

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5166022号
(P5166022)

(45) 発行日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)

(24) 登録日 平成24年12月28日 (2012. 12. 28)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 279/14 (2006. 01)

C O 7 C 279/14 C S P

A 6 1 K 47/44 (2006. 01)

A 6 1 K 47/44 Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7105 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7105

請求項の数 36 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-512035 (P2007-512035)
 (86) (22) 出願日 平成17年5月6日 (2005. 5. 6)
 (65) 公表番号 特表2007-536324 (P2007-536324A)
 (43) 公表日 平成19年12月13日 (2007. 12. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/004920
 (87) 国際公開番号 W02005/105152
 (87) 国際公開日 平成17年11月10日 (2005. 11. 10)
 審査請求日 平成20年3月11日 (2008. 3. 11)
 (31) 優先権主張番号 04010700.5
 (32) 優先日 平成16年5月5日 (2004. 5. 5)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 04030847.0
 (32) 優先日 平成16年12月27日 (2004. 12. 27)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 505047256
 サイレンス・セラピューティクス・アーゲ
 ー
 S I L E N C E T H E R A P E U T I C
 S A G
 ドイツ国、1 3 1 2 5 ベルリン、ローベ
 ルトーレスレーシュトラッセ 1 0
 (74) 代理人 110001508
 特許業務法人 津国
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100131808
 弁理士 柳橋 泰雄
 (74) 代理人 100119079
 弁理士 伊藤 佐保子

前置審査

最終頁に続く

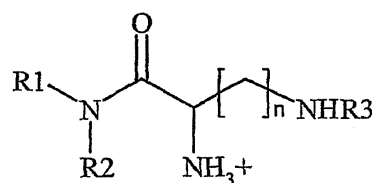
(54) 【発明の名称】 脂質、脂質複合体、およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) :

【化 1】



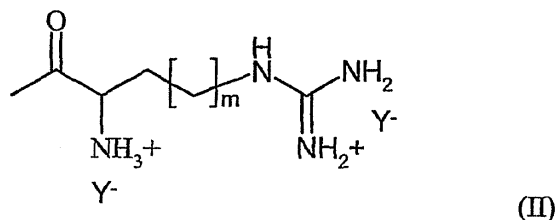
(I)

[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立してアルキルおよびアルケニルからなる群より選択され、

n は、1 から 4 の間の任意の整数であり、

R_3 は、リシル、オルニチル、2, 4 - ジアミノブチリル、ヒスチジル、および式 (II) :

【化 2】



(式中、 m は、1から3の任意の整数であり、
 Y^- は薬学的に許容されうる陰イオンである)
 のアシル部分からなる群より選択されるアシルである」
 の化合物。

10

【請求項 2】

R_1 および R_2 が、それぞれ独立してラウリル、ミリスチル、パルミチルおよびオレイルからなる群より選択される、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

R_1 がラウリルであり、 R_2 がミリスチルであるか、または R_1 がパルミチルであり、 R_2 がオレイルである、請求項 1 および 2 のいずれか記載の化合物。

【請求項 4】

m が、1 または 2 である、請求項 1 から 3 のいずれか記載の化合物。

【請求項 5】

化合物が、陽イオン性脂質である、請求項 1 から 4 のいずれか記載の化合物。

20

【請求項 6】

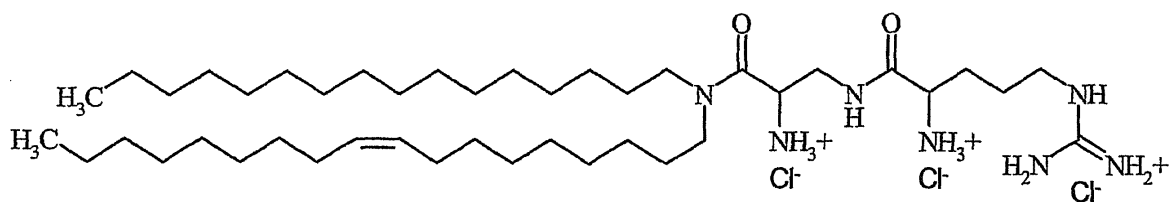
Y^- が、ハロゲン化物イオン、酢酸イオンおよびトリフルオロ酢酸イオンからなる群より選択される、請求項 1 から 5 のいずれか記載の化合物。

【請求項 7】

化合物が、

- アルギニル - 2, 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド

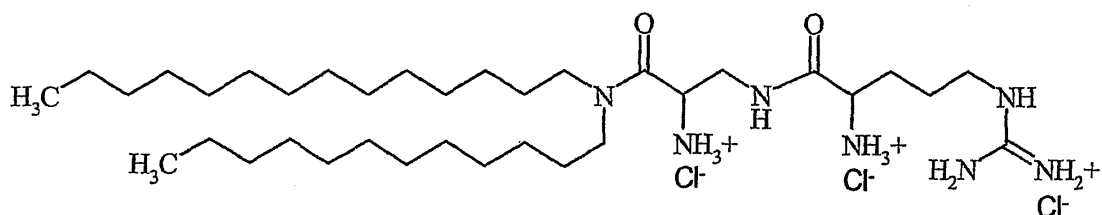
【化 3】



30

- アルギニル - 2, 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド

【化 4】

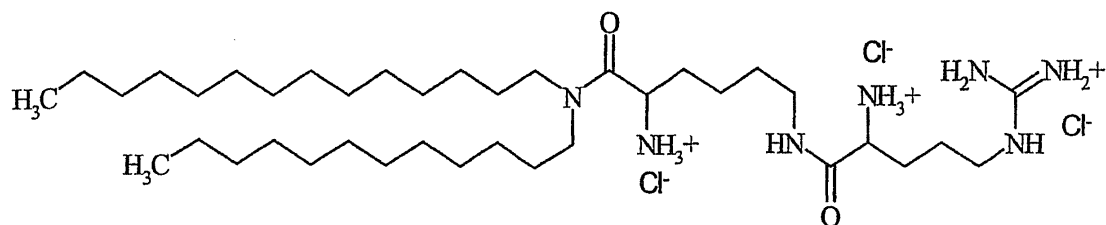


40

および

- アルギニル - リシン - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド

【化 5】



からなる群より選択される、請求項 1 から 6 のいずれか記載の化合物。

【請求項 8】

10

以下：

請求項 1 から 7 のいずれか記載の化合物であって、ここで化合物が、 - アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリドである化合物、

第 1 ヘルパー脂質として、1 , 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン；

第 2 ヘルパー脂質として、1 , 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - PEG 2000 ；

薬学的活性化合物および薬学的に許容されうる担体を含む薬学的組成物。

【請求項 9】

20

a) 50 mol%の - アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド、

48 mol%の 1 , 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン；および

2 mol%の 1 , 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - PEG 2000、または

b) 50 mol%の - L - アルギニル - 2 , 3 - L - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド、

49 mol%の 1 , 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン；および

30

1 mol%の N (カルボニル - メトキシポリエチレングリコール - 2000) - 1 , 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン

を含む、請求項 8 記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

薬学的活性化合物が、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよび核酸からなる群より選択される、請求項 8 または 9 記載の組成物。

【請求項 11】

タンパク質が、抗体またはモノクローナル抗体である、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 12】

核酸が、DNA、RNA、PNA および LNA からなる群より選択される、請求項 10 記載の組成物。

40

【請求項 13】

核酸が、機能的核酸であり、ここで該機能的核酸が、RNAi、siRNA、siNA、アンチセンス核酸、リボザイム、アプタマーおよびシュピーゲルマーからなる群より選択される、請求項 10 または 12 のいずれか記載の組成物。

【請求項 14】

機能的核酸が、RNAi、siRNA、siNA、アンチセンス核酸およびリボザイムからなる群より選択され、ここで、陽イオン性脂質に対する RNAi のモル比が 0.02 から 0.05 である、請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】

50

化合物および／またはヘルパー脂質構成要素が、水性媒質中に分散体として存在する、請求項 8 から 14 のいずれか記載の組成物。

【請求項 16】

化合物および／またはヘルパー脂質構成要素が、水混和性溶媒中に溶液として存在し、ここで、該溶媒が、エタノールおよび *tert*-ブタノールからなる群より選択される、請求項 8 から 14 のいずれか記載の組成物。

【請求項 17】

組成物が、核酸を含有し、核酸主鎖ホスフェート対陽イオン性脂質窒素原子の電荷比が、1 : 1.5 ~ 7 である、請求項 8 から 16 のいずれか記載の組成物。

【請求項 18】

分散体の粒径が、120 nm である、請求項 15 記載の組成物。

【請求項 19】

薬剤の製造のための、請求項 1 から 7 のいずれか記載の化合物または請求項 8 から 18 のいずれか記載の組成物の使用方法。

【請求項 20】

薬剤が、癌および／または心血管関連疾患の処置のためである、請求項 19 記載の使用
方法。

【請求項 21】

薬剤が、癌の処置のためのものであり、ここで、該癌が、固形および非固形腫瘍からなる群より選択される、請求項 20 記載の使用
方法。

【請求項 22】

固形腫瘍が、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌、および肝細胞癌からなる群より
選択される、請求項 21 記載の使用
方法。

【請求項 23】

癌が、血管形成および血管新生からなる群より選択される過程を伴う、請求項 20 から
22 のいずれか記載の使用
方法。

【請求項 24】

薬剤が、内皮細胞、上皮細胞および腫瘍細胞からなる群より選択される細胞に核酸を投
与するためのものである、請求項 19 記載の使用
方法。

【請求項 25】

内皮細胞が、脈管構造の内皮細胞である、請求項 24 記載の使用
方法。

【請求項 26】

脈管構造が、血管新生または腫瘍関連血管新生から発生する脈管構造である、請求項 2
5 記載の使用
方法。

【請求項 27】

脈管構造が、肝臓脈管構造、心臓脈管構造、腎臓脈管構造、膵臓脈管構造および肺脈管
構造からなる群より選択される、請求項 25 記載の使用
方法。

【請求項 28】

薬剤が、全身投与のためのものである、請求項 19 から 27 のいずれか記載の使用
方法。

【請求項 29】

薬剤が、局所投与のためのものである、請求項 19 から 27 のいずれか記載の使用
方法。

【請求項 30】

薬剤が、診断薬である、請求項 19 から 29 のいずれか記載の使用
方法。

【請求項 31】

移動剤としての請求項 1 から 7 のいずれか記載の化合物または請求項 8 から 18 のい
ずれか記載の組成物のインビトロの使用
方法。

【請求項 32】

移動剤が、薬学的活性構成要素および／またはさらなる構成成分を哺乳動物細胞または

10

20

30

40

50

ヒト細胞内に移動させる、請求項 3 1 記載の使用方法。

【請求項 3 3】

細胞が、内皮細胞または血管関連内皮細胞である、請求項 3 2 記載の使用方法。

【請求項 3 4】

薬学的活性化化合物を細胞内に、または細胞膜を通過して移動させるためのインビトロの方法であって、以下の工程：

- 該細胞または該膜を提供する工程；
 - 請求項 1 から 7 のいずれか記載の化合物を提供する工程；
 - 該薬学的活性化化合物を提供する工程；および
 - 該細胞または該膜を、該薬学的活性化化合物および請求項 1 から 7 のいずれか記載の化合物と接触させる工程
- を含む方法。

10

【請求項 3 5】

薬学的活性化化合物および／またはさらなる構成成分を細胞に、または細胞膜を通過して移動させるためのインビトロの方法であって、以下の工程：

- 該細胞または該膜を提供する工程；
 - 請求項 8 から 1 8 のいずれか記載の組成物を提供する工程；および
 - 該細胞または該膜を請求項 8 から 1 8 のいずれか記載の組成物と接触させる工程
- を提供する方法。

20

【請求項 3 6】

さらなる工程として

- 細胞中の、および／または膜の向こうの、該薬学的活性化化合物を検出する工程
- を含む、請求項 3 4 または 3 5 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、陽イオン性脂質、それを有する組成物、およびその使用、ならびに細胞に化学化合物を移動させるための方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

30

分子生物学および分子医学の両方が、細胞への生物学的活性化化合物の導入に大きく依存している。当該生物学的活性化化合物は、何よりも DNA、RNA、ならびにペプチドおよびタンパク質をそれぞれ典型的には含む。乗り越えなければならない障壁は、典型的には負に荷電した外表面を有する脂質二重層である。当技術分野において、細胞膜を通過して、したがって生物学的活性化化合物を導入するために、多数の技法が開発された。しかし、実験室での使用を考えている一部の方法は医学分野に使用することができず、さらに特定すれば薬物送達に適切ではない。例えば、当技術分野で公知のエレクトロポレーション法およびバリスティック法は、たとえあったとしても生物学的活性化化合物の局所送達を可能にするだけであろう。前記脂質二重層は別として、細胞膜も輸送系を備える。したがって、細胞膜を通過して生物学的活性化化合物を移動させるためにこの種の輸送系を使用する努力がなされた。しかし、当該輸送系の特異性または交差反応性が原因で、これらの使用は一般的に適用できる方法ではない。

40

【0003】

細胞に生物学的活性化化合物を移動させるために当技術分野において記載されたより一般に適用できる方法は、ウイルスベクターの使用である。しかし、ウイルスベクターは、ある種の細胞に効率的に遺伝子を移動させるためにのみ使用することができるが、細胞に化学合成された分子を導入するためには使用できない。

【0004】

代替的な方法は、いわゆるリポソームの使用であった (Bangham, J. Mol. Biol. 13, 238-252)。リポソームは、水中で両親媒性脂質が会合した際に発生する小胞である。リポ

50

ソームは、典型的にはリン脂質が同心状に配列した二重層を含む。層の数に応じて、リボソームを小さな単膜小胞、多重膜小胞および大きな多重膜小胞に分類することができる。リボソームは水性中間層に親水性化合物を取込むことを可能にするが、疎水性化合物は脂質層に取込まれることから、有効な送達剤であることが証明された。脂質製剤の組成およびその調製方法の両方が、結果として生じる脂質凝集物の構造および大きさに、したがってリボソームに作用を及ぼすことは、当技術分野において周知である。リボソームは、陽イオン性脂質を取込むことも公知である。

【 0 0 0 5 】

リボソームの構成要素であることに加えて、陽イオン性脂質は、生体高分子の細胞送達にそれとして使用できることから、かなりの注目も集めた。陽イオン性脂質を使用して、静電相互作用により本質的に定量的に任意の陰イオン化合物を封入できる。さらに、陽イオン性脂質は陰性荷電した細胞膜と相互作用して、細胞膜輸送を開始すると考えられている。陽イオン性脂質を含有するリボソーム製剤を使用すること、または当該陽イオン性脂質を生物学的活性化合物と共に使用することは、発見的解釈方法を必要とすることが見出された。それは、普通は血清の不在下で全てではなく一部の種類の細胞にしか各製剤がプラスミドを典型的には送達できないことが原因で、その使用が限定されているからである。

【 0 0 0 6 】

脂質およびそれらの脂質によって輸送される生物学的活性化合物の電荷および/または質量比は、様々な種類の前記生物学的活性化合物の送達に決定的な因子であることが判明した。例えば、大きさが 5 0 0 0 から 1 0 0 0 0 塩基を含むプラスミドの送達に適した脂質製剤は、典型的には約 1 0 から約 5 0 塩基を含む合成リボザイムまたはアンチセンス分子のようなオリゴヌクレオチドの送達に一般に有効ではない。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムに最適な送達条件は、同じ種類の細胞であっても異なることが最近示された。

【 0 0 0 7 】

米国特許第 6 , 3 9 5 , 7 1 3 号は、親油性基、リンカーおよび頭基から典型的にはなる陽イオン性脂質系組成物、ならびに細胞に生物学的活性化合物を移動させるための当該組成物の使用を開示している。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明の根底にある問題は、細胞、好ましくは動物細胞に生物学的活性化合物を導入する手段を提供することであった。本発明の根底にあるさらなる問題は、核酸、特に s i R N A、s i N A および R N A i、またはアプタマーおよびシュピーゲルマー (s p i e g e l m e r) のような低分子核酸のための送達剤を提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

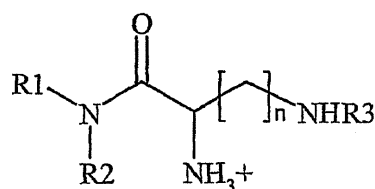
これらの問題は、添付の独立クレームの主題によって解決される。好ましい態様は、それに関する添付の従属クレームから解釈することができる。

【 0 0 1 0 】

第一の局面では、本発明の根底にある問題は、式 (I) :

【 0 0 1 1 】

【 化 6 】



(I)

10

20

30

40

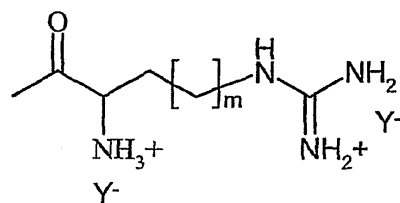
50

【 0 0 1 2 】

[式中、 R_1 および R_2 は、アルキルを含む群よりそれぞれ独立して選択され、
 n は 1 から 4 の間の任意の整数であり、
 R_3 はリシル、オルニチル、2, 4 - ジアミノブチリル、ヒスチジル、および式 (I I)
 :

【 0 0 1 3 】

【 化 7 】



(II)

10

【 0 0 1 4 】

(式中、 m は 1 から 3 の任意の整数であり、
 Y^- は薬学的に許容されうる陰イオンである)
 のアシル部分を含む群より選択されるアシルである]
 による化合物によって解決される。

【 0 0 1 5 】

一態様では、 R_1 および R_2 は、ラウリル、ミリスチル、パルミチル、およびオレイル
 を含む群よりそれぞれ独立して選択される。 20

【 0 0 1 6 】

一態様では、 R_1 はラウリルであり、 R_2 はミリスチルであるか、または
 R_1 はパルミチルであり、 R_2 はオレイルである。

【 0 0 1 7 】

一態様では、 m は 1 または 2 である。

【 0 0 1 8 】

一態様では、その化合物は陽イオン性脂質であり、好ましくは陰イオン Y^- と会合して
 いる。

【 0 0 1 9 】

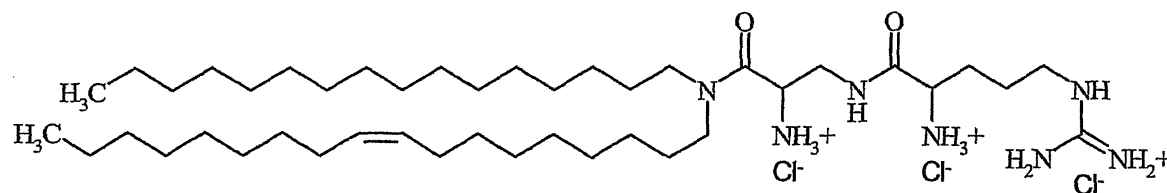
一態様では、 Y^- は、ハロゲン化物イオン、酢酸イオンおよびおよびトリフルオロ酢酸
 イオンを含む群より選択される。 30

【 0 0 2 0 】

一態様では、その化合物は、以下を含む群より選択される：
 - アルギニル - 2, 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル -
 アミドトリヒドロクロリド

【 0 0 2 1 】

【 化 8 】



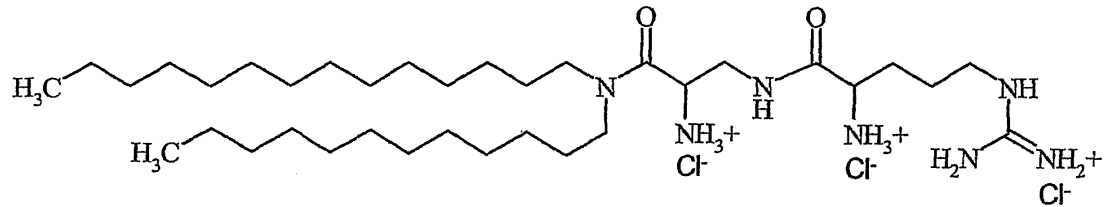
40

【 0 0 2 2 】

- アルギニル - 2, 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチル -
 アミドトリヒドロクロリド

【 0 0 2 3 】

【化 9】



【 0 0 2 4 】

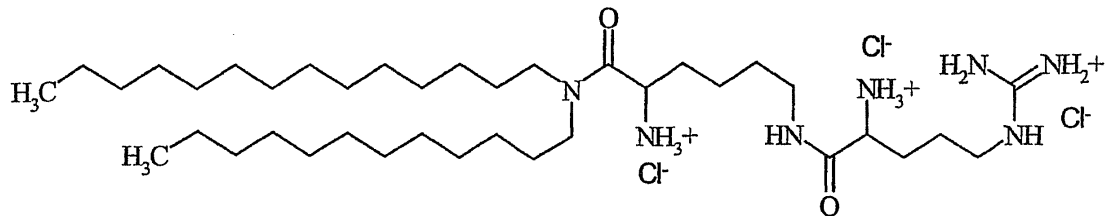
および

- アルギニル - リシン - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド。

10

【 0 0 2 5 】

【化 10】



【 0 0 2 6 】

20

第 2 の局面では、本発明の根底にある問題は、脂質構成要素として第 1 の局面による化合物と、担体とを含む組成物によって解決される。

【 0 0 2 7 】

一態様では、その組成物はさらなる構成成分を含む。

【 0 0 2 8 】

第 3 の局面では、本発明の根底にある問題は、第 1 の局面による化合物と、薬学的活性化合物と、好ましくは薬学的に許容されうる担体とを含む薬学的組成物によって解決される。

【 0 0 2 9 】

第 2 および第 3 の局面の一態様では、薬学的活性化合物および / またはさらなる構成成分は、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよび核酸を含む群より選択される。

30

【 0 0 3 0 】

第 2 および第 3 の局面の一態様では、そのタンパク質は抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。

【 0 0 3 1 】

第 2 および第 3 の局面の一態様では、その核酸は、DNA、RNA、PNA および LNA を含む群より選択される。

【 0 0 3 2 】

第 2 および第 3 の局面の一態様では、その核酸は機能的核酸であり、ここで、その機能的核酸は、好ましくは RNAi、siRNA、siNA、アンチセンス核酸、リボザイム、アプタマー、および Spiegelmer を含む群より選択される。

40

【 0 0 3 3 】

第 2 および第 3 の局面の一態様では、その組成物は、少なくとも一つのヘルパー脂質構成要素をさらに含み、ここで、そのヘルパー脂質構成要素は、好ましくはリン脂質およびステロイドを含む群より選択される。

【 0 0 3 4 】

第 2 および第 3 の局面の好ましい態様では、そのヘルパー脂質構成要素は、1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、および 1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンを含む群より選択される。

50

【 0 0 3 5 】

第2および第3の局面の一態様では、ヘルパー脂質構成要素の含有量は、その組成物の全脂質含有量の約20mol%から約80mol%である。

【 0 0 3 6 】

第2および第3の局面の好ましい態様では、ヘルパー脂質構成要素の含有量は、約35mol%から約65mol%である。

【 0 0 3 7 】

第2および第3の局面の一態様では、その脂質は、 α -アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パルミチル-N-オレイル-アミドトリヒドロクロリドであり、そのヘルパー脂質は、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンである。

10

【 0 0 3 8 】

第2および第3の局面の好ましい態様では、その脂質は、その組成物の全脂質含有量の50mol%であり、そのヘルパー脂質は50mol%である。

【 0 0 3 9 】

第2および第3の局面の一態様では、その組成物は、少なくとも二つのヘルパー脂質を含有する。

【 0 0 4 0 】

第2および第3の局面の好ましい態様では、少なくとも一つのヘルパー脂質は、PEG部分、HEG部分、ポリヒドロキシエチルデンブレン(ポリHES)部分、およびポリプロピレン部分を含む群より選択される部分を含み、ここで、当該部分は、好ましくは約500から10000Da、さらに好ましくは約2000から5000Daの分子量を提供する。

20

【 0 0 4 1 】

第2および第3の局面の好ましい態様では、PEG部分を含むヘルパー脂質は、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジアルキル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、およびセラミド-PEGを含む群より選択される。

【 0 0 4 2 】

第2および第3の局面のさらに好ましい態様では、PEG部分は約500Daから10000Da、好ましくは約2000から5000Daの分子量、さらに好ましくは2000Daの分子量を有する。

30

【 0 0 4 3 】

第2および第3の局面のなおさらに好ましい態様では、その組成物は、脂質構成要素として α -アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パルミチル-N-オレイル-アミドトリヒドロクロリド、第1ヘルパー脂質として1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、および第2ヘルパー脂質として1,2-ジステロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-PEG2000を含む。

【 0 0 4 4 】

第2および第3の局面のよりさらに好ましい態様では、第2ヘルパー脂質の含有量は、約0.05mol%から4.9mol%、好ましくは約1から3mol%である。

40

【 0 0 4 5 】

第2および第3の局面のよりなおさらに好ましい態様では、脂質の含有量は45mol%から50mol%であり、第1ヘルパー脂質の含有量は45から50mol%であり、PEG化第2ヘルパー脂質が存在するという条件ならば、第2ヘルパー脂質の含有量は約0.1mol%から約5mol%、好ましくは約1から4mol%、さらに好ましくは約2%であり、ここで、第1ヘルパー脂質と第2ヘルパー脂質との脂質の脂質含有量の合計は、100mol%であり、ここで、第1ヘルパー脂質と第2ヘルパー脂質との合計は50mol%である。

【 0 0 4 6 】

第2および第3の局面の好ましい態様では、その組成物は、

a) 50mol%の α -アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パルミチル-N-

50

オレイル - アミドトリヒドロクロリドと、

4 8 mol%の 1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンと、
2 mol%の 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - P E
G 2 0 0 0 と、または、

b) 5 0 mol%の - L - アルギニル - 2 , 3 - L - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチ
ル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリドと、

4 9 mol%の 1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンと、
1 mol%の N (カルボニル - メトキシポリエチレングリコール - 2 0 0 0) - 1 , 2 - ジス
テアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、好ましくはそのナトリウム
塩と

10

のいずれかを含有する。

【 0 0 4 7 】

第 2 および第 3 の局面の好ましい態様では、機能的核酸は二本鎖リボ核酸であり、ここ
で、その組成物はさらに核酸、好ましくは機能的核酸を含み、その機能的核酸はさらに好
ましくは二本鎖リボ核酸、最も好ましくは、R N A i、s i R N A、s i N A、アンチセ
ンス核酸およびリボザイムを含む群より選択される核酸であり、ここで、好ましくは陽イ
オン性脂質に対する R N A i のモル比は、約 0 から 0 . 0 7 5、好ましくは約 0 . 0 2 か
ら 0 . 0 5、なおさらに好ましくは 0 . 0 3 7 である。

【 0 0 4 8 】

第 2 および第 3 の局面の好ましい態様では、その組成物および / またはヘルパー脂質構
成要素は、水性媒質中に分散体として存在する。

20

【 0 0 4 9 】

第 2 および第 3 の局面の好ましい態様では、その組成物および / またはヘルパー脂質構
成要素は、水混和性溶媒に溶かした溶液として存在し、ここで、その溶媒は、好ましくは
エタノールおよび t e r t - ブタノールを含む群より選択される。

【 0 0 5 0 】

第 2 および第 3 の局面の好ましい態様では、機能的核酸は二本鎖リボ核酸、好ましくは
R N A i、s i R N A、s i N A、アンチセンス核酸、およびリボザイムを含む群より選
択される核酸であり、ここで、好ましくは陽イオン性脂質に対する R N A i のモル比は、
約 0 から 0 . 0 7 5、好ましくは約 0 . 0 2 から 0 . 0 5、なおさらに好ましくは 0 . 0
3 7 である。

30

【 0 0 5 1 】

第 2 および第 3 の局面の好ましい態様では、その組成物は核酸を含有し、ここで、核酸
主鎖ホスフェート対陽イオン性脂質窒素原子の電荷比は約 1 : 1 . 5 ~ 7、好ましくは 1
: 4 である。

【 0 0 5 2 】

第 2 および第 3 の局面の好ましい態様では、分散体中の粒子径は約 1 2 0 nm である。

【 0 0 5 3 】

第 2 および第 3 の局面の好ましい態様では、その分散体は約 1 から 1 0 0 μ M s i R
N A を含有するストック分散体であり、ここで、好ましくはそのストック分散体はインピ
ボまたはインピトロで 1 : 1 0 0 から 1 : 1 0 0 0 0、さらに好ましくは 1 : 1 0 0 0 に
希釈される。

40

【 0 0 5 4 】

第 4 の局面では、本発明の根底にある問題は、薬剤の製造のための、好ましくは癌およ
び / または心血管関連疾患の処置のための、第 1 の局面による化合物の使用または第 2 も
しくは第 3 の局面による組成物の使用によって解決される。

【 0 0 5 5 】

第 4 の局面の一態様では、その薬剤は癌の処置のためのものであり、ここで、好ましく
はその癌は、固形および非固形腫瘍を含む群より選択され、ここで、その固形腫瘍は、さ
らに好ましくは膵臓癌、乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌および肝細胞癌を含む群より選択

50

される。

【 0 0 5 6 】

第 4 の局面の一態様では、その癌は、血管形成および血管新生を含む群より選択される過程を伴う。

【 0 0 5 7 】

第 4 の局面の一態様では、その薬剤は、内皮細胞、上皮細胞、および腫瘍細胞を含む群より選択される細胞に核酸を投与するためのものであり、好ましくはその細胞は内皮細胞である。

【 0 0 5 8 】

第 4 の局面の一態様では、その内皮細胞は脈管構造の内皮細胞である。

10

【 0 0 5 9 】

第 4 の局面の一態様では、その脈管構造は、血管新生、好ましくは腫瘍関連血管新生から発生する脈管構造である。

【 0 0 6 0 】

第 4 の局面の一態様では、その脈管構造は肝臓脈管構造、心臓脈管構造、腎臓脈管構造、脾臓脈管構造および肺脈管構造を含む群より選択される。

【 0 0 6 1 】

第 4 の局面の一態様では、その薬剤は全身投与のためのものである。

【 0 0 6 2 】

第 4 の局面の一態様では、その薬剤は局所投与のためのものである。

20

【 0 0 6 3 】

第 4 の局面の一態様では、その薬剤は、心血管関連疾患の処置のためのものであり、ここで、その心血管疾患は、冠状動脈性心疾患、心不全、高血圧、血栓症、心筋梗塞、狭心症のような虚血性心疾患、および動脈硬化を含む群より選択される。

【 0 0 6 4 】

第 4 の局面の一態様では、その薬剤は、血管形成関連疾患の処置のためのものである。好ましくは、当該血管形成は、以下の器官と、血管形成が引き起こすと記載された疾患とに関係し、したがって、本発明による組成物の使用を考慮している (Carmeliet P., Nature Medicine 9, 653-660 (2003)) :

血管 血管奇形、ディジョージ症候群、HHT、海綿状血管腫、アテローム性動脈硬化症、移植動脈症、高血圧症、糖尿病、再狭窄

30

脂肪組織 肥満

皮膚 乾癬、いぼ、アレルギー性皮膚炎、ケロイド瘢痕、化膿性肉芽腫、水疱形成疾患、エイズ患者におけるカポジ肉腫、脱毛、皮膚紫斑病、毛細血管拡張症、静脈湖形成

眼 硝子体過形成遺残症候群、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、脈絡膜血管新生

肺 原発性肺高血圧症、喘息、鼻ポリープ、新生児呼吸促進、肺線維症、気腫

腸 炎症性腸病周疾患、腹水、腹膜癒着

生殖器系 子宮内膜症、子宮出血、卵巣嚢胞、卵巣過剰刺激、子宮前症

骨、関節 関節炎、滑膜炎、骨髓炎、骨棘形成、骨粗しょう症、骨折治癒不良

神経系 アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー、卒中

40

胃腸 胃または口腔内潰瘍、クローン病

腎臓 ネフロパシー

【 0 0 6 5 】

第 5 の局面では、本発明の根底にある問題は、診断薬の製造のための、第 1 の局面による化合物ならびに / または第 2 および / もしくは第 3 の局面による組成物の使用によって解決される。

【 0 0 6 6 】

第 6 の局面では、本発明の根底にある問題は、移動剤としての、第 1 の局面による化合物または第 2 および / もしくは第 3 の局面による組成物の使用によって解決される。

【 0 0 6 7 】

50

第6の局面の一態様では、その移動剤は、細胞、好ましくは哺乳動物細胞、さらに好ましくはヒト細胞に薬学的活性構成要素および/またはさらなる構成成分を移動させる。

【0068】

第6の局面の一態様では、その細胞は内皮細胞、好ましくは血管関連内皮細胞である。

【0069】

第7の局面では、本発明の根底にある問題は、細胞に、または膜、好ましくは細胞膜を通過して、薬学的活性化合物および/またはさらなる構成成分を移動させるための方法によって解決され、その方法は以下の工程を含む：

- 細胞または膜を提供する工程；
- 第1の局面のいずれかによる化合物を提供する工程；
- 薬学的活性化合物および/またはさらなる構成成分を提供する工程；
- 細胞または膜を薬学的活性化合物および/またはさらなる構成成分ならびに第1の局面による化合物と接触させる工程。

10

【0070】

第8の局面では、本発明の根底にある問題は、細胞に、または膜、好ましくは細胞膜を通過して、薬学的活性化合物および/またはさらなる構成成分を移動させるための方法によって解決され、その方法は以下の工程を提供する：

- 細胞または膜を提供する工程；
- 第2または第3の局面による組成物を提供する工程；
- 細胞または膜を、第2または第3の局面による組成物と接触させる工程。

20

【0071】

第7または第8の局面の一態様では、その薬学的活性化合物はさらなる工程として

- 細胞中の、および/または膜の向こうの薬学的活性化合物および/またはさらなる構成成分を検出する工程を含む。

【0072】

第9の態様では、本発明の根底にある問題は、以下の工程を含むN-パルミチル-オレイルアミンの合成のための方法によって解決される：

- オレイン酸を提供する工程；
- パルミチルアミンを提供する工程；
- オレイン酸およびパルミチルアミンを反応させて、N-パルミチル-オレオイルアミドを形成させる工程；
- N-パルミチル-オレオイルアミドをN-パルミチル-オレイルアミンに還元する工程。

30

ここで、オレイン酸は少なくとも90%、さらに好ましくは95%、最も好ましくは99%の純度であり、ここで、この百分率は、オレイン酸およびオレイン酸とは異なる任意の脂肪酸のモル比である。

【0073】

第9の局面の一態様では、オレイン酸およびパルミチルアミンを室温で反応させる。

【0074】

第9の局面の一態様では、オレイン酸をパルミチルアミンと反応させる前に前処理に供し、ここで、その前処理は、オレイン酸をクロロギ酸エチルと、好ましくは無水ジクロロメタンまたは無水テトラヒドロフラン中で反応させる工程を含む。

40

【0075】

第9の局面の一態様では、その反応を0 で、好ましくは不活性ガス下で行う。

【0076】

第9の局面の一態様では、その反応物を酸捕捉剤とさらに反応させ、ここで、その酸捕捉剤は、好ましくはトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、およびピリジンを含む群より選択される。

【0077】

50

第 9 の局面の一態様では、クロロギ酸エチルエステル、オレイン酸、トリエチルアミンおよびパルミチルアミンのモル比は、約 1 ~ 1 . 0 5 : 1 : 1 : 1 ~ 3 : 1 ~ 1 . 1 0 である。

【 0 0 7 8 】

第 9 の局面の一態様では、N - パルミチル - オレオイルアミドから N - パルミチ - オレオイルアミンへの還元を、 LiAlH_4 を用いて行う。

【 0 0 7 9 】

第 9 の局面の一態様では、オレイン酸をパルミチルアミンと反応させた直後に、反応物を洗浄し、沈殿させ、そのように得られた沈殿を場合により再結晶化する。

【 0 0 8 0 】

第 1 0 の局面では、本発明の根底にある問題は、全身投与、好ましくは脊椎動物への全身投与のための、第 1 の局面による化合物または第 2 もしくは第 3 の局面による組成物の使用によって解決される。

【 0 0 8 1 】

第 1 0 の局面の一態様では、その脊椎動物は哺乳動物、さらに好ましくはマウス、ラット、モルモット、ネコ、イヌ、サルおよびヒトを含む群より選択される哺乳動物である。

【 0 0 8 2 】

本発明による化合物を、図 1 に示すように R 1 - N - R 2 部分により形成される親油基と、 $\text{C}(\text{O}) - \text{CH}(\text{NH}_3^+)(\text{CH}_2)_n - \text{NH}$ 部分により形成されるリンカー基と、R 3 部分により形成される頭基とを含むとみなすことができる。本発明者らは、リンカー基で正の電荷を示すこの種の化合物が細胞膜を経て、好ましくは細胞内に、さらに好ましくは動物細胞内に生物学的活性化合物を移動させるのに特に適することを驚くことに見出した。本発明者らは、その生物学的活性化合物が核酸、さらに好ましくは s i R N A および s i N A であるならば、本発明による化合物によって仲介される移動が特に有効であろうということも驚くことに見出した。

【 0 0 8 3 】

本明細書に好ましくは使用されるように、アルキルという用語は、8 から 2 0 個の炭素原子、好ましくは 1 2 から 1 8 個の炭素原子を含む飽和脂肪族基であるか、または少なくとも一つの二重および三重結合をそれぞれ含む 8 から 3 0 個の炭素原子を含むモノもしくはポリ不飽和脂肪族炭化水素基を指す。このように、好ましい態様では、アルキルという用語はアルケニルおよびアルキニルも含む。アルキルは、分岐および非分岐の両方、すなわち非直鎖または直鎖アルキル基を指す。好ましい直鎖アルキル基は、8 から 3 0 個の炭素原子を含む。さらに好ましい直鎖アルキル基は、1 2 から 1 8 個の炭素原子を含む。好ましい分岐アルキル基は、8 から 3 0 個の炭素原子を含み、ここで、8 から 3 0 個の炭素原子の数は、当該分岐アルキル基の主鎖を形成している炭素原子の数を指す。分岐アルキル基の主鎖は、主鎖からの分岐として少なくとも一つのアルキル基を含み、そのアルキル基は本明細書の通り定義され、さらに好ましくは、そのアルキル基は、短鎖アルキル基、さらに好ましくは 1 から 6 個、なおさらに好ましくは 1 から 3 個、最も好ましくは 1 個の C 原子を含む。主鎖に 1 2 から 1 8 個の炭素原子を含む分岐アルキル基がより好ましく、その分岐アルキル基は、前記の通り定義される。特に好ましいアルキル基はフィタニル基である。

【 0 0 8 4 】

代替の態様では、アルキルは上に定義された通り不飽和分岐または非分岐アルキル基である。さらに好ましくは、当該不飽和脂肪族炭化水素基は、1、2 または 3 または 4 個の二重結合を含み、ここで、一つの二重結合を有する基が特に好ましい。C 1 8 : 1 デルタ 9、すなわち 1 8 個の C 原子を有し、9 番目の C 原子から 1 0 番目の C 原子への単結合よりもむしろ位置 9 で c i s 配置の二重結合がみられる脂肪族炭化水素基であるオレイルが最も好ましい。

【 0 0 8 5 】

本明細書に使用されるように、n は、1 から 4 の間の任意の整数であり、これは、n が

10

20

30

40

50

1、2、3、および4であり得ることを意味する。本明細書に使用されるように、 m は、1から3の間の任意の整数であり、これは、 m は1、2および3であり得ることを意味する。

【0086】

本発明による化合物は、好ましくは陽イオン性脂質であるものとする。さらに好ましくは、本発明による化合物に存在する任意の NH または NH_2 基は、プロトン化された形態で存在する。本発明による化合物の任意の正電荷は、陰イオンの存在によって典型的には、補償される。そのような陰イオンは一価または多価陰イオンであり得る。好ましい陰イオンは、ハロゲン化物イオン、酢酸イオン、およびトリフルオロ酢酸イオンである。本明細書に使用されるハロゲン化物は、好ましくはフッ化物、塩化物、ヨウ化物、および臭化物である。最も好ましいのは塩化物である。陽イオン性脂質および細胞内に移動させる生物活性化合物が会合すると、ハロゲン化物陰イオンは一つまたは数個の負電荷を好ましくは示す生物学的活性化合物と置換するが、生物学的活性化合物の全体的な電荷は必ずしも負ではないことを了承しなければならない。

【0087】

式(I)による任意の化合物は、少なくとも二つの不斉C原子を含むと認められる。当該化合物の任意の可能な鏡像異性体、すなわち特に $\text{R}-\text{R}$ 、 $\text{S}-\text{S}$ 、 $\text{R}-\text{S}$ 、および $\text{S}-\text{R}$ 鏡像異性体が本明細書に開示されることは本発明の範囲内である。

【0088】

本発明による化合物は、組成物を形成できるか、または組成物の一部であることがあり、ここで、当該組成物は担体を含む。本明細書において脂質組成物とも呼ばれる当該組成物において、本発明による化合物は脂質構成要素とも呼ばれる。当該担体は、好ましくは液体担体である。好ましい液体担体は、水性担体および非水性担体である。好ましい水性担体は、水、水性緩衝系、さらに好ましくは生理学的緩衝強度および生理学的塩濃度を有する緩衝系である。好ましい非水性担体は、溶媒、好ましくはエタノール、*tert*-ブタノールのような有機溶媒である。任意の理論に縛られることを望むわけではないが、任意の水混和性有機溶媒を原則として使用することができる。その組成物、さらに特定すれば液体組成物は、このようにリボソームとして存在できるか、またはリボソームを形成できると認められる。

【0089】

本発明による組成物は、本明細書においてヘルパー脂質構成要素としても呼ばれる一つまたは複数のヘルパー脂質を含み得る。ヘルパー脂質構成要素は、リン脂質およびステロイドを含む群より好ましくは選択される。リン脂質は、好ましくはリン酸のジエステルおよびモノエステルである。リン脂質の好ましいメンバーは、ホスホグリセリドおよびスフィンゴ脂質である。本明細書に使用されるステロイドは、部分水素化シクロペンタ[a]フェナントレンに基づく天然および合成化合物である。好ましくは、ステロイドは21から30個のC原子を含む。特に好ましいステロイドはコレステロールである。特に好ましいヘルパー脂質は、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPhyPE)および1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)である。

【0090】

本発明による特に好ましい組成物は、DPhyPEと組み合わせた - アルギニル - 2,3-ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド[# 6]、 - アルギニル - 2,3-ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド[# 11]、または - アルギニル - リシン - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド[# 15]のいずれかを含み、ここで、DPhyPEの含有量は、好ましくは80mol%、65mol%、50mol%、および35mol%であり、用語mol%は組成物の全脂質含有量に対する百分率、すなわち本発明による陽イオン性脂質と、任意のヘルパー脂質を非限定的に含めた任意の追加の脂質とを含めた、組成物の脂質含有量の百分率を指す。

【 0 0 9 1 】

本発明による組成物が好ましくは本発明による化合物および／または本明細書に開示された一つもしくは数個のヘルパー脂質を含むことは、本発明の範囲内であり、ここで、本発明による化合物、すなわち陽イオン性脂質および／またはヘルパー脂質構成要素のいずれかは水性媒質中で分散体として存在する。または、本発明による化合物、すなわち陽イオン性脂質および／またはヘルパー脂質構成要素は、水混和性溶媒に溶かした溶液として存在する。水性媒質として、好ましくは本明細書に開示された任意の水性担体が使用される。好ましい水混和性溶媒は任意の比で水と均質相を形成する任意の溶媒である。好ましい溶媒はエタノールおよび *tert*-ブタノールである。組成物、さらに特定すれば脂質組成物は、このようにリボソームとして存在できるか、またはリボソームを形成できると認められる。

10

【 0 0 9 2 】

本発明による組成物は、その多様な態様において薬学的組成物としても使用できると認められる。後者の場合、薬学的組成物は、薬学的活性化合物と、場合により薬学的に許容されうる担体とを含む。そのような薬学的に許容されうる担体は、本発明による組成物に関連して本明細書に定義された担体の群より好ましくは選択できる。当業者は、本明細書に記載された任意の組成物の成分およびその任意の組合せが薬学的に許容されうるという条件ならば、その組成物を原則として薬学的組成物としても使用できることを了解するであろう。薬学的組成物は、薬学的活性化合物を含む。当該薬学的活性化合物は、好ましくは任意の生物学的活性化合物、さらに好ましくは本明細書に開示された任意の生物学的活性化合物である、本発明による組成物のさらなる構成成分と同じであり得る。さらなる構成成分、薬学的活性化合物および／または生物学的活性化合物は、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、および核酸を含む群より好ましくは選択される。

20

【 0 0 9 3 】

好ましくは、任意の当該生物学的活性化合物は負荷電した分子である。本発明者は、任意の理論に縛られることを望むわけではないが、負荷電した分子という用語は、本発明による陽イオン性脂質の正荷電した基とイオン対を形成できる少なくとも一つの負荷電した基を有する分子を含むことを意味する。原則として、リンカー部分での正電荷は、当該脂質、または陽イオン性脂質と、負荷電した分子、すなわち生物学的活性化合物との間に形成した任意の複合体のいずれかの全体構造に対してある作用も有することがあろう。それは別として、米国特許第 6,395,713 号に開示された陽イオン性脂質に比べて、本発明による脂質に導入された追加の正電荷は、Xu Y, Szoka FC Jr.; *Biochemistry*; 1996 May 07, 35 (18): 5616-23に教示されたようにこの脂質の毒性増加に寄与するはずである。当業者が従来技術のこの文書から期待したであろうこととは対照的に、本発明による化合物は本明細書に開示された多様な目的に特に適し、特に毒性の増加を全く欠いている。

30

【 0 0 9 4 】

本明細書に好ましくは使用されるペプチドは、好ましくはペプチド結合を介して相互に共有結合している、少なくとも2個のアミノ酸からなる任意のポリマーである。さらに好ましくは、ペプチドは2から10個のアミノ酸からなる。ペプチドの特に好ましい態様はオリゴヌクレオチドであり、そのオリゴヌクレオチドは、なおさらに好ましくは約10から約100個のアミノ酸を含む。本明細書に好ましくは使用されるタンパク質は、相互に共有結合している多数のアミノ酸からなるポリマーである。当該タンパク質は、少なくとも約100個のアミノ酸またはアミノ酸残基を好ましくは含む。

40

【 0 0 9 5 】

陽イオン性脂質および本発明による組成物と共に使用できる好ましいタンパク質は、任意の抗体、好ましくは任意のモノクローナル抗体である。

【 0 0 9 6 】

特に好ましい生物学的活性化合物、すなわち薬学的活性化合物および本発明による組成

50

物と共に使用されるようなさらなる構成成分は核酸である。当該核酸は、DNA、RNA、PNA、またはその任意の混合物のいずれかであり得る。さらに好ましくは、その核酸は機能的核酸である。本明細書に好ましくは使用される機能的核酸は、それぞれペプチドおよびタンパク質をコードしている核酸ではない核酸である。好ましい機能的核酸は、当技術分野で全て公知である siRNA、siNA、RNAi、アンチセンス-核酸、リボザイム、アプタマー、および Spiegelmer である。

【0097】

siRNA は、例えば国際特許出願 PCT/EP03/08666 (国際公開番号 WO/2004/015107) に記載されたような低分子干渉 RNA である。これらの分子は、ワトソン-クリック型塩基対形成によって典型的には仲介される、相互に塩基対を形成している、すなわち相互に本質的に相補的である 15 から 25 個の間、好ましくは 18 から 23 個の間のヌクレオチド対を含む二本鎖 RNA 構造から典型的にはなる。この二本鎖 RNA 分子の一方の鎖は、標的核酸、好ましくは mRNA に本質的に相補的であるが、前記二本鎖 RNA 分子の 2 番目の鎖は前記標的核酸のストレッチに本質的に同一である。数個の追加のオリゴヌクレオチドがそれぞれ siRNA 分子の各側および各ストレッチに隣接することがあるが、それらのオリゴヌクレオチドは必ずしも相互に塩基対を形成する必要はない。

10

【0098】

RNAi は siRNA と本質的に同じ設計を有するが、その分子は、siRNA に比べてかなり長い。RNAi 分子は、典型的には 50 個以上のヌクレオチドおよび塩基対をそれぞれ含む。

20

【0099】

siRNA および RNAi と同じ作用機序に基づき活性である、さらなるクラスの機能的核酸は siNA である。siNA は、例えば国際公開番号 WO/2003/074654 に記載されている。さらに特定すれば、siNA は siRNA に対応し、ここで、siNA 分子はリボヌクレオチドを全く含まない。

【0100】

本明細書に好ましくは使用されるアンチセンス核酸は、標的 RNA、好ましくは mRNA との塩基相補性に基づいてハイブリダイズすることによって RNアーゼ H を活性化するオリゴヌクレオチドである。RNアーゼ H は、ホスホジエステル結合した DNA およびホスホチオエート結合した DNA の両方によって活性化する。しかし、ホスホジエステル結合した DNA は、ホスホチオエート結合した DNA を除き、細胞ヌクレアーゼによって速やかに分解される。このように、アンチセンスポリヌクレオチドは、DNA-RNA ハイブリッド複合体としてのみ有効である。アンチセンス核酸の好ましい長さは、16 から 23 ヌクレオチドに及ぶ。この種のアンチセンスオリゴヌクレオチドの例は、とりわけ米国特許第 5,849,902 号および米国特許第 5,989,912 号に記載されている。

30

【0101】

さらなる群の機能的核酸は、二つの部分を基本的に含む RNA から好ましくはなる触媒活性核酸であるリボザイムである。第 1 部分は触媒活性を示すが、第 2 部分は標的核酸との特異的相互作用を担う。典型的には、2 本のハイブリダイズする鎖上の本質的に相補的なストレッチの塩基のハイブリダイゼーションとワトソン-クリック型塩基対形成によって、標的核酸とリボザイムの前記部分との間で相互作用が生じると、触媒活性部分は活性になることができ、それは、リボザイムの触媒活性がホスホジエステラーゼ活性である場合は、触媒活性部分が標的核酸を分子内または分子間のいずれかで開裂することを意味する。リボザイム、その使用および設計原理は当業者に公知であり、例えば Doherty および Doudna (Annu. Ref. Biophys. Biomol Struct. 2000; 30: 457-75) に記載されている。

40

【0102】

なおさらなる機能的核酸の群はアプタマーである。アプタマーは、一本鎖または二本鎖のいずれかであり、標的分子と特異的に相互作用する D-核酸である。アプタマーの製造

50

または選択は、例えば欧州特許E P 0 5 3 3 8 3 8に記載されている。RNAi、siRNA、siNA、アンチセンス-ヌクレオチド、およびリボザイムとは対照的に、アプタマーは標的mRNAを全く分解しないが、タンパク質のような標的化合物の二次および三次構造と特異的に相互作用する。標的と相互作用すると、その標的は生物学的活性の変化を典型的には示す。アプタマーの長さは、典型的には下は15ヌクレオチドから上は80ヌクレオチドに及び、好ましくは約20から約50ヌクレオチドに及ぶ。

【0103】

別の群の機能的核酸は、例えば国際特許出願WO 9 8 / 0 8 8 5 6に記載されたspiegelmerである。spiegelmerはアプタマーに類似した分子である。しかし、spiegelmerは、アプタマーとは対照的にD-ヌクレオチドよりむしろL-ヌクレオチドから全面的に、または大部分なる。その他の点では、特に可能な長さのspiegelmerに関しては、アプタマーに関連して概説したのと同じことがspiegelmerにあてはまる。

【0104】

先に述べたように、本発明者は、本発明による化合物および当該化合物を含むそれぞれの組成物がRNAi、さらに特定すればsiRNAおよびsiNAを細胞内に移動させるのに特に有効であり得ることを驚くことに見出した。任意の理論に縛られることを望むわけではないが、本発明による脂質組成物に含有され、無PEGヘルパー脂質または特にPEG含有ヘルパー脂質のいずれかであり得る、特定のモル百分率のヘルパー脂質が原因で、さらに特定すると、この種の任意のヘルパー脂質の含有量が本明細書に特定された濃度範囲内に入るならば、驚くべき作用を実現できることに留意すべきである。それに関連して、本発明による組成物がPEG部分を含むヘルパー脂質を含有するならば、当該PEG由来ヘルパー脂質を含有する組成物を用いた任意の送達またはトランスフェクション行為は、核酸、特にRNAi分子、最も特定すればsiRNA、siNA、アンチセンスヌクレオチド、およびリボザイムの送達に特に有効であることが特に注目値する。この理由は、本発明者らがPEG含有ヘルパー脂質を約4%よりも大きく含有するリボソームは活性ではないが、4%未満（好ましくは3%未満）を有するリボソームは、機能的送達を仲介することを驚くことに見出したからである。基本的には、本発明者らは、本発明による脂質組成物中の特定量のPEGが有効なトランスフェクションおよび送達をそれぞれ提供するのに適することを発見した。

【0105】

さらなる局面では、本発明者らは、リポプレックス(lipoplex)またはリボソームとして好ましくは存在する、本発明による脂質組成物が、全体としては陽イオン電荷を、したがって少なくとも一つ過剰の正電荷を好ましくは示すことを驚くことに見出した。さらに好ましくは、その脂質組成物は約1:1.3から1:5の負:正電荷比を示す。したがって、本発明は、このようにさらなる局面では少なくとも一つの陽イオン性脂質と、核酸、好ましくはRNAi、siRNA、もしくはsiNA、または本明細書に定義された他の任意の機能的核酸を含む任意の脂質組成物にこのように関するものであり、その脂質組成物は、約1:1.3から1:5の負:正電荷比を有する。陽イオン性脂質は、好ましくは本明細書に記載された任意の陽イオン性脂質である。その脂質組成物は、好ましい態様では本明細書に記載された任意のヘルパー脂質またはヘルパー脂質の組合せを含む。好ましい態様では、核酸を含有する本発明による組成物は、リポプレックスを形成する。好ましい態様では、本明細書に使用されるリポプレックスという用語は、陽イオン性脂質、中性ヘルパー脂質、および核酸から構成される組成物を指す。

【0106】

本発明者らは、特に核酸含有脂質製剤の全体としての陽イオン電荷に関係して上に記述したことを考慮して、特にsiRNAと陽イオン性脂質とのモル比が、本発明による脂質組成物の適用の成功に決定的であり得ることも見出した。任意の理論に縛られることを望むわけではないが、特に本明細書に開示された陽イオン性脂質1molは、1分子あたり最大3個の正電荷を提供できるが、核酸、さらに特定すれば本明細書に開示されたsiRNA

A分子は、1分子あたり最大40個の負電荷を提供する。本発明によるsiRNA含有脂質製剤の全体としての正電荷に到達するために、モル比は0から最大0.075に及ぶことがある。好ましいモル比範囲は約0.02から0.05であり、なおさらに好ましくは約0.037のモル比範囲である。

【0107】

本発明者らの別の驚くべき発見は、本発明による組成物が核酸、好ましくはsiRNA分子またはsiNA分子を含有し、核酸主鎖ホスフェート対陽イオン性脂質の窒素原子の電荷比が約1:1.5~7、さらに好ましくは1:4であるならば、その組成物が特に有用な性質を示すことである。本明細書に使用される核酸主鎖ホスフェートという用語は、当該核酸を形成している個別のヌクレオチドにより提供される核酸のホスフェート部分を指す。本明細書に使用される陽イオン性脂質の窒素原子という用語は、合計3個の正電荷を好ましくは含む陽イオン脂質によって提供される窒素原子を指す。前記3個の正電荷は、二つの第一アミノ基および一つのグアニジン基により提供される。核酸主鎖ホスフェートにより提供される電荷を決定するために、以下の推定を行う：二つのヌクレオシドの間の各ホスフェートは一つの負電荷を提供し、3'末端ホスフェートがもしも存在するならば、それは二つの負電荷を提供する。有効な電荷比は、インビトロおよび/またはインビボ適用で観察された特定の環境では、上記に特定されたものと異なるおそれがあることが認められるが、陽イオン脂質の窒素原子によって提供される電荷と、ホスフェートの原子によって提供される電荷との比を決定するために、上記のように電荷が存在することとする。

【0108】

上に定義された電荷比は、細胞膜のようなリン脂質二重層膜を通過した核酸の効率的な移動を提供する。

【0109】

送達性質を提供する、本発明による組成物のさらなる特性は、その粒径分布である。好ましくは、分散体として存在する、本発明による組成物の粒径分布は、約120nmである。粒径は、実施例の部でさらに詳細に記載される準弾性光散乱法(Quasi Elastic Light Scattering)で好ましくは決定される。

【0110】

本発明者らは、本発明による組成物が核酸、好ましくはsiRNAおよびsiNA分子のような機能的核酸を細胞内に送達するのに特に適することを驚くことに見出した。実施例にさらに詳細に概説するように、本発明による組成物は、内皮細胞、上皮細胞、および癌細胞の細胞内間隙に前記核酸を送達するのに非常に活性である。他の内皮細胞も本発明による組成物を用いて感染させることができるが、なおさらに増加した特異性により送達が脈管構造の内皮細胞で特に活性であると思われる。特に有効なトランスフェクションは、脈管構造、さらに具体的には腫瘍によって誘導されるような血管新生の結果である脈管構造の内皮細胞で生じる。取扱うことができるであろう他の脈管構造は、腎臓、心臓、肺、肝臓、および脾臓の脈管構造である。

【0111】

本発明による組成物は、特に低刺激性または無毒である限りにおいて有益であることも了承されているものとする。当該毒性の欠如は、副作用を回避することにより患者のコンプライアンスと、ボラス投与のような特定形態の投与が増加することによって、この種の組成物を用いた任意の処置の医学的有用性に顕著に貢献するであろうことから、従来技術の組成物よりも明らかに好都合である。後者は、本明細書における実施例部分から解釈することができるように、動物研究から明白である。

【0112】

その組成物およびさらに特定すれば薬学的組成物が、それぞれ薬学的活性化合物およびさらなる構成成分として、本発明による組成物に含有され得る一つまたは複数の前記生物学的活性化合物を含み得ることは、本発明の範囲内である。原則としてこれらの任意の化合物を薬学的活性化合物として使用できることは、当業者に了承されるであろう。当該薬

学的活性化合物は、典型的には疾患の病態メカニズムに関与する標的分子に対するものである。本発明の任意の局面と共に使用される多様な生物学的活性化合物の、したがって薬学的活性化合物の根底にある一般的な設計原理および作用機序のおかげで、事実上任意の標的を取扱うことができる。したがって、この種の生物学的活性化合物を用いて取扱い、予防し、かつ／または処置できる任意の疾患または疾的状态の処置または予防に、本発明による化合物およびそれを含有するそれぞれの組成物を使用できる。これらの生物学的活性化合物は別として、他の任意の生物学的活性化合物も本発明の任意の態様による組成物の一部であり得ることが了承されているものとする。好ましくはそのような他の生物学的活性化合物が本発明による化合物と、さらに好ましくは陽イオン性脂質として存在する本発明による化合物と相互作用または複合体形成している条件で、そのような他の生物学的活性化合物は、好ましくは少なくとも一つの負電荷を含む。

10

【0113】

本明細書に使用されるように、生物学的活性化合物は、好ましくは生体系に任意の生物学的、化学的および／または物理的作用を示す、好ましくは生物学的に活性な任意の化合物である。当該生体系は、任意のヒト細胞、任意の組織、任意の器官、および任意の生物を含めるがそれに限定されるわけではない好ましくは任意の生化学反応、任意の細胞、好ましくは任意の動物細胞、さらに好ましくは任意の脊椎動物細胞、最も好ましくは任意の哺乳動物細胞である。任意の当該生物は、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、サルおよびヒトを含む群より選択される。

【0114】

20

本発明による任意の組成物、さらに特別には本発明による任意の薬学的組成物は、さらなる任意の薬学的活性化合物を含み得ることも本発明の範囲内である。

【0115】

その組成物、特に本発明による薬学的組成物を多様な形態の投与に使用でき、ここで、局所投与および全身投与が特に好ましい。筋肉内、経皮、皮下、静脈内、および肺投与を含む群より選択される投与経路がなおさらに好ましい。本明細書に好ましくは使用されるように、局所投与は、その組成物および生物学的活性化合物がそれぞれ投与される細胞、組織および器官それぞれにそれぞれの組成物が密接な空間的關係で投与されることを意味する。本明細書に使用されるように、全身投与は局所投与とは異なる投与を意味し、さらに好ましくはそれぞれ血液および液のような体液への投与であり、ここで、その体液は、その組成物および生物学的活性化合物がそれぞれ送達される細胞、組織および器官にその組成物をそれぞれ輸送する。

30

【0116】

本明細書に使用されるように、生物学的活性化合物がそれぞれ本発明による化合物および組成物によって細胞膜を通過して移動する細胞は、好ましくは真核細胞、さらに好ましくは脊椎動物細胞、なおより好ましくは哺乳動物細胞である。最も好ましくは、その細胞はヒト細胞である。

【0117】

本発明による化合物および組成物をそれぞれ用いて製造できる任意な薬剤は、罹患体の処置および予防のためのものである。当該罹患体は、好ましくは脊椎動物、さらに好ましくは哺乳動物、なおさらに好ましくは当該哺乳動物は、マウス、ラット、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、サルおよびヒトを含む群より選択される。さらなる局面では、移動剤、さらに好ましくはトランスフェクション剤として本発明による化合物および組成物を使用できる。

40

【0118】

本明細書に好ましくは使用されるように、移動剤は化合物を、さらに好ましくは薬学的活性化合物のような生物学的活性化合物を、膜、好ましくは細胞膜を通過して移動させるのに、より好ましくは当該化合物を本明細書に予め記載されたような細胞内に移動させるのに適した任意の薬である。好ましくは、細胞は内皮細胞、より好ましくは脊椎動物の内皮細胞、最も好ましくはマウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、サルおよびヒトのよ

50

うな哺乳動物の内皮細胞である。

【0119】

なおさらなる局面では、本発明は、細胞に生物学的活性化合物を移動させる、さらに特定すればトランスフェクトするための方法に関するものである。第1工程では、工程の順序は必ずしも限定されず、細胞ならびに膜および細胞がそれぞれ提供される。第2工程では、本発明による化合物および薬学的活性化合物のような生物学的活性化合物が提供される。この反応物にそれぞれ細胞および膜を接触させることができ、本発明による化合物および組成物の生物物理的性質が原因で、その生物学的活性化合物は、膜の一方の側からもう一方の側に、またはその膜が細胞を形成している場合は、細胞の外側から細胞内に輸送されるであろう。細胞および膜とそれぞれ接触させる前に、その生物学的活性化合物および本発明による化合物、すなわち陽イオン性脂質を接触させることは、本発明の範囲内である。その際、好ましくは複合体が形成し、当該複合体を細胞および膜とそれぞれ接触させる。

10

【0120】

本発明のさらなる局面では、生物学的活性化合物および薬学的活性化合物をそれぞれ移動させるための方法は、それぞれ細胞および膜を提供する工程、本発明による組成物を提供する工程、ならびに組成物とそれぞれ細胞および膜との両方を接触させる工程を含む。細胞および膜とそれぞれ接触させる前または間に、組成物が形成し得ることは本発明の範囲内である。

20

【0121】

本明細書に開示された生物学的活性化合物を移動させる任意の方法の一態様では、その方法は、さらなる工程、好ましくはその生物学的活性化合物が移動したかどうかを検出する工程を含み得る。そのような検出反応は、その方法により移動した生物学的活性化合物の種類に強く依存し、当業者に容易に明白なところであろう。当該方法が本明細書に記載された任意の細胞、組織、器官および生物で行われることは本発明の範囲内である。

30

【0122】

本発明のさらなる特性、態様および利点を解釈することができる以下の図および実施例を参照することにより、本発明をさらに例示する。

【0123】

実施例1：従来技術によるN-オレイル-パルミチルアミンの合成

N-オレイル-パルミチルアミンは、本発明による化合物の重要な出発物質である。N-オレイル-パルミチルアミンは、原則としてUS6,395,713に記載されたように合成できる。それぞれの反応スキームを図2に示す。しかし、出発物質は、例えばFlukaによって提供される工業用オレイルアミンである。この出発物質のガスクロマトグラフィーによる分析は、70%の純度を示し、ここで、その出発物質の30%は、種々の鎖長を有するアミンからなる。この原因は、当該物質が植物起原から得られることであり得るであろう。オレイルアミンおよび1-プロモヘキサデカン(パルミチルプロミド)の両方を混合することで、両出発物質を100から120で30分間反応させた後にN-オレイル-パルミチルアミンが生じる。収率は約83%である。

40

【0124】

実施例2：本発明によるN-パルミチル-オレイルアミンの合成

本発明による化合物に関連して、本発明者は新しい合成に気づいた(図3)。この新しい反応スキームは、多量の不純物がこの出発物質に基づいて調製された移動剤の品質に影響していると本発明者が見出したことに基づく。したがって、ガスクロマトグラフィーにより示される純度99%を有するオレイン酸を用いて、当該オレイン酸をクロロギ酸エチル、TEA、および CH_2Cl_2 と接触させ、そのように得られた混合カルボン酸-炭酸無水物をガスクロマトグラフィーにより示される純度99%をこれも有するヘキサデシルアミン(パルミチルアミン)と反応させて、反応を開始する。反応生成物N-パルミチル-オレイルアミド[# 1]を続いて LiAlH_4 (THF中)と反応させる結果、無色結晶状固体として存在する85%N-パルミチル-オレイルアミン[# 2]が生じる

50

。

【 0 1 2 5 】

さらに詳細な反応条件を以下に概説する。

【 0 1 2 6 】

N - パルミチル - オレオイルアミド [# 1] の合成

クロロギ酸エチルエステル 2 . 6 2 ml (2 7 . 5 mmol) をアルゴン不活性ガス下で 2 5 0 ml シュレンク窒素管中で無水ジクロロメタン 3 0 ml に溶解させ、0 に冷却する。無水ジクロロメタン 4 0 ml に溶かしたオレイン酸 7 . 9 3 ml (2 5 mmol) およびトリエチルアミン 4 . 1 6 ml (3 0 mmol) の溶液を、攪拌しながら 2 0 分以内に滴下する。氷浴で 3 0 分間攪拌した後で、 CHCl_3 5 0 ml に溶かしたパルミチルアミン 6 . 6 4 g (2 7 . 5 mmol) の溶液を速やかに滴下し、得られた混合物を室温で 2 時間攪拌する。続いて、得られた溶液をそれぞれ水 4 0 ml で 3 回洗浄し、有機相を Na_2SO_4 で脱水して、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去する。残渣をアセトン 1 0 0 ml で再結晶化する。8 9 % の収率に対応する無色固体 1 1 . 2 5 g (2 2 . 3 mmol) を得る。

【 0 1 2 7 】

N - パルミチル - オレイルアミン [# 2] の合成

エーテルに溶かした 1 M LiAlH_4 2 0 ml を滴下漏斗および還流凝縮器を有する 2 5 0 ml 三首フラスコ中にアルゴン不活性ガス下で提供し、続いてパルミチルオレオイルアミド 7 . 5 9 g (1 5 mmol) の THF 8 0 ml 溶液を 2 0 分間以内に滴下する。得られた混合物を 2 . 5 時間還流し、次にエーテルに溶かした別の 1 M LiAlH_4 5 ml を添加してさらに 2 . 5 時間還流する。氷浴で冷却しながら 6 M NaOH を用いて過剰の水素化物を分解して、沈殿をろ過する。沈殿を M t B E 各 4 0 ml で 2 回抽出して、合わせた有機相を Na_2SO_4 で脱水して、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去する。残渣を - 2 0 で M t B E 1 0 0 ml で結晶化する。収率 8 5 % に対応する無色結晶状固体 6 . 2 3 g (1 2 . 7 mmol) を得る。

【 0 1 2 8 】

実施例 3 : Boc - Dap (Fmoc) - N - パルミチル - N - オレイル - アミド [# 3] の合成

N - オレイル - パルミチルアミン 5 2 1 mg (1 . 0 6 mmol) を 5 0 ml 容丸底フラスコ中で無水ジクロロメタン 1 0 ml に溶かし、EEDQ 2 8 9 mg (1 . 1 7 mmol) を添加する。続いて、Boc - Dap (Fmoc) - OH 5 0 0 mg (1 . 1 7 mmol) を攪拌しながら添加して、得られた混合物を室温で 2 0 時間攪拌する。この溶液をジクロロメタン 8 0 ml と共に分液漏斗に移し、0 . 1 N HCl 各 2 0 ml で 3 回、飽和 NaHCO_3 溶液 2 0 ml で 1 回洗浄する。 Na_2SO_4 で脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去する (図 4) 。帯黄粘性油を得て、それをそれ以上精製しない。ヘキサン / 酢酸エチル 1 : 1 を用いた薄層クロマトグラフィーで R_f 値 0 . 7 0 を観察した。

【 0 1 2 9 】

実施例 4 : Boc - Dap - N - パルミチル - N - オレイル - アミド [# 4] の合成

Boc - Dap (Fmoc) - N - パルミチル - N - オレイル - アミド粗生成物 1 g を 5 0 ml 丸底フラスコ中で無水ジクロロメタン溶液 8 ml に溶かした。ジエチルアミン 3 ml を添加して、室温で攪拌した (図 4) 。薄層クロマトグラフィーを用いた反応の管理によると、4 . 5 時間後に出発生成物の反応は完了したことが示された。揮発性構成要素をロータリーエバポレーターで除去して、ヘキサン / 酢酸エチル 5 : 1 を用いてシリカゲル 6 0 (Merck) 4 0 g を用いて残渣をクロマトグラフィーにより精製する。酢酸エチル、酢酸エチル / メタノール 4 : 1 、およびジクロロメタン / メタノール 4 : 1 からなる段階勾配を用いて生成物を溶出させた。Boc - Dap - N - パルミチル - N - オレイル - アミド 5 7 6 mg (0 . 8 5 mmol) を黄色粘性油として得た。

【 0 1 3 0 】

実施例 5 : テトラ - Boc - [- アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミド] [# 5] の合成

Boc-Dap-N-パルミチル-N-オレイル-アミド 576 mg (0.85 mmol) を 100 容丸底フラスコ中で無水ジクロロメタン 10 ml に溶かし、EEDQ 210 mg (0.85 mmol) および Boc-Arg(Boc)₂-OH 403 mg (0.85 mmol) を撹拌しながら加えた (図 5)。得られた混合物をアルゴン雰囲気下で室温で 20 時間撹拌した。続いて、ジクロロメタンをロータリーエバポレーターで除去して、MtBE 100 ml に入れた残渣を分液漏斗に移した。有機相を 0.1N HCl、1N NaOH、および飽和 NaHCO₃ 溶液で徹底的に洗浄して、Na₂SO₄ で脱水して、溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。続いて、溶出液としてヘキサン/酢酸エチルを用いたフラッシュクロマトグラフィー (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) で粗生成物を精製した。収率 72% に対応する無色粘性油 694 mg (0.61 mmol) を得た。

10

【0131】

実施例 6: -アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パルミチル-N-オレイル-アミドトリヒドロクロリド [# 6] の合成

十分に乾燥したテトラ-Boc-[-アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パルミチル-N-オレイル-アミド] 694 mg (0.61 mmol) を 25 ml シュレンク室素管中にアルゴン雰囲気下で提供して、ジオキサンに溶かした 4N HCl 8 ml を添加した (図 5)。得られた混合物をアルゴン不活性ガス下で室温で 24 時間撹拌し、ここで、生成物は非晶質の部分的ワックス様固体として約 6 から 8 時間後に溶液から沈殿した。反応完了 (CHCl₃ / MeOH / NH₄OH 65 : 25 : 4 を用いた薄層による管理) 後に、高真空下でどのような揮発性構成要素も除去した。-アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パミチル-N-オレイル-アミド 489 mg (0.58 mmol) をトリヒドロクロリドとして得た。

20

【0132】

実施例 7: N-ラウリル-ミリスチルアミン [# 7] の合成

還流凝縮器および滴下漏斗を有する 500 ml 三首フラスコ中で無水 DMF 100 ml にデシルアミン (ラウリルアミン) 18.54 g (100 mmol)、Na₂CO₃ 6.36 g (60 mmol)、およびテトラブチルアンモニウムヨード (TBAI) 50 mg を懸濁した。無水ジオキサン 100 ml に溶かした 1-プロモテトラデカン 16.4 ml (60 mmol) の溶液を 100 で 110 分間かけて滴下し、得られた混合物を 100 でさらに 3.5 時間撹拌した (図 6)。この溶液をできるだけ高い温度でろ過した。4 で一晩沈殿した結晶状固体を取り出し、少量の冷メタノールで洗浄した。続いて、得られた固体をメタノール 200 ml で再結晶化した。無色板状結晶 9 g を得て、それを MtBE 100 ml で再結晶化する。冷却したフリットから -18 で沈殿した結晶を吸引し、冷 MtBE で洗浄した。収率 35% に対応する無色結晶状固体 7.94 g (21 mmol) を得た。

30

【0133】

実施例 8: Boc-Dap(Fmoc)-N-ラウリル-N-ミリスチルアミド [# 8] の合成

Boc-Dap(Fmoc)-OH 715 mg (1.68 mmol) を 50 ml 丸底フラスコ中で無水ジクロロメタン 15 ml に溶かして、EEDQ 420 mg (1.7 mmol) を添加した。得られた混合物を室温で 45 分間撹拌して、続いて N-ラウリル-ミリスチルアミン 641 mg (1.68 mmol) の 25 ml 無水ジクロロメタン溶液を 60 分間以内にゆっくりと滴下した (図 6)。20 時間の反応時間の後で、溶媒をロータリーエバポレーターで除去して、残渣を MtBE 100 ml と共に分液漏斗に移した。この溶液を 0.1N HCl および飽和 NaHCO₃ 溶液で徹底的に洗浄して、有機相を Na₂SO₄ で脱水して、溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。粗生成物 1.02 g を得て、溶出液としてヘキサン/酢酸エチルを用いたフラッシュクロマトグラフィー (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) によりそれを精製した。純粋な生成物 607 mg を無色で非常に粘性の油として得た。ヘキサン/酢酸エチル 1 : 1 を用いた薄層クロマトグラフィーは R_f 値 0.58 を提供した。

40

【0134】

50

実施例 9 : Boc - Dap - N - ラウリル - N - ミリスチルアミド [# 9] の合成

Boc - Dap (Fmoc) - N - ラウリル - N - ミリスチルアミド 607mg を 50ml 丸底フラスコ中で無水ジクロロメタン 8ml に溶かした (図 6) 。ジエチルアミン 3ml を添加して、反応物を室温で 4 . 5 時間撹拌した。ロータリーエバポレーターを用いて揮発性構成成分を除去して、ヘキサン / 酢酸エチル 5 : 1 を用いたシリカゲル 60 (Merck) 40g を用いたクロマトグラフィーによって残渣を精製した。酢酸エチル、ジクロロメタン、およびジクロロメタン / メタノール 3 : 1 からなる段階勾配により生成物を溶出させた。Boc - Dap - N - ラウリル - N - ミリスチルアミド 372mg (0 . 655mmol) を帯黄色粘性油として得た。

【 0135 】

10

実施例 10 : テトラ - Boc - [- アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチルアミド] [# 10] の合成

Boc - Dap - N - ラウリル - N - ミリスチルアミド 372mg (0 . 655mmol) を 50ml 丸底フラスコ中で無水ジクロロメタン 8ml に溶かし、EEDQ 162mg (0 . 655mmol) および Boc - Arg - (Boc)₂ - OH 311mg (0 . 655mmol) を撹拌しながら添加した (図 7) 。得られた混合物を室温で 20 時間撹拌した。続いて、ロータリーエバポレーターを用いてジクロロメタンを除去して、残渣を MtBE 80ml と共に分液漏斗に移した。有機相を 0 . 1N HCl、1N NaOH、および飽和 NaHCO₃ 溶液で徹底的に洗浄し、Na₂SO₄ で脱水し、溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。続いて、ヘキサン / 酢酸エチルの段階勾配を用いてフラッシュクロマトグラフィー (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) により粗生成物を精製した。収率 76% に対応する無色粘性油 500mg (0 . 5mmol) を得た。

20

【 0136 】

実施例 11 : - アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチルアミドトリヒドロクロリド [# 11] の合成

十分に乾燥したテトラ - Boc - [- アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチルアミド] 511mg (0 . 5mmol) を 25ml シュレンクアルゴン管にアルゴン下で提供し、ジオキサンに溶かした 4N HCl 10ml を添加した (図 7) 。得られた混合物を室温で 24 時間アルゴン不活性ガス下で撹拌し、ここで、生成物は 6 から 8 時間後に溶液から部分的非晶質の部分的ワックス様の固体として沈殿した。反応の完了 (CHCl₃ / MeOH / NH₄OH 65 : 25 : 4 を用いた薄層クロマトグラフィーによる管理) 時に、全ての揮発性構成要素を高真空で除去した。トリヒドロクロリドの形態の - アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチルアミド 323mg (0 . 5mmol) を得た。

30

【 0137 】

実施例 12 : Boc - Lys (Fmoc) - N - ラウリル - N - ミリスチルアミド [# 12] の合成

Boc - Lys (Fmoc) - OH 937mg (2mmol) を 50ml 丸底フラスコ中で無水ジクロロメタン 10ml に溶かし、EEDQ 495mg (2mmol) を添加した (図 8) 。得られた混合物を室温で 60 分間撹拌し、続いて N - ラウリル - ミリスチルアミン 764mg (2mmol) の 30ml 無水ジクロロメタン溶液を 120 分以内にゆっくりと滴下した。20 時間の反応時間の後で、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去して、MtBE 100ml と共に残渣を分液漏斗に移した。溶液を 0 . 1N HCl および飽和 NaHCO₃ で徹底的に洗浄して、有機相を Na₂SO₄ で脱水して、溶媒をロータリーエバポレーターを用いて除去した。粗生成物 1 . 757g を得て、溶出液としてヘキサン / 酢酸エチル 4 : 1 を用いたフラッシュクロマトグラフィーを用いてそれを精製した。純粋な生成物 1 . 377g を無色の非常に粘性の油として得る。ヘキサン / 酢酸エチル 1 : 1 を用いた薄層クロマトグラフィーは R_f 値 0 . 57 を与えた。

40

【 0138 】

実施例 13 : Boc - Lys - N - ラウリル - N - ミリスチルアミド [# 13] の合成

50

Boc-Lys(Fmoc)-N-ラウリル-N-ミリスチル-アミド 1.377g を 50ml 丸底フラスコ中で無水ジクロロメタン 16ml に溶かした。ジエチルアミン 6ml を添加して、得られた混合物を室温で 5 時間撹拌した (図 8)。ロータリーエバポレーターを用いて揮発性構成要素を除去して、ヘキサン/酢酸エチル 5:1 を用いたシリカゲル 60 (Merck) 40g を用いたクロマトグラフィーによって残渣を精製した。酢酸エチル、ジクロロメタン、およびジクロロメタン/メタノール 3:1 からなる段階勾配を用いて生成物を溶出させた。帯黄色粘性油として Boc-Lys-N-ラウリル-N-ミリスチルアミド 556mg (0.911mmol) を混合画分 119mg と共に得た。

【0139】

実施例 14: テトラ-Boc-[-アルギニル-リシン-N-ラウリル-N-ミリスチルアミド] [# 14] の合成

10

Boc-Lys-N-ラウリル-N-ミリスチル-アミド 556mg (0.911mmol) を無水ジクロロメタン 40ml に溶解し、EEDQ 226mg (0.911mmol) および Boc-Arg(Boc)₂-OH 433mg (0.911mmol) を撹拌しながら添加した (図 9)。得られた混合物を室温で 20 時間撹拌した。続いて、ロータリーエバポレーターを用いてジクロロメタンを除去して、残渣を MtBE 80ml と共に分液漏斗に移した。有機相を 0.1N HCl および飽和 NaHCO₃ 溶液で徹底的に洗浄し、Na₂SO₄ で脱水して、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去した。続いてヘキサン/酢酸エチルの段階勾配を用いてフラッシュクロマトグラフィー (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) により粗生成物を精製した。75% に対応する収量 730mg (0.684mmol) の無色粘性油を得た。

20

【0140】

実施例 15: -アルギニル-リシン-N-ラウリル-N-ミリスチルアミドトリヒドロクロリド [# 15] の合成

十分に乾燥したテトラ-Boc-[-アルギニル-リシン-N-ラウリル-N-ミリスチルアミド] 730mg (0.684mmol) を 25ml シュレンクアルゴン管にアルゴン下で提供して、ジオキサンに溶かした 4N HCl 10ml を添加した (図 9)。得られた混合物を室温で 24 時間アルゴン不活性ガス下で撹拌し、そのとき、生成物は約 8 時間後に非晶質の部分的ワックス様固体として溶液から沈殿した。CHCl₃/MeOH/NH₄OH 65:25:4 を用いた薄層クロマトグラフィーにより管理した反応が完了したときに、全ての揮発性構成要素を高真空で除去した。 -アルギニル-リシン-N-ラウリル-N-ミリスチルアミド 491mg (0.633mmol) をトリヒドロクロリドとして得た。

30

【0141】

実施例 16: トリ-Boc- -カルバミジノ- , -ジアミノ酪酸 [# 16] の合成

Boc-Dab-OH 1.31g (6mmol) を 100ml 丸底フラスコ中でアセトニトリル 15ml に入れて提供して、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) 12mmol を添加した (図 10)。続いて、一部の Boc-Dab-OH が溶解するまで水を滴下して、続いて 1,3-ジ-Boc-2-(トリフルオロメチルスルホニル)グアニジン 1.96g (5mmol) を添加した。得られた混合物を室温で 12 時間撹拌して、さらにロータリーエバポレーターを用いてアセトニトリルを除去した。水性残渣を水 5ml で希釈してジクロロメタン 50ml を添加した。撹拌しながら 2N HCl を添加することによって反応物を pH 2 に酸性化して、続いて有機相を分離した。ジクロロメタン 50ml で水相を抽出して、合わせた有機相を続いて適量の希 HCl および飽和 NaCl 溶液で洗浄した。有機相を Na₂SO₄ で脱水して、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去した。ヘキサン/酢酸エチル 2:1 を用いたシリカゲル 60 のクロマトグラフィーを用いて残渣を精製した。収率 50% に対応する無色非晶質固体 1.138g (2.47mmol) を得た。

40

【0142】

実施例 17: ベータ-アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パルミチル-

50

N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド [# 6] の合成

滴下漏斗を備える 250ml シュレンク管中にアルゴン雰囲気下で無水 CH_2Cl_2 15ml に Boc - Dap - OH 1.225g (6mmole) を懸濁し、トリメチルアミン 1.72ml を添加する。TMSCI 1.52ml (12mmole) の 30ml 無水 CH_2Cl_2 溶液を激しく撹拌しながら室温で 15 から 20 分以内に滴下する。その間にアルゴン雰囲気下で 100ml シュレンク管中にカルボニルジイミダゾール 941mg (5.8mmole) を無水 CH_2Cl_2 8ml に溶解する。撹拌しながら室温で 15 から 20 分以内に Boc - Arg (Boc) 2 - OH 2.66g (5.6mmole) の 25ml 無水 CH_2Cl_2 溶液を滴下する。両反応溶液を室温で 4 時間撹拌する。続いて、トリエチルアミン 832 μl (6mmole) を最初の溶液に加えて、アルゴン雰囲気下で室温で滴下漏斗により 15 から 20 分以内に 2 番目の溶液を滴下する。15 から 20 分後に水 30ml を添加し、45 分間激しく撹拌し、得られた溶液を pH 2 に調整する。有機相を分離して水相を CH_2Cl_2 で数回抽出する。合わせた有機相を NaCl および硫酸ナトリウムの飽和溶液で脱水して、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去する。溶出液としてジクロロメタンを用いてシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーを用いてガラス様残渣を精製する。無色非晶質固体 2.74g (4.15mmole; 74%) を得る [化合物 17]。

【 0 1 4 3 】

実施例 10 の条件と本質的に類似した条件で、この固体をオレイルパルミチルアミン [# 2] と反応させ、ここで、温度は 35 から 40 に調整する (収率 72%)。実施例 11 に記載されたように Boc 保護基の開裂により目的の最終生成物 - アルギニル - 2, 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド [# 6] を得る。溶出液として MeOH / 水を用いた RP - 18 シリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーを用いて、このように得られた生成物をさらに精製できる。

【 0 1 4 4 】

実施例 18 : 陽イオン性リボソームおよび siRNA から成る複合体 (リボプレックス) の製造

脂質フィルム / ケーキ再水和、エタノール注入法、逆相蒸発または界面活性剤透析法 [Liposomes as Tools in Basic Research and Industry; Jean R. Philippot and Francis Schuber; CRC Press January 1995 および Liposome Technology: Preparation of Liposomes:001 Gregory Gregoriadis CRC Press LLC. April 1984 参照] のような当技術分野で公知の標準的な技法を用いて、陽イオン性リボソームおよび siRNA からなるリボプレックスを製造した。

【 0 1 4 5 】

本明細書においてリボプレックスとも呼ばれる、siRNA のような核酸と組み合わせた、このように得られたリボソームは、脂質として - アルギニル - 2, 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリドと、追加的に 1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンまたは 1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンのいずれかを含み、ここで、1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンの使用が好ましい。当該リボソームおよびリボプレックスそれぞれの脂質画分は、50mol% ベータ - アルギニル - 2, 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリドと、50mol% 1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンまたは 50mol% 1, 2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンのいずれかであった。

【 0 1 4 6 】

50mol% - アルギニル - 2, 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリドと、50mol% 1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンとの組合せは、本明細書において a t u F e c t と呼ばれる。

【 0 1 4 7 】

10

20

30

40

50

本明細書に開示された他の任意の脂質および脂質組成物は、原則として以前に言及された技法およびさらなる加工工程を用いて製造できるものとする。

【0148】

リポソームおよびリポプレックスそれぞれは、粒径、多分散度、およびラメラ性に関して調節するためにさらなる加工工程に供される。これらの性質を超音波処理、多孔質膜を通過するような押出し、および均質化、好ましくは高圧均質化によって調整できる。

【0149】

このように形成したリポソームまたはリポプレックスをBeckman-Coulter N5サブミクロン粒子分析装置を用いた光子相関分光法によって特徴づけ、押出しまたは高圧均質化のいずれかによって粒径を調節した当該リポソームの結果を図12Aおよび12Bにそれぞれ示す。

10

【0150】

図12Aから、異なるサイズ排除を有する異なる膜、この場合は1000nmおよび400nmの膜をそれぞれ用いて、リポソームの粒径分布を修正できると解釈できる。両方の場合で、押出し工程を21回繰り返した。しかし、本発明の範囲内でサイズ排除は約50から5000nmのことがあり、押出し工程を10から50回繰り返すことができる。

【0151】

図12Bから解釈できるように、高圧均質化もリポソームの粒径分布を修正する適切な手段であり、ここで、当該高圧均質化を適用した場合に、リポソームの粒径はリポソームが供された均質化のサイクル数に依存する。典型的な圧範囲は100～2500barであり、ここで、この場合は適用された圧は1500barであった。

20

【0152】

実施例19: a t u F e c t の保存安定性

本明細書に開示された組成物が典型的には薬学的組成物として使用されるならば、当該薬学的製剤が保存条件で安定なことが不可欠である。保存安定性を研究するために、腫瘍抑制因子PTENに対するs i R N Aを設計して、実施例18に記載されたようなa t u F e c tを用いて処方した。

【0153】

さらに特定すれば、以下に引用する最終原液濃度を有する脂質原液を用いて、300mMスクロース溶液中で脂質フィルムの再水和を行った後に、それぞれ押出しおよび高圧均質化を行うことによってリポソームを製造した。このように得られたリポソームを下記のs i R N Aと共に1:1のモル比で混合したが、その代わりに、脂質層をs i R N Aの存在下で再水和することにより、得られたリポプレックスを押出しまたは均質化することもできた。

30

【0154】

s i R N A分子は以下の通りであった:

【0155】

【表1】

アンチセンス PTENAV10: 5' uaaguucuagcuguggg-P 3';

40

センス PTENBV10 5' ccaccacagcuagaacuua-P 3';

【0156】

配列中、太字のヌクレオチドは、それぞれのヌクレオチドが2'-O-メチルであることを示す。

【0157】

血清含有培地の存在下でH e L a細胞と共に種々の濃度(s i R N A分子のnMを図13に示す)でリポプレックスを48時間インキュベートした。以前に記載されたように、p 1 1 0 a (負荷対照)およびPTEN特異的抗体を用いた全細胞抽出物のイムノプロット

50

を行った（標準ウエスタンブロットコール）。

【0158】

しかし、適切な凍結保護剤にはスクロース、トレハロース、マルトース、セロビオース、ラフィノース、ガラクトース、マンニトールおよびPEGがあるが、それに限定されるわけではない。本実施例では、PTENターゲットティングsiRNAを含有するatufect製剤用の担体として300mMスクロース溶液を使用した。最終原液濃度は、総脂質1445mg/mlおよび15μM PTEN-siRNAであった。溶液を、室温で保管、4で7日間保存、または-80で7日間保存した。前記溶液を表示された終濃度に血清含有培地で希釈した（20、10、5nM）。40000/ウェルの細胞密度でHeLa細胞を用いて試験を行った。結果を図13に示す。これらの結果から、凍結保護剤に入れてsiRNAを含有するatufectを凍結して、それを-80で7日間保存すると、融解後に4で保管したときと同程度有効であると解釈することができる。

10

【0159】

実施例20：脂質組成物およびsiRNAの負荷

二つの異なる種類の脂質製剤を調製した。脂質製剤01は、陽イオン性脂質として50mol% -アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パルミチル-N-オレイル-アミドトリヒドロクロリドおよび50mol% 1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンからなり、一方、脂質製剤02は、陽イオン性脂質として50mol% -アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パルミチル-N-オレイル-アミドトリヒドロクロリドおよび50mol% 1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンから成った。各脂質製剤は、PTENに対するsiRNAを含有し（原液濃度は15μM siRNAおよび1445mg/ml脂質）、ここで、siRNAのモル濃度を細胞に対して調節して、それぞれ1μM、500nM、100nMおよび50nMの終濃度にした。

20

【0160】

1.5g/L重炭酸ナトリウムおよび4.5g/Lグルコースを90%、ウシ胎仔血清を10%含有するように調整した、4mM L-グルタミンを有するダルベッコ変法イーグル培地に標準細胞培養条件で成長したマウス細胞系（B16V、ATCC No. : CRL 6475）に、これらのPTEN特異的RNAi含有脂質製剤を投与した。細胞密度は40000細胞/6ウェルであり、48時間後に細胞を溶解させ、ウエスタンブロット分析に供した。その結果を図14に示す。キナーゼPRK2に特異的なモノクローナル抗体（Becton Dickinson）を用いて得たシグナルを、PTENシグナルに比した負荷対照として使用した（モノクローナル抗体、Santa Cruze, CA）。

30

【0161】

図14から、脂質製剤01、すなわち1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンを含有する製剤は、siRNA含有量が50nMであった場合に依然として有効であったが、ヘルパー脂質として1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンを含有する脂質製剤02は、PTEN特異的抗体（Santa Cruze, CA）によって検出されるsiRNA含有量が約1μM以上であった場合に限りPTENのノックダウンを発生できたと解釈できる。無関係のキナーゼPRK2のシグナルを負荷対照として使用し、それに対する抗体によって検出した。

40

【0162】

実施例21：脂質組成物およびPEG含有量

脂質構成要素として -アルギニル-2,3-ジアミノプロピオン酸-N-パルミチル-N-オレイル-アミドトリヒドロクロリド（陽イオン性脂質）と、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DPHyPE）および1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-ポリエチレングリコール-2000（DSPE-PEG2000）を含む脂質組成物のトランスフェクションおよび送達に対する有効性に及ぼすPEGの影響を試験するために、本明細書に開示された方法により以下の製剤を作成した。

50

製剤 C₁ ~ C₅ :

【 0 1 6 3 】

【 表 2 】

| | 陽イオン性脂質 [mol%] | DPhyPE [mol%] | DSPE-PEG [mol%] |
|----------------|-------------------|------------------|--------------------|
| C ₁ | 49 | 50 mol% | 1 |
| C ₂ | 48 | 50 mol% | 2 |
| C ₃ | 47 | 50 mol% | 3 |
| C ₄ | 46 | 50 mol% | 4 |
| C ₅ | 45 | 50 mol% | 5 |

10

【 0 1 6 4 】

製剤 H₁ ~ H₅ :

【 0 1 6 5 】

【 表 3 】

| | 陽イオン性脂質 [mol%] | DPhyPE [mol%] | DSPE-PEG [mol%] |
|----------------|-------------------|------------------|--------------------|
| H ₁ | 50 mol% | 49 | 1 |
| H ₂ | 50 mol% | 48 | 2 |
| H ₃ | 50 mol% | 47 | 3 |
| H ₄ | 50 mol% | 46 | 4 |
| H ₅ | 50 mol% | 45 | 5 |

20

30

【 0 1 6 6 】

任意の前記製剤に関して、脂質濃度は 1 . 4 4 5 mg/ml、s i R N A 濃度は 3 0 0 m M スクロース中に 1 5 μ M であった。形成した濃縮複合体原液を細胞培地に希釈することによって、終濃度 2 0、1 0、5 n M s i R N A をもたらしした。

【 0 1 6 7 】

前記製剤に含有される R N A i 分子は P T E N に対するものであったが、その配列を実施例 2 2 に記載する。それぞれ細胞 4 0 0 0 0 細胞 / ウェルを含有する 6 ウェルプレートの中に入った H e L a 細胞に、これらの脂質製剤を投与した。P T E N の発現について細胞を分析し、ウエスタンブロットの結果を図 1 5 に示した。p 1 1 0 a の発現を負荷対照として使用し、p 1 1 0 a に特異的なモノクローナル抗体によって検出した。図 1 5 に示したどのウエスタンブロットからも、P E G を含有している約 1 から 2 mol % のヘルパー脂質が P T E N 発現の効率的なノックダウンを提供するのに適していたと解釈することができる。

40

【 0 1 6 8 】

陽イオン性脂質構成要素を P E G 化ヘルパー脂質と交換するよりもむしろ、D P h y P E 構成要素を P E G 化ヘルパー脂質と交換すべきであると好ましくは結論できる。H 製剤が C 製剤よりも効力が高いと思われる上記実験からこのように解釈できる。P E G 化ヘル

50

パー脂質の含有量は、約 0.05% から 4.9%、好ましくは 1 から 3%、より好ましくは 2 から 3% である。

【0169】

実施例 22: siRNA 含有脂質製剤のインビボ使用

本発明による siRNA 含有脂質製剤の適切性を試験するために、脂質製剤をマウスモデルで使用した。インビボで肝臓に siRNA を送達するのに使用されることが多いいわゆる流体力学的加圧注射では、体重の約 10% に対応する体積、すなわちマウス 1 匹あたり約 2.5 ml の液体が尾静脈に速やかに注射されるが、その流体力学的加圧注射とは対照的に、siRNA 含有脂質製剤を低体積 (200 から 300 μ l) で全身投与して、その体積をゆっくりと、すなわち数秒かけてマウスの尾静脈に注入することにより、臨床的に関連する投与様式を実践した本インビボ実験を実施した。実験の設定を図 16 に示す。

10

【0170】

機能的に正常なラット胚線維芽細胞 (RAT2、ATCC: CRL-174) を発癌性 Ras (Ras^{V12}) を用いて形質転換した。続いて、形質転換された Ras^{V12} 依存性線維芽細胞をマウス (1 群 6 匹、8 週齢雄性 Shoen: NMR1-nu/nu、DIME D, Germany) に注射し、これらのマウスは 10 日後に腫瘍を発現した。この工程で、前記動物は形質転換線維芽細胞の注射後 19 日目まで無処置であるか、または 11 日目に様々な製剤を用いた処置を開始するかのいずれかとした。さらなる対照として機能的に正常なラット胚線維芽細胞をマウスに注射したが、そのマウスは腫瘍を発現しなかった。

20

【0171】

本明細書において T-Ras と呼ぶ siRNA 分子は、5' から 3' 方向に配列:

【0172】

【表 4】

aacguguagaaggcauccu-P

【0173】

を有する第一鎖 T-Ras 3A と、5' から 3' 方向に配列:

【0174】

【表 5】

30

aggaugccuucacacguu-P

【0175】

を有する T-Ras 3B とからなった。太字で印刷したヌクレオチドおよび下線を付したヌクレオチドは 2'-O-メチルヌクレオチドであることに注意されたい。任意の鎖で、3' 末端は、上記配列において P で表されるホスフェートで開始する。

【0176】

配列:

【0177】

40

【表 6】

5' uaaguucuagcuguggg-P 3'

【0178】

および第 2 配列

【0179】

【表 7】

5' ccaccacagcuagaacuaa-P 3'

【0180】

を有する P T E N 特異的 s i R N A 分子を対照として設計した。ここで、修飾パターンはそれぞれ T - R a s 3 A および T - R a s 3 B に関して概説したものと同様である。

【0181】

以下の製剤をマウスモデルに投与した：

製剤パネル A：

P B S；

T - R a s 3：10mg/kg / a t u F e c t / 3.7mg/kg；

ネイクトの T - R a s 3 10mg/kg；および

T - R a s 3 5mg/kg / a t u F e c t 38.5mg/kg。

製剤パネル B：

P B S；

a t u F e c t のみ 38.5mg/kg；

P T E N 10mg/kg / a t u F e c t 38.5mg/kg；および

T - R a s 3 5mg/kg / a t u F e c t 38.5mg/kg。

製剤パネル C：

スクロース (50mM)；

T - R a s 3 3.75mg/kg / a t u F e c t - P E G 28.9mg/kg、i . v . 投与；
および

T - R a s 3 3.75mg/kg / a t u F e c t - P E G 28.9mg/kg、i . p . 投与。

【0182】

本明細書において使用される a t u F e c t - P E G は、50mM スクロースに入れた 50mol% - アルギニル - 2,3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド、48mol% 1,2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、および 2mol% 1,2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - ポリエチレングリコール - 2000 (D S P E - P E G 2000) を意味する。

【0183】

動物における薬用量は、s i R N A 5mg/kg および総脂質 38.5mg/kg であり、注射液中の構成要素の濃度は、s i R N A 0.5mg/ml および総脂質 38.5mg/ml であった。モル比は、s i R N A では 0.5mg/ml が 0.04 μmole/ml に対応した (分子量約 12500Da)。脂質は、全脂質 38.5mg/ml であり、ここで、2.3 μmole/ml に対応して、陽イオン性脂質の含有量は 1.97mg/ml (分子量 843.6) であった。s i R N A 対陽イオン性脂質のモル比は 0.0174 対 1 であった。

【0184】

これらの実験結果を、時間、すなわち細胞による攻撃後の日数の関数として腫瘍体積を示している図 17A (製剤パネル A)、図 17B (製剤パネル B)、および図 17C (製剤パネル C) に示す。

【0185】

図 17A および 17B の両方から解釈できるように、a t u F e c t と共に配合した T - R a s 特異的 s i R N A からなるリポプレックスが最も強い阻害を示しており、これは、ターゲッティングの特異性を示している。a t u F e c t のみと比較した場合に、陰性対照分子 P T E N V 10 が腫瘍の成長阻害の向上を示していないことに注目すべきである (図 17B)。

【0186】

図 17C から解釈できるように、a t u F e c t - P E G も非常に有効であり、i . p

10

20

30

40

50

．および i . v . 投与の両方が可能であり、同様の有効性を招く。これに関連して、P E G 化複合体が機能的に活性であり、P E G 化により、当該脂質組成物が P E G 化（ヘルパー）脂質を欠如している類似の脂質組成物よりも毒性が低いと仮定できることに注目すべきであり明白である。

【 0 1 8 7 】

実施例 2 3 : 実施例 2 4 から 2 7 についての材料および方法

s i R N A - リポプレックスの調製

陽イオン性脂質 - L - アルギニル - 2 , 3 - L - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド、中性リン脂質 1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL)、および P E G 化脂質 N - (カルボニル - メトキシポリエチレングリコール - 2 0 0 0) - 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンナトリウム塩 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany) をモル比 5 0 / 4 9 / 1 で含む陽イオン性リポソームを、3 0 0 mM 無 R N アーゼ滅菌スクロース溶液中での脂質フィルム再水化により総脂質濃度 4 . 3 4 mg/ml となるように調製した。続いて、EmulsiFlex C3 装置 (Avestin, Inc., Ottawa, Canada) を用いた高圧均質化 (7 5 0 bar で 2 2 サイクルおよび 1 0 0 0 bar で 5 サイクル) により、多ラメラ分散体をさらに加工した。得られたリポソーム分散体を等体積の 0 . 5 6 2 5 mg/ml s i R N A の 3 0 0 mM スクロース溶液と混合して、核酸主鎖ホスフェート対陽イオン性脂質窒素原子の電荷比の計算値を約 1 対 4 とした。リポプレックス分散体の粒径は、Quasi Elastic Light Scattering (N5 サブミクロン粒子径分析装置、Beckman Coulter, Inc., Miami, FL) により決定された約 1 2 0 nm であった。インビトロ実験には、この分散体を 1 0 % 血清含有細胞培地に 5 ~ 2 0 nM s i R N A の濃度にさらに希釈した。

【 0 1 8 8 】

動物実験

喘息雄性ヌードマウス (Hsd : NMR I - nu / nu、8 週齢) をこの研究にわたり使用した。樹立した腫瘍異種移植片に関する腫瘍治療実験には、合計 $5 . 0 \times 10^6$ 個 / $100 \mu\text{l}$ の細胞を (3 Y 1 - Ras^{V12} には 5 0 % マトリゲルの存在下で) を皮下 (s . c .) に移植した。腫瘍治療実験には、リポソーム s i R N A 複合体溶液を低圧低体積尾静脈注射により i . v . 投与した。3 0 g のマウスについて 0 . 2 8 mg/ml s i R N A および 2 . 1 7 mg/ml 脂質 (1 . 8 8 mg/kg s i R N A および 1 4 . 5 mg/kg 脂質の用量に相当) を含有する原液の注射体積 $200 \mu\text{l}$ を用いて、多様な注射スケジュール (毎日対 1 日 2 回) により種々の投薬量を実現した。腫瘍体積をノギスを用いて決定して、体積 = (長さ \times 幅²) / 2 という式により計算した。承認されたプロトコールにより、the Landesamt für Arbeits-, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, Germany (No. G0264/99) のガイドラインに従って、この研究における全ての動物実験を行った。

【 0 1 8 9 】

統計解析

データを平均 \pm S E M として表現する。差の統計的有意性を M a n n - W h i t n e y の U 検定により決定した。P 値 < 0 . 0 5 を統計的に有意とみなした。

【 0 1 9 0 】

細胞培養およびマウスにおける s i R N A - C y 3 取込み実験

細胞培養での非配合 s i R N A - C y 3 分子の取込み研究のために、H e L a 細胞を所定量の s i R N A 溶液と共に無血清培地中で一晩インキュベートした。下記に挙げるように一晩トランスフェクションすることによって、リポプレックス化した s i R N A - C y 3 細胞の取込みを実施した。処置後の細胞を氷冷 P B S ですすぎ、顕微鏡観察の前に 4 % ホルムアルデヒド / P B S 溶液で 1 5 分間固定した。後期エンドソームおよびライソソームを標識するために、細胞を製造業者の勧めにより蛍光色素 LysoTracker (Molecular Probes) と共にインキュベートして、固定後に共焦点顕微鏡で検査した。配合 s i R N A お

よび裸の *siRNA* を静脈内投与することによって、蛍光標識 *siRNA* - Cy3 を用いたインビボ送達実験を実施した。最終用量 1.88 mg/kg *siRNA* - Cy3 および 14.5 mg/kg 脂質の単回 200 μ l i.v. 注射でマウスを処置した。所定の時点でマウスを屠殺し、蛍光の取込みをホルマリン固定、パラフィン包埋または OCT に取付けた凍結組織切片のいずれかで顕微鏡により検査した。

【0191】

インビトロトランスフェクション

ヒト HUVEC、HeLa、PC-3 細胞系およびマウス EOMA および NIH3T3 細胞系を American Type Culture Collection から入手し、ATCC の推奨に従って培養した。ヒト肝細胞癌細胞系 HuH-7 は MDC, Berlin で入手できた。記載されたように誘導性 Ras^{V12} の形質導入によって、発癌性 Ras^{V12} を発現しているラット 3Y1 細胞を作成した³⁸。

10

【0192】

上記の陽イオン性リボソームを用いて細胞系に *siRNA* をトランスフェクトした。簡潔には、細胞接種の約 12 時間後に、血清含有培地に希釈した種々の量の *siRNA* - リポプレックス溶液を細胞に添加して、1 ~ 50 nM *siRNA* の範囲のトランスフェクション濃度を実現した。トランスフェクション後 (48 h) に、細胞を溶解させて、記載されたようにイムノプロットに供した²⁰。以下の抗体をイムノプロットに使用した：ウサギ抗 PTEN (Ab-2, Neomarkers)、モノクローナル p110 / p85³⁹、ウサギ抗 PKN3³⁸、ヤギ抗 CD31 (Santa Cruz Biotechnology)、ウサギ抗 CD34 (Santa Cruz Biotechnology)、ウサギ抗リン酸化 Akt (S473) (Cell Signaling Technology)。

20

【0193】

インビボ BrdU アッセイ

インビボ細胞増殖を測定するために、腹腔内注射によりマウスを BrdU (Sigma, 250 mg/kg) で処置して、2 時間後に屠殺した。肝臓または腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を製造業者のプロトコールにより BrdU 染色に供した (BrdU In situ detection kit, Pharmingen)。

【0194】

毛細血管密度 (MVD) の決定

30

単一腫瘍切片からランダムに選択した領域 3 ~ 8 か所での CD31 / CD34 陽性血管を計数することによって、毛細血管の数を決定した²⁴。形状、分岐点、および管腔の大きさとは無関係に、血管単位としての血管数を調べた (「血管数」と呼ぶ)。追加的に、Axiovision 3.0 ソフトウェア (Zeiss) を用いて CD31 / CD34 陽性血管構造の合計長 (「合計血管長」と呼ぶ) の決定により血管密度を評価した。計数を Zeiss AxioPlan 光学顕微鏡を用いて倍率 $\times 200$ で腫瘍切片をスキャンすることによって行った。

【0195】

組織分析および顕微鏡観察

マウスを屠殺した後で、組織を直ちに 4.5% 緩衝ホルマリン中で 16 時間固定して、結果的にパラフィン包埋用に加工し、4 μ m 切片を切り出し、スライドガラスに載せた。ヤギポリクローナル抗 CD31 / PECAM-1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) (凍結切片には代替的にラット CD31、1:1000, Pharmingen) およびラットモノクローナル抗 CD34 (CeDarlane) で組織切片を染色して、パラフィン切片中の内皮細胞を可視化した。パラフィン組織切片に関する免疫組織化学およびヘマトキシリン/エオシン (H&E) 対比染色を標準的なプロトコールにより行った。蛍光標識 *siRNA* のインビボ取込み研究には、Zeiss AxioPlan 顕微鏡を用いた落射蛍光によりパラフィン切片を直接検査した。画像を記録して、Zeiss LSM5 画像化ソフトウェアを用いて処理した。*siRNA* 取込みの徹底的な顕微鏡分析を Zeiss LSM510 Meta 共焦点顕微鏡で行った。このために、切片をキシレンでパラフィン除去して、工程のエタノール洗浄により再水和して、Sytox Green 色素 (Molecular Probes 100 nM、10 分間) で対比染色し、すすぎ、最終的

40

50

に顕微鏡用FluorSave (Calbiochem) にマウントした。以下の抗体を用いて、すでに記載されたようにNIH3T3細胞の免疫蛍光染色を行った⁴⁰：免疫組織化学特異的ウサギ抗リン酸化Akt (S473) (Cell Signaling Technology) およびマウス抗β-チューブリン (DM1A、Calbiochem)。

【0196】

【表8】

表1 実施例24から27にかけて使用したsiRNA配列

| siRNAの名称 | 5' から3' 方向の配列 | |
|--------------|--|----|
| PKN3 s | <u>gagagccu</u> <u>guacugc</u> <u>gaga</u> | 10 |
| PKN3 as | <u>ucucgc</u> <u>caguacag</u> <u>gcucuc</u> | |
| PTEN s | <u>ccaccacagcu</u> <u>agaacu</u> <u>ua</u> | |
| PTEN as | <u>uaaguucu</u> <u>agcu</u> <u>guggug</u> | |
| PTEN s (対照) | <u>ccaccacagcu</u> <u>agaacu</u> <u>ua</u> | |
| PTEN as (対照) | <u>uaaguucu</u> <u>agcu</u> <u>guggug</u> | |
| PTEN s | <u>ccaccacagcu</u> <u>agaacu</u> <u>ua</u> | 20 |
| PTEN as-Cy3 | <u>uaaguucu</u> <u>agcu</u> <u>guggug</u> - Cy3 | |
| CD31-1 s | <u>ccaacu</u> <u>uaccca</u> <u>uccaga</u> | |
| CD31-1 as | <u>uucugga</u> <u>ugguga</u> <u>aguugg</u> | |
| CD31-2 s | <u>ggugau</u> <u>agcccc</u> <u>guggau</u> | |
| CD31-2 as | <u>auccacc</u> <u>ggggcu</u> <u>aucacc</u> | |
| CD31-6 s | <u>ccacu</u> <u>ucuga</u> <u>acu</u> <u>ccaaca</u> | 30 |
| CD31-6 as | <u>uguugga</u> <u>guucaga</u> <u>agugg</u> | |
| CD31-8 s | <u>cagau</u> <u>acucu</u> <u>agaac</u> <u>ggaa</u> | |
| CD31-8 as | <u>uuccgu</u> <u>ucuaga</u> <u>guau</u> <u>cug</u> | |

2'-O-メチル修飾を有するヌクレオチドに下線を付す

【0197】

実施例24：インビトロおよびインビボでの裸のsiRNAおよび配合siRNAの送達

40

本研究では、両鎖を交互に2'-O-メチル糖修飾することにより化学的に安定化した、3'-突出を欠如した19塩基長siRNA二本鎖を採用し¹⁶、ここで、未修飾ヌクレオチドは反対側の鎖の修飾ヌクレオチドに向かっている。実際に使用したsiRNA分子を実施例23に示す。

【0198】

第一段階で、我々はこれらの分子が送達ビヒクルの不在下での細胞培養においてRNAiを仲介するかどうか分析した。イムノプロット分析は、siRNA-リポプレックスに使用したナノモル濃度に比べて、マイクロモル濃度で裸のsiRNAが適用された場合でも遺伝子サイレンシングが起こらなかったことを実証した。結果を図18aに示す。

【0199】

50

図18aからさらに詳細に解釈できるように、イムノブロットから評価されるようにリポプレックス化*siRNA*ではPKN3タンパク質発現の濃度依存性阻害が存在したが、HeLa細胞での裸の*siRNA*ではそうではなかった。PTEN3を負荷対照とした。
【0200】

我々は未修飾従来型*siRNA* (21塩基長、ヌクレオチド2個、3'-突出)⁶およびコレステロール結合*siRNA*またはペプチド連結*siRNA*を含めたいくつかの結合分子も試験したが、送達ビヒクルの不在下で内因性タンパク質発現の標的特異的低減を全く検出しなかった(データは示さず)。
【0201】

遺伝子サイレンシングの欠如が、陰イオン性*siRNA*と負に荷電した細胞膜との間の反発作用が原因の非効率的な細胞取込みの結果であるかどうかを分析するために、我々は、3'蛍光(Cy3)標識*siRNA*を採用して共焦点顕微鏡観察によりそれらの取込みを研究した。我々および他の人々は、送達ビヒクルと共にトランスフェクトしたときに、アンチセンス分子の3'末端での蛍光標識がRNAサイレンシング活性を障害しないと以前に示した^{16, 17}。我々は、驚くことに高濃度の*siRNA*-Cy3分子が適用されたときに、トランスフェクション試薬の不在下で蛍光標識*siRNA*の有意な取込みを観察した。しかし、大部分の蛍光標識は、LysoTrackerマーカの共局在によって実証されるように、後期エンドソーム/ライソソーム小胞で終わるようであった。これは、非配合*siRNA*がエンドソーム経路にトラップされたままであることを示唆している。対照的に、リポソーム複合体としてトランスフェクトされた*siRNA*は、これらの小胞から解離して細胞質に放出された。これらの結果は、*siRNA*のリポソーム製剤が、*siRNA*の機能的送達に関して少なくとも二つの有益作用、すなわち細胞取込みの改善、および重要なことにはエンドサイトーシス/エンドソーム経路から、RNAi介在性mRNA分解が起こる細胞質への逃避を提供することを示している¹⁸。
【0202】

図18bの詳細は以下の通りである。
【0203】

図18bは、ネイキドの*siRNA*および配合*siRNA*の細胞内分布を示す。左および中央の欄のHeLa細胞では、蛍光標識*siRNA*-Cy3を共焦点顕微鏡観察により分析した。右の欄は、LysoTrackerで対比染色後の細胞内分布をマージした写真を示す(緑色: 矢印、エンドソーム/ライソソーム区画に関する*siRNA*-Cy3の局在)。上列: 裸の*siRNA*-Cy3、下列: リポプレックス化された*siRNA*-Cy3。
【0204】

リポソーム製剤がインビボで*siRNA*の薬理的性質を変化させるかどうかを分析するために、マウスの尾静脈に単回用量の*siRNA*-Cy3分子(1.88mg/kg *siRNA*)を注射した(低体積および低圧)。脾臓、肺、腎臓、および前立腺を含めたいくつかの器官の顕微鏡分析から、配合*siRNA*でCy3特異的蛍光の有意な増加が示された(データは示さず)。全ての分析時点(注射後1h、4h、24h、図18c)で、リポソームに配合された*siRNA*で処置されたマウスの肝臓から最大量の蛍光を検出した。この結果は、裸の*siRNA*を投与したときに比べて、リポプレックスに配合した*siRNA*分子がよりよく生体分布することを示す。
【0205】

しかし、器官全体での生体分布の改善は、送達された*siRNA*の機能性に欠くことができないこれらの分子が細胞内または細胞型特異的に取込まれることを必ずしも示さない。共焦点顕微鏡観察による肝臓への配合*siRNA*-Cy3の取込みのさらに詳細な分析から、細胞レベルで蛍光染色が血管および洞様血管の内面に主に存在することが明らかとなった(図18c、下欄)。肝臓血管のさらに精密な検査は、PBS対照に比べて内皮層が蛍光*siRNA*-Cy3ではっきりと標識されていることを明らかにした(図18d、上列)。内皮細胞内部で、*siRNA*-Cy3は細胞質に専ら存在する(図18d、下列)。固定されていない肝凍結切片で同じ染色パターンが観察され、このことから、ホルマ

10

20

30

40

50

リン固定のどのようなアーチファクトも除外される（データは示さず）。蛍光標識したリポプレックス化 *siRNA* も腫瘍脈管構造を標的とするかどうかを試験するために、我々は、種々の実験腫瘍を保持するマウスを *siRNA* - Cy3 リポプレックスの単回 i.v. 注射で処置した。三つの実験的腫瘍異種移植片（皮下（s.c.）2個、肝臓内（i.h.e.p.）1個）の全てで、我々は、腫瘍脈管構造に有意な蛍光シグナルを検出した（図18e、矢印）。内皮細胞マーカーである抗CD34抗体を用いた対比染色により、腫瘍脈管構造の内皮層による *siRNA* - Cy3 の取込みを確認した（図18e、下欄）。さらに、蛍光標識脂質を用いて、内皮によるリポプレックス - *siRNA* の取込みを確認した（示さず）。まとめると、これらのデータは、*siRNA* の陽イオン性脂質系製剤が *siRNA* の動特性および分布性を改善して内皮細胞への *siRNA* の主な取込みを可能にすることを実証している。

10

【0206】

図18cに示した結果の実験的設定は以下の通りであった。単回 i.v. 注射によって裸の *siRNA* - Cy3 またはリポプレックス化 *siRNA* - Cy3 を投与し、指示した時点の肝臓組織切片を落射蛍光顕微鏡観察により分析した（上欄）。下欄：リポプレックス（右の写真、*siRNA* - Cy3、赤色；核、Sytox Greenを用いた対比染色による緑色）に比べた非配合 *siRNA* - Cy3（左の写真）の分布を示す肝切片の共焦点顕微鏡拡大像。画像を同設定で記録した。肝臓血管（矢印）および洞様血管（二重矢印）の染色強度を比較されたい。

【0207】

20

図18dの詳細は以下の通りである。PBS処置対照切片（左欄）に比べて、肝臓血管の内皮内面は蛍光 *siRNA* - Cy3（右欄）で装飾されている。共焦点顕微鏡観察から、肝臓内皮細胞において配合 *siRNA* - Cy3（赤色、マージ）が細胞質に送達されているのが明らかになった（赤血球、二重矢印）。核では蛍光は検出できない（緑色、矢印）。

【0208】

図18eに示した結果についての実験設定は以下の通りであった。矢印で示すようにリポソームに配合した *siRNA* で、種々の腫瘍の内皮細胞をターゲティングした（*siRNA* - Cy3、赤色。核、緑色）。上列は、皮下で成長したPC-3腫瘍（左欄）およびRas^{V12}形質転換3Y1ラット線維芽細胞腫瘍（中央欄）または肝臓内で成長したHuH-7腫瘍（右欄）からの切片の蛍光像を示す。下列は、HuH-7腫瘍の内皮細胞におけるリポソームにより送達された *siRNA* - Cy3 の検出を示す。H&E染色（左欄）により、薄い細胞質および顕著な核（矢印）が特徴的な腫瘍内皮細胞を示す。連続切片は、内皮細胞の対応する *siRNA* - Cy3 蛍光（赤色、中央欄）および抗CD34免疫染色（右欄）をそれぞれ示す。

30

【0209】

実施例25： 肝臓および腫瘍の内皮細胞へのPTEN特異的 *siRNA* の機能的送達

siRNA - リポプレックスがインビロ内皮細胞における内因性遺伝子発現をサイレンシングする能力を実証するために、ホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3-キナーゼ）のアンタゴニストである腫瘍抑制因子PTENを標的として選択した。我々は、内皮細胞核でのBrdU取込みによるDNA合成増加を測定することによって、正の読出し系でのPTENの機能的遺伝子サイレンシングを監視しようとした。PTEN発現の欠如は、PI3-キナーゼシグナル伝達を慢性的に活性化することが知られており、それを下流のキナーゼAktのリン酸化の増加から測定できる¹⁹（図19a）。PI3-キナーゼの慢性活性化もDNA合成速度増加に伴う²⁰。

40

【0210】

最初に、マウスおよびヒトPTEN mRNAをターゲティングする、選択された *siRNA*^{PTEN}（実施例23参照）のRNAi活性を、インビトロ脂質介在性トランスフェクションにより立証した（図19a）。各ヌクレオチドに2'-O-メチル修飾を保有している同一の *siRNA* 配列を陰性対照として使用した（*siRNA*^{control}）

50

)。それは、この一様な修飾パターンがRNAi活性を完全に打ち消すからであり¹⁶、PTENタンパク質のノックダウンおよびAktのリン酸化増加がイムノプロットにより観察された。免疫蛍光研究から、活性siRNA^{PTEN}分子の存在下でAktのリン酸化増加が確認された(図19a)。これは、細胞培養においてsiRNA^{PTEN}分子がPI3-キナーゼシグナル伝達を活性化できることを実証している。

【0211】

PTENのインビボ遺伝子サイレンシングを試験するために、PBS、裸のsiRNA^{PTEN}、siRNA^{PTEN}-リポプレックスまたは脂質ビヒクルのいずれかで連続3日間低圧尾静脈注射により、マウス(1群4匹)を処置した(方法の項参照)。処置の4日目にマウスにBrdUを注射して、2時間後にマウスを屠殺して、BrdUの取込みを、BrdU陽性核について肝臓切片を免疫組織染色することにより測定した。内皮細胞のサイズが小さいことおよびリン酸化Akt特異的抗体およびPTEN特異的抗体を用いて信頼できるシグナルを検出するのが困難であることから、その場でタンパク質のノックダウンを検出できなかった。しかし、内皮細胞への蛍光標識siRNAの細胞特異的送達を観察されたことに一致して、我々はリボソームsiRNA^{PTEN}の場合にのみ肝臓内皮のBrdU陽性核が有意に増加することを観察した(図19b)。担腫瘍マウスを用いた類似の実験から、リボソームに配合した活性PTEN-siRNAを用いた処置後に腫瘍内皮のBrdU陽性核数が同様に有意に増加することが明らかになった(図19c)。不活性な、完全メチル化対照分子であるsiRNA^{control}は、PBS対照群に比べてBrdU取込みの増加を引き起こさなかった。我々は、これらのデータから、陽イオン性脂質と配合された安定化したPTEN特異的siRNAがインビボで機能的であって、全身投与後に内皮細胞に遺伝子サイレンシングを誘導すると結論する。

【0212】

図19aの詳細は以下の通りである。安定化したPTEN特異的siRNA(10nM)のインビトロトランスフェクションは、PTENタンパク質レベルを低減して、イムノプロットにより明らかな下流のキナーゼAkt(P^{*}-Akt)のリン酸化を増加させた(右上欄:PI3-キナーゼサブユニットp110、p85、未影響の負荷対照)。siRNA^{control}は、完全メチル化不活性siRNA^{PTEN}分子、utは未処置細胞を表す。リン酸化Aktの増加は、siRNA^{PTEN}をトランスフェクトしたNIH3T3細胞での免疫蛍光染色によっても可視化された(リン酸化Akt、赤色。細胞形態のマーカーとして抗-チューブリン、緑色)。

【0213】

図19bは、PBS、裸のsiRNA^{PTEN}、リポプレックス化siRNA^{PTEN}、および陽イオン性リボソームでそれぞれ処置された動物からの肝臓試料における代表的な写真(上欄)および対応する定量(下図)を表し、BrdU陽性内皮核(矢印)の数に有意差があることを示している(処置毎に写真2枚を示す)。統計的有意:裸のsiRNA^{PTEN}対siRNA^{PTEN}-リポプレックス、*P=0.0286。リボソーム対siRNA^{PTEN}-リポプレックス、*P=0.0286。

【0214】

図19cの詳細は以下の通りである。DNA合成に及ぼすリポプレックス化siRNA^{PTEN}の配列特異性を、腫瘍脈管構造についてのBrdUアッセイで確認した。BrdU陽性核(矢印)の増加を、siRNA^{control}-リポプレックスに比べたときのsiRNA^{PTEN}-リポプレックスで処置された動物からの腫瘍血管(V)から検出した。Tu:腫瘍組織。内皮細胞でのBrdU陽性核の定量は有意に増加した:siRNA^{control}-リポプレックス対siRNA^{PTEN}-リポプレックス、*P=0.032。

【0215】

実施例26: CD31のインビボ遺伝子サイレンシング

インビボsiRNA介在性遺伝子サイレンシングをより直接的に実証するために、我々は、内皮細胞に選択的に発現した遺伝子のターゲティングに集中した。我々は、適切な

標的としてCD31としても公知である血小板-内皮細胞接着分子1 (PECAM-1) を選択した。それは、その発現が脈管構造の細胞、主に内皮細胞ならびに血小板、単球、好中球、および選択されたT細胞に限られるからである²¹⁻²³。

【0216】

マウスおよびヒト由来内皮細胞系 (HUVEC、EOMA) を用いた2'-O-メチル修飾 siRNA 分子のスクリーニング (実施例23 参照) から、いくつかの強力なヒトおよびマウス特異的 CD31-siRNA 分子の同定に至った (図20a)。最も強力な siRNA 分子である siRNA^{CD31-8} を、実施例23に記載されたようにリボソームに配合し、2または7日間連続して担腫瘍マウスに全身投与した。等張スクロース溶液またはリボブレックス化 siRNA^{PTE} で対照マウスを処置して、特異性を試験した

10

【0217】

siRNA^{CD31-8}-リボブレックスで処置されたマウスにおける CD31 mRNA レベルの低減が、腫瘍、肝臓、および肺試料で観察されたが、脾臓組織試料では観察されなかった。CD31 mRNA レベルの観察された低減は、RNAi の作用機序が mRNA 開裂に基づくことを指摘している (図20b)。さらに、対照マウスで変化していないタンパク質レベルが観察されたことに比べて、siRNA^{CD31-8}-リボブレックスで連続する2日間処置されたマウスの腫瘍および肝臓溶解液から、CD31 タンパク質レベルの有意な低減が検出された (図20c、左欄)。

20

【0218】

特異性および等しい負荷を試験するために、我々は、これらの溶解液中の、別の内皮細胞マーカータンパク質である CD34 および PTE のタンパク質レベルを平行して分析した。我々は、脾臓および肺からの全細胞抽出物も検査したが、これらの器官から、信頼できる CD31 タンパク質の発現はイムノブロット分析により検出されなかった (データは示さず)。CD31 タンパク質のノックダウンが1日1回7日間の i.v. 注射により非担腫瘍マウスでの独立した実験で確認された (図20c、右欄)。

【0219】

さらに、異種移植片腫瘍マウスモデルにおける内皮マーカー CD31 および CD34 についての毛細血管密度 (MVD) の差を測定することによって、CD31 発現の低減もその場で明らかとなった。MVD 測定は、腫瘍血管形成についての代理マーカーであり、CD31 または CD34 特異的抗体を用いた血管の免疫組織化学染色により分析される²⁴⁻²⁶。配合された CD31 および PTE 特異的 siRNA を、一定体積 (200 μl) および一定圧で2日間担腫瘍マウス (腫瘍サイズ 800 mm³) に尾静脈注射により投与した。3日目にマウスを屠殺して、それぞれ CD31 および CD34 抗体を用いた免疫染色後に、連続した切片の間で MVD を比較した。

30

【0220】

リボブレックス化 siRNA^{CD31-8} で処置されたマウスは、血管の総数および血管長により測定される CD31 陽性血管の総量に統計的に有意な減少を示した (図20d)。CD34 特異的抗体を用いた染色は、MVD の変化を明らかにせず、これは、特異的 CD31 サイレンシングが生じたことをもう一度示している。両対照群、すなわち siRNA^{PTE} および等張スクロース処置群は、CD31 または CD34 染色のどちらでも MVD 評価の差を示さなかった。この結果は、mRNA およびタンパク質ノックダウンに関する分子データと共に、リボブレックス化 siRNA^{CD31-8} の全身投与に应答して CD34 陽性内皮細胞が減少せずに CD31 発現が特異的に低減することを示している。我々は、陽イオン性脂質に配合した siRNA を投与することによって、腫瘍および肝臓の脈管構造におけるインビボ CD31 (PECAM-1) 遺伝子サイレンシングを実現できると結論した。

40

【0221】

図20aの詳細は以下の通りである。図20aは、効果的な CD31 ノックダウンのた

50

めの強力な安定化 *siRNA* の同定を示す。HUVEC およびマウス EOMA 細胞に CD31 をターゲティングしている 4 つの異なるヒト、マウス特異的 *siRNA* (CD31-1、-2、-6、-8) および対照 PTEN-*siRNA* をトランスフェクトした。抗 CD31 および抗 PTEN を用いたイムノプロットにより特異的タンパク質ノックダウンを評価し、*siRNA*^{CD31-8} 分子が最高の有効性であることを実証した。

【0222】

図 20b の詳細は以下の通りである。2 日間連続でリポプレックス化 *siRNA*^{CD31-8} の i.v. 注射により処置されたマウスは、定量的 TaqMan RT-PCR により明らかとなるように、ある組織での CD31 mRNA レベルの低減を示した。PTEN mRNA レベルに対して CD31 mRNA の相対量を標準化した。

10

【0223】

図 20c の詳細は以下の通りである。抗 CD31 抗体および抗 PTEN ならびにタンパク質負荷が等しいことを示すための抗 CD34 (別の内皮マーカータンパク質) を用いて肝臓および腫瘍からの抽出物を用いたイムノプロット分析によって、*siRNA*^{CD31-8} - リポプレックスで全身処置されたマウスにおける CD31 タンパク質ノックダウンを確認した。2 日間 (左欄: 肝臓および腫瘍) または 7 日間連続 (右欄: 肝臓) で i.v. 注射することによりマウスを処置した。*siRNA*^{CD31-8} - リポプレックス処置動物では、肝臓および腫瘍におき CD31 タンパク質ノックダウンが観察された (動物 2、左欄参照) が、等張スクロース溶液または *siRNA*^{PTEN} - リポプレックスで処置されたマウスでは観察されなかった (動物 1、3 参照)。7 日間の処置方式で、対照動物 4、7、および 8 (右欄) に比べて動物 5 および 6 で、実質的な CD31 ノックダウンが観察された。インビボ研究に使用した *siRNA*^{CD31-8} - リポプレックスの機能性を HUVEC 細胞で平行して立証した (10nm *siRNA*)。

20

【0224】

図 20d の詳細は以下の通りである。等張スクロース、*siRNA*^{CD31-8} - リポプレックス、および *siRNA*^{PTEN} - リポプレックスで処置された対応するマウスからのパラフィン腫瘍切片の免疫染色により、CD31 タンパク質のインビボノックダウンを直接評価した。それぞれ抗 CD31 および抗 CD34 抗体で連続する切片を染色して、腫瘍脈管構造を可視化した。CD34 ではなく CD31 に対する染色強度の低減が、*siRNA*^{CD31-8} - リポプレックスで処置されたマウスからの腫瘍切片で見出された。*siRNA*^{CD31-8} - リポプレックスで処置されたマウスからの試料で低減した MVD を示している、CD31 陽性血管の (血管数 (上図) および血管の合計長 (下図) により決定された) MVD の定量。この差は、CD34 陽性血管の MVD 測定では観察されなかった。

30

【0225】

本明細書に開示された抗 CD31 *siRNA* 分子に関連して、本出願の開示は、任意の抗 CD31 *siRNA* 分子に、さらに好ましくは抗 CD31-8 *siRNA* 分子に関連して開示された、本明細書に示されて記載された修飾パターンを示している任意の抗 CD31 *siRNA* 分子に関するものであることに留意すべきである。

【0226】

実施例 27: 腫瘍モデルにおける全身投与された *siRNA*^{CD31-8} - リポプレックスの有効性

40

本実施例では、CD31 / PECAM-1 に対する配合 *siRNA* が腫瘍の成長に任意の治療的潜在性を表すかどうかという問題に取り組んだ。

【0227】

CD31 は、血管 / 血小板の形成および機能に関する多様な細胞メカニズムに関与すると意味づけられている^{23, 27, 28} が、腫瘍成長時の血管新生に対する CD31 の潜在的寄与についてはまだ取組まれていない。治療方法に選択された *siRNA* 分子は、対照分子として特異的 *siRNA*^{CD31-8} および *siRNA*^{PTEN} を含んだ。インビボ実験の前に HUVEC での用量依存性トランスフェクション実験で、インビボ有効性研

50

究用の $siRNA^{CD31-8}$ - リポプレックスおよび $siRNA^{PTEN}$ - リポプレックスを試験した。これらの $siRNA$ - リポプレックスの機能性および効力を実証している代表的なイムノプロットを図 21a に示す。

【0228】

これらの製剤を用いて低サブナノモル濃度範囲での $siRNA^{CD31-8}$ を用いて、 $CD31$ タンパク質のノックダウンを実現した。 $PTEN$ 、リン酸化 Akt 、および $CD34$ に関してプロービングすることによって、 $siRNA^{CD31-8}$ 介在性遺伝子サイレンシングの特異性を実証した。 $siRNA^{PTEN}$ を用いたトランスフェクションとは異なり、 $HUVEC$ 細胞において、 Akt のリン酸化状態は $CD31$ の低減により影響されなかった。未処置対照と比べたとき、 $CD34$ タンパク質レベルは、両リポプレックスで変化しなかった。2つの異なる種類の $s.c.$ 腫瘍異種移植片を保持するマウスで、全身投与した $CD31-siRNA$ - リポプレックスの潜在的治療効果を検討した。

【0229】

最初に、我々は種々のリポプレックス1日量を用いた繰返し全身処置を可能にする方式を樹立した。リポプレックス溶液 $200\mu l$ の1日1回または1日2回尾静脈注射の投与によって種々の総用量を実現した（単回用量 1.88mg/kg/d $siRNA$ 、 14.5mg/kg/d 脂質）。我々は、全身の健康の全般的なマーカーとして体重変化を監視することによって評価したとき、動物の健康状態に重篤な毒性作用は観察されなかった（図 21b）。

【0230】

次に、我々は、腫瘍成長の障害に及ぼす $siRNA^{CD31-8}$ - リポプレックスの有効性研究で1日1回または1日2回いずれかの $i.v.$ 処置を表す二つの投与方式を分析した。両処置方式は、リポプレックス $siRNA^{CD31-8}$ を用いて樹立した速やかに成長している $3Y1-Ras^{V12}$ の $s.c.$ 異種移植片の腫瘍成長に明らかな障害作用を招いた（図 21c）。とりわけ、この特定の腫瘍異種移植片について1日2回の方式が腫瘍成長に及ぼす障害作用を改善した。 $siRNA^{PTEN}$ - リポプレックス処置対照群およびスクロース処置対照群に比べたときに、この障害は統計的に有意であった（図 21c）。

【0231】

追加の実験では、リポソームに配合した $siRNA^{CD31-8}$ を用いた低成長性 $s.c.$ $PC-3$ 腫瘍異種移植片の全身処置は、 $siRNA^{PTEN}$ 対照に比べて腫瘍成長に有意な遅延を同様に引き起こした（図 21d）。まとめると、インビボ異種移植片実験は、リポソームに配合した $CD31-siRNA$ の全身投与によって、ヌードマウスにおける腫瘍細胞の成長を抑制できることをはっきりと実証している。これらのデータは、非古典的薬物標的である $CD31$ ($PECAM-1$) が $RNAi$ に基づく抗血管形成治療介入に対する適切な標的と思われることも暗示している。

【0232】

図 21a の詳細は以下の通りである。全身腫瘍処置に使用したリポプレックス化 $siRNA$ の、 $HUVEC$ での品質管理および有効性試験。抗 $CD31$ 抗体を用いたイムノプロットから、対照 $siRNA^{PTEN}$ ではなく、 $siRNA^{CD31-8}$ の場合に $CD31$ の濃度の依存したノックダウンが明らかとなった。 $CD31$ の低減は、 Akt リン酸化状態 (P^*-Akt) を監視することによって明らかになるように、 $siRNA^{PTEN}$ 対照に比べて $PI3$ - キナーゼシグナル伝達に作用を有さなかった。 $CD34$ タンパク質レベルは影響されなかった。

【0233】

図 21b の詳細は以下の通りである。体重に及ぼす二つの異なる $siRNA$ - リポプレックス用量の影響を監視した。異なる $siRNA^{PTEN}$ - リポプレックス用量（四角： 1.88mg/kg/d $siRNA$ および 14.5mg/kg/d 脂質となる1日1回の注射、菱形： 3.75mg/kg/d $siRNA$ および 28.9mg/kg/d となる1日2回注射（8時間間隔））を連続7日間投与して、体重変化を測定して、平均値としてプロットした（ n = マウス7匹）。比較のために、等張スクロース溶液（丸印）で処置された動物の体重（平均 \pm S

10

20

30

40

50

EM)を示す。

【0234】

図21cおよび21dの詳細は以下の通りである。CD31-siRNA-リポプレックス処置による腫瘍成長の阻害。ヌードマウスに二つの異なる腫瘍異種移植片(c:3Y1-Ras^{V12}、d:PC-3)をs.c.で樹立した(c:左図:n=一群マウス8匹、右:n=一群マウス7匹。d:n=一群マウス8匹)。担腫瘍マウスをsiRNA^{CD31-8}-リポプレックス(菱形)、siRNA^{PTE}-リポプレックス(三角)、または等張スクロース(黒四角)で処置した。示したように異なる処置方式を適用した:一重矢印1日1回、二重矢印1日2回。(c)樹立した3Y1-Ras^{V12}腫瘍の成長は、1日2回投与方式を適用することによってsiRNA^{PTE}-リポプレックスに比べてときにsiRNA^{CD31-8}-リポプレックスにより有意に阻害された(右図)。(d)樹立したPC-3異種移植片の成長は、示されたように投与されたsiRNA^{PTE}-リポプレックスに比べて、siRNA^{CD31-8}-リポプレックスで有意に阻害された(1.88mg/kg/d siRNA、14.5mg/kg/d脂質、矢印)。データは平均±SEMを表す。有意:Mann-Whitneyにより* $P < 0.05$ 。

10

【0235】

以下の参照は、実施例23から28に固有であり、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0236】

【表 9】

6. Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).
16. Czauderna, F. et al. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **31**, 2705-16 (2003).
17. Chiu, Y.L. & Rana, T.M. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* **10**, 549-61 (2002). 10
18. Zelphati, O. & Szoka, F.C., Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11493-8 (1996).
19. Stambolic, V. et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39 (1998).
20. Klippel, A. et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* **18**, 5699-711 (1998). 20
21. Watt, S.M., Gschmeissner, S.E. & Bates, P.A. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* **17**, 229-44 (1995).
22. Newman, P.J. et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* **247**, 1219-22 (1990).
23. Ilan, N. & Madri, J.A. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 515-24 (2003).
24. Fox, S.B. & Harris, A.L. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *Apmis* **112**, 413-30 (2004). 30

25. Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M. & Perret, G.Y. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* **64**, 2941-55 (2004).
26. Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R. & Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* **324**, 1-8 (1991).
27. Ilan, N., Mahooti, S. & Madri, J.A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci* **111** (Pt 24), 3621-31 (1998). 10
28. Solowiej, A., Biswas, P., Graesser, D. & Madri, J.A. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. *Am J Pathol* **162**, 953-62 (2003).
38. Leenders, F. et al. PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase. *Embo J* **23**, 3303-13 (2004).
39. Klippel, A., Escobedo, J.A., Hirano, M. & Williams, L.T. The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity. *Mol Cell Biol* **14**, 2675-85 (1994). 20
40. Santel, A. & Fuller, M.T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* **114**, 867-74 (2001).

【 0 2 3 7 】

明細書、特許請求の範囲、および／または図面に開示された本発明の特性は、個別に、およびその任意の組み合わせの両方で、本発明を多様な形態で実現するための材料であり得る。

【図面の簡単な説明】

30

【 0 2 3 8 】

【図 1】本発明による陽イオン性脂質の基本設計を示す図である。

【図 2】本発明による化合物を合成するための可能な出発物質である N - オレイル - パルミチルアミンの合成を示す図であり、ここで、当該合成は US 6,395,713 に記載された従来技術によるものである。

【図 3】本発明による重要な出発物質である N - オレイル - パルミチルアミンの合成を示す図である。

【図 4】 - アルギニル - 2,3 - アミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド、 - アルギニル - 2,3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド、および - アルギニル - リシン - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリドの合成を示す図である。 40

【図 5】 - アルギニル - 2,3 - アミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド、 - アルギニル - 2,3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド、および - アルギニル - リシン - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリドの合成を示す図である。

【図 6】 - アルギニル - 2,3 - アミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド、 - アルギニル - 2,3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド、および - アルギニル - リシン - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリドの合成を示す図である。

【図 7】 - アルギニル - 2,3 - アミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル 50

- アミドトリヒドロクロリド、 - アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド、および - アルギニル - リシン - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリドの合成を示す図である。

【図 8】 - アルギニル - 2 , 3 - アミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド、 - アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド、および - アルギニル - リシン - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリドの合成を示す図である。

【図 9】 - アルギニル - 2 , 3 - アミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリド、 - アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリド、および - アルギニル - リシン - N - ラウリル - N - ミリスチル - アミドトリヒドロクロリドの合成を示す図である。

10

【図 10】本発明による陽イオン性脂質の合成のための代替構成要素である代替陽イオン性頭基の合成を示す図である。

【図 11 - 1】ベータ - アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリドの合成のための代替合成経路を示す図である。

【図 11 - 2】ベータ - アルギニル - 2 , 3 - ジアミノプロピオン酸 - N - パルミチル - N - オレイル - アミドトリヒドロクロリドの合成のための代替合成経路を示す図である。

【図 12 A】本発明による脂質製剤の粒径分布および押出しおよび高圧均質化それぞれの影響を示す図である。

【図 12 B】本発明による脂質製剤の粒径分布および押出しおよび高圧均質化それぞれの影響を示す図である。

20

【図 13】凍結保護剤に曝露されて異なる温度で保存された R N A i 含有脂質製剤のウエスタンブロット分析の結果を示す図である。

【図 14】ヘルパー脂質が異なる脂質製剤に及ぼす種々の s i R N A 負荷の影響に関するウエスタンブロット分析の結果を示す図である。

【図 15】ウエスタンブロット分析の結果および種々の濃度の P E G 置換脂質の影響を示す図である。

【図 16】R a s V 1 2 依存性腫瘍マウスモデルを作成するために使用した実験設定および多様な製剤の試験におけるその使用を示す図である。

【図 17 A】種々の製剤を用いた、細胞による攻撃後の日数の関数としての腫瘍体積を示す図である。

30

【図 17 B】種々の製剤を用いた、細胞による攻撃後の日数の関数としての腫瘍体積を示す図である。

【図 17 C】種々の製剤を用いた、細胞による攻撃後の日数の関数としての腫瘍体積を示す図である。

【図 18 - 1】(a) 裸の P K N 3 特異的 s i R N A およびリポプレックス化 P K N 3 特異的 s i R N A の作用のウエスタンブロット分析の結果を示す図である。 (b) 裸の s i R N A および配合 s i R N A 細胞内分布を示す共焦点顕微鏡写真である。

【図 18 - 2】(c) 肝臓でのリポソーム製剤および裸の s i R N A の分布を示す落射蛍光顕微鏡写真 (上欄) および共焦点顕微鏡写真 (下欄) である。 (d) リポソームに配合した s i R N A でターゲティングした内皮細胞の落射蛍光顕微鏡写真および共焦点顕微鏡写真である。

40

【図 18 - 3】(e) 種々の腫瘍内皮細胞の蛍光顕微鏡写真である。

【図 19 - 1】(a) D N A 合成に及ぼす P T E N に対する s i R N A の作用機序の略図であり、異なる s i R N A 種を用いたウエスタンブロット分析の結果および前記異なる s i R N A 種で処置された H E L A 細胞の免疫蛍光顕微鏡写真を示す図である。

【図 19 - 2】(b) 異なる s i R N A 分子で処置された内皮細胞の写真および肝臓内皮細胞における B r d U アッセイの結果を表わす図である。 (c) 異なる s i R N A 分子で処置された内皮細胞の写真および腫瘍内皮細胞における B r d U アッセイの結果を表わす図である。

50

【図20-1】(a)効果的なCD31ノックダウンのための強力なsiRNA分子を決定するためのウエスタンブロット分析の結果を示す図である。(b)マウスの種々の器官におけるCD31 mRNAレベルに及ぼす抗CD31 siRNAの作用を例示する図である。(c)抗CD31 siRNA分子を用いてマウスの種々の器官におけるCD31タンパク質のノックダウンの有効性を決定するためのウエスタンブロット分析の結果を示す図である。

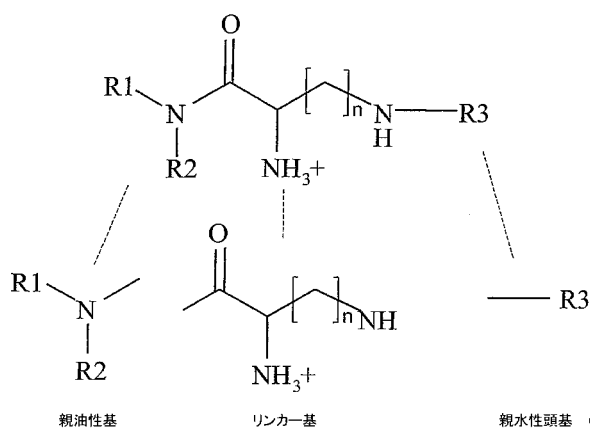
【図20-2】(d)抗CD31 siRNA分子で処置されたマウスのパラフィン腫瘍切片の直接免疫染色によるCD31タンパク質のインビボノックダウンの結果を示す図である。

【図21】(a)CD31、CD34、PTEN、およびp-Aktのノックダウンに及ぼす抗CD31 siRNAおよび抗PTEN siRNA分子の有効性を研究するウエスタンブロット分析の結果を示す図である。(b)時間の関数として被験動物の体重に及ぼす異なるパターンのリポプレックス投与の作用を例示する図である。(c)二つの異なる腫瘍異種移植片の体積に及ぼす異なる抗CD31 siRNAの処置方式の作用を例示する図である。(d)抗CD31処置方式での、樹立されたPC-3異種移植片の成長阻害を例示する図である。

10

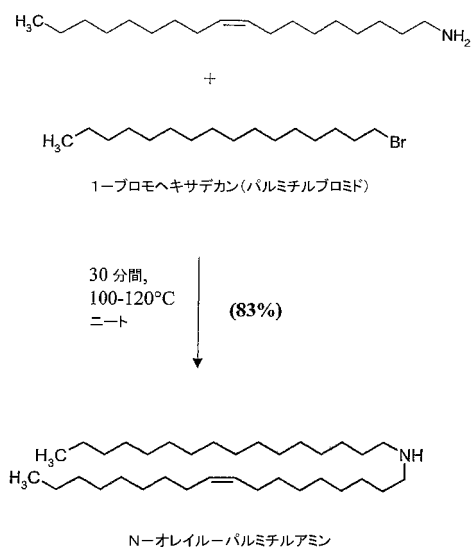
【図1】

本発明による化合物の一般構造:

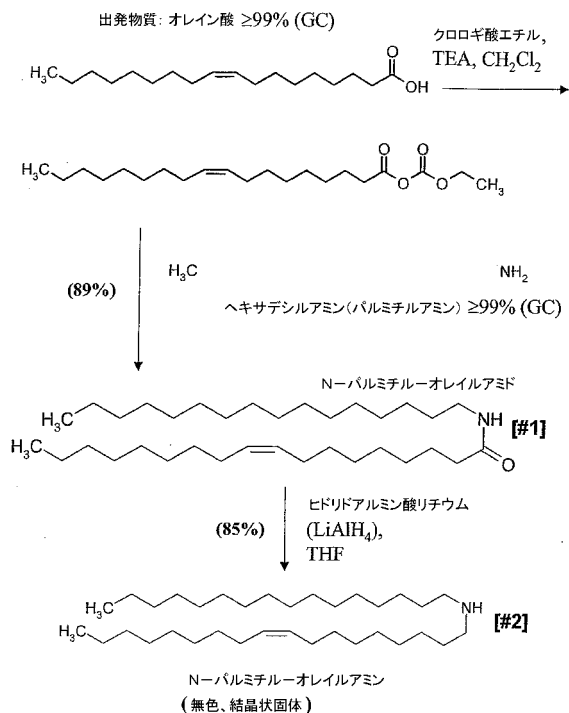


【図2】

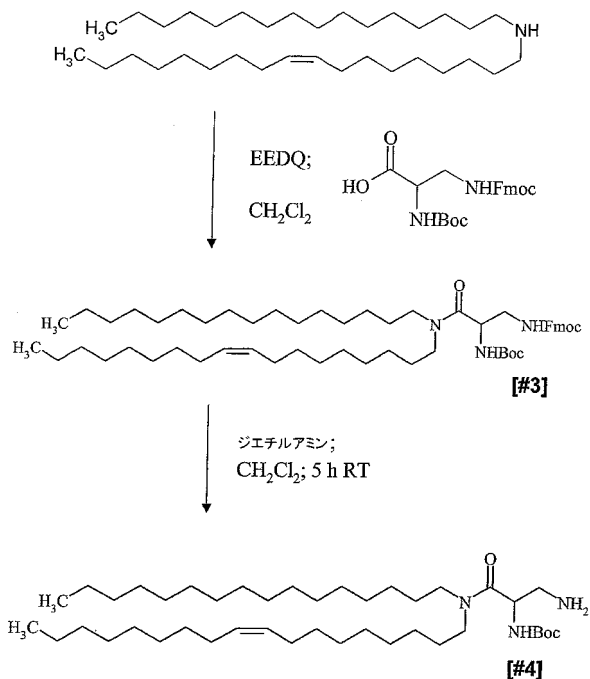
出発物質:オレイルアミン
Fluka工業用
種々のアルキル鎖を有するアミン約30%



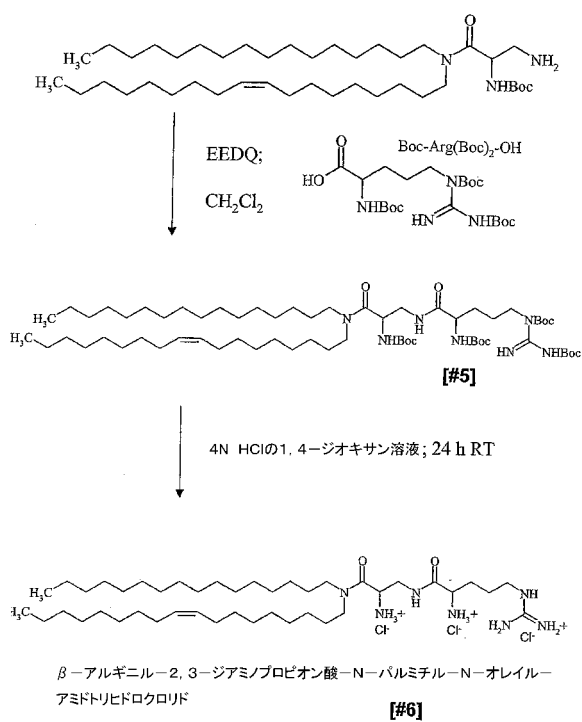
【図 3】



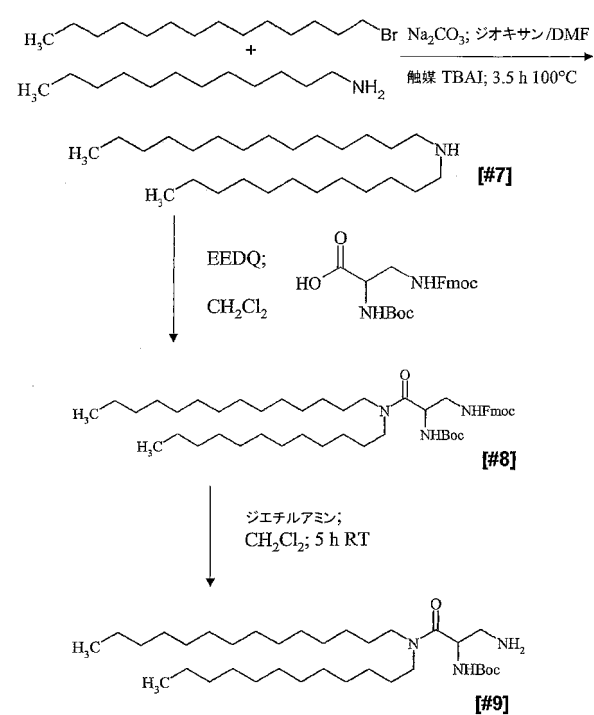
【図 4】



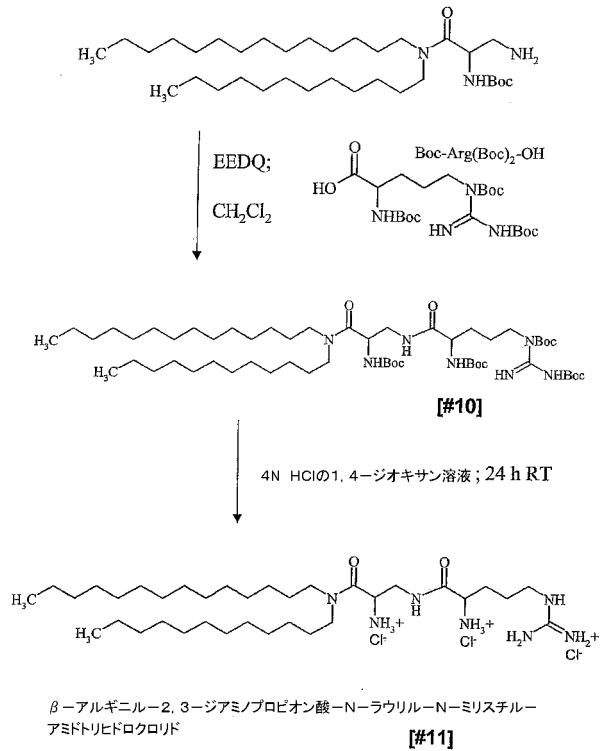
【図 5】



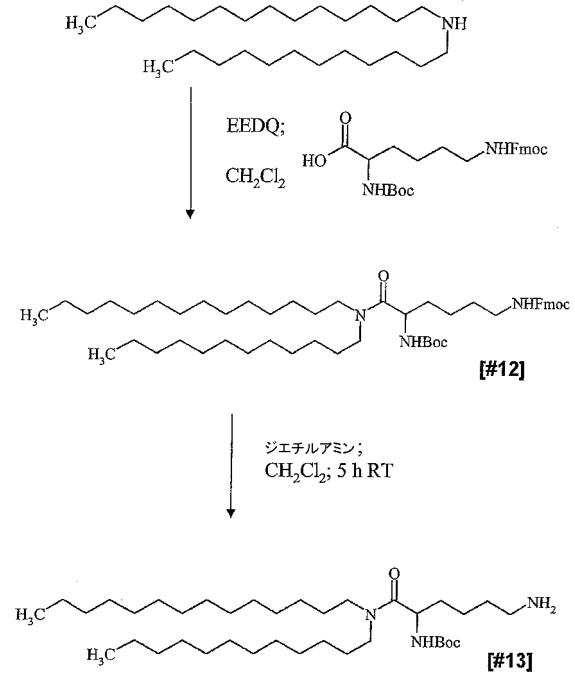
【図 6】



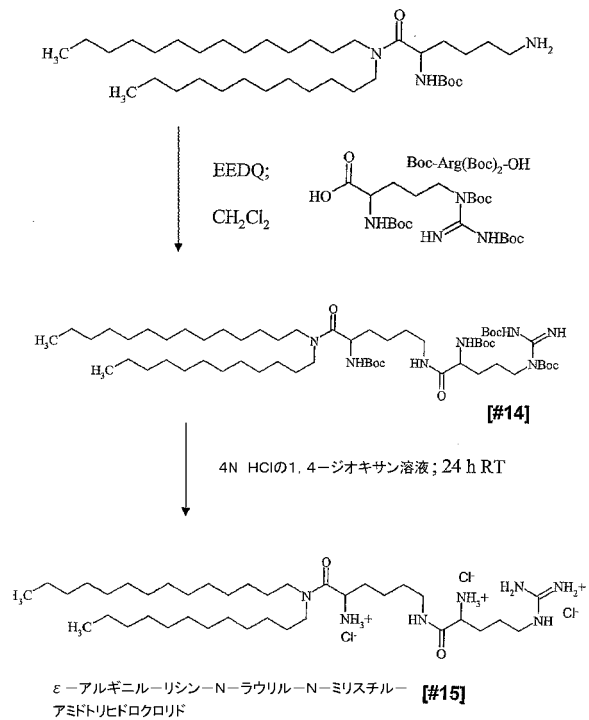
【図 7】



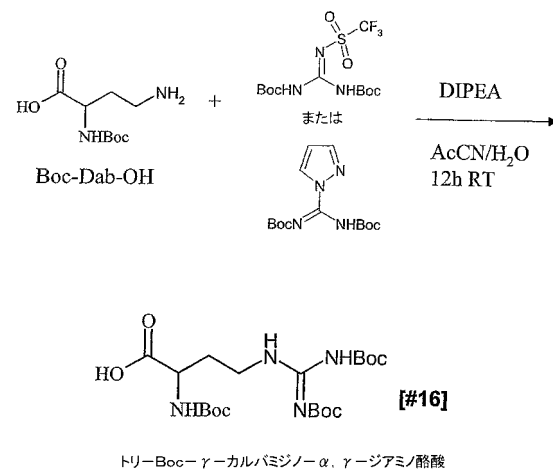
【図 8】



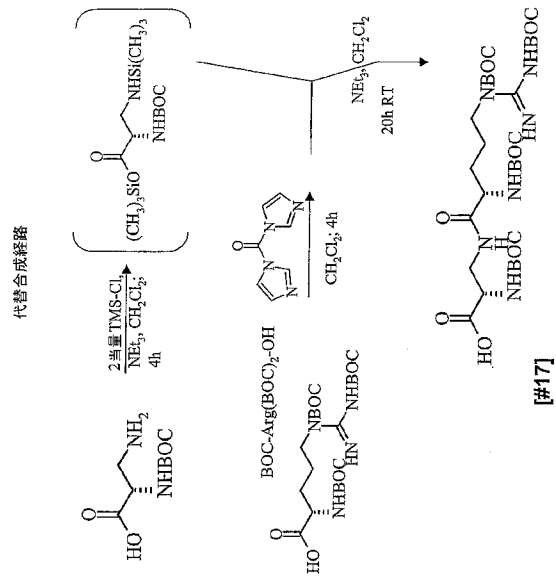
【図 9】



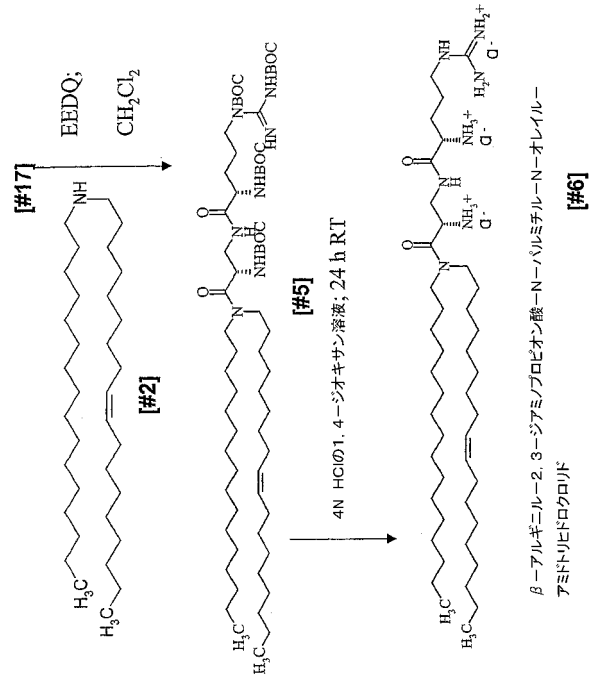
【図 10】



【図 1 1 - 1】

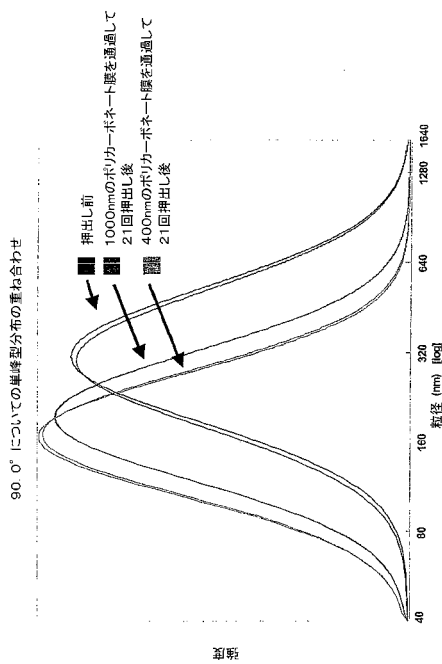


【図 1 1 - 2】



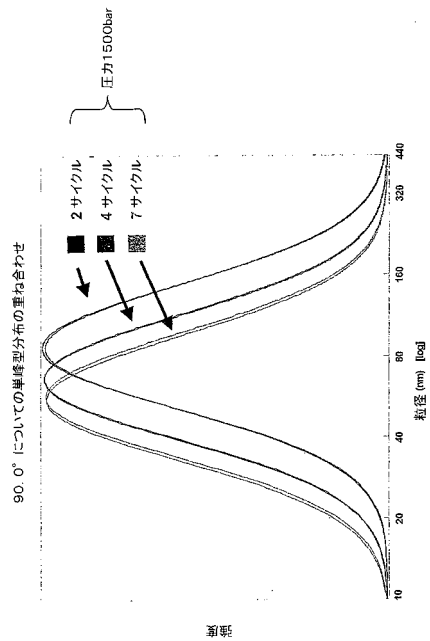
【図 1 2 A】

Beckman-Coulter NSサブミクロン粒子分析装置を用いた
光子相関分光法により決定された、
押出しによるatuFect-リポソームの粒径調節



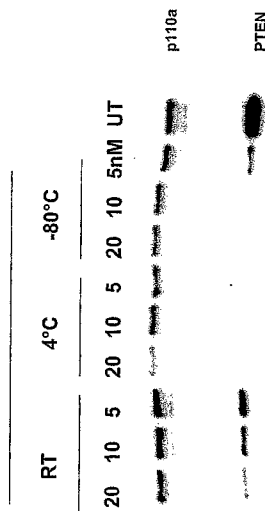
【図 1 2 B】

Beckman-Coulter NSサブミクロン粒子分析装置を用いた
光子相関分光法により決定された、
高圧均質化によるatuFect-リポソームの粒径調節

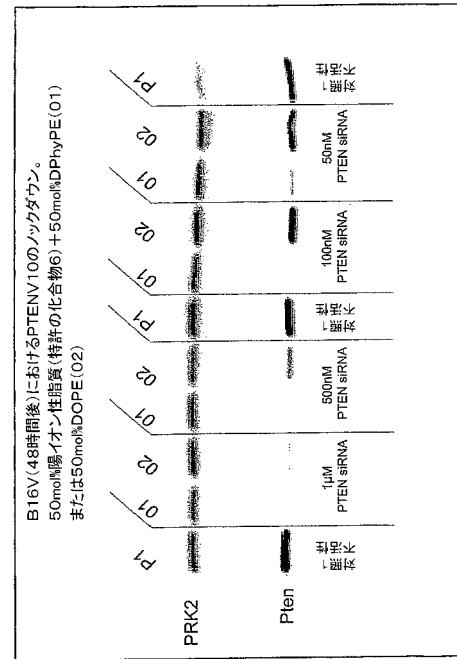


【図 13】

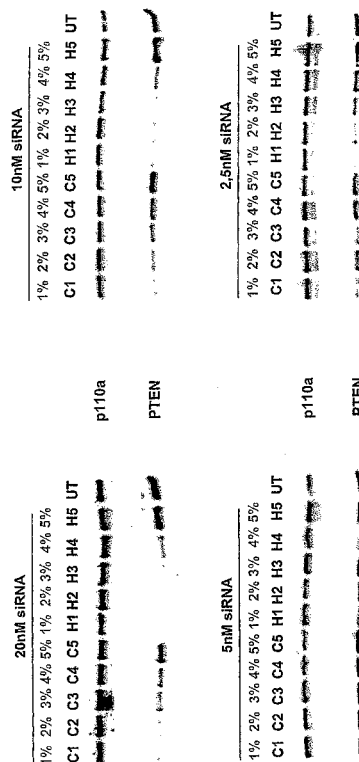
保存媒質300mMスクロース／7日間保存



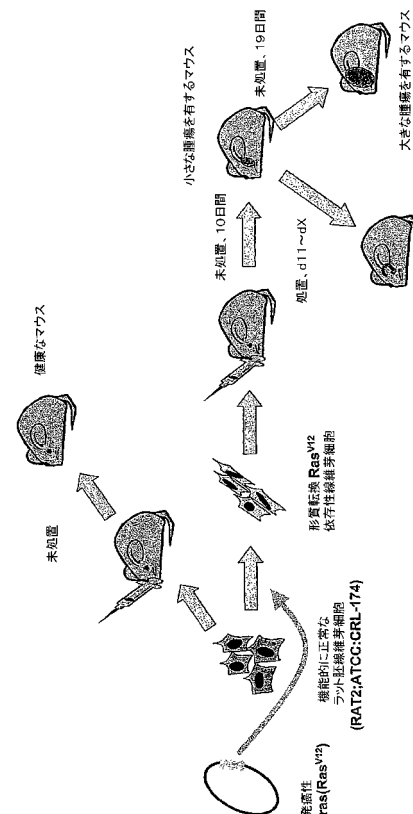
【図 14】



【図 15】

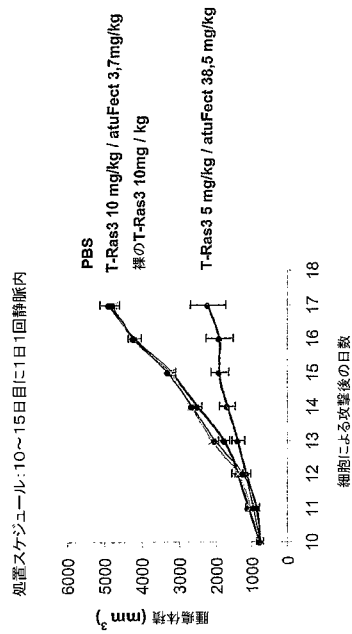


【図 16】

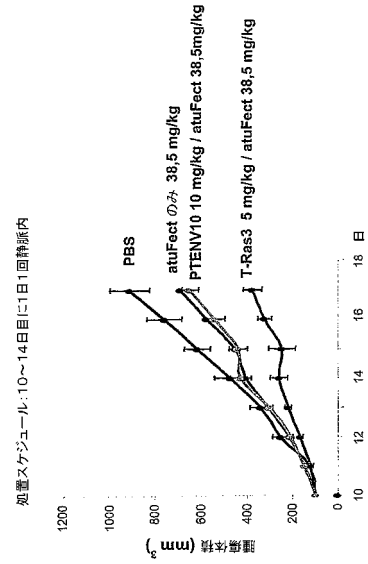


種々の阻害剤の有効性を試験するための、遺伝子操作されたRas依存性腫瘍モデル。
腫瘍の成長はRas^{V12}の発現に厳密に依存する。

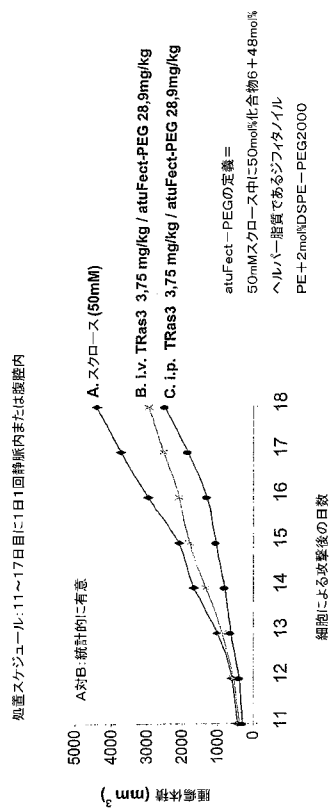
【図 17 A】



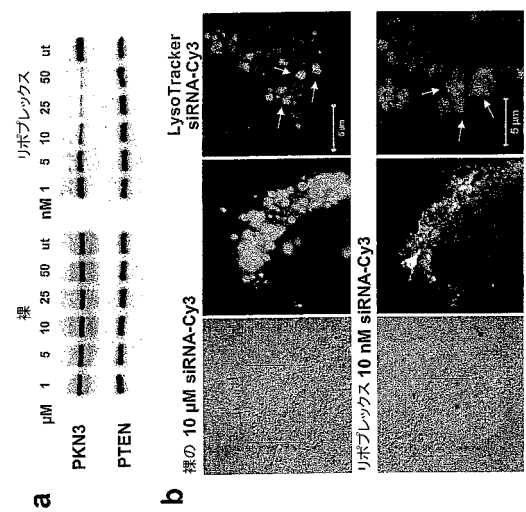
【図 17 B】



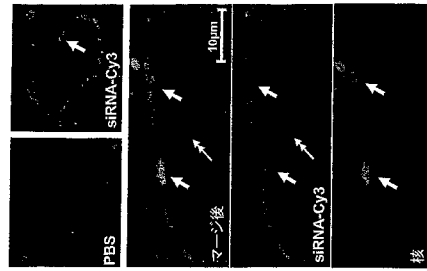
【図 17 C】



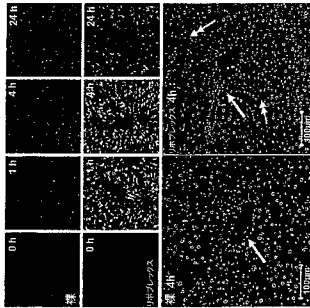
【図 18 - 1】



【図 18 - 2】

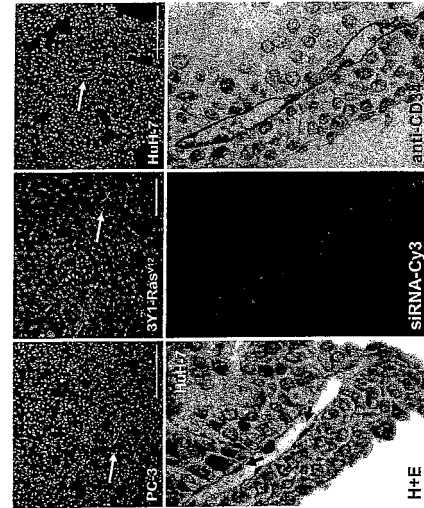


d



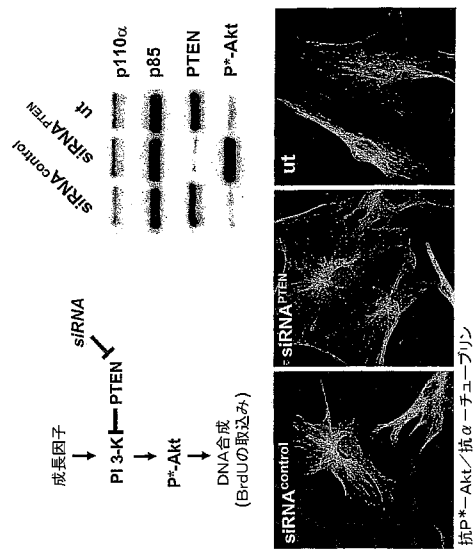
c

【図 18 - 3】



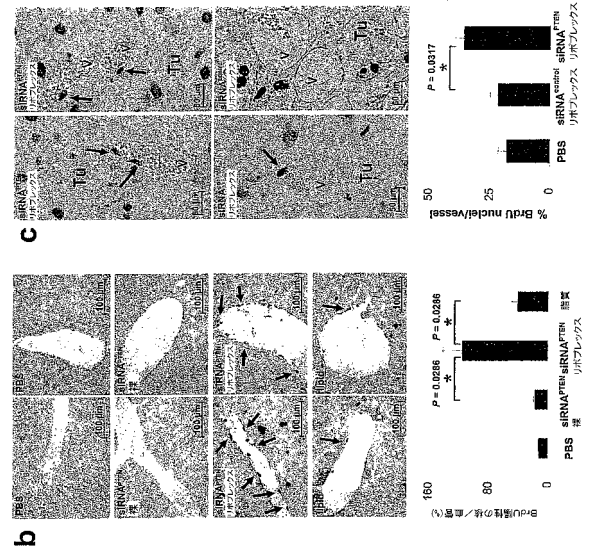
e

【図 19 - 1】

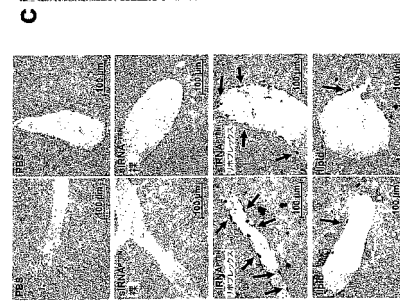


a

【図 19 - 2】

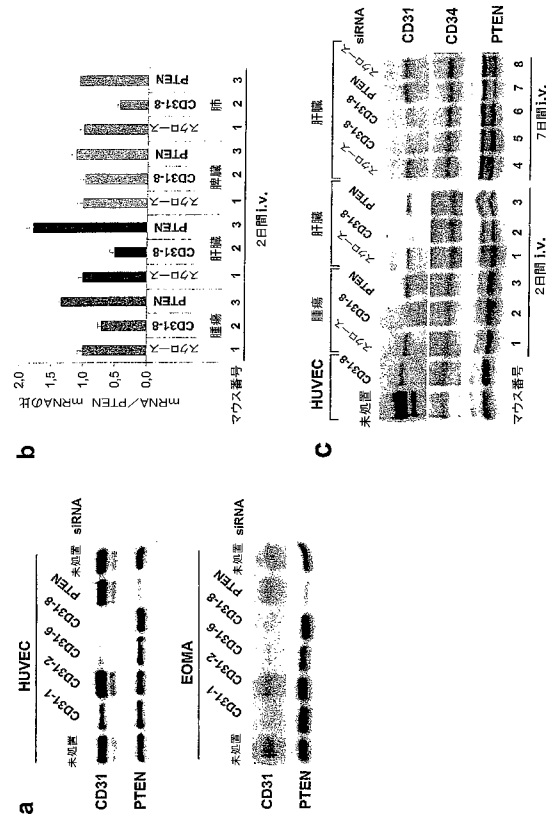


b

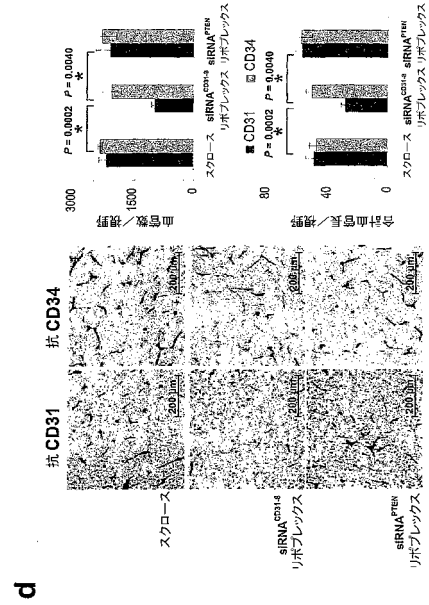


c

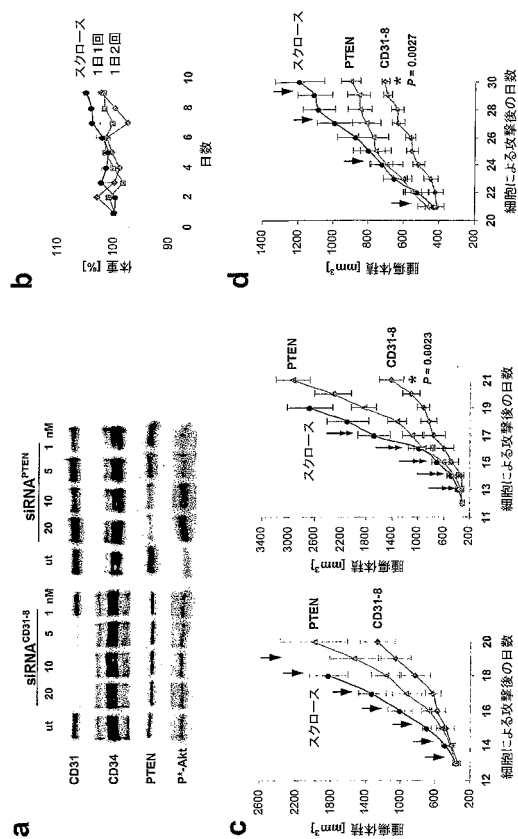
【図 20 - 1】



【図 20 - 2】



【図 21】



【配列表】

0005166022000001.app

フロントページの続き

| | | | |
|----------------|--------------|------------------|---------------|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| A 6 1 P | 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |
| A 6 1 P | 9/00 | (2006.01) | A 6 1 P 9/00 |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 |
| C 0 7 K | 5/068 | (2006.01) | C 0 7 K 5/068 |

A

(74)代理人 100135873
弁理士 小澤 圭子

(74)代理人 100116528
弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100122736
弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747
弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540
弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146031
弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100146422
弁理士 田中 聖

(72)発明者 カイル, オリヴァー
ドイツ国、1 6 5 4 8 グリーニッケ、ブッサルトヘク 2 ツェー

(72)発明者 カウフマン, ヨルグ
ドイツ国、1 3 4 3 7 ベルリン、シュピースヴェーク 6 6

(72)発明者 サンテル, アンスガー
ドイツ国、1 0 7 7 9 ベルリン、ベルヒテスガーデナー・シュトラッセ 8

審査官 松澤 優子

(56)参考文献 米国特許第 0 6 3 9 5 7 1 3 (U S , B 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61P 35/00
C07K 5/068
C12N 15/09
CA/REGISTRY(STN)