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等として製剤化することができる。経口で使用するための薬理学的調製物は、固体賦形剤を使用し、任意選択により得られた混合物を粉碎し、所望に応じて適切な助剤を添加した後に顆粒の混合物を処理して、錠剤または糖衣錠コアを得ることによって製造することができる。適切な賦形剤は、特に充填剤、例えばラクトース、スクロース、マンニトールもしくはソルビトールを含む糖；セルロース調製物、例えばトウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、バレイショデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボメチルセルロースナトリウムなど；および／または生理的に許容されるポリマー、例えばポリビニルピロリドン（PVP）である。所望に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤を添加することができる。

30

【0160】

糖衣錠コアには、適切なコーティングが施される。この目的では、任意選択により、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液および適切な有機溶媒、または溶媒混合物を含有し得る濃縮糖液を使用することができる。活性化合物の用量の異なる組合せを識別し、または特徴付けるために、染料または顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに添加することができる。

40

【0161】

経口で使用できる医薬組成物は、ゼラチン製の押込み型（push-fit）カプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤製の軟質封止カプセルを含む。押込み型カプセルは、有効成分を、充填剤、例えばラクトース、結合剤、例えばデンプン、滑沢剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウム、および任意選択により安定剤との混合物として含有することができる。軟質カプセルでは、有効成分は、適切な

50

液体、例えば脂肪油、流動パラフィンまたは液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁させることができる。さらに、安定剤を添加することができる。経口投与用のすべての製剤は、選択された投与経路に適した投与量にすべきである。

#### 【0162】

口腔内頬側投与では、組成物は、従来の方式で製剤化された錠剤またはロゼンジ剤の形態をとることができる。

#### 【0163】

経鼻吸入による投与では、本発明のいくつかの実施形態に従って使用するための有効成分は、好都合には加圧パックまたはネプライザーからエアロゾルスプレー形態で、適切な噴霧剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロ-テトラフルオロエタンまたは二酸化炭素を使用して送達される。加圧エアロゾルの場合、投与量単位は、定量を送達するための弁を提供することによって決定することができる。例えばディスペンサーで使用するためのゼラチン製のカプセルおよびカートリッジに、化合物と、ラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末ベースの粉末ミックスを入れて製剤化することができる。10

#### 【0164】

本明細書に記載の医薬組成物は、例えばボーラス注射または持続注入による非経口投与用に製剤化することができる。注射用製剤は、任意で添加保存剤を添加した、アンプル等の単位剤形または多回用量容器として提供することができる。組成物は、油性または水性ビヒクル中懸濁液、溶液または乳濁液であってもよく、懸濁化剤、安定化剤および/または分散化剤などの製剤用薬剤を含有することができる。20

#### 【0165】

非経口投与のための医薬組成物は、水溶性形態の活性調製物の水溶液を含む。さらに、有効成分の懸濁液は、適宜、油または水ベースの注射懸濁液として調製することができる。適切な親油性の溶媒またはビヒクルとして、脂肪油、例えばゴマ油、または合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチル、トリグリセリドもしくはリポソームが挙げられる。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘度を増大する物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランを含有することができる。任意で、懸濁液は、有効成分の可溶性を増大して、非常に濃縮された溶液を調製することができる適切な安定剤または薬剤を含有することもできる。30

#### 【0166】

あるいは有効成分は、適切なビヒクル、例えば発熱物質を含まない無菌の水ベースの溶液を用いて使用前に構成するために、粉末形態であってもよい。

#### 【0167】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物は、例えば従来の坐剤基剤、例えばカカオバターまたは他のグリセリドを使用して、直腸用組成物、例えば坐剤または停留浣腸として製剤化することもできる。

#### 【0168】

本発明のいくつかの実施形態の文脈で使用するのに適した医薬組成物は、有効成分が所期の目的を達成するのに有効な量で含有されている組成物を含む。より具体的には、治療有効量は、障害（例えばMND、例えばALS）の症状を防止、軽減もしくは寛解させ、または処置を受ける対象の生存を延長するのに有効な有効成分（薬剤）の量を意味する。40

#### 【0169】

治療有効量の決定は、特に本明細書に提示の詳細な開示に照らして、当業者によって十分に行われる。

#### 【0170】

本発明の方法で使用される任意の調製物では、治療有効量または用量は、最初にインピトロおよび細胞培養アッセイから推定され得る。例えば、用量は、所望の濃度または滴定量を達成するために、動物モデルで策定することができる。このような情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。50

## 【0171】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の動物モデルによって、この治癒不能の致命的なヒトの疾患を、臨床的にも病理学的にも研究する絶好の機会が得られる。それにもかかわらず、死後のALS組織は、依然として「至適標準」であり、それと動物モデルにおける病理学的な知見を比較しなければならない。3種のマウスモデル：運動ニューロン変性（Mnd）、進行性運動神経細胞障害（pmm）、wobbler、および1種のイヌモデル：遺伝性イヌ脊髄性筋萎縮症（HCSMA）を含む4種の天然の疾患モデルが、最も広範に研究されている。wobblerマウスは、臨床的、病理学的（核周部、軸索、筋肉）、および生化学的特徴の分析により、これらのモデルの中で最も広範に研究されている。実験的に誘発したALSの動物モデルにより、様々な神経毒性、ウイルスおよび免疫媒介の機構についての試験を調節できるようになってきた。近年、分子技術により、ヒトの疾患または運動ニューロン生物学に関連する遺伝子が操作されたマウスモデルが作り出されている。FALS患者の変異SOD1遺伝子を過剰発現する遺伝子導入マウスにより、この疾患の運動ニューロン変性機構について意義深い見識が得られる（非特許文献11によって総説されている）。10

## 【0172】

のことには、変異体TDP-43を有する新しい遺伝子導入マウスモデルが、ヒト孤発性筋萎縮性側索硬化症に類似しているらしいことが具体的に関連しており、これにより、非特許文献12に記載されている標的治療に関する研究の新しい機会が開拓される。

## 【0173】

具体的な一実施形態によれば、マウスモデルは、Jackson Laboratory Inc.から得たA315T停止マウスモデルである（非特許文献13）。

## 【0174】

別の例示的なマウスモデルは、ヒトSOD1のG93A変異体形態を発現する、遺伝子導入SOD1（スーパー・オキシドジスムター・ゼ1）マウスである（以下の実施例部分に記載されている）。SOD1マウス（TgN-SOD1-G93A-1Gur）は、ヒトの筋萎縮性側索硬化症（ALS）に類似の表現型を呈する（非特許文献14）。

## 【0175】

マウスへの投与量は、10～1000mg/kg/日、10～500mg/kg/日、50～200mg/kg/日、50～100mg/kg/日で変わる。この用量は、FDA変換表を用いることによって、ヒトに使用するために有効に変換することができる。30

## 【0176】

1日当たり飲料水による経口中間用量100mg/kgは、マウスにおいて活性かつ非毒性であり、平均血清ピーク濃度4mg/lをもたらすことが既に説明されている[非特許文献15]。これは、エノキサシン用量12.5μMに相当する。用量が連続的に適用され、十分に吸収されることを考慮すると、ある特定の組織特異的蓄積を想定することができる。エノキサシンは、血液脳関門を通過することが既に説明されている。

## 【0177】

ヒトにおいても同等の血清ピーク濃度が観測され、単一エノキサシン600mgによって3.7mg/mlの血漿ピーク濃度が得られた。必要な組織浸透に応じて、エノキサシンの一般的用量は、2×200mg/日～2×400mg/日で変わり、後者は、長年、標準用量とみなされてきた。このことから、本発明者らは、薬物の抗菌効率に必要な血清ピーク濃度範囲に完全に当てはまる用量を用いたが、この用量が、mRNAが運動ニューロンのインビボ活性を増強するのに十分であるかどうかを、まだ評価する必要がある（非特許文献16および非特許文献17）。

## 【0178】

したがって具体的な一実施形態によれば、ヒトの用量は、100～2000mg/日、100～1000mg/日、400～800mg/日または200～600mg/日である。この用量は、1日1回、2回またはそれ以上投与される複数の単位剤形に分割することができる。

## 【0179】

本明細書に記載の有効成分の毒性および治療効果は、標準調剤手順によって、インピトロ、細胞培養または実験動物で決定することができる。これらのインピトロおよび細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトで使用できる範囲の投与量を製剤化するのに使用することができる。投与量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて変わり得る。正確な製剤、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択され得る。(例えば、非特許文献18参照)。

## 【0180】

投与量および投与間隔は、個々に調整して、生物学的効果を誘発または抑制するのに十分な有効成分の最適レベル(最小有効濃度、M E C)を提供することができる。M E Cは、調製毎に変わるが、インピトロデータから推定することができる。M E Cを達成するのに必要な投与量は、個体の特徴および投与経路に応じて変わる。血漿濃度を決定するために、検出アッセイを使用することができる。

10

## 【0181】

投与は、処置を受ける状態の重症度および応答性に応じて、数日から数週間にわたって継続する処置過程により、または治癒がもたらされるかもしくは病状の軽減が達成されるまで、単回または複数回投与で行うことができる。

## 【0182】

投与される組成物の量は、当然のことながら、処置を受ける対象、苦痛の重症度、投与方式、担当医の判断等に応じて決まることになる。

20

## 【0183】

本発明の医薬組成物は、有効成分として抗A L S剤をさらに含むことができる。

## 【0184】

例示的な抗A L S剤は、リルゾール(例えばR i l u t e k(登録商標))を含む。

## 【0185】

具体的な一実施形態によれば、医薬組成物は、キノロン(例えば、エノキサシン)および抗A L S剤(例えば、リルゾール)を含む。

## 【0186】

一実施形態によれば、本発明の医薬組成物は、例えば、ダイサー(例えば、ダイサー1)、P A C T、T R B Pおよび/またはポリ(C)-結合タンパク質2を含む、プレm i R N Aのプロセシングを増強する追加の因子をさらに含むことができる。

30

## 【0187】

本発明のいくつかの実施形態の組成物は、所望に応じて、有効成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含有することができるパックまたはディスペンサーデバイス、例えばF D A承認キットで提示することができる。パックは、例えば金属またはプラスチック箔、例えばプリスター・パックを含むことができる。パックまたはディスペンサーデバイスは、投与のための指示を伴っていてもよい。パックまたはディスペンサーは、医薬品の製造、使用または販売を規制する行政機関によって規定された形態の、容器に関連する通知を収容していてもよく、この通知は、組成物の形態またはヒトもしくは動物への投与に関する機関による承認を反映するものである。このような通知は、例えば処方箋薬物または承認製品挿入物について米国食品医薬局によって承認されたラベリングであってもよい。また、適合性のある医薬用担体で製剤化された本発明の調製物を含む組成物を調製し、適切な容器に入れ、既にさらに詳説した通り示した状態の処置に関するラベルを付すことができる。

40

## 【0188】

一実施形態によれば、パッケージング材料にパッケージされ、パッケージング材料内または上にあるA L S処置における使用に関する印刷により識別される、プレm i R N Aのプロセシングを増強することができる薬剤および抗A L S剤を含む製品を提供する。

## 【0189】

具体的な一実施形態によれば、製品は、キノロン(例えば、エノキサシン)および抗A

50

L S 剤（例えば、リルゾール）を含む。

【0190】

一般的なm i R N A 代謝がM N Dにおいて損なわれるという本発明の知見は、これらの疾患へのさらなる診断上の関与を示唆している。

【0191】

したがって本発明の追加の一態様によれば、M N Dを診断する方法であって、前記方法が、M N Dの診断を必要としている対象の試料において、

( i ) 全m i R の発現、および任意選択により

( i i ) 全プレm i R の発現

を分析することを含み、

10

所定の閾値を超える前記( i )または( i ) / ( i i )の下方制御がM N Dの指標となる、方法を提供する。

【0192】

あるいはまたはさらには、M N Dを診断する方法であって、M N Dの診断を必要としている対象の試料において、

( i ) m i R の発現、および

( i i ) 前記m i R の前駆体の発現

を分析するステップを含み、

所定の閾値を超える( i ) / ( i i )の下方制御がM N Dの指標となる、方法を提供する。

20

【0193】

本明細書で使用される場合、用語「全m i R N A 」は、細胞 / 複数細胞 / 組織当たりの非特異的m i R N A の定量化を指す。具体的な一実施形態によれば、細胞 / 複数細胞 / 組織のm i R N A の一部だけを定量化するために、成熟m i R N A のレベルだけが測定され、その前駆体は測定されない。

【0194】

本明細書で使用される場合、用語「全プレm i R N A 」は、細胞 / 複数細胞 / 組織当たりの非特異的m i R N A の定量化を指す。具体的な一実施形態によれば、細胞 / 複数細胞 / 組織のプレm i R N A の一部だけを定量化するために、プレm i R N A のレベルだけが測定され、その成熟産物(m i R N A )は測定されない。

30

【0195】

したがって、m i R N A (成熟)とプレm i R N A の比は、疾患の病因にとって極めて重要である。

【0196】

したがって、本発明はさらに、特異的m i R N A のレベルの欠如(または不十分なレベル)が、M N DまたはA L Sに関連するとされている、特異的m i R N A のレベルの分析を企図し、ただしこの分析は、試験する特異的m i R N A の前駆体レベルを定量化することによっても行われる。

【0197】

このようなm i R N A は、それぞれその全体が参照によって本明細書に援用される特許文献2および特許文献3に提示されている。

40

【0198】

具体的な一実施形態によれば、特異的m i R N A は、m i R - 9、m i R - 2 0 6、m i R - 1、m i R - 2 - 1、m i R - 5、m i R - 7、m i R - 8、m i R - 1 1、m i R - 1 2、m i R - 1 3、m i R - 1 4、m i R - 1 5、m i R - 1 6、m i R - 1 7、m i R - 1 8、m i R - 1 9、m i R - 2 0、m i R - 2 1、m i R - 2 2、m i R - 2 3、m i R - 2 4、m i R - 2 5、m i R - 2 6、m i R - 2 7、m i R - 2 8、m i R - 2 9、m i R - 3 0、m i R - 3 1、m i R - 3 2、m i R - 3 3、m i R - 3 4、m i R - 9 2、m i R - 9 3、m i R - 9 4、m i R - 9 5、m i R - 9 6、m i R - 9 7、m i R - 9 8、m i R - 9 9、m i R - 1 0 0、m i R 1 0 1、m i R - 1 0 3、m i

50

R - 104、miR - 105、miR - 106、miR - 107、miR - 109、mi  
 R - 110、miR - 111、miR - 112、miR - 113、miR - 114、mi  
 R - 116、miR - 119、miR - 122、miR - 125、miR - 126、mi  
 R - 127、miR - 129、miR - 130、miR - 132、miR - 133、mi  
 R - 134、miR - 136、miR - 138、miR - 140、miR - 141、mi  
 R - 144、miR - 145、miR - 146、miR - 147、miR - 148、mi  
 R - 149、miR - 150、miR - 151、miR - 153、miR - 154、mi  
 R - 157、miR - 158、miR - 160、miR - 162、miR - 164、mi  
 R - 172、miR - 173、miR - 174、miR - 175、miR - 176、mi  
 R - 177、miR - 178、miR - 179、miR - 180、miR - 182、mi 10  
 R - 183、miR - 184、miR - 185、miR - 186、miR - 187、mi  
 R - 188、miR - 189、miR - 191、miR - 192、miR - 193、mi  
 R - 195、miR - 196、miR - 197、miR - 199、miR - 201、mi  
 R - 203、miR - 205およびmiR - 224またはそれらの前駆体からなる群から  
 選択される。

#### 【0199】

本明細書で使用される場合、用語「診断する」は、病理（例えば、疾患、障害、症候群、病状および／またはそれらの症候）を分類し、病理の重症度を決定し、病理の進行をモニタし、病理の転帰を予測し、かつ／または回復の見通しを立てる（例えば、予後）ことを指す。 20

#### 【0200】

本明細書で使用される場合、「生物学的試料」は、対象に由来する流体試料または組織試料を指す。流体試料の例として、血液、血漿、血清、髄液、リンパ液、涙、唾液、喀痰および乳が挙げられるが、それらに限定されない。組織試料の例として、脳組織試料または神経組織試料（例えば、死後診断のために）が挙げられる。

#### 【0201】

このような生物学的試料を得る方法は、限定されるものではないが、標準的採血手順および腰椎穿刺を含めて当技術分野で周知である。

#### 【0202】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、前述の通りヒトなどの哺乳動物を指す。対象は、健康な場合もあり、または筋疲労などのMNDの予備的徵候を示している場合もある。あるいは対象は、疾患への遺伝的素因を有している場合もある。 30

#### 【0203】

全miRNAレベルの決定は、前駆体レベルの決定を伴っても伴わなくても当技術分野で周知の方法を使用して実施される。本明細書では、簡単に例示的に説明する。RNAは、RNA単離キット、例えばTri reagent (Molecular Research Center Inc.)を使用するなどして抽出される。プレmiRNAおよびmiRNAの発現の連続平行分析のための逆転写は、miScript II&IIキット (Qiagen)を使用して行われる。miRNAおよびプレmiRNAの発現の定量的分析は、StepOnePlus Real-Time PCR系 (Life technologies Inc.)を用いて実施される。すべての実験は、好ましくは生物学的反復により独立に実施される。qPCRは、好ましくは技術的にデュプリケートで実施される。 40

#### 【0204】

全miRおよび任意選択によりプレmiRを分析した後、その結果は典型的に記録され、対象に通知される。診断は、E1 Escorial基準を構成するものを含む他の手段を用いて実証することができる。本発明の方法と共に使用できる他の診断方法は、経頭蓋磁気刺激法 (TMS) を含むものである。この非侵襲的な手順は、脳内に磁気パルスを与え、そのパルスにより、身体の特定領域の運動活性を刺激する。身体の異なる領域にテープで貼られた電極が、筋肉内の電気的活動を感じし、記録する。 50

## 【0205】

本発明の診断方法は、他の疾患の関与を除外し、または筋肉が関与する程度を測定するための他の実験でも実証できることが理解されよう。以下は、このような試験の一覧である。

1. 筋電図検査（EMG）を使用して、筋肉および神経の機能障害、ならびに脊髄疾患を診断する。筋電図検査は、特定の神経に沿ってインパルスが移動する速度を測定するためにも使用される。EMGは、収縮中および静止時に筋肉を調節する脳および/または脊髄から末梢神経根（腕および脚に見出される）への電気的活動を記録する。非常に細いワイヤー電極を、筋肉内に1つずつ挿入して、運動中および筋肉が静止しているときに生じる電圧の変化を評価する。電極は、記録機器に接続されている。試験は、試験される筋肉および神経の数に応じて、通常約1時間以上継続される。10

2. EMGは、通常、神経伝導速度の研究と共に行われる。この手順では、信号を送信する神経の能力を試験するために、電気エネルギーも測定する。技術者は、筋肉を覆う皮膚上に2組の平坦な電極をテープで貼る。第1の組の電極を使用して、小さい電気パルス（静電気による振動に類似している）を送信して、特定の筋肉に向かう神経を刺激する。第2の組の電極は、応答電気信号を記録機に伝える。次に、医師は、その応答を審査して、任意の神経障害または筋肉疾患を検証する。

3. 血液、尿または他の物質の実験室スクリーニング試験は、MNDの症状に類似の症状を有する場合がある筋肉疾患および他の障害を除外することができる。例えば、脳および脊髄を取り囲む流体の分析では、PPSを含むいくつかの障害を検出することができる。20 血液検査では、タンパク質クレアチニーゼレベル（筋収縮のためのエネルギーを生成する化学反応に必要である）を測定するように指示することができ、このレベルが高いことは、筋ジストロフィーなどの筋肉疾患を診断する一助になり得る。

4. 磁気共鳴画像（MRI）では、コンピューターによって生じる電波および強力な磁場を使用して、組織、器官、骨および神経を含む身体構造の詳細な画像を生成する。これらの画像は、脳および脊髄の腫瘍、目の疾患、炎症、感染症、ならびに脳卒中に至るおそれがある血管変則性を診断する一助になり得る。MRIは、多発性硬化症などの変性障害を検出し、モニタすることもでき、外傷から生じる脳障害の証拠を提供することができる。MRIは、しばしば頭部、頸部および脊髄に影響を及ぼす、MND以外の疾患を除外するするために使用される。30

5. 筋肉または神経生検は、神経疾患および神経再生を確認する一助になり得る。少量の筋肉または神経試料を、局所麻酔剤下で取り出し、顕微鏡で研究する。試料は、外科的に、皮膚の開口部を介して、または細い中空針を皮膚を介して筋肉内に挿入する針生検によって取り出すことができる。筋肉の小片は、身体から取り出されても中空針中に残っている。この試験は、損傷度についての有益な情報を提供できるが、侵襲的手順であり、それ自体、神経障害性の副作用を引き起こすおそれがある。多くの専門家は、生検が診断に常に必要であるとは考えない。

## 【0206】

本発明はさらに、MNDを処置するための薬剤を同定する方法であって、前記方法が、40  
(a) ALS患者またはALSモデルの運動ニューロンを、候補薬剤と接触させるステップと、

- (b) ステップ(a)の前およびステップ(a)の後に、  
(i) 前記運動ニューロンにおける全m i Rの発現、および任意選択により  
(ii) 前記運動ニューロンにおける全プレm i Rの発現  
を分析するステップとを含み、

ステップ(a)の前と比較してステップ(a)の後の、所定の閾値を超える前記(i)または(ii)/(ii)の上方制御が、候補化合物がMNDを処置するための治療剤であることの指標となる、方法を企図する。

## 【0207】

運動ニューロンは、マウス、ラットまたはヒトを含む任意の動物から単離することがで50

きる。あるいは、運動ニューロンは、例えばマウス運動ニューロン細胞系、N S C 1 9などの運動ニューロン細胞系の一部であってもよい[非特許文献19]。

#### 【0208】

またあるいは、運動ニューロンは、幹細胞から分化し得る。一実施形態によれば、幹細胞は、胚性幹細胞(ESC)である。このような胚性幹細胞は、M N Dのモデルとして働く遺伝子導入動物(例えば、マウス)から単離することができる。例えば、胚性幹細胞は、T g (H1 x b9 - G F P ) 1 T m j T g (S M N 2 ) 8 9 A h m b S m n 1<sup>t m</sup><sub>1 M s d</sub> / Jマウス(ジャクソン研究所ストックナンバー006570)から単離することができる。あるいは、胚性幹細胞は、ダイサーのコリン作動性特異的ノックアウトを含む遺伝子導入動物から単離することもできる。このM N Dモデルを、以下において本明細書でさらに説明する。10

#### 【0209】

例えば非特許文献20に記載のものなどの、胚性幹細胞を運動ニューロンに分化させるための様々な方法が知られている。

#### 【0210】

例示的な候補薬剤として、小分子薬剤、ポリヌクレオチド薬剤、化学物質、遺伝子発現を修飾することが知られている抗生物質化合物、修飾または非修飾ポリヌクレオチド(オリゴヌクレオチドを含む)、ポリペプチド、ペプチド、低分子RNA分子およびm i RNAが挙げられる。

#### 【0211】

本発明のこの態様に従って接触させる方法は、典型的に、試験される候補薬剤のタイプに応じて決まることが理解されよう。したがって、例えばポリヌクレオチド薬剤は、典型的に、遺伝子導入薬剤と一緒に運動ニューロンと接触させられる。典型的に、運動ニューロン培地には、追加の薬剤なしに少量の化学物質が入れられる。20

#### 【0212】

本発明の候補薬剤は、治療剤とみなすと、典型的にステップ(a)の前と比較してステップ(a)の後に、(i)または(ii)/(ii)を所定の閾値を超えて上方制御する。

#### 【0213】

M N Dを処置するための治療剤として候補薬剤を選択した後、その薬剤を、例えば疾患の動物モデルで試験することができ、最終的にはヒトで試験することができる。次に、治療効果を検証することによって、候補薬剤を医薬組成物として調製することができる。30

#### 【0214】

このような方法は、研究および製薬業界に対する重要性を超えて、個人医療分野でも有益である。対象の細胞は、候補処置剤(例えば、エノキサシン)と接触させられ、処置へのコンプライアンスは、接触後の(i)または(ii)/(ii)の上方制御に依存して決まる。

#### 【0215】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、±10%を指す。

#### 【0216】

用語「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「含む(includes)」、「含む(including)」、「有する(having)」およびそれらの同根語は、「含むがそれらに限定されない」を意味する。40

#### 【0217】

用語「からなる」は、「含みかつそれに限定される」を意味する。

#### 【0218】

用語「から本質的になる」は、追加の成分、ステップおよび/または部分が、特許請求されている組成物、方法または構造の基本的および新規な特徴を実質的に変えない場合に限り、組成物、方法または構造は、その追加の成分、ステップおよび/または部分を含み得ることを意味する。

#### 【0219】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「a n」および「t h e」は、状況によって別段明示されない限り複数の参照物を含む。例えば、用語「1つの化合物」または「少なくとも1つの化合物」は、化合物の混合物を含む複数の化合物を含むことができる。

#### 【0220】

本願を通して、本発明の様々な実施形態は、範囲型式で提示され得る。範囲型式の説明は、単に便宜上、簡潔にするためのものであり、本発明の範囲を強固に制限するものと解釈されるべきでないことを理解されたい。したがって、範囲の説明は、範囲内に可能な部分範囲ならびに個々の数値のすべてを具体的に開示しているとみなされるべきである。例えば1～6などの範囲の説明は、部分範囲、例えば1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6等、ならびに範囲に含まれる個々の数字、例えば1、2、3、4、5および6を具体的に開示しているとみなされるべきである。このことは、範囲の幅に関わらず適用される。10

#### 【0221】

数値範囲が本明細書で示される場合にはいつでも、示された範囲内の任意の引用数値（少数または整数）を含むことを意味する。第1の指示数と第2の指示数「の間の範囲」、および第1の指示数「から」第2の指示数「までの範囲」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、その第1および第2の指示数を含み、それらの間のすべての少数値および整数値を含むことを意味する。

#### 【0222】

本明細書で使用される場合、用語「方法」は、限定されるものではないが、化学、薬理学、生物学、生化学および医療分野の技術者に知られる方式、手段、技術および手順、または周知の方式、手段、技術および手順から技術者によって容易に開発されるものを含む、所与の課題を完遂するための方式、手段、技術および手順を指す。20

#### 【0223】

簡潔するために別個の実施形態の文脈において説明した本発明の特定の特徴は、組み合わせて单一の実施形態で提供できることも理解されたい。それとは逆に、簡潔のために单一の実施形態の文脈において説明した本発明の様々な特徴は、別個に提供し、または任意の適切な部分的組合せで、もしくは本発明の記載の任意の他の実施形態において適したものとして提供することもできる。様々な実施形態の文脈において説明した特定の特徴は、それらの要素がなく実施形態が動作不能にならない限り、それらの実施形態の必須の特徴とみなされるべきではない。30

#### 【0224】

本明細書で先に記載されたものであって、添付特許請求の範囲で特許請求される本発明の様々な実施形態および態様は、以下の実施例により実験的に支持される。

#### 【実施例】

#### 【0225】

ここで、本発明のいくつかの実施形態を、先の説明と共に非限定的に例示する以下の実施例を参照する。

#### 【0226】

一般に、本明細書で使用される命名法および本発明で利用される実験室手順には、分子、生化学、微生物学および組換えDNAの技術が含まれる。このような技術は、文献に完全に説明されている。例えば、非特許文献21；非特許文献22；非特許文献23；非特許文献24；非特許文献25；非特許文献26；特許文献8、特許文献9、特許文献10、特許文献11および特許文献12に記載の方法論；非特許文献27；非特許文献28；非特許文献29；非特許文献30；非特許文献31を参照されたい。利用可能な免疫アッセイは、特許文献および科学文献に広範に記載されており、例えば、特許文献13、特許文献14、特許文献15、特許文献16、特許文献17、特許文献18、特許文献19、特許文献20、特許文献21、特許文献22、特許文献23、特許文献24、特許文献25、特許文献26、特許文献27および特許文献28；非特許文献32；非特許文献33；非特許文献34；非特許文献35；非特許文献36；非特許文献37および非特許文献40  
50

38 ; 非特許文献39 ; 非特許文献40を参照されたい。これらの文献のすべては、あたかも本明細書に完全に記載されているように参照によって援用される。他の一般的な参考文献は、本明細書を通して提示されている。当該参考文献の手順は、当技術分野で周知であると思われ、読者の便宜のために提示される。当該参考文献に含有されているあらゆる情報は、参照によって本明細書に援用される。

#### 【0227】

(実施例1)

##### 実験手順

###### ヒト組織m i R N A の分析

4 p m o l の 5' および 3' DIG 標識抗 m i R - 9 および抗 m i R - 1 2 4 L N A プローブで製造者 (Exiqon社) の指示書に従った切片のハイブリダイゼーション法に従って<sup>10</sup>、腰部から得た凍結脊髄組織の 7 μm 切片に対して in situ ハイブリダイゼーションを実施した。

#### 【0228】

培養細胞における m i R N A 研究では、プレ m i R N A および m i R N A の発現の連続平行分析のための逆転写を、m i S c r i p t I & I I キット (Quia gen 社) を使用して実施した。m i R N A およびプレ m i R N A の発現の定量的分析は、S t e p O n e P l u s R e a l - T i m e P C R 系 (Life technologies Inc.) を用いて実施した。すべての実験は、少なくとも 3 回の生物学的反復により独立に実施し、q P C R は、技術的にデュプリケートで実施した。<sup>20</sup>

#### 【0229】

インビボ実験では、ヒト SOD1 の G93A 変異体形態を発現する遺伝子導入 SOD1 (スーパーオキシドジスムターゼ 1 ) マウスを使用した。SOD1 マウス (TgN-SOD1-G93A-1Gur) は、ヒトの筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に類似の表現型を呈する。20匹のマウスに、50日齢から飲料水でエノキサシン (用量 200 mg / kg) を与えた。マウスの寿命および神経筋機能をモニタした。神経筋機能を、既に非特許文献 41 に記載されている通り、マウスの筋肉緊張反射および全般的なケージ内運動活動を試験する神経学的スコアによって評価した。ハングワイヤー試験を利用し、それによって、前肢、後肢の身体的強度全体、ポールに肢をかけたときの内転能および歩行能を測定した。オランダの Noldus Information Technology によるカメラモニタによるコンピューター化自発運動試験自動化システムをベースとする、自動化 Catwalk 歩行分析システムを利用した。<sup>30</sup>

#### 【0230】

両側スチューデント t 試験を使用して、事後 Benjamin - Hochberg 補正を用いて統計解析を実施した。値は、p < 0.05 の場合に統計的に有意であるとみなし。結果は、少なくとも 3 回の独立な実験を代表するものであり、標準偏差で提示される。ヒト m i R N A 研究の q P C R データ統計値は、Data Assist ソフトウェア (Life Technologies) を使用して得た。

#### 【0231】

(実施例2)

##### m i R N A の発現は ALS において変わる

過去の報告は、一般的(非特異的)なマイクロ R N A (m i R N A) 代謝が、対照と比較して孤発性 ALS (sALS) の対象の腹側腰部脊髄 (SC) 組織において変化していることを示している [非特許文献 42]。本発明の研究では、本発明者らは、ALS 対象において変化した m i R N A 発現が、m i R N A バイオプロセシングの変異に関係しており、適切な処置によって逆転され得るという仮説について試験した。

#### 【0232】

最初に、m i R N A が ALS 対象において全体的に下方制御されるという観測を、m i R N A の in situ ハイブリダイゼーションによって実証し<sup>10</sup>、それによって、対照に対して患者の組織の m i R - 9 および m i R - 1 2 4 が同等に下方制御されることが明らか  
50

になった(図1a～c)。これらのデータは、m i R N AがA L S運動ニューロンにおいて広範に下方制御されることを示唆している。A L Sにおけるm i R N Aの調節異常機構についての見識を得るために、本発明者らは、H E K 2 9 3またはN S C - 3 4細胞に、A L Sを引き起こすF U SおよびT D P - 4 3の変異体形態を発現させるためのベクターをトランスフェクトし、m i R N Aの発現を調査した。混合運動ニューロン細胞系、N S C - 3 4に、A L Sを引き起こすT D P - 4 3およびF U Sの変異体形態を発現させるためのベクターをトランスフェクトすると、すべての場合において成熟m i R N Aの発現が下方制御されたことが明らかになった(図2a～dおよび図3)。これらのデータにより、A L Sを引き起こす毒性のある変異体が存在することは、m i R N Aプロセシングを攪乱するのに十分であることが明らかである。標準的m i R N Aバイオプロセシングには、核におけるドローシャ/D g c r 8複合体による、その後の細胞質におけるダイサー1による、プレm i R N A前駆体の消化が含まれる。したがって、バイオプロセシング系の特定の機能障害は、中間体m i R N A形態の蓄積によって明らかになり得る。N S C - 3 4細胞抽出物におけるプレm i R N Aの定量的分析では、成熟m i R N Aが下方制御されると同時に、それらの同族のプレm i R N A前駆体のレベルが、A L Sを引き起こすT D P - 4 3またはF U Sの変異体形態の発現によって実際に上方制御されたことが明らかになった(図2a～dおよび図3)。注目すべきことには、成熟m i R N Aへのプレm i R N Aプロセシングの機能障害は、異なるF U SおよびT D P - 4 3変異体で記録された臨床的重症度の記録と相関するように見える。ヒトL C M試料におけるプレm i R N Aを測定する試みは成功しなかったが、これはおそらく、これらの中間体前駆体の発現レベルが非常に小さかったことに起因する。成熟m i R N Aレベルが低く、対照よりもプレm i R N A前駆体がより高いというこの相反関係により、ダイサー1によるプレm i R N Aプロセシングが阻害されることが示唆された<sup>1 1</sup>。

#### 【0233】

本発明者らは、プレm i R N Aのダイシングが、A L Sを引き起こすT D P - 4 3またはF U S型の発現によって阻害されると推論し、したがって同じ患者により、遺伝子発現におけるm i R N A - プロセシング因子をコードするm R N Aの変化およびスプライシングデータについて調査した<sup>9</sup>。しかし、これらの照合では、対照に対してA L S患者におけるこれらの因子の発現が変化することは、明らかにならなかった。本発明者らは、A L Sを引き起こすT D P - 4 3およびF U Sの変異体形態によって攪乱されたm i R N Aプロセシングにおけるダイシングの役割を、機能的に実験的に支持するために、ダイサー1活性の増強を介してm i R N Aレベルを増大することが知られる、フルオロキノロン系抗生物質であるエノキサシンを用いることを試みた<sup>1 2</sup>。実際、H E K 2 9 3細胞にエノキサシンを導入すると、A L Sを引き起こすT D P - 4 3またはF U S変異体の、m i R N Aの成熟化に対する負の影響が逆転した(図2e～h)。したがって、A L Sにおけるm i R N Aバイオプロセシングの不良は、非毒性フルオロキノロンによって逆転可能となり得る。

#### 【0234】

この観測は、エノキサシンがA L Sの典型的なS O D 1 G 9 3 Aモデル(高コピー数、遺伝的背景欠損)において、インビオでも有益となり得るという仮説を後押しした。したがって、本発明者らは、マウスのコホートに、50日齢から飲料水でエノキサシンを与えることによって、前臨床研究を開始した。この予備研究では、m i R N Aの成熟化または活性をモジュレートする既存のまたはまだ開発されていないより強力な分子を用いて将来的に治療上使用できる、いくつかの形態のA L Sに関与する機序は明らかに示されなかつた。

#### 【0235】

m i R N Aは、脳脊髄液を含む体液において検出可能なので、これにより将来的にはA L Sのm i R N Aベースのマーカーの開発が可能になり得る。さらにこれらの観測により、いくつかの他の脳疾患においてm i R N Aの調節異常が示唆された通り、神経変性の他の形態で作用する分子機構の理解が深まる。

10

20

30

40

50

## 【0236】

運動ニューロンにおけるm i R N Aおよびダイサー1活性の喪失が、マウスの運動ニューロン疾患を引き起こすのに十分であるという認識は<sup>7</sup>、ここで報告する全体的m i R N A下方制御が、ヒトA L S患者の運動ニューロン生存にも影響を及ぼし得ることを強力に示唆している。したがって本発明の知見は、m i R N Aの成熟化または活性をモジュレートする強力な分子が開発され得る場合、A L Sのいくつかの形態に関与する共通の機序が、将来的に治療上使用できることを示唆している。

## 【0237】

本発明を、その具体的な実施形態と共に記載してきたが、多くの変更、改変および変形が当業者に明らかになることが明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および広範な範囲に含まれるすべてのこののような変更、改変および変形が包含されることを企図する。

10

## 【0238】

本明細書で言及したあらゆる刊行物、特許文書および特許出願文書は、あたかもそれぞれ個々の刊行物、特許文書または特許出願文書が、参照によって本明細書に具体的に個々に援用されることが示されるのと同程度に、それらの全体が参照によって本明細書に援用される。さらに、本願における任意の参考文献の引用または識別は、このような参考文献が、従来技術として本発明に利用可能であることを容認するものと解釈してはならない。各項目の見出しあは、それらが使用される範囲で、必ずしも限定的なものと解釈されるべきではない。

20

## 【0239】

## 参考文献

(他の参考文献は、本願を通して引用される)

<sup>1</sup> Sreedharan, J. et al., TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319 (5870), 1668 (2008).

<sup>2</sup> Kabashi, E. et al., TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40 (5), 572 (2008).

<sup>3</sup> Bosco, D. A. et al., Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet* (2010).

<sup>4</sup> Kwiatkowski, T. J., Jr. et al., Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323 (5918), 1205 (2009); Vance, C. et al., Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323 (5918), 1208 (2009).

30

<sup>5</sup> Buratti, E. and Baralle, F. E., The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol* 7 (4) (2010); Kawahara, Y. and Mieda-Sato, A., TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (9), 3347 (2012).

<sup>6</sup> Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., and Cleveland, D. W., TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19 (R1), R46 (2010).

40

<sup>7</sup> Haramati, S. et al., miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (29), 13111 (2010).

<sup>8</sup> Abelson, J. F. et al., Sequence variants in SLTRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science* 310 (5746), 317 (2005); Rademakers, R. et al., Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet* 17 (23), 3631 (2008); Georges, M., Cappieters, W., and Charlier, C., Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Curr Opin Genet Dev* 17 (3), 166 (2007); Chen, K. and Rajewsky, N., Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat Genet* 38 (12), 1452 (2006).

50

<sup>9</sup> Rabin, S. J. et al., Sporadic ALS has compartment-specific aberrant exon splicing and altered cell-matrix adhesion biology. *Hum Mol Genet* 19 (2), 313 (2010).

<sup>10</sup> Pena, J. T. et al., miRNA in situ hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues. *Nat Methods* 6 (2), 139 (2009).

<sup>11</sup> Gregory, R. I. et al., The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432 (7014), 235 (2004).

<sup>12</sup> Shan, G. et al., A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat Biotechnol* 26 (8), 933 (2008); Melo, S. et al., Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (11), 4394 (2011). 10

<sup>13</sup> Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., and Munsat, T. L., El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1 (5), 293 (2000).

#### 【0240】

補助参考文献（本明細書中において引用）

Chen, Y. Z., Bennett, C. L., Huynh, H. M., Blair, I. P., Puls, I., Irobi, J., Di erick, I., Abel, A., Kennerson, M. L., Rabin, B. A. et al. (2004) 'DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4)', *Am J Hum Genet* 74(6): 1128-35. 20

Ge, W. W., Wen, W., Strong, W., Leystra-Lantz, C. and Strong, M. J. (2005) 'Mutant copper-zinc superoxide dismutase binds to and destabilizes human low molecular weight neurofilament mRNA', *J Biol Chem* 280(1): 118-24.

Greenway, M. J., Andersen, P. M., Russ, C., Ennis, S., Cashman, S., Donaghy, C., Patterson, V., Swingler, R., Kieran, D., Prehn, J. et al. (2006) 'ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis', *Nat Genet* 38(4): 411-3.

Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Vande Velde, C., Bouchard, J. P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F. et al. (2008) 'TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis', *Nat Genet* 40(5): 572-4. 30

Kwiatkowski, T. J., Jr., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E. J., Munsat, T. et al. (2009) 'Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis', *Science* 323(5918): 1205-8.

Lagier-Tourenne, C. and Cleveland, D. W. (2009) 'Rethinking ALS: the FUS about TDP-43', *Cell* 136(6): 1001-4.

Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M. and Cleveland, D. W. (2010) 'TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration', *Hum Mol Genet* 19(R1): R46-64. 40

Lemmens, R., Moore, M. J., Al-Chalabi, A., Brown, R. H., Jr. and Robberecht, W. (2010) 'RNA metabolism and the pathogenesis of motor neuron diseases', *Trends Neurosci* 33(5): 249-58.

Lu, L., Zheng, L., Viera, L., Suswam, E., Li, Y., Li, X., Estevez, A. G. and King, P. H. (2007) 'Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis destabilizes vascular endothelial growth factor mRNA and downregulates its expression', *J Neurosci* 27(30): 7929-38.

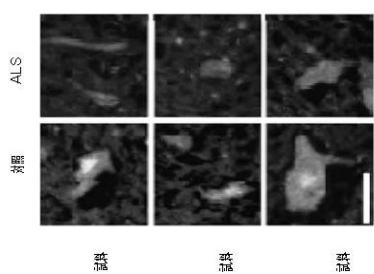
Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Acerkley, S., Durnall, J. C., Williams, K. L., Buratti, E. et al. (2008) 'TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Science* 319(58 50

70): 1668-72.

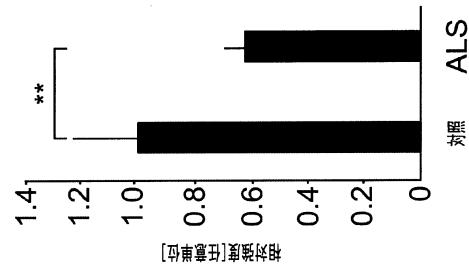
Strong, M. J. (2010) 'The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)', *J Neurol Sci* 288(1-2): 1-12.

Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P. et al. (2009) 'Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6', *Science* 323(5918): 1208-11.

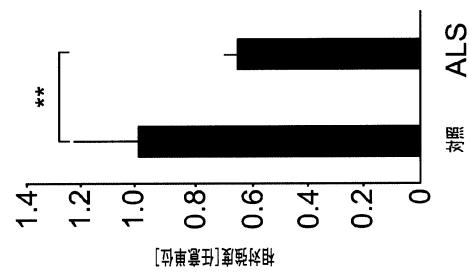
【図 1 A】



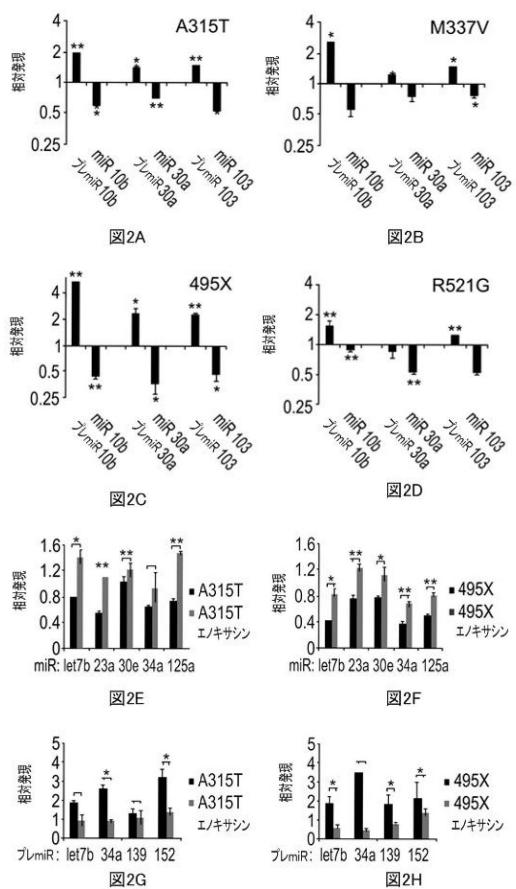
【図 1 C】



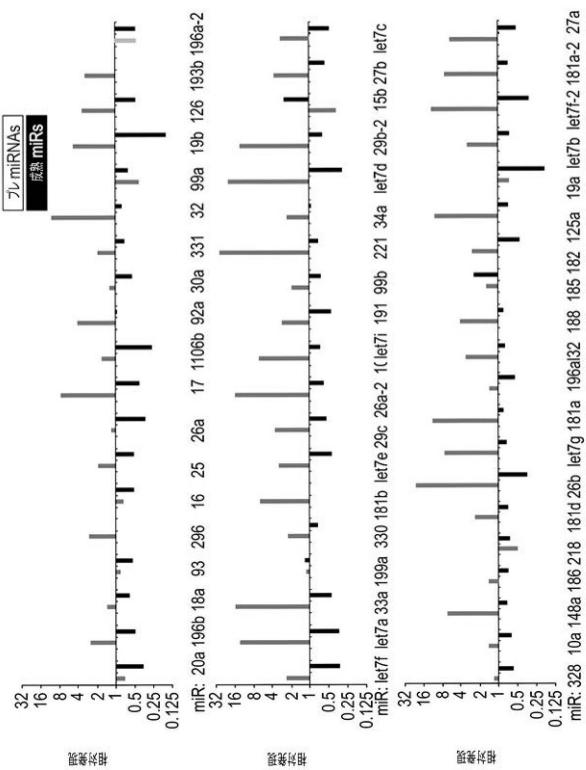
【図 1 B】



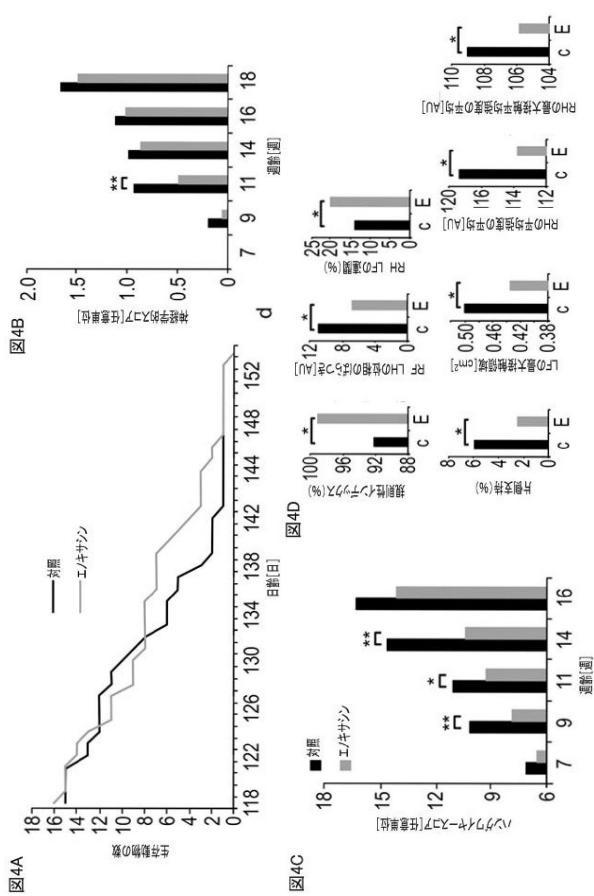
【図2】



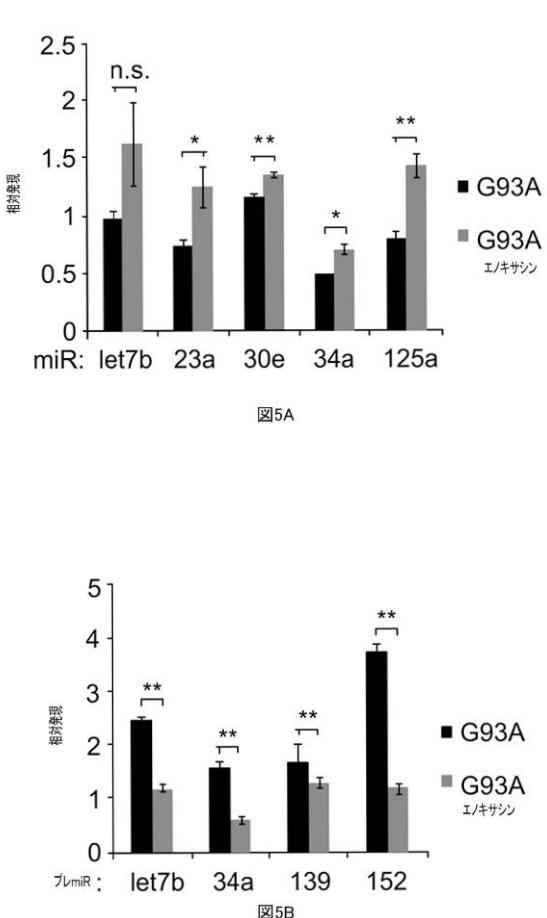
【図3】



【図4】



【図5】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/68	(2018.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
		G 0 1 N 33/15	Z

(72)発明者 エムデ アンナ エム.

イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト ピー.オ- . ボックス 9 5 アット ザ ワイン  
 ツマン インスティチュート オブ サイエンス イエダ リサーチ アンド デベロップメント  
 カンパニー リミテッド内

審査官 岩下 直人

(56)参考文献 特表2 0 0 3 - 5 1 4 8 5 8 ( J P , A )

WILLIAMS, Andrew H. et al., MicroRNA-206 Delays ALS Progression and Promotes Regeneration of Neuromuscular Synapses in Mice, Science, 2 0 0 9 年, Vol.326, No.5959, p.1549-1554

SHAN, Ge et al., A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing, Nature Biotechnology, 2 0 0 8 年, Vol.26, No.8, p.933-940

HARAMATI, Sharon et la., miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease, Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 2 0 1 0 年, Vol. 107, No.29, p.13111-13116

KAWAHARA, Yukio et al., TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosophila and Dicer complexes, Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 2 0 1 2 年, Vol.109, No.9, p.3347-3352

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )