

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2015 年 10 月 29 日(29.10.2015)



(10) 国際公開番号  
**WO 2015/162930 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 15/09* (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)  
*A61K 31/7105* (2006.01) *A61P 25/02* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/002208
- (22) 国際出願日: 2015 年 4 月 23 日(23.04.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2014-090634 2014 年 4 月 24 日(24.04.2014) JP
- (71) 出願人: 一般社団法人 医療産業イノベーション機構(MEDICAL INDUSTRY INNOVATION INSTITUTE) [JP/JP]; 〒1130033 東京都文京区本郷 4-1-4 常和本郷ビル 4 F Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 位▲高▼ 啓史(ITAKA, Keiji); 〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP). 片岡 一則(KATAOKA, Kazunori); 〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP). 池上 賢(IKEGAMI, Masaru); 〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP). 内田 智士(UCHIDA, Satoshi); 〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP). 内田 寛邦(UCHIDA, Hirokuni); 〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP). 長田 和也(NAGATA, Kazuya); 〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号 丸の内北口ビル 2 1 階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR IMPROVING PROTEIN EXPRESSION, AND COMPOSITION FOR PROTEIN EXPRESSION

(54) 発明の名称: タンパク質発現を向上させる方法およびタンパク質発現用組成物

(57) Abstract: The present invention provides a method for improving protein expression, and a composition for protein expression. The composition, which is for use in causing target protein expression, comprises mRNA that codes the target protein, and the protein-coding regions of at least 80% of the mRNA in the composition have, at the 3' end thereof, a sequence substantially comprising poly-A having a base length of 230-250.

(57) 要約: 本発明は、タンパク質発現を向上させる方法およびタンパク質発現用組成物を提供する。目的タンパク質を発現させることに用いるための組成物であって、組成物は、目的タンパク質をコードする mRNA を含んでなり、組成物中に含まれる mRNA の 80% 以上が、そのタンパク質コード領域の 3' 末端側に 230~250 塩基長の実質的にポリ A からなる配列を有する、組成物。



WO 2015/162930 A1

## 明 細 書

発明の名称：

タンパク質発現を向上させる方法およびタンパク質発現用組成物

関連出願の参照

[0001] 本願は、2014年4月24日に出願された日本国特許出願第2014-090634号の優先権の利益を享受するものであり、この内容の全体は引用することにより本願明細書に取り込まれる。

技術分野

[0002] 本発明は、タンパク質発現を向上させる方法およびタンパク質発現用組成物に関する。

背景技術

[0003] 生理活性物質としてタンパク質は極めて有望である。例えば、特定のタンパク質が減少することにより生じる疾患の治療において、タンパク質の補充療法は効果を示す。従って、これまでに、タンパク質を大量に細胞内で、または細胞外で生産する技術が開発されている。

[0004] タンパク質は、タンパク質をコードするDNAからのmRNAへの転写と、mRNAからのタンパク質の翻訳により生産される。DNAからのmRNAの転写には、転写調節因子が関与しており、転写調節によりmRNAの産生量を制御している。一方、mRNAからのタンパク質の翻訳は、mRNAへの翻訳開始因子の会合などにより制御されていると考えられている。また、mRNAは、細胞内では不安定であり、mRNAの3' UTRに付加されるポリAによりその安定性が変動することが知られている。

[0005] ポリAは、通常はポリA付加シグナルにより、mRNAの3' UTRに付加される。具体的には、RNAポリメラーゼIIによりDNAからmRNAが転写されると、切断・ポリアダニル化因子(CPSF)を含む複合体がmRNAの3' UTRのポリA付加シグナル領域を認識してシグナルの10～30塩基下流でmRNAを開裂させ、開裂部位からポリA化を開始させる。

そして、ポリ A が 100～300 塩基程度になるとポリ A の合成を終了する  
と考えられている（非特許文献 1）。しかしながら、ポリ A の合成は厳密に  
は制御されていない。

[0006] ポリ A の長さは、mRNA からのタンパク質の翻訳量に関係すると考えら  
れている。例えば、非特許文献 2 は、mRNA の 3' UTR に付加されるポ  
リ A の長さが 120 塩基のときに mRNA の翻訳効率が高まったことを開示  
する。しかしながら、制御された長さのポリ A を合成することは困難であり  
、この研究はこれ以上の進展を見せていない。現在では、ポリ A 付加シグナ  
ル領域に基づいて酵素的にポリ A を mRNA に付加しているのが実情である  
。そして、発現量の制御はプロモーターの選択により行い、プロモーター配  
列を工夫してタンパク質の発現を高めた発現ベクターが様々市販されるに至  
っている。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0007] 非特許文献 1 : E. Wahle, Journal of Biological Chemistry, 270: 2800-280  
8, 1995

非特許文献 2 : Holtkamp et al., Blood, 108: 4009-4017, 2006

### 発明の概要

[0008] 本発明は、タンパク質発現を向上させる方法およびタンパク質発現用組成  
物を提供する。

[0009] 本発明者らは、ポリ A 長が一定の範囲の長さである mRNA が真核生物翻  
訳開始因子 4E (eIF4E) との結合を顕著に高めることを見出した。本  
発明者らはまた、ポリ A 長が一定の範囲の長さである mRNA が顕著に高い  
翻訳効率を示すことを見出した。本発明は、これらの知見に基づくものであ  
る。

[0010] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 目的タンパク質を発現させることに用いるための組成物であって、  
組成物は、目的タンパク質をコードする mRNA を含んでなり、

組成物中に含まれる該 mRNA の 80%以上が、そのタンパク質コード領域の 3' 末端側に 230～250 塩基長の実質的にポリ A からなる配列を有する、

組成物。

(2) 組成物中に含まれる該 mRNA の 90%以上が、そのタンパク質コード領域の 3' 末端側に 230～250 塩基長の実質的にポリ A からなる配列を有する、上記 (1) に記載の組成物。

(3) 組成物中に含まれる該 mRNA の 95%以上が、そのタンパク質コード領域の 3' 末端側に 230～250 塩基長の実質的にポリ A からなる配列を有する、上記 (1) に記載の組成物。

(4) 組成物中に含まれる該 mRNA の 20%以下が、270 塩基長以上のポリ A を有する mRNA である、上記 (1)～(3) のいずれかに記載の組成物。

(5) タンパク質発現ベクターであって、

プロモーターと作動可能に連結したタンパク質をコードする遺伝子と、タンパク質をコードする遺伝子のタンパク質コード領域の下流に 230～250 塩基長の実質的にポリ A からなる配列とを含んでなる、タンパク質発現ベクター。

(6) mRNA の eIF4E への結合能を向上させる方法であって、

mRNA がそのタンパク質コード領域の 3' 末端側に 230～250 塩基長の実質的にポリ A からなる配列を有するように、mRNA が転写される DNA のタンパク質コード領域の下流にポリ A または実質的にポリ A からなる配列を付加することを含んでなる、方法。

(7) 標的タンパク質を対象の体内細胞で発現させる方法であって、

標的タンパク質をコードする mRNA を含んでなる組成物であって、組成物中に含まれる該 mRNA の 80%以上が、該 mRNA のタンパク質コード領域の 3' 末端側に 230～250 塩基長の実質的にポリ A 配列からなる配列

を有する、組成物を提供することと、  
組成物を対象に投与することと  
を含んでなる、方法。

(8) 疾患に罹患した対象または障害を有する対象において該疾患または障害を処置することに用いるための医薬組成物であって、その疾患または障害を治療することができるタンパク質をコードするmRNAを含んでなり、組成物中に含まれる該mRNAの80%以上が、該mRNAのタンパク質コード領域の3'末端側に230～250塩基長の実質的にポリA配列からなる配列を有する、医薬組成物。

(9) 疾患または障害が、タンパク質の低減または欠乏を原因とする疾患または障害であり、その疾患または障害を治療することができるタンパク質が、対象において低減または欠乏しているタンパク質である、上記(8)に記載の組成物。

(10) 疾患または障害が、脊髄損傷であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、脳由来神経栄養因子(BDNF)である、上記(8)に記載の組成物。

(11) 疾患または障害が、末梢神経損傷であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質が、インスリン様成長因子(IGF-1)である、上記(8)に記載の組成物。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1] 図1は、精製したmRNAの電気泳動写真である。

[図2] 図2は、図に記載のタンパク質へのmRNAの結合量に対するポリA長の効果を示す図である。

[図3] 図3は、培養細胞におけるポリA長と翻訳効率の関係を示す図である。

[図4] 図4は、無細胞抽出系におけるポリA長と翻訳効率の関係を示す図である。図4Aは、ヒト無細胞抽出系における結果を示し、図4Bは、ウサギ網状赤血球溶解液における結果を示す。

[図5] 図5は、インビボにおけるポリA長と翻訳効率の関係を示す図である。

[図6]図6は、坐骨神経損傷モデルの治療効果に対するポリA長の影響を示す図である。

### 発明の具体的な説明

[0012] 本発明では、「mRNA」とは、メッセンジャーRNAを意味する。mRNAは好ましくは真核生物に由来する。真核生物としては、大腸菌などの細菌、酵母などの真菌、カイコなどの昆虫、およびヒトなどの哺乳類が挙げられる。真核生物は、より好ましくは、大腸菌、酵母、カイコまたはヒトである。mRNAは、生体内では、DNAからの転写により産生される。転写が終了するとmRNAの3'末端にはポリAが付加される。mRNAにおいて、通常は、タンパク質コード領域(CDS)とポリAの間には3'非翻訳領域(3'UTR)が介在する。

[0013] 本明細書で用いられる「タンパク質コード領域」とは、DNA上でタンパク質をコードする領域、およびRNA上でタンパク質をコードする領域を意味する。また、「タンパク質コード領域の3'末端側」とは、mRNAにおいて、タンパク質コード領域の外の領域であって3'末端側の領域を意味し、好ましくは、3'UTRのさらに外側の領域であり、3'UTRの3'末端を意味することがある。

[0014] 本明細書で用いられる「上流」とは、遺伝子のタンパク質コード領域からみて遺伝情報が読み取られる方向とは逆側に存在する領域を意味する。本明細書で用いられる「下流」とは、遺伝子のタンパク質コード領域からみて遺伝情報が読み取られる方向に存在する領域を意味する。

[0015] 本明細書では、「ポリA」とは、アデニンが重合してなるDNAまたはRNAを意味する。本明細書では、「実質的にポリAからなる配列」は、該配列の全塩基の90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらに好ましくは100%がアデニン(A)からなることを意味する。すなわち、実質的にポリAからなる配列には、アデニン(A)以外の塩基が含まれていてもよい。実質的にポリAからなる配列では、アデニン(A)以外の塩基は、例えば、3箇所以内、好ましくは2箇所以内、より好ましくは

1 箇所以内の領域に集中して存在する。実質的にポリ A からなる配列では、アデニン（A）以外の塩基は、例えば、制限酵素切断部位である。

[0016] 本明細書では、「プロモーター」とは、DNA上に存在する mRNA の転写制御領域を意味する。本発明では、「プロモーター」としては、インビトロ転写系のプロモーターおよび真核生物のプロモーターを用いることができる。インビトロ転写系のプロモーターとしては、SP6 プロモーター、T3 プロモーターおよび T7 プロモーターが挙げられ、本発明で用いられ得る。真核生物のプロモーターとしては、大腸菌などの細菌のプロモーターおよび哺乳動物のプロモーターが挙げられ、宿主細胞に合わせて適宜選択して本発明で用いることができる。大腸菌用のプロモーターとしては、T7 プロモーター、tac プロモーターおよび T7 lac プロモーターが挙げられる。哺乳動物用のプロモーターとしては、CMV プロモーター、CAG プロモーターなどの  $\beta$  アクチンプロモーター、EF1 $\alpha$  プロモーターおよび SR $\alpha$  プロモーターが挙げられる。本明細書では、「ターミネーター」とは、転写の終結シグナルのことを意味する。

[0017] 生体内における通常の mRNA の翻訳時のポリ A 化の工程を説明すると、RNA ポリメラーゼ II により DNA から mRNA が転写されると、切断・ポリアデニル化因子（CPSF）を含む複合体が mRNA の 3' UTR のポリ A 付加シグナル領域を認識してシグナルの下流で mRNA を開裂し、開裂部位からポリ A 化を開始させると考えられている。

[0018] ポリ A 鎖は、ポリ A 結合タンパク質の結合部位として機能し、mRNA の核外への輸送を促進する。また、ポリ A 鎖は、細胞質において mRNA をその分解から守る役割を有する。また、これにより、ポリ A 鎖は、タンパク質への翻訳効率の向上に寄与する。

[0019] eIF4E は、真核生物翻訳開始因子 4E とも呼ばれ、mRNA の翻訳制御において重要な役割を担う。eIF4E は、mRNA の 5' キャップ構造の認識に関与し、また、eIF4G およびポリ A 結合タンパク質（PABP）を介して、mRNA を環状化する役割を果たす。

[0020] 本発明者らは、長いポリAを有するmRNAはPABPとより強く結合する一方で、mRNAとeIF4Eとの複合体形成は、ポリA長が特定の長さ（具体的には240塩基）であるときに顕著に促進されることを見出した。また、ポリA長が一定値を超えると、PABPへの結合が強まる一方で、eIF4Eとの結合は弱まった。eIF4Eは、PABPを介してmRNAのポリAと結合する（または複合体を形成する）と考えられているため、mRNAとPABPとの結合が強まる長いポリAを有するmRNAにおいて、eIF4Eとの結合が弱まるという結果は、非常に驚くべきものであった。

[0021] また、本発明によれば、mRNAのポリA長は210塩基以下の場合および270塩基以上の場合には、240塩基の場合と比較して、翻訳効率が顕著に低下した。従って、本発明においては、mRNAのポリA長は一定の長さに制御されることが好ましい。ここでいう「一定の長さ」とは、例えば、220～260塩基であり、好ましくは225～255塩基であり、特に好ましくは230～250塩基であり、さらに好ましくは230～245塩基であり、さらにより好ましくは235～245塩基である。また、ある態様では、270塩基以上のポリAを有するmRNAは組成物中からその量が低減されているか除去されている。

[0022] ポリA付加シグナルを除去するとポリA長の制御が容易になる。従って、本発明のある態様では、mRNAは、ポリA付加シグナルを有さない。また、本発明のある態様では、mRNAを転写するDNAは、そのタンパク質コード領域とそのターミネーターとの間にポリA付加シグナルを有さない。またある特定の態様では、mRNAを転写するDNAは、そのタンパク質コード領域とそのターミネーターとの間にポリA付加シグナルを有さず、代わりに一定の長さの実質的にポリAからなる配列を有する。

[0023] 本発明者らは、mRNAが一定の長さのポリAを有するときに、eIF4Eへの結合能を向上させることを明らかにした。従って、本発明のある側面では、mRNAのeIF4Eへの結合能を向上させる方法であって、mRNAがそのタンパク質コード領域の3'末端側に一定の長さの実質的にポリ

Aからなる配列を有するように、mRNAが転写されるDNAのタンパク質コード領域の下流にポリAまたは実質的にポリAからなる配列を付加することを含んでなる、方法が提供される。ある好ましい態様では一定の長さは、230～250塩基である。

[0024] mRNAは、RNAポリメラーゼIIによりDNA上の転写開始領域からターミネーターの間の領域が転写されて得られる。従って、ポリAまたは実質的にポリAからなる配列は、DNAのタンパク質コード領域とターミネーターの間に挿入することができる。

[0025] 本発明のmRNAのeIF4Eへの結合能を向上させる方法は、ポリA付加シグナルを除去することをさらに含んでいてもよい。ポリA付加シグナルは、代表的にはAATAA（またはAAUAA）であり、当業者であればポリA付加シグナルを容易に除去することができる。ポリA付加シグナルは、CDSとターミネーターとの間の領域、または3' UTRに含まれるので、これらの領域の一部または全部を除去することによっても除去することができる。

[0026] 本発明のmRNAのeIF4Eへの結合能を向上させる方法は、ある態様では、270塩基長以上のポリAを有するmRNAを低減するまたは除去することをさらに含んでいてもよい。本発明のある態様では、210塩基長以下のポリAを有するmRNAを低減するまたは除去することをさらに含んでいてもよい。本発明のある態様では、210塩基長以下および270塩基長以上のポリAを有するmRNAを低減するまたは除去することをさらに含んでいてもよい。

[0027] 発明者らは、mRNAのポリA長が240塩基のときに顕著に翻訳効率を向上させることを明らかにした。そして、その翻訳効率は、ポリA長が210塩基であるmRNAやポリAが270塩基であるmRNAの効率を大きく超えた。従来は、ポリAは長ければ長いほど安定であり翻訳効率が高まると考えられていたため、mRNAの翻訳効率が、ポリA長が特定の極めて狭い範囲で、しかも顕著に上昇することは、予想外のことであった。

[0028] 従って、本発明のある側面では、目的タンパク質を発現させることに用いるための組成物であって、組成物は、目的タンパク質をコードするmRNAを含んでなり、組成物中に含まれる該mRNAの80%以上（分子数比であり、以下同様）、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、さらにより好ましくは99%以上、最も好ましくは100%が、そのタンパク質コード領域の3'末端側に一定の長さ（例えば、230～250塩基）の実質的にポリAからなる配列を有する、組成物が提供される。上述の通り、mRNAのポリA長は一定の長さに制御されることが好ましい。mRNAの分子数比（%）は、当業者に周知の方法により求めることができる。分子数比は、例えば、目的タンパク質をコードするmRNAを電気泳動し、電気泳動パターンから求めることができる。また、RNA分析用マイクロチップによる定量性に優れた電気泳動法も開発されており、mRNAの分子数比の算出に用いることができる。

[0029] 本発明の組成物は、ある態様では、組成物中に含まれる目的タンパク質をコードするmRNAの20%以下、好ましくは15%以下、より好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下、さらにより好ましくは3%以下、取分け好ましくは1%以下が270塩基長以上のポリAを有するmRNAであり、最も好ましくは270塩基長以上のポリAを有する目的タンパク質をコードするmRNAは組成物中に実質的に含まれない。本発明の組成物は、ある態様では、組成物中に含まれる目的タンパク質をコードするmRNAの20%以下、好ましくは15%以下、より好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下、さらにより好ましくは3%以下、取分け好ましくは1%以下が、210塩基長以下のポリAを有するmRNAであり、最も好ましくは210塩基長以下のポリAを有する目的タンパク質をコードするmRNAは組成物中に実質的に含まれない。本発明のある態様では、組成物中に含まれる目的タンパク質をコードするmRNAの20%以下、好ましくは15%以下、より好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下、さらにより好ましくは3%以下、取分け好ましくは1%以下が210塩基長以下および

270塩基長以上のポリAを有するmRNAであり、最も好ましくは210塩基長以下または270塩基長以上のポリAを有するmRNAは組成物中に実質的に含まれない。

[0030] 天然に生じるmRNAまたはポリA付加シグナルによりポリAが付加されて生じるmRNAは、ポリAの長さが広範な範囲に分布する。一方で、本発明の組成物は、組成物に含まれる目的タンパク質をコードするmRNAに対してポリA長が一定の長さ（例えば、230～250塩基）であるmRNAを80%以上含むものであり、ポリA長が一定の長さ（例えば、230～250塩基）であるときには翻訳効率が顕著に高まるため、翻訳効率の観点からは極めて有利である。本発明の好ましい態様では、組成物に含まれる目的タンパク質をコードするmRNAの90%以上、さらに好ましくは95%以上、さらにより好ましくは97%以上、取分け好ましくは99%以上、最も好ましくは100%がそのタンパク質コード領域の3'末端側に一定の長さ（例えば、230～250塩基）の実質的にポリAからなる配列を有する。本発明のある態様では、mRNAはポリA付加シグナルを有さない。

[0031] 本発明の組成物は、1種類のmRNAを含むものであっても、複数種類のmRNAの混合物であってもよい。本発明の組成物は、様々な長さのポリAを有するmRNAの混合物であってもよい。本発明の組成物は、mRNA以外に緩衝液等の担体または賦形剤を含んでいてもよい。本発明の組成物は、mRNA送達用のキャリアを含んでいてもよい。

[0032] 本発明の組成物は、インビトロまたはインビボの細胞にタンパク質を発現させるために用いることができる。本発明の組成物はまた、無細胞抽出系などのインビトロトランスレーション系でタンパク質を発現させるために用いることができる。

[0033] 本発明のある側面では、タンパク質発現ベクターであって、プロモーターと作動可能に連結したタンパク質をコードする遺伝子と、タンパク質をコードする遺伝子のタンパク質コード領域の下流に一定の長さ（例えば、230～250塩基）の実質的にポリAからなる配列とを含んでなる、タンパク質

発現ベクターが提供される。本発明のタンパク質発現ベクターは、3' UTR領域に一定の長さ（例えば、230～250塩基）の実質的にポリAからなる配列が付加したmRNAを製造することに用いられる。本発明のある態様では、CDSとターミネーターとの間の領域にポリA付加シグナルを有さない。

[0034] 本発明のある側面では、標的タンパク質を対象の体内細胞で発現させる方法であって、標的タンパク質をコードするmRNAを含んでなる組成物であって、組成物中に含まれる該mRNAの80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、さらにより好ましくは99%以上、最も好ましくは100%が、該mRNAのタンパク質コード領域の3'末端側に一定の長さ（例えば、230～250塩基）の実質的にポリA配列からなる配列を有する、組成物を提供することと、組成物を対象に投与することとを含んでなる、方法が提供される。

[0035] 本発明の標的タンパク質を対象の体内細胞で発現させる方法では、ある態様では、270塩基長以上のポリAを有するmRNAを低減するまたは除去することをさらに含んでもよい。本発明のある態様では、210塩基長以下のポリAを有するmRNAを低減するまたは除去することをさらに含んでもよい。本発明のある態様では、210塩基長以下および270塩基長以上のポリAを有するmRNAを低減するまたは除去することをさらに含んでもよい。

[0036] 本発明のさらなる側面では、疾患に罹患した対象または障害を有する対象において該疾患または障害を処置する方法であって、その疾患または障害を治療することができるタンパク質をコードするmRNAを含んでなる組成物を該対象に投与することを含んでなり、組成物は、組成物中に含まれる該mRNAの80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、さらにより好ましくは99%以上、最も好ましくは100%が、該mRNAのタンパク質コード領域の3'末端側に一定

の長さ（例えば、230～250塩基）の実質的にポリA配列からなる配列を有する、方法が提供される。

[0037] 本発明の疾患または障害を処置する方法のある特定の態様では、疾患または障害は、末梢神経損傷であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、インスリン様成長因子（IGF-1）である。本発明のある特定の態様では、末梢神経損傷は、坐骨神経損傷であり得る。IGF-1は、例えば、IGF-1をコードするmRNAの筋内投与により、筋肥大効果（または筋萎縮防止効果）を発揮すると共に、神経再生促進作用を有し、損傷した神経の再生を促進し、対象の運動機能の回復を可能とする。

[0038] 本発明の疾患または障害を処置する方法の別のある特定の態様では、疾患または障害は、脊髄損傷であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、脳由来神経栄養因子（BDNF）である。BDNFは、例えば、BDNFをコードするmRNAのくも膜下腔内投与により、脊髄損傷後の神経機能回復を促進する。

[0039] 本発明の疾患または障害を処置する方法の別のある特定の態様では、疾患または障害は、タンパク質の低減または欠乏を原因とする疾患または障害であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、該疾患または障害において低減または欠乏しているタンパク質である。すなわち、この特定の態様は、タンパク質の補充療法である。本発明の疾患または障害を処置する方法の別のある特定の態様では、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、分泌性因子または分泌因子の産生を促進する促進因子であり、疾患または障害は、分泌因子の低減または欠乏を原因とする疾患または障害である。

[0040] 本発明のさらなる側面では、本発明の疾患または障害を処置する方法に用いるための医薬組成物が提供される。すなわち、本発明によれば、疾患に罹患した対象または障害を有する対象において該疾患または障害を処置することに用いるための医薬組成物であって、その疾患または障害を治療することができるタンパク質をコードするmRNAを含んでなり、組成物中に含まれ

る該mRNAの80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、さらにより好ましくは99%以上、最も好ましくは100%が、該mRNAのタンパク質コード領域の3'末端側に一定の長さ（例えば、230～250塩基）の実質的にポリA配列からなる配列を有する、医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物の特定の態様では、疾患または障害は、末梢神経損傷であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、インスリン様成長因子（IGF-1）である。本発明のある特定の態様では、末梢神経損傷は、坐骨神経損傷であり得る。本発明の医薬組成物の別の特定の態様では、疾患または障害は、脊髄損傷であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、脳由来神経栄養因子（BDNF）である。

[0041] 本発明の医薬組成物の別の態様では、タンパク質の低減または欠乏を原因とする疾患または障害を処置および／または予防するための医薬組成物であって、該タンパク質をコードするmRNAを含んでなり、組成物中に含まれる該mRNAの80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、さらにより好ましくは99%以上、最も好ましくは100%が、該mRNAのタンパク質コード領域の3'末端側に一定の長さ（例えば、230～250塩基）の実質的にポリA配列からなる配列を有する、医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、ある特定の態様では、タンパク質は分泌因子である。

[0042] 本発明のさらなる側面では、疾患に罹患した対象または障害を有する対象において該疾患または障害を処置することに用いるための医薬組成物の製造における、その疾患または障害を治療することができるタンパク質をコードし、かつ、タンパク質コード領域の3'末端側に一定の長さ（例えば、230～250塩基）の実質的にポリA配列からなる配列を有するmRNAの使用に関する。本発明のある特定の態様では、疾患に罹患した対象または障害を有する対象において該疾患または障害を処置することに用いるための医薬組成物の製造における、その疾患または障害を治療することができるタンパ

ク質をコードする mRNA を含んでなる組成物の使用であって、該組成物は、組成物中に含まれる該 mRNA の 80%以上、好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 97%以上、さらにより好ましくは 99%以上、最も好ましくは 100%が、該 mRNA のタンパク質コード領域の 3' 末端側に一定の長さ（例えば、230～250 塩基）の実質的にポリ A 配列からなる配列を有する、使用が提供される。本発明の使用の特定の態様では、疾患または障害は、末梢神経損傷であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、インスリン様成長因子（IGF-1）である。本発明のある特定の態様では、末梢神経損傷は、坐骨神経損傷であり得る。本発明の使用の別の特定の態様では、疾患または障害は、脊髄損傷であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、脳由来神経栄養因子（BDNF）である。本発明の使用の別の態様では、疾患または障害は、タンパク質の低減または欠乏を原因とする疾患または障害であり、疾患または障害を治療することができるタンパク質は、該疾患または障害において低減または欠乏しているタンパク質である。本発明の使用の特定の態様では、タンパク質は分泌性因子である。

[0043] 本発明の医薬組成物は、1 種類の mRNA を含むものであっても、複数種類の mRNA の混合物であってもよい。本発明の医薬組成物は、様々な長さのポリ A を有する mRNA の混合物であってもよい。本発明の医薬組成物は、mRNA 以外に緩衝液等の薬学的に許容可能な担体または賦形剤を含んでもよい。本発明の組成物は、mRNA 送達用のキャリアを含んでもよい。本発明の医薬組成物は、特に限定されないが、例えば、非経口投与により投与されうる。非経口投与としては、特に限定されないが、例えば、筋肉内投与、心室内投与、静脈内投与、腹腔内投与、脳室内投与、眼内投与、皮下投与、鼻腔内投与、腔内投与およびくも膜下腔内投与が挙げられ、これにより本発明で医薬組成物を投与することができる。本発明の医薬組成物は、ある態様では、注射剤として提供される。本発明の医薬組成物は、その疾患や障害に応じて適切な投与形態により、全身投与または局所投与すること

ができる。

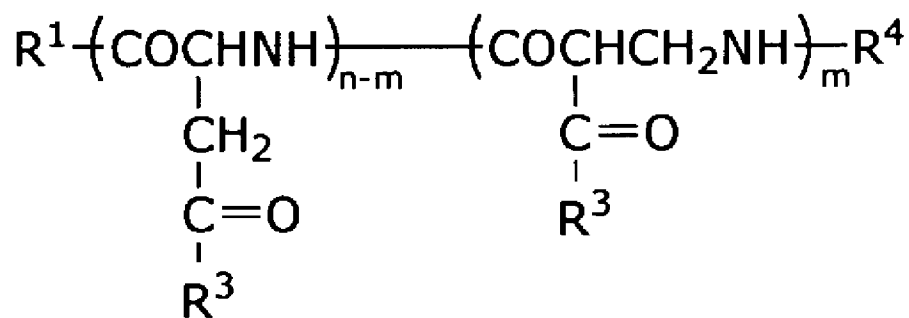
[0044] 本明細書で用いられる「治療」とは、疾患または障害を治癒、予防若しくは寛解、または、疾患または障害の進行速度の低下をもたらすことを意味する。治療は、治療上有効な量の医薬組成物を投与することにより達成され得る。

[0045] 本明細書で用いられる「対象」とは、好ましくはヒト対象またはヒト患者である。

[0046] 本発明の組成物または医薬組成物は、ある態様では、組成物中で、mRNAがPEG-Asp(DET)とポリオンコンプレックスを形成している。ここで、PEG-Asp(DET)とは、ポリエチレングリコールブロックとポリアスパラギン酸誘導体ブロックとの共重合体をいう。本発明で用いられるPEG-Asp(DET)において、PEGは、平均重合度5～20000、好ましくは10～5000、より好ましくは40～500であるが、ブロックコポリマーとmRNAとのポリオンコンプレックス形成が阻害されない限り、PEG含有量の重合度は限定されない。本発明で用いられるPEG-Asp(DET)において、ある態様では、アスパラギン酸誘導体は、側鎖のカルボキシル基がジエチルトリアミン(DET)基(—NH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—NH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—NH<sub>2</sub>)で置換されたアスパラギン酸である。ポリAsp(DET)の構造は以下の化学式で示される。

[0047] ポリAsp(DET)

[化1]



(I)

{式中、

$R^1$ は、水酸基、保護基、疎水性基、または重合性基であり、

$R^4$ は、H、保護基、疎水性基、または重合性基であり、

$R^3$ は、 $-(NH-(CH_2)_2)_2-NH_2$ で表される基であり、

$n$ は、0～5000のいずれかの整数であり、例えば、0～500のいずれかの整数であり、

$m$ は、0～5000のいずれかの整数であり、例えば、0～500のいずれかの整数であり、

$m+n$ は、2～5000のいずれかの整数であり、例えば、2～500のいずれかの整数であり、

$n-m$ は、0以上の整数であり、

式中の各繰り返し単位は記載の都合上特定の順で示しているが、各繰り返し単位は順不同に存在することができ、各繰り返し単位はランダムに存在してもよく、また、各繰り返し単位は同一であっても異なっていてもよく、

但し、ポリカチオンブロックが、ポリエチレングリコールと共重合体を形成している場合には、 $R^1$ または $R^4$ が結合を表し、ポリエチレングリコールは、該結合を介してポリカチオンブロックと共重合体を形成している。} なお、上記一般式(1)のポリマーでは、各繰り返し単位がペプチド結合により結合している。

## 実施例

### [0048] 実施例1：タンパク質発現プラスミドの構築

本実施例では、異なる長さのポリA配列をmRNAのタンパク質コード領域の下流に有するプラスミドを構築した。

[0049] ルシフェラーゼ遺伝子としては、GLuc遺伝子(動物種*Gaussia princeps*由来)とNLuc遺伝子(動物種*Oplophorus gracilirostris*由来)を用い、それぞれpCMV-GLuc Control Plasmid (New England Biolabs社、カタログ番号 N8081S) およびpNL1.1[NLuc] Vector (Primega社、カタログ番号N1001) から制限酵素HindIIIとXbaIにより切り出した。各ルシフェラーゼ遺伝子は、pSP73ベクタ

ー (Promega社、カタログ番号P2221) が持つT7プロモーターの制御下のマルチクローニングサイト中のHindIIIとXbaIの切断サイトにクローニングした。得られたプラスミドをpSP73-Lucプラスミドと呼ぶ。

[0050] その後、ルシフェラーゼ遺伝子の下流にインフレームでポリA配列 (120、180、210、240、270または360塩基長) を組み込んだ。ポリA鎖配列の作製には、オリゴDNAを使用した。具体的には以下の通りである。

[0051] 1-1. 120塩基鎖長のポリAを有するプラスミドの作製

5' -AATTC-A<sub>121</sub>-GAGACGA-3' と5' -GATCTCGTCTC-T<sub>121</sub>-G-3' の2つのオリゴDNAをアニールし、2本鎖DNAを作製した後、制限酵素EcoRIとBglIIを用いて直鎖状化したpSP73-Lucプラスミドに挿入し、120塩基鎖長のポリA (A (120)) を有するプラスミドを作製した。上記配列中、A<sub>n</sub>は、アデニンがn塩基長にわたり存在していることを示し、例えば、A<sub>121</sub>は、アデニンが121塩基長にわたり連続することを意味する。

[0052] 1-2. 180、210または240塩基鎖長のポリAを有するプラスミドの作製

5' -AATTC-A<sub>120</sub>-GATATCA-3' と5' -GATCTGATATC-T<sub>120</sub>-G-3' の2つのオリゴDNAから作製した2本鎖DNAを、制限酵素EcoRIとBglIIで直鎖状化したpSP73-Lucプラスミドに挿入し、120塩基長のポリAを有し、かつ制限酵素EcoRV認識配列を含むpSP73-GLuc-A(120)-EcoRVプラスミドを作製し、次いで得られたプラスミドを制限酵素EcoRVとBglIIで直鎖状化した。その後、得られたプラスミドの制限酵素部位に、さらに5' -G-A<sub>x</sub>-GAGACGA-3' と5' -GATCTCGTCTC-T<sub>x</sub>-C-3' (ここでxは、61、91または121である) の2つのオリゴDNAから作製した2本鎖DNAをそれぞれ挿入し、各180、210または240塩基鎖長のポリAを有するプラスミドを作製した。

[0053] 1-3. 270または360塩基鎖長のポリAを有するプラスミドの作製

5' -G-A<sub>120</sub>-GATATCA-3' と5' -GATCTGATATC-T<sub>120</sub>-C-3' の2つのオリゴDNAから作製した2本鎖DNAを、制限酵素EcoRVとBglIIで直鎖状化したpSP73-Luc

-A(120)-EcoRVプラスミドに挿入し、pSP73-GLuc-A(240)-EcoRVプラスミドを作製した。作製したプラスミドを制限酵素EcoRVとBglIIで直鎖状化した。その後、得られたプラスミドの制限酵素部位に、5' -G-A<sub>x</sub>-GAGACGA-3' と5' -GATCTCGTCTC-T<sub>x</sub>-C-3' (ここでxは、31または121である) の2つのオリゴDNAから作製した2本鎖DNAをそれぞれ挿入し、270および360塩基鎖長のポリAを有するプラスミドを作製した。

[0054] 以下、得られたプラスミドを「pSP73-Luc-A (ポリAの塩基長)」と表記する。例えば、ポリA配列が120塩基長のものは、pSP73-Luc-A (120) と表記される。

[0055] このタンパク質発現プラスミドを常法により大腸菌内で複製し、その後精製して以降の実施例で用いた。

[0056] 実施例2：mRNAのタンパク質結合能

本実施例では、mRNAのタンパク質への結合能を確認した。

[0057] 120、180または210塩基鎖長のポリAを有するプラスミドは、typeIIS型制限酵素BsmBIにより直鎖状のDNAにし、アガロース電気泳動により精製を行った。また、240、270または360塩基鎖長のプラスミドは、2種類の制限酵素BsmBIとHpaIにより直鎖状のDNAにし、アガロース電気泳動により精製を行った。精製された直鎖状DNAは、T7プロモーター制御下にルシフェラーゼ遺伝子を有する。得られた直鎖状DNAとmMESSAGE mMAC HINE T7Ultra Kit (Ambion社) を用いて、製造者マニュアルに従ってインビトロトランスクリプションによりmRNAを作製した。得られたmRNAは、RNeasy Mini Kit (Qiagen社) により精製した。精製されたmRNAのアガロース電気泳動の結果は図1に示される通りであった。図1には、A (120)、A (240) およびA (360) を有するmRNAの電気泳動の結果を示す。

[0058] 核内タンパク質と結合したmRNAは、以下のように得た。すなわち、Hu h7細胞は、96ウェルプレートに5,000個/ウェルで播種し24時間培養した。培地としては10% FBS含有DMEMを用いた。実施例1で

精製した様々な長さのポリ A を有する GLuc mRNA 190 ng を遺伝子導入試薬 LipofectamineLTX (Life technologies社) を用いて Huh7 細胞に導入した。導入 24 時間後に、Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit (Life technologies社) を使用し細胞溶解サンプルを得た。

[0059] mRNA とタンパク質との結合は、免疫沈降法により確認した。すなわち、PABP または eIF4E に対する抗体を用いてこれらのタンパク質と結合して複合体を形成した mRNA を沈降させて沈降した mRNA の量をタンパク質との結合の指標とした。具体的には、抗体は、抗 PABP 抗体 (Abcam 社, カタログ番号 ab21060) および抗 eIF4E 抗体 (Santacruz 社, カタログ番号 sc-13963) を使用した。免疫沈降反応は、Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit (Life technologies社) を用いて、4℃ で 30 分間インキュベートすることにより、抗体とタンパク質を結合させた。その後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて全 RNA を回収し、RevertraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO 社) により全 RNA に含まれる mRNA から cDNA を作製した。

[0060] タンパク質に結合して沈降した GLuc mRNA 量は、ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて、定量ポリメラーゼ連鎖反応 (定量 PCR) により定量を行った。プライマーは、フォワードプライマー : 5' -T TGAACCCAGGAATCTCAGG-3' とリバースプライマー : 5' -CACGCCCAAGATGAAGAAGT -3' を用いた。そして、ポリ A 長 120 の場合の mRNA 量を 1 として定量結果を標準化した。その結果は図 2 に示される通りであった。

[0061] 図 2 A により mRNA の PABP への結合結果を説明する。図 2 A に示されるように、A (240) (すなわち、ポリ A 長が 240 塩基) を有する mRNA は、A (120) (すなわち、ポリ A 長が 120 塩基) を有する mRNA よりも顕著に PABP に結合した。また、A (360) を有する mRNA は、A (240) を有する mRNA よりも多くの PABP と結合した。このことから、長いポリ A 長を有する mRNA は、PABP と有利に結合できることが確認できた。

[0062] 次に、図2BによりmRNAのeIF4Eへの結合結果を説明する。図2Bに示されるように、A(240)を有するmRNAは、A(120)またはA(360)を有するmRNAよりも顕著に多くのeIF4Eに結合することが示された。特定の長さのポリAがeIF4Eとの結合に適していることが明らかとなり、長すぎるポリAは、eIF4Eとの結合を阻害する可能性が示唆された。

[0063] PABPは、mRNAのポリAに結合することが知られ、長いポリAを有するmRNAに有利に結合するとの結果は、予想された結果であった。eIF4Eも、PABPを介してmRNAのポリAに結合すると考えられていたため、同様に、長いポリAを有するmRNAに有利に結合すると予想された。しかしながら、上記の結果によれば、eIF4Eは特定の長さのポリAを有するmRNA(具体的にはA(240)を有するmRNA)に強く結合する一方で、A(120)またはA(360)を有するmRNAよりも顕著に強く結合することが示された。すなわち、A(360)を有するmRNAでは、PABPとの結合が強いに関わらず、eIF4Eとの結合は意外にも弱まった。

[0064] 実施例3：インビトロでのmRNAからのタンパク質の翻訳効率

本実施例では、得られたmRNAからのタンパク質の翻訳効率を調べた。

[0065] Huh7細胞は96ウェルプレートに5,000個/ウェルで播種し24時間培養した。培地は10%FBS含有DMEMを用いた。実施例1で精製した様々な長さのポリAを有するGLuc mRNA 190ngを遺伝子導入試薬LipofectamineLTX(Life technologies社)を用いてHuh7細胞に導入した。また、対照として、ポリA付加シグナルを用いて酵素的にポリAを付加したmRNAを調製した。実施例1で得られたpSP73-Lucプラスミドを制限酵素NdeIを用いて切断した。直鎖状になったプラスミドとmMESSAGE mMACHINE T7Ultra Kit(Ambion社)を用いて、製造者マニュアルに従ってインビトロトランスレーションを行ない、mRNAを得た。続いて、同製造者マニュアルに従い、得られたmRNAにポリAを付加した(反応条件：37℃45分)。得られた

mRNAをRNeasy Mini Kit (Qiagen社) により精製し、上記の通りHu h 7細胞に導入した。

[0066] 定量は、ルシフェラーゼからの発光量に基づいて行なった。具体的には、Renilla Luciferase assay System (Promega社) を用いてGloMax™ 96 microplate luminometer (Promega社) により各mRNAからのルシフェラーゼ発光量を計測した。発光量を相対ルシフェラーゼ単位 (RLU) として求めた。その結果は、図3に示される通りであった。

[0067] 図3に示されるように、A (120)、A (180) またはA (210) を有するmRNAはほぼ同程度のタンパク質発現を示した。しかし、A (240) を有するmRNAは、これらと比較して顕著に高いレベルのタンパク質発現を示した。この発現量の増大は統計的に有意であった。一方で、A (270) またはA (360) を有するmRNAは、タンパク質の発現は、A (240) を有するmRNAと比較して統計的に有意に低かった。この結果から、ポリA長が240であるときには、ポリA長が210または270である場合と比較して顕著なタンパク質発現の増強を示すことが明らかとなった。そして、A (27) を有するmRNAで翻訳効率が顕著に低下したことは、270塩基以上のポリAが翻訳を阻害する活性を備えたことを示唆する。

[0068] A (90) を有するmRNAは、A (120) を有するmRNAと同等レベルのタンパク質発現を示した (データ非掲載)。また、ポリAの代わりにポリA付加シグナル (AATAA) を有するタンパク質発現プラスミドを用いてルシフェラーゼを発現させる (前記対照) と、A (360) を有するmRNAと同程度のRLUしか示さなかった。すなわち、A (240) を有するmRNAからの目的タンパク質の発現量は、天然のmRNAと類似する酵素的にポリAを付加したmRNAからの発現量を遙かに超えた。

[0069] なお、A (180)、A (210)、A (240)、A (270) およびA (360) は、ポリAとポリAの間に制限酵素部位由来の介在配列 (GAUG配列) を含むものである。GAUGのタンパク質発現に対する影響を確

認するために、A (120) と A (60) - GAUG - A (60) を上記と同様に作製して、発現量を比較したところ、A (60) - GAUG - A (60) は、A (120) の80%ほどの発現量を示し、介在配列の影響は限定的であることが明らかとなった（データ非掲載）。

[0070] 無細胞翻訳系（ウサギ網状赤血球溶解液およびヒト無細胞抽出液）でも同様の結果を確認した。具体的には、ウサギ網状赤血球溶解液としてRabbit Reticulocyte Lysate, Untreated (Promega社) を用いて、またはヒト無細胞抽出液としてHuman Cell-Free Protein Expression System (タカラバイオ社) を用いて、各ポリA長を有するGLuc mRNAをそれぞれ30℃で120分間、または32℃で30分間インキュベートした。発現量は、ルシフェラーゼからの発光量に基づいて定量した。Renilla Luciferase assay System (Promega社) を用いてGloMax™ 96 microplate luminometer (Promega社) により各mRNAからのルシフェラーゼ発光量を計測した。

[0071] 結果は図4にされる通りであった。図4AおよびBに示されるように、A (240) を有するmRNAは、A (120) またはA (360) を有するmRNAよりも顕著に高いタンパク質発現を示した。従って、無細胞抽出系を用いても、240塩基長のポリAを有するmRNAの発現量が他の長さのポリAを有する場合に比べて顕著に高いことが確認された。

[0072] 実施例4：インビボでのmRNAからのタンパク質の翻訳効率

本実施例では、マウス骨格筋でのルシフェラーゼタンパク質の発現効率を調べた。

[0073] 実施例1で得られたA (120)、A (240) またはA (360) を有するNLuc mRNAを用いた。投与には、mRNAを内包するナノミセル型キャリア (PLoS One 8(2): e56220, 2013参照) に内包して投与した。具体的には、ナノミセルを構成するブロック共重合体として、PEGブロック部分の数平均分子量が12,000で、かつ、Asp(DET)ブロック部分の数平均重合度が65のPEG-PAsp(DET)を用いた。PEG-PAsp(DET)は、ポリエチレングリコールブロックとポリアスパラギン酸誘導体ブロックとの共重合体であり、アスパラギン

ン酸誘導体は、カルボキシル基がジエチルトリアミン基 ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ) で置換されたアスパラギン酸である。PEG-PAsp(DET)とmRNAを10 mMのHEPESバッファーにそれぞれ溶かし、両者を混合させることでナノミセル溶液を調製した。PEG-PAsp(DET)のアミノ基(N)とmRNAのリン酸基(P)のモル比をN/P比とし、N/P比が8のナノミセル溶液を調製した。

[0074] ミセルは、マウスの下肢骨格筋にハイドロダイナミクス法により投与した。具体的には、マウスを3%のイソフルラン（アボットジャパン社）にて麻酔した後、大腿近位部に駆血帯を留置し、下肢の血行を一時的に遮断した。そして5  $\mu\text{g}$ のmRNAを含む300  $\mu\text{L}$ のナノミセル溶液を足関節内顆後方の大伏在静脈より5秒間かけて投与し、その5分後に駆血帯を外した。

[0075] 次に、投与72時間後に骨格筋で発現したルシフェラーゼタンパク質の量を定量した。具体的には、投与72時間後の下肢骨格筋を採取し、マルチビーズショッカー（安井器械）を用いて組織をホモジェナイズした。ルシフェラーゼタンパク質の定量は、ルシフェラーゼの発光量に基づき行なった。発光量の定量は、Nano-Glo Luciferase assay system（Promega社）とLumat LB 9507 luminometer（Berthold社）を用いて行い、細胞溶解液中のタンパク質濃度で発光量を標準化して求めた。

[0076] その結果、図4に示されるように、A(240)を有するmRNAは、A(120)またはA(360)を有するmRNAと比較して顕著に高いレベルでのタンパク質発現を示した。

[0077] これらのことから、mRNAの翻訳効率を高めるためには、ポリAの長さは240塩基長付近とすることがよいことが明らかとなった。

#### [0078] 実施例5：坐骨神経損傷モデルマウスの治療

本実施例では、坐骨神経損傷モデルマウスに、異なる長さのポリAを有するIGF-1発現mRNAを投与して治療効果を確認した。

[0079] マウス（Balb/c アルビノマウス、雌、10～14週齢、Charles River Laboratoriesから購入）の左足の坐骨神経を大転子付近で露出させて、液体窒素で冷却したピンセットで露出させた坐骨神経を圧迫して坐骨神経損傷モデ

ルマウスを作製した。

[0080] IGF-1発現mRNAの3' UTR領域に120塩基長または240塩基長のポリAを付加してPEG-ポリ(N'-[N-(2-アミノエチル)-2-アミノエチル]-アスパラギン酸)ブロック共重合体(PEG-PAsp(DET))と混合して、ポリイオンコンプレックス型ミセルを形成させた。

[0081] PEG-PAsp(DET)は、常法に従って調製した(ChemMedChem 1(2006) 439-444参照)。<sup>1</sup>H-NMR測定により、PEG部分の数平均分子量は12,000、PAsp(DET)部分の重合度は69と見積もられた。得られたPEG-PAsp(DET)ブロック共重合とmRNAとをそれぞれ10mM Tris-HCl(pH7.4)に溶解させて、得られた溶液を混合することにより、投与用のポリイオンコンプレックス型ミセルを形成させた。

[0082] ミセルをマウスの大腿付近で駆血した上で、得られたミセルを上記疾患モデルの足の静脈投与し、筋組織にミセルを浸透させた。治療効果を確認するため、投与後7日目から28日目にかけてマウスの運動機能を評価した。陰性対照として、IGF-1の代わりにルシフェラーゼmRNAを投与した坐骨神経損傷モデルマウスの運動機能を評価した。

[0083] 運動機能の評価は、図6Aのようにマウスを自由歩行させて足跡を取得し、運動機能回復の評価指標として知られるSciatic Functional Index(SFI)を指標として行った(SFIについては、Inserra MM et.al, Microsurgery, 1998;18(2):119-124を参照)。SFIは、下記式：

[数1]

$$SFI = -51.2 \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 118.9 \left( \frac{EPW - NPW}{NPW} \right) - 7.5$$

{式中、EPLは、疾患モデル側の足における足跡の進行方向の長さ、NPLは、健常脚における足跡の進行方向の長さ、EPWは、疾患モデル側の足の足跡の幅、NPWは、健常足の足跡の幅を示す。}に基づいて算出した。

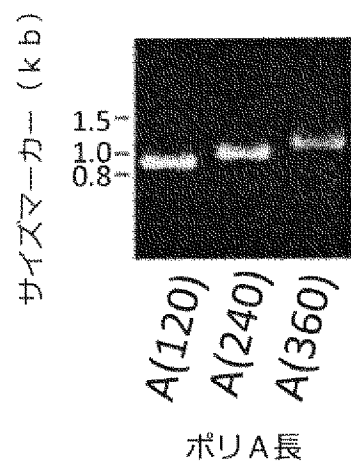
- [0084] 足跡の取得は、歩行解析装置キャットウォーク（NoIdus社製）を用いた。EPL、NPL、EPW、NPWについては、上記式にて説明したとおりであるが、図6Bにも図示されている。なお、理想的には、足が100%麻痺している場合、SFIは-100を示し、正常な場合には0を示し、SFI値の上昇は足の運動機能の回復を示す。
- [0085] 坐骨神経損傷モデルマウスの疾患モデル側の足にIGF-1発現mRNAを投与した後、7日目、10日目、12日目、14日目、21日目および28日目でマウスの歩行回復をSFI値を指標として調べた。結果は図6Cに示される通りであった。
- [0086] 図6Cに示されるように、陰性対照であっても時間経過と共に運動能は回復したが、ポリA長が240である場合（IGF-1 240A）に、顕著な運動能回復が観察された。また、ポリA長が240である場合（IGF-1 240A）に、ポリA長が120である場合（IGF-1 120A）よりも高い運動能回復が観察された。
- [0087] このようにmRNAにおいてポリAの長さを一定長（特に、240塩基長）にそろえると、mRNAからのタンパク質の発現量は顕著に増大し、その効果は生体内においても確認された。

## 請求の範囲

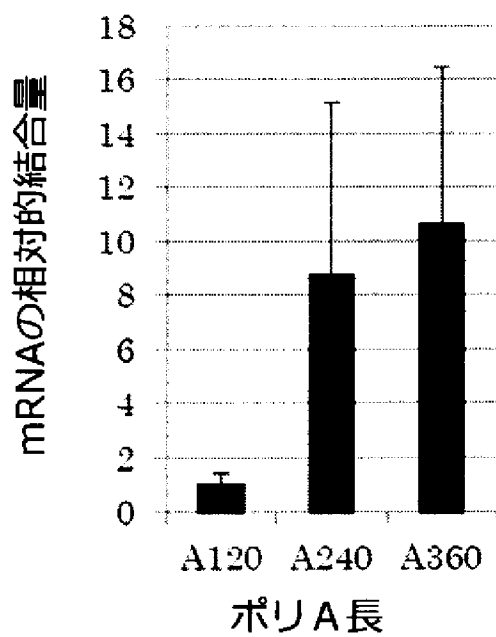
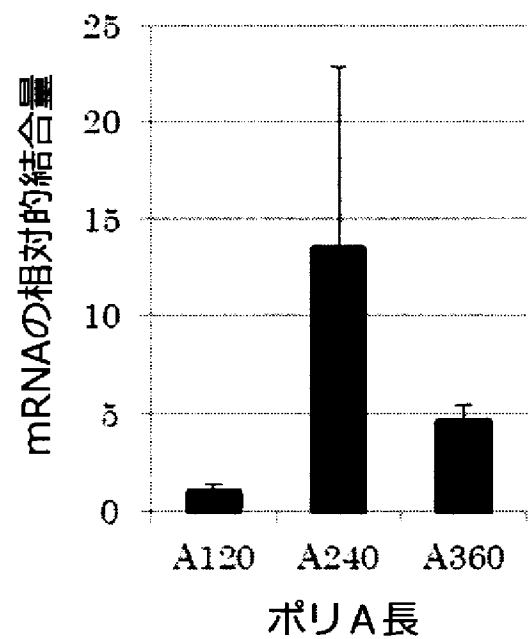
- [請求項1] 目的タンパク質を発現させることに用いるための組成物であって、  
組成物は、目的タンパク質をコードするmRNAを含んでなり、  
組成物中に含まれる該mRNAの80%以上が、そのタンパク質コード領域の3'末端側に230～250塩基長の実質的にポリAからなる配列を有する、  
組成物。
- [請求項2] 組成物中に含まれる該mRNAの90%以上が、そのタンパク質コード領域の3'末端側に230～250塩基長の実質的にポリAからなる配列を有する、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 組成物中に含まれる該mRNAの95%以上が、そのタンパク質コード領域の3'末端側に230～250塩基長の実質的にポリAからなる配列を有する、請求項1に記載の組成物。
- [請求項4] 組成物中に含まれる該mRNAの20%以下が、270塩基長以上のポリAを有するmRNAである、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項5] タンパク質発現ベクターであって、  
プロモーターと作動可能に連結したタンパク質をコードする遺伝子と、  
タンパク質をコードする遺伝子のタンパク質コード領域の下流に230～250塩基長の実質的にポリAからなる配列と  
を含んでなる、タンパク質発現ベクター。
- [請求項6] mRNAのeIF4Eへの結合能を向上させる方法であって、  
mRNAがそのタンパク質コード領域の3'末端側に230～250塩基長の実質的にポリAからなる配列を有するように、mRNAが転写されるDNAのタンパク質コード領域の下流にポリAまたは実質的にポリAからなる配列を付加すること  
を含んでなる、方法。

- [請求項7]            標的タンパク質を対象の体内細胞で発現させる方法であって、  
                      標的タンパク質をコードするmRNAを含んでなる組成物であって、  
                      組成物中に含まれる該mRNAの80%以上が、該mRNAのタン  
                      パク質コード領域の3'末端側に230～250塩基長の実質的にポリ  
                      A配列からなる配列を有する、組成物を提供することと、  
                      組成物を対象に投与することと  
                      を含んでなる、方法。
- [請求項8]            疾患に罹患した対象または障害を有する対象において該疾患または  
                      障害を処置することに用いるための医薬組成物であって、その疾患ま  
                      たは障害を治療することができるタンパク質をコードするmRNAを  
                      含んでなり、組成物中に含まれる該mRNAの80%以上が、該mR  
                      NAのタンパク質コード領域の3'末端側に230～250塩基長の実質的にポリA配列からなる配列を有する、医薬組成物。
- [請求項9]            疾患または障害が、タンパク質の低減または欠乏を原因とする疾患  
                      または障害であり、その疾患または障害を治療することができるタン  
                      パク質が、対象において低減または欠乏しているタンパク質である、  
                      請求項8に記載の組成物。
- [請求項10]           疾患または障害が、脊髄損傷であり、疾患または障害を治療するこ  
                      とができるタンパク質は、脳由来神経栄養因子（BDNF）である、  
                      請求項8に記載の組成物。
- [請求項11]           疾患または障害が、末梢神経損傷であり、疾患または障害を治療す  
                      ることができるタンパク質が、インスリン様成長因子（IGF-1）  
                      である、請求項8に記載の組成物。

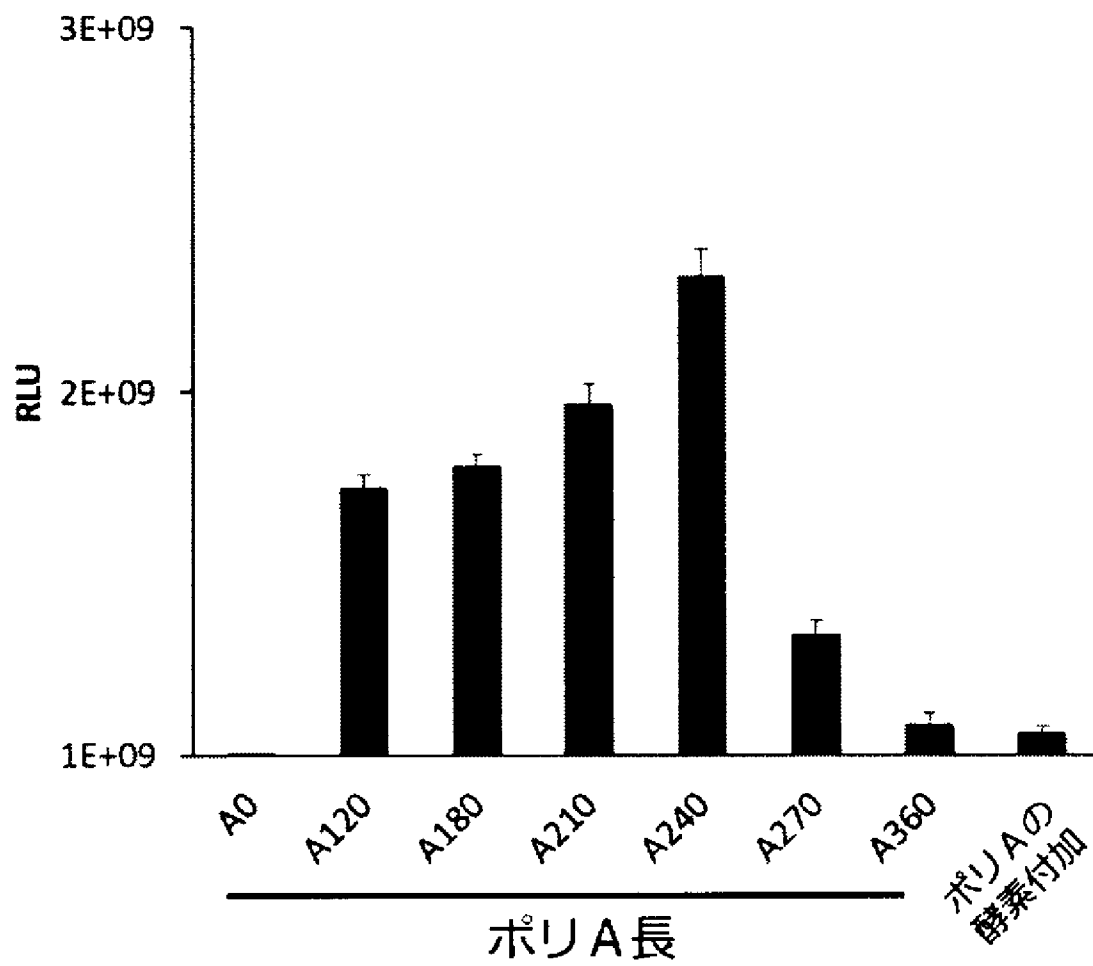
[図1]



[図2]

**A** mRNAのPABPとの結合**B** mRNAのeIF4Eとの結合

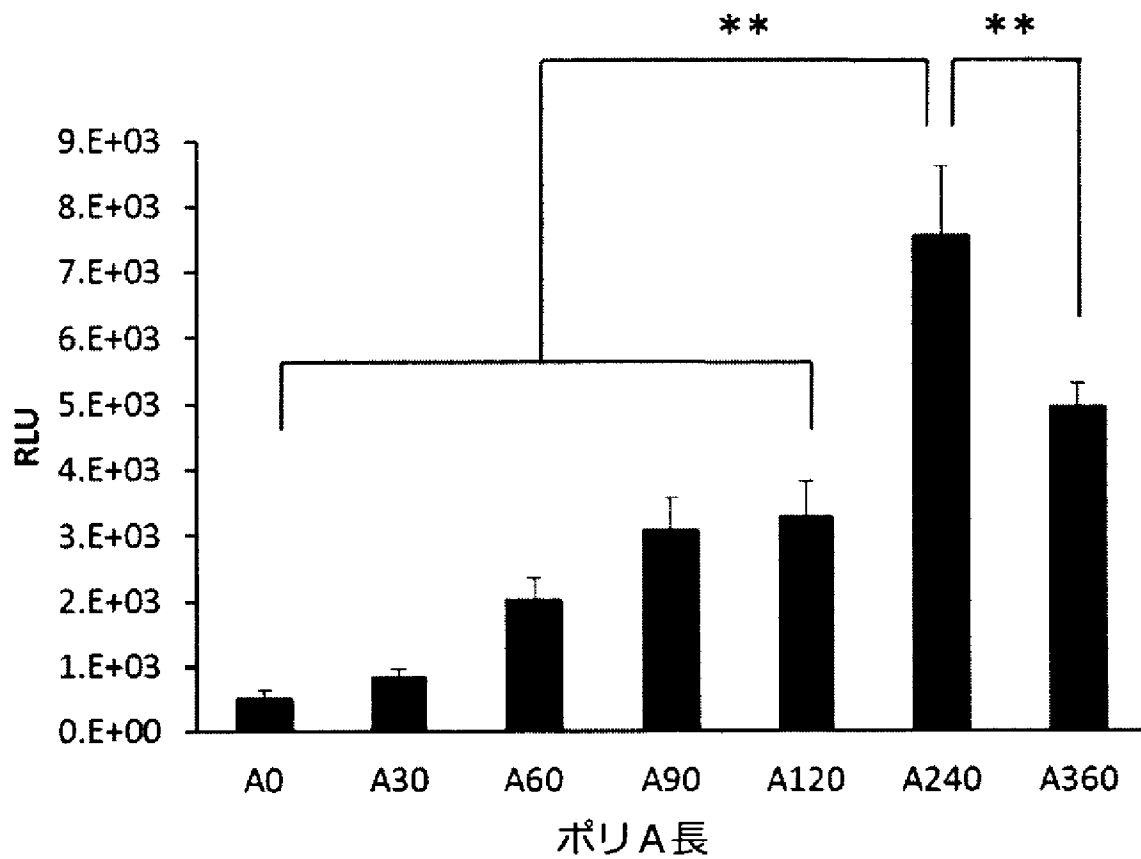
[図3]



[図4]

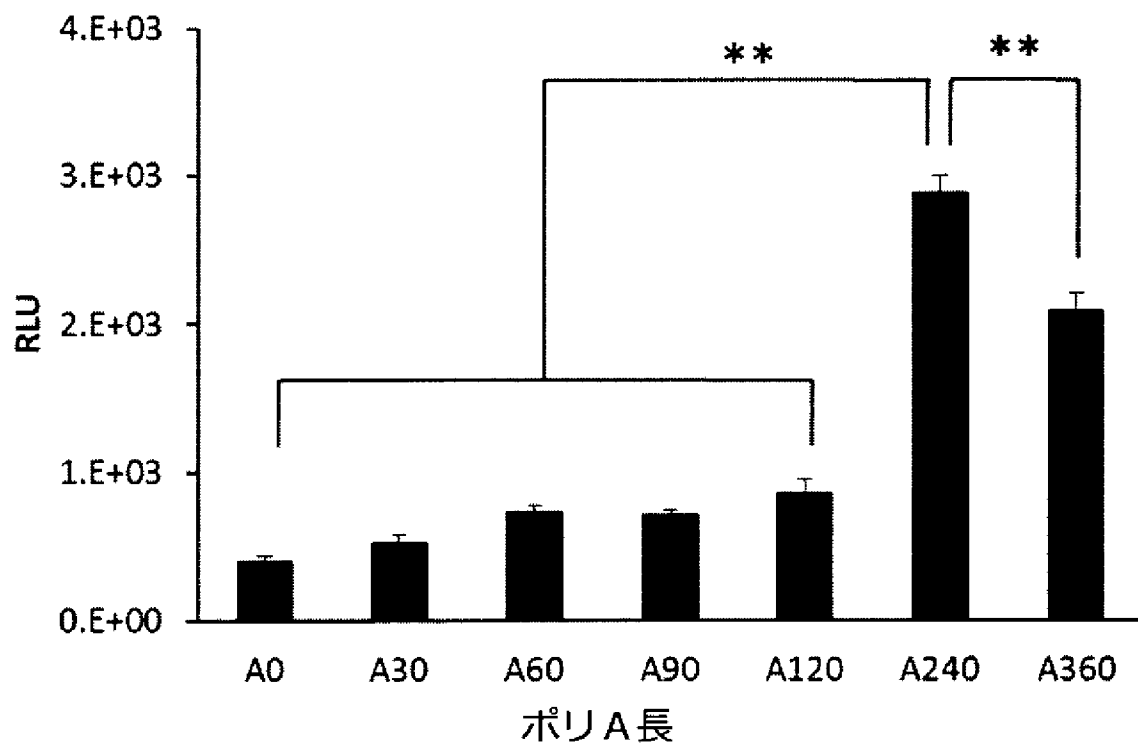
A

ヒト細胞抽出液

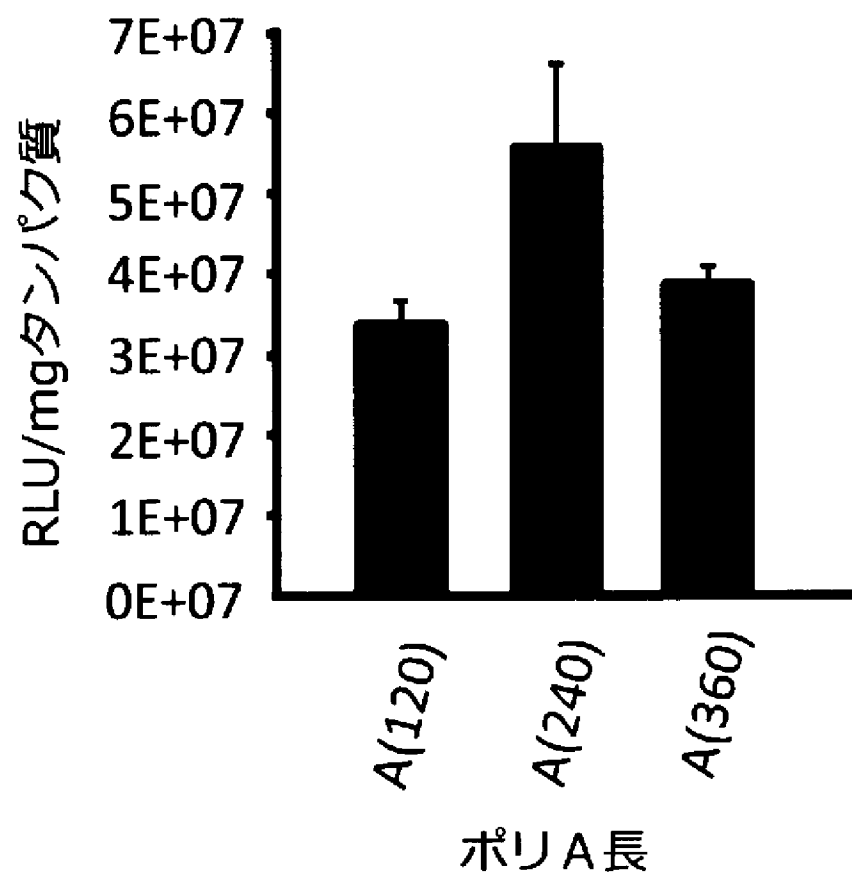


B

ウサギ網状赤血球溶解液



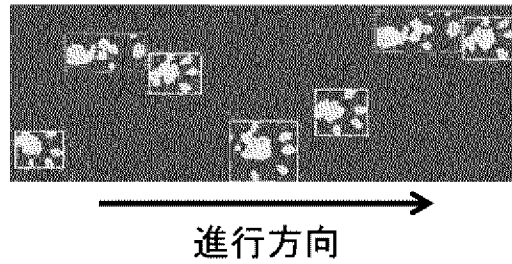
[図5]



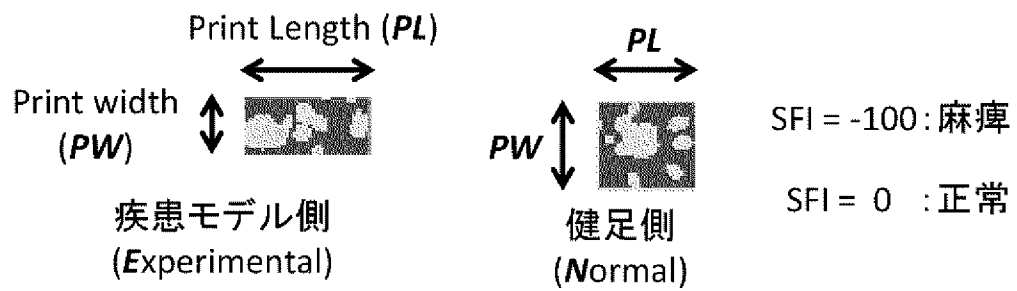
[図6]

A

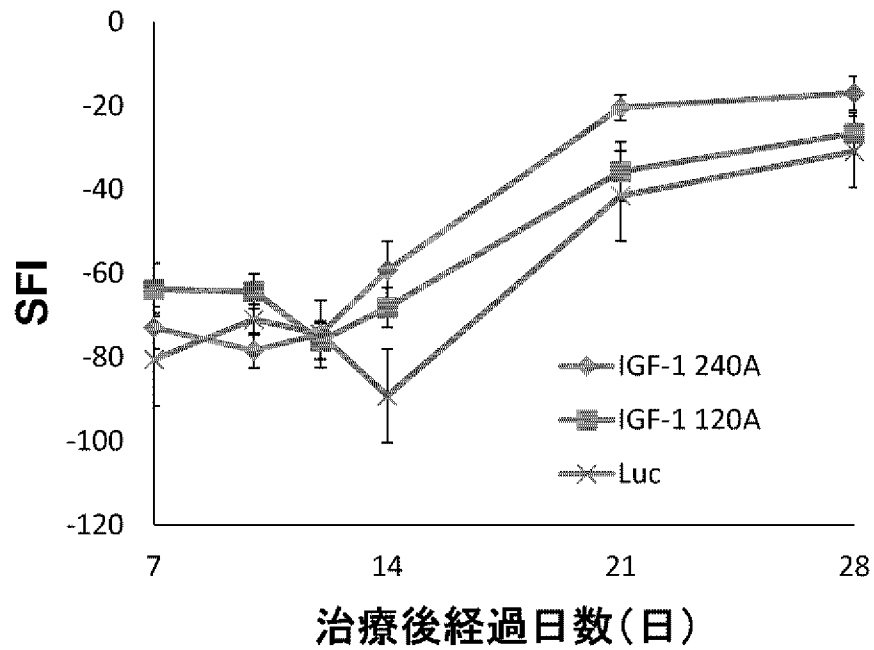
自由歩行したマウスの足跡を取得



B



C



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002208

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,  
A61P25/00(2006.01)i, A61P25/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K31/7105, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/02, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2015 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2015 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2015 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2002-508299 A (Sequitur, Inc.),<br>19 March 2002 (19.03.2002),<br>& US 2003/0083272 A1 & WO 1999/014346 A2<br>& EP 1021549 A       | 1-6, 8-11             |
| A         | JP 2010-508014 A (CureVac GmbH),<br>18 March 2010 (18.03.2010),<br>& US 2010/0047261 A1 & WO 2008/052770 A2<br>& EP 2083851 A         | 1-6, 8-11             |
| A         | JP 2006-517802 A (Biogen Idec MA Inc.),<br>03 August 2006 (03.08.2006),<br>& US 2006/0141625 A1 & WO 2004/074439 A2<br>& EP 1594955 A | 1-6, 8-11             |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 July 2015 (23.07.15)

Date of mailing of the international search report  
04 August 2015 (04.08.15)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/002208

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | BECKEL-MITCHENER A. C. et al., Poly(A) Tail Length-dependent Stabilization of GAP-43 mRNA by theRNA-binding Protein HuD, J. Biol. Chem., 2002, vol.277, no.31, p.27996-8002                      | 1-6, 8-11             |
| A         | BEILHARZ T. H. et al., Widespread use of poly(A) tail length control to accentuate expression of the yeast transcriptome, RNA, 2007, vol.13, p.982-97                                            | 1-6, 8-11             |
| A         | HOLTKAMP S. et al., Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells, Blood, 2006, vol.108, no.13, p.4009-17 | 1-6, 8-11             |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/002208

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The claim involves a method for therapy of a human being.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A61K31/7105, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/02, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 日本国実用新案公報   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 5 年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                      | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| A               | JP 2002-508299 A (セクイター, インク.) 2002.03.19,<br>& US 2003/0083272 A1 & WO 1999/014346 A2 & EP 1021549 A                  | 1-6, 8-11      |
| A               | JP 2010-508014 A (キュアバック ゲーエムペーハー) 2010.03.18,<br>& US 2010/0047261 A1 & WO 2008/052770 A2 & EP 2083851 A              | 1-6, 8-11      |
| A               | JP 2006-517802 A (バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド) 2006.08.03,<br>& US 2006/0141625 A1 & WO 2004/074439 A2 & EP 1594955 A | 1-6, 8-11      |

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 3 . 0 7 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 4 . 0 8 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)  
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松田 芳子

4 B

3 1 2 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                  |                |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                | 関連する<br>請求項の番号 |
| A                     | BECKEL-MITCHENER A. C. et al., Poly(A) Tail Length-dependent Stabilization of GAP-43 mRNA by the RNA-binding Protein HuD, J. Biol. Chem., 2002, vol.277, no.31, p.27996-8002                     | 1-6, 8-11      |
| A                     | BEILHARZ T. H. et al., Widespread use of poly(A) tail length control to accentuate expression of the yeast transcriptome, RNA, 2007, vol.13, p.982-97                                            | 1-6, 8-11      |
| A                     | HOLTKAMP S. et al., Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells, Blood, 2006, vol.108, no.13, p.4009-17 | 1-6, 8-11      |

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
人の治療方法を含むものである。
2. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。