

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成21年2月26日(2009.2.26)

【公表番号】特表2007-525958(P2007-525958A)

【公表日】平成19年9月13日(2007.9.13)

【年通号数】公開・登録公報2007-035

【出願番号】特願2006-517337(P2006-517337)

【国際特許分類】

C 1 2 N	7/00	(2006.01)
C 0 8 G	65/333	(2006.01)
C 0 8 G	81/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/76	(2006.01)
A 6 1 K	47/48	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	7/00	Z N A
C 0 8 G	65/333	
C 0 8 G	81/00	
C 1 2 N	15/00	A
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	47/48	

【誤訳訂正書】

【提出日】平成21年1月6日(2009.1.6)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

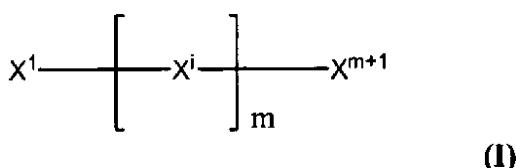
【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

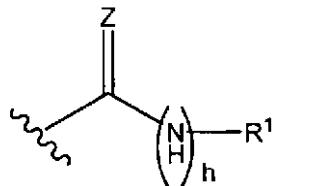
b) 式I:

【化1】

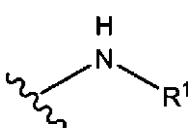


[式中、mは1～1,000の整数であり、iは2～mの整数であって x^i の位置を示し、 x^1 、 x^i および x^{m+1} は独立して選択されたモノマーであり、該モノマーは、(i)第二アミン類および第三アミン類から選択されるアミンを含み、かつ(iii)少なくとも1つのモノマーはQを含み、該Qは、式IIaおよび式IIb:]

【化2】



(IIa);



(IIb);

(式中、Zは、OおよびNHからなる群から選択され、hは0または1の整数であり、R¹は、ポリアルキレングリコール部位を含む)から選択される構造を有する]の構造を有し、

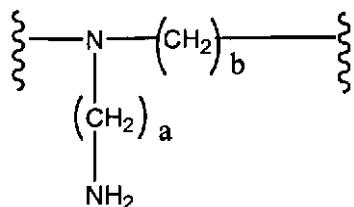
交差重合を含まず、かつ生理的pHで少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電しているコポリマーに、

a) 非共有結合的に錯化しているアデノウイルスを含む、錯体。

【請求項2】

Qが式IIaであり、hが0であり、ZがOであり、前記モノマーが式III:

【化3】



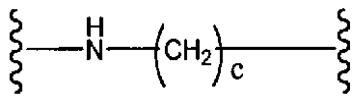
(III)

(式中、aは1~10の整数であり、bは1~10の整数である)の構造を含む、請求項1に記載の錯体。

【請求項3】

Qが式IIaであり、hが0であり、ZがOであり、前記モノマーが式IV:

【化4】



(IV)

(式中、cは1~10の整数である)の構造を含む、請求項1に記載の錯体。

【請求項4】

Qが式IIaであり、hが0であり、ZがOであり、前記コポリマーにおいて、

a) 前記モノマーの少なくとも1個が式III(式中、aは1~10の整数であり、bは1~10の整数である)の構造を含み、

b) 前記モノマーの少なくとも1個が式IV(式中、cは1~10の整数である)の構造を含む、請求項1に記載の錯体。

【請求項5】

aが2である、請求項4に記載の錯体。

【請求項6】

bが2である、請求項5に記載の錯体。

【請求項7】

c が 2 である、請求項 6 に記載の錯体。

【請求項 8】

a が 3 である、請求項 4 に記載の錯体。

【請求項 9】

b が 3 である、請求項 8 に記載の錯体。

【請求項 10】

c が 3 である、請求項 9 に記載の錯体。

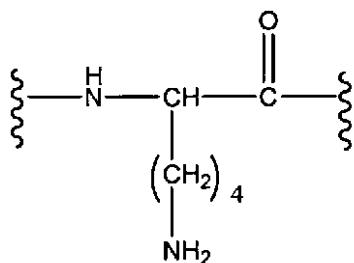
【請求項 11】

前記前記モノマーがエチレンイミンである、請求項 4 に記載の錯体。

【請求項 12】

Q が式 I I a であり、h が 0 であり、Z が 0 であり、前記モノマーが式 V :

【化 5】



(V)

の構造を含む、請求項 1 に記載の錯体。

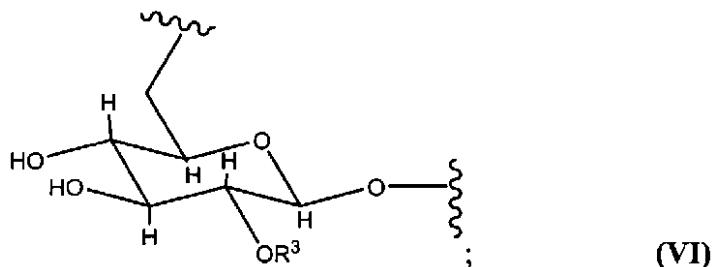
【請求項 13】

前記モノマーがリジンである、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 14】

Q が式 I I a であり、h が 1 であり、Z が NH であり、前記モノマーが式 VI :

【化 6】



(VI)

(式中、R³ は H、- (C₂H₂CH₂) NH (C₂H₂CH₃)₂ および - (C₂H₂CH₂) N (C₂H₂CH₃)₂ C₂H₂CH₂NH (C₂H₂CH₃)₂ から選択される基である) の構造を含む、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 15】

R³ は、前記モノマーの 3 個のうちの約 2 個については H であり、前記モノマーの 3 個のうちの約 1 個については、R³ は - (C₂H₂CH₂) NH (C₂H₂CH₃)₂ および - (C₂H₂CH₂) N (C₂H₂CH₃)₂ C₂H₂CH₂NH (C₂H₂CH₃)₂ から選択される基である、請求項 14 に記載の錯体。

【請求項 16】

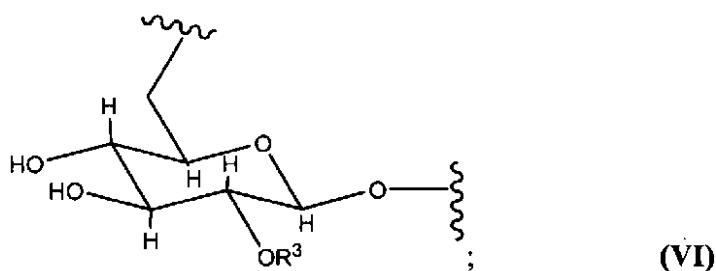
前記モノマーが D E A E - デキストランである、請求項 1 に記載の錯体。

【請求項 17】

Q が式 I I b であり、前記コポリマーが、

a) 式 VI :

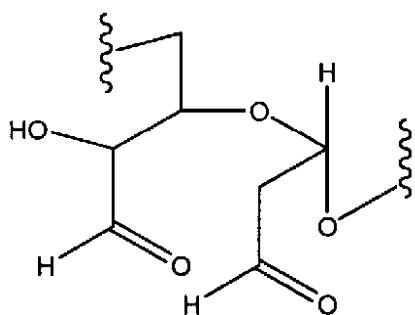
【化7】



(式中、R³はH、-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基である)の構造を含む少なくとも1個のモノマーと、

b) 式VIII：

【化8】



(VII)

の構造を含む少なくとも1個のモノマーとを含む、請求項1に記載の錯体。

【請求項18】

R³は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、残りのR³は-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基である、請求項17に記載の錯体。

【請求項19】

式VIIIの構造を含む前記モノマーの割合が、5%と25%との間である、請求項17に記載の錯体。

【請求項20】

式VIIIの構造を含む前記モノマーの割合が5%と25%との間である、請求項18に記載の錯体。

【請求項21】

R¹が、式VIII：

【化9】



(式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を含む、請求項

1に記載の錯体。

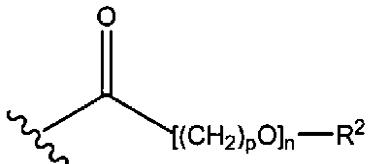
【請求項22】

pが2である、請求項21に記載の錯体。

【請求項23】

Qが、式IX：

【化10】



(IX)

(式中、nは2～2,000の整数、pは1～8の整数、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3～7員シクロアルキル、置換または非置換5～7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有する、請求項4に記載の錯体。

【請求項24】

Qで置換されているモノマーの割合が少なくとも10%である、請求項1に記載の錯体。

【請求項25】

Qで置換されているモノマーの割合が15～30%である、請求項1に記載の錯体。

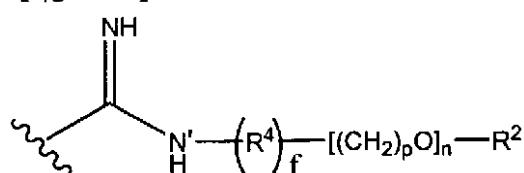
【請求項26】

Qが、式IX(式中、nは2～2,000の整数であり、pは1～8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3～7員シクロアルキル、置換または非置換5～7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有する、請求項12に記載の錯体。

【請求項27】

Qが式X：

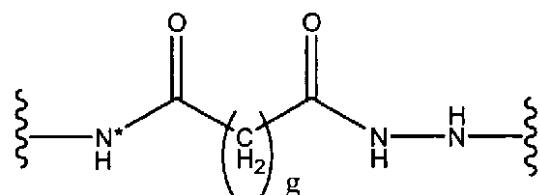
【化11】



(X)

[式中、nは2～2,000の整数であり、pは1～8の整数であり、fは0または1の整数であり、fが1の時、R⁴は式XI：

【化12】



(XI)

(式中、N'がN*に共有結合で結合し、gは1～9の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3～7員シクロアルキル、置換または非置換5～7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有する]の構造を有する、請求項14に記載の錯体。

【請求項28】

fが0である、請求項27に記載の錯体。

【請求項29】

fが1である、請求項27に記載の錯体。

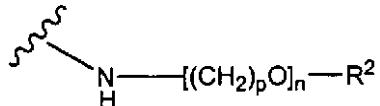
【請求項30】

gが4である、請求項29に記載の錯体。

【請求項31】

Qが式XII:

【化13】



(XII)

(式中、nは2～2,000の整数であり、pは1～8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3～7員シクロアルキル、置換または非置換5～7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有する、請求項17に記載の錯体。

【請求項32】

錯体の直径が、約20nmと約300nmとの間である、請求項1に記載の錯体。

【請求項33】

錯体の直径が、約80nmと約150nmとの間である、請求項1に記載の錯体。

【請求項34】

R²が、置換および非置換アルキル、置換および非置換アリール、葉酸塩、トランスフェリン、ガラクトース、グルコース、抗体、抗体断片およびペプチドから選択されるものである、請求項23に記載の錯体。

【請求項35】

R²がメチルである、請求項34に記載の錯体。

【請求項36】

pが2であり、aが2であり、bが2であり、cが2である、請求項35に記載の錯体。

【請求項37】

R²が、置換および非置換アルキル、置換および非置換アリール、葉酸塩、トランスフェリン、ガラクトース、グルコース、抗体、抗体断片およびペプチドから選択されるものである、請求項26に記載の錯体。

【請求項38】

R²がメチルである、請求項37に記載の錯体。

【請求項39】

pが2である、請求項38に記載の錯体。

【請求項40】

R²が、置換および非置換アルキル、置換および非置換アリール、葉酸塩、トランスフェリン、ガラクトース、グルコース、抗体、抗体断片およびペプチドから選択されるものである、請求項28に記載の錯体。

【請求項 4 1】

R²がメチルである、請求項40に記載の錯体。

【請求項 4 2】

pが2である、請求項41に記載の錯体。

【請求項 4 3】

R²が、置換および非置換アルキル、置換および非置換アリール、葉酸塩、トランスフェリン、ガラクトース、グルコース、抗体、抗体断片およびペプチドから選択されるものである、請求項29に記載の錯体。

【請求項 4 4】

R²がメチルである、請求項44に記載の錯体。

【請求項 4 5】

pが2である、請求項45に記載の錯体。

【請求項 4 6】

R²が、置換および非置換アルキル、置換および非置換アリール、葉酸塩、トランスフェリン、ガラクトース、グルコース、抗体、抗体断片およびペプチドから選択されるものである、請求項30に記載の錯体。

【請求項 4 7】

R²がメチルである、請求項46に記載の錯体。

【請求項 4 8】

pが2である、請求項47に記載の錯体。

【請求項 4 9】

R²が、置換および非置換アルキル、置換および非置換アリール、葉酸塩、トランスフェリン、ガラクトース、グルコース、抗体、抗体断片およびペプチドから選択されるものである、請求項31に記載の錯体。

【請求項 5 0】

R²がメチルである、請求項49に記載の錯体。

【請求項 5 1】

pが2である、請求項50に記載の錯体。

【請求項 5 2】

アデノウイルスに対するコポリマーの比が、3,500:1と30,000:1との間である、請求項1に記載の錯体。

【請求項 5 3】

アデノウイルスに対するコポリマーの比が、3,600:1と20,000:1との間である、請求項52に記載の錯体。

【請求項 5 4】

アデノウイルスに対するコポリマーの比が、10,000:1と30,000:1との間である、請求項52に記載の錯体。

【請求項 5 5】

コポリマーの分子量が、150kDaと170kDaとの間である、請求項1に記載の錯体。

【請求項 5 6】

mが、10~900の整数である、請求項1に記載の錯体。

【請求項 5 7】

mが、50~600の整数である、請求項56に記載の錯体。

【請求項 5 8】

mが、75~300の整数である、請求項57に記載の錯体。

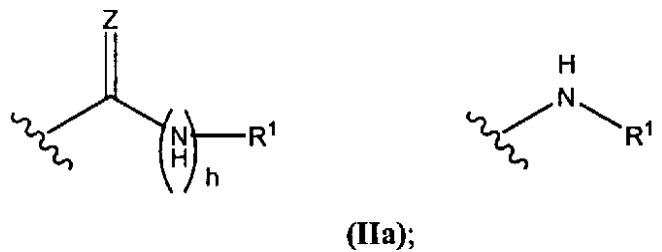
【請求項 5 9】

非共有結合的に錯化したアデノウイルスコポリマー錯体を製造する方法であって、コポリマーをアデノウイルスに接触させることを含み、

前記コポリマーが、式I〔式中、mは1~1,000の整数であり、iは2~mの整数

であつて X^i の位置を示し、 X^1 、 X^i および X^{m+1} は独立して選択されたモノマーであり、該モノマーは、(i) 第二アミン類および第三アミン類から選択されるアミンを含み、かつ(ii) 少なくとも 1 つのモノマーは Q を含み、該 Q は、式 I I a および式 I I b :

【化 1 4】



(式中、Zは、OおよびNHからなる群から選択され、hは0または1の整数であり、R

¹ は、ポリアルキレングリコール部位を含む)から選択される構造である)の構造を含み、

〔請求項 60〕

0が式II-1aであり、tが0であり、Zが0であり、前記モノマーは、

a) 式 I I I (式中、 a は 1 ~ 1 0 の整数であり、 b は 1 ~ 1 0 の整数である) の構造を有するモノマーを少なくとも 1 個と、

b) 式 IV (式中、c は 1 ~ 10 の整数である) の構造を有するモノマーを少なくとも 1 個とを含み、

前記モノマーの少なくとも 10% は、式 IX (式中、n は 2 ~ 2,000 の整数であり、p は 1 ~ 8 の整数であり、R² は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換 3 ~ 7 員シクロアルキル、置換または非置換 5 ~ 7 員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である) の構造で置換されており、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的 pH でコポリマー中の少なくとも 1 個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項 5-9 に記載の方法。

【請求項 61】

p が 2 であり、 a が 2 であり、 b が 2 であり、 c が 2 であり、 R² がメトキシである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 6 2】

Q が式 I I a であり、 h が 0 であり、 Z が 0 であり、前記モノマーが、式 V [式中、前記モノマーの少なくとも 10 % が、式 IX (式中、 n は 2 ~ 2,000 の整数であり、 p は 1 ~ 8 の整数であり、 R^2 は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換 3 ~ 7 員シクロアルキル、置換または非置換 5 ~ 7 員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である) の構造で置換されている] の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的 pH で前記コポリマー中の少なくとも 1 個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 3】

p が 2 であり、R² がメトキシである、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

Qが式 I I aであり、hが1であり、ZがNHであり、前記モノマーが、式VI〔式中、R³は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R³は-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択され

る基であり、Qで置換されているモノマーの割合は少なくとも10%であり、Qは、式X（式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、fは0であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である）の構造を有している]の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHで前記コポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項59に記載の方法。

【請求項65】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

Qが式IIaであり、hが1であり、ZがNHであり、前記モノマーが、式VII（式中、R³は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R³は-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基であり、Qで置換されているモノマーの割合は少なくとも10%であり、Qは、式X（式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、fは1であり、R⁴は式XIの構造を有し、gは4であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である）の構造を有している]の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHで前記コポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項59に記載の方法。

【請求項67】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

Qが式IIbであり、前記コポリマーが、

a)式VII（式中、R³はH、-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基である）の構造を含むモノマーを少なくとも1個と、

b)式VIIの構造を含むモノマーを少なくとも1個とを含み、

Qで置換されているモノマーの割合が少なくとも10%で、Qは、式XI（式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である）の構造を有し、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHで前記コポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項59に記載の方法。

【請求項69】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

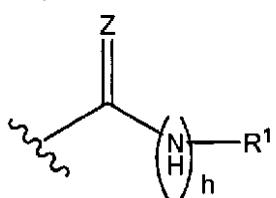
アデノウイルスを細胞中に導入する方法であって、

(a)コポリマーをアデノウイルスに非共有結合的に接触させ、

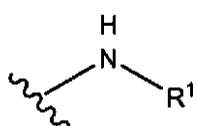
(b)該錯体を細胞に接触させることを含み、

前記コポリマーは、式I（式中、mは1~1,000の整数であり、iは2~mの整数であってXⁱの位置を示し、X¹、XⁱおよびX^{m+1}は独立して選択されたモノマーであり、該モノマーは、(i)第二アミン類および第三アミン類から選択されるアミンを含み、かつ(i)少なくとも1つのモノマーはQを含み、該Qは、式IIaおよび式IIb：

【化15】



(IIa);



(IIb);

(式中、Zは、OおよびNHからなる群から選択され、hは0または1の整数であり、R¹は、ポリアルキレングリコール部位を含む)から選択される構造である]の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、方法。

【請求項71】

前記アデノウイルスが、コポリマーのないアデノウイルスより、感染性がより高い、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記アデノウイルスが、コポリマーのないものより、感染性が少なくとも20%高い、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

前記アデノウイルスが、コポリマーのないものより、感染性が少なくとも100%高い、請求項71に記載の方法。

【請求項74】

Qが式IIaであり、hが0であり、ZがOであり、前記モノマーは、

a)式III (式中、aは1~10の整数であり、bは1~10の整数である)の構造を有するモノマーを少なくとも1個と、

b)式IV (式中、cは1~10の整数である)の構造を有するモノマーを少なくとも1個とを含み、

前記モノマーの少なくとも10%は、式IX (式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造で置換されており、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項70に記載の方法。

【請求項75】

pが2であり、aが2であり、bが2であり、cが2であり、R²がメトキシである、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

Qが式IIaであり、hが0であり、ZがOであり、前記モノマーが、式V [式中、前記モノマーの少なくとも10%が、式IX (式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造で置換されている]の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHで前記コポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項70に記載の方法。

【請求項77】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項76に記載の方法。

【請求項 7 8】

Qが式IIaであり、hが1であり、ZがNHであり、前記モノマーが、式VI〔式中、R³は、前記モノマーの3個のうち約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R³は-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基であり、Qで置換されているモノマーの割合は少なくとも10%であり、Qは、式X(式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、fは0であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有している〕の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHで前記コポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項70に記載の方法。

【請求項 7 9】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 0】

Qが式IIaであり、hが1であり、ZがNHであり、前記モノマーが、式VI〔式中、R³は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R³は-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基であり、Qで置換されているモノマーの割合は少なくとも10%であり、Qは、式X(式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、fは1であり、R⁴は式XIの構造を有し、gは4であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有している〕の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHで前記コポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項70に記載の方法。

【請求項 8 1】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項80に記載の方法。

【請求項 8 2】

Qが式IIbであり、前記コポリマーが、

a)式VI(式中、R³はH、-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基である)の構造を含むモノマーを少なくとも1個と、

b)式VIIの構造を含むモノマーを少なくとも1個とを含み、

Qで置換されているモノマーの割合が少なくとも10%で、Qは、式XII(式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有し、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項70に記載の方法。

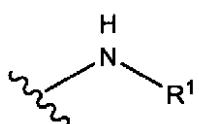
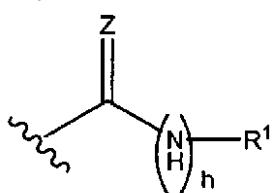
【請求項 8 3】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項82に記載の方法。

【請求項 8 4】

(a)式I〔式中、mは1~1,000の整数であり、iは2~mの整数であってXⁱの位置を示し、X¹、XⁱおよびX^{m+1}は独立して選択されたモノマーであり、該モノマーは、(i)第二アミン類および第三アミン類から選択されるアミンを含み、かつ(ii)少なくとも1つのモノマーはQを含み、該Qは、式IIaおよび式IIb:

【化16】



(式中、Zは、OおよびNHからなる群から選択され、hは0または1の整数であり、R¹は、ポリアルキレングリコール部位を含む)のから選択される構造である)の構造を含む]の構造を含み、

交差重合を含まず、かつ生理的pHで少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電しているコポリマーと、

(b)アデノウイルスと、

(c)生理学的に許容しうる賦形剤と、

を含み、

前記コポリマーは、前記アデノウイルスと非共有結合錯体を形成する、生理学的製剤。

【請求項85】

Qが式IIaであり、hが0であり、ZがOであり、前記モノマーは、

a)式III (式中、aは1~10の整数であり、bは1~10の整数である)の構造を有するモノマーを少なくとも1個と、

b)式IV (式中、cは1~10の整数である)の構造を有するモノマーを少なくとも1個とを含み、

前記モノマーの少なくとも10%は、式IX (式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造で置換されており、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項84に記載の生理学的製剤。

【請求項86】

pが2であり、aが2であり、bが2であり、cが2であり、R²がメトキシである、請求項85に記載の生理学的製剤。

【請求項87】

Qが式IIaであり、hが0であり、ZがOであり、前記モノマーが、式V (式中、前記モノマーの少なくとも10%が、式IX (式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造で置換されている)の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項84に記載の生理学的製剤。

【請求項88】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項87に記載の生理学的製剤。

【請求項89】

Qが式IIaであり、hが1であり、ZがNHであり、前記モノマーが、式VI (式中、R³は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R³は-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択され

る基であり、Qで置換されているモノマーの割合は少なくとも10%であり、Qは、式X（式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、fは0であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である）の構造を有している]の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項84に記載の生理学的製剤。

【請求項90】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項89に記載の生理学的製剤。

【請求項91】

Qが式IIaであり、hが1であり、ZがNHであり、前記モノマーが、式VII（式中、R³は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R³は-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基であり、Qで置換されているモノマーの割合は少なくとも10%であり、Qは、式X（式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、fは1であり、R⁴は式XIの構造を有し、gは4であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である）の構造を有している]の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項84に記載の生理学的製剤。

【請求項92】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項91に記載の生理学的製剤。

【請求項93】

Qが式IIbであり、前記コポリマーが、

a)式VII（式中、R³はH、-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基である）の構造を含むモノマーを少なくとも1個と、

b)式VIIの構造を含むモノマーを少なくとも1個とを含み、

Qで置換されているモノマーの割合が少なくとも10%で、Qは、式XI（式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である）の構造を有し、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項84に記載の生理学的製剤。

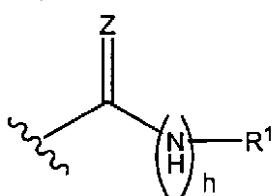
【請求項94】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項93の生理学的製剤。

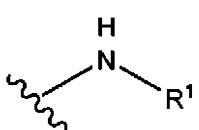
【請求項95】

コポリマーとアデノウイルスとを含むキットであって、該コポリマーとアデノウイルスとは非共有結合的に結合し、該コポリマーは、式I（式中、mは1~1,000の整数であり、iは2~mの整数であってXⁱの位置を示し、X¹、XⁱおよびX^{m+1}は独立して選択されたモノマーであり、該モノマーは、(i)第二アミン類および第三アミン類から選択されるアミンを含み、かつ(iii)少なくとも1つのモノマーはQを含み、該Qは、式IIaおよび式IIb：

【化17】



(IIa);



(IIb);

(式中、Zは、OおよびNHからなる群から選択され、hは0または1の整数であり、R¹は、ポリアルキレングリコール部位を含む)から選択される構造である]の構造を含み、

該コポリマーは、交差重合を含まず、かつ生理的pHで少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、キット。

【請求項96】

Qが式IIaであり、hが0であり、ZがOであり、前記モノマーは、

a)式III(式中、aは1~10の整数であり、bは1~10の整数である)の構造を有するモノマーを少なくとも1個と、

b)式IV(式中、cは1~10の整数である)の構造を有するモノマーを少なくとも1個とを含み、

前記モノマーの少なくとも10%は、式IX(式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造で置換されており、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項95に記載のキット。

【請求項97】

pが2であり、aが2であり、bが2であり、cが2であり、R²がメトキシである、請求項96に記載のキット。

【請求項98】

Qが式IIaであり、hが0であり、ZがOであり、前記モノマーが、式V〔式中、前記モノマーの少なくとも10%が、式IX(式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造で置換されている〕の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項95に記載のキット。

【請求項99】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項98に記載のキット。

【請求項100】

Qが式IIaであり、hが1であり、ZがNHであり、前記モノマーが、式VI〔式中、R³は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R³は-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基であり、Qで置換されているモノマーの割合は少なくとも10%であり、Qは、式X(式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、fは0であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または

非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有している]の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項95に記載のキット。

【請求項101】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項100に記載のキット。

【請求項102】

Qが式IIaであり、hが1であり、ZがNHであり、前記モノマーが、式VII〔式中、R³は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R³は-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基であり、Qで置換されているモノマーの割合は少なくとも10%であり、Qは、式X(式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、fは1であり、R⁴は式XIの構造を有し、gは4であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有している]の構造を含み、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項95に記載のキット。

【請求項103】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項102に記載のキット。

【請求項104】

Qが式IIbであり、前記コポリマーが、

a)式VII(式中、R³はH、-(CH₂CH₂)NH(CH₂CH₃)₂および-(CH₂CH₂)N(CH₂CH₃)₂CH₂CH₂NH(CH₂CH₃)₂から選択される基である)の構造を含むモノマーを少なくとも1個と、

b)式VIIの構造を含むモノマーを少なくとも1個とを含み、

Qで置換されているモノマーの割合が少なくとも10%で、Qは、式XII(式中、nは2~2,000の整数であり、pは1~8の整数であり、R²は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3~7員シクロアルキル、置換または非置換5~7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である)の構造を有し、

前記コポリマーは交差重合を含まず、かつ生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している、請求項95に記載のキット。

【請求項105】

pが2であり、R²がメトキシである、請求項104に記載のキット。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】アデノウイルスのポリマー化

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

(関連出願への相互参照)

本願は、2003年6月30日に出願した米国特許出願第60/484,060号の利益を主張し、これら全ては参考として本明細書中に組み込まれる。

【0002】

(連邦政府により支援された研究開発の下でなされた発明に対する権利に関する陳述)
適用なし。

【0003】

(コンパクトディスクで提出した「配列表」、表、またはコンピュータプログラムを列挙した付録に対する参考)

適用なし。

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

組換えアデノウイルスは、多種多様な増殖性および非増殖性細胞に遺伝子を送達することができるため、遺伝子治療においてベクターとして頻繁に使われている。しかし、アデノウイルスの全身送達は、例えば、血中半減期が短いこと(Morrisseyら、Toxicol Sci. 65: 266-275 (2002); Alemanyら、J Gen Virol. 81: 2605-2609 (2000))、細網内皮組織(RES)による消失(Zieglerら、Hum Gene Ther. 13: 935-945 (2002); Taoら、Mol Ther. 3: 28-35 (2001))、先天性免疫応答の誘発(Zhangら、Mol Ther. 3: 697-707 (2001); Schneilら、Mol Ther. 3: 708-722 (2001))、未検出の抗体による中和反応(Rahmanら、Mol Ther. 3: 768-778 (2001))、およびある組織および細胞タイプのアデノウイルス亜型の本来の親和性(Bergelson, Biochem Pharmacol. 57: 975-979 (1999))など、いくつかの困難に直面する。さらに、アデノウイルスは強い体液性免疫応答を誘発するので、繰り返し投与するのは難しい(Rahmanら、Mol Ther. 3: 768-778 (2001))。

【0005】

これらの問題のいくつかを解決するために、例えば、PEG(O' Riordanら、Hum Gene Ther. 10: 1349-1358 (1999); Croyleら、Hum Gene Ther. 11: 1713-1722 (2000))またはpHPMA(Fisherら、Gene Ther. 8: 341-348 (2001))のような親水性ポリマーのアデノウイルスカプシドへの共有結合を使用して、纖維を遺伝的に再設計することによってウイルス表面を変化させたり(Hidakaら、J Clin Invest. 103: 579-587 (1999))、rAdをカプセル化してリポソームにしたりする(Yotndaら、Mol Ther. 5: 233-241 (2002))者もいる。アデノウイルス表面を親水性ポリマー(例えば、PEG)で修飾するやり方は、循環半減期が増大し、免疫原性が低下し、溶解性が上がり、インビボ生物活性が適切になることで、PEGでの共有結合修飾により酵素の治療有効性が改善されるという既知の発見に基づいている(Harrisら、Clin Pharmacokinet. 40: 539-551 (2001); Wangら、Adv Drug Deliv Rev. 54: 547-570 (2002))。

【0006】

アデノウイルスとカプセル化するポリマーとの共有結合は、さらなる精製工程を必要とし、その後の化学収率が低下する。さらに、PEGを共有結合させた場合、アデノウイルスの感染力は通常低下する(O' Riordanら、Hum Gene Ther. 10: 1349-1358 (1999); Croyleら、Hum Gene Ther. 11: 1713-1722 (2000))。本発明はこのおよび他の問題を解決するためになされた。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の開示)

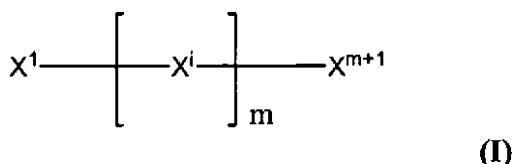
本発明は、コポリマーとアデノウイルスとの非共有結合錯体を規定する。P E I、ポリリジン、D E A E - デキストランおよびその誘導体のようなカチオンポリマーと、P E G およびその誘導体のような非イオン性ポリマーとの組合せであるコポリマーは、細胞中のアデノウイルスの送達および導入遺伝子発現の両方を良好にすることができる。本発明の錯体は、カプセル化されていないアデノウイルスよりさらに治療的に効果があり、容易に製造できる材料を提供する。

【0008】

第一の態様において、本発明は、コポリマーと非共有結合的に錯化されたアデノウイルスを含む錯体を提供する。前記コポリマーは、式I：

【0009】

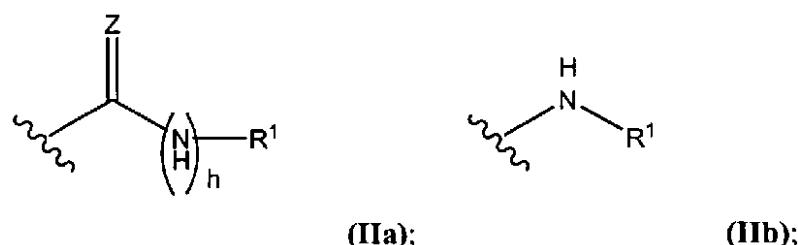
【化18】



(式中、mは1～1,000の整数である)で表される構造を含む。記号iは、2～mの整数であり、 X^i の位置を示す。記号 X^1 、 X^i および X^{m+1} は、独立して、次の要件を満たすモノマーから選択される。すなわち、該モノマーは、(i)第二アミン類および第三アミン類から選択されるアミンを含み、かつ(ii)少なくとも1つのモノマーはQを含む。Qは、式IIaおよび式IIb：

【0010】

【化19】



(式中、Zは、OおよびNHからなる群から選択される)から選択される構造である。記号hは、0～1の整数である。記号R¹は、ポリアルキレングリコール部位を含む。また、本発明のコポリマーは、交差重合を含まず、生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している。

【0011】

第二の態様において、式Iのコポリマーは、非共有結合的に錯化したアデノウイルスコポリマー錯体を生成する方法に関する。

【0012】

第三の態様において、式Iのコポリマーは、アデノウイルスを細胞に導入する方法に関する。この方法において、(a)アデノウイルスは非共有結合的にコポリマーに接触させられ、(b)錯体は細胞に接触させられる。

【0013】

第四の態様において、本発明は、(a)式Iのコポリマーと、(b)非共有結合的錯体を形成するアデノウイルスと、(c)生理学的に許容しうる賦形剤とを含む生理学的製剤提供する。

【0014】

第五の態様において、本発明は、式Iのコポリマーとアデノウイルスとを含み、前記コポリマーと前記アデノウイルスとは非共有結合的に結合しているキットを提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明の他の態様および実施形態は、以下の詳細な記載により明らかになるであろう。

【 0 0 1 6 】**(定義)**

別段の定義がない限り、本明細書で使用されている全ての技術用語および科学用語は、通常、本発明が属する業界の当業者によって普通に理解されている意味と同じ意味を持つ。通常、本明細書で使用されている学名、ならびに以下に記載される細胞培養、分子遺伝学、有機合成、分析化学ならびに核酸化学およびハイブリダイゼーションにおける実験室法は、業界でよく知られかつ一般的に用いられているものである。技術および技法は、通常、業界における従来の方法およびこの明細書を通して挙げられる種々の一般的参考文献（一般的には、Knipeら、FIELDS Virology, 4th ed. (2001) Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA, を参照。これらは参考として本明細書に組み込まれる）に従って行われる。標準的な技術またはその変型が化学合成および分析のために使用される。

【 0 0 1 7 】

「核酸」は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそのポリマーを言い、一本鎖型でも二本鎖型でもよい。これは遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドという語句を包含する。またこの語句は、修飾骨格残基または結合を有する合成の、自然発現の、および非自然発現のヌクレオチド類似体も包含する。これらのヌクレオチド類似体は、参照核酸と似た結合特性を持ち、あるいは、参照ヌクレオチドと似た方法で代謝する。このような類似体の例として、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、ホスホン酸メチル、キラルメチルホスホネート、2-O-メチルリボリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 1 8 】

他に断らない限り、特定の核酸配列は、暗黙のうちに保存的に修飾された変異体（例えば、縮重コドン置換）および相補的な配列、さらに明示的に示された配列も包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1またはそれ以上（または全て）のコドンの3文字目を混合基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列（Batzlerら、Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsukら、J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol Cell Probes 8: 91-98 (1994)）を产生することによって達成してもよい。

【 0 0 1 9 】

語句「細胞に接触」とは、本発明のアデノウイルスまたは錯体の細胞内への内部移行を言う。この語句は、例えば、ウイルスや錯体を静脈内投与や経口投与を経て、細胞内へ内部移行することを包含する。

【 0 0 2 0 】

語句「アデノウイルス」は、一般的に、アデノウイルスゲノムの全てまたは一部を含むポリヌクレオチドを含む。「アデノウイルス」は、ヒト、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ブタ、マウス、およびサルアデノウイルス亜属を始めとするマストアデノウイルス属の動物アデノウイルスをまとめて言うが、これらの例示に限定されるものではない。特に、ヒトアデノウイルスとして、A～F亜属、これらの個々のセロタイプが挙げられ、個々のセロタイプおよびA～F亜属として、ヒトアデノウイルス1型、2型、3型、4型、4a型、5型、6型、7型、8型、9型、10型、11(Ad11AおよびAd11P)型、12型、13型、14型、15型、16型、17型、18型、19型、19a型、20型、21型、22型、23型、24型、25型、26型、27型、28型、29型、30型、31型、32型、33型、34型、34a型、35型、35p型、36型、37型、38型、39型、40型、41型、42型、43型、44型、45型、46型、47型、48および91型が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において有用なウシアデノウ

イルスとして、ウシアデノウイルス1型、2型、3型、4型、7型、および10型が挙げられるが、これらに限定されない。イヌアデノウイルスとして、イヌ1型および2型が挙げられるが、これらに限定されない。興味深いウマアデノウイルスとして、ウマ1型および2型が挙げられるがこれらに限定されない。興味深いブタアデノウイルスとして、例えば、ブタ3型および4型が挙げられる。また、「アデノウイルス」は、核酸の欠失、挿入または突然変異から生成されるもののような、組換えアデノウイルスをまとめて言う。また、組換えアデノウイルスは、異なったセロタイプまたは亜属由来のDNAを結合することから生成することもできる。

【0021】

ここで使用される語句「非共有結合的」とは、イオン結合、静電的相互作用、水素結合、親水性 - 親水性相互作用、疎水性 - 疎水性相互作用、ファンデルワールス相互作用、あるいはこれらの組合せを介して物質同士が結合することを意味する。

【0022】

ここで使用される語句「ポリマー」とは、通常、100万までの繰り返し結合モノマーからなる高分子量の天然および合成化合物を言う。各モノマーは、比較的軽く簡単な分子である。

【0023】

ここで使用される語句「ホモポリマー」とは、単一のタイプのモノマーから誘導されるポリマーを言う。

【0024】

ここで使用される「コポリマー」とは、2種またはそれ以上の非類似のモノマーの併発重合によって製造されるポリマーを言う。

【0025】

ここで使用される「交差重合」とは、ポリアルキレングリコール分子の対向端への2種またはそれ以上のポリアルキレンイミン部位の共有結合を言う。

【0026】

置換基が従来の化学式によって記載されている場合、すなわち、左から右へ書かれている場合、それらの構造が右から左へ書かれたものもそれらと同じものとして包含される。例えば、-CH₂O-は-OCH₂-と同じである。

【0027】

それ自身または他の置換基における一部としての語句「アルキル」は、他に記載がない限り、直鎖または分岐鎖の、または環式の炭化水素基、またはこれらの組合せを意味し、これらは完全に飽和であっても、モノまたはポリ不飽和であってもよく、指定された炭素数を持つ（例えば、C₁ - C₁₀は1~10個の炭素を意味する）二価および多価の基を含み得る。飽和炭化水素基の例示として、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、シクロヘキシリル、（シクロヘキシリル）メチル、シクロプロピルメチルなどの基、例えば、n-ペンチル、n-ヘキシリル、n-ヘプチル、n-オクチルなどの同族体および異性体などが挙げられるが、これらに限定されない。不飽和アルキル基は、1またはそれ以上の二重結合または三重結合をもつ基である。不飽和アルキル基の例示として、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペンタジエニル)、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、および高級同族体および異性体が挙げられるが、これらに限定されない。語句「アルキル」は、他に断らない限り、「ヘテロアルキル」のような、以下でさらに詳しく定義するアルキル誘導体も含む。炭化水素基に限定されるアルキル基は、「ホモアルキル」と命名される。

【0028】

それ自身または他の置換基における一部としての語句「アルキレン」は、アルカンから誘導される二価の基を意味し、-CH₂CH₂CH₂CH₂-が挙げられるが、これに限定されない。さらに、ヘテロアルキレンのような、以下で記載する基も含む。本発明において、アルキル（またはアルキレン）基は、通常1~24個の炭素原子を有し、10個以

下の炭素原子を有するのが好ましい。「低級アルキル」または「低級アルキレン」とは、短いアルキルまたはアルキレン鎖の基であり、一般的に8個以下の炭素原子を有する。

【0029】

語句「アルコキシ」、「アルキルアミノ」および「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）は、慣用的意味で使用され、それぞれ、酸素原子、アミノ基またはイオウ原子を介して分子の残りの部分に結合するアルキル基を言う。

【0030】

それ自身または他の語句と組み合わせての語句「ヘテロアルキル」は、他に記載がない限り、指定された数の炭素と、O、N、SiおよびSからなる群から選択される少なくとも1個のヘテロ原子とを有する、安定な直鎖または分岐鎖の、または環式の炭化水素基、またはその組み合わせを言い、これらの窒素原子およびイオウ原子は、場合によっては酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は場合によっては、四級化されていてもよい。ヘテロ原子O、N、SおよびSiはヘテロアルキル基のどの内部位置に位置していてもよく、あるいはアルキル基が分子の残りの部分と結合している位置に位置していてもよい。これらの例示として、-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-OCH₃、および-CH=CH-N(CH₃)-CH₃が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、-CH₂-NH-OCH₃および-CH₂-O-Si(CH₃)₃のように、2個までのヘテロ原子が連続して存在してもよい。同様に語句「ヘテロアルキレン」は、それ自身または他の置換基の一部として、ヘテロアルキルから誘導される二価の基を意味し、-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-および-CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-が例示されるが、これらに限定されない。ヘテロアルキレン基では、ヘテロ原子が鎖の一末端または両端を占めることもできる（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）。さらに、アルキレン結合基およびヘテロアルキレン結合基では、結合基の向きが該結合基の式が記載された方向によって決まることはない。例えば、式：-C(O)₂R' - は、-C(O)₂R' - も-R'C(O)₂ - も両方表す。

【0031】

それ自身または他の語句と組み合わせての語句「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」は、他に記載がない限り、それぞれ「アルキル」および「ヘテロアルキル」の環状の変形体を表す。したがって、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルは、飽和および不飽和環状結合基を含む。さらに、ヘテロシクロアルキルは、ヘテロ環が分子の残りの部分に結合している位置をヘテロ原子が占めることもできる。シクロアルキルの例示として、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロシクロアルキルの例示として、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルフォリニル、3-モルフォリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0032】

本明細書において、語句「ポリアルキレングリコール」は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリブチレングリコールおよびこれらの誘導体を言う。ポリアルキレングリコール誘導体の例示的な実施形態として、アジペートジヒドラジド-メトキシ-ポリエチレングリコールがある。他の例示的な実施形態として、Shearwater Corporationのカタログ "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001) に列挙されたものがある。

【0033】

語句「アリール」は、他に記載がない限り、ポリ不飽和芳香族炭化水素置換基を意味し、これは、単環または複数の環（好ましくは1～3環）であり、互いに縮合あるいは共有結合で結合している。語句「ヘテロアリール」は、N、OおよびSから選択される1～4個のヘテロ原子を含むアリール基（または環）であって、該基中、窒素原子およびイオウ原子は、場合によっては、酸化されていてもよく、窒素原子は、場合によっては、四級化されていてもよいものを言う。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を介して分子の残りの部分に結合することができる。アリール基およびヘテロアリール基の限定ではない例示として、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ビフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソキサゾリル、4-イソキサゾリル、5-イソキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、ブリニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリルおよび6-キノリルが挙げられる。上記したアリール環およびヘテロアリール環の各環の置換基は、以下に記載する許容しうる置換基の群から選ばれる。

【0034】

簡略化するために、他の語句と組み合わせて用いる時の語句「アリール」（例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）は、上記したアリール環もヘテロアリール環も含む。したがって、語句「アリールアルキル」は、該基中のアリール基が、アルキル基に結合した基（例えば、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど）であって、前記アルキル基は、該基中の炭素原子（例えばメチレン基）が、例えば、酸素原子によって置き換えられているもの（例えば、フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-(1-ナフチルオキシ)プロピルなど）も含むことを意味する。

【0035】

ここで使用される語句「オキソ」は、二重結合で炭素原子と結合する酸素を意味する。

【0036】

上記の各語句（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」）は、示された基の置換された、および置換されていない両方の形を含むことを意味する。各タイプの基の例示的な置換基は、以下に記載する。

【0037】

アルキル基およびヘテロアルキル基（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニルおよびヘテロシクロアルケニルとしてしばしば記載される基も含まれる）の置換基として、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R"、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R"R'"、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R"、-OC(O)NR'R"、-NR"C(O)R'、-NR'-C(O)NR'R"、-NR" C(O)₂R'、-NR-C(NR'R")R'" = NR""、-NR-C(NR'R")R'" = NR""、-S(0)R'、-S(0)R"、-S(0)NR'R"、-NRSO₂R'、-CNおよび-NO₂の種々の基の1またはそれ以上を挙げることができるが、これらに限定されない。その数は、0～(2m'+1)（式中、m'は該基中の炭素原子の総数である）の範囲である。R'、R"、R'"およびR""は、それぞれ独立して、水素、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換アリール、例えば1～3個のハロゲンで置換されたアリール、置換または非置換アルキル、アルコキシ基またはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を言う。本発明の化合物が複数のR基を含む場合は、例えば、これらの基の複数が存在する場合の各R'、R"、R'"、R""と同様に、各R基は独立して選択される。R'およびR"が同一の窒素原子に結合する場合、それらは窒素原子といっしょになって5-、6-または7-員環を形成するこ

とができる。例えば、-NR'R"は、1-ピロリジニルおよび4-モルフォリニル（これらに限定されない）を含むことを意味する。置換基に関する以上の検討から、当業者であれば、語句「アルキル」は、ハロアルキル（例えば、-CF₃および-CH₂CF₃）およびアシリル（例えば、-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OCH₃など）のような水素以外の基に結合する炭素原子を含む基を含むことを理解するであろう。

【0038】

アルキル基で記載した置換基と同様に、アリール基およびヘテロアリール基の置換基も種々あり、例えば、ハロゲン、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R"、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R"R'"、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R"、-OC(O)NR'R"、-NR"C(O)R'、-NR'-C(O)NR'R"、-NR'C(O)₂R'、-NR-C(NR'R")=NR"、-S(OR'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R"、-NRSO₂R'、-CNおよび-N₂O、-R'、-N₃、-CH(Ph)₂、フルオロ(C₁-C₄)アルコキシおよびフルオロ(C₁-C₄)アルキルから選択される。その数は、0から芳香族環上の開放原子価の総数の範囲であり、R'、R"、R"'およびR""は、独立して水素、アルキル、ヘテロアルキル、アリールおよびヘテロアリールから選ばれる。本発明の化合物が複数のR基を含む場合は、例えば、これらの基の複数が存在する場合の各R'、R"、R"'、R""と同様に、各R基は独立して選択される。

【0039】

アリールまたはヘテロアリール環の隣り合った原子上の2個の置換基は、場合によつては、式：-T-C(O)-(CRR')_q-U-（式中、TおよびUは、独立して、-NR-、-O-、-CRR'または単結合であり、qは0～3の整数である）の置換基で置き換えられてもよい。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣り合った原子上の2個の置換基は、場合によつては、式：-A-(CH₂)_r-B-（式中、AおよびBは、独立して、-CRR'、-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂、-S(O)₂NR'または単結合であり、rは1～4の整数である）の置換基で置き換えられてもよい。そのように形成された新しい環の単結合の1つは、場合によつては、二重結合と置き換わってもよい。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣り合った原子上の2個の置換基は、場合によつては、式：-(CRR')_s-X-(CR'R")_d-（式中、sおよびdは、独立して、0～3の整数であり、Xは-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-または-S(O)₂NR'である）の置換基で置き換えられてもよい。置換基R、R'、R"およびR"'は、独立して、水素または置換もしくは非置換(C₁-C₆)アルキルから選択されるのが好ましい。

【0040】

ここで使用される語句「ヘテロ原子」は、酸素(O)、窒素(N)、イオウ(S)およびケイ素(Si)を含むことを意味する。

【0041】

化合物の中性の形は、塩基または酸に塩が接触し、従来の方法で親化合物を分離することによって再生されることが好ましい。該親化合物は、極性溶剤中の溶解性のようなある物性に関し、種々の塩の形のものとは相違する。

【0042】

本発明は、塩の形のものに加えて、プロドラッグの形の化合物も提供する。ここで記載する化合物のプロドラッグは、生理学的条件下で容易に化学反応を起こし、本発明の化合物を提供する化合物である。さらにプロドラッグは、エキソビオ環境で化学的または生化学的方法によって本発明の化合物に変換することができる。

【0043】

ここで使用される語句「環」は、場合によつてはその構成配置内にヘテロ原子を有する原子の環状構成配置を意味する。環は、置換または非置換シクロアルキル、置換または非

置換ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールのような芳香族および非芳香族部位を含む。環中の原子の数は、通常、環を構成する員数によって規定される。例えば「5～7員環」は、構成配置内に5～7個の原子があることを意味する。各構成員は、場合によっては、ヘテロ原子であることもある。したがって、語句「5～7員環」は、例えば、ピリジニル環、ピペリジニル環およびチアゾリル環を含む。環は、通常、添え字付きの括弧内に单一の明示的な置換基によって描かれる。添え字は通常1～10のような一連の整数を表す。該整数は、各置換基は場合によっては異なることがある環置換基の数を表す。例えば、置換基(R^1)_s(式中、sは2である)では、該環は、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルで置換されていてもよい。

【0044】

ここで使用される語句「ポリ(多)」は、少なくとも2であることを意味する。例えば、多価金属イオンは少なくとも2価の金属イオンを意味する。

【0045】

「部位」は、他の構造に結合する分子の基を言う。

【0046】

記号

【0047】

【化20】

~~~

は、それが結合として利用されても結合に対して垂直に表示されても、該表示部位が分子の残りの部分に結合している位置を示す。

#### 【0048】

本発明のある化合物は、不斉炭素原子(光学中心)または二重結合を有し、ラセミ体、ジアステレオマー、幾何異性体、および単一の異性体も本発明の範囲内に包含される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0049】

(発明の詳細な説明)

(I.序論)

本発明は、ウイルス粒子を非共有結合的にカプセル化し、錯体を形成するコポリマーに関する。該錯体は、容易に製造され(例えば、ウイルスとポリマーとを混合することによって)、細胞内で核酸を発現するために使用することができる。共有結合的に結合しているポリマーとは対照的に、アデノウイルスのような錯体生物学的材料の化学的修飾を必要とせず、それによって、発生可能な反応生成物の大きな特性確認を避けることができる。核酸の細胞への導入は、例えば、治療目的あるいは診断目的(例えば、レポーター遺伝子を使用すること)に有用である。例えば、数種の実験的癌治療にアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターの多種の態様が利用されている。例えば、米国特許第5,846,945号、第5,801,029号、PCT/US99/08592号、米国特許第5,747,469号、PCT/US98/03514号およびPCT/US97/22036号を参照。本発明のウイルス/ポリマー錯体は、インビトロ、インビボ、またはエキソビボのどの形態においても、興味深い核酸を異なるタイプの細胞に移動させるために使用することができる。

#### 【0050】

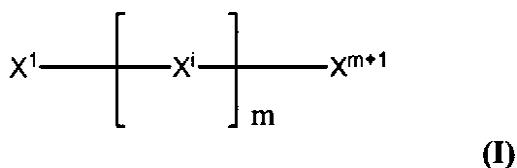
(II.組成)

(A.コポリマー)

第一の態様で、本発明は、コポリマーに非共有結合的に錯化したアデノウイルスを含む錯体を提供する。コポリマーは、式I:

#### 【0051】

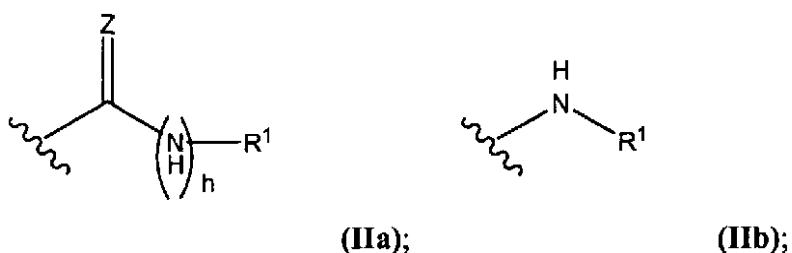
【化 2 1】



(式中、 $m$  は、1 ~ 1, 000 の整数である) の構造を含む。記号  $i$  は 2 ~  $m$  の整数であり、 $X^i$  の位置を示す。記号  $X^{-1}$ 、 $X^i$  および  $X^{m+1}$  は、独立して、次の要件を満たすモノマーから選択される。すなわち、該モノマーは、(i) 第二アミン類および第三アミン類から選択されるアミンを含み、かつ(ii) 該モノマーの少なくとも 1 つは Q を含む。Q は、式 IIA および式 IIB :

〔 0 0 5 2 〕

【化 2 2】



(式中、Zは、0およびN Hからなる群から選択される)から選択される構造である。記号hは、0~1の整数である。記号R<sup>1</sup>は、ポリアルキレングリコール部位を含む。また、本発明のコポリマーは、交差重合を含まず、生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに蓄電している。

[ 0 0 5 3 ]

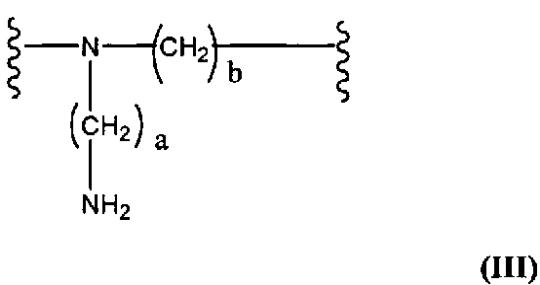
例示的な実施形態において、前記モノマーの少なくとも1つはさらに、-NH<sub>2</sub>および-OHから選択される化学的部位を含む。Qが式IIaから選択される場合は、少なくとも1個のQは、窒素および酸素から選択される原子を介して前記モノマーに共有結合で結合している。Qが式IIbから選択される場合は、少なくとも1個のQは、炭素原子を介して前記モノマーに共有結合で結合している。

[ 0 0 5 4 ]

例示的な実施形態としては、Qは式IIaであり、hは0であり、Zは0であり、前記モノマーは式III：

【 0 0 5 5 】

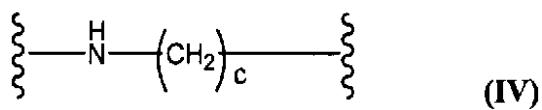
【化 2 3】



(式中、 $a$ は1～10の整数であり、 $b$ は1～10の整数である)の構造を含む。他の例示的な実施形態としては、 $Q$ は式I I aであり、 $h$ は0であり、 $Z$ は0であり、前記モニマーは式I V：

【 0 0 5 6 】

## 【化24】



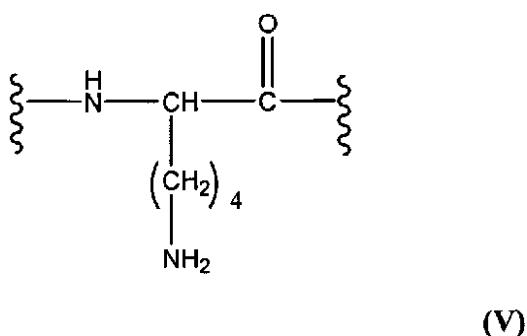
(式中、cは1～10の整数である)の構造を含む。さらに他の例示的な実施形態としては、Qは式IIaであり、hは0であり、Zは0であり、前記コポリマーは、a)式II  
I(式中、aは1～10の整数であり、bは1～10の整数である)の構造を持つモノマーを少なくとも1個と、b)式IIV(式中、cは1～10の整数である)の構造を持つモノマーを少なくとも1個有する。さらに他の例示的な実施形態としては、aは2である。他の例示的な実施形態としては、bは2である。例示的な実施形態としては、cは2である。さらに他の例示的な実施形態としては、aは3である。他の例示的な実施形態としては、bは3である。例示的な実施形態としては、cは3である。他の例示的な実施形態では、前記モノマーはエチレンイミンである。

## 【0057】

例示的な実施形態としては、Qは式IIa(式中、hは0であり、Zは0である)であり、前記モノマーは式V:

## 【0058】

## 【化25】



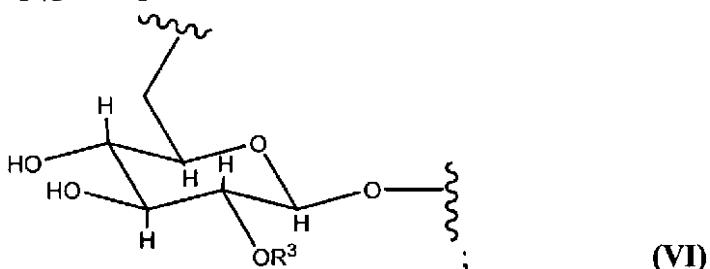
の構造を含む。他の例示的な実施形態では、前記モノマーはリジンである。

## 【0059】

例示的な実施形態としては、Qは式IIa(式中、hは1であり、ZはNHである)であり、前記モノマーは、式VI:

## 【0060】

## 【化26】



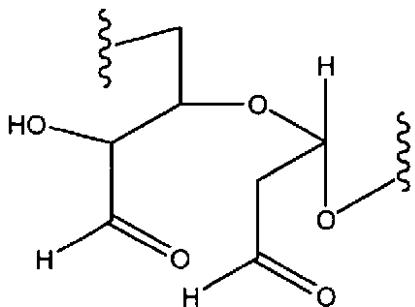
(式中、R<sup>3</sup>はH、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>および-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>から選択される基である)の構造を含む。他の例示的な実施形態では、R<sup>3</sup>は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R<sup>3</sup>は、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>および-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>から選択される基である。他の例示的な実施形態では、前記モノマーはDEAE-デキストランである。

## 【0061】

例示的な実施形態において、Qは式VIIbであり、前記コポリマーは、a)式VII (式中、R<sup>3</sup>はH、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>および-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>から選択される基である)の構造を含むモノマーを少なくとも1個、およびb)式VIII:

## 【0062】

## 【化27】



(VII)

の構造を含むモノマーを少なくとも1個を含む。他の例示的な実施形態において、R<sup>3</sup>は、前記モノマーの3個のうちの約2個についてはHであり、前記モノマーの3個のうちの約1個については、R<sup>3</sup>は、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>および(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>から選択される基である。他の例示的な実施形態において、式VIIの構造を含む前記モノマーの割合は、5%と25%との間である。さらに他の例示的な実施形態では、前記モノマーの3個のうちの約2個はHでありおよび前記モノマーの3個のうちの約1個はHであり、残りのR<sup>3</sup>は、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>および(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>から選択される基であり、式VIIの構造を含む前記モノマーの割合は、5%と25%との間である。

## 【0063】

ある実施形態において、非イオン性ポリマーはポリアルキレングリコール部位であって、前記モノマーのいくつかと共有結合で結合している部位を含む。ある実施形態では、この共有結合は、第二級アミンまたは第三級アミン、アミド、ジヒドラジド、エステル、尿素、イソ尿素、カルバメートまたはウレタンを形成する。ポリアルキレングリコールの例示として、ポリエチレングリコール(PEG)およびその誘導体が含まれる。

## 【0064】

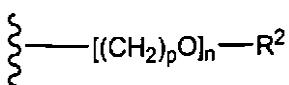
一実施形態において、ポリエチレングリコール(PEG)のような非イオン性ポリマーの、PEI、ポリリジン、DEAE-デキストランおよびこれらの変種のようなカチオンポリマーへの付加は、コポリマーとウイルスとによって形成される錯体の沈殿および凝集を阻止し、したがって、錯体の溶解性を高くる。他の実施形態では、PEGはトランスフェクション効率を高めるように機能する。

## 【0065】

他の例示的な実施形態において、R<sup>1</sup>は式VIII:

## 【0066】

## 【化28】



(VIII)

の構造を含む。記号nは2~2,000の整数である。記号pは1~8の整数である。R

<sup>2</sup> は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3～7員シクロアルキル、置換または非置換5～7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である。さらに他の例示的な実施形態では、pは2である。

## 【0067】

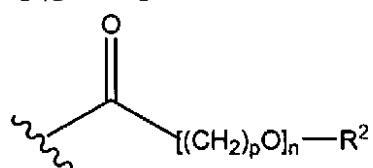
本発明のコポリマーにおいて、カチオンポリマーのモノマーの非イオン性ポリマーによる置換の度合いは異なる。例えば、カチオンポリマーPEI中のエチレンイミンモノマーの15%は、非イオン性ポリマーPEGによって置換されている。非イオン性ポリマー置換の度合いは、10%と20%との間である場合もある。非イオン性ポリマー置換の度合いは、10%と30%との間である場合もある。非イオン性ポリマー置換の度合いは、15%と25%との間の場合もある。非イオン性ポリマー置換の度合いは、約20%である場合もある。非イオン性ポリマー置換の度合いは、10%と40%との間の場合もある。

## 【0068】

例示的な実施形態において、Qで置換されているモノマーの割合は、少なくとも10%であり、Qは、式IX：

## 【0069】

## 【化29】



(IX)

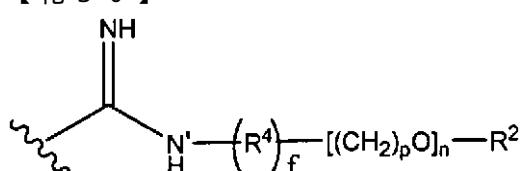
の構造を持つ。記号nは2～2,000の整数である。記号pは1～8の整数である。R<sup>2</sup>は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3～7員シクロアルキル、置換または非置換5～7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である。さらに他の例示的な実施形態では、pは2である。他の例示的な実施形態では、Qで置換されているモノマーの割合は、15～30%である。さらに他の例示的な実施形態において、Qで置換されているモノマーの割合は、17～22%である。

## 【0070】

例示的な実施形態において、Qで置換されているモノマーの割合は、少なくとも10%であり、Qは、式X：

## 【0071】

## 【化30】

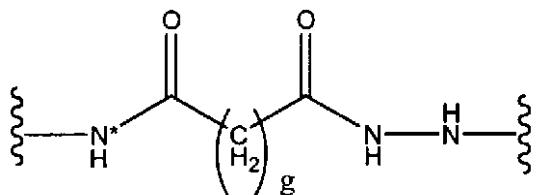


(X)

の構造を持つ。記号nは2～2,000の整数である。記号pは1～8の整数である。記号fは0～1の整数である。fが1の場合、記号R<sup>4</sup>は式XI：

## 【0072】

【化31】



(XI)

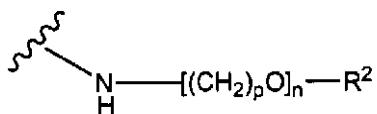
の構造を持つ。図式XⅠ中、N'が共有結合でN\*に結合しており、gは1～9の整数である。記号R<sup>2</sup>は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3～7員シクロアルキル、置換または非置換5～7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である。他の例示的な実施形態では、fは0である。さらに他の例示的な実施形態では、fは1である。さらに他の例示的な実施形態では、gは4である。他の例示的な実施形態では、Qで置換されているモノマーの割合は、15～30%である。他の例示的な実施形態では、Qで置換されているモノマーの割合は、17～22%である。

【0073】

例示的な実施形態において、Qで置換されているモノマーの割合は、少なくとも10%であり、Qは式XⅡ：

【0074】

【化32】



(XII)

の構造を持つ。記号nは2～2,000の整数である。記号pは1～8の整数である。R<sup>2</sup>は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換3～7員シクロアルキル、置換または非置換5～7員ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから選択される基である。他の例示的な実施形態では、Qで置換されているモノマーの割合は15～30%である。他の例示的な実施形態では、Qで置換されているモノマーの割合は17～22%である。

【0075】

例示的な実施形態において、錯体の直径は約20nmと約300nmとの間である。他の例示的な実施形態では、錯体の直径は、約80nmと約150nmとの間である。

【0076】

例示的な実施形態において、R<sup>2</sup>は、置換および非置換アルキル、置換および非置換アリール、葉酸塩、トランスフェリン、ガラクトース、グルコース、抗体、抗体断片およびペプチドから選択されるものである。他の例示的な実施形態では、R<sup>2</sup>はメチルである。他の例示的な実施形態では、pは2である。他の例示的な実施形態では、pは2、aは2、bは2、およびcは2である。

【0077】

例示的な実施形態において、コポリマーのアデノウイルスに対する比は、3,500：1と30,000：1との間である。他の例示的な実施形態において、コポリマーのアデノウイルスに対する比は、3,600：1と20,000：1との間である。さらに他の例示的な実施形態においては、コポリマーのアデノウイルスに対する比は、10,000：1と30,000：1との間である。

【0078】

本発明のコポリマーは、ある範囲の物理的次元を有することができる。例えば、本発明のコポリマーのあるものの平均分子量は、約100キロドルトン(kDa)と約300kDaとの間である。ある実施形態においては、該平均分子量は、125kDaと250kDaとの間である。他の実施形態においては、平均分子量は約150kDaと約170kDaとの間である。コポリマーの長さは、アデノウイルスと形成される錯体が実質的に電気的中性であれば、そう重大な意味は持たない。例示的な実施形態において、記号mは10～900の整数である。他の例示的な実施形態では、記号mは50～600の整数である。さらに他の例示的な実施形態では、記号mは75～300の整数である。

#### 【0079】

##### (コポリマーの製造)

以下の例示的なスキーム1～5で、本発明の化合物の製造方法を説明する。これらの方  
法は、挙げられた化合物の製造に限定されることはなく、同様に他の化合物を製造するため  
に使用することもできる。また、本発明の化合物は、該スキームに明示的に記載されてい  
ない方法によっても製造することができる。化合物は、容易に入手しうる原料や公知の  
中間体を使用して製造することもできる。

#### 【0080】

最も一般的な形のコポリマーは、カチオンポリマーを、一末端を除いて非反応性基でキ  
ヤッピングされた非イオン性ポリマーと反応させることによって形成する。例えば、コポ  
リマーPEG-mPEGは、カチオンポリマーPEIと、一末端はメトキシ基でキヤッピングされ、他末端にサクシンイミジルプロピオネート基を有する非イオン性ポリマーPE  
Gとの反応によって形成される。

#### 【0081】

##### (非イオン性ポリマー)

本発明で、ポリアルキレングリコールのような非イオン親水性ポリマーは、共有結合で  
カチオンポリマーに結合している。適切なポリアルキレングリコールが、アルドリッヂケ  
ミカル社から市販されているプロピレングリコールおよびポリ(1,2-ブチレングリコ  
ール)、およびネクター・セラピューティックス社から市販されているポリエチレングリ  
コールおよびその誘導体を始めとして、多くの供給元から市販されている。ポリアルキ  
レングリコールサブユニットが、第二または第三級アミン、アミド、ジヒドラジド、エステ  
ル、尿素、イソ尿素、カルバメート、ウレタンまたはその組み合わせのような基を介して  
カチオンポリマーと共有結合で結合している場合もある。ポリアルキレングリコールサブ  
ユニットの数(n)は、例えば、2～2,000の間の数でありえる。本発明の化合物の  
いくつかは、サブユニットの数が45～1,200の間の数である。本発明の他の化合物  
のサブユニットの数は250～1,000の間の数である。

#### 【0082】

望ましくない副反応を減らすために、ポリアルキレングリコールを、例えば、アルコキ  
シ基のようなエーテル結合形成基でキヤッピングすることができる。本発明のある化合物  
においては、モノメトキシポリエチレングリコール(mPEG)がキヤッピング基として  
使用される。キヤッピング基の他の例示として、置換および非置換アルキル、置換および  
非置換アリール、葉酸塩、トランスフェリン、ガラクトース、グルコース、抗体、抗体断  
片およびペプチドが挙げられる。さらに他のPEG用キヤッピング基の例示を、ネクター  
・セラピューティックス社(以前はシェアウォーター・ポリマーズ社)(バーミンガム、  
アラバマ)2001年のカタログ(インターネット(ワールドワイドウェブ)nектa  
r.com上で入手可能)中に見つけることができる。これは参考として本明細書に組み  
込まれる。

#### 【0083】

ある実施形態では、カチオンポリマーへカップリングする前に、非イオン性ポリマーを  
化学的に活性化する。活性化PEG(この例示ではmPEG)の潜在的に有用な形として  
、例えば、塩化シアヌルmPEG、サクシンイミジルサクシネートmPEG、トレシルm  
PEGおよびサクシンイミジルプロピオネートmPEG(mPEG-SPA)が挙げられ

る。さらに他の活性化 P E G 基の例示として、上記のネクター・セラピューティックス社のカタログ中に見つけ出すことができる。

## 【0084】

## (カチオンポリマー)

本発明のカチオンポリマーは、プラスに帯電しているモノマーを表す、記号  $X^1$ 、 $X^i$ 、および  $X^{m+1}$  を含む。これらプラスに帯電しているモノマーは、カチオンポリマーを形成する。これらプラスに帯電しているモノマーは、第二アミンまたは第三級アミンを含み、同様に、第一アミンまたはアルコール官能基も含みうる。本発明のカチオンポリマーの平均分子量は、約 800 ドルトンと約 800,000 ドルトンの間でりえる。ある実施形態では、平均分子量は、2,000 ドルトンと 100,000 ドルトンとの間である。他の実施形態では、平均分子量は約 15,000 ドルトンと約 50,000 ドルトンとの間である。さらに、m によって表されるカチオンポリマーの長さは、1 と 1000 との間で変更することができる。ある実施形態において、m は 10 と 900 との間の自然数である。他の実施形態では、m は 50 と 600 との間の自然数である。さらに他の実施形態で、m は 75 と 300 との間の自然数である。

## 【0085】

例示的な実施形態において、カチオンポリマーは、ポリアルキレンイミン、ポリリジン、D E A E - デキストランおよび D E A E - デキストラン変種である。

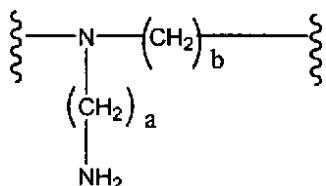
## 【0086】

## (カチオンポリマー：ポリアルキレンイミン)

例示的な実施形態において、カチオンポリマーはポリアルキレンイミンである。ポリアルキレンイミンは以下のモノマー：

## 【0087】

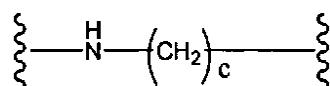
## 【化33】



(式中、a および b は 1 ~ 10 の間の整数である)を含む場合がある。ある場合は a が 2 であり、b が 2 である。他の場合は a が 3 であり、b が 3 である。ポリアルキレンイミンは以下のモノマー：

## 【0088】

## 【化34】



(式中、c は 1 ~ 10 の間の整数である)を含む場合もある。ある場合は、c は 2 である。他の場合では c は 3 である。さらに他の場合は、ポリアルキレンイミンは、上記したモノマーの混合物である。さらに他の場合では、ポリアルキレンイミンはポリエチレンイミン (P E I) である。

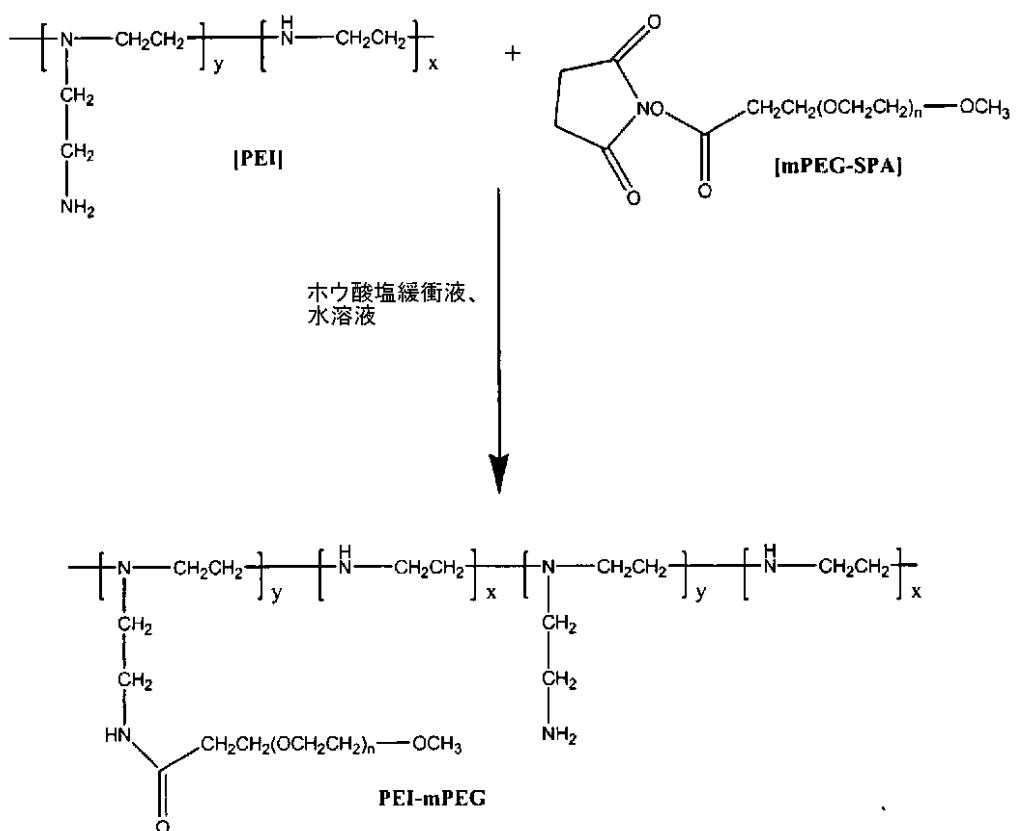
## 【0089】

例示的なポリエチレンイミン - P E G コポリマーは、スキーム 1 の方法によって製造される。

## 【0090】

【化35】

スキーム1



このスキームにおいては、PEI-mPEGコポリマーを製造するために、ホウ酸塩緩衝液を含む水溶液中でPEIを、メチル基でキャッピングされたサクシンイミド-活性化PEGに反応させる。ある実施形態においては、ポリアルキレンイミンは、スキーム1での構造であって、yに対するxの比が1:1と5:1との間である構造のモノマーを含む。該比はまた、例えば、2:1または3:1もとりうる。適切なポリアルキレンイミンが、アルドリッヂケミカル社から市販されているポリエチレンイミン、ポリサイエンス社から市販されているポリエチレンイミン、およびBASFから市販されているPOLYMINポリ(エチレンイミン)およびLUPASOL(登録商標)ポリ(エチレンイミン)を始めとして、多くの供給元から市販されている。

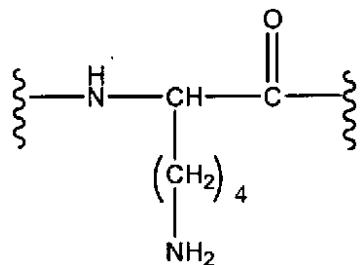
## 【0091】

(カチオンポリマー：ポリリジン)

本発明で使用される他の例示的なカチオンポリマーは、ポリリジンである。ポリリジンは、シグマケミカル社を始めとして多くの供給元から市販されている。ポリリジンは以下の構造：

## 【0092】

## 【化36】



を有するモノマーから構成される。

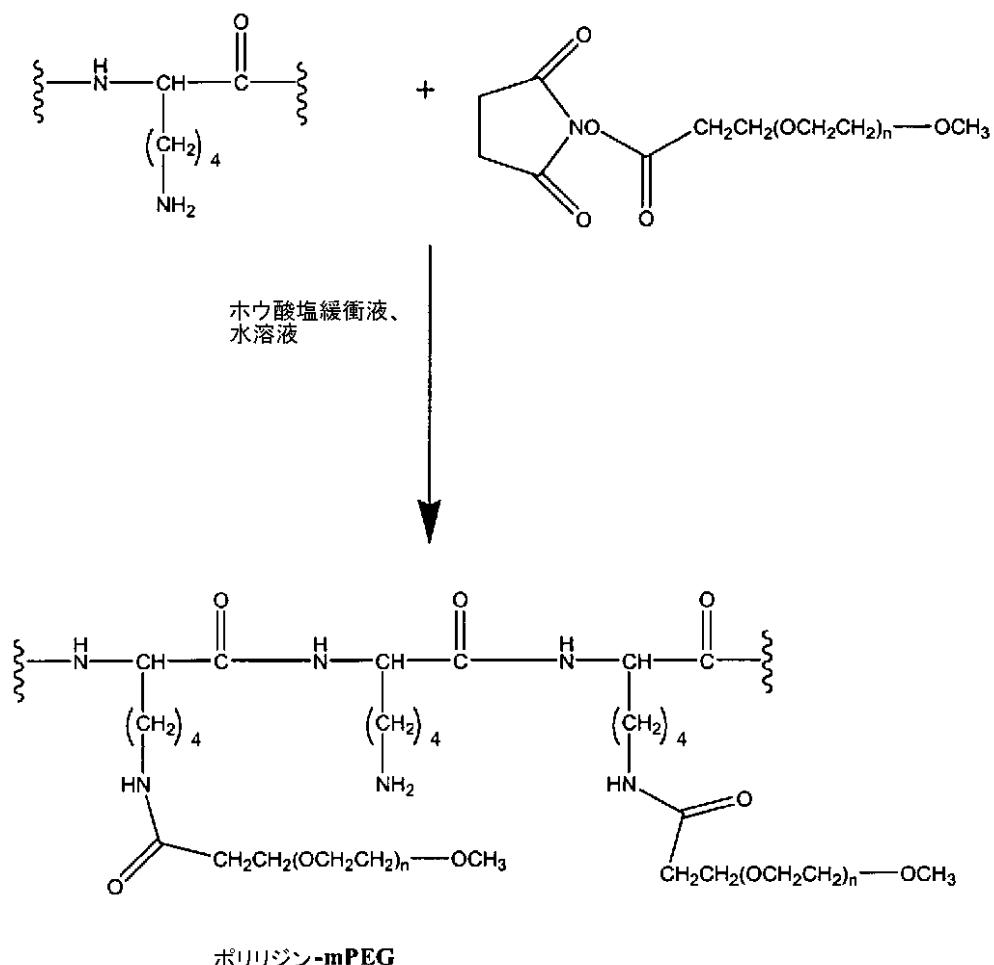
【0093】

ポリリジン - PEG コポリマーは、スキーム 2 の方法によって製造される。

【0094】

【化37】

スキーム 2



このスキームにおいては、ポリリジン - mPEG コポリマーを製造するために、ホウ酸塩緩衝液を含む水溶液中でポリリジンを、メトキシ基でキャッピングされたサクシンイミジルプロピオネート - 活性化 PEG に反応させる。

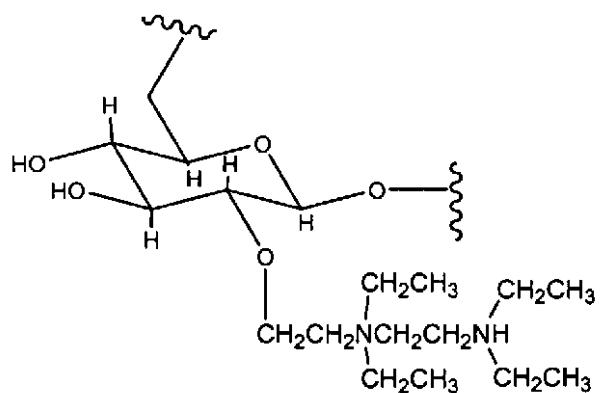
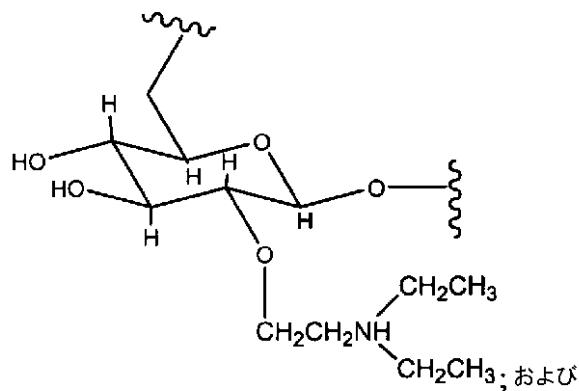
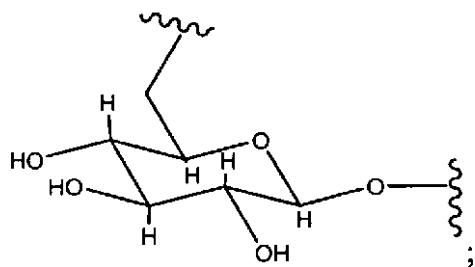
【0095】

(カチオンポリマー : D E A E - デキストラン)

本発明で使用される他の例示的なカチオンポリマーは、D E A E - デキストランである。D E A E - デキストラン塩酸塩は、シグマケミカル社を始めとする多くの供給元から市販されている。D E A E - デキストランは、以下に列挙するモノマーの混合物を含むことができる。

【0096】

【化 3 8】

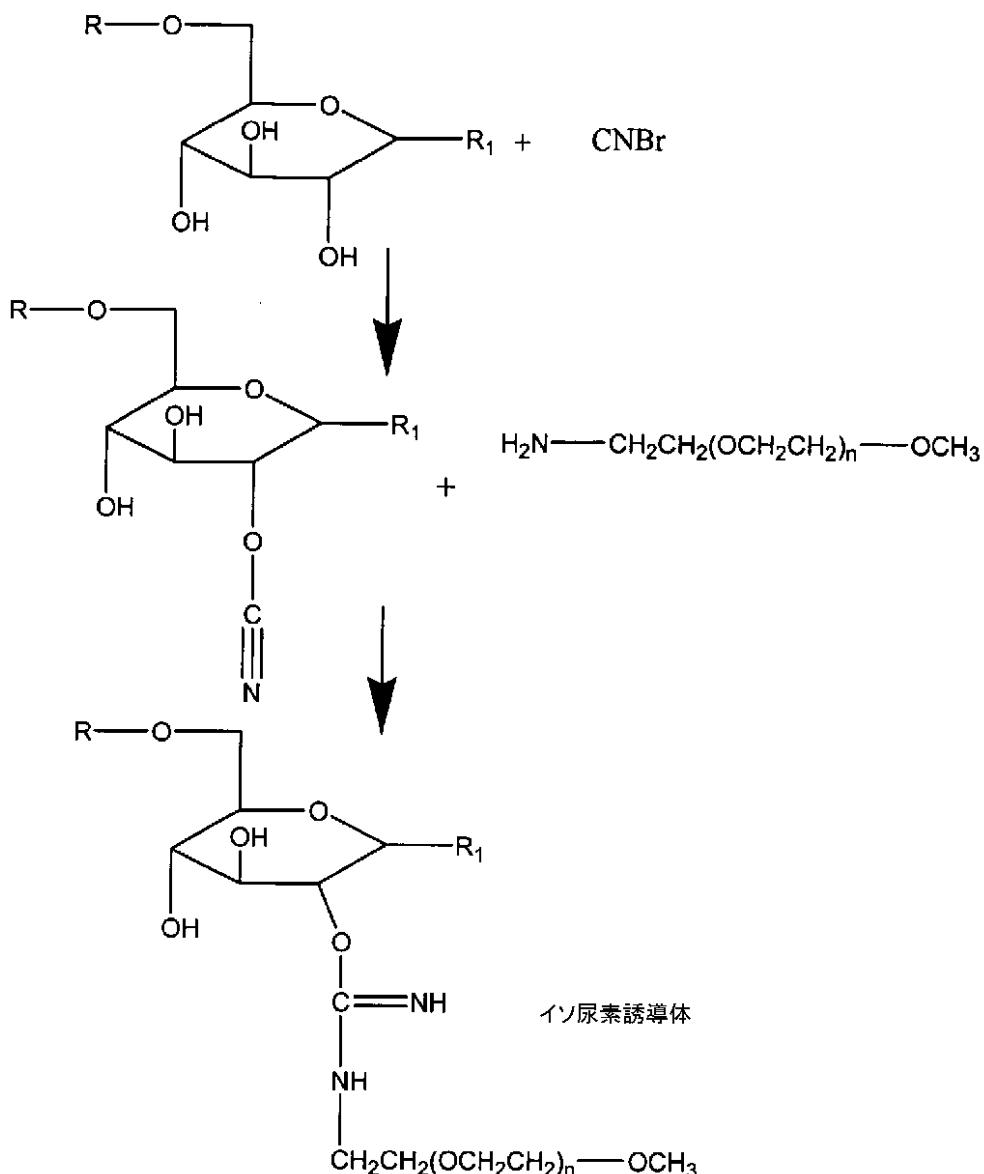


D E A E - デキストラン - P E G コポリマーは、スキーム 3 の方法によって製造される。  
。

【0 0 9 7】

## 【化39】

## スキーム3



このスキームにおいては、活性化サッカライドニトリルを製造するために、アセトン 60 %、水 30 % およびトリエチルアミン 10 % の溶剤中、-15°でサッカライドを臭化シアンと反応させる。続けて、水性酢酸塩緩衝液中、4°で 24 時間、アミン置換 mPEG と混合して、DEAЕ - デキストラン - mPEG イソ尿素を形成する。該実施形態において DEAЕ - デキストランがカチオンポリマーである場合、非置換グルコースサブユニットの DEAЕ - 置換グルコース（単数および複数 DEAЕ - 置換を含む）サブユニットに対する比は、1 : 1 と 5 : 1 との間である。該比は、例えば、2 : 1 または 3 : 1 も取りうる。

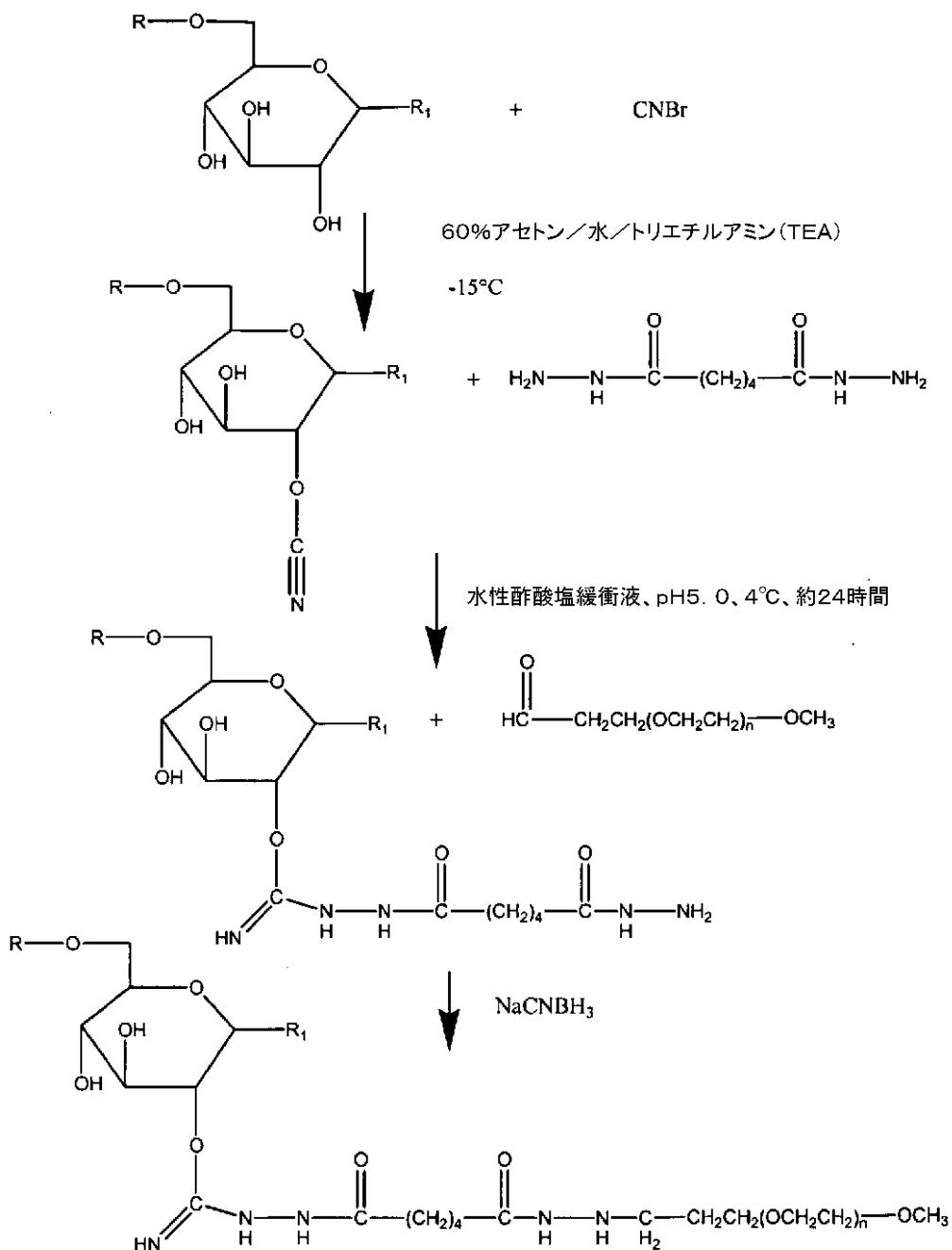
## 【0098】

他の例示的な実施形態において、アジペートジヒドラジドリンカーを有する DEAЕ - デキストラン - PEG コポリマーは、スキーム 4 の方法によって製造される。

## 【0099】

【化40】

スキーム4



このスキームにおいて、活性化サッカライドニトリルを製造するために、アセトン 60 % : 水 30 % : トリエチルアミン 10 % 溶剤中、-15°C で、サッカライドを臭化シアノと反応させる。活性化ポリマーは、まず、アジピン酸ジヒドラジドと反応させ、続けて、シアノ水素化ホウ素ナトリウムの存在下でアルデヒド官能基を有する mPEG と反応させ、アジペートジヒドラジドリンカーを有する D E A E - デキストラン - P E G コポリマーを得る。該実施形態において D E A E - デキストランがカチオンポリマーである場合、非置換グルコースサブユニットの D E A E - 置換グルコース（単数および複数 D E A E - 置換を含む）サブユニットに対する比は、1 : 1 と 5 : 1 の間である。該比は、例えば、2 : 1 または 3 : 1 もとりうる。

【0100】

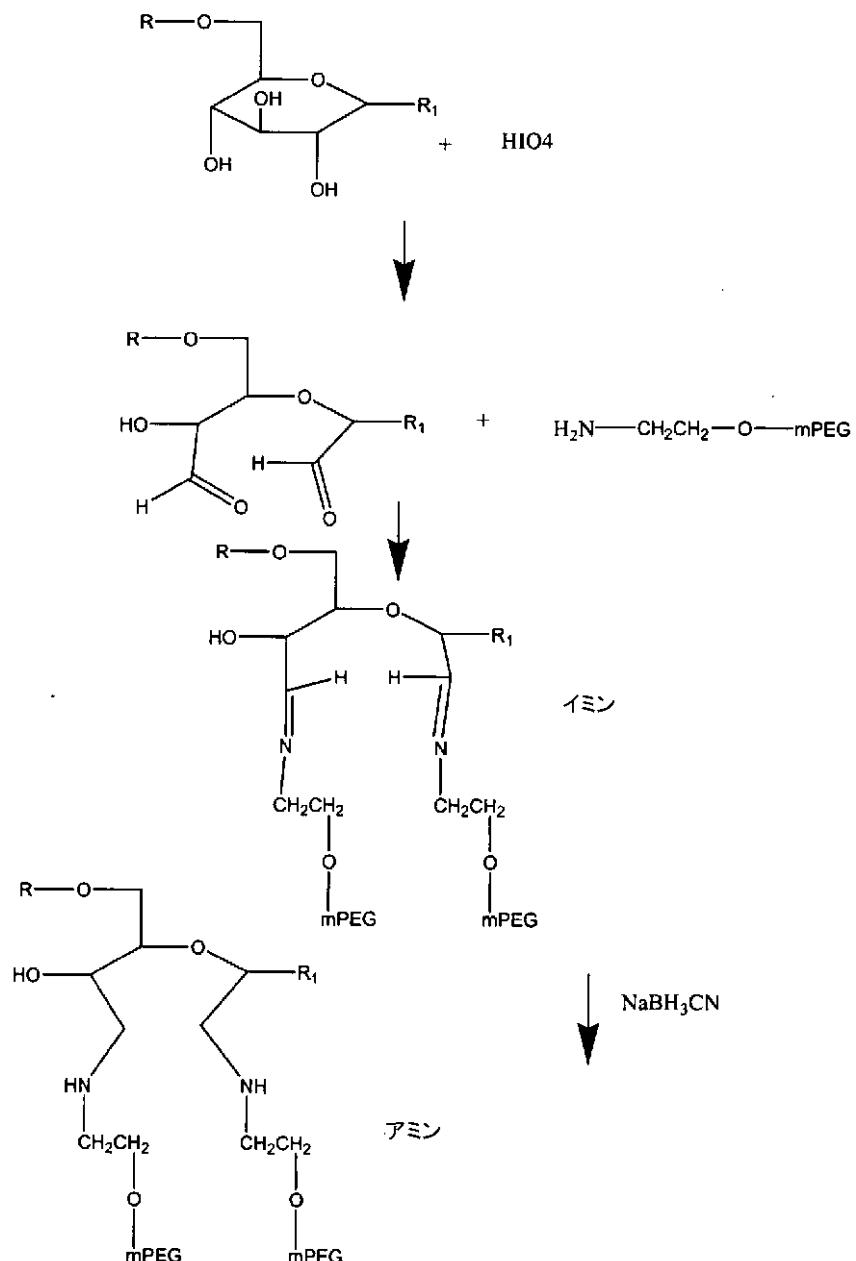
(カチオンポリマー : D E A E - デキストラン変種)

他の例示的な実施形態において、ある D E A E - デキストラン - P E G コポリマー変種が製造される。D E A E - デキストラン変種は、上で列挙したモノマーを含むことができる。D E A E - デキストラン - P E G コポリマー変種は、スキーム 5 の方法によって製造される。

【0101】

【化41】

スキーム5



このスキームでは、隣接する水酸基をジアルデヒドに酸化するために、サッカライドを過ヨウ素酸と反応させる。引き続き、アミン - 置換 m P E G と混合し、D E A E - デキストラン - m P E G イミンコポリマー変種を形成する。続くシアノ水素化ホウ素ナトリウムでの還元により D E A E - デキストラン - m P E G アミンコポリマー変種を製造する。

【0102】

(B. ウィルス)

ウィルスは、特定の細胞タイプに対する高い核酸送達効率を示すが、感染した宿主の免

疫システムによっては、検出されない場合が多い。これらの特徴によって、あるウイルスは遺伝子治療での用途に遺伝子送達ビヒクルとして、魅力的な候補となる。レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス（AAV）および単純ヘルペスウイルスが遺伝子治療において普通使用されるウイルスとして挙げられる例である。前記各ウイルスには、長所と限界があり、したがって、所定の遺伝子治療への適正に応じて選択することができる。

#### 【0103】

外来DNA送達用のベクターとしてのアデノウイルスは、近代分子生物学の道具として広範に使用されている。アデノウイルスの複製は、ほとんどのレトロウイルスベクターとは対照的に、受容宿主細胞が分裂することを必要としない。アデノウイルスは、哺乳動物細胞と発現たんぱく質に入るよう設計することができるが、一方、感染性ウイルス子孫の产生には問題がある。

#### 【0104】

アデノウイルスベクターは、増殖性感染に必要とされる種々の遺伝子において、複製コンピテントとしてあるいは条件付き欠損として产生することができる。例えば、アデノウイルス-SV40組換えでの経験から、全アデノウイルスE3領域は、組織培養細胞内のウイルスの増殖を大きくは変更せずに削除できることが突き止められた。この領域は、外来DNAによって置換することができる。得られたアデノウイルスは、野生型のアデノウイルス感染を許容するいかなる細胞株においても増殖することができる。E3-置換アデノウイルスは、遺伝子の挿入のために主として使用され、免疫付与用のたんぱく質を產生してきた。

#### 【0105】

免疫化するエピトープの量を増やすためにウイルス複製が望まれる免疫付与のためのベクターとしての用途が構築されているアデノウイルスとは対照的に、遺伝子治療の道具として改変されたウイルスは、一般的に複製欠損として設計される。後者のベクター用の外来DNAのほとんどは、削除されたE1AおよびE1B領域を置き換える。それは、種々のプロトコルによって構成されているが、外来DNAが挿入されているプラスミドを含み、アデノウイルス配列が隣接する。

#### 【0106】

外来DNAの細胞への挿入を助けるために、アデノウイルスを使用することができる他の方法がある。エンドソームを介して進行し、最終的に核にDNAが送達されるウイルスの結合のメカニズムは、アデノウイルス粒子の外側の外来DNAを内部に取り入れるために使用することができる。例えば、ポリリジンとのDNA錯体は、アデノウイルス粒子と接着し、内部に取り込むことができる。例えば、Cottam, J Virol 67: 3777-3785 (1993), Wagner, PNAS 88: 4255-5259 (1991)を参照。おそらく、錯体は纖維の推定受容体への結合によって細胞に入るのである。トランスフェリンのようなリガンドを含み、トランスフェリン受容体を用いる細胞への侵入を助けるこれらの技術の変更法がある。例えば、Wagner, PNAS 89: 6099-6103 (1992)を参照。培養中の細胞へのDNAの侵入を効率的にするために、ウイルスと外部DNAとを結合する必要はない。例えば、Yoshimura, J Biol Chem 268: 2300-2303 (1993)を参照。

#### 【0107】

##### (C. 錯体)

他の態様において、本発明は、アデノウイルスとコポリマーとを含む錯体を提供する。これらのコポリマーとしては、前記A部で記載した種類のものを挙げることができる。これらの錯体において、アデノウイルスとコポリマーとは、互いに非共有結合的に錯体を形成している。

#### 【0108】

本発明の錯体は、ある範囲の物理的次元を有することができる。例えば、錯体中のコポリマーの量対アデノウイルスの量は、変更することができる。ある実施形態では、アデノ

ウイルスに対するコポリマーの比は、3,500:1と30,000:1との間である。他の実施形態では、アデノウイルスに対するコポリマーの比は、3,600:1と20,000:1との間である。さらに他の実施形態では、アデノウイルスに対するコポリマーの比は、10,000:1と30,000:1との間である。

#### 【0109】

さらに、錯体の寸法も変更することができる。ある実施形態では、錯体は約20nmと約300nmとの間である。他の実施形態では、錯体は約80nmと約150nmとの間である。

#### 【0110】

##### (錯体の製造)

最も単純な形では、本発明のコポリマーが単純にアデノウイルスに接触あるいは混合している（実施例2参照）。錯体の形成は、ほとんど瞬時に起こり、さらに精製することも必要としない。次いで、本発明の錯体は、細胞と接触するために使用することができる。本発明の錯体を細胞に接触させて、ウイルスまたはウイルス核酸を細胞へ導入する。

#### 【0111】

アデノウイルスとカチオン性PEGコポリマーとが非共有結合的にカプセル化することで、インビトロおよびインビボでのウイルス感染と導入遺伝子発現を増大させつつ、ウイルス表面の電荷を完全にマスキングする。この表面修飾は、追加の処理工程なしで、単純な混合工程を経て達成された。PEGは、どのような精製ウイルス製剤にも製剤化剤として加えることができ、そうすることによって、前もって生成したウイルスペクターとの使用を可能にする。

#### 【0112】

ある実施形態では、細胞は錯体とインビトロで接触させられる。ある実施形態では、細胞はインビボで錯体と接触させられる。

#### 【0113】

他の態様において、本発明は、非共有結合的に錯化したアデノウイルスコポリマー錯体を製造する方法を提供する。この方法では、コポリマーは、この項で記載したように、アデノウイルスと接触させられる。

#### 【0114】

他の態様において、本発明は、アデノウイルスを細胞へ導入する方法を提供する。この方法では、コポリマーは非共有結合的にアデノウイルスに接触させられ、錯体を形成する。この錯体は次いで細胞と接触させられる。

#### 【0115】

##### (IV 医薬的応用)

第四の態様において、本発明は、(a)コポリマーと、(b)アデノウイルスであって、非共有結合錯体を形成するアデノウイルスと、(c)生理学的に許容しうる賦形剤とを含む生理学的製剤を提供する。この生理学的製剤中のコポリマーは、式I(式中、mは1~1,000の整数である)の構造を含む。記号iは2~mの整数であり、X<sup>i</sup>の位置を示す。記号X<sup>1</sup>、X<sup>i</sup>およびX<sup>m+1</sup>は、独立して、次の要件を満たすモノマーから選択される。すなわち、該モノマーは、(i)第二アミン類および第三アミン類から選択されるアミンを含み、かつ(ii)少なくとも1つのモノマーはQを含む。Qは、式IIaおよび式IIb(式中、Zは、OおよびNHからなる群から選択される)から選択される構造である。記号hは、0~1の整数である。記号R<sup>1</sup>は、ポリアルキレンジコール部位を含む。また、本発明のコポリマーは、交差重合を含まず、生理的pHでコポリマー中の少なくとも1個の窒素原子がプラスに帯電している。

#### 【0116】

生理学的に許容しうる賦形剤として、例えば、担体、水、pH調整剤または緩衝剤、保存料、安定剤または他の成分のような物質が挙げられる。生理学的に許容しうる担体は、組換えアデノウイルスペクター送達系を安定させるように作用する、生理学的に許容しうる化合物を含むことができる。生理学的に許容しうる化合物としては、例えば、グルコ-

ス、サッカロースまたはデキストランのような炭水化物、ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリン、アスコルビン酸またはグルタチオンのような酸化防止剤、キレート剤、水、低分子量たんぱく質、または他の安定剤や賦形剤が挙げられる。

#### 【0117】

他の生理学的に許容しうる化合物として、例えば、湿潤剤、乳化剤、分散剤、または保存料であって、特に微生物の成長または作用を防止するものが挙げられる。多種の保存料がよく知られ、例えば、フェノールおよびアスコルビン酸が挙げられる。当業者の間では、生理学的に許容しうる担体は、投与の経路および組換えアデノウイルスベクター送達系の特定の生理化学的特徴に依存して選択されることは知られている。担体、安定剤またはアジュバントの例示が、Gennaro, REMINGTON'S: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 19th ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA, 中に見出すことができ、これは参考として本明細書に組み込まれる。

#### 【0118】

本発明の化合物は、製造され、経口、非経口および局所投薬形態など多種多様に投与されうる。したがって、本発明の化合物は、注射、すなわち、静脈内注射、筋肉内注射、皮内注射、皮下注射、十二指腸内注射または腹腔内注射によって投与することができる。また、本明細書に記載された化合物は、吸入、例えば、鼻腔内に投与することもできる。さらに、本発明の化合物は、経皮的に投与することもできる。したがって、本発明は、生理学的に許容しうる賦形剤と、前記「コポリマー」の項で記載したコポリマーで構成される錯体と、前記「ウイルス」の項で記載したウイルスとを含む生理学的組成物も提供する。

#### 【0119】

錯体の有効量は、生理食塩水、適切な緩衝液、保存料、安定剤など（ただしこれらに限定されない）の医薬的に許容しうる賦形剤中で組成物として患者に投与され、また、制癌薬などの適切な剤と併用して投与してもよい。有効量は、有益なあるいは望ましい結果（臨床結果を含む）を発揮するのに充分な量である。有効量は、1回の投与でも複数回の投与でも投与することができる。本発明の目的から、錯体有効量は、病状の進行を緩和する、軽減する、安定化する、逆転させる、遅らせるまたは止めるのに、あるいは特定の組織や病状を診断するのに充分な量である。これらの治療に対して難治性の者もいるが、本方法は、これらの者に対する投与も包含すると理解される。与えられる量は、個人の状態、病気の程度、投与経路、何回を投与するか、および望ましい目的によって決められる。

錯体の送達は、一般的に、部位特異的な注射か静脈内注射のいずれかによって行う。ベクターの部位特異的注射には、例えば、腹腔内注射、胸膜内注射、動脈内注射、眼内注射、腫瘍内注射または、局所塗布が含まれてもよい。これらの方法は、必要に応じて、錯体と他の剤とを組み合わせて使う治療において簡単に行う。

#### 【0120】

錯体は、リポソーム、リン酸カルシウム沈降法あるいはエレクトロポレーションのような当業界でよく知られている一般的なトランスフェクション方法、直接注射および静脈内注入のような、種々の方法で標的細胞に送達されるが、方法はこれらに限定されるものではない。送達手段は、大部分、特定の錯体（その形）および標的細胞のタイプと場所（例えば、細胞がインビトロにあるかインビボにあるか）に依る。投与経路に依って、ヒトに対するウイルスの用量は、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  の範囲で変化する。

#### 【0121】

液状製剤としては、溶液、懸濁液、乳化液、例えば、水、または水／プロピレングリコール溶液があげられる。非経口注射用の液体製剤は、ポリエチレングリコール水溶液中の溶液状態で、製剤化することができる。

#### 【0122】

(V. キット)

第五態様においては、本発明は、コポリマーとアデノウイルスとを含み、前記コポリマーとアデノウイルスとは非共有結合的に結合しているキットを提供する。キットのコポリ

マーは、式 I (式中、 $m$  は 1 ~ 1,000 の整数である) の構造を含む。記号  $i$  は 2 ~  $m$  の整数であり、 $X^i$  の位置を示す。記号  $X^1$ 、 $X^i$  および  $X^{m+1}$  は、独立して、次の要件を満たすモノマーから選択される。すなわち、該モノマーは、(i) 第二アミン類および第三アミン類から選択されるアミンを含み、かつ (ii) 少なくとも 1 つのモノマーは Q を含む。Q は、式 II a および式 II b (式中、Z は、O および NH からなる群から選択される) から選択される構造である。記号 h は、0 ~ 1 の整数である。記号 R<sup>1</sup> は、ポリアルキレンギリコール部位を含む。また、本発明のコポリマーは、交差重合を含まず、生理的 pH でコポリマー中の少なくとも 1 個の窒素原子がプラスに帯電している。

#### 【0123】

また、本発明は、例えれば 遺伝子治療のための細胞感染用ウイルスの製剤キットを提供する。該キットは、例えれば、本発明のコポリマーを含む。場合によっては、該キットは、分離された容器内にアデノウイルスのようなウイルスを含むこともできる。該キットは、任意で、本発明の使用方法が記載された指示書を含むこともできる。アッセイの実行に役に立つ他の物質もキット内に含めることができる。例えば、試験管、ホールピペットなどが挙げられる。本発明のキットは、1 回のアッセイに十分なだけの物質を含むことができるし、複数回のアッセイに十分なだけの物質を含むことができる。

#### 【0124】

以下の実施例は、説明のために記載されるもので、これによって本発明が限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0125】

ここで記載される実施例および実施形態は、説明の目的にのみあるものであり、当業者には、それに照らして多種の変更および改変が示唆され、本出願の精神および範囲内および添付の請求の範囲の範囲内に入るものと理解される。本明細書に挙げられた公報、特許および特許出願の全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0126】

##### (一般説明)

以下の実施例において、特に明記しない限り、温度は摂氏温度 (°C) であり、操作は室温あるいは周辺温度、「rt」、「RT」(通常約 18 ~ 25 °C の範囲) で行った。溶剤の蒸発は、ロータリーエバボレータを使用して、減圧下 (通常 4.5 ~ 30 mmHg) で、浴温 60 °C まで行った。反応の進行は、通常、TLC で追跡し、反応時間は説明のためだけに提供する。収量は説明のためだけに提供する。以下の慣用の略記を使用する。L (リットル)、mL (ミリリットル)、mmol (ミリモル)、g (グラム)、mg (ミリグラム)、min (分) および h (時間)。

特に明記しない限り、合成に使用された全ての試薬は、シグマ (セントルイス、ミズリー) 社から購入した。<sup>1</sup>H-NMR 分析は、Numega レゾナンス研究所 (サンディエゴ、カリフォルニア) によって行われた。NMR 分析の前に、コポリマーは、10,000 MWCO 膜 (Slide-a-Lizer, ピアス社, ロックフォード, イリノイ) を使用して、脱イオン水に対して透析し、凍結乾燥した。CMV 即時初期プロモーター (BGC G) の制御下で Lacz 融合たんぱく質 (-Gal) 遺伝子を発現する組換えアデノウイルスについては、以前に記載された (Willis, K.N. ら、Hum Gene Ther. 5: 1079 - 1088 (1994))。同じ CMV 即時初期プロモーター (GFCB) 制御下で緑色蛍光たんぱく質 (GFP) 遺伝子をコード化する組換えアデノウイルスについても、以前に記載された (Rahman, A. ら、Mol Ther. 3: 768 - 778 (2001))。記載されたように、BGC G および GFCB を製造し精製した (Huayghe, B.G. ら、Hum Gene Ther. 6: 1403 - 1416 (1995))。

#### 【0127】

サイズ排除クロマトグラフィーは、アクタ FPLC システムで、セファクリル S-200 樹脂 (アマシャムバイオサイエンス社、ピスカタウェー、ニュージャージー) を詰めた

H i P r e p カラム (1.6 × 60 cm) を使用して行った。逆相クロマトグラフィーは、ジュピター 5 u C 4 カラム (150 × 2 mm, フェノメネックス社、トロント、カナダ) で、ウォーターズ HPLC システム (ウォーターズ社、ミルフォード、マサチューセッツ) と Sedex 75 蒸発光散乱検出器 (セデックス, Alfortville, フランス) とを使用して行った。錯体の粒径は、N 4 P 1 us 粒径分析計 (コールター社、マイアミ、フロリダ) で動的光散乱によって測定した。表面電荷 (ゼータ電位) は、DELSA 440 SX (コールター社、マイアミ、フロリダ) で測定した。被覆ウイルス粒子は、リソース Q カラム (アマシャムバイオサイエンス社, ピスカタウェー、ニュージャージー) (Shabram, P.W.ら, Hum Gene Ther. 8 : 453 - 465 (1997)) で、陰イオン交換クロマトグラフィーによって分析した。フローサイトメトリーは FACS キャリバーフローサイトメーター (ベクトンディッキンソン社、サンノゼ、カルフォルニア) でおこなった。前方散乱 (FSC)、側方散乱 (SSC) および FL-1 パラメーターは、合計 50,000 個の細胞について収集した。細胞および組織溶解物の総たんぱく含量は、牛血清アルブミン (BSA) 標準に比較した BCA 法 (ピアス社、ロックフォード、イリノイ) によって測定した。

## 【0128】

## (実施例 1)

## (PEI-mPEG ポリマーの製剤)

PEI (25 kDa) をアルドリッチ社 (ミルウォーキー、ウィスコンシン) から購入し、メトキシPEG-SPA (5 kDa) はシェアウォーター社 (ハンツビル、アラバマ) から得た。逆相HPLC (100%水中 0.1% TFA から 100% アセトニトリル中 0.1% TFA の線形勾配、20分、流速：0.4 mL / 分) による出発物質の分析は、10分で PEI の単一ピーク、15分で mPEG の単一ピークを示した。

## 【0129】

PEG グラフトポリマーを、スキーム 1 に示すように、PEI と mPEG-SPA との反応によって合成した。スキーム 1において、1M の PEI 溶液は、2.155 g の PEI (25 kDa) を 10 mL の水に溶解し、pH を 1N の HC 1 で 7.0 に調整し、体積を水で 50 mL に調整することによって製造した。153.9 ミリグラムの mPEG-SPA (3.0 × 10<sup>-5</sup> モル) に、800 μL のホウ酸塩緩衝液 (200 mM のホウ酸塩、150 mM の NaCl、1 mM の EDTA、pH 8.4) 中に希釈した 400 μL の PEI 原液 (1.27 × 10<sup>-4</sup> モル、1級アミン) を加えた。振盪しながら、反応を室温で 1 時間続けた。

## 【0130】

## (PEI-mPEG ポリマーの精製)

反応混合物をサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。画分を集め、PEI-mPEG コポリマーを含む画分をプールし、プールしたものを逆相クロマトグラフィーによって分析した。

## 【0131】

## (PEI-mPEG ポリマーの特性評価)

精製した反応生成物 (PEI-mPEG コポリマー) の逆相クロマトグラフィーによる分析は、単一の広範なピークを示した。特徴的な PEI ピークと PEG ピークの欠乏は、出発物質が無くなつたことを示していた。さらに、広範な PEI-mPEG の溶離ピークは、コポリマー中の PEI に対する PEG の比の不均質な分布を示唆していた。

## 【0132】

コポリマー中の PEI に対する PEG の比は、PEG の -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O プロトンと PEI の -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N プロトンとの <sup>1</sup>H-NMR ピーク面積を比較することによって測定した。このデータに基づき、PEI-mPEG コポリマーは、PEI 1 分子当たり平均で 27.2 個の PEG 鎖を含んでいた。これは、18.8 % の 1 級アミンが修飾されたことに相当し、平均分子量は 161 kDa に相当する。

## 【0133】

## (実施例 2 )

## (錯体の製造 )

組換えアデノウイルスを、(1)アデノウイルスをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)またはv PBS(1×PBS、3%w/vサッカロース、2mM塩化マグネシウム、pH7.5)で希釈し、最終濃度を $1 \times 10^{11}$ 個/mLの粒子とし、(2)PEI-mPEG原料を加え、(3)ピペッティングにより混合することによって、多種の比において、PEI-mPEGコポリマーで処理した。使用の前に、錯体の形成を室温で15分間行った。追加の精製は必要でなかった。

## 【0134】

## (錯体の特性評価 )

カプセル化前と後のアデノウイルスの特性評価は以下の方法、すなわち、動的光散乱法、ゼータ電位測定法、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび等密度CsCl密度勾配遠心法で分析した。分析に先立って、PEI-mPEGでカプセル化されたアデノウイルスを超純水で10倍に希釈した。本発明の錯体の物性を表1に示す。

## 【0135】

## 【化42】

表 1

| 製剤             | $\mu\text{g}/\text{mL}$<br>PEI-mPEG | 粒径<br>[nm] | ゼータ電位<br>[mV] |
|----------------|-------------------------------------|------------|---------------|
| rAd            | 0                                   | 123.0      | -29.2         |
| rAd-PEI-mPEG A | 20                                  | 164.5      | -10.2         |
| rAd-PEI-mPEG B | 99                                  | 130.7      | 0             |
| rAd-PEI-mPEG C | 494                                 | 129.6      | 0             |

粒径は動的光散乱法によって測定した。報告されている流体学的径は、水性緩衝液中のアデノウイルス粒子のブラウン運動を測定することにより決定した。PEI-mPEGコポリマーの添加により、用量依存的様式において表面電荷が低減し、より高いポリマー濃度で、中性に近づいた。表面電荷をマスク化されたので、アデノウイルス粒子がPEI-mPEGポリマーでカプセル化されたことが推定された。この結合は、ポリカチオン性PEI骨格と負に帯電したウイルス表面との間の電荷相互作用によって起こった。

## 【0136】

動的光散乱法による粒径の分析は、より高いポリマー濃度で僅かな増加のみを示した。しかし、最も低い濃度で平均粒径が大きく増加するのが観察された。後者は、おそらく、ポリマーにより媒介される粒子凝集に依るものであり、これは、ウイルス粒子表面がポリマーで部分的にのみ飽和される濃度のポリマーにより起こりやすい。

## 【0137】

カプセル化されたアデノウイルスが血清の存在下で安定であるかどうかを判断するために、PEI-mPEGで処理されたアデノウイルスをPBS中の50%v/vウシ胎児血清(FBS)中、室温で1時間インキュベートした。次いで、サンプルをリソースQ-HPLC分析によって試験した。「典型的な」アデノウイルス保持時間にアデノウイルスのピークは観察されなかった。これは、ポリマーがFBSによってrAdから離れなかつたことを示す。50%v/vFBS中でインキュベートされた、処理されていないコントロールアデノウイルスの保持時間は変化しなかつた。

## 【0138】

PEI-mPEGで処理されたウイルスのアリコートを等密度CsCl密度勾配遠心法に供した。カラムで精製されたBGCGとPEI-mPEG中のBGCGはそれぞれ、マイナーな修飾をして、以前に記載されたように、CsCl段階濃度勾配にかけた(Prage, L.ら、Virology. 49:745-757(1972))。各製剤から約 $5 \times 10^{11}$ 個のウイルス粒子を、10mMのトリスTris-HCl緩衝液、pH8.

0、中の1.25 g m / m l と 1.40 g m / m l の CsCl 段階濃度勾配に重ね合わせた。ウイルスサンプルを、8で1時間、約154,000×gで、ベックマン SW41 Tiローターで遠心分離した。それぞれのチューブからのウイルスバンドを集め、10 mMのトリス-HCl、pH 8.0 中の1.30 g m / m l のCsClと混合した。遠心分離を一晩、8、約199,000×gでVTi65.3ローター中で続けた。各ウイルスバンドを集め、2 mMのMgCl<sub>2</sub>および1×PBS (pH 7.4) 中の3%サッカロース中で、MWCO 50,000 を有する Spectra/Por 膜(スペクトラムメディカルインダストリーズ社、ヒューストン、テキサス)を使用して透析した。透析したウイルスを -80 で凍結して保存した。

## 【0139】

コントロールアデノウイルスと同じ浮遊密度を持つバンドがただ1つ見られた。単離したアデノウイルスバンドを PBS (1×PBS、3%サッカロース、2 mMの塩化マグネシウム、pH 7.5) に対して透析し、リソース-Q-HPLC によって分析した。標準クロマトグラフ条件を使用すると、ウイルスが典型的な保持時間で溶出した。これは、PEI-mPEG ポリマーは、電荷相互作用によってウイルスに結合し、CsCl 溶液の高いイオン強度によって排除されたことを示唆する。さらに、電子顕微鏡観察で、PEI-mPEG で被覆されたウイルスは、典型的な、二十面体アデノウイルス形態を示した。このデータは、PEI-mPEG ポリマーとアデノウイルスとの相互作用は、可逆的で、かつウイルス粒子の完全性に影響を与えないということを示している。

## 【0140】

## (実施例3)

## (インビトロでの感染力のアッセイ)

感染力と導入遺伝子発現について、アデノウイルスを PEI-mPEG ポリマーでカプセル化する効果を、インビトロの2つの異なる細胞株、A549 および T24 で調べた。A549 細胞、ヒト上皮肺癌細胞は、コクサキアデノウイルス受容体 (CAR) を発現し、したがって、容易にアデノウイルスに感染する。A549 細胞を、7% CO<sub>2</sub> インキュベーター中 37 で、10% FBS を加えた DMEM 中に維持した。対照的に T24 細胞は、CAR ネガティブで、A549 細胞に比べて感染性にかなり劣っている。T24、ヒト上皮膀胱癌細胞を、10% FBS を加えた Ham's F12 / DMEM 高グルコースの 1 : 1 混合物中に維持し、同じインキュベーター中で増殖させた。培養物を、約 80% コンフルエンスまで T-225 cm<sup>2</sup> 組織培養フラスコ内で成長させ、0.25% トリプシンを使用して取り外し、6-ウェルプレート中に 5 × 10<sup>5</sup> 細胞 / ウェルで播種した。アデノウイルスまたは PEI-mPEG でカプセル化されたアデノウイルスで感染させる前に、細胞を一晩 (37、7% CO<sub>2</sub>) 維持した。感染力を、緑色蛍光たんぱく質 (GFP) を発現する組換えアデノウイルスを使用して調べた。形質導入の頻度、すなわち、GFP ポジティブ (感染された) 細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって測定した。形質導入の頻度 (GFP ポジティブ細胞のパーセント) は、FITC (FL-1) ポジティブ細胞の数を分析した細胞の総数で割ることによって計算した。

## 【0141】

両細胞株に関し、形質導入の頻度は PEI-mPEG 濃度の増加に比例して増加した (図 3A)。T24 細胞に関し、非カプセル化アデノウイルスに対する増加は、rAd-PEI-mPEG A、B および C についてそれぞれ 1%、89% および 107% であった。A549 細胞に関して、カプセル化レベル A について -3% の減少が、カプセル化レベル B および C についてそれぞれ 10% および 31% の増加が観察された。

## 【0142】

カプセル化アデノウイルスのインビトロでの感染力は、使用した細胞株の CAR 発現状況に関係なく増加した。基準レベルを超える増加 (非カプセル化アデノウイルスで構築された) は CAR ネガティブ細胞 (T24) が僅かに高いが、最も高いトランスフェクションレベルは、CAR ポジティブ細胞 (A549) によって達成された。これは、ウイルスのカプセル化が、受容体介在感染を弱めるどころか、かえって受容体非依存的様式において

て感染力を高めていることを示す。この観察は、インビトロ感染力における緩やかな減少から激しい減少は、使用したペグ化に依存することが観察された、アデノウイルスの共有結合ペグ化反応 (O'Riordanら、Hum Gene Ther. 10: 1349 - 1358 (1999); Croyleら、Hum. Gene Ther. 11: 1713 - 1722 (2000)) で得られた結果とは対照的であった。

#### 【0143】

インビトロにおける感染力の増加は、PEI (PEGなし) および他のポリカチオンを被覆したアデノウイルスで報告されている (McKayら、Gene Ther. 7: 644 - 652 (2000))。200 nmを超える粒子は、脾臓に蓄積することが示され、したがって、循環から効率的に取り除かれる (Litzingerら、Biochim. Biophys. Acta. 1190: 99 - 107 (1994))。さらに、固体腫瘍のようなある標的組織への管外遊出には、300 nm未満の粒径が必要である (Hobbsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 4607 - 4612 (1998))。一方、PEI-PEGコポリマーの製剤はアデノウイルス凝集を起こさなかつた。

#### 【0144】

##### (インビトロにおける導入遺伝子発現)

インビトロにおける導入遺伝子の発現を、-ガラクトシダーゼを発現する組換えアデノウイルス (図3B) を使用して、2つの同じ細胞株で調べた。感染力のアッセイと同様の方法で、細胞を、PEI-mPEGでカプセル化されたBGCGまたはBGCGで感染した。細胞を溶解し、導入遺伝子発現を、化学発光-ガラクトシダーゼ・レポーター遺伝子アッセイキット (ロッシュ、マンハイム、ドイツ) を使用して分析した。要約すると、24 h 感染終了細胞をPBSで洗浄し、中性洗剤で室温下30分かけて溶解した。遠心分離によって細胞の破片を取り除いた後、50 μl の希釈細胞抽出物を96-ウェル化学発光アッセイプレートに移した。これに100 μl の化学発光基質 (ガラクトン・プラス) を加え、室温で1時間インキュベートした。次いで、アッセイプレートをTR717マイクロプレートルミノメーター (Tropix社、ベッドフォード、マサチューセッツ) で分析した。-ガラクトシダーゼ濃度を、-ガラクトシダーゼ標準 (キットで提供されている) と比較して決定し、溶解物の総たんぱく質含量で正規化した。両細胞株に関して、導入遺伝子発現の増加は、PEI-mPEGカプセル化アデノウイルスが非カプセル化アデノウイルスを上回っていたことが見られた。増加は、T24細胞について、27% (A)、157% (B) および130% (C) であり、A549細胞について、40% (A)、67% (B) および144% (C) であった。

#### 【0145】

##### (実施例4)

##### (生体内分布とインビボにおける導入遺伝子発現)

生体内分布と導入遺伝子発現を、組換えアデノウイルスまたはカプセル化アデノウイルスをBALB/cマウスの尾静脈へ静脈内注射した後評価した。注射後3日で器官/組織を採取し、アデノウイルスDNAの存在を定量的PCRによって分析し、-ガラクトシダーゼ酵素活性を化学発光-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子アッセイキットを使用して分析した。

#### 【0146】

##### (生体内分布とインビボにおける導入遺伝子発現)

メスのBALB/cマウスの尾静脈に、ゆっくりと(20秒で300 μl) PEI-mPEGでカプセル化されたBGCGまたはBGCGを注射した。投与して3日後動物を致死させ、肝臓および組織を切除した。組織は直ちに OCT中に置き、-70 ℃で素早く凍結した。6 μmの切片をカットし、次いで、X-galで染色した。各組織の切片を液体窒素中で素早く凍結した。投与グループ1つにつき3匹の動物とした。

#### 【0147】

アデノウイルスDNAの最も高い濃度が肝臓および脾臓で発見された。一方、最も低い

量は腎臓で観察された(図4)。このパターンはP E I - m P E Gでカプセル化されたアデノウイルスについても本質的に同じままであった。アデノウイルスD N A濃度は、非カプセル化およびカプセル化アデノウイルスの両方に関し、用量依存的様式で全ての器官において増加した。同じ粒子数の非カプセル化およびカプセル化アデノウイルスを投与された動物に関し、ウイルスD N A濃度を比較すると、組織1m gに対するアデノウイルスD N Aのコピー数の増加は、カプセル化アデノウイルスを受けたグループに見られた。平均増加は、肝臓が1.8倍、脾臓が2.9倍、腎臓が1.5倍、肺が2.7倍であった。

## 【0148】

(インビボにおける導入遺伝子の発現)

組織サンプルにおける-ガラクトシダーゼ酵素活性：組織サンプルを溶解基質チューブ(Q Biogene社、カールズバッド、カリフォルニア)に押し込め、組織100m g当たり0.2m Lの洗剤溶解緩衝液にプロテアーゼ阻害剤カクテルを加えたもの(-G a 1キットとして提供されている)を加えた。組織サンプルをFast Prep組織ホモジナイザー(Q Biogene社、カールズバッド、カリフォルニア)中で溶解した。3回の凍結溶解サイクルにかけた後、溶解物を50で1時間インキュベートし、内因性-ガラクトシダーゼ活性を不活性化した。溶解物を14,000×gで10分間遠心分離することによって清澄にした。上澄み液を取り除き、希釈したアリコートを、-G a 1酵素活性について、化学発光-ガラクトシダーゼ・レポーター遺伝子アッセイキット(ロッシュ、マンハイム、ドイツ)を使用して分析した。

## 【0149】

ウイルスD N Aレベルの評価：D N Aを製造業者のプロトコルに従って、Tri-Regent(モレキュラーリサーチセンター社)を使用して、組織約100m gから抽出した。ウイルスD N Aの定量を、Taqポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性を使用するリアルタイム定量PCRを使用して行い、PCRアンプリコン(Wen, S. F.ら、Cancer Gene Ther. 7: 1469-1480(2000))を検出した。B G C Gに加えて、マウスGAPDH D N Aの相対定量を評価し、D N Aの一貫性と品質を裏付けた。

## 【0150】

PCRで使用したプライマー配列およびプローブ配列は以下の通りであった。B G C Gフォワードプライマー、5'-AACGGTACTCCGCCACCC-3'(配列番号1); B G C Gリバース、5'-ACTGGTTAGACGCCCTTCCTCGA-3'(配列番号2); およびB G C Gプローブ、FAM-TCCGCATCGACCGGATCGG-TAMRA(配列番号3); マウスGAPDHフォワード、5'GAAAGGTGAAGGTCGAGTC-3'(配列番号4)およびGABDH GAPDHリバース5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'(配列番号5)。プローブはFAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA(配列番号6)であった。PCR熱プロファイルは、50で2分、95で10分、および95で15秒と62で1分のサイクルを40回であった。ウイルスD N A定量のために、B G C Gから単離された、希釈ウイルスD N AをウイルスD N A標準として使用した。Q-PCRからのデータは、ウイルスコピーの数/組織1m gとして表した。検出限界は、約10個のコピー/組織1m gであった。

## 【0151】

導入遺伝子発現は、採取した組織のアリコートから調製した抽出物中の-ガラクトシダーゼ酵素活性を測定することによって分析した(図5)。非カプセル化アデノウイルスについては、-G a 1活性を $3 \times 10^{10}$ 粒子を除いて全ての用量についてバックグラウンドレベルとした。 $3 \times 10^9$ 粒子を投与した1動物からの肝臓サンプルは1例外であり、バックグラウンド発現のダブリング(14.6ng/組織1g)を示した。対照的に、P E I - m P E Gでカプセル化されたアデノウイルスを投与された動物は、用量範囲を通して用量依存性発現を示した。非カプセル化アデノウイルスと同様に、発現は肝臓において最も高く、次いで脾臓、最も低かったのは腎臓および肺においてであった。非カプセル化

アデノウイルスを同用量与えられたグループと比較すると、カプセル化ウイルスを投与された動物の全組織において、発現における増加が観察された。最も大きな増加は動物の肝臓組織において見られた。すなわち、 $3 \times 10^{10}$  粒子を投与された動物は 9.1 倍、 $1 \times 10^{10}$  粒子 (LOQ 基準) を投与された動物は 27.2 倍を超え、 $3 \times 10^9$  粒子を投与された動物は 2.6 倍であった。

#### 【0152】

肝臓における導入遺伝子発現は、組織の低温切片の組織学的分析によって視覚化した。この分析は、インビオにおける形質導入の頻度を評価するための手段として使用した。マウス数匹に BGC G を種々の用量で注射し、他のマウスには P E I - m P E G - B G C G を種々の用量で注射した。 $3 \times 10^{10}$  粒子を投与した動物は、導入遺伝子を発現する細胞の数は殆ど等しかったが、他の用量レベルでは、P E I - m P E G カプセル化ウイルスで処理された動物に増加した発現が観察された。非カプセル化アデノウイルスを投与された動物の肝臓において、ごく少ないポジティブ細胞が検出され、一方、P E I - m P E G カプセル化 rAd を注射した場合、多数のポジティブ細胞が検出された。

#### 【0153】

組換えアデノウイルスの静脈内注射によって、多種の免疫コンピテントマウス株において、高い非線形用量応答が得られた。これは種々の器官で観察されたが、最も報告されたのは、肝臓、静脈内注射後最も高い発現を示した器官 (Zieglerら、Hum Gene Ther. 13: 935-945 (2002), Taoら、Mol Ther. 3: 28-35 (2001)) であった。この効果は、クッパー細胞と細網内皮系の他の部位 (Taoら、Mol Ther. 3: 28-35 (2001)) によるアデノウイルスの優先的な取り込みによって明らかにされる「生物学的フィルター」の存在が原因と考えられる。クッパー細胞の消耗によって肝細胞における発現が増加し、このことは、これらの細胞中でアデノウイルスが孤立し分解するという仮説 (Zieglerら、Hum Gene Ther. 13: 935-945 (2002), Taoら、Mol Ther. 3: 28-35 (2001)) を支持する。さらに、無関係のアデノウイルスを同時投与することによって、導入遺伝子の発現が増加した。このことは、RES 系は、容量に限界があり、ウイルスの高用量によって飽和されうる (Zieglerら、Hum Gene Ther. 13: 935-945 (2002)) ことを示唆している。

#### 【0154】

P E I - P E G コポリマーによるアデノウイルスのカプセル化は、組換えアデノウイルスと RES の相互作用を減らし、ベクター系の治療的可能性を改善する実用的な方針を提供する。薬剤の投与後 72 時間で、ウイルス DNA レベルは、非カプセル化ウイルスと同じ用量静脈内に注射したものと比べて、カプセル化アデノウイルスを投与されものは全ての組織においてより高い値を示した。これは、P E I - P E G によるカプセル化がアデノウイルスをクリアランスから保護することを示唆している。同時に、全分析組織における発現は増加されており、特に、肝臓において最も大きい増加が見られた。これらの発見は、P E I - P E G カプセル化が RES 系による組換えアデノウイルスの取り込みと分解を減らすという作用の機構と一致し、したがって、rAd を標的組織により近づける結果、より高いウイルス DNA レベルとより高い発現レベルの両方を得る。さらに、P E I - P E G カプセル化は、肝臓における形質導入事象の回数を増やす。この効果は、RES 系がアデノウイルス粒子で飽和されていない、低いウイルス用量～中間ウイルス用量でより顕著である。より高い発現を達成するための用量の増加は、しばしば用量依存性毒性によって使用不可となるので、これは価値のある発見である。まとめると、これらの結果は、P E I - P E G ポリマーでカプセル化されたアデノウイルスは、アデノウイルス遺伝子治療ベクターの治療効果を改良する興味深い方針を提供することを示す。

#### 【0155】

前記実施例は、本発明の説明のために提供されたもので、本発明の範囲を限定するものではない。本発明の他の変形も当業者には容易に明らかであり、添付される請求の範囲に包含される。本明細書に挙げられた全ての公報、特許および特許出願は、全ての目的のた

めに参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0156】

【図1】P E I - m P E Gコポリマー合成の図式的な概略。分子量25kDaの分岐鎖状のポリエチレンイミン( $x = 2$ および $y = 1$ 、平均で)をmPEG-SPA(5kDa)に、133mMのホウ酸塩、100mMの塩化ナトリウムおよび0.7mMのEDTA中、pH8.4で反応させた。

【図2】組換えアデノウイルス(パネルA)およびP E I - m P E Gでカプセル化されたアデノウイルス(パネルB、カプセル化度C)の原料-Qアニオン交換クロマトグラム。グラフは、時間の関数として260nmでの吸収を示す。挿入部分は、アデノウイルスのピーク(パネルA、RT=10.37分)と通過中のカプセル化されたアデノウイルスのピーク(パネルB、RT=0.64分)の吸収スペクトルを示す。クロマトグラフの条件は、以下の通りであった。流速:1mL/分、緩衝液A:50mMのヘペス、pH7.5、緩衝液B:緩衝液A+1.5MのNaCl、勾配:10分で20%Bから40%B。

【図3】組換えアデノウイルスおよびP E I - m P E Gでカプセル化されたアデノウイルスのインピトロ感染力と-ガラクトシダーゼ発現。使用した細胞株は、T24膀胱癌(白いバー)およびA549肺癌(黒いバー)であった。GFP(パネルA)または-ガラクトシダーゼ(パネルB)を発現する組換えアデノウイルスは、表1に記載されたウイルス粒子(rAd(enc)A、rAd(enc)BおよびrAd(enc)C)に対するポリマーの3つの異なった比を使用して、P E I - m P E Gでカプセル化した。また、処理されていない細胞(UT)およびカプセル化されていないアデノウイルスに感染した細胞(rAd)も示す。

【図4】アデノウイルスまたはカプセル化されたアデノウイルスを異なった用量で静脈内投与されたBALB/cマウスの肝臓(黒いバー)、脾臓(対角方向にハッチングしたバー)、腎臓(水平にハッチングしたバー)および肺(白いバー)における組換えアデノウイルスDNAに関する定量的PCR結果。ウイルスを、ウイルス粒子に対し最も高いP E I - m P E G比(表1中C)でカプセル化した。グループには、1匹の動物に $3 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^{1.0}$ 、および $3 \times 10^9$ 個のウイルス粒子を注射した。1グループにつき3匹の動物に投与した。

【図5】アデノウイルスまたはカプセル化されたアデノウイルスを異なった用量で静脈内投与されたBALB/cマウスの肝臓(黒いバー)、脾臓(対角方向にハッチングしたバー)、腎臓(水平にハッチングしたバー)および肺(白いバー)における-ガラクトシダーゼ活性。ウイルスを、ウイルス粒子に対し最も高いP E I - m P E G比(表1中C)でカプセル化した。グループには、1匹の動物に $3 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^{1.0}$ 、および $3 \times 10^9$ 個のウイルス粒子を注射した。1グループにつき3匹の動物に投与した。アッセイにおいてはバックグラウンドが異なるため、定量限界は、肝臓抽出物で7.7ng/g組織、他の組織は0.1ng/gとした。