

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年8月17日(2006.8.17)

【公表番号】特表2002-525066(P2002-525066A)

【公表日】平成14年8月13日(2002.8.13)

【出願番号】特願2000-570351(P2000-570351)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/00 A

A 6 1 K 48/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成18年6月26日(2006.6.26)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

合成輸送実体を用いることで、細胞内または該細胞上の特定の位置に、目的の核酸を生体膜を越えて輸送、および/または該目的の核酸を誘導する方法であって、

(a) 目的の核酸と結合因子(BE)標的配列とを含み、該結合因子(BE)標的配列がペプチド核酸(PNA)標的である担体分子を提供するステップと、

(b) ペプチド核酸(PNA)またはその誘導體もしくは類似体である結合因子(BE)に対して、少なくとも1つの機能因子(FE)を結合することによって、複合体を提供するステップと、

(c) 前記複合体の前記BEを前記担体の前記BE標的にハイブリダイズさせるステップと、

(d) 前記輸送実体を前記生体膜に接触させて、前記膜を越える前記目的の核酸の輸送に提供するステップと、

を含む方法。

【請求項2】

前記ステップ(b)で、前記BEおよび前記FEがリンカー因子によって分離される複合体が提供される請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記ステップ(b)で、提供された前記担体が、前記目的の核酸と少なくとも1つのBE

標的配列とを含むプラスミドまたはオリゴヌクレオチドである請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記ステップ (a) で、検出可能なマーカー因子もまた前記担体に挿入される請求項 1 から 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

前記目的の核酸が、ペプチド、タンパク質、または RNA をコードする遺伝子である請求項 1 から 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

前記生体膜が細胞壁である請求項 1 から 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

前記ステップ (b) で、アンテナペディア・ペプチドを含む FE が前記複合体に与えられ、前記細胞壁を越える前記目的の核酸の前記輸送を可能にする請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

生体膜が核膜である請求項 1 から 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

前記ステップ (b) で、核局在化シグナルを含む FE が前記複合体に与えられ、前記目的の核酸の前記輸送が核膜を越えることを可能にする請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記ステップ (b) で、HIV タンパク質 (例えば、TAT) 等のタンパク質を含む FE が前記複合体に与えられ、前記目的の核酸の膜輸送および核輸送を可能にする、請求項 1 から 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

細胞内または該細胞上の特定の位置に、目的の核酸を生体膜を越えて輸送、および/または該目的の核酸を誘導することが可能な輸送実体を作るための成分を含むキットであって、

ペプチド核酸 (PNA) またはその誘導体もしくは類似体の形状にある結合因子 (BE) と、機能因子 (FE) と、前記目的の核酸を含む所望のプラスミドへのクローニングに適当な前記 FE に対する標的を含むオリゴヌクレオチドと、そのような輸送および/または誘導に適した任意の試薬とを含むキット。

【請求項 12】

前記機能因子 (FE) がアンテナペディア・ペプチドである請求項 11 記載のキット。

【請求項 13】

前記機能因子 (FE) が SV40 ラージ T 抗原タンパク質等の核局在化シグナル (NLS)、または核局在化シグナル特性を示すそのフラグメントである請求項 11 記載のキット。

【請求項 14】

前記機能因子 (FE) が膜輸送および核輸送を可能にするタンパク質である請求項 11 記載のキット。

【請求項 15】

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法での使用に適した合成輸送実体であって、

ペプチド核酸 (PNA) またはその誘導体もしくは類似体の形状にある結合因子 (BE) と複合体を形成する少なくとも 1 つの機能因子 (FE) と、ベクター内に少なくとも 1 つの BE 標的配列および目的の核酸を含む核酸担体とから構成され、前記複合体が BE - BE 標的相互作用を用いて前記担体にハイブリダイズする合成輸送担体。

【請求項 16】

前記ベクターがプラスミドまたはオリゴヌクレオチドである請求項 15 記載の輸送実体。

【請求項 17】

前記担体が検出可能なマーカー因子を含む請求項 15 または 16 記載の輸送実体。

【請求項 18】

前記目的の核酸がペプチド、タンパク質、またはRNAをコードする遺伝子である請求項15から17のいずれか一項記載の輸送実体。

【請求項19】

前記BEおよびFEがリンカー因子によって分離される請求項15から18のいずれか一項記載の輸送実体。

【請求項20】

2つ以上のFE-BE複合体を含み、該FE-BE複合体の各々が、同一の担体上にある別のBE標的に結合する請求項15から19のいずれか一項記載の輸送実体。

【請求項21】

各々のFE-BE複合体が2つ以上のFEを含み、該2つ以上のFEが好ましくはリンカーによって離間している請求項20記載の輸送実体。

【請求項22】

前記FEがアンテナペディア・ペプチドである請求項15から21のいずれか一項記載の輸送実体。

【請求項23】

前記FEが、SV40ラージT抗原タンパク質等の核局在化シグナル(NLS)、または核局在化シグナル特性を表すそのフラグメントである請求項15から21のいずれか一項記載の輸送実体。

【請求項24】

前記FEが、膜輸送および核輸送を可能にする特性を表すHIVタンパク質(例えば、TAT)等のタンパク質である請求項15から21のいずれか一項記載の輸送実体。

【請求項25】

請求項1から10のいずれか一項に定義される方法または請求項15から24のいずれか一項に定義される輸送実体の使用によって提供される1つ以上の遺伝的修飾を含む組換え細胞。

【請求項26】

遺伝子治療での請求項15から24のいずれか一項記載の輸送実体または請求項25にもとづく細胞の使用。

【請求項27】

DNAワクチン接種での請求項15から24のいずれか一項記載の輸送実体または請求項25にもとづく細胞の使用。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】核酸の細胞特異的局在化のための輸送方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規の合成輸送実体を用いて、細胞内または細胞上の特定の位置へ、核酸、その誘導体または類似体を、生体膜を介した輸送、および/あるいはその誘導をおこなう方法に関する。

【背景技術】

【0002】

外来遺伝物質を宿主細胞に輸送してその機能を与える遺伝学的修飾の方法は、一般に細胞に輸送された遺伝物質の取り込み率によって限定される。真核細胞では、核取り込みがしばしば制限されている。しかし、この場合、直接注射法が使用されるにもかかわらず、該方法は遅くて、労働集約的である。したがって、より大規模に使用するためには、核酸を細胞内に輸送するための標準的な方法はむしろ、核酸の異なる化学成分間で形成された

複合体の取り込みに、基づいている。次に、遺伝物質は、受動的に細胞の核に入るまで放置される。

核局在化シグナル (NLS) がこのような状況下で提案されている。一例として、セベスチエン (Sebestyen) 他 (ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat. Biotechnol.) 第 16 巻 (1) 80 ~ 85 頁 (1998 年)) は、ジギトニン透過性細胞を用いて NLS ペプチドをプラスミドに対して化学的に結合させた後に、核転移が可能になることを示唆した。

さらに、非特許文献 2 は、970 kDa を上回る大きさのタンパク質を核に転移させることを報告した。より具体的には、核局在化シグナル (NLS) を含む融合タンパク質を細胞の核に輸送する。

ニールセン (Nielsen) 他を名義とする特許文献 1 は、ペプチド核酸 (PNA) として知られる一類の化合物を開示している。ここに記載された PNA は、適当なリンカーを介してペプチド骨格に結合した DNA 塩基等のリガンドを含むものと考えられる。特許文献 1 にもとづく PNA を利用して、例えば細胞内の特定の遺伝子およびウイルスを標的にすることが可能であり、一方で PNA の性質は電荷の欠如および水溶性によって特徴づけられる。

さらに、同じくニールセン (Nielsen) 他を名義とする特許文献 2 は、コンジュゲート、例えば多数ある核 (それらのすべてが PNA に対して所望の特性を与えることを目的としている) のうちのいずれか一つに化学的に結合した PNA から構成される PNA コンジュゲートを提案している。したがって、PNA は、例えば診断薬または治療薬として有用である。上記 PNA は、上記した特許文献 1 と同様に、細胞内でその有利な機能を発揮することことを意図している。

【0003】

【特許文献 1】米国特許第 5,539,082 号公報

【特許文献 2】WO96/11205 公報

【非特許文献 1】セベスチエン (Sebestyen) 他 (ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat. Biotechnol.) 第 16 巻 (1) 80 ~ 85 頁 (1998 年))

【非特許文献 2】ヨネダ (Yoneda) 他 (エクスピリメンタル・セル・リサーチ (Exp. Cell Res.) 第 201 巻 213 頁 (1992 年))

【発明の開示】

【0004】

本発明の目的は、遺伝学的修飾に関する一般的かつ効率的な方法を提供することであり、新規の合成輸送実体 (synthetic transport entity) によって、目的の核酸、またはその誘導体もしくは類似体を、生体膜を介して輸送すること、および/またはそれを細胞内もしくは細胞上に導くことである。本輸送実体は、本発明によれば、なんらかの種類の生物学的特性を示すと思われる機能的実体 (FE) と、ペプチド核酸 (PNA) 等の結合要素 (BE) とを、必要に応じて上記 FE および上記 BE を分離させておくためのリンカー分子とともに、結合させること、ならびにそれを目的の核酸の担体上に存在する BE 標的にそれをハイブリダイズさせることによって、提供される。本発明はまた、新規の輸送実体に関するものであることから、それに加えて該輸送エンティティの種々の有利な用途にも関する。

(図面の簡単な説明)

【0005】

図 1 は、本発明にもとづくセンス PNA - NLS 二重機能ペプチドに対するアンチセンス Cy-5 オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションでの標的部位を示す模式図である。

図 2 は、蛍光標識オリゴヌクレオチドの核転移を説明する図である。

図 3 は、核、細胞質、およびゴルジ様の Cy-5 / Cy-3 蛍光比である。

図 4 は、本発明にもとづく PNA - NLS 二重機能ペプチドによるアンチセンスおよびセンス・オリゴヌクレオチドのシフト・アッセイを示す図である。

図5は、本発明にもとづく輸送実体の効果を説明する図である。すなわち、EGFPプラスミドを含むPNA標的にハイブリダイズした場合のPNA-NLSの効果と、トランスフェクション混合物から過剰なPNA-NLS分子を除去する効果とを示す。

図6は、過剰なPNA-NLSの精製後、PNA-NLSの添加または無添加でのlacZおよびEGFPトランスフェクションを示す。

(定義)

【0006】

本明細書では、以下の用語および略語を以下の通りに使用する。

本明細書で用いられるように、用語「目的の核酸(nucleic acid of interest)」は、細胞の遺伝学的修飾を実施する上で有用な、任意のDNA、RNA、または他のヌクレオチド、ならびにその任意の類似体または誘導体に関する。すなわち、そのような「目的の核酸」を生体膜を介して細胞内または細胞核内に輸送すること、および/または上記「目的の核酸」をそのような新たな環境内の特定の位置に誘導することが、求められる場合がある。例えば、「目的の核酸」は、結合部位等の調節機能を付与する酵素等のタンパク質またはペプチドをコードする遺伝子であってもよい。

【0007】

「機能因子(functional element)」(FE)は、任意の部分であって、この部分に結合した分子に対して一種類以上の特異的な生物学的機能または特性を与えることができる部分である。例えば、輸送能を与えることが可能である。本機能因子については、以下の本発明の詳細な説明でさらに例示する。

「結合因子(binding element)」(BE)は、特異的標的に対して、好ましくはハイブリダイゼーションによって、特異的に、強く、しかも耐久性を持って結合することができる任意の天然または合成核酸、核酸誘導体、または核酸類似体である。そのようなBEの一例は、以下に説明するPNAである。

したがって、「PNA」は、ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid)のことをいい、より詳しくは、アミノエチル・グリシン単位からなる疑似ペプチド骨格を持つDNA模倣体のことをいい、これに対して核酸塩基がメチレンカルボニルリンカーを介して結合する(例えば、ニールセン(Nielsen)、P.E.: ペプチド核酸(PNA): 「遺伝子治療薬の先例(A lead for gene therapeutic drugs)」、薬物発見および設計の展望(Perspectives in Drug Discovery and Design)、第4巻76~84頁、およびデューホルム(Dueholm)他、ニュー・ジャーナル・オブ・ケミストリー(New J. Chem.)、第21巻19~31頁(1997年): 「PNAの化学、特性、および適用(Chemistry, Properties and applications of PNA)」を参照せよ)。PNA分子は、相補的ssDNA、dsDNA、RNA、およびPNA標的に対してハイブリダイズする能力を持つ。本特許出願では、用語「PNA」とは上記の骨格および核酸塩基から構成される任意のDNA類似体のことをいい、したがってこの用語は本明細書に示した参照文献に開示された特定の構造に限定されるものではない。

【0008】

「NLS」とは、ある種の輸送タンパク質上にある残基を認識して特異的に結合する任意のタンパク質/ペプチドであると考えられる核局在化シグナルのことをいう。より具体的には、NLSドメインはポリペプチドによって包含されたアミノ酸配列であり、細胞質から核へのポリペプチドの移動が促進される。NLSドメインを含む特異的核ポリペプチドは、核へのポリペプチドRNA複合体の輸送を可能にすることが示された(マッタージ(Mattaj)およびデロベルチス(DeRobertis)、1985年)。

用語「ベクター(vector)」は、本明細書では、遺伝学的修飾過程での核酸の保持および/または移動が可能であるプラスミド、オリゴヌクレオチド、または任意の他の分子もしくはコンストラクトを示すために用いられる。したがって、用語「ベクター」は、上に

例示したものの任意の類似体または誘導体にも関わる。

用語「細胞壁 (cell wall)」は、本明細書では生物を囲む働きをする任意の膜、例えば真核細胞膜、植物細胞もしくは細菌等を囲む膜に関する。

「トランスフェクション (transfection)」は、細胞が培地から遺伝物質を何らかのかたちで取り込むことについての一般的用語として用いられる。

本文脈中で、「形質転換配列 (transforming sequence)」は、宿主細胞内での遺伝学的修飾現象に關与する任意の配列に關し、例えばタンパク質コード配列、調節因子、全遺伝子等であってもよい。

【0009】

細胞について言及する場合、用語「組換え体 (recombinant)」とは、本明細書中では細胞内で生じた遺伝学的修飾を単に示すにすぎない。より具体的には、その改変が外来核酸の導入によって、または天然の核酸による変化によって得られること、あるいはその細胞がそのように改変された細胞に由来することを示す際に用いられる。

「細胞 (cell)」または「宿主細胞 (host cell)」は、異種または外来の任意の遺伝物質が導入された任意の細胞を示すために、本明細書中で用いられる。最も広義の意味では、遺伝子操作された細胞を示すために「宿主細胞」が用いられる。

用語「ポリマー (polymer)」、例えば「タンパク質 (protein)」、「ポリペプチド (polypeptide)」、および「ペプチド (peptide)」は、本明細書中では同義的に用いられ、アミノ酸残基からなる任意の短い、または長いポリマーに関する。天然のアミノ酸ポリマーに加えて、この用語は一つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然のアミノ酸の人工的な化学類似体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。さらに、本文脈中で、用語「ポリマー (polymer)」は、任意の糖タンパク質、脂質、リポタンパク質等を包含するとも理解される。

「標識 (label)」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫学的、または化学的手段によって検出可能な組成物である。

用語「ハイブリダイズ (hybridise)」とは、本明細書中では、核酸またはペプチド核酸あるいはその任意の誘導体または類似体の相補的塩基の塩基対合による任意の結合、二本鎖化、またはハイブリダイゼーションのことをいう。

用語「特異的ハイブリダイゼーション (specific hybridisation)」とは、特定のヌクレオチド配列が細胞環境等の中にある複合混合物、またはDNAおよび/もしくはRNAに存在する場合に、その特定のヌクレオチド配列に対してのみに行われる分子の結合、二本鎖化、またはハイブリダイゼーションのことをいう。

本明細書で用いられるように、「相同 (homologous)」配列は、標的化配列と細胞DNAとが特異的な塩基対合を行い得るように細胞DNAと同一または十分に類似している配列である。

本明細書で用いられるように、「標的化配列 (targeting sequence)」は、標的細胞に含まれるゲノムまたは染色体外DNAもしくはRNA配列にある所望の部位に、目的の核酸を誘導する配列である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

第1の態様では、本発明は、合成輸送実体 (synthetic transport entity) を使用することで、細胞内もしくは細胞上の特定の位置に、生体膜を介して目的の核酸を輸送し、および/またはそのような核酸を誘導する方法に關し、該方法は、

(a) 目的の核酸と結合因子 (BE) 標識配列とを含む担体分子を、必要に応じて一つの分子として、提供するステップと、

(b) 少なくとも一つの機能因子 (FE) をBEに結合することで、複合体を提供するステップと、

(c) 上記複合体のBEを上記担体のBE標的にハイブリダイズさせるステップと、

(d) 上記膜を介して目的の核酸を輸送するために、上記輸送実体を上記生体膜に接触

させるステップとを、含む。

【0011】

本発明の好ましい実施形態では、結合因子(FE)はPNA標的配列に対する特異的かつ持続性のあるハイブリダイゼーションをおこなうことができる、ペプチド核酸(PNA)またはその誘導體もしくは類似体である。生体膜は、例えば、細胞壁または核膜であってもよい。ステップ(b)で生成された複合体もまた、スパーサー因子(例えば、リンカー(L)分子)を含むものであってもよく、該スパーサー因子はBFとFEとを分ける。以下により詳しく論じられる特定の実施形態では、複合体は複数のFEから構成され、この場合、分離のために複数のリンカーを用いることが可能である。ステップ(a)は、検出可能なマーカ―または標識を担体内に挿入することも含むものであってもよく、この担体によって、この方法によって実行される遺伝学的修飾の効率についてのその後の分析が容易になる。

したがって、本方法では、結合因子(BE)、好ましくはPNAまたはPNA様分子の有利な特性は、目的の核酸の効果が求められる細胞または核へ、その目的の核酸を実際に移すのに先立って、遺伝子輸送の最初のステップで主として用いられる。したがって、本明細書のはじめに述べられた先行技術特許とは逆に、本発明にもとづく方法の利点は、細胞または核に入るPNAもしくは結合因子の能力にもとづくものではなく、また依存したりするものではない。むしろ、PNAまたは任意の等価な結合因子を本発明にもとづいて使用することで、目的の核酸の担体に対して、PNA/PNA標的相互作用を介して、機能因子(FE)を強力かつ満足のいくかたちで結合させる。したがって、FEは、生体膜を介した輸送実体全体を実際に輸送するために、本発明にもとづいて使用される。

【0012】

本発明の好ましい実施形態で使用されるPNAは、合成DNA類似体であり、DNA-DNA、RNA-DNA、またはRNA-RNA結合よりも高い親和性で、DNAおよびRNAに対して強く結合する。その特異的配列は、ハイブリダイゼーションによって結合することが意図される核酸に対して特異的であるように、設計される。PNAは、非常にゆっくりと代謝され、また非毒性を示すもので、このことは医薬分野で使用した場合に明らかに大きな利点である。また、PNAは、相補的である核酸の配列に対して高特異的結合をおこなうことができ、そのことによって、PNAが遺伝的形質転換のために本方法でBEとして使用される場合、正しく形質転換された細胞を高頻度で提供する。したがって、本方法でのBEとしてのPNAの使用によって、形成された複合体に対して優れたRNAおよびDNAハイブリダイゼーション特性と生物学的安定性とが得られる。PNAは、固相ペプチド合成によって当業者により容易に作られる(例えば、国際特許出願公報WO95/01370およびWO92/2072ならびにニールセン(Nielsen)、P.E. : ペプチド核酸(PNA) : 「遺伝子治療薬の先例(A lead for gene therapeutic drugs)」、薬物発見および設計の展望(Perspectives in Drug Discovery and Design)、第4巻76~84頁を参照せよ)。

【0013】

好ましい実施形態では、上記リンカー配列は、実施的または完全には帯電していない。この場合、「非反応性(non-reactive)」という用語を用いて、リンカーが用いられる環境下で該リンカーがいっさいの不要または有害な化学反応を引き起こさないこと、例えばトランスフェクション過程でそれが接触する細胞および/または核の他のいずれの成分とも反応しないことが説明される。それはまた、本発明で使用されるあらゆる試薬に関して、同様にPNA等のBEならびに機能因子(FE)、担体等を鑑みて、本質的に非反応性でなければならない。本リンカーは、所望の結果を妨げることなくスパーサー因子として機能する任意の他の分子が使用される場合もあることが理解されるにもかかわらず、例えば適当な数のアミノ酸残基からなるポリマーから構成されるものであってもよい。リンカー配列の大きさおよび性質は、周囲の因子に依存するもので、なぜならその主な機能がそれらの因子間に十分な空間を設けることで所望の機能の効果を可能にするからである。さらに、それは、膜を介しての輸送後、目的の核酸の所望の効果または発現を妨げるもので

あつてはならない。

【0014】

特定の実施形態では、本リンカーを細胞性プロテアーゼまたはヌクレアーゼ等の酵素によって開裂可能であることから、生体膜を介した輸送および/または細胞表面受容体に対する粘着が可能となり、それに続いて標的内、例えば細胞質または核内で不要である部分または複数の部分を捨てることが可能となる。一つの具体的実施形態では、挿入された目的の核酸がより有効な効果を生ずるようにBEを切断する。本方法の別の典型的な実施形態では、リンカーは、例えば不要の生物学的分解（例えば、プロテアーゼによる）から、本輸送実体を実質的に隠蔽またはマスキングすることができる。さらに、あるいはその代わりとして、リンカーは、さらに別の有利な特性（例えば、それ自体の中に別の生物学的機能を与える特性）を持つものであってもよい。

【0015】

本機能因子（FE）は、任意の数の機能（例えば、細胞膜標的分子への結合等の構造的機能またはインテグラーゼ活性等の酵素的機能）を提供することで、転移されたDNAの部位特異的挿入を向上させる。本発明にもとづく使用に適した有利なFEの具体例として、細胞付着の機能（例えば、トランスフェリン受容体を介したもの）、細胞膜貫通（例えば、アンテナペディア・ペプチドを介したもの）、核輸送（以下により詳しく説明）、核酸濃縮ペプチド（好ましくは、強い正荷電）、エンドゾーム/リボゾーム（例えば、アデノウイルス・カプシド・タンパク質、およびDNA組み込み（例えば、インテグラーゼを介したもの）が挙げられる。一つの具体的実施形態では、本発明にもとづくFEは、TATと示されたHIVウイルスのタンパク質である。本発明の別の具体例では、FEはエンドゾーム妨害成分であり、転移された生物学的因子がリソソーム分解の細胞過程によって分解されるのを防ぐ。

【0016】

本発明の一実施形態では、貫通すべき生体膜は、真核細胞または原核細胞を囲む膜または壁である。追加または別の実施形態では、本方法は目的の核酸を真核細胞の核に挿入するために用いられる。最後に指摘した実施形態では、効率的な輸送を、BE（例えば、PNA）とFEまたはFEの一部としての適当な核局在化シグナル（NLS）との複合体を生成することによって、おこなうことが可能である。

本方法では、目的とする用途および所望の結果に応じて、適当な順番で、BEと複数の上記FEおよびリンカーとから構成される輸送実体を用いてもよい。したがって、一例として、BE-リンカー-FE-リンカー-FE等の順序で用いることも可能である。さらに、特定の実施形態で、担体は複数のBE標的配列を含むことから、該配列上に複数ある種々のBE-リンカー-FE複合体のハイブリダイゼーションが可能となる。この特定の実施形態では、BEおよび/またはFEが同一である必要はない。これに反して、異なるものを含むことが有利である場合もある。したがって、特定の実施形態では、複合体はPNA-リンカー-FE-リンカー-FE配列を含むものであってもよい。リンカーは、例えば因子の大きさおよび他の特性に応じて、適当な空間が生ずるように作られる。さらに、本担体は、BE、例えばPNAに対する複数の標的を含むものであってもよい。したがって、そのような担体は、本明細書に例示される複数の複合体に対してハイブリダイゼーションすることが可能である。

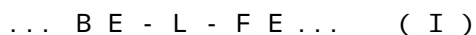
さらに、本発明は診断目的で使用される上記の方法に関する。したがって、目的の核酸が診断用マーカーまたは標識をコードするものであってもよく、またこの方法を生体内（in vivo）でおこなうことも可能であり、その場合、後で診断を必要としている患者に対して該診断がおこなえるようにする。

また、本発明は本明細書に開示された方法のいずれか一つを実行するのに適したキットに関する。そのようなキットは、結合因子（BE）、例えばPNAまたはその機能的フラグメントと、機能因子（FE）、例えば核局在化シグナル（NLS）またはアンテナペディア・ペプチドと、上記BEに対する標的部位を有する二重鎖オリゴヌクレオチド、例えばPNA標的配列とを、含むものであってもよい。別の実施形態では、本発明にもとづく

キットは、輸送 (transfer) および / または誘導 (direction) のための適当な試薬も含む。本発明にもとづくキットは、適当な容器に入れられており、必要に応じて、適切な方法で該キットの使用を容易にする指示書を具備する。

【0017】

第2の態様では、本発明は新規の輸送実体に関することから、該輸送実体は上記方法のいずれか一つで有用である。本BE-FE複合体を、一般式Iによって表すことが可能である。



この式中、BEは結合因子、Lはリンカー (しかし、任意の因子である)、およびFEは機能因子を示す。

次に、上記複合体は、担体上に存在するBE標的に対して配列特異的にハイブリダイゼーションすることが可能であり、それに加えて、あるいは本BEの一部として、複数の目的の核酸を含む。担体は、例えば、プラスミドまたはその機能的部分 (例えば遺伝子、オリゴヌクレオチド、もしくはキメラプラスミド) を含むものであってもよい (例えば、コール・ストラウス (Cole Strauss)、A. 他、サイエンス (Science) 第273巻、1996年9月: 「RNA-DNAオリゴヌクレオチドによる鎌状赤血球貧血に關与する突然変異の修復 (Correction of the Mutation Responsible for Sickle Cell Anemia by an RNA-DNA Oligonucleotide)」を参照せよ)。上記したようにBEは、好ましくはPNAであってもよい。本発明にもとづくリンカーの使用は、任意ではあるが、好ましいものであり、また本発明の第一の態様に関連しては詳しく上記されている。

したがって、この第2の態様の一実施形態は、目的の核酸を、膜 (例えば、細胞壁) を介して輸送すること、および / または上記核酸を細胞内もしくは細胞上の特定の位置に誘導することに適した合成輸送実体である。

さらに、本発明のこの第2の態様では、輸送実体が、意図した用途および所望の結果に応じて適当な順番で、上記した複数のFEおよびリンカーを含むことができると考えられる。したがって、特定の実施形態では、複合体はBE-リンカー-FE-リンカー-FE配列を含むものであってもよい。使用した担体は、好ましくは、目的とする複数の核酸と同様に複数のBE標的を含むプラスミドまたはオリゴヌクレオチドである。したがって、配列特異性が高いBE/BE標的ハイブリダイゼーションによって複合体が担体に結合し、FEは問題となっている膜を介した輸送を好ましくは提供する。必要に応じて、リンカー分子を含む。

さらに、この第2の態様の別の実施形態では、本発明は、目的とする複数の核酸を真核細胞の核膜を介して輸送することに特に適している輸送実体に関し、該輸送実体は、BE、好ましくはペプチド核酸 (PNA) から構成され、FE (この場合、核局在化シグナル (NLS) を含む) と複合体を形成している。したがって、本輸送実体は、真核細胞を形質転換すること、目的の核酸を細胞の核に誘導することを目的とした任意の方法での使用に、特に適している。しかし、いずれの場合も、特定のBE、FE、および核酸に応じて、本輸送実体を、任意の遺伝子または遺伝要素による任意の核の効果的かつ特異的形質転換を可能にするように、設計することができる。

【0018】

したがって、より具体的には、第2の態様の有利な実施形態は、本発明にもとづくPNA-NLS複合体であり、該複合体は一般式によって記載される。



この式中、BEは複数のPNA塩基からなる一つの配列、Lはリンカー配列、およびFEはNLS配列である。

次に、上記PNA-NLS複合体は、PNA標的および目的の核酸、例えばペプチド、タンパク質、もしくはRNAをコードする遺伝子を含むプラスミドとハイブリダイズする。上記RNAは、例えばリボザイム、すなわち酵素機能を持つRNAであってもよい。特定の実施形態では、NLS配列はSV40大型T抗原タンパク質またはそのフラグメントであり、それは所望の核局在化シグナル特性を示す。しかし、当業者が明確に理解するよ

うに、適当な N L S の選択は、将来の意図された用途に応じておこなわれる。したがって、宿主細胞の膜を介して、またその核の中に、本発明にもとづいて輸送実体を輸送する所望の機能を満たす限り、本 N L S は、任意の他の起源または組成物のものであると考えられる。

【 0 0 1 9 】

一つの具体的かつ例証となる実施形態では、本発明にもとづく P N A - N L S 複合体は、式 I I I によって記載される。

G C G C T C G G C C C T T T C L P r o L y s L y s L y s A
r g L y s V a l (I I I)

この式中、L は式 I V によって表される。

N H C H ₂ C H ₂ O C H ₂ C H ₂ O C H ₂ C O ₂ H (I V)

しかし、当業者が明確に理解することが容易であるように、添付した特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に有利な合成輸送実体をなおも得られるかたちで、これらの配列に変更を加えることが可能である。本発明を用いることで、核酸または細胞に輸送される任意の他の生体分子および/もしくは複合体に対して、機能を直接付加させることで、ウイルスおよび微生物の異なる機能を模倣することが可能である。同時に、本輸送実体の使用によって、天然のウイルス・ベクターの有害な特性が回避される。

したがって、本発明の例示として使用される複合体を含む P N A によって、優れた R N A および D N A ハイブリダイゼーション特性および生物学的安定性が得られ、また該 P N A は固相ペプチド合成によって容易に作られる(例えば、国際特許出願 W O 9 5 / 0 1 3 7 0 および W O 9 2 / 2 0 7 2 と、ニールセン(Nielsen)、P . E . : ペプチド核酸(P N A) : 「遺伝子治療薬の先例(A lead for gene therapeutic drugs)」、薬物発見および設計の展望(Perspectives in Drug Discovery and Design)、第 4 巻 7 6 ~ 8 4 頁を参照せよ)。

【 0 0 2 0 】

より具体的には、本発明にもとづく輸送実体の構築では、ベクターの B E 標的に対する複合体の B E のハイブリダイゼーションによって、本複合体および担体が互いに結合する。したがって、特定の実施形態では、P N A は P N A 標的配列にハイブリダイズする。そのような配列特異的ハイブリダイゼーションは、当業者によって容易に実行される(ハイブリダイゼーション技術については、例えば、一般に、「核酸ハイブリダイゼーション、実践的なアプローチ(Nucleic Acid Hybridisation, A practical Approach)」、ハムズ(Hames)、B . D . 、およびヒギンズ(Higgins)、B . D . 、I R L プレス(IRL Press)(1985)、ガル(Gall)およびパーデュ(Pardue) : 米国科学アカデミー紀要(Proc. Natl. Acad.

Sci. USA)、第 6 3 巻 3 7 8 ~ 3 8 3 頁(1969)、ならびにジョン(John)他、ネイチャー(Nature)第 2 2 3 巻 5 8 2 ~ 5 8 7 頁(1969)に記載されている)。オリゴヌクレオチドは、直接化学合成法等の当業者が周知の任意の適当な方法によって合成可能であり、該方法としてナラング(Narang)他、メソッド・オブ・エンザイモロジー(Meth. Enzymol.)第 6 8 巻 9 0 ~ 9 9 頁(1979)のホスホトリエステル法、ブラウン(Brown)他、メソッド・オブ・エンザイモロジー(Meth. Enzymol.)第 6 8 巻 1 0 9 ~ 1 5 1 頁(1979)のホスホジエステル法、ビューケージ(Beaucage)他、テトラヒドロソ・レターズ(Tetra. Lett.)第 2 2 巻 1 8 5 9 ~ 1 8 6 2 号(1981)のジメチルホスホルアミダイト法、および米国特許第 4 , 4 5 8 , 0 6 6 号の固相支持法が挙げられる。

担体の構築に使用される異なるベクターおよび核酸が当該技術分野で周知であり、当業者によって容易に選択される(使用可能な実験方法についての一般参照として、例えば、サンプルーク(Sambrook)他、モレキュラー・クローニング、ラボラトリー・マニュアル(Molecular

Cloning, A Laboratory Manual)、第 2 版、1 ~ 3 巻、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)、コールド・スプリング・ハーバー、N . Y . 、1 9 8 9 年を見よ)。

【0021】

本発明にもとづく輸送実体の具体的実施形態では、その輸送実体を含んだ細胞の検出および同定を可能にするために、担体もまたマーカーまたは標識（例えば、蛍光標識）を含む。プラスミド担体の場合、標識は、例えば緑色蛍光タンパク質（GFP）等の蛍光タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。オリゴヌクレオチド担体の場合、マーカーは、例えばCy-3等の蛍光マーカーである。それらの標識および検出は、この分野の当業者に周知であり、例えば米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,274,149号、および第4,366,241号に開示されている。

本発明の最後に述べた実施形態にもとづいて新規の輸送実体を用いることで、目的とする任意の核酸配列、例えば遺伝子を、核に入るNLS能によって宿主細胞に効率的に導入することが可能である。遺伝要素を効率的かつ特異的に移す効果的な複合的能力を持つ本発明にもとづくトランスフェクション実体は、多くの異なる用途で大きな価値を有し、そのいくつかを以下に、より詳しく説明する。

【0022】

本発明を例示するように、細胞を形質転換させる方法は、

(i) 少なくとも1つのPNA標的を含む担体をPNA-NLSコンジュゲートのPNAドメインにハイブリダイズすることによって、本発明にもとづく複合体を提供するステップと、

(ii) ステップ(a)で形成された複合体とトランスフェクション試薬の存在下でトランスフェクトされる細胞とを接触させるステップと、

(iii) 複合体が細胞の核に入るのを可能にするステップと、

(iv) 遺伝的形質転換を起こさせるステップとによって表され、上記PNA複合体が核転移開始因子として用いられる。したがって、必要不可欠な位置にあるベクター内に事前に含まれた任意の形質転換配列を、細胞の核に入るNLS能と目的の核酸配列を含むベクター上のPNA標的に特異的に結合するPNA能とにより効率的に輸送することが可能である。

【0023】

ステップ(i)に関しては、種々のハイブリダイゼーション・フォーマットがこの分野の当業者に知られており、例えばサンドイッチ・アッセイおよび競合または置換アッセイがある。ハイブリダイゼーション技術は、例えば、一般に「核酸ハイブリダイゼーション、実践的なアプローチ (Nucleic Acid Hybridisation, A practical Approach)」、編集。ハムズ (Hames)、B. D. およびヒギンズ (Higgins)、B. D.、IRLプレス (IRL Press) (1985)、ガール (Gall) およびパーデュ (Pardue) : 米国科学アカデミー紀要 (Proc. Natl. Acad.

Sci. USA)、第63巻378~383頁(1969)、ならびにジョン (John) 他、ネイチャー (Nature) 第223巻582~587頁(1969)に記載されている。

したがって、最初に、本発明の方法はNLSの輸送能を利用することで、NLSを該NLSに結合した任意の因子とともに宿主細胞の核に入れる。ひとたび核の中に置かれると、NLSタンパク質複合体が分解してFE(NLS)の結合相手であるタンパク質が核を出て分解し、その一方で輸送された担体が核の中に残る。したがって、次に、担体に存在する目的の核酸が利用されて標的細胞内での遺伝的形質転換をおこなう。その一方で、FE(NLS)の相手であるタンパク質が、別の実体を核の中に随伴することで、その機能を繰り返すことができることから、本発明にもとづいて得られるかなり高い形質転換頻度に貢献する。

したがって、上記したように、セベスチエン (Sebestyen) 他は、細胞での遺伝学的修飾法で、プラスミドに対する核局在化シグナルの化学的結合を用いておらず、ここではPNAは用いられていない。しかし、そのことは彼らの方法がプラスミドの機能までも損ねてしまうという重大な欠点があることがわかる。したがって、得られた形質転換頻度の実質的な差を説明可能であると考えられるセベスチエン (Sebestyen) 他と本発明との方法

での本質的な違いが存在する。

したがって、具体的な実施形態では、トランスフェクション試薬 (transfection reagent) はポリマー・トランスフェクション試薬、例えば P E I (ポリエチレン・イミン) である。P E I は、すでに遺伝子治療の実験構成に用いられており、それに該当する用量で非毒性でありながら高いトランスフェクション効率 (transfection efficiency) を与える能力を持つことが報告されている。P E I トランスフェクションの経路は、今日一般に使われている脂質ベースの標準的なトランスフェクション試薬とは異なる。ポリマーは、プロトン・アクセプターとして機能し、浸透ストレスによってエンドソームを崩壊させて核酸を放出させると考えられている。この状況では、本発明の他の実施形態で、他の特異的な機能因子 (例えば P E I および脂質等と同様のトランスフェクション試薬) を除外してもよい。このことは、輸送実体に含まれた機能因子が所望の膜を通過する輸送をおこなうことができるかどうか依存している。本発明の具体例では、本発明にもとづく方法は、さらに別のステップ (v) を有し、ここでは結果として得られた形質転換がすでに導入された標識またはマーカーによって確認される。そのような標識またはマーカーの性質および同一性もまた、この出願の別の場所で議論する。

【0024】

本発明にもとづく上記に開示した方法の有利な一実施形態では、ステップ (i v) に適宜した形質転換が、プラスミド・ベクターによって1種類以上のタンパク質を導入する。それによって、外来性または非天然のタンパク質またはポリペプチド等を発現する効率的な形質転換が得られる。本発明の別の実施形態では、ステップ (i v) にもとづく形質転換は、1種類以上の遺伝子調節配列を宿主細胞に導入するために用いることが可能であり、それによって他のサイレント遺伝子が発現される可能性がある。この後者の実施形態は、遺伝子活性化として知られている技術を用いるもので、該技術は米国特許第5,641,670号等に記載されている。本発明の2つの上記開示された実施形態のいずれか一方で、結果として生ずる形質転換細胞を、薬物として有用なタンパク質等の物質の生産に用いてもよい。

【0025】

本発明のさらなる実施形態では、ステップ (i v) に定義された形質転換は、宿主細胞での突然変異の修復を目的としており、例えば、塩基特異的 D N A 修復によって得ることが可能である。別の実施形態では、上記形質転換は、宿主細胞での突然変異を誘導することを目的とする。このことは、例えば発現産物の性質によって遺伝子の発現が必要ではない場合、あるいは種々の遺伝子疾患の研究に関する動物モデルの生産で必要とされない場合に、求められることがある。

本発明のさらなる利点は、例示されている P N A - N L S 複合体が幅広い適用性を有していることから、本発明を用いて、世界中の研究室で日常的に従来用いられる全プラスミドのうちの90%を上回るプラスミドの輸送をおこなうことが可能であるということである。

【0026】

したがって、本発明の別の態様は、上に開示された方法によって生産された組換え細胞である。本発明はまた、何らかのゲノム上の欠陥を研究するために特別に設計された動物モデル、例えばマウスに関する。培養細胞の一般的クローン技術および方法は、当業者に周知である (例えば、サムブルーク (Sambrook) 他、モレキュラー・クローニング、ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)、第2版、1~3巻、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、コールド・スプリング・ハーバー、N . Y .、1989年、およびフレッシュニー (Freshney)、動物の培養、基本技術マニュアル (Culture of Animal Cell, A Manual of Basic Technique)、第3版、ウイリー・リス (Wiley-Liss)、ニュー・ヨーク、N . Y (1994) を参照せよ)。

【0027】

本発明の特に有利な一態様は、上記のトランスフェクション方法およびPNA-NLS複合体を遺伝子治療で用いることである。そのような用途では、コンジュゲートをオリゴヌクレオチド・ベクター（例えば、DNA-RNA、PNA-DNA、または任意の他の組み合わせのキメラ・コンストラクト）にハイブリダイズさせることが可能である。遺伝子治療の手法は、いくつかの状況で、獲得性および遺伝子性の遺伝的欠陥を正すために使われている。ヒト、または動物（例えば哺乳類）で人口遺伝子を発現する能力は、しばしば他の治療法による処置が適さない多くの重要な疾患の予防および/または治療を容易にする。しかし、遺伝子治療のための現在利用可能なアプローチは、発現すべき遺伝物質が含まれる感染性のベクター（例えば、レトロウイルス・ベクター）を利用する。そのようなアプローチは限界を有しており、そのような限界として、例えば、ベクター生産過程で複製能を持つウイルス（replication-competent virus）を生成する可能性と、新規な細胞特異性を持つ感染性の因子を生成する可能性のある治療用ウイルスと内因性レトロウイルス因子との間の組換えと、宿主範囲、もしくは増加した病原性および細胞毒性と、腫瘍形成性の挿入現象が生ずる危険性が増加する多数の細胞への独自の組み込みと、レトロウイルスでの限定されたクローニング能力（治療的適用性を制限）と、目的とする産物の一時的な生体内（in vivo）発現とが挙げられる。したがって、本発明にもとづくPNA-NLSコンジュゲートまたは複合体が使用される本発明にもとづく用途は、従来のウイルス方法に関連して制限およびリスクを回避する。例えば、すでに、嚢胞性線維症との関連では、アデノウイルス・ベクターが遺伝子治療のベクターとして用いられていた。そのようなベクターは、不要な免疫応答を生ずる場合があり、したがって、そのことは本発明にもとづく新規のPNA-NLSコンジュゲートによって回避される。

【0028】

したがって、本発明はまた、それ自体として遺伝子治療法に関するもので、本発明にもとづくコンジュゲートまたは複合体が特定の用途で、少なくとも1種類のトランスフェクション試薬、例えば上記したポリエチレン・イミン（PEI）とともに用いられる。そのような方法は、しばしば、突然変異遺伝子または欠損遺伝子を修復することを目的とするけれども、例えば、不要なタンパク質の発現を防ぐために、または何らかの欠損の研究用に動物モデルを作るために突然変異を誘導するために用いることも可能である。遺伝治療によって処置可能な疾患の一例は、かなりの数の患者を苦しめている嚢胞性線維症（CF）である。CFは、実際に手が届きやすい肺が標的器官であることから、プラスミド媒介遺伝子移入の影響を受けやすいと考えられる。しかし、遺伝的欠陥が確認される疾患の数が着実に増加の一途をたどることから、将来、多数の別の遺伝子関連症状または疾患が本発明にもとづく遺伝子治療による処置にかなり適していることが確認されると予測される（例えば、遺伝子治療法の総説については、アンダーソン（Anderson）、サイエンス（Science）（1992）256：802～813と、ナベル（Nabel）およびフェルグナー（Felgner）（1993）、TIBTECH 11：211～217と、ミタニ（Mitani）およびカスケイ（Caskey）（1993）、TIBTECH 11：162～166と、ムリガン（Mulligan）（1993）、サイエンス（Science）926～932と、ジロン（Dillon）（1993）、TIBTECH 11：167～175と、ミラー（Miller）（1992）、ネイチャー（Nature）357：455～460と、バン・ブルンド（Van Brundt）（1988）、バイオテクノロジー（Biotechnology）6（10）：1149～1154と、ビニュ（Vigne）（1995）、修復神経学および神経科学（Restorative Neurology and Neuroscience）8：35～36と、クレメール（Kremer）およびペリコーデット（Perricaudet）（1995）、英国医学会会報（British Medical Bulletin）51（1）31～44と、微生物学および免疫学の今日の話（Current Topics in Microbiology and Immunology）内のハダダ（Haddada）他（1995）と、ユ（Yu）他、遺伝子治療（Gene Therapy）（1994）1：13～26とが挙げられる）。

【0029】

本発明の同様の態様は、本発明にもとづく輸送実体または複合体を用いて、遺伝子治療に使用される細胞を遺伝学的に修飾することである（細胞治療の基本を開示したものとし

て、例えば、ゲージ (Gage)、F・H、ネイチャー (Nature) 第 392 巻 1998 年 4 月 30 日を参照せよ)。したがって、本発明はまた、そのような細胞治療法と該細胞治療法に使用される細胞 (本発明にもとづく方法によって遺伝学的に修飾されている) に関する。

したがって、最後の態様では、本発明はまた、処置の方法を包含し、該方法では本輸送実体の有効量を、遺伝子治療による処置を必要としている被検体に投与する。上記処置は、予防的および/または治療的であってもよく、さらに任意の疾患または症状に向けられるものであってもよい。そのような症状として、限定されるものではないが、種々の遺伝的欠損が挙げられる。むしろ、さらに別の症状もまた考えられる可能性があり、遺伝的環境を、例えば所望の治療的機能をコードする遺伝子を含むプラスミドの挿入によって、変えることが望まれる。そのような処置方式に関する詳細は、処置すべき症状、患者の年齢および体重等の因子に依存した個々の症例に関わる医師によって決定される。そのような方法での使用に適した製剤もまた、本発明の範囲内である。

【0030】

(図面の詳細な説明)

図 1 は、本発明にもとづくセンス PNA - NLS 二重機能ペプチドにハイブリダイズするアンチセンス Cy - 5 オリゴヌクレオチドの標的部位を示す模式図である。PNA - NLS / オリゴヌクレオチド複合体は、カリオフィリン / タンパク質に結合する。その後、この複合体は核内に送られる。同様に、PNA 標的部位は、EGFP プラスミドにクローニングされ、PNA - NLS ハイブリダイゼーション後の核輸送が可能となる。略語：AS はアンチセンス、S はセンス、SV40 NLS はシミアン・ウイルス 40 核局在化シグナル、および PNA はペプチド核酸である。

図 2 (a) は、蛍光標識したオリゴヌクレオチドの核転移を示す図である。矢印は、Cy - 5 オリゴがエンリッチされている核を示す。図 2 (b) は、Cy - 5 AS - オリゴヌクレオチドの位置を表す Cy - 5 チャンネルを示す。図 2 (c) は、Cy - 3 - S - オリゴヌクレオチドの位置を示す Cy - 3 チャンネルを示す。

図 3 は、Cy - 5 / Cy - 3 蛍光の核、細胞質、およびゴルジ様比率を示す。(a) アンチセンス・オリゴ、核、(b) アンチセンス・オリゴ、ゴルジ様、(c) アンチセンス・オリゴ、細胞質、(d) センス・オリゴ、核、(e) センス・オリゴ、ゴルジ様、および (f) センス・オリゴ、細胞質。

図 4 は、本発明にもとづく PNA - NLS 二重機能ペプチドによるアンチセンスおよびセンス・オリゴヌクレオチドのシフト・アッセイである。(a) PNA に対する標的配列 (AS) を持つオリゴヌクレオチド、(b) (a) と同様ではあるけれども、長時間露出して 1 : 10 ハイブリダイゼーションのより弱いシフトが示されたオリゴヌクレオチド、(c) PNA に対する標的配列を持たないオリゴヌクレオチド。オリゴヌクレオチド濃度を、各々のレーンで 2.64 pmol とした。PNA - NLS を異なるモル比で 5' 標識オリゴヌクレオチドに加えた。すなわち、レーン 1 は 1 : 10、レーン 2 は 1 : 1、レーン 3 は 10 : 1、レーン 4 は 100 : 1、レーン 5 は 1000 : 1、およびレーン 6 は 0 : 1 である。

図 5 は、本発明にもとづく輸送実体の効果を示す図である。すなわち、EGFP プラスミドを含む PNA 標的に対してハイブリダイズした場合の PNA - NLS の効果とトランスフェクション混合物から過剰な PNA - NLS 分子を取り除く効果とを示す。(a) PNA - NLS 無しでトランスフェクトした EGFP を含む PNA 標的部位、(b) PNA - NLS に対してハイブリダイズした EGFP プラスミドを含む PNA 標的部位 (EGFP プラスミドと PNA - NLS との比が 1 : 100)、(c) PNA - NLS に対してハイブリダイズした EGFP プラスミド (EGFP プラスミドと PNA - NLS との比が 1 : 100) を含み、かつトランスフェクション前に過剰の PNA - NLS が除去された PNA 標的部位。

図 6 は、PNA - NLS の添加有りまたは添加無しの LacZ および EGFP トランスフェクションを示す図である。EGFP トランスフェクションもまた、未結合 PNA - N

L S (精製)の除去後に調べた。

【0031】

実験

以下、例を挙げながら本発明をさらに詳しく説明する。実施例は単に発明を例証しているだけであり、添付した特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を制限するものとして解釈されないことが理解される。この出願の以下または他の箇所に記した全ての参照文献を、本明細書中に援用する。

【0032】

材料および方法

細胞株および培地

【0033】

COS-7、3T3、およびHeLa細胞をトランスフェクションに用い、DMEM、4500mg/lのグルコース、10mMのL-グルタミン、10%牛胎仔血清、および50μg/mlのゲンタマイシンで培養した。

【0034】

PNA-NLS

ペプチド核酸(PNA)の合成は、パースペクティブ・バイオシンセシス社(Perspective BioSynthesis Ltd.)でおこなった。PNAの配列の選択は、起こり得る非特異的結合を避けるために、既知の真核DNA配列と同様に、プラスミドからの排除の判定によっておこなった。PNAペプチドを、疎水性スパーサーFmoc-NC₆O₃H₁₁-OH(Fmoc-AEEA-OH)によって、SV40コア-NLSである一続きのアミノ酸残基PKKKRKVに結合させた。完全な配列は、GCGCTCGGCCCTTCC-リンカー-PKKRKVである。ペプチドと同様に、ペプチドアミド・リンカーを有するポリエチレングリコール-ポリスチレン(PEG-PS)支持体上で、PNAの合成をおこなった。このリンカーは最終産物の分解の際にPNAアミドを生成した(<http://www.pbio.com/cat/synth/pna/pnacycle.htm>)。

【0035】

蛍光色素標識オリゴヌクレオチド

2種類の蛍光色素標識オリゴヌクレオチド、すなわちAS-Cy-5標識されたPNA-NLS二元機能ペプチドに対するアンチセンスとS-Cy-3標識されたPNA-NLS二元機能ペプチドに対するセンスとを、サイバージェン(Cybergene)ABで合成した。これらのオリゴヌクレオチドをHPLCで精製した。オリゴヌクレオチドに結合するためのCy-3およびCy-5蛍光色素サブユニットは、パーキン・エルマー(Perkin-Elmer)から購入した。

【0036】

低イオン強度PAGEを用いた移動度シフトDNA結合アッセイ

⁻³²P-ATP(>5000mCi/mmol)を用いて、アンチセンスおよびセンス・オリゴヌクレオチドをT4-ポリヌクレオチド・キナーゼによって末端標識した。種々の濃度のPNA-NLSとともに、室温で標識オリゴヌクレオチドをインキュベートした。オリゴヌクレオチド/PNA-NLS複合体を分離するために、15%の低イオン強度の非変性ポリアクリルアミド・ゲルを用いた(「低イオン強度PAGEを用いた移動度シフト・アッセイ」(Mobility shift assay using low-ionic-strength PAGE)、分子生物学における簡単なプロトコール(Short protocols in molecular biology)、編集:フリーデリック(Frederick)M)。アウスベル(Ausbel)。ロジャー・ブレント(Roger Brent)、ロバート(Robert)E・キングストン(Kingston)、デビッド(David)D・ムーア(Moore)、J・G・セイドマン(Seidman)、ジョン(John)A・スミス(Smith)、ケビン・ストルル(Kevin Struhl)、第2版、1992)。

【0037】

PNA-NLS蛍光色素標識オリゴヌクレオチドによるトランスフェクション

トランスフェクションは、以下のように25kDaPEIによっておこなった。PNA

- N L S : A s : S を 1 : 1 : 1 のモル比で混合し、90 で加熱した。この混合物をゆっくりと室温に冷やすことで、A S - オリゴに対する P N A - N L S のハイブリダイゼーションを最適化する条件を得た。この混合物を水で希釈して、0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度にした。オリゴヌクレオチドおよび P N A - N L S の混合物に対して、ヌクレオチド 2 μg あたり 1.44 μl の 0.1 M 25 k D a P E I 溶液を加えた。トランスフェクション溶液による複合体の形成を室温で 10 分間おこなった後、10% 牛血清および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシンを含む 1 ml の D M E M と混合した。次に、培地/トランスフェクション複合体混合物を細胞に添加した。トランスフェクションをおこなうために、該トランスフェクションの 8 時間前に 10^5 C O S - 7 細胞を 6 穴プレートの各穴の培地 2 ml に播種して細胞を付着させた。オリゴヌクレオチド・トランスフェクションのインキュベーション時間を 10 時間とした。全てのインキュベーションは、5% C O ₂ 中、37 でおこなった。

【0038】

P N A - N L S、E G F P、および l a c Z プラスミドによるトランスフェクション

P N A - N L S ハイブリッド用の標的配列を取り込むために、プラスミド E G F P - N 3 (増強緑色蛍光タンパク質(クローンテック(Clonetech)))を修飾した。E G F P - N 3 プラスミドを A f 1 I I で消化し、A f 1 I I 部位でフランキングした P N A 標的配列を含むオリゴヌクレオチド・フラグメントによって連結した。このフラグメントを、E G F P 遺伝子機能またはプラスミド機能にとって必須であることが知られている任意の配列の外側の位置に、クローニングした。このコントラストの種々のクローンを単離したところ、異なる数の P N A 標的部を有していた。E G F P および l a c Z 遺伝子の発現によって、陽性細胞の数を直接記録することによって測定されるように、レポーター遺伝子の機能性に関してプラスミドの状態についての情報が得られた。トランスフェクションは、以下のようにして 25 k D a の P E I によっておこなった。P N A - N L S : プラスミド試料を 100 : 1 のモル比で混合し、90 に加熱した。混合物をゆっくりと室温にまで冷やし、プラスミド標的部に対する本発明にもとづく P N A - N L S のハイブリダイゼーションを最適化した。この混合物を 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度に希釈した。混合物に対して、プラスミド 2 μl あたり 1.44 μl の 0.1 M 25 k D a P E I 溶液を添加した。トランスフェクション溶液による複合体の形成を室温で 10 分間おこなった後、10% 牛血清および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシンが追加された 1 ml の D M E M と混合した。次に、トランスフェクション混合物を標的細胞に加えた。l a c Z に関する手順は上記した通りにおこなった。トランスフェクションのために、 10^5 C O S - 7 細胞を 6 穴プレートの穴あたり 2 ml の培地に播種した。このことは、細胞の付着を目的として、トランスフェクションの 8 時間前におこなった。遺伝子発現を最大とするために、インキュベーション時間を 48 時間とした。全てのインキュベーションは、5% C O ₂ 中、37 でおこなった。

【0039】

L a c Z 染色

トランスフェクト細胞を、2% パラホルムアルデヒド、0.2% グルタルアルデヒド含有 1 x P B S で固定した。染色溶液 A は、5 mM フェリシアン化カリウム、5 mM フェロシアン化カリウム、および 2 mM 塩化マグネシウムを含むものとした。X - g a l を濃度 40 mg / ml で D M S O に溶解した。溶液 A を 1 : 1 の比率で X - g a l / D M S O 溶液と混合し、37 で予熱し、さらに固定細胞に添加した。次に、細胞を 37 で一晩インキュベートし、光学顕微鏡で記録した。

【0040】

蛍光顕微鏡および画像分析

冷却フレーム C C D (電荷結合素子)カメラを装着したライカ(Leica) D M R X A 顕微鏡下で、生細胞の蛍光顕微鏡観察をおこなった。それに続く画像分析は、インテリジェント・イメージング・イノベーションズ社(Intelligent Imaging Innovations Ltd.)のスライドブック(Slidebook 2.1.4)というソフトウェアを用いておこなった。核取り込

みの増加を、核をマスキングすることによって計算し、Cy-5 (図2b) およびCy-3 (図2c) スペクトルからの蛍光の測定をそれぞれおこない、さらにバックグラウンドの蛍光を差し引いた。

【0041】

結果：

PNA-NLSハイブリダイズ・オリゴヌクレオチドの核転移

第1の実験群では、Cy-3およびCy-5蛍光標識15量体オリゴヌクレオチドとPNA-NLSとをモル比1:1でハイブリダイズさせた。この技術の原理を模式的に図1にまとめた。PEI媒介トランスフェクションの後、対照Cy-3蛍光色素標識オリゴヌクレオチドと比較して、200~800%に及ぶCy-5蛍光色素標識オリゴヌクレオチド/PNA-NLS複合体の核転移の増加(図2および3)が観察された。分析した際、細胞は異なる細胞区画で異なる蛍光レベルを有していた。蛍光レベルは、全ての陽性細胞の核のものと同様であった。細胞質蛍光は、低強度から高強度に変化した。オリゴヌクレオチド内の同族配列にPNA-NLSが結合することを確認するために、放射性標識オリゴヌクレオチドをPNA-NLSとともにインキュベートし、低イオン強度の非変性ポリアクリルアミドゲル上で分離した。図4から明らかのように、PNA-NLS結合は特異的であり、PNA-NLSと対応オリゴヌクレオチドとのモル比を1:10で用いることで、シフトが一目瞭然となった。一方、 10^4 :1の比は、標的部位が欠けたオリゴに影響を及ぼすことはなかった。

【0042】

PNA-NLSハイブリダイズ・プラスミドの核転移

PNA-NLS分子を、PNA標的配列含有プラスミドとハイブリダイズさせた。LacZまたはEGFPレポーター・コンストラクトを用いた。遺伝子導入の効率を、LacZ活性について染色した後のEGFP発現細胞の頻度または青色細胞の数として、測定した。LacZまたはEGFPプラスミドのPEI媒介トランスフェクションは、PNA-NLSペプチドを100:1の比で添加することで、3~8倍に増強した(図5、6)。プラスミドは、両方とも、既知の機能を持たない領域(レポーター遺伝子のポリアデニル化シグナルの3'に位置)にクロニングされた11個のコンカテマーPNA標的部位を有した。最初に、用量応答分析を実行したところ、PNA-NLS:プラスミドの比率100:1が最適であった(データ不図示)。2個のコンカテマーPNA標的部位を含むLacZプラスミドは、野生型の効率(不図示)と変わらなかったことから、それ以上調べなかった。トランスフェクション効力(transfection efficacy)は、EGFPプラスミドの場合(図5、6)に示されるように、プラスミド-PNA-NLS複合体を遊離のPNA-NLSから精製した場合に、増強された(対照と比較して8倍)。このことは、遊離のPNA-NLSがプラスミド/PNA-NLS複合体の核輸送を阻害することで核の転移を損なうことが示されている。対照プラスミドをPNA-NLSと混合した場合、トランスフェクション効力に対して何ら効果が見られなかった。プラスミド/PNA-NLS相互作用は、LacZまたはEGFPプラスミドのいずれかを含む複合体でのレポーター遺伝子の発現によって示されるように、マーカー遺伝子の正常な機能を妨げるようには見えない。さらに、100倍以上の遊離のNLSペプチド(NLS:プラスミドの比率が 10^4 :1)を垂添加することで、PNA部位を含むプラスミドのトランスフェクション効力が著しく減少した(不図示)。

【0043】

考察

本発明は、SV40NLSペプチドに結合したPNA分子が、蛍光標識オリゴヌクレオチドに対して、またはレポーター遺伝子を含むプラスミドに対して結合した場合に、核標的シグナルとして作用し得ることを示す。同様の結果は、HeLa、NIH-3T3、またはCOS-7細胞でDOTAPまたは25kDPEIをトランスフェクション試薬として用いることで得られることから、技術の汎用性が示された(データ示さず)。本発明にもとづく方法は、一般にトランスフェクションについての潜在的価値についてであり、ま

た遺伝子治療もしくはDNAワクチン接種の場面で適用することも可能である。標的細胞への核酸の取り込みの増大は、遺伝子発現にとって、同様にアンチセンス・コンストラクトの送達にとって、もしくは突然変異誘発オリゴヌクレオチドの送達にとっても、重要であると考えられる。アンチセンス活性の場面では、PNA-NLSコンストラクト単独の適用も可能でなければならない。本発明によれば、研究された未修飾EGFPまたはLacZプラスミドには存在しないPNA標的配列であるCGCGAGCCGGGAAGGを使用した。PNAとその標的配列との相互作用は、かなり特異的であり、PNAは非関連配列とは相互にハイブリダイズしない。DNAとPNAとの間の強力な相互作用もまた、複合体が分離するのを防止する(クヌーセン(Knudsen)H.、ニールセン(Nielsen)P.E. : 二重鎖および三重鎖形成PNAのアンチセンス特性(Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs)、核酸研究(Nucleic Acid Research) 24(3)494~500(1996))。

【0044】

本発明が進められている最中に、NLSペプチドをプラスミドに化学的に結合させ、それを細胞質に注射した後の核転移についての研究に、ジギトニン透過性ヒーラ(HeLa)細胞が用いられるという報告が出現した(セベスティエン(Sebestyen)M.G.、ルドケ(Ludtke)J.J.、バシク(Bassik)M.C.、チャン(Zhang)G.、バドカー(Budker)V.、ラクタノフ(Lukhtanov)E.A.、ハグストロム(Hagstrom)J.E.、ウオルフ(Wolff)J.A.、DNAベクター・ケミストリー: プラスミドDNAに対するシグナル・ペプチドの共有結合(DNA vector chemistry: The covalent attachment of signal

peptides to plasmid DNA)、ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotechnology) 16(1): 80-5(1998))。セベスティエン(Sebestyen)等によって得られた結果もまた、NLS結合プラスミドを用いた核内への輸送増加を示している。しかし、この技術に特有の化学的修飾により、修飾プラスミドでのレポーター遺伝子の発現が阻害される。対照的に、PNA-NLSペプチドを用いることで、発現が保たれた。このために、おそらく非不可欠な地域のPNA標的部位の位置が必須であった。プラスミドについては、2つのPNA標的部位はトランスフェクション効力に対して何ら効果を有しなかった。その一方で11個の部位が著しく効率を高めた。プラスミドの同一領域に全ての標的部位を局在化することが重要であるかどうか、あるいはそれらが均一に広がるかどうかについての研究を実施しなかった。しかし、これらの選択肢は両方とも、添付した特許請求の範囲によって定義されるように、保護の範囲内にある。さらに、セベスティエン他(1998)のデータから推定されるように、S配列の数を115以上(≥ 115 NLS)とした場合に何ら効果が見られなかったことから、NLS濃度が局所的に高いことが必須であることが提案される。一方、本発明によれば、11個のPNA-NLS標的部位を持つ250bpコンカトマー・ストレッチを用いることで、取り込みの促進が見られる。しかし、現時点では、PNA-NLS配列が各標的部位に結合するかどうかは、完全には明らかにされておらず、したがって、このことは本発明にもとづいた方法を使用するこの分野の当業者によって試験されなければならない。SV40コアNLSが最も研究されたNLS配列のうちの一つであることから、実用上の理由でSV40コアNLSを選択した。970kDaを上回る大きさのSV40結合タンパク質が核の中に転移することが報告されている(ヨネダ(Yoneda)Y.、センバ(Semba)T.、カネダ(Kaneda)Y.、ノーブル(Noble)R.L.、マツオカ(Matsuoka)Y.、クリハラ(Kurihara)T.、オカダ(Okada)Y.、イマモト(Imamoto)N. : 「核局在化シグナルとそのSV40T抗原のフランキング配列とを含む長い合成ペプチドは、核内へのIgMの効率的な輸送を導く(A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently)」、実験的細胞研究(Experimental Cell Research) 201(2): 313~320(1992))。このことは、2800kDaのEGFPプラスミドを含むPNA標的配列の分子量と比較すべきである。さらに、ザンタ

(Zanta) 他 (Zanta) M. A.、ベルギーズ・バランジエール (Belguise-Valladier) P.、ベール (Behr) J.、遺伝子送達 (Gene delivery) : 「単一核局在化シグナルペプチドは、DNAを細胞核に運ぶのに十分である (A single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus)」、米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、1999 96 : 91 ~ 96) は、本特許出願の最も早い優先日より後に、精製したレポーター遺伝子フラグメントにハイブリダイズする NLS-DNA のリグーションが用いられる興味深い論文を開示している (8)。その著者は、NLSアプローチの実現可能性をはっきりと示している。しかし、Zanta (Zanta) 他 (上掲) によって使用される方法は、本方法よりも扱いにくい。なぜなら、プラスミドの制限酵素による切断とその後のレセプター遺伝子フラグメントに対するオリゴヌクレオチド担持 NLS のリグーションとを伴うからである。

【0045】

本方法および輸送実体 (例えば、PNA-NLS方式) は、突然変異修復のために修復コンストラクトが核の中へ送り届けられる方式で有効であると同様に、一時的なトランスフェクションを伴う方式および治療でも有効である。SV40コア NLS に基づいた核転移の方式は、蛍光色素標識オリゴヌクレオチドを用いることによって核蛍光のプラトーが達成されたことにより、飽和しているように見えた。このことは、オリゴヌクレオチドの細胞質レベルが異なることで標的オリゴヌクレオチドが同様の核内レベルとなる一方で非標的オリゴヌクレオチドが相対的に幅広い変動を示すという事実によって、示される (図 3b)。Cy-5 標識アンチセンスによるオリゴヌクレオチドの核転移の記録は、Cy-5フルオロフォアを赤外線放射することから、客観性が与えられた。SV40 NLS の結合相手は、カリオフィリンであり、このカリオフィリンは続けてカリオフィリンと複合体を形成する (ミヤモト (Miyamoto) Y.、イマモト (Imamoto) N.、セキモト (Sekimoto) T.、タチバナ (Tachibana) T.、セキ (Seki) T.、タダ (Tada) S.、エノモト (Enomoto) T.、ヨネダ (Yoneda) Y.、異なる3つのクラスの NLS レセプターによる核局在化シグナル (NLS) の異なったモード (Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS receptors)、ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、272 (42) : 26375 ~ 81 (1997))。この輸送メカニズムが飽和し得ることから、NLSの全量は重要であり、本方法を用いて当業者によって測定される (ミショー (Michaud) N.、ゴールドファーブ (Goldfarb) D. S.、「ほとんどの核タンパク質が単一の経路によって導入される (Most nuclear proteins are imported by a single pathway)」、実験的細胞研究、208 (1) : 128 ~ 136 (1993))。核内移入方式の飽和もまた、遊離の NLS の添加が核輸送を妨げるという本発明にもとづく知見を適切に説明するものである。オリゴヌクレオチドの核内移入をさらに高めるために、異なる NLS 経路を標的にする一組の NLS 配列を含む PNA-NLS ペプチドの混合物を用いることができた (ミショー (Michaud) 他、上掲)。このことは、ひとつの経路の飽和が導入生体分子の核転移を制限しないことを確実にする。このため、Qip1、Rch1、および NPI-1 等の少なくとも3つの異なる NLS レセプター・ファミリーが報告されている (ミヤモト (Miyamoto) 他、上掲)。本発明によれば、レンチウイルスの核への侵入を模倣する一つの方法は、PNA-NLS ペプチドを介して HIV-マトリックス結合 (MA) タンパク質を核酸コンストラクトに結合させることであることが示唆される。次に、複合体は Vpr に結合し、前一体化複合体 (pre-integration complex) として続いて処理されると考えられる (バクリンスキー (Bukrinsky) M. I.、ハファー (Haffar) O. K.、「HIV-1 核内移入 : 今回は Vpr とともに、マトリックス・タンパク質が中心段階にもどる (HIV-1 nuclear import: Matrix protein is back on center stage, this time together with Vpr.)」、分子医学 (Mol

ecular Medicine)、4(3):138~143(1998))。MA-Vpr複合体の機能が、シャオ(Xiao)等(1997)によって記載された拡張SV40NLS配列(extended SV40 NLS sequence)に類似するということが提案されている(シャオ(Xiao)C.Y.、ハブナー(Hubner)S.、ジェーンズ(Jans)D.A.、核局在化配列をランキングする二重鎖DNA依存型タンパク質キナーゼ部位(セリン120)によってSV40巨大腫瘍抗原の核内移入を調節する(SV40 large tumor antigen nuclear import is regulated by the double-stranded DNA-dependent protein kinase site (serine 120) flanking the nuclear localization sequence)、ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、272(35):22191~22198(1997))。従来技術では、核酸送達の種々の態様を強化するタンパク質が研究されている(ブシフ(Boussif)O.、レゾールチ(Lezoualch)F.、ザンタ(Zanta)M.A.、マーグニイ(Mergny)M.D.、シャーマンD.、デメネイクス(Demeneix)B.、ベール(Behr)J.P.、培地および生体内での細胞への遺伝子およびオリゴヌクレオチド輸送のための万能因子:ポリエチルイミン(A versatile factor for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine)、米国科学アカデミー紀要(National Academy of Sciences of the United States of America)、92(16):7297~7301(1995))。本発明によれば、そのような機能は、MLS媒介輸送に加えて、PNAによるアプローチを用いて核酸を直接標的にすることが可能であることを示唆している。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】本発明にもとづくセンスPNA-NLS二重機能ペプチドに対するアンチセンスCy-5オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションでの標的部位を示す模式図である。

【図2】蛍光標識オリゴヌクレオチドの核転移を説明する図である。

【図3】核、細胞質、およびゴルジ様のCy-5/Cy-3蛍光比である。

【図4】本発明にもとづくPNA-NLS二重機能ペプチドによるアンチセンスおよびセンス・オリゴヌクレオチドのシフト・アッセイを示す図である。

【図5】本発明にもとづく輸送実体の効果を説明する図である。すなわち、EGFPプラスミドを含むPNA標的にハイブリダイズした場合のPNA-NLSの効果と、トランスフェクション混合物から過剰なPNA-NLS分子を除去する効果とを示す。

【図6】過剰なPNA-NLSの精製後、PNA-NLSの添加または無添加でのlacZおよびEGFPトランスフェクションを示す。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】図面

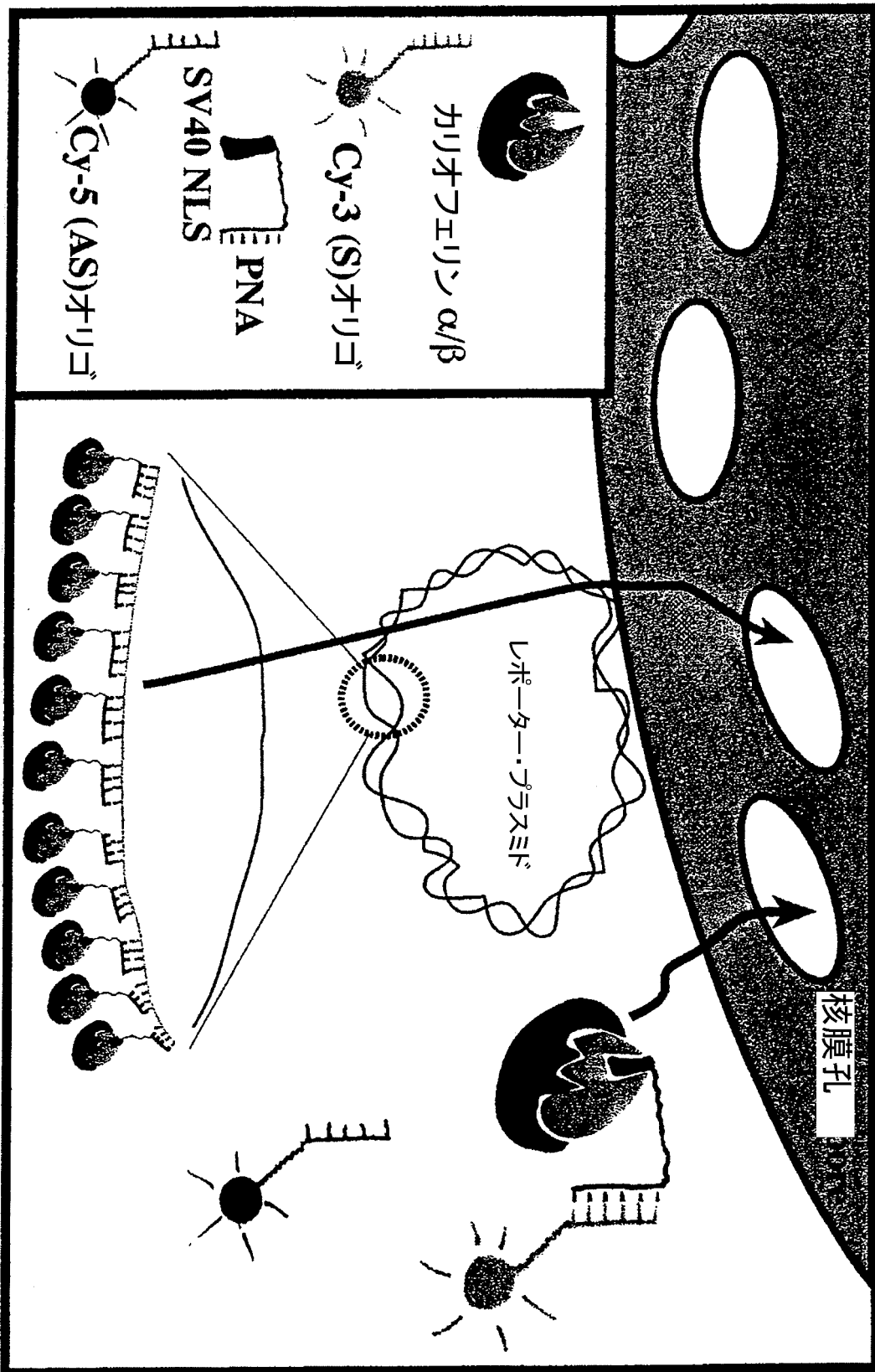
【訂正対象項目名】図1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【図1】

Figure 1



【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】図面

【訂正対象項目名】図6

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【図6】

Figure 6

