

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4291412号
(P4291412)

(45) 発行日 平成21年7月8日(2009.7.8)

(24) 登録日 平成21年4月10日(2009.4.10)

(51) Int.Cl. F I

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 47/24

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 35/00

請求項の数 7 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-510642	(73) 特許権者	ボード オブ リージェンツ ザ ユニヴ ァーシティ オブ テキサス システム アメリカ合衆国 テキサス州 78701 オースティン ウェスト セブンス ス トリート 201
(86) (22) 出願日	平成8年8月26日(1996.8.26)	(74) 代理人	弁理士 中村 稔
(65) 公表番号	特表平11-512099	(74) 代理人	弁理士 大塚 文昭
(43) 公表日	平成11年10月19日(1999.10.19)	(74) 代理人	弁理士 宍戸 嘉一
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/014146	(74) 代理人	弁理士 竹内 英人
(87) 国際公開番号	W01997/007784		
(87) 国際公開日	平成9年3月6日(1997.3.6)		
審査請求日	平成15年8月25日(2003.8.25)		
(31) 優先権主張番号	08/520,385		
(32) 優先日	平成7年8月29日(1995.8.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リボソーマルホスホジエステル、ホスホロチオエート、およびp-エトキシオリゴヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)からなるリボソームと、
(b) 前記リボソームに封じ込められた16-18merのアンチセンスp-エトキシオリゴヌクレオチド、
を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドのリボソーム組成物であって、前記リン脂質の前記オリゴヌクレオチドに対するモル比が5:1~100:1である、前記リボソーム組成物。

【請求項2】

アンチセンスオリゴヌクレオチドがGAAGGGCTTCTGCGTCの配列を有するp-エトキシオリゴヌクレオチドである、請求項1の組成物。

【請求項3】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが、CTGAAGGGCTTCTTCCの配列を有するp-エトキシオリゴヌクレオチドである、請求項1の組成物。

【請求項4】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが、GGGCTTTTGAACTCTGCTの配列を有するp-エトキシオリゴヌクレオチドである、請求項1の組成物。

【請求項5】

(a) DOPCからなるリボソームと、
(b) 前記リボソームに封じ込められた16-18merのアンチセンスp-エトキシオリゴヌクレオチドとを含み、

前記リン脂質の前記オリゴヌクレオチドに対するモル比が5:1~100:1である、腫瘍細胞の増殖を抑制するための医薬組成物。

【請求項6】

(a) リン脂質としてDOPCのみと、16-18merのアンチセンス p - エトキシオリゴヌクレオチドとを含む凍結乾燥組成物であって、前記リン脂質の前記オリゴヌクレオチドに対するモル比が5:1~100:1である前記凍結乾燥組成物を水和し、それにより遊離のオリゴヌクレオチドとリポソームに封じ込められたオリゴヌクレオチドを含む水懸濁液を形成させる過程と、

(b) 透析により遊離のオリゴヌクレオチドを前記リポソームから分離する過程とを含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドのリポソーム組成物を調製する方法。

10

【請求項7】

水懸濁液を透析前に超音波処理する、請求項6記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、ある種のアンチセンスオリゴヌクレオチドのリポソーム製剤、具体的にはリポソーマルホスホジエステル、リポソーマルホスホロチオエート、およびリポソーマル p - エトキシオリゴヌクレオチドに関する。本発明はまた、そのような製剤を製造する方法、および医学的治療においてそのような製剤を使用する方法に関する。

標的mRNAの特異的領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド(オリゴ)は、内在性遺伝子の発現を抑制するために用いられてきた。標的mRNAにアンチセンスオリゴヌクレオチドが結合すると、DNA-RNAハイブリッドが形成される。このハイブリッド形成はmRNAのトランスクリプションを抑制し、それにより、タンパクの遺伝子発現を抑制する。細胞の生存にとってそのタンパク質が必須であるなら、その発現の阻害は細胞死につながるであろう。従って、アンチセンスオリゴヌクレオチドは抗癌および抗ウイルス治療において有用な道具となりうる。

20

遺伝子発現の抑制にアンチセンスオリゴヌクレオチドを利用するにあたっての主たる障害は、細胞内での不安定さ、細胞への取り込みの低さ、および細胞内デリバリーのしにくさである。天然のホスホジエステルはヌクレアーゼによる加水分解に耐性ではない。従ってなんらかの抑制的効果が見られるためには、高濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドが必要である。ホスホロチオエートなどの修飾したホスホジエステルアナログはこのヌクレアーゼ加水分解の問題を克服するために用いられてきたが、それらはこの問題に対して完全に満足いく解答を提供するものではなかった。

30

アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞による取り込みは低い。この問題を解決するために、カルシウム - リン酸沈殿、DEAE - デキストラン法、あるいはエレクトロポレーションなどの物理的な技術がオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増大させるために用いられてきた。これらの技術は再現するのが困難で、生体には適用できないものである。リポフェクチンのような陽イオン性脂質もホスホジエステルまたはホスホロチオエートオリゴヌクレオチドをデリバリーするために用いられてきた。陽イオン性脂質と負に帯電したホスホジエステルまたはホスホロチオエートオリゴヌクレオチドとの間に静電的相互作用が生じ、その結果複合体が生じ、それが標的細胞に取り込まれる。これらの陽イオン性脂質はヌクレアーゼ消化からオリゴヌクレオチドを保護するものではないため、ヌクレアーゼ耐性のホスホロチオエートをデリバリーするときのみ有益であって、ヌクレアーゼで切断されるホスホジエステルについてはそうではない。

40

調製されている他の修飾ホスホジエステル(PD)アナログにはp - エトキシ(pE)オリゴがある。pEオリゴの修飾は、その修飾がこれらのオリゴが標的mRNAに結合するのを妨げないようにリン酸骨格になされている。pEオリゴはリン酸骨格の結合していない酸素原子にエチル基を導入することにより行われ、それによりこれらのオリゴを電荷を持たない化合物に変化させる。ヌクレアーゼに耐性ではあるが、内部への移行に際してこれらのオリゴはエンドソーム/リソソーム内に隔離されるため、pEオリゴの細胞内取り込みと細胞内のデリバリーは低く、標的mRNAへの接近が妨げられる。

疾病の治療において用いる改良されたアンチセンス組成物に対する需要があり、またその

50

ような改良組成物を製造する方法に対する需要もある。

本発明の実施態様のひとつは、アンチセンスオリゴヌクレオチドのリボソーム組成物である。該組成物は (a) 中性のリン脂質から本質的になるリボソーム、 (b) ホスホジエステルオリゴヌクレオチド、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドおよび p - エトキシオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれ、リボソームに封じ込められたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。リン脂質はホスファチジルコリンが好ましい。特に好ましいリン脂質はジオレオイルホスファチジルコリンである。アンチセンスオリゴヌクレオチドがホスホジエステルである場合は、リン脂質のオリゴに対する好ましいモル比は約3,000:1以下である。アンチセンスオリゴヌクレオチドがホスホロチオエートである場合は、リン脂質のオリゴに対する好ましいモル比は約10:1と50:1の間である。アンチセンスオリゴヌクレオチドが p - エトキシオリゴヌクレオチドである場合は、リン脂質のオリゴに対する好ましいモル比は約5:1と100:1の間である。

10

本発明の他の実施態様としては哺乳動物の腫瘍細胞の増殖を抑制する方法がある。該方法は腫瘍のある哺乳動物に、腫瘍細胞の増殖を抑制するのに効果的な上記組成物の量を投与する過程を含む。

本発明の他の実施態様としては、アンチセンスオリゴヌクレオチドのリボソーム組成物を調製する方法がある。該方法は、 (a) 中性のリン脂質と、ホスホジエステルオリゴヌクレオチド、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、および p - エトキシオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれたアンチセンスオリゴヌクレオチドから本質的になる凍結乾燥組成物を水和させ、それによりフリーのオリゴヌクレオチドとリボソームに封じ込まれたオリゴヌクレオチドを含む水懸濁液を形成させる過程と、 (b) 透析によってリボソームからフリーのオリゴヌクレオチドを分離する過程を含む。好ましい実施態様において、その水懸濁液は透析の前に超音波処理される。

20

本発明の組成物は、抗癌治療で用いられるようなアンチセンスオリゴのための改良されたデリバリーシステムを構築する。オリゴのヌクレアーゼ加水分解を最小にすることに加えて、本発明のリボソーム組成物は、従来技術の組成物に比較して細胞への取り込みおよび細胞内のデリバリーが増強されている。従って、このような組成物が、癌細胞で発見されたが正常細胞では見られない遺伝子の発現を抑制するオリゴのデリバリーに用いられるならば、治療の結果がよくなる。本発明に従って治療され得る癌は沢山あり、白血病は一つの顕著な例である。

30

本発明の製剤はまた、従来技術のリボソーム製剤に比較して、リボソーム中へのオリゴの取り込みを増加させる。

図 1 A および図 1 B は、 (A) フリーのオリゴ、 (B) リボソーム p E オリゴの A L L - 1 細胞による取り込みを示す写真である。

図 2 A は A L L - 1 および H L 6 0 細胞を、Bcr-Abl mRNA の B 1 / A 2 ブレークポイントジャンクションを標的としたリボソーム - p E アンチセンスオリゴとともにインキュベートしたときの増殖抑制の程度を示す。

図 2 B は、 A L L - 1 細胞を B 1 / A 2 リボソーム - p E アンチセンスオリゴおよび B 2 / A 2 リボソーム - p E 対照オリゴとともにインキュベートしたときの増殖抑制の程度を示す。

40

図 3 A は B V 1 7 3 細胞および H L 6 0 細胞を、Bcr-Abl mRNA の B 2 / A 2 ブレークポイントジャンクションを標的としたリボソーム - p E アンチセンスオリゴとともにインキュベートしたときの増殖抑制の程度を示す。

図 3 B は、 B V 1 7 3 細胞を B 2 / A 2 ブレークポイントジャンクションを標的としたリボソーム - p E アンチセンスオリゴおよび B 1 / A 2 ブレークポイントジャンクションを標的とした対照オリゴとともにインキュベートしたときの増殖抑制の程度を示す。

図 4 A は、 K 5 6 2 細胞および H L 6 0 細胞を、Bcr-Abl mRNA の B 3 / A 2 ブレークポイントジャンクションを標的とするリボソーム - p E アンチセンスオリゴとともにインキュベートしたときの増殖抑制の程度を示す。

図 4 B は、 K 5 6 2 細胞を B 3 / A 2 ブレークポイントジャンクションを標的とするリボ

50

ソーム - p E アンチセンスオリゴおよび B 1 / A 2 ブレークポイントジャンクションを標的とする対照オリゴとともにインキュベートしたときの増殖抑制の程度を示す。

図 5 は、T w e e n 2 0 を含むリボソーム - p E オリゴを B V 1 7 3 細胞とインキュベートしたときの増殖抑制の程度を示す。

「リボソーム」は本明細書においては脂質二重膜を有する、脂質を含む小胞の意味で、また、アンチセンスオリゴヌクレオチドを包含できる他の脂質キャリアー粒子の意味でも用いられる。リボソームは、脂質が実質的に電荷を持たない限り、1 またはそれ以上のリン脂質から作ることができる。本組成物は、陰イオン性および陽イオン性のリン脂質およびコレステロールを実質的に含まないことが重要である。適切なリン脂質には、ホスファチジルコリンおよび当業者によく知られた他のリン脂質が含まれる。リボソームは、例えば単層でも多重層でも、不確定の層構造を持っていたてもよい。リボソームを含む製薬上の組成物は通常水または生理食塩水のような、製薬上認められている滅菌された担体または希釈剤を含む。

「封じ込める」、「被胞化する」、「取り込む」の語は、本明細書中では、オリゴが少なくともリボソーム内部の水性空間（二重層の内膜領域を含む）の一部に取り囲まれるという意味で用いられる。

本発明の組成物は、好ましくは、患者に非経口的に、例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、リンパ管内、腹腔内、皮下、胸膜内、もしくは、くも膜下腔内への注射によって投与され、または生体外骨髄パージング (ex vivo bone marrow purging) に用いられる。好ましい投与量は 5 - 2 5 mg/kg の間である。投与は、癌が消失するまで又は退行するまでタイムスケジュールに従って繰り返すのが好ましく、他の治療形態と組み合わせてもよい。本発明の製造と使用を以下の実施例によってさらに説明する。

実施例 1

材料

ホスホジエステルおよびホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは Genta Incorporated より供給された。リン脂質は Avanti Polar Lipids から購入した。

オリゴヌクレオチドラベル

ホスホジエステルを、3 7 で 8 時間 T 4 キナーゼによって、[³² P] A T P を用いて 5 ' 端ラベルした。ラベルされたオリゴヌクレオチドをエタノールで - 2 0 一晚沈殿させた。7 0 % エタノールで 3 回洗浄後、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドを Microcon - 3 フィルターで 2 度濾過し、ラベルされたオリゴヌクレオチドをフリーの [³² P] A T P から分離した。

³⁵ S ラベルしたホスホロチオエートは Genta Incorporated から供給された。

リボソーム - ホスホジエステルの調製

蒸留水に溶解したホスホジエステルオリゴヌクレオチドを、過剰の t - ブタノール存在下、混合物中の t - ブタノールの最終体積が 8 0 - 9 0 % となるようにして、リン脂質と混合した。微量の [³ H] コレスタニルエーテルおよび [³² P] ホスホジエステルも、それぞれ脂質とオリゴヌクレオチドのマーカーとして、その混合物に加えた。その混合物をボルテックスし、アセトン/ドライアイスバス中で凍結した。凍結した混合物を凍結乾燥し、H e p e s 緩衝生理食塩水 (1 m M H e p e s および 1 0 m M N a C l) で一晚水และさせた。リボソームを槽タイプのソニケーターで 1 0 分間、2 回超音波処理した。

リボソーム - ホスホロチオエートの調製

リボソーム - ホスホロチオエートは、ホスホジエステルの代わりにホスホロチオエートを用いた点を除いて、リボソーム - ホスホジエステルについて記載したのと同様にして調製した。また、オリゴヌクレオチドマーカーとして [³² P] ホスホジエステルの代わりに [³⁵ S] ホスホロチオエートを用いた。

リボソームに取り込まれたオリゴヌクレオチドからのフリーのオリゴヌクレオチドの分離
フリーのホスホジエステルまたはホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの、リボソームに取り込まれたものからの分離は、混合物を過剰の 2 5 0 0 倍体積の R P M I 培地に対して室温で一晩透析することによって行った。ホスホジエステル又はホスホロチオエートの

リボソームへの取り込みを評価するための液体シンチレーション測定用に、調製したものの一定量を透析の前後で採取した。

リボソーム - ホスホジエステルの生成

ホスホジエステル (PD) 取り込みのためにジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) 脂質を選んだ。DOPC が中性であるのに対して PD は負に帯電しているからである。この脂質を用いることにより、静電的反発 (これは取り込みを低下させる) を低減し得るからである。正に帯電した脂質は、非特異的な細胞障害性を引き起こすかもしれないので、用いなかった。PD オリゴヌクレオチドをリボソームへ取り込ませる最初の試みは、凍結 - 融解法、および脱水 - 再水和法を用いて行った。

(A) 凍結 - 融解 (FT) 法

[³H] ラベル DOPC 脂質を窒素ガス存在下で有機溶媒からエバポレートし脂質膜を形成させた。真空乾燥した後、脂質膜を hepes 緩衝生理食塩水 (1 mM H e p e s、10 mM NaCl, pH 8.0) で水和し槽タイプのソニケーターで超音波処理した。これらの予備形成したリボソームを [³²P] ラベル PD オリゴヌクレオチドと 100 または 1000 対 1 のモル比で混合した。混合物全体をアセトン/ドライアイスバスで 5 - 10 分間凍結し、室温で 25 - 30 分間溶解した。この過程を 3 回繰り返し、リボソーム - PD からフリーの PD - オリゴヌクレオチドを分離するため、試料を Bio Gel A0.5 M カラムに乗せた。凍結 - 融解操作の前後で一定量を採取し、ホスホジエステルのリボソームへの取り込みを決定するために液体シンチレーション計測にかけた。

取り込みは以下のように決定した。

$$\text{凍結-融解後の } \frac{[^{32}\text{P}] \text{ PD}}{\mu\text{mole}} \div \frac{[^3\text{H}] \text{ DOPC}}{\mu\text{mole}} \times 100\%$$

凍結-融解前の [³²P] PD / μmole [³H] DOPC

取り込みはなかった (表 1)

(B) 脱水 - 再水和 (DR) 法

[³H] ラベル DOPC を窒素ガス存在下で有機溶媒からエバポレートし、脂質膜を形成させた。真空乾燥後、脂質膜を hepes 緩衝生理食塩水で水和し、槽タイプのソニケーターで超音波処理した。これらの予備形成したリボソームをアセトン/ドライアイスバス中で凍結させ凍結乾燥した。乾燥した脂質を次に [³²P] ホスホジエステルオリゴヌクレオチドを含む蒸留水で再水和した。DOPC の PD に対するモル比は 100/1 または 1000/1 にした。フリーの PD オリゴヌクレオチドをリボソーム - PD から分離するために、その混合物を Bio Gel A0.5 M カラムにかけた。カラムにかける前後で一定量を採取し、液体シンチレーション計測にかけた。取り込みは 5 % より少なかった (表 1)

表 1

DOPC リポソームへのPD取り込みに関する
凍結－融解（FT）法と脱水－再水和（DR）法の比較

モル比	方法	取り込み%
100/1	FT	0
	DR	2.0
1000/1	FT	0
	DR	4.6

10

PD に対する DOPC のモル比が 500/1 および 5000/1 では、それぞれ 0 および 2.5 % の取り込みが得られた。

20

その後凍結および凍結乾燥前に混合物に t - ブタノールを加えることにより取り込みが 11.9 % に上昇することが見いだされた。また、再水和過程において加える蒸留水の体積を 200 から 50 μ l に低下させることにより、1000/1 モル比で 11.9 % に対して 1.8 % の取り込みが得られた。取り込みに対するモル比の影響を上記の改良された条件の下で再び測定した（表 2）。

表 2

リポソームへのPDの取り込みに関する脂質のオリゴヌクレオチドに対する
モル比の影響

30

モル比	取り込み%
1000/1	11.9
2000/1	17.0
3000/1	13.4
4000/1	5.5
5000/1	9.2

40

蒸留水に溶解した PD を過剰の t - ブタノール存在下、混合物中の t - ブタノールの最終体積が 80 - 90 % になるように混合し、アセトン/ドライアイスバス中で凍結し、凍結乾燥した。これは予備形成リポソームの調製を省くためである。この操作により 2000/1 のモル比において同等の取り込みレベル（16.2 %）が得られた。

脂質および PD の回収率が 50 % より低かったためフリーの PD をリポソーム - PD から分離する方法を変更することとした。以下の他の 2 つ分離方法を用いた。すなわち、Mi

50

c r o c o n - 1 0 フィルターおよび透析である（表 3 ）。

表 3

フリーの P D をリポソームに取り込まれた P D から分離する
異なった方法間の比較^a

方法	取り込み%	脂質および P D 回収%
カラム	1 1.9	40-50
フィルター	4 4.7	60-70
透析	7 6.7	>90

10

^a P D オリゴヌクレオチドの取り込みのため D O P C を 1000/1 のモル比で用いた。

20

リポソーム混合物を、透析分離過程の前に 1 0 分間超音波処理すると、同等の取り込みレベルが得られた。

他の脂質、ジミリストイルホスファチジルコリンも P D 取り込みのために用いた。8 5 % を越える取り込みがあった。

リポソーム - ホスホロチオエートの生成

ホスホロチオエート（P T）と P D は構造アナログであるので P T を用いて同様な取り込みプロトコルを用いた。P T に対する種々のモル比の D O P C のを用いた（表 4）。また、リポソーム混合物の（透析前の）超音波処理の効果も調べた。

30

表 4

リポソームへのPT取り込みに関する、
脂質のオリゴヌクレオチドに対するモル比の効果

超音波未処理の		
モル比	取り込み%	超音波処理
10/1	>90	>90
50/1	>90	>90
100/1	45.8	55.5
200/1	44.1	49.1
500/1	27.8	47.0
1000/1	25.1	42.1

実施例 2

p - エトキシオリゴのリポソームへの取り込み

p E オリゴはOligos Therapeutics (Willsonville, OR) から購入した。リン脂質はAvanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) から購入した。

(a) オリゴラベル

p E オリゴを、37℃ 24時間、 $[^{32}\text{P}]$ ATPを用いて、T4ポリヌクレオチドキナーゼによって5'端をラベルし、エタノールで-20℃で一晩沈殿させた。次に、フリーの $[^{32}\text{P}]$ ATPからラベルされたオリゴを分離するために沈殿を70%エタノールで3回洗浄した。

(b) リポソーム調製

混合物中のt - ブタノールの最終的濃度が少なくとも95%以上となるような過剰のt - ブタノール存在下、蒸留水に溶かしたp E オリゴを種々のモル比でリン脂質と混合した。微量の $[^3\text{H}]$ コレスタニルエーテルおよび $[^{32}\text{P}]$ p E もそれぞれ脂質およびオリゴのマーカーとして混合物に加えた。混合物をボルテックスし、アセトン/ドライアイスバスで凍結し、その後凍結乾燥した。凍結乾燥した調製品をHepes緩衝生理食塩水(1mM Hepesおよび10mM NaCl)で、オリゴの最終濃度が10-100 μMとなるように水和させた。リポソーム - p - エトキシオリゴを槽タイプのソニケーターで10 - 20分間超音波処理した。

(c) リポソームに取り込まれたp E オリゴからのフリーのp E オリゴ分離

リポソームに取り込まれたp E オリゴからのフリーのp E オリゴ分離は、1000倍過剰のHepes緩衝生理食塩水に対して、室温で一晩透析(分子量カット = 12-14,000)することによって行った。リポソームへのp E オリゴの取り込みを評価するため、リポソーム - p E オリゴの一定量を透析の前後で液体シンチレーション計測のために採取した。

(d) 取り込み効率

ホスファチジルコリン脂質(PC)とp E オリゴは双方とも中性分子で共存可能であるはずなので、p E オリゴの取り込みのためにホスファチジルコリン脂質を選んだ。異なるすべてのPCの中で、-15から-20℃でチェーンメルティング相転移を起こすことから

10

20

30

40

50

ジオレオイルPC (DOPC) を選んだ。従って、室温では、DOPC は液晶相となっており、リポソームを調製するのに理想的な相である。

リポソームへ pE オリゴを取り込ませるために、異なったモル比の pE オリゴを過剰の t-ブタノール存在下で DOPC と混合した。微量の放射性ラベルした pE オリゴと DOPC を混合物に含めた。DOPC / pE オリゴ混合物をドライアイス / アセトンバスで凍結し、凍結乾燥した。次に、凍結乾燥した DOPC / pE オリゴ粉末を H e p e s 緩衝生理食塩水で水和し、最終オリゴ濃度を $10 \mu\text{M}$ とした。pE オリゴは、28 から 83 % の効率で DOPC リポソームにうまく取り込まれた (表 5)。取り込みの効率は DOPC のオリゴに対するモル比に依存し、 $10 > 100 > 5 > 1000:1$ であった。

表 5

10

pE オリゴの取り込みに関する、
DOPC の pE オリゴに対するモル比の効果

DOPC : pE オリゴのモル比	取り込み効率 (%) ^a
5 : 1	45
10 : 1	83
100 : 1	71
1000 : 1	28

20

^a 取り込み効率の値は 3 つの別個の実験から得た。

白血病細胞に対する pE オリゴのデリバリー

リポソームへの pE オリゴの高い取り込み効率 ($> 80\%$) を達成した後、次にそれらのリポソーム - pE オリゴが mRNA の局在する細胞質に到達できるかどうかの試験を進めた。pE オリゴの局在を蛍光顕微鏡で視覚化できるように 5' 端をローダミンでラベルした 16-mer pE オリゴを購入した。

30

(a) 白血病細胞と pE オリゴとのインキュベーション

ヒト急性リンパ白血病細胞である ALL - 1 細胞を用いた。ALL - 1 細胞を 24 穴プレートに 0.3mL の培地中、50,000/well プレートした。プレートした 2 時間の後、ローダミンと結合した、フリーのあるいはリポソーム - pE オリゴを最終濃度 $16 \mu\text{M}$ として ALL - 1 細胞に加えた。24 時間のインキュベーション後、リン酸緩衝生理食塩水で細胞を 3 回洗浄し、その後共焦点レーザースキャン顕微鏡下で観察した。図 1 (ALL - 1 細胞による、(A) フリーの、または (B) リポソーム - pE オリゴの取り込み) を参照のこと。

40

このデータは、リポソームに取り込まれると、より多量の pE オリゴが ALL - 1 細胞に取り込まれることを示す。リポソームは pE オリゴを細胞質にデリバリーすることができた。

白血病細胞におけるリポソーム - pE オリゴの増殖抑制

次に、リポソーム - pE オリゴが白血病細胞の増殖を特異的に抑制し得るか否かの試験を進めた。3 つの異なった種類のヒト白血病細胞株を用いた。すなわち、ALL - 1 (急性リンパ白血病)、BV 173 および K 562 (両者とも慢性骨髄性白血病) である。3 つの細胞株はすべて、9 番と 22 番の染色体の相互転座に由来する、再編成されたフィラデルフィア染色体 (Ph) を持つ。この転座は、22 番染色体のブレークポイントクラスター領域の 3' 端へ、c-Abl プロトオンコジーン の 9 番染色体からの転座を引き起こし、そ

50

の結果、Bcr-Ablハイブリッド遺伝子を生成する。BcrとAbl遺伝子が融合するブレイクポイントジャンクションは3つの細胞株で異なっている。A L L - 1細胞では、ブレイクポイントジャンクションはBcrエキソン1 / Ablエキソン2である。B V 1 7 3細胞では、ブレイクポイントジャンクションはBcrエキソン2 / Ablエキソン2である。K 5 6 2細胞では、ブレイクポイントジャンクションはBcrエキソン3 / Ablエキソン2である。これらのハイブリッド遺伝子はすべて、新しいBcr-Abl融合タンパク質を産生し、白血病の病因と関係しているチロシンキナーゼ活性を増大させる。従って、Bcr-Ablタンパク質の産生を抑制することで、白血病細胞の増殖抑制および細胞死さえも引き起こせるかもしれない。Bcr-Ablタンパク質の産生を特異的に抑制するため、Bcr-Abl mRNAのブレイクポイントジャンクション、これはP h染色体ポジティブな白血病細胞にのみ見られ正常細胞にはみられないものだが、これに対するアンチセンス配列を標的とすることにした。このようにして、正常細胞には影響がなく白血病細胞の増殖のみが影響を受けるように、非特異的な障害性副作用を最小限にすることを期待した。

(a) p E アンチセンスオリゴの配列 (5 ' 端から 3 ' 端方向に記載する)

A L L - 1細胞で見いだされたBcrエキソン1 / Ablエキソン2 (B 1 / A 2) に対するアンチセンス

GAAGGGCTTCTGCGTC

B V 1 7 3細胞で見いだされたBcrエキソン2 / Ablエキソン2 (B 2 / A 2) に対するアンチセンス

CTGAAGGGCTTCTTCC

K 5 6 2細胞で見いだされたBcrエキソン3 / Ablエキソン2 (B 3 / A 2) に対するアンチセンス

GGGCTTTTGAACTCTGCT

(b) 白血病細胞に対するリボソーム p E オリゴのデリバリー

1 ウェル当たり、10%ウシ胎仔血清を含むRPMI培地100 μL中の10,000個のA L L - 1細胞もしくはB V 1 7 3細胞または5,000個のK 5 6 2細胞を96穴プレートにプレートした。プレートした2時間後、最終濃度0 - 10 μMのリボソーム - p E オリゴを白血病細胞に加えた。細胞をリボソーム - p E オリゴとともに5日間インキュベートした。フィラデルフィア染色体を持たないヒト前骨髄性細胞株であるH L 6 0細胞を対照細胞として用いた。H L 6 0細胞は同じ条件下で10,000細胞 / ウェルプレートした。

(c) 白血病細胞の生存率の決定

インキュベーション終了後、100 μLの培地を各ウェルに加え、各ウェルの最終体積を200 μLとした。次に50 μLの細胞を分取し、130 μLの培地と20 μLのアラマールブルー (AlamarBlue) 色素の入った96穴プレートに加えた。細胞を37 °Cで更に4 - 8時間インキュベーションし、570および595 nmでマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Menlo Park, CA) で直接読み取った。アラマールブルー色素は、細胞増殖の結果による、培地の化学的還元に応答して色が変化する酸化還元指示薬を取り込む。570と595 nmの間の吸光度の違いは白血病細胞全体の吸光度の値として理解される。リボソーム p E オリゴで処理した白血病細胞の生存率を未処理の対照細胞の生存率と比較した。

A L L - 1およびH L 6 0細胞をBcr-Abl mRNAのB 1 / A 2 ブレイクポイントジャンクションを標的とするリボソーム - p E アンチセンスオリゴとインキュベートすると、A L L - 1の量依存的増殖抑制が見られたが、H L 6 0では見られなかった (図2 A)。B V 1 7 3とK 5 6 2細胞についても、それぞれBcr-Abl mRNAのB 2 / A 2およびB 3 / A 2 ブレイクポイントジャンクションを標的としたリボソーム - p E アンチセンスオリゴと共にインキュベートしたとき、同様な増殖抑制が見られた (図3 A、4 A)。同じ条件下で、H L 6 0は増殖が抑制されなかった。

この増殖抑制効果が配列依存性であることを確認するために、P h染色体ポジティブ細胞株をアンチセンスおよび対照リボソーム - p E オリゴと共にインキュベートした。A L L - 1細胞をB 1 / A 2リボソーム - p E アンチセンスオリゴまたはB 2 / A 2リボソーム

10

20

30

40

50

- p E 対照オリゴとともにインキュベートすると増殖抑制が引き起こされた (図 2 B) 。しかし、B 1 / A 2 アンチセンスオリゴははるかに大きな抑制効果を引き起こした。同様に、対照オリゴによりも対応するリボソーム - p E アンチセンスオリゴの方が、B V 1 7 3 および K 5 6 2 細胞に対して高い抑制効果が見られた (図 3 B、4 B) 。

また、リボソーム - p E オリゴ混合物中に T w e e n 2 0 界面活性剤を含めることにより、リボソーム - p E オリゴの抑制効果の能力が高まることを見いだされた。リボソーム - p E オリゴ混合物に T w e e n 2 0 を 5 % (p E オリゴの重量) 加えた。その後、混合物をバルテックスし、アセトン / ドライアイスバス中で凍結し、その後凍結乾燥した。乾燥した混合物を水和し、前述のように超音波処理した。T w e e n 2 0 を含むリボソーム - p E オリゴを B V 1 7 3 細胞に加えると、5 μ M において、1 0 0 % の増殖抑制が見られたが (図 5) 、一方同じ条件下で、通常のリボソーム - p E オリゴ (T w e e n 2 0 なし) による 1 0 0 % 増殖抑制は 1 0 μ M で見られた。

本発明の具体的実施態様の前述の記載は、本発明の可能な実施態様の完全なリストを意図するものではない。当業者は本明細書に記載した具体的実施態様に本発明の範囲内で変更を加えうることを理解するであろう。

配列表

配列番号 : 1 の情報

- (i) 配列の性質
- (A) 長さ : 1 6 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : 他の核酸
- (iii) ハイボセティカル配列 : N o
- (iv) アンチセンス : Y e s
- (xi) 配列 : 配列番号 : 1 :

GAAGGGCTTC TGCGTC

1 6

配列番号 : 2 の情報

- (i) 配列の性質
- (A) 長さ : 1 6 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : 他の核酸
- (iii) ハイボセティカル配列 : N o
- (iv) アンチセンス : Y e s
- (xi) 配列 : 配列番号 : 2 :

CTGAAGGGCT TCTTCC

1 6

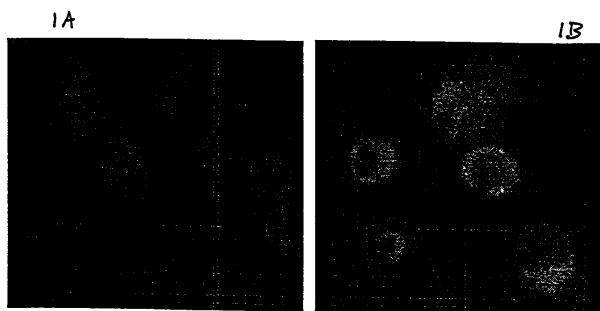
配列番号 : 3 の情報

- (i) 配列の性質
- (A) 長さ : 1 8 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (ii) 配列の種類 : 他の核酸
- (iv) アンチセンス : Y e s

(xi) 配列：配列番号：3：
GGGCTTTTGA ACTCTGCT

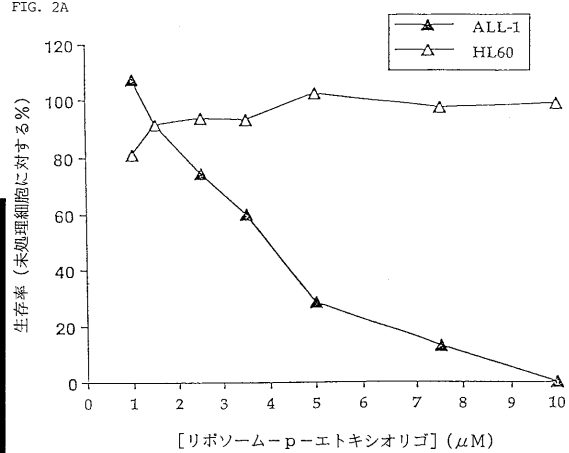
【図 1】

Fig. 1



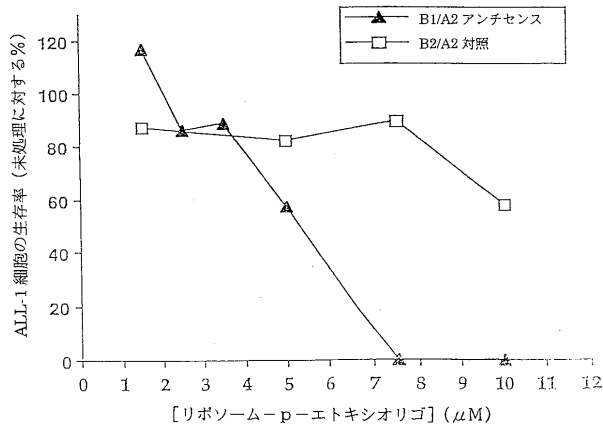
【図 2 A】

FIG. 2A



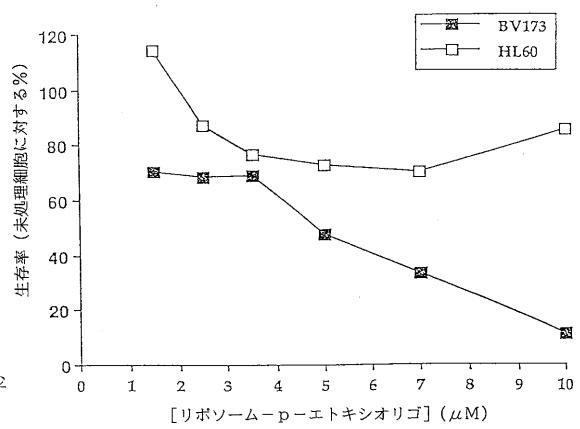
【図 2 B】

FIG. 2B



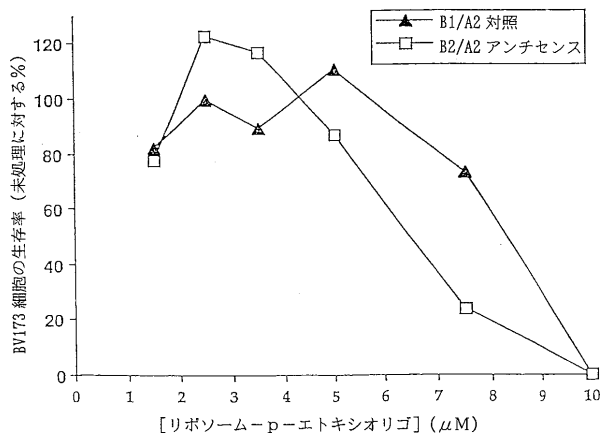
【図 3 A】

FIG. 3A



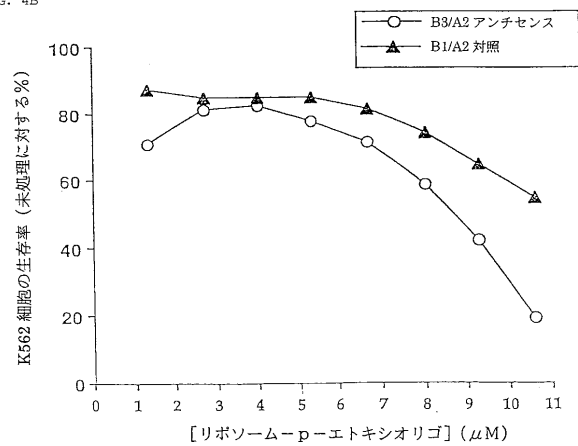
【図 3 B】

FIG. 3B



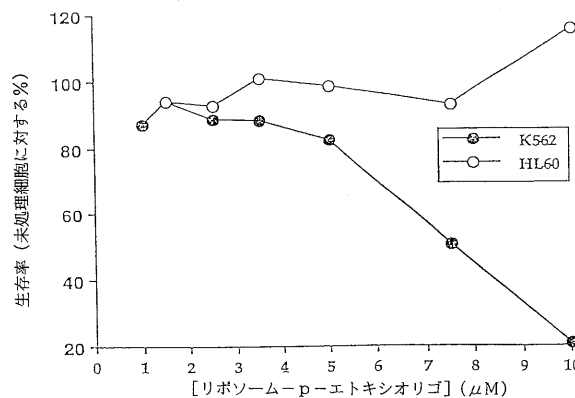
【図 4 B】

FIG. 4B



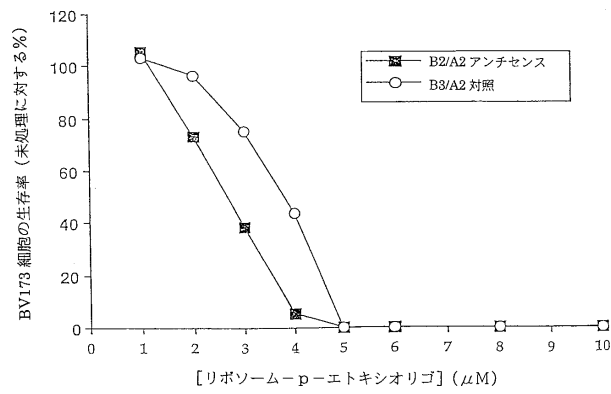
【図 4 A】

FIG. 4A



【図 5】

FIG. 5



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/00 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z
 C 0 7 H 21/00 (2006.01) C 0 7 H 21/00

(74)代理人

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人

弁理士 小川 信夫

(74)代理人

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 ロベス ベレスタイン ガブリエル

アメリカ合衆国 テキサス州 77096 ヒューストン ラザーグレン 5630

(72)発明者 タリ アナ マリア

アメリカ合衆国 テキサス州 77025 ヒューストン チャールストン パーク ドライヴ
 16 - # 1703

審査官 當麻 博文

(56)参考文献 独国特許発明第04110085 (DE, C2)

国際公開第94/026888 (WO, A1)

国際公開第95/003788 (WO, A1)

国際公開第94/028874 (WO, A1)

ZELPHATI, O. et al., Antisense Research and Development, 1993年, Vol.3, p.323-338

LEONETTI, J.-P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 米国, 1990年 4月, Vol.87, p.
 .2448-2451

ZELPHATI, O. et al., Antiviral Research, 1994年, Vol.25, p.13-25

Nucleic Acids Research, 1991年, Vol.19/No.20, p.5551-5559

STEIN, C.A. et al., Science, 1993年 8月20日, Vol.261, p.1004-1012

瀬崎仁, ドラッグデリバリーシステム, 日本, 南江堂, 1986年 4月15日, 第1刷, p.1
 68-176

BONGARTZ, J.-P. et al., Nucleic Acids Research, 1994年, Vol.22/No.22, p.4681-4688

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00 ~ 33/44

A61K 9/127

A61K 47/24

A61K 48/00

C12N 15/00

C07H 21/00

A61P 35/00

CAplus(STN)

MEDLINE(STN)

BIOSIS(STN)

EMBASE(STN)