

トランスレーショナルリサーチの重要性

長村 文孝

東京大学医科学研究所先端医療研究センター先端医療開発推進分野教授

key words: アカデミア発 橋渡し研究加速ネットワークプログラム NIH 基礎研究 開発型

医薬品開発の動向

2004年に米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) は “Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products” を発出した。この中で、図1に示すように医薬品開発への投資額は製薬企業および政府の開発機関である米国立衛生研究所 (National Institute of Health; NIH) とともに年々増加しているにもかかわらず、図2に示すようにFDAで承認申請が受理される (承認ではない) 数が医薬品・生物製剤ともに減少していた。先の白書はこれに対して非常な危機感を示し、規制当局の側から開発を促進する対応策を打ち出していく意図が込められていた。

一方、このころより、製薬業界では「2010年問題」への対応が大きな問題となっていた。これは、売り上げの上位に位置する医薬品の多くが特許切れを迎えるが、それにとって

代わる大型の新薬開発が進んでいないため、経営上大きな危機を迎えるというものであった。表1は2002年と2012年の医薬品の世界売り上げトップ10を示したものである。2002年は、2位に赤血球造血刺激因子でバイオ製剤であるエリスロポエチン製剤が入っているが、その他は化合物の薬物作用を探求するスクリーニング等により開発された医薬品であった。また、その多くは「2010年問題」に含まれる特許切れを迎えていた。2012年になるとトップ10の医薬品は全て入れ替わっているが、特に注目する点として、6品目が特定の作用機序に関与する分子をターゲットとした分子標的療法薬であり、そのうち5品目が抗体であったことが挙げられる。ヒュミラ®とレミケード®の作用機序は関節リウマチ等の原因であるTNF α の過剰生産に対して抗体でTNF α を阻害することであり、エンブレル®はTNFが結合する受容体とヒト免疫グロブリンのFc部分から構成されており、TNF

が細胞表面の受容体と結合することを阻害する。リツキサン®はB細胞性リンパ腫ではリンパ腫細胞表面にCD20が発現していること、ハーセプチン®は乳がん等でHER2が過剰発現している場合が多いことに注目し、悪性細胞で発現している分子に抗体が結合し障害を与えることが作用機序である。固形がんでは血管新生による腫瘍の増殖が認められるが、アバスタチン®は血管新生を促進する分子であるVEGFの作用を阻止する抗体として開発された。いずれも基礎研究での発見に注目し、医薬品として抗体あるいは受容体制剤として開発されている。

トランスレーショナルリサーチ (Translational Research; TR) は、基礎研究の成果を初期臨床試験の段階まで臨床応用することが1つの定義である。抗体薬や受容体薬の開発は基礎研究の成果を基になされており、TRの代表といえる。新たな医薬品開発の方策としてTRは重要視されるようになり、各国の医薬品開発

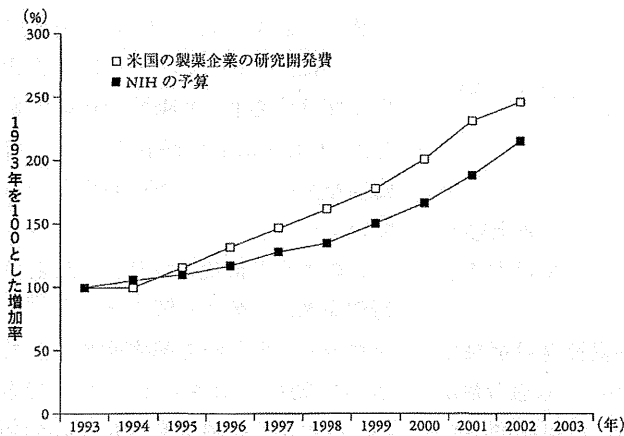


図1 米国における製薬企業の開発費とNIH予算の増加状況
出所：FDA：Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products, 2004

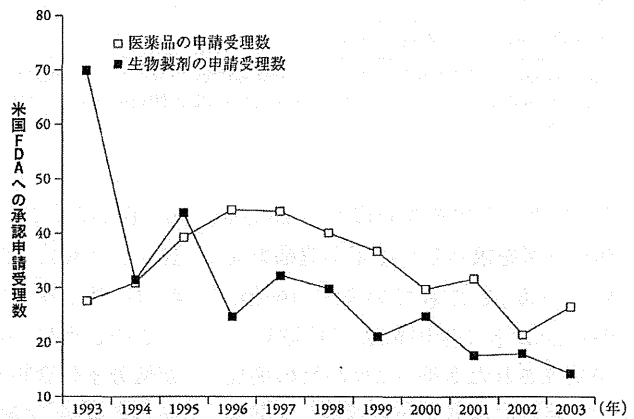


図2 米国FDAでの医薬品・生物製剤の承認申請受理数
出所：FDA：Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products, 2004

競争の大きな柱に成長している。本稿では、このように大きな役割を果たすようになったTRの意義と今後の課題について述べる。

基礎研究と臨床をつなぐトランスレーショナルリサーチの意義

TRは、欧米では“From bench to bedside”とも呼ばれ、日本でも基礎研究と臨床をつなぐ「橋渡し研究」とも呼ばれる。従来の医薬品開発では、有効性分を含んでいそうな材料の探索、そこからの化合物の収集、そして新規化合物の薬効を見極めるスクリーニングを経て候補物を選択することが主流であった。一方、近年ではヒトゲノム解析計画により人間の設計図とも呼べる全ゲノム配列が明らかとなり、また、疾患の発症機序や病態の特徴に関与するメカニズムが分子生物学的に急速に明らかとなってきている。このような知見を基にして治療手段を考案し、臨床開発を進めるのがTRである。そのため、開発のアプローチは抗体に留まらず、核酸医薬、再生・細胞療法、

表1 医薬品世界売り上げランキング

順位	2002年			2012年		
	商品名	薬効	売上	商品名	薬効	売上
1	リビトール	高脂血症薬	8,507	ヒュミラ	TNF α 抗体	9,603
2	エボジェン/プロクリット/エスポー	エリスロポエチン	6,675	レミケード	TNF α 抗体	9,071
3	ゾコール/リボバス	高脂血症薬	5,580	エンブレル	TNF受容体	8,476
4	タケブロン/プレバシッド	抗潰瘍薬	4,695	アドエア/セレタイド	吸入喘息薬	8,216
5	プリロセック/オメプラール	抗潰瘍薬	4,687	クレストール	高脂血症薬	7,430
6	ノルバスク/アムロジン	降圧薬/Ca拮抗薬	4,174	リツキサ	抗CD20抗体	7,227
7	メバロチン/プラバコール	高脂血症薬	3,755	ランタス	インスリン製剤	6,555
8	ジブレキサ	統合失調症薬	3,689	ハーセプチン	抗HER2抗体	6,444
9	パキシル/セロクサット	抗うつ薬(SSRI)	3,297	アバスタチン	抗VEGF抗体	6,307
10	セレブレックス	抗炎症薬(Cox2阻害)	3,150	ジャヌビア	糖尿病薬	6,208

売上は単位百万ドル。■は分子標的薬を示す。
出所：セジデム・ストラテジックデータ(株)ユート・ブレン事業部

遺伝子治療等多岐にわたる。また、化合物の選択も、鍵となる重要な分子に作用する候補分子としてスクリーニングを行ったり、立体構造と親和性から候補物質のスクリーニングを行ったりするなど変化している。

1. 基礎研究を担うアカデミア

TRの基となる基礎研究の主体は、実際には大学等のアカデミアである。製薬企業側からも「産業側は自社シーズ主体に創薬研究を行い製品を作り出すといういわゆる『自前主義』のビジネスモデルは既に断念し、オープンイノベーションの旗印の

表2 米国FDAで承認された医薬品の発明元 (1998年から2007年)

	製薬企業	バイオベンチャー	アカデミア
全医薬品 (252品目)	58%	18%	24%
優先審査* (123品目)	46%	23%	30%
科学的新規性の高い医薬品 (118品目)	44%	25%	31%

*priority review: 既存の治療に対して大きな優越性を示す場合か、十分な治療法のない疾患あるいは進行度に対する薬剤が指定される。通常は10か月以内の審査期間が6か月以内に短縮される。
出所: 文献2) より

下、アカデミアを含め広く外部に創薬シーズを求めべく産学連携を進めている」とされている¹⁾。1998年から2007年に米国FDAで承認申請が受理された医薬品252品目の開発元を特許の帰属先から解析した研究では、表2に示すように申請が受理された医薬品、優先審査に指定された医薬品、科学的に新規性が高い医薬品で分類してみると、ベンチャー企業発医薬品では18%、23%、25%、アカデミア発では24%、30%、31%であり、医療上必要性あるいは科学的新規性の高い医薬品でベンチャー企業発とアカデミア発が増えている²⁾。ただし、ベンチャー企業発の医薬品の元々の開発主体はアカデミアであったことが多く、実際にはアカデミアの研究に基づく医薬品がこの数値よりも多いことが推測される。また、この論文での承認申請は2007年までであり、その後アカデミアでの基礎研究が基となっている医薬品の候補は増えていると推定され、アカデミアの基礎研究が医薬品開発の大きな柱と言える。また、表1の分子標的薬6剤のうち、5剤がベンチャー企業で開発され、大手製薬企業に特許権が譲渡されたか、あるいはベンチャー企業が買収されて市販化されたという事実もある。また、収益の面からも、分子標的薬、特に抗体は薬価が非常に高いこともあ

り、表1に示されるように売上額も高くなり製薬企業にとっては大きな収益の柱となっている。

このように、医薬品開発は従来型が低分子化合物を中心とし患者数が多い疾患を対象とした自社開発から、アカデミアが開発主体でアンメット・メディカル・ニーズを対象としたTRに移ってきている。それゆえ、市場規模も大きく何より健康に直結した医薬品開発の国際競争においてTRの促進は国家的課題となってきた。

2. 臨床からの橋渡し事例

一方、新たな医薬品開発だけではなく、ある医薬品の有効性および副作用について個人差が生じる原因の追究は長年の課題であった。これについては、多くの臨床情報、すなわち患者のゲノム情報あるいは悪性腫瘍であれば腫瘍細胞の遺伝子変異を基にした研究が精力的に行われてきた。

患者側の遺伝子多型の差が臨床に用いられている代表例としては、抗がん剤のイリノテカンではUGT1A1の遺伝子多型が代謝に影響し副作用に関連していること³⁾、C型肝炎ウイルス感染者でのペグインターフェロンとリバビリンの併用療法でインターフェロンの関連遺伝子であるIL28B 遺伝子のSNP (遺伝子多型) が

有効性に関連していることが判明し、前者は保険適用となり添付文書にも記載され、後者は先進医療として認められている⁴⁾。腫瘍細胞の例としては、セツキシマブでは血管新生に関連するEGFR陽性が適応であるが、KRASに変異が存在すると有効性を認めないことが明らかとなっている⁵⁾。

このような研究には多くの患者の情報を基に、ゲノム解析というバイオロジー、すなわち基礎研究に立ち返って初めてなされることが出来る。このような研究を特にがんの領域ではTRに含めたり、あるいは「バックTR」「リバースTR」と呼ばれることもある。単に基礎から臨床への一方通行ではなく、パーソナライズド・メディスン (個別医療) 実現のための双方向性と捉えられており治験段階からの検討と合わせ積極的に推進されている。

トランスレーショナルリサーチの状況と課題

1. 知的財産の扱い

日本で産学の連携が促進されるようになったのは1990年代後半に入ってからである。そのため、特許権確保の意識が研究者の間では希薄であった。このような産業界との連携が不十分であったこと、あるいは特許権を取得しなかったことから、日本のアカデミアで発見したことが日本国内ではなく海外企業によって医薬品開発に結びついた例は多い。

最近では特許出願後に論文発表で公表することが一般的になりつつあるが、研究者に対する知財に関する教育機会の不足もあり十分に浸透しているとは言い難い。また、関連特

許まで取得する「強い特許」となるための特許戦略や出願における権利範囲は科学的論理とは異なるため弁理士の能力に依存するが、バイオに精通した弁理士はまだ少ない。アカデミアにおいて特許を管理する部署も十分に機能していないケースもあるため、製薬企業からすると開発には不十分であると判断されるケースも多い。

最近、ALK融合遺伝子を有する非小細胞性肺癌に対するクリゾチニブは、その有効性ととも標的分子の論文発表から承認まで約4年という開発期間の短さが注目を集めた。これは論文に注目した海外企業が早期に治験を開始し承認に至った例である。一方、国内での産学間での連携強化と迅速な開発が、海外との開発競争において未だ十分ではない警鐘ともいえる。

2. 開発にかかるコストと人材不足

先に述べたように、TRの特徴の1つは低分子化合物だけではなく、多くの新しい概念の治療方法が存在することである。企業側からすると新たな製造設備の建設等のコスト、非臨床試験ならびに臨床試験での評価方法・実施方法等未知の領域が多いという理由から、開発に躊躇するケースが多い。また、前述したように特許権が不十分であり他者との競争に耐えられそうにないと判断されることがある。そのため、開発に関心を示す企業が現れないことが多い。その場合、開発するに十分な知財権があれば、医師主導治験を含む臨床試験を研究者が実施し、有効性・安全性に関するデータを取得して再度企業にアプローチすることができる。

このように自ら開発を主体的に行う場合には、表3にまとめた、シーズ(研究開発する対象)としての初期の臨床試験の段階までにわたって多くの事項を行う必要がある。これは製薬企業の果たしている資金確保、各種専門家の確保、プロジェクトマネジメントを含む開発戦略の策定等の役割を研究者が行う必要があることを意味する。被験物確保の点からは、近年、再生医療あるいは免疫担当細胞を用いたがん免疫療法開発が盛んであるが、多くの場合、患者由来細胞を原料としており、ヒトに投与することのできる品質を確保できる細胞調製施設(Cell Processing Center; CPCあるいはCell Processing Facility; CPF)をアカデミアで保有・運営する必要がある。このような施設は建設、維持に多額の費用が必要であり、ヒトに投与するに足る品質を有する被験物の製造と管理をアカデミアが担う必要があることもTRの実施が困難であった一因であった。生物統計家、データ解析、プロジェクトマネジメント等の専門家の不足は海外と比して著しく、養成が急務となっている。

「日本版NIH構想」への期待

このような開発環境を研究者個人で整えるのは困難であり、日本のアカデミアとしても組織として整える必要があった。そこで、文部科学省では、TRの支援の拠点形成のために平成19(2007)年度に橋渡し研究支援プログラムを開始し、次いで平成24(2012)年度からの橋渡し研究加速ネットワークプログラムでは開始時に全国で7拠点を選定してい

表3 開発型トランスレーショナルリサーチで考慮する事項

基礎研究段階
<ul style="list-style-type: none"> 動物実験を含めた研究倫理 知的財産確保と強化 研究資金の確保
非臨床試験段階
<ul style="list-style-type: none"> 治験申請に必要な非臨床試験のデザインと実施 Good Laboratory Practice (医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準) 遵守が必要で非臨床試験の選定と委託 適切な動物実験施設 被験物製造(細胞調製施設等) 規制対応
臨床試験段階
<ul style="list-style-type: none"> 製造設備の維持・管理(細胞調製施設等) Good Manufacturing Practice (医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準) 準拠被験物の委託製造あるいは製造 特殊検査の対応 標準業務手順書の作成・文書管理 実施計画書・説明同意文書等の作成 データマネジメント モニタリング・監査等の質の保証業務 補償・賠償への対応 規制対応
全段階を通じて
<ul style="list-style-type: none"> 研究、非臨床試験、臨床試験実施に必要な費用の確保 利益相反管理 運携・導出企業の選定 プロジェクトマネジメント

る⁶⁾。このプログラムでは、拠点外のアカデミアも含めたシーズの知財獲得から医師主導治験の実施までを支援することのできる支援体制を構築するために、専門的に業務を遂行できる人材の養成・確保、教育体制の整備、細胞調製施設を含めた施設整備等が求められている。このプログラムにより拠点整備は進行しているが、いわゆる「日本版NIH構想」において、厚生労働省の早期・探索的臨床試験拠点整備事業および臨床研究中核病院整備事業が平成27(2015)年度に一体運用される計画となっており、省庁の垣根を越えた支援が期待されている。また、橋渡

し研究加速ネットワークプログラムの予算は、平成25(2013)年度が約30億円で平成26(2014)年度は約65億円と異例ともいえる増額となっており国の期待も上がることができ

る。米国ではNIHは世界最大の基礎研究所というだけでなく、研究所病院を有するTR開発施設であり、また、研究費の配分あるいは医療開発の実務支援を一元的に行う国策としての医薬品開発の事実上の司令塔となっている。NIHが臨床研究に費やす予算は年間約300億ドルであり、約80%が競争的資金として分配され、約10%がNIHの施設に分配されている⁷⁾。NIHのアカデミアのTR拠点への支援としては、National Center for Advancing Translational Sciencesを創設し、Clinical and Translational Science Awards (CTSA)を設け

ていることが挙げられる。CTSAでは米国の62の施設が拠点として選定され、総額4.6億ドルが各センターに配分され、各センターには年間約400万ドルから約2,300万ドルが支出されている⁸⁾。その他、NIHは、低分子化合物や抗体の治験用製造施設を関連企業として有しており、また、他のアカデミア向けに細胞調製を行う拠点の指定による治験での被験物提供体制を整えており、TRの問題の1つである被験物の確保を容易にしている。また、NIH発のシーズの開発やライセンスアウト、NIHから研究費を配分された試験の実施に必要な資料整備等の支援を行っており、治験実施施設支援の役割も果たしている。

日本においても急速にTR推進のための環境が整備されつつある。しかし米国と比するとその規模と体制

においてまだ格段の差が存在する。医薬品開発の大きな柱であるTRを国際競争力のあるものにするためには「日本版NIH構想」のもと戦略的かつ継続的な支援が必要である。

文献

- 1) Inagaki O: Expectation for the Drug Development Activity in Academia. YAKUGAKU ZASSHI 133 (2): 213-219, 2013
- 2) Kneller R: The importance of new companies for drug discovery: origins of a decade of new drugs. Nat Rev Drug Discov 9: 867-882, 2010
- 3) カンプト添付文書
- 4) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/sensiniryu/kikan02.html>
- 5) アービタックス添付文書
- 6) <http://www.tr.mext.go.jp/>
- 7) <http://www.nih.gov/about/budget.htm>
- 8) <http://www.ncats.nih.gov/research/cts/ctsa/ctsa.html>

ながむら ふみたか
〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1
nagamura@ims.u-tokyo.ac.jp

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

電子辞書DF-X11001 PASORAMA+

●電子辞書 2014年
価格:本体76,000円+税
[JAN4950096164505]

SIIの電子辞書「DAYFILER」シリーズの医学モデル。パソコンで電子辞書が引けるPASORAMA+、タッチ操作が可能なWVGA・静電式カラータッチパネル液晶、無線LANなどの機能に、ショートカットキー設定機能を加え、単語帳機能・検索履歴機能の容量もアップグレード。収録コンテンツは「医学書院 医学大辞典」「ステッドマン医学大辞典」「治療薬マニュアル」などの医学系はもちろん、国語系、英語系も充実。

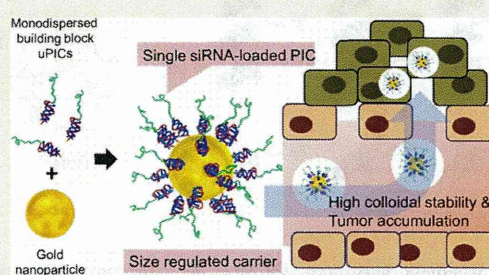
Precise Engineering of siRNA Delivery Vehicles to Tumors Using Polyion Complexes and Gold Nanoparticles

Hyun Jin Kim,[†] Hiroyasu Takemoto,[‡] Yu Yi,[§] Meng Zheng,[‡] Yoshinori Maeda,[§] Hiroyuki Chaya,[‡] Kotaro Hayashi,[§] Peng Mi,[‡] Frederico Pittella,[‡] R. James Christie,[‡] Kazuko Toh,[‡] Yu Matsumoto,[‡] Nobuhiro Nishiyama,[‡] Kanjiro Miyata,^{‡,*} and Kazunori Kataoka^{†,§,||,*}

[†]Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo 113-8656, Japan, [‡]Polymer Chemistry Division, Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8503, Japan, [§]Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo 113-8656, Japan, [‡]Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan, and ^{||}Center for NanoBio Integration, The University of Tokyo, Tokyo 113-8656, Japan

ABSTRACT For systemic delivery of siRNA to solid tumors, a size-regulated and reversibly stabilized nanoarchitecture was constructed by using a 20 kDa siRNA-loaded unimer polyion complex (uPIC) and 20 nm gold nanoparticle (AuNP). The uPIC was selectively prepared by charge-matched polyionic complexation of a poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) (PEG-PLL) copolymer bearing ~40 positive charges (and thiol group at the ω -end) with a single siRNA bearing 40 negative charges. The thiol group at the ω -end of PEG-PLL further enabled successful conjugation of the uPICs onto the single AuNP through coordinate bonding, generating a nanoarchitecture (uPIC-AuNP) with a size of 38 nm and a narrow size distribution.

In contrast, mixing thiolated PEG-PLLs and AuNPs produced a large aggregate in the absence of siRNA, suggesting the essential role of the preformed uPIC in the formation of nanoarchitecture. The smart uPIC-AuNPs were stable in serum-containing media and more resistant against heparin-induced counter polyanion exchange, compared to uPICs alone. On the other hand, the treatment of uPIC-AuNPs with an intracellular concentration of glutathione substantially compromised their stability and triggered the release of siRNA, demonstrating the reversible stability of these nanoarchitectures relative to thiol exchange and negatively charged AuNP surface. The uPIC-AuNPs efficiently delivered siRNA into cultured cancer cells, facilitating significant sequence-specific gene silencing without cytotoxicity. Systemically administered uPIC-AuNPs showed appreciably longer blood circulation time compared to controls, *i.e.*, bare AuNPs and uPICs, indicating that the conjugation of uPICs onto AuNP was crucial for enhancing blood circulation time. Finally, the uPIC-AuNPs efficiently accumulated in a subcutaneously inoculated luciferase-expressing cervical cancer (HeLa-Luc) model and achieved significant luciferase gene silencing in the tumor tissue. These results demonstrate the strong potential of uPIC-AuNP nanoarchitectures for systemic siRNA delivery to solid tumors.



KEYWORDS: siRNA delivery · unimer polyion complex · gold nanoparticle · cancer therapy

Small interfering RNA (siRNA), which induces the sequence-specific degradation of mRNA in the cytoplasm (termed RNA interference (RNAi)), has attracted much attention in cancer therapy.^{1,2} However, systemically administered siRNA is rapidly degraded by RNases in the bloodstream and/or eliminated through kidney filtration because they are smaller than 6 nm.^{3,4} Thus, siRNA carriers need to be developed in order to overcome these issues for successful therapy. A variety of synthetic nanocarriers have been constructed mainly with cationic nanomaterials, such as lipids,

polycations, inorganic nanoparticles, and their hybrid systems.^{5–10} These nanocarriers can protect siRNA from enzymatic degradations and apparently increase its size to circumvent kidney filtration. This allows the siRNA payloads to accumulate in tumor tissues through the leaky tumor vasculature via the so-called enhanced permeability and retention (EPR) effect.^{11,12} In this regard, several recent studies have revealed that precise size-tuning promotes the selective accumulation of nanoparticles in tumor tissues.^{13,14} Nanoparticles with a size that is smaller than 50 nm can efficiently

* Address correspondence to kataoka@bmv.t.u-tokyo.ac.jp, miyata@bmv.t.u-tokyo.ac.jp.

Received for review April 17, 2014 and accepted August 18, 2014.

Published online August 18, 2014 10.1021/nn502125h

© 2014 American Chemical Society

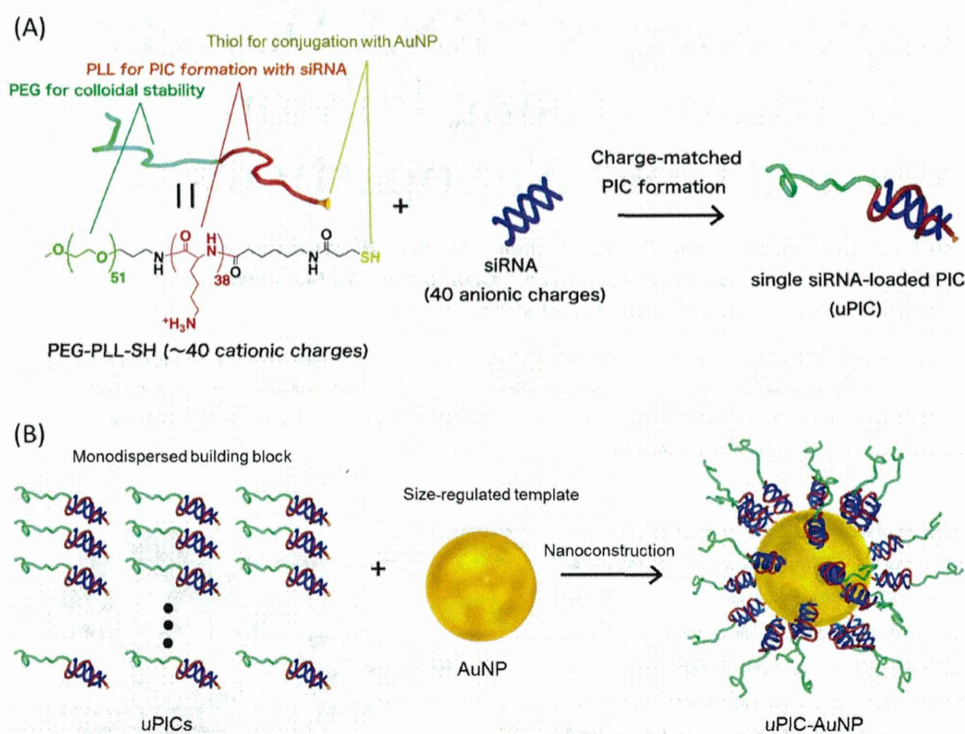


Figure 1. Schematic illustration showing the nanoconstruction of uPIC-AuNPs from monodispersed building blocks. (A) Formation of uPICs comprising a single pair of PEG-PLL and siRNA. (B) Thiol-gold coordination complex between uPICs and AuNP.

accumulate in tumor tissues, especially in a poorly permeable pancreatic tumor model.¹³ Thus, the size of nanocarriers is important for enhancing siRNA accumulation in a variety of tumor tissues.

While multimolecular self-assemblies of siRNA with oppositely charged nanomaterials have been widely developed because of their facile and efficient encapsulation of siRNA, it is difficult to control the size and the distribution of these carriers. In contrast, the bottom-up nanocarrier construction with monodispersed building blocks and a nanotemplate enables more precise size-tuning at the nanoscale. With regard to such building blocks, our recent study demonstrated that a block copolymer of poly(ethylene glycol) and poly(L-lysine) (PEG-PLL) with a controlled degree of polymerization of PLL (DP_{PLL}) formed a unimer polyion complex (uPIC)¹⁵ comprising a single siRNA molecule,^{16,17} potentially serving as a monodispersed building block. A building-block-loading nanotemplate is necessary to satisfy the Janus-type property requirement for the selective siRNA release into the cytosol. Gold nanoparticles (AuNPs) are promising biocompatible nanotemplates, as their size can be precisely controlled with a narrow distribution, and also they can be coated with polymers or biomolecules through thiol chemistry.^{18,19} This type of bonding is relatively stable under extracellular conditions, but these polymers or biomolecules can be competed off

the AuNP with glutathione (GSH), which is abundant in the cytosol.²⁰ Subsequently, the GSH-coordinated anionic AuNPs may interact with uPICs to destabilize them for triggered siRNA release.

To achieve an efficient systemic siRNA delivery to solid tumors, we developed a size-regulated and reversibly stabilized nanoarchitecture (uPIC-AuNP) by utilizing an AuNP template and a monodispersed uPIC building block prepared with a single siRNA/PEG-PLL pair (Figure 1). To this end, a PEG-PLL was prepared to have a DP_{PLL} of ~40 (matched with the negative charges of 21mer/21mer siRNA) and thiol groups at the ω -end of PLL for coordinate bonding with AuNP. After confirming stable binding between single siRNA molecules and copolymers, the resulting uPICs were conjugated to a 20 nm AuNP to build uPIC-AuNP nanoarchitectures exhibiting sizes less than 50 nm and narrow size distributions under biological conditions. The uPIC-AuNPs achieved efficient siRNA accumulation in a subcutaneous tumor model by systemic administration and successfully induced sequence-specific gene silencing in the tumor tissue.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and Characterizations of uPICs Comprising a Single PEG-PLL/siRNA Pair. PEG-PLL synthesis was targeted to possess 40 positive charges (or $DP_{PLL} = 40$), as it can complementarily neutralize the negative charges

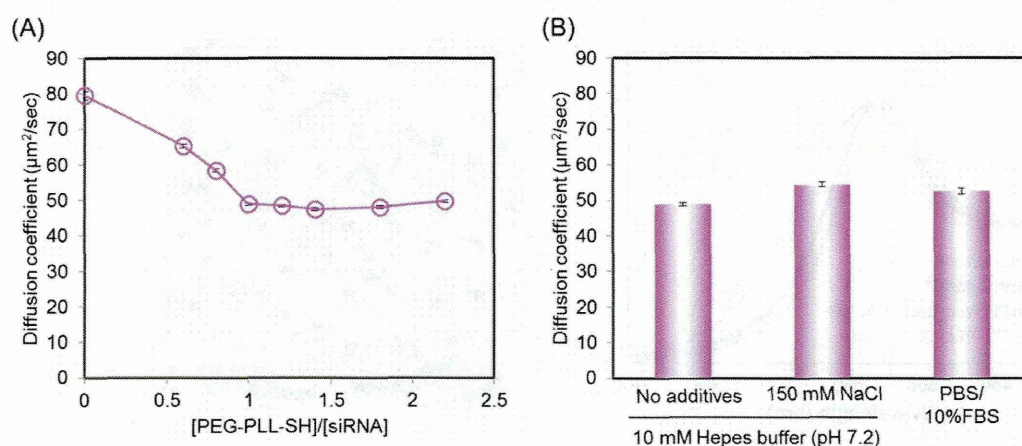


Figure 2. (A) Change in the diffusion coefficient of Cy3-siRNA upon polyionic complexation with PEG-PLL-SH in 10 mM Hepes buffer (pH 7.2) (Cy3-siRNA concentration = 10 nM). Results are expressed as mean and standard deviation ($n = 10$). (B) Diffusion coefficients of Cy3-siRNA-containing PICs prepared at [PEG-PLL-SH]/[siRNA] = 1.0 in various media (Cy3-siRNA concentration = 10 nM). Results are expressed as mean and standard deviation ($n = 10$).

of single 21mer/21mer siRNA and form uPICs through charge-matched polyionic complexation (Figure 1). The obtained PEG-PLL with TFA protective groups (PEG-PLL(TFA)) was determined to possess the DP_{PLL} of 38 in ^1H NMR spectrum (data not shown). The primary amine in the ω -end of PEG-PLL(TFA) was further modified with LC-SPDP for thiol-gold coordinate bonding, and the quantitative introduction of LC-SPDP was confirmed in ^1H NMR spectrum (Figure S1, Supporting Information (SI)). After successive removals of TFA and pyridyl groups with sodium hydroxide and dithiothreitol (DTT), respectively, the thiolated PEG-PLL (PEG-PLL-SH) was mixed with Cy3-labeled siRNA (Cy3-siRNA) at varying mixing ratios in 10 mM Hepes buffer (pH 7.2), and then characterized by fluorescence correlation spectroscopy (FCS). Note that FCS can determine a diffusion coefficient (D) of highly dilute fluorescent molecules even in serum-containing media.^{21,22} The D values of PEG-PLL-SH/Cy3-siRNA mixtures decreased progressively with a molar ratio of PEG-PLL-SH to siRNA ([PEG-PLL-SH]/[siRNA]) and leveled off at [PEG-PLL-SH]/[siRNA] = 1 (Figure 2A). The initial decrease in the D indicates PIC formation between Cy3-siRNA and PEG-PLL-SH. The following plateau region in the D strongly suggests that all the Cy3-siRNAs were complexed with PEG-PLL-SH at [PEG-PLL-SH]/[siRNA] = 1, and an excess amount of PEG-PLL-SH at [PEG-PLL-SH]/[siRNA] > 1 did not bind to siRNA. The PIC prepared at [PEG-PLL-SH]/[siRNA] = 1 was further characterized by analytical ultracentrifugation (AUC) based on the absorbance at 260 nm for a precise structural determination. The molecular weight (MW) of PICs in 10 mM Hepes buffer (pH 7.2) containing 150 mM NaCl was calculated by combining the AUC (sedimentation equilibrium) data with a partial specific volume (PSV) of PICs (0.602 cm^3/g) and the buffer density (1.005 cm^3/g). Note that the PSV of PICs was

determined as a mass average of PSV of siRNA (0.508 cm^3/g) and PSV of PEG-PLL (0.753 cm^3/g). The major parameters used for the calculation of MW of PICs are summarized in Table S1 (SI). The PIC exhibited a MW of approximately 22 kDa, consistent with the formation of a uPIC comprising a single pair of PEG-PLL (MW = 7200 Da) and siRNA (MW = 13 300 Da). Single siRNA loading in uPIC was confirmed by using FCS. The association number of siRNA in the PIC was determined to be 0.9 ± 0.1 using 10 nM Cy3-siRNA. It was calculated by normalizing the fluorescent particle number (or amplitude number particle) of the PIC to that of naked siRNA. Note that the diffusion coefficient of uPICs determined at 10 nM siRNA ($\sim 50 \mu\text{m}^2/\text{sec}$) was maintained even at much higher concentrations, *i.e.*, 20 and 40 μM siRNA (Table S2 (SI)), indicating that the similar uPICs were also prepared under the preparation condition of uPIC-AuNPs (17 μM siRNA). The uPIC formation with a single pair of siRNA and PEG-PLL (DP of PLL = ~ 40) can be further validated from the standpoint of their molecular structures. Considering the fact that siRNA adopts a right-handed A-form helix with 11 bp per helical turn, a helical pitch of 2.8 nm, and a diameter of 2.3 nm,²³ PLL segment having the maximum main chain length of 4.1 nm per 11 amino acids and the maximum side chain length of 0.65 nm can completely make ion pairs with siRNA phosphates along the helical structure. Nevertheless, the complete ion pair formation between siRNA and PLL remains to be evidenced in further studies. The stability of uPICs prepared at [PEG-PLL-SH]/[siRNA] = 1 was further investigated by FCS (Figure 2B). The addition of 10% fetal bovine serum (FBS) and a physiological salt hardly affected the D values of the uPICs, indicating stable PIC formation under the biological conditions. These results demonstrated that the stable uPICs were selectively prepared using

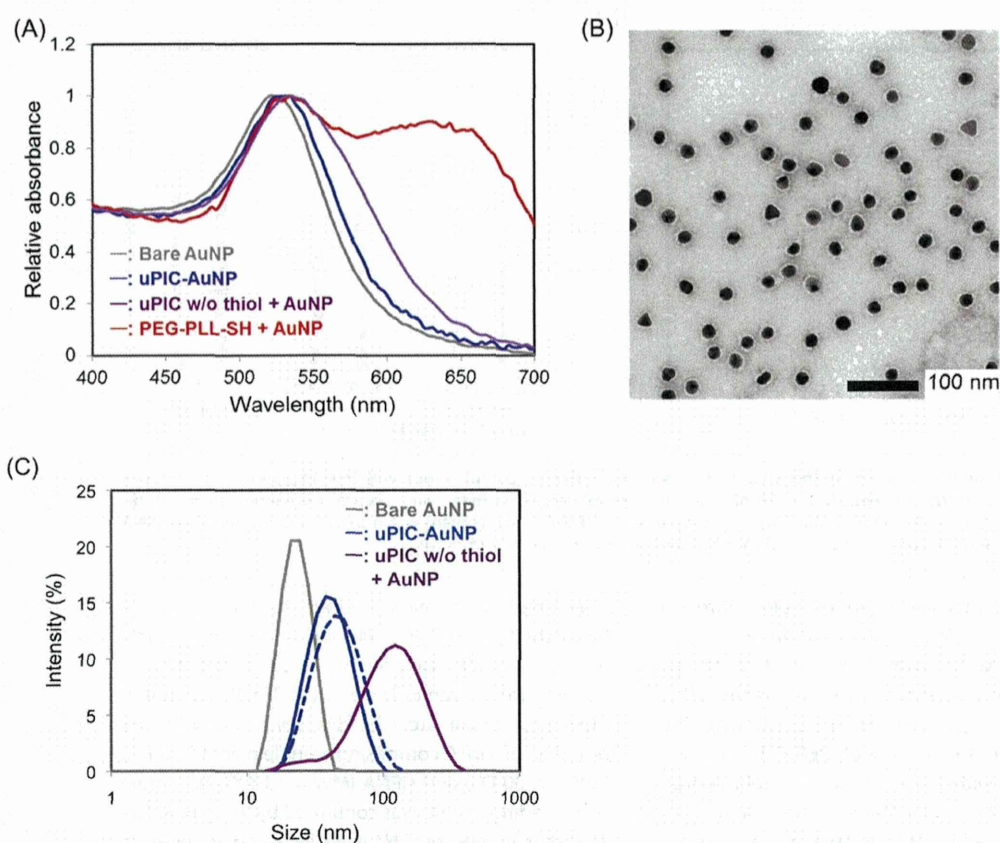


Figure 3. (A) UV-vis absorbance spectra of various sample solutions. Bare AuNP: AuNPs without PICs in 10 mM Hepes buffer (pH 7.2), uPIC-AuNP: uPIC-loaded AuNPs in 10 mM Hepes (pH 7.2) containing 150 mM NaCl, uPIC w/o thiol + AuNP: the mixture of AuNPs and uPICs prepared with nonthiolated PEG-PLL in 10 mM Hepes (pH 7.2) containing 150 mM NaCl, and PEG-PLL-SH + AuNP: the mixture of AuNPs and thiolated PEG-PLL without siRNA. (B) TEM image of uPIC-AuNPs. (C) Intensity-based DLS histograms of various sample solutions. Bare AuNP: AuNPs without PICs in 10 mM Hepes buffer (pH 7.2), uPIC-AuNP: uPIC-loaded AuNPs in 10 mM Hepes (pH 7.2) containing 150 mM NaCl (solid line) or 10% FBS (dashed line), and uPIC w/o thiol + AuNP: the mixture of AuNPs and uPICs prepared with nonthiolated PEG-PLL in 10 mM Hepes (pH 7.2) containing 150 mM NaCl. All samples were incubated overnight at ambient temperature (AuNP concentration: 12 nM).

PEG-PLL bearing ~ 40 positive charges, allowing their use as monodispersed building blocks for nanoconstruction.

Preparation and Characterizations of the Smart uPIC-AuNP Nanoarchitecture. uPICs were used as monodispersed building blocks for the construction of smart uPIC-AuNP nanoarchitectures (Figure 1). Specifically, the uPICs, which were prepared at $[\text{PEG-PLL-SH}]/[\text{siRNA}] = 1$ in 10 mM Hepes buffer (pH 7.2), were mixed with 20 nm AuNPs at a molar ratio ($[\text{siRNA}]/[\text{AuNP}] = 360$) in the same buffer, then incubated at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 8 h. Unbound uPICs were removed thoroughly by repeated centrifugal steps and the resulting uPIC-AuNPs were dispersed in 10 mM Hepes buffer (pH 7.2) containing 150 mM NaCl. The successful conjugation of uPICs onto AuNP was verified by UV-vis absorbance spectra, transmission electron microscopy (TEM), and dynamic light scattering (DLS). The absorbance spectrum of uPIC-AuNPs suggested that flocculation of AuNPs hardly occurred during the conjugation process, as a notable change in the absorbance spectra based on the surface

plasmon resonance was not observed between bare AuNPs and uPIC-AuNPs (Figure 3A). Furthermore, the TEM image depicted that the uPIC-AuNPs were composed of single AuNP without particle aggregation, as their spherical shapes with a narrow size distribution (Figure 3B) were similar to those of the bare AuNP templates (Figure S2 (SI)). On the other hand, the intensity-based DLS histograms clearly show an increase in size of AuNPs after uPIC conjugation (Figure 3C). The peak top in the histogram was shifted from *ca.* 23 nm in bare AuNPs to *ca.* 38 nm in uPIC-AuNPs. Considering that the siRNA length is *ca.* 6 nm^{24} and a hydrodynamic radius of PEG (MW = 2200) in a random coil is *ca.* 1.5 nm,²⁵ this size increase is consistent with the conjugation of uPICs on AuNP, as illustrated in Figure 1B. In addition, the zeta-potential of uPIC-AuNPs was determined to be $-24.7 \pm 0.4\text{ mV}$. This value was significantly higher in the positive direction than that of bare AuNPs ($-31.3 \pm 1.2\text{ mV}$), consistent with the presence of PEG outer shell in uPIC-AuNPs. It should be noted that the uPIC-AuNPs maintained their

size and size distribution even after overnight incubation in 10% FBS-containing media (Figure 3C), indicating the high stability of these nanoarchitectures in the biological media. These results clearly demonstrate that the uPIC-AuNPs were successfully constructed in a size-regulated and monodispersed manner.

Next, the number of uPICs (or siRNAs) loaded in the uPIC-AuNPs was determined using a fluorescently labeled siRNA. The uPIC-AuNPs prepared with Alexa647-labeled siRNA (Alexa-siRNA) were treated with an excess amount of mercaptoethanol (12 mM) to induce a thiol exchange reaction on the AuNP surface.¹⁹ The amount of released uPIC was quantified from its fluorescence intensity in the supernatant according to the standard curve (Figure S3 (SI)), and normalized by the amount of AuNP in solution. The number of loaded uPICs was calculated to be *ca.* 20 per AuNP. This value is slightly smaller than that for previous siRNA-loaded AuNP systems, where thiolated siRNAs were directly attached to AuNPs and the number of loaded siRNA amounted to *ca.* 30 per AuNP.²⁶ The difference between these two formulations could be explained by their different spacer length between thiol and the charged segment. The thiolated siRNA had a longer spacer than the present PEG-PLL-SH polymer, alleviating the steric repulsive effects on the AuNP surface.

With regard to the nanoconstruction of uPIC-AuNPs, it was verified whether the preformation of uPICs and the thiol moiety in PEG-PLL-SH were indispensable for successful preparation of the uPIC-AuNPs. When PEG-PLL-SH polymers were directly mixed with AuNPs prior to PIC formation (or in the absence of siRNA), visible flocculates were formed as indicated by the red-shift in their UV-vis absorbance spectrum (Figure 3A),¹⁸ probably due to consecutive electrostatic binding between negatively charged citrate-stabilized AuNPs and oppositely charged PLL segments. On the other hand, the mixing between AuNPs and uPICs prepared with nonthiolated PEG-PLL led to the formation of considerably larger nanoparticles (DLS peak top: \sim 120 nm) with a broader size distribution (Figure 3C) and a slightly broader absorbance spectrum (Figure 3A) compared to the uPIC-AuNPs. This result indicates that a large number of AuNPs aggregated into larger particles under the physiological salt condition as a result of low colloidal stability through ineffective surface PEGylation in the absence of thiol-gold coordinate bonding. Note that bare AuNPs immediately aggregated to form visible flocculates by salting-out effect under the same condition (data not shown). Thus, the successful preparation of uPIC-AuNPs may stem from (i) the charge-neutralization of cationic PLL segment with siRNA, which reduces the electrostatic adsorptions between PLL chains and AuNPs, and (ii) the effective conjugation of uPICs (or PEG chains) onto AuNPs through thiol-gold coordinate bonding, which enhances colloidal stability.

The reversible stability of uPIC-AuNPs was verified by mimicking cytoplasmic reductive conditions as well as the extracellular conditions. The nanoarchitectures were incubated in a heparin solution with or without 10 mM GSH, which corresponds to the cytoplasmic concentration. In this stability assay, heparin was used as a representative of glycocalyx that is a major component of extracellular matrices and is abundant in the renal basement membrane. Glycocalyx is considered as a major obstacle for PIC-based siRNA delivery because PICs might be disrupted through electrostatic interactions with the negatively charged matrices.²⁷ In the absence of heparin and GSH, almost no bands derived from siRNA were observed for both uPICs and uPIC-AuNPs (Figure 4A), confirming the polyionic complexation of siRNA as indicated by the FCS result (Figure 2A). It should be noted that the staining of siRNA with SYBR Green II was significantly impaired when siRNA forms PICs with PEG-PLL, leading to almost no fluorescence signal from the siRNAs loaded by uPICs as well as uPIC-AuNPs. The heparin treatment induced a concentration-dependent siRNA release from uPICs and uPIC-AuNP by counter polyanion exchange. However, this release required more heparin in the case of uPIC-AuNPs compared to uPICs. In particular, while the released siRNA was clearly observed upon treatment of uPICs with 1 μ g/mL of heparin, almost no band was detected for uPIC-AuNPs under the same conditions. These results indicate that uPICs conjugated onto the AuNP were more stable than free uPICs. This enhanced PIC stability may be attributed to the PEG outer layer surrounding uPIC-AuNP.

In contrast, the GSH-treated uPIC-AuNPs showed a band of released siRNA with smaller amount of heparin, compared to those in the absence of GSH, demonstrating the GSH-responsive siRNA release from uPIC-AuNPs. The underlying mechanism for this GSH-responsive release can be explained as follows. GSH (or its cystein thiol) can detach uPICs from AuNP through the thiol-thiol exchange reaction. The detached uPICs should become more sensitive for counter polyanion exchange with heparin as indicated by Figure 4A (uPIC + Heparin lanes vs uPIC-AuNP + Heparin lanes), resulting in the facilitated siRNA release. This can be explained by the fact that the cysteine thiol in GSH can competitively interact with coordinate bonds between uPICs and AuNP, forming alternative coordinate bonds with AuNPs (or uPICs) that promote the detachment of uPICs from uPIC-AuNPs. In this regard, it is worth mentioning that the GSH-treated uPIC-AuNPs also released siRNA in the absence of heparin. GSH alone did not release siRNA from uPICs even at 50 mM (Figure 4B), suggesting that the coexistence of GSH and AuNPs should be crucial for the siRNA release. We assumed that GSH-conjugated AuNPs (GSH-AuNPs), which should be generated by incubation of uPIC-AuNPs with GSH, might elicit siRNA release from