



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I589307 B

(45) 公告日：中華民國 106 (2017) 年 07 月 01 日

(21) 申請案號：104135644

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 29 日

(51) Int. Cl. : A61K9/127 (2006.01)

A61K47/44 (2006.01)

A61K31/7105 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2014/10/30 日本

2014-221062

(71) 申請人：德爾塔菲製藥股份有限公司 (日本) DELTA-FLY PHARMA, INC. (JP)
日本(72) 發明人：石田 竜弘 ISHIDA, TATSUHIRO (JP) ; 江島清 ESHIMA, KIYOSHI (JP) ; 福島正
和 FUKUSHIMA, MASAKAZU (JP)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

TW 201440813A

WO 2013177419A2

WO 2012/161196A1

Ma Ping et al.; "紫杉醇 (Paclitaxel) 奈米傳送系統: 全面性的評論"; J Nanomed
Nanotechol, 2013, vol. 4, no. 2.

審查人員：蔡明秀

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：6 共 48 頁

(54) 名稱

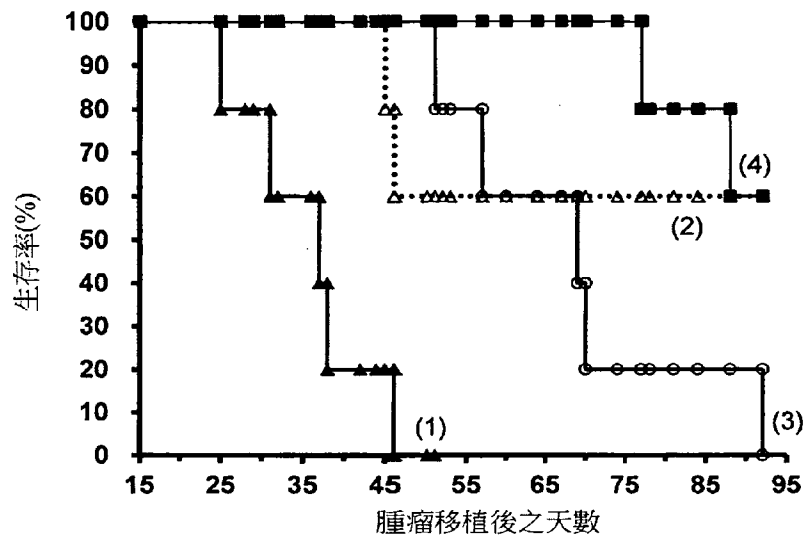
局部投與用脂質複合體之新穎製造方法及使用該脂質複合體之抗腫瘤劑

(57) 摘要

本發明之目的在於提供一種能夠將活性成分有效率地傳遞至標的細胞之新傳遞手段。

本發明係一種包含二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼、及陽離子性脂質以及 RNAi 分子
之脂質複合體以及其工業上之製造方法。

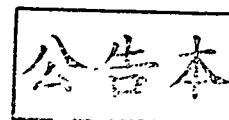
指定代表圖：



- (1) 對照群
- (2) 脂質複合體
- (3) 紫杉醇
- (4) 脂質複合體 + 紫杉醇

圖6-3

發明摘要



※ 申請案號：104135644

※ 申請日：104. 10. 29

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/44 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

局部投與用脂質複合體之新穎製造方法及使用該脂質複合體
之抗腫瘤劑

【中文】

● 本發明之目的在於提供一種能夠將活性成分有效率地傳遞至標
的細胞之新傳遞手段。

本發明係一種包含二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼、
及陽離子性脂質以及RNAi分子之脂質複合體以及其工業上之製造方
法。

【英文】

無

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(6-3)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

局部投與用脂質複合體之新穎製造方法及使用該脂質複合體之抗腫瘤劑

【技術領域】

本發明係關於一種局部投與用脂質複合體之新穎製造方法及使用該脂質複合體之抗腫瘤劑。

【先前技術】

脂質體包含構成活體之細胞膜之磷脂質而生物適應性較高，且能夠於活體內一面保護藥物或活性成分免於分解酶等破壞一面進行輸送，從而作為藥物遞送系統之有用工具受到關注。

另一方面，引起RNA干涉(以下，記載為「RNAi」)之RNAi分子作為用以治療腫瘤等之有用工具受到關注，業界正在開發能夠抑制腫瘤之增生之各種RNAi分子。又，正在開發使用包含RNAi分子及脂質混合物之複合體(脂質複合體)將作為活性成分之RNAi分子傳遞至腫瘤細胞之方法(非專利文獻1-3)。

本發明者等人此前開發出以參與腫瘤之增生之胸苷酸合成酶(以下，記載為「TS」)為標的之RNAi分子(專利文獻1)，且報告有如下情況：使用於包含特定之比率之陽離子性脂質混合物中搭載有該RNAi分子之複合體(脂質複合體)，例如利用靜脈內投與將其傳遞至腫瘤，藉此能夠抑制表現TS之腫瘤之增生，進而藉由將該脂質複合體與化學治療劑併用，能夠提高對腫瘤之瞄準效率，從而顯著地提昇藉由RNAi分子之抗腫瘤效果(專利文獻2)。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻1]WO2010/113844

[專利文獻2]WO2012/161196

[非專利文獻]

[非專利文獻1]Qixin Leng et al., Drug Future. 2009 September; 34(9): 721.

[非專利文獻2]Sherry Y. Wu et al., The AAPS Journal, Vol. 11, No.4, December 2009.

[非專利文獻3]B.Ozpolat et al., Journal of Internal Medicine 267; 44-53 2009.

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

於先前之脂質複合體之製造中，脂質混合物之製作方法包括將作為構成成分之磷脂質等預先溶解於氯仿或環己烷等有機溶劑中之步驟。然而，於利用氯仿或環己烷等有機溶劑之工業上之製作方法中，需要危險物處理設備或防爆裝置等大規模之設備。又，先前，於製備脂質複合體時，於醫院之藥劑部門中，需要於對癌患者用藥前製備RNAi分子之水溶液並另外製備脂質混合物之後將兩者混合之繁雜之步驟，需要大量勞動力。

因此，本發明之目的在於提供一種脂質複合體之工業上之製造方法，其無需於使用大量之氯仿或環己烷等有機溶劑並進而進行冷凍乾燥之後將所生成之脂質混合物分散於水等溶劑中並與RNAi分子之水溶液等進行混合之繁雜之脂質複合體製造步驟，僅藉由使其懸浮於水等溶劑中便容易地徑自製造生成脂質複合體之粉體。

又，本發明之目的在於取消醫院之藥劑部中之繁雜且需要大量勞動力之脂質複合體之調劑步驟。

[解決問題之技術手段]

本發明者等人為了解決上述課題而反覆進行了銳意研究，結果發現，藉由將二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質溶解於生物容許性較高且無爆炸性之醇中，一面攪拌該醇溶液一面滴加至RNAi分子之溶液中，其後將該溶液進行冷凍乾燥，將醇等溶劑去除，能夠製造脂質複合體之冷凍乾燥物。並且發現，藉由將利用該方法所獲得之脂質複合體之冷凍乾燥物混合於適當之緩衝液中並對罹患癌之標的器官實施局部投與，能夠有效地治療該癌患者。本發明係基於該等見解。

本發明如下。

[1]一種脂質複合體之製造方法，其係包含二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質以及RNAi分子之脂質複合體之製造方法，且包括如下步驟：

(a)將二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質溶解於醇中；

(b)於攪拌下將(a)中所獲得之醇溶液滴加至溶解有RNAi分子之溶液中；及

(c)將(b)中所獲得之溶液進行冷凍乾燥；且

該磷脂醯膽鹼具有選自以下之(i)-(iii)中之一個以上之特徵：

(i)至少含有一個包含碳-碳間之雙鍵之不飽和脂肪鏈；

(ii)至少含有一個包含順式型之碳-碳間之雙鍵之不飽和脂肪鏈；

(iii)相轉移溫度未達0℃。

[2]如[1]之方法，其中陽離子性脂質為O,O'-二(十四碳醯基)-N-(α -三甲基銨基乙醯基)二乙醇胺氯化物(DC-6-14)。

[3]如[1]或[2]之方法，其中磷脂醯膽鹼為1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、或1,2-二

(二十碳烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DEPC)。

[4]如[3]之方法，其中磷脂醯膽鹼為DOPC。

[5]如[1]之方法，其中於步驟(a)中包括將DOPE、DOPC及DC-6-14溶解於醇中並進行混合。

[6]如[1]至[5]中任一項之方法，其進而包括(d)將於(c)中所獲得之冷凍乾燥物混合於緩衝液中之步驟。

[7]一種用於治療胃癌、卵巢癌、及胰腺癌之腹膜播種轉移之局部投與用醫藥組合物，其包含：

脂質混合物，其包含二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質，且該磷脂醯膽鹼具有選自以下之(i)-(iii)中之一個以上之特徵：

(i)至少含有一個包含碳-碳間之雙鍵之不飽和脂肪鏈；

(ii)至少含有一個包含順式型之碳-碳間之雙鍵之不飽和脂肪鏈；

(iii)相轉移溫度未達0°C；及

短髮夾(short hairpin)RNA(TS-shRNA)，其能夠藉由RNAi作用抑制胸苷酸合成酶之表現。

[8]如[7]之醫藥組合物，其中陽離子性脂質為O,O'-二(十四碳醯基)-N-(α -三甲基銨基乙醯基)二乙醇胺氯化物(DC-6-14)。

[9]如[7]之醫藥組合物，其中磷脂醯膽鹼為DOPC。

[10]如[7]之醫藥組合物，其中脂質混合物包含DOPE、DOPC及DC-6-14。

[11]如[10]之醫藥組合物，其以3：2：5之莫耳比包含DOPE、DOPC及DC-6-14。

[12]如[7]至[11]中任一項之醫藥組合物，其中shRNA包含以序列編號8所表示之鹼基序列。

[13]如[7]至[12]中任一項之醫藥組合物，其與癌化學治療劑併

用。

[14]一種組合物，其包含如[7]至[13]中任一項之醫藥組合物及癌化學治療劑。

[15]如[14]之組合物，其中癌化學治療劑選自由具有微管之解聚合抑制作用之抗腫瘤劑、去氧胞苷衍生物、及具有TS抑制作用之抗腫瘤劑所組成之群。

本說明書包含成為本申請案之優先權之基礎之日本專利申請案編號2014-221062號之揭示內容。

● [發明之效果]

根據本發明，可提供一種脂質複合體之工業上之製造方法，其係於使用大量之氯仿或環己烷等有機溶劑並進而進行冷凍乾燥之後，無需如將所生成之脂質混合物分散於水等溶劑中並與RNAi分子之水溶液等進行混合之繁雜之脂質複合體製造步驟，僅藉由使其懸浮於水等溶劑中便容易地徑自製造生成脂質複合體之粉體。

又，根據本發明，能夠取消醫院之藥劑部中之需要繁雜且大量勞動力之脂質複合體之調劑步驟。

進而，根據藉由本發明所獲得之脂質複合體，可將能夠抑制腫瘤之增生之RNAi分子有效率地傳遞至腫瘤細胞。

【圖式簡單說明】

圖1係表示製劑(先前製劑)、製劑(新穎製劑(1))、及製劑(新穎製劑(2))之物性(粒徑、多分散度指數、及 ζ 電位)之比較結果之表，該製劑(先前製劑)係將利用先前公知之方法所獲得之包含DOPC、DOPE及DC-6-14之脂質混合物溶解於有機溶劑(環己烷/乙醇(95/5(V/V)))中，並將所獲得之溶液進行冷凍乾燥，使所獲得之乾燥物分散於水中而製作溶液，於該溶液中混合RNAi分子之水溶液而製作；該製劑(新穎製劑(1))係將利用本發明方法所獲得之包含DOPC、DOPE及DC-6-14之

脂質混合物溶解於有機溶劑(環己烷/乙醇(95/5(V/V)))中，並將所獲得之溶液進行冷凍乾燥，使所獲得之乾燥物均勻地溶解於乙醇中而製作溶液，將該溶液於攪拌下滴加至RNAi分子之均勻水溶液中，並將所獲得之溶液進行冷凍乾燥，使所獲得之乾燥物分散於水中而製作；該製劑(新穎製劑(2))係將使DOPC、DOPE及DC-6-14之各脂質均勻地溶解於乙醇中而成之均勻溶液於攪拌下滴加至RNAi分子之均勻水溶液中，將所得之水/乙醇溶液進行冷凍乾燥，並使所獲得之乾燥物分散於水中而製作。

圖2係表示利用先前公知之方法所獲得之先前製劑與利用本發明方法所獲得之新穎製劑(1)及新穎製劑(2)之TS-shRNA保持能之比較結果的照片圖。

圖3係表示藉由即時RT-PCR法對利用先前公知之方法所獲得之先前製劑與利用本發明方法所獲得之新穎製劑(1)及新穎製劑(2)之對胃癌之腹膜播種轉移模型小鼠進行腹腔內投與所帶來之腫瘤之標的基因(TS之mRNA)之抑制效果進行比較研究而得之結果的圖表圖。*：P < 0.05，**：P < 0.01。

圖4係將於胃癌之腹膜播種轉移模型小鼠之腹腔內分別投與有先前製劑、新穎製劑(1)及新穎製劑(2)之群與對照群中之螢光素酶活性(即，腫瘤之增生抑制效果)量化的圖表圖。***：P < 0.005。

圖5-1係表示擔載TS-shRNA之脂質複合體(新穎製劑(2))之單獨投與、紫杉醇之單獨投與、以及擔載TS-shRNA之脂質複合體(新穎製劑(2))與紫杉醇之併用投與所帶來的對卵巢癌之腹膜播種轉移模型小鼠之腫瘤之增生抑制效果之藉由IVIS而得之分析結果的照片圖。

圖5-2係表示基於圖5-1之成像資料將腹腔中之腫瘤之增生定量化之結果的圖表圖。

圖5-3係利用對數圖表表示圖5-2所示之結果。

圖 5-4 係表示於圖 5-1 所示之動物實驗中，於對照群、擔載 TS-shRNA 之脂質複合體(新穎製劑(2))單獨投與群、紫杉醇單獨投與群、及與擔載 TS-shRNA 之脂質複合體(新穎製劑(2))之併用投與群之間之延命效果的圖表圖。

圖 5-5 係表示將擔載 TS-shRNA 之脂質複合體(新穎製劑(2))對卵巢癌之腹膜播種轉移模型小鼠進行腹腔內投與之後，利用 RT-PCR 法對 TS-shRNA 之腹水及血中之濃度推移進行測定而得之結果的圖表圖。

圖 6-1 係表示基於藉由 IVIS 而得之成像資料將進行過擔載 TS-shRNA 之脂質複合體(新穎製劑(2))之單獨投與、紫杉醇之單獨投與、以及擔載 TS-shRNA 之脂質複合體(新穎製劑(2))與紫杉醇之併用投與的胰腺癌之腹膜播種轉移模型小鼠之腫瘤之增生定量化之結果的圖表圖。

圖 6-2 係利用對數圖表表示圖 6-1 所示之結果。

圖 6-3 係表示擔載 TS-shRNA 之脂質複合體(新穎製劑(2))之單獨投與、紫杉醇之單獨投與、以及擔載 TS-shRNA 之脂質複合體(新穎製劑(2))與紫杉醇之併用投與所帶來的胰腺癌之腹膜播種轉移模型小鼠之間之延命效果的圖表圖。

【實施方式】

本發明之脂質複合體包含含有二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質之脂質混合物及 RNAi 分子，或為包含該等之複合體。

作為能夠於本發明中利用之「磷脂醯膽鹼」，具有選自以下之(i)-(iii)中之一個以上之特徵：

- (i)至少含有一個包含碳-碳間之雙鍵之不飽和脂肪鏈；
- (ii)至少含有一個包含順式型之碳-碳間之雙鍵之不飽和脂肪鏈；
- (iii)相轉移溫度較低(例如未達 0°C 、未達 -10°C 、未達 -20°C)。

作為此種「磷脂醯膽鹼」，可列舉1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、1,2-二(二十碳烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DEPC)。較佳為DOPC。

作為能夠於本發明中利用之「陽離子性脂質」，可利用選自O,O'-二(十四碳醯基)-N-(α -三甲基銨基乙醯基)二乙醇胺氯化物(DC-6-14)、N,N-二油醯基-N,N-二甲基銨氯化物(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基銨溴化物(DDAB)、N-(1-(2,3-二油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨氯化物(DOTAP)、N-(1-(2,3-二油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨氯化物(DOTMA)、N,N-二甲基-(2,3-二油醯氧基)丙基胺(DODMA)、及該等之衍生物中之任一者。較佳為陽離子性脂質為DC-6-14。

較佳為本發明中之脂質複合體含有包含DOPE、DOPC及DC-6-14之脂質混合物。

脂質複合體中之DOPE、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質之含有比(莫耳比)可自DOPE：磷脂醯膽鹼：陽離子性脂質=2~4：1~3：4~6之範圍進行選擇。較佳為DOPE：DOPC：DC-6-14=3：2：5。

本發明之脂質複合體之粒徑為200 nm~2000 nm，較佳為約400 nm~700 nm。又，本發明之脂質複合體之 ζ 電位為30~60 mV，較佳為約30~40 mV。

本發明之脂質複合體可藉由包括以下步驟之方法而製作。

即，將磷脂醯乙醇胺、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質之混合物之冷凍乾燥物、或各成分溶解於醇中。

作為醇，可利用乙醇、甲醇，尤佳為生物容許性較高之乙醇。磷脂醯乙醇胺、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質可利用任意之形態者，例如可分別利用粉末之形態者。

磷脂醯乙醇胺、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質可於分別預先個別地溶解於醇中之後，以成為上述特定量之方式分取各者進行混合，或

者亦可將包含成為上述特定量之磷脂醯乙醇胺、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質之脂質混合物之冷凍乾燥物溶解於醇中。

於包含磷脂醯乙醇胺、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質醇之醇混合液中，可分別獨立地以1~100 mM、較佳為10~80 mM包含磷脂醯乙醇胺、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質。

磷脂醯乙醇胺、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質於醇中之溶解可加熱而進行。例如可加熱至35°C~60°C、較佳為40°C~50°C而進行。

繼而，可藉由將所獲得之醇溶液於攪拌下滴加至溶解有RNAi分子之溶液(例如，利用水進行溶解而成之水溶液)中，並將所獲得之溶液進行冷凍乾燥，而獲得脂質複合體之冷凍乾燥物。醇溶液與溶解有RNAi分子之溶液較佳為以1~3:7~9之比率進行混合。

所獲得之冷凍乾燥物可藉由進一步加入緩衝液等水溶液進行混合而獲得脂質複合體之懸浮液，從而可將該懸浮液投與至活體。作為緩衝液，只要為能夠投與至活體之水溶液即可，例如可利用生理鹽水或糖類輸液等。混合較佳為利用旋渦混合器等攪拌1~15分鐘、較佳為5分鐘左右。藉由施加該攪拌，可將脂質複合體之粒徑製備為上述所需尺寸。

本發明中之脂質複合體之製造方法由於無需使用毒性高且爆炸性高之氯仿或環己烷，故而無需將防爆用之重裝設備安放於該製劑之製造工廠內，又，即便有極少量之殘留溶劑，亦僅為生物容許性較高之乙醇，於對患者之投與方面問題較少。

又，根據本發明，能夠於醫院之調劑部門等醫療現場簡便地製造脂質複合體。即，藉由將填充有上述脂質複合體之冷凍乾燥物之注射劑用小玻璃瓶等提供至醫療現場，僅於對患者用藥前由醫院之調劑部門向其中加入緩衝液，便能夠在用時製備包含脂質複合體之投與液(水分散溶液)。

本發明之脂質複合體可用於對患者進行局部投與。於本發明中，所謂「局部投與」，並非意指靜脈注射等全身投與。局部投與例如可列舉腹腔內、胸腔內、肌肉內、皮下、皮內、眼內、腦內、腦脊髓腔內、陰道內、直腸內、器官內、對表皮之塗佈等，但並不限定於該等。較佳為「局部投與」為腔內投與，進而較佳為胸腔內投與或腹腔內投與。

本發明之脂質複合體包含能夠藉由RNAi作用抑制對在腫瘤細胞中表現且參與腫瘤細胞之增生之因子進行編碼之基因之表現的RNAi分子(siRNA或shRNA等)作為活性成分。作為「對在腫瘤細胞中表現且參與腫瘤細胞之增生之因子進行編碼之基因」，例如可列舉對胸苷酸合成酶、VEGF(vascular endothelial growth factor，血管內皮生長因子)、EGFR(epidermal growth factor receptor，表皮生長因子受體)、PDGF(platelet derived growth factor，血小板衍生生長因子)、HGF(hepatocyte growth factor，肝細胞生長因子)、Wint、Bcl-2、凋亡抑制基因等增生調節因子群、核糖核苷酸還原酶、DNA聚合酶等核酸合成相關酶群等進行編碼之基因，但並不限定於該等。該等基因之基因資訊揭示於GenBank等公知之資料庫，可基於該等基因資訊而設計、合成siRNA或shRNA。關於能夠藉由RNAi作用而抑制胸苷酸合成酶之表現之shRNA，可使用以下所詳細敘述者。又，作為活性成分，亦可使用癌化學治療劑。

於本發明之脂質複合體中，RNAi分子可包含於被脂質混合物之脂質雙層膜包圍之中空部，或者亦可結合於脂質雙層膜之外膜表面，較佳為結合於脂質雙層膜之外膜表面。RNAi分子於脂質雙層膜之外膜表面之結合可藉由上述製造方法而達成。

本發明之脂質複合體可用作抗腫瘤劑。

於一態樣中，本發明之脂質複合體包含可藉由RNAi作用而抑制

胸苷酸合成酶(以下，記載為「TS」)之表現之shRNA。

本發明中之可抑制TS之表現之shRNA可藉由將TS之mRNA作為標的而對TS特異地發揮RNAi作用，從而顯著抑制TS之表現。此處，所謂「將mRNA作為標的」，係指下述所詳細敘述之shRNA之反義股與標的mRNA於嚴格之條件下可進行雜交。

所謂嚴格之條件下，可依據常規方法並基於形成雜種之核酸之融解溫度(T_m)而取得。例如作為可維持雜交狀態之洗淨條件，通常可列舉「1×SSC，0.1%SDS，37℃」左右之條件，更嚴格為「0.5×SSC，0.1%SDS，42℃」左右之條件，進而嚴格為「0.1×SSC，0.1%SDS，65℃」左右之條件。

本發明中之shRNA包含對TS進行編碼之具有ORF(open reading frame，開放閱讀框)之鹼基序列或其一部分相同之鹼基序列之義股、及與該義股於嚴格之條件下進行雜交之反義股。此處，所謂「ORF之鹼基序列或其一部分相同之鹼基序列」，意指將ORF之鹼基序列中之胸腺嘧啶置換為尿嘧啶而表示之鹼基序列或其一部分相同之鹼基序列。

該義股包含15～25個鹼基、較佳為19個鹼基。義股之鹼基序列較理想為與對TS進行編碼之ORF之鹼基序列相同，亦可為實質上相同、即同等之序列。即，義股之鹼基序列亦可於ORF之鹼基序列中具有1個或複數個、即1～3個鹼基、較佳為1～2個鹼基、更佳為1個鹼基之置換、缺失、插入及/或加成。

該反義股具有能夠與義股於嚴格之條件下進行雜交之鹼基序列。反義股只要能夠於嚴格之條件下進行雜交，則亦可為具有包含1～3個鹼基、較佳為1～2個鹼基、更佳為1個鹼基之置換、缺失、插入及/或加成之失配者。較佳為反義股包含與義股完全互補之鹼基序列。

義股及反義之鹼基序列可基於對TS進行編碼之公知之鹼基序列 (GenBank : CR601528.1)進行選擇。作為選擇該等鹼基序列之方法，已知有各種方法，例如能夠使用 siRNA Design Support System(TAKARA BIO股份有限公司)等。

於本發明中，作為義股，可列舉包含以下鹼基序列者，但並不限定於該等：5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3'(序列編號1)；5'-GAAUACAGAGAUUAUGGAAU-3'(序列編號3)；5'-CGAUCAUGAUGUAGAGUGU-3'(序列編號5)。

較佳為本發明中之 shRNA 包含義股 5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3'(序列編號1)及反義股 5'-UCAUGAUCGAUGGUGUUAC-3'(序列編號2)；義股 5'-GAAUACAGAGAUUAUGGAAU-3'(序列編號3)及反義股 5'-AUUCCAUAUCUCUGUAUUC-3'(序列編號4)；或義股 5'-CGAUCAUGAUGUAGAGUGU-3'(序列編號5)及反義股 5'-ACACUCUACAUCAUGAUCG-3'(序列編號6)。

進而較佳為本發明中之 shRNA 含有包含序列編號1所表示之鹼基序列之義股及包含序列編號2所表示之鹼基序列之反義股。

義股與反義股經由連結子部分進行連結，並藉由該連結子部分形成環而摺疊，從而使該反義股與該義股雜交而形成雙鏈部分。shRNA分子所包含之連結子部分只要可將義股與反義股連結而形成莖環結構，則可為多核苷酸連結子，亦可為非多核苷酸連結子，並無特別限定，較佳為對業者而言公知之2~22鹼基之多核苷酸連結子。具體而言，可例示 UAGUGCUCUGGUUG(序列編號7)、UUCAAGAGA、CCACC、CUCGAG、CCACACC、UUCAAGAGA、AUG、CCC及UUCG，較佳為UAGUGCUCUGGUUG(序列編號7)。

本發明中之 shRNA 於 3' 末端具有至少包含 2 個鹼基之懸突

(overhang)。

於本發明中，所謂懸突，係指加成於反義股之3'末端且於義股之對應之位置不存在可互補地結合之鹼基的鹼基。於在反義股之3'末端不具有懸突之情形時，與具有懸突之情形相比，藉由shRNA而得之TS之表現抑制之程度降低約40~60%。該懸突之鹼基之種類、數量並無限定，例如可列舉包含1~5、較佳為1~3、進而較佳為1或2個鹼基之序列，例如可列舉TTT、UU或TT。較佳為UU。

於本發明中，作為較佳之shRNA，為包含序列編號8所表示之鹼基序列之單鏈RNA。

又，義股或反義股可視需要將5'末端磷酸化，亦可於5'末端結合三磷酸(ppp)。

本發明中之具備shRNA之脂質複合體除包含能夠抑制TS之表現之shRNA以外，還可包含能夠藉由RNAi作用而抑制「對在腫瘤細胞中表現且參與腫瘤細胞之增生之因子進行編碼之基因」之表現之siRNA或shRNA。作為此種siRNA或shRNA，可使用以上所定義者。能夠抑制TS之表現之shRNA及其他siRNA或shRNA可存在於同一脂質複合體上，或亦可分別存在於個別之脂質複合體上。

如於下述實施例所詳細敘述般，具備上述shRNA之脂質複合體藉由局部投與能夠抑制腫瘤細胞之增生，而可用於治療癌。

作為使用本發明之抗腫瘤劑能夠治療之癌，可列舉高表現TS之癌，並無特別限制，例如可列舉：結腸-直腸癌、肝癌、腎癌、頭頸部癌、食道癌、胃癌、膽道癌、膽囊-膽管癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、子宮體癌、膀胱癌、前列腺癌、惡性胸膜間皮瘤、睪丸瘤、卵巢癌、骨-軟組織肉瘤、皮膚癌、腦腫瘤等。又，癌性胸膜炎或癌性腹膜炎亦能夠利用本抗腫瘤劑進行治療。作為治療候補，較佳為胃癌、肺癌、膽道癌、肝癌、惡性胸膜間皮瘤、卵巢

癌、癌性胸膜炎或腹膜炎，尤佳為胃癌、卵巢癌或胰腺癌之腹膜播種轉移、胸膜惡性間皮瘤、胸腔內有主病灶之肺癌及癌性肺炎。

又，本發明之抗腫瘤劑亦可與脂質複合體一起包含醫藥之製造中通常所使用之賦形劑、結合劑、崩解劑、潤滑劑、稀釋劑、溶解輔助劑、懸浮劑、等張劑、pH值調整劑、緩衝劑、穩定劑、著色劑、矯味劑、除臭劑、組胺酸等。

作為賦形劑，例如可列舉：乳糖、蔗糖、氯化鈉、葡萄糖、麥芽糖、甘露醇、赤藻糖醇、木糖醇、麥芽糖醇、肌醇、葡聚糖、山梨糖醇、白蛋白、脲、澱粉、碳酸鈣、高嶺土、結晶纖維素、矽酸、甲基纖維素、甘油、海藻酸鈉、阿拉伯膠及該等之混合物等。作為潤滑劑，例如可列舉：精製滑石、硬酯酸鹽、硼砂、聚乙二醇及該等之混合物等。作為結合劑，例如可列舉：單糖漿、葡萄糖液、澱粉液、明膠溶液、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯基吡咯啉酮、羧甲基纖維素、蟲膠、甲基纖維素、乙基纖維素、水、乙醇、磷酸鉀及該等之混合物等。作為崩解劑，例如可列舉：乾燥澱粉、海藻酸鈉、瓊脂末、昆布糖末、碳酸氫鈉、碳酸鈣、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯類、月桂基硫酸鈉、硬脂酸單甘油酯、澱粉、乳糖及該等之混合物等。作為稀釋劑，例如可列舉：水、乙基醇、聚乙二醇、丙二醇、乙氧化異硬脂醇、聚氧化異硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯類及該等之混合物等。作為穩定劑，例如可列舉：焦亞硫酸鈉、乙二胺四乙酸、硫代乙醇酸、硫代乳酸及該等之混合物等。作為等張劑，例如可列舉：氯化鈉、硼酸、葡萄糖、甘油及該等之混合物等。作為pH值調整劑及緩衝劑，例如可列舉：檸檬酸鈉、檸檬酸、乙酸钠、磷酸鈉及該等之混合物等。

本發明之抗腫瘤劑可藉由局部投與進行投與。局部投與可列舉以上所定義者。又，本發明之組合物可製成適合於局部投與之劑型，

且可製備成注射劑、懸浮劑、乳化劑、噴霧劑等各種製劑形態。又，本發明之抗腫瘤劑可以經冷凍乾燥之形態提供，且於使用時可加入適當之緩衝液(例如，生理鹽水)而使用。

本發明之抗腫瘤劑之效果可對源自上述癌之細胞或組織、及罹患上述癌之個體投與該抗腫瘤劑，並將腫瘤之大小與未投與該抗腫瘤劑之(或投與前之)細胞或組織、及個體之腫瘤之大小進行比較，以腫瘤縮小或消失為指標進行評價。又，本發明之抗腫瘤劑之效果可對源自上述癌之細胞或組織、及罹患上述癌之個體投與該抗腫瘤劑，並與未投與該抗腫瘤劑之個體進行比較，以生存率之提昇(延命效果)、胸水或腹水減少或消失為指標進行評價。

本發明之抗腫瘤劑可與既有之癌症化學療法或癌症化學治療劑一起使用。作為可與本發明之抗腫瘤劑併用之癌症化學療法或癌症化學治療劑，只要可改變腫瘤環境以使本發明之脂質複合體容易侵入至腫瘤組織者即可，例如，作為既有之癌症化學治療劑，可列舉：被認為對胃癌或卵巢癌之腹膜播種轉移患者有效之 Taxol(註冊商標)(Bristol-Myers Squibb)或 Taxotere(註冊商標)(Sanofi-Aventis)等具有微管之解聚合抑制作用之抗腫瘤劑、對胰腺癌及該腹膜播種轉移之治療有用之 Gemcitabine(註冊商標)(Eli Lilly)等包含去氧胞苷衍生物之抗腫瘤劑。

進而，本發明之抗腫瘤劑可除上述癌症化學治療劑以外或代替上述癌症化學治療劑與其他既有之癌症化學治療劑一起使用。作為此種癌症化學治療劑，可列舉環磷醯胺、氮芥N-氧化物、異環磷醯胺、美法侖、白消安、二溴甘露醇、卡波醌、噻替派、雷莫司汀、尼莫司汀、替莫唑胺、卡莫司汀、培美曲塞二鈉、甲胺蝶呤、6-巰基嘌呤核苷、巰基嘌呤、去氧氟尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、阿糖胞苷十八烷基磷酸鹽、依諾他濱、氟達拉濱、愛甯達、順鉑、卡鉑、奧賽力鉑、歐

洲紫杉醇、鹽酸伊立替康、卡培他濱等，可使用選自該等中之一種或複數種癌症化學治療劑。該等癌症化學治療劑與上述癌症化學治療劑相同，亦可藉由與本發明之抗腫瘤劑併用而將shRNA有效率地傳遞至腫瘤細胞，又，與將該癌症化學治療劑或本發明之抗腫瘤劑單獨使用之情形相比，可顯著地獲得較高之抗腫瘤效果。

本發明之抗腫瘤劑與上述既有之癌症化學治療劑只要為併用投與，則可以組合物之形式提供。

本發明之抗腫瘤劑可與上述既有之癌症化學治療劑一起製成「組合物」之形態。「組合物」可為包含本發明之抗腫瘤劑及上述既有之癌症化學治療劑作為有效成分之調配劑，亦可將本發明之抗腫瘤劑及上述既有之癌症化學治療劑以適合併用投與之單一之包裝(package)(套組製劑)之形式進行製造、包裝、流通者。

「併用投與」並不僅為將本發明之抗腫瘤劑與上述既有之癌症化學治療劑同時投與之情況，亦包含將本發明之抗腫瘤劑及上述既有之癌症化學治療劑隔以間隔進行投與之情況。本發明之抗腫瘤劑與上述既有之癌症化學治療劑之投與路徑及投與手段可相同，亦可不同。

本發明之抗腫瘤劑之投與量及投與次數可根據患者之年齡、體重、疾病之嚴重度等因素而變化，可將每1次相對每1 kg體重自0.0001 mg~100 mg之範圍適當選擇之量設為shRNA之量，以1天1~3次，每天或每1~21天地進行投與。

上述既有之癌症化學治療劑之投與量可根據作為有效成分之化學物質之種類、患者之年齡、體重、疾病之嚴重度等因素而變化，可將每1次相對每1 kg體重自0.0001 mg~1000 mg之範圍適當選擇之量以1天1~3次，每天或每1~14天地進行投與。例如，於既有之癌症化學治療劑為紫杉醇之情形時，可1天500~1000 mg，每1~21天地投與至腹腔內或靜脈內。於既有之化學治療劑為培美曲塞鈉水合物之情形

時，可1天500~1000 mg，每1~21天地進行靜脈內投與。於既有之化學治療劑為5-FU系經口抗癌劑之替吉奧之情形時，可1天1~3次，每天或隔2~3天地進行投與。上述既有之癌症化學治療劑與單獨使用之情形相比，可低用量且多次地進行投與。藉此，可抑制或延遲因上述既有之癌症化學治療劑之投與而可能引起之副作用(例如骨髓抑制、溶血性貧血、彌漫性血管內凝血綜合症、猛爆性肝炎、脫水症狀、腸炎、間質性肺炎、口炎、消化道潰瘍、消化道出血、消化道穿孔、急性腎功能衰竭、皮膚黏膜眼綜合症、中毒性表皮壞死症、精神神經障礙、急性胰臟炎、橫紋肌溶解症、嗅覺喪失等，但並不限定於該等)之發病。

又，本發明係關於一種使用上述本發明之抗腫瘤劑之癌之治療方法。作為可藉由該方法進行治療之癌，包含如以上所定義之癌。又，於該方法中，上述本發明之抗腫瘤劑及既有之癌症化學治療劑之用法及用量如上所述。

[實施例]

以下例示實施例對本發明進一步進行詳細說明。但是，本發明並不受該等實施例所限制。

實施例1：脂質複合體之製備

於本實施例中，試劑係使用以下所記載者。

二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)：日本精化

1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)：日本精化

O,O'-二(十四碳醯基)-N-(α -三甲基銨基乙醯基)二乙醇胺氯化物
(DC-6-14)：Pharmaron

乙醇：和光純藥工業

氯化鈉：和光純藥工業

(以TS為標的之shRNA)

以TS為標的之shRNA(以下，記載為「TS-shRNA」)係基於可抑制TS之表現且抗腫瘤效果已得到確認之公知之shRNA(參照WO2012/161196)，而合成具有以下序列者。

TS-shRNA：

5'-

GUAAACACCAUCGAUCAUGAUAGUGCUCUCCUGGUUGUCAUGAUCGA
UGGUGUUACUU-3'(序列編號8)

(1)藉由本發明方法之脂質複合體(新穎製劑)之製備

(1-1)利用脂質混合物之冷凍乾燥物之脂質複合體(新穎製劑(1))之製備

稱量日本精化製造之 Presome DF1(以 3/2/5 之莫耳比包含 DOPE/DOPC/DC-6-14之脂質混合物)(100 mg)，於室溫下溶解於乙醇 1.842 mL中，藉此獲得脂質混合物之乙醇溶液。

於RNase free water(66.2 μ L)中加入3.8 μ L之300 μ M TS-shRNA，獲得TS-shRNA水溶液。

繼而，一面緩慢攪拌一面將上述脂質混合物之乙醇溶液(30 μ L)慢慢地滴加至上述TS-shRNA水溶液(70 μ L)中，藉此獲得脂質複合體之乙醇/水溶液。

使所獲得之脂質複合體之乙醇/水溶液於-40 $^{\circ}$ C以下冷凍，其後，使用真空冷凍乾燥機(LABCONCO FZ-4.5，Asahi Life Science)進行冷凍乾燥。

於所獲得之冷凍乾燥品中加入利用RNase free water製備之生理鹽水(0.9 v/w%氯化鈉水溶液)100 μ L，並利用PresentMixer2013攪拌10秒鐘，藉此獲得脂質複合體(以TS-shRNA量計為20 μ g/100 μ L)。

以下，將以此方式所獲得之脂質複合體記載為「新穎製劑(1)」。

(1-2)利用DOPE、DOPC及DC-6-14之各者之脂質粉末之脂質複合

體(新穎製劑(2))之製備

分別稱量DOPE(55.8 mg)、DOPC(78.6 mg)、及DC-6-14(66.0 mg)之粉末，並分別添加乙醇1 mL，其後加溫至40°C，藉此獲得75 mM DOPE、100 mM DOPC、100 mM DC-6-14之溶液。

對乙醇(4.777 μ L)加入上述75 mM DOPE溶液(9.172 μ L)、100 mM DOPC溶液(4.586 μ L)、及100 mM DC-6-14溶液(11.465 μ L)，獲得以3/2/5之莫耳比包含DOPE/DOPC/DC-6-14之脂質混合物之乙醇溶液。

繼而，一面緩慢攪拌一面將上述脂質混合物之乙醇溶液(30 μ L)慢慢地滴加至上述TS-shRNA水溶液(70 μ L)中，藉此獲得脂質複合體之乙醇/水溶液。

將所獲得之脂質複合體之乙醇/水溶液與上述(1-1)同樣地進行冷凍乾燥，並加入利用RNase free water製備之生理鹽水進行攪拌，藉此獲得脂質複合體(以TS-shRNA量計為20 μ g/100 μ L)。

以下，將以此方式所獲得之脂質複合體記載為「新穎製劑(2)」。

(2)藉由先前公知之方法之脂質複合體之製備

分別稱量DOPE(0.51 mg)、DOPC(0.36 mg)、及DC-6-14(0.76 mg)之粉末，並於環己烷/乙醇混液(95%/5%(V/V))1.0 mL中進行混合、溶解。繼而，將所獲得之溶液進行冷凍乾燥處理去除環己烷、乙醇，其後，加入生理鹽水(50 μ L)，並使用旋渦混合器劇烈攪拌10分鐘使其懸浮，其後，加入包含TS-shRNA之(0.4 μ g/ μ L)水溶液(50 μ L)進行混合，藉此獲得脂質複合體(以TS-shRNA量計為20 μ g/100 μ L)。

以下，將以此方式所獲得之脂質複合體記載為「先前製劑」。

實施例2：關於各脂質複合體之物性之同等性比較

使用Zetasizer Nano ZS(Malvern)，對實施例1所獲得之新穎製劑(1)、新穎製劑(2)及先前製劑之粒徑(d.nm)、多分散度指數(polydispersity index：PDI)、及 ζ 電位(mV)進行測定。

將結果示於圖1。

根據該結果，可確認：利用先前公知之方法所獲得之先前製劑與利用本發明方法所獲得之新穎製劑(1)及新穎製劑(2)於其物性方面無有意義差，且利用先前公知之方法所獲得之脂質複合體與利用本發明方法所獲得之脂質複合體於物性方面並無不同。

實施例3：脂質複合體之TS-shRNA保持能之評價

於本實施例中，試劑係使用以下所記載者。

Tris：和光純藥工業

硼酸：和光純藥工業

EDTA·2Na：Sigma-Aldrich

瓊脂糖：Sigma-Aldrich

溴化乙錠(EtBr)：和光純藥工業

對實施例1所獲得之新穎製劑(1)、新穎製劑(2)及先前製劑之各者，針對shRNA保持能進行評價。

分別稱量Tris(5.4 g)、硼酸(2.75 g)、EDTA·2Na(0.185 g)，利用蒸餾水定容為1 L，藉此製備TBE緩衝液。於瓊脂糖(0.4 g)中加入TBE緩衝液(40 mL)並煮沸使瓊脂糖完全溶解，其後加入1 mg/mL EtBr(4 μ L)，並將其流入凝膠版中，恢復室溫，藉此製作1%瓊脂糖凝膠。

於電泳裝置(PLUS-2, Syma Biotech)設置凝膠版，分別將先前製劑、新穎製劑(1)及新穎製劑(2)稀釋10倍應用於瓊脂糖凝膠，並將TBE緩衝液加入至泳動槽，其後，於100 V下泳動15分鐘。其後，利用AE-9000N E-Graph(Atto)觀察TS-shRNA之光譜帶。又，於各脂質複合體製備1天後及3天後亦同樣地進行評價。

將結果示於圖2。

於剛製備後之先前製劑以及新穎製劑(1)及新穎製劑(2)中，於與游離型之TS-shRNA相同之位置完全觀察不到光譜帶，提示出關於包

含各脂質複合體之樣品，幾乎不存在游離型TS-shRNA。又，由於直至製備3天後，亦觀察不到與TS-shRNA相同之位置之光譜帶，因此得以確認：先前製劑以及新穎製劑(1)及新穎製劑(2)直至製備3天後繼續保持TS-shRNA。

根據該等結果可確認：於利用先前公知之方法所獲得之脂質複合體與利用本發明方法所獲得之脂質複合體之間於shRNA保持能方面並無有意義差。

實施例4：藉由各脂質複合體之腹腔內投與而帶來之腫瘤之標的基因抑制效果之評價

(即時RT-PCR)

於本實施例中，試劑係使用以下所記載者。

TaqMan(註冊商標)Reverse Transcription Reagents : Life Technologies

FastStart Universal Probe Master(ROX) : Roche

Universal ProbeLibrary #64 : Roche

Universal ProbeLibrary #60 : Roche

Forward primer for TS mRNA : Life Technologies

鹼基序列：5'-CCC CTT CTT CTC TGG TGG A-3'(序列編號9)

Reverse primer for TS mRNA : Life Technologies

鹼基序列：5'-AGG AGT TGC TGT GGT TTA TCA AG-3'(序列編號10)

Forward primer for GAPDH mRNA : Life Technologies

鹼基序列：5'-CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC-3'(序列編號11)

Reverse primer for GAPDH mRNA : Life Technologies

鹼基序列：5'-ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC-3'(序列編號12)

針對實施例1所獲得之新穎製劑(1)新穎製劑(2)及先前製劑對腫瘤

之標的基因抑制效果，藉由即時RT-PCR(反轉錄酶-聚合酶連鎖反應，reverse transcriptase-polymerase chain reaction)法進行評價。

培養MKN45人類胃癌細胞(理化學研究所)，以成為 5×10^6 個(細胞)/小鼠之方式移植至BALB/c nu/nu小鼠(5週齡，雄)之腹腔內。分別對移植當天及移植6天後之小鼠之體重進行測定，將體重減少之(認為移植細胞已植入)小鼠作為MKN45腹膜播種模型小鼠供於實驗。

以TS-shRNA之投與量成為20 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 之方式將先前製劑、新穎製劑(1)或新穎製劑(2)於細胞移植後7天、9天、11天計3次地分別對各模型小鼠進行腹腔內投與。於細胞移植13天後自各模型小鼠將腫瘤切除，並利用MULTI-BEADS SHOCKER(註冊商標)(安井機械)將腫瘤均質化，其後，使用RNeasy(註冊商標)Mini Kit(QIAGEN)提取RNA。

利用NanoDrop 8000(Thermo Fisher Scientific)測定所獲得之RNA萃取液之RNA濃度之後，利用RNase free water進行稀釋以使RNA濃度成為1 $\mu\text{g}/7.7 \mu\text{L}$ ，並使用TaqMan(註冊商標)反轉錄試劑(Reverse Transcription Reagents)進行反轉錄(於 16°C 下30分鐘，於 42°C 下30分鐘，於 85°C 下5分鐘)。

對所獲得之cDNA溶液5 μL 加入15 μL 以下所示之TS PCR mix或GAPDH PCR mix，使用StepOnePlus™(Life Technologies)進行即時RT-PCR(1週期：於 50°C 下2分鐘；於 95°C 下10分鐘進行40週期：於 95°C 下15秒鐘；於 60°C 下1分鐘)，藉此對TS mRNA量及GAPDH mRNA量進行測定。

TS PCR mix(10樣品份)	
ROX	100 μL
Universal probe #64	0.45 μL
Forward primer for TS mRNA	1.8 μL
Reverse primer for TS mRNA	1.8 μL
RNase free water	45.95 μL

總量	150 μ L
GAPDH PCR mix(10樣品份)	
ROX	100 μ L
Universal probe #60	0.45 μ L
Forward primer for GAPDH mRNA	1.8 μ L
Reverse primer for GAPDH mRNA	1.8 μ L
RNase free water	45.95 μ L
總量	150 μ L

將結果示於圖3。圖3係以將利用GAPDH mRNA之值對利用即時RT-PCR所測得之TS mRNA之值進行修正而得之資料設為「TS mRNA表現位準」並且將未投與脂質複合體而投與過9%蔗糖溶液之模型小鼠(對照群)之值設為100%之相對值而表示。

與對照群相比，於先前製劑、新穎製劑(1)及新穎製劑(2)之所有群確認到約30%左右之有意義之TS mRNA之表現位準之降低。由此顯示出藉由先前公知之方法所獲得之脂質複合體及藉由本發明方法所獲得之脂質複合體可有意義地抑制播種轉移至腹膜之腫瘤之標的基因表現，又，明確其效果於藉由先前公知之方法所獲得之脂質複合體與藉由本發明方法所獲得之脂質複合體之間並無有意義差。

實施例5：藉由各脂質複合體之腹腔內投與所帶來之腫瘤之標的基因抑制效果之評價

(IVIS(In Vivo Imaging Systems, 活體成像系統))

於本實施例中，試劑係使用以下所記載者。

螢光素：和光純藥工業

PBS：日水製藥

(以螢光素酶(Luc)為標的之shRNA)

以Luc為標的之shRNA(以下，記載為「Luc-shRNA」)具有以下序列。

Luc-shRNA :

5'-

CUUACGCUGAGUACUUCGAUAGUGCUCUGGUUGUCGAAGUACU
CAGCGUAAGUU-3'(序列編號13)

於本實施例中，使用與螢光素酶相對之shRNA(Luc-shRNA)，於上述實施例1記載之脂質複合體之製備方法中，將shRNA代替為Luc-shRNA，除此以外，以相同之方式製備擔載Luc-shRNA之脂質複合體，並對新穎製劑(1)、新穎製劑(2)及先前製劑之腫瘤之標的基因抑制效果，藉由IVIS進行評價。

培養螢光素酶表現NCI-N87人類胃癌細胞(NCI-N87-Luc，Summit Pharmaceuticals International)，並以成為 4×10^6 個(細胞)/小鼠之方式移植至BALB/c nu/nu小鼠(5週齡，雄，日本SLC)之腹腔內，藉此製作NCI-N87-Luc腹膜播種模型小鼠。

將先前製劑、新穎製劑(1)或新穎製劑(2)以Luc-shRNA之投與量成為20 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 之方式於細胞移植後8天、11天、14天、17天、20天計5次地對各模型小鼠分別進行腹腔內投與。又，將螢光素以成為7.5 mg/mL 之方式利用PBS進行溶解，於細胞移植後7天、10天、13天、16天、19天、22天分別將螢光素10 μL 進行腹腔內投與，其後，對腫瘤之螢光素酶活性利用IVIS(Xenogen，Alameda，CA，USA)進行觀察。使用未投與脂質複合體而投與過9%蔗糖溶液之模型小鼠作為對照群。

使用所獲得之結果之成像資料，表示將腹腔中之螢光素酶活性定量化之圖表(圖4)。

對照群中，隨著時間推移可確認到螢光素酶活性之上升，顯示出腫瘤已於腹腔內增生。另一方面，擔載Luc-shRNA之先前製劑、新穎製劑(1)及新穎製劑(2)之各者之腹腔內投與群中，自第1次投與後可

確認到顯著之螢光素酶之活性降低，於實施實驗之期間(直至細胞移植22天後)，螢光素酶活性並未再次上升(圖4)。

本實施例中雖使用與螢光素酶相對之Luc-shRNA，但認為其難以對腫瘤之增生產生影響。實際上，對細胞移植24天後之各群之腫瘤重量進行測定，結果於群間並未確認到顯著之差。由此情況顯示出：藉由投與擔載Luc-shRNA之各脂質複合體，僅抑制了腫瘤之螢光素酶之活性。根據該等結果，明確於藉由先前公知之方法所獲得之脂質複合體與藉由本發明方法所獲得之新穎之脂質複合體之間保持相同之TS-shRNA活性。

實施例6：藉由脂質複合體(新穎製劑(2))之腹腔內投與之對卵巢癌腹膜播種之治療評價

針對與上述實施例1同樣地製備之擔載TS-shRNA之脂質複合體(新穎製劑(2))對卵巢癌腹膜播種之治療效果進行評價。

培養螢光素酶表現OVCAR-3人類卵巢癌細胞(OVCAR-3-luc，Pharmaron)，並以成為 1.5×10^7 個(細胞)/小鼠之方式移植至BALB/c nu/nu小鼠(6-8週齡，雌，Beijing HFK Bio-Technology Co.,LTD)之腹腔內，藉此製作OVCAR-3-luc腹膜播種模型小鼠。

於本實施例中，對模型小鼠投與脂質複合體(新穎製劑(2))、紫杉醇(Taxol，Pharmaron)、或脂質複合體(新穎製劑(2))及紫杉醇。對於對照，投與9%蔗糖溶液。

以TS-shRNA之投與量成為20 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 之方式將脂質複合體(新穎製劑(2))於細胞移植後8天、11天、14天、17天計4次地對模型小鼠進行腹腔內投與。對於投與紫杉醇之群，以成為15 mg/kg體重之方式於細胞移植後8天、11天、14天、17天計4次地對模型小鼠進行腹腔內投與。

將螢光素以成為7.5 mg/mL之方式利用PBS進行溶解，並於細胞

移植後7天、14天、21天、26天分別將螢光素10 μL 進行腹腔內投與，其後，對腫瘤之螢光素酶活性利用IVIS進行觀察。

將結果示於圖5-1。又，使用圖5-1之成像資料，分別表示將腹腔中之螢光素酶活性定量化之圖表(圖5-2)及其對數圖表(圖5-3)。

對照群中，隨著時間推移可確認到螢光素酶活性之上升，顯示出腫瘤已於腹腔內增生。另一方面，確認腹腔內投與過擔載TS-shRNA之脂質複合體之群中，與對照群相比，螢光素酶活性之上升得到抑制，即，腹腔內之腫瘤之增生得到抑制。進而，於併用脂質複合體與紫杉醇之群中觀察到最高之腫瘤抑制效果。

又，將各模型小鼠之生存時間示於圖5-4。

與對照群相比，於併用脂質複合體與紫杉醇之群中確認到明顯較高之延命效果。

進而，將利用RT-PCR法對投與過脂質複合體之模型小鼠之血中及腹水中之TS-shRNA之濃度推移進行測定而得之結果示於圖5-5。

其結果確認：於腹水中觀測到8小時左右之較長之半衰期，另一方面，於血中未漏出TS-shRNA。

實施例7：藉由脂質複合體(新穎製劑(2))之腹腔內投與之對胰腺癌腹膜播種之治療評價

針對與上述實施例1同樣地製備之擔載TS-shRNA之脂質複合體(新穎製劑(2))對胰腺癌腹膜播種之治療效果進行評價。

培養螢光素酶表現PANC-1人類胰腺癌細胞(PANC-1-luc, Pharmaron)，並以成為 1.0×10^7 個(細胞)/小鼠之方式移植至BALB/c nu/nu小鼠(6-8週齡，雌，Beijing HFK Bio-Technology Co.,LTD)之腹腔內，藉此製作PANC-1-luc腹膜播種模型小鼠。

於本實施例中，對模型小鼠投與脂質複合體(新穎製劑(2))、紫杉醇(Taxol, Pharmaron)、或脂質複合體(新穎製劑(2))及紫杉醇。對於

對照，投與9%蔗糖溶液。

以TS-shRNA之投與量成為20 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 之方式將脂質複合體(新穎製劑(2))於細胞移植後8天、11天、14天、17天計4次地對模型小鼠進行腹腔內投與。對於投與紫杉醇之群，以成為10 mg/kg 體重之方式於細胞移植後8天、11天、14天、17天計4地對模型小鼠進行腹腔內投與。

將螢光素以成為7.5 mg/mL 之方式利用PBS進行溶解，並於細胞移植後7天、14天、21天、25天分別將螢光素10 μL 進行腹腔內投與，其後，對腫瘤之螢光素酶活性利用IVIS進行觀察。

基於IVIS之成像資料分別表示將腹腔中之螢光素酶活性定量化之圖表(圖6-1)及其對數圖表(圖6-2)。

對照群中，隨著時間推移可確認到螢光素酶活性之上升，顯示出腫瘤已於腹腔內增生。另一方面，確認投與過脂質複合體(新穎製劑(2))、紫杉醇(Taxol, Pharmaron)、或脂質複合體(新穎製劑(2))及紫杉醇之群中，與對照群相比，螢光素酶活性之上升得到抑制，即，腹腔內之腫瘤之增生得到抑制。特別是於投與過紫杉醇之群、及併用脂質複合體與紫杉醇之群中觀察到較高之腫瘤抑制效果。

又，將各模型小鼠之生存時間示於圖6-3。

與對照群相比，於併用脂質複合體與紫杉醇之群中確認到明顯較高之延命效果。

[產業上之可利用性]

根據本發明，由於可不使用如氯仿或環己烷之毒性較高且爆炸之危險性較高之有機溶劑而僅使用生物容許性較高之溶劑而製造脂質複合體，故而最適合於藥品製劑之工業上之製法。又，由於可避免於醫院之藥劑部等醫療現場分別製備脂質混合物之水分散液及RNAi分子之水溶液並將兩者進行混合之複雜之調劑，僅藉由在脂質複合體之

粉末中加入鹽水或糖類輸液並輕輕地攪拌便可為患者製備投與液，故而可大幅削減醫院之藥劑部之調劑相關之勞動力及成本。

進而，藉由對胃癌或卵巢癌或胰腺癌等之腹膜播種轉移(與各種癌之末期相近之狀態)實施腹腔內投與，又，對胸腔內確認有主要病灶之胸膜惡性間皮瘤或肺癌或癌性肺炎實施胸腔內投與等，進行合乎目的之局部投與，可有效率地將RNAi分子傳遞至腫瘤細胞，從而可有效率地抑制該腫瘤之增生。期待本發明於藥物遞送之領域中、或於癌治療之領域中做出較大貢獻。

本說明書所引用之所有刊物、專利及專利申請案直接藉由引用而併入本說明書中。

【符號說明】

無

序列表

<110> 日商德爾塔菲製藥股份有限公司

<120> 一種局部投與用脂質複合體之新穎製造方法及使用該脂質複合體之抗腫瘤劑

<130> PH-6198-TW

<150> JP 2014-221062

<151> 2014-10-30

<160> 13

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 1

guaacaccau cgaucauga

19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 2

ucaugaucga ugguguuac

19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 3

gaauacagag auauggaau

19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 4

auuccauauc ucuguauuc

19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 5

cgaucaugau guagagugu

19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 6

acacucuaca ucaugaucg

19



<210> 7
 <211> 15
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 7
 uagugcuccu gguug

15

<210> 8
 <211> 55
 <212> RNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 8
 guaacaccrau cgaucaugau agugcuccug guugucauga ucgauggugu uacuu

55

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 引子

<400> 9
 ccccttcttc tctggtgga

19

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 10

aggagttgct gtggtttatc aag

23

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 11

ctctgctcct cctgttcgac

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 12

acgaccaaatt ccggttgactc

20

<210> 13

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 13

cuuacgcuga guacuucgau agugcuccug guugucgaag uacucagcgu aaguu

55

申請專利範圍

1. 一種脂質複合體之製造方法，該脂質複合體包含二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質之脂質混合物，以及RNAi分子，且該方法包括如下步驟：

(a)將二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質溶解於醇中，且

磷脂醯膽鹼為1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、或1,2-二(二十碳烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DEPC)，陽離子性脂質為O,O'-二(十四碳醯基)-N-(α -三甲基銨基乙醯基)二乙醇胺氯化物(DC-6-14)；

(b)於攪拌下將(a)中所獲得之醇溶液滴加至溶解有RNAi分子之溶液中；及

(c)將(b)中所獲得之溶液進行冷凍乾燥。

2. 如請求項1之方法，其中磷脂醯膽鹼為DOPC。
3. 如請求項1之方法，其中步驟(a)中包括將DOPE、DOPC及DC-6-14溶解於醇中並進行混合。
4. 如請求項1至3中任一項之方法，其進而包括(d)將(c)中所獲得之冷凍乾燥物混合於緩衝液中之步驟。
5. 一種包含脂質混合物及短髮夾RNA(TS-shRNA)之組合物用以製造用於治療胃癌、卵巢癌、及胰腺癌之腹膜播種轉移之局部投與用醫藥的用途，

該脂質混合物係二油基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、磷脂醯膽鹼及陽離子性脂質之脂質混合物，且磷脂醯膽鹼為1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、或1,2-二(二十碳烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DEPC)，陽離子性

脂質為O,O'-二(十四碳醯基)-N-(α -三甲基銨基乙醯基)二乙醇胺氯化物(DC-6-14)；

該短髮夾RNA(TS-shRNA)能夠藉由RNAi作用而抑制胸苷酸合成酶之表現。

6. 如請求項5之用途，其中磷脂醯膽鹼為DOPC。
7. 如請求項5之用途，其中脂質混合物包含DOPE、DOPC及DC-6-14。
8. 如請求項7之用途，其係以3：2：5之莫耳比含有DOPE、DOPC及DC-6-14。
9. 如請求項5至8中任一項之用途，其中shRNA包含以序列編號8所表示之鹼基序列。
10. 如請求項5至8中任一項之用途，其中上述醫藥與癌化學治療劑併用。
11. 如請求項9之用途，其中上述醫藥與癌化學治療劑併用。
12. 如請求項10之用途，其中癌化學治療劑係選自由具有微管之解聚合抑制作用之抗腫瘤劑、去氧胞苷衍生物、及具有TS抑制作用之抗腫瘤劑所組成之群。

圖式

樣品	粒徑(nm)	多分散度指數	ζ電位(mV)
先前製劑	488.9 ± 73.7	0.484 ± 0.100	33.3 ± 2.2
新穎製劑(1)	623.4 ± 55.9	0.548 ± 0.034	36.2 ± 2.5
新穎製劑(2)	651.5 ± 66.5	0.529 ± 0.014	34.7 ± 1.2

圖1

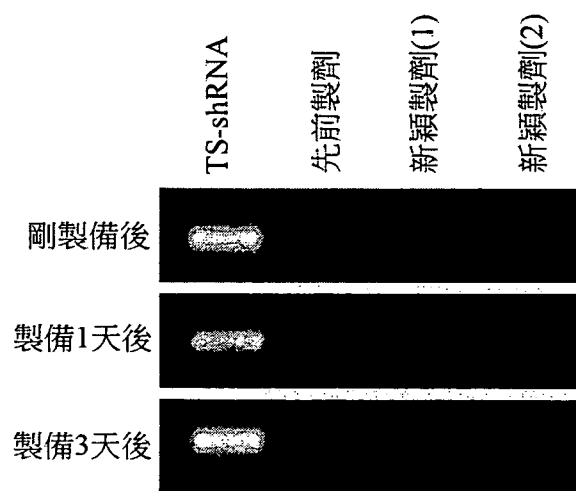


圖2

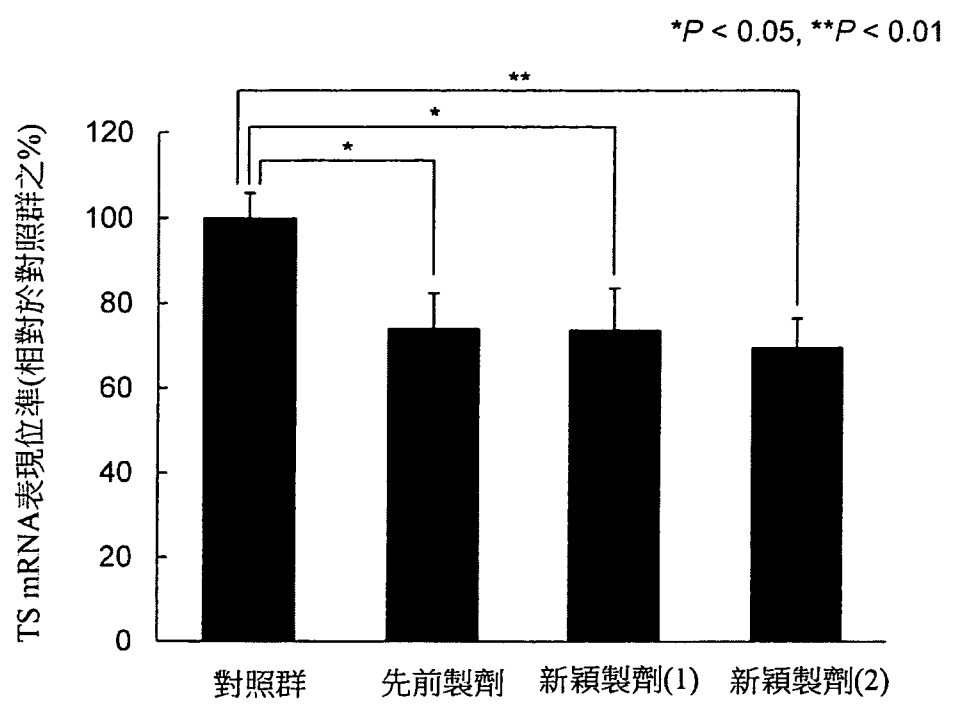


圖3

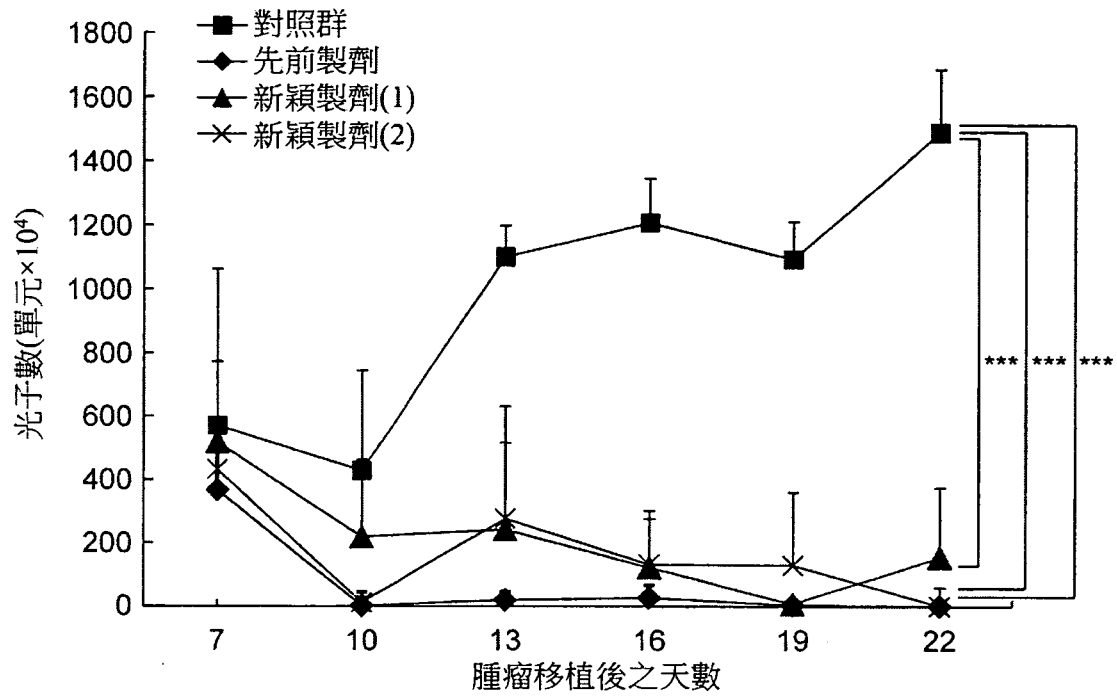


圖4

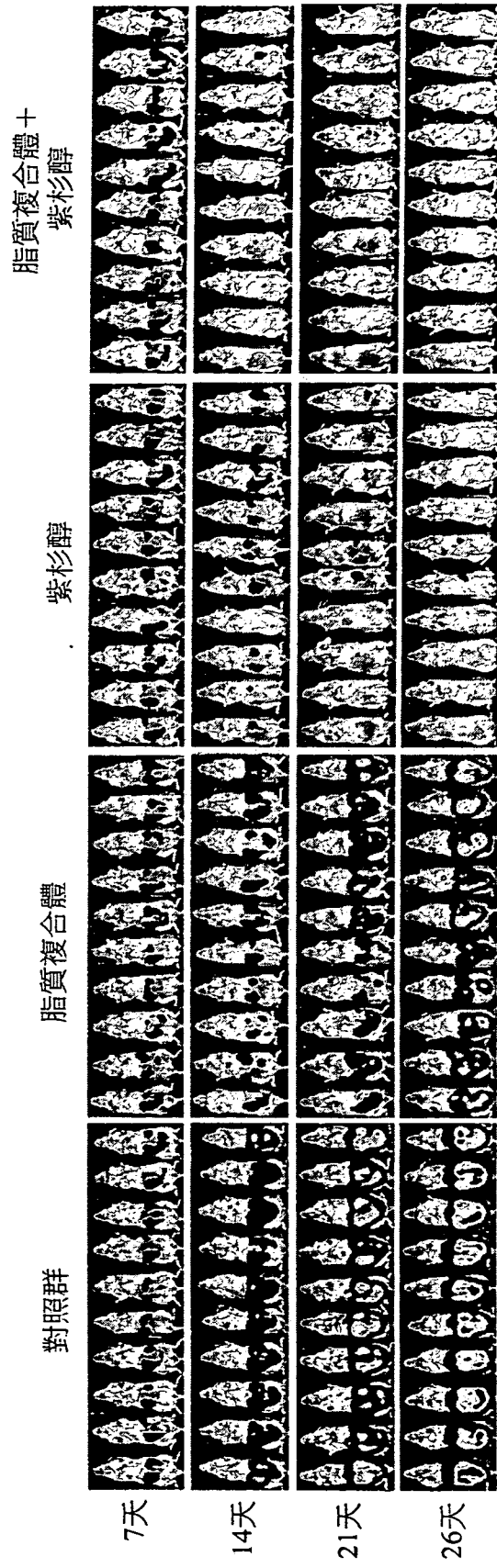


圖5-1

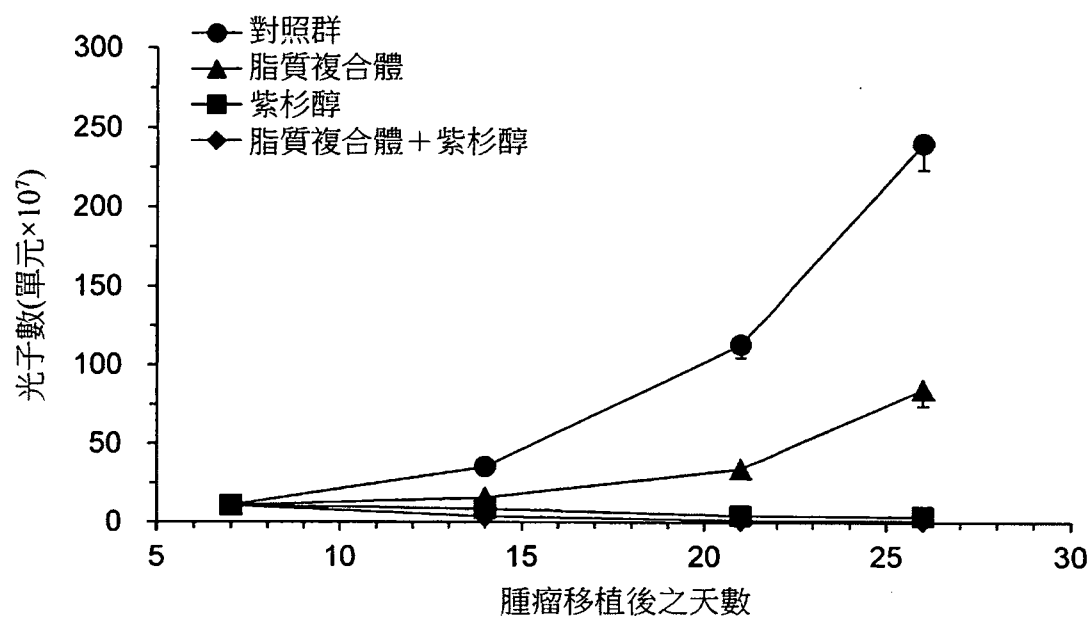


圖5-2

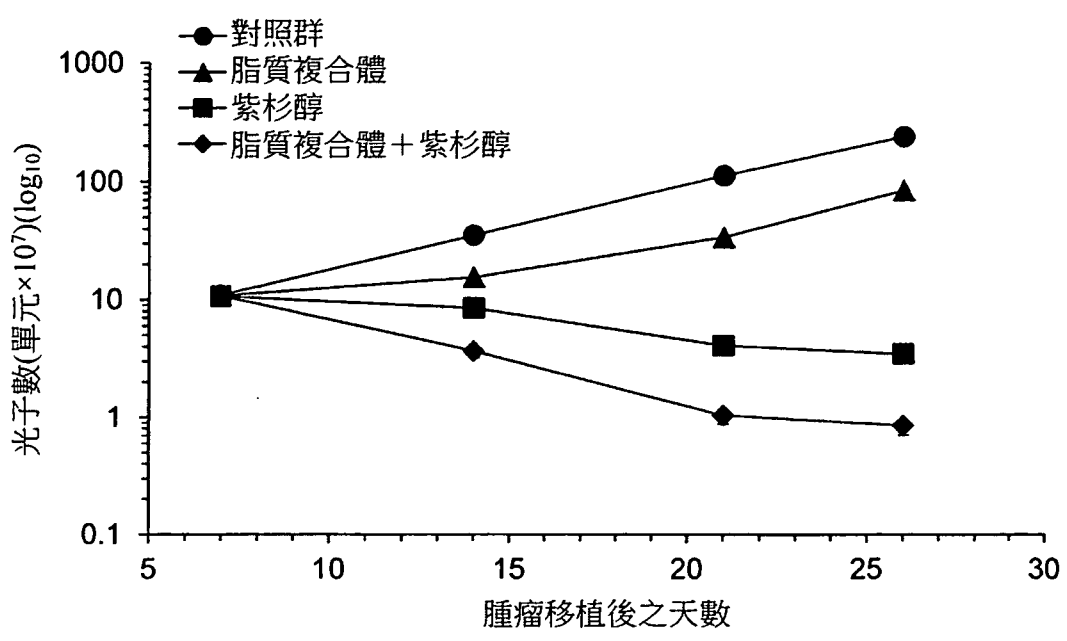
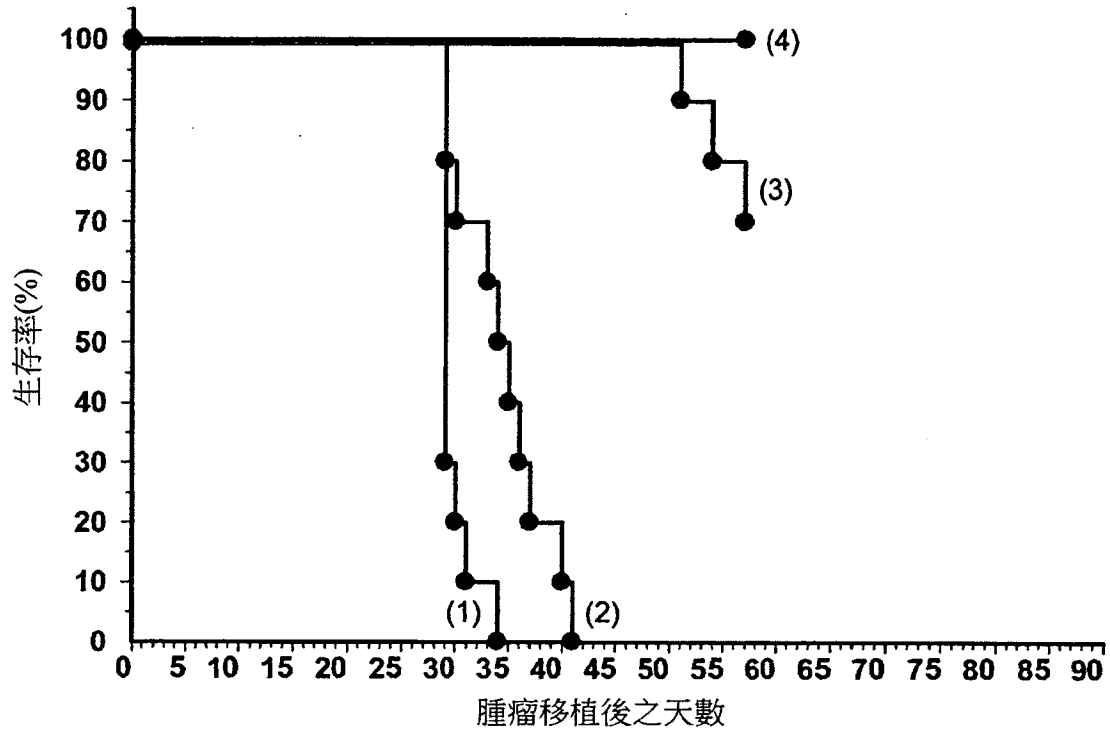


圖5-3



- (1) 對照群
- (2) 脂質複合體
- (3) 紫杉醇
- (4) 脂質複合體 + 紫杉醇

圖5-4

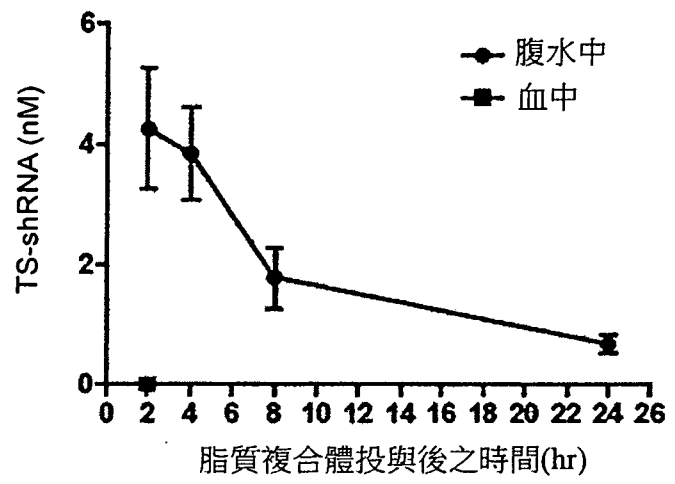


圖5-5

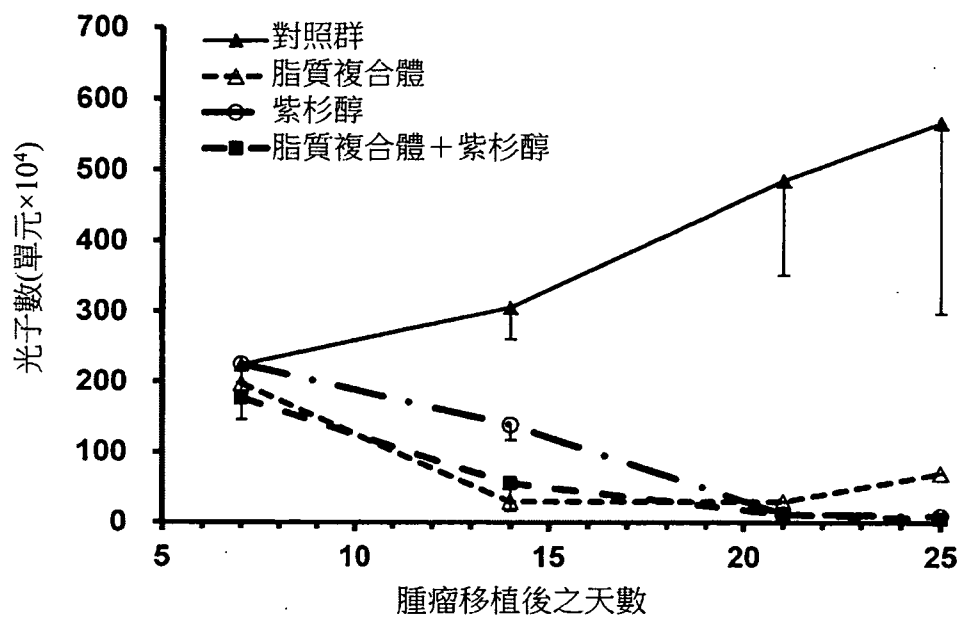


圖6-1

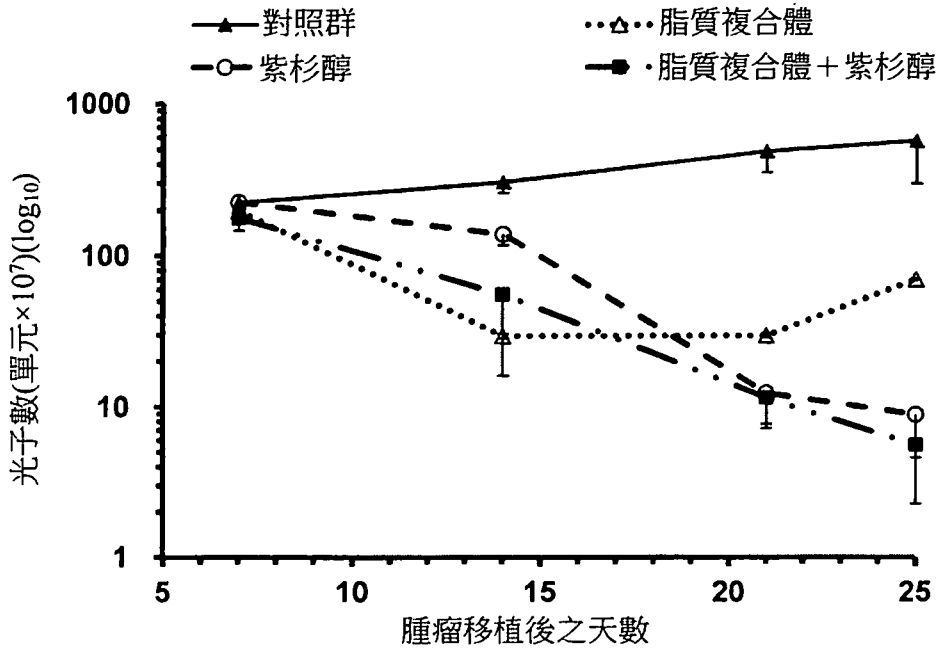
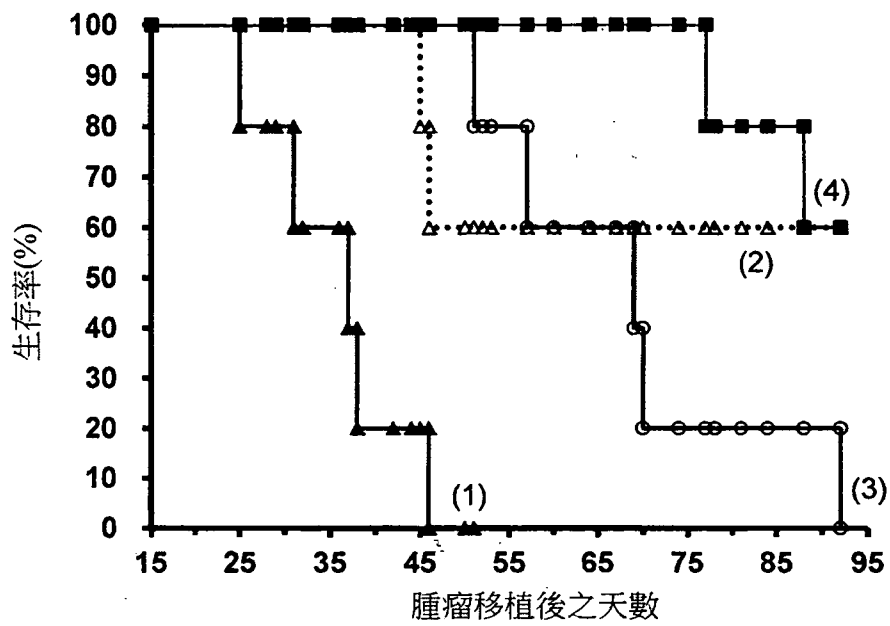


圖6-2



- (1) 對照群
- (2) 脂質複合體
- (3) 紫杉醇
- (4) 脂質複合體 + 紫杉醇

圖6-3

