

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007年11月22日 (22.11.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/132873 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
 A61K 9/19 (2006.01) A61K 47/44 (2006.01)
 A61K 47/18 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
 A61K 47/34 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
 A61K 47/36 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/060002

(22) 国際出願日:

2007年5月16日 (16.05.2007)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2006-138201 2006年5月17日 (17.05.2006) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 小山 義之 (KOYAMA, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒1580093 東京都世田谷区上野毛 1 丁目 9 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 伊藤 智子 (ITO, Tomoko).

(74) 代理人: 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 1 丁目 2 番 1 2 号 S V A X T S ビル Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FREEZE-DRIED PRODUCT FOR TRANSFERRING NUCLEIC ACID, OLIGONUCLEIC ACID OR DERIVATIVE THEREOF

(54) 発明の名称: 核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体導入用の凍結乾燥体

(57) Abstract: It is intended to provide a freeze-dried product which shows a favorable performance of expressing a function when employed in transferring a gene, an antisense nucleic acid or the like, the concentration of which can be easily controlled and which can be conveniently handled and shows good keeping qualities. A freeze-dried product of a complex which contains a nucleic acid, an oligonucleic acid or a derivative thereof, a cationic polymer or a cationic lipid or a mass containing the same and an anionic polymer; a method of producing the freeze-dried product which comprises the step of blending a nucleic acid, an oligonucleic acid or a derivative thereof with a cationic polymer or a cationic lipid or a mass containing the same and an anionic polymer to form a complex, and the subsequent step of freeze-drying the same; a preparation, a reagent or a kit for transferring a nucleic acid, an oligonucleic acid or a derivative thereof which contains the freeze-dried product; and a method of transferring a nucleic acid, an oligonucleic acid or a derivative thereof into a cell which comprises using the freeze-dried product.

(57) 要約: 遺伝子及びアンチセンス核酸等の導入に用いると良好な機能発現能を示すとともに、濃度調節が容易で、取り扱いが簡便で、保存性にも優れている凍結乾燥体を提供する。核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体; カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体; 及びアニオン性ポリマーを含む複合体の凍結乾燥体; 該凍結乾燥体の調製方法であって、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体; カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体; 及びアニオン性ポリマーを混合することにより複合体を形成させる工程; 次いで凍結乾燥する工程を含む調製方法; 当該凍結乾燥体を含む、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体の導入用製剤又は試薬あるいはキット; ならびに細胞に核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体を導入する方法であって、当該凍結乾燥体を用いる方法。



WO 2007/132873 A1

明 細 書

核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体導入用の凍結乾燥体

技術分野

- [0001] 本発明は、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体を細胞に導入することを目的とする、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体；カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体；及びアニオン性ポリマーを含む複合体の凍結乾燥体、その調製方法、ならびにそれを含む核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体の導入用製剤及び試薬ならびにキットに関する。

背景技術

- [0002] 現在、目的とする遺伝子、アンチセンスオリゴ核酸、その誘導体を細胞内に導入し、かつその遺伝子、又は機能を発現させることにより、先天的な遺伝病や、ガン細胞やAIDSなどを治療しようとする遺伝子療法、アンチセンス療法が実用化されつつあり、それとともに遺伝子(DNA)、アンチセンスオリゴ核酸、その誘導体を細胞内に導入するためのキャリアーとして各種ベクターが検討されている。
- [0003] このようなベクターの一つであって、安全性に関する懸念がなく、効率がよく、免疫原性がなく、また調製が容易である非ウイルス性ベクターとしては、カチオン性ポリマー、カチオン性リポソーム、カチオン性脂質などのカチオン性物質が研究されている。
- [0004] これらのカチオン性物質を用いる方法では、DNAとカチオン性物質の複合体が正に荷電しているため、血液細胞及びアルブミンなどの血液成分と相互作用することにより凝集してしまい、細胞への導入の障害となっていた。この問題を解消するために、核酸とカチオン性ポリマーの複合体をヒアルロン酸誘導体で被覆したり(特許文献1：特開2005-176830号)；カルボキシル基含有側鎖及び糖残基含有側鎖を有するポリエチレングリコール(PEG)で被覆したり(特許文献2：特開2003-231748号)；遊離カルボン酸ペンダント基を有するPEGを用いて複合体の凝集を防止する(非特許文献1：J. Biomater. Sci. Polymer Edn., Vol. 14, No. 6, pp.515-531 (2003))といった方法が検討されている。

[0005] このようにして調製されたDNAとカチオン性物質の複合体は、低い凝集性を示し、また細胞における遺伝子発現も良好である。しかし、このような複合体は、不均一な懸濁液であるため保存性が低く調製後速やかに使用する必要があり、また高濃度で調製すると凝集してしまうため、濃度の調整が困難であり、取り扱いも煩雑であるという欠点があった。また、再現性の良い調製にも難があった。

一方、上記のようなDNAとカチオン性物質との複合体を、遺伝子などの導入に用いる場合、複合体のサイズ(粒径)の制御もまた重要である。組織内や血流中に投与した場合、その後の複合体の拡散や、細胞への送達、取り込みの効率がその薬理効果に大きく影響するためである。しかし、一般に、カチオン性ポリマーのようなイオン性高分子を混合して複合体化する場合、高分子の凝集が起り、非常に大きな粒子や繊維状の複合体ができやすい。これを防ぐには、混合する溶液の濃度を極端に薄くすることが必要である。しかし、遺伝子導入などに利用される製剤では、ある程度以上の濃度が必要であるため、大きな凝集塊の生成を回避できないという問題があった。また、一旦薄い溶液を混合して小さな複合体を形成させた後、濃縮する方法も考えられるが、複合体粒子が速やかに凝集してしまうため、適切な濃縮手段がなかった。

[0006] そこでこれらの問題を解決するために、生物製剤を容易に輸送可能にし、貯蔵安定性を高めるための一般的方法である凍結乾燥法も検討されていた。しかし、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体とポリカチオン性物質の複合体を凍結乾燥したものでは、凍結乾燥により複合体の構造が破壊されてしまうため、遺伝子導入やオリゴ核酸の導入に用いてもほとんど遺伝子やアンチセンスとしての機能の発現を示さないことが確認されている(非特許文献2:J. Pharm. Sci., vol 90, pp1445-1455 (2001))。

[0007] これらを解決する手法として、高濃度の単糖や二糖などを加えて凍結乾燥する方法が提唱された(非特許文献3:Biochim Biophys Acta. 2000 Sep 29;1468(1-2):127-138.)。しかし、ここで必要な糖の量は、重量比にしてDNAの500倍から1000倍であり、再水和後の溶液が生理条件よりもはるかに高浸透圧になってしまうことを考えると実用的ではない。また、単糖や二糖自体には、遺伝子発現に対する有利な効果はない。また、再水和後の浸透圧を軽減するために、中性多糖であるデキストランの利

用が試みられた(非特許文献4:J. Pharm. Sci., vol 94, pp1226-1236 (2005))。しかし、高分子量のデキストランは遺伝子発現を大きく阻害し、また、低分子量(分子量3000程度)のデキストランを用いた場合、凍結乾燥による凝集を防止するためには、重量比にしてDNAの100倍以上の、かなりの高濃度のデキストランの添加が必要であった(非特許文献4:J. Pharm. Sci., vol 94, pp1226-1236 (2005))。このような凍結乾燥体のin vivoでの利用に際しては、必要なDNA濃度を得るために、凍結乾燥後は少量の水又は溶媒で再水和し、さらに高濃度に濃縮する必要がある。そうすると再水和後のデキストラン濃度は10%を超えてしまい、また凍結乾燥時のDNA濃度、冷却温度なども限定されており、その実用面での応用は困難である。

特許文献1:特開2005-176830号

特許文献2:特開2003-231748号

非特許文献1:J. Biomater. Sci. Polymer Edn., Vol. 14, No. 6, pp.515-531 (2003)

非特許文献2:J. Pharm. Sci., vol 90, pp1445-1455 (2001)

非特許文献3:Biochim Biophys Acta. 2000 Sep 29;1468(1-2):127-138

非特許文献4:J. Pharm. Sci., vol 94, pp1226-1236 (2005)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本願発明者らは、上記の欠点を解消すべく鋭意研究を行った結果、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体;カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体;及びアニオン性ポリマーを含む複合体の凍結乾燥体を用いて細胞への導入を行うと、導入した遺伝子やオリゴ核酸又はその誘導体が良好にその機能を発現することを発見して、本発明を完成するに至った。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明は、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体;カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体;及びアニオン性ポリマーを含む複合体の凍結乾燥体に関する。また、当該凍結乾燥体を含む、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体の導入用製剤及び試薬並びにキットに関する。更にまた、当該凍結乾燥体の調製方法であって、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体;カチオン性ポリマー又はカチオン性

脂質若しくはそれを含む集合体;及びアニオン性ポリマーを混合することにより複合体を形成させる工程;次いで凍結乾燥する工程を含む調製方法に関する。本発明は、更にまた細胞に遺伝子、オリゴ核酸、又はその誘導体を導入する方法であって、当該凍結乾燥体を用いる方法にも関する。

発明の効果

- [0010] 本発明の凍結乾燥体は、濃度調節が容易で、取り扱いが簡便で、保存性にも優れている。また、本発明の凍結乾燥体は、アニオン性ポリマーを含むため、使用するに際して溶媒に再水和して懸濁液または希釈液とした際にも、極めて微少なサイズの複合体を含む安定な分散体を、任意の濃度で得ることができる。そして、遺伝子導入に際しても、凝集を起こさずに、細胞に対して効率よく核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体を導入することができ、かつ局所投与、静脈内投与などの各種投与方法によって、良好な機能発現能を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0011] 本発明の凍結乾燥体は、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体;カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体;及びアニオン性ポリマーを含む複合体の凍結乾燥体である。本複合体中で核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体は、カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体とイオン結合による複合体を形成しており、カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質はさらにアニオン性ポリマーとイオン結合している。これらは、混合比、混合順序等によっては、主にアニオン性ポリマーで覆われた複合体を形成することができる。
- [0012] 本発明の凍結乾燥体に用いることができる核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体としては、遺伝子治療やアンチセンス治療により導入する任意の核酸やオリゴ核酸等を用いることができ、具体的には種々のDNA及びRNA(一本鎖及び二本鎖)(プラスミドDNA、二本鎖オリゴRNA、mRNA、tRNA、rRNA、cDNAなど);センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド(組換え体も含む)及びその誘導体;リボザイム又はそれらの混合物などの各種の核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体を挙げることができる。また、これらの核酸の塩基部分と糖部分は、必要であれば修飾又は置換されていてもよい。核酸であれば、プラスミドDNA、アンチセンス核酸であれば、オリゴDNA、そ

の誘導体であるS-オリゴ、RNA干渉用二本鎖RNA、リボザイムRNA等を好ましく用いることができ、なかでもプラスミドDNAを特に好ましく用いることができる。

[0013] 本発明の凍結乾燥体に用いることができるカチオン性ポリマーとしては、正に荷電された分子量が1000～300万程度の天然由来又は合成高分子であって、水中でDNAと複合体を形成できる官能基を1分子中に複数、好ましくは5個以上有する高分子を使用することができ、このような官能基としては、例えば置換されていてもよいアミノ基若しくはアンモニウム基又はその塩（これらの基は、例えば炭素数1～6のアルキル基、フェニル基などで単又は多置換されていてもよい）、イミノ基、イミダゾリル基、グアニジノ基などの有機アミノ基を挙げることができる。このようなカチオン性ポリマーとしては、例えば、正に荷電された蛋白質やポリペプチド；正に荷電された dendrimer；正に荷電された合成ポリマー；及び正に荷電された多糖類誘導体、又はそれらの塩、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。

[0014] 本発明の凍結乾燥体にカチオン性ポリマーとして用いることができる正に荷電された蛋白質、正に荷電されたポリペプチドの分子量は、好ましくは1000～50万程度である。このような蛋白質、ポリペプチドとしては、具体的にはプロタミン、ヒストン、Hel Δ 1、ゼラチンなどのタンパク質及びポリペプチドを例示することができ、また、正に荷電されたアミノ酸残基を含むポリアミノ酸もまた例示することができる。このような正に荷電されたアミノ酸残基を含むポリアミノ酸としては、具体的にはポリ-L-リジン、ポリアルギニン、ポリオルニチンなどを例示することができる。これらの蛋白質、及びポリペプチドの塩としては、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、ホウ酸塩などを例示することができる。

[0015] カチオン性ポリマーとして用いることができる上記のような官能基を有する正に荷電された dendrimer とは、分岐した分子鎖の末端または内部に、置換されていてもよいアミノ基若しくはアンモニウム基又はその塩（これらの基は、例えば炭素数1～6のアルキル基、フェニル基などで単又は多置換されていてもよい）を有する dendrimer であり、その分子量は、好ましくは1000～50万程度である。Dendrimer としては、具体的にはポリアミドアミン dendrimer、ポリリジン dendrimer などを例示することができる。また、Dendrimer の塩としては、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、ホウ酸塩などを

例示することができる。

- [0016] カチオン性ポリマーとして用いることができる正に荷電された合成ポリマーは、上記のような、水中でDNAと複合体を形成できる官能基を1分子中に複数、好ましくは5個以上有する合成ポリマーであって、分子量が好ましくは1000～300万である合成ポリマーである。合成ポリマーとしては具体的には、ポリエチレンイミン(直鎖状ポリエチレンイミン、又はポリ分岐型エチレンイミンを含む)、2-ジメチルアミノエチルメタクリレート(2-DMEA)の重合体又は共重合体、2-トリメチルアミノエチルメタクリレート(2-TMEA)の重合体又は共重合体などを例示することができる。合成ポリマーの一例であるポリエチレンイミンの分子量は、好ましくは1000～50万程度であり、より好ましくは5000～20万程度であり、もっとも好ましくは1万～10万程度である。また、ポリエチレンイミンの塩として、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、ホウ酸塩などを例示することができる。
- [0017] カチオン性ポリマーとして用いることができる正に荷電された多糖類誘導体は、水中でDNAと複合体を形成できる官能基を1分子中に複数、好ましくは5個以上有する、分子量が、好ましくは1000～300万であり、より好ましくは5000～500000である多糖類誘導体である。このような多糖類としては、具体的にはキトサン、上記のような官能基を導入したデキストラン誘導体などを例示することができる。これらのうちキトサンの分子量は、好ましくは1000～50万程度であり、より好ましくは5000～20万程度であり、もっとも好ましくは1万～10万程度である。キトサンの塩としては、塩酸塩、酢酸塩などを例示することができる。また、デキストラン誘導体の分子量は、好ましくは3000～100万である。このようなデキストラン誘導体としては、具体的にはジエチルアミノエチルーデキストランなどを例示することができる。
- [0018] 上記のカチオン性ポリマーは、通常は正に荷電されていないものであっても、アミノ基などの官能基の導入によって正に荷電されるものであれば使用可能であり、また、必要により糖鎖、オリゴペプチド、抗体などで更に修飾されていてもよい。
- [0019] 本発明の凍結乾燥体に用いることができるカチオン性脂質(カチオン性コレステロール誘導体を含む)としては、DC-Chol(3 β -(N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)コレステロール)、DDAB(N, N-ジステアリル-N, N-ジメチルアンモニウムブロミド)、DMRI(N-(1, 2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル

)-N, N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド)、DODAC(N, N-ジオレイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド)、DOGS(ジヘプタデシルアミドグリシルスペルミジン)、DOSPA(N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N-(2-(スペルミンカルボキサミド)エチル)-N, N-ジメチルアンモニウムトリフルオロアセタート)、DOTAP(N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド)、又はDOTMA(N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド)、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。

[0020] また、カチオン性脂質を含む集合体としては、上記カチオン性脂質(たとえばDOSPA)と、例えばDOPE(ジオレイルホスファチジルエタノールアミン)、コレステロールなどの中性物質を混合したものを使用することができる。例えばカチオン性脂質を含む集合体としては、リポフェクタミン(上記DOSPAとDOPEの3:1w/w混合体リポソーム)、リポフェクチン(上記DOTMAとDOPEの1:1w/w混合体リポソーム)、またはこれらの混合物などを好ましく挙げることができる。

[0021] 本発明の凍結乾燥体においては、カチオン性ポリマーとしては、ポリエチレンイミン;プロタミン;Hel Δ 1;ポリアミドアミンデンドリマー、ポリリジンデンドリマーなどのデンドリマー;キトサン;2-ジメチルアミノエチルメタクリレートの重合体又は共重合体;2-トリメチルアミノエチルメタクリレートの重合体又は共重合体などを好ましく用いることができ、ポリエチレンイミン、ポリアミドアミンデンドリマー、ポリリジンデンドリマー、キトサンを特に好ましく用いることができる。また、カチオン性脂質若しくはそれを含む集合体としては、リポフェクタミン(上記DOSPAとDOPEの3:1w/w混合体リポソーム)を好ましくは用いることができる。

[0022] 本発明の凍結乾燥体において使用するアニオン性ポリマーとしては、分子中にアニオン性基を含む、負に荷電された、分子量が500~400万程度の天然由来又は合成高分子であって、水中でポリカチオンと複合体を形成できる官能基を1分子中に複数、好ましくは5個以上有する高分子を使用することができ、このような官能基としては、例えばカルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩を挙げることができる。このようなアニオン性ポリマーとしては、両イオン性ポリマーも

含まれる。

- [0023] 本発明の凍結乾燥体においては、アニオン性ポリマーとしては、カルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基を有する多糖類又はその誘導体；負に荷電した側鎖を有するアミノ酸残基を含むポリアミノ酸；カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体；カルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基を有する合成高分子；カルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基、並びに置換されていてもよいアミノ基若しくはアンモニウム基又はその塩（これらの基は、例えば炭素数1～6のアルキル基、フェニル基などで単又は多置換されていてもよい）を有する高分子；並びにそれらの組み合わせを用いることができる。
- [0024] 本発明の凍結乾燥体においてアニオン性ポリマーとして用いることができる上記のような官能基を有する多糖類又はその誘導体としては、好ましくはグルコサミノグリカンを用いることができる。このようなグルコサミノグリカンの分子量は、好ましくは1000～400万、より好ましくは4000～300万である。このようなグルコサミノグリカンとして、具体的には例えばヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパリン、デルマタン硫酸などを例示することができる。なかでもヒアルロン酸を好ましく用いることができる。ヒアルロン酸は、その塩又は負に荷電した誘導体としても用いることができる。その分子量は、5,000以上であればよいが、10,000以上が好ましく、10万～300万がより好ましい。ヒアルロン酸の塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩などを例示することができる。また、ヒアルロン酸の誘導体としては、例えば、ヒアルロン酸にポリエチレングリコール、ペプチド、糖、蛋白質、ヨウ酸、抗体又はその一部などを導入することによって得られるものが挙げられ、スペルミン、スペルミジン等を導入し、プラスに荷電した部分を持つ両イオン性の誘導体も含まれる。
- [0025] 本発明の凍結乾燥体においてアニオン性ポリマーとして用いることができる、負に荷電した側鎖を有するアミノ酸残基を含むポリアミノ酸とは、カルボキシル基、 $-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩などの基を側鎖として有するアミノ酸残基を含む、好ましくは500～100万の分子量を有するポリアミノ酸である。このよ

うなポリアミノ酸としては、具体的にはポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸などを例示することができる。

[0026] 本発明の凍結乾燥体においてアニオン性ポリマーとして用いることができるカルボキシル側鎖を持つPEG誘導体とは、PEG1分子当たりカルボキシル側鎖を複数、好ましくは5個以上有する、500以上、好ましくは2,000以上、より好ましくは4,000～40,000の分子量を有するPEG誘導体である。カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体は、その塩又は負に荷電した誘導体としても用いることができる。これらの塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩などを例示することができる。このようなPEG誘導体としては、具体的には非特許文献1(J. Biomater. Sci. Polymer Edn. Vol. 14, pp 515-531 (2003))に記載されたPEG誘導体を例示することができる。

[0027] 本発明の凍結乾燥体においてアニオン性ポリマーとして用いることができるカルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基を有する合成高分子とは、1分子当たり複数、好ましくは5個以上の、カルボキシル基、 $-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基を有する重合体又は共重合体であって、好ましくは500～400万の分子量を有する重合体又は共重合体である。このような重合体又は共重合体としては、具体的には分子量1000～300万のアクリル酸又はメタクリル酸の重合体又は共重合体、あるいはポリビニルアルコールの硫酸エステル体、サクシニミジル化ポリ-L-リジンなどを例示することができる。

[0028] 本発明の凍結乾燥体においてアニオン性ポリマーとして用いることができるカルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基、並びに置換されていてもよいアミノ基若しくはアンモニウム基又はその塩(これらの基は、例えば炭素数1～6のアルキル基、フェニル基などで単又は多置換されていてもよい)を有する高分子とは、1分子当たりカルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基を複数、好ましくは5個以上、並びに上記のように置換されていてもよいアミノ基若しくはアンモニウム基又はその塩を有する、500以上、好ましくは2,000以上、より好ましくは4,000～40,000の分子量を有する高分子である。このような高分子としては、好ましくは、カルボキシル側

鎖とその当量以下の上記のアミノ基若しくはアンモニウム基又はその塩を持つPEG誘導体を挙げることができ、具体的には非特許文献5 (Macromol. Biosci. Vol. 2, pp 251-256 (2002)) に記載されている方法で調製することができるPEG誘導体を例示することができる。

- [0029] 本発明の凍結乾燥体において用いることができるアニオン性ポリマーは、通常は負に荷電されていないものであっても、カルボキシル基などの官能基の導入によって負に荷電されるものであれば使用可能であり、また必要により糖鎖、オリゴペプチド、抗体などで更に修飾されていてもよい。
- [0030] 本発明の凍結乾燥体においては、アニオン性ポリマーとしては、ヒアルロン酸、カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体、ポリアクリル酸などのアニオン性ポリマー又はそれらの塩を好ましく用いることができ、ヒアルロン酸、カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体又はそれらの塩などを特に好ましく用いることができる。
- [0031] また、アニオン性ポリマーとして、核酸導入の標的細胞に対して特異的接着能を有するものを用いることにより、標的細胞に対して特異的に核酸導入を行うことが可能である。例えばアニオン性ポリマーとしてヒアルロン酸を用いる場合、ヒアルロン酸と特異的に結合するCD44などの細胞表面分子を有する細胞を標的とすることができる。また、RGDペプチドを導入したアニオン性ポリマーを用いることにより、多くの種類の腫瘍細胞を標的とすることができ、またガラクトース側鎖を導入したアニオン性ポリマーを用いることにより肝細胞又は肝由来の細胞を標的とすることができる。
- [0032] 本発明の凍結乾燥体において、カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体と、アニオン性ポリマーの組み合わせとしては、ポリエチレンイミンとヒアルロン酸；ポリエチレンイミンとカルボキシル側鎖を持つPEG誘導体；DOSPAを含む集合体（例えばリポフェクタミン（DOSPAとDOPEの3:1w/w混合体リポソーム））とヒアルロン酸；DOSPAを含む集合体（例えばリポフェクタミン）とカルボキシル側鎖を持つPEG誘導体を好ましく挙げることができる。
- [0033] 本発明凍結乾燥体において使用する核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体と、カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体の各荷電基のモル比（負電荷：正電荷比）は、標的細胞・核酸等・カチオン性ポリマー等の種類により異な

るが、1:0.8~1:100であるとよく、好ましくは1:1~1:50であり、より好ましくは1:1.2~1:30である。ここでいう核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体と、カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体の配合比とは、各荷電基のモル比であり、具体的には核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体のリン酸アニオンによる負電荷:カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体の正電荷又は正に帯電できる官能基のモル比を指す。

[0034] 本発明凍結乾燥体において使用する核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体と、アニオン性ポリマーの各荷電基のモル比(負電荷:負電荷比)は、標的細胞・核酸等・アニオン性ポリマーの種類により異なるが、1:0.2~1:1000であるとよく、好ましくは1:0.2~1:100であり、より好ましくは1:1~1:60である。ここでいう核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体酸と、アニオン性ポリマーの配合比とは、各荷電基のモル比であり、具体的には核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体のリン酸アニオンによる負電荷:アニオン性ポリマーの負電荷又は負に帯電できる官能基のモル比を指す。

[0035] 例えばアニオン性ポリマーとしてヒアルロン酸を用いる場合、核酸とヒアルロン酸との配合比は、1:0.2~1:1000であるとよく、好ましくは1:0.2~1:100であり、より好ましくは1:1~1:60である。

[0036] 例えばアニオン性ポリマーとしてカルボキシル側鎖を持つPEG誘導体を用いる場合、核酸とカルボキシル側鎖を持つPEG誘導体との配合比は、1:0.2~1:1000であるとよく、好ましくは1:0.2~1:100であり、より好ましくは1:1~1:60である。

[0037] 特に、カチオン性ポリマーとしてポリエチレンジアミンを、アニオン性ポリマーとしてヒアルロン酸を用いる場合、核酸:ポリエチレンジアミン:ヒアルロン酸配合比は、1:2~60:1~240、好ましくは1:4~24:1~160であり、より好ましくは1:7~20:2~60、特に好ましくは1:8~14:2~32である。

[0038] 特に、カチオン性ポリマーとしてポリエチレンジアミンを、アニオン性ポリマーとしてカルボキシル側鎖を持つPEG誘導体を用いる場合、核酸:ポリエチレンジアミン:カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体配合比は、1:2~60:1~240、好ましくは1:4~24:2~160であり、より好ましくは1:7~20:2~60、特に好ましくは1:8~14:4~32である。

- [0039] 特に、カチオン性脂質を含む集合体としてリポフェクタミン(DOSPAとDOPEの3:1w/w混合体リポソーム)を、アニオン性ポリマーとしてヒアルロン酸を用いる場合、核酸:リポフェクタミン:ヒアルロン酸配合比は、1:1~50:0.2~240、好ましくは1:1.2~48:0.2~160であり、より好ましくは1:1.5~30:0.5~60、特に好ましくは1:1.8~16:1~32である。
- [0040] 特に、カチオン性脂質を含む集合体としてリポフェクタミンを、アニオン性ポリマーとしてカルボキシル側鎖を持つPEG誘導体を用いる場合、核酸:リポフェクタミン:カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体配合比は、1:1~50:0.1~160、好ましくは1:1.2~48:0.2~160であり、より好ましくは1:1.5~30:0.5~60特に好ましくは1:1.8~16:2~32である。
- [0041] 本発明の凍結乾燥体に含まれる核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体;カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体;及びアニオン性ポリマーの好ましい配合比は、上述のとおりであるが、核酸などを導入する細胞の数や種類により最適な条件は変動するため、配合比は、当業者が、用いる細胞、核酸等の種類に応じて、適宜決定することができる。
- [0042] 本発明凍結乾燥体は、上述した核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体;カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体;及びアニオン性ポリマーを、上述した配合比で、混合することによって複合体を形成させる工程、次いでこれを凍結乾燥する工程によって調製することができる。混合する順序としては、[1]核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体;[2]カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体、[3]アニオン性ポリマーの順、又は、[1]核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体;[2]アニオン性ポリマー、[3]カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体の順が好ましい。核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体は、カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体とイオン結合によって結合し、さらにカチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体が、アニオン性ポリマーともイオン結合した複合体が形成される。あるいは、各成分の配合組成によっては、このような複合体構造の外殻を主にアニオン性ポリマーが被覆し、負の表面電位を有する態様が形成される

- [0043] 次いで得られた複合体を凍結乾燥する。凍結乾燥は、通常の凍結乾燥条件下で行うことができ、例えば減圧下(好ましくは、5～100mmHg、より好ましくは10mmHg)、外気温 -78°C ～ 60°C 、好ましくは -30°C ～ 40°C で乾燥することによって行うことができる。乾燥に要する時間は、減圧度、溶媒の量によって異なり、通常は1時間～2日間で完了する。
- [0044] このようにして調製した本発明の凍結乾燥体は、ヒトや動物に対する各種の遺伝子治療、アンチセンス治療、あるいは特定の遺伝子を導入したり、制御、ノックダウン、ノックアウトした実験動物や細胞の作成に利用することができる。具体的には、使用直前に本発明の凍結乾燥体を水、生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液、培地液などの溶媒に懸濁又は溶解することにより再水和物としてから用いることができる。再水和に際しては、凍結乾燥体を、例えば核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体の100～10000倍(重量比)の溶媒を用いて懸濁又は希釈する。凍結乾燥前と異なる量、異なる種類の溶媒を用いることができるため、従来困難であった比較的高濃度の懸濁液や溶液(たとえば1ml中にDNAを1mg含む液)も容易に調製することができる。
- [0045] このようにして再水和した本発明の凍結乾燥体は、細胞への核酸等の導入に際しては、具体的には、例えば、ウェル中、体外に取り出した標的細胞を、水和した本発明の凍結乾燥体で処理することにより遺伝子やアンチセンス核酸を導入した後、該細胞を生体内に戻して、目的とする遺伝子を発現させるex vivo法、あるいは、in vivo、in situ法などの直接的な遺伝子やアンチセンス核酸の導入法など、生体細胞への核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体の導入に通常用いられる任意の方法を用いることができる。
- また、本発明の凍結乾燥体は、再水和することなく、そのまま核酸等の導入を行う細胞と接触させたり、核酸等の導入を行う動物に皮下移植する、核酸等の導入の標的である組織内、組織表面、または近傍に移植するなどの手段によって投与することもできる。
- [0046] 本発明の凍結乾燥体の細胞への適用量は、上述した導入方法、疾患の種類などによって異なるが、例えば核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体の量にして、ex vivo法、in situ法では、直径1～2cmのウェル当たりで $0.2 \sim 10 \mu\text{g} / 10^{4 \sim 7}$ 個・細胞、in vivo

o法では、投与部位によって大きく異なるが、腫瘍内への局所投与では例えば5～1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ・腫瘍、膀胱などの臓器への投与では例えば0.1 μg ～100mg/臓器、全身投与では例えば0.1ng～10mg/Kg・体重とすることができる。

[0047] 生体に直接投与するin vivo法としては、水和させた本発明の凍結乾燥体水和物を、静脈、皮下又は筋肉、腹腔、腫瘍内、腫瘍近傍などへ注射し；鼻腔、口腔、肺などから吸入させ；膀胱内、直腸内に直接注入し；病変部組織ないし近傍の血管内に直接投与し；あるいは、ゲル状物、スポンジなどの多孔体、不織布などに担持させて留置するなど、遺伝子治療技術の如何なる方法も用いることができる。

また、本発明の凍結乾燥体水和物を再水和することなく用いる際においても、上記の量の凍結乾燥体を、上述したようなex vivo法、in situ法、またはin vivo法により、用いることができる。

[0048] 本発明の凍結乾燥体においては、通常のコア、オリゴコア、又はその誘導体と、カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体との複合体が持つ正の荷電を、アニオン性ポリマーが中和すると共に、その中和作用が、生体、細胞への投与後においても保持されていることによって、複合体と、血清タンパク質、血球細胞、細胞外マトリックスなどによる凝集等の相互作用が阻止され、また、コア、オリゴコア、又はその誘導体の酵素分解が阻止されるため、コアが細胞に効率的に取り込まれ、その発現効率も高い。

上記より、本発明の凍結乾燥体水和物は、コア、オリゴコア、又はその誘導体の導入用製剤又は試薬として、あるいはコア、オリゴコア、又はその誘導体の導入用キットとして使用することができる。

[0049] 本発明を、実施例により更に具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明を何ら限定するものではない。

実施例 1

[0050] プラスミド(Plasmid)/ポリエチレンジアミン(PEI)/ヒアルロン酸(HA)複合体の凍結乾燥体による遺伝子発現

凍結乾燥した遺伝子・PEI・HAからなる三成分の複合体をマウスのメラノーマ細胞由来のB16とインキュベートし、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を確認した。

[0051] ルシフェラーゼプラスミドは、非特許文献6 (Biomacromolecules Vol. 7, pp 1274 - 1279) 記載と同じものを用いた。PEIは、Polyscience 社製の直鎖状PEI、Mw=25000のものを用いた。HAは、ナカライテスク株式会社の「微生物由来」のヒアルロン酸を用いた。PBSはRoman Industries 社製のPhosphate Buffered Salts (Tablet) を蒸留したイオン交換水に溶解したものを用いた。以降の実施例でも同様である。

[0052] [操作手順]

[1] 遺伝子を導入する2日前に、24穴マルチプレートにB16細胞をまき、EMEM培地を用いて2晩インキュベートした。

[2] 導入する前日にルシフェラーゼプラスミド1.3 μ gを含む水溶液2 μ lを2 μ lのPEI水溶液と+/-比(電荷モル比)が8となるように混合し、数回ピペッティングした後、様々な濃度のHA溶液4 μ lを加え、充分攪拌した後マイナス30℃で凍結した。その後、凍結乾燥して、本発明の凍結乾燥体を調製した。またHAとPEIの混合順序を変えたものについても同様の方法で調製した。

[3] 培養した培地を取り除き、10%FBSと25Uのペニシリンと25 μ gのストレプトマイシンを含むEMEM500 μ lをウェルに入れた。

[4] [1]で調製した凍結乾燥体にPBS 16 μ lを混合し、1時間インキュベートしたあと、ウェルに加えた。

[5] 37℃、5%CO₂-95% air下で4時間インキュベートした。

[6] 培地を新しい10%FBSと25Uのペニシリンと25 μ gのストレプトマイシンを含むEMEMと取り換え、37℃で20時間インキュベートした。

[7] 20時間のインキュベート後、培地を取り除き、PicaGeneの細胞溶解液を200 μ lずつ各ウェルに加えた。20分ほど放置してから、細胞を剥がし、マイクロチューブに回収した。

[8] 遠心分離(15000rpm, 1分)した後、上清を用いてルシフェラーゼアッセーを行った。ルシフェラーゼアッセーは、PicaGene Luminescence kitの方法に従って行った。

[0053] なお、プロテインアッセーには、この細胞溶解液をそのまま用いた。プロテインアッセーは、Bio-Rad 社のProtein assay kitを用いて行った。

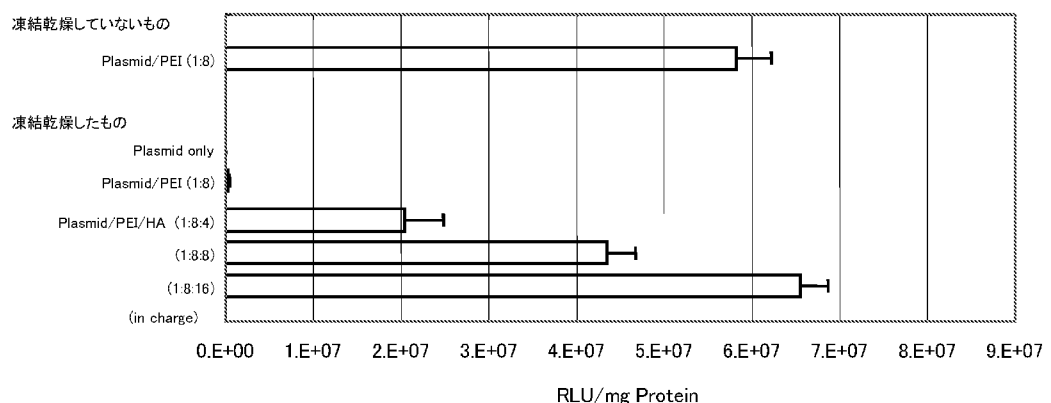
[0054] 比較のため、HAを添加しなかったものについて、凍結乾燥したもの、凍結乾燥しなかったものについても遺伝子発現を調べた。

[0055] [結果]

結果を下図に示す。ここで、図中の()の中の値はPEIのカチオン、HAのアニオンの、プラスミドのアニオンに対する比であり、具体的には、PEI、HAのDNAに対する電荷のモル比である。

[0056] 凍結乾燥したPlasmid /PEI二元複合体では、発現が凍結乾燥前の1000分の1以下になり、ほとんど発現が観察されなかったのに対して、HAを加えたものに於いては高い発現が見られ、Plasmid:PEI:HA = 1:8:16 (in charge)で混合した後凍結乾燥したものでは、凍結乾燥前のPlasmid /PEI二元複合体よりもさらに11%以上高い発現効率を示した。

[0057] [表1]



実施例 2

[0058] 混合順序の影響

実施例1において、[2]で、ルシフェラーゼプラスミドに先にHAを加えてからPEIを加えて混合し、凍結乾燥したものについて同様に評価した。

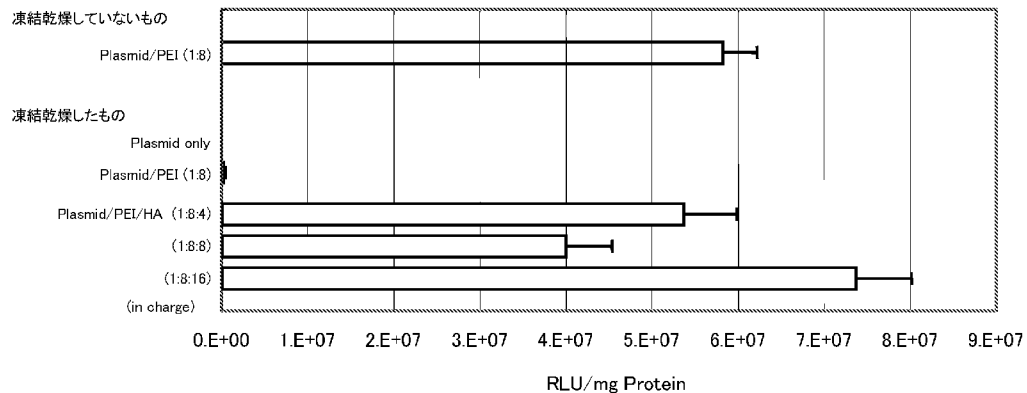
[0059] [結果]

結果を下図に示す。ここで、図中の()の中の値はPEIのカチオン、HAのアニオンの、プラスミドのアニオンに対する比であり、具体的には、PEI、HAのDNAに対する電荷のモル比である。

[0060] 凍結乾燥したPlasmid /PEI二元複合体では、ほとんど発現しなかったのに対して、

HAを加えたものに於いては高い発現が見られ、Plasmid:PEI:HA = 1:8:16 (in charge) で混合した後凍結乾燥したものでは、凍結乾燥前のPlasmid /PEI二元複合体よりもさらに26%以上高い発現効率を示した。この結果から、混合順序を変えても、高い発現が見られることが明らかになった。

[0061] [表2]



実施例 3

[0062] Plasmid/PEI/カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体(以下PEG-C)を含む凍結乾燥体による遺伝子発現

実施例3では、アニオン性ポリマーとして、分子量約1万、1分子に約18個のカルボキシル基を含むPEG-Cを、非特許文献1(J. Biomater. Sci. Polymer Edn. Vol. 14, pp 515-531 (2003))に記載された方法で合成して用いた。

[0063] 凍結乾燥した遺伝子・PEI・PEG-Cからなる三成分の複合体をマウスのメラノーマ細胞由来のB16とインキュベートし、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を確認した。

[0064] [操作手順]

[1] 遺伝子を導入する2日前に、24穴マルチプレートにB16細胞をまき、EMEM培地を用いて2晩インキュベートした。

[2] 導入する前日にルシフェラーゼプラスミド1.3 μgを含む水溶液12.5 μlを12.5 μlのPEI水溶液と+/−比(電荷モル比)が8となるように混合し、数回ピペッティングした後、様々な濃度のPEG-C溶液25 μlを加え、充分攪拌した後マイナス30℃で凍結させた。その後、凍結乾燥して、本発明の凍結乾燥体を調製した。

[3] 培養した培地を取り除き10%FBSと25Uのペニシリンと25 μgのストレプトマイシン

ンを含むEMEM500 μ lをウェルに入れた。

[4][2]で調製した凍結乾燥体にPBS 50 μ lを混合し、1時間インキュベートしたあと、ウェルに加えた。

[5]37°C、5%CO₂ – 95% air下で4時間インキュベートした。

[6]培地を新しい10%FBSと25Uのペニシリンと25 μ gのストレプトマイシンを含むEMEMと取り換え、37°Cで20時間インキュベートした。

[7]20時間のインキュベート後、培地を取り除き、細胞をPBSで一回洗い、その後PicaGeneの細胞溶解液を200 μ lずつ各ウェルに加えた。20分ほど放置してから、細胞を剥がし、マイクロチューブに回収した。

[8]遠心分離(15000rpm, 1分)した後、上清を用いてルシフェラーゼアッセーを行った。ルシフェラーゼアッセーは、PicaGene Luminescence kitの方法に従って行った。

[0065] なお、プロテインアッセーには、この細胞溶解液をそのまま用いた。プロテインアッセーは、Bio-Rad 社のProtein assay kitを用いて行った。

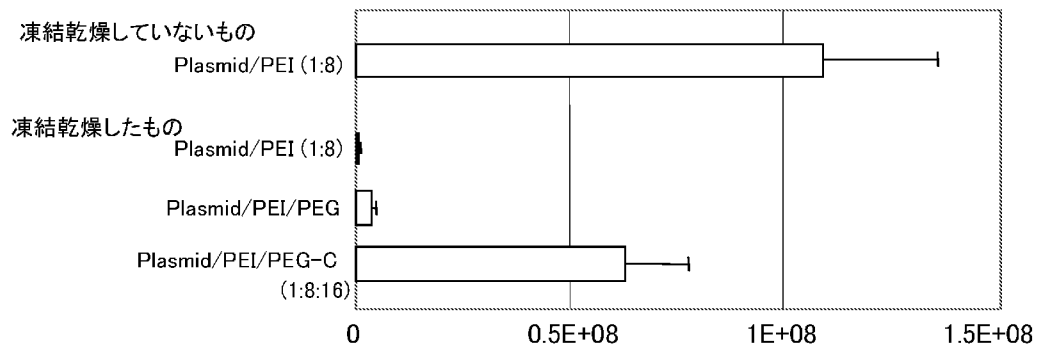
[0066] また、比較のため、PEG-Cとほぼ同じ分子量で、電荷を持たない中性ポリマー、PEGを、PEG-Cと同重量加えて凍結乾燥したものについても同様に実験を行った。

[0067] [結果]

結果を下図に示す。ここで、図中の()の中の値はPEIのカチオン、PEG-Cのアニオンの、プラスミドのアニオンに対する比であり、具体的には、PEI、PEG-CのDNAに対する電荷のモル比である。

[0068] 凍結乾燥したPlasmid/PEI二元複合体では発現はほとんど観察されなかった。また、電荷を持たないPEGを加えたものでも、発現はほとんど見られなかった。一方、PEG-Cを加えた本発明の凍結乾燥体に於いては、凍結乾燥していない元のPlasmid/PEI二元複合体の6割近い高い発現が見られた。

[0069] [表3]



実施例 4

[0070] プラスミド (Plasmid) / リポフェクタミン (Lipofectamine) / HA凍結乾燥体による遺伝子発現

本実施例では、リポフェクタミンはInvitrogen社製のものを用了。

[0071] 凍結乾燥した遺伝子・Lipofectamine・HAからなる三成分の凍結乾燥体をマウスのメラノーマ細胞由来のB16とインキュベートし、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を確認した。

[0072] [操作手順]

[1] 遺伝子を導入する2日前に、24穴マルチプレートにB16細胞をまき、EMEM培地を用いて2晩インキュベートした。

[2] 導入する前日にルシフェラーゼプラスミド1.3 μ gを含む水溶液12.5 μ lを12.5 μ lのLipofectamine水溶液と、ルシフェラーゼプラスミドとLipofectamineの重量比が8となるように混合し、数回ピペッティングした後、様々な濃度のHA溶液25 μ lを加え30分インキュベート後マイナス30℃で凍結させた。その後、凍結乾燥して、本発明の凍結乾燥体を調製した。

[3] 培養した培地を取り除き25Uのペニシリンと25 μ gのストレプトマイシンを含むEMEMを500 μ lウェルに入れた。

[4] [2]で調製した凍結乾燥体にPBS 50 μ lを混合し45分インキュベートしたあと、ウェルに加えた。

[5] 37℃、5%CO₂ - 95% air下で4時間インキュベートした。

[6] 25Uのペニシリンと25 μ gのストレプトマイシンを含む新しいEMEM1100 μ lと、FBS400 μ lを加え、37℃で20時間インキュベートした。

[7] 24時間のインキュベート後、培地を取り除き、細胞をPBSで一回洗い、その後PicaGeneの細胞溶解液を200 μ lずつ各ウェルに加えた。20分ほど放置してから、細胞を剥がし、マイクロチューブに回収した。

[8] 遠心分離(15000rpm, 1分)した後、上清を用いてルシフェラーゼアッセーを行った。ルシフェラーゼアッセーは、PicaGene Luminescence kitの方法に従って行った。

[0073] なお、プロテインアッセーには、この細胞溶解液をそのまま用いた。プロテインアッセーは、Bio-Rad 社のProtein assay kitを用いて行った。

[0074] 比較のため、HAを添加しなかったものについて、凍結乾燥したもの、凍結乾燥しなかったものについても遺伝子発現を調べた。

[0075] また、[3]の細胞とDNA複合体とのインキュベートを、80%FBSを含んだEMEM培地中で行ったものについても同時に検討した。この場合、[6]ではFBSは加えず、25 Uのペニシリンと25 μ gのストレプトマイシンを含むEMEMのみを1500 μ l加えた。

[0076] [結果]

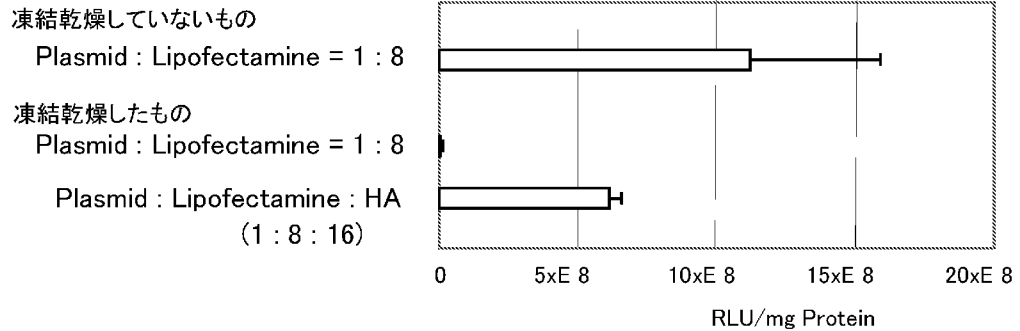
結果を下図に示す。ここで、図中の()の中の値はLipofectamine、HAのPlasmidに対する重量比である。

[0077] FBSを含まない培地中で遺伝子導入したものでは、凍結乾燥したPlasmid/ Lipofectamine二元複合体では、発現が凍結乾燥前の3000分の1以下になり、発現はほとんど観察されなかったのに対して、HAを加えたものに於いては凍結乾燥していない元のPlasmid/ Lipofectamine二元複合体の約55%の発現が示された。

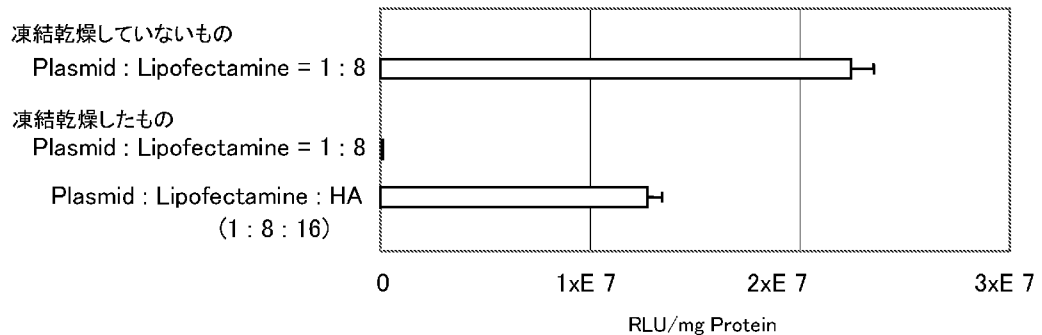
[0078] 80%血清存在下では、凍結乾燥したPlasmid/ Lipofectamine二元複合体の発現はさらに低下したが、凍結乾燥したPlasmid/Lipofectamine/HA三元複合体は、凍結乾燥していない元のPlasmid/ Lipofectamine二元複合体の約57%の高い発現を示した。

[0079] [表4]

FBS(0%)



FBS(80%)



実施例 5

[0080] プラスミド (Plasmid) / リポフェクタミン (Lipofectamine) / PEG-C 凍結乾燥体による遺伝子発現

実施例4と同様の実験を、HAの代わりに、プラスミドDNAに対して電荷比16倍のPEG-Cを用いて行った。具体的には、実施例4でHA溶液25 μ lを加えたのに代えて、下記のグラフに記載した通りにプラスミドDNAの16倍の電荷比になる量のPEG-Cを水に溶かして25 μ lとして加えた。

[0081] 遺伝子導入は血清を含まない培地中又は80%の血清を含む培地中で行った。

[0082] [結果]

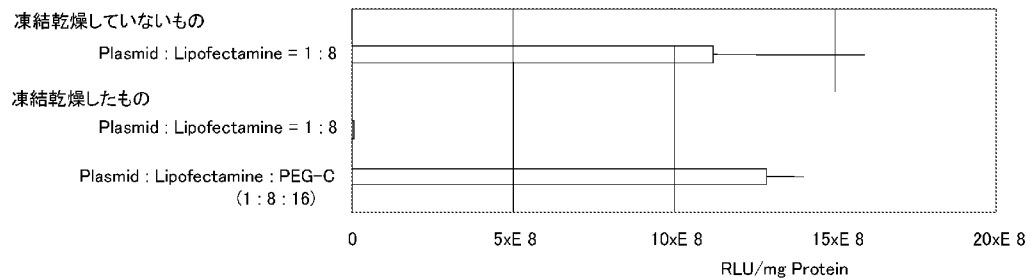
結果を下図に示す。ここで、図中の()の中の値はLipofectamine、PEG-CのDNAに対する重量比である。

凍結乾燥したDNA/Lipofectamine二元複合体では発現はほとんど観察されなかったのに対し、PEG-Cを加えたものでは高い発現が示され、80%血清存在下では、Plasmid/Lipofectamine/PEG-C三元複合体は、凍結乾燥していない元のPlasmid/ Lipo

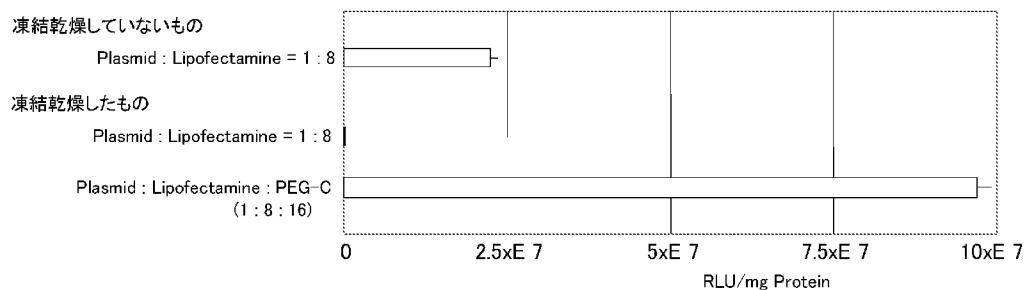
fectamine二元複合体よりもさらに4倍以上もの高い発現効率を示した。

[0083] [表5]

FBS(0%)



FBS(80%)



実施例 6

[0084] 凍結乾燥前後における濃度の変化の影響

実施例5において、[2]で、溶媒を10倍量用いて低濃度で液を調製、混合して凍結乾燥し、[4]では5と同様にPBS50 μ lを加えて再水和したものについて同様に評価した。

[0085] [結果]

結果を下図に示す。ここで、図中の()の中の値はLipofectamine、PEG-CのDNAに対する重量比である。

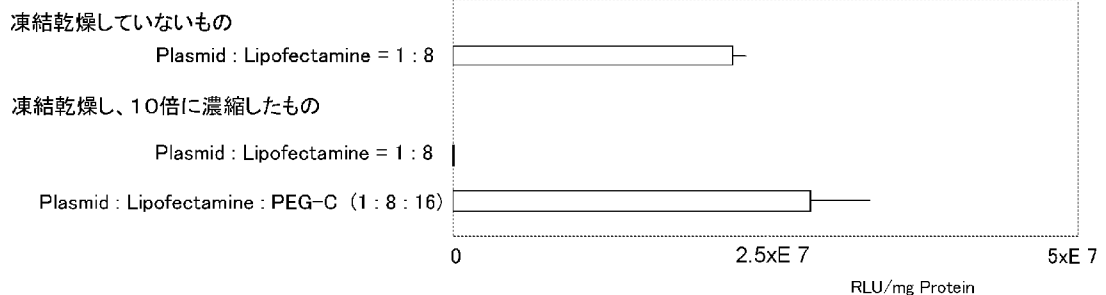
凍結乾燥したDNA/ Lipofectamine二元複合体では、発現が凍結乾燥前の1000分の1以下になり、発現はほとんど観察されなかったのに対して、PEG-Cを加えたものに於いては凍結乾燥後濃縮したものにおいても、高い発現が見られ、80%血清存在下では、Plasmid/Lipofectamine/PEG-C三元凍結乾燥体は、凍結乾燥していない元のPlasmid/ Lipofectamine二元複合体よりもさらに30%近く高い発現効率を示した。

[0086] これらの結果から、凍結乾燥をすることによって、容易に遺伝子導入可能な任意の

濃度の複合体懸濁液・溶液が調製できることが確認された。

[0087] [表6]

FBS(80%)



実施例 7

[0088] 凍結乾燥した固体状のDNA複合体の生体への投与

[操作手順]

ルシフェラーゼをコードしたプラスミドのTEバッファー溶液(0.8mg/ml)50 μ lを水400 μ lで希釈し、そこにヒアルロン酸水溶液(5.8mg/ml)100 μ lを加え、最後にPEI溶液(1.25mg/ml)50 μ lを加えた。三成分混ぜてから30分後に-30℃で凍結させ、その後凍結乾燥し、固体状の複合体を得た。

100 μ lのメディウム^{*1}に懸濁した 4.72×10^6 のマウスのメラノーマ細胞由来のB16を5週齢の雄のddYマウスの皮下に移殖した。腫瘍が6-8mmになった時、麻酔下で腫瘍部分に切り目を入れ、上記の固体状のDNA/PEI/HA複合体を腫瘍の中に埋め込み縫合した。

二日後、エーテルで犠死させ、腫瘍と皮を取り出し、1mlの細胞溶解液^{*2}中でホモジナイズした。その後、10000rpm、4℃で20分遠心し、上澄み(5 μ l)に基質(プロメガ社製)(20 μ l)を加え、ルシフェラーゼの発光量をルミノメーターで30秒間測定した。

総タンパク量は、各サンプルの上澄みを1/80に希釈したもの20 μ lをBioRadのタンパク定量試薬1mlに加え、20分後に波長595nmにおける吸光度を測定し、定量した。

[0089] [結果]

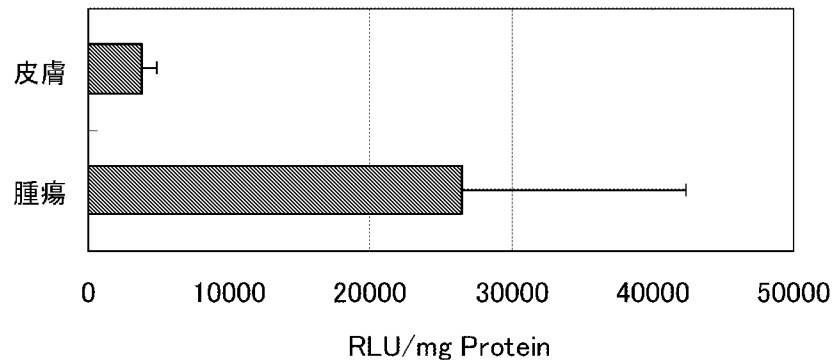
固体状のDNA複合体は、腫瘍内で極めて高い発現を示した(結果を下記表に示す)。

^{*1}メディウム;EMEM培地(10%FBS、penicillin G sodium (100unit/mL)、streptomycin s

ulfate(0.1mg/mL)を含む)

*²細胞溶解液;0.05%Triton x-100、2mM EDTA、0.1M Tris-HCl(pH7.5)

[0090] [表7]



実施例 8

[0091] 培養プレート上で凍結乾燥したDNA複合体による細胞への遺伝子導入

[操作手順]

ルシフェラーゼをコードしたプラスミドの溶液(0.8mg/ml)1.56 μ lを12.5 μ lの水で希釈し、そこにPEI溶液(1.25mg/ml) 1.56 μ lを加え、最後にヒアルロン酸水溶液(5.8mg/ml)3.56 μ lを加えた。三成分混ぜてから培養プレートのウェルに入れ、30分後に-30℃で凍結させ、その後凍結乾燥した。ヒアルロン酸を加えないものについても同様に凍結乾燥した。また、凍結乾燥せずにフレッシュな懸濁液を用いたものについても同時に比較した。

メディウム*¹300 μ lに懸濁した 1.2×10^5 のマウスのメラノーマ細胞由来のB16を、DNA複合体を凍結乾燥したウェルの中に撒いた。4時間後メディウム1mlを足し、さらに20時間後新しいメディウム1mlと取り替えた。それから24時間後、プロメガの細胞溶解液を200 μ l加え、細胞をハーベストし、15000rpm、4℃で1分遠心し、上澄み(5 μ l)に基質(プロメガ社製)(20 μ l)を加え、ルシフェラーゼの発光量をルミノメーターで30秒間測定した。

総タンパク量は、各サンプルの上澄みを1/5に希釈したもの20 μ lをBioRadのタンパク定量試薬1mlに加え、20分後に波長595nmにおける吸光度を測定し、定量した。

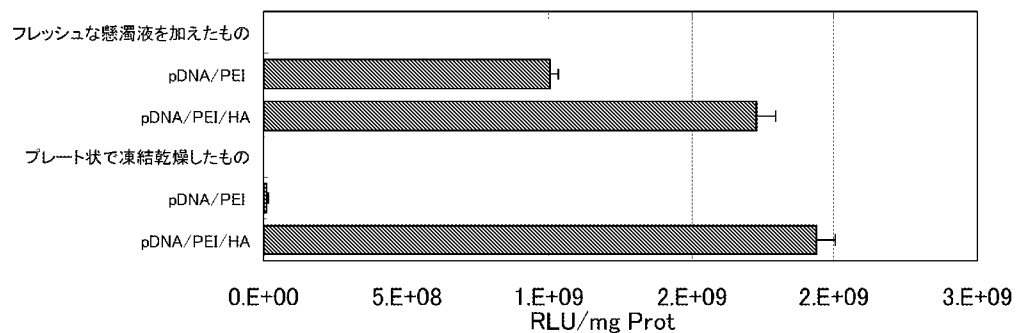
*¹メディウム;EMEM培地(10%FBS、penicillin G sodium(100unit/mL)、streptomycin sul

fate (0.1mg/mL)を含む)

[0092] [結果]

ヒアルロン酸(HA)を加えてないものは凍結乾燥するとほとんど遺伝子導入活性が無くなったが、ヒアルロン酸を加えたものは凍結乾燥しても、フレッシュな懸濁液同様の高い活性を示した(結果を下記の表に示す)。

[0093] [表8]



実施例 9

[0094] 凍結乾燥によって濃縮したDNA複合体懸濁液を用いたin vivo 遺伝子導入

[操作手順]

ルシフェラーゼをコードしたプラスミドの溶液(0.8mg/ml)62.5 μ lを0、500、2000、または8000 μ lの水で希釈し、そこにヒアルロン酸水溶液(5.8mg/ml)125 μ lを加え、最後にPEI溶液62.5 μ l(1.25mg/ml)を加えた。三成分混ぜてから30分後に-30℃で凍結させ、その後凍結乾燥した。

凍結乾燥したDNA複合体を5%グルコース250 μ lで再溶媒和した。

100 μ lのメディウム^{*1}に懸濁した 4.72×10^6 のマウスのメラノーマ細胞由来のB16を5週齢の雄のddYマウスの皮下に移殖した。腫瘍が6-8mmになったところで、再溶媒和したDNA複合体懸濁液をマウスの尾静脈に投与した。

24時間後、エーテル麻酔下で脱血し、腫瘍、肝臓、肺を取り出し、1mlの細胞溶解液^{*2}中でホモジナイズした。その後、10000rpm、4℃で20分遠心し、上澄み(5 μ l)に基質(プロメガ社製)(20 μ l)を加え、ルシフェラーゼの発光量をルミノメーターで30秒間測定した。

総タンパク量は、各サンプルの上澄みを1/80に希釈したもの20 μ lをBioRadのタン

パク定量試薬1mlに加え、20分後に波長595nmにおける吸光度を測定し、定量した。

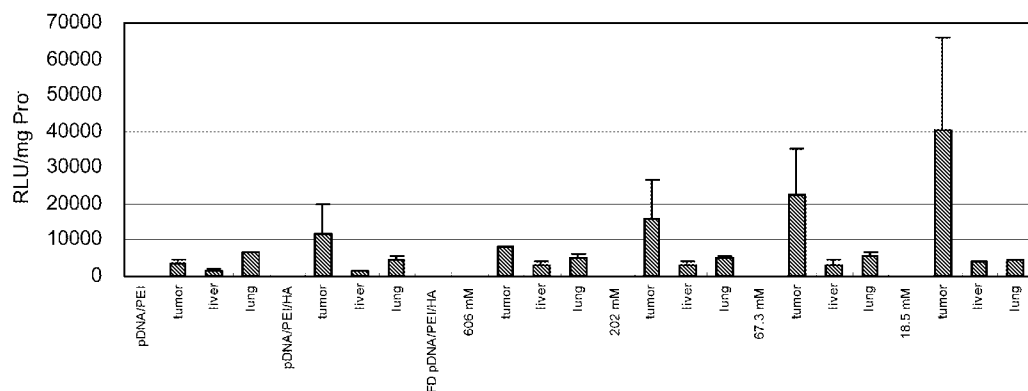
*¹メディウム;EMEM培地(10%FBS、penicillin G sodium(100unit/mL)、streptomycin sulfate(0.1mg/mL)を含む)

*²細胞溶解液;0.05% Triton x-100、2mM EDTA 0.1M Tris-HCl(pH7.5)

[0095] [結果]

結果を下記表に示す。表中の濃度は、複合体調製時の最終DNA濃度を核酸塩基濃度で表したものである。ヒアルロン酸(HA)を加えて凍結乾燥したものでは、調製時にDNA濃度の低かったものほど高い遺伝子発現が見られ、特に腫瘍内では顕著に高いルシフェラーゼ活性が示された。

[0096] [表9]



実施例 10

[0097] 培養プレート上で凍結乾燥したsiRNA複合体による遺伝子発現抑制効果

[操作手順]

アンチ・ルシフェラーゼsiRNA (Invitrogen社製)の水溶液(21.28 μ g/ml)25 μ lにプロタミン水溶液(78 μ g/ml)25 μ lを加え、その後ヒアルロン酸溶液(53.7 μ g/ml、または107.5 μ g/ml)50 μ lを加えた。三成分混ぜてから培養プレートのウェルに入れ、30分後に-30℃で凍結させ、その後凍結乾燥した。

メディウム*¹100 μ lに懸濁した 1.2×10^5 のマウスのメラノーマ細胞由来のB16を培養プレート上に撒き、4時間後メディウム1mlを足したのち、pDNA溶液(50 μ g/ml)25 μ lとPEI溶液(78 μ g/ml)25 μ lを混合したものを加えた。さらに20時間後新しいメディウム1mlと取り替えた。

そこから24時間後プロメガの細胞溶解液を200 μ l加え、細胞をハーベストし、15000 rpm、4°Cで1分遠心し、上澄み(5 μ l)に基質(プロメガ社製)(20 μ l)を加え、ルシフェラーゼの発光量をルミノメーターで30秒間測定した。

総タンパク量は、各サンプルの上澄みを1/5に希釈したもの20 μ lをBioRadのタンパク定量試薬1mlに加え、20分後に波長595nmにおける吸光度を測定し、定量した。

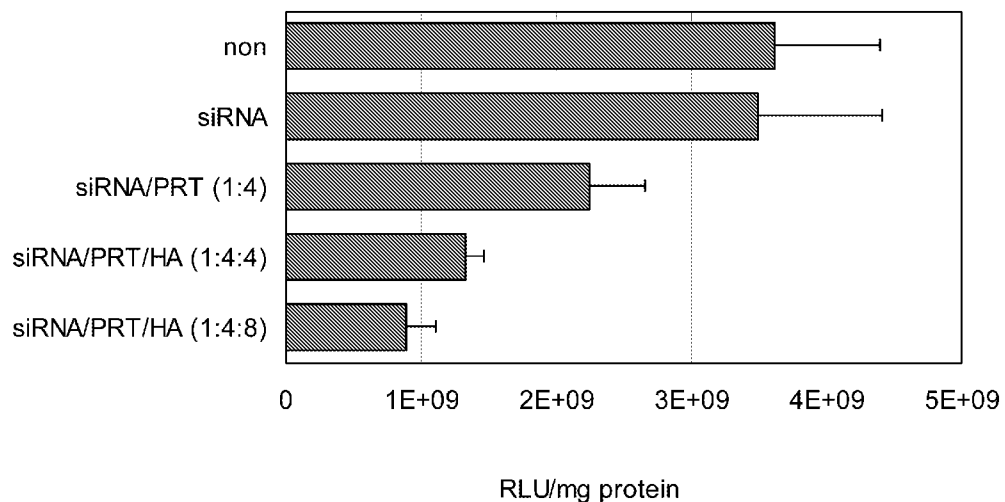
*¹メディウム;EMEM培地(10%FBS、penicillin G sodium(100unit/mL)、streptomycin sulfate(0.1mg/mL)を含む)

プロタミンやヒアルロン酸を加えないものについても同様に凍結乾燥した。

[0098] [結果]

プロタミン(PRT)とヒアルロン酸(HA)を加えて凍結乾燥したプレート上で培養した細胞では、有意にルシフェラーゼの発現が抑制されていた(下記表を参照)。

[0099] [表10]



実施例 11

[0100] 濃度を変えて調製したDNA複合体の再水和後のサイズ

[操作手順]

実施例1で用いたものと同じルシフェラーゼプラスミドの溶液(0.8mg/ml)1.5 μ lを0、1、2.5、または200 μ lの水で希釈し、そこにヒアルロン酸水溶液(5.8mg/ml)3 μ lを加え、最後にPEI溶液1.5 μ l(1.25mg/ml)を加えた。三成分混ぜてから30分後に-30°Cで凍結させ、その後凍結乾燥した。

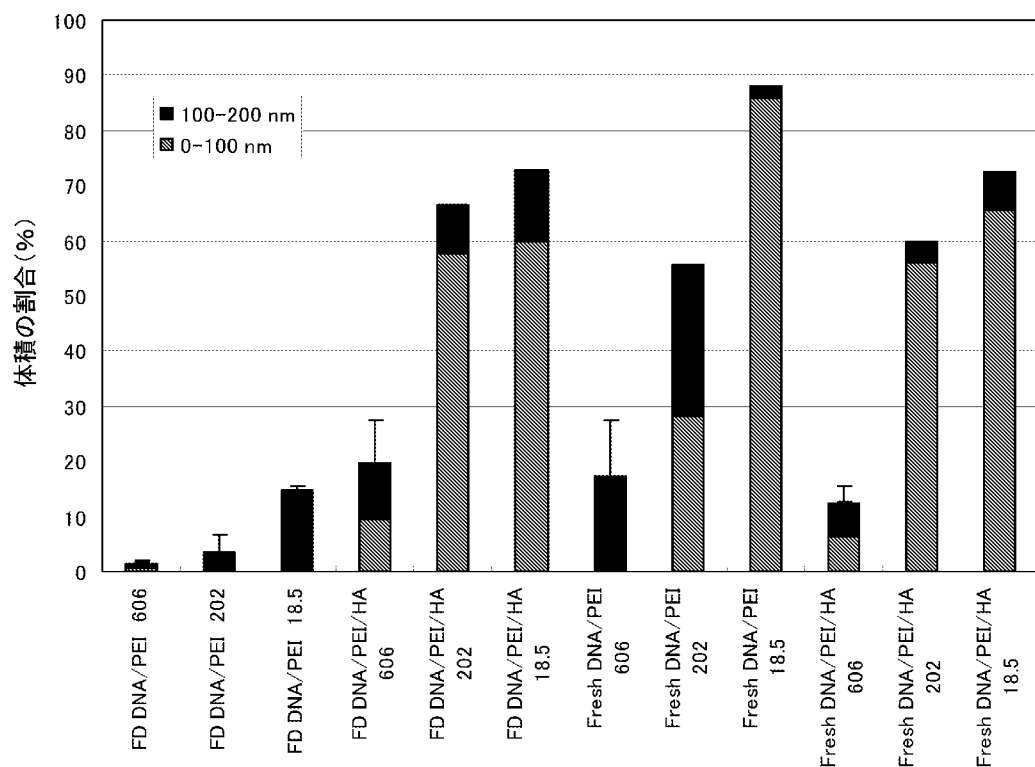
凍結乾燥したDNA複合体を水6 μ lで再水和し、30分後水800 μ lを加えてマルバーンのゼータアナライザでサイズを測定した。

[0101] [結果]

生成した複合体粒子のうち0~100nmのものの割合、および100~200nmのものの割合を下記表に示す。成分の後の数値は、複合体調製時の最終DNA濃度を核酸塩基濃度で表したものである。

ヒアルロン酸(HA)を加えていないものでは、再水和後には微細な粒子はほとんど観察されなかった。一方、ヒアルロン酸を加えて凍結乾燥したものでは、再水和後も多くの粒子が微少なサイズを維持していることが観察された。また、再水和後のDNA濃度はどれも同じであったが、複合体を稀薄条件下で調製したものほど小さな粒子の割合が多いことが認められた。

[0102] [表11]



請求の範囲

- [1] 核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体；カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体；及びアニオン性ポリマーを含む複合体の凍結乾燥体。
- [2] 核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体とカチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体の各荷電基のモル比（負電荷：正電荷比）が、1:0.8～1:100である、請求項1記載の凍結乾燥体。
- [3] 核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体とアニオン性ポリマーの各荷電基のモル比（負電荷：負電荷比）が、1:0.2～1:1000である、請求項1又は2に記載の凍結乾燥体。
- [4] カチオン性ポリマーが、正に荷電された分子量が1000～300万程度の天然由来又は合成高分子であって、水中でDNAと複合体を形成できる官能基を1分子中に複数有する高分子である、請求項1～3のいずれか1項記載の凍結乾燥体。
- [5] カチオン性ポリマーが、正に荷電された蛋白質やポリペプチド；正に荷電されたデンドリマー；正に荷電された合成ポリマー；及び正に荷電された多糖類誘導体、又はそれらの塩、並びにそれらの組み合わせから選択される、請求項4記載の凍結乾燥体。
- [6] カチオン性脂質が、DC-Chol(3β-(N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)コレステロール)、DDAB(N, N-ジステアリル-N, N-ジメチルアンモニウムブロミド)、DMRI(N-(1, 2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N, N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド)、DODAC(N, N-ジオレイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド)、DOGS(ジヘプタデシルアミドグリシルスぺルミジン)、DOSPA(N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N-(2-(スぺルミンカルボキサミド)エチル)-N, N-ジメチルアンモニウムトリフルオロアセタート)、DOTAP(N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド)、又はDOTMA(N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド)である、請求項1～3のいずれか1項記載の凍結乾燥体。
- [7] アニオン性ポリマーが、分子中にアニオン性基を含む、負に荷電された、分子量が

500～400万程度の天然由来又は合成高分子であって、水中でポリカチオンと複合体を形成できる官能基を1分子中に複数有する高分子である、請求項1～6のいずれか1項記載の凍結乾燥体。

- [8] アニオン性ポリマーが、カルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基を有する多糖類又はその誘導体；負に荷電した側鎖を有するアミノ酸残基を含むポリアミノ酸；カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体；カルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基を有する合成高分子；カルボキシル基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、リン酸基、及びこれらの塩から選択される官能基、並びに置換されていてもよいアミノ基若しくはアンモニウム基又はその塩を有する高分子、並びにそれらの組み合わせから選択される、請求項7記載の凍結乾燥体。
- [9] カチオン性脂質を含む集合体が、DOSPA(N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N-(2-(スぺルミンカルボキサミド)エチル)-N, N-ジメチルアンモニウムトリフルオロアセタート)を含む集合体であり、アニオン性ポリマーがヒアルロン酸である、請求項1記載の凍結乾燥体。
- [10] カチオン性脂質を含む集合体が、DOSPA(N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N-(2-(スぺルミンカルボキサミド)エチル)-N, N-ジメチルアンモニウムトリフルオロアセタート)を含む集合体であり、アニオン性ポリマーがカルボキシル側鎖を持つPEG誘導体である、請求項1記載の凍結乾燥体。
- [11] カチオン性ポリマーがポリエチレンイミンであり；アニオン性ポリマーがヒアルロン酸である、請求項1記載の凍結乾燥体。
- [12] カチオン性ポリマーがポリエチレンイミンであり；アニオン性ポリマーがカルボキシル側鎖を持つPEG誘導体である、請求項1記載の凍結乾燥体。
- [13] 核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体：ポリエチレンイミン：ヒアルロン酸の配合比が、1：4～24：1～160(各荷電基のモル比)である、請求項11記載の凍結乾燥体。
- [14] 核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体：ポリエチレンイミン：カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体の配合比が1：4～24：2～160(各荷電基のモル比)である、請求項12記載の凍結乾燥体。

- [15] 核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体:DOSPAを含む集合体:ヒアルロン酸の配合比が、1:1.2~48:0.2~160(各荷電基のモル比)である、請求項9記載の凍結乾燥体。
- [16] 核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体:DOSPAを含む集合体:カルボキシル側鎖を持つPEG誘導体の配合比が、1:1.2~48:0.2~160(各荷電基のモル比)である、請求項10記載の凍結乾燥体。
- [17] 請求項1記載の凍結乾燥体の調製方法であって、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体;カチオン性ポリマー又はカチオン性脂質若しくはそれを含む集合体;及びアニオン性ポリマーを混合することにより複合体を形成させる工程;次いで凍結乾燥する工程を含む調製方法。
- [18] 請求項1~16のいずれか1項記載の凍結乾燥体を含む、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体の導入用製剤又は試薬。
- [19] 請求項1~16のいずれか1項記載の凍結乾燥体を含む、核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体の導入用キット。
- [20] 細胞に核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体を導入する方法であって、請求項1記載の凍結乾燥体を用いる方法。
- [21] 細胞への核酸、オリゴ核酸、又はその誘導体の導入の前に、凍結乾燥体を溶媒に再水和する工程を含む、請求項20記載の方法。
- [22] 凍結乾燥体を溶媒に再水和せずに使用する、請求項20記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K9/19(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/36(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/44(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)n, A61K48/00(2006.01)n, A61P43/00(2006.01)n
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K9/19, A61K47/18, A61K47/34, A61K47/36, A61K47/42, A61K47/44, A61K31/7088, A61K48/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) CAlus (STN) PubMed Science Direct
JMEDPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-231748 A (Keio University), 19 August, 2003 (19.08.03), (Family: none)	1-22
Y	Tomoko ITO et al., "Hyaluronic Acid de Coat shita Plasmid/Polycation Fukugotai ni yoru Saibo Tokuiteki Idenshi Hatsugen System", Polymer Preprints, Japan, 01 September, 2004 (01.09.04), Vol.53, No.2, pages 3018 to 3019	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 June, 2007 (27.06.07)

Date of mailing of the international search report
10 July, 2007 (10.07.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060002

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ITO, T. et al, Hyaluronic acid and its derivative as a multi-functional gene expression enhancer: protection from non-specific interactions, adhesion to targeted cells, and transcriptional activation. J. Controlled Release, [online], 2006.03.27, Vol. 112, No. 3, p. 382-388., [retrieved on 2007.06.15], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T3D-4JK4D9M-3&_reqID=70846115&_acct=C000053883&_userid=1798639&md5=1c96f0f3ad92fe7886b24b65cb130af0#fig1 >	1-22
Y	PEER, D. et al, Hyaluronan is a key component in cryoprotection and formulation of targeted unilamellar liposomes. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, Vol. 1612, No. 1, p. 76-82	1-22
Y	KOWK, K. Y. et al, Strategies for maintaining the particle size of peptide DNA condensates following freeze-drying. Int. J. Pharmaceutics, 2000, Vol. 203, No. 1-2, p. 81-8	1-22
A	ALLISON, S. D. et al, Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, Vol. 1468, p. 127-138	1-22
A	RUPONEN, M. et al, Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery. J. Controlled Release, 2003, Vol. 93, No. 2, p. 213-217.	1-22
A	TORCHILIN, V. P. et al, p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, Vol. 1511, p. 397-411	1-22

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K9/19(2006.01)i, A61K47/18(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/36(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/44(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)n, A61K48/00(2006.01)n, A61P43/00(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A61K9/19, A61K47/18, A61K47/34, A61K47/36, A61K47/42, A61K47/44, A61K31/7088, A61K48/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN) CAlplus(STN) PubMed Science Direct JMEDPlus(JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-231748 A (学校法人慶應義塾) 2 0 0 3 . 0 8 . 1 9 (ファミリーなし)	1 - 2 2
Y	伊藤智子他 ヒアルロン酸でコートしたプラスミド/ポリカチオン複合体による 細胞特異的遺伝子発現システム 高分子学会予稿集、2 0 0 4 . 0 9 . 0 1、5 3 巻 2 号、p. 3018-3019	1 - 2 2

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 7 . 0 6 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 7 . 2 0 0 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

濱田 光浩

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 7 6 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ITO, T. et al, Hyaluronic acid and its derivative as a multi-functional gene expression enhancer: protection from non-specific interactions, adhesion to targeted cells, and transcriptional activation. J. Controlled Release, [online], 2006.03.27, Vol. 112, No. 3, p. 382-388., [retrieved on 2007.06.15], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T3D-4JK4D9M-3&_reqID=70846115&_acct=C000053883&_userid=1798639&md5=1c96f0f3ad92fe7886b24b65cb130af0#fig1 >	1 - 2 2
Y	PEER, D. et al, Hyaluronan is a key component in cryoprotection and formulation of targeted unilamellar liposomes. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, Vol. 1612, No. 1, p. 76-82	1 - 2 2
Y	KOWK, K. Y. et al, Strategies for maintaining the particle size of peptide DNA condensates following freeze-drying. Int. J. Pharmaceutics, 2000, Vol. 203, No. 1-2, p. 81-8	1 - 2 2
A	ALLISON, S. D. et al, Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, Vol. 1468, p. 127-138	1 - 2 2
A	RUPONEN, M. et al, Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery. J. Controlled Release, 2003, Vol. 93, No. 2, p. 213-217.	1 - 2 2
A	TORCHILIN, V. P. et al, p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, Vol. 1511, p. 397-411	1 - 2 2