

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5941460号
(P5941460)

(45) 発行日 平成28年6月29日(2016.6.29)

(24) 登録日 平成28年5月27日(2016.5.27)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 K 31/713 Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

A 6 1 K 47/24

A 6 1 K 47/28 (2006.01)

A 6 1 K 47/28

請求項の数 12 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-516384 (P2013-516384)

(86) (22) 出願日 平成24年5月22日(2012.5.22)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2012/063082

(87) 国際公開番号 W02012/161196

(87) 国際公開日 平成24年11月29日(2012.11.29)

審査請求日 平成25年11月19日(2013.11.19)

(31) 優先権主張番号 特願2011-114946 (P2011-114946)

(32) 優先日 平成23年5月23日(2011.5.23)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

特許法第30条第1項適用 日本薬学会ホームページによる第131年会要旨公開

特許法第30条第1項適用 第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム講演集

(73) 特許権者 311005736

Delta-Fly Pharma株式会社

徳島県徳島市川内町宮島錦野37番地の2

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72) 発明者 石田 電弘

徳島県徳島市新浜町2丁目4-20-34
01

(72) 発明者 黄 政龍

京都府京都市伏見区深草坊町12番34

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チミジル酸合成酵素に対する shRNA 分子を含むリポソームおよびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

RNA i 作用によりチミジル酸合成酵素の発現を抑制することができるショートヘアピンRNA (shRNA) と、PEG修飾カチオン性リポソームを含む、抗腫瘍剤であって、該shRNAは該PEG修飾カチオン性リポソームの表面に結合されており、かつ3'末端に少なくとも2塩基からなるオーバーハングを有し、PEG修飾カチオン性リポソームが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレイルグリセロホスホコリン(POPC)、コレステロール(CHOL)およびO、O'-ジテトラデカノイル-N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)ジエタノールアミンクロリド(DC-6-14)より構成されるカチオン性リポソームを含み、DOPE、POPC、CHOLおよびDC-6-14が、3:2:3:2のモル比で含まれる、上記抗腫瘍剤。

【請求項2】

shRNAが配列番号1で表される塩基配列からなるセンス鎖および該センス鎖とストリンジントな条件下でハイブリダイズするアンチセンス鎖を含む、請求項1に記載の抗腫瘍剤。

【請求項3】

shRNAが配列番号1で表される塩基配列からなるセンス鎖と配列番号2で表される塩基配列からなるアンチセンス鎖を含む、請求項1または2に記載の抗腫瘍剤。

【請求項4】

s h R N A が配列番号 8 で表される塩基配列からなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 5】

抗腫瘍剤の粒径が 2 0 0 ～ 3 0 0 n m である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 6】

さらに、腫瘍細胞の増殖に関与する遺伝子からなる群より選択される遺伝子の発現を抑制することができる s i R N A または s h R N A が P E G 修飾カチオン性リポソームの表面に結合されている、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 7】

腫瘍細胞の増殖に関与する遺伝子が、V E G F、E G F R、P D G F、H G F、W i n t、B c l - 2、サバイビン、リボヌクレオチドレダクターゼ、D N A ポリメラーゼをコードする遺伝子からなる群から選択される一または複数の遺伝子である、請求項 6 に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 8】

腫瘍を処置するための化学療法剤と併用される、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍剤と腫瘍を処置するための化学療法剤とを含む、組み合わせ物。

【請求項 10】

腫瘍を処置するための化学療法剤が、T S 阻害作用を有する抗腫瘍剤である、請求項 8 に記載の抗腫瘍剤または請求項 9 に記載の組み合わせ物。

【請求項 11】

T S 阻害作用を有する抗腫瘍剤が、5 - F U 系抗腫瘍剤またはペメトレキセドナトリウム水和物である、請求項 10 に記載の抗腫瘍剤または組み合わせ物。

【請求項 12】

5 - F U 系抗腫瘍剤が、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤である、請求項 11 に記載の抗腫瘍剤または組み合わせ物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、チミジル酸合成酵素に対する s h R N A 分子を含むリポソームを有効成分とする抗腫瘍剤ならびにその用途、特に化学療法剤と併用するその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、R N A 干渉（以下、R N A i）を引き起こす R N A i 分子は、腫瘍などを治療するための有用なツールとして注目されており、腫瘍の増殖を抑制することが可能な様々な R N A i 分子が開発されている。本発明者らは以前に、D N A 合成に関与しているチミジル酸合成酵素（以下、T S）を標的とする R N A i 分子を報告し、当該 R N A i 分子が T S の発現を顕著に抑制することにより、抗腫瘍効果を有すること、また 5 - F U 系抗腫瘍剤（特にテガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤）の抗腫瘍効果を増強することを報告した（特許文献 1）。

【0003】

しかしながら、一般的に R N A i 分子は i n v i v o 投与によって迅速に分解されてしまう。そのため、腫瘍に対して十分な量の R N A i 分子を送達することは極めて困難であった。

【0004】

当該課題を解決すべく、今日、様々な R N A i 分子の送達方法が開発されている。例えば、R N A i 分子（特にショートヘアピン構造を有する R N A i 分子（s h R N A））を

10

20

30

40

50

コードするDNAを適当なベクターに組み込んで、当該ベクターを投与する方法が挙げられる（特許文献1）。しかし、この方法では当該ベクターを腫瘍内に直接注入して投与しなければならず、臨床応用を考慮すると、より容易な投与方法（例えば、静脈内投与など）が望まれていた。また、RNAi分子とリポソームからなる複合体（リポプレックス）を用いて、RNAi分子を腫瘍細胞へ送達する方法が開発されている（非特許文献1-3）。しかし、これらリポプレックスの繰り返し投与に際しては、投与された生体における免疫系の働きによりリポプレックスは、速やかに排除されてしまい十分な効果を得ることができない、また重篤な副作用が生じるなどの問題を生じていた。

【0005】

したがって、当該分野においては依然として、*in vivo*投与によってRNAi分子を効率的に腫瘍に送達する方法が切望されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO2010/113844

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Qixin Leng et al., Drug Future, 2009 September; 34 (9): 721.

【非特許文献2】Sherry Y. Wu et al., The AAPS Journal, Vol. 11, No. 4, December 2009

【非特許文献3】B. Ozpolat et al., Journal of Internal Medicine 267; 44-53 2009

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、TSを標的とするshRNAの簡易かつ効率的な*in vivo*送達方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、TSの発現を抑制することが可能なshRNAをPEG修飾したカチオン性リポソーム表面に静電的に結合させることによって簡易に癌細胞へ送達できることを見出した。また、shRNAを結合したPEG修飾したカチオン性リポソームを化学療法剤、特に5-FU系抗腫瘍剤と併用することによって、癌細胞への指向性を高め、癌細胞における効果を顕著に増大できることを見出した。さらに、shRNAを結合したPEG修飾したカチオン性リポソームを、TS阻害作用を有する化学療法剤（例えば5-FU系抗腫瘍剤やペメトレキセドナトリウム水和物）と併用することによって、癌細胞における当該化学療法剤に対する感受性を高め、抗腫瘍効果を増強できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づく。

【0010】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0011】

[1] RNAi作用によりチミジル酸合成酵素の発現を抑制することができるショートヘアピンRNA（shRNA）と、PEG修飾カチオン性リポソームを含む、抗腫瘍剤であって、該shRNAは該PEG修飾カチオン性リポソームの表面に結合されており、かつ3'末端に少なくとも2塩基からなるオーバーハングを有する、上記抗腫瘍剤。

【0012】

[2] shRNAが配列番号1で表される塩基配列からなるセンス鎖および該センス鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするアンチセンス鎖を含む、[1]の抗腫瘍剤。

【0013】

〔3〕 s h R N Aが配列番号1で表される塩基配列からなるセンス鎖と配列番号2で表される塩基配列からなるアンチセンス鎖を含む、〔1〕または〔2〕の抗腫瘍剤。

【0014】

〔4〕 s h R N Aが配列番号8で表される塩基配列からなる、〔1〕～〔3〕のいずれかの抗腫瘍剤。

【0015】

〔5〕 P E G修飾カチオン性リポソームが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (D O P E)、パルミトイルオレオイルグリセロホスホコリン (P O P C)、コレステロール (C H O L) およびO, O' -ジテトラデカノイル-N- (α-トリメチルアンモニオアセチル) ジエタノールアミンクロリド (D C - 6 - 1 4) より構成されるカチオン性リポソームを含む、〔1〕～〔4〕のいずれかの抗腫瘍剤。

10

【0016】

〔6〕 D O P E、P O P C、C H O LおよびD C - 6 - 1 4が、3 : 2 : 3 : 2のモル比で含まれる、〔5〕の抗腫瘍剤。

【0017】

〔7〕 抗腫瘍剤の粒径が200～300nmである、〔1〕～〔6〕のいずれかの抗腫瘍剤。

【0018】

〔8〕 さらに、腫瘍細胞の増殖に関与する遺伝子からなる群より選択される遺伝子の発現を抑制することができるs i R N Aまたはs h R N AがP E G修飾カチオン性リポソームの表面に結合されている、〔1〕～〔7〕のいずれかの抗腫瘍剤。

20

【0019】

〔9〕 腫瘍細胞の増殖に関与する遺伝子が、V E G F、E G F R、P D G F、H G F、W i n t、B c l - 2、サバイビン、リボヌクレオチドレダクターゼ、DNAポリメラーゼをコードする遺伝子からなる群から選択される一または複数の遺伝子である、〔8〕の抗腫瘍剤。

【0020】

〔10〕 腫瘍を処置するための化学療法剤と併用される、〔1〕～〔9〕のいずれかの抗腫瘍剤。

30

【0021】

〔11〕 〔1〕～〔10〕のいずれかの抗腫瘍剤と腫瘍を処置するための化学療法剤とを含む、組み合わせ物。

【0022】

〔12〕 腫瘍を処置するための化学療法剤が、T S阻害作用を有する抗腫瘍剤である、〔10〕の抗腫瘍剤および〔11〕の組み合わせ物。

【0023】

〔13〕 T S阻害作用を有する抗腫瘍剤が、5-FU系抗腫瘍剤またはペメトレキセドナトリウム水和物である、〔12〕の抗腫瘍剤または組み合わせ物。

【0024】

〔14〕 5-FU系抗腫瘍剤が、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤である、〔13〕の抗腫瘍剤または組み合わせ物。

40

【0025】

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2011-114946号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

【発明の効果】

【0026】

本発明に係るチミジル酸合成酵素に対するs h R N A分子を含むリポソームを有効成分とする抗腫瘍剤は、i n v i v o投与により、T Sを発現する腫瘍の増殖を抑制することが可能である。

50

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、ヒト結腸直腸癌株DLD-1 (A) およびDLD-1/FU (B) における、TSを標的としたsiRNAおよびshRNAのTS発現抑制効果を示す特性図である。各レーンはそれぞれ以下のsiRNAまたはshRNAで処理したサンプルを示す。1:未処理; 2: siCont 10nM; 3: siTS 1nM; 4: siTS 5nM; 5: siTS 10nM; 6: shTS 1nM; 7: shTS 5nM; 8: shTS 10nM。

【図2】図2は、ヒト結腸直腸癌株DLD-1における、TSを標的としたsiRNA (A) およびshRNA (B) の5-FUの有無によるTS発現抑制効果を示す特性図である。(C) 新しい培地を添加して96時間後の各サンプルにおける細胞成長阻害率(%)を示す。

10

【図3】図3は、ヒト結腸直腸癌株DLD-1/FUにおける、TSを標的としたsiRNA (A) およびshRNA (B) の5-FUの有無によるTS発現抑制効果を示す特性図である。(C) 新しい培地を添加して96時間後の各サンプルにおける細胞成長阻害率(%)を示す。

【図4】図4は、ヒト結腸直腸癌株DLD-1 担癌マウスにおける、TSを標的としたshRNAのS-1の有無による腫瘍成長抑制効果 (A) および体重の増減 (B) を示す特性図である。

【図5】図5は、ヒト結腸直腸癌株DLD-1 担癌マウスにおける、TSを標的としたshRNAのTS-1の有無による腫瘍成長抑制効果を示す写真図である。1: 対照 (スクロース投与); 2: S-1; 3: TS-shRNAリポソーム; 4: S-1+TS-shRNAリポソーム。

20

【図6】図6は、ヒト悪性胸膜中皮腫株MSTO 211 Hにおける、ペメトレキセドナトリウム水和物、TSを標的としたshRNA、あるいはペメトレキセドナトリウム水和物およびTSを標的としたshRNAによる、細胞成長阻害率(%)の経時的変化を示す。

【図7】図7は、ヒト悪性胸膜中皮腫株MSTO 211 H 担癌マウスにおける、TSを標的としたshRNAのペメトレキセドナトリウム水和物の有無による腫瘍成長抑制効果を示す特性図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明におけるチミジル酸合成酵素 (以下、「TS」と記載) の発現を抑制することができるショートヘアピンRNA (以下、「shRNA」と記載) は、チミジル酸合成酵素のmRNA部分を標的とすることにより、TS特異的にRNAi作用を奏し、TSの発現を顕著に抑制することができる。ここで本発明のRNAi分子が、「mRNA部分を標的とする」とは、下記に詳述するshRNAのアンチセンス鎖が、標的mRNA部分とストリンジентな条件下でハイブリダイズできることをいう。

【0029】

ストリンジентな条件下とは、常法に従ってハイブリッドを形成する核酸の融解温度 (Tm) に基づいて求めることができる。例えば、ハイブリダイズ状態を維持できる洗浄条件として通常「1×SSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件、より厳格には「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件、さらに厳格には「0.1×SSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件が挙げられる。

40

【0030】

本発明におけるshRNAは、TSをコードするORFの塩基配列またはその一部に同一な塩基配列を有するセンス鎖と、当該センス鎖とストリンジентな条件下でハイブリダイズするアンチセンス鎖を含む。ここで「ORFの塩基配列またはその一部に同一な塩基配列」とは、ORFの塩基配列中のチミンをウラシルに置換して表される塩基配列またはその一部に同一である塩基配列を意味する。

50

【0031】

当該センス鎖は15～25塩基、好ましくは19塩基からなる。センス鎖の塩基配列は、TSをコードするORFの塩基配列と同一であることが望ましいが、実質的に同一、すなわち相同な配列であってもよい。すなわち、センス鎖の塩基配列は、ORFの塩基配列において1または複数、すなわち、1～3の塩基、好ましくは1～2塩基、より好ましくは1塩基の置換、欠失、挿入および／または付加があってもよい。

【0032】

当該アンチセンス鎖は、センス鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列を有する。アンチセンス鎖は、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる限り、1～3の塩基、好ましくは1～2塩基、より好ましくは1塩基の置換、欠失、挿入および／または付加を含むミスマッチを有するものであってもよい。好ましくは、アンチセンス鎖は、センス鎖と完全に相補的な塩基配列からなる。

10

【0033】

センス鎖およびアンチセンスの塩基配列は、TSをコードする公知の塩基配列（Gen Bank：CR601528.1）に基づいて選択することができる。これらの塩基配列を選択する方法として種々の方法が知られており、例えば、siRNA Design Support System（タカラバイオ株式会社）などを用いることが可能である。

【0034】

本発明において、センス鎖として以下の塩基配列からなるものが挙げられるがこれらに限定されない：5'-GUAA CACCAUCGAUCAUGA-3'（配列番号1）；5'-GAAUACAGAGAU AUGGA AU-3'（配列番号3）；5'-CGAUCAUGAUGUAGAGUGU-3'（配列番号5）；5'-GGGUGUUUUGGAGGAGUUGTT-3'（配列番号11）。

20

【0035】

好ましくは本発明におけるshRNAは、センス鎖5'-GUAA CACCAUCGAUCAUGA-3'（配列番号1）とアンチセンス鎖5'-UCAUGAUCGAUGGUGUUAC-3'（配列番号2）；センス鎖5'-GAAUACAGAGAU AUGGA AU-3'（配列番号3）とアンチセンス鎖5'-AUUCCAUAUCUCUGUAUUC（配列番号4）；またはセンス鎖5'-CGAUCAUGAUGUAGAGUGU-3'（配列番号5）とアンチセンス鎖5'-ACACUCUACAUCAUGAUCG-3'（配列番号6）；センス鎖5'-GGGUGUUUUGGAGGAGUUGTT-3'（配列番号11）とアンチセンス鎖5'-AACAA CUC CUC CAAAACACCC-3'（配列番号12）を含む。

30

【0036】

さらに好ましくは、本発明におけるshRNAは、配列番号1で表される塩基配列からなるセンス鎖と配列番号2で表される塩基配列からなるアンチセンス鎖を含む。

【0037】

センス鎖とアンチセンス鎖は、リンカー部分を介して連結され、当該リンカー部分がループを形成することにより折りたたまれ、当該アンチセンス鎖と当該センス鎖がハイブリダイズして、二本鎖部分を形成する。shRNA分子に含まれるリンカー部分は、センス鎖とアンチセンス鎖を連結しステムループ構造を形成し得る限り、ポリヌクレオチドリンカーであっても、非ポリヌクレオチドリンカーであってもよく、特に限定しないが、当業者に公知である2～22塩基のポリヌクレオチドリンカーが好ましい。具体的には、UAGUGCUC CUGGUUG（配列番号7）、UUCAAGAGA、CCACC、CUCGAG、CCACACC、UUCAAGAGA、AUG、CCCおよびUUCGが例示でき、UAGUGCUC CUGGUUG（配列番号7）が好ましい。

40

【0038】

本発明におけるshRNAは3'末端に少なくとも2塩基からなるオーバーハングを有する。

50

【0039】

本発明において、オーバーハングとは、アンチセンス鎖の3'末端に付加された塩基であって、センス鎖の対応する位置に相補的に結合し得る塩基が存在しない塩基をいう。アンチセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有していない場合、オーバーハングを有している場合と比べて、下記にて詳述するPEG修飾カチオン性リポソームを用いたトランスフェクションにおいて、shRNAによるTSの発現抑制の程度がおよそ40～60%低下する。当該オーバーハングの塩基の種類、数は限定されず、例えば、1～5、好ましくは1～3、さらに好ましくは1もしくは2塩基からなる配列が挙げられ、例えば、TTT、UUやTTが挙げられる。好ましくは、UUである。

【0040】

本発明において、好ましいshRNAとしては、配列番号8で表される塩基配列からなる一本鎖RNAである。

【0041】

また、センス鎖またはアンチセンス鎖は必要に応じて、5'末端がリン酸化されていてよく、5'末端に三リン酸(ppp)が結合していても良い。

【0042】

本発明におけるPEG修飾カチオン性リポソームは、カチオン性リポソームの表面にまたは複数のポリエチレングリコール分子(PEG)が共有結合されてなり、これによってカチオン性リポソームのin vivoでの血中滞留性を増加させることができる。

【0043】

カチオン性リポソームは公知の手法、例えば薄膜振とう法(Bangham法)に基づいて作製することができる(A. D. Bangham et al., J. Mol. Biol., 13, 238-252 (1965); A. D. Bangham and R. W. Horne, J. Mol. Biol., 8, 660-668 (1964))。すなわち、フラスコ等の容器内において少なくとも1種のリン脂質をクロロホルム等の有機溶媒に溶解し、当該有機溶媒を揮発させて容器の底部に脂質膜を形成させた後、そこに緩衝液等の水溶液を入れて攪拌することによって、リポソームを含む懸濁液を得ることができる。

【0044】

本発明におけるカチオン性リポソームは、以下より選択される一以上のリン脂質からなる1つまたは複数の膜を有する：ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(以下、「DOPE」と記載)、パルミトイルオレオイルグリセロホスホコリン(以下、「POPC」と記載)、コレステロール(以下、「CHOL」と記載)、O, O'-ジテトラデカノイル-N-(α -トリメチルアンモニオアセチル) ジエタノールアミンクロリド(以下、「DC-6-14」と記載)、水素添加精製卵黄ホスファチジルコリン、水素添加精製大豆ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンおよび1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン。

【0045】

好ましくは本発明におけるカチオン性リポソームは、DOPE、POPC、CHOLおよびDC-6-14からなる。カチオン性リポソームにおけるDOPE、POPCおよびDC-6-14の含有比(モル比)は、DOPE:POPC:CHOL:DC-6-14 = 2～4:4～1:3～1:1～4であり、好ましくは3:2:3:2である。

【0046】

カチオン性リポソームの表面に結合されるPEGは、分子量500～5000の範囲にあるものから選択され、好ましくは分子量2000程度である。カチオン性リポソームへのPEGの結合は、公知の手法によって行うことができ、特に限定されないがポストインサクション法を用いて行うことができる。すなわち、上記カチオン性リポソームの形成後、リン脂質とPEGからなる複合分子を当該カチオン性リポソームと適当な条件下(例えば、30～60℃、30分間～3時間)でインキュベートすることによって、複合分子の脂質部分をカチオン性リポソームの外側のリン脂質膜中に、PEGをカチオン性リポソームの表面に曝露する形態で組み込むことができる。この際、用いる複合分子の量は、上記

10

20

30

40

50

カチオン性リポソームの総脂質に対して3～10%（モル比）好ましくは5%である。本発明において利用し得るリン脂質とPEGからなる複合分子としては、mPEG₂₀₀₀-DSPGが挙げられるがこれに限定されない。

【0047】

本発明におけるPEG修飾カチオン性リポソームは、粒径が80～200nm、好ましくはおよそ100nmである。本発明におけるPEG修飾カチオン性リポソームは、ゼータ電位が10～40mV、好ましくはおよそ25mVである。

【0048】

上記shRNAは、上記PEG修飾カチオン性リポソームの膜表面に共有結合または非共有結合によって結合している。上記shRNAと上記PEG修飾カチオン性リポソームの結合に際しては、上記shRNAと上記PEG修飾カチオン性リポソームを含む混合液を1～15分間、好ましくは10分間程度激しく攪拌することが好ましい。攪拌を加えることによって、得られるshRNAを備えたPEG修飾カチオン性リポソームの粒径を数百nmのサイズに調製できる（Barichello, J. M., et al., Int. J. Pharm. (2011), doi:10.1016/j.ijpharm.2011.03.001）。また、攪拌を加えることによって、PEG修飾カチオン性リポソーム上に上記shRNAを均一に分散させ結合させることができ、shRNAの不均一な結合によってもたらされる組織によるPEG修飾カチオン性リポソーム取り込みの不均一性を防ぐことができる。

【0049】

本発明において、shRNAを備えたPEG修飾カチオン性リポソームは粒径が120～600nm、好ましくは200～300nmである。また、本発明において、shRNAを備えたPEG修飾カチオン性リポソームはゼータ電位が、5～30mV、好ましくはおよそ10～25mVである。shRNAを備えたPEG修飾カチオン性リポソームの表面電荷はより中性に近く、またPEGによる立体障害の存在から血清タンパク質と結合することが少ないために、肺胞にトラップされることを防ぐことができ、血中滞留性を増加させることができる。

【0050】

本発明におけるshRNAを備えたPEG修飾カチオン性リポソームは、上記shRNAに加えて、腫瘍細胞において発現する別の遺伝子を標的とするsiRNAまたはshRNAを含んでも良い。「腫瘍細胞において発現する別の遺伝子」とは、腫瘍細胞の増殖に関与する因子、例えばVEGF、EGFR、PDGF、HGF、Wnt、Bcl-2、サバイビンなどの増殖調節因子群、リボヌクレオチドレダクターゼ、DNAポリメラーゼなどの核酸合成関連酵素群などをコードする遺伝子が挙げられるがこれらに限定されない。上記shRNAと腫瘍細胞において発現する別の遺伝子を標的とするsiRNAまたはshRNAは、同一のPEG修飾カチオン性リポソームに結合していても良いし、それぞれ別個のPEG修飾カチオン性リポソームに結合していても良い。

【0051】

なお、本明細書において、shRNAを備えたPEG修飾カチオン性リポソームを、「PEG修飾リポプレックス」と呼ぶ場合がある。

【0052】

下記実施例にて詳述されるように、in vivo投与により上記shRNAを備えたPEG修飾カチオン性リポソームは腫瘍細胞の増殖を抑制することが可能であり、癌を治療するための抗腫瘍剤として使用できる。

【0053】

本発明の抗腫瘍剤を用いて治療できる癌としては、TSを高発現している癌が挙げられ、特に制限されるものではないが、例えば、結腸・直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、頭頸部癌、食道癌、胃癌、胆道癌、胆のう・胆管癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣腫瘍、骨・軟部肉腫、白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、皮膚癌、脳腫瘍、悪性胸膜中皮腫等が挙げられる。好ましくは結腸・直腸癌、胃癌、

頭頸部癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、胆道癌、肝臓癌、悪性胸膜中皮腫であり、特に好ましくは結腸・直腸癌、悪性胸膜中皮腫である。

【0054】

本発明の抗腫瘍剤はまた、shRNAを備えたPEG修飾カチオン性リポソームと共に、医薬の製造において通常用いられている、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、pH調整剤、緩衝剤、安定化剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤、ヒスチジン等を含んでも良い。

【0055】

賦形剤としては、例えば、乳糖、ショ糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、マルトース、マンニトール、エリスリトール、キシリトール、マルチトール、イノシトール、デキストラン、ソルビトール、アルブミン、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸、メチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴムおよびこれらの混合物等が挙げられる。滑沢剤としては、例えば、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコールおよびこれらの混合物等が挙げられる。結合剤としては、例えば、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、エチルセルロース、水、エタノール、リン酸カリウムおよびこれらの混合物等が挙げられる。崩壊剤としては、例えば、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖およびこれらの混合物等が挙げられる。希釈剤としては、例えば、水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類およびこれらの混合物等が挙げられる。安定化剤としては、例えば、ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、チオグリコール酸、チオ乳酸およびこれらの混合物等が挙げられる。等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、ホウ酸、ブドウ糖、グリセリンおよびこれらの混合物等が挙げられる。pH調整剤および緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、クエン酸、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウムおよびこれらの混合物等が挙げられる。

【0056】

本発明の抗腫瘍剤は、経口投与または非経口投与（例えば、静脈内投与、動脈内投与、注射による局所投与、腹腔または胸腔への投与、皮下投与、筋肉内投与、舌下投与、経皮吸収または直腸内投与など）によって、投与することができる。好ましくは、本発明の抗腫瘍剤は、静脈内投与、腹腔内投与または胸腔内投与である。

【0057】

また、本発明の抗腫瘍剤は、投与経路に応じて適当な剤形とすることができる。具体的には注射剤、懸濁剤、乳化剤、軟膏剤、クリーム剤錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、細粒剤、トローチ錠、直腸投与剤、油脂性坐剤、水溶性坐剤等の各種製剤形態に調製することができる。

【0058】

本発明の抗腫瘍剤の効果は、上記癌に由来する細胞や組織、および上記癌に罹患する個体に当該抗腫瘍剤を投与し、腫瘍の大きさが当該抗腫瘍剤を投与していない（または投与前の）細胞や組織、および個体における腫瘍の大きさと比較して、腫瘍が縮小または消滅していることを指標にして評価することが可能である。本発明の抗腫瘍剤の効果の評価するのに利用できる癌細胞として、TSが発現していれば癌種等は特に制限されず、例えば、ヒト結腸直腸癌細胞株DLD-1、DLD-1/5FU（5-FU耐性のDLD-1株）、KM12C/5FU（5-FU耐性のKM12C株）、HT29/5FU（5-FU耐性のHT29株）、ヒト胃癌細胞株NUGC-3/5FU（5-FU耐性のNUGC-3株）、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株（MSTO 211H）等が挙げられる。

【0059】

本発明の抗腫瘍剤の効果は、TSのmRNAを標的とする当業者に公知のRNAi分子を有効成分とする抗腫瘍剤と比べて、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、またはそれ以上の抗腫瘍効果を有し得る。

【0060】

従来的にshRNAの標的細胞へのin vivo送達は、shRNAをコードするDNAを含むウイルスベクターが利用されており(WO2010/113844)、当該ウイルスベクター注入時の水圧またはウイルス感染により当該shRNAをコードするDNAは細胞内に移行し、核内でshRNAは発現する。発現されたshRNAは、内在性のshRNAと同様に、ダイサーと呼ばれる酵素と接触してステムループ構造が切り出され、相補的な二本鎖RNAからなるsiRNAとなりRNAi作用を生じる。一方、本発明の抗腫瘍剤は経口または非経口投与により、PEG修飾カチオン性リポソームに担持されるshRNAを腫瘍細胞に送達する。腫瘍細胞に送達されたshRNAはエンドサイトーシスにより細胞内へ移行する。すなわち、上記従来技術と異なり、本発明におけるshRNAは標的細胞にて発現されたものではない。このようにin vivoにおいて細胞外から導入されたshRNAが分解されることなくRNAi作用を発揮し、標的細胞にて発現される内在性の遺伝子の発現を抑制できることは、本発明者らによって初めて見出されたことである。

10

【0061】

また、PEG修飾カチオン性リポソームにsiRNAを担持させる場合、その製造過程において相補的な二本鎖を形成していない、センス鎖またはアンチセンス鎖のみが担持される可能性がある。このようなセンス鎖またはアンチセンス鎖のみが担持されたPEG修飾カチオン性リポソームは不純物であるといえ、医薬品という観点から望ましくない。一方、shRNAをPEG修飾カチオン性リポソームに担持させることによって、上記のような不純物が生じる可能性は低く、医薬品という観点から望ましいといえる。

20

【0062】

本発明の抗腫瘍剤は、既存の化学療法剤と共に使用することができる。既存の化学療法剤としては、TS阻害作用を有する抗腫瘍剤が挙げられる。

【0063】

「TS阻害作用を有する抗腫瘍剤」としては、TSの機能を阻害しうる限り特に限定されず、例えば、5-FU系抗腫瘍剤、ペメトレキセドナトリウム水和物、ラルチトレキセド(Tomodex)、メトトレキサート(MTX)、OSI-7904L(OSI社)などが挙げられる。

30

【0064】

TSの発現量と5-FU系抗腫瘍剤の感受性の関係が報告されている(Patrick G. Johnston et al., Cancer Res 1995; 55:1407-12. およびKun-Huei Yeh et al., Cancer 1998; 82:1626-31)。癌患者の中でもTSの発現が比較的低い癌患者は、5-FU系抗腫瘍剤が顕著に奏効する一方で、癌患者の中でもTSの発現が比較的亢進している癌患者の多くは、5-FU系抗腫瘍剤に対して耐性を有する。本発明の抗腫瘍剤を投与することによって、腫瘍組織内のTSの産生を抑えることができ、当該腫瘍組織の5-FU系抗腫瘍剤の感受性を高めることができる。また、上記PEG修飾カチオン性リポソームは、5-FU系抗腫瘍剤と併用した場合に、選択的に腫瘍内に蓄積される(Yusuke Doi et al., Cancer Sci, November, 2010, vol. 101, no. 11, 2470-2475)。

40

【0065】

これらの効果によって、5-FU系抗腫瘍剤と併用した場合に、当該PEG修飾カチオン性リポソームを含む本発明の抗腫瘍剤は、上記shRNAを腫瘍に効率的に送達することが可能であり、5-FU系抗腫瘍剤または本発明の抗腫瘍剤を単独で用いた場合と比べて、2倍、3倍、4倍、5倍またはそれ以上の顕著に高い抗腫瘍効果を得ることができる。

50

【0066】

「5-FU系抗腫瘍剤」としては、5-FUおよび活性代謝物質が5-FUである5-FU誘導体が挙げられる。5-FU誘導体としては例えば、テガフルを含有するものを挙げることができる。5-FU誘導体としては好ましくは、テガフル含有配合剤であり、具体的には、テガフル・ウラシル配合剤（例えば、ユーエフティ（登録商標）（大鵬薬品工業株式会社））、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤などが例示できる。この中でも、下記に詳述されるテガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤、例えばティーエスワン（登録商標）（大鵬薬品工業株式会社）が特に好ましい。なお、本明細書において、5-FU系抗腫瘍剤を「S-1」、「TS-1」と記載する場合があるが、これらの用語は相互に互換的に用いられる。

10

【0067】

また、ペメトレキセドナトリウム水和物としては、アリムタ（登録商標）（日本イーライリリー株式会社）が挙げられる。ペメトレキセドナトリウム水和物も、上記5-FU系抗腫瘍剤と同様に、本発明の抗腫瘍剤との併用により、上記shRNAを腫瘍に効率的に送達することが可能である、および／または当該ペメトレキセドナトリウム水和物または本発明の抗腫瘍剤を単独で用いた場合と比べて、2倍、3倍、4倍、5倍またはそれ以上の顕著に高い抗腫瘍効果を得ることができる。

【0068】

本発明の抗腫瘍剤は、上記TS阻害作用を有する抗腫瘍剤に加えて、または変えて、他の既存の化学療法剤と共に使用することができる。このような化学療法剤としては、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード N-オキシド、イホスファサミド、メルファラン、ブスルファン、ミトブロニトール、カルボコン、チオテパ、ラニムスチン、ニムスチン、テモゾロミド、カルムスチン、ペメトレクスドジソディウム、メトトレキサート、6-メルカプトプリンリボシド、メルカプトプリン、ドキシフルリジン、カルモフル、シタラビン、シタラビンオクホスファート、エノシタビン、ゲムシタビン、フルダラビン、ペメトレキセド、シスプラチン、カルボプラチン、オキザリプラチン、パクリタキセル、ドセタキセル、塩酸イリノテカン、カペシタビンなどが挙げられ、これらから選択される一または複数の化学療法剤を用いることができる。これらの化学療法剤も、上記TS阻害作用を有する抗腫瘍剤と同様に、本発明の抗腫瘍剤との併用により、上記shRNAを腫瘍に効率的に送達することが可能である、および／または当該化学療法剤または本発明の抗腫瘍剤を単独で用いた場合と比べて、2倍、3倍、4倍、5倍またはそれ以上の顕著に高い抗腫瘍効果を得ることができる。

20

30

【0069】

本発明の抗腫瘍剤と、上記既存の化学療法剤とは併用投与される限り、組み合わせ物として提供することができる。

【0070】

「組み合わせ物」は、本発明の抗腫瘍剤と上記既存の化学療法剤とを有効成分として含む配合剤であっても良いし、ならびに本発明の抗腫瘍剤と上記既存の化学療法剤を併用投与に適した単一のパッケージ（キット製剤）として製造・包装・流通されるものでもあっても良い。

40

【0071】

「併用投与」には、本発明の抗腫瘍剤と上記既存の化学療法剤とを同時に投与する場合だけでなく、本発明の抗腫瘍剤および上記既存の化学療法剤を間隔をあけて投与する場合も含まれる。

【0072】

本発明の抗腫瘍剤の投与量および投与回数は、患者の年齢、体重、疾患の重篤度などの要因によって変化し得るが、shRNAの量にして1回につき体重1kgあたり0.0001mg～100mgの範囲から適宜選択される量を、1日に1～3回、毎日または1～21日毎に投与することができる。本発明の抗腫瘍剤に含まれる上記shRNAを備えたPEG修飾カチオン性リポソームは、従来公知のRNAi分子とリポソームからなる複合

50

体（リポブレックス）と比べて高い血中滞留性を有するために、頻回投与を回避することができる。これによって、投与された生体内における免疫系の異物認識を受け難くすることができる。

【0073】

上記既存の化学療法剤の投与量は、有効成分である化学物質の種類、患者の年齢、体重、疾患の重篤度などの要因によって変化し得るが、1回につき体重1kgあたり0.0001mg～1000mgの範囲から適宜選択される量を、1日に1～3回、毎日または1～14日毎に投与することができる。例えば、既存の化学療法剤が5-FU系抗腫瘍剤である場合、1日にテガフルにして60～160mgを毎日または1～7日毎に投与することができる。上記既存の化学療法剤は単独で用いる場合と比べて、低用量かつ頻回投与
10

【0074】

本発明はまた、上記本発明の抗腫瘍剤を用いた癌の治療方法に関する。当該方法により治療し得る癌としては、上に定義したような癌が含まれる。また、当該方法において上記本発明の抗腫瘍剤および既存の化学療法剤の用法および用量は上記したとおりである。

【実施例】

20

【0075】

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳しく説明する。しかしながら、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0076】

実施例1：RNAi分子の調製

以下のsiRNAおよびshRNAを、公知の一般的な手法に基づいて合成した。

【0077】

(I) TSを標的とするsiRNA

TSを標的とするsiRNAは、抗腫瘍効果が既に確認されているTSに対するsiRNA（WO2010/113844）に基づいて合成されており、以下のセンス鎖および
30

【0078】

センス鎖：

5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3'（配列番号1）

アンチセンス鎖：

5'-UCAUGAUCGAUGGUGUUA-3'（配列番号2）

なお、以下、TSを標的とするsiRNAを「siTS」と記載する。

【0079】

(II) ルシフェラーゼを標的とするsiRNA

対照のsiRNAとして、ルシフェラーゼを標的とするsiRNAを合成した。当該siRNAは以下のセンス鎖およびアンチセンス鎖からなる。
40

【0080】

センス鎖：

5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATT-3'（配列番号9）

アンチセンス鎖：

5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGTT-3'（配列番号10）

なお、以下、ルシフェラーゼを標的とするsiRNAを「siCont」と記載する。

【0081】

(III) TSを標的とするshRNA

TSを標的とするshRNAは、抗腫瘍効果が既に確認されているTSに対するshR
50

NA (WO2010/113844) に基づいて合成されており、以下の配列を有する。

【0082】

TS-shRNA:

5'-GUAACACCAUCGAUCAUGAUAGUGCUCCUGGUUGUCAUGAUCGAUGGUGUUACUU-3' (配列番号8)

3'末端の2つのウラシル(オーバーハング)を有する点で、前記公知のTSに対するshRNAと異なる。なお、以下、TSを標的とするshRNAを「shTS」と記載する。

【0083】

実施例2: siRNAおよびshRNAによるTS発現抑制

10

<トランスフェクション>

トランスフェクション試薬には、カチオニックリポソームの一種であるLipofectamineTM RNAi MAX (以下、「Lf RNAi MAX」と記載)を使用した。

【0084】

実施例1で調製したshRNAまたはsiRNAならびにLf RNAi MAXをそれぞれ、OptiMEMで希釈し、shRNAまたはsiRNAとLf RNAi MAXの比率が100 (pmol): 5 (μL) になるように混合した。このとき、shRNAまたはsiRNA溶液とLf RNAi MAX溶液の量は等量とした。この混合液を10~20分間室温で放置することで複合体(リポプレックス)を形成した。

20

【0085】

各リポプレックスを、あらかじめOptiMEMの入っている10cmディッシュにそれぞれ直接添加し、合計容積が5mlとなるように調整した。次にDLDD-1もしくはDLDD-1/FU細胞懸濁液10mlを当該ディッシュに500,000細胞/ディッシュとなるように播種し、最終合計容積を15mlとし、トランスフェクションを行った。このとき、shRNAまたはsiRNAの最終濃度が1, 5, 10nMとなるように調整した。トランスフェクションを開始してから37℃、5%CO₂条件下、培地中で72時間培養し、その後、以下の方法により細胞抽出液を調製した。

【0086】

<細胞抽出液の調製>

30

トランスフェクションを開始してから72時間後、培地を除去し、冷PBS(-)で洗浄した後、トリプシン溶液を用いて細胞をはがし、遠心して上清を取り除いた。さらに冷PBS(-)で洗浄後、冷Lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH7.4), 1%NP-40, 0.25%デオキシコール酸ナトリウム, 150mM NaClおよびProtease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, MO, USA))を100~150μL添加し、1時間、氷上(4℃)の条件下インキュベートして細胞を溶解した。その後、遠心分離し(15,000×g、15分間、4℃)、得られた上清を細胞抽出液とした。

【0087】

<SDS-PAGE用サンプルの調製>

40

上記細胞抽出液と2×サンプルバッファーを等量ずつ混合し、95℃に設定したマイクロチューブ用ホットプレートを用いて3分間加熱した。その後30秒間遠心し、室温で冷ましてSDS-PAGE用サンプルとした。

【0088】

<SDS-PAGE>

上記サンプルを6μL (9μgタンパク質/レーン) ずつゲルにアプライし、パワーサプライ(Bio-Rad laboratories)とつないでゲル2枚で40mA (ゲル1枚では20mA) の定電流で約80分間電気泳動した。

【0089】

<ウェスタンブロッティング>

50

適当な大きさに切ったろ紙及びHybond-ECLを、前処理としてブロッキングバッファーに浸した。SDS-PAGE後、トランスファー装置を用いてタンパクをHybond-ECLに転写した。転写したHybond-ECLをブロッキングバッファー（5%スキムミルク）に浸して室温で1時間ブロッキングし、Tween bufferで5分間3回洗浄した。

【0090】

TS及びβ-アクチンを検出するために、Tween bufferで希釈したそれぞれの一次抗体（Mouse monoclonal anti-human TS antibody（1:1000）（ANASPEC, Inc. CA, USA）、Mouse monoclonal anti-human β-actin antibody（1:500）（Bio Vision, Inc., CA, USA））を4℃で一晩反応させた。Tween bufferで5分間3回洗浄後、Tween bufferで希釈した二次抗体（HRP-conjugated goat anti-mouse secondary antibody（1:2000）（MP Biomedicals, LLC, Japan））溶液を室温で1時間反応させた。Tween bufferで5分間3回洗浄後、ECL Chemiluminescence Reagentと約1分間反応させた。目的タンパク質のバンドはX線フィルムにより検出した。

【0091】

結果を図1に示す。

【0092】

実施例1で調製したshRNAおよびsiRNAが、DL D-1細胞およびDL D-1/FU細胞におけるTSの発現を顕著に抑制できることが明らかとなった。

【0093】

実施例3：siRNAおよびshRNAによる癌細胞（ヒト結腸腺癌細胞）増殖阻害効果
本実験では96ウェルプレートスケールで実験を行った。上記実施例2と同様に調製したリポプレックスをあらかじめOptiMEMを入れておいたウェルに直接添加し、全容積が50μlとなるようにした。次にヒト結腸腺癌細胞DL D-1またはDL D-1/FUの細胞懸濁液（2,000細胞/100μl）を、リポプレックスを入れたウェルに添加し（最終合計容積を150μl）トランスフェクションを行った。ここで、ウェル中のshRNAまたはsiRNAの最終濃度は5nMである。

【0094】

トランスフェクション開始24時間後、培地を除去し、既存の化学療法剤5-FU（フルオロウラシル）を含むまたは含まない新しい培地を（200μl）添加した。ここで、DL D-1に対しては5-FUを0.1μg/mLの濃度で、DL D-1/FUに対しては5-FUを10μg/mLの濃度で添加した。新しい培地を添加して0、24、48、72、96時間後、培地を除去し、0.5%MTT（3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド）溶液を50μL加え、4時間、37℃、5%CO₂条件下でインキュベーションした。また細胞の入っていないウェルにも0.5%MTT溶液を加えバックグラウンドとした。

【0095】

インキュベーション終了後、それぞれのウェルに酸性イソプロパノール150μLを加え、シェイカーを用いホルマザン結晶を溶解し、プレートリーダーを用いて、570nmの波長で吸光度を測定し、細胞の増殖率を算出した。

【0096】

細胞の増殖率（%）＝[A₅₇₀（新しい培地を添加してX時間後）/A₅₇₀（新しい培地を添加して0時間後）]×100

結果を図2および3示す。

【0097】

図2および図3に示すとおり、siTSおよびshTSは5-FUの存在下において、DL D-1細胞およびDL D-1/FU細胞の増殖を顕著に阻害した。

【0098】

実施例4：PEG修飾カチオン性リポソームの調製

カチオン性リポソームはBangham法により調製した。

【0099】

カチオン性脂質、すなわちDOPE、POPC、CHOLおよびDC-6-14はそれぞれあらかじめクロロホルムで溶解させ、ストック溶液を調製した。脂質組成がDOPE：POPC：CHOL：DC-6-14＝3：2：3：2（モル比）となるようにそれぞれストック溶液からガラスシリンジを用いて正確に量り取り、栓付き試験管に入れ、混合した（総脂質量として150mmol）。次に、ロータリーエバポレーター（IWAKI、東京）を用いて減圧下クロロホルムを除去し、その後、完全にクロロホルムを取り除くために試験管を一晩真空ポンプに入れ、試験管内に脂質薄膜を形成させた。この脂質薄膜に内水相として9％スクロース溶液（30mL，pH7.4）を加え、37℃で激しく攪拌することで脂質薄膜を完全に水和させ、MLV（multilamellar vesicle）を得た（最終脂質濃度は50mM）。この溶液を37℃に加温しながら、200、100、50nmのポリカーボネート膜（Nucleopore，CA，USA）を用いてエクストリュージョン法により粒子径が約100nmとなるLUV（large unilamellar vesicle）を調製した。リポソームの粒子径（動的光散乱法）及びゼータ電位（電気泳動光散乱法）はNICOMP 370（Particle Sizing System，CA，USA）により測定した。調製したリポソームの平均粒子径119.9nmであり、ゼータ電位は25.56mVであった。

【0100】

リポソームへのPEG修飾は、ポストインサクション法により行った。基本となるリポソームを調製後、9％スクロース溶液中に完全に溶解させたmPEG₂₀₀₀-DSPCを脂質（DOPE、POPC、CHOL、DC-6-14）総量に対してモル比で5％となるようにリポソーム溶液に添加し、振盪機付きインキュベータ中で37℃、1時間、軽く振盪させながら行った。

【0101】

実施例5：PEG修飾リポプレックスの調製

PEG修飾リポプレックスは、上記実施例4で調製したPEG修飾カチオン性リポソームと上記実施例1で調製したshTSとを、カチオン性リポソーム：shTS＝2000：1（モル比）となるように混合し、10分間激しく攪拌することで調製した。調製したPEG修飾lipoplexの平均粒子径及びゼータ電位は、286.8nm及び15.81mVであった。

【0102】

実施例6：PEG修飾リポプレックスのDL D-1担がんマウスへの全身投与による抗腫瘍効果

DL D-1担がんマウスの作製

BALB/c nu/nu雄性マウスの皮下にDL D-1細胞懸濁液（ 2×10^6 細胞／100μL）を接種した。細胞移植8日後、腫瘍体積が50－100mm³に達したマウスをin vivoの実験に用いた。

【0103】

PEG修飾リポプレックスの制がん活性評価

上記DL D-1担がんマウスに対し、腫瘍移植後8日目からPEG修飾リポプレックスをshRNA量で80μg／300μLずつ1日間隔で合計8回マウス尾静脈より投与した。

【0104】

既存の化学療法剤「TS-1」（大鵬薬品工業）を併用する場合には、腫瘍移植後8日目から、6.9mgテガフル／kgの用量で15日間、毎日経口投与した。

【0105】

制がん活性は、腫瘍体積変化と体重変化について検討した。

【0106】

腫瘍体積は以下の式に基づいて算出した。

【0107】

腫瘍体積 (mm^3) = (腫瘍の長辺) $\times$ (腫瘍の短辺)² $\times 0.5$

結果を図4および図5に示す。

【0108】

対象群と比較して、TS-1またはPEG修飾リポプレックスを単独で用いて処置した群では約34%の腫瘍成長抑制効果が示された。一方、TS-1およびPEG修飾リポプレックスの併用処置群では約66%の腫瘍成長抑制効果が示された。いずれの処置群においても体重増加抑制を含む、重篤な毒性は見られなかった。また、図5に示されるとおり、PEG修飾リポプレックスとTS-1とを併用することによって、腫瘍成長が顕著に抑制されることが確認できた。

10

【0109】

実施例7：shRNAによる癌細胞（ヒト悪性胸膜中皮腫細胞）増殖阻害効果

本実験は、ヒト結腸腺癌細胞DLD-1またはDLD-1/FUに代えて、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞MSTO 211Hを癌細胞として使用し、5-FUに代えて、ペメトレキセドナトリウム水和物（アリムタ（日本イーライリリー株式会社））を既存の化学療法剤として使用した点を除いて、上記実施例3と同様の方法を用いて行った。なお、トランスフェクションを行う際の、ウェル中のshRNAの最終濃度は5nMおよび10nMに調整し、ペメトレキセドナトリウム水和物は10ng/mLの濃度で培地に添加して用いた。

20

【0110】

細胞の増殖率は、上記実施例3と同様の方法で測定した。結果を図6に示す。

【0111】

図6に示すとおり、shTSはペメトレキセドナトリウム水和物の存在下において、MSTO 211H細胞の増殖を顕著に阻害した。

【0112】

実施例8：PEG修飾リポプレックスのMSTO 211H担がんマウスへの全身投与による抗腫瘍効果

MSTO 211H担がんマウスの作製

30

BALB/c nu/nu雄性マウスの皮下にMSTO 211H細胞懸濁液（ 5×10^6 細胞/ $100 \mu\text{L}$ ）を接種した。細胞移植14日後、腫瘍体積が $50 - 100 \text{mm}^3$ に達した事を確認し、in vivoの実験に用いた。

【0113】

PEG修飾リポプレックスのMSTO 211H担がんマウスにおける制がん活性評価

上記MSTO 211H担がんマウスに対し、腫瘍移植後14日目から、上記実施例5で調製したPEG修飾リポプレックスをshRNA量で $40 \mu\text{g} / 200 \mu\text{L}$ ずつ1日間隔で合計6回マウス尾静脈より投与した。

【0114】

既存の化学療法剤ペメトレキセドナトリウム水和物（アリムタ（日本イーライリリー株式会社））を併用する場合には、腫瘍移植後14日目から、 $100 \text{mg} / \text{kg}$ の用量で6回（1, 2, 3, 8, 9, 10日目）腹腔内投与した。

40

【0115】

制がん活性は、投与開始後21日目における腫瘍増殖抑制率（TGI（%））で示し、TGI（%）は上記実施例6と同様に算出した。

【0116】

結果を図7に示す。

【0117】

ペメトレキセドナトリウム水和物、またはTSに対するshRNA（TS shRNA）を含むPEG修飾リポプレックス、を単独で用いて処置した群ではそれぞれ約28%、

50

約 19 % の腫瘍成長抑制効果が示された。また、ペメトレキセドナトリウム水和物と標的をもたない shRNA (NS-shRNA) を含む PEG 修飾リポプレックスを併用した場合、約 22 % の腫瘍成長抑制効果が示されたが、これはペメトレキセドナトリウム水和物単独処置群における腫瘍成長抑制効果と同等であった。一方、ペメトレキセドナトリウム水和物および TS-shRNA を含む PEG 修飾リポプレックスの併用処置群では約 42 % の腫瘍成長抑制効果が示された。図 7 に示すとおり、ペメトレキセドナトリウム水和物および TS-shRNA を含む PEG 修飾リポプレックスとを併用することによって、腫瘍成長が顕著に抑制されることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0118】

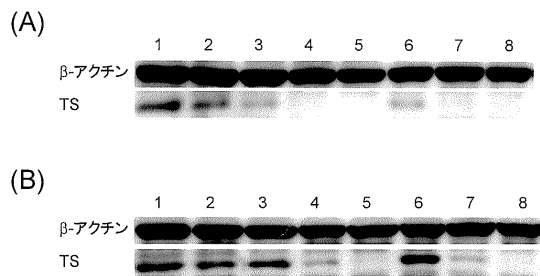
本発明に係るチミジル酸合成酵素に対する shRNA 分子を含むリポソームを有効成分とする抗腫瘍剤は、*in vivo* 投与により、TS を発現する腫瘍の増殖を抑制することが可能である。さらに、当該抗腫瘍剤を化学療法剤と併用することによって、癌組織への指向性を高め抗腫瘍効果を顕著に向上させることができる。本発明は癌治療の分野における貢献が期待される。

【0119】

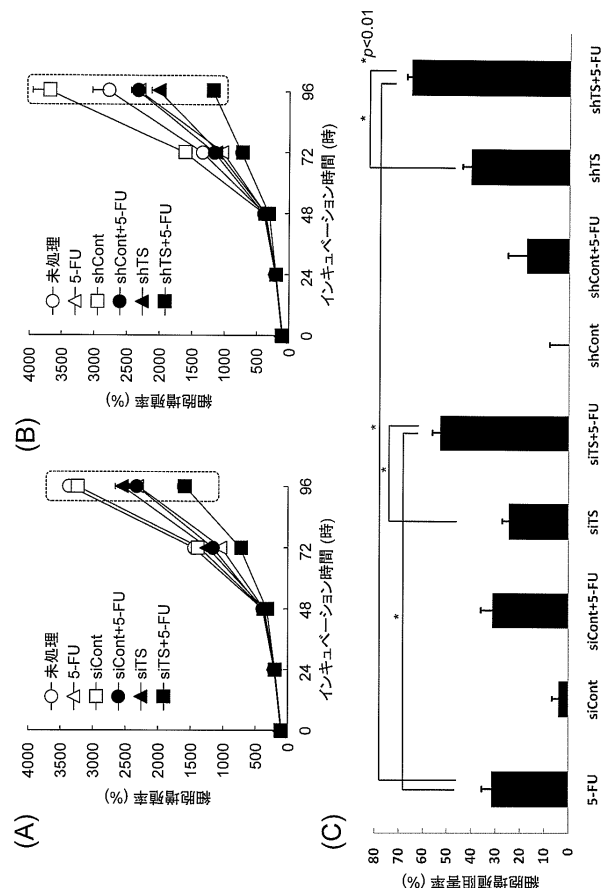
本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

10

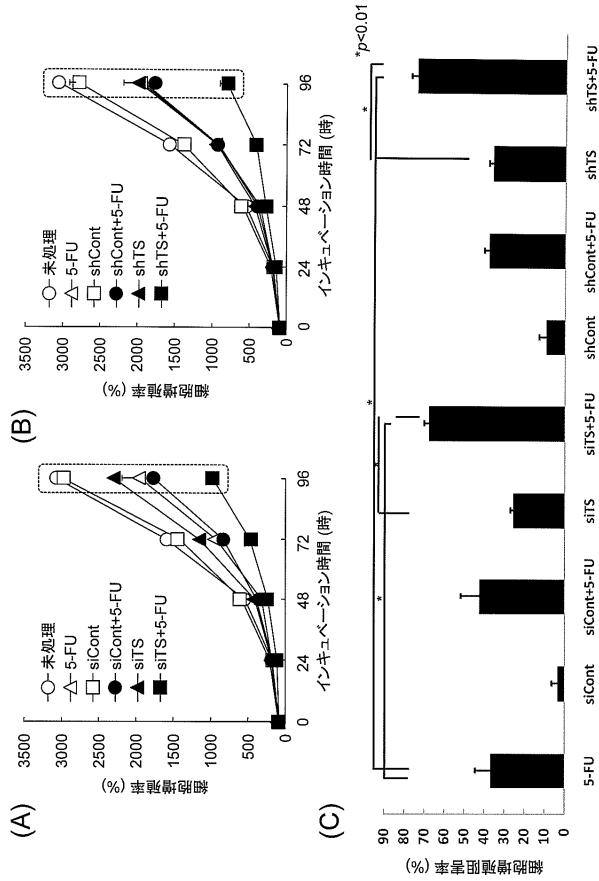
【図 1】



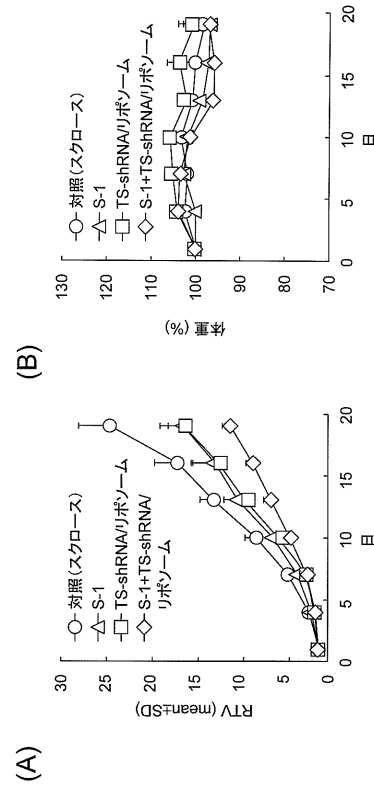
【図 2】



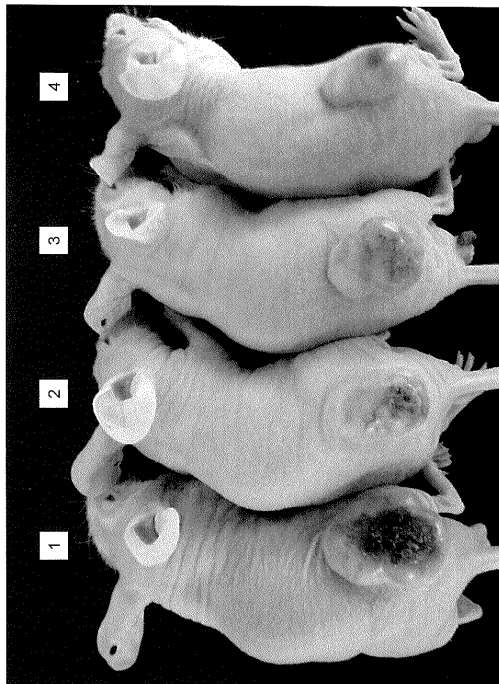
【図 3】



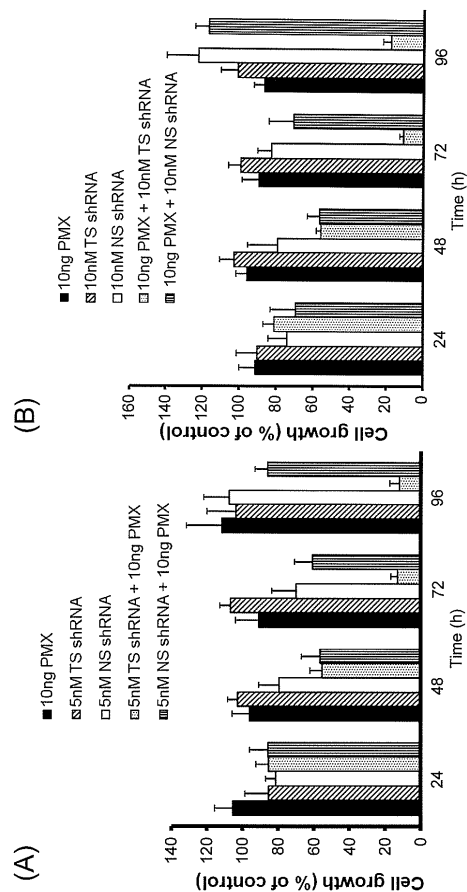
【図 4】



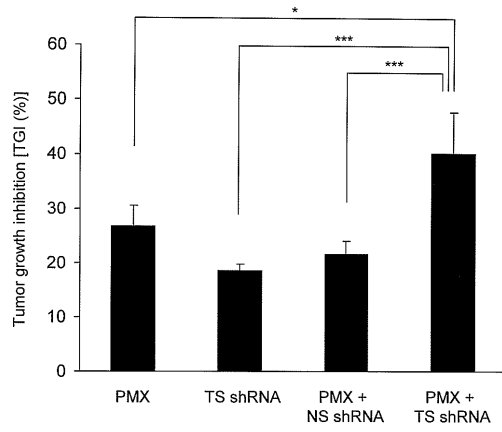
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0005941460000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 31/519	(2006.01)	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 K 31/513	(2006.01)	A 6 1 K 31/513	
A 6 1 K 31/45	(2006.01)	A 6 1 K 31/45	
A 6 1 K 31/53	(2006.01)	A 6 1 K 31/53	
C 1 2 N 15/113	(2010.01)	C 1 2 N 15/00	G

(72)発明者 和田 洋巳
京都府京都市左京区田中大久保町46-1 フォルム洛北602号

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 国際公開第2010/113844 (WO, A1)
特開2005-253342 (JP, A)
石田竜弘ら, 腫瘍内微小環境変化を利用したsiRNAデリバリーシステムの開発, 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム講演要旨集, 2010年11月29日, Vol.32, 7-8
上原 友美, 核酸含有PEG修飾ナノキャリアによるTLR刺激が及ぼすanti-PEG IgM分泌誘導への影響, 日本薬学会 第131年会 発表要旨, 2011年 2月 1日, 29P-0464, インターネット (http://nenkai.pharm.or.jp/131/pc/imulti_result.asp)
Kim HK et al., Enhanced siRNA delivery using cationic liposomes with new polyarginine-conjugated PEG-lipid., Int J Pharm., 2010年 5月25日, 392(1-2), 141-7
JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 2009年, VOL.137, P.234-240

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 31/00-33/44
A 6 1 K 45/00-45/08
A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 47/00-47/48
C 1 2 N 15/113
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)