

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5802389号
(P5802389)

(45) 発行日 平成27年10月28日(2015.10.28)

(24) 登録日 平成27年9月4日(2015.9.4)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00

請求項の数 18 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2010-537590 (P2010-537590)	(73) 特許権者	510165792
(86) (22) 出願日	平成20年12月12日(2008.12.12)		ポリプラストランスフェクション
(65) 公表番号	特表2011-505826 (P2011-505826A)		フランス国 イルキルシュ セデクス プ
(43) 公表日	平成23年3月3日(2011.3.3)		ールヴァール セバスチャン ブラント
(86) 国際出願番号	PCT/IB2008/055256		ペーパー 90018 ビオパルク
(87) 国際公開番号	W02009/074970	(74) 代理人	100079038
(87) 国際公開日	平成21年6月18日(2009.6.18)		弁理士 渡邊 彰
審査請求日	平成23年10月26日(2011.10.26)	(74) 代理人	100106091
(31) 優先権主張番号	61/013, 358		弁理士 松村 直都
(32) 優先日	平成19年12月13日(2007.12.13)	(74) 代理人	100060874
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 岸本 瑛之助
前置審査		(72) 発明者	アディブ アブデナジ
			フランス国 イルキルシュ リュ デュ
			ジェネラル リベルマン 27デー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成ポリマーを用いた遺伝子サイレンシングに活性な核酸を送達する手段

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

チロシンおよび/またはトリプトファンによって修飾された、ポリエチレンジアミンおよびポリアリルアミンを含む群から選択された線状のポリアミンと、RNA干渉に活性のある二本鎖RNAまたはsiRNAとからなる、トランスフェクション剤として有用な組成物。

【請求項 2】

前記ポリアミンの質量は400Da超である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記ポリアミンは、2~220KDaの質量を有するポリエチレンジアミンおよび10~70KDaの質量を有するポリアリルアミンを含む群から選択される、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

RNA干渉に活性のある二本鎖RNAまたはsiRNAは、通常のものであるかまたは修飾されており、該修飾基は、2'-フルオ、2'-メトキシ、ホスホロチオアート、LNAまたはモルホリノである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

siRNAは、15~30merを有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

チロシンおよび/またはトリプトファンによって修飾されたポリアミンと、RNA干渉に活性のある二本鎖RNAまたはsiRNAとを等張培地において含む、請求項1~3のいずれか1

10

20

つに記載の組成物。

【請求項 7】

前記等張培地は、NaCl、グルコースおよび緩衝液からなる、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

RNA干渉に活性のある二本鎖RNAまたはsiRNAの濃度は、ピコモルからマイクロモルまで変動する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

1 種以上の添加剤を更に含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記添加剤は、PEG、PVA、単糖類、多糖類、ペプチド、タンパク質またはビタミン類である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

RNA干渉に活性のある前記二本鎖RNAまたはsiRNAは、プラスミドDNAにおいて発現される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記組成物中のチロシンおよび/またはトリプトファンによって修飾された前記ポリアミンの窒素修飾の割合(百分率)は、0.01~100%で変動する、請求項 1~3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 13】

前記線状のポリアミンは、チロシンおよび/またはトリプトファン残基により修飾され、ポリマー当たり 25~33%の窒素修飾を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

チロシンによって修飾された線状ポリエチレンジアミンと、RNA干渉に活性のある二本鎖RNAまたはsiRNAとを含む組成物。

【請求項 15】

請求項 1 または 11 に記載の組成物の使用を含む、RNA干渉に活性のある二本鎖RNAまたはsiRNAおよびプラスミドDNAをin vitroまたはex-vivo転移する方法。

【請求項 16】

請求項 1 に記載のチロシンおよび/またはトリプトファンによって修飾されたポリアミンを含む組成物を合成する方法であって、

- 前記ポリアミンを、チロシンおよび/またはトリプトファンを含む群から選択される芳香族アミノ酸と結合させて、第 1 の反応混合物を形成する工程；
- ジメトキシトリアジン-N-メチルホルムリウムを前記第 1 の反応混合物に加えて、第 2 の反応混合物を形成する工程；
- 前記第 2 の反応混合物を攪拌し、前記第 2 の反応混合物を蒸発させる工程；および
- 前記組成物を得る工程

を含む、方法。

【請求項 17】

ポリアミンの合成は、塩基性緩衝液、あるいは塩基存在下の水性培地または水/アルコール混合物中で行われる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記組成物中のチロシンおよび/またはトリプトファンによるポリアミンの窒素修飾の割合(百分率)は、0.01%から100%までで変動する、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、培養下の真核細胞へ、in vivoまたはex vivoで、細胞中で遺伝子サイレンシングを媒介する核酸、特に低分子干渉RNA(下記説明および特許請求の範囲においてsiRNA

10

20

30

40

50

という)であって、RNA干渉(RNAi)および場合によってはプラスミドDNAを提供するものを、効果的な合成のポリマー媒介性に送達するための手段、組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

RNA干渉(RNAi)は、初期の遺伝子機能レベルであるmRNAにおける遺伝子サイレンシングのための技術である(非特許文献1)。この原理は短いRNA二本鎖(siRNA; small interfering RNA: 低分子干渉RNA)がmRNAの単一の標的と極端に選択的に相互作用して、配列特異的mRNAの分解およびひいてはタンパク質産生の阻害をもたらすことにある。

【0003】

RNAiは、siRNAの活性配列の予測可能な設計とmRNAのターゲッティングとに起因して非常に有効である。トランスフェクション試薬であるベクターによるトランスフェクションによってsiRNA二本鎖を導入し、細胞質に送達する場合、RNAiは細胞系(非特許文献2)および初代細胞(primary cell)などの種々の哺乳動物細胞において、外因性または内因性遺伝子を効率的にサイレンシングすることがわかっている。

【0004】

RNAiは人間の治療にとって強力なツールであり、癌またはウイルス感染などの重篤な疾患のための新しい治療アプローチの開発に劇的に影響を及ぼすだろう。RNAiの非常に大きな可能性を引き出すために、疾患のある器官の細胞および組織への効果的な送達のために開発されるRNAiトランスフェクションベクターおよび戦略の創出が必要である。

【0005】

RNAiの成功は、siRNA(設計および化学)および細胞送達系のためのベクター/担体の両者に左右される。アンチセンスまたはリボザイム技術と比較すると、標的mRNA(そうではない場合もある)の二次構造は、siRNAによるサイレンシングの強力な制限因子ではない。siRNAの多数の配列は、所与の標的mRNAに有効であり得る。siRNA二本鎖の安定性および細胞に送達されるsiRNAの量は、選ばれた配列による標的利用可能性よりむしろサイレンシングにとって最も大きい制限因子である。細胞内にsiRNAを導入するために2つのアプローチが提唱されている: 合成siRNA二本鎖のトランスフェクションによる細胞の細胞質への送達および核への遺伝子導入によって予め導入されたプラスミド(またはDNAカセット)からの、in situで発現したsiRNAの送達。

【0006】

哺乳動物細胞におけるRNAiは、si/shRNAまたはmicroRNA適合低分子ヘアピン型RNA(shRNA_{mir})を発現するsiRNAまたはDNAベクターのいずれかの効果的な細胞内送達に依存する(非特許文献3~7)。哺乳動物細胞におけるshRNA(short hairpin RNA: 低分子ヘアピン型RNA)またはsiRNAの発現は、Pol IIまたはPol III(U6またはH1)プロモータのいずれかからの転写により実現され得る。DNAベクターは、二本鎖低分子ヘアピン型RNA(shRNA)(後に細胞機構によってsiRNAに処理される)を発現するプラスミドおよびウイルスベクター系をベースとする。近年のshRNA系の開発によって、組織特異的で誘導性の遺伝子のノックダウンが可能になっている。RNA干渉用の活性RNAを発現するそういったDNAベクターの細胞内送達は、組換えウイルスまたは非ウイルス送達系を用いて実現され得る。

【0007】

遺伝子送達技術に関して、強力なウイルスベクターまたは非ウイルスベクターは細胞内にsiRNA二本鎖を導入するのに有用である。培養哺乳動物細胞に関し、ウイルスベクターには核内にDNAを送達する導入効率および能力があるため、ウイルスベクターは送達されたプラスミドDNAから発現したsiRNAの細胞内プールの産生のための強力なツールであると考えられる。しかし、組換えウイルス送達系は、依然として、それらの免疫原性および臨床的症状における潜在的リスクに悩まされる。対照的に、合成系を核酸(プラスミドまたは合成siRNA)にトランスフェクトすることは、柔軟性を示し免疫原性のない万能な方法である。非ウイルスベクターを(化学的または酵素的に生じた)合成siRNA二本鎖体にトランスフェクトすることは、主に短い二本鎖RNAを細胞質に送達するのに最良の技術であ

10

20

30

40

50

る。siRNA送達のために最も効率的な非ウイルスベクターは、元は遺伝子送達の分野に由来するか特異的RNAi適用のために新たに開発された、カチオン性脂質媒介トランスフクションをベースとしている。カチオン性脂質調合物は、核酸（プラスミド、オリゴヌクレオチド、siRNA二本鎖）を、正電荷粒子にコンパクトにし、この正電荷粒子は、細胞表面でアニオン性のプロテオグリカンと相互に作用し、かつ、エンドサイトーシスにより細胞に入ることができる。エンドサイトーシスの細胞内小胞（主にエンドソーム）に向けて輸送された後、カチオン性脂質には脂質交換／拡散によってこれら細胞内区画の膜を不安定にする性質があり、核酸の「脱複合体化（decomplexation）」および細胞質内への放出を可能にする（Xu and Szoka,1996）。また、プロトンスポンジ活性（proton sponge activity）と呼ばれる二次機構は、エンドソームの膨潤および破壊を誘導し、ひいては細胞質内の核酸を放出する一部の脂質に関与する可能性がある。RNAi機構が細胞質内で発生すると、カチオン性脂質の製剤をベースとするベクターは合成siRNA二本鎖を細胞内に送達するのに効率的な媒体となる。プラスミドからin situで発現したsiRNAに関して、エンドソーム区画を不安定にする、カチオン性脂質製剤またはカチオン性ポリマーをベースとする非ウイルスベクターが適している。

【0008】

遺伝子（長い二本鎖DNA）を細胞に効率的にトランスフェクトするカチオン性ポリマーの能力とは対照的に、それらは、短い核酸の送達には効率的ではない。カチオン性ポリマーはカチオン性脂質をベースとする系よりも、siRNA送達に効率的ではないことがわかっている。カチオン性ポリマーは、約100～200nMの濃度のsiRNAによりin vitroのRNA干渉を媒介することができる。このような濃度でのRNA干渉の選択性のために、カチオン性ポリマーの使用が制限される。また、使用される多量のsiRNAは、細胞毒性効果を誘導する多量のポリマーと関連する。これまで、カチオン性ポリマー（例えば、分枝または線状（linear）のポリエチレンジアミン、ポリ-ヒスチジンポリマー、キトサン、ポリ（アミノエステルグリコールウレタン）、アミノシクロデキストリン誘導体）がin vitroで用いられてきたが、カチオン性脂質に比して関連性のある効果はなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】ファイレ・エイ（Fire, A）、エス・グ（S. Xu）、エム・ケイ・モントゴメリ（M. K. Montgomery）、エス・エイ・コスタス（S. A. Kostas）、エス・イー・ドライバ（S. E. Driver）およびシー・シー・メロ（CC. Mello）著、「ポテント・アンド・スペシフィック・ジェネティック・インターフェアランス・バイ・ダブル・スタンダードRNA・イン・カエノルハブディティス・エレガンス（Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*）」、ネイチャー（Nature）、1998年、第31巻、p. 806-11。

【非特許文献2】エルバシヤ・エス（Elbashir, S）、エム・ジェイ・ハーボルス（M., J. Harborth）、ダブリュー・レンデッケル（W. Lendeckel）、エイ・ヤルシン（A. Yalcin）、ケイ・ウェバー（K. Weber）およびティー・ツシュル（T. Tuschl）著、「デュプレックス・オブ・21-ヌクレオチド・RNA・メディアイト・RNAインターフェアランス・イン・カルチャード・マンマリアン・セルズ（Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells）」、ネイチャー（Nature）、2001年、第411巻、p. 494-8。

【非特許文献3】スイ・ジー（Sui, G.）、シー・スーホー（C. Soohoo）、ビー・アフアーエル（B. Affar el）、エフ・ガイ（F. Gay）、ワイ・シ（Y. Shi）、ダブリュー・シー・フォレスター（W. C. Forrester）および、ワイ・シ（Y. Shi）著、「ア・DNAベクター・ベースドRNAiテクノロジー・ツー・サブレス・ジーン・エクスプレッション・イン・マンマリアン・セルズ（A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells.）」、Proc Natl Acad Sci U S A、2002年、第99巻、p. 5515-20

10

20

30

40

50

【非特許文献4】ユ・ジェイ・ワイ (Yu, J.Y.)、エス・エル・デルイター (S. L. DeRuiter) およびディー・エル・ターナー (D. L. Turner.) 著、「RNA インターフェアランス・バイ・エクスプレッション・オブ・ショート・インターフェアリング RNAs アンド・ヘアピン RNAs・イン・マンマリアン・セルズ (RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells.)」、Proc Natl Acad Sci U S A、2002年、第99巻、p. 6047-52.

【非特許文献5】ミヤギシ・エム (Miyagishi, M.) およびケイ・タイラ (K. Taira) 著、「U6 プロモーター・ドライブン・siRNAs ウィズ・フォー・ウリジン・3' オーバーハングス・イフィシエントリー・サプレス・ターゲッテッド・ジーン・エクスプレッション・イン・マンマリアン・セルズ (U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells.)」、Nat Biotechnol、2002年、第20巻、p. 497-500.

【非特許文献6】シルバ・ジェイ・エム (Silva, J. M.)、エム・ゼット・リ (M. Z. Li) 、ケイ・チャン (K. Chang) 、ダブリュー・ゲ (W. Ge) 、エム・シー・ゴールドディン (M. C. Golding) 、アール・ジェイ・リッケルス (R.J. Rickles) 、ディー・シオラス (D. Siolas) 、ジー・フ (G. Hu) 、ピー・ジェイ・パディッソン (P.J. Paddison) 、エム・アール・シュラバッハ (M. R. Schlabach) 、エヌ・シェス (N. Sheth) 、ジェイ・ブラッドショー (J. Bradshaw) 、ジェイ・バーチャード (J. Burchard) 、エイ・クルカラニ (A. Kulkarni) 、ジー・キャベット (G. Cavet) 、アール・サチダナンド (R. Sachidanandam) 、ダブリュー・アール・マクコンビ (W. R. McCombie) 、エム・エイ・クリアリ (M. A. Cleary) 、エス・ジェイ・エレッジ (S.J. Elledge) およびジー・ジェイ・ハノン (G.J. Hannon) 著、「セカンド・ジェネレーション・shRNA ライブラリーズ・カバリング・ザ・マウス・アンド・ヒューマン・ゲノムズ (Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes)」、Nat Genet、2005年、第37巻、p. 1281-8.

【非特許文献7】ブルメルカンブ・ティー・アール (Brummelkamp, T. R.) 、アール・ベルナルド (R. Bernards) および、アール・アガニ (R. Agami) 著、「ア・システム・フォー・ステーブル・エクスプレッション・オブ・ショート・インターフェアリング RNAs・イン・マンマリアン・セルズ (A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells)」、Science、2002年、第296巻、p. 550-3.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者らの目的は、カチオン性ポリマー（この主要なクラスの非ウイルス送達ベクター）の、in vitro siRNA トランスフェクション能力を増大させることであつた。カチオン性ポリマーは、静電的相互作用を介して、siRNA のリン酸塩とポリマーのアミノ基との間で相互作用することができる。しかし、siRNA の構造によれば、ポリマーは2回転しか含まないといった小さなダブルヘリックス（鎖1本あたり約20個のヌクレオチド）を凝縮することができない。siRNA とカチオン性ポリマーとの間で複合体形成さえも生じ、その結果siRNA がポリアミン骨格に沿って固着することになり、カチオン性ポリマーは協同的相互作用を失って、複合体形成された分子の粒子またはミクロ凝集体への凝縮が誘導される。

【課題を解決するための手段】

【0011】

ポリアミンおよび小さな二本鎖オリゴヌクレオチドによって担われる正電荷と負電荷との間の静電的相互作用に加えて、核酸塩基および水素結合形成相互作用による疎水性スタッキングは、ポリアミンとsiRNA との間の相互作用を増大させるために本発明者らが提唱する方法である。総合すると、静電的および疎水性の相互作用並びに水素結合は、siRNA の安定した複合体形成および凝縮をもたらす十分なエネルギーを提供する。

【0012】

芳香族アミノ酸 (aromatic amino acid: A A A) はタンパク質において疎水性の原因となり、疎水性相互作用を介してタンパク質 - タンパク質間およびタンパク質 - リガンド間の相互作用に関与する。A A A はまた、核酸塩基 (グアニジン、アデノシン、チミンまたはシトシン) とスタッキングすることによって核酸と相互作用することもできる。

【 0 0 1 3 】

本発明は、芳香族アミノ酸で高度に修飾されたポリアミン骨格を含む新しい概念の疎水性ポリアミンに関する。このタイプのポリマーによって、静電相互作用、疎水性スタッキングおよび水素結合を介して siRNA のような小さな核酸と相互作用する可能性が得られる。克服するためのエネルギー障壁として、化学的グラフトによってポリアミンに A A A を付加することにより、最終的に凝縮をもたらす協同的相互作用を誘導するのに十分なエネルギーが提供され得ることになる。その結果、安定した粒子または凝集体の下での疎水性相互作用によって生成する複合体が安定する。

10

【 0 0 1 4 】

本発明は、カチオン性ポリマーのグループに属する新種の非ウイルス性トランスフェクション剤を記載するものであり、特に小サイズのオリゴヌクレオチドのトランスフェクションに適合させられている。特に、小さなオリゴヌクレオチドの物理的性質が、本発明者が疎水性およびカチオン性ポリマーをベースとする新種のトランスフェクション剤を設計するきっかけとなった。

【 0 0 1 5 】

本発明者らは、関心のあるオリゴヌクレオチドを疎水性およびカチオン性ポリマーと結合させることによってトランスフェクションの安定な複合体を形成する高効率のトランスフェクション剤が得られ得ることを見出した。

20

【 0 0 1 6 】

有利には、前記トランスフェクション剤はまた、RNA 干渉を媒介する小型の RNA を *in situ* での発現を促進し得るプラスミド DNA を siRNA に共トランスフェクトするのにも有用である。

【 0 0 1 7 】

また、本発明の目的は、siRNA 用のトランスフェクション剤および場合によっては RNAi に活性のある RNA を発現する DNA ベクターとして有用な新規組成物を提供することにある。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、細胞を *in vitro* でトランスフェクトする方法に関する。

30

【 0 0 1 9 】

トランスフェクション剤として有用な本発明の組成物は、芳香族アミノ酸によって修飾されたポリアミンと、小さな二本鎖または一本鎖 RNA とを含む。

【 0 0 2 0 】

有利には、ポリアミンは、分枝または線状のポリエチレンジアミン、ポリアリルアミン、デンドリマー、ポリアミノエステル、ポリリジン、ポリヒスチジン、ポリアルギニン、ポリオルニチンまたはキトサンを含む。

【 0 0 2 1 】

ポリアミンは、より具体的には、線状ポリエチレンジアミン (linear polyethylenimine : L P E I) 、ポリアリルアミン (polyallylamine : P A A) およびポリリジン (polylysine : P L L) を含む群から選択される。

40

【 0 0 2 2 】

好ましくは、ポリアミンの分子量は 4 0 0 D a 超である。

【 0 0 2 3 】

有用なポリアミンは、2 ~ 2 2 0 K D の線状ポリエチレンジアミン、1 0 ~ 7 0 K D のポリアリルアミンおよび 1 ~ 3 0 0 K D のポリリジを含む群から選択される。

【 0 0 2 4 】

ポリアミンを修飾するのに用いられる芳香族アミノ酸は、チロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンまたはそれらの誘導体を含む群から選択される。

50

【 0 0 2 5 】

好ましくは、芳香族アミノ酸はトリプトファンおよび/またはチロシンである。

【 0 0 2 6 】

上記組成物において、RNAは通常のものであるか修飾されており、修飾基は例えば 2' -フルオ、2' -メトキシ、ホスホロチオアート、LNAまたはモルホリノである。

【 0 0 2 7 】

上記RNAは、二本鎖または一本鎖アンチセンスsiRNAまたは一本鎖センス/アンチセンスsiRNAの混合物である。

【 0 0 2 8 】

有利には、siRNAは、15 ~ 30merを有する。

10

【 0 0 2 9 】

好適な組成物は、等張培地（例えば、NaCl、グルコース）、緩衝液中に、上記のような芳香族アミノ酸および二本鎖または一本鎖siRNAによって修飾されたポリアミンを含む。

【 0 0 3 0 】

siRNAの濃度はピコモルからマイクロモルまで変動し得る。

【 0 0 3 1 】

有利には、上記組成物は、1種以上の添加剤（例えば、PEG、PVA、単糖類、多糖類、ペプチド、タンパク質、ビタミン類）を含む。

【 0 0 3 2 】

20

本発明の一実施形態によれば、上記組成物は、RNAiに活性なRNAを発現するかまたは導入遺伝子をコードするプラスミドDNAを更に含む。

【 0 0 3 3 】

前記プラスミドは、特に、siRNA、shRNAまたはmino-RNA適合低分子ヘアピン型RNAを発現する。

【 0 0 3 4 】

前記siRNAはそれぞれ、分解に対し適切な基により安定化される群を含むことができ、該群は、デオキシヌクレオチドなどの修飾された類似体により置換されたプリンヌクレオチド、ピリミジンヌクレオチド、および/または、糖-あるいは骨格修飾されたリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドなどの修飾されたヌクレオチド類似体を含む群から選択される。オリゴヌクレオチド配列は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体、例えば、メチルホスホナート、モルホリノ・ホスホロジアマダート、ホスホロチオアート、PNA、LNA、2'アルキルヌクレオチド類似体を含むし得る（Verma and Eckstein, 1998）。

30

【 0 0 3 5 】

別の目的は、前記組成物の合成方法を提供することである。

【 0 0 3 6 】

上記組成物の芳香族アミノ酸によって修飾されたポリアミンを合成する方法は、ポリアミンの存在下でジメトキシトリアジン-N-メチルモルホリウム（Dimethoxytriazine-N-methylmorpholium: DMTMM）によって活性化された芳香族アミノ酸のスーパーエステルの使用を含む。

40

【 0 0 3 7 】

有利には、ポリアミンの合成は、塩基性緩衝液（例えば、ホウ酸塩緩衝液、200mM、pH = 7.5 ~ 9）中で、あるいは塩基または水/アルコール混合物の存在下の水性培地中で行われる。

【 0 0 3 8 】

前記組成物中の芳香族アミノ酸によるポリアミンの修飾の割合（百分率）は、更に具体的には、0.01 ~ 100%、特に15 ~ 50%である。

【 0 0 3 9 】

本発明はまた、siRNAまたはsiRNAおよびプラスミドDNAのin vitro、ex vivoおよびin v

50

ivoの転移 (transfer) 方法であって、上記のような組成物を用いる工程を包含する、方法に関する。

【0040】

siRNAのin vitro転移は有利には、懸濁液中に接着細胞または浮遊細胞を含む培地で実行される。

【0041】

培地は、正常培地または合成培地である。

本発明また、遺伝子による遺伝病 (genetic hereditary disease) または複雑な遺伝子疾患の原因となるか、またはそれに関与する1種以上の標的タンパク質の発現に対し調節作用を誘導する医薬組成物として使用される組成物を提供する。

10

【0042】

本発明の目的は、RNA干渉を媒介する小さなRNAのin situ発現を促進し得る、DNAベクタートランスフェクション剤として有用な新規組成物を提供することにある。

【0043】

本発明の他の特徴および利点は図1～8を参照しながら以下の実施例に与えられることになる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】D₂O中のL-PEI-Tyr接合体の¹H-NMR分析。

【図2】図2Aおよび2B：A549細胞におけるsiRNA送達。

20

【図3】種々の程度のチロシン残基で修飾されたL-PEI_{10K}をトランスフェクトされたGL3Luc siRNAによるA549-GL3Luc細胞によって安定して発現されたルシフェラーゼ遺伝子 (pGL3) のRNA干渉効率。

【図4】L-PEI_{10K}またはL-PEI_{10K}Tyr_{33%}接合体をトランスフェクトされたGL3Luc siRNAによるA549-GL3Luc細胞によって安定して発現されたルシフェラーゼ遺伝子 (pGL3) の比較サイレンシング効率。

【図5】L-PEI_{10K}-Tyr_{33%}をトランスフェクトされたGL3Luc siRNAによるA549-GL3Luc細胞によって安定して発現されたルシフェラーゼ遺伝子 (pGL3) の選択的RNA干渉。

【図6】L-PEI_{10K}-Tyr_{33%}と複合体形成されたsiRNAのトランスフェクション後のヒーラ細胞系における効率的且つ選択的なGAPDH遺伝子サイレンシング。

30

【図7】PAA_{17K}-Tyr_{40%}をトランスフェクトされたGL3Luc siRNAによるA549-GL3Luc細胞によって安定して発現されたルシフェラーゼ遺伝子 (pGL3) の選択的RNA干渉。

【図8】図8Aおよび8B：GL2Luc siRNAおよびpCMVLucプラスミド (pGL2Luc) にPEI_{10K}-Tyr_{19%}を共トランスフェクトされた後にヒーラ細胞によって発現されたルシフェラーゼ遺伝子 (GL2Luc) の選択的RNA干渉。

【発明を実施するための形態】

【0045】

(材料と方法)

(化学薬品およびオリゴヌクレオチド)

オリゴヌクレオチドを化学的に合成し、Eurogentec (ベルギー) によってPAGE精製した。オリゴヌクレオチドは、1×アニーリング緩衝液 (50 mMの酢酸カリウム、50 mMの酢酸マグネシウム) (Eurogentec) 中、2分間にわたり95℃でアニーリングされ、次いで、室温で2～4時間インキュベートされた。GAPDH SMARTプール (登録商標) 試薬はDharmaconから入手した。

40

【0046】

使用されたsiRNA二本鎖体は、配列 (配列番号1および配列番号2；配列番号3および配列番号4；配列番号5および配列番号6；配列番号7および配列番号8) に相当する。

【0047】

【表 1 A】

GL3Luc siRNA二本鎖体	配列番号 1	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA (dT) ₂ -3'
	配列番号 2	3'-(dT) ₂ GAAUGCGACUCAUGAAGCU-5'
GL2Luc siRNA二本鎖体	配列番号 3	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA (dT) ₂ -3'
	配列番号 4	3'-(dT) ₂ GCAUGCGCCUUAUGAAGCU-5'
siRNA TNF- α ローダミン二本鎖体	配列番号 5	5'-GCACCACUAGUUGGUUGUC (dT) ₂ -3'
	配列番号 6	3'-(dT) ₂ CGUGGUGAUAACCAACAG-5'
ラミンA/C siRNA二本鎖体	配列番号 7	5'-CUGGACUCCAGAAGAACAAdTdT-3'
	配列番号 8	3'-dTdTGACCUGAAGGUCUUCUUGU-5'

10

【0048】

化学用試薬および出発原料はすべてSigma-Aldrich (フランス) から購入され、事前に精製することなく使用された。溶媒はSDS-Carlo Erba (フランス) から取り寄せられた。ジエチルエーテルは乾燥させられて、ナトリウムベンゾフェノンから蒸留された。

【0049】

¹H NMRスペクトルは、CDCl₃、D₂OまたはCD₃OD中 25 °C でBrukerのAF-400スペクトロメーターで記録され、プロトンの化学シフトをTMSから低磁場で記録した。NMR多重度は、s = シングレット、d = ダブルット、br = ブロード、m = マルチプレット、t = トリプレットと略している。

【0050】

20

(線状ポリエチレンイミン (L-PEI) の合成)

LPEIは2-エチル-2-オキサゾリンモノマーのリビングカチオン開環重合後に生成させられた中間体ポリ-2-エチル-2-オキサゾリンから得られる。

【0051】

ポリ-2-エチル-2-オキサゾリンの合成: 0.4 molの2-エチル-2-オキサゾリンモノマーをアセトニトリル 40 mL に溶解させ、次いで、0.4 / X molのp-トルエンスルホン酸メチルをアルゴン雰囲気下に添加した。反応物を80 °C で24 ~ 48時間にわたって加熱した。反応物をNa₂CO₃飽和水溶液でクエンチし、24時間にわたって加熱した。室温で緩やかに冷却した後、沈殿が生じるまで10 mLのメタノールおよびエーテルを添加した。沈殿物をろ過し、エーテルで洗浄した。ポリ-2-エチル-2-オキサゾリンを80 ~ 90%の収率で得た。

30

【0052】

¹H-NMR分析(400MHz, CDCl₃): 1-1.06ppm (s, 3H, CH₃CH₂CONCH₂CH₂); 2.2-2.3ppm (m, 2H, CH₃CH₂CONCH₂CH₂); 3-3.4ppm (s, 4H, CH₃CH₂CONCH₂CH₂).

L-PEIの合成: 0.35 molのポリ-2-エチル-2-オキサゾリンを水100 mL に溶解させ、次いで、200 mLの37%塩酸を添加し、混合物を120 °C に加熱した。24時間後、反応混合物を蒸発させ、次いで、水を添加した後に凍結乾燥させた。収率は90%であった。

【0053】

¹H-NMR(400MHz, D₂O)による分析: 3.4 ppmにシングルピーク

40

【0054】

【表 1 B】

0.4/Xモルのp- トルエンスルホン酸メチル	X=モノマー数	ポリ-2-エチル-2- オキサゾリンの分子量	ポリエチレンイミンの分子量
8 mmoles	50	5 KDa	2 KDa
1.6 mmoles	250	25 KDa	10 KDa
0.8 mmoles	500	47 KDa	20 KDa

10

【0055】

(ポリエチレンイミン-芳香族-アミノ酸接合体の合成)

(N, O-Boc-チロシンの合成)

L-チロシン (Sigma) 5 g を Na_2CO_3 (0.1 mg/mL) 125 mL および THF 50 mL に溶解させた。次いで、THF 75 mL に溶解した Boc_2O 17.2 g をチロシン溶液に添加し、その混合物を室温で3日間にわたり攪拌した。水 (40 mL) を加え、N, O-Boc-チロシンをエーテルで抽出した。水相を HCl で酸性化し、酢酸エチルで新たに2回抽出した。蒸発させた後、この粗製産物をシリカゲルクロマトグラフィー (5% MeOH / CH_2Cl_2 中) によって精製する。5.2 g の N, O-Boc-チロシンを得た。

20

【0056】

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) による分析: 7.2ppm (d, 2H, 芳香族H), 7.1ppm (d, 2H, 芳香族H), 4ppm (m, 1H, BocO-Ar- CH_2 -CH(NHBOC)-COOH), 3-2.99ppm (dd, 1H, BocO-Ar- CH_2 -CH(NHBOC)-COOH), 2.84-2.78ppm (dd, 1H, BocO-Ar- CH_2 -CH(NHBOC)-COOH), 1.48ppm (s, 9H, BocO-Ar- CH_2 -CH(NHBOC)), 1.32ppm (s, 9H, BocO-Ar- CH_2 -CH(NHBOC)-COOH)。

(N-Boc-トリプトファンの合成)

N-Boc-トリプトファンの合成は、N, O-Boc-チロシンの合成のために用いられたのと同じ手順により実現されたが、トリプトファン 2 g および Boc_2O 6.5 g により出発し、白色固体 2.79 g を得た。

30

【0057】

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) による分析: 8.1ppm (s, 1H, -COOH), 7.6ppm (d, H, 芳香族H), 7.38ppm (d, 1H, 芳香族H), 7.2ppm (m, 1H, 芳香族H), 7.16 (m, 1H, 芳香族H), 7.01ppm (m, 1H, 芳香族H), 5.09ppm (d, 1H, NHBOC), 4.68ppm (br, 1H, BocO-Ar- CH_2 -CH(NHBOC)-COOH), 3.35ppm (m br, 2H, BocO-Ar- CH_2 -CH(NHBOC)-COOH), 1.45ppm (s, 9H, BocO-Ar- CH_2 -CH(NHBOC))

(ポリエチレンイミン-チロシン接合体 (L-PEI-Tyr) の合成)

(L-PEI_{10KD}-Tyr_{33%} の合成)

手順1: 100 mg の L-PEI_{10K}・HCl (1.26 mmol) を 5 mL の 200 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH = 8.2) に溶解させた。次いで、pH を 10 N NaOH を用いて 8 に調節した。THF 15 mL に溶解した N, O-Boc-チロシン (0.632 mmol) 240 mg を添加し、混合物を 10 分間にわたり攪拌した。DMTMM (500 mg) を混合物に添加し、48 時間にわたって攪拌した。蒸発させた後、固体を水で洗浄した。乾燥後、239 mg の黄色固体を得た (L-PEI_{10K}-TyrBoc₂)。185 mg の L-PEI-TyrBoc₂ をトリフルオロ酢酸 (TFA) 5 mL に溶解させた。3 時間後、反応混合物を蒸発させ、水中で透析した。凍結乾燥後、111 mg の白色固体 (L-PEI_{10K}-Tyr) を得た。

40

【0058】

手順2: 水 4 mL 中の L-PEI_{10K}・HCl 200 mg (2.53 mmol) に、N-メチル

50

ホルリン 0.56 mL とメタノール 1.2 mL 中の N, O - B o c - チロシン 483 mg (0.5 当量、1.26 mmol) とを添加した。反応混合物を 30 分間にわたり攪拌し、DMTMM 700 mg を添加した。48 時間後、反応混合物を蒸発させ、固体を TFA 8 mL に溶解させた。3 時間後、反応混合物を蒸発させ、次いで、水中で 1 日、2 N HCl 中で 2 日透析した。凍結乾燥後、260 mg の白色固体を得た。

【0059】

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3)(図1): 6.9ppm (s br, 2H, 芳香族H), 6.7ppm (s br, 2H, 芳香族H), 3.8ppm (s, 4H, $\text{TyrCONCH}_2\text{CH}_2$), 3.68ppm (br, 1H, $\text{ArCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COPEI}$), 3.1ppm (br, 2H, $\text{ArCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COPEI}$), 2.74ppm (s br, 4H, NHCH_2CH_2)

(ポリエチレンイミン - トリプトファン接合体 (L-PEI-Trp) の合成)

(L-PEI_{10KD}-Trp_{33%} の合成)

L-PEI-Trp の合成は、L-PEI-Tyr の合成のために用いられたのと同じ手順により実現されたが、0.1 g の LPEI および 0.193 g の N - B o c - トリプトファンにより出発した。

【0060】

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O): 7.4-7.1ppm (m br, 5H, 芳香族H), 3.91ppm (m br, 3H, $\text{ArCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COPEI}$), 3.47ppm (s br, 4H, $\text{ArCONCH}_2\text{CH}_2$ および HNCH_2CH_2)

(細胞培養)

ヒーラ (ヒト子宮頸部上皮腺癌、CCI-2) 細胞の成育が MEM (Eurobio) 中においてなされ、この MEM には、2 mM のグルタマックス (Eurobio)、Earle's BSS (Eurobio)、1.5 g/L の重炭酸ナトリウム (Eurobio)、0.1 mM の非必須アミノ酸 (Eurobio)、1.0 mM のピルビン酸ナトリウム (Eurobio)、100 単位/mL のペニシリン (Eurobio)、100 $\mu\text{g/mL}$ のストレプトマイシン (Eurobio) および 10% の FBS (Perbio) が補充されていた。

【0061】

GL3ルシフェラーゼ (SV40要素制御下のホタル (Photinus pyralis) ルシフェラーゼ) を安定的に発現する A549 (ヒト肺癌、ATCC No.CCL-185) 細胞は、pGL3Luc プラスミド (Clontech) の安定なトランスフェクションの後に得られた。A549-GL3Luc 細胞を RPMI-1640 中で成育させ、10% のウシ胎仔血清、2 mM のグルタマックス、100 単位/mL のペニシリン、100 $\mu\text{g/mL}$ のストレプトマイシンおよび 0.8 $\mu\text{g/mL}$ の G418 (Promega) を補充した。細胞はすべて 5% CO_2 湿潤雰囲気中 37 に維持された。

【0062】

(トランスフェクション実験)

トランスフェクションの 1 日前、 2.5×10^4 個の細胞を、24 ウェル組織培養プレートにおいて 10% FBS を含む 1 mL の新鮮な完全培地中に播いた。トランスフェクションの前に、siRNA / ポリマーの複合体を調製した。所望量の siRNA を 50 μL の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6 または 8) に希釈した。次いで、所望量のポリマー溶液 (7.5 mM 窒素) を siRNA 溶液に添加した。得られた溶液を 10 秒間にわたりボルテックスにより混合し、室温にて 10 ~ 15 分間にわたり放置した。トランスフェクション溶液を細胞に加える前に、完全培地を除去し、10% の FBS を含む新鮮な完全培地 0.55 mL と置き換えた。次いで、複合体溶液 50 μL をウェル毎に加え、プレートを 37 でインキュベートした。

【0063】

(共トランスフェクション実験)

トランスフェクションの 1 日前、 5×10^4 個の細胞を、24 ウェル組織培養プレートにおいて 10% FBS を含む 1 mL の新鮮な完全培地中に播いた。トランスフェクションの前に、ポリマー、プラスミドおよび siRNA との複合体を調製した。100 ng の pCMVLuc (GL2Luc 二本鎖配列) および所望量の siRNA を 50 μL の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) に希釈した。次いで、2 μL の L-PEI_{10K}-Tyr_{19%} 溶液 (7.5 mM 窒素) をプラスミドおよび siRNA 溶液に添加した。得られた溶液を 10 秒間にわたりボルテックスにより混合

10

20

30

40

50

し、室温にて10～15分間にわたり放置した。細胞にトランスフェクション溶液を加える前に、完全培地を除去し、10% FBSを含んだ新鮮な完全培地0.55 mlと置き換えた。次いで、複合体溶液50 µlをウェル毎に添加し、プレートを37 °Cでインキュベートした。ルシフェラーゼ遺伝子発現を24時間のインキュベーション期間後に測定した。実験は三重測定で行い、ルシフェラーゼ活性は、細胞溶解液中のタンパク質含量（タンパク質重量（mg））によって規格化された相対光単位（Relative Light Unit：RLU）として表された。次いで、サイレンシング効率をGL2Luc siRNAトランスフェクト細胞およびGL3Luc siRNAトランスフェクト細胞からのルシフェラーゼ活性の比から算出した。

【0064】

（DNAベクターをベースとするRNAi技術によるトランスフェクション手順）

トランスフェクションの1日前、 5×10^4 個の細胞を、24ウェル組織培養プレートにおいて10%のFBSを含む1 mlの新鮮な完全培地中に播種した。トランスフェクションの前に、ポリマーと、RNAi（siRNA、shRNA、microRNA適合低分子ヘアピン型RNA）を媒介する短鎖RNAを発現するDNAベクターとの複合体を調製した。プラスミドRNAiベクター（1 µg）を50 µlの50 mMリン酸緩衝液（pH 7）に希釈した。次いで、2～4 µlのL-PEI_{10K}-Tyr_{19%}溶液（7.5 mM窒素）をプラスミドRNAiベクター溶液に添加した。得られた溶液を10秒間にわたりボルテックスで混合し、室温にて10～15分間にわたり放置した。細胞にトランスフェクション溶液を加える前に、完全培地を除去し、10% FBSを含んだ新鮮な完全培地0.55 mlと置き換えた。次いで、1～50 µlの複合体溶液をウェル毎に添加し、プレートを37 °Cでインキュベートした。インキュベーション1日後、新鮮な完全培地0.4 mlを加えた。標的遺伝子の発現のレベル（mRNAレベル）またはタンパク質産生阻害のレベル（タンパク質レベル）を24日以上後に決定した。コントロールとして、標的遺伝子発現に対する（ミスマッチ配列を含む）非特異的活性RNAを発現するプラスミドRNAiベクターを用いた。

【0065】

（ルシフェラーゼおよびタンパク質アッセイ）

ルシフェラーゼ遺伝子発現は、市販のキット（Promega、フランス）を用いて測定された。完全培地を除去した後、1 mlのPBS溶液で3回洗浄した。次いで、1×溶解バッファー100 µlをウェル毎に加え、プレートを室温で30分間にわたりインキュベートした。溶解液を集め、14,000 gで5分間にわたり遠心分離した。ルシフェリン溶液100 µl注入後、ルシフェラーゼアッセイ法により溶解液2.5 µlを評価した。発光（RLU）をルミノメーター（LB960、Berthold、フランス）により5秒間積算してモニタリングした。結果はBCAアッセイ法（Pierce、フランス）を用いて、細胞タンパク質の重量（mg）当たりの10秒間にわたり積算された光単位（RLU）として表される。

【0066】

（mRNAレベルの測定）

メッセンジャーRNAレベルは、QuantiGene（登録商標）BRANCHED DNAアッセイ（Geno Spectra）（全細胞溶解液を用い、標的増幅なしに実施される）により決定された。

【0067】

48時間のトランスフェクションの後、ヒラ細胞を1 mlのPBS（Cambrex）で1回洗い、1×Genospectraの溶解バッファー0.6 ml中に50 °Cで30分間にわたり溶解させた。次いで、プレートを-80 °Cで少なくとも30分間にわたり保存した。溶解液を融解し、2～20 µlの溶解液を捕捉プレートに加えた。溶解作用試薬10 µl（48反応のため。溶解作用試薬は25 µlのCE（capture extender：捕捉増量剤）、25 µlのLE（label extender：標識増量剤）および25 µlのBL（遮断プローブ）と425 µlの3×溶解混合物を加えることにより調製される。すべての化合物はGenospectraから入手）をプレートに加え、その容積を1×溶解混合物により100 µlとした。プレートに蓋をし、50 °Cで16時間にわたりインキュベートした。プレートを、1×洗浄バッファー（Genospectra）300 µlで3回洗浄し、増幅作用溶液（0.116 µlの増幅剤を増幅剤希釈剤116 µlに希釈。すべてGenospectraから）100 µlを各ウェル

に加えた。プレートを50で1時間にわたりインキュベートした。1×洗浄バッファーで3回洗浄した後、100μlの標識プローブ作用試薬(標識プローブ0.116μlを増幅剤希釈剤116μl中に希釈;すべてGenospectraから)を各ウェルに加え、50で1時間にわたりインキュベートした。次いで、プレートを1×洗浄緩衝液で3回洗浄した後、100μlの基質作用試薬(116μlの基質中、10%ラウリル硫酸リチウム0.348μl、すべてGenospectraから)を各ウェルに加えた。30分のインキュベーションの後、各ウェルにおける発光を分光光度計(Berthold)により測定した。

【0068】

(蛍光顕微鏡法)

トランスフェクションの1日前、 2.5×10^4 個のA549細胞を、24ウェル組織培養プレートにおいて10%FBSを含む1mlの新鮮な完全培地中に播種した。トランスフェクションの前に、siRNA/ポリマーの複合体を調製した。所望量のsiRNA-ローダミン(Rho)を50μlの50mMリン酸緩衝液(pH6または8)に希釈した。次いで、所望容積のL-PEI_{10K}-Tyr_{33%}溶液(7.5mM窒素)をsiRNA溶液に添加した。得られた溶液を10秒間にわたりボルテックスで混合し、室温にて10~15分間にわたり放置した。細胞にトランスフェクション溶液を加える前に、完全培地を除去し、10%FBSを含んだ新鮮な完全培地0.55mlと置き換えた。次いで、複合体溶液50μlをウェル毎に加え、プレートを37で24または48時間にわたりインキュベートした。

【0069】

観察前に、細胞を1mlのPBS-BSA 1%で洗浄し、次いで、蛍光顕微鏡(ECLIPSE TE2000-S、Nikon)によって観察した。

【0070】

(結果)

2-エチル-2-オキサゾリンモノマーのカチオン開環重合を用いて、平均分子量が10kDaである線状ポリエチレンイミン(linear polyethylenimine:L-PEI)を生じさせた。次いで、「材料と方法」に記載の手順1または2に従って、L-PEI_{10K}を種々の程度でチロシン残基により修飾した。L-PEI-Tyr誘導体はすべて、図1に例示されるように¹H-NMRによって特徴付けられる。

【0071】

(L-PEI-Tyr誘導体による培養細胞へのsiRNA送達)

線状ポリエチレンイミンおよびチロシン修飾線状ポリエチレンイミン(L-PEI_{10K}Tyr_{33%})による培養細胞への比較siRNA送達能力を蛍光siRNA(ローダミン標識siRNA、siRNA-Fluor)を用いて試験した。少量のsiRNA-Fluor(最終濃度25および50nM)を、50μlの50mMリン酸緩衝液(pH6.0)中で2μlのL-PEI_{10K}またはL-PEI_{10K}Tyr_{33%}(両者とも7.5mM窒素の保存溶液)と複合体形成させた。得られたトランスフェクション物を、10%FBSを含む完全培地で培養されたA549細胞に加えた。細胞を24ウェル組織培養プレートフォーマットで24時間にわたりインキュベートした後に、蛍光顕微鏡によって観察した。結果を図2に示す(10%FBSを含む1mlの完全細胞培養培地でインキュベートし、50μlの50mMリン酸緩衝液(pH6.0)中で25nM(A)または50nM(B)のsiRNA-ローダミン(Rho)を2μlのL-PEI_{10K}またはL-PEI_{10K}Tyr_{33%}(7.5mM窒素)と複合体形成させた)。観察前、細胞を1mlのPBS-BSA 1%で洗浄し、次いで、蛍光顕微鏡法(ECLIPSE TE2000-S、Nikon)(倍率200)によって観察した。

【0072】

試験された両siRNA濃度のL-PEI_{10K}媒介の送達に関して、細胞の細胞質内には点状の蛍光は殆ど観察されなかった。L-PEI_{10K}Tyr_{33%}によるsiRNA送達後に、強力な点状の蛍光が細胞質のあらゆる領域で観察された。これらの結果から、未修飾のポリアミンに比してL-PEI_{10K}Tyr_{33%}を用いると、siRNAの細胞取り込みは非常に有効であることがわかる。

【0073】

内因性レポーター遺伝子のサイレンシングを媒介する本発明のポリマーの効率を試験す

10

20

30

40

50

るためのターゲットモデルとして、本発明者らは、GL3ルシフェラーゼ（SV40要素の制御下のホタル（*Photinus pyralis*）ルシフェラーゼ）を安定して発現するA549細胞を用いた。細胞は、10% FBSを含む完全培地0.55 ml中（24ウェルの組織培養プレートフォーマットにおける）で、50 μ lの50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）中で2 μ lのL-PEI_{10K}Tyr_{x%}（7.5 mM窒素）と複合体形成したGL3Luc siRNA（20 nM）をトランスフェクトされた。ルシフェラーゼ遺伝子発現を48時間のインキュベーション期間後に測定した。実験は三重測定で行い、ルシフェラーゼ活性は細胞溶解液中のタンパク質含量（タンパク質の重量（mg））によって規格化された相対光単位（Relative Light Unit：RLU）として表された。次いで、サイレンシング効率を非トランスフェクト細胞から算出した。

10

【0074】

化学的に製造された明確（Elbashirらによって検証済み、2001年）且つ従来のsiRNA（siRNA_{GL3Luc}）と、GL3Luc mRNAと一致し、2-デオキシリボヌクレオチド（dT）の3'-オーバーハングを含む、19個のヌクレオチドの短鎖dsRNAからなる配列特異的GL3Luc siRNAとをトランスフェクション実験に用いた。SiRNAを、50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）中、未修飾のL-PEI_{10K}または種々の程度（ポリマー1つあたり3、8、25または33%の窒素修飾）でチロシン残基により修飾したL-PEI_{10K}と複合体形成させた。得られたトランスフェクション複合体溶液を、血清を含んだ培地で成育中の細胞に加え、最終的に細胞を、20 nMの濃度のsiRNAに曝露した。結果を図3に示す。トランスフェクション48時間後、細胞溶解物のタンパク質含量によって規格化された標準的な発光アッセイによりルシフェラーゼ活性を測定することによってサイレンシング効率を決定した。未修飾のポリアミンによりトランスフェクションを行った場合、ルシフェラーゼ活性（タンパク質のRLU/mgとして表される）は有意には阻害されなかった（<2%）。ポリアミン-チロシン接合体を用いた場合、サイレンシング効率はチロシンがポリアミンにグラフトする程度に応じて増大し、25~33%の修飾で平坦域に達し、ルシフェラーゼ活性は90~95%阻害された。

20

【0075】

（L-PEI_{10K}またはL-PEI_{10K}Tyr_{33%}接合体をトランスフェクトされたGL3Luc siRNAによってA549 GL3Luc細胞により安定的に発現されたルシフェラーゼ遺伝子（pGL3）の比較サイレンシング効率）

30

GL3ルシフェラーゼ（SV40要素の制御下のホタル（*Photinus pyralis*）ルシフェラーゼ）を安定して発現するA549細胞を用いて、ポリマー媒介性siRNA送達後の選択的サイレンシングを評価した。10% FBSを含む0.55 mlの完全培地において（24ウェル組織培養プレートフォーマット中）、50 μ lの50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）中で2 μ lのL-PEI_{10K}またはL-PEI_{10K}Tyr_{33%}（7.5 mM窒素）と複合体形成したGL3Luc siRNA（1~100 nM）を細胞にトランスフェクトした。ルシフェラーゼ遺伝子発現を48時間のインキュベーション期間後に測定した。実験は三重測定で行い、ルシフェラーゼ活性は細胞溶解液中のタンパク質含量（タンパク質の重量（mg））によって規格化された相対光単位（Relative Light Unit：RLU）として表された。次いで、サイレンシング効率を非トランスフェクト細胞から算出した。

40

【0076】

50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）中で特異的siRNA GL3LucをL-PEI_{10K}Tyr_{33%}と複合体形成させた。細胞に5~100 nMのsiRNAをトランスフェクトした。5~100 nMのsiRNAによりトランスフェクションを行った場合、トランスフェクション48時間後に決定されたルシフェラーゼ活性は98%まで阻害された。結果を図4に示す。コントロールポリマーとして、未修飾のL-PEI_{10K}は同じ条件でルシフェラーゼ活性を100 nMで10%阻害することがわかった。しかし、このL-PEI_{10K}濃度によりトランスフェクションを行った場合、5~50 nMのより低いsiRNA濃度を用いたところルシフェラーゼ活性は阻害されなかった。

【0077】

50

(siRNA / L-PEI_{10K}Tyr複合体を用いた特異的遺伝子サイレンシング)

L-PEI_{10K}Tyr_{33%}による同じトランスフェクション条件において、GL2Luc遺伝子 (Elbashirら (2 0 0 1) によって検証済みのsiRNA) を標的にする非特異的siRNAを用いてルシフェラーゼサイレンシングの選択性を試験した。1 0 % F B S を含む 0 . 5 5 m l の完全培地 (2 4 ウェル組織培養プレートフォーマット中) において、ルシフェラーゼ遺伝子を安定して発現するA549-GL3Luc細胞に、5 0 μ l の 5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0) 中で 2 μ l の L-PEI_{10K}-Tyr_{33%} (7 . 5 m M 窒素) と複合体形成したGL3Luc siRNA (1 ~ 2 0 n M) をトランスフェクトした。ルシフェラーゼ遺伝子発現を 4 8 時間のインキュベーション期間後に測定した。実験は三重測定で行い、ルシフェラーゼ活性は細胞溶解液中のタンパク質含量 (タンパク質重量 (m g)) によって規格化された相対光単位 (R L U) として表された。次いで、サイレンシング効率を非トランスフェクト細胞から算出した。結果を図 5 に示す。

10

【 0 0 7 8 】

この関連しない配列GL2Luc siRNAを同じ条件で細胞にトランスフェクトした場合にルシフェラーゼ活性への作用がないことにより、配列特異的なRNA干渉が裏付けられた。

【 0 0 7 9 】

(L-PEI_{10K}Tyr_{33%}と複合体形成されたsiRNAの効果的な内在性遺伝子サイレンシングのトランスフェクション)

5 0 μ l の 5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0) 中で、2 μ l の L-PEI_{10K}-Tyr_{33%} (7 . 5 m M 窒素) と複合体形成したGAPDH siRNA (1 ~ 2 5 n M) をヒーラ細胞にトランスフェクトした。4 8 時間のインキュベーション期間後に分枝DNAアッセイによりGAPDH mRNAレベルが測定され、1 ~ 2 5 n M の siRNA濃度を用いたところ、GAPDH mRNAレベルは 9 0 % 超阻害された。結果を図 6 に示す。非特異的コントロールとして、無関係の配列 (ラミン A / C) と一致するsiRNAを同じ条件でトランスフェクトした。非特異的コントロールはGAPDH mRNAレベルへの阻害作用を示さなかった。

20

【 0 0 8 0 】

(疎水性 アミノ酸または誘導体によって修飾されたカチオン性ポリマーは効果的な遺伝子サイレンシングを媒介する)

チロシン残基により修飾されたポリマーによる培養細胞へのsiRNA送達後の遺伝子サイレンシングの改善について、分子量 1 7 k D a を有するポリアリルアミン (polyallylamine : P A A) を用いて例証する。P A A に 4 0 % の窒素修飾程度でチロシン残基をグラフトした。5 0 μ l の 5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 6 . 0) 中、siRNAGL3Lucおよび 1 μ l の PAA_{17K}-Tyr_{40%}でトランスフェクション複合体を調製した。1 0 % F B S を含む 0 . 5 5 m l の完全培地において、5 0 μ l の 5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0) 中で 2 μ l の L-PEI_{10K}Tyr_{33%} (7 . 5 m M 窒素) と複合体形成したGAPDH siRNA (1 ~ 2 5 n M) を A 549-GL3Luc細胞にトランスフェクトした。4 8 時間のインキュベーション期間後に分枝DNAアッセイによりGAPDH mRNAレベルを測定した。非特異的コントロールとして、無関係の配列 (ラミン A / C) と一致するsiRNAを同じ条件でトランスフェクトした。実験は三重測定で行い、GAPDHサイレンシング効率は非トランスフェクト細胞の内在性GAPDHレベルから算出された。結果を図 7 に示す。PAA_{17K}-Tyr_{40%}により 9 0 % のサイレンシングが得られたが、未修飾のPAAはサイレンシングが低く、サイレンシングは約 1 0 % と有意ではなかった。また、siRNAGL2Lucは全体的にルシフェラーゼ遺伝子をサイレンシングすることができなかったことから、PAA_{17K}-Tyr_{40%}により得られたサイレンシングは選択的であることが裏付けられた。

30

40

【 0 0 8 1 】

線状または分枝のポリエチレンイミン、ポリアリルアミンまたポリ - L - リジンなどの多数のポリマーは、種々の疎水性 アミノ酸または誘導体 (例えば、チロシン、トリプトファン、またはフェニルアラニン誘導体である 3 , 4 - ジヒドロキシ - L - フェニルアラニン (dihydroxy-L-phenylalanine : D O P A)) で化学的に修飾された。GL3ルシフェラーゼを安定して発現するA549細胞のトランスフェクション後に、5 または 2 0 n M の siRN

50

Aを用いて、これらのポリマー接合体のサイレンシング効率を試験した。結果を以下の表1に示す。

【0082】

【表1C】

表1：種々の分子量および修飾程度で芳香族 α -アミノ酸残基により修飾されたポリアミン（L-PEI：線状ポリエチレンイミン、PAA：ポリアリルアミン、PLK：ポリ-L-リジン）の接合体サンプルのサイレンシング効率

ポリマー	分子量kDa (ポリアミン)	グラフト率 (%)	分子量kDa (接合体)	20nMのsiRNA におけるサイレンシング (%)	5nMのsiRNA におけるサイレンシング (%)
L-PEI-Tyr	10	25	31	84+/-18	86+/-1
B-PEI-Tyr	25	25	75,6	96+/-1	92+/-1
PAA-Tyr	17	40	47,4	91+/-5	nd
PLK-Tyr	22	50	35	87+/-11	86+/-8
L-PEI-Trp	10	33	32,5	40+/-9	nd
PAA-Trp	17	37	49,8	87+/-10	nd
L-PEI-DOPA	10	23	27,9	nd	80+/-24

nd : not determined (未決定)

【0083】

各接合体の分子量は、ポリアミンの平均分子量および芳香族 α -アミノ酸残基による修飾の割合（百分率）から算出された。ルシフェラーゼ遺伝子を安定して発現するA549-GL3Luc細胞を用いて、サイレンシング効率を決定した。10% FBSを含む0.55mlの完全培地（24ウェル組織培養プレートフォーマット中）において、50 μ lの50mMリン酸緩衝液（pH6.0）中で2 μ lの接合体と複合体形成したGL3Luc siRNA（5～20nM）を細胞にトランスフェクトした。ルシフェラーゼ遺伝子発現を48時間のインキュベーションの期間後に測定した。実験は三重測定で行い、ルシフェラーゼ活性は細胞溶解液中のタンパク質含量（タンパク質重量（mg））によって規格化された相対光単位（RLU）として表された。次いで、サイレンシング効率を非トランスフェクト細胞から算出した。

【0084】

試験されたポリマー接合体はいずれも、低濃度のsiRNAを用いたところ、ルシフェラーゼ遺伝子の高いサイレンシング（80%以上）を示した。

【0085】

高い遺伝子サイレンシング効率を得るためには、修飾程度を大きくすることが必要である。この要件は、同じポリマーの骨格を用いるが分子量が異なる場合にも確認された。結果を以下の表2に示す。

【0086】

10

20

30

40

【表 2】

表 2：チロシン残基によって 25% 修飾された種々の分子量の線状ポリエチレンイミンの接合体サンプルのサイレンシング効率

分子量kDa (ポリアミン)	分子量kDa (接合体)	5nMのsiRNAにおけるサイレンシング (%)
2	6,04	67
10	30,2	96
22	66,5	95

10

【0087】

各接合体の分子量は、ポリアミンの平均分子量およびチロシン残基による修飾の割合（百分率）から算出される。ルシフェラーゼ遺伝子を安定して発現する A549-GL3Luc 細胞を用いてサイレンシング効率を決定した。10% FBS を含む 0.55 ml の完全培地（24 ウェル組織培養プレートフォーマット中）において、50 μ l の 50 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）中で 2 μ l の接合体と複合体形成した GL3Luc siRNA（5 nM）を細胞にトランスフェクトした。ルシフェラーゼ遺伝子発現を 48 時間のインキュベーションの期間後に測定した。実験は三重測定で行い、ルシフェラーゼ活性は細胞溶解液中のタンパク質含量（タンパク質重量（mg））によって規格化された相対光単位（RLU）として表された。次いで、サイレンシング効率を非トランスフェクト細胞から算出した。

20

【0088】

前記結果によって示されるように、2、10 または 22 kDa の線状ポリエチレンイミンは、チロシン残基により同じ程度（25%）修飾された。全てのこれらのポリマー接合体は、低濃度の siRNA（5 nM）を A549-GL3Luc 細胞にトランスフェクトした後にルシフェラーゼ遺伝子をサイレンシングすることができた。

【0089】

更に詳細に解析すると、ポリアミンにグラフトされた高含量の疎水性 アミノ酸はポリマー接合体の質量（分子量）を大幅に増大させる（表 1 および 2）。特に、疎水性 アミノ酸または誘導体が結合した後でポリアミンの最初の質量が 2 ~ 3 倍増大すると、修飾されたポリマーは RNA 干渉に有効であることが明らかとなった。これらの修飾されたポリマーは、カチオン性というよりはむしろ疎水性である。この分析によって、疎水性相互作用は siRNA 存在下でポリアミンの挙動全体を支配し、高い遺伝子サイレンシング効率を促進することが裏付けられる。

30

【0090】

（プラスミドと、L-PEI_{10K}-Tyr と複合体形成した siRNA との共トランスフェクション後の効果的な遺伝子サイレンシング）

ヒーラ細胞（50000 細胞 / ウェル）に、10% FBS を含んだ 0.55 ml の完全培地（24 ウェル組織培養プレートフォーマット中）において、pCMVLuc プラスミド（100 ng、GL2Luc 配列）と、50 μ l の 50 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）中で 2 μ l の PEI_{10K}-Tyr_{19%} と複合体形成した、特異的 GL2Luc siRNA または ミスマッチ GL3Luc siRNA（0 ~ 50 nM）のいずれかとを共トランスフェクトした。ルシフェラーゼ遺伝子発現を 24 時間のインキュベーションの期間後に測定した。結果を図 8 に示す。実験は三重測定で行い、ルシフェラーゼ活性（A）は細胞溶解液中のタンパク質含量（タンパク質重量（mg））によって規格化された相対光単位（RLU）として表された。次いで、サイレンシング効率（B）は GL2Luc siRNA トランスフェクト細胞および GL3Luc siRNA トランスフェクト細胞からのルシフェラーゼ活性の割合から算出された。

40

【0091】

50

10 ~ 50 nM の siRNA 濃度を用いたところ、特異的 GL2Luc siRNA は GL2 ルシフェラーゼ発現を 90 % 以上阻害した (図 8)。非特異的コントロールとして、無関係の配列 (GL3Luc 配列) に一致する siRNA に同じ条件で共トランスフェクトした。非特異的コントロールは ルシフェラーゼ活性への阻害作用を示さなかった。この実験から、L-PEI_{10K}-Tyr 接合体は導入遺伝子をコードするプラスミドと特異的且つ活性 siRNA とを同時に共送達することが可能であることが裏付けられる。

【 0 0 9 2 】

(参照)

Brummelkamp, T. R., R. Bernards, and R. Agami . 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 296:550-3.

10

Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411:494-8.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and CC. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-11.

Miyagishi, M., and K. Taira. 2002. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* . 20:497-500.

Silva, J. M., M. Z. Li, K. Chang, W. Ge, M. C. Golding, R.J. Rickles, D. Siolas, G. Hu, P.J. Paddison, M. R. Schlabach, N. Sheth, J. Bradshaw, J. Burchard, A. Kulkarni, G. Cavet, R. Sachidanandam, W. R. McCombie, M. A. Cleary, S.J. Elledge, and G.J. Hannon. 2005. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet*. 37:1281-8.

20

Sui, G., C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, W. C. Forrester, and Y. Shi. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:5515-20.

Verma, S., and F. Eckstein. 1998. Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users. *Annu Rev Biochem*. 67:99-134.

Yu, J. Y., S. L. DeRuiter, and D. L. Turner. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:6047-52.

30

【圖 2】

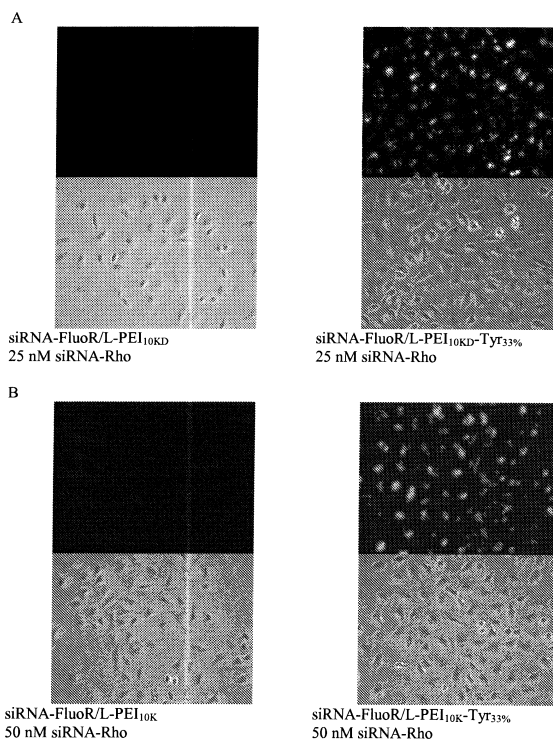


Figure 2

【圖 5】

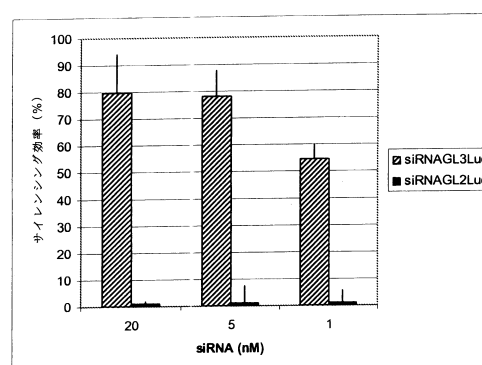


Figure 5

【 図 6 】

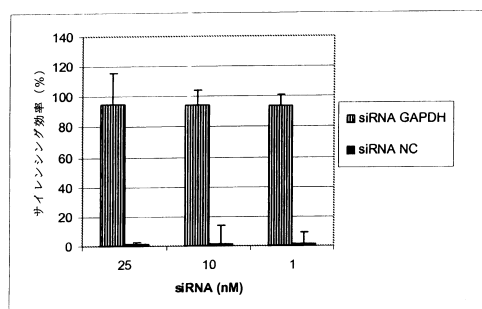


Figure 6

【図 7】

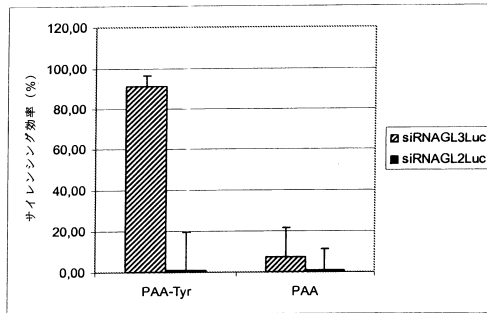


Figure 7

【図 8】

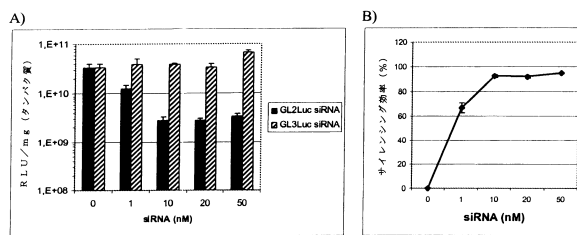


Figure 8

【配列表】

[0005802389000001.xml](#)

フロントページの続き

- (72)発明者 エルバッハー パトリック
フランス国 ベンフェルト リュ ポン - ヌフ 6
- (72)発明者 ストック ファブリス
フランス国 リンゴルスハイム リュ デュ マレシャル フォッシュ 119
- (72)発明者 ハフディ ナディア
フランス国 イルキルシュ アヴニユ アンドレ マルロー 65

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 国際公開第2008/007073(WO, A1)
Nucl. Acids Res. , 2005年, Vol.33 No.9, e86
Bioconjugate Chem. , 2005年, Vol.16, P.208-214
Nucl. Acids Symp. Ser. , 2008年 9月, No.52, P.91-92
Nucl. Acids Res. , 2001年, Vol.29 No.18, P.3882-3891
Bioconjugate Chem. , 2003年, Vol.14, P.840-847

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C12N 1/00
PubMed
DWPI(Thomson Innovation)