

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-506696
(P2015-506696A)

(43) 公表日 平成27年3月5日(2015.3.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-555484 (P2014-555484)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月31日 (2013.1.31)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月30日 (2014.7.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/000791
 (87) 国際公開番号 W02013/115579
 (87) 国際公開日 平成25年8月8日 (2013.8.8)
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0009811
 (32) 優先日 平成24年1月31日 (2012.1.31)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0010233
 (32) 優先日 平成25年1月30日 (2013.1.30)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 513262676
 インダストリー・アカデミック・コーポレーション・ファウンデーション・ヨンセイ・ユニヴァーシティ
 大韓民国・ソウル・120-743・ソデムング・シンチョン・ドン・ヨンセイ・ロ・50・ヨンセイ・ユニヴァーシティ
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

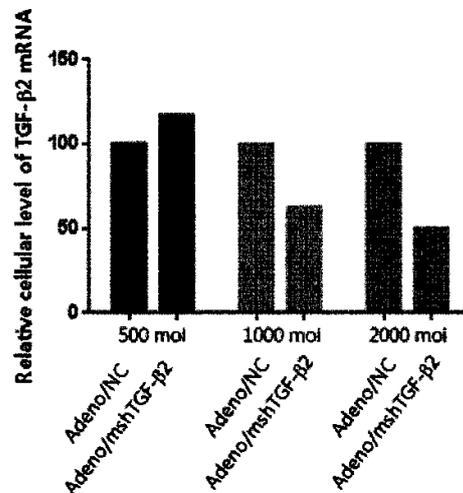
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TGF-β2発現を抑制するshRNA

(57) 【要約】

本発明は、TGF-β2発現を抑制するshRNAに関する。

本発明によれば、TGF-β2発現を抑制するshRNAを用いた抗腫瘍組成物を提供することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 または 2 に表される塩基配列を標的配列とし、TGF- β 2 発現を抑制する shRNA。

【請求項 2】

配列番号 3 または 4 に表される請求項 1 に記載の shRNA。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の shRNA を有効成分として含む抗腫瘍組成物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の shRNA を発現する組換え発現ベクター。

10

【請求項 5】

配列番号 5 に表されるトップストランド (top strand) と、配列番号 6 に表されるボトムストランド (bottom strand) と、を有する DNA を含む請求項 4 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 6】

配列番号 7 に表されるトップストランド (top strand) と、配列番号 8 に表されるボトムストランド (bottom strand) と、を有する DNA を含む請求項 4 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 7】

U6 プロモーターを含むベクターに DNA を組換えさせて収得する請求項 4 に記載の組換え発現ベクター。

20

【請求項 8】

pSP72-E3-sh-human TGF- β 2 または pSP72-E3-sh-mouse TGF- β 2 である請求項 4 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 4 に記載の組換え発現ベクターを有効成分とする抗腫瘍組成物。

【請求項 10】

請求項 4 に記載の組換え発現ベクターを導入したアデノウイルス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、TGF- β 2 発現を抑制する shRNA 及びこれを含む抗腫瘍組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

TGF- β 2 は、TGF- β 1 と同様に、細胞毒性 T 細胞、ナチュラルキラー細胞、そしてマクロファージなどの増殖と分化を抑制してますます大きくなる腫瘍に対する免疫応答を阻害するだけでなく、多機能の分泌タンパク質で細胞の形態 (type) と時期によって増殖抑制、複製、浸潤、転移、細胞死滅、免疫応答、そして血管生成など多様な役割を行うだけでなく、TGF- β 1 のように、TGF- β 2 も信号経路を非活性化させるか、あるいは細胞周期の非正常的な調節などに起因して、TGF- β 2 による増殖抑制作用に抵抗性を生じる腫瘍が進行 (progression) する後期に至ると、TGF- β 2 は腫瘍をさらに発展させる役割をすることになる。よって、人体の免疫体系を克服して増殖した腫瘍細胞は TGF- β 2 を分泌することで、免疫監視から自由であり同時に増殖と浸潤転移及び血管生成にプラス要因として作用することになる。TGF- β 2 が TGF- β 1 とは明白に異なった作用をする点は以下である。TGF- β 2 が Foxp3 を誘導して免疫抑制誘導を著しく進行させるとのことと、腫瘍の転移、新生血管形成、そして増殖などにも影響を及ぼして悪性としての腫瘍進行を誘導することである。

40

【0003】

TGF- β 2 に係る先行研究である、非特許文献 1 には、人間 TGF- β 2 のコーディ

50

ング配列に対する合成 18 - mer ホスホチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド (phosphothioate antisense oligonucleotide) を用い、腫瘍の免疫抑制除去、腫瘍の大きさ減少、リンパ節への転移及び血管形成減少などが観察されたが、その効果は不十分であった。

【 0 0 0 4 】

非特許文献 2 には、murine の TGF - 2 に対する shRNA を、TGCTGT TGACAGTGAAGCGCGGTGTATAAATCGAGACCAAAATTAGTGT GAAGCCACAGATGTATTTGGTCTCGATTTATACACCTTG CCCCTACTGCCCTCGGA (target) で製作し、さらに TGF - 2 shRNA を生成するレンチウイルス (lentivirus) を製作したが、レンチウイルスが染色体にインテグレーション (integration) して癌がなくなった後にも正常細胞には引き続き伝達される副作用が大きな問題となった。

10

【 0 0 0 5 】

【非特許文献 1】Schlingensiepen et al、Transforming growth factor-beta2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer、Cancer Sci 102: 1193-1200、2011.

【非特許文献 2】Chenyu Zhanget al、Transforming growth factor- 2 is a molecular determinant for site-specific melanoma metastasis in the brain、Cancer Res.2009 February 1;69(3):828-35.

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

そこで、本発明者は、上記のような問題点を解決するために研究努力した結果、人間 TGF - 2 またはマウス TGF - 2 の沈黙 (silencing) を効果的に誘導するターゲットを選定して shRNA を製作し、これをアデノウイルスに搭載させて既存の非ウイルス性製剤による shRNA の伝達能力を画期的に改善させることで、本発明が完成された。

【 0 0 0 7 】

したがって、本発明は、配列番号 1 または 2 と表される塩基配列を標的配列とし、TGF - 2 発現を抑制する shRNA を提供することにその目的がある。

30

【 0 0 0 8 】

本発明は、また、前記 shRNA を有効成分として含む抗腫瘍組成物を提供することに他の目的がある。

【 0 0 0 9 】

本発明は、また、前記 shRNA 発現する組換え発現ベクターを提供することにさらに他の目的がある。

【 0 0 1 0 】

本発明は、また、前記組換え発現ベクターを有効成分とする抗腫瘍組成物を提供することにさらに他の目的がある。

【 0 0 1 1 】

本発明は、また、前記組換え発現ベクターが導入されたアデノウイルスを提供することにさらに他の目的がある。

40

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

本発明は、前記課題を解決するための手段として、配列番号 1 または 2 に表される塩基配列を標的配列とし、TGF - 2 発現を抑制する shRNA を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明は、前記課題を解決するための他の手段として、前記 shRNA を有効成分で含む抗腫瘍組成物を提供する。

【 0 0 1 4 】

50

本発明は、前記課題を解決するためのさらに他の手段として、前記 s h R N A 発現用の組換え発現ベクターを提供する。

【0015】

本発明は、前記課題を解決するためのさらに他の手段として、前記組換え発現ベクターを有効成分として含む抗腫瘍組成物を提供する。

【0016】

本発明は、前記課題を解決するためのさらに他の手段として、前記組換え発現ベクターが導入されたアデノウイルスを提供する。

【発明の効果】

【0017】

本発明は、TGF- β 2 発現を抑制する新たな s h R N A を製作し、遺伝子伝達体としてアデノウイルスを使用して感染率を増加させることで、従来技術と比較して特異性、伝達能及び発現抑制能を大きく向上させた。

【0018】

すなわち、本発明により、TGF- β 2 発現を抑制する s h R N A を含む抗腫瘍組成物が提供される。特に、大部分の癌細胞において伝達効率性が優れたアデノウイルスに標的性を付与することで、すべての癌に適用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】E3シャトルベクターである p S P 7 2 E 3 / s i - n e g a t i v e ベクターを示す図である。

【図2】TGF- β 2 s h R N A が、シャトルベクターでサブクローニング (s u b c l o n i n g) された後に、アデノウイルスバックボーンである d 1 3 2 4 と相同組換えする過程の模式図である。

【図3】実際に、組換えが容易なバクテリアから相同組換えされたコロニーの選択のために、(a) はアデノウイルスの E 3 部位の P C R 結果を示すものであり、(b) はアデノウイルスの I X 遺伝子部位の P C R 結果を示すものであり、(c) は相同組換えされたアデノウイルスゲノム (g e n o m i c) D N A のトランスフェクション (t r a n s f e c t i o n) 可能可否を確認する P a c I 切断後の断片 (f r a g m e n t) D N A が出現する結果を示すものである。

【図4】H i n d I I I 切断パターン (d i g e s t i o n p a t t e r n) で最終組換えされたコロニーを選択確認したものである。

【図5】図4の選択されたコロニーが s h R N A h T G F - β 2 塩基配列を有しているか否かを配列分析で確認した結果である。

【図6】実施例2の人間TGF- β 2 s h R N A を発現するアデノウイルスによるTGF- β 2 発現抑制能をリアルタイム - P C R で確認したものである。

【図7】実施例2のマウスTGF- β 2 s h R N A を発現するアデノウイルスによるTGF- β 2 発現抑制能をリアルタイム - P C R で確認したものである。

【図8】実施例2のマウスTGF- β 2 s h R N A を発現するシャトルベクターによるTGF- β 2 発現抑制能をリアルタイム - P C R で確認したものである。

【図9】実施例2の人間TGF- β 2 s h R N A を発現するアデノウイルスによるTGF- β 2 発現抑制能を E L I S A で確認したものである。

【図10】p B S K I I - 3 4 8 4 ベクター (a) 、 p C A 1 4 - 3 4 8 4 ベクター (b) 、 p C A 1 4 - C M V - 3 4 8 4 ベクター (c) 、及び p C A 1 4 - C M V - 3 4 8 4 - E 1 B 5 5 ベクター (d) を示すものである。

【図11】d 1 3 2 4 アデノウイルスから d 1 3 2 4 - C M V - 3 4 8 4 - s h T G F - β 2 アデノウイルスを製作する過程を示す模式図である。

【図12】マウス s h T G F - β 2 が含まれた相同組換え過程を示すものであって、E 3 スクリーニングで相同組換えされたコロニーを選択確認し (a) 、H i n d I I I 切断パターンによる相同組換えされたクローン (1 、 2 、 4) を選択確認し (b) 、前記クローン

10

20

30

40

50

1、2、4のDNAをPacIで切断した場合、クローン1だけがまともに相同組換えされたことを確認(c)したものである[C:対照群、d1324-E3-sh-mTGF2、S:シャトルベクターpCA14-CMV-3484-E1B55、1~6:相同組換えされたコロニー]。

【図13】人間shTGF-2が含まれた相同組換え過程を示すものであって、HindIII切断パターン(digestion pattern)で相同組換えされたコロニーを選択確認(a)、PacI切断後に相同組換えされたコロニーを最終選択確認(b)したものである[C:対照群、d1324-E3-sh-mTGF2、1~3:相同組換えされたコロニー]。

【図14】実施例4の腫瘍選択的複製可能アデノウイルスの癌細胞から細胞溶血を確認したものである。

【図15】人間TGF-2 shRNAを発現するアデノウイルスと人間TGF-1 shRNAを発現するアデノウイルスによるhTGF-1、2、3発現抑制能をリアルタイム-PCR結果として比較したものである。

【図16】人間TGF-2 shRNAを発現するアデノウイルスと人間TGF-1 shRNAを発現するアデノウイルスによるTGF-1、2、3発現抑制能をELISA結果として比較したものである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

RNA干渉(RNA interference、RNAi)は、標的遺伝子の発現を選択的に抑制する天然のメカニズムである。配列特異的なmRNA分解の媒介者は、より長いdsRNAからリボヌクレアーゼIIIの切断により生産された19~23ヌクレオチドの小さな干渉RNAである。細胞質のRISC(RNA-induced silencing complex)はsiRNAに結合し、そのsiRNAのうち、1本鎖に相補的な配列を含むmRNAの分解を指示する。哺乳動物においてRNA干渉の適用は、治療遺伝子沈黙(silencing)の機能を有する。siRNAの長所を有しながらも、siRNAは試験管内で製造しなければならず、ノックダウン遺伝子を、通常的に6~10日間一時的形質感染によって伝達されるべきであることから臨床適用に制限を有する。本発明に係るshRNA(small-hairpin RNA)発現システムが上記のような短所を解決することができる。

【0021】

shRNAは、1本鎖のRNAにおいて部分的に回文状の塩基配列を含むことで、分子内で2本鎖の構造を有し、ヘアピンのような構造となる約20塩基以上の分子である。

【0022】

本発明は、TGF-2発現を抑制するshRNAに関し、下記配列を標的配列とすることを特徴とする。

【0023】

マウス標的配列: 5'-GGATTGAAC TGTATCAGATCCTTAA-3'

[配列番号1]

【0024】

人間標的配列: 5'-GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA-3' [配列番号2]

【0025】

本発明において、TGF-2発現を抑制するshRNAは、TGF-2遺伝子の一部に相補的な配列を有し、TGF-2遺伝子のmRNAを分解したり、翻訳を抑制したりすることができる。相補性が80~90%の場合には、mRNAの翻訳を抑制することができ、100%の場合には、mRNAを分解させることができる。

【0026】

したがって、本発明においてTGF-2発現を抑制するshRNAは、マウスmRNAの494~518番目のヌクレオチドに、人間mRNAの578~602番目のヌクレ

10

20

30

40

50

オチドに対する相補的な配列に対して80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは100%相同性を有する塩基配列を含むことができる。

【0027】

一態様として、マウスのshRNAは、配列番号1(標的配列)に示された塩基配列とその相補的な塩基配列からなっていて、人間のshRNAは配列番号2(標的配列)に示された塩基配列とその相補的な塩基配列からなることができる。前記のそれぞれの塩基配列とその相補的な塩基配列は、4~10bpのループ領域により回文的に(palindrom)連結されてヘアピン構造を形成することができる。

【0028】

本発明のshRNAの具体的な例としては、下記配列を含むことができる：

10

【0029】

配列番号1のマウス標的配列とするshRNA：5'-GGATTGAAGCTGTATCAGATCCTTAA tctc TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC-3' [配列番号3]

【0030】

配列番号2の人間標的配列のためのshRNA：5'-GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA tctc TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC-3' [配列番号4]

【0031】

RNAiによりTGF- β 2の発現を抑制する物質としては、3'末端に突出部を有する短いヘアピン構造で構成されたshRNA(short hairpin RNA)を使用することができる。

20

【0032】

RNAiによりTGF- β 2の発現を抑制する物質は、人工的に化学合成してもよく、センス鎖及びアンチセンス鎖のDNA配列を逆方向に連結したヘアピン構造のDNAをT7RNAポリメラーゼにより実験室条件(in vitro)でRNAを合成して製作してもよい。実験室条件で合成する場合、T7RNAポリメラーゼ及びT7プロモーターを用いて、鋳型DNAからアンチセンス及びセンスRNAを合成することができる。これらを実験室条件でアニーリングした後に、細胞に導入するとRNAiが誘発され、TGF- β 2 mRNAの分解を誘導する。細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法、または各種トランスフェクション試薬(例えば、oligofectamine、lipofectamine及びlipofectionなど)を用いた方法によって行われる。

30

【0033】

RNAiによりTGF- β 2の発現を抑制する物質としては、shRNAまたは前記DNAを含む発現ベクターを用いてもよく、前記発現ベクターを含む細胞を用いてもよい。前記発現ベクターや細胞の種類は特に限定しないが、既に医薬として使用されている発現ベクターや細胞が好ましい。

【0034】

本発明では、配列番号1または2に表される塩基配列を標的配列とするshRNAが用いられる。

40

【0035】

したがって、本発明は、前記shRNA発現用の組換え発現ベクターを含む。

【0036】

本発明の組換えベクターは、当該分野に公知された組換えDNA方法によって構成される。

【0037】

本発明においてshRNAを伝達するのに有用なウイルス(またはウイルスベクター)としては、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルスなどがあり、腫瘍のように制限的な発現誘導が必要な理由として、アデノウイルスが好ましい。

50

【0038】

アデノウイルスに前記 s h R N A を導入するために、s h R N A 配列に基づいて下記の D N A を製作することができる。

【0039】

<マウス標的配列に対する D N A >

トップストランド：5' - g a t c c G G A T T G A A C T G T A T C A G A T C C
T T A A t c t c T T A A G G A T C T G A T A C A G T T C A A T C C t t t t
a - 3' [配列番号5]

【0040】

ボトムストランド：5' - a g c t t a a a a G G A T T G A A C T G T A T C A
G A T C C T T A A g a g a T T A A G G A T C T G A T A C A G T T C A A T C C
g - 3' [配列番号6]

10

【0041】

<人間標的配列に対する D N A >

トップストランド：5' - g a t c c G G A T T G A G C T A T A T C A G A T T C
T C A A t c t c T T G A G A A T C T G A T A T A G C T C A A T C C t t t t
a - 3' [配列番号7]

【0042】

ボトムストランド：5' - a g c t t a a a a G G A T T G A G C T A T A T C A
G A T T C T C A A g a g a T T G A G A A T C T G A T A T A G C T C A A T C C
g - 3' [配列番号8]

20

【0043】

また、本発明において s h R N A を伝達するのに有用な非ウイルスベクターとしては、上述のウイルスベクターを除いた通常に遺伝子療法に用いるすべてのベクターを意味し、そのような例としては、真核細胞で発現可能な多様なプラスミド及びリボソームなどがある。

【0044】

一方、本発明において T G F - 2 発現を抑制する s h R N A は、伝達された細胞に適切に転写されるために、少なくともプロモーターに作動可能に連結されることが好ましい。前記プロモーターは真核細胞で機能するプロモーターであればどれでもよいが、U 6 プロモーターが R N A 重合酵素 III として s m a l l s i z e R N A を生成するのに有利な理由として特に好ましい。T G F - 2 発現を抑制する s h R N A の効率的な転写のために必要に応じてリーダー配列、ポリアデニル化配列、プロモーター、エンハンサー (e n h a n c e r)、アップストリーム (u p s t r e a m) 活性化配列、シグナルペプチド配列及び転写終結因子を含む調節配列をさらに含むことができる。

30

【0045】

ここで、用いられる用語「作動可能に連結された」とは、核酸配列との間の結合が機能的に連関されていることを意味する。任意の核酸配列が作動可能に連結された場合は、任意の核酸配列が他の核酸配列と機能的に関連性を有するように位置している場合である。本発明において、任意の転写調節配列が s h R N A の転写に影響を及ぼす場合、前記転写調節配列が前記 s h R N A と作動可能に連結されているという。

40

【0046】

また、本発明は、前記配列番号3または4の T G F - 2 発現を抑制する s h R N A、配列番号5に表されるトップストランド (t o p s t r a n d) と、配列番号6に表されるボトムストランド (b o t t o m s t r a n d) を含む D N A または配列番号7に表されるトップストランド (t o p s t r a n d) と、配列番号8に表されるボトムストランド (b o t t o m s t r a n d) を含む D N A またはこれを発現する組換え発現ベクターを有効成分として含む抗腫瘍組成物に関する。

【0047】

本発明の抗腫瘍組成物の投与経路は、特に限定されず、経口投与または非経口投与 (例

50

えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膣内投与、患者への局所投与、皮膚投与など)のいずれか1つの投与経路に投与してもよい。経口投与の適当な製剤形態としては、固形または液体の形態が可能であって、非経口投与の適当な製剤形態としては、注射剤、点滴剤、坐剤、外用剤、点眼剤、点鼻剤などの形態が可能である。本発明の抗腫瘍組成物は、その製剤形態によって、必要に応じて薬学的に許容可能な添加剤を含んでもよい。薬学的に許容可能な添加剤の具体的な例としては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、保存剤、安定化剤、等張化剤、着色剤、矯味剤、希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、充填剤、増量剤、緩衝剤、送達担体、キャリア、賦形剤及び/または薬学的アジュバントなどがあげられる。

【0048】

経口用の固形製剤形態の本発明の抗腫瘍組成物としては、例えば、有効成分に賦形剤を加え、それと共に、必要に応じて、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤または矯味剤などの製剤用添加物を加えた後、通常方法で、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤として調製することができる。経口用液体製剤形態の本発明の抗腫瘍組成物としては、有効成分として、矯味剤、安定化剤、または保存剤などの製剤用添加物1種または2種以上を加え、通常方法により、内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤などとして調製することができる。

【0049】

本発明の抗腫瘍組成物を液体製剤として処方するために用いる溶媒としては、水性または非水性のいずれでもよい。液体製剤は当該分野に周知の方法により調製することができる。例えば、注射剤は、生理食塩水、PBSのような緩衝液、滅菌水などの溶剤に溶解した後、濾過紙などに濾過滅菌し、続いて滅菌容器(例えば、アンプルなど)に充填して調製することができる。この注射剤には、必要に応じて、慣用の薬学的キャリアを含んでもよい。

【0050】

また、非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法を使用してもよい。本発明で使用する事ができるキャリアとしては、中性、緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンを含む生理食塩水などがあげられる。

【0051】

TGF- β 2発現を抑制するshRNA発現ベクターなど遺伝子送達については、適用される細胞内においてTGF- β 2発現を抑制するshRNAまたはshRNA発現ベクターを発現させている限り、特に方法は限定しないが、例えば、ウイルスベクター、リボソームを用いた遺伝子導入を利用することが可能である。ウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、レンチウイルスなどの動物ウイルスがあげられる。

【0052】

RNAiによりTGF- β 2発現を抑制する物質は、細胞に直接注入してもよい。

【0053】

本発明の抗腫瘍組成物の有効成分は治療学的有効量として用い、前記組成物の投与量は、使用目的、疾患の中毒度、患者の年齢、体重、性別、既往歴、または有効成分として用いる物質の種類などを考慮して当業者が決定することができる。例えば、有効成分として、大人1kg当たり約 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ particlesである。本発明の抗腫瘍組成物の投与頻度は、例えば、1日1回~数ヶ月に1回であればよい。

【0054】

本発明のshRNAは、TGF- β 2発現を抑制するので、本発明の薬剤学的組成物は、腫瘍と係る多様な疾病または疾患、例えば癌、具体的には、脳癌、胃癌、肺癌、乳房癌、卵巣癌、肝臓癌、気管支癌、鼻咽頭癌、喉頭癌、食道癌、膵臓癌、膀胱癌、前立腺癌、大腸癌、結腸癌及び子宮頸部癌などの予防及び治療に利用される。本明細書において用語「治療」は(i)腫瘍細胞形成の予防；(ii)腫瘍細胞の除去による腫瘍と係る疾病または疾患の抑制；及び(iii)腫瘍細胞の除去による腫瘍と係る疾病または疾患の軽減を意味する。よって、本明細書において用語「治療学的有効量」は上記の薬理学的効果を

10

20

30

40

50

達成するのに十分な量を意味する。

【実施例】

【0055】

以下、本発明に係る実施例で本発明をより詳しく説明されるが、本発明の範囲が下記実施例によって制限されない。

実施例1：shRNA製造 - TGF- β 2の沈黙 (silencing) を効果的に誘導するターゲット選定

【0056】

本発明は、TGF- β 2の沈黙 (silencing) を誘導するために、センス25mer / アンチセンス25mer (4個塩基を有するループを含む) に基づいたshRNAを製作し、アデノウイルスで発現させるためにシャトルベクターに導入し、相同組換え (homologous recombination) ウイルスを製作した。

10

【0057】

shRNA TGF- β 2の特異性検証のために、スクランブルド (scrambled) shRNAを有するシャトルベクターも同時に製作した。従来方法と比較して特異性と発現抑制能が大きく向上した。

【0058】

このために、TGF- β 2のshRNA最小10nMでマウスのTGF- β 2 mRNAを75%以上抑制する効果があるshRNAを、リアルタイムPCR方法を介して確保した。

20

【0059】

このために、マウス用shRNAは、皮膚癌細胞であるB16F10にトランスフェクションさせ、24時間が過ぎた後に減少される程度を調査した。

【0060】

次は、実験方法である。

リアルタイムRT-PCRで多様な種類の候補shRNA 10nMを30% B16F10にトランスフェクションし、24時間培養後、確認 (validation) を介してマウスTGF- β 2に対して5個のshRNAスクリーニングの結果、ターゲットに該当されるshRNAにおいて73.75%の沈黙 (silencing) 効果を確認した。

30

【0061】

リアルタイムRT-PCRのために、正方向プライマーとしては、5' - GTGAATGGCTCTCCTTCGAC - 3' [配列番号9]と逆方向プライマーとしては、5' - CCTCGAGCTCTTCGCTTTTA - 3' [配列番号10]であって、反応条件は、次のように行った。

【0062】

- 1段階：逆転写 (42 $^{\circ}$ 5min、95 $^{\circ}$ 10sec)、
- 2段階：PCR反応 (95 $^{\circ}$ 5sec、60 $^{\circ}$ 20sec) 50cycles、
- 3段階：分離 (60 $^{\circ}$ -> 95 $^{\circ}$) で行った。

【0063】

確認 (validation) 実験結果、10個の標的配列候補のうち、下記表1に基づいて下記ターゲットを選定した。

40

【0064】

マウス標的配列：5' - GGATTGAAC TGTATCAGATCCTTAA - 3' [配列番号1]

【0065】

【表 1】

shRNA	プライマー	ct	Δ ct	$\Delta\Delta$ ct	$2^{-\Delta\Delta$ ct	発現抑制率(%)
Scrambled shRNA (陰性対照群)	actin	15.83				
	Trp53	25.45	9.62			
	mTGF- β 2	24.32	8.49			
Trp53 (陽性対照群)	actin	15.61				
	mTGF- β 2	27.6	11.99	2.37	0.193446	80.6554376
mTGF- β 2 shRNA	actin	16.08				
	mTGF- β 2	26.5	10.42	1.93	0.262429	73.7570829

10

【0066】

注) ct: cycle threshold, saturationに到達するのに所要されたサイクル数、小さいほど元のmRNA量は多くなる。

【0067】

ct: TGF- β 2用ctからactin用ctを引いた値。

ct: TGF- β 2 shRNA処理サンプルのctから対照群のTGF- β 2のctを引いた値。

$2^{-\Delta\Delta$ ct: 2のマイナス指数の $\Delta\Delta$ ct値

発現抑制率: $2^{-\Delta\Delta$ ctを百分率で表したものである。

20

【0068】

前記標的配列に対して25/25+4ループを有するshRNAを合成し、これらの標的配列に対する抑制効果をリアルタイムPCRで確認した。

【0069】

マウス標的配列(配列番号1)とするshRNA: 5'-GGATTGAACGTGTATCAGATCCTTAA tctc TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC-3' [配列番号3]

【0070】

上述のリアルタイムPCRによって選定された配列番号3の塩基配列をアデノウイルスで発現させるために、両端にBamHIとHindIII塩基サイトを挿入し、中間にtctcの4個の塩基を有するループ(loop)を有するように製作した。すなわち、マウスshRNAの基本的な構造は5'-25mer-ループ(4mer)-25mer-3'で構成されている。

30

【0071】

これに基づいて、アデノウイルスに導入するための下記の2本鎖のDNAストランド(strand)を製作してshRNA生成を誘導した。

【0072】

トップストランド: 5'-gatcc GGATTGAACGTGTATCAGATCC TTAATctc TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC tttta-3' [配列番号5]

40

【0073】

ボトムストランド: 5'-agcctt aaaa GGATTGAACGTGTATCAGATCCTTAA gaga TTAAGGATCTGATACAGTTCAATCC g-3' [配列番号6]

【0074】

人間TGF- β 2抑制のためのリアルタイムPCR用プライマーは次のようである。

【0075】

正方向プライマー: 5'-GCTGCCTACGTCCACTTTACAT-3' [配列番号11]

【0076】

50

逆方向プライマー：5' - ATATAAGCTCAGGACCCCTGCTG - 3' [配列番号12]

【0077】

反応条件は、1段階：逆転写（42 5 min、95 10 sec）、2段階：PCR反応（95 5 sec、60 20 sec）50 cycles、3段階：分離（60 -> 95）で行った。

【0078】

確認（validation）実験結果、3個の標的配列候補のうち、下記表2に基づいて下記ターゲットを選定した。

【0079】

人間標的配列：5' - GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA - 3' [配列番号2]

【0080】

【表2】

shRNA	プライマー	ct	Δ ct	$\Delta\Delta$ ct	2- $\Delta\Delta$ ct	発現抑制率(%)
Scrambled shRNA (陰性対照群)	actin	20.98				
	Trp53	20.19	-0.79			
	mTGF- β 2	26.94	5.96			
Trp53 (陽性対照群)	actin	20.78				
	mTGF- β 2	24.09	3.31	4.1	0.058315	94.1685438
mTGF- β 2 shRNA	actin	20.19				
	mTGF- β 2	29.71	9.52	3.56	0.084788	91.521223

【0081】

前記標的配列に対して25/25+4ループを有するshRNAを合成し、これらの標的配列に対する抑制効果をリアルタイムPCRで確認した。

【0082】

人間標的配列（配列番号2）のためのshRNA：5' - GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA tctc TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC - 3' [配列番号4]

【0083】

上述のリアルタイムPCRにより選定された配列番号4の塩基配列をアデノウイルスで発現させるために、両端にBamHIとHindIII塩基サイトを挿入し、中間にtctcの4個の塩基を有するループを有するように製作した。すなわち、人間shRNAの基本構造は、5' - 25mer - ループ(4mer) - 25mer - 3' で構成されている。

【0084】

これに基づいて、アデノウイルスに導入させるための下記2本鎖のDNAを製作した。

【0085】

トップストランド：5' - gatcc GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA tctc TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC tttta - 3' [配列番号7]

【0086】

ボトムストランド：5' - agctt aaaa GGATTGAGCTATATCAGATTCTCAA gaga TTGAGAATCTGATATAGCTCAATCC g - 3' [配列番号8]

実施例2：ターゲット配列に対するshRNA発現する複製不能アデノウイルスベクター製作

【0087】

10

20

30

40

50

リアルタイムRT-PCRを介して確認された最も効果的に発現を抑制するshRNA塩基配列をセンスとアンチセンス配列がtcctcあるいはtcctctcを間に置いて位置するようにし、両端にBamHIとHindIII制限酵素塩基配列を有した塩基で構成された、オリゴヌクレオチドと相補的なオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成して合体(annealing)させた後、E3シャトルベクターであるpSP72 E3/si-negativeベクター[図1、pSP72cloningベクター(Promega)にアデノウイルスE3L(26591-28588)とE3R(30504-31057)を挿入し、Ambion社のpsilencer 2.1-U6hygroで-EcoRI-U6promoter+-BamHI-nonsense shRNA用塩基配列であるactaccgttggttatagggtgttcaagagacacctataacaacggtagttttttggaa-HindIIIが入った形態のpSP72 E3/si-negative(scrambled)]を製作した。

10

【0088】

人間またはマウスのshRNA TGF- β 2導入のために、まず、上記のpSP72 E3/si-negativeプラスミドをBamHIとHindIIIで処理した後、人間またはマウスのshRNA TGF- β 2を挿入させてpSP72 E3-sh-human TGF- β 2またはpSP72 E3-sh-mouse TGF- β 2を製作した[図2]。陰性対照群アデノウイルスとしては、両端にBamHIとHindIIIを有するようにし、スクランブルド(scrambled)塩基配列(actaccgttggttatagggtg)とloop(ttcaagaga)を製作した。

20

【0089】

アデノウイルスのE3部位PCRで養成クローン(#1、2、5、6、7、8、9)だけを選択した後、[図3の(a):dl324/IXアデノウイルスバックボーン(backbone)ゲノム(genomic)DNAとpSP72-sh-hTGF- β 2シャトルベクターとの相同組換え後、sh-hTGF- β 2が含まれたクローンを選択するPCR結果、図3の(b):dl324/IXアデノウイルスバックボーンゲノムDNAとpSP72-sh-hTGF- β 2シャトルベクターとの相同組換え後、IX遺伝子有無を介して図3の(a)で確認されたsh-hTGF- β 2が含まれたクローンのうちからゲノムDNAも含まれたクローンを再び選択するPCR結果]、図3の(c)で示すように、HindIII切断パターン(digestionpattern)で最終の相同組換え体を選択した[図4]。

30

【0090】

次に、図3及び図4を詳細に説明する。

【0091】

図3の(a)において、dl324/IXレーンはdl324バックボーンであり；シャトルレーンはpSP72-sh-hTGF- β 2である。レーン1~10は、dl324バックボーンとpSP72-sh-hTGF- β 2との間の相同組換え後、バクテリアクローン(bacterial clone)から得たプラスミドをE3部位に増幅させた結果を示すもので、約2kbに相当するバンドが示されればpositiveである。E3部分をPCRしたとき、E3部分のないdl324バックボーンでは2kbに相当するバンドが示されないが、E3部分に、U6プロモーターとsh-hTGF- β 2とのshコンストラクト(construct)が挿入されたシャトルベクターの場合、PCRすると2kbのプロダクト(product)の大きさ(size)が示されることにより相同組換えされたか否かを確認することができる。

40

【0092】

図3の(b)において、dl324/IXレーンはdl324バックボーンであり；シャトルベクターはpSP72-hTGF- β 2である。図3の(a)で確認されたsh-hTGF- β 2が含まれたクローン(#1、2、5、6、7、8、9)のうちからゲノムDNAも含まれたクローンを再び選択するPCR結果で相同組換えされたことを確認する、図3の(a)に続いて連続的な選択実験により両方でpositiveしたクローンが

50

相同組換えされたことを意味する。IX遺伝子部分をPCRしたとき、IX遺伝子を有するd1324バックボーンとIX遺伝子を有しないシャトルベクターとの差を用いて相同組換えされたか否かを確認した。その結果、#1、2、6、7だけが再び選択された。

【0093】

図3の(c)は、バックボーンとサンプルとをHindIIIでカッティング(cutting)したときに変化するパターンとの差により相同組換えされたか否かを最終的に確認したものである。レーン1~3は前記#1クローン由来DNAであり、レーン4~6は#2クローン、レーン7~9は#6クローンで得たDNAをDH5aというコンピテントセル(competent cell)に再びトランスフォーメーション(transformation)して得た子孫(progeny)クローンで各母体(parental)クローンから来由されたそれぞれの3個のDNAのうち#1クローンだけが既存のd1324-IX(もっぱら左側一番目lane)とは異なったHindIIIパターンを示した。これは、バックボーンアデノウイルスDNAがシャトルベクターと相同組換えをなしたことを意味し、よって、本発明は#1クローンに基づいている。

10

【0094】

図4は、pPoly2というプラスミドにPacI部位に挿入されているAd-d1324-IX-sh-hTGF-2をPacIで切断してpPoly2がまともに切断されたか否かを確認することで、ウイルス生産に要求される最終コンストラクト(construct)を決定する実験である。図3の(c)から確認した#1クローンに属する3個のDNAは、PacIで切断時すべて約2kbに相当するpPoly2バックボーンDNAが全部出てしまった。これらが、それぞれのshRNA-hTGF-2塩基配列を有しているか否かを配列分析して確認した結果、すべてのクローンで同一のshRNA-hTGF-2塩基配列を有することを確認した(図5)。その後、これらをPacI切断後に一緒に293A細胞にトランスフェクション(transfection)してアデノウイルスを生産した。

20

【0095】

すなわち、前記方法で製作されたE3シャトルベクターをそれぞれのXmnI制限酵素で処理して単一鎖に作った後、SpeI制限酵素を処理して単一鎖となった複製不能アデノウイルスであるd1324とともに、大腸菌BJ5183で同時に形質転換させて遺伝子相同組換えを誘導した。相同組換えされたプラスミドDNAを収得してHindIII制限酵素で処理してDNAパターンの変化を確認し、最終的に配列分析して相同組換え有無を確認した後、確認されたプラスミドをPacIで切断した後、293細胞株に形質転換してshRNA-hTGF-2を発現する複製不能アデノウイルスを製作した(複製可能アデノウイルスにshRNAを製作する場合には、shRNAによる抑制効果と細胞リシース(lysis)効果とが混在されていて、抑制効果だけを明確に確認することができなかったため、複製不能アデノウイルスを製作した)。このアデノウイルスは、293細胞株で増殖させてCsCl変化度(gradient)で濃縮して限界希釈培養法(limiting dilution)または溶菌斑検査(plaque assay)でウイルス力価を決定した。

30

【0096】

最終ウイルス力価(virus titer)は、限界希釈適正法(limiting dilution titration)により 2.5×10^9 pfu/mlであった。

40

実施例3：癌細胞での効果確認 - shRNA発現するアデノウイルスによるTGF-2発現抑制確認

【0097】

1) リアルタイムRT-PCRで確認

TGF-2発現抑制確認は、人間の場合、人間前立腺癌細胞であるDU-145に実施例2のアデノウイルス1~100moiで感染させて2日後、トリゾール(Trizol)で細胞をリシス(lysis)させ、クロロホルム、イソプロパノール、エタノー

50

ルなどを連続的に処理してRNAを収獲した後、TGF- β mRNA発現抑制の程度をリアルタイムPCRで確認した。

【0098】

マウスの場合、マウス黒色腫細胞であるB16F10に、実施例2のアデノウイルス100、500、1000moiで感染させ、その後の過程は人間の場合と同様に実施した。

【0099】

人間TGF- β 抑制のためのリアルタイムPCR用プライマーは、正方向プライマー：5'-GCTGCCCTACGTCCACTTTACAT-3' [配列番号11]と逆方向プライマー：5'-ATATAAGCTCAGGACCCTGCTG-3' [配列番号12]を用い、AB powerSYBR Green RNA-to-Ct 1step kitを用いてRT enzyme mix (125X) 0.2 μ l、RT-PCR Mix (2x) 12.5 μ l、Forward Primer (100pM) 0.5 μ l、reverse Primer (100pM) 0.5 μ l、RNA (10ng/ μ l) 5 μ l、Nuclease-free water 6.3 μ lで総体積は25 μ lとなるようにし、反応条件は、次の表3のようである。

10

【0100】

マウスTGF- β 抑制のためのリアルタイムPCR用プライマーは、正方向プライマー：5'-GTGAATGGCTCTCCTTCGAC-3' [配列番号9]と逆方向プライマー：5'-CCTCGAGCTCTTCGCTTTTA-3' [配列番号10]を用い、AB powerSYBR Green RNA-to-Ct 1step kitを用いてRT enzyme mix (125X) 0.2 μ l、RT-PCR Mix (2x) 12.5 μ l、Forward Primer (100pM) 0.5 μ l、reverse Primer (100pM) 0.5 μ l、RNA (10ng/ μ l) 5 μ l、Nuclease-free water 6.3 μ lで総体積は25 μ lとなるようにし、反応条件は、次の表3のようである。

20

【0101】

【表3】

Step	Temp(°C)	Duration	Cycles
RT step	48	30min	Hold
Enzyme Activation	95	10min	Hold
Denature	95	15sec	40
Anneal/Extend	60	1min	

30

【0102】

人間TGF- β のshRNA確認結果、1moiのアデノウイルスで73%の沈黙 (silencing) 効果を示すなど、50moiのアデノウイルスで90%以上のTGF- β 発現抑制が観察された [表4、図6]。

40

【0103】

【表 4】

区分	発現抑制率(%)	
NC	0 moi	0
	1 moi	0
	5 moi	0
	10 moi	0
	50 moi	0
	100 moi	0
hTGF- β 2	0 moi	0
	1 moi	73.6554
	5 moi	80.34303
	10 moi	83.30102
	50 moi	91.61075
	100 moi	90.1877

10

注) NC: Scrambled shRNA sequenceが挿入されたアデノウイルス

20

【0104】

マウスTGF- β 2のshRNA確認結果、1000moiのアデノウイルスで50%の沈黙(silencing)効果を示した[図7]。人間と比較して相対的に低い抑制率は、マウス細胞に対するアデノウイルスの低い感染率に起因したものと見られる。これに対する確認は、マウスshTGF- β 2が発現するプラスミドをトランスフェクション(transfection)することで、発現されたshRNAが効果的にTGF- β 2 mRNAを抑制するものと確認した[図8]。

【0105】

2) ELISAで確認

上述のアデノウイルス1、5、10、50moi感染後、2日間人間の実施例2の前立腺癌細胞に培養しながら最後の24時間は無血清バッジに分泌されたTGF- β 2量を測定した。

30

【0106】

TGF- β 2のshRNAを発現するアデノウイルスを1moiだけ感染しても一日間に分泌されるTGF- β 2はほとんど検出されなかった[表5、図9]。これは、TGF- β 2のshRNAが非常に効果的にTGF- β 2のmRNAを分解していることを意味する。

【0107】

【表 5】

	区分	検出量(pg/ml, 平均±標準偏差)
NC	0 moi	330.2 ± 18.2
	1 moi	442 ± 13.75791
	5 moi	471.9 ± 6.878953
	10 moi	426.4 ± 28.95237
	50 moi	425.1 ± 51.80463
hTGF-β2	0 moi	431.6 ± 10.4
	1 moi	0
	5 moi	0
	10 moi	0
	50 moi	0

10

実施例 4：腫瘍選択的殺傷アデノウイルス製作

【0108】

複製不能なアデノウイルスで TGF-β2 に対する shRNA の効果を確認した後、この shRNA を発現しながら腫瘍選択的に細胞を殺傷するアデノウイルスを製作した。腫瘍選択的殺傷複製可能なアデノウイルスを作る前にアデノウイルスの E1A 部分に多様な遺伝子を入れることができるシャトルベクターを製作しようと、pBSKIIプラスミド [Stratagene, USA] に E1A と E1B55kDa 遺伝子を含み、多様な酵素部位 (Enzyme site) を含む pBSKII-3484 合成遺伝子を製作した [図 10 の (a)]。合成された遺伝子を相同組換え確認を容易にするための pCA14 シャトルベクターに導入するための形態に変えるために pBSKII-3484 を PCR して FspI で制限酵素を処理した後に、ブランティング (blunting) 酵素で blunt end (blunt end) を作って再び BamHI で処理した。pCA14 [Microbix Biosystems Inc, Canada] は、SspI で制限酵素を用いて切った後、ブランティング酵素を用いて blunt end を作った後に、BglII を処理して同一伝達制限酵素 (Isoschizomer) である BamHI と BglII、そして両端の blunt end を介して合成した遺伝子を挿入してシャトルベクター pCA14-3484 を製作した [図 10 の (b)]。その後、CMV プロモーター遺伝子を KpnI と XhoI で pCA14-3484 に挿入して pCA14-CMV-3484 を製作した [図 10 の (c)]。そして、pCA14-CMV-3484 で EcoRI と SalI 制限酵素により E1B55kDa 部分を切断し、ブランティング (blunting) した後、再び連結 (ligation) された pCA14-CMV-3484-E1B55 を得た [図 10 の (d)]。製作されたシャトルベクター pCA14-CMV-3484-E1B55 を XmnI で切断して linearization させた後、IX 遺伝子のない dl324-BstBI-human shTGF-β2 (または、mouse shTGF-β2) を BstBI で切断した後、大腸菌 BJ5183 で同時に形質転換させて相同組換えを誘導した。

20

30

40

【0109】

相同組換えされたプラスミド DNA を取得して HindIII 制限酵素で処理して DNA パターンの変化を確認し、最終的に配列分析して相同組換え有無を確認した後、確認されたプラスミドを PacI で切断した後、293 細胞株に形質転換して腫瘍を選択的に殺傷しながら人間 (またはマウス) TGF-β2 の発現を抑制する dl324-CMV-3484-shTGF-β2 アデノウイルスを製作した [図 11]。

【0110】

図 12 は、実際マウス shTGF-β2 が含まれた腫瘍選択的複製可能なアデノウイルス製作のための相同組換え過程を示すものであって、E3 スクリーニング結果、1、2、4

50

、5、6クローンが *positive clone* で1次選択され (a)、*HindIII* 切断パターン (*digestion pattern*) で相同組換えされたコロニーを選択し、1、2、4番コロニーのすべてを対照区とパターン比較した結果、組換えされたものと確認され (b)、*PacI* 切断後、1、2、4コロニーのうちの1番だけ *PacI* で切断して2 kb程度のバンドを確認することで、1番コロニーのDNAが相同組換えされた *d1324-CMV-3484-E1B55-E3-sh-mTGF-2* のDNAであることを確認することができた (c)。

【0111】

図13は、人間 *shTGF-2* が含まれた腫瘍選択的複製可能アデノウイルス製作のための相同組換え過程を示すものであって、*HindIII* 切断パターンによる相同組換えされたクローン (1、2、3) が選択され (a)、前記クローン1、2、3のDNAを *PacI* で切断した場合、クローンDNA1、2、3すべてが切断されて2 kb程度のバンドが確認されており、これは、1、2、3コロニーのDNAが相同組換えされた *d1324-CMV-3484-E1B55-E3-sh-hTGF-2* のDNAを確認することができた (b)。

実施例5：細胞溶血確認

【0112】

複製可能なアデノウイルスの細胞殺傷能を確認するために、24ウェルプレート (*well plate*) に各種の細胞を 4×10^4 から 1×10^5 まで細胞の大きさに応じて細胞数を定めた後、分株して培養した後、翌日 *survivin promoter* と *CMVプロモーター* を有した複製可能なアデノウイルスをMOIごとに感染させて養成対照群である293A細胞株から最も低いMOIで細胞がウイルスによってすべて死んだときに実験を終了して、各プレートに死なないで生きていた細胞をクリスタルバイオレットで染色した。3.7%パラホルムアルデヒド (*Paraformaldehyde*) で細胞を5分間常温で固定した後、0.05%のクリスタルバイオレットにより常温で30分間染色した後、水で洗浄して染色された細胞を観察した。2つの種類の腫瘍殺傷ウイルスでウイルスの腫瘍殺傷効果を比較した結果、プロモーターによる殺傷効果との差は大きくないものと示され、2つとも腫瘍選択性が優れるものとして確認された。

【0113】

図14は、腫瘍選択的複製可能アデノウイルス (*CMV promoter* と *E1B55KDa* が発現されない *d1324-CMV-3484* と *surviving promoter* により選択性を付与し、*55KDa* が発現される *d1324-hSurvivin-3484*) が正常細胞 (BJ細胞) では、複製が起きないのに対し、多様な種類の人間癌細胞では複製が起きて細胞の溶血が起きることを示したものである。

実施例6：癌細胞での効果確認

【0114】

A375メルラノーマ細胞株で人間 *sh-TGF-1* または *sh-TGF-2* を発現する実施例2の複製不能アデノウイルスを1、5、10、50、100moiで感染させてから細胞内に存在する *TGF-1*、*TGF-2*、*TGF-3* mRNAの水準をリアルタイムPCR方法で行った。

【0115】

その結果、*TGF-1* の *shRNA* を発現する場合、細胞内 *TGF-1* mRNAを減少させるものの、*TGF-2* mRNAや*TGF-3* mRNAが増加する傾向を示した。一方、*TGF-2* の *shRNA* を発現する場合、細胞内 *TGF-2* mRNAを効果的に減少させると共に、*TGF-2* mRNAや*TGF-3* mRNAが減少する傾向を示した [図15]。これは、細胞内の補償効果側面による効能低下の心配が、少なくとも *TGF-2* の *shRNA* を発現する場合には、その現象がなかっただけでなく、他の *TGF-* の *isotype* も抑制させる付随効果も有することができる長所となる。これと同様な結果がELISAを用いて *TGF-* タンパク質の発現減少効果パターンにもリアルタイムPCRで同様に現れた [図16]。

10

20

30

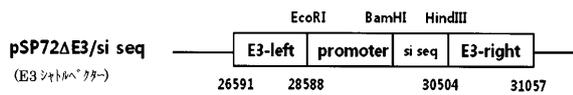
40

50

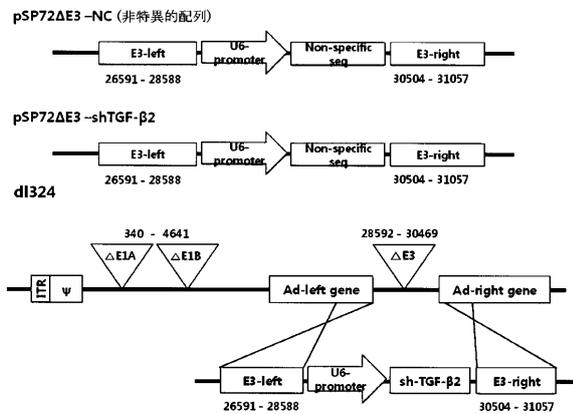
【 0 1 1 6 】

これは、TGF- β 2 に対する shRNA 発現するアデノウイルスが、TGF- β 1 に対する shRNA 発現するアデノウイルスよりも発現抑制効果が相対的に優れることを確認させたことである。

【 図 1 】

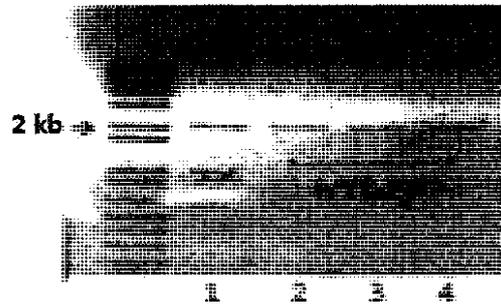


【 図 2 】



【 図 4 】

[Fig. 4]



【 図 5 】

[Fig. 5]

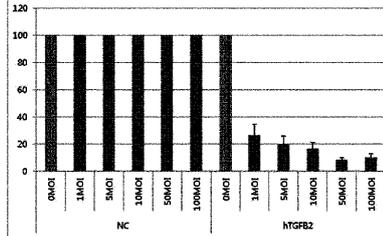
```

sh-TGF-beta2
#1-1 TCTTGGGAGTCTTGGAGTTTAAATATATGTTTAAATGGACTACATATGTTACGGT 240
sh-TGF-beta2
#1-1 AACTTGGAAAGTATTTGCGATTTCTGGGTTTATATATCTTGTGGAAAGGAGGGATCCG 300
sh-TGF-beta2
#1-1 GATTGAGCTATATCAGATCTTCAATCTCTTGGAACTCTGATATAGTCTCATCCCTTAA-- 64
#1-1 GATTGAGCTATATCAGATCTTCAATCTCTTGGAACTCTGATATAGTCTCATCCCTTAAAG 360
sh-TGF-beta2
#1-1 CCTGTGACTTGGAGCACTTGTGTTATTCGAGCTATAATGGTTACAATAAAGCAATAG 420
sh-TGF-beta2
#1-2 GGACTATCATATGCTTACCGTAACCTTGAAGATTTCTGATTTCTTGGGTTTATATATCTT 360
sh-TGF-beta2
#1-2 GATCCGGATTCGACTATACCAATCTGATATAGTCTCATCCCTTAAAGATCTG 45
#1-2 GTGGAAAGGACCGGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCG 430
sh-TGF-beta2
#1-2 ATATAGTCAATCTCTTAAATATGTTTAAATGGACTACATATGTTACGGT 54
#1-2 ATATAGTCAATCTCTTAAATATGTTTAAATGGACTACATATGTTACGGTATATA 480
sh-TGF-beta2
#1-2 TGGTTACAATAAAGCAATAGGATCAAAATTCACAATAAAGCACTTTTCACCTGA 540
sh-TGF-beta2
#1-3 CTTGGGAGTCTTGGAGTTTAAATATGTTTAAATGGACTACATATGTTACGGT 240
sh-TGF-beta2
#1-3 GATCCGG 7
sh-TGF-beta2
#1-3 ACTTGGAAAGTATTTGCGATTTCTGGGTTTATATATCTTGTGGAAAGGAGGGATCCG 300
sh-TGF-beta2
#1-3 ATTGAGCTATATCAGATCTTCAATCTCTTGGAACTCTGATATAGTCTCATCCCTTAA-- 64
#1-3 ATTGAGCTATATCAGATCTTCAATCTCTTGGAACTCTGATATAGTCTCATCCCTTAAAGC 360
sh-TGF-beta2
#1-3 TTTGCGACTTCGAGCACTTGTGTTATTCGAGCTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGC 420

```

【 図 6 】

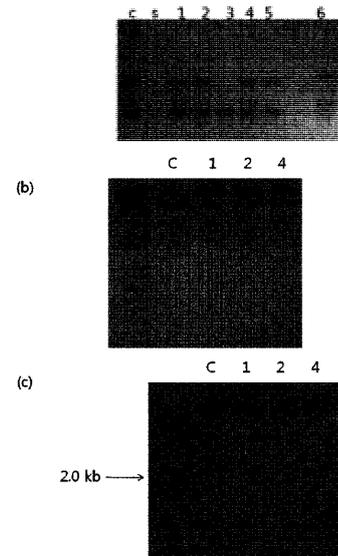
[Fig. 6]



【 図 1 2 】

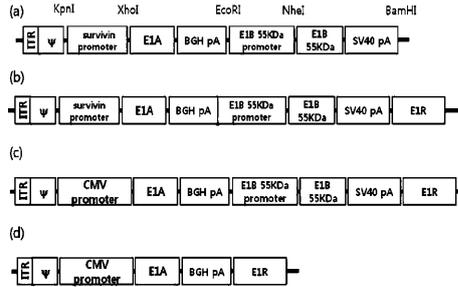
[Fig. 12]

(a) dl324-CMV-3484-ΔE1B55-ΔE3-sh-mTGF-β2



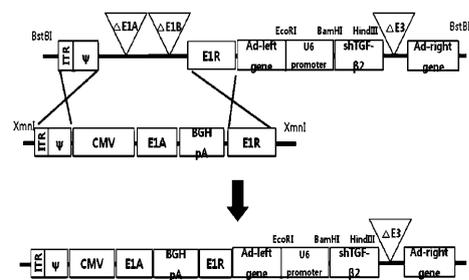
【 図 1 0 】

[Fig. 10]

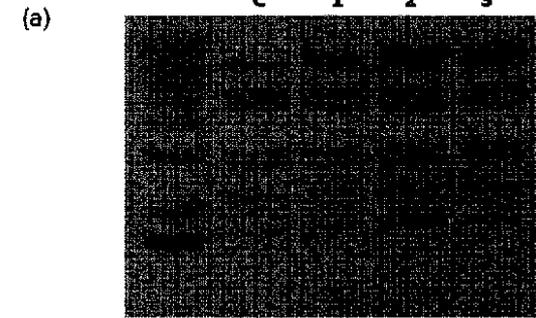


【 図 1 1 】

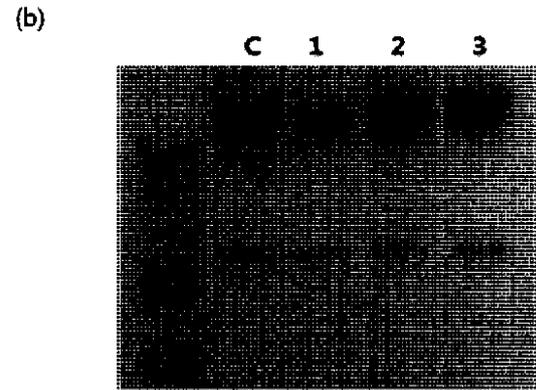
[Fig. 11]



【 図 1 3 (a) 】

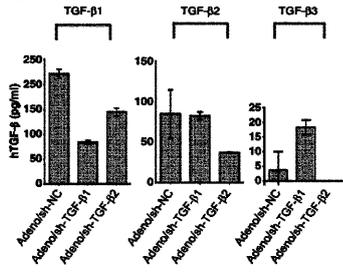


【 図 1 3 (b) 】



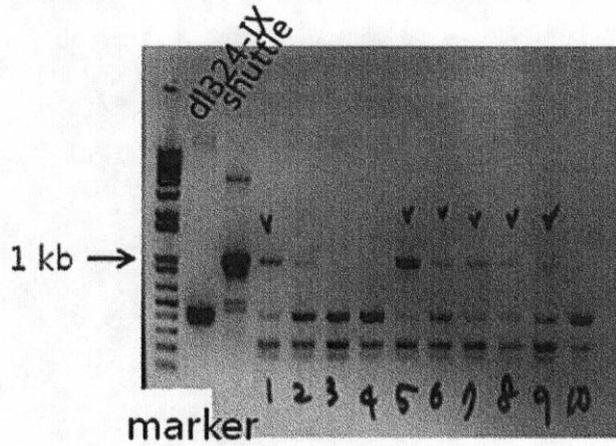
【 図 16 】

[Fig. 16]

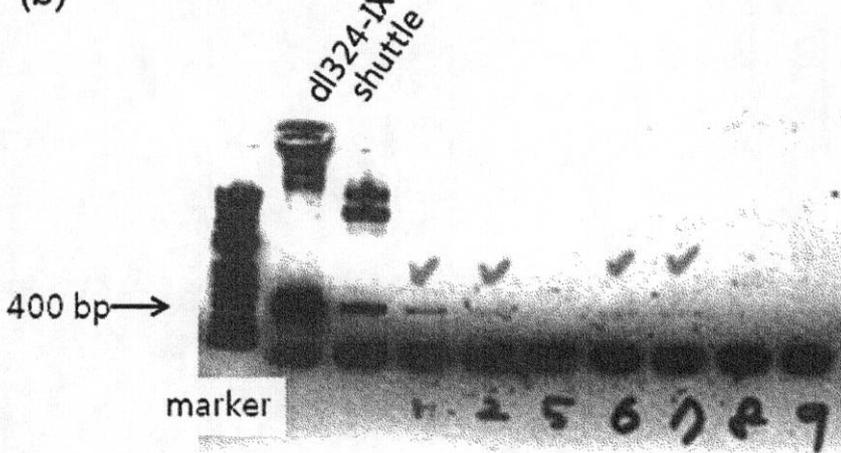


【 図 3 】

(a) ヒト TGF- β 2 の shRNA についてのスクリーニング



(b) E3 region PCR

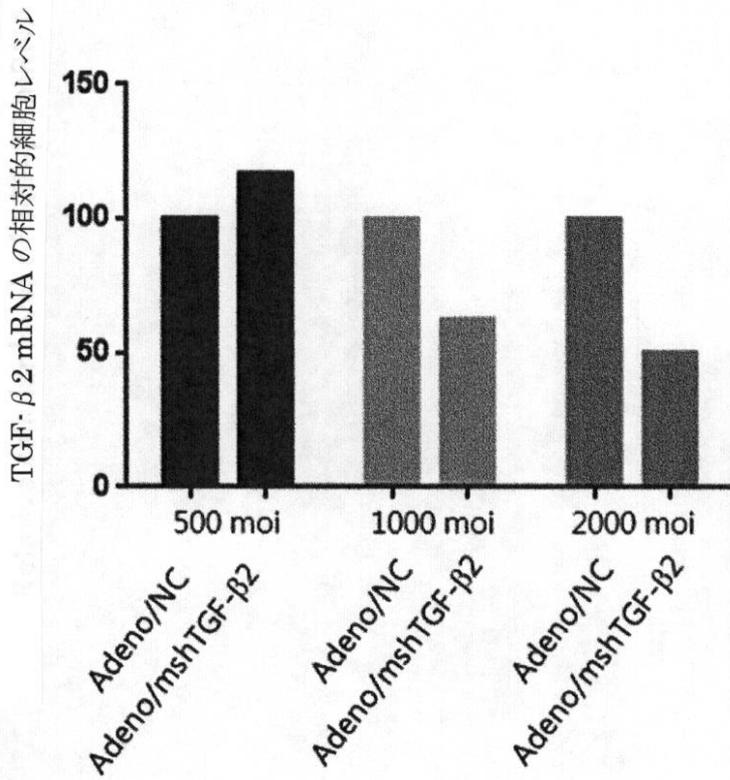


IX gene region PCR

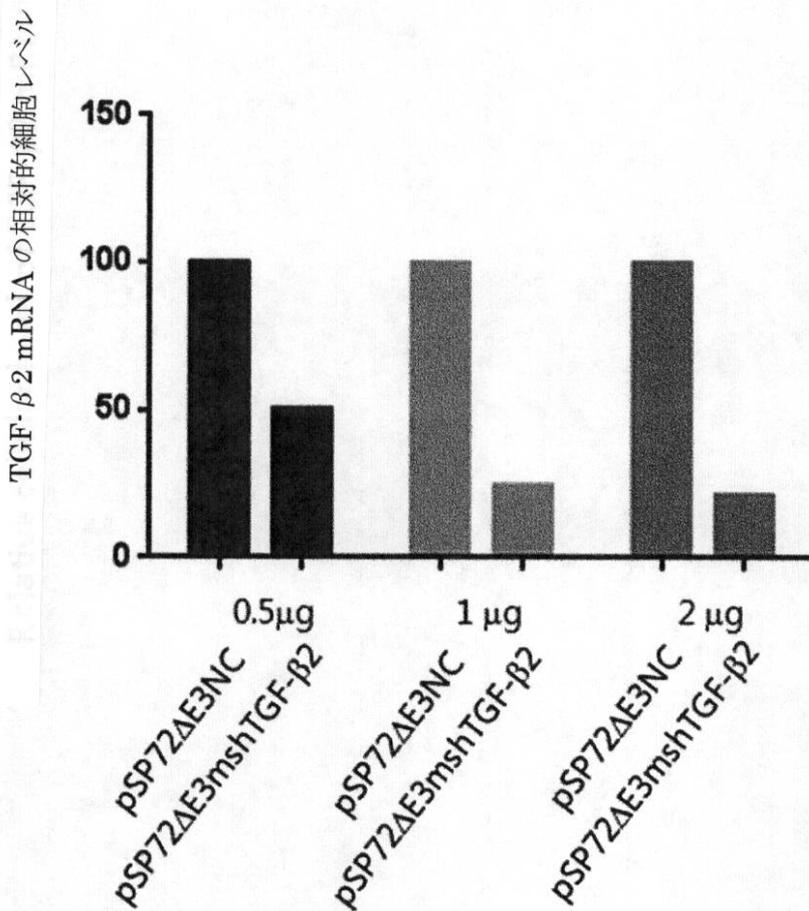
(c)



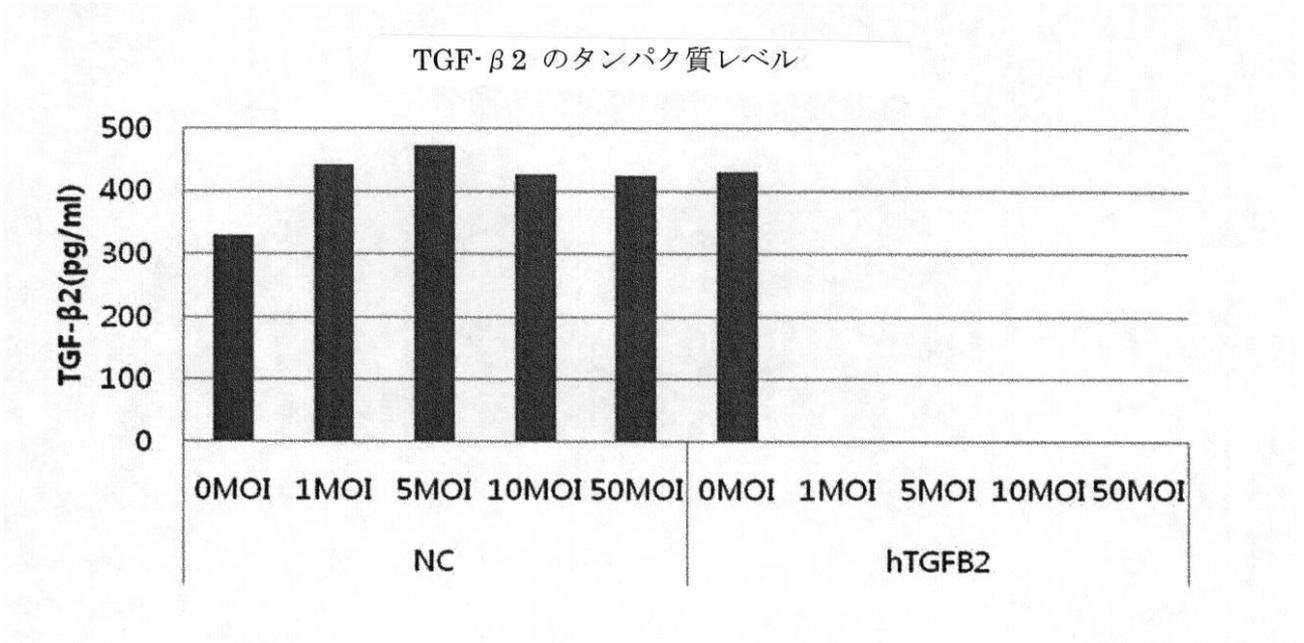
【 図 7 】



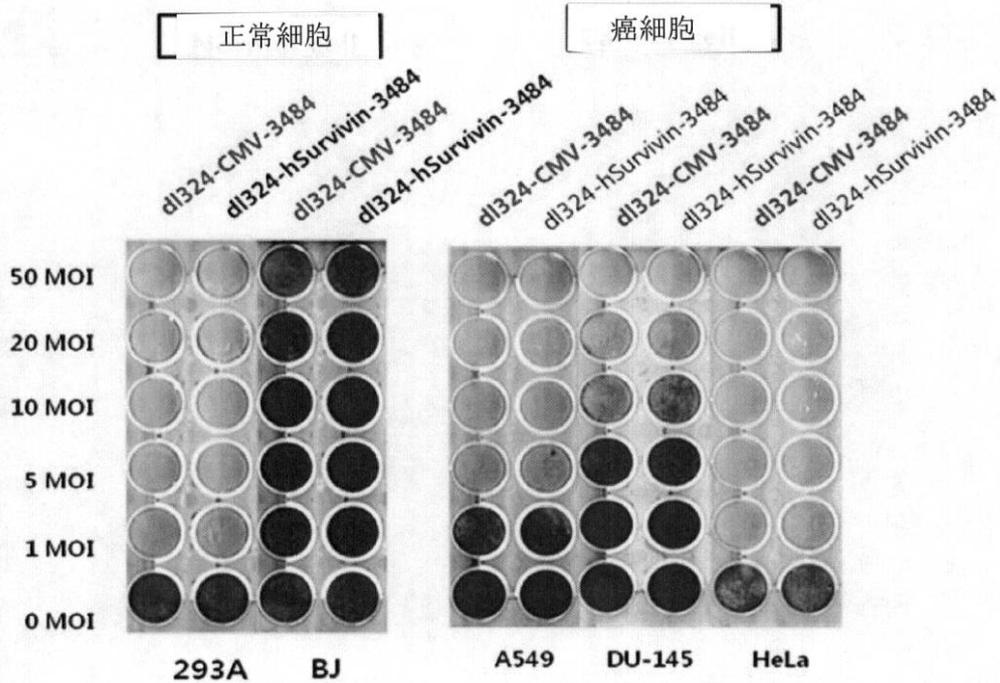
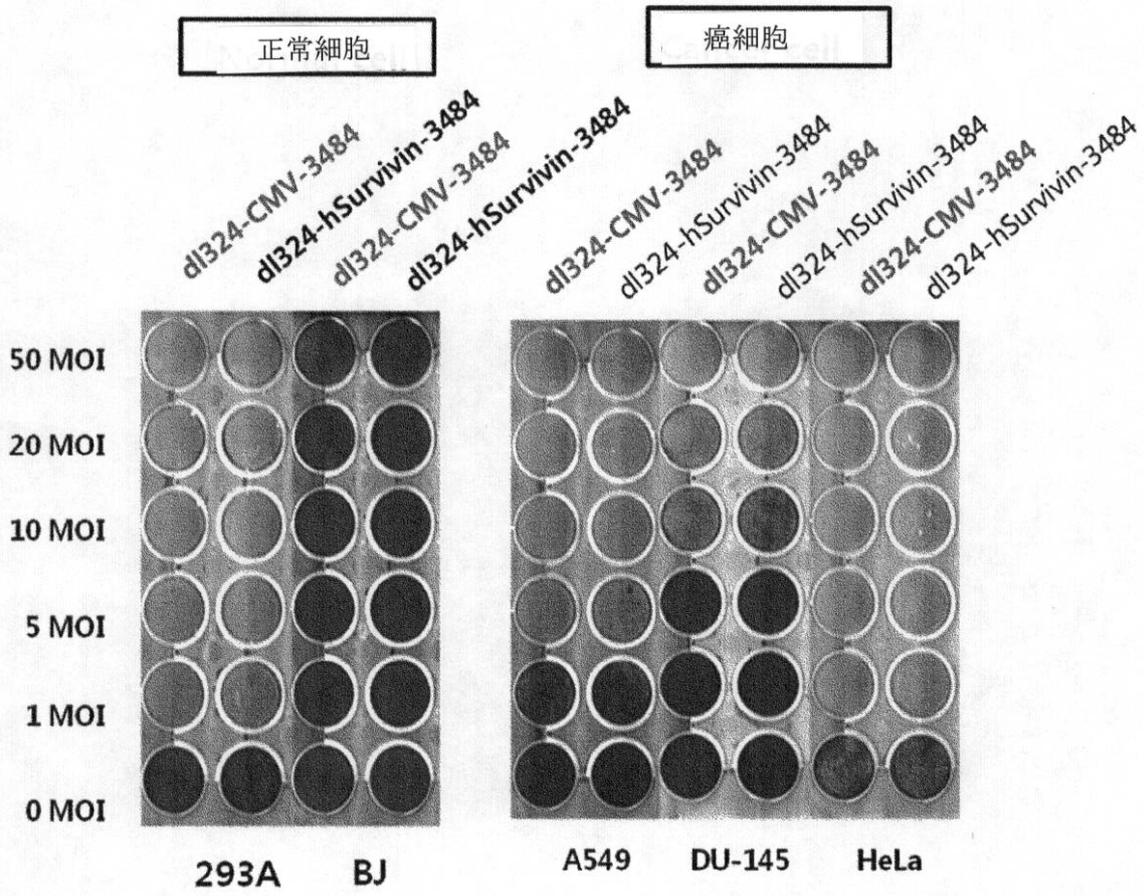
【 図 8 】



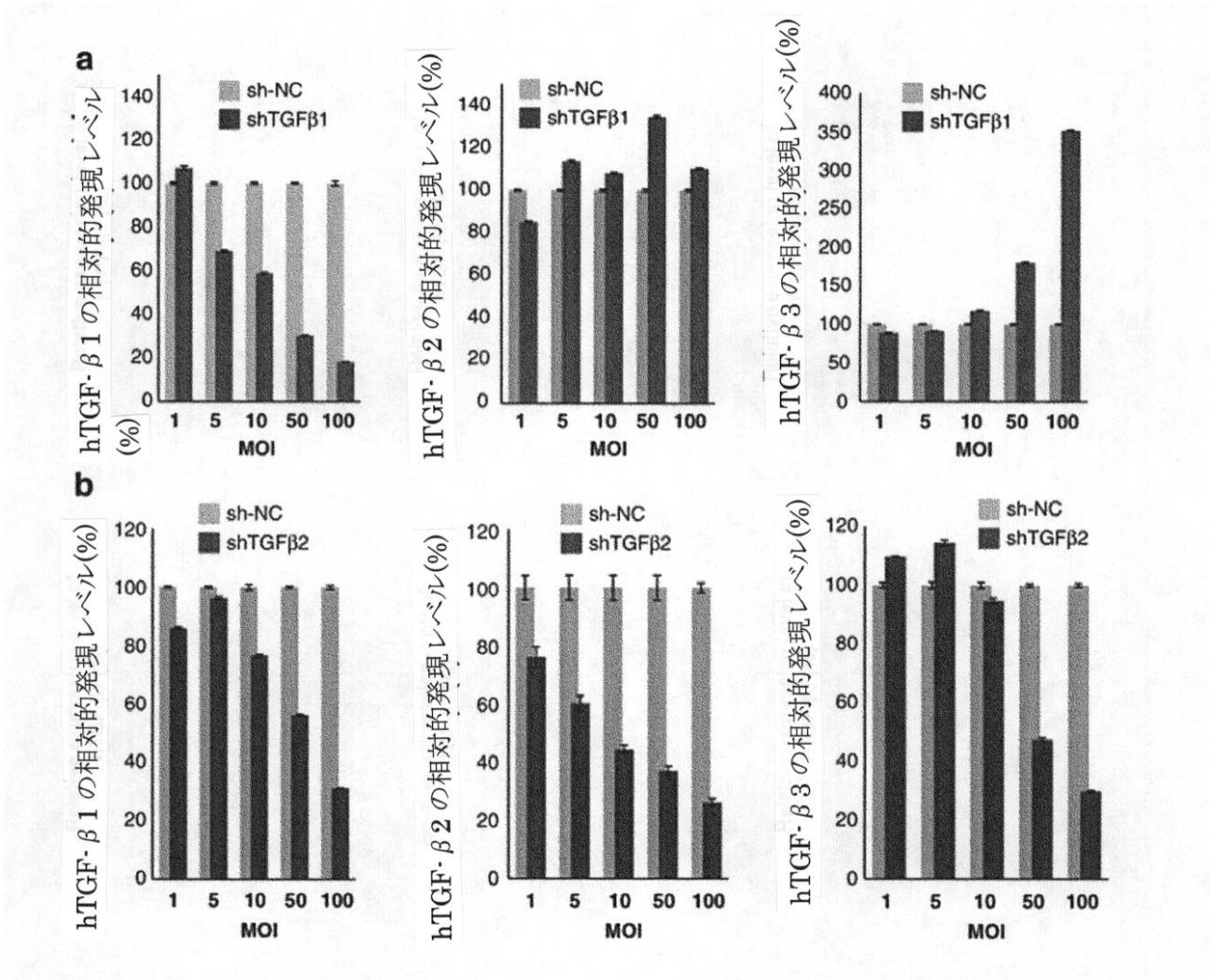
【 図 9 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 配 列 表 】

[2015506696000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/000791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/113(2010.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i, C12N 7/01(2006.01)i</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) C12N 15/113; C07H 21/04; A61K 35/12; A61P 35/00; C12N 15/11; A61K 48/00; C12N 15/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: expression suppression, antitumor, TGF-b2, shRNA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG, Chenyu et al., "Transforming growth factor-β2 is a molecular determinant for site-specific melanoma metastasis in the brain", Cancer Research, 13 January 2009, vol. 29, no. 3, pages 828-835. See abstract; pages 828,830,832 and 834.	1-10
A	YOO, Ji Young et al., "VEGF specific short hairpin RNA expressing oncolytic adenovirus elicits potent inhibition of angiogenesis and tumor growth", Molecular Therapy, February 2007, vol. 15, no. 2, pages 395-302. See abstract; pages 296 and 301.	1-10
A	US 2011-0262408 A1 (NEMUNAITIS, John J. et al.) 27 October 2011 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2010-0066429 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 17 June 2010 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2006-0031596 A (INTRADIGM CORPORATION) 12 April 2006 See the entire document.	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 23 MAY 2013 (23.05.2013)		Date of mailing of the international search report 24 MAY 2013 (24.05.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/000791

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0262408 A1	27.10.2011	WO 2011-079077 A1	30.06.2011
KR 10-2010-0066429 A	17.06.2010	WO 2008-156012 A1	24.12.2008
KR 10-2006-0031596 A	12.04.2006	CA 2520987 A1	21.10.2004
		CN 1798579 A	05.07.2006
		EP 1615670 A2	18.01.2006
		JP 2007-525447 A	06.09.2007
		US 2007-0003519 A1	04.01.2007
		US 2010-0203036 A1	12.08.2010
		US 7781414 B2	24.08.2010
		WO 2004-089284 A2	21.10.2004

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2013/000791

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))		
C12N 15/113(2010.01)I, C12N 15/63(2006.01)I, A61K 31/7105(2006.01)I, C12N 7/01(2006.01)I		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/113; C07H 21/04; A61K 35/12; A61P 35/00; C12N 15/11; A61K 48/00; C12N 15/00		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 발현억제, 항종양, TGF- β 2, shRNA		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	
	관련 청구항	
A	ZHANG, CHENYU 외 3명, 'Transforming growth factor- β 2 is a molecular determinant for site specific melanoma metastasis in the brain', <i>Cancer Research</i> , 2009.01.13., 29권, 3호, 828-835 페이지. 요약; 페이지 828, 830, 832 및 834 참조.	1-10
A	YOO, JI YOUNG 외 6명, 'VEGF specific short hairpin RNA expressing oncolytic adenovirus elicits potent inhibition of angiogenesis and tumor growth', <i>Molecular Therapy</i> , 2007.02., 15권, 2호, 395-302 페이지. 요약; 페이지 296 및 301 참조.	1-10
A	US 2011-0262408 A1 (NEMUNAITIS, JOHN J. 외 3명) 2011.10.27 문서 전체 참조.	1-10
A	KR 10-2010-0066429 A (독립행정법인 산업기술융합연구소 외 1명) 2010.06.17 문서 전체 참조.	1-10
A	KR 10-2006-0031596 A (인트라디그렘 코오포레이션) 2006.04.12 문서 전체 참조.	1-10
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.		<input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.
* 인용된 문헌의 특별 카테고리:		
"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌	"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌	
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌	"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.	
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌	"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.	
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌	"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌	
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 05월 23일 (23.05.2013)	국제조사보고서 발송일 2013년 05월 24일 (24.05.2013)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 허주영 전화번호 82-42-481-8150	

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2013/000791

제1기제관 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

- 서면
- 전자적 형태

b. 제출시기

- 출원시 국제출원에 포함
- 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
- 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/000791

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0262408 A1	2011.10.27	WO 2011-079077 A1	2011.06.30
KR 10-2010-0066429 A	2010.06.17	WO 2008-156012 A1	2008.12.24
KR 10-2006-0031596 A	2006.04.12	CA 2520987 A1	2004.10.21
		CN 1798579 A	2006.07.05
		EP 1615670 A2	2006.01.18
		JP 2007-525447 A	2007.09.06
		US 2007-0003519 A1	2007.01.04
		US 2010-0203036 A1	2010.08.12
		US 7781414 B2	2010.08.24
		WO 2004-089284 A2	2004.10.21

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 ジェ・ジン・ソン
大韓民国・ソウル・120-749・ソデムン-グ・ソンサン-ロ・250・ルドウレ・ギュス-
ドン・330・キャンサー・リサーチ・センター・オブ・メディカル・カレッジ・オブ・ヨンセイ
・ユニヴァーシティー

(72) 発明者 ジョ・ハン・キム
大韓民国・ソウル・158-728・ヤンチョン-グ・モク・5-ドン・モクドン・ツイン・ヴィ
ラ・シー-1207

(72) 発明者 セ・ウン・オー
大韓民国・ソウル・120-749・ソデムン-グ・ソンサン-ロ・250・キャンサー・リサー
チ・センター・オブ・メディカル・カレッジ・オブ・ヨンセイ・ユニヴァーシティー

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA02 FA02 GA11
HA01 HA11 HA17
4B065 AA90X AA90Y AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA23 CA44
4C084 AA13 NA13 NA14 ZB261
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 NA13 NA14 ZB26