

(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
2010 年 12 月 2 日(02.12.2010)

(10) 国際公開番号
WO 2010/137570 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7105 (2006.01) A61K 47/28 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 47/08 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/14 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/20 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)

Tokyo (JP). 斎藤 英胤(SAITOU, Hidetsugu) [JP/JP];
〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應
義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 中村 光康
(NAKAMURA, Mitsuyasu) [JP/JP]; 〒1020083 東京
都千代田区麹町2-12-1-608 Tokyo
(JP). 松田 祐子(MATSUDA, Sachiko) [JP/JP]; 〒
1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義
塾大学医学部内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/058777

(22) 国際出願日: 2010 年 5 月 25 日(25.05.2010)

(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 2009-130403 2009 年 5 月 29 日(29.05.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学
校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒
1088345 東京都港区三田二丁目15番45号
Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 上田 政和
(UEDA, Masakazu) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿
区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(Sae-
gusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区
道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (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, 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, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, 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.

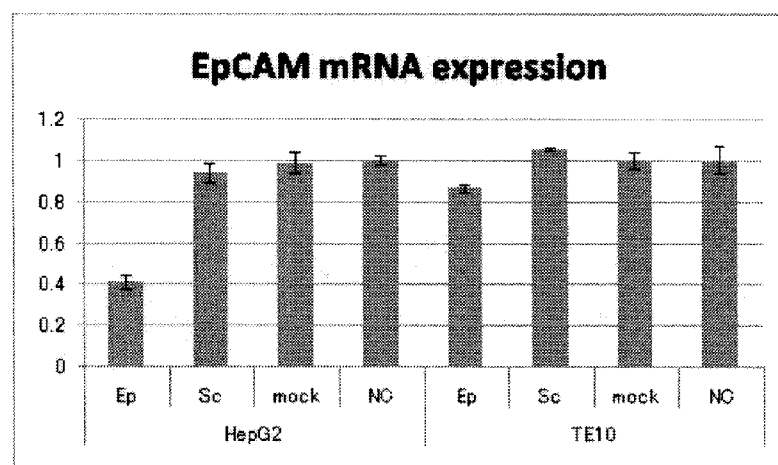
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア

[続葉有]

(54) Title: ANTI-VIRAL AGENT OR AN ANTI-CANCER AGENT

(54) 発明の名称: 抗ウイルス剤または抗癌剤

[図1]



(57) Abstract: Disclosed are: an anti-viral agent or an anti-cancer agent; and a process for producing the anti-viral agent or the anti-cancer agent. The anti-viral agent or the anti-cancer agent comprises: a fusion product of HBs antigen particles and a liposome; and a small nucleic acid molecule which can mediate RNA interference (RNAi) that enables the cleavage of mRNA for a viral nucleic acid or a target cancer gene and which is encapsulated in the fusion product.

(57) 要約: 抗ウイルス剤または抗癌剤、及びその製造方法を提供する。 ウイルス核酸または癌標的遺伝子のmRNAを切断可能なRNA干渉(RNAi)を媒介し得る小核酸分子をHBs抗原粒子とリボソームの融合体に内包してなる抗ウイルス剤または抗癌剤。



(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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))

明 細 書

発明の名称：抗ウイルス剤または抗癌剤

技術分野

[0001] 本発明は、抗ウイルス剤または抗癌剤、あるいはそれらの製造方法に関する。

背景技術

[0002] RNAi (RNA interference: RNA干渉) は、標的遺伝子と相同な二本鎖RNA (dsRNA) を細胞内に導入すると、標的遺伝子の転写産物であるmRNAの相同部分が特異的に分解され、これにより遺伝子発現が抑制されるという現象である。1998年に線虫でRNAiが発見 (Fire et al., Nature, 391, 806-811, 1998) されて以来、さまざまな生物種でRNAi現象が観察されており、2001年にヒトを含む哺乳動物でも21~23塩基程度のdsRNAであるsiRNA (small interference RNA) によりRNAi現象を起こすことが可能であることが報告された (Elbashir et al., Nature, 411, 494-498, 2001)。

[0003] 現在、RNAi技術を医薬品へ応用することに大きな期待が寄せられている。ほとんどの疾患は何らかのタンパク質の機能異常に起因すると考えられており、その異常タンパク質の発現を抑制することが可能なsiRNAは極めて多くの疾患に適応される可能性がある。また、siRNAによる遺伝子発現抑制効果は配列特異性が高いことから、標的とする原因因子のみに効果が現れ、副作用がほとんど生じないと想定されるためである。なお、現状ではsiRNAを活用した医薬品 (siRNA医薬) は従来の薬剤とは異なる作用機序に基づくものであり、ヒトにおける安全性が完全に確立されていないため、有効な既存薬が少ない難病や、ガンや感染症といった疾患の治療薬として開発が先行している。

[0004] siRNA医薬のもう1つの利点は、疾患と遺伝子の関係が明らかとなれば有効成分としてのsiRNAの設計が可能となり、容易に有効成分を合成できる点である。従来型の低分子医薬品はその有効成分の探索に極めて多くの時間と労力を割いてきたが、siRNA医薬ではそのような努力を最小限にすることが可能で

ある。

[0005] 一方、siRNAは生体内での安定性が非常に悪く、生体膜透過性に乏しいことが大きな問題点としてある。更にもう1つの大きな問題として、標的とする細胞のみへ必要量のsiRNAを長時間持続して送達することが挙げられる。

[0006] siRNAのDDS技術に関しては多くの研究が行われている。siRNAを細胞へ導入しその機能を発揮させるには次のように幾つかのステップをクリアーする必要がある。

1. 細胞へのsiRNA複合体の到達

siRNAは容易にエキソヌクレアーゼなどの血中の分解酵素によって分解されるため、目的とする部位に到達する前に分解されてしまう。このため分解酵素から保護する必要がある。

[0007] 2. 細胞へのsiRNAの取り込み

siRNA自体は細胞膜を透過できないため、細胞質へ取り込まれない。このためエンドサイトーシスなどの細胞への取り込み機構を介して取り込ませることが行われている。膜透過性ペプチドやカチオニック脂質などは直接細胞膜に作用し、細胞内へのsiRNAの導入を行うと考えられていたが、少なくとも膜透過性ペプチドはエンドサイトーシスを介した経路でsiRNAを細胞内へ入れることが分かっており、カチオニック脂質についても高濃度で用いる以外の場合にはエンドサイトーシスが関与していると考えられている。

[0008] 3. 取り込み機構から細胞質への脱出

取り込み機構を介して取り込まれたsiRNAは細胞内ではエンドゾームを主とした細胞内小胞に入る。このままではsiRNAは作用しないので、そこからの脱出が必要である。エンドソームからの脱出にはpH感受性の脂質を用いたもの、一部の膜透過性ペプチド、カチオニック脂質、などが利用されている。

[0009] 以上のステップを総てクリアーした場合に、siRNAによるノックダウン効果が見られることになる。

[0010] 一方、特許文献1～2は、HBs（B型肝炎ウイルス表面）抗原タンパク質を構成要素とするHBs抗原粒子（HBs抗原粒子）を用いたsiRNAの送達に

ついて記載しているが、特定の疾患の治療に使用できることは記載していない。

- [0011] siRNAは、細胞に導入されるまで、あるいは細胞に導入されてからも速やかに分解されるため、長時間継続して細胞にsiRNAを導入する必要がある。

先行技術文献

特許文献

- [0012] 特許文献1：特開2008-162981

特許文献2：特開2008-029249

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] 本発明は、長時間継続して標的細胞、組織ないし臓器にRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子を導入することができ、毒性が低く、十分に標的遺伝子の発現を抑制できる量を送達可能な抗ウイルス剤または抗癌剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0014] 本発明者は、以下の抗ウイルス剤または抗癌剤、それらの製造方法を提供するものである。

項1. ウイルス核酸または癌標的遺伝子のmRNAを切断可能なRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子をHBs抗原粒子とリポソームの融合体に内包してなる抗ウイルス剤または抗癌剤。

項2. HBs抗原が、細胞、臓器もしくは組織の標的化部分を含む項1に記載の抗ウイルス剤または抗癌剤。

項3. HBs抗原が、HBs抗原（Q129R, G145R）である、項1または2に記載の抗ウイルス剤または抗癌剤。

項4. ウイルス核酸または肝細胞癌標的遺伝子のmRNAを切断可能なRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子が、siRNA、miRNAまたはshRNAである、項1～3のいずれかに記載の抗ウイルス剤または抗癌剤。

項 5. 標的遺伝子が肝細胞内で発現する標的遺伝子である、項 1～4 のいずれかに記載の抗ウイルス剤または抗癌剤。

項 6. リポソームと HBs 抗原粒子を界面活性剤の存在下または非存在下に融合し、その融合体に RNA 干渉 (RNAi) を媒介し得る小核酸分子を加えることを特徴とする抗ウイルス剤または抗癌剤の製造方法。

項 7. 界面活性剤が MEGA-8、Triton X-100、Tween 20、Tween 80、N-ラウロイルサルコシン-ナトリウム塩、ドデシル硫酸リチウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、SDS、塩化セチルピリジニウム、CTAB、CHAPS、CHAPSO、スルホベタイン SB10 及びスルホベタイン SB16 からなる群から選ばれる項 6 に記載の方法。

項 8. ウイルス核酸または癌標的遺伝子の mRNA を切断可能な RNA 干渉 (RNAi) を媒介し得る小核酸分子を HBs 抗原粒子とリポソームの融合体に内包してなる粒子の、抗ウイルス剤または抗がん剤としての使用。

項 9. ウイルス核酸または癌標的遺伝子の mRNA を切断可能な RNA 干渉 (RNAi) を媒介し得る小核酸分子を HBs 抗原粒子とリポソームの融合体に内包してなる粒子の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする、ウイルス感染症又は癌の治療方法。

[0015] 本発明の抗ウイルス剤または抗癌剤は、ウイルス核酸の mRNA を切断可能な RNA 干渉 (RNAi) を媒介し得る小核酸分子を HBs 抗原粒子とリポソームの融合体に内包してなる抗ウイルス剤と、癌標的遺伝子の mRNA を切断可能な RNA 干渉 (RNAi) を媒介し得る小核酸分子を HBs 抗原粒子とリポソームの融合体に内包してなる抗癌剤の両方を包含する。

発明の効果

[0016] 本発明の抗ウイルス剤または抗癌剤は、siRNA、shRNA、miRNA などの RNA 干渉 (RNAi) を媒介し得る小核酸分子が細胞内で実際に作用してウイルス感染症および癌を治療できることが実証されており、ウイルス感染症および癌に対する高い効果が期待でき、かつ、副作用が実質的にない理想的な治療薬である。

図面の簡単な説明

- [0017] [図1]HepG2, TE10についてのmRNAの測定結果を示す。
[図2]HepG2, についての細胞増殖能の測定結果を示す。
[図3]L粒子を用いた48時間後のルシフェラーゼアッセイ。
[図4]DharmaFECT（登録商標）トランスフェクション試薬を用いた48時間後のルシフェラーゼアッセイの結果を示す。
[図5]実施例2の遺伝子構築物の構造を示す。

発明を実施するための形態

- [0018] 本発明のHBs抗原粒子は、B型肝炎ウイルスのHBs抗原タンパク質またはその改変体を構成要素とするナノ粒子である。
- [0019] 本発明の融合体は、HBs抗原粒子とリポソームが融合して得られるものである。
- RNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子としては、siRNA（短干渉RNA）、shRNA（短ヘアピンRNA）、miRNA（マイクロRNA）、siNA（短干渉核酸）、dsRNA（二本鎖RNA）、アンチセンスRNAが挙げられ、好ましくはsiRNA、shRNAが挙げられる。
- [0020] 本発明の抗ウイルス剤または抗癌剤の有効成分は、RNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子をHBs抗原粒子とリポソームの融合体に内包したものである。ここで、「内包」とは、小核酸分子が標的細胞等に導入される前に血液中などの生体内で実質的に分解されない状態で融合体と複合化することを意味し、HBs抗原粒子内または融合体内に封入される場合と、HBs抗原粒子の外側であるが、リポソームの一部と相互作用して、RNaseなどの酵素による分解を受けない状態で複合化している場合の両方を含む。RNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子は、HBs抗原粒子とリポソームを先に界面活性剤の存在下または非存在下に融合し、その後にRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子を作用させた場合、あるいは、HBs抗原粒子とリポソームとRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子を同時に混合し反応させた場合には、小核酸分子はHBs抗原粒子の外側に存

在するが、リポソームの一部と相互作用して、RNaseなどの酵素による分解を受けない状態で複合化すると考えられる。一方、RNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子を封入したリポソームとHBs抗原粒子を必要に応じて界面活性剤の存在下に混合し反応させた場合には、前記小核酸分子がHBs抗原粒子内に封入される場合とHBs抗原粒子の外側であるが、リポソームの一部と相互作用して、RNaseなどの酵素による分解を受けない状態で融合ないし複合化する場合の両方があり得、これらは単独又は混合物として存在し得る。

[0021] 本発明のHBs抗原粒子は、粒子形成能を有するHBs抗原タンパク質またはその改変体と脂質膜を構成要素とし、例えば粒子形成能を有するHBs抗原タンパク質またはその改変体が球状、楕円体状或いはこれらに類似する形状の脂質膜と複合化した構造を有するものである。

[0022] 本明細書において、HBs抗原タンパク質またはその改変体を構成要素とするHBs抗原粒子としては、HBs抗原タンパク質（HBsAg）またはその改変体と脂質膜を構成要素とする粒子などが例示される。

[0023] 本明細書において、HBs抗原粒子は、HBs抗原タンパク質又はその改変体を主成分として包含し、該タンパク質は脂質膜に保持されている。また、該タンパク質には通常糖鎖が結合している。この糖鎖は、真核細胞でHBs抗原タンパク質又はその改変体を発現させたときに真核細胞内で結合されるものであるが、HBs抗原粒子が得られた後に、共有結合などにより化学的に糖鎖を結合させてもよい。

[0024] HBs抗原粒子としては、酵母、昆虫細胞あるいはCHO細胞などの哺乳動物細胞を含む真核細胞でHBs抗原タンパク質またはその改変体を発現させることにより得られるものが挙げられる。HBs抗原粒子の製造法は、特開2001-316298に記載され、HBs抗原の調製法は、Vaccine. 2001 Apr 30;19(23-24):3154-63. Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1 + pre-S2 + S) protein. Yamada T, Iwabuki H, Kanno T, T

anaka H, Kawai T, Fukuda H, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S. に記載されている。

- [0025] 真核細胞でHBs抗原タンパク質を発現させると、該タンパク質は、小胞体膜上に膜蛋白として発現、蓄積され、ナノ粒子として放出されるので、脂質膜を有する構造となる。真核細胞で発現させたHBs抗原粒子は、HBVゲノムを全く含まないので、人体への安全性が極めて高い。
- [0026] 1つの好ましい実施形態において、HBs抗原粒子は、65～80重量部のHBs抗原タンパク質またはその改変体、8～20重量部の脂質、5～20重量部の糖鎖から構成される。本願の実施例で使用されているHBs抗原粒子（L粒子）は、HBs抗原タンパク質またはその改変体約70重量部、糖鎖約16重量部、脂質約13重量部からなる。
- [0027] 本発明の小核酸分子、例えばsiRNA、shRNA（ショートヘアピンRNA）、miRNAは、ウイルス核酸または癌細胞の標的遺伝子のRNA（特にmRNA）を分解させるものであれば特に限定されず、標的となる遺伝子が決まれば、常法に従い設計することができる。siRNAの長さは、21～23塩基であるものが好ましいが、標的のRNAを切断できるのであれば、例えば15～30塩基のより長いあるいはより短い配列を有するものであってもよい。shRNAは、siRNAの2本のRNAを適当な長さ（長さの下限は0、1、2、3、4または5塩基であり、長さの上限は100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15又は10塩基）のRNAでつないだものが例示される。
- [0028] 本発明の好ましい実施形態において、リポソームと融合した後の、小核酸分子を除いたリポソームHBs抗原粒子融合体は、10～60重量部のHBs抗原タンパク質またはその改変体、40～95重量部の脂質（リン脂質を含む）、1～10重量部の糖鎖から構成され得る。
- [0029] HBs抗原粒子を構成する脂質としては、酵母ないし動物細胞などの真核細胞由来の膜成分（例えばリン脂質、コレステロールなど）、リポソームを構成するリン脂質が挙げられる。糖鎖は、真核細胞においてHBs抗原タンパク質を発現される際にタンパク質に導入されるものであるが、標的となる

細胞／組織／臓器を特異的に認識する部位として糖鎖を結合させることも可能である。標的認識部位として使用可能な糖鎖としては、例えばシアリルルイスXが挙げられる。シアリルルイスXは、炎症を起こしている細胞表面に存在するレクチンタンパク質と相互作用するため、生体内の炎症部位への標的化に使用することができる。シアリルルイスXなどの標的認識分子としての糖鎖は、複合体の導入前と導入後のいずれの粒子に対して導入してもよい。あるいは、糖鎖をNaIO₄などの酸化剤で酸化してアルデヒド基を導入し、これに特定の細胞、臓器、組織などを認識するリガンドを結合させることにより、ウイルス感染細胞あるいは癌細胞を標的化することが可能である。

[0030] HBs抗原タンパク質は、Sタンパク質を必須の構成要素として含み、さらにPreS1およびPreS2の2つの領域を含み得る。Sタンパク質(226アミノ酸)は、粒子形成能を有している。S粒子に55アミノ酸からなるPre-S2を付加したのがMタンパク質(M粒子の構成蛋白)であり、M蛋白に108アミノ酸または119アミノ酸からなるPre-S1を付加したものがLタンパク質(L粒子の構成蛋白)である。Lタンパク質、Mタンパク質はSタンパク質と同様に粒子形成能を有している。従って、PreS1およびPreS2の2つの領域は任意に置換、付加、欠失、挿入を行ってもよい。例えばPre-S1領域の3から77アミノ酸残基に含まれる肝細胞認識部位を欠失させた改変タンパク質を用いることで、肝細胞認識能を失った中空粒子を得ることができる。また、PreS2領域にはアルブミンを介して肝細胞を認識する部位が含まれているので、このアルブミン認識部位を欠失させることもできる。一方、S領域(226アミノ酸)は粒子形成能を担っているため、S領域の改変は、粒子形成能を損なわないように行う必要がある。例えばS領域において、129位のGlnをArgに置換し、及び／又は、145位のGlyをArgに置換したタンパク質は、HBs抗原粒子の抗原性が低下し、粒子形成能とsiRNAの細胞への導入能は損なわれないため好ましく、特にLタンパク質のS領域において、129位のGlnをArgに置換し、かつ、145位のGlyをArgに置換したタンパク質であるHBs抗原(Q129R, G145R)は、粒子形成能とsiRNAの細胞への導入能を有し、免疫原性が低いために好ましい。

[0031] なお、PreS1領域、特にPreS1領域の1位～50位のアミノ酸は、リポソームなどの脂質との融合に寄与することが本発明者らの研究により明らかになった。従って、本発明のHBs抗原タンパク質またはその改変体は、PreS1領域、特にPreS1領域の1位～50位を有するものが好ましく、この領域に置換、付加、欠失、挿入などの改変があるとしてもこの領域の脂質融合能を損なわないような変異であるのが好ましい。

[0032] HBs抗原タンパク質の改変体としては粒子を形成する能力を有する限り種々の改変体が広く包含され、HBs抗原タンパク質を例にとると、PreS1とPreS2領域に関しては任意の数の置換、欠失、付加、挿入が挙げられ、S領域に関しては、1又は数個もしくは複数個、例えば1～120個、好ましくは1～50個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に1～5個のアミノ酸が置換、付加、欠失又は挿入されていてもよい。置換、付加、欠失、挿入などの変異を導入する方法としては、該タンパク質をコードするDNAにおいて、例えばサイトスペシフィック・ミュータジェネシス (Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987); 同 100, 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984)) などの遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段 (例えばDNA合成機を使用する) (J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); 同 91, 3350 (1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981)) などが挙げられる。コドンの選択は、宿主のコドンユースを考慮して決定できる。

[0033] HBs抗原タンパク質またはその改変体としてLタンパク質などの肝細胞を認識可能なタンパク質から構成されるHBs抗原粒子の場合には、細胞認識部位を導入する必要はない。一方、Pre-S1領域の3から77アミノ酸残基に含まれる肝細胞認識部位を欠失させた改変タンパク質、或いはPreS1とPreS2の両方の領域を欠失させたタンパク質から構成されるHBs抗原粒子の場合、そのままでは細胞認識ができないので、細胞認識部位を導入して、肝細胞以外の任意の細胞を認識させ、前記ポリマー／核酸複合体を種々の標的細胞

に導入することができる。このような特定の細胞を認識する細胞認識部位としては、例えば成長因子、サイトカイン等のポリペプチドからなる細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するためのポリペプチド分子、ウイルスおよび微生物に由来するポリペプチド分子、抗体、糖鎖などが好ましく用いられる。具体的には、癌細胞に過剰に発現されるEGF受容体やIL-2受容体に対する抗体やEGF、またHBVの提示するレセプターも含まれる。或いは、抗体Fcドメインを結合可能なタンパク質（例えば、ZZタグ）、ストレプトアビジンを介してビオチン標識した生体認識分子を提示するためにビオチン様活性を示すストレプトタグなどを使用することもできる。

[0034] 細胞認識部位がポリペプチドである場合には、HBs抗原タンパク質またはその改変体をコードするDNAと細胞認識部位をコードするDNAを必要に応じてスペーサーペプチドをコードするDNAを介してインフレームに連結し、これをベクター等に組み込み、真核細胞で発現させることにより、任意の標的細胞を認識するHBs抗原粒子を得ることができる。

[0035] 細胞認識部位が抗体である場合、HBs抗原タンパク質またはその改変体をコードするDNAとZZタグをコードするDNAを必要に応じてスペーサーペプチドをコードするDNAを介してインフレームに連結し、これをベクター等に組み込み、真核細胞で発現させ、得られたHBs抗原粒子と標的細胞を認識し得る抗体を混合することにより、目的とする、抗体が結合したHBs抗原粒子を得ることができる。

[0036] 細胞認識部位が糖鎖の場合、糖転移酵素を使用して、細胞認識能を持たないHBs抗原粒子にシアリルルイスXなどの細胞を認識可能な糖鎖を連結することにより、得ることができる。

[0037] HBs抗原粒子とリポソームの融合は、必要に応じて界面活性剤の存在下に水又は水性媒体中で該リポソームとHBs抗原粒子を混合し、必要に応じて攪拌ないし振盪することにより容易に実施できる（直接融合法）。

[0038] あるいは、HBs抗原粒子とリポソーム（小核酸分子を含まない）の融合は

、水又は水性媒体中でリポソームとHBs抗原粒子を界面活性剤の存在下で混合・透析し、複合体を形成した後、小核酸分子を内包させてもよい。

[0039] 有効成分となる、小核酸分子を含むHBs抗原粒子とリポソームの融合体(HBs抗原融合粒子)の大きさは、50～1000nm、好ましくは60～700nm程度、より好ましくは70～500nm程度、特に好ましくは70～300nm程度、特に70～200nm程度である。HBs抗原融合粒子の粒子径は、生体内(特に血液中)での半減期、クリアランスなどに影響する。

[0040] 本明細書において、HBs抗原粒子の大きさは、動的散乱光法による測定装置、例えば、FPAR1000(大塚電子)により測定することができ、表面電荷はゼータサイザーナノ-ZS(Malvern Instruments)により測定することができる。

[0041] 本発明のHBs抗原融合粒子の大きさが上記の範囲内に入っている場合、生体内(特に血液中)での半減期が長く、小核酸分子を長期間標的細胞に導入できるので特に好ましい。

[0042] 小核酸分子を内包したHBs抗原融合粒子の粒子径を調整するには、直接融合法においてはリポソームの粒子径を最小化する処理を行い、その後、粒子サイズを最小化したHBs抗原粒子と融合させる。また、界面活性剤法においても前もって例えば50nm～100nmの小サイズに調節したリポソームと粒子サイズを最小化したHBs抗原粒子を準備し、これを界面活性剤存在下で融合させ、その融合体を更に最小化処理を行うことで可能である。

[0043] リポソームの粒子径の最小化には、例えば、エクストルーダーを用いて孔径が小さいフィルター(例えば、100nm, 80nm, 50nmなど)を通過させることによって粒子径を調節可能である。また、別の方法として、ロッド状の超音波発生機により数時間処理することによって粒子径を小さくすることも可能である。勿論、他の方法よりリポソーム粒子径の最小化処理法を利用しても問題ない。HBs抗原粒子の粒子径を最小化するには、例えば、ロッド状の超音波発生機により数時間処理することによって粒子径を小さくすることが

可能であるが、他の方法による最小化処理法を利用しても問題ない。なお、界面活性剤法による複合体を最小化する際には、例えば、エクストルーダーを用いて孔径が小さいフィルター（例えば、200nm, 150nm, 100nmなど）を通過させることによって粒子径を調節可能である。

[0044] リポソームは、多重層リポソーム、一枚膜リポソームのいずれであってもよい。リポソームの大きさは40～300nm程度、好ましくは50～200nm程度、特に60～150nm程度である。リポソームをHBs抗原粒子と直接融合させる場合、リポソームの大きさは、HBs抗原粒子の0.5～2倍程度の大きさであるのが好ましい。界面活性剤を用いてリポソームとHBs抗原粒子を複合体化する場合には、リポソームの大きさは任意であるが、上記の大きさのリポソームが好ましく例示される。

[0045] リポソームは超音波処理法、逆相蒸発法、凍結融解法、脂質溶解法、噴霧乾燥法などにより製造することができる。

[0046] リポソームはHBs抗原粒子に対し、適切な量と組成で作製され、使用される。具体的には、HBs抗原粒子 100重量部に対し、リポソームを20～1000重量部使用する。

[0047] リポソームの構成成分としては、リン脂質、コレステロール類、脂肪酸などが挙げられ、具体的にはホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン等の天然リン脂質、あるいはこれらを常法によって水素添加したものその他、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルセリン、エレオステアロイルホスファチジルコリン、エレオステアロイルホスファチジルエタノールアミン、エレオステアロイルホスファチジルセリン等の合成リン脂質が挙げられる。リン脂質は様々な飽和度を有する脂質を組み合わせで使用するのが望ましい。その他、コレステロール類としては、コレステロール

、フィトステロールなどが挙げられ、脂肪酸としてはオレイン酸、パルミト
オレイン酸、リノール酸、或いはこれら不飽和脂肪酸を含む脂肪酸混合物が
挙げられる。側鎖の小さい不飽和脂肪酸を含むリポソームは曲率の関係から
小さいリポソーム作製に有効である。

[0048] リポソームには、エンドソームからの小核酸分子の脱出のためにpH感受性
の脂質(例えばCHEMS)、膜透過性ペプチド、カチオニック脂質の少なくとも1
種を包含させるのが好ましい。カチオニック脂質としては、DC-6-14 (0,0' -
ditetradecanoyl-N-(α -trimethylammonioacetyl)diethanolamine chloride
)、DODAC(dioctadecyldimethylammonium chloride)、DOTMA (N-(2,3-diole
yloxy)propyl-N,N,N-trimethylammonium)、DDAB (didodecylammonium bromi
de)、DOTAP (1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonio propane)、DC-Ch
ol (3 β -N-(N',N',-dimethyl-aminoethane)-carbamol cholesterol)、DMRIE
(1,2-dimyristoyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethyl ammonium)、DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propana
minum trifluoroacetate) 等が挙げられる。

[0049] 好ましい1つの実施形態において、本発明のリポソームは、カチオニック脂
質、リン脂質、コレステロールを含む。これらの比率としては、リポソーム
全体を100重量部として

カチオニック脂質：10～60重量部、好ましくは20～50重量部、より好ましく
は30～40重量部、

リン脂質：10～50重量部、好ましくは15～45重量部、より好ましくは20～40
重量部、

コレステロール：10～50重量部、好ましくは15～45重量部、より好ましくは2
0～40重量部。

[0050] リン脂質としては、DSPE-PG10G、DSPE-PEG350のようにPEGなどで修飾され
たリン脂質を使用することもできる。

[0051] リポソームとHBs抗原粒子の融合体の製造法の例を具体的に説明すると
、例えば前記したリン脂質、コレステロール等を適当な有機溶媒に溶解し、

これを適当な容器に入れて減圧下に溶媒を留去して容器内面にリン脂質膜を形成し、これに水溶液、好ましくは緩衝液を加えて攪拌して、リポソームを得ることができる。該リポソームを直接、またはいったん凍結乾燥した後に、HBs抗原粒子と混合することにより、リポソームとHBs抗原粒子の融合体を得ることができる（直接融合法）。別の方法として、例えば前記したリン脂質、コレステロール等を適当な有機溶媒に溶解し、これを適当な容器に入れて減圧下に溶媒を留去して容器内面にリン脂質膜を形成し、水又は水性媒体中で水和しリポソームを作製する。作製したリポソームを凍結融解し超音波処理によりサイズ調整を行い、界面活性剤を加える。これに界面活性剤が含有されているHBs抗原粒子溶液を混合し、透析処理を実施することによりリポソームとHBs抗原粒子の融合体を得ることも出来る（界面活性剤法）。界面活性剤としては、界面活性剤がMEGA-8、MEGA-9、MEGA-10、n-オクチル- α -D-グルコピラノシド、n-オクチル- α -D-チオグルコシド、n-ヘプチル- β -D-チオグルコシド、Triton X-100、Tween 20、Tween 80、N-ラウロイルサルコシン-ナトリウム塩、ドデシル硫酸リチウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、SDS、塩化セチルピリジニウム、CTAB、CHAPS、CHAPSO、スルホベタインSB10及びスルホベタインSB16、などが挙げられる。

[0052] 界面活性剤法によるリポソームとHBs抗原粒子の融合の場合、界面活性剤の濃度は、0.1～5%程度、好ましくは0.5～2%程度である。この場合、水などの溶媒100重量部あたりHBs抗原粒子は0.01～0.5重量部程度、好ましくは0.02～0.1重量部程度使用され、リポソームは0.03～10重量部程度、好ましくは0.06～5重量部程度使用される。界面活性剤法を実施するときの温度は5～75℃程度、好ましくは10～60℃程度の温度で、10分から6時間、好ましくは20分～3時間程度で好ましく実施することができる。

[0053] 直接融合法の場合、水などの溶媒100重量部あたりHBs抗原粒子は0.005～0.5重量部程度、好ましくは0.02～0.2重量部程度使用され、リポソームは0.01～10重量部程度、好ましくは0.03～5重量部程度使用される。直接融合法

を実施するときの温度は0～50℃程度、好ましくは0～40℃程度の温度で、1分～120分、好ましくは2分～60分程度で好ましく実施することができる。

[0054] 本発明において、抗ウイルス剤の対象となるウイルスとしては、二本鎖RNAウイルス、一本鎖RNAウイルスなどのRNAウイルスおよびDNAウイルスが挙げられ、RNAウイルスの感染症が、好ましい治療対象として例示できる。本発明の「ウイルス核酸」は、これらRNAウイルスおよびDNAウイルス由来の核酸を包含する。

[0055] RNAウイルスとしては、アレナウイルス科（ラッサウイルスなど）、オルトミクソウイルス科（インフルエンザウイルスA型、B型など）、カリシウイルス科（ノロウイルス、サポウイルスなど）、コロナウイルス科（SARSウイルス、鳥インフルエンザウイルスなど）、トガウイルス科（風疹ウイルスなど）、ノダウイルス科（ウイルス性神経壊死症ウイルスなど）、パラミクソウイルス科（ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、RSウイルスなど）、ピコルナウイルス科（ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルスなど）、フィロウイルス科（マールブルグウイルス、エボラウイルスなど）、ブニヤウイルス科（クリミア・コンゴ出血熱ウイルスなど）、フラビウイルス科（黄熱病ウイルス、デング熱ウイルス、C型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス）、ラブドウイルス科（狂犬病ウイルス）、レオウイルス科、レトロウイルス科（ヒト免疫不全ウイルス、ヒトTリンパ好性ウイルス、サル免疫不全ウイルス、STLVなど）が挙げられる。

[0056] 治療の対象となる癌としては、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などが挙げられる。

[0057] 本発明の抗ウイルス剤または抗癌剤は、特定の臓器、組織、細胞などを標的化して、小核酸分子を導入することができる。

[0058] 癌の標的遺伝子としては、以下のものが挙げられる：

EGFR, ErbB2, ErbB3, IGF-1R, RET, K-ras, R-ras, CSF-1R, PDGFR- β , FLT-

3, Met, EphA2, BRAF, ABL, c-Kit, c-Src, Met, β -catenin, c-Myc, N-Myc, Cycline-D1, PI3K, AKT, IKK- β , NF- κ β , EWS, HIF-1 α , XBP-1, HIPV E 7, E2F4, HIPV E6, Hdmx, Notch-1, Delta-like-1, Jagged-1, Cycline B1, Chk1, FLIP, BCL-2, BCL-XL, Survivin, XIAP, Telomerase, Id1, Gks-1, Sk p-2, β TRCP1, cathepsin L, VEGF(A-D), PlGF, Angiogenin, Angiotropin, EGF, HGF, SF, FGF, PDGF, TNF- α , IGF-1, Cathepsin, MMP 2, 9, Stromely sin, uPA, c-myc, ras, c-src, v-raf, c-jun, VEGFR1, 2, 3, Thymidine, p hospholylase, RAS-farnesyl, transferase, Geranyl, IL-1, 6, 8, 10, α v β 3 integrin, Ang-1, Angiostatin II, Endothelin, Erythropoietin, iNOS, PAF, Cox-2, Thrombopoietin, CEACAM1, RhoA, CXCR4, IGFBP2, EphA2, Ep CAM, TGF- β , IDO, MIC-A, MIC-B, ABCB1, 4, 5, ERCC1。

[0059] 小核酸分子をHBs抗原粒子とリポソームの融合体に内包してなる粒子が投与される哺乳動物としては、ヒト、ウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウス、イヌ、ネコなどが挙げられ、ヒトが特に好ましい。

[0060] 投与される小核酸分子の投与量は特に限定されないが、ヒト成人1日当たり例えば、約0.1 ng～約100 mg/kg/日、好ましくは約1 ng～約10 mg/kg/日である。

[0061] 小核酸分子をHBs抗原粒子とリポソームの融合体に内包してなる本発明の抗ウイルス剤又は抗がん剤の有効量は、上記の小核酸分子の投与量を実現できる量である。

実施例

[0062] 以下、本発明を実施例に基づきより詳細に説明するが、本発明がこれら実施例に限定されないことはいうまでもない。

[0063] 実施例 1

DC-6-14 (0,0'-ditetradecanoyl-N-(α -trimethylammonioacetyl)diethanolamine chloride)

DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine)

1. siRNA封入BNC-Liposomeの作製方法

クロロホルム、DC-6-14、DOPE、Cholesterol、を200mlナス型フラスコ内で溶解させ、脂質溶液を作製した。（モル比でDC-6-14：DOPE：Cholesterol：DSPE-PG10G＝4：3：3：1）調製したナス型フラスコをロータリーエバポレーターにセットし、窒素置換し、減圧してクロロホルムを留去し、脂質フィルムを作製した。作製した脂質フィルムに大塚蒸留水を加えて水和し、水和した溶液を液体窒素で凍結・融解を繰り返し、リポソームを作製した。作製したリポソームをNLI社LIPEX Extruderを用いてPCMB 25mm、2 μ m (Whatman 110602)、PCMB 25mm、1 μ m (Whatman 110603)、PCMB 25mm、0.08 μ m (Whatman 110604)、PCMB 25mm、0.05 μ m (Whatman 110605)、PCMB 25mm、0.03 μ m (Whatman 110606) それぞれ順に各3回かけ粒径を調製し、Filter滅菌した。リポソーム溶液 10 μ l を 大塚蒸留水240 μ lで希釈し、FPAR-1000AS（大塚電子）を用いて粒径測定した。リポソームの粒径は、68～75nmであった。コレステロールE-テストによりコレステロール濃度を測定し、測定値からリポソーム総脂質濃度を算出した。リポソーム総脂質濃度は、7.55mg/mlであった。リポソームにPG-10Gを約10%添加した。リポソームにsiRNA及びBNC-ST（L粒子において、Lタンパク質のS領域において、129位のGlnをArgに置換し、かつ、145位のGlyをArgに置換したタンパク質であるHBs抗原（Q129R, G145R）を酵母で発現させて得られたステルス性のL粒子）を加え、速やかに混合しFilter滅菌した。混合比は重量比でリポソーム1に対し、BNCは0.5～3の混合比を用いた。

[0064] 2. 定量RT-PCRによるmRNAの定量

2×10^5 個の細胞（HepG2、TE10）を6ウェルディッシュ（コーニング 3516）に撒いた。

24時間後にsiRNAとして終濃度250nMになるようにsiRNA封入BNC-Liposomeを加えた。さらに24時間後にメディウムチェンジを行った。メディウムは、HepG2には10% FBS（JRH 12303 500M）を加えたMEM（SIGMA M4655）及びTE10にはDMEM（SIGMA D5796）培地である。siRNA導入後3日目にQIAGEN RNeasy Mini Kit（74104）にてRNA抽出した。プロトコールは添付のメーカー取り扱い説

明書を参考とする。ABI社のHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit (4387406) を用いて約2 μ gのRNAからcDNAを作成し、ABI 7300 Real Time PCR System (TaqMan Gene Expression Assay ABI 436916使用) にてPCRを施行、未処理の細胞を基準として $\Delta\Delta$ cT値求め比較した。

[0065] 結果を図1に示す。図1において、

Ep EpCAMのsiRNA
Sc スクランブルsiRNA
Mock siRNAなし (BNC-Liposomeのみ)
NC ネガティブコントロール (未処理)。

[0066] 下記にsiRNAの配列を以下に示す。

EpCAM siRNA 配列 (Ambionより購入 ID:11452)

Sense 5' -GGCAGAAAUGAAUGGCUCA (TT) (配列番号 1)

Antisense 5' -UGAGCCAUUCAUUUCUGCC (TT) (配列番号 2)

Scramble siRNA 配列 (Osta et.al 2004 Cancer Research参照)

Sense 5' -UUCUCCGAACGUGUCACGU (TT) (配列番号 3)

Antisense 5' -ACGUGACACGUUCGGAGAA (TT) (配列番号 4)

図1に示されるように、肝細胞由来であるHepG2細胞では本発明のsiRNA導入法によりEpCAMの発現が40%まで抑制された。スクランブルsiRNAやmockではEpCAMの発現に変化は見られなかった。一方、食道癌細胞TE10ではEpCAMに対するsiRNAを用いても明らかなmRNAの減少は見られなかった。

[0067] 3. 細胞増殖率測定

1×10^4 個の細胞 (HepG2) を96ウェルディッシュ (コーニング 3599) に撒いた。24時間後にsiRNAとして終濃度250nMになるようにsiRNA封入BNC-Liposomeを加えた。24時間後にメディウムチェンジを行った。メディウムは上述の10% FBSを加えたMEM培地である。siRNA導入後3日目にCell Proliferation ELISA, BrdU Kit (Roche 11 647 229 001) を用いて未処理の細胞 (ネガティブコントロール: NC) を基準に細胞増殖率を比較した。そのプロトコールは添付の通りである。

結果を図2に示す。

図2に示されるように、本発明のsiRNAを導入したHepG2細胞は細胞増殖が抑制され、抗腫瘍作用を有することが確認された。

[0068] 実施例2

リポソームとHBs抗原粒子を界面活性剤の存在下または非存在下に融合し、その融合物にRNA干渉(RNAi)を媒介し得る小核酸分子を加えることを特徴とする抗ウイルス剤によるウイルス増殖抑制

(1) 細胞株とその継代培養HCV

レプリコン細胞株OR6 (HuH-7細胞由来でポリクローナルなOR/C-5B/KEゲノム全長HCV RNAが複製している細胞) を10%牛胎児血清(FBS: Biowest社製)、ペニシリンストレプトマイシン(invitrogen社製)、geneticin(300ug/ml invitrogen)を含むDMEM培地(invitrogen社製)を用いて、10cm²のコラーゲンコートされた組織培養シャーレ(BD Biocoat社製: 354450)中でコンフルエント(confluent)にならないよう注意しつつ5%CO₂, 37℃条件下で培養し、対数増殖期のうちにトリプシン-EDTA溶液(シグマ社製)を用いて新しい組織培養フラスコに移して継代培養した。

[0069] (2) L粒子、かつ市販のトランスフェクション試薬を用いたsiRNAによるOR6 HCVレプリコン細胞の増殖抑制試験

(1) トランスフェクションプロトコール及びルシフェラーゼアッセイプロトコール

100nM siRNAについてトランスフェクション試薬(DharmaFECT1) (登録商標)を使用した。

1. コラーゲンコートされた組織培養24-ウェルプレート(Collagen coated 124-Well Plate: BD Biocoat社製 354408)に 2×10^4 個の500 μ lの細胞をプレートに播種し、細胞を終夜抗生物質フリー完全培地10%FBS(Biowest社製)含有DMEM(invitrogen社製)培地にて培養した。

チューブ1の調製: 87.5 μ lの2 μ M siRNA溶液を87.5 μ lの血清フリー培地に加えた。総体積は175 μ lであった。

チューブ2の調製：3.5 μ lのDharmaFECT1（登録商標）を171.5 μ lの血清フリー培地に加えた。総体積は175 μ lであった。

2. チューブ1とチューブ2の内容物をピペットを用いて注意深く混合し、室温で20分間インキュベートした。

3. 1400 μ lの抗生物質フリー完全培地を加えた。

4. 24 ウェルプレート各ウェルから培養培地を除去し、500 μ lのトランスフェクション培地を加えた。

5. 細胞を48-72hr培養した（タンパク質分析用）

6. Renillaルシフェラーゼ（RL）アッセイのために、細胞を48-72時間培養した。処理細胞をRenilla 溶解 試薬（Promega）で収穫し、製造業者のプロトコールに従いRLアッセイにかけた。各アッセイについて細胞を少なくとも3重でプレートに播種した。

[0070] (II) siRNAトランスフェクション用のL粒子とルシフェラーゼアッセイプロトコール

1. コラーゲンコートされた組織培養24-ウェルプレート（Collagen coated 124-Well Plate：BD Biocoat社製 354408）に 2×10^4 個の500 μ lの細胞をプレートに播種し、細胞を終夜抗生物質フリー完全培地10%FBS（Biowest社製）含有DMEM（invitrogen社製）培地で培養した。

2. siRNAを含むL粒子溶液を細胞に加えた。

3. 1時間後、細胞の培地を抗生物質フリー完全培地で交換した。

4. 細胞を48時間培養した。

5. Renilla溶解試薬（Promega）で細胞を収穫し、製造業者のプロトコールに従いRL アッセイにかけた。

[0071] 細胞増殖を抑制しないネガティブコントロールとしてDharmacon社市販の siRNA（ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #1）、HCVを抑制するポジティブコントロールとしてレプリコン内に含まれているレニラルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNAを用いた。negative controlとして使用したsiRNAは：ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #1

Cat #D-001810-01-05

ルシフェラーゼ用の siRNA のヌクレオチド配列は以下の配列：

5' - GGCCUUUCACUACUCCUACUU -3' （配列番号 5）からなる。

また、HCV用のsiRNAのヌクレオチド配列は：

5' - GUCUCGUAGACCGUGCAUCAUU -3' （配列番号 6）からなる。

レプリコン細胞が発現しているルシフェラーゼ値、各種トランスフェクション試薬やSiRNA導入した場合のルシフェラーゼ発現値の変化率を求めた。

[0072] L粒子を用いた48時間後のルシフェラーゼアッセイ（図3）、DharmaFECT（登録商標）トランスフェクション試薬を用いた48時間後（図4）及び72時間後（図5）のルシフェラーゼアッセイの結果を示す。図3～5において、

Mock: transfectin agentのみ添加したもの。DharmaFECT1（登録商標）またはL粒子のみでSiRNAは含まれていない。Nontarget：Dharmacon社市販のnontarget siRNAが含まれている

posi(hluc)：レニラレポーター遺伝子の配列をtargetにしたsiRNAが含まれている。レプリコン細胞にレニラレポーター遺伝子が入っているためpositive controlとして使用。

siHCV：HCVRNAの配列をtargetにして作成したsiRNAを意味する。

[0073] siRNAトランスフェクション用のL粒子を使用した場合

何も添加しないレプリコン細胞株OR6の48時間後のルシフェラーゼ活性値を100%とした場合、MOCKとしてトランスフェクション試薬(SiRNAが含まれていないL粒子のみ)のみ導入した場合のルシフェラーゼ活性値、ネガティブコントロールとしてNon-targeting siRNA #1 200nMを導入した場合、ポジティブコントロールとして用いたレニラレポーター遺伝子配列に対するsiRNA 200nM、HCVRNA の配列に対するsiRNA200nMを導入レプリコン細胞株OR6に導入したルシフェラーゼ活性値は、それぞれMOCK（80.1%±27%）、ネガティブコントロール（42.5%±7.2%）、ポジティブコントロール（12.1%±2.0%）、HCVRNA の配列に対するsiRNA（12.9%±2.3%）（平均±標準偏差(SD)）

にウイルス複製率が低下した。

[0074] トランスフェクション 試薬 (DharmaFECT1) (登録商標) を使用した場合
何も添加しないレプリコン細胞株OR6の48時間後のルシフェラーゼ活性値を100%とした場合、MOCKとしてトランスフェクション試薬(DharmaFECT) (登録商標)のみ導入した場合のルシフェラーゼ活性値の割合、ネガティブコントロールとしてNon-targeting siRNA #1 100nMを導入した場合、ポジティブコントロールとして用いたレニラレポーター遺伝子配列に対するsiRNA 100nM、HCV RNA の配列に対するsiRNA 100nMを導入レプリコン細胞株OR6に導入したルシフェラーゼ活性値は、それぞれMOCK (1.51%±0.84%)、ネガティブコントロール (1.47%±1.25%)、ポジティブコントロール (0.59%±0.11%)、HCV RNA の配列に対するsiRNA (0.89%±0.27%) (平均±標準偏差(SD))にウイルス複製率が低下した。

[0075] 市販のトランスフェクション試薬ではそのものの自体の毒性が強く、siRNAの評価ができなかった。一方、L粒子を用いた場合、毒性は20%程度にとどまり、市販のトランスフェクション試薬と比較し毒性を少なく抑えることが示唆された。

[0076] OR6レプリコン細胞とはHCV ゲノムの複製に必要なHCVゲノムの断片を含むキメラRNAがヒト肝癌由来細胞株HuH7細胞内で持続的に複製維持している細胞モデルである。

[0077] レプリコンRNAは本来HCVゲノム中で5'UTRの下流にレニルシフェラーゼレポーター遺伝子、細胞毒性を示す抗生物質ネオマイシン耐性遺伝子、かつその下流に脳心筋炎ウイルス(EMCV)遺伝子由来の内部リボゾーム挿入部位(IRIS)が挿入されている。この配列によりRNAの内部から翻訳反応が開始され、その下流に位置し構造(s)蛋白質、非構造(NS)タンパク質が効率よく翻訳される。試験管内転写反応により合成したRNAを肝癌由来のHuH7細胞に導入した後、ネオマイシンにより選択を行う。導入したRNAが細胞内で効率よく自己複製し、ネオマイシンにてクローンが選択された場合、その細胞は生存可能となる。このようにして細胞内で自己複製が可能なHCVゲノム配列とその自己複製

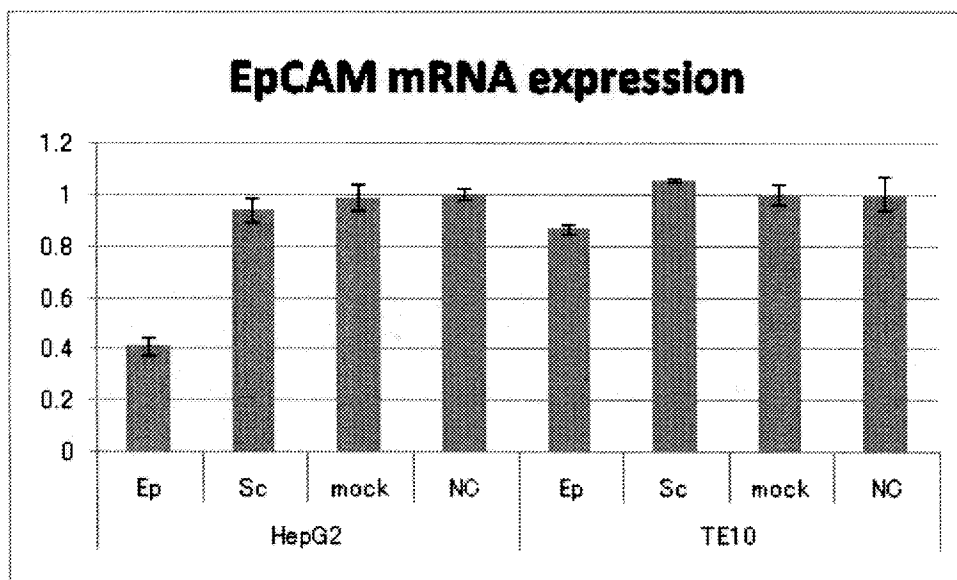
を可能にする細胞が選択されレプリコン複製細胞が得られるが、具体的にOR6細胞はgenotype 1でstrain 0由来のレプリコン細胞である（図5）。

請求の範囲

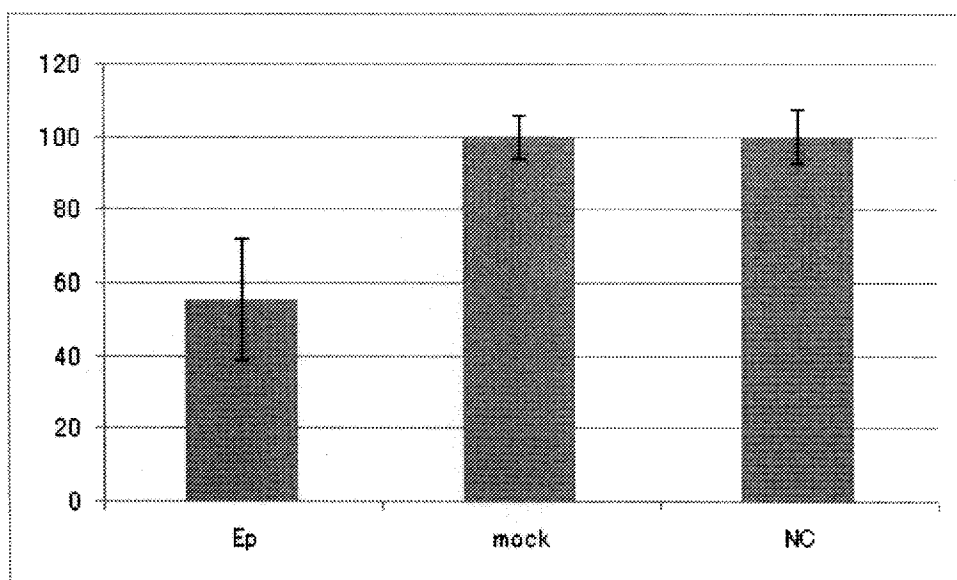
- [請求項1] ウイルス核酸または癌標的遺伝子のmRNAを切断可能なRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子をHBs抗原粒子とリポソームの融合体に内包してなる抗ウイルス剤または抗癌剤。
- [請求項2] HBs抗原が、細胞、臓器もしくは組織の標的化部分を含む請求項1に記載の抗ウイルス剤または抗癌剤。
- [請求項3] HBs抗原が、HBs抗原（Q129R，G145R）である、請求項1または2に記載の抗ウイルス剤または抗癌剤。
- [請求項4] ウイルス核酸または肝細胞癌標的遺伝子のmRNAを切断可能なRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子が、siRNA、miRNAまたはshRNAである、請求項1～3のいずれかに記載の抗ウイルス剤または抗癌剤。
- [請求項5] 標的遺伝子が肝細胞内で発現する標的遺伝子である、請求項1～4のいずれかに記載の抗ウイルス剤または抗癌剤。
- [請求項6] リポソームとHBs抗原粒子を界面活性剤の存在下または非存在下に融合し、その融合物にRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子を加えることを特徴とする抗ウイルス剤または抗癌剤の製造方法。
- [請求項7] 界面活性剤がMEGA-8、Triton X-100、Tween 20、Tween 80、N-ラウロイルサルコシン-ナトリウム塩、ドデシル硫酸リチウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、SDS、塩化セチルピリジニウム、CTAB、CHAPS、CHAPSO、スルホベタインSB10及びスルホベタインSB16からなる群から選ばれる請求項6に記載の方法。
- [請求項8] ウイルス核酸または癌標的遺伝子のmRNAを切断可能なRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子をHBs抗原粒子とリポソームの融合体に内包してなる粒子の、抗ウイルス剤または抗がん剤としての使用。
- [請求項9] ウイルス核酸または癌標的遺伝子のmRNAを切断可能なRNA干渉（RNAi）を媒介し得る小核酸分子をHBs抗原粒子とリポソーム

の融合体に内包してなる粒子の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする、ウイルス感染症又は癌の治療方法。

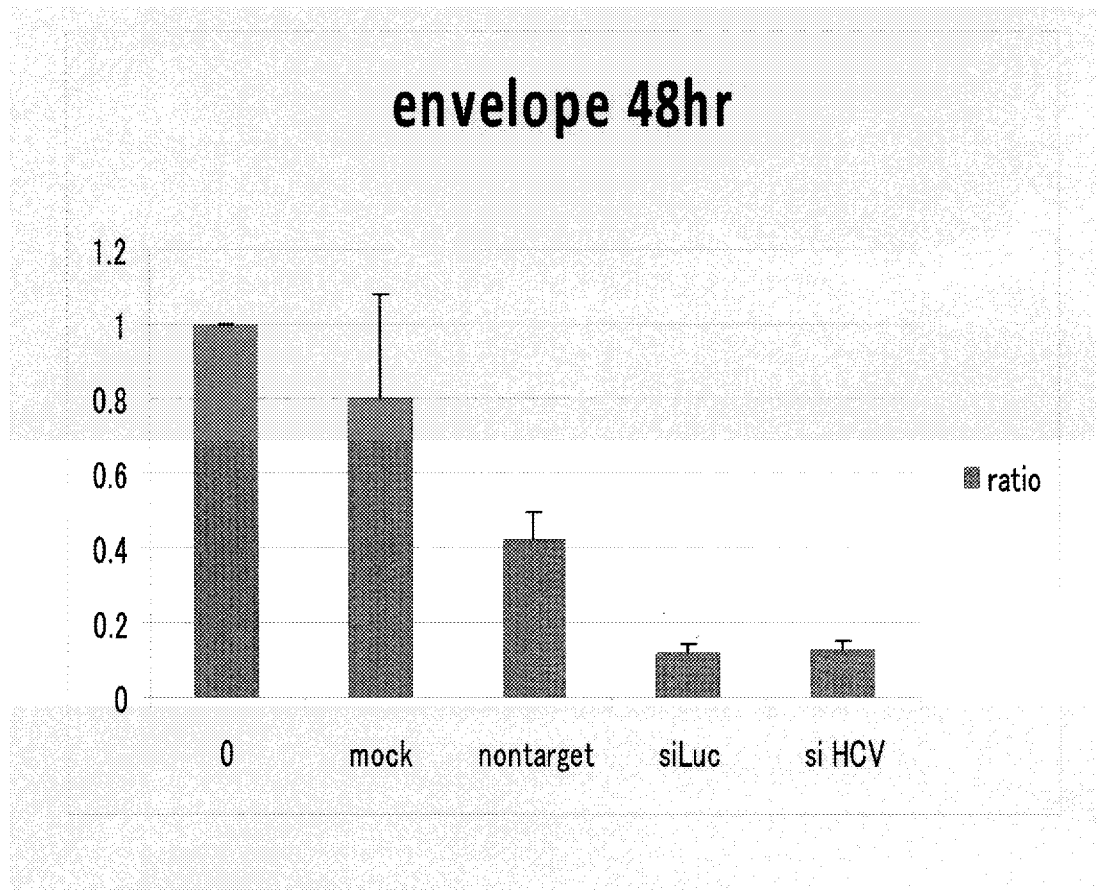
[図1]



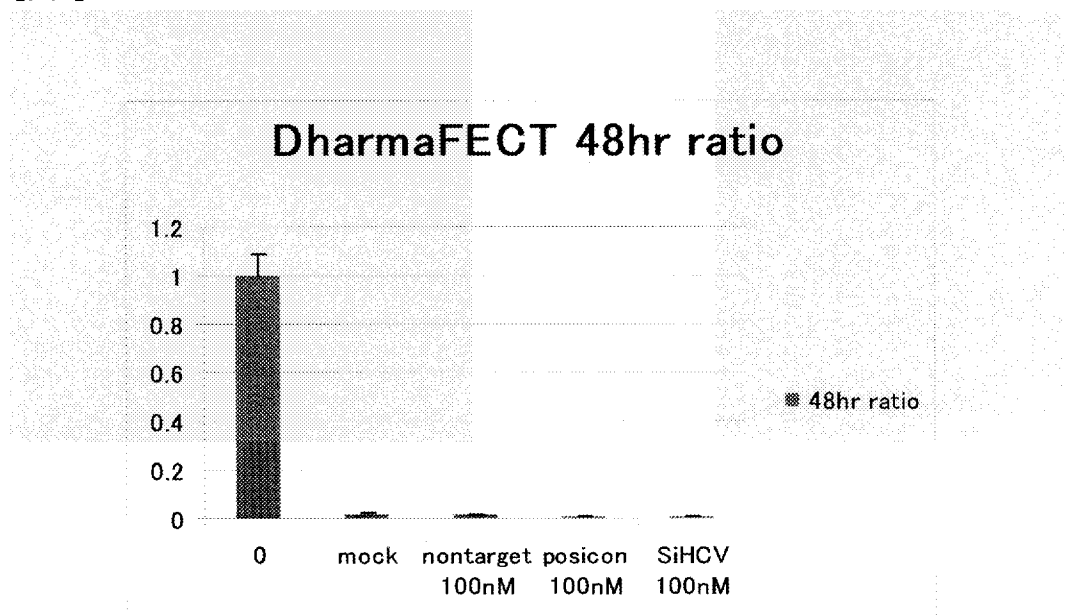
[図2]



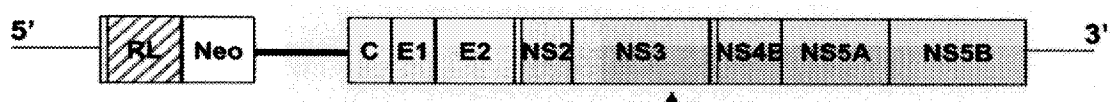
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058777

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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)

A61K31/7105, A61K9/127, A61K31/713, A61K47/08, A61K47/14, A61K47/18,
A61K47/20, A61K47/22, A61K47/28, A61K47/42, A61K47/48, A61K48/00,
A61P31/12, A61P35/00, C12N15/09

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CAP/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JUNG, J. et al, Bio-nanocapsules for in vivo pinpoint drug delivery, Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2007, Vol.127, No.5, p.797-805	1-7
Y	JP 2008-029249 A (Osaka University), 14 February 2008 (14.02.2008), claims; paragraphs [0014], [0042] (Family: none)	1-7
Y	WO 2009/044793 A1 (Alphagen Co., Ltd.), 09 April 2009 (09.04.2009), claims (Family: none)	1-7

☒ 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

"T" 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
02 July, 2010 (02.07.10)Date of mailing of the international search report
13 July, 2010 (13.07.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058777

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Taro YAMASHITA et al., "EpCAM o Mochiita Kan Saibogan Bunrui no Kakuritsu, Kangan Kansaibo no Dotei to sono Chiryo eno Oyo", Acta Hepatologica Japonica, 30 April 2009 (30.04.2009), vol.50, Suppl.(1), page A96	1-7
Y	JP 2005-533517 A (Chiron Corp.), 10 November 2005 (10.11.2005), claims & WO 2004/011647 A1 & EP 1532248 A1 & EP 1532248 B1	1-7
Y	JP 2009-501513 A (Merck & Co., Inc.), 22 January 2009 (22.01.2009), claims & WO 2007/001928 A2 & EP 1896619 A2	1-7
Y	JP 2001-316298 A (Japan Science and Technology Corp.), 13 November 2001 (13.11.2001), paragraph [0122] & WO 2001/064930 A1 & EP 1262555 A1 & US 2003/092069 A1 & JP 4085231 B2 & US 7597905 B2	3-5
P,X P,Y	JP 2009-213470 A (Yamaguchi University), 24 September 2009 (24.09.2009), claims (Family: none)	1,2,4-7 3-5
P,Y	JP 2010-077091 A (Kabushiki Kaisha Bikuru), 08 April 2010 (08.04.2010), claims (Family: none)	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058777

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61K31/7105(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
A61K47/08(2006.01)i, A61K47/14(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i,
A61K47/20(2006.01)i, A61K47/22(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i,
A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058777

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.: 8, 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions set forth in claims 8 and 9 pertain to methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter on which the International Searching Authority is not required
(Continued to extra sheet)
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058777

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i)
and PCT Rule 39.1(iv).

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. 特別ページ参照

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. A61K31/7105, A61K9/127, A61K31/713, A61K47/08, A61K47/14, A61K47/18, A61K47/20, A61K47/22, A61K47/28, A61K47/42, A61K47/48, A61K48/00, A61P31/12, A61P35/00, C12N15/09

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 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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）

CAP/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の 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 請求項の番号
Y	JUNG, J. et al, Bio-nanocapsules for in vivo pinpoint drug delivery, Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2007, Vol.127, No.5, p.797-805	1-7
Y	JP 2008-029249 A (国立大学法人大阪大学) 2008.02.14, 請求項、【0014】、【0042】等 (ファミリーなし)	1-7

☒ 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

0 2 . 0 7 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 7 . 2 0 1 0

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100-8915

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）

伊藤 基章

4 C

4 1 4 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求項の番号
Y	WO 2009/044793 A1 (株式会社アルファジェン) 2009. 04. 09, 請求項等 (ファミリーなし)	1-7
Y	山下太郎 他, EpCAM を用いた肝細胞癌分類の確立, 肝癌幹細胞の同定とその治療への応用 , 肝臓, 2009. 04. 30, Vol. 50, Suppl. (1), p. A96	1-7
Y	JP 2005-533517 A (カイロン コーポレイション) 2005. 11. 10, 請求項等 & WO 2004/011647 A1 & EP 1532248 A1 & EP 1532248 B1	1-7
Y	JP 2009-501513 A (メルク エンド カンパニー インコーポレーテッド) 2009. 01. 22, 請求項等 & WO 2007/001928 A2 & EP 1896619 A2	1-7
Y	JP 2001-316298 A (科学技術振興事業団) 2001. 11. 13, 【0122】等 & WO 2001/064930 A1 & EP 1262555 A1 & US 2003/092069 A1 & JP 4085231 B2 & US 7597905 B2	3-5
P, X	JP 2009-213470 A (国立大学法人山口大学) 2009. 09. 24, 請求項等	1, 2, 4-7
P, Y	(ファミリーなし)	3-5
P, Y	JP 2010-077091 A (株式会社ビークル) 2010. 04. 08, 請求項等 (ファミリーなし)	1-7

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（PCT17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 8, 9 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、
請求項 8, 9に係る発明は、手術又は治療における人体又は動物の体の処置方法を包含するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
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PCT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。

発明の属する分野の分類

A61K31/7105(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
A61K47/08(2006.01)i, A61K47/14(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i, A61K47/20(2006.01)i,
A61K47/22(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i,
A61K48/00(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n