

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4965447号
(P4965447)

(45) 発行日 平成24年7月4日 (2012.7.4)

(24) 登録日 平成24年4月6日 (2012.4.6)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K 39/44 (2006.01)	A 6 1 K 39/44
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 9 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2007-529046 (P2007-529046)	(73) 特許権者	504146523
(86) (22) 出願日	平成17年8月25日 (2005.8.25)		エンジンアイシー モレキュラー デリ
(65) 公表番号	特表2008-510794 (P2008-510794A)		バリー ビーティーワイ リミテッド
(43) 公表日	平成20年4月10日 (2008.4.10)		オーストラリア国 2066 エヌエスダ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2005/003614		ブリュ, シドニー, レーン コウブ ウェ
(87) 国際公開番号	W02006/021894		スト, シリウス ロード 25, ビルデ
(87) 国際公開日	平成18年3月2日 (2006.3.2)		イング 2
審査請求日	平成20年7月9日 (2008.7.9)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	60/604, 433		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成16年8月26日 (2004.8.26)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌由来のインタクトなミニセルを介した哺乳動物細胞への機能性核酸の送達

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) アンチセンス分子もしくはリボザイムを含有する、または機能性核酸分子をコードするセグメントを含むプラスミドを含有するインタクトな細菌由来ミニセル、(b) 癌化学療法剤を含有するインタクトな細菌由来ミニセル、ならびに (c) 製薬上許容される担体、を含んでなる組成物であって、各ミニセルが腫瘍細胞で過剰に発現する哺乳動物細胞表面受容体に対する特異性を有する二重特異性リガンドに結合しており、前記アンチセンス分子、リボザイムまたは機能性核酸分子が、前記癌化学療法剤への耐性に関与するタンパク質の転写産物を標的とする、上記組成物。

【請求項 2】

前記ミニセル (a) が前記プラスミドを含有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記機能性核酸が、前記癌化学療法剤への耐性に関与するタンパク質の転写産物を標的とする s i R N A、s h R N A または m i R N A 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記機能性核酸分子が、P-糖タンパク質、M D R - 2 または M D R - 3 の転写産物を標的とする、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記哺乳動物細胞表面受容体が E G F R である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

20

【請求項 6】

10⁹ 個ミニセル当たり約 1 個未満の混入親細菌細胞を含有する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

10¹⁰ 個ミニセル当たり約 1 個未満の混入親細菌細胞を含有する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

10¹¹ 個ミニセル当たり約 1 個未満の混入親細菌細胞を含有する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

癌の治療用である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物細胞に機能性核酸を効果的に送達できるようにするための継続中の努力に関する。より詳細には、本発明は、哺乳動物細胞に機能性核酸を送達するための細菌性ミニセルベクターの使用に関する。本発明は、特に癌および A I D S 治療に関連して、標的とした細胞中で薬剤耐性を除去し、アポトーシスを促進し、腫瘍性を抑えるのに格別の有用性を有する。

【背景技術】

【0002】

近年の進歩により、細胞に機能性核酸を導入する様々な技術が明らかになっている。例えば、リポソームを基にしたトランスフェクション法によって、外来的に生成される核酸を送達することができる。しかし、そのような外来的手法には、標的を一時的にしか阻害しないという欠点がある。加えて、リポソームは *i n v i v o* で不安定である。外来的に生成される核酸の送達の代替法として、ベクターにより、内在的に生成される機能性核酸をコードするプラスミドを送達することができる。この目的には現在ウイルスベクターが有用であるが、安全性について深刻な問題を抱えている。例となる問題には、野生型ウイルスによる組換え、挿入性および発癌性、ウイルスが誘発する免疫抑制、ウイルスベクターの大型 D N A セグメント保有能力制限、弱毒化したウイルスの病原性の逆転、組換えウイルスの製造および分配の難しさ、低い安定性、および既存の免疫によって生じる炎症応答などの有害反応が含まれる。これらの問題を回避するためのアプローチは、機能性核酸をより安全かつ効果的に送達できるようにする際に著しい利益をもたらすはずである。

【0003】

機能性核酸の効果的な送達法は、薬剤耐性を逆転させるのに特に有益なはずである。哺乳動物細胞は、薬物に対抗する様々な生物学的過程を駆使し、それが癌の治療の成功を大きく妨げている。同様に、薬剤耐性は、H I V 治療の有効性、特に、高活性抗レトロウイルス療法 (H A A R T) を制限するが、この療法はヌクレオシド系逆転写酵素インヒビター (N R T I) およびプロテアーゼインヒビター (P I) または非ヌクレオシド系逆転写酵素インヒビター (N N R T I) の組合せに基づく。

【0004】

臨床な腫瘍の化学療法に対する耐性は、内在性であるかまたは後天的ということがある。内在性耐性は診断時に腫瘍に存在し、最先端の化学療法に応答できない。後天的耐性は、初期治療には首尾よく応答するが、再発の際に耐性表現型を示す腫瘍に存在する。そのような腫瘍は、既に使用した薬物、および異なる構造や作用メカニズムを有する薬物をはじめとする、新たな薬物の両方に対して耐性を獲得する。M D R (多剤耐性) という用語は、腫瘍細胞が単一薬物への曝露後、構造的に無関係な数種の薬物に対して交差耐性を有するようになる現象を指す。

【0005】

多剤耐性のメカニズムは、複雑かつ多数の要因が絡むものであるが、それは大部分、ゲ

10

20

30

40

50

ノムが高度に不安定であること、そして癌細胞中での突然変異による。代表的なメカニズムは、薬物の不活性化、細胞膜ポンプによる薬物の排出、薬物流入の低下、薬物標的の突然変異、およびアポトーシスの開始の欠陥である (Bredel、2001; Chenら、2001; WhiteおよびMcCubrey、2001; Sunら、2001)。

【0006】

薬物の排出は、とりわけ一般的であり、細胞内環境から細胞外環境へ薬物をポンプ排出する膜結合タンパク質の過剰発現により生じうる。そのようなポンプは、ATP結合カセット (ABC) トランスポータースーパーファミリーのメンバーであることが多い (Doigeら、1993)。P-糖タンパク質 (Pgp) はその一例であり、様々な癌細胞においてMDRの主因である (Endicottら、1989; Litmanら、2001)。他の例には、MDR関連タンパク質 (MRP; Coleら、1992)、乳癌耐性タンパク質 (BCRP; Litmanら、2000)、および肺耐性関連タンパク質 (LRP; 主要ヴォールト (vault) タンパク質; Schefferら、2000) がある。他の多剤トランスポータータンパク質も癌細胞 (Gottesmanら、2002) および病原微生物 (Van Bambekeら、2000) 中で同定されている。

【0007】

細胞傷害性薬物および放射線照射により誘発された腫瘍細胞のアポトーシス (プログラムされた細胞死) に対する耐性 (SellersおよびFisher、1999) は、もう一つの一般的なメカニズムである。このメカニズムには、しばしば、B細胞白血病タンパク質2 (Bcl-2)、Bcl-X_L、Bcl-W、A1/Bfl1、Mcl-1などの抗アポトーシスタンパク質の過剰発現、およびp53タンパク質中の変異が関与することが多い。Bcl-2のようなタンパク質がその抗アポトーシス効果を発揮する仕組みは、依然として正確には分かっていないが、結腸直腸癌、前立腺癌、乳癌をはじめとする多くの癌でこれらのタンパク質は過剰発現している (Hanadaら、1995; Bakhshiら、1985; Wangら、1996)。転写因子である核内因子κB (NF-κB) の発現の増加も、腫瘍細胞が化学療法耐性を獲得する主要なメカニズムである (Wangら、1999)。

【0008】

P-糖タンパク質の作用を阻止する薬物など、MDRを抑える薬物が特定されている (Listら、1993; Millerら、1991; Wishartら、1992)。しかし、多くのそのような薬物は臨床試験では効果を得られなかった。というのは、それらの薬物は患者の血漿に結合し、その目的地まで到達できず (Ayeshら、1996a; Broxtermanら、1987; Lehnertら、1996)、正常細胞にとって有害であったからである。MDRを抑えるために機能性核酸を使用することも試されてきた。しかし、上記したように、この目的のための既存のベクターは不安定または有害であり、あるいはそれらのベクターは、ヒトでそれらを使用することを阻む他の深刻な安全性の問題がある (Sioud、2004)。

【0009】

従って、標的細胞において薬剤耐性を低減し、アポトーシスを促進し、そして腫瘍性を抑える機能性核酸を送達するためのツールおよび方法を求める必要性は引き続き存在している。

【発明の開示】

【0010】

発明の概要

これらや他の必要性に対処するために、本発明は、一態様では、機能性核酸を送達する方法であって、以下のステップ: (a) 機能性核酸分子または機能性核酸分子をコードするセグメントを含むプラスミドを含有するインタクトなミニセルを用意するステップと、続いて (b) 前記ミニセルを標的哺乳動物細胞と接触させて、該哺乳動物細胞が該ミニセルを取り込むことができるようにするステップとを含む方法を提供する。ミニセルの取り込みに続いて、機能性核酸分子はその細胞質に放出され、核に輸送され、標的細胞によって発現される。前述のプラスミドは、機能性核酸分子をコードするセグメントに作動可能に連結された、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、またはシグナル配列など

10

20

30

40

50

の調節エレメントを含んでもよい。プラスミドは、RNAポリメラーゼ (pol) I I またはRNA I I I ポリメラーゼプロモーターヒト7SK、H1、およびU6などのpol I I I に依存するプロモーターを含むことが特に有利である。さらに、プラスミドは、緑色蛍光タンパク質をコードする核酸セグメントなどのレポーターエレメントを含みうる。ミニセルと哺乳動物細胞との接触は*in vitro*または*in vivo*で生じうる。

【0011】

本発明に関連して、「機能性核酸」のカテゴリーには、shRNA分子をはじめとするsiRNA分子；miRNA分子、アンチセンス分子；およびリボザイム分子が包含される。好ましくは、機能性核酸分子は、薬剤耐性を促進するか、アポトーシスを阻害するか、または新生物の表現型に関与するタンパク質の遺伝子または転写産物を標的とする。薬剤耐性に関与する特に有用な標的には、P-糖タンパク質、MDR-2、MDR-3、BCRP、APT11a、およびLRPなどのATP結合カセットトランスポーターが含まれる。アポトーシス耐性に関与する特に有用な標的には、Bcl-2 (B細胞白血病／リンパ腫)、Bcl-X_L、A1/Bfl1、接着斑キナーゼ、およびp53突然変異体タンパク質が含まれる。他の有用な標的は、発癌性タンパク質および突然変異型腫瘍抑制因子タンパク質である。

【0012】

別の態様では、本発明は、薬剤耐性またはアポトーシス耐性を克服し、被験体において悪性腫瘍を治療する方法を提供する。その方法は、(a) 機能性核酸分子または機能性核酸分子をコードするセグメントを含むプラスミドを含有するインタクトなミニセルを用意するステップであって、前記機能性核酸分子が薬剤耐性を促進するタンパク質の転写産物を標的とするステップと、(b) 前記ミニセルを標的哺乳動物細胞と接触させて、該哺乳動物細胞が該ミニセルを取り込むことができるようにするステップと、(c) 該標的哺乳動物細胞に化学療法剤を送達するステップとを含む。好ましくは、ステップ(a)および(b)の後にステップ(c)を実施して、薬物を投与する前に機能性核酸が薬物に対する耐性を減少させるようにする。薬物は任意の慣用手段によって送達しうるが、インタクトなミニセルを介して送達するのが好ましい。

【0013】

本発明のある実施形態では、二重特異性リガンドを介してミニセルを標的哺乳動物細胞と接触させる。二重特異性リガンドは、ミニセル上の表面成分、および受容体などの哺乳動物細胞上の表面成分の両方に対して特異性を有する。その結果、リガンドによってミニセルは哺乳動物細胞に結合し、そのミニセルは哺乳動物細胞に取り込まれ、ミニセルの内容物が哺乳動物細胞の細胞質に放出される。本発明の他の実施形態では、貪食適格 (phagocytosis-competent) またはエンドサイトーシス適格 (endocytosis-competent) である標的哺乳動物細胞にミニセルを接触させる。標的細胞が貪食適格である場合、二重特異性リガンドの使用は任意的なものである。

【0014】

別の態様では、本発明は、(i) インタクトなミニセルおよび(ii) 製薬上許容される担体を含む組成物であって、前記ミニセルが機能性核酸分子または機能性核酸分子をコードするプラスミドを含む組成物を提供する。機能性核酸分子は、shRNAまたはmiRNAまたは他のsiRNA分子、アンチセンス分子、またはリボザイム分子であってよい。機能性核酸分子は、薬剤耐性を促進するか、アポトーシスを阻害するか、または新生物の表現型に関与するタンパク質の遺伝子または転写産物を標的とするのが好ましい。薬剤耐性に関与する特に有用な標的には、P-糖タンパク質、MDR-2およびMDR-3などのATP結合カセットトランスポーターが含まれる。アポトーシス耐性に関与する特に有用な標的には、Bcl-2 (B細胞白血病／リンパ腫)、Bcl-X_L、A1/Bfl1、接着斑キナーゼ、およびp53突然変異体タンパク質が含まれる。他の有用な標的は、発癌性タンパク質および突然変異腫瘍抑制因子タンパク質である。プラスミドには、機能性核酸分子をコードするセグメントに作動可能に連結された、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、またはシグナル配列などの調節エレメントが含まれてよい。さ

10

20

30

40

50

らに、プラスミドは、レポーターエレメントを含んでよい。機能性核酸分子は、m i R N A または s h R N A として複数の R N A 干渉配列を含んでよく、これらの配列は共シストロン性 (co-cistronic) であっても、または別個のプロモーターから発現させてもよく、薬剤耐性に関連する複数の標的を同時にノックダウンさせることができる。好ましい実施形態では、この組成物は 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} または 10^{12} 個ミニセル当たり 1 個未満の混入親細胞を含む。

【0015】

さらに別の態様では、本発明は、細胞、組織、または器官に医薬を投与することによって、薬剤耐性を克服するかまたはアポトーシスを促進する方法で使用する違約の調製における、インタクトなミニセルの使用を提供する。その医薬では、ミニセルは機能性核酸分子または機能性核酸分子をコードするプラスミドを含み、ここで、該機能性核酸分子は、薬剤耐性を促進するか、またはアポトーシスを阻害するタンパク質の転写産物を標的とする。この意味において治療対象の疾患は、癌または、例えば、A I D S や結核などの後天的疾患であってよい。

【0016】

本発明は、癌および H I V と関連して、疾患を治療するために (i) 機能性核酸を送達するための安全かつ安定したビヒクルを用意し、(i i) 罹患細胞における薬剤耐性の主要なメカニズムを抑制し、(i i i) 薬剤耐性の克服に伴う有害な副作用を低減し、そして (i v) 標的化した薬物封入ビヒクルを提供することによって、機能性核酸を送達するための従来の方法および製剤を著しく改良することができる。

【0017】

図面の簡単な説明

図 1：様々な治療がヒト大腸癌細胞株 C a c o - 2 の生存率に及ぼす影響を示す図である。x 軸に治療を示し (ミニセルは「M」によって表す)、細胞生存率 (%) を棒グラフによって示す。各棒グラフは、6 回の独立した測定の実測値および平均値の標準偏差を示す。

【0018】

図 2：ヌードマウス (一群当たりマウス 11 頭) において、(1) s h R N A をコードするプラスミドを保有する標的化組換えミニセル (抗 b c l 2 または抗 M d r 1) および (2) 化学療法剤イリノテカンを含む封入した標的化ミニセルによる二重治療後に、ヒト大腸癌 (C a c o - 2) 異種移植片が退縮したことを示す図である。大腸癌細胞を標的とするために使用した二重特異性抗体は、一方のアームでネズミチフス菌 O 抗原に対して特異的であり、かつ他方のアームでヒト上皮成長因子受容体 (E G F R) に対して特異的なものであった。標的化組換えミニセルを 9 日目および 23 日目に静脈内注射し、標的化したイリノテカン封入ミニセルを 15、18、29、および 32 日目に静脈内投与した。静脈内投与した他の対照治療には以下のものが含まれる：第 1 群—腫瘍のみ、第 2 群—遊離イリノテカン、第 3 群—^{E G F R} ミニセル _{I r i n o}、第 4 群—^{E G F R} ミニセル _{s h R N A - M D R - 1}、第 5 群—^{E G F R} ミニセル _{s h R N A - b c l - 2} および第 6 群—^{E G F R} ミニセル _{s h R N A - M D R - 1} 後に遊離イリノテカン。y 軸に腫瘍体積を示す。各測定値の S E M を示す。

【0019】

図 3：ヌードマウス (一群当たりマウス 11 頭) において、(1) s h R N A をコードするプラスミドを保有する標的化組換えミニセル (抗 b c l 2 または抗 M d r 1) および (2) 化学療法剤 5 - F U を封入した標的化ミニセルによる二重治療後に、ヒト大腸癌 (C a c o - 2) 異種移植片が退縮したことを示す図である。大腸癌細胞を標的とするために使用した二重特異性抗体は、一方のアームでネズミチフス菌 O 抗原に対して特異的であり、かつ他方のアームでヒト上皮成長因子受容体 (E G F R) に対して特異的なものであった。標的化組換えミニセルを 9 日目および 23 日目に静脈内注射し、標的化した 5 - F U 封入ミニセルを 15、18、29、および 32 日目に静脈内投与した。静脈内投与した他の対照治療には以下のものが含まれる：G 1—腫瘍のみ；G 2 (対照)、遊離 5 - F U (

10

20

30

40

50

5 × 10⁴ ng / マウス体重 (g m)、マウス一頭に当たり約 1 × 10⁶ ng) ; G 3 (対照)、^{E G F R} ミニセル_{5 - F U} ; G 4 (対照)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} ; G 5 (対照)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - b c 1 - 2} ; G 6 (対照)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} 後に^{C M V} ミニセル_{5 - F U} ; G 7 (対照)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - n o n s e n s e} 後に^{E G F R} ミニセル_{5 - F U} ; G 8 (対照)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} 後に遊離 5 - F U ; G 9 (実験)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} 後に^{E G F R} ミニセル_{5 - F U} ; および G 10 (実験)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - b c 1 - 2} 後に^{E G F R} ミニセル_{5 - F U}。y 軸に腫瘍体積を示す。各測定値の S E M を示す。

【0020】

図4：ヌードマウス（一群当たりマウス11頭）において、（1）s h R N A をコードするプラスミドを保有する標的化組換えミニセル（抗 M D R - 1）および（2）化学療法剤ドキシソルビシンを封入した標的化ミニセルによる二重治療後に、ヒト乳癌（M D A - M B - 4 6 8）異種移植片が退縮したことを示す図である。乳癌細胞を標的とするために使用した二重特異性抗体は、一方のアームでネズミチフス菌 O 抗原に対して特異的であり、かつ他方のアームでヒト E G F R に対して特異的なものであった。標的化組換えミニセルを21日目に静脈内注射し、標的化した D o x 封入ミニセルを27、34、および41日目に静脈内投与した。静脈内投与した治療には以下のものが含まれる：G 1 - 腫瘍のみ；G 2 (対照)、^{E G F R} ミニセル_{D o x} ; および G 3 (実験)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} 後に^{E G F R} ミニセル_{D o x}。y 軸に腫瘍体積を示す。各測定値の S E M を示す。

【0021】

図5：投薬スケジュールが、薬剤耐性の逆転および治療効果に及ぼす影響を示す図である。ヒト大腸癌（C a c o - 2）異種移植をヌードマウスで樹立し、以下の静脈内処置を施した：G 1 - 腫瘍のみ；G 2 (対照)、遊離イリノテカン；G 3 (実験)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} の96時間後に^{E G F R} ミニセル_{I r i n o} ; G 4 (実験)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} の120時間後に^{E G F R} ミニセル_{I r i n o} ; および G 5 (実験)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} の144時間後に^{E G F R} ミニセル_{I r i n o}。乳癌細胞を標的とするために使用した二重特異性抗体は、一方のアームでネズミチフス菌 O 抗原に対して特異的であり、かつ他方のアームでヒト E G F R に対して特異的なものであった。y 軸に腫瘍体積を示す。各測定値の S E M を示す。

【0022】

図6：投薬スケジュールが薬剤耐性の逆転および治療効果に及ぼす影響を示す図である。ヒト大腸癌（C a c o - 2）異種移植をヌードマウスで樹立し、以下の静脈内処置を施した：G 1 - 腫瘍のみ；G 2 (対照)、遊離 5 - F U ; G 3 (実験)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} の96時間後に^{E G F R} ミニセル_{5 - F U} ; G 4 (実験)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} の120時間後に^{E G F R} ミニセル_{5 - F U} ; および G 5 (実験)、^{E G F R} ミニセル_{s h R N A - M D R - 1} の144時間後に^{E G F R} ミニセル_{5 - F U}。乳癌細胞を標的とするために使用した二重特異性抗体は、一方のアームでネズミチフス菌 O 抗原に対して特異的であり、かつ他方のアームでヒト E G F R に対して特異的なものであった。y 軸に腫瘍体積を示す。各測定値の S E M を示す。

【0023】

好ましい実施形態の詳細な説明

本発明者らは、インタクトな細菌由来ミニセルは、s i R N A 分子、m i R N A 分子、リボザイム、またはアンチセンス核酸など、いかなる範囲の機能性核酸も安全かつ有効に標的哺乳動物細胞中に導入できることを発見している。特定の状況の癌および H I V 感染において、本発明者らは、インタクトなミニセルを介して機能性核酸を標的細胞中に導入することによって、標的細胞の薬剤耐性またはアポトーシス耐性を低減できることを見出した。

【0024】

本発明者らは、ミニセルによって、同一の標的哺乳動物細胞を、特に *in vivo* で連続的にトランスフェクトすることができ、そしてミニセルによって一定範囲の異なる内容物を同一の標的哺乳動物細胞に連続的に送達できることも発見している。これらの発見は、第一に任意のマクロ粒子送達ビヒクルに対するものであり、そしてこれらの発見によって、ある治療効果を得る前に、種々の治療的内容物を同一の細胞に送達する必要がある、癌やHIVのような複雑な多因子疾患を治療する方法が初めて提供される。同様に、本発明者らは、異なる遺伝子中の複数の突然変異に関連付けられる薬剤耐性の複雑な問題について、多数の遺伝的欠陥に対抗するために宿主細胞に複数のRNAi配列を導入するミニセルによって対処することができることを見出し、またミニセル介在RNAi送達に続いて、標的の薬剤耐性媒介タンパク質のノックダウンに十分な時間を設けることで、特定の化学療法剤に以前は耐性であった癌細胞を同じ薬物を封入したミニセルによって効果的に治療できることを発見した。これは、他の全ての治療方法に不応な癌を効果的に治療する初めての *in vivo* における実証である。薬剤耐性癌細胞を効果的に治療するのに必要な、ミニセルを介して送達される化学療法剤の濃度は、遊離薬物治療の1000分の1未満であることが発見されている。これは驚くべき発見である。というのは、RNAiまたは薬剤耐性を媒介するタンパク質のインヒビターを使用する、薬剤耐性を逆転させる今までの方法は全て、現在のところ哺乳動物被験体に深刻な毒性を与えかねない薬物濃度を必要とした。従って、本発明の方法、すなわち、RNAiのミニセル介在送達に続いてミニセル介在化学療法剤を送達することは、深刻な毒性もなく癌を効果的に治療する可能性を有している。

10

20

【0025】

さらに、本発明者らは、ミニセルに対する宿主の免疫応答を克服するために、ミニセルの血清型を適合させることが可能なことを発見した。

【0026】

以下の記述によって、これらの発見に関する本発明を大まかに述べるが、本発明は、記載した特定の実施形態、方法論、プロトコル、または試薬に限定されない。同様に、本明細書で使用する用語は、特定の実施形態について記載するにすぎず、本発明の範囲を制限するものではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

30

I. 定義

特に明記しない限り、本明細書中で使用する全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を持つ。

【0028】

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用する、一部の用語および語句の意味を以下に示す。他の用語および語句は、明細書全体にわたって定義する。

【0029】

単数形は、前後関係から明瞭にそうではないと指示されない限り複数形を含む。

【0030】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、転写産物とハイブリダイズし、その翻訳を阻止できる、特定の遺伝子転写産物の一部に相補的な核酸分子を指す。アンチセンスオリゴヌクレオチドはRNAまたはDNAを含みうる。

40

【0031】

「生体分子配列」または「配列」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の全体または一部分をさす。

【0032】

本明細書で互換的に使用される「癌」、「新生物」、「腫瘍」、「悪性腫瘍」、および「癌腫」は、細胞増殖の著しい制御不能によって特徴付けられる、異常な増殖表現型を示す細胞または組織を指す。本発明の方法および組成物は、特に、前癌性、悪性、前転移性、転移性、および非転移性細胞に適用される。

50

【0033】

「相補的」は、機能性核酸分子とその標的など、2分子の相互作用する表面同士が、その形状において適合すること (topological compatibility)、または互いに整合することを指す。それらの分子は、相補的であると表すことができ、さらには接触面特性は互いに相補的である。

【0034】

「対応する (Correspond to)」または「表す (represent)」は、例えば、遺伝子に「対応する」かまたは遺伝子を「表す」ポリヌクレオチドもしくは配列と関連して使用される場合、ポリヌクレオチド配列が、遺伝子または核酸の遺伝子産物、例えば mRNA 中に存在することを意味する。ポリヌクレオチドは、遺伝子のゲノム配列のエクソン内に全体として存在するか、またはポリヌクレオチド配列の異なる部分が異なるエクソン中に存在することもあり、例えば、近接するポリヌクレオチド配列が、スプライシング前または後に、遺伝子の発現産物である一つの mRNA 中に存在するように存在する。

10

【0035】

「サイトカイン」は、ある細胞集団によって放出されるタンパク質の総称であり、細胞間メディエーターとして別の細胞集団に作用する。

【0036】

「薬物」は、動物、特に、哺乳動物およびヒトで、局所的もしくは全身的效果が得られる任意の生理学的または薬理学的活性物質をさす。

【0037】

20

「発現」は、一般的に、ポリヌクレオチド配列が、首尾よく転写・翻訳されて、その結果、検出可能なレベルのアミノ酸配列またはタンパク質が発現される過程をさす。本明細書のある状況では、発現とは mRNA の産生をさす。他の状況では、発現とはタンパク質の産生をさす。

【0038】

「機能性核酸」とは、宿主細胞への導入後、タンパク質の発現を特異的に干渉する核酸分子を指す。一般に、機能性核酸分子は、タンパク質をコードする転写産物と直接的に相互作用することによって、タンパク質の発現を減少させる能力を有する。リボザイム、アンチセンス核酸および shRNA 分子をはじめとする siRNA 分子、短鎖 RNA (通常 400 塩基長未満)、マイクロ RNA (miRNA) が代表的な機能性核酸である。

30

【0039】

「遺伝子」は、ポリペプチドまたは前駆体の産生に必要な制御配列およびコード配列を含むポリヌクレオチド配列を指す。ポリペプチドは、完全長コード配列またはコード配列の任意の一部分によってコードされうる。遺伝子は、連続するコード配列を構成していてもよいし、または適当なスプライシング連結部によって結合された一個または複数のイントロンを含んでもよい。さらに、遺伝子は、発現産物の生物活性もしくは化学構造、発現速度、または発現制御方式に作用する可能性がある、コーディング領域または非翻訳領域中の 1 個または複数の改変を含みうる。そのような改変には、それだけには限らないが、1 個または複数のヌクレオチドの突然変異、挿入、欠失、および置換が含まれる。この点に関して、そのように改変された遺伝子は「ネイティブ」遺伝子の「変異体」と称される場合がある。

40

【0040】

「宿主細胞」は、組換えベクターまたは他のポリヌクレオチド移入のためのレシピエントとして使用しうる細胞、または使用されている細胞をさし、トランスフェクトされた由来細胞の子孫も含まれる。単一細胞の子孫は、形態またはゲノム DNA もしくは全 DNA の相補鎖において、自然の、偶然の、または計画した突然変異のために、由来の親と必ずしも完全に同一でなくてもよい。

【0041】

「ハイブリダイゼーション」は、それによりポリヌクレオチド配列が塩基対形成によって相補配列と結合するあらゆる過程をさす。

50

【0042】

本明細書で互換的に使用される「個体」、「被験体」、「宿主」、および「患者」は、診断、処置、または治療が望まれるあらゆる哺乳動物被験体をさす。好ましい一実施形態では、個体、被験体、宿主、または患者はヒトである。他の被験体には、それだけには限らないが、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、霊長類、およびマウスが含まれる。

【0043】

「標識」は、直接的に、あるいはシグナル生成系の一種または複数の追加要素との相互作用を介して、検出可能なシグナルを提供できる作用物質をさす。直接的に検出可能な本発明で役立つ標識には蛍光標識がある。具体的な蛍光団には、フルオレセイン、ローダミン、BODIPY、シアニン色素などがある。本発明は、標識として ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^3H などの放射性同位元素の使用も意図している。金コロイドまたは着色ガラスまたはプラスチック（例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス）ビーズなどの比色標識も使用しうる。例えば、米国特許第4,366,241号、同第4,277,437号、同第4,275,149号、同第3,996,345号、同第3,939,350号、同第3,850,752号、および同第3,817,837号を参照のこと。

【0044】

「オリゴヌクレオチド」は、例えば、約10ヌクレオチド(nt)～約1000ntを含むポリヌクレオチドを指す。本発明で使用されるオリゴヌクレオチドは、約10nt～約150ntであることが好ましい。オリゴヌクレオチドは、天然オリゴヌクレオチドまたは合成オリゴヌクレオチドであってよい。オリゴヌクレオチドは修飾されていてもよい。

【0045】

「ミニセル」は、DNA分離を伴う細胞分裂の二分裂中に、配位障害によって生じる細菌細胞の無核形をさす。ミニセルは、ある状態で自然に発生し放出され、ミニセルとは対照的に、特定の遺伝子の再構成またはエピソーム遺伝子の発現によらない他の小型小胞とは区別される。本発明を実施するためには、ミニセルはインタクトな細胞壁を有する（「インタクトなミニセル」）のが望ましい。

【0046】

「修飾オリゴヌクレオチド」および「修飾ポリヌクレオチド」は、塩基、糖部分、ヌクレオシド間リン酸結合の、全てまたはいずれかの天然分子構造の分子レベルでの、1個または複数の化学的修飾がなされているオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを指し、さらにこれらの部位で置換、または修飾の組合せが加えられている分子を指す。ヌクレオシド間リン酸結合は、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、ホスホルアミダート、シロキサン、カルボナート、カルボキシメチルエステル、アセトアミダート、カルバマート、チオエーテル、架橋ホスホルアミダート、架橋メチレンホスホナート、ホスホロチオアート、メチルホスホナート、ホスホロジチオアート、架橋ホスホロチオアートもしくはスルホンヌクレオチド間結合、または3'-3'、5'-3'、もしくは5'-5'結合、および同様のそのような結合の組合せでありうる。ホスホジエステル結合は、ホスホロチオアート、メチルアミノ、メチルホスホナート、ホスホルアミダート、およびグアニジンなど、代替りの結合と置換されていてよく、それらのポリヌクレオチドのリボースサブユニットもまた置換されていてよい（例えば、ヘキソースホスホジエステル、ペプチド核酸）。修飾は、オリゴヌクレオチド分子内部（一個または繰り返し）にあるかまたはその末端であってもよく、デオキシリボースなどのヌクレオシド間リン酸結合およびリン酸修飾の分子への付加を含んでもよく、それらは向かい合う鎖または関連する酵素や他のタンパク質を切断しまたは架橋する。「修飾オリゴヌクレオチド」および「修飾ポリヌクレオチド」という用語は、糖部分への修飾（例えば、3'置換リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドモノマー）を有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドも含み、それらのいずれも5'→3'結合を介して互いに結合する。

【0047】

語句「核酸分子」および用語「ポリヌクレオチド」は、リボヌクレオチドであろうと、デオキシヌクレオチドであろうと、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。これらには、一本鎖、二本鎖、または多重鎖DNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、あるいはプリン塩基およびピリミジン塩基または他の天然、化学的もしくは生化学的に修飾された非天然もしくは誘導体したヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。ポリヌクレオチド主鎖は、（通常RNAまたはDNA中に見られる）糖およびリン酸基、あるいは修飾もしくは置換した糖またはリン酸基を含みうる。あるいは、ポリヌクレオチドの主鎖は、ホスホルアミダイトなどの合成サブユニットのポリマーを含むことができ、すなわちオリゴデオキシヌクレオチドホスホルアミダイトまたはホスホルアミダイト-ホスホジエステル混合オリゴマーとすることができる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログなどの修飾ヌクレオチド、ウラシル、他の糖類、ならびにフルオロリボースおよびチオアートなどの結合基、およびヌクレオチド分枝鎖を含みうる。ポリヌクレオチドは、標識成分とのコンジュゲート化などによってさらに修飾してよい。他の修飾型には、キャップ、アナログによる天然ヌクレオチドの一つまたは複数の置換、ならびにポリヌクレオチドをタンパク質、金属イオン、標識成分、他のポリヌクレオチド、または固体支持体に付着させる手段の導入が含まれる。

10

【0048】

「製薬上許容される」は、生理学的適合を指す。製薬上許容される担体または賦形剤は、投与する組成物の生物活性を抑止せず、化学的に不活性であり、それを投与する生物体に害を及ぼさない。

20

【0049】

本明細書で互換的に使用される「ポリペプチド」および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態をさし、翻訳、非翻訳、化学的修飾、生化学的修飾、および誘導体化されたアミノ酸を含みうる。ポリペプチドまたはタンパク質は、天然、組換え、もしくは合成、またはこれらの任意の組合せでありうる。さらに、ポリペプチドまたはタンパク質は、天然タンパク質またはペプチドの断片を含みうる。ポリペプチドまたはタンパク質は、単一分子でも、または多分子複合体であってもよい。さらに、そのようなポリペプチドまたはタンパク質は、修飾ペプチド主鎖を含みうる。この用語には、異種アミノ酸配列との融合タンパク質、N末端メチオニン残基の有無による異種および同種リーダー配列との融合体、免疫学的なタグ付きタンパク質などをはじめとする融合タンパク質が含まれる。

30

【0050】

「精製」は、その自然環境から取り出され、それが自然に伴う他の成分を少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、または99.99%含まない化合物をさす。

【0051】

「リボザイム」は、ヌクレオチド塩基配列に特異的な方式で、他のRNA分子を繰り返し切断することができる酵素活性を有するRNA分子を指す。

40

【0052】

「RNA干渉」(RNAi)は、短鎖干渉RNA(sRNA)、短鎖ヘアピンRNA、短鎖RNA、またはマイクロRNAが介在する、遺伝子発現(タンパク質合成)の配列特異的または遺伝子特異的抑制を指す。

【0053】

「配列同一性」は、類似性または相補性の程度を指す。部分的同一または完全同一がありうる。部分的相補配列は、同一配列がその標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズするのを、少なくとも部分的に阻害する配列であり、この配列は機能的用語「実質的に同一」を使用して称される。標的配列と完全相補配列とのハイブリダイゼーションの阻害は、低ストリンジェンシー条件下での、ハイブリダイゼーションアッセイ(サザンまたはノーザ

50

ンブロット、溶液ハイブリダイゼーションなど）を使用して調べることができる。実質的に同一な配列またはプローブは、低ストリンジェンシー条件下で、完全同一配列またはプローブと標的配列との結合（すなわちハイブリダイゼーション）と競合し、かつこれを阻害する。このことは、低ストリンジェンシー条件が非特異的結合を許すようなものである、と言っているのではなく、すなわち、低ストリンジェンシー条件は、2つの配列の結合が互いに特異的（すなわち選択的）な相互作用であることを必要とする。非特異的結合が存在しないことは、部分的な程度の相補性さえも持たない（例えば同一性約30%未満の）第2の標的配列を使用することによって試験することができ、非特異的結合の不在下では、プローブは、第2の非相補的標的配列とハイブリダイズしない。

【0054】

10

配列同一性を調べる別の方法は、2個の核酸またはポリペプチド配列に関して、特定の領域にわたって最も一致するように整列した場合、2つの配列中で同一の残基を参照することを伴う。本明細書で使用する場合、「配列同一性の割合」は、最適に整列した2つの配列を比較ウィンドウにわたって比較することにより決定した値を意味し、その比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列部分は、（付加または欠失を含まない）参照配列と比較して、2つの配列を最適に整合させるために、付加または欠失（すなわちギャップ）を含みうる。パーセンテージは、同一の核酸塩基が両配列中に生じる位置数を決定して、マッチした位置数を求め、マッチした位置数をその比較ウィンドウ中の位置総数で割り、その結果を100倍して配列同一性のパーセンテージを得ることにより算出する。

【0055】

20

「短鎖干渉RNA」（siRNA）は、一般的に、RNA干渉（RNAi）を媒介することができる、約10～約30ヌクレオチド長の二本鎖RNA分子を指す。本明細書で使用する用語siRNAには、shRNAとしても知られる短鎖ヘアピンRNAが含まれる。

【0056】

「治療」、「治療すること」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを指す。効果は、疾患またはその症状を完全にまたは部分的に予防することに関して、予防的であってよく、ならびに／あるいは疾患および／または疾患に帰することができる有害作用を部分的にまたは完全に安定化もしくは治癒する点で、治療的であってよい。「治療」は、哺乳動物、特にヒトでのあらゆる疾患治療を包含し、（a）疾患または症状にかかりやすい傾向があるが、まだ罹患していると診断されていない被験体で、疾患または症状が生じないように予防すること、（b）疾患症状の阻害、すなわち、その発生を抑止すること、または（c）疾患症状の軽減、すなわち、疾患または症状を退行させることが含まれる。

30

【0057】

II. ミニセルが介在する機能性核酸の送達

一態様では、本発明は、標的細胞に機能性核酸を送達する方法であって、以下のステップ含む方法を提供する：（a）機能性核酸分子または機能性核酸分子をコードするセグメントを含むプラスミドを含有するインタクトなミニセルを用意するステップと、続いて（b）前記ミニセルを標的哺乳動物細胞と接触させて、該哺乳動物細胞が該ミニセルを取り込むことができるようにするステップ。ミニセルの取り込みに続いて、機能性核酸分子はその標的細胞の細胞質に放出され、または標的細胞によって発現される。WO2005/056749に記載されているように、ミニセルは、二重特異性リガンドを介して標的哺乳動物細胞と接触しうる。ミニセルと標的哺乳動物細胞との間の接触は*in vitro*でも、または*in vivo*でもよい。

40

【0058】

A. ミニセル

本発明のミニセルは、DNA分離を伴う細胞分裂の二分分裂中に、配位障害によって生じる大腸菌または他の細菌細胞の無核形である。原核生物の染色体の複製は、細胞中央（mid-cell）隔壁形成を含む正常な二分分裂に関連付けられる。大腸菌では、例えば、minC

50

Dなどのmin遺伝子が突然変異することによって、細胞分裂中の細胞極での隔壁形成の障害が取り除かれ、正常な娘細胞および無核ミニセルを産生させることができる。de Boerら、1992；Raskinおよびde Boer、1999；HuおよびLutkenhaus、1999；Harry、2001を参照のこと。ミニセルは、ある状態で自然に発生し放出され、ミニセルとは対照的に、特定の遺伝的再構成またはエピソーム遺伝子の発現によらない他の小型小胞とは区別される。本発明を実施するためには、ミニセルはインタクトな細胞壁を有する（「インタクトなミニセル」）のが望ましい。

【0059】

minオペロンの突然変異に加えて、無核ミニセルはまた、隔壁形成に影響する一定範囲の他の遺伝的再構成または突然変異に続いて発生し、それは例えば枯草菌のdivIVB1中で発生する。ReeveおよびCornett、1975；Levinら、1992を参照のこと。ミニセルはまた、細胞分裂／染色体分離に関与するタンパク質の遺伝子発現レベルにおける不安定により形成されることもある。例えば、minEが過剰発現すると極分裂とミニセルの産生がもたらされる。同様に、無染色体ミニセルは、染色体分離での欠陥、例えば、枯草菌でのsmc変異（Brittonら、1998）、枯草菌でのspoOJ欠失（Iretonら、1994）、大腸菌でのmukB変異（Hiragaら、1989）、および大腸菌でのparC変異（StewartおよびD'Ari、1992）から生じる。遺伝子産物は、transに供給されうる。高コピー数プラスミドから過剰発現した場合、例えば、CafAは細胞分裂の速度を亢進し、かつ／または複製後の染色体分配を障害し（Okadaら、1994）、鎖状細胞および無核ミニセルをもたらさう（Wachiら、1989；Okadaら、1993）。ミニセルは、グラム陽性またはグラム陰性起源の任意の細菌細胞から調製することができる。

【0060】

本発明に従って、ミニセルは、送達が望まれる機能性核酸または機能性核酸をコードするプラスミドを含む。本発明の「機能性」核酸分子は、タンパク質をコードする転写産物と直接的に相互作用することにより、タンパク質の発現を減少させる能力を有する。siRNA分子、リボザイム、およびアンチセンス核酸が、代表的な機能性核酸を構成する。

【0061】

B. siRNA分子

短鎖干渉RNA（siRNA）分子は、転写後遺伝子サイレンシングメカニズムであるRNA干渉（RNAi）の実施に有用である。一般的には、siRNAは、約10～約30ヌクレオチド長の二本鎖RNA分子を指し、タンパク質の発現を特異的に干渉するその能力にちなんで名付けられた。好ましくは、siRNA分子は12～28ヌクレオチド長であり、より好ましくは15～25ヌクレオチド長であり、よりさらに好ましくは19～23ヌクレオチド長であり、最も好ましくは21～23ヌクレオチド長である。従って、siRNA分子は、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29ヌクレオチド長であることが好ましい。

【0062】

一方の鎖の長さが、siRNA分子の長さを表す。例えば、21リボヌクレオチド長（21mer）として記載されているsiRNAは、互いにアニールして19個の連続した塩基対を形成する、2本の対向するRNA鎖を含みうる。各鎖の2個の残存するリボヌクレオチドは、「オーバーハング」を形成する。siRNAが長さの異なる2本の鎖を含む場合、長い方の鎖がsiRNAの長さを表す。例えば、21ヌクレオチド長の一本の鎖と、20ヌクレオチド長の第2の鎖を含むdsRNAは21merを構成する。

【0063】

オーバーハングを含むsiRNAが望ましい。オーバーハングは、鎖の5'末端または3'末端にありうる。オーバーハングはRNA鎖の3'末端にあるのが好ましい。オーバーハングの長さは、様々であってよいが、約1～約5塩基が好ましく、約2ヌクレオチド長がより好ましい。本発明のsiRNAは、約2～4塩基の3'オーバーハングを含むの

が好ましい。3'オーバーハングは2リボヌクレオチド長であるのがより好ましい。3'オーバーハングを含む2個のリボヌクレオチドは、ウリジン(U)であることがさらにいっそう好ましい。

【0064】

本発明によれば、s i R N Aという用語は、短鎖ヘアピンRNA (s h R N A)を含む。s h R N Aは、ステムループ構造を形成する一本鎖RNAを含み、その際、ステムは、二本鎖s i R N Aを含む、相補センス鎖およびアンチセンス鎖からなり、ループは様々なサイズのリンカーである。一般的に、s h R N Aのステム構造は、約10～約30ヌクレオチド長である。s h R N A分子のステムは、12～28ヌクレオチド長であることが好ましく、より好ましくは15～25ヌクレオチド長、よりさらに好ましくは19～23ヌクレオチド長、最も好ましくは21～23ヌクレオチド長である。従って、s h R N A分子は、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29ヌクレオチド長のステムを含むのが好ましい。

【0065】

本発明のs i R N Aは、標的リボヌクレオチド配列と相互作用するように設計され、それは、s i R N Aが、標的配列とハイブリダイズするのに十分に標的配列に相補的であることを意味する。一実施形態では、本発明は、標的リボヌクレオチド配列または標的リボヌクレオチド配列の相補鎖に少なくとも70%、75%、80%、85%または90%同一であるリボヌクレオチド配列を含むs i R N A分子を提供する。好ましくは、s i R N A分子は、標的リボヌクレオチド配列または標的リボヌクレオチド配列の相補鎖に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である。最も好ましくは、s i R N Aは、標的ヌクレオチド配列またはリボヌクレオチド配列の相補鎖に100%同一である。しかし、標的と比較して挿入、欠失、または単一点突然変異を有するs i R N A分子も有効でありうる。

【0066】

s i R N Aの設計を補助するツールは、公衆に容易に利用可能である。例えば、コンピュータを基にしたs i R N A設計ツールは、インターネットのwww.d h a r m a c o n . c o mでインターネット上で利用可能である。

【0067】

C. リボザイム

リボザイムは、ヌクレオチド塩基配列に特異的な方式で、他のRNA分子を繰り返し切断できる酵素活性を持つRNA分子である。そのような酵素的RNA分子は、事実上いかなるRNA転写産物を標的にすることも可能で、i n v i t r oでの効率的な切断が可能である。

【0068】

現在、6種類の基本的な天然に存在する酵素的RNAが知られている。それぞれが、生理学的状態下、i n t r a n sにRNAホスホジエステルの加水分解を触媒することができる(従って、他のRNA分子を切断できる)。一般に、酵素的ポリヌクレオチドは、最初に標的RNAと結合することによって作用する。そのような結合は、標的RNAを切断する役目を担う、該分子の酵素部分に密接して保持される、酵素的ポリヌクレオチドの標的結合部分によって生じる。従って、酵素的ポリヌクレオチドは、相補塩基対によって最初に標的RNAを認識し、続いて結合し、正確な部位に結合した後は、酵素のように働いて標的RNAを切断する。そのような標的RNAの戦略的切断は、コードされたタンパク質の合成を行う能力を破壊する。酵素的ポリヌクレオチドは、RNA標的に結合しこれを切断した後、そのRNAから離れて別の標的を探し求め、繰り返し新たな標的に結合しこれを切断することができる。

【0069】

リボザイムの酵素的性質は有利である。単一リボザイム分子が標的RNAの多くの分子を切断することができるので、リボザイムの有効濃度を極めて低くすることができる。

【0070】

有用なリボザイムは、ハンマーヘッド (Rossiら (1992))、ヘアピン (HampelおよびTritz、(1989)、Hampelら (1990))、デルタ肝炎ウイルスモチーフ (PerrottaおよびBeen (1992))、グループ I イントロン (米国特許第4,987,071号)、RNAガイド配列と関連する RNaseP RNA (Guerrier-Takadaら (1983))、およびアカパンカビ VS RNA (SavilleおよびCollins (1990); SavilleおよびCollins (1991); CollinsおよびOlive (1993)) をはじめとする、いくつかのモチーフの一つを含みうる。これらの特異的モチーフは限定的ではなく、1個または複数の標的 RNA 領域に相補的な特異的基質結合部位を有し、そしてその基質結合部位中にまたはその周囲にその分子に RNA 切断活性を付与するヌクレオチド配列を有するものは全て本発明のリボザイムで重要である。

10

【0071】

本発明のリボザイムは、(例えば、安定性、標的化などを改良するために)修飾したオリゴヌクレオチドを含みうる。それらのリボザイムをコードする核酸配列は、例えば、RNAポリメラーゼ II または RNAポリメラーゼ III プロモーターなどの強力な構成的プロモーターの制御下にあってよく、その結果、トランスフェクトされた細胞は、標的内在性メッセンジャーを破壊し、翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを産生する。

【0072】

D. アンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質をコードする核酸と特異的にハイブリダイズし、そのタンパク質の転写または翻訳を干渉する。一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAを標的とし、その複製および/または転写を干渉する。別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、pre-mRNAおよびmRNAをはじめとするRNAと特異的にハイブリダイズする。そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、タンパク質翻訳部位へのRNAの移動、RNAからのタンパク質の翻訳、一個または複数のmRNA種を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAが関与し、またはRNAによって促進されうる触媒活性に作用しうる。そのような干渉の全体的効果は、標的タンパク質の発現を調節し、低減し、または阻害するものである。

20

【0073】

遺伝子の中には、アンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する際に使用しうるいくつかの部位がある。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、開始コドンとしても知られる、オープンリーディングフレームの翻訳開始コドンを包含する領域に結合しうる。この点で、一般的には、「開始コドン」および「翻訳開始コドン」は、翻訳開始コドンからどちらかの方向(すなわち5'または3')にある、少なくとも約25個~少なくとも約50個の連続したヌクレオチドを包含するmRNAまたは遺伝子の一部分をさす。

30

【0074】

アンチセンス相互作用を生じさせる別の部位は、オープンリーディングフレームの終止コドンである。「終止コドン領域」および「翻訳終止コドン領域」という用語は、一般的に、翻訳終止コドンを形成するどちらかの方向に、少なくとも約25個~少なくとも約50個の連続したヌクレオチドを包含するmRNAまたは遺伝子の一部分をさす。

40

【0075】

オープンリーディングフレームまたはコード領域も有効に標的になりうる。一般的に、オープンリーディングフレームは、翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとの間の領域を指すと理解されている。別の標的領域は、翻訳開始コドンから5'方向のmRNAの一部分である5'非翻訳領域である。その領域には、5'キャップ部位とmRNA翻訳開始コドンとの間のヌクレオチド、またはその遺伝子の対応するヌクレオチドが含まれる。

【0076】

同様に、3'非翻訳領域は、アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する標的として使用しうる。3'非翻訳領域は、翻訳終止コドンから3'方向のmRNAの一部分であり、従って翻訳終止コドンとmRNAの3'末端との間のヌクレオチド、またはその遺伝子の対

50

応するヌクレオチドが含まれる。

【0077】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、mRNAの5'キャップ領域も標的としうる。5'キャップは、5'-5'三リン酸結合を介してmRNAの5'末端残基に連結するN7メチル化グアノシン残基を含む。5'キャップ領域は、5'キャップ構造自体とキャップに隣接する最初の50ヌクレオチドとを含むと見なされる。

【0078】

幾つかの真核生物mRNA転写産物は直接翻訳されるが、多くは翻訳される前に転写産物から切り取られる一個または複数のイントロン領域を含む。残余の（従って翻訳される）エクソン領域は、一緒にスプライスされて連続するmRNA配列を形成する。mRNAスプライス部位、すなわち、イントロン-エクソン連結部は潜在的な標的領域であり、異常なスプライシングが疾患に関与するか、または特定のmRNAスプライス産物の過剰産生が疾患に関与する状況では特に有用である。さらに、再構成または欠失による異常な融合連結部もアンチセンスオリゴヌクレオチドの潜在的標的である。

【0079】

これらの様々な標的部位を考慮すると、標的ポリヌクレオチドに十分に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドを選択しなければならない。安定した特異的結合がオリゴヌクレオチドとポリヌクレオチド標的の間で生じるように、十分な程度の相補性があり、または正確な対合が生じなければならない。重要なことには、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、特異的にハイブリダイズ可能である、その標的ポリヌクレオチドの配列に100%相補的である必要はない。アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的ポリヌクレオチドの結合が、標的ポリヌクレオチドの正常な機能を妨害して有用性を消失させる場合、ならびに特異的結合が望まれる条件下で、すなわち、*in vivo*アッセイもしくは治療という状況での生理学的状態で、およびアッセイを実施する条件下での*in vitro*アッセイという状況で、アンチセンスオリゴヌクレオチドと非標的配列の非特異的結合を回避するに十分な程度の相補性がある場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能である。

【0080】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも約8nt～少なくとも約50nt長でありうる。一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約12～約30nt長である。

【0081】

本発明に従って使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、周知技術の固相合成法によって好都合に、かつ常法に従って製造することができる。そのような合成のための装置は、例えば、Applied Biosystems (Foster City, CA)をはじめとする、数企業から販売されている。そのような合成のための、当技術分野で公知の他のいかなる手段も、追加して、またはその代わりとして使用しうる。ホスホロチオアートおよびアルキル化誘導体などのオリゴヌクレオチドを調製するために、同様の技術を使用することはよく知られている。

【0082】

E. 機能性核酸をコードする核酸

本発明の好ましい実施形態では、ミニセルは、機能性核酸をコードする核酸を含む。例えば、プラスミドは、哺乳動物標的細胞の細胞内で発現する機能性核酸をコードしうる。これが、機能性核酸の内因性送達を可能にし、この送達は外来性送達の一過的な性質に勝る。

【0083】

従って、インタクトな組換えミニセルは、薬剤耐性またはアポトーシス耐性遺伝子のサイレンシングを目標とした、一個または複数のsiRNA配列をコードするプラスミドDNAを保有しうる。複数の機能性核酸をコードするミニセルを使用すると、多剤耐性メカニズムが現れている細胞を処置することができる。異なるsiRNA配列は、異なるプロ

10

20

30

40

50

モーターから別個に発現させることができる。例えば、P g p mRNAを標的とする s i RNAは、U 6 プロモーターから発現させることができ、B c l - 2 mRNAを標的とする s i RNAは、H 1 プロモーターから発現させることができる。これらの複数の発現カセットは、単一プラスミド上に保有されていることが好ましいが、異なるプラスミド上にあってもよい。異なる s i RNA 配列は、単一プロモーターからも発現させることができ、その際、組換えプラスミドは、非コーディングポリヌクレオチド配列により互いに連結された、複数の s i RNA コード配列を含む発現カセットを保有する。単一遺伝子転写ターミネーターは、完全発現カセットの下流に置くことができる。

【0084】

一戦略では、プラスミドは、2 個の別個の転写産物として s i RNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖をコードし、これらは標的細胞中で発現された後、ハイブリダイズして機能性 s i RNA 二重鎖を形成する。第 2 の好ましい戦略では、プラスミドは、それぞれが、短鎖ヘアピン RNA ステムループ構造を形成する単一转写産物として発現する、一個または複数の s i RNA をコードする。ヘアピン構造は、ダイサー (D i c e r) 酵素によってプロセシングされて機能性 s i RNA になりうる。

【0085】

F. レポーターエレメント

本発明のアプローチによって導入する核酸分子は、レポーターエレメントを含むことができる。レポーターエレメントは、組換え宿主に、通常、それ以外の場合には宿主が産生しないポリペプチドをコードすることによって容易に検出できる表現型または特徴を備えさせ、そのポリペプチドは、発現により、i n v i v o イメージング技術などによる組織学的解析または i n s i t u 分析により検出できるものである。例えば、本発明によるインタクトなミニセルによって送達されるレポーターエレメントは、貪食性宿主細胞中で、i n s i t u 分析によって検出可能であり、転写活性化の定量指標または半定量指標である、比色変化または蛍光変化を発生するタンパク質をコードすることができる。これらのタンパク質の例は、エステラーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼおよび他の酵素であり、それらの活性が検出可能な発色団または蛍光団を生じさせる。

【0086】

好ましい例は、インジゴ生成基質であるインドリル β-D-ガラクトシドの切断による色調変化を生じる大腸菌の β-ガラクトシダーゼ、および長鎖アルデヒドを酸化させるルシフェラーゼ (細菌性ルシフェラーゼ)、または光を同時に放出させて複素環式カルボン酸 (ルシフェリン) を酸化させるルシフェラーゼがある。さらに、この意味において有用なものは、Prasher ら (1995) が記載したような、オワンクラゲというクラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードするレポーターエレメントである。GFP 関連技術分野の例としては以下が挙げられる: 2 つの P C T 出願、(アミノ酸 65-67 から形成される発色団を含む、238 アミノ酸 GFP アポタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を開示する) W O 0 9 5 / 2 1 1 9 1 および (蛍光特性が変化したペプチドを提供する、オワンクラゲ GFP のアポペプチドに対する c D N A の改変を開示する) W O 0 9 5 / 2 1 1 9 1、ならびに励起の大きさの 4~6 倍の改善によって特徴付けられる、突然変異型 GFP の Heim らの報告 (1994)。

【0087】

別の種類のレポーターエレメントは、組換えミニセルを毒素耐性にする発現産物に関連する。例えば、n e o 遺伝子は、有毒レベルの抗生物質 G 4 1 8 に対して宿主を保護し、ジヒドロ葉酸還元酵素をコードする遺伝子は、メトトレキサートに対する耐性を付与し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) 遺伝子はクロラムフェニコールに対する耐性を付与する。

【0088】

レポーターエレメントとして使用するための他の遺伝子には、宿主ミニセルを形質転換して、特徴的な細胞表面抗原を発現させることができる遺伝子、例えば、H I V g p 1 2 0 またはヘルペス g D など、ウイルスエンベロープタンパク質が含まれ、それらはイムノ

10

20

30

40

50

アッセイによって容易に検出することができる。

【0089】

G. 調節エレメント

本発明のアプローチによって導入される核酸分子はまた、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、および／またはシグナル配列など、調節エレメントに作動的に連結した所望のコードセグメントも有する。適当なプロモーターは、組織特異的であるか、または治療状況に応じて腫瘍特異的なものでありうる。

【0090】

プロモーターは、所与の組織で優先的に活性化される場合、「組織特異的」であり、従って標的組織中で、作動可能に連結された構造配列の発現の駆動に有効である。組織特異的プロモーターのカテゴリーには、例えば、それぞれ、アルブミンおよび α_1 -アンチトリプシンについての肝細胞特異的プロモーター；膵臓腺房細胞で活性なエラスターゼI遺伝子制御領域；膵臓 β 細胞で活性なインスリン遺伝子制御領域；精巣細胞、乳房細胞、リンパ細胞、および肥満細胞で活性なマウス乳癌ウイルス制御領域；脳の稀突起膠細胞で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域；および視床下部細胞で活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域が含まれる。Frainら（1990）、Cilibertoら（1985）、Pinkertら、（1987）、Kelseyら（1987）、Swiftら（1984）、MacDonald（1987）、Hanahan、（1985）、Lederら（1986）、Readheadら（1987）、およびMasonら（1986）を参照のこと。

【0091】

ある種の腫瘍細胞中でまたは腫瘍細胞自体で、優先的に発現するプロモーター、および本発明により異なる癌の治療に有用なプロモーターもある。癌細胞に特異的なプロモーターのクラスを例示する：黒色腫を標的とするチロシナーゼプロモーター；乳癌を標的とするMUC1／Df3プロモーター；横紋筋肉腫（RMS）に対する発現を標的とするハイブリッドmyoDエンハンサー／SV40プロモーター；大腸癌細胞などのCEA発現細胞に特異的な癌胎児性抗原（CEA）プロモーター；および非小細胞肺癌を標的とするヘキソキナーゼII型遺伝子プロモーター。Hart（1996）、MortonおよびPotter（1998）、Kuraneら（1998）およびKatabiら（1999）を参照のこと。

【0092】

RNAポリメラーゼ（pol）IIまたはpol IIIに依存するプロモーターが、好ましいプロモーターである。特に好ましいプロモーターは、RNA IIIポリメラーゼプロモーターH1およびU6である。

【0093】

発現産物を分泌させるか、または特定の細胞区画へ発現産物を局在化するために、本発明によるシグナル配列を使用することができる。すなわち、目的とする発現産物を貪食細胞またはその子孫によって分泌させ、それにより選択した治療パラダイムと一致して周辺細胞に影響を及ぼすことができるように、インタクトなミニセルを介して送達される治療用ポリヌクレオチド分子は、正しいオープンリーディングフレームでシグナル配列を含みうる。シグナル配列の例には、米国特許第5,143,830号に記載されているヘモリンC末端分泌配列、米国特許第5,037,743号に開示されているBAR1分泌配列、および米国特許第6,025,197号に記載されているzsig32ポリペプチドのシグナル配列部分が含まれる。

【0094】

H. 機能性核酸の標的

本発明の機能性核酸は、薬剤耐性を促進するか、アポトーシスを阻害するか、または新生物の表現型を促進するタンパク質の遺伝子または転写産物を標的とする。こうした状況における機能性核酸の戦略の好首尾な適用は、当技術分野で既になされているが、ミニセルベクターの利点によるものではない。例えば、Sioud（2004）、Caplen（2003）、Wuら（2003）、Niethら（2003）、CaplenおよびMousses（2003）、Duxburyら（2004）、Yagueら（2004）、Duanら（2004）を参照のこと。

【0095】

薬剤耐性に関与するタンパク質は、機能性核酸の好ましい標的である。これらのタンパク質は、後天的薬剤耐性または内因性薬剤耐性に関与している可能性がある。腫瘍細胞などの疾患細胞が、最初は薬物に応答するが、次の治療サイクルで不応性になる場合、耐性表現型は後天的である。後天的薬剤耐性に関与する有用な標的には、P-糖タンパク質（P-gp、P-170、PGY1、MDR1、ABCB1、MDR関連タンパク質、多剤耐性タンパク質1）、MDR-2、およびMDR-3などのATP結合カセットトランスポーターが含まれる。MRP2（多剤耐性関連タンパク質）、BCR-ABL（限界点クラスタ領域-アベルソンプロトオンコジーン）、STI-571耐性関連タンパク質、肺耐性関連タンパク質、シクロオキシゲナーゼ-2、核内因子κ、XRCC1（X線交差補完群1）、ERCC1（切除交差補完遺伝子）、GSTP1（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）、突然変異型β-チューブリン、およびIL-6などの成長因子が、後天的薬剤耐性に関与する追加の標的である。以前に処理されていない細胞が、一種または複数の薬物に応答しない場合、耐性表現型は内因性である。内因性耐性の一因となるタンパク質の一例はLRP（肺耐性関連タンパク質）である。

10

【0096】

有用な標的には、アポトーシス耐性に関与するタンパク質も含まれる。これらには、Bcl-2（B細胞白血病/リンパ腫）、Bcl-X_L、A1/Bfl1、接着斑キナーゼ、およびp53突然変異タンパク質が含まれる。

【0097】

20

有用な標的にはさらに、発癌性および突然変異型腫瘍抑制タンパク質が含まれる。例えば、β-カテニン、PKC-α（タンパク質キナーゼC）、C-Raf、K-Ras（V12）、DP97 DeadボックスRNAヘリカーゼ、DNMT1（DNAメチルトランスフェラーゼ1）、FLIP（Flice様阻害タンパク質）、C-Sfc、53BP1、ポリコム群タンパク質EZH2（zesteホモログエンハンサー）、ErbB1、HPV-16E5、およびE7（ヒト乳頭腫ウイルス初期5および初期7）、フォルティリン（Fortilin）およびMC1P（骨髄細胞白血病1タンパク質）、DIP13α（DDC相互作用タンパク質13a）、MBD2（メチルCpG結合ドメイン）、p21、KLF4（Kruppel様因子4）、tpst/TCTP（翻訳制御腫瘍タンパク質）、SPK1およびSPK2（スフィンゴシンキナーゼ）、P300、PLK1（Pollo様キナーゼ-1）、Trp53、Ras、ErbB1、VEGF（血管内皮増殖因子）、およびBAG-1（BCL2関連の抗死遺伝子（athanogene）1）が含まれる。

30

【0098】

HIV感染に関しては、標的には、HIV-Tat、HIV-Rev、HIV-Vif、HIV-Nef、HIV-Gag、HIV-Env、LTR、CD4、CXCR4（ケモカイン受容体）、およびCCR5（ケモカイン受容体）が含まれる。

【0099】

腫瘍細胞の異種性のために、いくつかの異なる薬剤耐性またはアポトーシス耐性経路が、標的細胞中で作動可能である。従って、本発明の方法で使用する機能性核酸は、経時変化が求められる可能性がある。例えば、後天的薬剤耐性をもたらす新たな突然変異が生検試料により明らかになった場合、特異的siRNAを設計し、適当な発現プラスミド上にコードさせ、そのプラスミドをミニセル産生細菌株に形質転換し、その株を使用して組換えミニセルを生成し、後天的薬剤耐性に対処するために投与することができる。

40

【0100】

III. 薬剤耐性を克服し疾患を治療する方法

別の態様では、本発明は、被験体において、薬剤耐性を克服し、癌やAIDSなどの疾患を治療する方法を提供する。該方法は、（a）機能性核酸分子または機能性核酸分子をコードするセグメントを含むプラスミドを含有するインタクトなミニセルを用意するステップであって、前記機能性核酸分子が薬剤耐性を促進するタンパク質の遺伝子または転写産物を標的とするステップと、（b）前記ミニセルを標的哺乳動物細胞と接触させて、該

50

哺乳動物細胞が該ミニセルを取り込むことができるようにするステップと、(c) 該標的哺乳動物細胞に薬物を送達するステップとを含む。好ましくは、ステップ(a)および(b)の後にステップ(c)を実施して、薬物を投与する前に機能性核酸が薬物に対する耐性を減少できるようにする。薬物の送達および機能性核酸の導入は、任意の順序で連続的に、または同時に行うことができる。

【0101】

本発明によれば、任意の慣用手段によって薬物を送達することができる。例えば、経口、非経口(皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、および注入手段を含む)、局所、経皮、または吸入によって薬物を送達することができる。各薬物の適当な送達方式および投薬量は、医学分野の当業者が容易に確かめることができる。

10

【0102】

A. ミニセルを介した薬物送達

薬物送達は、慣用の手段により行うことができるが、ミニセルを介した送達が好ましい。この点で、本発明者らは、異なる内容物を封入し、標的化したインタクトなミニセルにより、同一の哺乳動物細胞を首尾よく再トランスフェクトできることを発見した。例えば、siRNAをコードするプラスミドが封入されたミニセルを哺乳動物細胞にトランスフェクトし、その後、薬物を封入したミニセルが、薬物をその同じ哺乳動物細胞に送達することができる。この発見は驚くべきことであり、ミニセルの分解、内容物のエンドソーム放出、および細胞内標的への内容物の流出を伴う細胞内過程は、一回目のトランスフェクトおよび内容物送達後も、依然として十分に機能することを示している。

20

【0103】

薬物は、機能性核酸または機能性核酸をコードするプラスミドとは別のミニセル中に封入することができる。あるいは、薬物は、機能性核酸分子または機能性核酸分子をコードするプラスミドと同じミニセル中に封入することができる。ある種の薬物は、核酸と相互作用し、同一ミニセル中への薬物および核酸の同時パッケージングを不可能にする。例えば、ドキソルビシンは、DNAと相互作用することが知られている。

【0104】

好ましくは、本発明のミニセルは、標的細胞に対して薬物の生理学的または薬理学的効果を発揮するのに十分な量の薬物を含む。また、ミニセルに含まれる薬物は、ミニセルの親細菌細胞が通常はその薬物を産生しないという意味で、ミニセルに対して異種性または外来性であるのが好ましい。

30

【0105】

親水性および疎水性薬物は、ミニセルを含む細胞外媒体とミニセル細胞質との間の薬物の濃度勾配を作成することによって、ミニセル中に封入することができる。細胞外媒体の薬物濃度がミニセル細胞質よりも高い場合、薬物は自然にこの濃度勾配を下ってミニセル細胞質中へ移動する。しかし、濃度勾配が逆転している場合、薬物はミニセルの外へ移動しない。

【0106】

ミニセルに通常水溶性ではない薬物をロードするためには、最初に薬物を適当な溶媒に溶解することができる。例えば、パクリタキセルは、エタノールとクレモフォアEL(ポリエトキシレート化ヒマシ油)の1:1混合物に溶解し、続いてPBSで希釈して、水性媒体に部分的に希釈され、そして必要最小限の量の有機溶媒を有して、薬物が確かに溶液中に残存する、パクリタキセル溶液を得ることができる。薬物のロードのために、ミニセルをこの最終媒体でインキュベートすることができる。そのようにして、本発明者らは、疎水性薬物でさえも、ミニセルの細胞質中に拡散して、高度にそして治療上顕著な、細胞質への薬物をロードを実現することができることを発見した。ミニセル膜は、疎水性分子が細胞質中に拡散するのを予防すると推測される、疎水性リン脂質二重層から構成されるので、これは予想外であった。

40

【0107】

ミニセルに薬物をロードする別の方法は、親細菌細胞が薬物をコードする核酸を転写翻

50

訳し、その結果、薬物が親細菌細胞の細胞質に放出されるような条件下で、組換え親細菌細胞を培養するステップを含む。例えば、所望の薬物のため細胞の生合成経路をコードする遺伝子クラスターをクローン化し、ミニセルを産生することができる親細菌株中に移送することができる。遺伝子群の遺伝子転写翻訳によって、親細菌細胞の細胞質中で薬物は生合成され、細菌の細胞質は薬物で満たされる。親細菌細胞が分裂し子孫ミニセルを形成する場合、ミニセルもその細胞質に薬物を含む。予め封入したミニセルは、当技術分野で公知の、上記のミニセル精製法のいずれかによって精製することができる。

【0108】

同様に、ミニセルに薬物をロードする別の方法は、薬物をコードする遺伝子がミニセル内で転写翻訳されるような条件下で、薬物をコードする発現プラスミドを含む組換えミニセルを培養するステップを含む。

【0109】

B. 薬物

本発明で有用な薬物は、動物、特に、哺乳動物およびヒトで所望の局所的または全身的效果をもたらす、任意の生理学的にまたは薬理的に活性な物質でありうる。薬物は、それだけには限らないが、ペプチド、タンパク質、核酸、および小分子をはじめとする無機または有機化合物であってよく、そのどれも特徴づけされているか、または特徴づけされていないことが可能である。薬物は、様々な形態、例えば、未変化分子、分子複合体、薬理的に許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ラウリン酸塩、パルミチン酸塩、リン酸塩、亜硝酸塩、硝酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、サリチル酸塩などであってよい。酸性薬物には、金属塩、アミン、または有機カチオン、例えば、四級アンモニウムを使用することができる。塩基、エステル、およびアミドなどの薬物の誘導体を使用することもできる。非水溶性薬物は、その水溶性誘導体の形で、またはその塩基誘導体として使用することができ、その誘導体は、どちらの場合でも、またはその送達により、酵素により転換され、身体のpHにより、または他の代謝過程により、元の治療活性形態へ加水分解される。

【0110】

有用な薬物には、化学療法剤、免疫抑制剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、核溶解性(nucleolytic)化合物、放射性同位元素、受容体、およびプロドラッグ活性化酵素が含まれ、これらは天然に存在するかまたは組換え法により生成しうる。

【0111】

従来の多剤耐性により影響を受ける薬物、例えば、ビンカアルカロイド（ビンブラスチンおよびビンクリスチンなど）、アントラサイクリン（ドキソルビシンおよびダウノルビシンなど）、RNA転写インヒビター（アクチノマイシン-Dなど）および微小管安定化薬（パクリタキセルなど）が、本発明では特に有用性を有する（Ambudkarら、1999）。

【0112】

一般に、癌化学療法剤が好ましい薬物である。有用な癌化学療法剤には、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、エチレンイミン、アルカンスルホナート、テトラジン、白金化合物、ピリミジンアナログ、プリンアナログ、代謝拮抗物質、葉酸アナログ、アントラサイクリン、タキサン、ビンカアルカロイド、トポイソメラーゼインヒビターおよびホルモン剤が含まれる。代表的な化学療法剤は、アクチノマイシン-D、アルケラン、Ara-C、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、BiCNU、ビカルタミド、ブレオマイシン、ブスルファン、カペシタビン、カルボプラチン、カルボプラチナ（Carboplatinum）、カルムスチン、CCNU、クロランブシル、シスプラチン、クラドリビン、CPT-11、シクロホスファミド、シタラビン、シトシンアラビノシド、サイトキサン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デクスラゾキサン、ドセタキセル、ドキソルビシン、DTIC、エピルビシン、エチレンイミン、エトポシド、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルタミド、ホテムスチン、ゲムシタビン、ハーセプチン、ヘキサメチルアミン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イリノ

10

20

30

40

50

テカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロナート、ペントスタチン、プリカマイシン、プロカルバジン、リツキシマブ、ステロイド、ストレプトゾシン、STI-571、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロマイド、テニポシド、テトラジン、チオグアニン、チオテパ、トムデックス、トポテカン、トレオスルファン (Treosulphan)、トリメトトレキサート、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、VP-16、およびゼロダである。

【0113】

有用な癌化学療法剤には、以下のものも含まれる：アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロスホスファミド (cyclophosphamide)；スルホン酸アルキル類、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ (Benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (Meturedopa)、およびウレドーパ (Uredopa)；以下を含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン (methylamelamine)：アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスファオルアミド、およびトリメチルオロメラミン (trimethylolomelamine)；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロランブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド (Cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビエヒン (Novembiehin)、フェネステリン (Phenesterine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロ尿素、例えば、カヌスチン (Cannustine)、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン；抗生物質、例えば、アクラシノマイシン (Aclacinomycin)、アクチノマイシン、アウスラマイシン (Authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアミシン、カラビシン (Carabycin)、カルミノマイシン (Carminomycin)、カルジノフィリン (Carzinophilin)、クロモイニシン (Chromoinycin)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エソルビシン (Eso-rubicin)、イダンビシン (Idambicin)、マルセロマイシン (Marcellomycin)、マイトマイシン、マイコフェノール酸、ノガラマイシン (Nogalamycin)、オリボマイシン (Olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (Potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (Quelamycin)、ロドルビシン (Rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン (Tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン、およびゾルビシン；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル (5-FU)；葉酸アナログ、例えば、デノプテリン (Denopterin)、メトトレキサート、プテロプテリン (Pteropterin)、およびトリメトトレキサート；プリンアナログ、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン (Thiamiprine)、およびチオグアニン；ピリミジンアナログ、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン (azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロックスウリジン、および5-FU；アンドロゲン、例えば、カルステロン (Calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、ルネピチオスタン (Rnepitostane)、およびテストラクトン；抗アドレナリン薬、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、およびトリロスタン；葉酸補剤、例えば、フロリン酸 (frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミド (aldophosphamide) グリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル (Bestrabucil)；ピサントレン；エダトラキサート (Edatraxate)；デホファミン (Defofamine)；デメコルシン；ジアジコン；エルホルニチン (Elfornithine)；酢酸エリプチニウム (elliptinium)；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメト (Phenamet)；ピラルビシン；ポドフィリン酸 (podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK (登録商標)；ラゾキサン；シゾフラン (Sizofrran)；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクォン；2、2'、2"-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン

10

20

30

40

50

；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（Gacytosine）；アラビノシド（「A r a - C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル（T A X O L（登録商標）、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）およびドキセタキセル（Doxetaxel）（T A X O T E R E（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロランブシル；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金アナログ、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン；ビンブラスチン；白金；エトポシド（V P - 1 6）；イホスファミド；マイトマイシン C；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロナート；C P T - 1 1；トポイソメラーゼインヒビター R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチルオルニチン（D M F O）；レチノイン酸；エスペラマイシン（Esperamicins）；カペシタビン；ならびに上記のいずれかの製薬上許容される塩、酸、または誘導体。さらに、以下のものが含まれる：腫瘍に対するホルモンの作用を調節するか、または阻害する働きをする抗ホルモン剤、例えば、以下をはじめとする抗エストロゲン薬：例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害 4（5）-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン（Keoxifene）、オナプリストン、およびトレミフェン（フェアストン）；および抗アンドロゲン薬、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン；ならびに上記のいずれかの製薬上許容される塩、酸または誘導体。

10

【0114】

20

有用な薬物には、サイトカインも含まれる。そのようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるものは、成長ホルモン、例えば、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインシュリン；リラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば、濾胞刺激ホルモン（F S H）、甲状腺刺激ホルモン（T S H）、および黄体化ホルモン（L H）；肝臓増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子 α および β ；ミューレリアン（mullerian）阻害物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（T P O）；神経成長因子、例えば、N G F - β ；血小板増殖因子；形質転換増殖因子（T G F）、例えば、T G F - α および T G F - β ；インスリン様成長因子 - I および - I I；エリスロポエチン（E P O）；骨誘導因子；インターフェロン、例えば、インターフェロン - α 、- β 、および - γ ；コロニー刺激因子（C S F）、例えば、マクロファージ - C S F（M - C S F）；顆粒球 - マクロファージ - C S F（G M - C S F）；および顆粒球 - C S F（G C S F）；インターロイキン（I L）、例えば、I L - 1、I L - 1 a、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 1 1、I L - 1 2、I L - 1 5；腫瘍壊死因子、例えば、T N F - α または T N F - β ；L I F および k i t リガンド（K L）をはじめとする他のポリペプチド因子である。本明細書で使用するように、サイトカインという用語には、天然供給源由来または組換え細胞培養物由来タンパク質、およびネイティブ配列サイトカインの生物活性同等物が含まれる。

30

40

【0115】

薬物は、続いてペプチジル化学療法剤のようなプロドラッグを活性な抗癌薬物に転換するプロドラッグ活性化酵素により活性化される、プロドラッグであってよい。例えば、W O 8 8 / 0 7 3 7 8；W O 8 1 / 0 1 1 4 5；米国特許第 4, 9 7 5, 2 7 8 号を参照のこと。一般に、酵素成分には、プロドラッグをより活性な細胞傷害性の形態に変えるような方式で、プロドラッグに作用することができる任意の酵素が含まれる。

【0116】

I V. ミニセルを特異的哺乳動物細胞に標的化する

本発明の一態様では、W O 2 0 0 5 / 0 5 6 7 4 9 に記載されているように、ミニセルは、二重特異性リガンドを介して標的哺乳動物細胞に到達する。ミニセルと哺乳動物細胞

50

成分の両方に特異性を有する二重特異性リガンドは、ミニセルが哺乳動物細胞によって取り込まれ、哺乳動物細胞が機能性核酸分子を産生できるように、ミニセルと哺乳動物細胞を結合させる。この標的化した送達法は、*in vivo*もしくは*in vitro*で、または*in vivo*と*in vitro*の両方で実施することができる。

【0117】

二重特異性リガンド、ミニセル、および哺乳動物細胞間の接触は、いくつかの異なる方式で生じる。*in vivo*送達には、既に二重特異性リガンドが結合したミニセルを投与するのが好ましい。従って、ミニセル、二重特異性リガンド、および標的細胞は全て、二重特異性リガンド標的化ミニセルが、*in vivo*で標的細胞に到達した時に接触する。あるいは、二重特異性リガンドおよびミニセルは、*in vivo*で別々に投与す

10

【0118】

二重特異性リガンド、ミニセル、および哺乳動物細胞間の接触は、*in vitro*での一回または複数のインキュベーション中に行うこともできる。一実施形態では、3種の要素を同時に全て一緒にインキュベートする。あるいは、段階的インキュベーションを行うこともできる。段階的アプローチの一例では、初めにミニセルと二重特異性リガンドと一緒にインキュベートして二重特異性リガンド標的化ミニセルを形成させ、続いてこれを標的細胞と共にインキュベートする。別の例では、二重特異性リガンドを初めに標的細胞と共にインキュベートし、続いてミニセルとインキュベートする。一回または複数の*in vitro*インキュベーションと*in vivo*投与との組合せによっても、二重特異性

20

【0119】

本発明者らは、標的化した送達アプローチは、特異的接着およびミニセルのエンドサイトーシスに通常不応である細胞を含め、一定範囲の哺乳動物細胞に広く適用可能であることを見出した。例えば、一方のアーム上に抗O-多糖体特異性を有し、他方のアーム上に抗HER2受容体、抗EGF受容体、または抗アンドロゲン受容体特異性を有する二重特異性抗体リガンドは、ミニセルと一定範囲の標的非貪食性細胞上のそれぞれの受容体とを効率よく結合させる。これらの細胞には、肺、卵巣、脳、乳房、前立腺、および皮膚癌細胞が含まれる。さらに、効率的な結合は、非貪食性細胞のそれぞれによる、ミニセルの迅速なエンドサイトーシスを進行させる。

30

【0120】

本発明の標的細胞には、機能性核酸が導入されるあらゆる細胞が含まれる。望ましい標的細胞は、リガンドの結合と同時にエンドサイトーシスを促進する、細胞表面受容体の発現により特徴付けられる。好ましい標的細胞は、細胞が専門の貪食細胞（例えば、マクロファージ、樹状細胞、およびナチュラルキラー（NK）細胞）ではないという意味で非貪食性である。さらに、好ましい標的細胞は哺乳動物細胞である。

【0121】

本発明の標的化した送達法で有用なリガンドには、標的細胞の表面成分とミニセルの表面成分とを結合する任意の作用物質が含まれる。標的細胞の表面成分は、受容体、特に、エンドサイトーシスを媒介できる受容体が好ましい。リガンドは、ポリペプチド成分および／または炭水化物成分を含みうる。抗体は、好ましいリガンドである。例えば、細菌由来のインタクトなミニセルの表面成分と標的哺乳動物細胞の表面成分とに対して二重特異性を保有する二重特異性抗体は、ミニセルを*in vitro*および*in vivo*で標的哺乳動物細胞に標的化するために、効率よく使用することができる。有用なリガンドには、受容体、酵素、結合ペプチド、融合／キメラタンパク質、および小分子が含まれる。

40

【0122】

特定のリガンドの選択は、2つの主たる判定基準によりもたらされる：（i）インタクトなミニセル表面の1個または複数のドメインへの特異的結合、および（ii）標的細胞表面の1個または複数のドメインへの特異的結合。すなわち、リガンドは、細菌由来のインタクトなミニセル表面構造に対して特異性を有する第1アーム、および哺乳動物細胞の

50

表面構造に対して特異性を有する第2アームを有することが好ましい。第1アームおよび第2アームのそれぞれは多価であってよい。各アームは、多価の場合でさえも単一特異性であることが好ましい。

【0123】

細菌由来ミニセルへ結合するためには、リガンドの一方のアームは、親細菌細胞に見出されるリポ多糖のO-多糖成分に特異的であることが望ましい。リガンド結合に利用することができる他のミニセル表面構造には、線毛 (pilli)、線毛 (fimbriae)、および鞭毛細胞表面露出ペプチドセグメントなど、細胞表面に露出した、外膜上のポリペプチドおよび炭水化物が含まれる。

【0124】

標的細胞へ結合するために、リガンドの一方のアームは、哺乳動物細胞表面成分に特異的である。そのような成分には、特徴づけられているか、または特徴づけられていない細胞表面タンパク質、ペプチド、および炭水化物が含まれる。細胞表面受容体、特に、受容体介在エンドサイトーシスを活性化することができる細胞表面受容体は、標的化に望ましい細胞表面成分である。そのような受容体が標的細胞表面で過剰に発現した場合、治療しようとする細胞を標的とする選択性を高め、それにより非標的細胞へ送達される可能性を減少させる。

【0125】

例として、腫瘍細胞、転移性細胞、内皮細胞および平滑筋細胞などの脈管構造細胞、肺細胞、腎細胞、血液細胞、骨髄細胞、脳細胞、肝細胞など、または所望の細胞の細胞表面受容体モチーフに特異的に結合するリガンドを選択することによって、選択した細胞のいずれかの前駆体を標的とすることができる。細胞表面受容体の例には以下のものが含まれる：ほとんどの大腸癌、直腸癌、乳房癌、肺癌、膵臓癌、および消化管癌で過剰に発現する癌胎児性抗原 (CEA) (Marshall, 2003)；乳房癌、卵巣癌、大腸癌、肺癌、前立腺癌、および子宮頸癌で過剰に発現することが多いヘレグリン受容体 (HER-2、neuまたはc-erbB-2) (Hungら、2000)；乳房、頭頸部、非小細胞肺、および前立腺の固形腫瘍を含め、一定範囲の固形腫瘍で高度に発現する上皮成長因子受容体 (EGFR) (Salomonら、1995)；アジアロ糖タンパク質受容体 (Stockert、1995)；トランスフェリン受容体 (Singh、1999)；肝細胞で発現するセルピン酵素複合体受容体 (Ziadyら、1997)；膵管腺癌細胞に過剰に発現する線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) (Kleeffら、2002)；抗血管新生遺伝子治療に対して血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) (Beckerら、2002およびHoshidaら、2002)；非粘液性卵巣癌の90%で選択的に過剰に発現する葉酸受容体 (GosselinおよびLee、2002)；細胞表面糖衣 (Batraら、1994)；炭水化物受容体 (Thurnherら、1994)；および呼吸上皮細胞への遺伝子送達に有用であり肺疾患、例えば、嚢胞性線維症の治療について興味を持たれるポリマー免疫グロブリン受容体 (Kaetzelら、1997)。

【0126】

好ましいリガンドは、抗体および／または抗体誘導体を含む。本明細書で使用する「抗体」という用語は、免疫応答の*in vitro*または*in vivo*生成によって得られた免疫グロブリン分子を包含する。「抗体」という用語には、ポリクローナル抗体、単一特異性抗体、およびモノクローナル抗体、および一本鎖抗体フラグメント (scFv) などの抗体誘導体が含まれる。本発明で有用な抗体および抗体誘導体は組換えDNA技術によっても得ることができる。

【0127】

野生型抗体は、2本の同一の重鎖と2本の同一の軽鎖である4本のポリペプチド鎖を有する。両方のポリペプチド鎖の型は、同一クラスの抗体および可変領域間で異ならないか、または最小限に異なる定常領域を含む。可変領域は、特定の抗体に特有であり、特異的エピトープを認識する抗原結合ドメインを含む。抗体結合に最も直接的に関与する抗原結合ドメイン領域は「相補性決定領域」(CDR)である。

【0128】

「抗体」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持している抗体フラグメントなど、抗体の誘導体も包含する。そのような抗体フラグメントには、F a bフラグメント（抗原結合ドメインを含み、ジスルフィド結合により架橋された軽鎖と重鎖の一部とを含むフラグメント）、F a b'（単一抗原結合ドメインを含み、ヒンジ領域を介して一個のF a bと重鎖の追加部分とを含む抗体フラグメント）、F（a b'）₂（重鎖のヒンジ領域内の鎖間ジスルフィド結合によって連結した2個のF a b'分子）、二重特異性F a b（2個の抗原結合ドメインを含むF a b分子であって、その各々が異なるエピトープを標的としうるF a b分子）、s c F v（アミノ酸鎖により共に結合した一抗体の軽鎖と重鎖の可変抗原結合決定領域）が含まれる。

【0129】

抗体フラグメントをはじめとする抗体が、リガンドの一部または全てを構成する場合、抗体はヒト起源であるか、またはヒトでの使用に適切であるように修飾されているのが好ましい。いわゆる「ヒト化抗体」は、当技術分野で周知である。例えば、Osbornら、2003を参照のこと。ヒト化抗体は、ヒトでその抗原性を減少させるために、遺伝子操作により改変され、かつ／または*in vitro*処理されている。抗体をヒト化する方法は、例えば、米国特許第6,639,055号、同第5,585,089号、および同第5,530,101号に記載されている。その最も簡単な事例では、マウスmAbの相補性決定領域（CDR）として知られる抗原結合ループをヒトIgG中に移植することによって、ヒト化抗体を形成する。Jonesら、1986；Riechmannら、1988；およびVerhoevenら、1988を参照のこと。しかし、一般的に、高親和性ヒト化抗体の作製は、マウス親mAbのいわゆるフレームワーク領域（FR）から、一個または複数の追加の残基を移行させる必要がある。そのヒト化技術の数種の変形形態も開発されている。Vaughanら、1998を参照のこと。

【0130】

「ヒト化抗体」ではなく、ヒト抗体も本発明では使用することができる。ヒト抗体は、そのそれぞれの抗原に対して親和性が高く、常法に従って、非常に大きい一本鎖可変フラグメント（s c F v）またはF a bファージディスプレイライブラリーから得る。Griffithsら、1994；Vaughanら、1996；Sheetsら、1998；de Haardら、1999；およびKnappikら、2000を参照のこと。

【0131】

有用なリガンドは、二重特異性一本鎖抗体も含み、この抗体は、典型的には、リンカー分子により、対応する可変重鎖部分と共有結合した可変軽鎖部分からなる組換えポリペプチドである。米国特許第5,455,030号、同第5,260,203号、および同第4,496,778号を参照のこと。二重特異性抗体は、他の方法によっても作製することができる。例えば、化学的ヘテロ複合体は、異なる特異性のインタクトな抗体または抗体フラグメントを化学的に結合することによって作製することができる。Karpovskyら、1984を参照のこと。しかし、そのようなヘテロ複合体は、再現可能な方式で作製するのは困難であり、正常なモノクローナル抗体の少なくとも2倍は大きい。二重特異性抗体は、抗体フラグメントの酵素切断と再会合が関与するジスルフィド交換によっても作製することができる。Glennieら、1987を参照のこと。

【0132】

F a bおよびs c F vフラグメントは一価であるので、これらは標的構造に対して親和性が低いことが多い。従って、これらの成分から作製した好ましいリガンドは、二量体、三量体、または四量体複合体に設計して機能親和性を高める。TomlinsonおよびHolliger、2000；Carter、2001；HudsonおよびSouriau、2001；およびTodorovskaら、2001を参照のこと。そのような複合体構造は、化学的および／または遺伝的架橋によって作製しうる。

【0133】

本発明の二重特異性リガンドは、各末端で単一特異的、すなわち、一端でミニセル上の単一成分に特異的であり、他端で標的細胞上の単一成分に特異的であるのが好ましい。リ

10

20

30

40

50

ガンドは、一端でまたは両端で多価、例えば、いわゆるディアボディ、トリアボディ、およびテトラボディ形でありうる。HudsonおよびSouriau、2003を参照のこと。ディアボディは、2個のs c F vの非共有結合性会合により形成される二価二量体であり、これにより2個のF v結合部位がもたらされる。同様に、トリアボディは3個のs c F vによる三価三量体の形成から生じ、3個の結合部位がもたらされ、テトラボディは4個のs c F vによる四価四量体の形成から生じ、4個の結合部位がもたらされる。

【0134】

哺乳動物細胞上の受容体に特異的な、数種のヒト化、ヒト、およびマウスのモノクローナル抗体ならびにそのフラグメントが、ヒト治療使用に認可されており、そのリストは急速に増えている。HudsonおよびSouriau、2003を参照のこと。二重特異性リガンドの一方のアームを形成するのに使用できるそのような抗体の一例は、HER2:HerceptinTM；トラスツズマブに対して特異性を有する。

10

【0135】

抗体可変領域も、広範なタンパク質ドメインに融合させることができる。IgG1 C H3など、ヒト免疫グロブリンドメインへ融合させると、質量が増大し、二量体化が促進される。Huら、1996を参照のこと。ヒトIgヒンジ-Fc領域へ融合させると、エフェクター機能を追加することができる。さらに、多量体タンパク質からの異種タンパク質ドメインに融合させると、多量体化が促進される。例えば、短鎖s c F vと短鎖両親媒性ヘリックスとの融合は、ミニ抗体の産生に使用されている。PackおよびPluckthun、1992を参照のこと。fos/junなど、ヘテロ二量体を形成するタンパク質に由来するドメインは、二重特異性分子を産生するために使用することができ(Kostelnyら、1992)、あるいは「ノブ・イントゥー・ホール(knobs into holes)」などの戦略を設計することによって、ホモ二量体化ドメインを設計し、ヘテロ二量体を形成させることができる(Ridgwayら、1996)。最後に、多量体化および追加機能を提供する融合タンパク質パートナー、例えば、ストレプトアビジンを選択することができる。Dubelら、1995を参照のこと。

20

【0136】

V. 貪食適格またはエンドサイトーシス適格である細胞への送達

さらに、本発明は、細菌由来ミニセルを貪食適格またはエンドサイトーシス適格である哺乳動物細胞と接触させることによって送達を準備する。細胞内細菌性病原体の方式で、親細菌細胞を取り込むことができる哺乳動物細胞は、同様にミニセルを取り込み、その内容物を哺乳動物細胞の細胞質中に放出する。この送達手法は、標的リガンドの使用なしに達成することができる。

30

【0137】

様々なメカニズムが、所与の型の細胞によってミニセルを取り込むステップに関与してよく、この点において本発明は特定の任意のメカニズムに依存しない。例えば、貪食は、マクロファージおよび他の貪食細胞が、例えば、好中球が、粒子表面上にその粒子が完全に包まれるまで仮足を伸展することによって粒子を摂取するという、詳しく報告されている過程である。「非特異的」貪食性として記載されているが、その過程での特異的受容体の関与は実証されている。WrightおよびJong(1986)；Speertら(1988)を参照のこと。

40

【0138】

従って、貪食の一形態には、表面リガンドと仮足の膜に位置するリガンド受容体との間の相互作用が関与する(ShawおよびGriffin、1981)。特異的受容体が介在するこの結合ステップは、細菌表面のアドヘンシに依存すると考えられる。非腸内毒素原性大腸菌など、毒性の低い細菌に関して、貪食は、貪食細胞受容体に対する表面リガンドの不在下でも生じうる。例えば、Pikaarら(1995)を参照のこと。従って、本発明は、限定はされないが、その親細菌細胞の性質と一致して表面アドヘンシを保持するかまたは保持せず、かつ貪食細胞(すなわち「貪食適格である」宿主細胞)(好中球およびマクロファージが哺乳動物でその主要な型である)によって取り込まれる、ミニセルの使用を包含する

50

。

【0139】

別の取り込み過程は、エンドサイトーシスであり、それによって、サルモネラ、エシェリキア、シゲラ、ヘリコバクター、シュードモナス、およびラクトバチルス属の菌種によって代表される細胞内病原体は、哺乳動物上皮細胞へ侵入できるようになり、そこで複製する。この点における2つの基本的メカニズムは、「被覆ピットエンドサイトーシス」としても知られているクラスリン依存性受容体介在エンドサイトーシス、(Riezman、1993)、およびクラスリン非依存性エンドサイトーシス (SandvigおよびDeurs、1994) である。エンドサイトーシスによって作用するエンドサイトーシス適格細胞 (すなわち「エンドサイトーシス適格である」宿主細胞) が本発明に従ってミニセルを取り込む場合、いずれかまたは両方のメカニズムが関与しうる。代表的なエンドサイトーシス適格細胞は、乳房上皮細胞、消化管腸細胞、胃上皮細胞、肺上皮細胞、および尿路および膀胱上皮細胞である。

10

【0140】

標的リガンドを使用せずに貪食適格哺乳動物細胞へ送達する場合、企図したその適用の性質は、使用したミニセルの細菌源の選択に影響を与える。例えば、サルモネラ、エシェリキアおよびシゲラ属の菌種は、消化管腸細胞上のエンドサイトーシス媒介受容体により認識されるアドヘシンを保有し、大腸癌細胞に有効な薬物を送達するのに適しているであろう。同様に、胃上皮細胞に特異的なアドヘシンを保有するピロリ菌由来ミニセルは、胃癌細胞を目標とした送達に適切であると思われる。肺上皮細胞によって認識される受容体アドヘシンを保有するシュードモナス属の菌種由来のインタクトなミニセルの投与には吸入または通気が理想的であろう。尿路および膀胱上皮細胞に特異的なアドヘシンを保有するラクトバチルス属由来ミニセルは、尿路または膀胱癌への薬物の尿道内送達に適合すると思われる。

20

【0141】

VI. 製剤

本発明は、その範囲に組成物または製剤を含み、該組成物または製剤は、(a) インタクトなミニセル、および (b) その製薬上許容される担体を含み、該ミニセルは、機能性核酸分子または機能性核酸分子をコードするセグメントを含むプラスミドを含有する。機能性核酸は、本明細書に記載した siRNA、shRNA、リボザイム、またはアンチセンス分子のいずれであってもよい。機能性核酸はまた、本明細書に記載したようなプラスミドなど、別の核酸によってコードされうる。機能性核酸をコードする核酸は、本明細書に記載したような調節エレメントまたはレポーターエレメントのいずれかを含みうる。

30

【0142】

製剤は、任意に、本明細書に記載したような薬物を含む。製剤のミニセルは薬物を含むのが好ましい。あるいは、ミニセルは、薬物をコードする、プラスミドなどの核酸分子を含みうる。

【0143】

ミニセル含有製剤は、 10^7 個ミニセル当たり約1個未満の混入親細菌細胞を含有するのが好ましく、 10^8 個ミニセル当たり約1個未満の混入親細菌細胞を含有するのがより好ましく、 10^9 個ミニセル当たり約1個未満の混入親細菌細胞を含有するのがさらに好ましく、 10^{10} 個ミニセル当たり約1個未満の混入親細菌細胞を含有するのがよりさらに好ましく、 10^{11} 個ミニセル当たり約1個未満の混入親細菌細胞を含有するのが最も好ましい。

40

【0144】

製剤はまた、任意により、ミニセルを標的細胞に標的化する二重特異性リガンドを含む。ミニセルおよびリガンドは、本明細書に記載したもののいずれであってもよい。従って、ミニセルは、機能性核酸をコードする核酸を含み、二重特異性リガンドは、ミニセルの表面成分と標的哺乳動物細胞の表面成分とに結合できるのが好ましい。

【0145】

50

製剤は、本発明の、必須のものとしてミニセル、および任意により薬物と二重特異性リガンドとからなり（すなわち、そのようなミニセル、薬物、およびリガンド、さらにこの組成物の核酸または薬物送達の質を極度に妨げない他の構成物を含む製剤）、一種または複数の製薬上許容される担体または賦形剤を使用し、慣用方法で製剤化することができる。

【0146】

製剤は、追加の防腐剤を含むかまたは含まないで、例えば、アンプルまたはバイアルの単位剤形、または複数回用量容器で提供しうる。製剤は、油性もしくは水性ビヒクルの溶液、懸濁液、または乳濁液であり、かつ懸濁化剤、安定化剤、および／または分散化剤などの製剤用薬剤を含みうる。適当な溶液は、レシピエント血液と等張であり、生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロース溶液により例示される。あるいは、製剤は、適当なビヒクル、例えば、滅菌しバイロジェンを含まない水または生理食塩水によって再調製するための凍結乾燥粉末であってよい。製剤はまた、デポー製剤の剤形であってよい。そのような長時間作用製剤は、移植（例えば、皮下にまたは筋肉内）または筋肉内注射によって投与しうる。

10

【0147】

A. 投与経路

本発明の製剤は、様々な経路により、哺乳動物の身体の様々な部位に、所望の治療効果を実現するために局所にまたは全身に投与することができる。送達は、例えば、経口投与、体腔への製剤の塗布、吸入または通気、あるいは非経口、筋肉内、静脈内、門脈内、肝内、腹膜、皮下、腫瘍内、または皮内投与により行いうる。方式および投与部位は、標的細胞の位置に依存する。例えば、嚢胞性一線維性細胞は、標的化ミニセルの吸入送達によって有効に標的になりうる。同様に、腫瘍転移は、標的化ミニセルを静脈内送達することにより、より有効に治療しうる。原発性卵巣癌は、標的化ミニセルを腹腔内送達することにより治療しうる。

20

【0148】

B. 純度

本発明のミニセルは、混入親細菌細胞を実質上含まない。すなわち、本発明のミニセル含有製剤は、 10^7 個ミニセル当たり約 1 個未満の混入親細菌細胞を含有するのが好ましく、 10^8 個ミニセル当たり約 1 個未満の混入親細菌細胞を含有するのがより好ましく、 10^9 個ミニセル当たり約 1 個未満の混入親細菌細胞を含有するのがさらにいっそう好ましく、 10^{10} 個ミニセル当たり約 1 個未満の混入親細菌細胞を含有するのがよりさらに好ましく、 10^{11} 個ミニセル当たり約 1 個未満の混入親細菌細胞を含有するのが最も好ましい。

30

【0149】

ミニセルを精製する方法は、当技術分野で公知であり PCT/I B 02/04632 に記載されている。そのような一つの方法は、クロスフローろ過（供給フローは膜表面に並行している；Forbes、1987）とデッドエンドろ過（供給フローは膜表面に対して直交している）を組み合わせる。任意により、これらのろ過の組合せを低速遠心力での分画遠心法に先行させ、細菌細胞のいくらかの部分除去し、それによりミニセル用の上清を濃縮することができる。

40

【0150】

別の精製法は、生物学的に適合する媒体での密度勾配遠心分離を利用する。遠心分離後、勾配からミニセルのバンドを採取し、任意により、ミニセルをさらに数回の密度勾配遠心分離にかけて純度を最高にする。方法はさらに、ミニセル含有試料で分画遠心法を実施する予備ステップ含みうる。低速遠心力で実施する場合、分画遠心法は、親細菌細胞のいくらかの部分除去し、それによりミニセル用に上清を濃縮する。

【0151】

特に有効な精製法は、ミニセルの純度を上昇させるために細菌のフィラメント化を利用する。すなわち、ミニセル精製法は、（a）親細菌細胞がフィラメント形態を選択するの

50

を誘発するような条件に、ミニセル含有試料を曝すステップ、続いて (b) 試料をろ過して精製ミニセル調製物を得るステップを含むことができる。

【0152】

既知のミニセル精製法も併用することができる。方法の極めて有効な一つの組合せは以下の通りである。

【0153】

ステップA：ミニセル産生細菌細胞培養の分画遠心法。2000gで約20分間実施しうるこのステップによって、ほとんどの親細菌細胞は除去されるが、ミニセルは上清に残存する。

【0154】

ステップB：等張無毒の密度勾配媒体を使用する密度勾配遠心分離。このステップでは、ミニセルの損失を最小にして、親細菌細胞を含む多くの混入物質からミニセルを分離する。このステップは精製法内で繰り返すのが好ましい。

【0155】

ステップC：0.45 μm フィルターにより、クロスフローろ過を行って親細菌細胞の混入をさらに低減する。

【0156】

ステップD：ストレス誘発による残存する親細菌細胞の線維化。これは、ミニセル懸濁液を数種のストレスのいずれかを誘発する環境条件にさらすことによって実現しうる。

【0157】

ステップE：親細菌細胞を死滅させるための抗生物質による処理。

【0158】

ステップF：膜ブレブ、膜断片、細菌破片、核酸、媒体成分など、微小な混入物質を除去し、ミニセルを濃縮するためのクロスフローろ過。0.2 μm フィルターを使用して微小な混入物質からミニセルを分離し、0.1 μm フィルターを使用してミニセルを濃縮しうる。

【0159】

ステップG：フィラメント化死滅細菌細胞を除去するためのデッドエンドろ過。このステップには0.45 μm フィルターを使用しうる。

【0160】

ステップH：ミニセル調製物からのエンドトキシンの除去。このステップには抗脂質A被膜磁気ビーズを使用しうる。

【0161】

C. 投与スケジュール

一般に、本明細書に開示した製剤は、いかなる潜在的毒性も最小限に抑えながら、最適の生理学的効果を得るために、定型試験により求めた適当な投薬量で使用する。投与レジメンは、患者の年齢、体重、性別、健康状態、治療しようとする病状の重症度、投与経路、ならびに患者の腎機能および肝機能をはじめとする様々な要因に従って選択しうる。

【0162】

最小の副作用で最大効力を得る範囲内でミニセルと薬物の濃度を求める際に精度を最適にするには、標的部位および標的細胞へのミニセルと薬物の利用能の動力学に基づくレジメンが必要であろう。治療レジメンに向けて最適濃度を決定する場合、ミニセルまたは薬物の分配、平衡、および除去が考慮されうる。組み合わせる場合、所望の効果をj得るために、ミニセルおよび薬物の投与量を調節しうる。

【0163】

さらに、製剤の投与は、薬物動態学的／薬物力学的モデリング系を使用して最適化しうる。例えば、一種または複数の投与レジメンを選択し、薬物動態学的／薬物力学的モデルを使用して、一種または複数の投与レジメンの薬物動態学的／薬物力学的プロファイルを定量することができる。次に、その特定の薬物動態学的／薬物力学的プロファイルに基づき、所望の薬物動態学的／薬物力学的応答を実現する投薬レジメンの一つを選択すること

10

20

30

40

50

ができる。例えば、W O O O / 6 7 7 7 6 を参照のこと。

【0164】

具体的には、製剤は、数週間にわたって少なくとも週1回投与する。一実施形態では、製剤は、数週間から数ヵ月に渡って少なくとも週1回投与する。

【0165】

より具体的には、製剤は、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、または31日間、少なくとも1日に1回投与する。あるいは、製剤は、毎日、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、または31日毎に、またはそれ以上の日数毎に約1回投与する。

10

【0166】

あるいは、製剤は、毎週、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20週毎に、またはそれ以上の週数毎に約1回投与する。あるいは、製剤は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20週間、またはそれ以上の週数に少なくとも約週1回投与する。

【0167】

あるいは、製剤は、毎月、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12ヵ月毎に、またはそれ以上の月数毎に約1回投与する。

20

【0168】

製剤は単一の一日量で投与し、または一日分の合計投薬量は毎日2回、3回、または4回の分割用量で投与する。

【0169】

薬物の前にミニセルを投与する方法では、薬物投与はミニセルの投与後、数分間から数時間のいつ行ってもよい。あるいは、薬物は、ミニセルの後、数時間から数日間、おそらく数週間から数ヵ月までのいつ投与してもよい。

【0170】

より具体的には、ミニセルは、薬物の少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24時間前に投与してもよい。さらに、ミニセルは、薬物投与の少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、または31日前に投与してもよい。さらに別の実施形態では、ミニセルは、薬物の少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20週間以上前に投与してもよい。別の実施形態では、ミニセルは薬物の少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヵ月前に投与してもよい。

30

【0171】

別の実施形態では、ミニセルは薬物の後に投与する。ミニセルの投与は、薬物の投与の数分間から数時間後のいつ行ってもよい。あるいは、ミニセルは、薬物の後、数時間から数日、おそらく数週間から数ヵ月までのいつ投与してもよい。

40

【0172】

以下の実施例は、限定するものではなく説明的なものにすぎず、本発明の理解をより完全にする。実施例は、薬剤耐性腫瘍細胞は、(1) 薬剤耐性をコードする遺伝子の発現を低減し、または除去するように設計したRNAi配列を保有する標的化組換えミニセルを投与するステップと、(2) 癌細胞が感受性となったものに、標的化し薬物を封入した薬物保有ミニセルを投与するステップとによって、*in vivo*で効率的に治療できることを実証する。

【実施例1】

50

【0173】

抗MDR1および抗bcl-2 shRNA発現プラスミドおよび組換えミニセルの精製
 shRNA配列(Mdr1またはbcl-2)をコードするプラスミドを保有する組換えミニセルを以下のように生成した。この研究で使用するMdr1 shRNA配列は、Wuらが2003年に記載し(5'-TCGAAAGAAACCAACTGTCTAGTGTAGagtactgTACACTGACAGTTGGTTTCTTTTTTTT-3')
 (配列番号1)、使用したbcl-2 shRNA配列は、Wacheckらが2003年に記載している(5'-TCGATGTGGATGACTGAGTACCTGAagtactgTCAGGTACTCAGTTCATCCACATTTTTT-3') (配列番号2)
 。それぞれのshRNA配列を合成し、プラスミドU6プロモーターから発現されるように、別個にプラスミドIMG-800(Imgenex Corp., San Diego, CA, USA)中にサブクローニングした。このプラスミドは、細菌細胞で高いプラスミド複製数を可能にすることができるpUC複製起点を保有する。shRNA配列が、U6プロモーターから発現させるため、適正でありかつインフレームであることを確認するために、組換えプラスミドを配列決定した。US 10/602, 201に記載されているように、その組換えプラスミドをネズミチフス菌minCDE突然変異株に形質転換し、プラスミドを保有するミニセルを精製した。組換えミニセルを、それぞれ、ミニセルshRNA-MDR-1およびミニセルshRNA-bcl-2と名付けた。

【実施例2】

【0174】

薬剤耐性癌細胞への受容体標的化組換えミニセル介在shRNAプラスミド送達およびin vitroでの薬剤耐性の逆転の実証

複数の転写産物をコードする一定範囲の異なる薬剤耐性を対象とするsiRNAは、in vitroで癌細胞において薬剤耐性を逆転させることが示されており、重要なハードルは、siRNAを癌細胞中に特にin vivoで標的化して送達することである。特許出願WO2005/056749に記載されているように、抗MDR1 shRNAプラスミドを保有する組換えミニセル(ミニセルshRNA-MDR-1)およびnonsenseRNA配列に対する対照shRNA(ミニセルshRNA-nonsense)を精製し、抗ネズミチフス菌O抗原と抗ヒトEGFR特異性とを保有する二重特異性抗体を調製し、組換えミニセルに結合させた。これらの標的化組換えミニセルをEGFRミニセルshRNA-MDR-1およびEGFRミニセルshRNA-nonsenseと名付けた。化学療法剤5-FUおよびイリノテカンを含封入したミニセルも調製し、上記のように標的化し、それぞれ、EGFRミニセル5-FUおよびEGFRミニセルIrinと名付けた。

【0175】

このin vitro研究には、イリノテカンおよび5-FUに対して高度に耐性であるヒト大腸癌細胞株Caco-2(ATCC)を選択して、第一に、EGFR標的化組換えミニセルが首尾良くそのshRNAプラスミドを癌細胞に送達できたかどうか、第二に、抗MDR1 siRNAの発現が薬剤耐性を逆転させ、EGFRに標的化し薬物を封入したミニセルに対して、Caco-2細胞を感受性にする事ができたかどうかを判定した。10%Cosmicウシ血清を添加した最小必須培地に、Caco-2細胞を 3×10^6 個細胞/フラスコで播種し、37℃で3時間、5%CO₂中でインキュベートした。

【0176】

その細胞を(a)EGFRミニセルshRNA-MDR-1、および(b)EGFRミニセルshRNA-nonsenseで処理した。いかなる処理も行わなかった対照フラスコを含めた。フラスコ当たり 10^{10} 個の濃度でミニセルを加え、全てのフラスコを72時間インキュベートした。各処理細胞をトリプシン処理し、24ウェルプレートに 1×10^4 個細胞/ml/ウェルで播種し、37℃で3時間、5%CO₂中でインキュベートした。続いて、対照未処理細胞を(6ウェル/処理)(a)遊離イリノテカン(25 μM

)、(b)遊離5-FU(25 μM)、(c)EGFRミニセルIrinol、および(d)EGFRミニセル5-FUと共にインキュベートした。

【0177】

EGFRミニセルshRNA-MDR-1で処理したCaco-2細胞を(6ウェル/処理)(a)CMVミニセル5-FU(二重特異性抗体がサイトメガロウイルスの表面タンパク質を標的とするので非特異的に標的化)、(b)遊離イリノテカン、(c)遊離5-FU、(d)EGFRミニセルIrinol、および(e)EGFRミニセル5-FUと共にインキュベートした。続いて、EGFRミニセルshRNA-nonsenseで処理したCaco-2細胞をEGFRミニセル5-FUで処理した。

【0178】

全細胞をさらに72時間インキュベートした後、CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(Pro-mega Corp., Madison, WI, USA)を使用し、製造業者の使用説明書に従って比色MTT細胞増殖アッセイ(Coryら、1991)を行った。比色測定値を490nmで読み取った。

【0179】

結果(図1)は、Caco-2細胞は大腸癌用の主要な化学療法剤、すなわち、イリノテカンおよび5-FUに対して高度に耐性であることを示した。加えて、この細胞は、EGFRミニセルIrinol、EGFRミニセル5-FU、およびEGFRミニセルshRNA-MDR-1で処理した後も依然として耐性であった。二重処理、すなわち、EGFRミニセルshRNA-MDR-1後にEGFRミニセルIrinolまたはEGFRミニセル5-FUを受けた細胞は、この処理が薬剤耐性の逆転を非常に首尾よく成し遂げたことを示し、単回の併用処理後、>50%の細胞死が観察されたことを示した。それに反して、EGFRミニセルshRNA-nonsense後にEGFRミニセル5-FUの二重処理は、薬剤耐性に対しては効果がなく、Caco-2細胞中での抗MDR-1shRNA発現が、薬剤耐性の逆転を特異的に担っていることが示唆された。EGFRミニセルshRNA-MDR-1後に遊離イリノテカンまたは5-FUを併用処理することも、薬剤耐性の逆転に有効であったが、細胞生存は約30%の減少であり程度は低かった。このデータも、受容体に標的化し薬物を封入したミニセルによる化学療法剤送達、細胞外環境で得られる遊離薬物と比較して、より高濃度の薬物を細胞内に送達しうることを示唆する。

【0180】

この結果により実証された(a)受容体標的化組換えミニセルを介して、shRNAを非貪食性哺乳動物細胞に効率的に送達することができ、(b)機能性核酸(shRNA)をコードするプラスミドは、ミニセルが崩壊する細胞内オルガネラから放出され、(c)プラスミドは、哺乳動物細胞核に輸送され、ここでshRNAが発現し、(d)多剤耐性タンパク質、MDR-1をコードするmRNAの分解においてshRNAは有効であり、(e)同一の哺乳動物細胞は、ここで、プラスミドの代わりに薬物を保有する受容体標的化ミニセルの次の処理に感受性となり、(f)二重処理プロトコル、すなわち、受容体標的化ミニセル介在shRNA送達後に、受容体標的化ミニセル介在化学療法剤を送達することは、非貪食性哺乳動物細胞における薬剤耐性の逆転に非常に有効である。

【実施例3】

【0181】

本発明の方法、すなわち、受容体標的化ミニセル介在shRNA送達後に、受容体標的化ミニセル介在薬物送達を行う二重処理を使用し実現した腫瘍退縮のin vivo実証

本実施例は、受容体標的化ミニセルを、癌細胞でin vivoにおいて薬剤耐性を逆転させるために使用できること実証する。

【0182】

ネズミチフス菌minCDE-由来ミニセルを精製し、化学療法剤イリノテカンを封入した。7×10⁹個ミニセルを含むBSG溶液を遠心分離し、上清を廃棄し、ミニセルを940 μlのBSGと60 μlのイリノテカン溶液中に再懸濁した(1mg/ml、滅菌

10

20

30

40

50

蒸留水に溶解)。懸濁液を回転させながら 37℃で一晩インキュベートして、ミニセル細胞質中にイリノテカンが拡散するようにした。続いて、ミニセル外表面に非特異的に結合した過剰なイリノテカンは、以下のように攪拌細胞限外ろ過により洗い流した。Amicon 攪拌限外ろ過セル 8010 型 (Millipore, Billerica, MA, USA) を製造業者の使用説明書に従い、限外ろ過膜ディスク (ポリエーテルスルホン、分子量カットオフ 300 kDa、Millipore) を用いて組立てた。続いて、細胞を滅菌蒸留水で 3 回洗浄、BSG でさらに 3 回洗浄した。続いて、細胞を 9 ml の新鮮な BSG で満たし、イリノテカンを含めたミニセル溶液を 1 ml 加えた。細胞を 10 psi の圧力下で維持し、容量が 5 ml に減少するまで攪拌し、5 ml の BSG で満たした。容量が再度 5 ml に減少するまで限外ろ過を続けた。この補充/限外ろ過手順を 6 回実施して、イリノテカンを封入したミニセルの外表面の徹底的な洗浄を行った。最終の限外ろ過中、容量を 1 ml に減少させ、試料を滅菌エッペンドルフ遠心チューブに移した後、13,200 rpm で 10 分間遠心分離してイリノテカンを封入したミニセルをペレット化した。

10

【0183】

上記および米国特許出願公開第 2004-0265994 号に記載されているように、二重特異性抗体を構築した。手短に言えば、各モノクローナル抗体の Fc フラグメントを介して、抗ネズミチフス菌リボ多糖 (Biodesign, Saco, Maine, USA) と、抗ヒト上皮成長因子受容体 (EGFR) マウスモノクローナル抗体 (Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA) とを精製組換えプロテイン A/G に結合させた。抗 EGFR モノクローナル抗体を選択したのは、異種移植した細胞がヒト大腸癌細胞 (Caco-2) であり、この細胞はその細胞表面上に EGFR を過剰に発現することが知られていたからである (Nyati ら、2004)。

20

【0184】

精製した組換えプロテイン A/G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) を Immunopure 結合緩衝液 (Pierce Biotechnology) で希釈して終濃度を 100 µg/ml にし、抗ネズミチフス菌 LPS と抗ヒト EGFR モノクローナル抗体のそれぞれを 20 µg/ml 含有するプレミックス溶液で、この溶液の 0.5 ml を 4℃で一晩インキュベートした。続いて、プロテイン A/G に結合しなかった過剰な抗体を以下のように除去した。Dynabeads (登録商標) プロテイン G 溶液 (磁性粒子表面に共有結合した組換えプロテイン G でコーティングした Dynabeads (登録商標) [2.8 µm ; Dynal Biotech, Oslo, Norway) を静かに混合し、溶液の 100 µl をエッペンドルフ遠心チューブに移した。チューブを Dynal MPC-S (磁気粒子濃縮装置 S 型) に置いて、ビーズを固定し、上清を廃棄した。0.1 M の Na-リン酸緩衝液 (pH 5.0) を含有する洗浄液 0.5 ml にビーズを再懸濁した。ビーズの固定化および洗浄ステップを 3 回繰り返した。プロテイン A/G 二重特異性抗体の混合物を含有する溶液をビーズに加え、静かに攪拌しながら室温で 40 分間インキュベートした。チューブを MPC-S スタンド上に置いてビーズを固定し、プロテイン A/G・二重特異性抗体をピペットで除去した。このステップは、未結合の過剰なモノクローナル抗体を除去し、プロテイン A/G にその Fc フラグメントを介して結合する二重特異性抗体を含む溶液を得た。組換えミニセルをプロテイン A/G 二重特異性抗体と共に室温で 1 時間インキュベートして、その抗 LPS Fab 領域を介してミニセルを抗体でコーティングした。

30

40

【0185】

本実施例で使用したマウスは、Animal Resources Centre (Perth, WA, Australia) から購入し、動物実験は全て、実験動物のケアおよび使用の指針、ならびに動物倫理委員会の承認を遵守して行った。実験は、EnGeneIC Pty Ltd (Sydney, NSW, Australia) の NSW 農業認可小動物施設で実施した。5% 仔ウシ血清 (GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) およびグルタミン (Invitrogen) を添加した RPMI 1640 培地で、95% 空気および 5% CO₂ の加湿雰囲気にて 37℃で組織培養することにより、ヒト大腸癌細胞 (Caco-2、ATCC) を増殖させた。1 × 10⁶ 個細胞を含む 50 µl の無血清培地は、増殖因子

50

を減少させたマトリゲル (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) $50 \mu\text{l}$ と共に、各マウスの肩甲骨間に 23 ゲージ針を使用し皮下注射した。電子デジタルカリパス (ミットヨ、日本国、精度 0.001 まで) を使用して腫瘍を週 2 回測定し、平均腫瘍体積は、式、長さ (mm) $\times$ 幅² (mm) $\times 0.5 =$ 体積 (mm³) を使用し算出した。腫瘍の体積が $50 \text{ mm}^3 \sim 80 \text{ mm}^3$ に達したとき、様々な処置を開始し、マウスは一群当たり 11 頭の異なる 8 群に無作為に分けた。

【0186】

異なる群に以下の処置を施した。第 1 群 (対照) は処置しなかった。第 2 群 (対照) : 静脈内に遊離イリノテカン ($1.2 \times 10^4 \text{ ng} / \text{マウス体重 (gm)}$)、マウス一頭当たり約 $2.4 \times 10^5 \text{ ng}$)。この対照は、腫瘍細胞が薬物耐性であった *in vitro* の結果を確認するために含めた。第 3 群 (対照) : EGFR に標的化し、イリノテカンを封入したミニセル (^{EGFR}ミニセル_{Irin} と名付ける)。第 4 群 (対照) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-MDR-1}。第 5 群 (対照) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-bcl-2}。第 6 群 (対照) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-MDR-1} 後に遊離イリノテカン。第 7 群 (実験群) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-MDR-1} 後に ^{EGFR}ミニセル_{Irin}。第 8 群 (実験群) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-bcl-2} 後に、^{EGFR}ミニセル_{Irin}。HPLC によるイリノテカン定量研究により、 5×10^8 個ミニセルが約 80 ng の薬物を封入していたことが示された。全てのミニセル処置では 5×10^8 個ミニセルを与え、shRNA 処置を 9 日目および 23 日目を施した。全ての薬物処置は、15、18、29、および 32 日目に施した。これにより、shRNA と薬物の処置の間に 6 日を空けることができ、shRNA の細胞内送達および核送達、遺伝子発現、ならびに薬剤耐性媒介タンパク質、すなわち、MDR-1 または bcl-2 の発現の抑制を可能にするための時間が確実に十分得られるようにした。

【0187】

結果には、対照群 (G1~6) と実験群 (G7 および 8) の平均腫瘍体積間に著しい対比 (図 2) が示された。実験群の腫瘍体積は、急速に安定化し、各群 11 頭の動物の大部分において顕著な安定性を示した。それに反して、全ての異なる対照群の平均腫瘍体積は、引き続き増大し、対照動物が非常に重症になったので、異種移植樹立後 36 日目に実験を停止した。他方で、実験群の動物は健康であり、処置のいかなる有害な副作用も示されなかった。一元配置分散分析を使用したデータの統計分析では、実験群 (7 および 8) が、対照群 1~6 と比較して非常に有意であったことが示された ($p = 0.0004$)。この結果は、癌における薬剤耐性の深刻な問題に対処するための、標的化した shRNA の *in vivo* 送達の初めての実証である。結果はまた、本発明が一般的な適用を有することを実証した。というのは、薬剤耐性の機能的に異なる 2 つの方法、すなわち、過剰発現した膜結合タンパク質ポンプ (MDR-1) および細胞質の抗アポトーシスタンパク質 (bcl-2) を、薬剤耐性癌細胞において *in vivo* でダウンレギュレーションすることができる。受容体を標的化し、化学療法剤を封入したミニセルの別の処置で、同一の細胞を処置することによってそのような腫瘍を効果的に治療できるであろう。

【実施例 4】

【0188】

本発明の方法、すなわち、ミニセル介在 shRNA 送達後にミニセル介在薬物送達を行う二重処置を使用し実現した腫瘍退縮効力の第 2 の *in vivo* 実証

結腸直腸癌細胞は、別の主要な化学療法剤、5-フルオロウラシル (5-FU) に対して非常に耐性であることも知られており、本実施例は、本発明の方法が *in vivo* で薬剤耐性を逆転させるだけでなく、腫瘍の安定化/退縮を可能にすることを示す。

【0189】

上記のように、ミニセルをネズミチフス菌 minCDE-突然変異型株から取得し、勾配遠心分離/フィラメント化/ろ過/エンドトキシン除去手順を使用し精製した。同様に、shRNA プラスミド、shRNA-MDR-1、shRNA-bcl-2、および shRNA-nonsense を保有する組換えミニセルを取得し、それぞれのネズミチフ

ス菌 *minCDE* - 組換え株から精製した。実施例 3 でイリノテカンについて記載したように、精製した空のミニセルに化学療法剤 5-FU を封入した。HPLC 分析を使用して、ミニセル中に封入されている 5-FU の濃度を定量した。

【0190】

実施例 3 に記載したように、抗ヒト EGFR および抗ネズミチフス菌 O 抗原二重特異性を有する二重特異性抗体を構築した。組換えミニセル (10^{10} 個) をこの二重特異性抗体と共に室温で 1 時間インキュベートして、その抗 O 抗原 Fab 領域を介しミニセルを抗体でコーティングした。

【0191】

Caco-2 癌細胞異種移植を Balb/c ノードマウスで樹立し、腫瘍の体積が $50 \text{ mm}^3 \sim 80 \text{ mm}^3$ に達したとき、マウスを 10 群 ($n =$ 一群当たりマウス 11 頭) に無作為に分けた。10 種の静脈内処置には以下のものが含まれた。(a) G1 - 腫瘍のみ、対照。G2 (対照) : 遊離 5-FU ($5 \times 10^4 \text{ ng}$ / マウス体重 (g)、マウス一頭当たり約 $1 \times 10^6 \text{ ng}$)。この対照は、腫瘍細胞が薬物耐性であった *in vitro* の結果を確認するために含めた。G3 (対照) : EGFR に標的化し、5-FU を封入したミニセル (^{EGFR}ミニセル_{5-FU} と名付ける)。G4 (対照) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-MDR-1}。G5 (対照) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-bcl-2}。G6 (対照) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-MDR-1} 後に ^{CMV}ミニセル_{5-FU}。CMV 抗体は、サイトメガロウイルスの表面タンパク質を標的とし、これは非特異的標的化された対照として機能する。G7 (対照) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-nonsense} 後に ^{EGFR}ミニセル_{5-FU}。G8 (対照) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-MDR-1} 後に遊離 5-FU。G9 (実験群) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-MDR-1} 後に ^{EGFR}ミニセル_{5-FU}。G10 (実験群) : ^{EGFR}ミニセル_{shRNA-bcl-2} 後に ^{EGFR}ミニセル_{5-FU}。shRNA 処置を 9 日目および 23 日目に施し、薬物処置を 15、18、29、および 32 日目に施した。これにより、shRNA と薬物の処置の間に 6 日を空けることができ、shRNA の細胞内送達および核送達、遺伝子発現、ならびに薬剤耐性媒介タンパク質、すなわち MDR-1 または bcl-2 の発現の抑制を可能にするための時間が確実に十分得られるようにした。

【0192】

結果では、対照群 (G1 ~ 8) と実験群 (G9 および 10) の平均腫瘍体積に著しい対比 (図 3) が示された。実験群の腫瘍体積は、各群 11 頭の動物の大部分において顕著な安定性を示した。それに反して、全ての異なる対照群の平均腫瘍体積は、引き続き増大し、対照動物が非常に重症になったので、異種移植樹立後 36 日目に実験を停止した。他方で、実験群の動物は健康であり、処置のいかなる有害な副作用も示されなかった。一元配置分散分析を使用したデータの統計分析では、実験群 (9 および 10) が、対照群 1 ~ 8 と比較して非常に有意であったことが示された ($p = 0.0008$)。

【実施例 5】

【0193】

本発明の方法を使用しドキシソルビシン耐性ヒト乳癌細胞において実現した腫瘍退縮の *in vivo* 実証

本発明者らは、ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-468 はドキシソルビシンに対して感受性が高く、^{EGFR}ミニセル_{Dox} を静脈内処置したマウス異種移植は安定化 / 退縮することが示された。

【0194】

本実施例では、MDA-MB-468 細胞を組織培養で培養し、漸増濃度の Dox で処理して Dox 耐性クローンを発生させた。*in vitro* および *in vivo* でのそのような薬物処置が、MDR-1 および bcl-2 など、多剤耐性タンパク質の発現をアップレギュレーションすることは十分に確かめられている。数個の Dox 耐性クローンを取得し、1 個を使用して、Balb/c ノードマウスで異種移植を樹立した。静脈内処置群 ($n =$ 一群当たりマウス 11 頭) には、G2 - ^{EGFR}ミニセル_{Dox} および G3 - ^{EG}

$E^G F^R$ ミニセル $s h R N A - M D R - 1$ 後に、 $E^G F^R$ ミニセル $D o x$ 、を含めた。G1マウスは腫瘍のみの対照とした。 $s h R N A$ 処置を21日目に施し、薬物処置を27、34、および41日目に施した。

【0195】

結果は、G3マウスにおいて $E^G F^R$ ミニセル $s h R N A - M D R - 1$ 後に $E^G F^R$ ミニセル $D o x$ で処置することは、癌細胞における $D o x$ 耐性の逆転に非常に有効であり、腫瘍が安定化することを示した(図4)。 $E^G F^R$ ミニセル $D o x$ による対照の処置(G2)では、腫瘍細胞が $D o x$ に対して非常に耐性であり、腫瘍は急速に成長することが示された。

【実施例6】

【0196】

薬剤耐性の逆転に対する投薬スケジュールの効果および治療効果の *in vivo* 実証

本実施例は、薬剤耐性の逆転に対する投薬スケジュールの効果および治療効果を実証する。受容体を標的化し薬物を封入したミニセルを投与する前に、効率的に $s h R N A$ を腫瘍細胞に送達するための十分な時間を与えると結果は向上する。Caco-2細胞異種移植を行ったヌードマウスに、 $E^G F^R$ ミニセル $s h R N A - M D R - 1$ を静脈内投与する経時実験を実施した。別の群(n = 一群当たりマウス11頭)では、 $E^G F^R$ ミニセル $s h R N A - M D R - 1$ 処置後、96時間(G3)、120時間(G4)、または144時間(G5)目に、マウスに $E^G F^R$ ミニセル $I r i n o$ を与えた。G1およびG2は腫瘍のみと遊離イリノテカン($\sim 2.4 \times 10^5$ ng/用量)対照とした。一用量当たり 5×10^8 個のミニセルを投与し、各用量にはミニセル中に約80 ngのイリノテカンが封入され、これは遊離薬物として投与した用量の3,000分の1の用量であった。結果は、 $s h R N A$ の発現を可能にする時間と、続く $E^G F^R$ ミニセル $I r i n o$ の投与との間に明瞭な相関が示され(図5)、薬剤耐性を逆転し有意な処理効果を得るには144時間(G5)が最も有効であった。

【実施例7】

【0197】

薬剤耐性の逆転に対する投薬スケジュールの効果および治療効果の第2の *in vivo* 実証

本実施例は、実施例6で観察された投薬スケジュール効果が広く適用可能であることを実証する。

【0198】

G2に遊離5-FU(1×10^6 ng/用量)を与え、G3、G4、およびG5では、第2の処置を $E^G F^R$ ミニセル $5 - F U$ で実施したことを除き、同一の対照と実験群で実施例6に記載した実験を繰り返した。一用量当たり 1×10^9 個のミニセルが投与され、各用量には約80 ngの5-FU、すなわち、G2マウスでの遊離薬物投与の約12,500分の1が含まれた。

【0199】

結果より、 $E^G F^R$ ミニセル $s h R N A - M D R - 1$ (G5)の投与後144時間目に $E^G F^R$ ミニセル $5 - F U$ を投与すると、最大の薬剤耐性の逆転有効性および治療有効性がもたらされることが示された(図6)。本発明の効能は、これらの非常に耐性のある腫瘍を効果的に治療するのに必要な薬物濃度から明白である。ミニセルは、それぞれ、遊離イリノテカンおよび5-FUによる治療と比較して、3,000分の1および12,500分の1の薬物しか含まなかったからである。遊離薬物は、図5および6から分かるように、腫瘍増殖に対して効果はなかった。

【0200】

参考文献

本明細書中で言及したすべての刊行物および特許文献は、参照により本明細書中に組み入れられる。しかしながら、刊行物または特許文献の参照は、先行技術についての承認を構成するものではない。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 1 】

Ambudkar, et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39: 361 (1999).

Antoku, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 286: 1003 (2001).

Ayesh et al., Anticancer Drugs, 7(6): 678-86 (1996)

Ayesh et al., Biochim. Biophys. Acta, 1316(1): 8-18 (1996)

10

Bakhshi, et al., Cell, 41: 899 (1985).

Bargou, et al., Int. J. Cancer, 60: 854 (1995).

Batra et al., Gene Ther. 1(4): 255-60 (1994).

Becker et al., Cancer Biol Ther., 1(5):548-53 (2002).

Bredel, Brain Res. Rev., 35: 161 (2001).

Britton et al., Genes Dev., 12: 1254 (1998).

Broxterman et al., Cancer Lett., 35(1): 87-95 (1987).

Brummelkamp, et al., Science 296:550 (2002).

Caplen, Expert Opin. Biol. Ther., 3(4): 575-86 (2003).

10

Caplen and Mousses, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1002: 56-62 (2003).

Carter, P. Nat Rev Cancer, 1(2): 118-29 (2001).

Chen, et al., Int. J. Cancer, 93: 107 (2001).

Ciliberto et al., Cell. 41: 531 (1985).

20

Cole et al., Science 258:1650-1654 (1992).

Collins & Olive, 32 Biochem. 2795-99 (1993).

Cory et al., *Cancer Commun.* 3: 207-212 (1991).

Cory, S. *Annu. Rev. Immunol.*, 13: 513-543 (1995).

de Boer et al., J. Bacteriol. 174: 63 (1992).

30

de Haard, H. J. et al. J. Biol. Chem. 274, 18218-18230 (1999).

Doige et al., Ann. Rev. Microbiol., 47: 291-319 (1993).

Dubel et al., J. Immunol. Methods, 178: 201-209 (1995).

Duan et al., Mol. Cancer Therapeutics, 3(7): 833-38 (2004).

Duxbury et al., J. Am. Coll. Surg., 198: 953-59 (2004).

40

Elbashir et al., Genes Dev., 15(2):188-200 (2001).

Elbashir et al., Nature, 411(6836):494-8 (2001).

- Endicott et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 58 : 137-71 (1989).
- Fardel et al., *Gen Pharmacol.*, 27(8):1283–1291 (1996).
- Forbes, *Australian J. Biotechnology* 1: 30 (1987).
- Frain et al., *Mol. Cell Biol.*, 10: 991 (1990).
- Frankel et al., *Leukemia*, 14: 576–585 (2000). 10
- Gariboldi et al., *Int. J. Oncology*, 22: 1057-64 (2003).
- Glennie et al., *J. Immunol.*, 139(7):2367-75 (1987).
- Gosselin et al., *Biotechnol. Annu. Rev.*, 8:103-31 (2002).
- Gottesman, et al., *Nat. Rev. Cancer* 2: 48 (2002). 20
- Griffiths et al. , *EMBO J.* 13: 3245–3260 (1994).
- Guerrier-Takada et al., *Cell*, 35: 849 (1983).
- Hampel and Tritz, *Biochem.*, 28: 4929 (1989).
- Hampel et al., *Nucleic Acids Research*: 299 (1990)
- Hanada, et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 11962 (1995). 30
- Hanahan, *Nature*, 315: 115 (1985).
- Hannon, *Nature (Lond.)*, 418: 244 (2002).
- Harry, *Mol. Microbiol.*, 40: 795 (2001).
- Hart, *Semin. Oncol.*, 23: 154 (1996).
- Heim et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 91: 12501 (1994). 40
- Hiraga et al., *J. Bacteriol.*, 171: 1496 (1989).
- Hoshida et al., *Pancreas*, 25(2):111-21 (2002).

- Hu et al., *Cancer Res.*, 56: 3055-3061 (1996).
- Hu et al., *Mol. Microbiol.*, 34:82-90 (1999).
- Hunter et al., *Mol. Cell. Biol.*, 16: 877 (1996).
- Hudson & Souriau, *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 845–855 (2001).
- Hudson & Souriau, *Nat. Med.*, 9 (1):129-34 (2003). 10
- Hung et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 465:171-80 (2000).
- Hutvagner & Zamore, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12: 225 (2002).
- Ireton et al., *J. Bacteriol.* 176: 5320 (1994).
- Jones et al., *Nature* 321: 522–525 (1986). 20
- Juliano & Ling, *Biochimica et Biophysica Acta*, 455:152 (1976).
- Kaetzel et al., *Biochem. Soc. Trans.* 25:475–480 (1997).
- Karpovsky et al., *J. Exp. Med.*, 160(6):1686-701 (1984).
- Katabi et al., *Human Gene Therapy* 10: 155 (1999).
- Kelsey et al., *Genes and Devel.* 1: 161 (1987). 30
- Kleeff et al., *Cancer Gene Ther.*, 9(6):522-32 (2002).
- Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296: 57–86 (2000).
- Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-53 (1992).
- Kroemer, *Nat. Med.*, 3: 614 (1997).
- Kurane et al., *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1212 (1998). 40
- Leder et al., *Cell* 45: 485 (1986).
- Lehnert, *Eur. J. Cancer*, A(6): 912-20 (1996).

- Levin et al., J. Bacteriol. 174: 6717 (1992).
- List , Oncology, 7(10): 23-8, 32, 35-38 (1993).
- List et al., J. Clin. Oncol., 11(9): 1652-60 (1993).
- Litman, et al., J. Cell Sci., 113: 2011 (2000).
- Litman et al., Cell Mol. Life Sci., 58(7): 931-59 (2001). 10
- MacDonald et al., Hepatology 7: 425 (1987).
- Mason et al., Science 234: 1372 (1986).
- McCubrey, et al., Cell Cycle Checkpoints and Cancer, pp. 17–53. Georgetown, TX: Landes Bioscience, (2001a).
- McCubrey, et al., Leukemia, 15: 1203 (2001). 20
- Miller et al., J. Clin. Oncol., 9(1): 17-24 (1991).
- Morton & Potter, J. Pharmacology & Exper. Therapeutics 286: 1066 (1998).
- Nieth et al., FEBS Letters, 545: 144-50 (2003).
- Nyati et al., Clin Cancer Res. 10; 691-700 (2004).
- Okada et al., Sci. Prog. 77: 253 (1993-94). 30
- Okada et al., J. Bacteriol. 176: 917 (1994).
- Osbourn et al., Drug Delivery Tech., 8: 845-851 (2003).
- Pack et al., Biochemistry, 31(6):1579-84 (1992).
- Perrotta and Been, Biochem., 31: 16 (1992) 40
- Pikaar et al., J. Infect. Dis. 172: 481 (1995).
- Pinkert et al., Genes and Devel. 1: 268 (1987).
- Prasher et al., Trends in Genetics 11: 320 (1995).

- Raskin & de Boer, J. *Bacteriol.* 181: 6419 (1999).
- Readhead et al., *Cell* 48: 703 (1987).
- Reeve & Cornett, J. *Viol.* 15: 1308 (1975).
- Ridgway et al., *Protein Eng.*, 9(7): 617-21 (1996).
- Riezman, *Trends in Cell Biology*, 3: 330 (1993). 10
- Rossi et al., *Aids Research and Human Retroviruses*, 8: 183 (1992)
- Salomon et al., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183–232 (1995).
- Salveson et al., *Cell*, 91: 443 (1997).
- Sandvig & Deurs, *Trends in Cell Biology*, 4: 275 (1994). 20
- Sato, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9238 (1994).
- Sattler, et al., *Science (Wash. DC)*, 275: 983 (1997).
- Saville & Collins, *Cell*, 61: 685-96 (1990).
- Saville & Collins, *PNAS (USA)*, 88: 8826-30 (1991).
- Scheffer, et al., *Curr. Opin. Oncol.*, 12: 550 (2000). 30
- Sellers & Fisher, *J. Clin. Invest.*, 104: 1655 (1999).
- Sharp, *Genes Dev.*, 15: 485 (2001).
- Shaw & Griffen, *Nature* 289: 409 (1981).
- Sheets et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95: 6157–6162 (1998).
- Siould, “Therapeutic siRNAs,” *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(1): 22-28 (2004). 40
- Speert et al., *J. Clin. Invest.*, 82: 872 (1988).
- Stewart & D'Ari, J. *Bacteriol.*, 174: 4513 (1992).

Sun, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 280: 788 (2001).

Swift et al., Cell, 38: 639 (1984).

Thurnher et al., Glycobiology, 4(4):429-35 (1994).

Todorovska et al., J. Immunol. Methods, 248: 47-66 (2001).

Tomlinson & Holliger, Methods Enzymol., 326: 461-479 (2000).

10

米国特許第 3,817,837 号

米国特許第 3,850,752 号

米国特許第 3,939,350 号

米国特許第 3,996,345 号

20

米国特許第 4,275,149 号

米国特許第 4,277,437 号

米国特許第 4,366,241 号

米国特許第 4,496,778 号

米国特許第 4,987,071 号

30

米国特許第 4,975,278 号

米国特許第 5,037,743 号

米国特許第 5,143,830 号

米国特許第 5,260,203 号

40

米国特許第 5,455,030 号

米国特許第 5,530,101 号

米国特許第 5,585,089 号

米国特許第 6,025,197 号

米国特許第 6,639,055 号

米国特許出願公開第 2004-0265994 号

Van Bambeke, et al., *Biochem. Pharmacol.*, 60: 457 (2000).

Vaughan, et al., *Nature Biotechnol.*, 14: 309–314 (1996).

10

Vaughan et al., *Nature Biotechnol.*, 16: 535–539 (1998).

Wachi et al., *J. Bacteriol.*, 171: 6511 (1989).

Wang, et al., *Nat. Med.*, 5: 412 (1999).

Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7063–7068 (1996).

20

White & McCubrey, *Leukemia*, 15: 1011–1021 (2001).

WO 81/01145

WO 88/07378

WO 95/21191

WO 00/67776

30

WO 05/056749

Wu, et al., *Cancer Res.*, 63: 1515-19 (2003).

Wacheck, et al., *Oligonucleotides*, 13: 393 (2003).

Wright & Jong, *Experimental Medi.*, 163: 1245 (1986).

Yague et al., *Gene Therapy*, 11: 1170-74 (2004).

40

Ziady et al., *Am. J. Physiol.*, 273(2 Pt 1):G545-52 (1997).

【図面の簡単な説明】

【 0 2 0 2 】

【図 1】 様々な治療がヒト大腸癌細胞株 C a c o - 2 の生存率に及ぼす影響を示す図である。

【図 2】 ノードマウスにおいて、（ 1 ） s h R N A をコードするプラスミドを保有する標的化組換えミニセル（抗 b c l 2 または抗 M d r 1 ） および （ 2 ） 化学療法剤イリノテカ

50

ンを封入した標的化ミニセルによる二重治療後に、ヒト大腸癌（Caco-2）異種移植片が退縮したことを示す図である。

【図3】ヌードマウスにおいて、（１）shRNAをコードするプラスミドを保有する標的化組換えミニセル（抗bcl2または抗Mdr1）および（２）化学療法剤5-FUを封入した標的化ミニセルによる二重治療後に、ヒト大腸癌（Caco-2）異種移植片が退縮したことを示す図である。

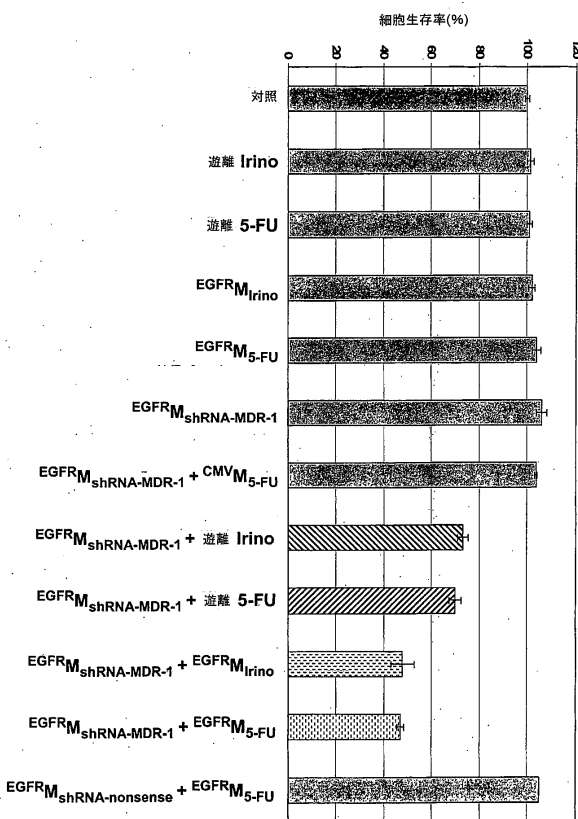
【図4】ヌードマウスにおいて、（１）shRNAをコードするプラスミドを保有する標的化組換えミニセル（抗MDR-1）および（２）化学療法剤ドキソルビシンを封入した標的化ミニセルによる二重治療後に、ヒト乳癌（MDA-MB-468）異種移植片が退縮したことを示す図である。

【図5】投薬スケジュールが、薬剤耐性の逆転および治療効果に及ぼす影響を示す図である。

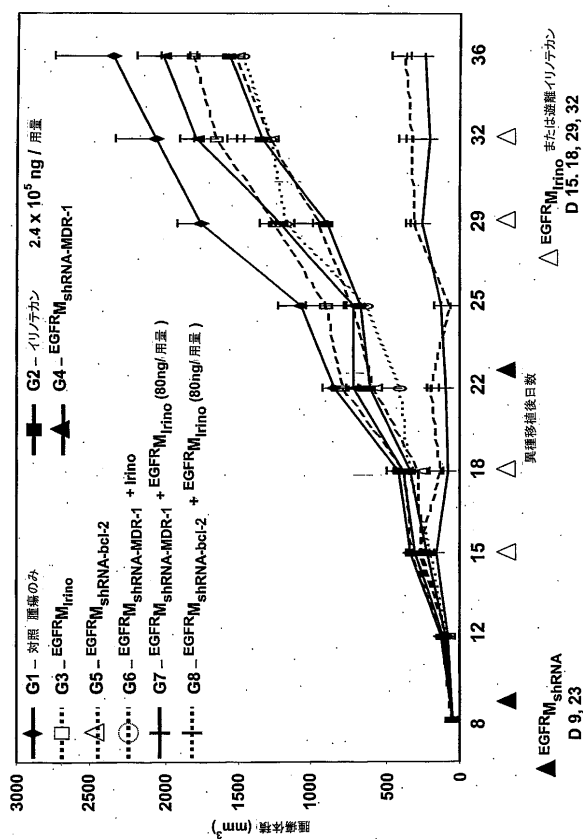
【図 6】投薬スケジュールが薬剤耐性の逆転および治療効果に及ぼす影響を示す図である

10

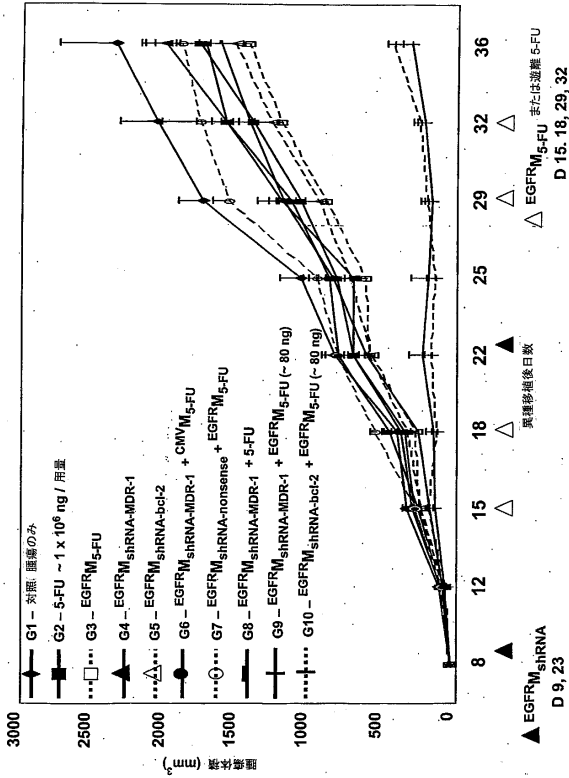
【図 1】



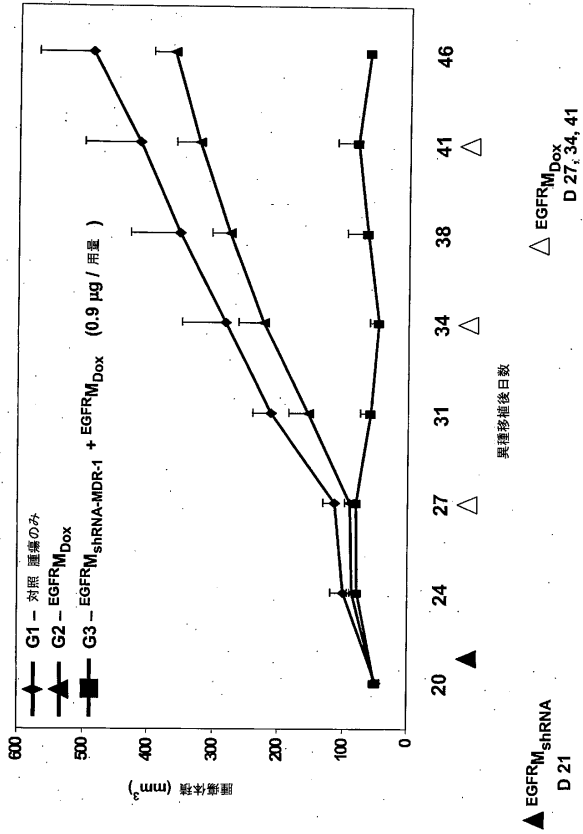
【図 2】



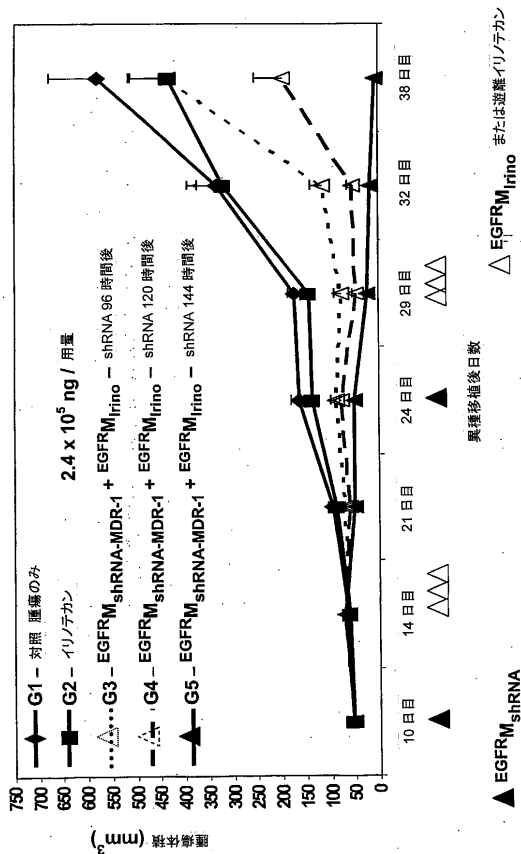
【図 3】



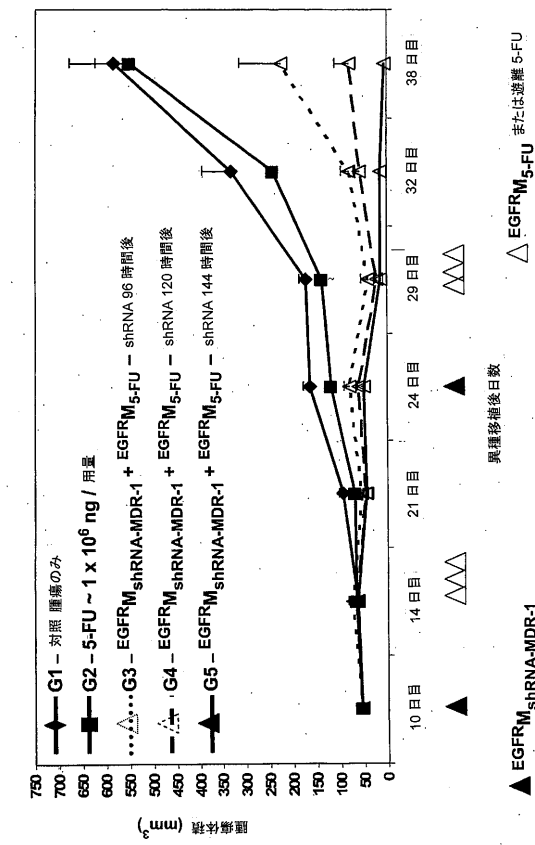
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

- (72)発明者 ブランバット, ヒマンシュ
オーストラリア国 2176 ニューサウスウェールズ, シドニー, ボスレー パーク, プレイリ
ー ヴェール ロード 96
- (72)発明者 マックディアミド, ジェニファー
オーストラリア国 2037 ニューサウスウェールズ, シドニー, グリーブ, ロンバード スト
リート 8

審査官 菊池 美香

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0203481 (US, A1)
国際公開第03/033519 (WO, A1)
特開平10-075793 (JP, A)
特表平10-502819 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- A61K 48/00
 - A61K 39/395
 - A61K 39/44
 - A61P 35/00
 - CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 - JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)