

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4903146号
(P4903146)

(45) 発行日 平成24年3月28日 (2012. 3. 28)

(24) 登録日 平成24年1月13日 (2012. 1. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)
 A 6 1 K 48/00 (2006. 01)
 A 6 1 K 31/713 (2006. 01)
 A 6 1 K 47/48 (2006. 01)
 A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 31/713
 A 6 1 K 47/48
 A 6 1 P 35/00

請求項の数 14 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-527944 (P2007-527944)
 (86) (22) 出願日 平成17年8月15日 (2005. 8. 15)
 (65) 公表番号 特表2008-509705 (P2008-509705A)
 (43) 公表日 平成20年4月3日 (2008. 4. 3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/029111
 (87) 国際公開番号 W02006/023491
 (87) 国際公開日 平成18年3月2日 (2006. 3. 2)
 審査請求日 平成20年6月26日 (2008. 6. 26)
 (31) 優先権主張番号 60/601, 950
 (32) 優先日 平成16年8月16日 (2004. 8. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502444076
 イミューン ディズィーズ インスティテ
 ユート インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
 ストン ハンチントン アベニュー 80
 O
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 リーバーマン ジュディー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブ
 ルックリン バックミンスター ロード
 63

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNA干渉を送達する方法およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

融合タンパク質-二本鎖RNA複合体を含む、全身投与によるRNA干渉誘導二本鎖RNAの選択的な送達のために用いられる医薬製剤であって、
 該融合タンパク質-二本鎖RNA複合体が、

(a) 鎖の一方がRNA干渉の標的RNAに対して相補的であっても一方の鎖がそれと同一である二本鎖RNAセグメントを含むRNA分子；ならびに

(b) (1) 標的細胞の表面上にある抗原と特異的に結合する抗体、および(2) 二本鎖RNAと結合するプロタミントタンパク質、または、二本鎖RNAと結合するプロタミントタンパク質の断片を含む融合タンパク質を含み、
 該融合タンパク質-二本鎖RNA複合体が標的細胞においてRNA干渉を選択的に開始させる、
 医薬製剤。

【請求項 2】

二本鎖RNAがsiRNAである、請求項1記載の医薬製剤。

【請求項 3】

抗体が、ウイルスエンベロープタンパク質、細胞受容体、または活性化受容体の細胞外ドメインに対する抗体である、請求項1記載の医薬製剤。

【請求項 4】

抗体が一本鎖抗体、抗体のFab部分、または(Fab')₂セグメントである、請求項1記載の医薬製剤。

【請求項 5】

抗体がErbB2を認識する、請求項4記載の医薬製剤。

【請求項 6】

抗体がgp120またはgp160を認識する、請求項4記載の医薬製剤。

【請求項 7】

標的細胞の表面上にある抗原が、CD4、CCR5、およびCXCR4からなる群より選択される、請求項1記載の医薬製剤。

【請求項 8】

二本鎖RNAが、c-myc、VEGF、CD4、CCR5、gag、MDM2、Apex、Ku70、またはErbB2をコードするmRNAを標的とする、請求項1記載の医薬製剤。

10

【請求項 9】

標的細胞が、肝細胞、筋細胞、神経細胞、リボサイト、リンパ球、マクロファージ、心筋細胞、内皮細胞、および上皮細胞からなる群より選択される、請求項1記載の医薬製剤。

【請求項 10】

標的細胞が悪性細胞である、請求項1記載の医薬製剤。

【請求項 11】

悪性細胞が、肺癌細胞、網膜癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、頭頸部癌細胞、リンパ腫細胞、黒色腫細胞、神経膠腫細胞、膀胱癌細胞、泌尿生殖器癌細胞、胃癌細胞、膵癌細胞、肝癌細胞、腎癌細胞、および胃腸癌細胞からなる群より選択される、請求項10記載の医薬製剤。

20

【請求項 12】

標的細胞が幹細胞である、請求項1記載の医薬製剤。

【請求項 13】

幹細胞が成体幹細胞である、請求項12記載の医薬製剤。

【請求項 14】

幹細胞が胚性幹細胞である、請求項12記載の医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

発明の分野

本発明は、RNA干渉の方法、特に標的細胞内への短鎖干渉性RNA(siRNA)の送達の方法を対象とする。

【0002】

政府の支援

本発明は、National Institutes of Health(NIH)の助成金番号第AI056900号による支援を受けた；米国政府はそれに対して一定の権利を有する。

【0003】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法施行規則119条(e)項に基づき、2004年8月16日に提出された米国仮出願第60/601,950号の恩典を主張し、そのすべての内容は参照として本明細書に組み入れられる。

40

【背景技術】

【0004】

発明の背景

特定のmRNAを特異的に破壊するかその発現を阻止し、それによって遺伝子発現を減弱または消失させるために外因性の二本鎖RNA(dsRNA)を細胞内に導入する手法である、RNA干渉(RNAi)に対しては、最近大きな注目が集まっている(A. Fire et al., "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," *Nature*, 391: 806-11, 1998(非特許文献1))。短鎖干渉性RNA(siRNA)およびマイクロ干渉性R

50

NA(miRNA)などの特定の型のRNAは、数多くの特異的遺伝子の発現を効果的に阻害することが示されており、その手法はショウジョウバエ、セノラブディティス-エレガンス(*Caenorhabditis elegans*)、植物において、そして最近では哺乳動物細胞培養物においても有効であることが証明されている(S.M. Elbashir et al., "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells," *Nature*, 411: 494-8, 2001 (非特許文献2))。短鎖干渉性RNA分子は特異的な標的へと向かい、それによって特異的遺伝子のサイレンシングを行うため、それらは疾患の治療において、さらには医薬品標的の決定のための新たな医薬品および疾患機構のスクリーニングのためにも有用であることが示唆されている。しかし、治療法およびスクリーニング法の両方でさまざまな応用が示唆されているものの、siRNAおよびmiRNAを含むRNA干渉性因子の細胞内への送達がボトルネックとなることが判明している。

10

【0005】

RNA干渉を細胞内に送達するための現在の公知の方法には、脂質を利用する、アミンを利用する、およびポリマーを利用する手法、ならびにそれらの組み合わせを用いる、化学的トランスフェクションが含まれる(例えば、Ambion Inc., Austin, TX; および、Merck KGaA, Darmstadt, Germanyの関連会社であるNovagen, EMD Biosciences, Inc.からの製品を参照のこと)。残念ながら、化学的トランスフェクションによる、siRNAを含むRNA干渉性因子の初代細胞内への効率的な移入は、少数の細胞種に限定されるように思われる(Ovcharenko D (2003) "Efficient delivery of siRNAs to human primary cells," *Ambion TechNotes* 10(5): 15-16(非特許文献3))。

20

【0006】

siRNAを送達するための、記載されているその他のやり方には、短鎖ヘアピンRNA分子をレンチウイルス構築物などのベクターから発現させること、および電気穿孔法を用いてsiRNA分子を細胞内に導入することが含まれる。しかし、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)レトロウイルスを基にしたネコFIVレンチウイルスベクター、およびヒト免疫不全ウイルス(HIV)を基にしたHIVレンチウイルスベクター系は、永続的な組込みにかかわる問題を抱えている。電気穿孔法は往々にして比較的過酷な処理であり、siRNAをインビボで細胞内に送達するために一般的に用いることはできない。

【0007】

RNA干渉の送達を使用するための、以上に考察した従来のすべての遺伝子送達方法に伴うもう1つの問題は、それらがすべての細胞を非特異的に標的とすることである。したがって、特定の細胞を標的とすることができ、それにより非標的細胞内へのRNA干渉の送達によって引き起こされる潜在的な副作用を最小限に抑えるか回避することができると考えられる遺伝子送達方法を開発することは、有用であると考えられる。加えて、ウイルスベクターを回避しようと考えられ、しかもインビボおよびインビトロの両方でsiRNAを含むRNA干渉の送達のために用いられると考えられる有効な干渉性RNA送達方法が望ましいと考えられる。

30

【0008】

さらに、いくつかの細胞種は、ウイルスベクター、リポソームなどを含む従来のベクターを用いてsiRNAの形質導入を行うのが極めて困難であることが判明している。このような細胞種には、リンパ球ならびに樹状細胞および幹細胞などの免疫系細胞が含まれる。

40

【0009】

したがって、siRNAを含む、発見されているRNA干渉の、治療および薬物スクリーニングにおける潜在能力を十分に活用するためには、インビトロおよびインビボの両方でsiRNAを細胞内に送達するためのやり方を開発することが必要である。

【0010】

【非特許文献1】A. Fire et al., "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," *Nature*, 391: 806-11, 1998

【非特許文献2】S.M. Elbashir et al., "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells," *Nature*, 411: 494-8, 2001

50

【非特許文献3】Ovcharenko D., "Efficient delivery of siRNAs to human primary cells," Ambion TechNotes 10(5): 15-16, 2003

【発明の開示】

【0011】

発明の概要

したがって、本発明は、インビトロおよびインビボの両方で短鎖干渉性RNAの所望の細胞内への標的指向性(targeted)送達を行い、それ故に意図した標的細胞以外へのRNAの進入を回避する、新規の方法を提供する。このため、本発明の方法は、RNA干渉の非特異的ターゲティングによって引き起こされるRNA干渉の潜在的な副作用を抑えた、RNA干渉による特定の細胞の治療を可能にする。さらに、RNA干渉の効果が特異的な標的細胞に集中するため、特異的ターゲティングにより、治療を必要とする対象に投与されるRNA干渉の量を最小限に抑えることもできる。特異的な標的細胞には、癌細胞、ウイルス感染細胞およびある種のウイルスに対する感受性のある細胞が非限定的に含まれる。タンパク質、糖質または脂質などの特有な細胞表面分子を発現する任意の細胞種または細胞種の群を、本発明の方法を用いて標的とすることができる。

10

【0012】

本発明の方法は、細胞ターゲティング部分およびRNA干渉物結合部分を含む複合体または融合分子を、RNA干渉を細胞内に効果的に送達するために用いることができるという所見に基づく。例えば、本発明者らは、抗体-プロタミン融合タンパク質が、siRNAと混合された時に、siRNAと結合し、その抗体によって認識される抗原を発現する細胞内にそのsiRNAを選択的に送達し、その抗原を発現する細胞のみにおける遺伝子発現のサイレンシングをもたらすことを示している。

20

【0013】

細胞ターゲティング部分およびsiRNA結合部分を含む融合タンパク質を、siRNAと混合するか複合体化したものを用いて、本発明者らはまた、通常は形質導入するのが難しい細胞に対するsiRNA分子の送達も示した。

【0014】

加えて、本発明者らは、培養下にある細胞だけでなく生物体内の細胞にも本方法を用いて形質導入を行うことができ、それらを治療的に用いることを示した。本発明者らは、インビボで皮下および静脈内の両方の送達を用いて効率的な送達を示した。

30

【0015】

したがって、1つの態様において、本発明は、細胞を融合タンパク質-二本鎖RNA複合体と接触させる段階を含む、細胞におけるRNA干渉の方法であって、複合体が、(a)鎖の一方がRNA干渉の標的RNAに対して相補的であっても一方の鎖がそれと同一である二本鎖RNAセグメントを含むRNA分子；ならびに(b)(1)標的細胞上のある部位と特異的に結合するターゲティング部分、および(2)二本鎖RNAセグメントと結合する結合部分を含む融合タンパク質を含み、二本鎖RNAセグメントが細胞におけるRNA干渉を開始させるような方法を提供する。1つの好ましい態様において、二本鎖RNAはsiRNAである。

【0016】

前述のように、本発明の方法に従ってRNA干渉を送達するために用いられる融合タンパク質は、ターゲティング部分およびsiRNA結合部分からなる。

40

【0017】

1つの好ましい態様において、ターゲティング部分は、細胞表面に存在する細胞表面受容体に対するリガンドである。1つの態様において、細胞表面受容体はCD4、CCR5またはCXCR4である。例えば、1つの態様において、リガンドはCD4受容体リガンドであり、これはCD4+ T細胞を特異的な標的とさせるために用いることができる。HIVはCD4+ T細胞を特異的に感染させるため、HIV遺伝子の発現のサイレンシングを行うsiRNA分子を、CD4受容体リガンドターゲティング部分を用いて細胞内に選択的かつ効果的に送達することができる。1つの好ましい態様において、本発明に従って有用なリガンドはF105である。F105はsiRNAをHIV感染細胞に向かわせるために用いることができる。

50

【0018】

本明細書中および本明細書の全体を通して用いられる「F105」という用語は、HIV-1 gp120エンベロープ糖タンパク質上の不連続エпитープと結合してgp120とCD4細胞表面受容体との結合を阻止する、HIV感染個体で同定されたモノクローナル抗体F105のことを指す。F105の配列は、Marasco et al., J. Clin Invest 90: 1467-1478, 1992に記載されている。

【0019】

もう1つの好ましい態様において、ターゲット部分は抗体である。例えば、ターゲット部分は、ウイルスエンベロープタンパク質、細胞受容体、活性化受容体の細胞外ドメイン、細胞表面糖質または細胞表面脂質を認識する抗体である。抗体は好ましくは、一本鎖抗体、抗体のFab部分、または(Fab')₂セグメントである。1つの態様において、抗体はErbB2を認識する。

10

【0020】

1つの態様において、結合部分はタンパク質またはタンパク質の核酸結合ドメインであり、結合部分はターゲティング部分のカルボキシ部分と融合している。ターゲティング部分の位置は、構築物のカルボキシル末端もしくはアミノ末端、または融合タンパク質の中間部のいずれであってもよい。または、融合タンパク質が、複数のsiRNA結合部分、および1つまたは複数のターゲティング部分を含んでもよい。

【0021】

1つの好ましい態様において、結合部分は、プロタミン、GCN4、Fos、Jun、TFIIS、FMRI、酵母タンパク質HX、ビジリン(Vigillin)、Mer1、細菌ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、リボソームタンパク質S3、および熱ショックタンパク質からなる群より選択されるタンパク質中に存在する核酸結合ドメインの群より選択される、タンパク質の核酸結合ドメインである。1つの好ましい態様において、結合部分は、タンパク質プロタミンまたはプロタミンのRNA干渉誘導分子結合性断片である。

20

【0022】

標的生物は、任意の単細胞生物または多細胞生物でありうる。標的動物または標的細胞がヒトまたはヒト細胞であるならば、RNA干渉誘導分子との、好ましくはsiRNAとの結合部分は、好ましくはプロタミンまたはプロタミンのRNA結合性断片などのヒトRNA結合部分である。

30

【0023】

1つの態様において、siRNAは、c-myc、VEGF、CD4、CCR5、gag、MDM2、Apex、Ku70、またはErbB2をコードするmRNAを標的とする。

【0024】

1つの態様において、細胞は培養細胞である。または、細胞は器官の一部である。または、細胞は対象動物の一部である。1つの態様において、細胞は、肝細胞、筋細胞、神経細胞、リボサイト、リンパ球、マクロファージ、心筋細胞、内皮細胞および上皮細胞である。もう1つの態様において、細胞は、肺癌細胞、網膜癌細胞、乳癌細胞、卵巢癌細胞、前立腺癌細胞、頭頸部癌細胞、リンパ腫細胞、黒色腫細胞、神経膠腫細胞、膀胱癌細胞、泌尿生殖器癌細胞、胃癌細胞、膵癌細胞、肝癌細胞、腎癌細胞または胃腸癌細胞を含む、悪性細胞である。もう1つの態様において、細胞は、例えば成体幹細胞または胚性幹細胞を含む、幹細胞である。

40

【0025】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、RNA干渉を細胞内に送達する方法であって、細胞を融合タンパク質-二本鎖RNA複合体と接触させる段階を含み、複合体が(a)鎖の一方がRNA干渉の標的RNAに対して相補的であってもう一方の鎖がそれと同一である二本鎖RNAセグメントを含むRNA分子；ならびに(b)(1)標的細胞上のある部位と特異的に結合するターゲティング部分、および(2)二本鎖RNAセグメントと結合する結合部分を含む融合タンパク質を含み、二本鎖RNAセグメントが細胞におけるRNA干渉を開始させるような方法を提供する。好ましくは、二本鎖RNAはsiRNAである。

50

【0026】

1つの態様において、ターゲティング部分は、ウイルスエンベロープタンパク質、細胞受容体、または活性化受容体の細胞外ドメインを認識する抗体を含む、抗体である。好ましくは、抗体は一本鎖抗体、抗体のFab部分、または(Fab')₂セグメントである。好ましくは、抗体はErbB2、gp120またはgp160を認識する。

【0027】

もう1つの好ましい態様において、ターゲティング部分は、細胞表面受容体CD4、CCR5およびCXCR4に対するリガンドを含む、細胞表面受容体リガンドである。

【0028】

1つの態様において、結合部分はタンパク質またはタンパク質の核酸結合ドメインであり、結合部分はターゲティング部分のカルボキシル部分と融合している。好ましくは、結合部分は、GCN4、Fos、Jun、TFIIS、FMRI、酵母タンパク質HX、ビジリン、Mer1、細菌ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、リボソームタンパク質S3、および熱ショックタンパク質からなる群より選択されるタンパク質中に存在する核酸結合ドメインの群より選択される、タンパク質の核酸結合ドメインである。好ましくは、結合部分はタンパク質プロタミンまたはプロタミンのRNA干渉誘導分子結合性断片である。

【0029】

1つの態様において、siRNAは、c-myc、VEGF、CD4、CCR5、gag、MDM2、Apex、Ku70、またはErbB2をコードするmRNAを標的とする。

【0030】

1つの態様において、細胞は培養細胞である。または、細胞は器官の部分である。または、細胞は対象動物の部分である。1つの態様において、細胞は、肝細胞、筋細胞、神経細胞、リボサイト、リンパ球、マクロファージ、心筋細胞、内皮細胞および上皮細胞からなる群より選択される。もう1つの態様において、細胞は、肺癌細胞、網膜癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、頭頸部癌細胞、リンパ腫細胞、黒色腫細胞、神経膠腫細胞、膀胱癌細胞、泌尿生殖器癌細胞、胃癌細胞、膵癌細胞、肝癌細胞、腎癌細胞または胃腸癌細胞を含む、悪性細胞である。もう1つの態様において、細胞は、例えば成体幹細胞または胚性幹細胞を含む、幹細胞である。

【0031】

1つの態様において、本発明は、siRNAをインビボで細胞内に送達する方法を提供する。1つの好ましい態様において、siRNAを含む複合体は、薬学的に許容される担体中にある複合体の腫瘍内への直接注射によって細胞内に送達される。もう1つの態様において、siRNAを含む複合体は、それを薬学的に許容される担体中にある状態で対象に静脈内注射することによって送達される。1つの好ましい方法は、siRNAを含む複合体の局部投与である。1つの態様において、siRNA複合体は腔内に送達される。

【0032】

1つの態様において、本発明は、腫瘍細胞の治療のための方法を提供する。本方法は、腫瘍細胞特異的抗体または腫瘍細胞特異的受容体リガンドを含むターゲット部分を、所望のsiRNA結合タンパク質、例えばプロタミンと融合させる段階、およびsiRNAを融合タンパク質と組み合わせたものを含む混合物を調製する段階、およびこのような複合体を遺伝子発現の腫瘍細胞特異的阻害を必要とする対象内に送達する段階を含む。

【0033】

もう1つの態様において、本発明は、ウイルス性疾患を治療するための方法を提供する。本方法は、ウイルスエンベロープタンパク質特異的抗体を含む標的特異的部分と、siRNA結合部分、好ましくはプロタミンとを含む融合タンパク質を調製する段階、および融合タンパク質を所望のsiRNAと組み合わせる段階、およびこのような複合体を遺伝子発現の感染細胞特異的阻害を必要とする対象内に送達する段階を含む。

【0034】

さらにもう1つの態様において、本発明は、マラリアなどの寄生虫病を治療する方法を提供する。本方法は、寄生虫タンパク質特異的抗体を含む標的特異的部分をsiRNA結合部

10

20

30

40

50

分、好ましくはプロタミンとともに含む融合タンパク質を調製する段階、および融合タンパク質を所望のsiRNAと組み合わせる段階、およびこのような複合体を遺伝子発現の寄生虫特異的阻害を必要とする対象内に送達する段階を含む。

【0035】

1つの態様において、本発明は、薬学的介入の標的のスクリーニングのための方法を提供する。本方法は、複数の異なるsiRNAを、ターゲット部分およびsiRNA結合部分を含む融合タンパク質を特定の複数の異なるsiRNAと組み合わせるか混合したものを用いて、同時並行的な細胞培養環境にある細胞内に送達する段階、ならびにsiRNAにより標的とされた遺伝子のサイレンシングの効果を測定する段階を含む。本方法はさらに、まずsiRNAで処理した細胞内への、低分子量有機分子および/または無機分子、薬物、修飾性ならびに非修飾性の核酸などの被験物質の添加、ならびにsiRNAを用いて特異的遺伝子がサイレンシングを受けた細胞の機能に対する被験物質の添加の効果を測定する段階を含んでもよい。

10

【0036】

発明の詳細な説明

本発明は、インビトロおよびインビボの両方における、RNA干渉の、特に短鎖干渉性RNA (siRNA)分子またはマイクロRNA分子(miRNA)の、細胞内への標的指向性送達のための方法を提供する。これらの方法は、例えば、細胞特異的な遺伝子サイレンシングが望まれる疾患の治療に有用である。

【0037】

RNA干渉(RNAi)は、植物、無脊椎動物および哺乳動物細胞で記載されている転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)の機構である(Sharp P.A. Nature Struct. Biol. 8: 746-750, 2001; Bernstein et al. Nature 409: 363-366, 2001, Hannon, G.J. Nature 418: 244-251, 2002)。哺乳動物において、約30塩基対(bp)長よりも短い短鎖干渉性RNA(siRNA)分子に対する曝露は、標的RNAに対する特異性のあるmRNAの分解につながる(Elbashir et al., Genes Dev. 15: 188-200, 2001; Elbashir et al. EMBO J 20: 6877-6888, 2001)。

20

【0038】

RNAiの利点はその高い特異性および強力な遺伝子サイレンシングにあり、それと相まって、あらゆる遺伝子が潜在的な標的であってあらゆる細胞がそれに必要な装置を有するという事実もある(¹に概説されている)。特異性および標的外作用の活性化について若干の疑問が残されているものの²⁻⁴、これらの問題はいずれもインビボではまだ記述されていない。その上、潜在的ないくつかの不都合な事象を、siRNAの配列の適切な選択またはその化学修飾によって回避しうる可能性が高い。

30

【0039】

siRNAを低分子薬として開発する上での主な障害は、それをインビボで細胞膜を通して、それがRNAi経路に入って配列特異的なmRNA分解を導くことができる場所である細胞質へと送達することである。原形質膜を損傷させる可能性のあるトランスフェクション試薬または高い圧力が存在しなければ、自らの環境のサンプリングを能動的に行うマクロファージなどの細胞を含め、ほとんどの細胞はsiRNAを取り込まない。1件の報告では、トランスフェクション試薬を伴わずに投与されたsiRNAの点鼻注入によって、肺における呼吸合包体ウィルス感染症に対する防御が達成されているため、1つの例外は肺上皮細胞であると思われる⁵。マウスにおけるsiRNAの治療能力を実証した初期の研究では、siRNAを細胞内に強制的に入れるために高圧(いわゆるハイドロダイナミック)静脈内注射を用いている⁶。しかし、ハイドロダイナミック注射は右心ええ不全の原因となり、ヒトでの全身的使用には現実的でない。トランスフェクションはsiRNAを局所的に送達することができるが、細胞表面受容体を介してsiRNAを特定の細胞に送達するための全身的な方法は、最大限の治療的恩典を実現し、必要な薬物の量を減らし、バースタンダー細胞における非特異的なサイレンシングおよび毒性を回避するために、siRNAを所望の細胞に導入するための手段を提供すると考えられる。

40

【0040】

本発明者らは、精子においてDNAを凝集させるプロタミンの核酸結合特性を、抗体Fab断

50

片-プロタミン融合タンパク質を介してsiRNAを送達するために利用した⁷。Fab断片は、補体およびその他の分子と抗体定常領域との相互作用による潜在的な副作用を回避するために用いた。HIVエンベロープを対象とするFab抗体断片(F105)をプロタミンと融合したもの(F105-P、これはHIV感染細胞にプラスミドDNAを運ぶことが以前に示されている^{7,8})を、HIV感染細胞またはHIV envを発現するようにトランスフェクトされた細胞に特異的にsiRNAを送達して、遺伝子発現のサイレンシングを行わせるために用いた。siRNAはこの融合タンパク質と結合し、有効な送達のために共有結合を要しなかった。この戦略は、siRNAを、トランスフェクションに対して抵抗性の高いTリンパ球などの初代細胞内に送達するのに有効であった。HIV envに関する発現ベクターがトランスフェクトされたB16黒色腫細胞を用いた場合、F105-Pと複合化したsiRNAの静脈内または腫瘍内注射は、envを発現する腫瘍のみにsiRNAを送達し、正常組織およびenv-腫瘍には送達せず、siRNAが癌遺伝子を標的とした場合には腫瘍増生を阻害した。本発明者らが抗ErbB2-プロタミン融合タンパク質を用いてsiRNAをErbB2⁺乳癌細胞に特異的に送達できたことからみて、この方法は一般化が可能である。この融合タンパク質には、昆虫細胞においてバキュロウイルスから発現される一本鎖抗体を用いた。

10

【0041】

本明細書で用いる場合、「二本鎖RNA」または「dsRNA」とは、2本の鎖から構成されるRNA分子のことを指す。二本鎖分子には、それ自体に対して折り返して二本鎖構造を形成する単一のRNA分子から構成されるものも含まれる。例えば、一本鎖miRNAの元であるpre-miRNA(Bartel et al. 2004. Cell 116: 281-297)と呼ばれる前駆分子のステムループ構造はdsRNA分子を含む。

20

【0042】

siRNAに用いられるもののような二本鎖RNAは、一本鎖RNA、二本鎖DNAまたは一本鎖DNAとは異なる特性を有する。核酸種のそれぞれは細胞内ではほとんど重複しない結合タンパク質のセットと結合しており、ほとんど重複しないヌクレアーゼのセットによって分解される。すべての細胞の核ゲノムはDNAを基にしており、そのため自己免疫疾患を除けば免疫応答を起こす可能性は低い(Pisetsky. Clin Diagn Lab Immunol. 1998 Jan; 51: 1-6)。一本鎖RNA(ssRNA)は、真核細胞においてDNA転写の産物として内因性に認められる形態である。細胞ssRNA分子には、メッセンジャーRNA(および前駆体であるpreメッセンジャーRNA)、核内低分子RNA、核小体低分子RNA、トランスファーRNAおよびリボソームRNAが含まれる。一本鎖RNAは、TLR7受容体およびTLR8受容体を介してインターフェロン応答および炎症免疫応答を誘導することができる(Proc Natl Acad Sci. 2004. 101: 5598-603; Science. 2004. 303: 1526-9; Science. 2004. 303: 1529-3)。二本鎖RNAはサイズ依存的な免疫応答を誘導し、30bpよりも大きいdsRNAはインターフェロン応答を活性化するが、それよりも短いdsRNAはダイサー酵素の下流にある細胞の内因性RNA干渉装置に流れ込む。短鎖一過性RNA(short temporal RNA)および調節性低分子RNA(small modulatory RNA)を含むマイクロRNA(miRNA)は、哺乳動物で知られている唯一の細胞dsRNA分子であり、2001年になるまで発見されなかった(Kim. 2005. Mol Cell. 19: 1-15)。血流中の細胞外RNAに対する応答は、いかなる長さの二本鎖でも一本鎖でも、腎臓による急速な排泄および酵素による分解である(PLoS Biol. 2004. 2: 18-20)。

30

40

【0043】

遺伝子発現を阻害することが示されている、さまざまな特異的siRNA分子が設計されている(Ratcliff et al. Science 276: 1558-1560, 1997; Waterhouse et al. Nature 411: 834-842, 2001)。加えて、特異的siRNA分子は、例えば、標的細胞における宿主CD4タンパク質発現を標的とし、それによってCD4を発現する細胞を標的とするHIV-1の侵入部位を減少させることにより、HIV-1の細胞への侵入を阻害することも示されている(Novina et al. Nature Medicine, 8: 681-686, 2002)。短鎖干渉性RNAはさらに、インビボでのFasを介したアポトーシスを低下させるためにFasの発現のサイレンシングを行わせる目的でも設計され、首尾良く用いられている(Song et al. Nature Medicine 9: 347-351, 2003)。

【0044】

50

植物では、より長い約24～26nt長のsiRNAが、相同DNAの全体的サイレンシングおよびメチル化と相関することが示されている。反対に、約21～22ntの短いsiRNAクラスは、mRNA分解とは相関するが、全体的シグナル伝達ともメチル化とも相関しない(Hamilton et al. EMBO J. 2002 Sep 2;21(17): 4671-9)。これらの知見は、植物におけるRNAサイレンシング経路の予想外に高いレベルの複雑さを明らかにしており、それは動物にも当てはまる可能性がある。高等真核生物では、DNAはCpG二ヌクレオチド中のグアノシンの5'側に位置するシトシンの箇所でメチル化される。この修飾は遺伝子発現に対する重要な調節効果を有し、多くの遺伝子のプロモーター領域に位置するCpG島として知られるCpG領域がかかわる場合は特にそうである。遺伝子に関連したほぼすべての島は常染色体上ではメチル化から保護されているが、選択されたインプリンティングを受けた遺伝子および雌性の不活性X染色体上の遺伝子の転写不活性化に伴ってCpG島の高度なメチル化がみられる。通常はメチル化されていないCpG島の異常なメチル化は、不死化細胞および形質転換細胞では比較的頻度の高い事象として記述されており、ヒトの癌における確定された腫瘍抑制遺伝子の転写不活性化と関連づけられている。この最後の状況において、プロモーター領域の過剰メチル化は、腫瘍抑制遺伝子の機能を除去する上でコード領域の変異に代わる選択肢として存在する(Herman, et al.)。標的遺伝子のメチル化を導くためのsiRNA分子の使用法は、米国特許出願公報第20040091918号に言及されている、2003年2月13日に提出された米国仮出願第60/447,013号に記載されている。

【0045】

RNA干渉はその標的配列と完全に一致する必要はないことも知られている。しかし、siRNAのアンチセンス(ガイド)鎖の5'部および中央部は標的核酸配列と完全に相補的であることが好ましい。

【0046】

本発明によるRNA干渉誘導分子には、天然性または修飾性のヌクレオチド、天然のリボース糖または修飾糖、および天然性または修飾性のリン酸骨格を有するRNA分子が含まれる。

【0047】

したがって、本明細書において言及するRNA干渉誘導分子には、短鎖一過性RNA(stRNA)、短鎖干渉性RNA(siRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)を含む、非修飾性および修飾性の二本鎖(ds)RNA分子が非限定的に含まれる(例えば、Baulcombe, Science 297: 2002-2003, 2002を参照されたい)。dsRNA分子、例えばsiRNAは、3'突出部、好ましくは3'UUまたは3'TT突出部を含む。1つの態様において、本発明のsiRNA分子には、約30～40塩基を上回る、約40～50塩基を上回る、約50塩基またはそれを上回るssRNAを含むRNA分子は含まれない。1つの態様において、本発明のsiRNA分子は、二本鎖構造を有する。1つの態様において、本発明のsiRNA分子は、その全長のうち約25%超、約50%超、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超が二本鎖である。

【0048】

本明細書で用いる場合、RNA干渉によって誘導される「遺伝子サイレンシング」とは、細胞における標的遺伝子に関するmRNAレベルの、RNA干渉を導入していない細胞において認められるmRNAレベルに対する少なくとも約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、約100%の低下のことを指す。1つの好ましい態様において、mRNAレベルは少なくとも約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、約100%低下する。

【0049】

本明細書で記載するRNA干渉には、1つまたは複数の非天然ヌクレオチド、すなわちアデニン「A」、グアニン「G」、ウラシル「U」、またはシトシン「C」以外のヌクレオチドを有するRNA分子も含まれ、修飾ヌクレオチド残基または天然ヌクレオチドの誘導体もしくは類似体も有用である。任意の修飾残基、誘導体または類似体を、それがdsRNAのRNAi活性を消失させないか実質的に(少なくとも50%は)低下させない範囲で、用いることができる。したがって、これらの形態には、遊離リン酸(free pho)(NTP)RNA分子を含む、アミノ

アシルUTP、シュード-UTP、5-I-UTP、5-I-CTP、5-Br-UTP、 α -S ATP、 α -S CTP、 α -S GTP、 α -S UTP、4-チオUTP、2-チオCTP、2' NH_2 UTP、2' NH_2 CTPおよび2' F UTPが非限定的に含まれる。このような修飾ヌクレオチドには、アミノアシルウリジン、シュード-ウリジン、5-I-ウリジン、5-I-シチジン、5-Br-ウリジン、 α -Sアデノシン、 α -Sシチジン、 α -Sグアノシン、 α -Sウリジン、4-チオウリジン、2-チオ-シチジン、2' NH_2 ウリジン、2' NH_2 シチジン、および2' F ウリジン、ならびにその他のあらゆる有用な形態のヌクレオチドが非限定的に含まれる。

【0050】

本明細書で言及するRNA干渉にはさらに、リボース糖における修飾、ならびにヌクレオチド鎖の「リン酸骨格」における修飾を含むRNA分子も含まれる。例えば、RNA中に認められる天然の α -D-リボヌクレオシドの代わりに α -D-アラビノフラノシル構造を含むsiRNA分子またはmiRNA分子を、本発明によるRNA干渉に用いることができる(米国特許第5,177,196号)。その他の例にはヌクレオシドの糖と複素環式塩基との間に α -結合を含むRNA分子が含まれ、これはオリゴヌクレオチド分子に対して、2'-O-メチルリボース、アラビノース、特に α -アラビノースを含むオリゴヌクレオチドに類似したヌクレアーゼ抵抗性および強固な相補鎖結合性を与える(米国特許第5,177,196号)。また、siRNA分子およびmiRNA分子を安定化するためにホスホロチオエート結合を用いることもできる(米国特許第5,177,196号)。3'末端または5'末端のいずれかまたは両方にさまざまな「尾部」が共有結合しているsiRNA分子およびmiRNA分子も当技術分野で公知であり、本発明の方法を用いて送達されるsiRNA分子およびmiRNA分子を安定化するためにこれらを用いることもできる。一般的に言って、RNA分子の3'末端または5'末端に結合したインターカレート基、さまざまなレポーター基および親油基は当業者に周知であり、本発明の方法に従って用いることができる。本発明に従って有用な修飾RNA分子の調製に適用しうる3'-コレステロールまたは3'-アクリジン修飾オリゴヌクレオチドの合成に関する記載は、例えば以下の論文に見い出すことができる: Gamper, H. B., Reed, M. W., Cox, T., Virosco, J. S., Adams, A. D., Gall, A., Scholler, J. K. and Meyer, R. B. (1993) Facile Preparation and Exonuclease Stability of 3'-Modified Oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 21 145-150; および Reed, M. W., Adams, A. D., Nelson, J. S. and Meyer, R. B., Jr. (1991) Acridine and Cholesterol-Derivatized Solid Supports for Improved Synthesis of 3'-Modified Oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.* 2217-225 (1993)。

【0051】

さまざまな特異的siRNA分子およびmiRNA分子が記載されており、そのほかの分子も当業者によって容易に設計可能である。例えば、<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>にあるmiRNA Databaseは、本発明に従って有用なそのほかのmiRNAを同定するための有用な源となる(Griffiths-Jones S. *NAR*, 2004, 32, Database Issue, D109-D111; Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. *RNA*, 2003, 9(3), 277-279)。

【0052】

本明細書中および本明細書の全体を通して用いられる「siRNA」とは、そのsiRNAが遺伝子または標的遺伝子と同じ細胞内で発現された時に、その遺伝子または標的遺伝子の発現を低下または阻害することができる二本鎖RNAを形成する核酸のことを指す。したがって、「siRNA」とは、相補鎖によって形成される二本鎖RNAのことを指す。ハイブリダイズして二本鎖分子を形成するsiRNAの相補的部分は、典型的には、実質的または完全な同一性を有する。1つの態様において、siRNAとは、標的遺伝子に対して実質的または完全な同一性を有し、二本鎖siRNAを形成する核酸のことを指す。siRNAの配列は、完全長の標的遺伝子またはその部分配列に対応しうる。典型的には、siRNAは少なくとも約15~50ヌクレオチド長(例えば、二本鎖siRNAのそれぞれの相補的配列が約15~50ヌクレオチド長であり、二本鎖siRNAの約15~50塩基対長、好ましくは約19~30塩基のヌクレオチド、好ましくは約20~25ヌクレオチド長、例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌ

10

20

30

40

50

クレオチド長である)。

【0053】

siRNAにはまた、短鎖ヘアピン(ステムループとも呼ばれる)RNA(shRNA)も含まれる。1つの態様において、これらのshRNAは、短い、例えば約19～約25ヌクレオチドのアンチセンス鎖、その後に続く約5～約9ヌクレオチドのヌクレオチドループ、および類似のセンス鎖から構成される。または、センス鎖がヌクレオチドループ構造の前にあって、アンチセンス鎖がその後にあってよい。

【0054】

1つの好ましい態様において、本発明に従って有用なsiRNAは、以下のものからなる群より選択される：

10

C-myc #1: 5-GAACAUCAUCAUCCAGGAC-3 (センス, SEQ ID NO: 13);
CUUGUAGUAGUAGGUCCUG (アンチセンス, SEQ ID NO: 14, FEBS Lett. 2004 Feb
27;560(1-3):210-4);

C-myc #2: 5-ACUCGAACAGCUUCGAAAC-3 (センス, SEQ ID NO: 15);
UGAGCUUGUCGAAGCUUUG (アンチセンス, SEQ ID NO: 16, Id)

VEGF: 5-CGAUGAAGCCCUGGAGUG C-3 (センス, SEQ ID NO: 17);
GCACUCCAGGGCUUCAUCG (アンチセンス, SEQ ID NO: 18, Mol Vis. 2003 May
30;9:210-6)

20

MDM2: 5'GCUUCGGAACAAGAGACUCdTdT (センス, SEQ ID NO: 7);
3'dTdTGGUUGUGACGAAUGCGAAU (アンチセンス, SEQ ID NO: 8);

Apex1: 5'-CCAACACUGCUUACGCUUAdTdT-3' (センス, SEQ ID NO:
9); 3'-dTdTGGUUGUGACGAAUGCGAAU (アンチセンス, SEQ ID NO: 10);

30

pp32: 5'-AAGAAGCUUGAAUUAAGCGdTdT-3' (センス, SEQ ID NO:
11); 3'-dTdTUUCUUCGAACUUAUUCGC-5' (アンチセンス, SEQ ID NO: 12); および

Ku70: 5'-ACGGAUCUGACUACUCACUCAdTdT-3' (センス, SEQ ID
NO: 19); 3'-dTdTUGCCUAGACUGAUGAGUGAGU-5' (アンチセンス, SEQ ID
NO:20)

40

【0055】

もう1つの態様において、本発明に従って有用なsiRNAは、WO 05/042719号、WO 05/0138
86号、WO 04/039957号および米国特許出願第20040248296号に見いだされる。本発明の方
法において有用な、その他の有用なsiRNAには、以下の米国特許出願および国際公開公報
に見いだされるものが非限定的に含まれる。

20050176666, 20050176665, 20050176664, 20050176663, 20050176025,
 20050176024, 20050171040, 20050171039, 20050164970, 20050164968,
 20050164967, 20050164966, 20050164224, 20050159382, 20050159381,
 20050159380, 20050159379, 20050159378, 20050159376, 20050158735,
 20050153916, 20050153915, 20050153914, 20050148530, 20050143333,
 20050137155, 20050137153, 20050137151, 20050136436, 20050130181,
 20050124569, 20050124568, 20050124567, 20050124566, 20050119212,
 20050106726, 20050096284, 20050080031, 20050079610, 20050075306,
 20050075304, 20050070497, 20050054598, 20050054596, 20050053583,
 20050048529, 20040248174, 20050043266, 20050043257, 20050042646,
 20040242518, 20040241854, 20040235775, 20040220129, 20040220128,
 20040219671, 20040209832, 20040209831, 20040198682, 20040191905,
 20040180357, 20040152651, 20040138163, 20040121353, 20040102389,
 20040077574, 20040019001, 20040018176, 20040009946, 20040006035,
 20030206887, 20030190635, 20030175950, 20030170891, 20030148507,
 20030143732, and WO 05/060721, WO 05/060721, WO 05/045039, WO 05/059134,
 WO 05/045041, WO 05/045040, WO 05/045039, WO 05/027980, WO 05/014837,
 WO 05/002594, WO 04/085645, WO 04/078181, WO 04/076623, および WO
 04/046354

10

20

【0056】

本発明によるRNA干渉は、直接的な化学合成、より長い二本鎖RNAの組換えダイサータンパク質またはショウジョウバエ胚溶解物に対する曝露によるプロセッシングによるもの、S2細胞由来のインビトロ系によるもの、ファージRNAポリメラーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼおよびDNAベースのベクターを用いることといった、任意の公知の手法を用いて生じさせることができる。細胞溶解物またはインビトロでのプロセッシングの使用はさらに、その後、短い、例えば約21〜23ヌクレオチドのsiRNAを、溶解物などから単離することを含みうる。化学合成は通常、2つの一本鎖RNA-オリゴマーを作製し、その後2つの一本鎖オリゴマーをアニーリングさせて二本鎖RNAにすることによって進行する。その他の例には、siRNAの化学合成および酵素合成を教示しているWO 99/32619号およびWO 01/68836号に開示された方法が含まれる。さらに、特定のsiRNAの設計および製造のためのさまざまな商業サービスを利用することもできる(例えば、QIAGEN Inc., Valencia, CAおよびAMBI ON Inc., Austin, TXを参照)。

30

40

【0057】

本発明の方法において有用なRNA干渉には、真核細胞の内部でコードされる任意のタンパク質を標的とするsiRNAが含まれる。これらのタンパク質の例には、内因性哺乳動物タンパク質、寄生虫タンパク質、ウイルスの細胞内への侵入後に真核細胞によってコードされるウイルスタンパク質が含まれる。このようなRNA干渉を調製するための方法の例は、例えば、国際特許出願PCT/US03/34424号、PCT/US03/34686号ならびに米国仮特許出願第60/488,501号、第60/488,155号および第60/516,172号に示されており、これらのすべての特許の内容および参考文献はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0058】

先行技術に記載されたsiRNA送達方法とは異なり、本発明の方法は、siRNA療法の望まし

50

くない潜在的な副作用を最小限に抑えるか回避するために、特異的な細胞のターゲティングを可能にする。

【0059】

本発明の方法を用いてRNA干渉を送達しうる標的細胞種には、肝細胞、筋細胞、神経細胞、リボサイト、リンパ球、マクロファージ、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞などを非限定的に含む真核細胞が含まれる。1つの態様において、標的細胞種には、肺癌細胞、網膜癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、頭頸部癌細胞、リンパ腫細胞、黒色腫細胞、神経膠腫細胞、膀胱癌細胞、泌尿生殖器癌細胞、胃癌細胞、膵癌細胞、肝癌細胞、腎癌細胞、胃腸癌を非限定的に含む、腫瘍細胞または癌細胞が含まれる。1つの好ましい態様において、標的細胞は、ヒトリンパ球、ヒト樹状細胞、ヒト成体幹細胞および胚性幹細胞からなる群より選択される。

10

【0060】

加えて、本発明の方法は、特異的に悪性細胞または腫瘍細胞を標的とする手段を提供するが、これは、これらの細胞が典型的には種々の特定のタンパク質を表面に発現し、それ故に本発明のRNA干渉送達系における融合タンパク質の細胞ターゲティング部分を用いてターゲティングを行うことが可能なためである。

【0061】

ターゲット部分は、送達系を特異的に標的細胞へと運ぶ。siRNAを含む、干渉性RNAを送達するための特定のターゲット部分は、本開示に基づき、標的細胞に応じて経験的に決定することができる。例えば、血管内標的、免疫細胞標的などのように容易に到達可能な細胞または組織でのインビボでの体細胞療法の場合には、ターゲット部分の重要な属性は親和性および選択性である。

20

【0062】

本発明の方法は、siRNAを限定的な数の細胞内に送達し、それによって例えばsiRNAを用いる治療法の潜在的な副作用を抑える系を提供する。ターゲティング部分に対して選択される個別の細胞表面標的は、標的細胞に依存すると考えられる。細胞は、例えば、細胞表面に存在する特有なタンパク質、脂質または糖質に対する抗体を用いることにより、特異的に標的とすることができる。当業者は、このような細胞を、当技術分野における一般的な知識に基づいて容易に決定することができる。

【0063】

例えば、HIV感染細胞などの感染細胞を標的とする場合には、HIV感染細胞を特異的に標的とすると考えられるモノクローナル抗体を用いることができる。これにはエンベロープ糖タンパク質に対する抗体の使用が含まれると考えられる。15e、21h(Thali, M., et al., J. Virol. 67: 3978-3988(1993))、F105、176および48dといった、HIV-1 gp120またはHIV-2 gp120に対するさまざまな公知の抗体のうち任意のものをを用いることができる。抗体、デコイ配列などの細胞内発現のための遺伝子などの核酸配列を予防的に送達しようと望む場合には、このような細胞の表面に存在する受容体、例えばHIV感受性細胞の場合にはCD4受容体またはCCR5受容体などを標的とすることにより、感受性の高い細胞を標的とすることができる。このような状況において、タンパク質は、ウイルス侵入の原因となる細胞表面受容体と選択的に結合すると考えられるリガンド、例えば、CD4もしくはCCR5、またはCD4受容体もしくはCCR5受容体に対する抗体などのような受容体に対する抗体でありうる。

30

40

【0064】

ターゲティング部分を選択するためのこの戦略は、極めて順応性が高い。例えば、タンパク質、糖質および脂質を含む、任意の細胞特異的抗原を、本発明の方法に従ってsiRNAに特定の細胞種を標的として向かわせるために用いる抗体を作り出すために用いることができる。例えば、ある種の腫瘍は往々にして、特定の細胞表面受容体(例えば、乳癌の場合のneu)または異常な形態の特定のタンパク質を大量に有する。このため、腫瘍抗原を、細胞の増生および/もしくは増殖を阻害するため、または細胞を破壊するために腫瘍細胞内にsiRNAを送達するための特異的標的として利用することができる。腫瘍細胞表面で

50

発現されるあらゆる公知の腫瘍抗原を、ターゲティング部分として利用するための抗体を作製するために用いることができる。例えば、本発明に従って有用な腫瘍抗原には、以下のものが非限定的に含まれる: mini-MUC; MUC-1(Marshall et al., J. Clin. Oncol. 18: 3964-73(2000); HER2/neu; HER2受容体(米国特許第5772997号); マンモグロブリン(米国特許第5922836号); ラビリシン(labyrinthin)(米国特許第6166176号); SCP-1(米国特許第6140050号); NY-ESO-1(米国特許第6140050号); SSX-2(米国特許第6140050号); N末端ブロッコ可溶性サイトケラチン(米国特許第4775620号); 43kDヒト癌抗原(米国特許第6077950号); ヒト腫瘍関連抗原(PRAT)(米国特許第6020478号); ヒト腫瘍関連抗原(TUAN)(米国特許第5922566号); L6抗原(米国特許第5597707号); 癌胎児性抗原(RT-PCR analysis for breast cancer prognosis in Clin Cancer Res 6: 4176-85, 2000); CA15-3(Eur J Gynaecol Oncol 21: 278-81, 2000); オンコプロテイン18/スタスミン(Op 18)(Br J. Cancer 83: 311-8, 2000); ヒト腺性カリクレイン(hK2)(Breat Cancer Res Treat 59: 263-70, 2000); NY-BR抗原(Cancer Immun. Mar 30;1:4, 2001)、腫瘍タンパク質D52(Cancer Immun. Mar 30;1:4, 2001)および前立腺特異抗原(Breat Cancer Res Treat 59: 263-70, 2000); およびEEA。

10

【0065】

公知であって識別可能な任意のウイルス抗原を、ウイルスに感染した細胞を認識する特異的抗体を作製するために用いることができる。特異的標的には、例えば、ウイルスエンベロープ、およびウイルスゲノムによってコードされるその他のこの種のタンパク質が含まれる。

20

【0066】

寄生虫抗原には、例えば、マラリアを引き起こす熱帯熱マラリア原虫(*P.falciparum*)抗原が含まれ、これらを、本発明に従って有用な抗体を作製するために用いることもできる。本発明に従って有用な熱帯熱マラリア原虫抗原の非限定的な例は、米国特許第6,663,871号およびその中で引用された参考文献に見いだされる。

【0067】

関心対象のその他の受容体には、インターロイキン類およびインターフェロン類などのリンホカインに対するもの、例えば、インターロイキン-2(IL-2)受容体(IL-2R)が含まれる。Tacタンパク質とも呼ばれるp55、IL-2R α 鎖は、Agまたはマイトジェンにより活性化されたT細胞には付随してみられるが、休止T細胞ではみられない。これは、T細胞白血病、皮膚T細胞リンパ腫およびホジキン病といったリンパ系癌の悪性細胞の表面に高レベルで発現される。抗Tac抗体はこのタンパク質と結合すると考えられる。この種の抗体のヒト化型が知られており、Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA:10029-10039(1989); Hakimi, J., et al., J. of Immun. 151: 1075-1085(1993)(Mik.beta.1、これはIL-2R β 鎖に対するMabである); Kreitman, R. J., et al., J. of Immun. 149: 2810-2815(1992); Hakimi, J., et al., J. of Immun. 147: 1352-1359(1991)に記載されている。

30

【0068】

これらのさまざまなタンパク質に対する抗体が知られており、入手可能である。これらの抗体は、所望の結合部位をコードする遺伝子を例示的な遺伝子の代わりに用いることにより、本明細書に記載した一般的手順に従って、この系で用いるために容易に適合化することができる。例えば、ターゲティングを受ける細胞がHIV感染細胞であるならば、ターゲティング部分はHIVエンベロープ糖タンパク質を標的とすることができる。このタンパク質に対する任意のさまざまな抗体を用いることができる。例えば、F105抗体を基にした組換え抗体を、公知の教示手法によって作製することができる(Posner, M. R., et al., J. Immunol. 146: 4325-4332(1991); Thali, M., et al, J. Virol. 65: 6188-6193(1991); Marasco, W. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893(1993))。作製しうるその他の抗体には、15e、21h、17b、48dなどが含まれる。

40

【0069】

1つの好ましい態様において、本発明のターゲティング部分はF105抗体である。F105モノクローナル抗体はHIV感染個体で同定されたもので、HIV-1 gp120エンベロープ糖タンパ

50

ク質の不連続エピトープと結合し、gp120とCD4ウイルス受容体との結合を阻止する。F105のヌクレオチド配列は決定されており、例えば、Marasco et al., J. Clin. Invest. 90: 1467-1478, 1992に見ることができる。この抗体を発現させるためのベクターは、米国特許出願公報第20040023902号およびその中の実施例に記載された通りに作製することができる。

【0070】

手短に述べると、抗体の重鎖(V_H および C_H)のアミノ(抗原結合)末端(Fd断片)およびF105抗体の軽鎖(例えば、 κ 鎖)の結合領域を発現する二シストロン性 哺乳動物発現ベクターを、終止コドンを含まないFd断片を用い、そのセグメントを標準的な手法により、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅することによって、構築することができる。上流PCRプライマーは、その細胞から送達因子を用いようとする動物の免疫グロブリンのリーダー配列に対応することが好ましい。例えば、標的細胞がヒト細胞である場合には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸1~6を含むリーダー配列(例えば、ヒト免疫グロブリン重鎖GenBankアクセッション番号CAA28307、バージョンGI:683576を参照)に、HindIII部位などの追加的な便利なクローニング部位を付加することができる。クローニング部位は、例えば、制限酵素認識部位の配列をPCR増幅プライマーに追加することによって付加することができる。F105用の下流PCRプライマーは、重鎖定常領域のカルボキシ末端によるアミノ酸に対応するように設計することができる。例えば、抗体がF105を基にする場合には、第1の定常領域ドメイン($CH1$ 、 $CH1$ としても知られ、 C_H1 ドメインとしても知られる。例えば、GenBankアクセッション番号X04646、gi:33061による、ヒト遺伝子ならびにIgG鎖定常領域およびヒンジ領域のmRNAの核酸配列を参照されたい)を含む、ヒト免疫グロブリン重鎖のアミノ酸226~233。適切なベクター中への核酸のクローニングを容易にするために、便利なクローニング部位を下流プライマーの中に追加することもできる。PCR反応は当業者に周知の標準的な手段に従って行われる。

【0071】

もう1つの好ましい態様において、本発明のターゲティング部分は、ErbB2受容体を認識する一本鎖抗体断片であるML39 ScFvである(Li et al. "Single-chain antibody-mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells." Cancer Gene Ther. 2001; 8:555-65)。ML39 ScFvはErbB2受容体を認識し、そのため、ErbB2を発現する細胞、例えば乳癌細胞に対するターゲティングおよび送達のための本発明の方法におけるターゲティング部分として有用である。ML39 ScFvターゲティング部分を含む融合タンパク質を作製するための方法は、以下およびLiら、2001(前記)に記載されている。

【0072】

その他の有用なターゲティング部分には、例えばXuら(Mol Cancer Ther. 2002, 1(5):337-46)に記載されたトランスフェリン受容体に対する一本鎖抗体断片、および例えばLiら(Intl J Oncology. 2003, 23: 1329-1332)に記載された前立腺特異膜抗原を認識する一本鎖抗体断片がある。

【0073】

公知の配列を有する任意の抗体を、上記のような類似の構築物を調製するために用いることができる。

【0074】

前述したように、融合タンパク質の第2の部分は結合部分である。ターゲティング部分および結合部分の両方を発現すると考えられる遺伝子セグメントを含む単一のベクターを用いることが好ましい。しかし、細胞に少なくとも2種類のベクターをコトランスフェクトして、融合タンパク質を発現する細胞を選択するためのベクター系を用いることもできる。単一のベクターを用いることが好ましい。ターゲット部分をコードする配列は、結合部分をコードする遺伝子または遺伝子セグメントと、標準的な手段によって結合することが好ましい。例えば、ヒトプロタミンに対する遺伝子(Balhorn, J. of Cell. Biol. 93: 298-305(1982))。

【0075】

特定の標的細胞受容体または細胞表面に存在する酵素に対するリガンドを、ターゲティング部分として用いてもよい。例えば、標的細胞がTリンパ球であるならば、考えられる標的の1つはCD4受容体またはCCR5もしくはCXCR4といったその補助受容体であり、それらは標的として利用することもでき、好ましいリガンドはHIVエンベロープタンパク質gp120、またはCD4受容体、もしくはCCR5もしくはCXCR4といったその補助受容体と結合することがわかっているgp120の断片である。または、標的が細胞表面のグリコシルトランスフェラーゼ、例えばガラクトシルトランスフェラーゼであるならば、リガンドは例えば、D-ガラクトース、N-アセチル-D-グルコサミンおよびウリジンより選択することができる。リガンドは、当技術分野で公知の方法を用いてRNA結合モチーフと結合させることができる。

10

【0076】

抗体をターゲティング部分として用いるならば、一本鎖抗体をターゲット部分として用いることが好ましい。しかし、標的細胞に容易に到達できない場合、例えば細胞が血液供給が乏しく間質圧の高い大きな固形腫瘍塊の一部である場合などは、血清中半減期を考慮することが重要である。このような場合には、完全な抗体および(Fab')₂セグメントが典型的には好ましい。1つの好ましい態様においては、結合部分が無傷の免疫グロブリン、例えばIgG₁などの軽鎖または重鎖のカルボキシ末端と結合するように、融合タンパク質を合成することができる。

【0077】

抗原反応を抑えるためには、ターゲティング部分は、その細胞がターゲティングを受けると考えられる宿主動物を考慮に入れて選択することが好ましい。したがって、標的動物がマウスであるならばマウス抗体を用いることが好ましく、一方、標的動物がヒトであるならばヒト抗体またはヒト化抗体をもちいることが好ましい。

20

【0078】

1つの態様において、siRNAをコードするベクターは特定の標的細胞内に送達される。本明細書で用いる場合、「ベクター」という用語は、DNAセグメントを1つの細胞から別の細胞へと移行させる核酸分子を指して用いられる。ベクターは多くの場合、プラスミド、バクテリオファージまたは植物ウイルスもしくは動物ウイルスに由来する。「発現ベクター」という用語は、本明細書で用いる場合、所望のsiRNAコード配列と、特定の宿主生物における機能的に結合したコード配列の発現のために必要な適切な核酸配列とを含む組換えDNA分子のことを指す。原核生物における発現のために必要な核酸配列には通常、プロモーター、オペレーター(任意)およびリボソーム結合部位が、しばしば別の配列とともに含まれる。真核細胞はプロモーター、エンハンサーならびに転写終結シグナルおよびポリアダニル化シグナルを利用することが知られている。

30

【0079】

また、細胞内に放出されたRNA干渉誘導分子を関心対象の細胞内区画に送達するための局在化配列を用いることもできる。典型的には、送達系はまず細胞表面の特定の受容体に結合する。その後、ターゲティングを受けた細胞が、細胞に結合した送達系を内部に取り込む。

【0080】

例えば、受容体および抗原を含む、細胞表面上の膜タンパク質は、リガンドと受容体または抗体との相互作用の後に、受容体を介したエンドサイトーシスによって内部に取り込ませることができる(Dautry-Varsat, A., et al., Sci. Am. 250: 52-58 (1984))。このエンドサイトーシス過程を、本発明の送達系に利用することができる。この過程はRNA干渉誘導分子が内部に取り込まれる時にそれを損傷させるおそれがあるため、関心対象のRNA干渉誘導分子の多数の反復配列を含むセグメントを用いることが望ましいと思われる。また、エンドソームおよびリソソームを破壊する配列または部分を含めることもできる。例えば、Cristiano, R. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11548-11552(1993); Wagner, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6099-6103(1992); Cotten, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6094-6098(1992)を参照されたい。

40

50

【0081】

本明細書で言及する短鎖干渉性RNA(siRNA)複合体またはマイクロ干渉性RNA(miRNA)複合体は、ターゲット部分がsiRNAなどのRNA干渉物と複合体化または混合された複合体である。適したsiRNA複合体化剤には、ポリアミノ酸；ポリイミン；ポリアクリレート；ポリアルキルアクリレート、ポリオキセタン、ポリアルキルシアノアクリレート；カチオン化ゼラチン、アルブミン、デンプン、アクリレート、ポリエチレングリコール(PEG)およびデンプン；ポリアルキルシアノアクリレート；DEAE誘導体化ポリイミン、ポルラン、セルロースおよびデンプンが含まれる。特に好ましい複合体化剤には、キトサン、N-トリメチルキトサン、ポリ-L-リジン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリスベルミン、プロタミン、ポリビニルピリジン、ポリチオジエチルアミノメチルエチレンP(TDAE)、ポリアミノスチレン(例えば、p-アミノ)、ポリ(メチルシアノアクリレート)、ポリ(エチルシアノアクリレート)、ポリ(ブチルシアノアクリレート)、ポリ(イソブチルシアノアクリレート)、ポリ(イソヘキシルシアノアクリレート)、DEAE-メタクリレート、DEAE-ヘキシルアクリレート、DBAE-アクリルアミド、DEAE-アルブミンおよびDEAE-デキストラン、ポリメチルアクリレート、ポリヘキシルアクリレート、ポリ(D,L-乳酸)、DL-乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)、アルジネートおよびポリエチレングリコール(PEG)およびポリエチレンイミン。1つの態様において、干渉性RNA結合ドメインは、GCN4、Fos、Jun、TFIIS、FMRI、酵母タンパク質HX、ピジリン、Mer1、細菌ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、リボソームタンパク質S3および熱ショックタンパク質からなる群より選択される、タンパク質中に存在する核酸結合ドメインより選択される。

10

20

【0082】

1つの好ましい態様において、siRNA複合体化剤は、プロタミンまたはプロタミンのRNA結合ドメイン、例えばsiRNA結合性断片などである。プロタミンは分子量約4000~4500Daのポリカチオン性ペプチドである。プロタミンは低分子量の塩基性核酸結合タンパク質であり、動物のゲノムDNAを精子頭部の限定的な容積中にパッケージングするために凝縮させる(Warrant, R. W., et al., Nature 271: 130-135(1978); Krawetz, S. A., et al., Genomics 5: 639-645(1989))。プロタミンの正の電荷は、RNAなどの核酸のリン酸骨格の負の電荷と強く相互作用して、中性で、本明細書に示すように安定な干渉性RNAプロタミン複合体を生じる。

【0083】

1つの態様において、本発明に従って有用なプロタミン断片は、核酸配列SEQ ID NO:1、またはSEQ ID NO:1と同じアミノ酸をコードしうるそのホモログによってコードされる：
GCGGCCGCACGCAGCCAGAGCCGGAGCAGATATTACCGCCAGAGACAAA
GAAGTCGCAGACGAAGGAGGCGGAGCTGCCAGACACGGAGGAGAGCCAT
GAGATCTCATCATCACCACCACCATTA (SEQ ID NO: 1)

30

【0084】

1つの態様において、本発明に従って有用なプロタミン断片は、核酸配列SEQ ID NO:2、またはSEQ ID NO:2と同じアミノ酸をコードしうるそのホモログによってコードされる：
GCGGCCGCAATGGCCAGGTACAGATGCTGTCGCAGCCAGAGCCGGAGCA
GATATTACCGCCAGAGACAAAGAAGTCGCAGACGAAGGAGGCGGAGCTG
CCAGACACGGAGGAGAGCCATGAGATCTCATCATCACCACCACCATTA
(SEQ ID NO: 2)

40

【0085】

1つの態様において、本発明に従って有用なプロタミン断片は、核酸配列SEQ ID NO:3、またはSEQ ID NO:3と同じアミノ酸をコードしうるそのホモログによってコードされる：

GCGGCCGCACGCAGCCAGAGCCGGAGCAGATATTACCGCCAGAGACAAA
GAAGTCGCAGACGAAGGAGGCGGAGCTGCCAGACACGGAGGAGAGCCAT
GAGGTGTTGTCGCCCCAGGTACAGACCGAGATGTAGAAGACACAGATCTC
ATCATCACCACCACCATTA (SEQ ID NO: 3)

【0086】

1つの態様において、本発明に従って有用なプロタミン断片は、核酸配列SEQ ID NO:4、またはSEQ ID NO:4と同じアミノ酸をコードしうるそのホモログによってコードされる：

GCGGCCGCACGCAGCCAGAGCCGGAGCAGATATTACCGCCAGAGACAAA
GAAGTCGCAGACGAAGGAGGCGGAGCAGATCTCATCATCACCACCACCAT
TAA (SEQ ID NO: 4)

10

【0087】

1つの態様において、本発明に従って有用なプロタミン断片は、核酸配列SEQ ID NO:5、またはSEQ ID NO:5と同じアミノ酸をコードしうるそのホモログによってコードされる：

GCGGCCGCCGGCGGAGGAGGATCTCATCATCACCACCATTAA (SEQ ID
NO: 5)

20

【0088】

1つの態様において、本発明に従って有用なプロタミン断片は、核酸配列SEQ ID NO:6、またはSEQ ID NO:6と同じアミノ酸をコードしうるそのホモログによってコードされる：

GCGGCCGCAATGGCCAGGTACAGATGCTGTCGCAGCCAGAGCCGGAGCA
GATATTACCGCCAGAGACAAAGAAGTCGCAGACGAAGGAGGCGGAGCAG
ATCTCATCATCACCACCACCATTA (SEQ ID NO: 6)

【0089】

最も好ましい態様において、完全長プロタミンはgp160抗体と結合される。

30

【0090】

核酸-プロタミン複合体の調製の方法、試薬およびそれについて詳細に記載している参考文献は、米国特許出願公報US2002/0132990号およびUS2004/0023902号に開示されており、それらはその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0091】

siRNA複合体は、局所投与、皮下、筋肉内、腹腔内、髄腔内および静脈内への注射、特定の器官、例えば、脳、肝臓、心臓もしくは腎臓などに、または例えば、悪性腫瘍もしくはウイルス感染症に冒された特定の位置にsiRNA複合体を送達するためのカテーテルといった、任意の送達系を用いて送達することができる。siRNA複合体を腔内に投与することもできる。

40

【0092】

「薬学的に許容される担体」とは、siRNA-複合体を混合するため、および/または対象に到達するための、薬学的に許容される任意の手段のことを意味する。本発明の方法の臨床的使用のためには、本発明のsiRNA-複合体を、経口的、直腸内、腔内、腸管外、局所的、静脈内またはその他の投与様式のための医薬調合物として調合する。医薬調合物は、本発明の化合物を、1つまたは複数の薬学的に許容される成分と配合された状態で含む。担体は固体、半固体または液体の希釈剤、クリームまたはカプセルの形態にある。これらの医薬製剤は本発明のさらなる目的である。通常、有効化合物の量は重量比で製剤の0.1~95%であり、腸管外使用のための製剤では好ましくは重量比で0.2~20%であり、経口投与のための製剤では好ましくは重量比の1~50%である。

50

【0093】

経口投与のための投薬単位の形態にある、本発明のsiRNA複合体を含む医薬製剤の調製においては、選択された化合物を、ラクトース、サッカロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アミロペクチン、セルロース誘導体、ゼラチンまたは別の適した成分などの粉末化された固体成分と、さらにはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリルフマル酸ナトリウムおよびポリエチレングリコールワックスなどの崩壊剤および潤滑剤と混合することができる。続いて混合物を加工処理して顆粒にする、または加圧成形して錠剤にする。

【0094】

軟ゼラチンカプセルは、軟ゼラチンカプセル用の植物油、脂肪またはその他の適した媒体中に本発明の1つまたは複数の有効化合物の混合物を含むカプセルを用いて調製することができる。硬ゼラチンカプセルは、有効化合物の顆粒を含みうる。硬ゼラチンカプセルはまた、ターゲット部分およびRNA結合部分ならびにターゲットsiRNAを含むsiRNA複合体を、ラクトース、サッカロース、ソルビトール、マンニトール、ジャガイモデンプン、コーンスターチ、アミロペクチン、セルロース誘導体またはゼラチンなどの粉末化された固体成分と配合されて含むこともできる。

【0095】

直腸または膣への投与のための投薬単位は、(i)有効物質、すなわちsiRNA-複合体が中性脂肪基剤と混合されたものを含む坐薬の形態；(ii)植物油、パラフィン油もしくはゼラチン製直腸カプセル用に適したその他の媒体との混合物中に有効成分を含むゼラチン製直腸カプセルの形態；(iii)既製の微量注腸剤の形態；または(iv)投与直前に適した溶媒で再構成するための乾燥微量注腸用調合物の形態、として調製することができる。

【0096】

経口投与のための液体製剤は、シロップ剤または懸濁剤の形態として、例えば、有効成分を重量比で0.2%~20%を含み、残りが糖または糖アルコール、ならびにエタノール、水、グリセロール、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールの混合物からなる溶液または懸濁液として調製することができる。必要であれば、このような液体製剤が、着色剤、香味剤、サッカリンおよびカルボキシメチルセルロースまたはその他の増粘剤を含んでもよい。また、経口投与のための液体製剤を、使用前に適した溶媒で再構成するための乾燥粉末の形態として調製することもできる。

【0097】

腸管外投与のための溶液は、薬学的に許容される溶媒中にある、好ましくは濃度が重量比で0.1%~10%である本発明の化合物の溶液として調製することができる。これらの溶液は、安定化成分および/または緩衝成分を含んでもよく、アンプルまたはバイアルの形態にある単位用量として分配される。腸管外投与のための溶液はまた、使用前に即時に適した溶媒で再構成するための乾燥製剤として調製することもできる。

【0098】

RNA干渉を送達するための本発明の方法を、RNA干渉を、噴霧された乾燥粒子を含む、または複合体化されてマイクロ粒子もしくはナノ粒子を形成した、顆粒形態として、経口的に送達するために用いることもできる。

【0099】

本明細書中および本明細書の全体を通じて言及する対象または個体には、ネズミ、具体的にはマウスおよびラット、ウシならびにヒトなどの霊長動物といった哺乳動物が含まれる。

【0100】

本明細書で用いるインビボ送達とは、ヒトを含む、生きている対象へのsiRNAの送達のことを意味する。

【0101】

本明細書で用いるインビトロ送達とは、生きている対象の外部での細胞および器官へのsiRNAの送達のことを意味する。

【0102】

本発明はまた、薬学的介入の標的のスクリーニングのための方法であって、複数の異なるsiRNAを、ターゲット部分およびsiRNA結合部分を含む融合タンパク質が特定の異なるsiRNAと混合されたものを用いて同時並行的な細胞培養環境にある細胞内に送達する段階、ならびにsiRNAの標的とされた遺伝子のサイレンシングの影響を測定する段階を含む方法も提供する。影響の測定は、従来のノーザンブロット分析、またはRT-PCRを利用したRNA定量もしくは当業者に周知のその他のRNA定量法といったより定量的な方法を用いて、標的RNA分子を測定することによって行うことができる。または、サイレンシングを、標的RNAによって産生されるタンパク質の存在および/または欠如を決定するための従来の免疫組織化学の方法を用いて検出することもできる。

10

【0103】

本明細書の全体を通じて引用された参考文献は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0104】

実施例

実施例1

最近の研究により、感染症、癌および神経変性疾患の予防および治療における、二重鎖性の短鎖干渉性RNA(siRNA)の有望な治療能力がインビトロで示されている。しかし、siRNAの治療応用における大きな障害は、最大限の治療効果を達成し、バイズタンダー細胞による非特異的サイレンシングまたはその他の毒性を回避するために、その分子をいかにして所望の細胞集団内に差し向けるかにある。

20

【0105】

二重鎖siRNAは自らの細胞標的を選択することができないため、分子を送達するためには「誘導ミサイル」を設計することが必要である。細胞表面受容体は、遺伝子送達のための可能性のある標的として利用されている。N末端のヒト一本鎖抗体断片(ScFv)およびC末端の完全長または短縮型ヒトプロタミンポリペプチドから構成される融合タンパク質は、RNAと結合して、抗体によって認識される対応する細胞表面タンパク質を発現する標的細胞内にそれを送達することができる(US 2004/0023902号)。または、重鎖のC末端がプロタミンまたはプロタミンの断片と融合されている、別々の重鎖および軽鎖から融合タンパク質を作製することもできる。

30

【0106】

本発明者らは、以下のsiRNAおよびプロタミン構築物を用いた:

GCGGCCGCACGCAGCCAGAGCCGGAGCAGATATTACCGCCAGA

GACAAAGAAGTCGCAGACGAAGGAGGCGGAGCTGCCAGACACGGAGGAG

AGCCATGAGATCTCATCATCACCACCACCATTA (SEQ ID NO: 1)

【0107】

ターゲティング部分をコードする核酸

本発明者らはプロタミンまたはその断片を用いた:

GCGGCCGCAATGGCCAGGTACAGATGCTGTCGCAGCCAGAGCCGGAGCA
GATATTACCGCCAGAGACAAAGAAGTCGCAGACGAAGGAGGCGGAGCTG
CCAGACACGGAGGAGAGCCATGAGATCTCATCATCACCACCACCATTA
(SEQ ID NO: 2);

GCGGCCGCACGCAGCCAGAGCCGGAGCAGATATTACCGCCAGAGACAAA
GAAGTCGCAGACGAAGGAGGCGGAGCTGCCAGACACGGAGGAGAGCCAT
GAGGTGTTGTCGCCCCAGGTACAGACCGAGATGTAGAAGACACAGATCTC
ATCATCACCACCACCATTA (SEQ ID NO: 3);

10

GCGGCCGCACGCAGCCAGAGCCGGAGCAGATATTACCGCCAGA
GACAAAGAAGTCGCAGACGAAGGAGGCGGAGCAGATCTCATCATCACC
CCACCATTA (SEQ ID NO: 4);

GCGGCCGCCGGCGGAGGAGGATCTCATCATCACCACCATTAA
(SEQ ID NO: 5);

20

GCGGCCGCAATGGCCAGGTACAGATGCTGTCGCAGCCAGAGCC
GGAGCAGATATTACCGCCAGAGACAAAGAAGTCGCAGACGAAGGAGGCG
GAGCAGATCTCATCATCACCACCACCATTA (SEQ ID NO: 6)

【0108】

示されている結果は、gp160抗体と結合した完全長プロタミン(F105-P)を用いて得た。

【0109】

本発明者らの本研究において、本発明者らは、抗体-プロタミン融合タンパク質が細胞表面受容体を介して細胞内にsiRNAを特異的かつ効果的に送達しうるか否かを明らかにするために、この系を適合させた。原理的には、同じ考え方を、抗体の代わりに受容体リガンドを用いる融合タンパク質を設計するように変更することができる。原理の証明として、本発明者らは、HIV感染細胞またはHIV gp160を発現するようにトランスフェクトされた細胞へのsiRNAのターゲティングを行うために、HIV gp120を認識するヒト抗体(F105)由来の軽鎖および修飾重鎖から構成される修飾抗体タンパク質(F105-プロタミン)を用いた。抗体重鎖はそのC末端で完全長プロタミンと融合させた。本発明者らは、siRNAと複合体化した融合タンパク質が、感染細胞にはsiRNAを効率的かつ特異的に送達するが、非感染細胞にはそうでないことを示すことができている；ターゲティングの効率が高い；そして、送達されたsiRNAは特異的mRNAのサイレンシングを行うことができる。さらに、これらの送達されたsiRNAはHIV複製を阻害する。

30

40

【0110】

記載された送達方法を用いて、本発明者らは、以下のsiRNAが遺伝子発現を阻害することを首尾良く試験することができた。

C-myc #1: 5-GAACAUCAUCAUCCAGGAC-3 (センス, SEQ ID NO: 13);
CUUGUAGUAGUAGGUCCUG (アンチセンス, SEQ ID NO: 14, FEBS Lett. 2004 Feb
27;560(1-3):210-4);

C-myc #2: 5-ACUCGAACAGCUUCGAAAC-3 (センス, SEQ ID NO: 15);
UGAGCUUGUCGAAGCUUUG (アンチセンス, SEQ ID NO: 16, 同上)

VEGF: 5-CGAUGAAGCCCUGGAGUG C-3 (センス, SEQ ID NO: 17);
GCACUCCAGGGCUUCAUCG (アンチセンス, SEQ ID NO: 18, Mol Vis. 2003 May
30;9:210-6);

MDM2: 5'GCUUCGGAACAAGAGACUCdTdT (センス, SEQ ID NO: 7);
3'dTdTGGUUGUGACGAAUGCGAAU (アンチセンス, SEQ ID NO: 8);

Apex1: 5'-CCAACACUGCUUACGCUUAdTdT-3' (センス, SEQ ID NO:
9); 3'-dTdTGGUUGUGACGAAUGCGAAU (アンチセンス, SEQ ID NO: 10); および

pp32: 5'-AAGAAGCUUGAAUUAAGCGdTdT-3' (センス, SEQ ID NO:
11); 3'-dTdTUUUCUUCGAACUUAUUCGC-5' (アンチセンス, SEQ ID NO: 12)

【0111】

タンパク質の精製

この融合タンパク質は、COS細胞においてニシストロン性プラスミドから発現され、ヒト免疫グロブリンの軽鎖と結合するL-プロテインカラムを通して精製される。COS細胞に対して、F105またはF105-プロタミンを発現するプラスミド(pCMV-F105、pCMV-F105-プロタミン)を安定的にトランスフェクトした。安定的にトランスフェクトされたCOS細胞から上清を収集し、上清をL-プロテインカラムに通すことによってF105またはF105-Pを精製した。このタンパク質は、非還元性ゲル中で単一の特定のピークとしてカラムから溶出させることができ、F105またはF105-Pとサイズが同一である、55kDaに対応するバンドが得られた。還元性ゲル中では、抗体の軽鎖および重鎖に対応する約22kDaおよび25kDaの2種類のタンパク質が認められた。本発明者らはまた、ヒトFabまたはプロタミン抗体をプローブとして用いるウエスタンブロット分析によって、タンパク質の実体も確かめた。

【0112】

siRNAに対する結合能力

本発明者らは続いて、F105-PがsiRNAと結合しうるか否かを、抗プロタミン抗体と複合体化したプロテインA、Gビーズを用いて、FITC標識siRNAとプレインキュベートしたF105-Pを免疫沈降させることによって評価した。

【0113】

F105-Pを、30pmolから始まって0.9375pmolまでの二倍希釈物を有するビーズと混合し、4度で一晩回転させた。FITC-siRNA(200pmol)をこの混合物に添加してさらに1時間回転させ、続いて十分に洗浄した。F105-Pによって運ばれるsiRNAの比を決定するために、F105-Pの種々の濃度で結合したsiRNAの吸光度の値を分光光度計で測定し、標準曲線に対してプロットした。ローディングしたsiRNAの約5%を融合タンパク質との共沈後に回収することができ、このことはF105-PがsiRNAを濃縮しうることを示唆している。最適な結合のために必要なF105-PとsiRNAのモル比は1:6であることが明らかになり、svFvにより送達されるsiRNAによる機能的サイレンシングを評価するすべての実験にこれを用いた(図1)。

【0114】

gp160を発現するマウス黒色腫細胞へのsiRNAのターゲティング

マウス黒色腫B16細胞にgp160を安定的にトランスフェクトし、siRNA単独、F105-P単独で処理するか、siRNA、またはF105-Pを種々の量のsiRNAとモル比1:6で複合体化したものをトランスフェクトした。gp160受容体を発現しない非トランスフェクトB16細胞を対照として用いた(レーン4)。処理から2日後に細胞を採取し、改変ノーザンブロット法のためにRNAを抽出した(図3)。

【0115】

HIV感染細胞に対するsiRNAのターゲティング

次に、本発明者らは、F105-PがsiRNAを標的HIV感染細胞内に送達しうるか否かを評価した。ジャーカット細胞をHIV_{IIIB}に感染させたところ、48時間後には細胞内p24染色によれば細胞の40%が感染した。続いて細胞を、F105-PをFITC-CD4 siRNAとモル比1:6で混合したもので処理した。処理から24時間後に、細胞の21%が標識siRNAを取り込んだ(図2)。

10

【0116】

F105-Pによって送達されたsiRNAが標的遺伝子のサイレンシングを効果的に行うか否かを明らかにするために、HeLa-GFP細胞にHIV HXB.2プラスミドをトランスフェクトし、siRNAターゲティングGFPを標的とするsiRNAと結合したF105-Pに曝露させた。p24を発現する細胞ではGFP発現が約5分の1に低下したが、非トランスフェクト細胞および非感染細胞はGFP発現の低下を全く示さなかった。同様に、F105のみ、GFP-siRNAのみ、またはF105-Pを無関係なsiRNA(マウスFas siRNA)と混合したものをを用いた対照では、GFP発現は低下しなかった。

20

【0117】

本発明者らはまた、F105-プロタミンにより送達されたGFP-siRNAがGFP-siRNAがGFP発現のサイレンシングを行うことも示した。HeLa-GFP細胞にHIV HXBプラスミドDNAを2日間にわたってトランスフェクトし、続いてGFP siRNA単独、F105-プロタミン単独、F105+GFP-siRNA、F105-プロタミン+対照マウスFas-siRNA、またはF105-プロタミンにさまざまな量のGFP siRNAをローディングしたもので処理した。GFP発現は、細胞内HIV p24に関して染色される、F105-プロタミンと複合体化したGFP-siRNAで処理した感染細胞のみでサイレンシングを受ける。サイレンシングは用量依存的であり、約300~500pmolのsiRNAでプラトーに達する(図4)。

30

【0118】

F105-Pを介したsiRNA送達HIVの複製を低下させるか否かを明らかにするために、本発明者らは、感染PHAで活性化された初代CD4 T細胞をHIV_{IIIB}に感染させた。初代T細胞に従来の方法を用いてsiRNAを感染させることは難しい。細胞のほとんどが産生を伴って感染したところで(細胞の77%がHIV p24に関して染色)、細胞をHIV gag-siRNAと複合体化したF105に曝露させた。対照細胞では疑似処理細胞と比較してHIV p24発現のわずかな低下がみられたが(p24+が61~79%に対して85%)、バックグラウンドを上回るHIV複製は、F105-プロタミンにより送達されたgag-siRNAによる処理後の細胞では36~45%のみで検出された。図5は、HIV複製が、HIV gag-siRNAを送達するためにF105-プロタミンで処理された初代CD4細胞では阻害されることを示している。活性化CD4 T細胞の60~85%がHIVに感染した培養物(細胞内p24染色により評価)を、疑似処理するか、または指定濃度のp24-siRNA単独、F105-プロタミン(F105-P)+GFP-siRNA、F105+p24-siRNA、またはF105-プロタミン+p24-siRNAで処理した。培養物を2日後に細胞内p24染色に関して評価した。HIV感染は、p24-sRNAと複合体を形成したF105-プロタミン複合体で処理した細胞のみで減少した。処理細胞の約40%で検出可能なp24染色が認められ、これに対して対照細胞では61~85%であった。

40

【0119】

本発明者らは、F105-プロタミンにより送達されたc-myc siRNA(図6A)およびVEGF siRNA(図6B)が標的遺伝子発現のサイレンシングを行うことを示している。マウス黒色腫B16細胞にgp160プラスミドDNAを安定的にトランスフェクトし、続いてF105-プロタミン単独、F

50

105-プロタミン+対照GFP-siRNA、またはF105-プロタミンにさまざまな量のc-myc siRNA(図6A)もしくはVEGF siRNA(図6B)をローディングしたもので処理した。gp160発現がみられないB16細胞を、F105-P送達に関する対照として用いた。c-myc(図6A)またはVEGF(図6B)の発現は、F105-プロタミンと複合体化した対応するsiRNAで処理されたgp160-B16細胞でサイレンシングを受ける。サイレンシングは用量依存的であり、約300pmolのsiRNAでプラトーに達する。

【0120】

本発明者らは、腫瘍特異的遺伝子を標的とするsiRNAを送達するためにF105-プロタミンで処理した、gp160を安定的に発現するマウス黒色腫B16細胞において、腫瘍増殖が阻害されることを示している。gp160を発現するB16細胞を、処理しないか、またはF105-プロタミン単独、F105-プロタミン+GFP-siRNA(1nmol)(図7A~7D、7F)、c-myc-siRNA(1nmol)(図7A)、mdm2-siRNA(1nmol)(図7B)、VEGF-siRNA(1nmol)(図7C)もしくはpp32-siRNA(1nmol)(図7D)単独、またはF105-プロタミンにさまざまな量のc-myc-siRNA(図7A)、mdm2-siRNA(図7B)、VEGF-siRNA(図7C)、pp32-siRNA(図7D)を個別もしくは組み合わせてローディングしたもの(図7F)で処理した(角括弧内の数字はsiRNAの量をpmol単位で表している)。培養物を2日後に、 $[^3\text{H}]$ -チミジン取込みアッセイを用いて細胞増殖に関して評価した。処理しないか、またはF105-プロタミン単独、またはF105-プロタミンに1nmolのc-myc-siRNA、mdm2-siRNA、VEGF-siRNA、pp32-siRNAもしくはGFP-siRNAをローディングしたもので処理した、gp160発現がみられない親B16細胞を、対照として用いた(図7E)。pp32を陰性対照として用いたが、これはそれが腫瘍抑制遺伝子であることが報告されているためである。

【0121】

本発明者らは、F105-プロタミンが、マウスにおけるgp160陽性B16腫瘍内にsiRNAを送達することを示した。gp160を安定的に発現するB16黒色腫細胞をマウス1匹当たり 1×10^6 個ずつ、C57/B6マウスの右側腹部に皮下接種した。9日後に、FITC標識siRNAをローディングしたF105-P(図8C、8D)またはオリゴフェクトアミン(図8E、8F)を腫瘍組織内に注射し、腫瘍を16時間後に蛍光顕微鏡検査のために採取した。ヘマトキシリン/エオシン(HE)染色により、接種された腫瘍巣が示された(図8A、8B)。F105-PはFITC-siRNAをgp160-B16腫瘍組織内に特異的に送達するが、オリゴフェクトアミンはFITC-siRNAを腫瘍組織および腫瘍巣の周囲の近隣組織の両方に送達する。

【0122】

実施例2

本発明者らは、インビトロだけでなくインビボでもsiRNAを特定の細胞集団に送達するためにF105-プロタミンを適用することの実行可能性について評価した。この評価は黒色腫マウスモデルで行ったが、その他の任意のモデル動物をこの第一段階の評価に用いることも可能と考えられ、それらの結果は、例えば、特異的な標的指向性遺伝子サイレンシングを必要とするヒトにsiRNAを送達するために直ちに適用することができる。図9Aおよび9Bは、F105-Pが、腫瘍内(図9A)および静脈内(図9B)注射によってc-myc、MDM2、およびVEGF siRNAをインビボのgp160-B16腫瘍内に送達し、腫瘍増殖を低下させることを示している。

【0123】

本発明者らは、gp160を安定的に発現するようにマウス黒色腫B16細胞を操作し、それらをマウス1匹当たり 5×10^6 個ずつ、C57/BL6マウスの右側腹部に皮下(s.c.)接種した。細胞接種後の第0日、第1日、および第3日に、マウスに対して、腫瘍細胞を移植した部位である右側腹部に、siRNAの組み合わせ(c-myc siRNA、mdm2-siRNA、およびVEGF siRNAのうち2種類の二重鎖を20 μg /二重鎖ずつ)とF105-Pを6:1のモル比で複合体を形成させたもの、またはsiRNA単独、またはPBSを、容量100 μl として、s.c.(図9A)またはi.v.(図9B)注射した。接種5日後から腫瘍サイズを毎日追跡調査した。gp160を発現しない親B16細胞は阻害されなかった。

【0124】

本発明者らの結果により、F105-Pと複合体化したsiRNAを投与されたマウスでは、腫瘍

サイズおよび腫瘍重量の両方が対照と比較して小さいことが示された。

【0125】

したがって、本発明者らの結果は、F105-Pがgp160陽性細胞内へのsiRNAのインビボ送達を増強することを示している。これらのデータは、F105-P系が、インビトロおよびインビボの両方において機能的siRNAを細胞内に送達するための有効なやり方であることを示している。この新規な送達系は、例えば、ヒト細胞内へのsiRNAの標的指向性送達にとって幅広い意味を持つ。特定の細胞集団内への阻害性RNAのターゲティングを行いうるため、望ましくない副作用の発生を最小限に抑え、治療の有効性を高めることができる。

【0126】

実施例3

10

材料および方法

siRNA

siRNAは、2'-O-ACE-RNAホスホルアミダイト(A4グレード、Dharmacon Research)を用いて合成した。fasおよびEGFPを対象とするsiRNAについては以前に記載されている⁶。siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖は以下の通りとした：

c-myc #1²⁷: 5'-GAACAUCAUCAUCCAGGAC-3' (センス, SEQ ID NO:13);

3'-CUUGUAGUAGUAGGUCCUG-5' (アンチセンス, SEQ ID NO:14);

c-myc #2²⁷: 5'-ACUCGAACAGCUUCGAAAC-3' (センス, SEQ ID NO:15);

3'-UGAGCUUGUCGAAGCUUUG-5' (アンチセンス, SEQ ID NO:16)

*VEGF*²⁸: 5'-CGAUGAAGCCCUGGAGUGC-3' (センス, SEQ ID NO:17);

3'-GCACUCCAGGGCUUCAUCG-5' (アンチセンス, SEQ ID NO:18);

*MDM2*²⁶: 5'-GCUUCGGAACAAGAGACUCdTdT-3' (センス, SEQ ID NO:7);

3'-dTdTGGUUGUGACGAAUGCGAAU-5' (アンチセンス, SEQ ID NO: , SEQ ID NO:8); および

pp32 (*ANP32A*)²⁹: 5'-AAGAAGCUUGAAUUAAGCGdTdT-3' (センス, SEQ ID NO:11);

3'-dTdTUUUCUUCGAACUUAUUCGC-5' (アンチセンス, SEQ ID NO:12)

Ku70: 5'-ACGGAUCUGACUACUCACUCAdTdT-3' (センス, SEQ ID NO:19);

3'-dTdTUGCCUAGACUGAUGAGUGAGU-5' (アンチセンス, SEQ ID NO:20)

【 0 1 2 7 】

記載された通りに⁶、センス鎖の5'末端がFITCで標識された、CD4を対象とする蛍光siRNAを、Dharmacon社から得た。

【 0 1 2 8 】

細胞株

COS細胞、B16細胞、ジャーカット細胞、SKBR3細胞、およびMCF7細胞(ATCC)を、10% ウシ胎児血清を添加したRPMI1640中で増殖させた。EGFPを安定的に発現するHeLa細胞(HeLa-GFP)は以前に記載されている³⁰。pCMV-F105-P⁸が安定的にトランスフェクトされ、500mL回転ボトル内で37℃で増殖させたCOS細胞からの培養上清を、記載された通りに⁸、プロテインL-アガロースを用いて精製した。HIV envを発現するB16細胞の安定的トランスフェクト体を、pcDNA3.1-EAC1³¹を用いて、G418選択および単細胞クローニングによって作製した。

【 0 1 2 9 】

F105-P結合アッセイ

F105-Pの結合能力を評価するために、200pmol FITC-siRNAを、抗プロタミン(Pharmingen)でコーティングされたプロテインA,Gビーズ(Pierce)とあらかじめ複合体化したF105-Pの希釈物に対して添加した。4℃での一晩のインキュベーションおよび十分な洗浄の後に、488nmでの吸光度を測定し、標準曲線に対してプロットした。F105-Pの非存在下でのビーズに対するバックグラウンドの結合は無視しうる程度であった。

【0130】

siRNAの送達

指定されたsiRNAを、プロタミン、F105、F105-P、ML39 ScFv、ML39 ScFv-PまたはPBSと、PBS中にてモル比6:1で混合(siRNA濃度、300nM)して4℃で30分間置き、その後に細胞に添加した。非付着細胞(400 μ lの細胞培養液中に 4×10^5 個)を24ウェルプレート中で処理した。HeLa-GFP細胞およびB16細胞を、6ウェルプレート中で800 μ l中にて約75%の集密度で同様に処理した。対照に関しては、製造元のプロトコールに従って細胞にオリゴフェクトアミン(Invitrogen)またはTransIT-siQUEST(Minis)を用いてトランスフェクトした。siRNA処理から2日後に、細胞を遺伝子発現、HIV感染または増殖に関して分析した。

【0131】

HIVの感染、トランスフェクションおよび検出

CD4免疫磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いた選択によって正常ドナーPBMCから単離したCD4 T細胞を、フィットヘマグルチニン(4 μ g/mL、Difco)により4日間刺激し、HIVのIIIB株(NIH AIDS Reagent Repository)にMOI 0.1で感染させた。7日後に、指定されたsiRNAで細胞を処理した。同様に、ジャーカット細胞をHIV IIIB株にMOI 0.01で感染させ、3日後にsiRNAで処理した。6ウェルプレート中にあるHeLa-GFP細胞に対して、Effectine Transfection Kit(Qiagen)を製造元のプロトコールに従って用いて、 $\square$ HXB3(NIH AIDS Reagent Repository)をトランスフェクトした。2日後に、トランスフェクトされた培養物を指定されたsiRNAで処理し、処理から2日後にHIVおよびGFP発現に関して分析した。GFP発現はノーザンブロット法およびフローサイトメトリーによって分析した。HIVが増殖している細胞は、記載された通りに¹³、透過化処理した細胞のRD1が結合した抗p24に関する細胞内染色のフローサイトメトリー分析によって同定した。ウイルス産生についても、培養上清のp24 Ag ELISA(Perkin Elmer Life Science Inc.)によりアッセイした。

【0132】

フローサイトメトリー

トリプシン処理したB16細胞を0.1% Triton X-100(Beckman Coulter)を用いて透過化処理し、ウサギ抗マウスc-mycまたはVEGF一次抗体(R&D Systems, Inc.)で染色した後に、PE標識ヤギ抗ウサギ二次抗体(BD Pharmingen)で染色した。乳癌細胞株におけるKu70発現についてもPE結合Ku70抗体(Santa Cruz)を用いて同様に分析した。フローサイトメトリーはFACScaliburをCeliQuestソフトウェア(Becton Dickinson)とともに用いて行った。

【0133】

ノーザンブロット法

処理したHeLa-GFP細胞から、Trizol(Invitrogen Life Technologies)を用いて全RNAを収集し、記載された通りに³⁰、GFPおよび β -アクチンを探索するノーザンブロット法によって分析した。B16細胞へのsiRNAの送達は、記載された通りに短鎖RNAを効率的に捕えるために設計された改変ノーザンブロット法によって分析した。

【0134】

インターフェロンアッセイ

gp160-B16細胞(1×10^6 個/2ml)を擬似処理するか、またはF105-PおよびGFP siRNA(300pmol)もしくはまたは5 μ g/mlのポリ(I:C)で処理した。24時間後にRNAを単離し、以下に述べるようにIFN応答遺伝子またはインターフェロン応答遺伝子定量的RT-PCRによって分析した。

【0135】

定量的PCR

Trizolを用いて単離した全RNA(1 μ g)を、Superscript III(Invitrogen)およびランダム

10

20

30

40

50

ヘキマサーを製造元のプロトコールに従って用いて逆転写させた。リアルタイムPCRを、0.2 μ l のcDNAまたは同等量のRNAに対して、逆転写酵素を用いずに、Platinum Taqポリメラーゼ(Invitrogen)およびBiorad iCyclerを用いて行った。SYBR green(Molecular Probes)をPCR産物の検出のために用いた。反応はすべて25 μ l の反応容積中で3回ずつ行った。マウスc-mycおよびGAPDHに対するプライマーは以下の通りである：

GAPDH-fwd 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' (SEQ ID NO: 21)

GAPDH-rev 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' (SEQ ID NO:22)

c-myc-fwd 5'-CCCCTGGTGCTCCATGAG-3' (SEQ ID NO:23)

10

c-myc-rev 5'-TCCTCCTCAGAGTCGC-3' (SEQ ID NO:24)

STAT1-fwd 5'-TTTGCCCAGACTCGAGCTCCTG-3' (SEQ ID NO:25)

STAT1-rev 5'-GGGTGCAGGTTCGGGATTCAAC-3' (SEQ ID NO:26)

OAS1-fwd 5'-GGAGGTTGCAGTGCCAACGAAG-3' (SEQ ID NO:27)

20

OAS1-rev 5'-TGGAAGGGAGGCAGGGCATAAC-3' (SEQ ID NO:28)

インターフェロン β -fwd 5'-CTGGAGCAGCTGAATGGAAAG-3' (SEQ ID NO:29)

インターフェロン β -rev 5'-CTTGAAGTCCGCCCTGTAGGT-3' (SEQ ID NO:30)

30

【0136】

PCRのパラメーターは、95℃での5分間のTaq活性化と、それに続く95℃×20秒間、60℃×30秒間および69℃×20秒のPCRの40サイクルからなる。標準曲線を作成し、標的遺伝子mRNAの相対量をGAPDH mRNAに対して標準化した。特異性は融解曲線分析およびアガロースゲル電気泳動によって確かめた。

【0137】

細胞増殖

マイクロタイターウェル中の処理したB16細胞またはgp160-B16細胞(2×10^4 個)に対して、 ^3H -チミジン(1 μ Ci)を6時間にわたり添加した。細胞を収集し、Top Countマイクロプレートリーダー(Packard)を用いてシンチレーション計数を行った。

40

【0138】

マウスにおける腫瘍移植および治療

動物実験はすべて、CBR Instituteの動物管理使用委員会による承認を得た。8~10週齢で体重20~25gの雌性C57/B16マウスをJackson Laboratoriesから購入した。siRNAのインビボ送達を評価するために、B16細胞またはgp160-B16細胞(2×10^6 個)を右側腹部にs.c.注射した。腫瘍が最初に検出された翌日(第9日)に、マウスに対して、PBS中にある50 μ gのFITC標識siRNA、またはそれをオリゴフェクトアミンもしくはF105-Pと混合したものを直接腫瘍内またはi.v.に注射した。マウスを16時間後に屠殺し、凍結切片の作製のために腫瘍を急速凍結した。腫瘍および隣接組織におけるFITC-siRNAの分布を、連続切片の蛍光顕微鏡検査およびヘマトキシリン・エオシン染色によって評価した。治療試験に関しては、第

50

0日に各群8匹ずつのマウスの右側腹部にB16細胞またはgp160-B16細胞(5×10^6 個)をs.c.移植し、腫瘍を第5日までに検出した。F105-Pとc-myc siRNA #1および#2、MDM2 siRNAおよびVEGF siRNAを、F105-P:全siRNAが1:6というモル比で複合体化したもの(注射容量100 μ l中に80 μ gのsiRNA)を、腫瘍移植後の第0日、第1日および第3日に直接腫瘍内または静脈内に注射した。移植後の第5日から第9日まで腫瘍サイズを毎日キャリパーによって測定した。マウスを第9日に屠殺し、腫瘍を切離して重量を測定した。

【0139】

抗ErbB2 ML39 ScFvおよびScFv-P

以前に記載された通りに¹⁰、Hisタグが付加された抗ErbB2 ML39 ScFvおよびScFv-プロタミン断片(アミノ酸8~29)(ScFv-P)を発現するバキュロウイルスベクターを発現させて精製した。手短に述べると、BaculoGold(Pharmingen)を用いて作製した、ML39 ScFvを発現する組換えウイルスに感染したSF9細胞の培養上清の硫酸アンモニウム沈殿後に、ML39 ScFvを Ni^{++} クロマトグラフィーによって精製した。ML39 ScFv-Pも同様にバキュロウイルスから発現させたが、SF9細胞からは6M塩酸グアニジン(GuanHCl)を用いて抽出し、その後6M GuanHCl中での Ni^{++} クロマトグラフィーを行った。溶出したタンパク質を、PBSならびに5%グリセロール、0.5Mアルギニン、1mM EGTAならびに還元型および酸化型の1mMグルタチオンを含むPBSに対して段階的に透析した。両方のタンパク質を最終的には5%グリセロールを含むPBSに対して透析し、濃縮した上で-70°Cで保存した。

【0140】

ML39 ScFv-Pを用いた送達

融合タンパク質の結合を検出するために、酵素非含有細胞解離緩衝液(Life Technologies)を用いてSKBR3細胞およびMCF7細胞を剥離させ、5%FBSを含むPBSで洗浄して、ML39 ScFv-P(1 μ g/ml)とともに4°Cで30分間インキュベートし(5×10^5 細胞/ml)、その後FITCが結合したHisタグ付加モノクローナル抗体(Babco)とともにさらに30分間インキュベートした。固定した細胞をフローサイトメトリーにより分析した。送達およびサイレンシングの実験に関しては、指定されたタンパク質をFITC-siRNA(300nM)またはKu70 siRNA(指定量)とともに4°Cで30分間インキュベートし、その後細胞に添加した。FITC-siRNAの送達は37°Cで4時間培養した後に評価し、Ku70のサイレンシングは3日後に評価した。

【0141】

統計

増殖アッセイを8回ずつ行ったことを例外として、インビトロ実験はすべて3回ずつ行った。結果は平均 $\pm$ SEMとして記述されている。統計分析は一元配置分散分析(ANOVA)によって行い、群間比較は独立標本t検定またはボンフェロニの多重比較t検定によって行った。

【0142】

結果

F105-PのHIV env⁺細胞のみに対するsiRNA送達

F105のIg κ 軽鎖およびC末端でプロタミンと融合された重鎖Fab断片の両方をコードする二シストロン性プラスミドがトランスフェクトされたCOS細胞からF105-Pを発現させて精製した。F105-PがsiRNAと結合する能力を明らかにするために、一定量のFITC標識siRNAをさまざまな量のF105-Pとともにインキュベートし、抗プロタミンを結合させたビーズによって沈降させ、捕捉されたsiRNAの488nmでの吸光度を測定した。F105-Pの各分子は約6個のsiRNA分子と結合することができる(図10A)。F105-Pが、HIV envを発現する細胞内にsiRNAを特異的に送達しうるか否かを明らかにするために、FITC-siRNAを単独で、または非修飾F105抗体もしくはF105-Pとともに、HIV感染ジャーカー細胞培養物に対して添加した。脂質トランスフェクションを送達に関する陽性対照として用いた。トランスフェクトされたFITC-siRNAは非感染細胞、感染細胞ともにその約70%によって同等に取り込まれた。感染細胞および非感染細胞はいずれも、FITC-siRNAそれ単独では、またはそれをプロタミンを欠く抗体断片、無関係な抗体-プロタミン融合タンパク質、もしくは非修飾プロタミンと混合した場合には、評価可能な程度には取り込まなかった。F105-Pと混合した場合には、非感染細胞は依然としてsiRNAを取り込まなかったが、感染ジャーカー細胞の40%

はそれを取り込んだ(図10B)。HIV envを発現する細胞内へのgag siRNAの特異的送達、env(gp160-B16)またはエンブティベクター(B16)が安定的にトランスフェクトされたマウス黒色腫B16細胞を用いる改変ノーザンブロット法を用いて検証された(図10C)。gag siRNAは、gag siRNAをF105-Pと混合したもので処理されたgp160-B16細胞では検出されたが、gp160-B16細胞を同じ混合物とともにインキュベートした場合も、複合体化されていないgag-siRNAとともに用いたgp160-B16細胞においても検出されなかった。取込みは約100pmolのsiRNA [100nM] を添加した場合にプラトーに達した。

【0143】

F105-Pにより送達されたsiRNAによる遺伝子発現のサイレンシング

F105-Pにより送達されたsiRNAが標的遺伝子発現のサイレンシングを行いうるか否かを評価するために、F105-Pを用いて、EGFPを安定的に発現するHeLa細胞に、EGFPを標的とするsiRNAを導入した(HeLa-GFP)。HeLa-GFP細胞にはHIV λ HXB3が約80%の効率でトランスフェクトされた。F105-Pを用いて送達されたGFP siRNAは、HIV gag抗原に関して染色されるトランスフェクト細胞のみにおいて、EGFP mRNA(図11A)およびタンパク質(図11B)を用量依存的な様式で減少させた。サイレンシングは約300pmol [300nM] のsiRNAでプラトーに達した。非トランスフェクトp24⁻細胞では、または無関係なfas siRNAを用いた場合、もしくは抗体を用いなかった場合、またはF105-Pの代わりに非修飾F105を用いた場合には、EGFP発現の低下が観察されなかったため、F105-Pにより送達されたsiRNAによるサイレンシングは特異的であった。EGFP mRNAの減少は、融合タンパク質により送達されたsiRNAがmRNA分解を介して標的遺伝子発現のサイレンシングを行うことを裏づけている。

【0144】

送達されたsiRNAの感染T細胞におけるHIVの阻害

初代T細胞は従来の脂質利用戦略を用いてトランスフェクトするのは困難なことが知られている。本発明者らはこのため、F105-PがHIV感染CD4 T細胞内にgag siRNAを送達してウイルス複製を低下させるか否かを評価した。gag siRNAがローディングされたF105-Pは、事前に感染したCD4 T細胞におけるHIV複製を用量依存的な様式で低下させた(図12A)。産生を伴って感染した細胞の割合は、非処理培養物における85%から、1nmolのgag siRNAを添加した場合には36%へと低下した。さらに、その10分の1のsiRNAを用いた場合ですら、HIV gagに関して染色された細胞の割合は45%に過ぎなかった。F105-Pおよびgag-siRNAで処理した初代細胞からの培養上清へのウイルス粒子の放出は、HIV p24 ELISAによる測定では、170ng/mlから、少なくとも100pmolのsiRNAを用いた条件下では<40ng/mlに減少した(図12B)。これらの実験において、siRNAの非存在下でのF105またはF105-P抗体の存在下では、抗体の中和活性のために感染が約30%(約170ng/mlから約115ng/mlに)低下した。しかしながら、siRNAでコーティングされた抗体は、形質導入が困難なこれらの初代T細胞におけるHIV複製をより効率的に抑制した。さらに、すでに産生を伴って感染した細胞においてすら抑制を実現することができた。

【0145】

送達された癌遺伝子siRNAによる増殖の阻害

HIVに関する優れたマウスモデルがないことから、抗体-プロタミン融合タンパク質がインビボでsiRNAを送達する能力を調べるために、本発明者らは腫瘍モデルとしてgp160-B16細胞を皮下注射した。さまざまな癌遺伝子、腫瘍増殖因子、抗アポトーシス遺伝子および薬剤耐性遺伝子を標的とするsiRNAは、ほとんどはインビトロで腫瘍増殖を抑制することが示されている¹。siRNAに腫瘍細胞を特異的な標的とさせることができれば、正常な細胞増殖または生存のために必要なあらゆる遺伝子を原理的には標的にしうと考えられる。c-myc、MDM2およびVEGFに対する以前に同定されたsiRNAを、単独でまたは併用して、インビトロで遺伝子発現をダウンレギュレートする能力およびgp160-B16細胞の増殖を低下させる能力に関して調べた(図13)。c-mycを対象とする2種類のsiRNAは、HIV envを発現するB16細胞のみに効果的かつ特異的にローディングされ、定量的RT-PCRによる評価でmRNAを減少させ(図13A)、フローサイトメトリーによる評価でc-mycタンパク質を減少させた(図13B)。F105-Pおよびc-myc-siRNAは、HIV envを発現しないB16細胞には影響を及ぼさなかつ

た。両方のc-myc siRNAをF105-Pを介してgp160-B16細胞にローディングしたところ、腫瘍細胞の増殖は用量依存的な様式で低下し、siRNA濃度 $>100\text{nM}$ では最大で3分の1に抑制された(図13D)。増殖は、送達されたsiRNAおよびトランスフェクトされたsiRNAによって同程度に低下し、飽和siRNA濃度は約 100pmol であった。VEGF-siRNAおよびmdm2-siRNAを送達することによって同程度の遺伝子サイレンシングが得られた(図13C)が、VEGF siRNAはインビトロでの腫瘍細胞増殖の阻害に対してわずかな効果しか及ぼさなかった(図13E、図13F)。しかし、血管新生を阻止することにより、VEGF siRNAはインビボではさらに高い効果を有する可能性がある。腫瘍抑制因子と推定されるpp32⁹を標的とする対照siRNAは、遺伝子発現のサイレンシングには効果があったが、腫瘍増殖は阻害せずむしろ幾分増強したように思われる。c-mycおよびMDM2、または3種類の遺伝子すべてを標的とするsiRNAは、gp160-B16細胞の増殖の最大限の阻害を導いた。3種類の遺伝子すべてを標的とするsiRNAによって腫瘍増殖は7分の1に阻害され、これに対して、c-mycを標的とする2種類のsiRNAを組み合わせた場合は3分の1に阻害され、MDM2またはVEGFを標的とするsiRNAのそれぞれでは2分の1またはそれを下回る阻害であった(図13G)。さらに、F105-Pにより送達されたこれらのsiRNAはいずれも、HIV envを発現しないB16腫瘍細胞の増殖には有意な影響を及ぼさなかった(図13H)。

【0146】

送達されたsiRNAによるインターフェロン応答の非誘発

送達されたsiRNAは非特異的炎症応答を活性化する可能性があり、それはサイトゾル二本鎖RNAがインターフェロン応答を直接誘発すること、または細胞表面またはエンドソーム内部にあるRNA(TLR3、TLR7)を認識するToll様受容体(TLR)との結合を介して間接的にそれを行うことを理由として毒性を引き起こす可能性がある。本発明者らはこのため、疑似処理するか、F105-Pにより送達される無関係なGFP siRNAに曝露させるか、またはインターフェロン誘導物質であるポリ(I:C)で処理したgp160-B16細胞において、予想されるピーク応答時間(24時間)の前後で、インターフェロン- β (IFN- β)ならびに2種類の重要なインターフェロン応答遺伝子である2',5'-オリゴアデニル酸シンターゼ(OAS1)およびStat-1の発現を定量的RT-PCRによりアッセイした(図13I)。ポリ(I:C)は3種類の遺伝子すべての発現を誘導したが、F105-Pと複合体化したsiRNAはこれらの遺伝子のいずれの発現に対しても統計学的に有意な影響を及ぼさなかった。したがって、F105によるsiRNAの送達は有害な可能性のあるIFN応答を誘発しないように思われる。

【0147】

蛍光siRNAの特異的な全身的送達

次の段階は、F105-PがインビボでsiRNAをgp160-B16細胞内に特異的に送達しうるかを明らかにすることであった。このため、本発明者らは、同系C57/B16マウスの右側腹部にgp160-B16細胞を皮下移植し、F105-Pが蛍光siRNAを送達する効率を評価した。裸のFITC-siRNAを腫瘍組織内に注入した場合には、腫瘍細胞はsiRNAを効率的には取り込まなかった。オリゴフェクトアミンと混合したFITC-siRNAを注入した場合には、siRNAは腫瘍および隣接皮下組織によって取り込まれた。これに対して、F105-PはFITC-siRNAをgp160+腫瘍細胞内に特異的に沈着させ、隣接組織には沈着させなかった(図14A)。高倍率では、蛍光シグナルは腫瘍細胞の細胞膜を染色し、細胞質中に散在して認められ、核には認められなかった(図14B)。gp160を発現しない移植B16細胞はFITC-siRNAを取り込まなかったため、F105-P送達は特異的であった。さらに、F105-P-siRNA混合物を少容量($100\mu\text{l}$)で静脈内注射した場合、gp160-B16細胞の約30%はFITC-siRNAを取り込んだが、gp160-B16細胞は全く取り込まなかった(図14C)。F105-Pを伴わない静脈内注射後にはFITC-siRNAは腫瘍によって全く取り込まれなかった。

【0148】

送達されたsiRNAによるインビボでの黒色腫増殖の阻害

抗体を介したsiRNA送達の治療能力を評価するために、本発明者らは、 5×10^6 個のB16細胞またはgp160-B16腫瘍細胞を各群8匹ずつのマウスの側腹部に皮下移植した後の第0日、第1日および第3日に、c-myc、MDM2およびVEGFに対するsiRNAの混合物と複合体化したF105

10

20

30

40

50

-Pを、腫瘍内に直接注入するか静脈内に注射した。腫瘍サイズは腫瘍が触知可能になった第5日から測定し、マウスを第9日に屠殺した時点で腫瘍の重量を測定した(図14D~14G)。gp160-B16腫瘍は、F105-P-siRNA複合体の腫瘍内または静脈内注射による投与を受けたマウスの方が、siRNAのみを投与されたものよりも小さかった。F105-Pのみを投与されたマウスは、PBSを投与されたマウスと同程度のサイズの腫瘍を有していた。腫瘍内注射の方が全身的送達よりも幾分有効性が高かった。予想された通り、gp160発現を伴わないB16腫瘍の増殖はF105-P-siRNA投与によって影響されず、裸のsiRNAの注射によってはB16腫瘍もgp160-B16腫瘍も縮小しなかった。したがって、F105-Pは、全身投与された場合ですら、envを発現する腫瘍細胞に対してsiRNAを特異的に送達し、腫瘍増殖を抑制することが可能であった。

10

【0149】

プロタミンと融合した一本鎖抗体による送達

抗体により媒介されるsiRNAの送達を、gp120以外の細胞表面分子に対するターゲティングのためにも用いるか否かを明らかにするために、本発明者らは、バキュロウイルスから、多くの乳癌細胞の表面に発現される受容体ErbB2を認識する一本鎖抗体断片(ML39 ScVf)が、そのC末端でプロタミンのアミノ酸8~29に対応する断片と融合したものから構成される融合タンパク質(ML39 ScVf-P)を発現させた¹⁰。ML39 ScVf-Pは、プラスミドDNAをErbB2+細胞のみに導入することが以前に示されている¹⁰。この融合タンパク質は昆虫細胞の内部に保たれるため、それをグアニジンHCl中に抽出し、段階的な再生によってリフォールディングさせた。しかしながら、感染した昆虫細胞からの一本鎖抗体融合タンパク質の収量は、哺乳動物細胞で発現させたF105-Pの収量よりもはるかに多かった。ML39 ScVfはErbB2⁺ SKBR3細胞とは結合するが、ErbB2⁻ MCF7乳癌細胞株とは結合しなかった(図15A)。本発明者らはまず、ML39 ScVf-PがFITC-siRNAをSKBR3細胞内に導入する能力をMCF7細胞と比較した(図15A)。ML39 ScVf-PはFITC-siRNAをErbB2発現細胞の32%に送達したが、ErbB2⁻細胞にはバックグラウンドを上回る形質導入を行わなかった。担体タンパク質を伴わない場合、または一本鎖非修飾抗体もしくはプロタミンのみを用いることによる送達はみられなかった。送達の特異的であったため、本発明者らは次に、ML39 ScVf-Pにより送達されたsiRNAによるKu70のサイレンシングについて調べた(図15B、15C)。Ku70のサイレンシングはErbB2⁺ SKBR3細胞のみで起こり、MCF7細胞では起こらなかった上、プロタミンもしくはML39 ScVfをKu70 siRNAと混合したもの、またはML39 ScVf-Pを無関係なEGFP siRNAと混合したものはKu70発現に対して影響を及ぼさなかったため、融合タンパク質およびKu70 siRNAが必要であった。ML39 ScVf-Pによるサイレンシングに関する用量反応は約1000pmolのsiRNAでプラトーに達し、これはトランスフェクションまたはF105-P送達による効果的なサイレンシングに必要なものの約3~10倍であった。完全長プロタミン(51アミノ酸)が一本鎖抗体と融合したものをを用いること、または再生条件もしくはsiRNAに対する結合比を最適化することによってこれを改善しうるか否かについては、さらに研究が必要である。

20

30

【0150】

考察

本発明者らは、HIVエンベロープタンパク質を、プロタミンと融合した抗体Fab断片を介したsiRNAの標的指向性送達に関するモデル受容体として用いた。送達はインビトロおよびインビボのいずれにおいても、envを保有する細胞に対して特異的であり、従来の静脈内投与による全身的送達も可能であった。さらに、トランスフェクトすることが困難である初代CD4⁺ T細胞内にsiRNAを導入すること、およびすでに感染した細胞においてHIV産生を抑制することも可能であった。siRNAの標的指向性送達は、siRNAの治療指数を高め、必要な薬物の量を減らし、標的外効果に関する懸念を最小限に抑えるはずである。

40

【0151】

この原理の証明研究における有望なデータは、さらなる向上の基盤を築くものである。ErbB2に関して示されたように、Fab断片を一本鎖抗体に置き換えることによって融合タンパク質を修飾することができる。また、抗体を細胞表面受容体リガンドに置き換えることも可能と考えられる。原理的には、完全長プロタミンまたは核酸結合性プロタミン断片ま

50

たはその他の核酸結合ペプチドを、抗体またはリガンドのN末端またはC末端のいずれかでターゲティング部分と融合させることができる。融合タンパク質を産生させるためにその他の発現系を用いることもできると考えられる。本発明者らは、抗体融合タンパク質により送達されたsiRNAはインビトロで投与された場合にインターフェロン2応答を誘導せず²、その他の非特異的炎症反応も誘導しない⁴という予備的な証拠を提示している。しかし、このことはインビボでより慎重に検討して検証する必要がある。しかし、本発明者らは、本発明者らのインビボ腫瘍モデルにおいて、いかなる明らかな毒性も炎症性浸潤も観察しなかった。

【0152】

融合抗体により送達されるsiRNAの薬物動態はまだ明らかになっていない。しかし、融合タンパク質と複合体化したsiRNAは、非修飾siRNAと比較して好適な半減期を有する可能性が高いと考えられる。腎臓による裸のsiRNAの濾過が、非修飾siRNAの短いインビボ半減期の原因となる律速因子である。この複合体の推定サイズ($V_H C_{H1}$ (233aa)-プロタミン (51aa)が1分子、30kDa; $V_K C_K$ が1分子、28kDa; siRNAが6分子、 6×7000 Da)は100kDaであり、腎臓濾過のカットオフ値を優に上回る。融合タンパク質-siRNA複合体が、肺および脾臓のような濾過器官における、組織マクロファージおよび樹状細胞などの細網内皮細胞内に捕捉されて全身的送達を妨げると考えられる粒子を形成する可能性は低い。実際に、これらの器官では蛍光性siRNAの取込みは認められなかった(非提示データ)。非修飾siRNAのインビトロ血清中半減期は、内因性RNアーゼ活性のため約1時間である¹¹。融合タンパク質に対する結合は、複合体化したsiRNAを血漿RNアーゼから保護する可能性があるが、これは今後明らかにされる必要がある。複合体中のsiRNAの化学修飾は、血清中での分解に対する脆弱性を低下させるはずであるが、化学修飾は細胞内サイレンシングの効率を犠牲にして起こるように思われるため、修飾がインビボでの有効性を高めるか否かははっきりしない¹²。

【0153】

本発明者らの送達戦略は、抗ウイルス性siRNAを、HIV-1が活発に複製している細胞内に特異的にターゲティングさせた。siRNA輸送はgp160発現を要したため、ウイルス産生はウイルス遺伝子を活発に転写している細胞のみで抑制された。これが感染細胞を標的とする低分子抗ウイルス薬としてsiRNAを用いるための実行可能なまたは最適な方法をもたらすか否かは予測することが難しい。HIV感染細胞の主要タイプ(CD4 T細胞およびマクロファージ)の表面にある別の共通の細胞表面受容体、例えばHIV補助受容体CCR5またはCXCR4などを用いて、より効率的なサイレンシングが実現される可能性もある。本発明者らのターゲティング戦略には柔軟性があるため、融合タンパク質のHIV env抗体成分を、ケモカイン受容体に対する特異的抗体、またはケモカインもしくはケモカイン類似体などの受容体リガンドによって置き換えることも可能と考えられる。これはより早期の段階にある細胞を標的として、感染を予防することが考えられる。しかし、正常細胞に害を及ぼすことなく感染細胞を除去する目的で、細胞生存のために必要な必須遺伝子のサイレンシングを行わせるために、すでに感染した細胞に対する特異的送達を利用することも可能と考えられる。siRNAを抗体-融合タンパク質と共有結合させる必要はないため、異なるsiRNAの混合物を変化させながら送達するために同じ試薬を柔軟に用いることができる。siRNAの混合物を用いて多数のウイルスおよび/または宿主遺伝子を標的とすることにより、HIV gagのみを標的とすることによって実現されるよりもHIV感染の抑制を改善しうる可能性が高いと考えられる¹³。

【0154】

本研究において、本発明者らは、HIV envを発現するように黒色腫細胞にトランスフェクションを行うことにより、それらを標的とする人工的な系を用いた。この送達戦略は、さまざまな種類の細胞表面受容体を介して種々の細胞の任意のものを標的とするように改変することができる。往々にして低分化状態または系譜拘束の指標である、特異的腫瘍マーカーが、多くのヒト腫瘍細胞に関して同定されている。その例には、ある種の乳癌細胞表面にあるc-erbB2(Her2)¹⁴、鼻咽頭癌上のEBVによりコードされるLMPタンパク質、また

10

20

30

40

50

はB細胞リンパ腫上の表面免疫グロブリンが含まれる。しかし、腫瘍が治療法から逃れるために何らかの特定の細胞表面受容体の発現をダウンレギュレートすることができるという可能性もある程度はある。ターゲティングのための受容体の適切な選択(腫瘍増殖のために必要な増殖因子に対する受容体、すなわち、黒色腫細胞の表面にあるIL-6RまたはT細胞リンパ腫細胞の表面にあるIL-2Rなど)により、逃れる確率は低くなると思われる。また、機能を調節する必要がある正常細胞を、この方法によって標的とすることも可能と考えられる。その例には、自己免疫疾患におけるTリンパ球、炎症疾患における樹状細胞もしくはマクロファージ、または高コレステロール血症にとっての肝細胞があると思われる。このうち後者は、最近、細胞受容体リガンドと共有結合した化学修飾siRNAの全身投与によってインビボでターゲティングを受けている(アポB受容体に対するコレステロール結合)¹²。

10

【0155】

F105-Pにより送達されるsiRNAの細胞質中への輸送経路は、まだ解明されていない。細胞表面受容体との結合後の最も可能性の高い経路は、クラスリンを介したエンドサイトーシスである。サイレンシングの効率をトランスフェクションと比較することにより、siRNAがエンドサイトーシスを受けるならば、それらは過酷なエンドソーム環境において安定であることが示唆される。siRNAがいかにしてエンドソームから細胞質中に排出されるかは不明であるが、画像化法(図15C)およびサイレンシングはサイトゾルに対する輸送を明らかに示している。蛍光siRNAの送達を追跡するための細胞生物学研究が必要である。

【0156】

20

送達の障害を克服することは、ほとんどの適応症にとって、siRNAを低分子薬として用いるための最大の障壁である(¹に概説されている)。局所的送達は脂質を利用する方法によっても可能であり、特に皮膚または肺などの粘膜表面ではそうであるが^{15~17}(本明細書中で腫瘍内送達に関してオリゴフェクトアミンを用いて示されてもいるように)、全身的送達はより取り組みがいがある。siRNAによる疾患からのインビボ防御に関する最初の試験で用いたハイドロダイナミック注射法^{6,18,19}はヒトでの使用には現実的でない。いくつかの適応症に対しては、器官からの排液路となる静脈内への局所注射が、ヒトに用いる代替的なアプローチとなる可能性がある^{20,21}。インビボで奏効することが報告されているアプローチには、ポリマーであるアテロコラーゲンとの複合体²²、ポリエチレンイミンを含むナノ粒子、脂質複合体およびリポソーム^{23~25}、ならびに肝臓¹²へのターゲティングのためのコレステロールに対する共有結合が含まれる。しかし、これらの方法は細胞種特異的ではない。抗体を介した送達を用いるサイレンシングは効率が高く、コレステロールと結合したsiRNAのインビボでのサイレンシングのために必要なものに比して約15分の1のsiRNAしか必要としない¹⁰。本発明者らの方法は、siRNAの共有結合も特化した化学構造も必然的には含まないため、それには調製の簡便さおよび同じ送達試薬を用いた異なるsiRNAの評価を可能にする柔軟性という利点がある。本方法は、ほとんどあらゆる細胞種のターゲティングのために容易に適応させることができる。さらに、本方法は学術研究施設によるインビボ試験が適用されやすい。siRNAをコードするプラスミドを神経膠腫細胞に送達することが報告されているイムノリポソームを、siRNAの細胞特異的ターゲティングのために適応させうる可能性もある²⁶。インビボで最も良く奏効する方法を、標的細胞および適応疾患に対して個別化する必要があるかもしれない。考えられる複数の戦略が利用可能になれば、その中から選択するために、さまざまな送達アプローチの直接比較が必要と考えられる。しかし、本研究およびSoutschekらの最近の報告¹²は、送達の障壁は克服可能であることを示唆している。

30

40

【0157】

当業者には、前記の開示の恩典を考慮に入れて、本発明の概念を逸脱することなしに、そのさまざまな変更、および本明細書に記載された具体的な態様からの逸脱を行うことができ、本発明は添付された特許請求の範囲および精神のみによって制約されることが明らかである。

【図面の簡単な説明】

50

【0158】

【図1】F105-プロタミンがsiRNAと結合する能力を示している。100pmolのFITC-siRNAを、L-プロテインビーズに結合させた指定量のF105-プロタミンとともに室温で30分間インキュベートした。洗浄後の捕捉siRNAの488nmでの蛍光を測定し、FITC-siRNAの標準曲線と比較した。

【図2】F105-プロタミンが、感染したジャーカット細胞のみにsiRNAを送達することを示している。図2Aは、HIV IIIBに感染させない(左)か感染させ(右)、HIV gag p24に対する細胞内染色によって感染に関して評価した対照ジャーカット細胞を示している。細胞の45%がHIVに産生を伴って感染している。図2Bは、siRNAが、F105-プロタミンによってのみ、感染細胞の約半数(全細胞の21%)に送達され、それ自体によってもプロタミンを伴わないF105によっても送達されないことを示している。非感染培養物による取込みはみられない。陽性対照として、細胞にオリゴフェクトアミンを用いてトランスフェクトした。siRNAをトランスフェクトした場合に、感染細胞と非感染細胞との間に取込みに関する差はなかった。

【図3】F105-プロタミンが、gp160が安定的にトランスフェクトされたB16細胞内にsiRNAを送達することを示している。マウス黒色腫B16細胞にgp160を安定的にトランスフェクトして、siRNA単独、F105-P単独で処理するか、siRNA、またはF105-Pを種々の量のsiRNAとモル比1:6で複合体化したものをトランスフェクトした。gp160受容体を発現しない非トランスフェクトB16細胞を対照として用いた(レーン4)。処理から2日後に細胞を採取し、改変ノーザンブロット法のためにRNAを抽出した。

【図4】F105-プロタミンにより送達されたGFP-siRNAが、GFP発現のサイレンシングを行うことを示している。HeLa-GFP細胞にHIV HXBプラスミドDNAを2日間にわたってトランスフェクトし、続いてGFP siRNA単独、F105-プロタミン単独、F105+GFP-siRNA、F105-プロタミン+対照マウスFas-siRNA、またはF105-プロタミンにさまざまな量のGFP siRNAをローディングしたもので処理した。GFP発現は、細胞内HIV p24に関して染色される、F105-プロタミンと複合体化したGFP-siRNAで処理した感染細胞のみでサイレンシングを受ける。サイレンシングは用量依存的であり、約300~500pmolのsiRNAでプラトーに達する。

【図5】HIV複製が、HIV gag-siRNAを送達するためにF105-プロタミンで処理された初代CD4細胞で阻害されることを示している。活性化CD4 T細胞の60~85%がHIVに感染している培養物(細胞内p24染色により評価)を、擬似処理するか、または指定濃度のp24-siRNA単独、F105-プロタミン(F105-P)+GFP-siRNA、F105+p24-siRNAもしくはF105-プロタミン+p24-siRNAで処理した。培養物を2日後に細胞内p24染色に関して評価した。HIV感染は、p24-siRNAと複合体化したF105-プロタミンで処理した細胞のみで低下した。処理細胞の約40%で検出可能なp24染色が認められ、これに対して対照細胞では61~85%であった。

【図6】F105-プロタミンにより送達されたc-myc siRNAおよびVEGF siRNAが、標的遺伝子発現のサイレンシングを行うことを示している。マウス黒色腫B16細胞にgp160プラスミドDNAを安定的にトランスフェクトし、続いてF105-プロタミン単独、F105-プロタミン+対照GFP-siRNA、またはF105-プロタミンにさまざまな量のc-myc siRNA(図6A)もしくはVEGF siRNA(図6B)をローディングしたもので処理した。gp160発現がみられないB16細胞を、F105-P送達に関する対照として用いた。c-myc(図6A)またはVEGF(図6B)の発現は、F105-プロタミンと複合体化した対応するsiRNAで処理されたgp160-B16細胞でサイレンシングを受ける。サイレンシングは用量依存的であり、約300pmolのsiRNAでプラトーに達する。

【図7】腫瘍特異的遺伝子を標的とするsiRNAを送達するためにF105-プロタミンで処理された、gp160を安定的に発現するマウス黒色腫B16細胞で、腫瘍増殖が阻害されることを示している。gp160を発現するB16細胞を、処理しないか、またはF105-プロタミン単独、F105-プロタミン+GFP-siRNA(1nmol)(図7A~7D、7F)、c-myc-siRNA(1nmol)(図7A)、mdm2-siRNA(1nmol)(図7B)、VEGF-siRNA(1nmol)(図7C)もしくはpp32-siRNA(1nmol)(図7D)単独、またはF105-プロタミンにさまざまな量のc-myc-siRNA(図7A)、mdm2-siRNA(図7B)、VEGF-siRNA(図7C)、pp32-siRNA(図7D)を個別もしくは組み合わせて(図7F)ローディングしたもので処理した(角括弧内の数字はsiRNAの量をpmol単位で表している)。培養物を2日後に、³H

10

20

30

40

50

-チミジン取込みアッセイを用いて細胞増殖に関して評価した。処理しないか、またはF105-プロタミン単独、またはF105-プロタミンに1nmolのc-myc-siRNA、mdm2-siRNA、VEGF-siRNA、pp32-siRNAもしくはGFP-siRNAをローディングしたもので処理した、gp160発現がみられない親B16細胞を、対照として用いた(図7E)。pp32は、腫瘍抑制遺伝子であることが報告されているため、陰性対照として用いられる。

【図8】F105-プロタミンが、マウスにおけるgp160陽性B16腫瘍内にsiRNAを送達することを示している。gp160を安定的に発現するB16黒色腫細胞をマウス1匹当たり 1×10^6 細胞ずつ、C57/B6マウスの右側腹部に皮下接種した。9日後に、FITC標識siRNAをローディングしたF105-P(図8C、8D)またはオリゴフェクトアミン(図8E、8F)を腫瘍組織内に注射し、腫瘍を16時間後に蛍光顕微鏡検査のために採取した。ヘマトキシリン/エオシン(HE)染色により、接種された腫瘍巣が示された(図8A、8B)。F105-PはFITC-siRNAをgp160-B16腫瘍組織内に特異的に送達するが、オリゴフェクトアミンはFITC-siRNAを腫瘍組織および腫瘍巣の周囲の近隣組織の両方に送達する。図8Dは、腫瘍巣のみにおける緑色蛍光染色を示しており、一方、図8Fは腫瘍巣および周囲組織の両方での緑色蛍光染色を示している。

【図9】F105-Pが、腫瘍内(図9A)および静脈内(図9B)注射によってc-myc、MDM2およびVEGFのsiRNAをインビボのgp160-B16腫瘍内に送達し、腫瘍増殖を低下させることを示している。gp160を安定的に発現するように操作されたマウス黒色腫B16細胞をマウス1匹当たり 5×10^6 個ずつ、C57/BL6マウスの右側腹部に皮下(s.c.)接種した。細胞接種後の第0日、第1日および第3日に、マウスに対して、腫瘍細胞を移植した部位である右側腹部に、siRNAの組み合わせ(c-myc siRNA、mdm2-siRNAおよびVEGF siRNAのうち2種の二重鎖を20 μ g/二重鎖で)とF105-Pを6:1のモル比で複合体化したもの、またはsiRNA単独、またはPBSを、容量100 μ lとして、s.c.(図9A)またはi.v.(図9B)注射した。接種5日後から腫瘍サイズを毎日追跡調査した。gp160を発現しない親B16細胞は阻害されなかった。

【図10】F105-PがsiRNAと結合し、それらをHIV env発現細胞のみに送達することを示している。図10Aは、それぞれのF105-P分子が約6個のFITC標識siRNA分子と結合しうること示している。一定量のFITC-siRNAを、抗プロタミン結合ビーズに結合させたさまざまな量のF105-Pとともにインキュベートし、ビーズに結合したFITC-siRNAの結合を蛍光強度によって測定して標準曲線と比較した。図10Bは、F105-Pが、FITC標識siRNAをHIVに感染したジャックカット細胞のみに送達することを示している。ジャックカット細胞を感染させない(上の列、左)かHIV IIIBに感染させた(上の列、右)。細胞の約82%は、HIV p24に対する細胞内染色によって評価されるように、産生を伴って感染した。プロタミンと結合したHIV env抗体(F105-P)は、FITC標識siRNAを、ゲートを備えた感染ジャックカット細胞のみに対して送達し、結合していない抗体(F105)、プロタミン(P)、無関係なErbB2一本鎖抗体をプロタミンと結合させたもの(ErbB2-P)および培地単独ではこれは起こらなかった。HIV感染細胞の約40%はFITC標識siRNAを取り込んだが、非感染細胞は取り込まなかった。siRNAをトランスフェクトした場合の取込みに関して感染細胞と非感染細胞との間に差はなかった。図10Cは、F105-Pがgag-siRNAを、HIV envを発現するp160-B16細胞内には送達するが、env陰性B16細胞には送達しないことを示している。処理の2日後に、gag siRNAアンチセンス鎖をプローブとする改変ノーザンブロット法によって細胞を分析した。トランスフェクト細胞は送達に関する陽性対照として用いられる。

【図11】F105-Pにより送達されたGFP-siRNAが、HIV λ HXB3がトランスフェクトされたHeLa-GFP細胞のみでeGFP発現を低下させることを示している。約80%の効率でHIVプラスミドによりトランスフェクトされたHeLa-GFP細胞、または擬似トランスフェクトされたものを、F105またはF105-Pまたは培地により送達されたGFP siRNAまたはFas siRNAで処理し、ノーザンブロット法によりEGFP mRNA(図11A)に関して分析するか、フローサイトメトリーによりタンパク質(図11B)に関して分析した。GFP siRNAをF105-Pと複合体化した場合には、eGFP発現は細胞内HIV p24に関して染色される感染細胞のみでサイレンシングを受ける。各培養物におけるp24非トランスフェクト細胞はeGFPをダウンモジュレートせず、内部特異性対照として用いられる。サイレンシングは用量依存的な様式で増大する。

【図12】gag-siRNAと複合体化したF105-Pが、感染した初代CD4細胞におけるHIV産生を

阻害することを示している。送達用物質を伴わなわかないか、またはF105もしくはF105-Pと複合体化したgag siRNAまたはGFP siRNAで処理した、HIV感染CD4T細胞(p24染色によれば、約85%が感染)を、2日後に細胞内p24染色(図12A)および培養上清のp24 Ag ELISA(図12B)により、ウイルス複製に関して分析した。env特異的抗体は単独(F105-P+無関係なGFP siRNA、およびF105+gag siRNAの条件を参照)で、そのウイルス中和活性のためにHIV複製を若干低下させた(約25~28%)が、F105-Pにより送達されたgag siRNAは最高用量でウイルス産生を約58%(p24染色による)または約77%(ELISA)減少させた。これらの細胞は脂質を介したsiRNAトランスフェクションに対する抵抗性があり、トランスフェクト対照ではHIVの阻害は全く観察されなかった。

【図13】F105-Pが、c-myc、MDM2およびVEGFのsiRNAを、HIV envを発現するB16黒色腫細胞のみに送達し、遺伝子発現のサイレンシングを行い、腫瘍増殖を阻害することを示している。gp160-B16を、c-mycを対象とする2種類のsiRNA(図13A、図13B)またはVEGFを標的とするsiRNA(図13C)の種々の濃度で処理した。遺伝子発現は定量的PCR(図13A)または透過処理した細胞のフローサイトメトリー(図13B、図13C)によって分析した。(図13B、図13C)では、トランスフェクションに関する飽和濃度である100pmolのsiRNAのトランスフェクションを介した100Tの印を付した点を除き、送達はF105-Pを介して行った。(図13B)におけるサイレンシングは、同程度の濃度のc-myc siRNA #1(Δ)、#2($\diamond$)またはその両方()を用いた場合に同程度であった。無関係なGFP-siRNAによる、またはgp160を発現しないB16細胞における、図13Bおよび図13Cにおける対照も、平均蛍光強度の低下を示さなかった(非提示データ)。サイレンシングは標的細胞上でのgp160発現および特異的siRNAを必要とし、用量依存的であり、約100~1000pmolのsiRNAでプラトーに達する。遺伝子サイレンシングは、siRNAをF105-Pによって送達した場合とオリゴフェクトアミンを用いてトランスフェクトした場合で同等であった。図13D~13Gは、F105-Pにより送達される2種類のc-myc配列(図13D)、MDM2(図13E)、VEGF(図13F)を対象とするsiRNA、またはこれらのsiRNAの組み合わせ(図13G)で処理したgp160-B16細胞の増殖を示している。(図13D~13F)において100pmolのsiRNA(100T)をトランスフェクトした影響は、F105による100~300pmolのsiRNAの送達と同等であった。(図13D~13F)に関して実施したそのほかの同時対照は、GFP-siRNAの場合、または細胞をsiRNAもしくはF105のみで処理した場合と、増殖に関して差を認めなかった。siRNAの組み合わせは、単一の因子よりも腫瘍増殖を阻害する効率が高かった。図13Hは、F105-Pと複合体化したsiRNAが、HIV envを発現しないB16細胞の増殖に対して効果を及ぼさなかったことを示している。*は非処理対照との比較で $P<0.001$ を表し、#は $P<0.01$ を表す。図13Iは、定量的RT-PCRによって測定したIFN- β ならびにインターフェロン応答遺伝子STAT1およびOAS1が、擬似処理(左のバー横座標を上回るものは認めたい)またはF105-Pにより送達されたGFP-siRNAに対する曝露から1日後には有意に誘導されず、ポリ(I:C)によっては誘導されたことを示している。遺伝子発現はGAPDH mRNAに対して標準化した。

【図14】F105-Pと複合体化したsiRNAの腫瘍内または静脈内注射が、envを保有するB16腫瘍のみにsiRNAを送達して腫瘍増殖を抑制したことを示している。図14Aは、gp160-B16(左)またはB16黒色腫細胞(右)をマウスの側腹部に移植して9日後に、F105-Pまたはオリゴフェクトアミンと複合体化したFITC-siRNAを皮下腫瘍内に注入したことを示している。FITC-siRNAを単独で送達したgp160-B16細胞では染色が全く観察されなかった。FITC-siRNAをF105-Pと複合体化するか単独で送達したB16細胞では染色が全く観察されなかった。図14Bは、F105-PおよびFITC-siRNAが注入された腫瘍細胞が細胞質中に蛍光染色を示すことを示す高倍率像を示している。図14Cは、FITC-siRNAをローディングしたF105-Pを静脈内注射したことを示している。腫瘍を12時間後に蛍光顕微鏡検査(上の列)およびヘマトキシリン・エオシン染色(下の列)のために採取した。FITC-siRNAが単独で送達されたgp160-B16細胞、およびF105-Pと複合体化したFITC-siRNAが送達されたB16細胞に関して、染色は全く観察されなかった。F105-PはインビボではFITC-siRNAをgp160-B16腫瘍のみに特異的に送達して、周囲の正常組織およびenvを欠くB16腫瘍には送達せず、一方、オリゴフェクトアミンはFITC-siRNAを腫瘍および隣接組織の両方に送達する。裸のsiRNAはいずれの細胞

10

20

30

40

50

の中にも効果的には入らない。腫瘍内注射は静脈内注射よりも効率が高い。F105-Pにより送達された、c-myc、MDM2およびVEGFを標的とするsiRNAは、gp160-B16腫瘍のインビボでの増生を抑制する。マウスに対して、B16細胞(点線)またはgp160-B16細胞(実線および断続線)の移植後の第0、1および3日に、各群8匹ずつのマウスの側腹部に腫瘍内(図14D、図14E)または静脈内(図14F、図14G)注射による治療を行った。F105-Pと複合体化したsiRNAの混合物(c-myc no.1およびno.2、MDM2ならびにVEGF)(黒四角)またはsiRNAのみ(□)を注入した。PBS(Δ)による擬似処置を受けたマウスを対照として用いた。腫瘍サイズ(図14D、図14F)を毎日測定し、マウスを屠殺した第9日に腫瘍の重量を測定した(図14E、図14G)。これらの抗腫瘍性siRNAは、F105-Pによって送達された場合にのみ、しかもHIV envを発現する腫瘍のみで腫瘍増殖を抑制した。*はPBSを注射した対照との比較で $P<0.001$ を表し、#は $P<0.01$ を表し、&は $P<0.05$ を表す。siRNAを伴わないF105-Pの注射は防御をもたらさなかった。

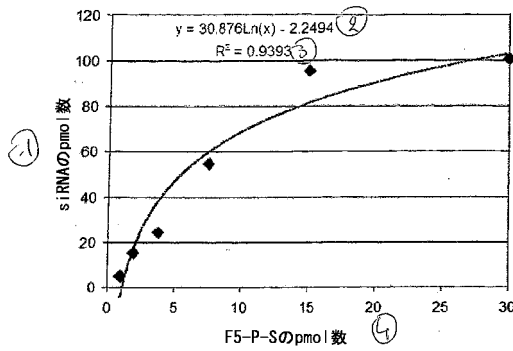
10

【図15】ErbB2に対する一本鎖抗体断片とプロタミン断片と融合したものが、siRNAをErbB2+乳癌細胞のみに対して特異的かつ効果的に送達することを示している。図15Aは、一本鎖ErbB2抗体プロタミン融合タンパク質ML39 ScFv-Pが、ErbB2⁺SKBR3細胞とは結合するが、ErbB2⁻MCF7細胞とは結合しないことを示している(上の列)。この融合タンパク質の結合はHis-タグ抗体によって検出される(赤)；アイソタイプ対照で染色された細胞は白色ピークで示される。ML39 ScFv-Pは、100pmolのFITC-siRNAを、SKBR3細胞の32%に送達するが、MCF7細胞の形質導入は行わない。非改変抗体、プロタミン単独または培地は、FITC-siRNAを送達しない。FITC-siRNAはトランスフェクションによって両方の細胞株に導入される。図15Bは、ML39 ScFv-PによるKu70-siRNAの送達が、Ku70発現をErbB2細胞のみで低下させることを示している。フロープロットでは、白色ヒストグラムはアイソタイプ抗体で染色された細胞を；赤色ヒストグラムは擬似処理細胞を；グレーのヒストグラムは表記された通りに処理された細胞を表す。Ku70 siRNAのトランスフェクションは、MCF7細胞(左)およびSKBR3細胞(右)におけるKu70発現を等しく低下させる。ML39 ScFv-PによるKu70 siRNA(1000pmol)の送達は、Ku70のサイレンシングを行うが、対照タンパク質またはML39 ScFv-P+GFP siRNAを用いた場合はサイレンシングが起こらない。MFI、平均蛍光強度。図15Cは、ML39 ScFv-P送達を用いたKu70サイレンシングの用量反応曲線を示している。Ku70のMFIが示されている。siRNA(100pmol、100T)をトランスフェクトして達成されるものと同等なサイレンシングを達成するためには、ML39 ScFv-Pにより送達されるsiRNAが約1000pmol必要である。

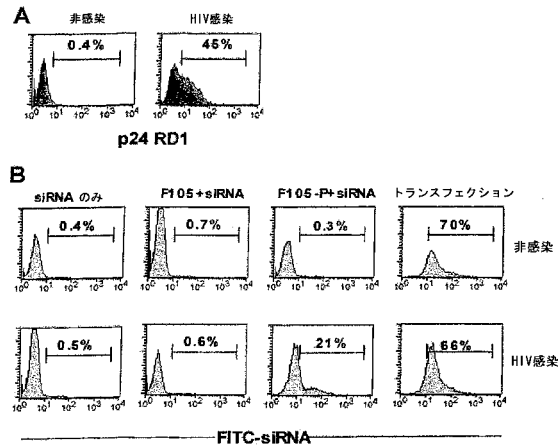
20

30

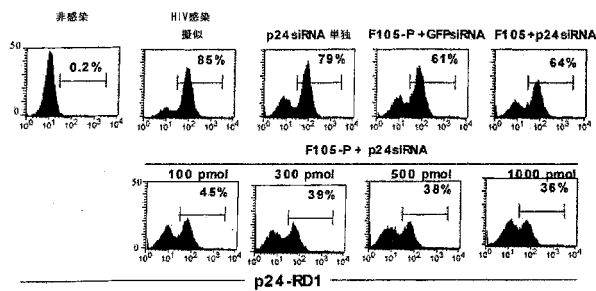
【図 1】



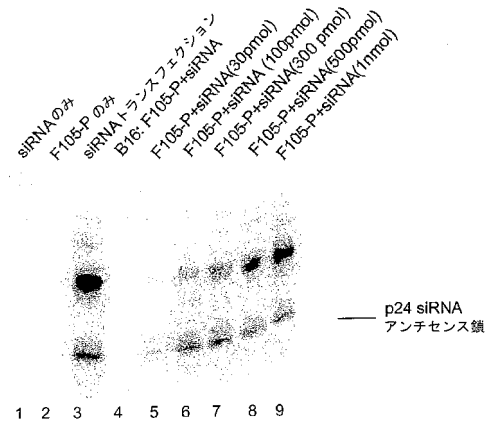
【図 2】



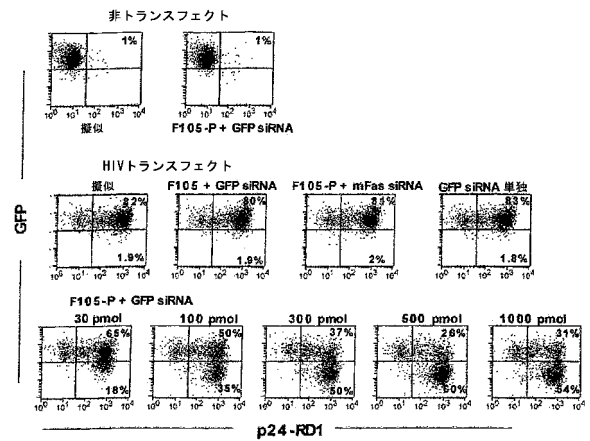
【図 5】



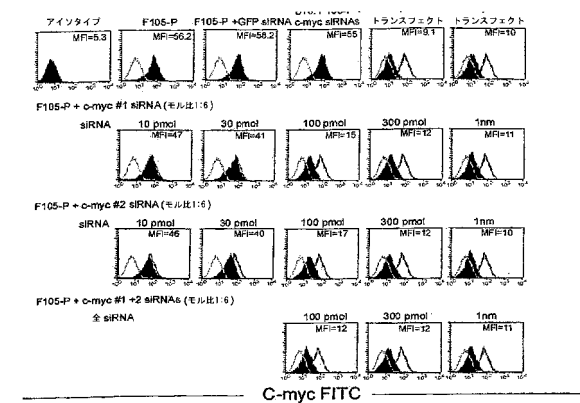
【図 3】



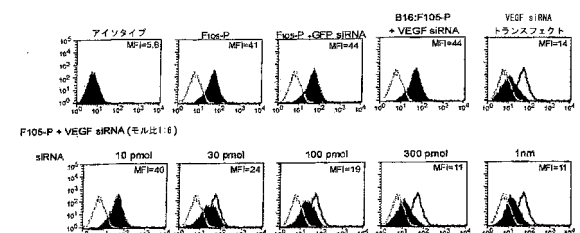
【図 4】



【図 6】

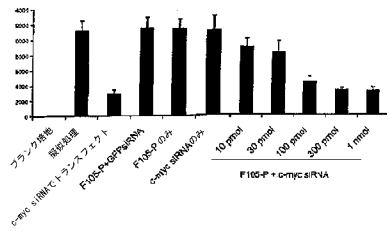


A

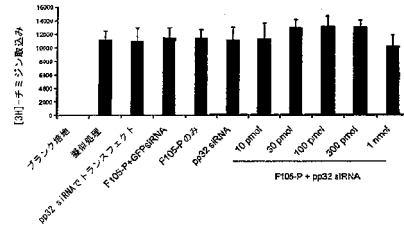


B

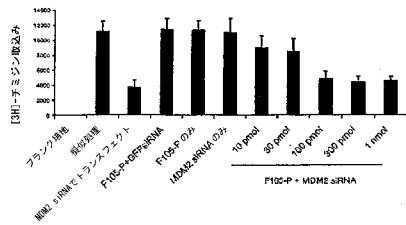
【図 7 A】



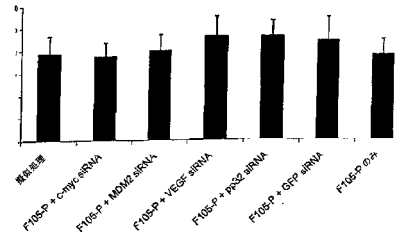
【図 7 D】



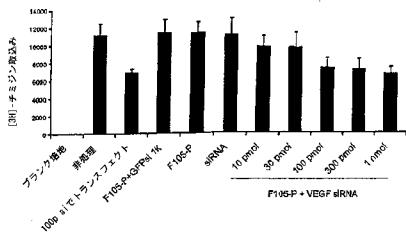
【図 7 B】



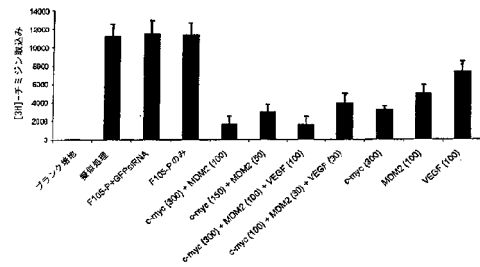
【図 7 E】



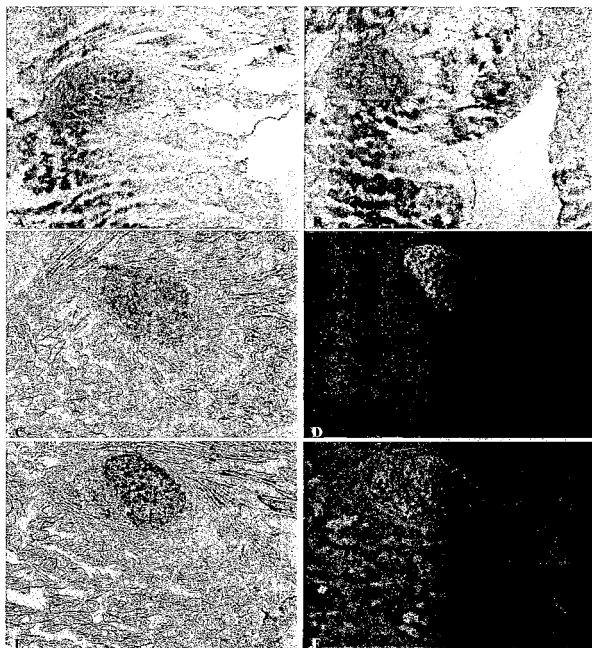
【図 7 C】



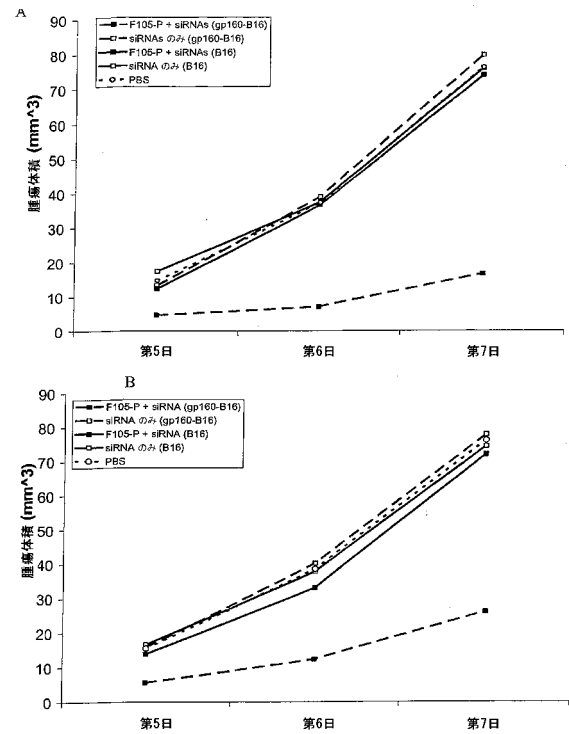
【図 7 F】



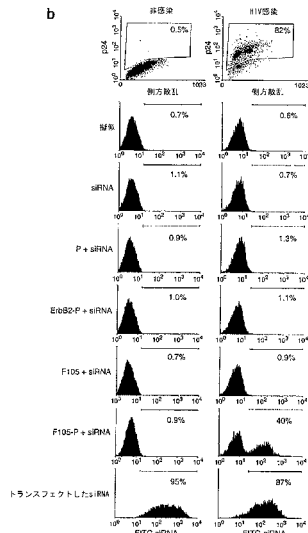
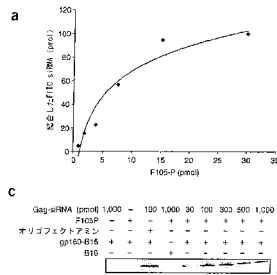
【図 8】



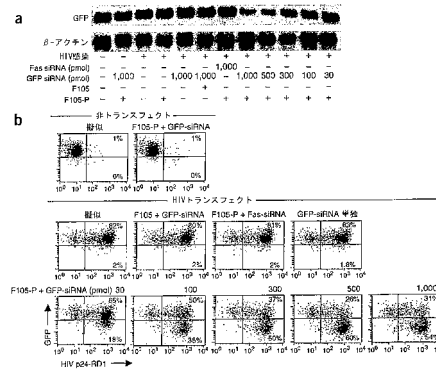
【図 9】



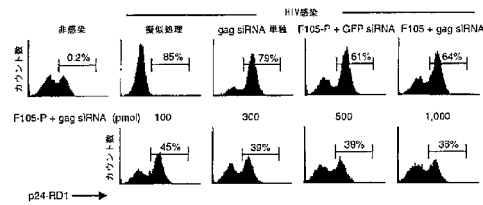
【図 10】



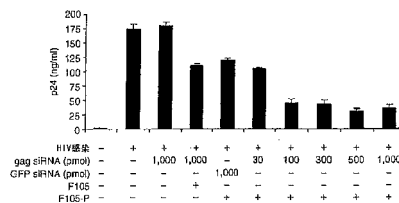
【图 1 1】



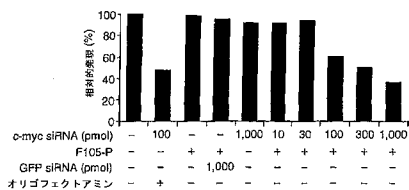
【図 1 2 a】



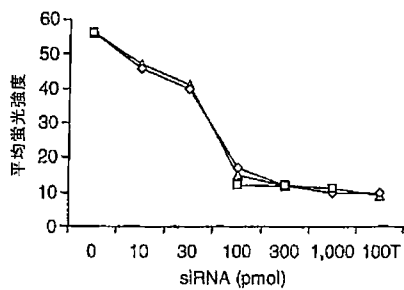
【図 1 2 b】



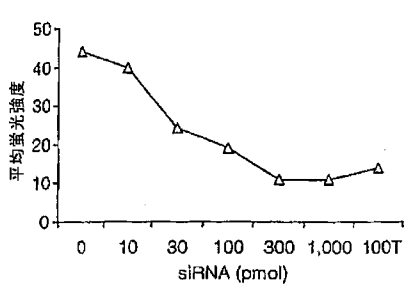
【図 1 3 a】



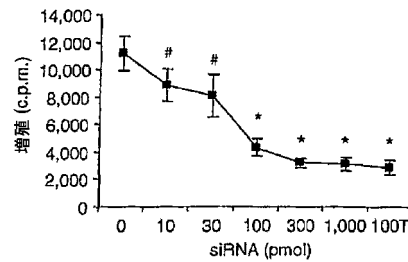
【図 1 3 b】



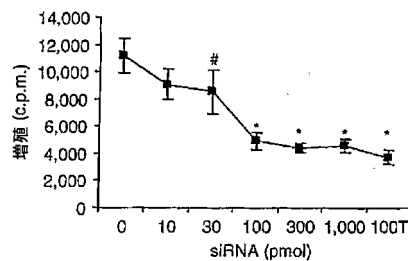
【図 1 3 c】



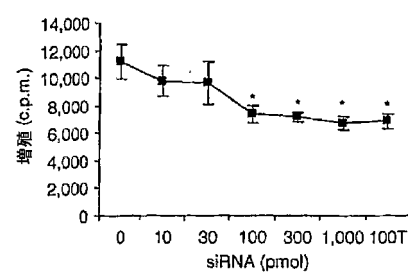
【図 1 3 d】



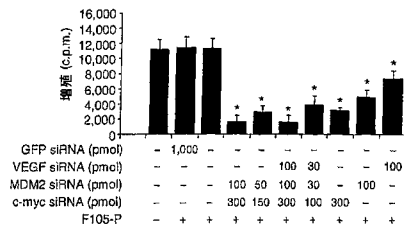
【図 1 3 e】



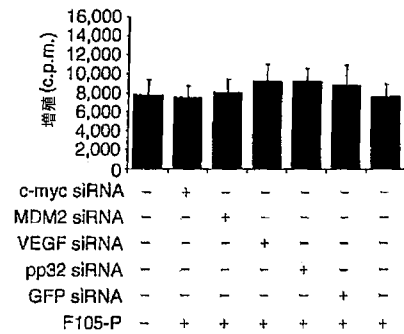
【図 1 3 f】



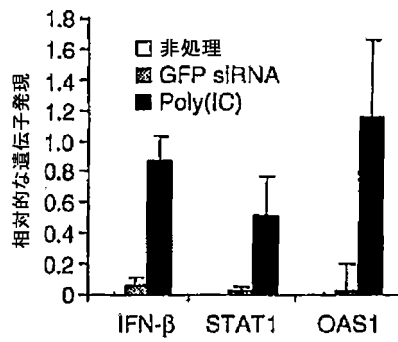
【図 1 3 g】



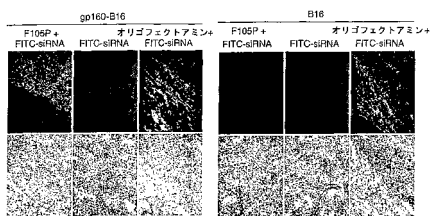
【図 1 3 h】



【図 1 3 i】



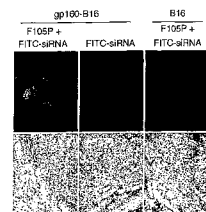
【図 1 4 a】



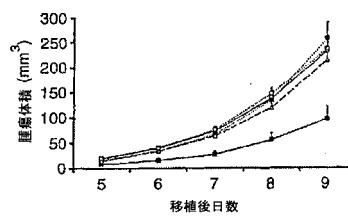
【図 1 4 b】



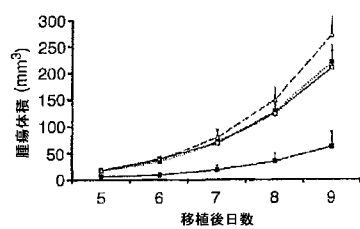
【図 1 4 c】



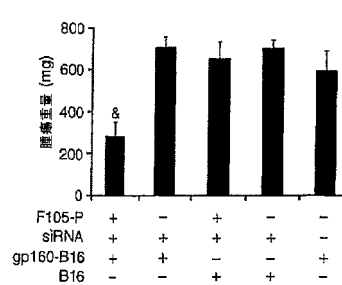
【図 1 4 f】



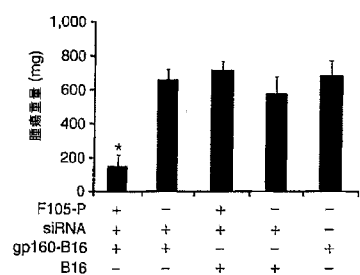
【図 1 4 d】



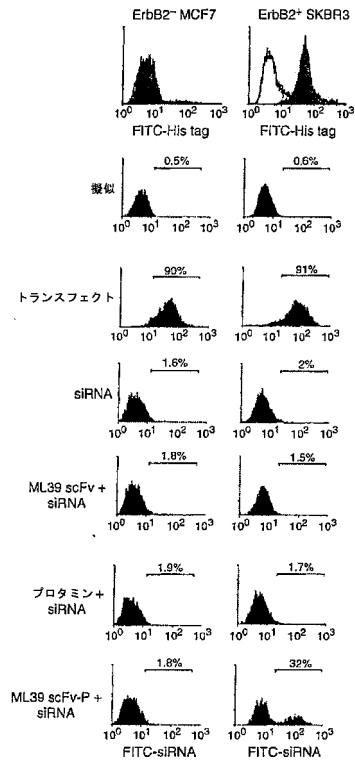
【図 1 4 g】



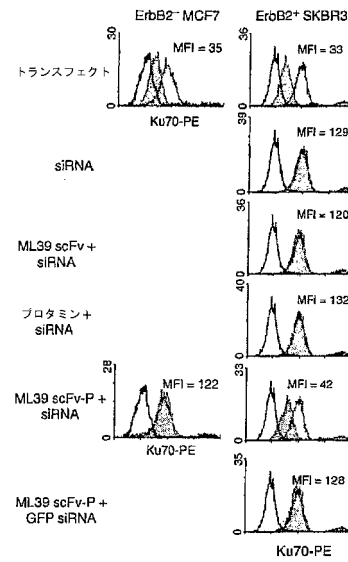
【図 1 4 e】



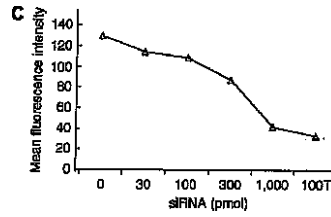
【図 15 a】



【図 15 b】



【図 15 c】



【配列表】

0004903146000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12

(72)発明者 ソング アーウェイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 クインシー イースト スクワンタム ストリート 89

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第2004/048545 (WO, A1)
特表平10-501681 (JP, A)
特表平07-500820 (JP, A)
Nucl. Acids Res., 2003年, Vol.31, No.11, P.2717-2724
Pharmaceut. Res., 2002年, Vol.19, No.6, P.744-754

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/113
C12Q 1/68
C12Q 1/02
A61K 31/713
A61K 48/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
WPI