

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-527239

(P2009-527239A)

(43) 公表日 平成21年7月30日(2009.7.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 D	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-555786 (P2008-555786)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月21日 (2007.2.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月20日 (2008.10.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/051661
 (87) 国際公開番号 W02007/096382
 (87) 国際公開日 平成19年8月30日 (2007.8.30)
 (31) 優先権主張番号 102006008701.1
 (32) 優先日 平成18年2月23日 (2006.2.23)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 599072611
 キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシ
 ュレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦国、ヒルデン 40724、キ
 アゲン シュトラーセ 1
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 エルバッハー クリシュトフ
 ドイツ連邦共和国 42781 ハー
 ヒュルスベルク 8
 (72) 発明者 クリュージェル ウーテ
 ドイツ連邦共和国 42653 ゴー
 リン
 ゲン アプタイヴェーク 33
 Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 CA01 CA11
 DA03 EA04 GA13 HA17 HA20
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換細胞の製造のための方法

(57) 【要約】

本発明は、i) 生体分子、好ましくは核酸、および少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーと少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができるポリマーからの複合体の製造、およびii) 細胞を複合体と接触させることによって、生体分子を細胞へ導入：の段階を含む、生体分子を細胞へ導入するための方法に関する。本発明はさらに、上記方法で得られた形質転換細胞、生体分子を細胞へ導入するための特定のポリマーの使用、生体分子を細胞へ導入するためのキット、このキットの使用、生体分子とポリマーからの複合体、治療用組成物、人体または動物体の治療のための生体分子とポリマーからの複合体の使用、遺伝子治療による疾患の治療のための方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) 生体分子、好ましくは核酸、および少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーと少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができるポリマーからの複合体の製造、および

ii) 細胞を複合体と接触させることによって、生体分子を細胞へ導入
: の段階を含む、生体分子を細胞へ導入するための方法。

【請求項 2】

段階 i) における複合体の調製が、ポリマーを生体分子と pH 値 6 ないし 8 の範囲にて接触させることによって実施される点で特徴づけられる、請求項 1 で請求される方法。

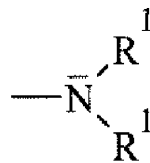
10

【請求項 3】

生体分子がデオキシリボ核酸である点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項 4】

アミンモノマーが構造 I の少なくとも2つの官能基を有し、



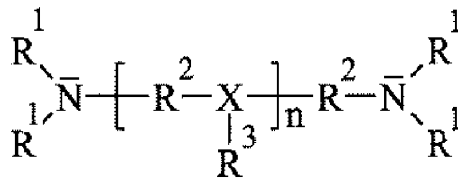
I

20

ここで官能基中の残基 R^1 は、同一でも異なってもよく、および $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基、ヒドロキシ官能性 $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基または水素原子を表す点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項 5】

アミンモノマーが構造 II を有し、



II

30

ここで

n は 1 ないし 100 の範囲の整数であり、

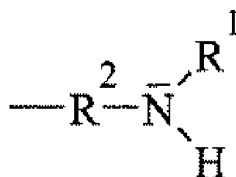
X は、存在する場合、酸素原子または窒素原子であり、および酸素原子の場合には R^3 基は原子 X 上に存在せず、

構造 II 中の R^1 は、同一でも異なってもよく、および $a C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基、ヒドロキシ官能性 $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基または水素原子を表し、

40

構造 II 中の R^2 は、同一でも異なってもよく、および $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン基または $C_1 \sim C_{20}$ オキシアルキレン基を表し、および

構造 II 中の R^3 は、同一でも異なってもよく、および $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基、ヒドロキシ官能性 $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基、水素原子または構造 III の残基を表す点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

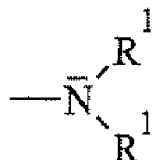


I I I

【請求項 6】

アミンモノマーが、構造 I の少なくとも 2 つの官能基が結合している芳香族環系を含み、

10



I

ここで R¹ が C₁ ~ C₂₀ 炭化水素残基、ヒドロキシ官能性 C₁ ~ C₂₀ 炭化水素残基または水素原子を表す点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項 7】

20

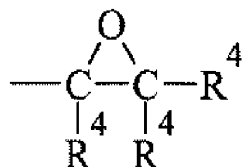
芳香族環系がベンゼン環、ピリミジン環、ピリジン環またはトリアゼン環である、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項 8】

残基 R¹ のうち少なくとも 1 つが水素原子である点で特徴づけられる、請求項 4 から 7 のうちの一つで請求される方法。

【請求項 9】

エポキシドモノマーが構造 I V の少なくとも 2 つの官能基を有し、



30

I V

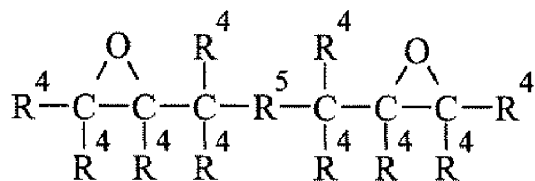
ここで

構造 I V 中の R⁴ は、同一でも異なってもよく、および C₁ ~ C₂₀ 炭化水素残基、ヒドロキシ官能性 C₁ ~ C₂₀ 炭化水素残基または水素原子を表す点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項 10】

エポキシドモノマーが構造 V を有し、

40



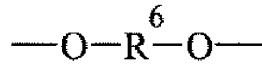
V

ここで

R⁴ は C₁ ~ C₂₀ 炭化水素残基、ヒドロキシ官能性 C₁ ~ C₂₀ 炭化水素残基または水素原子を表し、および

50

R⁵は、存在する場合、C₁～C₂₀アルキレン基または構造V Iの基であり、

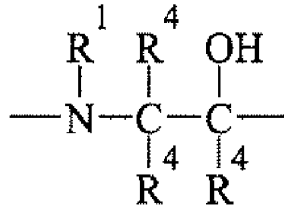


V I

ここでR⁶はC₁～C₂₀アルキレン基またはC₁～C₂₀₀オキシアルキレン基を表す点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項11】

ポリマーが構造V I Iの少なくとも2つの構造単位を有し、



V I I

ここで

R¹はC₁～C₂₀炭化水素残基、ヒドロキシ官能性C₁～C₂₀炭化水素残基または水素原子を表し、および

構造単位V I I中のR⁴は、同一でも異なってもよく、およびC₁～C₂₀炭化水素残基、ヒドロキシ官能性C₁～C₂₀炭化水素残基または水素原子を表す点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項12】

ポリマーが少なくとも0.1kDaの平均分子量を有する点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項13】

ポリマーが、2種類の構造的に異なるアミンモノマーの、1種類のエポキシドモノマーとの反応によって得ることができる点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項14】

一方のアミンモノマーが親水性モノマーであり、および他方のアミンモノマーが疎水性モノマーである点で特徴づけられる、請求項13で請求される方法。

【請求項15】

まず一方のアミンモノマーをエポキシドモノマーと、アミンモノマーのエポキシドモノマーに対するモル比が多くとも0.5:1で反応させ、モノマーの反応生成物を分離し、および次いで反応生成物を他方のアミンモノマーと反応させる点で特徴づけられる、請求項13または14で請求される方法。

【請求項16】

ポリマーが、2種類の構造的に異なるエポキシドモノマーの、1種類のアミンモノマーとの反応によって得ることができる点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項17】

ポリマー中に存在するアミノ基または水酸基が化学的に修飾される点で特徴づけられる、前記請求項のうちの一つで請求される方法。

【請求項18】

生体分子を細胞へ導入するための、少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーの、少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができるポリマーの使用。

【請求項19】

10

20

30

40

50

(1) 少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーの、少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができる、請求項4から17で定義されるポリマー、および

(2) 他のキット成分

を含む、生体分子を細胞へ導入するためのキット。

【請求項20】

請求項1から17のうちの一つで請求される方法における、請求項19で請求されるキットの使用。

【請求項21】

生体分子、好ましくは核酸、および少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーと少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができるポリマーの複合体。

10

【請求項22】

生体分子、好ましくは核酸、および少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーと少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができるポリマーの複合体を含む治療用組成物。

【請求項23】

生体分子、好ましくは核酸、および少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーと少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができるポリマーの複合体の、治療用組成物の製造のための使用。

20

【請求項24】

人体または動物体の治療のための、少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーと少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができるポリマー。

【請求項25】

I) 生物からの細胞の採取、

II) 請求項1から17のうちの一つで請求される方法による、細胞への生体分子の導入、および

III) 生物へ細胞を戻す

: 段階を含む、遺伝子治療による疾患の治療のための方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体分子を細胞内へ導入するための方法、生体分子を細胞内へ導入するための特定のポリマーの使用、生体分子を細胞内へ導入するためのキット、生体分子を細胞内へ導入するための前記キットの使用、生体分子およびポリマーの複合体、治療用組成物、生体分子およびポリマーの複合体の使用、遺伝子治療による疾患の治療のためのポリマー、および遺伝子治療による疾患の治療のための方法に関する。

【0002】

外来核酸、特に外来DNAを、細胞内へ組み込む(形質転換またはトランスフェクション)ための多数のさまざまな方法が先行技術で公知である。in vivo形質転換のためには、本質的に2つの方法が使用される: ウイルス媒介性遺伝子導入、および陽イオン性リポソームまたはたとえばポリエチレンジアミン、ポリ-L-リジンまたはポリ-L-アルギニンといった陽イオン性ポリマーによる形質転換。使用されるウイルスベクターは、アデノウイルスおよびレトロウイルスを含み、それらは非ウイルスDNAを有系分裂活性な細胞にトランスフェクションできる。陽イオン性リポソームは、DNAの負に荷電したリン酸骨格と相互作用する。

40

【0003】

in vitro形質転換に適した一方法は、リン酸カルシウム沈澱法であり、塩化カルシウムおよびリン酸ナトリウムの混合物中で、導入すべきDNAが沈澱するリン酸カル

50

シウムに結合する。沈澱した結晶は細胞培養に添加され、およびエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれる。この化学的形質転換法に加えて、DNAを細胞核へ、または細胞へ直接注入するために注入器具が用いられるマイクロインジェクション、電気パルスによって細胞膜をDNA透過性にするエレクトロポレーション、およびDNAで被覆された金属小球を用いて外来DNAが細胞内へ打ち込まれるいわゆるパーティクルガン法といった多数の物理的 *in vitro* 形質転換法もまた知られている。

【0004】

上記の *in vitro* 形質転換法の特有の短所は、その方法がしばしば非常に細胞特異的であることである。リン酸カルシウム沈澱法では、形質転換過程はさらに、正しい塩濃度の選択に高度に依存し、および実験技能および細胞の種類によって経験が必要である。さらにより重要なことに、しかし、先行技術で記載される形質転換法は、適当な形質転換効率を有する形質転換試薬はしばしば高度に細胞毒性であり、一方、細胞毒性がもしあっても非常に低い試薬はしばしば不十分な形質転換効率を特徴とする、という短所を有する。

10

【0005】

代替法として、これらの短所を克服するために、細胞の *in vitro* 形質転換またはトランスフェクションに陽イオン性ポリマーが使用される。たとえば、DNAのポリエチレンイミン (PEI) との複合体化は、遺伝子を細胞内へ輸送するためにうまく使用されることが知られている (ブシフ (Boussif) 他、1995; ブシフ (Boussif) 他、1996; アブダラ (Abdallah) 他、1996)。この場合、遺伝子導入は複合体がランダムに細胞へ結合しおよび取り込まれることによって起こる。ポリエチレンイミンと同様に、ポリ-L-リジンのような塩基性アミノ酸のホモポリマー、ポリアミドアミン (PAMAM)、ポリアミド、ポリアリルアミン、陽イオン性メタクリレート、キトサン、またはポリ(D, L-ラクチド・グリコリド共重合体) (PLGA) のような樹状陽イオン性ポリマーもまた、細胞のトランスフェクションのための陽イオン性ポリマーとして用いられる。細胞のトランスフェクションに使用されうる陽イオン性ポリマーの総説は、たとえばホルトーフ (Holtorf) およびミコス (Mikos) によって『陽イオン性および非縮合ポリマーを基礎とする遺伝子送達』 ("Cationic and non-condensing polymer-based gene delivery")、核酸を基礎とする治療薬の薬学的展望 (Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid-Based Therapeutics), 2002 (183), 367-387 ページで示される。

20

30

【0006】

先行技術で公知であるこれらの陽イオン性ポリマーの短所は、それらが低いトランスフェクション効率しか有しないか、またはそれらが十分なトランスフェクション効率を特徴とするがしかししばしば高度に細胞毒性であるかのどちらかである。さらに、先行技術で公知であるポリマーの一部、特に樹状ポリマーについて、合成のコストが不釣り合いに高い。たとえば、42 kDa PAMAMデンドリマーを合成するためには何週間もかかる。

【0007】

本発明の一つの目的は、細胞の形質転換、特に *in vitro* 形質転換において先行技術から生じる短所を克服することであった。

40

【0008】

本発明の別の目的は、高い形質転換効率を特徴とする、形質転換細胞の製造のための方法を提供することであった。加えて、可能なら、その方法は細胞毒性である助剤の使用を必要としない。

【0009】

本発明のもう一つの目的は、形質転換すべき細胞集団の特性および特定の形質転換条件に、可能な最低の合成コストで、形質転換に使用する助剤を適応させることが可能である、形質転換細胞の製造のための方法を提供することであった。使用する助剤が可能な限り

50

容易におよび安価に製造されることもまた可能であるべきである。

【0010】

前述の目的の達成への貢献が、生体分子を細胞内へ導入するための方法によって提供され、その方法は下記の段階を含む：

i) 少なくとも2つのアミン基を有するアミンモノマーの、少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができる、生体分子、好ましくは核酸、およびポリマーからの複合体の調製、および

ii) 細胞を複合体と接触させることによって、生体分子を細胞内へ導入。

【0011】

全く驚くべきことに、ジアミンのジエポキシドとの重付加反応によって作製されるポリマーを用いて、生体分子が高い効率でおよびわずかな細胞毒性ストレスだけで、細胞内へ輸送されることが見出された。

【0012】

本発明に記載の方法の段階i)において、まず複合体が生体分子およびポリマーから調製され、ポリマーは、少なくとも2つのアミン基を有するアミンモノマーの、少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができる。

【0013】

好ましくは、本発明に記載の方法が細胞の形質転換に適するように、複合体の調製のための段階i)で使用される生体分子は、核酸である。「形質転換」の語はここでは、生体分子、特に核酸、好ましくはデオキシリボ核酸(DNA)を任意の細胞へ導入する過程を非常に一般的にいう。それはまた、外来DNAが培養細胞へ導入される、トランスフェクションという特別な場合を特に含む。「形質転換」の語は、細胞へのたとえば遺伝子といったDNAの一時的だけの導入(一過性形質転換)、および細胞のゲノムへのDNAの永続的な組み込み(安定形質転換)の両方を含む。

【0014】

複合体の調製のための段階i)に使用される核酸は、およびその同意語としてポリヌクレオチドの語もまた使用でき、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)、または混合型でもありうるが、デオキシリボ核酸が特に好ましい。一般的に、核酸はプリン又はピリミジン塩基の、または修飾プリンまたはピリミジン塩基の、N-グリコシドまたはC-グリコシドである任意の種類のパリヌクレオチドであることができ、したがってまた天然に存在しない塩基も含みうる。塩基自体以外に、糖残基もまた修飾されうる。核酸は、サブユニットの修飾結合、たとえばホスホロチオレートまたはホスホロアミデート結合を有する核酸を含む。核酸は、一本鎖、二本鎖または多重鎖、直鎖または環状でありうる。核酸は、たとえばゲノムDNAまたはメッセンジャーRNA(mRNA)のように細胞中に存在する分子に相当しうるか、または相補DNA(cDNA)、アンチセンスRNA(aRNA)、または合成核酸のように*in vitro*で作製されうる。核酸は、数個のサブユニット、少なくとも2つのサブユニット、好ましくはたとえばオリゴヌクレオチドのように8個以上のサブユニット、たとえばある種の発現ベクターのように数百サブユニットおよび最大数千サブユニットから成ることができる。好ましくは核酸は、核酸が挿入される細胞においてポリペプチドの発現を可能にする調節配列と機能的関係にある、ポリペプチドについてのコード情報を含む。

【0015】

したがって、好ましい一実施形態では、核酸は発現ベクターである。別の一実施形態では、核酸はpDNA(プラスミドDNA)、siRNA、siRNA二重鎖、siRNAヘテロ二重鎖またはmiRNAであり、「siRNA」の語は、酵素「ダイサー(Dicer)」による二本鎖RNA(dsRNA)の切断から生じおよび酵素複合体「RISC」(RNA誘導性サイレンシング複合体)に組み込まれている約22塩基のリボ核酸をいう。合成siRNAもまた、段階i)において生体分子として使用されうる。

【0016】

核酸に加えて、生体分子としてオリゴペプチド、タンパク質または脂質も考慮されうる

10

20

30

40

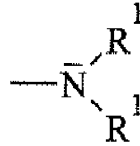
50

【0017】

段階 i) で使用されるポリマーは、少なくとも2つのアミン基を有するアミンモノマーの、少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができる。

【0018】

本発明に記載の方法の好ましい一実施形態によると、アミンモノマーは構造 I の少なくとも2つの官能基を有し、



I

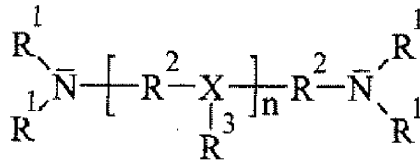
ここで官能基中の残基 R^1 は、同一でも異なってもよく、および $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基、特に好ましくは $C_1 \sim C_{10}$ 炭化水素残基および非常に好ましくは $C_1 \sim C_5$ 炭化水素残基、特にメチル残基、エチル残基、 n -プロピル残基またはイソプロピル残基、ヒドロキシ官能性 $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基、特に好ましくはヒドロキシ官能性 $C_1 \sim C_{10}$ 炭化水素残基および非常に好ましくはヒドロキシ官能性 $C_1 \sim C_5$ 炭化水素残基または代替的に水素原子を表す。さらに、本発明によると、構造 I の官能基中の残基 R^1 のうち少なくとも1つが水素原子であることもまた好ましい。「炭化水素残基」の語はそのとき、炭素原子および水素原子だけから成る残基、および炭素原子および水素原子と共にヘテロ原子、特にハロゲン類の原子もまた含む残基 (= ハロゲン化炭化水素) の両方を含む。

【0019】

アミン官能基 I はしたがって、一級アミン基、二級アミン基または三級アミン基である可能性があり、および少なくとも2つの一級アミン基 (この場合には残基 R^1 の両方が水素原子である) を有するアミンモノマーが最も好ましい。特に好ましい残基 R^1 は、エチル基、メチル基、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}-$ 基および水素原子である。

【0020】

さらに、本発明によると、アミンモノマーは構造 II を有するのが好ましく、



II

ここで

X は、存在する場合、酸素原子または窒素原子、特に好ましくは酸素原子または窒素原子であり、および酸素原子の場合には原子 X 上の R^3 基は存在せず、およびアミンモノマー中の原子 X はまた異なりうる、

構造 II 中の R^1 は、同一でも異なってもよく、および $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基、特に好ましくは $C_1 \sim C_{10}$ 炭化水素残基および非常に好ましくは $C_1 \sim C_5$ 炭化水素残基、特にメチル残基、エチル残基、 n -プロピル残基またはイソプロピル残基、ヒドロキシ官能性 $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素残基、特に好ましくはヒドロキシ官能性 $C_1 \sim C_{10}$ 炭化水素残基および非常に好ましくはヒドロキシ官能性 $C_1 \sim C_5$ 炭化水素残基または代替的に水素原子を表し、

構造 II 中の R^2 は、同一でも異なってもよく、および $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン基、特に好ましくは $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン基および非常に好ましくは $C_1 \sim C_6$ アルキレン基または $C_1 \sim C_{200}$ オキシアルキレン基、特に好ましくは $C_1 \sim C_{50}$ オキシアルキレン基および非常に好ましくは $C_2 \sim C_{10}$ オキシアルキレン基を表し、残基 R^2 として残基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ および $-\text{CHCH}_3\text{CH}_2-$ が特に好ましくおよび $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ が非

10

20

30

40

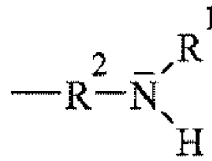
50

常に好ましく、

n は、R²がアルキレン基である場合は、0 ないし 6、特に好ましくは 1 ないし 5、さらにより好ましくは 1 ないし 3 および非常に好ましくは 1 ないし 3 の範囲の整数であり、および R²がオキシアルキレン基である場合には、0 ないし 100、特に好ましくは 1 ないし 50、さらにより好ましくは 2 ないし 25 および非常に好ましくは 2 ないし 10 の範囲の整数であり、および

構造 I I 中の R³は、同一でも異なってもよく、および C₁ ~ C₂₀炭化水素残基、特に好ましくは C₁ ~ C₁₀炭化水素残基および非常に好ましくは C₁ ~ C₅炭化水素残基、特にメチル残基、エチル残基、n - プロピル残基またはイソプロピル残基、ヒドロキシ官能性 C₁ ~ C₂₀炭化水素残基、特に好ましくはヒドロキシ官能性 C₁ ~ C₁₀炭化水素残基および非常に好ましくはヒドロキシ官能性 C₁ ~ C₅炭化水素残基、水素原子または構造 I I I の残基を表し、

10



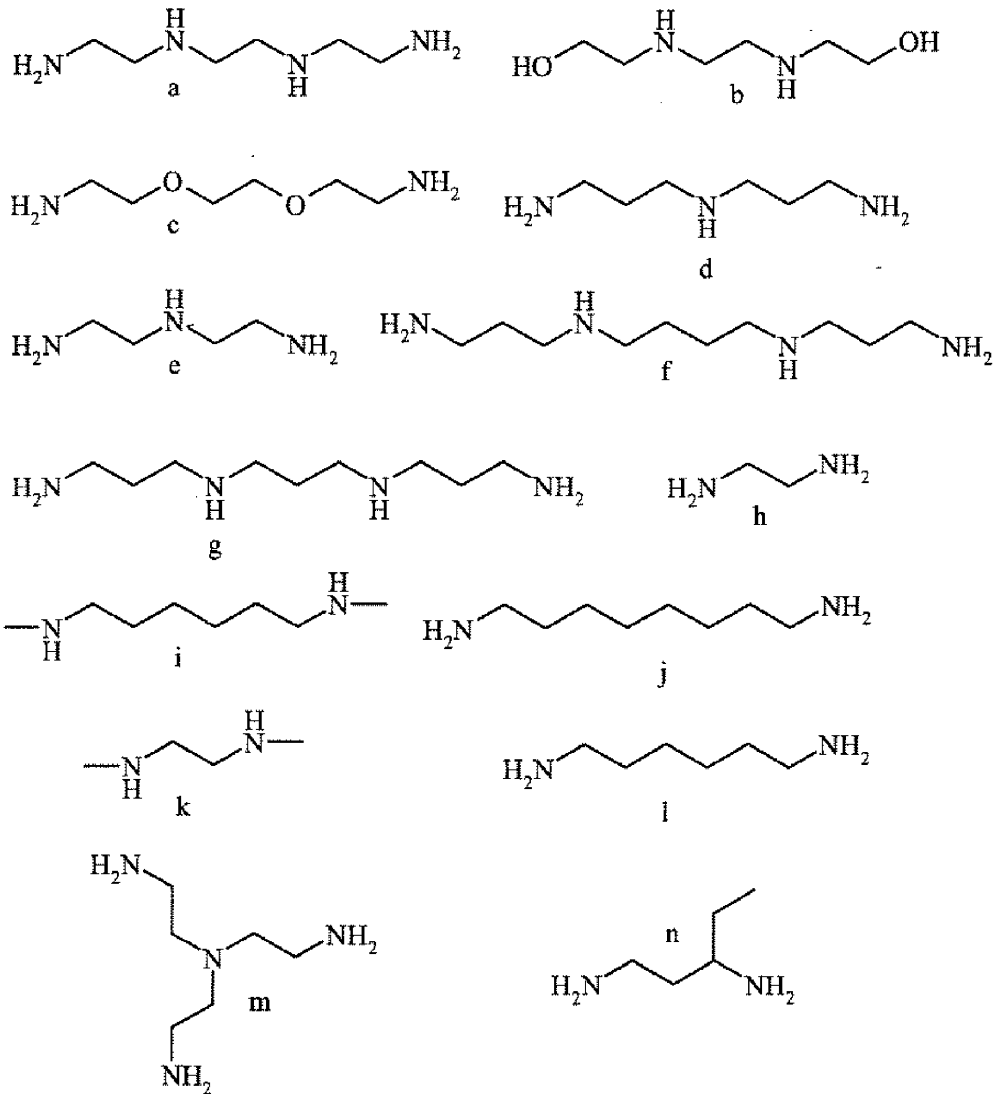
I I I

特に R¹ = H および R² = -CH₂CH₂- の残基 -CH₂-CH₂-NR¹H が残基 R³として非常に好ましい。

20

【0021】

上記の構造 I I を有する、本発明に記載の特に好ましいアミンモノマーは、下記のモノマー a ~ n を含む群から選択される：



10

20

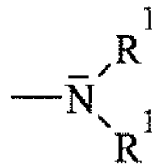
30

40

50

【0022】

構造 I I を有する上記のアミンモノマー以外で、本発明に記載の方法の別の実施形態によると、ポリマーの製造のために、随意的にヘテロ原子置換された芳香族環系、特に好ましくは随意的にヘテロ原子置換された芳香族 C₆ または C₁₀ 環系を含み、構造 I



I

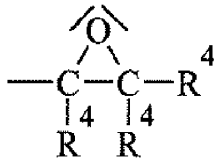
の少なくとも 2 つの官能基が結合していて R¹ が上記で定義される通りのアミンモノマーを使用することもまた可能である。

【0023】

「芳香族環系」とは、好ましくはヒュッケル (Hueckel) 則を満たす sp² 混成炭素原子の任意の環系を意味し、ここで随意的にまた 1 個以上のハロゲン原子、たとえばフッ素または塩素 (= ハロゲン化芳香族)、1 個以上のアルキル基、特にメチル基、または 1 個以上の水酸基が炭素原子へ結合しうる。

【0024】

ポリマーの調製に使用されるエポキシドモノマーは、好ましくは、構造 I V の少なくとも 2 つの官能基を有するエポキシドモノマーであり、

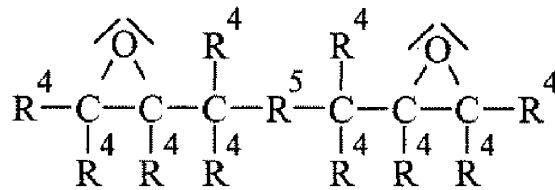


I V

ここで構造 I V 中の残基 R⁴は、同一でも異なってもよく、および C₁ ~ C₂₀炭化水素残基、特に好ましくは C₁ ~ C₁₀炭化水素残基および非常に好ましくは C₂ ~ C₅炭化水素残基、特にメチル残基、エチル残基、n - プロピル残基またはイソプロピル残基、ヒドロキシ官能性 C₁ ~ C₂₀炭化水素残基、特に好ましくはヒドロキシ官能性 C₁ ~ C₁₀炭化水素残基および非常に好ましくはヒドロキシ官能性 C₂ ~ C₅炭化水素残基または水素原子を表し、残基 R⁴として水素原子が非常に好ましい。

【 0 0 2 5 】

本発明に記載の特に好ましいエポキシドモノマーは、構造 V を有し、



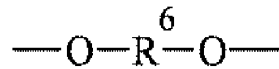
V

ここで

R⁴は上記で定義される通りであり、および

R⁵は、存在する場合、

C₁ ~ C₂₀アルキレン基、特に好ましくは C₁ ~ C₁₀アルキレン基および非常に好ましくは C₁ ~ C₆アルキレン基を表し、アルキレン基として - CH₂CH₂-、- CH₂CH₂CH₂- または - CHCH₃CH₂- が特に好ましく、および - CH₂CH₂- が非常に好ましく、または構造 V I の基であり、



V I

ここで R⁶は

C₁ ~ C₂₀アルキレン基、特に好ましくは C₁ ~ C₁₀アルキレン基および非常に好ましくは C₁ ~ C₆アルキレン基を表し、ここで

- CH₂CH₂-、

- CH₂CH₂CH₂-、

- CHCH₃CH₂-、

[- CH₂CH₂-]_n、 n = 1 ~ 10、

[- CH₂CH₂CH₂-]_n、 n = 1 ~ 10、

[- CHCH₃CH₂-]_n、 n = 1 ~ 10、

またはエチレンおよびプロピレン単位を含むポリアルキレンが、アルキレン基として特に好ましく、

または C₁ ~ C₂₀₀オキシアルキレン基、特に好ましくは C₂ ~ C₁₀₀オキシアルキレン基および非常に好ましくは C₂ ~ C₅オキシアルキレン基を表し、ここで

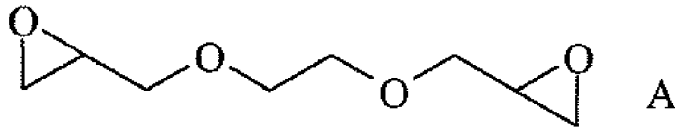
[- CH₂CH₂- O -]_nCH₂-、 n = 2 ~ 100、

[- CH₂CH₂CH₂- O -]_nCH₂CH₂CH₂-、 n = 2 ~ 100、

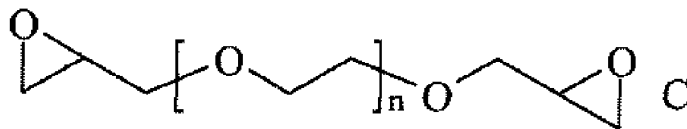
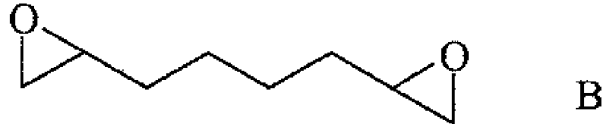
$[-CHCH_3CH_2-O-]_nCHCH_3CH_2-$ 、 $n=2\sim 100$ 、
 またはオキシエチレンおよびオキシプロピレン単位を含むポリオキシアルキレンが、オキシアルキレン基として特に好ましい。

【0026】

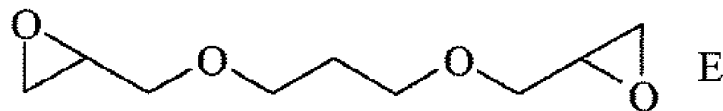
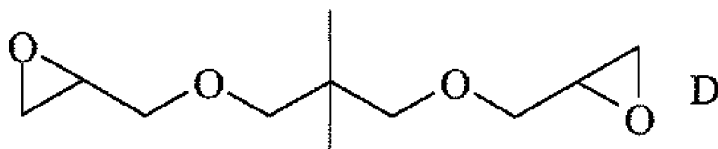
上記の構造Vを有する、本発明に記載の特に好ましいエポキシドモノマーは、下記のモノマーA～Fを含む群から選択される：



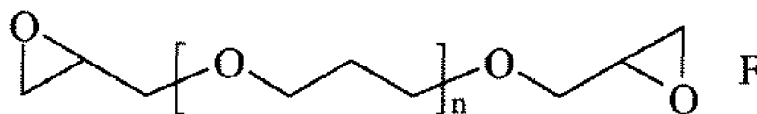
10



20



30



【0027】

複合体の調製のための段階i)における使用に好ましい、本発明に記載のポリマーは、特に下記のモノマー成分の反応によって得ることができるものである：a A、a B、a C、a D、a E、a F、b A、b B、b C、b D、b E、b F、c A、c B、c C、c D、c E、c F、d A、d B、d C、d D、d E、d F、e A、e B、e C、e D、e E、e F、f A、f B、f C、f D、f E、f F、g A、g B、g C、g D、g E、g F、h A、h B、h C、h D、h E、h F、i A、i B、i C、i D、i E、i F、j A、j B、j C、j D、j E、j F、k A、k B、k C、k D、k E、k F、l A、l B、l C、l D、l E、l F、m A、m B、m C、m D、m E、m F、n A、n B、n C、n D、n E、n F、o A、o B、o C、o D、o E、o F、q A、q B、q C、q D、q E、q F、r A、r B、r C、r D、r E、r F、s A、s B、s C、s D、s E、s F、t A、t B、t C、t D、t E、t F、u A、u B、u C、u D、u E、u F、v A、v B、v C、v D、v E、v F、w A、w B、w C、w D、w Eおよびw F。

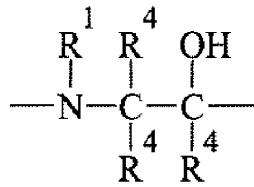
40

【0028】

アミンモノマーおよびエポキシドモノマーの間の反応は付加反応であり、ここで一級または二級アミン基を有するアミンモノマーが使用された場合は、構造VIIの少なくとも

50

2つの構造単位を有するポリマーが形成され、



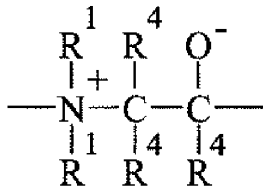
V I I

およびここで R^1 および R^4 は前記で定義される通りである。

10

【0029】

しかし、三級アミン基を含むアミンモノマーが使用された場合は、構造 V I I I の少なくとも2つの構造単位を有するポリマーが形成され、



V I I I

20

ここで R^1 および R^4 はまた上記で定義される通りである。

【0030】

アミンモノマーおよびエポキシドモノマーからの重付加反応によるポリマーの合成は、この重合反応について当業者に公知である方法で実施されうる。当業者は、簡単な予備試験によって、目的産物の望まれる性質に関連して、特に望まれる分子量に関連して、反応条件、特に溶媒の種類、原料（アミンモノマーおよびエポキシドモノマー）の濃度、反応温度および反応時間を決定する。

【0031】

通常、反応はまず、アミンモノマーおよびエポキシドモノマーの両方を、適当な溶媒に溶解または分散、好ましくは溶解することによって実施され、好ましくはアミンモノマーおよびエポキシドモノマーの両方が少なくとも部分的に可溶である溶媒を使用する。適当な溶媒の例は、水、たとえばメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、*n*-ブタノール、*tert*-ブタノールまたはイソブタノールのようなアルコール、エーテル、ケトン、炭化水素、ハロゲン化炭化水素、アルコキシアルカノール、好ましくはアルコキシプロパノール、アルキルピロリドン、たとえば*N*-メチルピロリドン、ジアルキルスルホキシド、たとえばジメチルスルホキシド、またはこれらの溶媒の少なくとも2つの混合物である。

30

【0032】

付加物生成の最初には、溶媒中の各モノマーの濃度は通常は、1ないし10000 mmol/lの範囲、特に好ましくは10ないし5000 mmol/l、さらにより好ましくは50ないし1000 mmol/lおよび非常に好ましくは100ないし500 mmol/lの範囲である。

40

【0033】

さらに、ポリマーが同一の構造のアミンモノマーからおよび同一の構造のエポキシドモノマーから調製される場合、アミンモノマーおよびエポキシドモノマーを、アミンモノマーのエポキシドモノマーに対するモル比2:1ないし1:2、特に好ましくは1.5:1ないし1:1.5および非常に好ましくはモル比約1:1で使用することが有利でありうる。

【0034】

50

付加反応は通常は、10ないし200の範囲の温度にて、特に好ましくは20ないし150 および非常に好ましくは50ないし100にて実施され、反応時間および反応に必要な温度は本質的にモノマーの反応性に依存する。通常は、付加反応は約0.5~10時間、特に好ましくは約1~5時間を要する。一級アミン基を有するアミンモノマーを使用する場合、反応は通常は一級アミン基をもう検出できなくなるまで実施される一方、二級または三級アミン基を有するアミンモノマーを使用する場合、反応は二級または三級アミン基がもう検出可能でなくなるまで実施される。

【0035】

本発明に記載の方法の特別の一実施形態によると、複合体の調製のための段階i)で使用されるポリマーは、構造的に異なるアミンモノマーの、エポキシドモノマーとの反応によって得ることができる。たとえば、本発明に記載の方法のこの特別の一実施形態では、親水性および疎水性アミンモノマーを使用することが可能である。

10

【0036】

構造的に異なる2つのアミンモノマーを使用する場合、ポリマーの製造について2つの手順が考えられる。一方では、両方のアミンモノマーをエポキシドモノマーと共に適当な溶媒に溶解または懸濁することができ、およびこの場合には、エポキシドモノマーに関して両方のアミンモノマーが概ね同一の反応性を有するならば、ポリマー中でモノマーのランダムな分布を得る。他方では、しかし、一方のアミンモノマーを過剰のエポキシドモノマーとまず反応させ、アミンモノマーのエポキシドモノマーに対するモル比が多くても0.5:1、特に好ましくは多くても0.25:1および非常に好ましくは多くても0.1:1であることもまた可能である。この方法では、鎖の末端に反応性エポキシド基を有するポリマーが得られる。第一のアミンモノマーをエポキシドモノマーと反応させた後、このように得られたポリマーを反応混合物の残りの成分、特にまだ存在するエポキシドモノマーから分離し、および前記分離は、当業者に公知である分離方法、たとえば抽出、蒸留、結晶化または透析によって、特に好ましくは透析によって実施されうる。次いでポリマーを、それが今は未反応のモノマーの除去後に純物質の形で存在するとして、再び適当な溶媒に溶解し、および、第二のアミンモノマーが今度はポリマーの末端エポキシド基へ付加するように、第二のアミンモノマーと接触させる。

20

【0037】

もちろん、同様に、2種類の構造的に異なるエポキシドモノマーおよび1種類のアミンモノマーからポリマーを調製することもまた可能である。さらに、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4または少なくとも5種類の構造的に異なるアミンモノマーを使用すること、および/または少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4または少なくとも5種類の構造的に異なるエポキシドモノマーを使用することもまた考えられる。

30

【0038】

重付加反応の完了に際して、未反応のアミンおよび/またはエポキシドモノマーと共に、使用した溶媒中に溶解または分散しているポリマーが得られる。本発明に記載の方法の段階i)における複合体の調製のためにポリマーを使用する前に、したがって、反応混合物を処理、特にポリマーを反応混合物の残りの成分から分離することが好ましい。分離方法として、再び特に抽出、蒸留、結晶化または透析を考慮することができ、透析では溶媒中に直接溶解または分散してポリマーが得られるため、透析が特に好ましい。加えて、透析膜の選択に応じて、透析は特定のサイズのポリマーの選択的単離を与える。反応混合物の残りの成分からのポリマーの分離に加えて、ポリマーを、または透析の場合には、ポリマーおよび溶媒の組成物を滅菌することもまた好ましく、および再び当業者に公知であるすべての滅菌法、たとえば滅菌ろ過、照射、UV光照射またはオートクレーブを使用でき、滅菌ろ過が最も好ましい。

40

【0039】

特に好ましい一実施形態によると、モノマーが反応混合物の残りの成分から分離され、およびポリマーが次いで滅菌され、まず反応混合物を水で、反応混合物の水に対する体積比5:1ないし1:5、特に好ましくは2:1ないし1:2の範囲で、および非常に好ま

50

しくは約1:1で希釈し、およびこのように得られた希釈された反応混合物を次いで、分子量カットオフが多くとも10kDa、特に好ましくは多くとも5kDaおよび非常に好ましくは多くとも1kDaの透析膜を用いて、好ましくは水系溶媒に対して、たとえば脱塩水に対して、生理食塩水に対して、または栄養培地に対して透析する。水に対して透析された場合、この方法で得られたポリマー水溶液から、次いで水を好ましくは凍結乾燥法によって分離し、およびこの場合には純粋なポリマーを得ることができる。このポリマーを次いで、好ましくは水系媒体に、たとえば脱塩水に、PBSのような生理食塩水または栄養培地に再懸濁し、および次いで滅菌する。この方法で得られた滅菌ポリマー水溶液は、好ましくは0.1ないし500mg/ml、特に好ましくは0.5ないし100mg/mlおよび非常に好ましくは1ないし10mg/mlの範囲の濃度でポリマーを含む。透析直後に得られた好ましくは水系のポリマー溶液を、直ちに滅菌することもまた考えられる。重要：in vitro使用のためには、試薬は無菌でなければならない。

【0040】

段階i)に使用されるポリマーの、質量分析によって決定される分子量は、好ましくは0.1ないし500kDa、特に好ましくは1ないし100kDaおよび非常に好ましくは10ないし50kDaの範囲である。特に、反応時間、モノマーの濃度、溶媒、反応温度、アミンモノマーのエポキシドモノマーに対するモル比、および透析膜のカットオフ値を変えることによって、ポリマーの平均分子量を簡単な方法で調節することができ、およびしたがって形質転換効率もまた、意図される特定の形質転換について最適化されうる。

【0041】

さらに、本発明に記載の方法の特別の一実施形態によると、反応混合物の残りの成分からの分離前に、または後でさえ、ポリマーを化学的に修飾することもまた有利である可能性があり、修飾は好ましくはポリマー中に存在するアミノ基または水酸基上で実施される。本発明に記載の好ましい修飾は、細胞へのポリマーの取り込みを促進する修飾である。本発明に記載の好ましい修飾は、たとえばDE-A-10016881に記載される通りのビオチン基の結合を含む。陽イオン性ポリマーへのエフェクター基の結合による細胞への核酸のターゲティング導入に関する可能性についてのこの文書での開示は参照により本開示に含まれおよび本発明の開示の一部を成す。ビオチン基に加えて、アミノ基または水酸基もまた他のエフェクター基で、たとえばアビジンまたはストレプトアビジンで、特定の細胞受容体と結合するリガンドで、たとえばトランスフェリンでまたは糖質で、特にガラクトシドで、またはタンパク質伝達ドメインを持つペプチドで修飾されうる。さらに、グリシドールでの処理によって末端ジオール基をポリマー中に形成でき、またはプロモ酢酸またはその塩での処理によって負に荷電した基をポリマー中に作製できる。さらに、ポリマー中に存在するアミノ基は、たとえば硫酸ジメチル、臭化メチル、メチルトシラートまたはメチルメシラートといったアルキル化剤での処理によって少なくとも一部が四級化されうる。アミノ基のアルギニン基への少なくとも一部の変換もまた考えられる。

【0042】

段階i)において生体分子およびポリマーから製造される複合体は、生体分子をポリマーと接触させることによって得られ、複合体は静電相互作用の結果として構築される。随意的に生体分子はまた、それが核酸である場合は、ポリマーと接触させる前に、適当なエンハンサーとの、特にサケ精子由来の硫酸プロタミンなどといったポリペプチドとのインキュベーションによってまず濃縮されうる。細胞への取り込みを促進するために生体分子をペプチドと接触させることもまた考えられる。生体分子、特に核酸を細胞へ導入するために、ポリマーを、別の形質転換剤、たとえばリポソーム脂質または非リポソーム脂質と組み合わせ、または化学的に異なるポリマーとの混合物で使用することがさらに考えられる。

【0043】

好ましくは生体分子をポリマーと、生体分子のポリマーに対する重量比10:1ないし1:50の範囲で、特に好ましくは1:1ないし1:30の範囲で、および非常に好ましくは1:2ないし1:20の範囲で接触させる。当業者は、所定の実験によって混合物の

最適比を決定できる。好ましくは、生体分子が核酸である場合、正電荷過剰の場合は、ポリマーの生体分子に対する比は、ゼータ電位が約 + 20 ~ + 50 mV となるように設定される。

【0044】

生体分子のポリマーとの接触は、好ましくは水溶液、たとえば生理食塩水、緩衝液または栄養培地中で起こり、接触は特に好ましくはpH値5ないし8、特に好ましくは5.5ないし7.5の範囲にて、および温度4ないし40、特に好ましくは10ないし37、および非常に好ましくは15ないし25の範囲にて実施される。有利には、この接触は成分の水溶液を合わせることによって実施され、およびこれらの溶液のうち一方または両方はまた緩衝されていてもよく、および随意的に他の添加物を含みうる。特に好ましくは、接触は、生体分子と形成される複合体が生理食塩水濃度で解離しない条件で実施され、たとえば生体分子が核酸である場合は、エチジウムブロマイド置換検定(プランク(Plank)他1999)で容易に測定されうる。

10

【0045】

本発明に記載の方法の段階ii)では、上記の生体分子およびポリマーの複合体を細胞と接触させ、生体分子が導入されている細胞が得られ、および前記接触は*in vivo*および*in vitro*で行うことができるが、細胞の*in vitro*処理が特に好ましい。その時、基本的に、生体分子およびポリマーの複合体は細胞の存在下で形成することが可能である(およびしたがって段階i)およびii)は同時に実施される)。しかし、段階ii)が段階i)の後に実施されるように、複合体形成は処理すべき細胞の非存在下で起こることが考えられおよび好ましい。

20

【0046】

*in vitro*処理の場合には、細胞または組織を適当な環境で複合体とインキュベートでき、原核生物および真核生物の両方が細胞として考慮される。培養細胞を処理する場合は、複合体または、複合体を含む滅菌水溶液が培地に添加されうる。本発明に記載の方法は、懸濁液中の細胞培養で増殖する細胞(浮遊細胞)および基材表面に接着しながら増殖する細胞接着細胞)の両方に適する。

【0047】

*in vivo*での処理については、複合体または、複合体を含む滅菌水溶液は、ヒトを含む動植物に使用されうる。使用は全身または局所、および動物については特に非経口、たとえば静脈、腹腔内、筋肉内、皮内または皮下注射、点滴静注、肺、頬側、鼻、皮膚または経皮投与によることができる。他の投与経路、たとえば経口/経腸投与もまた、適当な条件下でおよび対応する処方を用いて可能である。複合体または、複合体を含む滅菌水溶液はまた、たとえば臓器または腫瘍といった標的組織へ局所的に直接使用されうる。*in vivo*使用については、複合体は医薬品として適合する形でなければならない。このために、複合体を医薬品として許容される添加物と組み合わせることができる。処方はその時、投与方法に依存する。注射または輸液のためには、複合体はたとえば等張食塩水に、またはPBSまたはリンゲル液のような等張緩衝液に含まれることが可能であり、肺投与のためには、たとえば医薬品として適合するエアロゾルの形でありうる。たとえば投与前に水で再構成されうる凍結乾燥調製物のように、使用目的に応じて、固形処方もまた選択できる。適当な医薬品添加物および処方は、たとえばジェナロ(Gennaro)(編)、『レミントン調剤の科学と実践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)第19版、1995年(マック・パブリッシング社(Mack Publishing Co.))、米国ペンシルベニア州イーストン(Easton))から当業者に公知である。この方法で、適当な核酸を生体分子として用いて、複合体は遺伝子治療において医薬品として使用されうる。

30

40

【0048】

用量は、疾患の性質、患者の状態、治療手法および他の因子に関連して当業者によって選択される。一般的に、生体分子が核酸である場合、ヒトへの使用にはDNA投与量は0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ないし100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、好ましくは2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ないし10 μ

50

g / k g 体重の範囲となる。

【 0 0 4 9 】

最初に述べた目的の達成への寄与はさらに、生体分子が上記の方法によって導入されている細胞によって提供される。

【 0 0 5 0 】

好ましくは細胞の形質転換のために、生体分子を細胞へ導入するための、少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーの、少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができる上記のポリマーの使用もまた、最初に述べた目的の達成に寄与する。

【 0 0 5 1 】

最初に述べた目的の達成へのさらなる寄与はまた、好ましくは細胞の形質転換のために、生体分子を細胞へ導入するための、下記を含むキットによって提供される。

(1) 少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーの、少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができる上記のポリマー、および

(2) 他のキット成分、特にエンハンサー（核酸の濃縮の目的でまたは取り込み改善のため）、たとえばサケ精子由来の硫酸プロタミン、PBSのような追加の緩衝液、または生理食塩水、形質転換効率を調節するための試薬、および別の形質転換試薬、たとえばリポソーム脂質または非リポソーム脂質または別のポリマー。

【 0 0 5 2 】

トランスフェクトすべき特定の細胞型に応じて、脂質またはリポソームとのポリマーの組み合わせまたはさまざまなポリマーの混合物が有用でありうる。このように、本特許出願に基づいて作製された、しかし化学的に異なるポリマーの、混合物の使用もまた用いられうる。

【 0 0 5 3 】

最初に述べた目的の達成へのさらなる寄与はまた、生体分子、好ましくは核酸、および少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーと少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができる上記のポリマーの複合体によって提供される。この複合体は、たとえば生体分子およびポリマーを、本発明に記載の方法に関連して最初に記載されたように、適当な水系内で接触させることによって得ることができる。

【 0 0 5 4 】

最初に述べた目的の達成へのさらなる寄与はまた、生体分子、好ましくは核酸、および少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーと少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができるポリマーの上記の複合体を含む治療用組成物によって提供される。この複合体に加えて、治療用組成物は特に、医薬品として許容される添加物、たとえば生理食塩水もまた含む。同様に、そのような医薬組成物の製造のための上記の複合体の使用はまた、最初に述べた目的の達成に寄与する。

【 0 0 5 5 】

最初に述べた目的の達成へのさらなる寄与はまた、人体または動物体の治療用の、好ましくは遺伝子治療による治療のための、少なくとも2つのアミノ基を有するアミンモノマーと少なくとも2つのエポキシド基を有するエポキシドモノマーとの反応によって得ることができる、本発明に記載の方法に関連して記載されたポリマーによって提供される。

【 0 0 5 6 】

最後に、本発明はまた、下記の段階を含む、遺伝子治療による疾患の治療のための方法に関する：

I) 生物からの細胞の採取、

II) 採取された細胞への生体分子の導入、好ましくは生体分子を細胞へ導入するための本発明に記載の方法による、採取された細胞の形質転換、および

III) 生物へ細胞を戻す。

10

20

30

40

50

【0057】

前記遺伝子治療のために考慮されうる細胞として、特に、採取、生体分子の導入、好ましくは形質転換、および生物からまたは生物への再移植に耐える、十分に抵抗性であるすべての細胞が使用されうる。また、処理細胞の有利な性質から、たとえば形質転換細胞によって分泌されるタンパク質から、生物が十分な利益を得られるように、細胞は可能な限り長命であるべきである。特に、線維芽細胞のような皮膚細胞、肝細胞、Tリンパ球のようなT細胞、または骨髄細胞が、細胞として特に有利である。

【0058】

本発明はここで非限定的な実施例に基づいてより詳細に説明される。

【実施例】

【0059】

実施例（細胞の形質転換）

ポリマーの製造

トリエチレンテトラミン（10 mmol）およびエチレングリコールジグリシジルエーテル（10 mmol）をジメチルスルホキシド50 mlに溶解し、および溶液を丸底フラスコ内で3時間60℃にて調整する。次いで反応混合物を同量の脱塩水で倍量に希釈し、および脱塩水に対して18時間透析し、水を3回交換した（分子量カットオフ1 kDaの透析膜）。透析後、試料を凍結乾燥し、無色透明の粘性物質を得た。これをエンドトキシンフリー脱塩水に溶解し、ポリマー濃度3 mg/mlを得た。このように得られたポリマー水溶液を滅菌ろ過によって滅菌した。

【0060】

細胞の培養

肝細胞がん細胞株Huh-7を、96ウェルプレートに、密度 2×10^4 細胞/ウェルにてウェル当たり100 μ lのDMEM培地中に播種した。細胞播種の24時間後、トランスフェクションを実施した。

【0061】

複合体の形成

核酸およびポリマーから複合体を形成するために、DMEM S培地（0.01 μ g/ μ l*）に溶解した表1に示すDNAの量（pCMVプラスミド、クロンテック・ラボラトリーズ社（Clontech Laboratories）、およびトリエチレンテトラミンおよびエチレングリコールジグリシジルエーテル（「MK-7-11」）から得られたポリマーの滅菌水溶液の表1に示す量を96ウェルプレートのウェルへピペットで加え、および10分間室温にてインキュベートした。先行技術で公知である、キアゲン社（Qiagen GmbH）（ドイツ、ヒルデン（Hilden））のトランスフェクション試薬スーパーフェクト（Superfect）（登録商標）を用いたトランスフェクションを対照として実施した。

【0062】

*手順に関する注意：DNAおよびポリマーの間の複合体形成は、血清を含まない培地50 μ l中で実施した。記載の濃度はこの体積に関する。10分間のインキュベート時間後、血清を含む培地100 μ lをピペットで加えた。合計体積（150 μ l）を次いで、あらかじめ培地を除去してあった細胞へ加えた。

10

20

30

40

【表 1】

表 1

複合体	プラスミドの量	ポリマーの量	スーパーフェクト (登録商標) の量
1	0.5 μ g	0.5 μ l	
2	0.5 μ g	1 μ l	
3	0.5 μ g	2 μ l	
4	0.5 μ g	4 μ l	
5	0.5 μ g		0.5 μ l
6	0.5 μ g		1 μ l
7	0.5 μ g		2 μ l
8	0.5 μ g		4 μ l

10

【0063】

細胞のトランスフェクション

トランスフェクションのために、直前に培地を交換しておき、複合体を細胞へ加え、および4時間37にてインキュベートした。4時間のインキュベート時間後、培地を交換し、複合体を含む溶液を新しい細胞培地と取り替えた。細胞を本発明に記載の複合体と、または核酸およびスーパーフェクト(Superfect)の複合体とインキュベート後、トランスフェクション後2日目に細胞を溶解緩衝液(5mM MgCl₂、1% NP-40、100mM NaCl、10mM Tris/HCl、pH7.4)を用いて溶解した。トランスフェクション効率を、 α -ガラクトシダーゼ検定によって、ONPG(2-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド、メルク社(Merck KGaA)、ドイツ、ダルムシュタット(Darmstadt))を基質として用いて測定した。トランスフェクション効率(ml当たり α -ガラクトシダーゼ単位で)を図1に示す。

20

【0064】

図1から、本発明に記載の方法によって、先行技術で公知である形質転換試薬よりも良好なトランスフェクション効率が達成されることがわかる。

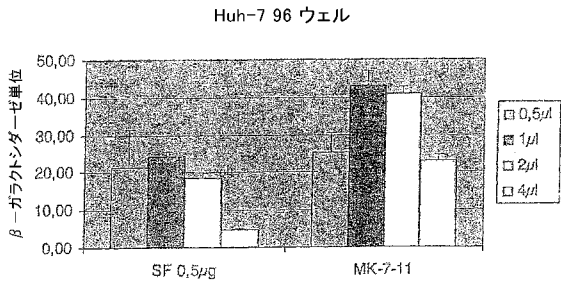
30

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】図1は、従来のトランスフェクション方法と比較して、本発明に記載の方法によるpCMVプラスミドを用いるHuh-7細胞のトランスフェクションにおけるトランスフェクション効率を示す。「MK-7-11」の表示は、下記の実施例においてトリエチレンテトラミンおよびエチレングリコールジグリシジルエーテルから得られたポリマーの表示である。

【 図 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2007/051661
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K48/00 A61K47/48 A61K47/34 C07H21/00 C08G65/00 C12N15/00		
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) A61K C08G C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CAPLUS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 1999, QU R. ET AL.: "Adsorption property and mechanism of polymeric aza-crown ether resin for metallic ions" XP007904004 abstract & QU RONGJUN ET AL: "Adsorption property and mechanism of polymeric aza-crown ether resin for metallic ions" GAOFENZI CAILIAO KEXUE YU GONGCHENG, SICHUAN DAXUE, GAOFENZI YANJIUSUO,, CN, vol. 15, no. 2, May 1999 (1999-05), pages 151-154, XP008088326 ISSN: 1000-7555 ----- -/--	19,24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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		Date of mailing of the international search report
15 Februar 2008		21/02/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bettio, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2007/051661

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 552 818 A (SHINETSU CHEMICAL CO [JP]) 13 July 2005 (2005-07-13) paragraphs [0044] - [0049]	19,24
X	WO 2004/078822 A (EBARA CORP [JP]; AKIYAMA EIICHI [JP]; KAWAKAMI TAKASHI [JP]; ITO HITOS) 16 September 2004 (2004-09-16) Seite 46 Zeile 13; Seite 48 Tabelle 4 Experimenten 11-13	19,24
Y	NGUYEN H K ET AL: "EVALUATION OF POLYETHER-POLYETHYLENEIMINE GRAFT COPOLYMERS AS GENE TRANSFER AGENTS" GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, vol. 7, January 2000 (2000-01), pages 126-138, XP002947334 ISSN: 0969-7128 Zusammenfassung; Seite 126 zweiter Absatz	1-25
Y	BANERJEE P. ET AL.: "Linear Polyethyleneimine Grafted to a Hyperbranched Poly(ethylene glycol)-like Core: A Copolymer for Gene Delivery" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 17, 22 December 2005 (2005-12-22), pages 125-131, XP007904002 abstract	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP2007/051661
--

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-18, 20 and 25 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/051661

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1552818	A	13-07-2005 US 2005147676 A1	07-07-2005
WO 2004078822	A	16-09-2004 JP 2004263153 A	24-09-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen PCT/EP2007/051661

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
INV. A61K48/00 C12N15/00	A61K47/48	A61K47/34 C07H21/00 C08G65/00
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfobjekt (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) A61K C08G C12N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfobjekt gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE CAPLUS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 1999, QU R. ET AL.: "Adsorption property and mechanism of polymeric aza-crown ether resin for metallic ions" XP007904004 Zusammenfassung & QU RONGJUN ET AL: "Adsorption property and mechanism of polymeric aza-crown ether resin for metallic ions" GAOFENZI CAILIAO KEXUE YU GONGCHENG, SICHUAN DAXUE, GAOFENZI YANJIUSUO,, CN, Bd. 15, Nr. 2, Mai 1999 (1999-05), Seiten 151-154, XP008088326 ISSN: 1000-7555</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	19, 24
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindarischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindarischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
15. Februar 2008		21/02/2008
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Bettio, Andrea

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/051661

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	EP 1 552 818 A (SHINETSU CHEMICAL CO [JP]) 13. Juli 2005 (2005-07-13) Absätze [0044] - [0049] -----	19,24
X	WO 2004/078822 A (EBARA CORP [JP]; AKIYAMA EIICHI [JP]; KAWAKAMI TAKASHI [JP]; ITO HITOS) 16. September 2004 (2004-09-16) Seite 46 Zeile 13; Seite 48 Tabelle 4 Experimenten 11-13 -----	19,24
Y	NGUYEN H K ET AL: "EVALUATION OF POLYETHER-POLYETHYLENIMINE GRAFT COPOLYMERS AS GENE TRANSFER AGENTS" GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, Bd. 7, Januar 2000 (2000-01), Seiten 126-138, XP002947334 ISSN: 0969-7128 Zusammenfassung; Seite 126 zweiter Absatz -----	1-25
Y	BANERJEE P. ET AL.: "Linear Polyethyleneimine Grafted to a Hyperbranched Poly(ethylene glycol)-like Core: A Copolymer for Gene Delivery" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 17, 22. Dezember 2005 (2005-12-22), Seiten 125-131, XP007904002 Zusammenfassung -----	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/051661

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 1-18, 20, 25 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- Die Zahlung der zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/051661

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 1552818	A	13-07-2005	US	2005147676 A1		07-07-2005
WO 2004078822	A	16-09-2004	JP	2004263153 A		24-09-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K	47/48	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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, LV, 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

Fターム(参考) 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02 BA05 CA43 CA44
 4C076 AA95 CC29 EE25 EE59 FF34
 4C084 AA13 NA11 NA13 ZB211
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA11 NA13 ZB21