

(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2014-518875

(P2014-518875A)

(43) 公表日 平成26年8月7日(2014.8.7)

| (51) Int.Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
|--------------------------|---------------------|-------------|
| A 61 K 31/711 (2006.01) | A 61 K 31/711 Z N A | 4 C 076 |
| A 61 K 47/36 (2006.01) | A 61 K 47/36 | 4 C 084 |
| A 61 K 31/7105 (2006.01) | A 61 K 31/7105 | 4 C 086 |
| A 61 K 31/713 (2006.01) | A 61 K 31/713 | |
| A 61 K 31/7088 (2006.01) | A 61 K 31/7088 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2014-511695 (P2014-511695) | (71) 出願人 | 513297449 ポリヴァロール ソシエテ アン コマン ディト カナダ エイチ3ブイ 1エイチ8 ケベ ック モントリオール クインーメリ ロ ード 3535 オフィス 220 |
| (86) (22) 出願日 | 平成24年5月24日 (2012.5.24) | (74) 代理人 | 100092093 弁理士 辻居 幸一 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成26年1月27日 (2014.1.27) | (74) 代理人 | 100082005 弁理士 熊倉 賢男 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/CA2012/050342 | (74) 代理人 | 100084663 弁理士 箱田 篤 |
| (87) 國際公開番号 | W02012/159215 | (74) 代理人 | 100093300 弁理士 浅井 賢治 |
| (87) 國際公開日 | 平成24年11月29日 (2012.11.29) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/489,306 | | |
| (32) 優先日 | 平成23年5月24日 (2011.5.24) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/489,302 | | |
| (32) 優先日 | 平成23年5月24日 (2011.5.24) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】特定のキトサン系ナノ複合体を用いて siRNA を効果的かつ安全に送達するための組成物及び方法

(57) 【要約】

キトサンを用いた非ウイルス性送達システムの具体的な製剤によって、インピトロ及びインビボの両方で治療用 RNAi 誘導性核酸を細胞へ効率的に送達するための組成物及び方法を開示する。特に、組成物は、以下の物理化学的特性を有する核酸及び特定のキトサンを含有する：数平均分子量は 5 kDa ~ 200 kDa の間、脱アセチル化度は 80% ~ 95% の間、及び、キトサンのアミンと核酸のリン酸との比率は 2.0 未満。

【選択図】図 4 A

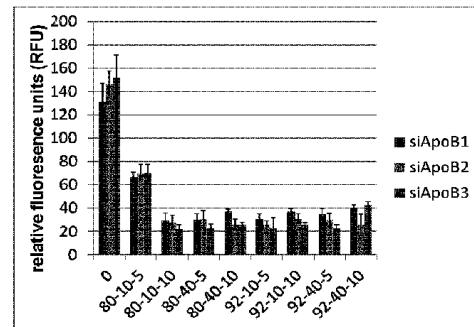


Fig. 4A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インビボでの遺伝子の発現を阻害するための組成物であって、キトサン及び前記遺伝子に対する R N A i 誘導性核酸配列を含み、前記キトサンは 5 k D a ~ 2 0 0 k D a の分子量 (M n) 、 8 0 % ~ 9 5 % の脱アセチル化度 (D D A) を有し、前記キトサンのアミンと前記核酸のリン酸との比率 (N : P) は 2 0 未満である、組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記キトサンの分子量は 5 ~ 1 5 k D a 、 D D A は 9 0 ~ 9 5 % 、及び N : P 比は 2 ~ 1 0 である、組成物。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の組成物であって、前記キトサンの分子量は 1 0 k D a 、 D D A は 9 2 % 、及び N : P 比は 5 である、組成物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記キトサンの分子量は 1 0 k D a 、 4 0 k D a 、 8 0 k D a 、 1 5 0 k D a 、又は 2 0 0 k D a である、組成物。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記キトサンはアセチル基のプロック分布又は化学修飾を含む、組成物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記キトサンは 1 . 0 ~ 7 . 0 の間の多分散性を有する、組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列は、ヌクレオチドが 1 0 ~ 5 0 個の間の二本鎖線状デオキシリボ核酸又はリボ核酸の配列である、組成物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列は、デオキシリボ核酸又はリボ核酸の配列のヘアピン構造である、組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列は、糖骨格、リン酸骨格、及び / 又はヌクレオチド塩基環のいずれかにおいて化学的に修飾されている、組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列は、低分子干渉 R N A 、低分子ヘアピン R N A 、又は R N A i 誘導ベクターである、組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 1 0 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列は、I I 型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌の病因に関与する遺伝子を標的とする、組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 1 0 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列は、腫瘍の発生、転移、又は化学療法抵抗性の誘導に関与する遺伝子を標的とする、組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 1 1 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列は糖調節タンパク質を標的とする、組成物。

【請求項 14】

請求項 1 3 に記載の組成物であって、前記糖調節タンパク質はインクレチン分解酵素である、組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

請求項13に記載の組成物であって、前記インクレチン分解酵素はジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV) である、組成物。

【請求項 16】

請求項1～11のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記RNAi誘導性核酸配列はアテローム生成タンパク質を標的とする、組成物。

【請求項 17】

請求項16に記載の組成物であって、前記アテローム生成タンパク質は、アポリポタンパク質B (ApoB)、アポリポタンパク質E (ApoE)、アポリポタンパク質B100 (ApoB100)、アポリポタンパク質B48 (ApoB48)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL)、マトリックスメタロプロテアーゼ9 (MMP9)、又はコレステロールエステル転送タンパク質 (CETP) である、組成物。
10

【請求項 18】

請求項1～12のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記RNAi誘導性核酸配列は、ヘリカーゼタンパク質、RNAヘリカーゼ、P68、DDX5、DDX32、DDX1、Akt、PKB、ABC輸送体のメンバー、MDR1、MRP、RASタンパク質ファミリーのメンバー、SRC、HER2、EGFR、Ab1、又はRafを標的とする、組成物。

【請求項 19】

請求項18に記載の組成物であって、前記ヘリカーゼタンパク質はRecQLヘリカーゼファミリーのメンバーである、組成物。
20

【請求項 20】

請求項18又は19に記載の組成物であって、前記ヘリカーゼタンパク質はRecQL1DNAヘリカーゼである、組成物。

【請求項 21】

請求項18に記載の組成物であって、前記RNAi誘導性核酸配列はMDR1を標的とする、組成物。

【請求項 22】

患者における糖尿病及びその関連状態、アテローム性動脈硬化症及びその関連状態、又は癌及びその関連状態を治療するための、請求項1～21のうちいずれか一項に記載の組成物。
30

【請求項 23】

請求項22に記載の組成物であって、前記糖尿病関連状態は、インスリン依存性糖尿病 (I型糖尿病)、インスリン非依存性糖尿病 (II型糖尿病)、インスリン抵抗性、高インスリン血症、糖尿病誘発性高血圧、肥満、血管の損傷、目の損傷、腎臓の損傷、神経の損傷、自律神経系の損傷、皮膚の損傷、結合組織の損傷、及び免疫系の損傷である、組成物。

【請求項 24】

請求項22に記載の組成物であって、前記アテローム性動脈硬化症関連状態は心血管疾患である、組成物。
40

【請求項 25】

請求項24に記載の組成物であって、前記心血管疾患は、冠動脈心疾患、急性冠症候群、又は狭心症である、組成物。

【請求項 26】

請求項22～25のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物は前記ApoBの血漿濃度を低下させる、組成物。

【請求項 27】

請求項22～25のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物はGLP1の生物学的利用能を増加させる、組成物。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

請求項 22～27のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物は更に前記患者のグルコース代謝の制御を向上させる、組成物。

【請求項 29】

請求項 22～28のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物は更に前記患者の血糖値を低下させる、組成物。

【請求項 30】

請求項 22～29のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物は更に患者のコレステロール値を低下させる、組成物。

【請求項 31】

請求項 22～30のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物は更に前記患者の低密度リポタンパク質濃度を低下させる、組成物。 10

【請求項 32】

請求項 22～31のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物は更に前記患者の体重増加を減少させる、組成物。

【請求項 33】

請求項 22～32のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物は、前記 ApoB の血漿濃度を少なくとも 35% 低下させ、かつ LDL / VLDL コレステロール値を少なくとも 20% 低下させる、組成物。

【請求項 34】

請求項 22～32のうちいずれか一項に記載の組成物であって、更にインスリン、グルコシダーゼ阻害剤、スルホニル尿素、DPP-IV 阻害剤、又は血糖降下化合物を含む、組成物。 20

【請求項 35】

請求項 22～34のうちいずれか一項に記載の組成物であって、好適な送達剤、インスリン、又は血糖降下化合物との同時投与のために製剤化される、組成物。

【請求項 36】

請求項 35 に記載の組成物であって、前記好適な送達剤は、Mirus Transit TKO (登録商標) 親油性試薬、lipofection (登録商標)、lipofectamine (登録商標)、cellflection (登録商標)、ポリカチオン、又はリポソームである、組成物。 30

【請求項 37】

請求項 35 に記載の組成物であって、前記血糖降下化合物は、メトホルミン、アカルボース、アセトヘキサミド、グリメピリド、トラザミド、グリピジド、グリブリド、トルブタミド、クロルプロパミド、チアゾリジンジオン、アルファ グルコシダーゼ阻害剤、ビグアニジン誘導体、トログリタゾン、又はこれらの混合物である、組成物。

【請求項 38】

請求項 34 に記載の組成物であって、前記スルホニル尿素は、トルブタニド、トラザミド、グリソキセピド、グリミペイド、又はグリボムリドである、組成物。

【請求項 39】

請求項 34 に記載の組成物であって、前記 DPP-IV 阻害剤は、シタグリプチン、ビルダグリプチン、又はサクサグリプチンである、組成物。 40

【請求項 40】

請求項 22 に記載の組成物であって、前記癌は、乳癌、神経膠腫、大腸癌、肺癌、小細胞肺癌、胃癌、肝臓癌、血液癌、骨癌、肺臓癌、皮膚癌、頭部若しくは頸部の癌、皮膚又は眼内の黒色腫、子宮肉腫、卵巣癌、直腸若しくは結腸直腸の癌、肛門癌、結腸癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、外陰癌、扁平上皮癌、膀胱癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織腫瘍、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性又は急性の白血病、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓癌、尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中枢神経系腫瘍、神経膠腫、星状細胞腫、多形性膠芽腫、中枢神経系原発リンパ腫、骨髄腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、ブドウ膜黒色腫、精巣癌、

口腔癌、咽頭癌、小児腫瘍、白血病、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経膠腫、横紋筋芽細胞腫、又は肉腫である、組成物。

【請求項 4 1】

請求項 2 2 又は 4 0 に記載の組成物であって、好適な送達剤のうちの少なくとも 1 つ及び抗癌化合物との同時投与のために製剤化される、組成物。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 に記載の組成物であって、前記好適な送達剤は、Mirus Transist TKO (登録商標) 親油性試薬、Lipofection (登録商標) 、Lipofectamine (登録商標) 、Cellfection (登録商標) 、ポリカチオン、又はリボソームである、組成物。

10

【請求項 4 3】

請求項 2 2 及び 4 1 ～ 4 2 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、好適な抗癌療法の間の同時投与のために製剤化される、組成物。

【請求項 4 4】

請求項 4 3 に記載の組成物であって、前記抗癌療法は、外科手術、化学療法、ホルモン療法、及び定位放射線のうちの少なくとも 1 つである、組成物。

【請求項 4 5】

請求項 1 ～ 4 4 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物は 1 mg / kg の用量での注射用に製剤化される、組成物。

20

【請求項 4 6】

請求項 1 ～ 4 5 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記組成物は投与したときに肝臓毒性を誘発しない、組成物。

【請求項 4 7】

核酸配列を細胞内に送達する方法であって、請求項 1 ～ 4 6 のうちいずれか一項に記載の組成物を前記細胞と接触させる段階を含む、方法。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載の方法であって、前記細胞は、一次細胞、形質転換細胞、又は不死化細胞である、方法。

【請求項 4 9】

キトサンと RNAi 誘導性核酸配列とを酸性媒体中で混合することを含む、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌を治療するための組成物を製造する方法であって、前記キトサンは、5 kDa ～ 200 kDa の分子量 (Mn) 、80% ～ 95% の脱アセチル化度 (DDA) を有し、前記キトサンのアミンと核酸のリン酸との比率 (N : P) は 20 未満である、方法。

30

【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載の方法であって、前記キトサンは前記 RNAi 誘導性核酸配列と混合する前に、塩酸に溶解させる、方法。

【請求項 5 1】

請求項 5 0 に記載の方法であって、前記キトサンは 1 : 1 の比率のグルコサミン : HC 1 に溶解させる、方法。

40

【請求項 5 2】

請求項 4 9 ～ 5 1 のうちいずれか一項に記載の方法であって、前記キトサンの Mn は 10 kDa 、 DDA は 80% 又は 92% であり、前記キトサンのアミンと核酸のリン酸との比率 (N : P) は 5 又は 10 である、方法。

【請求項 5 3】

請求項 4 9 ～ 5 2 のうちいずれか一項に記載の方法であって、前記キトサンと前記 RNAi 誘導性核酸配列との混合により、200 nm 未満のサイズの球状ナノ粒子が生成される、方法。

【請求項 5 4】

請求項 5 3 に記載の方法であって、前記ナノ粒子のサイズは 45 ～ 156 nm である、

50

方法。

【請求項 5 5】

キトサン及びRNA誘導性核酸配列を含む組成物の有効量を患者に投与することを含む、前記患者における糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌、を治療する方法であって、前記キトサンは、5 kDa～200 kDaの分子量(Mn)、80%～95%の脱アセチル化度(DDA)を有し、前記キトサンのアミンと核酸のリン酸との比率(N:P)は20未満である、方法。

【請求項 5 6】

請求項55に記載の方法であって、前記キトサンの分子量は5～15 kDa、DDAは90～95%、及びN:P比は2～10である、方法。 10

【請求項 5 7】

請求項55に記載の方法であって、前記キトサンの分子量は10 kDa、DDAは92%、及びN:P比は5である、方法。

【請求項 5 8】

請求項55に記載の方法であって、前記キトサンの分子量は10 kDa、40 kDa、80 kDa、150 kDa、又は200 kDaである、方法。

【請求項 5 9】

請求項55に記載の方法であって、前記キトサンはアセチル基のブロック分布又は化学修飾を含む、方法。

【請求項 6 0】

請求項55に記載の方法であって、前記キトサンは1.0～7.0の間の多分散性を有する、方法。 20

【請求項 6 1】

請求項55に記載の方法であって、前記RNAi誘導性核酸配列は、ヌクレオチドが10～50個の間の二本鎖線状デオキシリボ核酸又は二本鎖線状リボ核酸の配列である、方法。

【請求項 6 2】

請求項55に記載の方法であって、前記RNAi誘導性核酸配列は、デオキシリボ核酸又はリボ核酸の配列のヘアピン構造である、方法。

【請求項 6 3】

請求項55に記載の方法であって、前記RNAi誘導性核酸配列は、糖骨格、リン酸骨格、及び/又はヌクレオチド塩基環のいずれかにおいて化学的に修飾されている、方法。 30

【請求項 6 4】

請求項55に記載の方法であって、前記RNAi誘導性核酸配列は、低分子干渉RNA、低分子ヘアピンRNA、またRNAi誘導ベクターである、方法。

【請求項 6 5】

請求項55に記載の方法であって、前記RNAi誘導性核酸配列は、II型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌の病因に関与する遺伝子を標的とする、方法。

【請求項 6 6】

請求項55に記載の方法であって、前記RNAi誘導性核酸配列は、腫瘍の発生、転移、又は化学療法抵抗性の誘導に関する遺伝子を標的とする、方法。 40

【請求項 6 7】

請求項55に記載の方法であって、前記RNAi誘導性核酸配列は糖調節タンパク質を標的とする、方法。

【請求項 6 8】

請求項67に記載の方法であって、前記糖調節タンパク質はインクレチン分解酵素である、方法。

【請求項 6 9】

請求項68に記載の方法であって、前記インクレチン分解酵素はジペプチジルペプチダーゼ IV(DPP-IV)である、方法。 50

【請求項 7 0】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列はアテローム生成タンパク質を標的とする、方法。

【請求項 7 1】

請求項 7 0 に記載の方法であって、前記アテローム生成タンパク質は、アポリポタンパク質 B (A p o B)、アポリポタンパク質 E (A p o E)、アポリポタンパク質 B 1 0 0 (A p o B 1 0 0)、アポリポタンパク質 B 4 8 (A p o B 4 8)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、マトリックスマタロプロテアーゼ 9 (M M P 9)、又はコレステロールエステル転送タンパク質 (C E T P) である、方法。

【請求項 7 2】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列は、ヘリカーゼタンパク質、R N A ヘリカーゼ、P 6 8、D D X 5、D D X 3 2、D D X 1、A k t、P K B、A B C 輸送体のメンバー、M D R 1、M R P、R A S タンパク質のファミリーのメンバー、S R C、H E R 2、E G F R、A b 1、又はR a f を標的とする、方法。

【請求項 7 3】

請求項 7 2 に記載の方法であって、前記ヘリカーゼタンパク質はヘリカーゼの R e c Q ファミリーのメンバーである、方法。

【請求項 7 4】

請求項 7 2 に記載の組成物であって、前記ヘリカーゼタンパク質は R e c Q L 1 D N A ヘリカーゼである、方法。

【請求項 7 5】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記 R N A i 誘導性核酸配列は M D R 1 を標的とする、方法。

【請求項 7 6】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は前記 A p o B の血漿濃度を低下させる、方法。

【請求項 7 7】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は G L P 1 の生物学的利用能を増加させる、方法。

【請求項 7 8】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は更に前記患者のグルコース代謝の制御を向上させる、方法。

【請求項 7 9】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は更に前記患者の血糖値を低下させる、方法。

【請求項 8 0】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は更に患者のコレステロール値を低下させる、方法。

【請求項 8 1】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は更に前記患者の低密度リポタンパク質濃度を低下させる、方法。

【請求項 8 2】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は更に前記患者の体重増加を減少させる、方法。

【請求項 8 3】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は、前記 A p o B の血漿濃度を少なくとも 3 5 % 低下させ、かつ L D L / V L D L コレステロール値を少なくとも 2 0 % 低下させる、方法。

【請求項 8 4】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は更に、インスリン、グルコシダーゼ阻

10

20

30

40

50

害剤、スルホニル尿素、DPP IV阻害剤、又は血糖降下化合物を含む、方法。

【請求項 8 5】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は、好適な送達剤、インスリン、又は血糖降下化合物との同時投与のために製剤化される、方法。

【請求項 8 6】

請求項 8 5 に記載の方法であって、前記好適な送達剤は、Mirus Transit TKO（登録商標）親油性試薬、Lipofection（登録商標）、Lipofectamine（登録商標）、Cellfection（登録商標）、ポリカチオン、又はリポソームである、方法。

【請求項 8 7】

請求項 8 5 に記載の方法であって、前記血糖降下化合物は、メトホルミン、アカルボース、アセトヘキサミド、グリメピリド、トラザミド、グリビジド、グリブリド、トルブタミド、クロルプロパミド、チアゾリジンジオン、アルファ グルコシダーゼ阻害剤、ビグアニジン誘導体、トログリタゾン、又はこれらの混合物である、方法。

10

【請求項 8 8】

請求項 8 4 に記載の方法であって、前記スルホニル尿素は、トルブタニド、トラザミド、グリソキセピド、グリミペイド、又はグリボムリドである、方法。

【請求項 8 9】

請求項 8 4 に記載の方法であって、前記DPP IV阻害剤は、シタグリプチン、ビルダグリプチン、又はサクサグリプチンである、方法。

20

【請求項 9 0】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記癌は、乳癌、神経膠腫、大腸癌、肺癌、小細胞肺癌、胃癌、肝臓癌、血液癌、骨癌、肺臓癌、皮膚癌、頭部又は頸部の癌、皮膚又は眼内の黒色腫、子宮肉腫、卵巣癌、直腸又は結腸直腸の癌、肛門癌、結腸癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、外陰癌、扁平上皮癌、膿瘍、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織腫瘍、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性又は急性の白血病、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓癌、尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中枢神経系腫瘍、神経膠腫、星状細胞腫、多形性膠芽腫、中枢神経系原発リンパ腫、骨髄腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、ブドウ膜黒色腫、精巣癌、口腔癌、咽頭癌、小児腫瘍、白血病、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経膠腫、横紋筋芽細胞腫、又は肉腫である、方法。

30

【請求項 9 1】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は、好適な送達剤のうちの少なくとも 1 つ及び抗癌化合物と共に投与される、方法。

【請求項 9 2】

請求項 9 1 に記載の方法であって、前記好適な送達剤は、Mirus Transit TKO（登録商標）親油性試薬、Lipofection（登録商標）、Lipofectamine（登録商標）、Cellfection（登録商標）、ポリカチオン、又はリポソームである、方法。

40

【請求項 9 3】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は好適な抗癌療法の間に同時投与される、方法。

【請求項 9 4】

請求項 9 3 に記載の方法であって、前記抗癌療法は、外科手術、化学療法、ホルモン療法、及び定位放射線のうちの少なくとも 1 つである、方法。

【請求項 9 5】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は 1 mg / kg の用量で注射される、方法。

【請求項 9 6】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記組成物は投与したときに肝臓毒性を誘発しない

50

、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年5月24日に出願された米国仮特許出願第61/489,306号、及び2011年5月24日に出願された米国仮特許出願第61/489,302号の優先権を主張し、それらの全内容を本明細書において援用する。

【0002】

技術分野

本発明の記載は、特定のキトサン系ナノ複合体を用いて治療用RNAi誘導性核酸を効率的に送達するための組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

siRNA（低分子（short）干渉RNA）による遺伝子サイレンシングは、生物学における発展分野であり、かつ治療可能性を有する新規な転写後遺伝子サイレンシング戦略として進化してきた。ヒトゲノムの配列決定及び疾患の分子原因の理解に基づき、意のままに病原性遺伝子をオフにできる可能性は、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、及び癌などの多種多様な臨床的病状を治療するための魅力的な手法である。siRNAにより、疾患に関するヒトゲノム中のほぼ全ての遺伝子は制御の影響を受けやすいため、創薬に対する機会が開かれている。局所投与されるsiRNAについては既に最初の臨床試験に入っている一方で、siRNAの全身送達を成功させるための戦略は、まだ開発の前臨床段階にある。

【0004】

I型糖尿病

I型糖尿病（T2DM）は、多様な病的症状を伴う進行性代謝障害であり、多くの場合、脂質代謝及び糖代謝における障害と関連している（Bell et al., 2001, *Nature*, 414: 788-791）。I型糖尿病は、筋肉、脂肪組織、及び肝臓などの末梢組織におけるインスリン作用に対する抵抗性を特徴とする。また、膵細胞のインスリンを分泌する能力における進行性障害も特徴とする。糖尿病の長期的な影響は、その血管合併症：微小血管合併症、網膜症、神経障害、及び腎症から生じる。大血管合併症も同様にI型糖尿病と関連し、かつ心血管及び脳血管の合併症を含む。

【0005】

今日知られている抗糖尿病薬の主な種類は以下の通りである。ビグアニドは、肝臓でのグルコース産生を阻害し、腸管吸収を減少させ、かつ末梢でのグルコースの取り込みを強化することによって、血糖を制御するのに役立つ薬物の種類である。この種類には、グルコース及び血中トリグリセリドの濃度の両方を下げる薬物であるメトホルミンが含まれる。スルホニル尿素は、膵臓の細胞からの内因性インスリンの放出を刺激することにより、I型糖尿病を制御又は管理するのに役立つ薬物の種類である。この種類には、とりわけ、トルブタミド、トラザミド、グリソキセピド、グリミペイド（glimipide）、及びグリボムリド（glibomuride）が含まれる。グリコシダーゼ阻害剤は、膵臓細胞からのインスリンの放出を刺激するため血糖値を下げ、レバグリニド及びナateglinideを含む。

【0006】

残念ながら、これらの治療法は組み合わせたとしても、頻繁に安全性、容忍性、体重増加、浮腫、及び胃腸不耐性によって制約される（Drucker et al., 2010, *Nat Rev Drug Discov*, 9: 267-268; Nauck et al., 2009, *Diabetes Care*, 32: 84-90; Ng et al., 2010, *Prim Care Diabetes*, 4: 61-63; Truitt

10

20

30

40

50

t et al., 2010, Curr Med Res Opin, 26: 1321
 1331; 及び Wajcberg and Tavarria, 2009, Expert Opin Pharmacother, 10: 135 142)。更に、疾患が進行し、細胞の機能が低下すると、進行中の治療の有効性が減少する (Turner et al., 1999, JAMA, 281: 2005 2012)。

【0007】

インクレチン効果の発見により、最小限の副作用を有する T2DM を制御可能な治療薬の種類を用いて、治療の新しい道が提供してきた。インクレチン効果は、インスリン分泌の刺激を介して食後の血糖値を調節するグルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) によって主に仲介される。GLP-1 はまた、動物モデルにおいて実証されているように、胃内容排出の遅延、GLP-1 が中枢神経系に与える効果による満腹感の促進、細胞増殖の促進、細胞アポトーシスの阻害などの間接的な効果も有する (Nauck et al., 2002, J Clin Endocrinol Metab, 87: 1239 1246; 及び Creutzfeldt et al., 1996, Diabetes Care, 19: 580 586)。しかしながら、臨床における GLP-1 の可能性は、遍在性のセリンプロテアーゼジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による GLP-1 の急速な分解によって妨害されていた。DPP-IV が GLP-1 の N 末端領域における His: Ala: Glu 配列を開裂するという発見により、DPP-IV 抵抗性 GIP1 類似体の開発、及び DPP-IV 阻害剤の開発が可能となった。

【0008】

DPP-IV 阻害剤は、ジペプチジルペプチダーゼIV のタンパク質分解活性を阻害する新たな種類の薬物である。DPP-IV のタンパク質分解活性は、インクレチンとして知られている糖調節(glycoregulation)ペプチドの血中濃度を低下させる。それ故、ジペプチジルペプチダーゼIV の阻害により、これらのインクレチン、特に、グルカゴン様ペプチド1 (GIP1-1) の作用が増強する。これらの阻害剤には、シタグリップチン、ビルダグリップチン、及びサクサグリップチンが含まれ、かつ1日1回経口投与される。

アテローム性動脈硬化症

【0009】

アテローム性動脈硬化症は、動脈内でのアテローム斑の形成によって引き起こされる慢性疾患である。アテローム性動脈硬化症は、冠動脈心疾患、急性冠症候群、及び狭心症などの多くの心血管疾患を表す (Lloyd Jones et al., 2010, Circulation, 121: e46 e215)。米国では、2010年のアテローム性動脈硬化症の予測経済コストは 5030 億 US ドルであり、それは主に、直接的な医療及び間接的な生産コストによるものであった (Lloyd Jones et al., 2010, Circulation, 121: 948 954)。アテローム性動脈硬化症に対する原因因子は不明のままであるが、証拠の増加から、脂質異常症、高脂血症、及び炎症のこの疾患の病因における高い役割が示唆されている (Hanson et al., 2006, Nat Rev Immunol, 6: 508 519; Montecucco and Mach, 2008, Clin Interv Aging, 3: 341 349)。現在、アテローム性動脈硬化症及び関連病態の心血管疾患 (CVD) による罹患率及び死亡率の減少は、一般的にスタチン系の治療と称される、3 ヒドロキシ 3 メチルグルタリルコエンザイム A (HMG CoA) 還元酵素阻害剤の積極的な臨床使用に主に起因する (Vermissen et al., 2008, BMJ, 337: a2423)。これらの治療は、低密度リボタンパク質コレステロール (LDL-C) を減少させる。介入研究により、脂質低下治療が施されると、CVD の罹患率及び死亡率におけるリスクが減少することが実証された。更に、減少した罹患率 / 死亡率、及び LDL-C の低下から、対数線形的な関連性が示された (Law et al., 1994, BMJ, 308: 367 372)。

【0010】

LDL-C を低下させるため、従って、アテローム性動脈硬化症を減少させるための別

10

20

30

40

50

の手法は、肝臓からの超低密度リポタンパク質（VLDL）分泌の阻害又は遮断である。アポリポタンパク質B（apoB）はVLDLの分泌に必要であるため、この阻害はapoBを標的とすることにより達成することができる（Rutledge et al., 2010, Cell Biol, 88: 251-267）。apoBは主に、ヒトの肝細胞及び腸細胞で発現される。

【0011】

ヒトでは、apoB遺伝子は染色体2(2q)に位置し、かつ43kbにわたる。apoB mRNAは28個のイントロン及び29個のエキソンから成り、16時間の半減期を特徴とする（Ludwig et al., 1987, DNA, 6: 363-372; Scott, 1989, Curr Opin Cell Biol, 1: 1141-1147）。apoB mRNAの翻訳から、4,536個のアミノ酸、かつ517-550kDaの見かけの分子量を有するタンパク質が生じ、それ故、最大の単量体タンパク質の1つとして表される。アテローム性動脈硬化症及びその関連するCVDのための代替療法としてのapoB阻害の重要性は、apoBのシートドメインを介して、例えばリン脂質、コレステロール、及びコレステロールエステルなどの脂質と物理的に相互作用するapoBの能力により、肝臓において大きなリポタンパク質粒子、すなわちVLDLが形成され、かつ腸においてカイロミクロンが形成されることにある（Rutledge et al., 2010, Biochem Cell Biol, 88: 251-267において検討された）。

癌

20

【0012】

古典的な癌療法には、1つ又はいくつかの化学療法薬の使用が含まれる。これらの治療法は、化学療法薬の非特異性により、毒性及び重度の副作用と関連する。化学療法に関する別の主要な問題は、経時的な化学療法抵抗性の発生である。例えば、化学療法に対する抵抗性は乳癌の管理に関連する主要な問題の1つである。

【0013】

癌細胞は1以上の化学療法剤に対する抵抗性を獲得するための多くのメカニズムを使用している。薬剤耐性の主要なメカニズムとしては、（1）可溶性薬物の細胞内取り込みの減少、（2）所望の細胞損傷を引き起こす薬物の能力を変化させる細胞内の遺伝子及び表現型の変化、及び（3）多剤耐性（MDR）をもたらす細胞表面輸送体による薬物流出の増加、が挙げられる。これら全ての場合において、単一の化学療法物質に対する抵抗性は、常に他の化学療法薬に対する広範囲の薬剤耐性パターンと関連する。

30

【0014】

最も一般的かつ研究された抵抗メカニズムの1つは、輸送タンパク質による細胞内薬物濃度の減少であり、輸送タンパク質は薬物が作用部位に到達する前に薬物を細胞外に排出するため、細胞は薬剤誘発性細胞死を受けることなく低薬物濃度に適応する。これらの輸送体のほとんどは、ATP結合力セット膜貫通タンパク質スーパーファミリーに属する。

【0015】

ヒトでは、48個のABC遺伝子（ATP結合力セットファミリーの遺伝子）がこれまでに特定されている。乳癌では、実際にこれまでに報告された全てのMDR耐性は、以下のタンパク質のうちの1つと密接に関連していた：p糖タンパク質（PgP）、多剤耐性関連タンパク質（MRP）、及び乳癌耐性タンパク質（BCRP）。

40

【0016】

PgPは、種々の癌組織における薬物のATP依存性排出に関与する最も一般的なタンパク質である。しばらくの間、過剰発現PgPは、哺乳動物の腫瘍細胞においてMDRをもたらし得る唯一のタンパク質であると考えられていた。乳癌において、化学療法の治療を受けた52%の患者では、治療により患者らのPgPは上方制御されていた。PgPをコードする遺伝子はABC B1 (mdr1)と称され、染色体7の位置q21.1-2に位置する。ABC B1は28個のエキソンから構成されており、その産物は1.2kbのmRNAをもたらす。PgPのタンパク質配列分析から、2つの細胞質外ドメイ

50

ンの存在が明らかとなり、各々は 6 個の推定膜貫通領域、及び ATP 結合共通モチーフを含む。

【 0 0 1 7 】

更に、ゲノムの完全性及び安定性の維持に関する興味深い酵素の 1 種類は、DNA ヘリカーゼである。これらのタンパク質は、二本鎖ゲノムをほどき、損傷又は誤対合した DNA への修復機構の接近を可能とする ATP 依存性機構による、DNA の複製、修復、組み換え、及び転写において重要な役割を果たしている。

【 0 0 1 8 】

例えば、ヘリカーゼの RecQ ファミリーは、組換え、修復、及びホリデイジャンクションの形成において重要な役割を果たすことが示されている。より最近では、これらのヘリカーゼは、転写後の遺伝子サイレンシングの過程に関与していた (Cogoni and Macino, 1999, Science, 286: 2342-2344)。この過程では、あらゆるハイブリダイゼーション及びサイレンシング機構が開始され得る前に、二本鎖 DNA を分離するためにヘリカーゼが必要とされる。このファミリーのタンパク質に対して、他の役割が提唱されている。例えば、RecQL1 は、2 つのハイブリッドスクリーニングで実証されるように、核局在シグナルとして機能する QIP1 及び QIP2 のタンパク質の両方と相互作用するので、核タンパク質輸送において役割を担っていると考えられている (Seki et al., 1997, 234: 48-53)。

【 0 0 1 9 】

RecQ ファミリーは、5 つのメンバーから構成され、それらが付加的なカルボキシ末端基又はアミノ末端基を含有するか否かに応じて 2 つのグループに分けることができる。これらの遺伝子の変異は、癌だけでなく、他の生理学的な異常の発生率の増加を引き起こす (Karow et al., 2000, Curr Opin Genet Dev, 10: 32-38; Kawabe et al., 2000, Oncogene, 19: 4767-4772)。このような異常としては、ブルーム症候群 (BLM)、ウェルナー症候群 (WRN)、及びロスモンド トムソン症候群 (RecQ4) が挙げられる。ヒト RecQL1 遺伝子は特定されたこのファミリーの最初のヒトメンバーであり、大腸菌 DNA ヘリカーゼ、RecQ との広範な相同意を有することが示されており、かつ染色体 12 p 11 に位置している (Puranam and Blackshear, 1994, J Biol Chem, 269: 29838-29845; Puranam et al., 1995, Genomics, 26: 595-598)。

【 0 0 2 0 】

とりわけ、AsPC1、A549、及び LS174T などの癌性細胞株における RecQL1 の過剰発現は、これらの癌性細胞において高い組換え率を補償するために引き起こされ、それ故、アポトーシスを防止すると考えられている (Futami et al., 2008, Cancer Sci, 99: 71-80)。これらの細胞株において、又はマウス異種移植モデルにおいて、特定の siRNA を用いた RecQL1 遺伝子サイレンシングは、癌性細胞死の増加及び腫瘍塊の減少をもたらす (Futami et al., 2008, Cancer Sci, 99: 71-80)。

【 0 0 2 1 】

恒常的安定性及び機能的完全性の維持に関する酵素の他の種類には、RNA ヘリカーゼがある。これらの酵素は、8 個の保存モチーフから成る、中央に位置する「ヘリカーゼドメイン」の存在を特徴とする。これらのモチーフに基づいて、RNA ヘリカーゼはファミリーに分類される。これらの保存モチーフは、NTP 加水分解及び RNA 巻き戻し機能を実行するために必要とされる (Linder et al., 2001, Trends Biochem Sci., 26: 339-341; Tanner and Linder, 2001, Mol Cell, 8: 251-262)。RNA ヘリカーゼと関連する他の機能は、RNA タンパク質相互作用の破壊である (Jankowsky et al., 2001, Science, 291: 121-125)。これらの酵素は、それらの NTPase 及びヘリカーゼの活性の両方を制御することができる分子複合体のメン

10

20

30

40

50

バーである (Silverman et al., 2003, Gene, 312: 116)。RNA二次構造の調節により、スプライシング (Balvay et al., 1993, Bioessays, 15: 165-169)、及び翻訳 (van der Velden and Thomas, 1999, Int J Biochem Cell Biol, 31: 87-106)などの段階が制御されるので、これらのヘリカーゼに固有の特徴は、転写後の事象において重要な役割を果たしている。

【0022】

RNAヘリカーゼなどのRNAプロセシング分子の調節不全は、ヒトの病理及び癌の発生に関与している。ヒトの病理に関するこれらのヘリカーゼの例としては、とりわけ、DDX1/5/6/9/10、及びDHX32が挙げられる (Abdelhaleem, 2004, Anticancer Res, 2004, 24: 3951-3953; Abdelhaleem, 2004, Biocim Biophys Acta, 1704: 37-46)。これらのヘリカーゼは、特徴的なDEADボックスドメインを含み、かつほとんどの癌において上方制御されている (Abdelhaleem, 2004, Anticancer Res, 2004, 24: 3951-3953; Abdelhaleem, 2004, Biocim Biophys Acta, 1704: 37-46)。

【0023】

今日のところ、インビボにおいて siRNA送達を維持することにより、代替療法を提供する必要性がなお存在する。特に、II型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、及び癌を治療するための代替手段を提供することが非常に望ましいであろう。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0024】

本発明の記載の目的の1つは、キトサン及びRNA誘導性核酸配列を含む組成物を提供することであり、キトサンは、5kDa～200kDaの分子量 (Mn)、80%～95%の脱アセチル化度 (DDA) を有し、キトサンのアミンと核酸のリン酸 (phosphate)との比率 (N:P) は20未満である。

【0025】

本発明の記載の他の目的は、患者における、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌、及び/又は関連状態を治療するために、本明細書に記載の組成物を提供することである。

【0026】

本発明の記載によれば、キトサン及びRNA誘導性核酸配列を酸性媒体中で混合することを含む、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌、及び/又は関連状態を治療するための組成物を製造する方法が提供され、キトサンは、5kDa～200kDaの分子量 (Mn)、80%～95%の脱アセチル化度 (DDA) を有し、キトサンのアミンと核酸のリン酸との比率 (N:P) は20未満である。

【0027】

本発明の記載によれば、患者における糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌、及び/又は関連状態を治療するための；又は患者における糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌、及び/又は関連状態を治療するための薬剤の製造における、本明細書で定義する組成物の使用も提供される。

【0028】

本発明の記載の目的の1つは、患者における癌の治療、又は化学療法抵抗性の逆転、又は両方の組み合わせのために、本明細書に記載の組成物を提供することである。本発明の記載によれば、癌を治療するため、又は古典的な化学療法に対する化学療法抵抗性の癌における感受性を増加させるため、又は両方のために、組成物を製造する方法が提供される。

【0029】

本発明の記載の他の目的は、患者における糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌、及び/又は関連状態を治療する方法を提供することであり、それは本明細書で定義する組

成物、より具体的には、キトサン及びRNA誘導性核酸配列を含む組成物の有効量を患者に投与することを含み、キトサンは、5kDa～200kDaの分子量(Mn)、80%～95%の脱アセチル化度(DDA)を有し、キトサンのアミンと核酸のリン酸との比率(N:P)は20未満である。

【0030】

また、本明細書に記載の組成物が細胞と接触する段階を含む、核酸配列を細胞に送達する方法を提供する。

【0031】

一実施形態では、キトサンの分子量は、5～15kDa、DDAは90～95%、かつN:P比は2～10であり、好ましくはキトサンの分子量は10kDa、DDAは92%、かつN:P比は5である。 10

【0032】

さらなる実施形態では、キトサンの分子量は10kDa、40kDa、80kDa、150kDa、又は200kDaである。

【0033】

他の実施形態では、キトサンは、アセチル基のプロック分布又は化学修飾を含む。

【0034】

さらなる実施形態では、キトサンは1.0～7.0の間の多分散性を有する。

【0035】

さらなる実施形態では、RNA誘導性核酸配列は、ヌクレオチドが10～50個の間の二本鎖線状デオキシリボ核酸配列であり；RNA誘導性核酸配列は、ヌクレオチドが10～50個の間の二本鎖線状リボ核酸配列であり；RNA誘導性核酸配列は、デオキシリボ核酸配列又はリボ核酸配列のヘアピン構造であり；及び／又はRNA誘導性核酸配列は、低分子干渉RNA、低分子ヘアピンRNA、又はRNAsi誘導ベクターである。 20

【0036】

他の実施形態では、RNAsi誘導性核酸配列は、糖骨格、リン酸骨格、及び／又はヌクレオチド塩基環のいずれかにおいて化学的に修飾されている。

【0037】

好ましくは、RNA誘導性核酸配列は、I型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌の病因に関する遺伝子；例えば腫瘍の発生、転移、又は化学療法抵抗性の誘導若しくは獲得などに関する遺伝子、糖調節タンパク質又はアテローム生成タンパク質；例えばインクレチン分解酵素など；例えばジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)など；例えばアボリポタンパク質B(ApoB)、アボリポタンパク質E(アポE)、アボリポタンパク質B100(ApoB100)、アボリポタンパク質B48(ApoB48)、好中球ゼラチナーゼ関連リボカリン(NGAL)、マトリックスマタロプロテイナーゼ9(MMP-9)、又はコレステロールエステル転送タンパク質(CETP)などを標的とする。 30

【0038】

他の実施形態では、RNAsi誘導性核酸配列は、ヘリカーゼタンパク質、RNAヘリカーゼ、P68、DDX5、DDX32、DDX1、Akt、PKB、ABC輸送体のメンバー、MDR1、MRP、RASタンパク質ファミリーのメンバー、SRC、HER2、EGFR、Ab1、又はRafを標的とする。 40

【0039】

他の実施形態では、ヘリカーゼタンパク質は、例えば、RecQL1-DNAヘリカーゼなどの、RecQヘリカーゼファミリーのメンバーである。更に、RNAsi誘導性核酸配列は、MDR1を標的とする。

【0040】

他の実施形態では、糖尿病関連状態は、インスリン依存性糖尿病(I型糖尿病)、インスリン非依存性糖尿病(II型糖尿病)、インスリン抵抗性、高インスリン血症、糖尿病誘発性高血圧、肥満、血管の損傷、目の損傷、腎臓の損傷、神経の損傷、自律神経系の損 50

傷、皮膚の損傷、結合組織の損傷、及び免疫系の損傷である。

【0041】

さらなる実施形態では、アテローム性動脈硬化症に関連する状態は、冠動脈心疾患、急性冠症候群、又は狭心症などの心血管疾患である。

【0042】

他の実施形態では、組成物は、ApoBの血漿濃度を低下させ；GLP-1生物学的利用能を増加させ；患者のグルコース代謝の制御を向上させ；患者の血糖値を低下させ；患者のコレステロール値を低下させ；患者の低密度リポタンパク質濃度を低下させ、及び／又は患者の体重増加を減少させる。

【0043】

さらなる実施形態では、組成物はApoBの血漿濃度を少なくとも35%低下させ、かつLDL/VLDLコレステロール値を少なくとも20%低下させる。

【0044】

他の実施形態では、組成物は、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、皮内投与、乳房内投与、腹腔内投与、経口投与、又は胃腸投与用に製剤化される。

【0045】

特定の実施形態では、組成物は1mg/kgの用量での注射用に製剤化される。

【0046】

他の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、インスリン、グルコシダーゼ阻害剤、スルホニル尿素、DPP-IV阻害剤、又は血糖降下化合物を含むことができる。

【0047】

本明細書に記載の組成物はまた、好適な送達剤、インスリン、又は血糖降下化合物との同時投与のために製剤化することができる。このような送達剤は、Mirus Transit TKO(登録商標)親油性試薬、lipofection(登録商標)、lipofectamine(登録商標)、cellflection(登録商標)、ポリカチオン、若しくはリポソームであり；又はこのような血糖降下化合物は、メトホルミン、アカルボース、アセトヘキサミド、グリメピリド、トラザミド、グリビジド、グリブリド、トルブタミド、クロルプロパミド、チアゾリジンジオン、アルファグルコシダーゼ阻害剤、ビグアニジン(biguanidine)誘導体、トログリタゾン、又はこれらの混合物であり；このようなスルホニル尿素は、トルブタニド(tolbutamide)、トラザミド、グリソキセピド、グリミペイド、又はグリボムリドであり；このようなDPP-IV阻害剤は、シタグリプチン、ビルダグリプチン、又はサクサグリプチンである。

【0048】

一実施形態では、癌は、乳癌、神経膠腫、大腸癌、肺癌、小細胞肺癌、胃癌、肝臓癌、血液癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭部若しくは頸部の癌、皮膚又は眼内の黒色腫、子宮肉腫、卵巣癌、直腸若しくは結腸直腸の癌、肛門癌、結腸癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、外陰癌、扁平上皮癌、腫瘍、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織腫瘍、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性又は急性の白血病、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓癌、尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中枢神経系腫瘍、神経膠腫、星状細胞腫、多形性膠芽腫、中枢神経系原発リンパ腫、骨髓腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、ブドウ膜黒色腫、精巣癌、口腔癌、咽頭癌、小児腫瘍、白血病、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経膠腫、横紋筋芽細胞腫、又は肉腫である。

【0049】

他の実施形態では、組成物は、好適な送達剤のうちの少なくとも1つ及び抗癌化合物との同時投与のために製剤化される。

【0050】

好適な送達剤は、Mirus Transit TKO(登録商標)親油性試薬、lipofection(登録商標)、lipofectamine(登録商標)、Cellflection(登録商標)、ポリカチオン、又はリポソームとすることができます。

10

20

30

40

50

【0051】

また、組成物は、好適な抗癌療法の間の同時投与のために製剤化されることが記載されており、このような抗癌療法は、外科手術、化学療法、ホルモン療法、及び定位放射線のうちの少なくとも1つである。

【0052】

好ましい実施形態では、組成物は、投与されたときに肝臓毒性及び炎症を誘導しない。

【0053】

本明細書に記載の組成物は、更に、5～7.1の間で変化するpHを有するトランスフェクション媒体を含むことができ；乾燥粉末として製剤化することができ；及び／又は水性媒体中で粒子の懸濁液である。

10

【0054】

他の実施形態では、キトサンはRNA誘導性核酸配列と混合する前に、塩酸に溶解させる。

【0055】

好ましくは、キトサンは1：1の比率のグルコサミン：HClに溶解させる。

【0056】

他の実施形態では、キトサンとRNA誘導性核酸配列との混合により、200nm未満のサイズ、好ましくは45～156nmのサイズの球状ナノ粒子が生成される。

【0057】

一実施形態では、細胞は一次細胞、形質転換細胞、又は不死化細胞である。

20

【0058】

他の実施形態では、キトサンはRNAI誘導性核酸配列と混合する前に、塩酸に溶解させる。

【0059】

他の実施形態では、キトサンのMnは10kDa、DDAは80%又は92%であり、キトサンのアミンと核酸のリン酸との比率(N:P)は5又は10である。

【0060】

次に、添付の図面を参照する。

【図面の簡単な説明】**【0061】**

【図1】図1Aは、(A)92 10 5キトサン/dsODN DPP IVナノ粒子、(B)80 80 5キトサン/dsODN DPP IVナノ粒子、(C)80 10 10キトサン/dsODN DPP IVナノ粒子、(D)92 10 5キトサン/dsODN ApoBナノ粒子、(E)80 80 5キトサン/dsODN ApoBナノ粒子、及び(F)80 10 10キトサン/dsODN ApoBナノ粒子の、球状キトサン/dsODNナノ粒子及び集団サイズ分布における環境制御型走査電子顕微鏡(ESEM)画像を示している。図1Bは、(A)92 10 5キトサン/dsODN RecQL1ナノ粒子、(B)80 40 5キトサン/dsODN RecQL1ナノ粒子、及び(C)80 10 10キトサン/dsODN RecQL1ナノ粒子の、球状キトサン/dsODNナノ粒子及び集団サイズ分布における環境制御型走査電子顕微鏡(ESEM)画像を示している。

30

【図2】(0062)図2Aは、(A)80 10 5キトサン/siRNA ApoBナノ粒子、(B)80 40 5キトサン/siRNA ApoBナノ粒子、(C)92 10 5キトサン/siRNA ApoBナノ粒子、及び(D)92 40 5キトサン/siRNA ApoBナノ粒子の、球状キトサン/siRNAナノ粒子及び集団サイズ分布における環境制御型走査電子顕微鏡(ESEM)画像を示している。図2Bは、(A)80 10 5キトサン/siRNA MDR1ナノ粒子、(B)80 200 5キトサン/siRNA MDR1ナノ粒子、(C)92 10 5キトサン/siRNA MDR1ナノ粒子、及び(D)92 150 5キトサン/siRNA MDR1ナノ粒子の、球状キトサン/siRNAナノ粒子及び集団サイズ分布の環境制御型走査電子顕

40

50

微鏡(E S E M)画像を示している。

【図3】(0063)図3Aは、異なるpH値及び異なる時間の間インキュベートした様々なN:P比を有するキトサン/dsODNナノ粒子のポリアクリルアミドゲル電気泳動の写真表示を示している。(A)dsODN DPP IV及び(B)dsODN ApoBと複合体を形成し、pH6.5(MES)及びpH8(TAE)中で0.5時間、4時間、及び20時間インキュベートしたキトサン92-10を示している。図3Bは、異なるpH値及び異なる時間の間インキュベートした様々なN:P比を有するキトサン/dsODNナノ粒子のポリアクリルアミドゲル電気泳動を示している。キトサン92-10はdsODN RecQL1と複合体を形成して、かつpH6.5(MES)及びpH8(TAE)中で0.5時間、4時間、及び20時間インキュベートした。ナノ粒子が上記の条件で安定でない場合、siRNAを模倣したdsODNは放出され、ゲル中に移動する。

【図4】(0064)図4AはpH6.5でのキトサン/siRNAナノ粒子の安定性における柱状図を示している。異なるDDA及びMWのキトサン製剤は、N:P比が5及び10で3つの異なる抗Apob siRNA配列(siApob1、siApob2、及びsiApob3)と複合体化し、かつ20時間インキュベートし、ナノ粒子形成後、核酸定量に用いるRNA挿入色素であるRibogreen(登録商標)を各試料に添加して複合体化していないRNA画分を測定した。高い蛍光値は粒子分解及び不安定性を表している。図4Bは、MWがナノ粒子サイズに及ぼす影響を示す柱状図を示している。92%のDDA及び異なるMWのキトサンが、異なるN:P比で抗RecQL1 siRNAと複合体化した。図4Cは、MWがナノ粒子サイズに及ぼす影響を示す柱状図を示している。80%のDDA及び異なるMWのキトサンが、異なるN:P比で抗RecQL1 siRNAと複合体化した。図4Dは、MWがナノ粒子サイズに及ぼす影響を示す柱状図を示している。72%のDDA及び異なるMWのキトサンが、異なるN:P比で抗RecQL1 siRNAと複合体化した。図4Eは、動的光散乱で測定した、RecQL1 siRNA濃度がナノ粒子サイズに及ぼす影響、及び塩がナノ粒子サイズに及ぼす影響を示す柱状図を示しており、N:P比が5で、92%のDDA、10の分子量を有するキトサンは、増加する濃度の抗RecQL1 siRNAと複合体化した。

【図5】(0065)図5は、異なるpHにおいて、DDA、MW、及びN:P比がナノ粒子の安定性に及ぼす影響を示しており、低い蛍光は粒子の安定性を示している。様々なDDA、MWのキトサンが、異なるN:P比で抗MDR1 siRNAと複合体化してナノ粒子を形成した。ナノ粒子を異なるpHでインキュベートし、siRNAの放出をRibogreen(登録商標)アッセイを用いて測定した。

【図6】(0066)図6Aは、キトサン/dsODNナノ粒子のヌクレアーゼ保護アッセイ：(A)dsODN DPP IVと複合体を形成したキトサン(92-10-5又は80-10-10)、(B)DNase I消化後に残ったdsODN DPP IV、(C)dsODN Apobと複合体を形成したキトサン(92-10-5又は80-10-10)、(D)DNase I消化後に残ったdsODN Apob、の結果を示しており、全ての消化は対照を用いて処理試料の信号強度により評価した(すなわち、0UDNase I=強度100%)。図6Bは、キトサン/dsODNナノ粒子のヌクレアーゼ保護アッセイ：(A)dsODN RecQL1と複合体を形成したキトサン(92-10-5、80-40-5、又は80-10-10)、及び(B)DNase I消化後に残ったdsODN RecQL1、の結果を示しており、全ての消化は対照を用いて処理試料の信号強度により評価した(すなわち、0UDNase I=強度100%)。

【図7】(0067)図7Aは、いくつかの細胞株でのトランスフェクションから24時間後のdsODN/ナノ粒子の細胞内取り込み：(A)HepG2細胞株におけるキトサン(92-10-5、80-80-5、又は80-10-10)/5'6FAM標識dsODN DPP IVの取り込み；及び(B)HepG2、HEK293、及びRAW264.7細胞におけるキトサン(92-10-5、80-80-5、又は80-10

10

20

30

40

50

10) / 5' 6 FAM 標識 dsODN ApoB の取り込み、における柱状図表現を示してお
り、DharmaFECT (登録商標) #1 及び 4 を取り込みの陽性対照として用いた。図 7B は、いくつ
かの細胞株でのトランスフェクションから 24 時間後の dsODN ナノ粒子の細胞取り込み：AsPC-1、LS174T、及び A549 細胞株におけるキトサン (92 10 5、80 40 5、又は 80 10 10) / 5' 6 FAM 標識 dsODN RecQL1 の取り込み、を示す柱状図を示してお
り、DharmaFECT (登録商標) #1 を取り込みの陽性対照として用いた。

【図 8】(0068) 図 8 は、キトサン / dsODN DPP IV ナノ粒子でトラン
スフェクトした (A) HepG2、(B) Caco-2、及び (C) HT-29 の細胞株、
キトサン / deODN ApoB ナノ粒子でトランスフェクトした (D) HepG2、(E)
HEK293、及び (F) RAW264.7 の細胞株における、トランスフェクションから 24 時間後
のキトサン / siRNA ナノ粒子取り込みの共焦点画像を示している。キトサン 92 10 (DDA、Mn) をローダミン (赤) で標識し、かつ dsODN を 6 FAM (緑) で 5' 標識した。キトサン 92 10 は N : P 比が 5 で siRNA と複合化した。細胞膜を染色してから膜アンカー両親媒性色素である CellMask (登録商標) (青) で造影し、内部移行したナノ粒子と膜に結合したナノ粒子とを区別した。示される画像は、dsODN は緑、キトサンは赤、膜は青、透過 DIC は灰色でそれぞれ別々のチャネルを表しており、合成画像を左下部分に示す。

【図 9】(0069) 図 9 は、トランスフェクションから 24 時間後のキトサン / siRNA ナノ粒子取り込みの共焦点画像を示している。LS174T 細胞株をキトサン / siRNA RecQL1 ナノ粒子でトランスフェクトした。画像はトランスフェクションから 24 時間後に撮影した。キトサン 92 10 (DDA、Mn) をローダミン (赤) で標識し、かつ siRNA を 6 FAM (緑) で 5' 標識した。キトサン 92 10 は N : P 比が 5 で siRNA RecQL1 と複合化した。細胞膜を染色してから CellMask (登録商標) (青) で造影した。示される画像は、siRNA は緑、キトサンは赤、膜は青、透過 DIC は灰色でそれぞれ別々のチャネルを表しており、合成画像を左下部分に示す。

【図 10】(0070) 図 10 は、トランスフェクションから 24 時間後のキトサン / siRNA ナノ粒子取り込みの共焦点画像を示している。MCF-7MDR 細胞株をキトサン / siRNA MDR1 ナノ粒子でトランスフェクトした。画像はトランスフェクションから 24 時間後に撮影した。キトサン 92 10 (DDA、Mn) をローダミン (赤) で標識し、かつ siRNA を Cy3 (緑) で 5' 標識した。キトサン 92 10 (A) キトサン 80 10 (B)、及び キトサン 80 200 (C) は、N : P 比が 5 で siRNA Cy3 と複合化した。細胞膜を染色してから CellMask (登録商標) (青) で造影した。示される画像は、siRNA は緑、キトサンは赤、膜は青、透過 DIC は灰色でそれぞれ別々のチャネルを表しており、合成画像を左下部分に示す。

【図 11】(0071) 図 11A は、特定の細胞株における DPP IV 及び ApoB の遺伝子発現阻害におけるリアルタイム PCR (qPCR) 分析の柱状図を示している。HepG2 細胞を (A) キトサン (92 10 5、80 80 5、及び 80 10 10 / siRNA DPP IV)；(B) キトサン (92 10 5 / siRNA ApoB) ナノ粒子でトランスフェクトし、阻害率は CT 法を用いて、トランスフェクト細胞と非トランスフェクト細胞とを比較することにより得た。図 11B は、特定の細胞株における RecQL1 遺伝子発現阻害におけるリアルタイム PCR (qPCR) 分析を示す柱状図を示している。LS174T 細胞をキトサン (92 10 5、80 40 5、及び 80 10 10 / siRNA RecQL1) でトランスフェクトし、阻害率は CT 法を用いて、トランスフェクト細胞と非トランスフェクト細胞とを比較することにより得た。

【図 12】(0072) 図 12 は、3 つの異なる DPP IV 発現細胞株における DPP IV の酵素活性を示す柱状図を示している。DPP IV 阻害率は、siRNA モックトランスフェクト細胞と比較して決定した。値は、平均 ± s.d. ; n = 4 / 群として

10

20

30

40

50

表す。^{*} p < 0.05、^{**} p < 0.01。

【図13】(0073)図13は、キトサン/siRNAの投与がapoBの血漿濃度に及ぼす影響を示す柱状図を示している。タンパク質濃度は、各処理群においてELISAにより測定した。柱及びエラーバーは、未処理のアテローム硬化性群であるDに対する平均タンパク質濃度を表している。グループDμは、通常の低脂肪食が与えられた正常陰性対照群である。

【図14】(0074)図14は、キトサン/siRNA投与後のLDL/VLDLコレステロールの治療的低下を示す柱状図を示している。LDL/VLDLコレステロール値は、安樂死の日に採取した試料において比色定量ELISAキットにより測定した。柱及びエラーバーは、未処理のアテローム硬化性群であるDに対する平均コレステロール値を表している。グループDμは、通常の低脂肪食が与えられた正常陰性対照群である。

【図15】(0075)図15は、治療用ナノ複合体(TNC)処理動物の肝臓における肝臓コレステロールの小滴の減少を示している。(A)C1 1、(B)C2 1、(C)C3 1、(D)C4 1、(E)C5 1、(F)D 2日、(G)D 3、(H)D 1、及び(I)Dμ 1のマウスの、ヘマトキシリンエオシンで染色してパラフィン固定した肝臓切片は、キトサン/siRNAの投与が肝臓におけるコレステロールの蓄積に及ぼす効果を実証している。矢印(↑)は、コレステロールの小滴の蓄積を示している。D群は未処理のアテローム硬化性陽性対照であり、一方で、Dμは、低脂肪食が与えられた正常陰性対照である。

【図16】(0076)図16はTNC処理動物の肝臓における炎症の吸収を示している。(A)C1 1、(B)C2 1、(C)C3 1、(D)C4 1、(E)C5 1、(F)D 2日、(G)D 3、(H)D 1、及び(I)Dμ 1のマウスの、サフランオ/ファストグリーン/鉄ヘマトキシリンで染色してパラフィン固定した肝臓切片は、キトサン/siRNA投与又はアテローム性動脈硬化症の発生に関連する炎症反応の吸収を実証している。円(○)及び矢印(↑)は、リンパ球浸潤を示している。

【図17】(0076)図17は、全ての動物群の毎週の体重(g)の測定値を示す柱状図を示している。全ての動物は、各キトサン/siRNA投与の前に、各週の初日に体重を測定した。低脂肪で正常対照のDμと比較して、高脂肪食を与えられた全ての動物について4週間を超える継続的な体重増加が観察され、それはTNC処理によって基本的に影響を受けなかった。

【図18】(0078)図18は、週当たりの体重増加の割合を示す柱状図を示している。全ての動物は、キトサン/siRNA投与の前に、各週の初日に体重を測定した。体重増加は、動物の体重と前の週のその動物の記録体重との間の相対的な差である[(t_{n-1} - t_n) / t_{n-1}]。この図は最初のTNC投与後の即座の体重の増加又は減少を示している。

【発明を実施するための形態】

【0062】

(0079)本発明の開示によれば、例えば低分子干渉RNA(siRNA)、低分子ヘアピンRNA(shRNA)、及びRNAi誘導ベクター(すなわち、細胞内でのベクターの存在がsiRNA又はshRNAの産生をもたらすベクター)などのRNAi誘導性物質を、哺乳動物、例えばヒトの細胞、組織、及び臓器に効率的に送達するための、非ウイルスベクターの新規かつ特定の組成物が提供される。特に、本発明の記載では、特定のキトサンと核酸との比率でRNAi誘導性物質を含む、特定の平均分子量(Mn)及び脱アセチル化度(DDA)の範囲を有するキトサン組成物を提供する。

【0063】

(0080)従って、標的転写物の過剰な発現又は異常な発現、又は標的転写物によりコードされるポリペプチドの異常又は過剰な活性に関連する疾患又は状態を、治療又は予防する組成物及び方法を提供する。

【0064】

10

20

30

40

50

(0081) 本明細書において提供される組成物は、症状が発現する前に、発現している間に、又は発現後に、適切な時間枠内で、このような状態の危険性がある、又は患っている患者に、本明細書に開示の組成物を用いたRNAi誘導性物質を投与することで症状の緩和をもたらすために使用することができる。

【0065】

(0082) 組成物及び方法は、限定されるものではないが、例えば転写物の機能を研究するために、転写物によってコードされるポリペプチドが存在しない、又はポリペプチドの活性が低下した細胞又は生物における種々の化合物の効果を研究するためなど、様々な目的のために適用することができる。更に、組成物及び方法は、II型糖尿病及びその関連病状、アテローム性動脈硬化症及びその関連病状、並びに癌の臨床治療に適用することができる。具体的には、組成物及び方法は、糖尿病を治療するために、インクレチン分解酵素(DPP IV)又はあらゆる糖調節タンパク質を阻害するために適用することができ、アテローム性動脈硬化症を治療するために、APOB遺伝子又はあらゆるアテローム生成タンパク質(すなわち、APOE)を阻害するために適用することができ、又は限定されるものではないが、癌を治療するために、RecQL DNAヘリカーゼ、又はDX5 p68 RNAヘリカーゼそれぞれの発現を下方制御するために適用することができる。

10

【0066】

(0083) 特に、本発明の記載は、例えばヘリカーゼ過剰発現腫瘍の直接の治療として、又は緩和医療のための放射線増感物質として、本明細書に記載の組成物と合わせたこのような核酸の使用に関する。更に、本明細書に記載の組成物及び方法は、例えば、放射線療法、外科手術、ホルモン療法、又は従来の化学療法などのあらゆる他の癌治療と組み合わせて使用することができる。本発明の記載では更に、放射線治療を強化するための、又は他の治療法と組み合わせて使用する、組成物及び方法を提供する。

20

【0067】

(0084) 本明細書に開示の組成物は、以下の物理化学的特性を有するRNAi誘導性核酸及びキトサンを含む：N:P比は25未満、キトサンは5kDa～200kDaの範囲の数平均分子量(Mn)、及び80%DDA～95%DDAの範囲の脱アセチル化度を有する。本発明の記載では、市販のリポプレックスに匹敵して、効果的に種々の細胞株をトランスフェクトし、かつ遺伝子サイレンシングを誘導する組成物及び方法の有効性を示し、いくつかの例において、明らかな細胞毒性なしに、トランスフェクション効率はmRNAレベルにおいて80%に達し、かつ細胞取り込みは95%に達した。

30

【0068】

(0085) RNA干渉(RNAi)は、二本鎖RNAがメッセンジャーRNAなどの細胞転写物を配列特異的分解に向かわせる過程である(Sharp, 2001, *Genes Dev.*, 15: 485-490; Vance and Vaucheret, 2001, *Science*, 292: 2277-2280)。この現象は、最初はシー・エレガンスで発見された(Fire et al., 1998, *Nature*, 391: 806-811)。自然に発生するRNAiは、21-25の間のヌクレオチドの小さな二本鎖断片によって仲介され、それは低分子干渉RNAと称されている。これらのsiRNAは、ダイサーと呼ばれるdsRNA特異的エンドヌクレアーゼによって、長い二本鎖RNA(dsRNA)を21塩基対の低分子干渉RNA(siRNA)に切断する過程により生成され、siRNAは2つのヌクレオチド3'オーバーハングが隣接する19塩基対二本鎖領域のコア領域から成る(Bernstein et al., 2001, *Nature*, 409: 363-366)。その後、siRNAはRNA誘導性サイレンシング複合体(RISC)に取り込まれ、RISCをsiRNAと相補的な配列を有する標的mRNAを認識するよう誘導して、特定の転写物の切断がもたらされる。

40

【0069】

(0086) その後、RNAiは合成された21個のヌクレオチドRNA二本鎖(siRNA)を導入することで哺乳動物細胞において誘発することが可能であり(Elbas-

50

hir et al., 2001, *Nature*, 411: 494–498)、そのため長い ds RNA のダイサー仲介過程における必要条件を回避できることが発見されたため、RNAi は臨床応用において大きな可能性を有するとすぐに認められた。

【0070】

(0087) 例えば、apoB の発現を標的とし、かつ減少させることによって、VLDL の過剰形成を防止することが可能であるため、生物におけるこれらのアテローム生成物質の蓄積が減少する (Soutschek et al., 2004, *Nature*, 432: 173–178)。配列特異的 siRNA を用いて非ヒト靈長類において mRNA レベルで apoB を標的とすることにより、処理から 24 時間後に apoB タンパク質、血清コレステロール、及び低密度リポタンパク質の濃度の著しい減少が実証された (Zimmermann et al., 2006, *Nature*, 441: 111–114)。脂質ベースのナノ粒子 (SNALP siRNA) を用いたこのような処理における治療効果は、最大の siRNA 用量で 11 日間持続し、こうして siRNA 処理の即時、強力、かつ持続的な生物学的效果が実証された。残念なことに、これらの脂質ベースのベクターは、肝細胞壊死を示唆するアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 及びアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の血清濃度の上昇によって示されるように、高レベルの肝臓毒性をもたらした (Zimmermann et al., 2006, *Nature*, 441: 111–114)。従って、これらの報告は、アテローム性動脈硬化及び CVD の治療のための標的として apoB の重要性を実証しているが、それらはまた全身的な apoB における安全かつ効果的な減少を達成するための、siRNA 送達システムにおける現在の欠点を強調している。10

【0071】

(0088) 合成低分子干渉 RNA の形態における RNAi の直接送達は、乏しい細胞標的及び取り込み、細胞内及び / 又は細胞外でのヌクレアーゼ分解 (すなわち RNase) による短い半減期だけでなく、制限された血液の安定性及び毒性に悩まされ、依然として問題のままである (Stein, 1996, *Trends Biotechnol.*, 14: 147–149; Urban Klein et al., 2004, *Gene Therapy*, 11: 6; Katas and Alpar, 2006, *J Control Release*, 115: 216–225)。その結果、RNAi の臨床治療への置き換えは、これらの問題において未解決事項のままである。RNAi は、トランスフェクションなどの手段により細胞内に導入されると、幅広い種類の異なる細胞型において機能することが示されている。しかしながら、トランスフェクション効率は、低分子干渉 RNA 分子を担持する送達ビヒクルに依存する。ベクターと称される送達ビヒクルは、siRNA を濃縮、保護し、かつ標的細胞内へ運ぶことが可能でなければならない。標的の近傍では、非ウイルスベクターは細胞内取り込みを促進し、リソソーム隔離を回避し、かつ非ウイルスベクターの内容物を放出することで、所望の生物学的效果を達成する。20

【0072】

(0089) 合成 siRNA の化学修飾により、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗性、かつ向上した血液の安定性がもたらされた。例えば、特定のリボースの C2 位置でのホスホチオエート結合の選択的添加又は 2'-O メチルでの置換により、活性を妥協することなく、siRNA のヌクレアーゼ耐性が増加する (Corey, 2007, *J Clin Invest*, 117: 3615–3622; Whitehead et al., 2009, *Nat Rev Drug Discov*, 8: 129–138; Judge et al., 2006, *Mol Ther*, 13: 494–505)。それでもなお、いくつかの化学修飾は、細胞毒性及びオフターゲット効果を増加させ、かつ mRNA ハイブリダイゼーションを減少させ得る (Weyermann et al., 2005, *Eur J Pharm Biopharm*, 59: 431–438; Amarzguioui et al., 2003, *Nucleic Acids Res*, 31: 589–595)。siRNA の半減期を増加させるための化学修飾を介して達成された進歩にもかかわらず、トランスフェクション効率、細胞標的化、及び取り込みは、効果的な送達30

に対する障壁のままである。従って、化学的に非修飾 / 修飾した siRNA の保護、及び標的細胞への輸送の両方が可能なパッケージングシステムが必要である。しかしながら、トランスフェクション効率は、低分子干渉 RNA 分子を担持する送達ビヒクルに依存する。ベクターと称される送達ビヒクルは、siRNA を濃縮、保護し、かつ標的細胞内へ運ぶことができなければならない。標的の近傍では、非ウイルスベクターは、細胞内取り込みを促進し、リソーム隔離を回避し、かつ非ウイルスベクターの内容物を放出することで、所望の生物学的效果を達成する。このような非ウイルスベクターはインビトロ及びインビオで試験されており、siRNA の臨床的実現への置き換えの可能性を示している。それでもなお、主要な欠点はこのような非ウイルスベクターに関連している。低いトランスフェクション効率、血清安定性、凝集、及び毒性は、臨床における薬剤送達のための強力かつ非毒性の手段として非ウイルスベクターの商業化が現実になる前に対処されるべき主な障害として残っている。非ウイルスベクターの主な種類を以下に説明する。

10

【0073】

リン酸カルシウム

(0090) このベクターの主な欠点は、限られた効率及びヌクレアーゼ分解から核酸を保護することができないことがある。核酸を保護するこのベクターの能力の改善にもかかわらず、そのトランスフェクション効率は低いままであるため、インビオでのその有効な使用が妨げられている。

20

【0074】

カチオン性脂質

(0091) カチオン性脂質は、静電相互作用を介して核酸と複合体を形成し、最終的に多層状の脂質 核酸複合体（リポプレックス）を形成する。リポソーム製剤は、通常、カチオン性脂質及びDOPPE（ジオレオイルホスファジルエタノールアミン）などの中性脂質を含む。中性脂質は、リポソーム製剤の安定性に寄与し、膜融合を促進するだけでなく、エンドソームを不安定化することでリソーム脱出に寄与している。リポプレックスは、核酸を培養細胞に送達する最も効率的な方法の一つである。これらのトランスフェクション効率にもかかわらず、リポプレックスは培養細胞で観察され、かつインビオでのいくつかの調査で確認されたように、有毒である。毒性は複合体中のカチオン性脂質と核酸との電荷比、及び投与量に密接に関連している。リポプレックスに関する毒性を低減するために、さらなる生体適合性製剤が試験されて開発されている。毒性の減少は、主に、他のポリマーとのグラフト化、又はカチオン性ポリマーの全電荷を減少させることによって達成される。

30

【0075】

カチオン性ポリマー

(0092) カチオン性ポリマーは、逆帯電したポリカチオンとポリアニオン種（すなわち核酸）との間の相互作用を介してナノメートルサイズのナノ粒子を形成する。これらのナノ粒子は核酸をカプセル化し、結果的に、ヌクレアーゼによる積荷の劣化を防ぐ（Romoren et al., 2003, Int J Pharm, 261: 115-127）。多数の天然及び合成のカチオン性ポリマーは、遺伝子の送達又はサイレンシングのためのビヒクルとして使用してきた。カチオン性ポリマーを用いたこれらのナノ粒子の多くは、リポプレックスと比較して優れたトランスフェクション効率及び低い血清感受性を有する。天然に存在するポリカチオンの中には、ヒストン、カチオン化ヒト血清アルブミンなどのタンパク質、及びキトサン、アミノ多糖類がある。

40

【0076】

(0093) 合成ポリカチオン群としては、ポリ-L-リジン（PLL）、ポリ-L-オルニチン、並びにポリアミン、例えばポリエチレンイミン（PEI）、ポリプロピレンイミン、及びポリアミドアミンデンドリマーが挙げられる。

50

【0077】

(0094) ポリプレックスの利点は、リポソームでは複数の脂質成分が必要であるのとは逆に、ポリプレックス形成は複数のポリカチオンの相互作用を必要としないことであ

り、それはポリプレックスの巨視的特性を制御容易とする。ポリカチオンの他の主な利点はそれらのブロック構造であり、それ故、直接的な化学修飾によってより高い効率又は特異的な細胞標的を達成することが可能である。しかしながら、これらの利点にもかかわらず、高い電荷密度のナノ粒子はより毒性があるようであるため、多くのカチオン性ポリマーは高い表面電荷密度により毒性が見出されている。更に、ポリマー中の電荷密度は総電荷量よりも細胞毒性においてより重要な役割を果たしていることが報告されている。P E I の細胞毒性は分子量と共に直線的に増加するので、毒性は分子量にも依存する可能性がある。更に、リソーム隔離と呼ばれる現象である、リソーム中でのP E Iなどの非分解性ポリマーの蓄積はまた、毒性に対するさらなる寄与となり得る。

【0078】

10

(0095) キトサンは、キチンのアルカリ中での脱アセチル化から生じる、グルコサミン及びN-アセチルグルコサミンのモノマーが1,4グリコシド結合によって連結した天然高分子である。キトサンの分子量及び脱アセチル化度は、その生物学的及び物理化学的な特性を決定づける。例えば、キトサンの生分解性はアセチル基の量及び分布に影響される。これらのアセチル基の欠如、又はこれらのブロック分布ではなくランダム分布により、非常に低い分解率がもたらされる。

【0079】

20

(0096) キトサンは、生体適合性、生分解性、粘膜付着性、抗菌/抗真菌活性、及び非常に低い毒性を含む、幅広い有益な特性を有している。従って、キトサンは薬学及び生物医学の分野の注目を集め、かつ核酸のパッケージング及び濃縮のために最も広く使用される非ウイルスベクターの1つとなった。

【0080】

30

(0097) いくつかの研究では、キトサンの分子量及び脱アセチル化度(DDA)がキトサン プラスミドDNAナノ粒子の取り込みに及ぼす影響、種々の細胞株に対するナノ粒子輸送及びトランスフェクション効率について取り組んでいる。Hu a n gらは、A549細胞においてこの主題に取り組んでいる(2005, J Control Release, 106: 391-406)。しかしながら、この研究では、平均分子量(Mn)及びDDAがpDNAのトランスフェクション効率に及ぼす影響を研究するために、わずか7つの製剤(88%のDDAの10、17、48、98、及び213kDaのキトサン; 61及び46%のDDAの213kDaのキトサン)しか使用せず、プラスミド中の数千の塩基対に対して通常21bpであるはるかに小さいsiRNAには対処しなかった。彼らは、Mn及びDDAが減少すると、プラスミドにおいてより低いトランスフェクション効率がもたらされることを見出した。しかしながら、これらの2つのパラメータの間の関係はこれよりずっと複雑であり、最適な安定性を達成するためにはキトサンのMnとDDAとの間の微妙なバランスが要求される。彼らが複雑な関係を描くことができなかつたのは、彼らの限られた数の製剤に起因する。更に、一度に1つのパラメータのみを変化させており、それは彼らがトランスフェクション媒体のpH、及びキトサンとDNAとの比率(N:P)と関連してMnとDDAとの間の連結効果を確認することを妨げた。プラスミド キトサンのポリプレックスについて、この複雑な関係に取り組む他の研究が、Lavertuらによって実施された(2006, Biomaterials, 27: 4815-4824)。彼らの研究では、彼らはいくつかの異なるDDAレベルに対して分子量を変化させ、また、キトサンとDNAとの比率(N:P)及び/又はトランスフェクション媒体のpHを調査した。この研究は、こうした最適化により、HEK293細胞において、広く使用されている商業的リボソーム(Lipofectamine(登録商標)及びFugene(登録商標))と同等である高いトランスフェクション効率が達成されたことを実証した。

40

【0081】

50

(0098) キトサンの脱アセチル化度が増加すると鎖に沿ってより高い電荷密度が生成され、pDNAとより強固に結合してナノ粒子を形成するため、キトサンのDNA結合能/親和性が増加する(Mate et al., 2009, Biomacromolecules

les, 10 : 1490 1499)。このように、非常に低いDDAのキトサンは、効率的にDNAを結合することができず、細胞をトランスフェクトするための物理的に安定な複合体を形成することが不可能である(Kopring Hoggard et al., 2003, J Gene Med, 5 : 130 - 141)。本明細書において上述したように、DDAはまた、生分解性に対して支配的な影響を与え、高いDDAは分解されにくい。この観点から、Kopring Hoggardら(2001, Gene Ther, 8 : 1108 1121)による最近の研究により、高いMnのキトサン系複合体のエンドソーム脱出はキトサンの酵素分解に依存し、かつ高いDDAのキトサンではあまり容易に起こらないであろうことが示唆された。結果的に生じた分解断片は、エンドソーム浸透圧を高め、膜の破裂につながると仮定される。従って、高度に脱アセチル化されたキトサン(ほぼ100%のDDA)について、分解性の低下はエンドソーム脱出の減少をもたらすであろう。

【0082】

(0099)キトサンのMnが核酸と結合する能力に及ぼす影響は、いくつかの研究で評価された。逆帯電した巨大分子間の結合親和性は、各分子の原子価に強く依存し、低原子価からは弱い結合のみが生じる(Danielsen et al., 2004, Biomacromolecules, 5 : 928 936)。短い鎖を有する低分子量におけるキトサンの原子価の低下は、そのDNAへの親和性を減少させることが示されている(Ma et al., 2009, Biomacromolecules, 10 : 1490 1499)。高度な複合体の安定性は、酵素攻撃に対する保護のために細胞外において望ましいが、MacLaughlinら(1998, J Control Release, 56 : 259 272)は、高いMnのキトサンは、ひとたび細胞内に入れば分解され得ず、細胞をトランスフェクトするのに過度に安定した複合体を形成し得ることを示唆した。更に、Lavertuら(2006, Biomaterials, 27 : 4815 4824)は、Mnは細胞内取り込みにおいて支配的な要因ではないようであるが、核酸結合親和性及び細胞内放出において役割を果たしているようであることを示した。これらの解釈及び核酸と結合するキトサンの微妙にバランスのとれた中間の安定性の必要性は、更に等温滴定熱量測定(Ma et al., 2009, Biomacromolecules, 10 : 1490 1499)により、及びポリブレックス輸送及び分解の生細胞内イメージング(Thibault et al., 2010, Mol Ther, 18 : 1787 1795)により、結合親和性を直接評価することで支持された。

【0083】

(00100)アミンとリン酸との比率は、DNA結合及びナノ粒子形成において重要な役割を果たしていることが見出されている。例えば、N:P比の増加は、DNAへのキトサンの結合を増強する。同じDDAの場合、低いMnのキトサンにはプラスミドDNAを完全に結合するために高いN:P比が必要である。同様に、等しいMnでは、低いDDAにはDNAを完全に結合するために高いN:P比が必要である(Kopring Hoggard, 2003, J Gene Med, 5 : 130 141; Kiang et al., 2004, Biomaterials, 25 : 5293 5301)。pHはトランスフェクション効率において重要な役割を果たすことが示されている。Lavertuら(2006, Biomaterials, 27 : 4815 4824)は、わずかに酸性の媒体中において複合体はより安定であり、かつトランスフェクション効率の上昇が達成されることを示した。これは、pHの低下によりキトサンのプロトン化が増加し、その結果ポリブレックスの正電荷(ゼータ電位)及びキトサンのDNAに対する結合親和性が増加するという事実によって説明することができる。キトサン製剤のパラメータ(DDA、Mn、N:P、及びpH)の複合効果は、Lavertuら(2006, Biomaterials, 27 : 4815 4824)によるインピトロでのプラスミドDNA送達において研究された。彼らは興味深いことに、最大の導入遺伝子の発現は、高DDA/低Mnから低DDA/高Mnの斜め線に沿って伸びるDDA:Mn値において起こることを見出した(Lavertu et al., 2006, Biomaterials, 27 : 4815 4824)。

10

20

30

40

50

7 : 4 8 1 5 - 4 8 2 4)。従って、D D Aを増加 / 減少させる場合、最大のトランスフェクションを維持するために、それに対応してM nを減少 / 増加させなければならない。

【0 0 8 4】

(0 0 1 0 1) 上述したように、p Hは、トランスフェクション効率において重要な役割を果たしている。L a v e r t u r a (2 0 0 6 , B i o m a t e r i a l s , 2 7 : 4 8 1 5 4 8 2 4)は、p Hが上昇すると、プラスミドD N Aを用いた最も効率的な製剤のためのM nはより高いM nの方へ移動し、それはより高いp Hでのキトサンの中和によってキトサンの電荷密度の減少がもたらされるためであることを示した。一方、所定のD D Aでは、N : P比が5 : 1から10 : 1へ変化すると、恐らくキトサン濃度の増加による安定化効果によって、最も効率的な製剤のためのM nはより低いM nの方へ移動する。従って、トランスフェクション効率に対する、及びより効率的かつ安定したキトサンD N A製剤の開発において、これらの種々の製剤パラメータの重要性を確認することができる。

【0 0 8 5】

(0 0 1 0 2) p D N Aとs i R N Aとの間の構造的差異は、効果的な送達のために必要なナノ粒子の複合体形成 / 安定性及び最適パラメータに影響すると考えられている。キトサンは、インビトロ及びインビボの両方においてs i R N Aの送達のために使用されてきた(de F ougerol l e s et al . , 2 0 0 7 , N a t R e v D r u g D i s c o v , 6 : 4 4 3 4 5 3 ; H o w a r d et al . , 2 0 0 6 , M o l T h e r , 1 4 : 4 7 6 4 8 4 ; K a t a s a n d A l p a r , 2 0 0 6 , J C o n t r o l R e l e a s e , 1 1 5 : 2 1 6 2 2 5 ; Z i m m e r m a n n et al . , 2 0 0 6 , N a t u r e , 4 4 1 : 1 1 1 1 1 4 ; 及び L i u et al . , 2 0 0 7 , B i o m a t e r i a l s , 2 8 : 1 2 8 0 1 2 8 8)。しかしながら、またs i R N A送達のための最適な物理化学的パラメータを特定する試みにもかかわらず、決定的な結果は、実験的不一致により文献において認められていない。例えば、s i R N A積荷のナノ粒子形成、安定性、及び保護は、典型的でない生理的環境のp Hであるp H 7 . 9で評価された。このp Hでは、キトサンは、その見かけのp K aが6 . 5に近いため、主に脱プロトン化されており、それ故、s i R N A積荷を効率的に結合することが不可能である。複合体形成はこれらの条件下で試験されていたので、いくつかのグループは、キトサンのp K aよりも高いp Hで見られるキトサンのs i R N Aに対する乏しい結合を補うために、高いN : P比を用いていた。これらの高いp H値(すなわち、7 . 9)の使用は、重大な設計上の誤り、かつ実験的不一致の原因を示しており、これらの研究者を、ナノ粒子の複合体形成、安定性、及び積荷の保護を達成するために、高いN : P比を使用するよう導いた。残念ながら、過剰なキトサンは、トランスフェクション効率に競合的に影響し、複数の非特異的効果を生み出し、かつ毒性を増加させる可能性があり、間違った結論につながり得る。

【0 0 8 6】

(0 0 1 0 3) 例えば、s i R N Aの送達において、中間のD D A(8 0 %)及び高いM n(6 4 1 7 0 k D a)は、低分子量のキトサン(1 0 k D a)よりも明らかに効率的であることが報告された(K a t a s et al . , 2 0 0 6 , J C o n t r o l R e l e a s e , 1 1 5 : 2 1 6 2 2 5 ; 及び L i u et al . , 2 0 0 7 , B i o m a t e r i a l s , 2 8 : 1 2 8 0 1 2 8 8)。しかしながら、これらの高分子量のキトサンは、毒性があることが見出された(H o w a r d et al . , 2 0 0 6 , M o l T h e r , 1 4 : 4 7 6 4 8 4 ; 及び R i c h a r d s o n et al . , 1 9 9 9 , I n t J P h a r m , 1 7 8 : 2 3 1 2 4 3)。更に、キトサン/ s i R N Aのナノ粒子の複合体形成、他の物理化学的特性、及びトランスフェクション効率を評価した全ての以前の報告では、製剤は非常に高いN : P比(N : P > 2 5)でのみ効率的であると一様に結論づけていた(H o w a r d et al . , 2 0 0 6 , M o l T h e r , 1 4 : 4 7 6 4 8 4 ; K a t a s et al . , 2 0 0 6 , J C o n t r o l R e l e a s e , 1 1 5 : 2 1 6 2 2 5 ; L i u et al . , 2 0 0 7 , 50

Biomaterials, 28 : 1280 – 1288)。これらの報告では、過剰なキトサンの大部分は実際に可溶性であり、ナノ粒子の構造的要素ではないことを認識していなかった (Maretal., 2010, Biomacromolecules, 11 : 549 – 554)。非常に高いN:P比 (N:P > 25) を有するこのような製剤では、大量の可溶性キトサンの凝集及び非特異的毒性作用による制限された投与を含む、重要な現実的問題が提示されている。

【0087】

(00104) 本発明の開示において示されるように、ナノ粒子の物理化学的特性を評価するために、キトサンのpKaに近いだけでなく生理的pHにも近い適切なpH条件の本発明での使用から、このような高いN:Pは、効率的なナノ粒子送達ビヒクルを形成するためにはないことが明らかとなった (図3)。

10

【0088】

(00105) キトサンは、鼻腔内、経口、腹腔内、及び筋肉内の経路を含む様々な投与経路を介して薬理学的に活性な化合物を送達するために使用されていた。キトサン/インスリンは、ラット及びヒツジにおいて鼻腔内経路を介して投与された。これらの製剤は、脱アセチル化度に関して指定はなく、10kDa以上の分子量の水溶性キトサンの使用を含むものであった (Illum, 1996, Danbiosyst UK Limited, United States, vol. 5554388; 1998, Danbiosyst UK Limited, United States, vol. 5744166)。

20

【0089】

(00106) キトサンはまた、可溶性製剤を用いた鼻腔内経路を介したマウスの免疫付与のための抗原性補強剤として使用されている (米国特許出願公開第2003/0039665号)。これらの製剤は、脱アセチル化度が50~90%の間で、Mnが10~500kDaの間の範囲のキトサングルタメートを含むものであった。

【0090】

(00107) キトサンはまた、インビトロ及びインビボでも同様に、プラスミドDNAからsiRNAまで様々な核酸を送達するために使用されてきた。様々な送達ビヒクルと共にsiRNAを用いた40を超えるインビボ研究の例が、眼を治療するため (Nakamura et al., 2004, Mol Vis, 10 : 703 – 711)、及び肺標的を治療するため (Howard et al., 2006, Mol Ther, 14 : 476 – 484) に報告されており (de Fougerolles et al., 2007, Nat Rev Drug Discov, 6 : 443 – 453)、又は局所若しくは全身の送達によって、神経系 (Kumar et al., 2006, Plos Medicine, 3 : 505 – 514)、肝臓 (Soutschek et al., 2004, Nature, 432 : 173 – 178)、腫瘍 (Grzelinski et al., 2006, Hum Gen Ther, 17 : 751 – 766)、及び他の臓器に対して行われてきた。一実施例では、キトサン/siRNAのナノ粒子は、関節炎のマウスモデルにおいて、抗炎症治療のための腹腔マクロファージにおけるTNFノックダウンを仲介した (Howard et al., 2006, Mol Ther, 14 : 476 – 484)。

30

【0091】

(00108) いくつかの研究では、インビトロ及びインビボにおいてsiRNAを送達するキトサンの能力を調査した。Katashら (2006, J Control Release, 115 : 216 – 225) は、84%のDDAを有するキトサン塩の2つの異なる形態 (CS-HC1及びCS-グルタメート) を使用して、キトサンパラメータがトランスフェクション効率に及ぼす影響を調査した。4つの異なる高分子量のキトサン (470kDa、270kDa、160kDa、及び110kDa) を使用して、25μg/ml (1.25 : 1) から300μg/ml (15 : 1) へのキトサン濃度の上昇は、ナノ粒子サイズを約150nmから450nmに増加させることを彼らは見出した (Ka

40

50

tas et al., 2006, J Control Release, 115: 216 225)。

【0092】

(00109) 更に、キトサン グルタメートからはキトサン HCl よりも小さいナノ粒子が生じることが彼らの研究で示された。Katasら(2006, J Control Release, 115: 216 225)は、彼らの実験条件下において、siRNA のキトサンへの完全な結合は、キトサンが極端に過剰な条件である N:P 比が 100:1 を超える場合にのみ起こり、キトサンのたぶん > 95% は可溶性であり、siRNA と複合体を形成しないことを見出した (Mat et al., 2010, Biomacromolecules, 11: 549 554)。この多量で過剰かつ中程度のDDA (84%) のキトサンは、インビボにおいて持続的な炎症を引き起こし、かつ有害な免疫学的応答を増加させることが予想される (Jean et al., 2009, Gene Ther., 16: 1097 1110)。彼らの研究では、470 kDa の分子量を有するキトサングルタメートは、その低分子量又はキトサン塩酸塩と比較して、インビトロにおいてトランスフェクションから 24 時間後に最大の遺伝子サイレンシング効果を示した (Katas et al., 2006, J Control Release, 115: 216 225)。470 kDa の平均分子量を有するキトサングルタメートのイオンゲル化は、単純な複合体形成により形成されたキトサン siRNA ナノ粒子 (51% mRNA ノックダウン) よりも、高いサイレンシング効率 (82% mRNA ノックダウン) を示した (Katas et al., 2006, J Control Release, 115: 216 225)。
10
20

【0093】

(00110) Howardら(2006, Mol Ther., 14: 476 484)らが率いる別のグループは、鼻腔内投与経路を介して、キトサン siRNA ナノ粒子を遺伝子組み換え E G F P マウスモデルに送達した。彼らの研究について、彼らは 4 つの異なる N:P 比 (N:P 6, 33, 71, 及び 285) で、84% の DDA かつ 114 kDa のキトサンを使用した。より高い N:P 比では、250 μg / ml の低いキトサン濃度で、より小さなナノ粒子がもたらされた (N:P 6 = 223.6 nm vs N:P 3 = 181.6 nm) (Howard et al., 2006, Mol Ther., 14: 476 484)。より高いキトサン濃度 (1 mg / ml) でも同様のパターンが観察され、84% の DDA、114 の Mn、及び 33 の N:P 比を有するキトサンのナノ粒子は、製剤 84 114 285 に対する 139 nm と比較して、328 nm の平均直径を有していた (Howard et al., 2006, Mol Ther., 14: 476 484)。
30

【0094】

(00111) 彼らの予備的なインビトロでの研究から、ナノ粒子サイズは N:P 比に依存し、かつより低い N:P 比においてサイズが増加し、それは高い N:P 比が必要であることを示唆していることが示された。この知見は、本明細書に提示の結果と矛盾し、本明細書では、キトサン siRNA の複合体形成及び安定性を評価するとき、pH の重要な役割の下に実証している。彼らの知見に基づき、NIH3T3 及び H1299 細胞株において、細胞内取り込み及びサイレンシング効率がそれぞれ 36 及び 57 の高い N:P 比で測定された。36 の高い N:P 比におけるキトサン製剤は、EGFP 安定細胞株のサイレンシング効率を調査するために使用された。サイレンシング効率はそれぞれ、H1299 及び原発性腹膜マウスマクロファージにおいて、77.9% 及び 86.9% であった。N:P が 36 のキトサン製剤 84 114 のインビボでのサイレンシング効率において、1 日に 30 μg の siRNA の注入を 5 日間行った後に、未処理の対照と比較して、EGFP 遺伝子組み換えマウスモデルにおいて 43% のサイレンシング効率が達成された (Howard et al., 2006, Mol Ther., 14: 476 484)。
40

【0095】

(00112) Howardら(2009, Mol Ther., 17: 162 168) 50

) らの他のインビボ研究では、TNF mRNAを標的とした27塩基対のsiRNAを、N:P比が63でキトサン84-114と複合体化して、コラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスモデルに注射した。彼らの製剤は、TNF の血漿濃度から測定したところ、43%のサイレンシングを達成した。

【0096】

(00113) Jিら(2009, Nanotechnology, 20: 405103)は、DDA範囲が75%~85%の190kDa及び310kDaのキトサンは、siRNAのための適した送達ビヒクルであることを示唆した。上記の研究と同様に、Jিらは、Lovo細胞におけるFHL2癌遺伝子のノックダウン実験のために、50の高いN:P比でキトサン製剤を使用した。彼らの製剤は69%のmRNAノックダウンを達成した。
10

【0097】

(00114) siRNAのキトサン送達に対する最適なパラメータを特定する試みにおいて、Liуら(2007, Biomaterials, 28: 1280-1288)は、様々なDDA、Mn、及びN:P比で広範なキトサンを試験し、N:P比 > 25が効率的なサイレンシングのために必要であることを明言した。彼らはまた、N:Pが50で調製した低分子量のキトサン siRNA(10kDa)製剤は、H1299ヒト肺癌細胞において内在性のEGFPのノックダウンを示さないが、DDAが80%でより高いMn(64.8-170kDa)で調製したキトサン製剤は、45%~65%の間の範囲のより優れた遺伝子サイレンシングを示すことを見出した。最も高い遺伝子サイレンシング効率(80%)は、それぞれ114及び170kDaのMnで84%のDDA、極端に高いN:P150のキトサン/siRNAナノ粒子を用いて達成し、それは約200nmの直径を有するナノ粒子の安定形成における彼らの評価と相關していた。更に、Liуら(2007, Biomaterials, 28: 1280-1288)は、N:P比が50で抗EGFP siRNAと複合体化した95%のDDA及び9kDaのキトサンは、動的光散乱(DLS)により測定したところ、3500nmの望ましくない大きなサイズを有していることを見出した。更に、基本的なpH7.9で行われた安定性試験に対する彼らのゲルシフトアッセイによると、この特定の製剤は、50の大きさのN:P比ではsiRNAと複合体を形成しなかったと彼らは述べており、それは本明細書では技術的副作用として粒子分解がもたらされることが示された。更に、未処理の陰性対照と比較した場合、この特定の製剤はEGFPノックダウンを示さなかった。
20
30

【0098】

(00115)他の研究者によって見出された上記の結果は、本明細書に提示の新規な知見とは対照的であり、本明細書では、キトサン siRNAナノ粒子は、80%~95%の間のDDAで広範な分子量(5~200kDa)のキトサンを用いて、中程度から低度のN:P比(25未満、好ましくは5)で形成することができ、これらのナノ粒子は、以前に報告された系と比較して、高いレベルの遺伝子サイレンシング、良好な安定性、及び小さいサイズ範囲を達成する。

【0099】

(00116)キトサンコーティングされたポリ(イソヘキシリシアノアクリレート(isohexyl cyanoacrylate))(PIHCA)ナノ粒子は、異種移植侵襲性乳癌モデルにおいて抗RhoA siRNA物質を静脈内送達するために使用されてきた(Pille et al., 2006, Hum Gen Ther, 17: 1019-1026)。キトサンコーティングされたPIHCA 抗RhoA siRNAナノ粒子の投与は、癌細胞において過剰発現されたRhoAをノックダウンすることによって、インビボでの癌の侵襲性を著しく減少させた。Zhangらは、Balb/cモデルにおける呼吸器合胞体ウイルス(RSV)感染を予防及び治療するために、肺組織中のNS1タンパク質を標的としたsiRNAの新規発現のための、キトサン由来製剤であるNanogene042を研究した(Zhang et al., 2005, Nat Med, 11: 56-62)。Zhangらは、shRNA系のプラスマドを使用して、イン
40
50

ビボでの低下したウイルス価及びウイルス負荷 (viral titer load) を含わせて、N S 1 遺伝子の効率的なサイレンシング、及び R S V 感染の減衰を観察した。Nanogene 042 は、典型的な高いMWのキトサンと比較して、より高いトランスフェクション効率を示し、かつより少ない炎症を誘導した (Zhang et al., 2005, Nat Med, 11: 56-62)。しかしながら、Nanogene 042 の分子量は、記載の参考文献に開示されていない。

【0100】

(00117) 本発明の記載における目的のために、C57BL/6 (C57BL/6 NCr1) マウスモデルを、種々の実施形態の実施を可能とするために使用する。C57BL/6 マウスモデルは、Charles River 及び Research Diet によって開発された。C57BL/6 マウスモデルは、高脂肪食 (D12492) を与えると、痩せた対照と比較して、高脂肪食から 2 週間後に明らかに体重が増加し、肥満となり得る。C57BL/6 マウスモデルは、多目的研究及び高脂血症調査に使用し、高脂肪食の間の循環血液中の LDL コレステロール値を調査する (Soutschek et al., 2004, Nature, 432: 173-178; Crooke et al., 2005, J Lipid Res, 46: 872-884; Bose et al., 2008, J Nutr, 138: 1677-1683)。高脂肪食 (D12492) の脂肪は、わずか 10 kcal % の脂肪を含む対照食 D12450B の脂肪の 6 倍超に相当する。更に、高脂肪食の D12492 は、18 (mg) / kg の対照食 D12450B と比較して、300.8 (mg) / kg のコレステロールを含んでいる。従って、このような高脂肪な固体試料の供給は、肝臓での LDL の除去に対する動脈内での LDL の蓄積における不安定さをもたらすため、C57BL/6 マウスモデルにおけるアテローム性動脈硬化症の発生に至らせる。

【0101】

(00118) 本明細書の以下に記載の通り、本明細書に記載の組成物は siRNA と組み合わせると、有効な遺伝子導入ベクターとなり、市販のリポソームである Dharmatech (登録商標) と類似のインビトロでのトランスフェクション効率を達成することが見出された。更に、組成物は、DharmaTech (登録商標) と、siRNA の細胞への送達における同等の効率、及び類似のサイレンシングを達成するだけでなく、より低い毒性を有する。

【0102】

(00119) キトサン / dsODN ナノ粒子を用いた取り込み効率は、細胞型間での類似した相対的ばらつきはあるが、商業的に使用されるリポブレックス (DharmaTech (登録商標)) に匹敵するか又はより高いレベルを達成した (図 7A 及び 7B)。更に、これらの結果は以下に記載の共焦点顕微鏡データと一致している (図 8)。画像は全ての細胞株でのキトサン及び dsODN の細胞分布を示しており、それは FACS の定量的データとの定性的相関関係を示唆している。複数の細胞株をトランスフェクトし、かつ種々の siRNA を複数の細胞株に効率的に送達する記載した製剤の能力が、本明細書において実証されている (例えば、図 7A 及び 8 を参照のこと)。

【0103】

(00120) 本明細書に開示の結果は、当技術分野において以前に使用されていた N : P 比をはるかに下回る N : P 比で、効率的に siRNA を送達し、かつ特定の遺伝子をノックダウンするための、記載のキトサン系製剤の有効性を明確に示している。一般に、本明細書において使用される全ての低い N : P 比のキトサン製剤は、高いレベルの遺伝子サイレンシングを達成した。

【0104】

(00121) 本結果から、使用するキトサン製剤 (80 10 5, 80 40 5, 92 10 5, 92 40 5, 80 10 10, 80 80 5, 92 150 5, 及び 80 200 5)、及び siRNA の化学修飾の程度に応じて、45 15 6 nm の間の範囲の平均直径 (表 2) を有する球状のナノ粒子が示される (図 1 及び 2)

10

20

30

40

50

。キトサンと複合体化したd s O D Nと、未修飾s i R N A A p o B (S e q 1、S E Q I D N O : 5)と、適度に修飾されたs i R N A A p o B (S e q 2、S E Q I D N O : 6 及びS E Q I D N O : 7)との間に、ナノ粒子サイズにおける統計的な差異は認められなかった。一方で、完全に修飾されたs i R N A配列は、種々のキトサンと複合体化すると、より大きなナノ粒子が生じた。

【 0 1 0 5 】

(0 0 1 2 2) 本明細書に記載の特定の製剤から得られた結果は、得られた動的光散乱の結果と一致しており(表2)、そのため本明細書に記載の組成物及び方法の頑健性が示唆される。更に、形成したナノ粒子は2 0 0 n m未満の再現可能なサイズをもたらし、それは腎クリアランスを回避可能とする。それ故インビボにおけるトランスフェクション効率を改善し、かつ循環ナノ粒子の半減期を増加させる。
10

【 0 1 0 6 】

(0 0 1 2 3) キトサン / s i R N A の安定性を、蛍光に基づくアッセイであるR i b o g r e e n a s s a y (登録商標)を用いて評価し、複合体の不安定化後に放出されるs i R N Aを定量した。結果から、N : P比が5及び10のキトサン / s i R N Aナノ粒子は、p H 6 . 5で最大20時間安定であったことが示された。キトサン8 0 1 0 5は、他の製剤と比較した場合、最も低い安定性を示した。キトサン8 0 1 0におけるN : P比の増加によりナノ粒子の安定性の改善がもたらされた。キトサン8 0 1 0を除いて、5を超えるN : P比の増加は、ナノ粒子の安定性の増加をもたらさなかった(例えば、図4 Aを参照のこと)。
20

【 0 1 0 7 】

(0 0 1 2 4) 本明細書に記載の製剤は、明らかな細胞毒性なしで、市販のリポソームであるD h a r m a F E C T (登録商標)に匹敵する遺伝子サイレンシングのレベルを達成可能であることが実証されている。本明細書に開示の結果から、他の研究者において以前に使用されていたN : P比(N : P > 20)をはるかに下回るN : P比(N : P = 5)で、効率的にs i R N Aを送達し、かつ特定の遺伝子をノックダウンするための、記載のキトサン系製剤の有効性が明確に示された(例えば図1 1 A及び1 1 Bを参照のこと)。一般に、我々の低いN : P比のキトサン製剤の全ては、F A C Sデータを支持する高いレベルの遺伝子サイレンシングに達した(例えば図7 A及び7 Bを参照のこと)。低分子量(1 0 k D a)及び高D D A(9 2 %)のキトサンが最も効率的(図1 1及び1 2)であり、かつより小さい(図4 B)傾向があることが見出され、それはN : P比が5での特に最適な製剤を示唆するものである。
30

【 0 1 0 8 】

(0 0 1 2 5) また、アテローム性動脈硬化症の治療のために本明細書に記載の組成物は、未処理の陽性対照(以下、D と称する)と比較して、インビボでのA p o Bの血漿濃度を約30%低下させたことが記載されている(図1 3)。また、このような低下により、非アテローム硬化性の動物群の陰性対照におけるA p o B血清濃度と同様のA p o B血清濃度がもたらされ、それ故、治療域にあることが実証される。また、本明細書において、アテローム性動脈硬化症の治療のために本明細書に記載の組成物は、明らかないかなる毒性なしに、L D Lコレステロールの20%の低下をもたらしたことが実証されている(図1 4)。また、s i R N Aを含むキトサン系の治療用ナノ複合体(T N C)は、血清中の正常A L T / A S T濃度により実証されるように如何なる肝臓毒性ももたらさないことが実証されている。
40

【 0 1 0 9 】

(0 0 1 2 6) 更に、T N Cで処理した動物肝臓におけるコレステロールの蓄積は著しく減少し、T N C処理は注射から3週間後の肝臓でのコレステロールの蓄積において治療効果を有することが実証されている(図1 5)。同様に、キトサン系のT N Cは、本明細書の他の実施形態に示されるように、毒性なしで肝臓内に急速に吸収される一過性の免疫細胞の浸潤を誘導した(図1 6)。肝臓毒性の欠如及び免疫細胞浸潤の急速な吸収は、更により高いA p o B及びL D L Cの血漿における減少を達成するために、注射量を増加
50

できる可能性を示した。

【0110】

(00127) 更に、ApoBを標的にしたキトサンを有さない裸のsiRNAは、強力な炎症反応を誘導するため、非複合化形態での治療的使用においてそれらの投薬及び可能性が制限されることが記載されている。1mg/kgの抗ApoB siRNAの試験用量でのTNC処理動物における毒性/炎症性の欠如は、ApoBの血漿濃度を35%減少させるそれらの能力と合わせて、最大耐量(MTD)を決定し、かつより高いApoBの血漿中の減少を達成するために、用量反応研究におけるそれらの重要性及び潜在的な使用を示唆している。

【0111】

(00128) TNC処理動物は、3番目かつ最後の注射後から少なくとも8週間、減少したApoBの血漿濃度を有していたことが実証される。低いN:Pのキトサン系TNCにおけるApoBの血漿濃度の減少は、明らかないかなる炎症又は肝臓毒性を有さず、C1動物群での最後の注射後から7週間を超えて維持された(図13及び16)。これらの結果は、特に有望なTNC処理における長命な特性、及び効果的な制御された放出特性を示唆している。

【0112】

(00129) 従って、本明細書に記載の低いN:PのキトサンApoB siRNAのTNCは、1mg/kgの注射量で、ApoBの血漿濃度の~35%の低下、及びLDL/VLDLコレステロール減少における~20%の低下を達成したことが本明細書において開示される(図13及び14)。これらの結果から、効果的な治療結果が得られたことが示唆される。なぜなら、ApoB siRNAのためのリポソーム送達システムを用いた、以前に公開されて特許請求された成功結果は、同様か又はより高いApoB/LDL VLDLコレステロールの減少を達成するためにより多くの用量を必要とし、これらの用量は肝臓毒性並びにALT及びASTの濃度の増加に関連するためである(Zimmermann et al., 2006, Nature, 111: 114; Soutschek et al., 2004, Nature, 432: 173-178)。例えば、脂質製剤(SNALP)と一緒に5mgkg⁻¹のsiRNAの使用は、ApoBの血漿濃度において73%の低下を達成した(Zimmermann et al., 2006, Nature, 111: 114)。この5倍高い注射濃度は、本発明の結果と比較して2.5倍高いApoBの血漿における減少を達成した。更に、Merck社によって開発された第二世代の脂質LNP OCD(LNP201)を用いた、Ldlr-/-、Cetp-/-マウスモデルにおけるApoBを標的としたsiRNAの使用により、3mgkg⁻¹にてLDLの約70%の減少が示された(Tadini Strappes et al., 2011, J Lipid Res, 52: 1084-1097)。更に、使用されるsiRNA配列に依存して、ApoBの血漿濃度の68%及び31%の低下を達成するために、50mgkg⁻¹の裸のコレステロール修飾siRNAが必要であった(Soutschek et al., 2004, Nature, 173: 178)。更に、これらの研究は、アテローム性動脈硬化症を模倣するためにC57BL/6マウス群に試験終了まで高脂肪食を与えた包含の研究とは逆に、標準の固形飼料(脂肪分制御)を与えた正常なC57BL/6マウスで実施されていた。

【0113】

(00130) 更に、現在のところ第III相臨床試験にある、抗ApoBアンチセンスオリゴヌクレオチド(AOS)ISIS 147764の腹腔内投与では、高脂肪が与えられたC57BL/6に対して、少なくとも25mgkg⁻¹の週2回の投与が必要とされ、治療から6~8週間後に55%のApoBの血漿濃度の減少を達成した。更に、Crookeらは、6~8週間の間、週2回の50mgkg⁻¹の投与後に、血漿コレステロールが正常に戻ったことを報告した(Crooke et al., 2005, J Lipid Res, 46: 872-884)。ISIS 147764が血漿中のコレステロールの減少に及ぼす影響は、治療の4週目に観察された(50mgkg⁻¹ 2回/週)。

10

20

30

40

50

【0114】

(00131) 本明細書に記載の組成物及び方法は、従来技術と比較して、比較的低用量(1 mg kg^{-1})にてapoBの減少における効率を明確に実証する。更に、apoBの減少は常に用量依存性であることが示されているので、本発明の開示及び開示のTNCを用いて用量を増加させることは、血漿中のapoB及びLDL/VLDL-Cの減少の強化につながることが本明細書から明確になる(Zimmermann et al., 2006, *Nature*, 441: 111-114; Soutschek et al., 2004, *Nature*, 432: 173-178; Crooke et al., 2005, *J Lipid Res*, 46: 872-884; 及び、Crooke, 2005, *Expert Opin Biol Ther*, 5: 907-917)。

10

【0115】

(00132) 本発明の記載では、糖尿病、並びに関連した状態及び症状を治療するための方法を提供する。このような糖尿病及び関連する状態としては、インスリン依存性糖尿病(I型糖尿病)、インスリン非依存性糖尿病(II型糖尿病)、インスリン抵抗性、高インスリン血症、及び糖尿病誘発性高血圧が挙げられる。他の糖尿病に関連する状態としては、肥満、並びに血管、目、腎臓、神経、自律神経系、皮膚、結合組織、及び免疫系の損傷が挙げられる。本明細書に記載の組成物は、単独で、又はインスリン及び/又は血糖降下化合物と組み合わせて使用することができる。

【0116】

(00133) 本発明の記載では、癌を治療するための方法を提供する。このような癌としては、乳癌、神経膠腫、大腸癌、肺癌、小細胞肺癌、胃癌、肝臓癌、血液癌、骨癌、肺臓癌、皮膚癌、頭部又は頸部の癌、皮膚又は眼内の黒色腫、子宮肉腫、卵巣癌、直腸又は結腸直腸の癌、肛門癌、結腸癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、外陰癌、扁平上皮癌、腔癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織腫瘍、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性又は急性の白血病、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓癌、尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中枢神経系腫瘍、神経膠腫、星状細胞腫、多形性膠芽腫、中枢神経系原発リンパ腫、骨髄腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、ブドウ膜黒色腫、精巣癌、口腔癌、咽頭癌、小児腫瘍、白血病、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経膠腫、横紋筋芽細胞腫、及び肉腫が挙げられる。

20

【0117】

(00134) MDRを回避する1つの手法は、Pgpの輸送活性を阻害する、Pgp調節物質又は拮抗薬化合物の使用である。しかしながら、それらの化学療法剤及び毒性との薬物動態学的相互作用により、臨床でのそれらの使用は制限されている。あるいは、Pgpの発現はRNA干渉(RNAi)によって阻害することができる。化学調節剤とは異なり、この技術は、Pgpの下方制御及び耐性逆転に対するより特異的な手法を提供することができる。

30

【0118】

(00135) siRNA又はshRNAを用いた様々な研究により、多剤耐性表現型を克服するためのRNAiの使用の可能性が実証されてきた。Pgp阻害によるRNAi介性の耐性逆転の原理の証明を示す最初の研究は、2003年に公表された(Nieh et al., 2003, *FEBS Letters* 545(2-3): 144-150)及び(Wu et al., 2003, *Cancer Research* 63(7): 1515)。両研究は、siRNAを用いた過渡的な手法を使用して、様々な細胞モデルにおいて多剤耐性表現型を調節した。Haoらは200nMのsiRNAを用いて、高耐性MDR細胞株に対して、MCF7/ADR及びA2780DX5においてPgp濃度を65%抑制することができた。更に、彼らは、MDR1標的siRNAは、Pgp輸送可能薬物(ドキソルビシン)に対する耐性を逆転したが、非Pgp基質であるヒドロキシウレアに対する感受性には影響しないことを示した。これらのデータから、siRNAによって介されるPgp発現のサイレンシングは特異的であることが示唆される。しかしながら、90%近くの最も顕著な一過性のMDR逆転は、より低い濃

40

50

度(100nM)のsiRNAの使用にもかかわらず、膵臓癌由来の細胞株(EPP85181RDB)及び胃癌細胞(EPG85257RDB)において達成された(Nieth et al., 2003, FEBS letters 545(23):144-150)。最近、Donmezら(2011, Biomedicine and Pharmacotherapy 65(2):85-89)は、濃度は20nMと低いが、ドキソルビシン耐性MCF7細胞においてMDR1の89%の遺伝子サイレンシング活性を示した。これらのデータは、RNAiの有効性がsiRNA配列依存的、及び細胞株依存的であり得ることを示している。

【0119】

(00136) siRNAに加えて、安定した抗MDR1/Pgp shRNA発現ベクターは、MDR表現型を調節するために使用されていた。ある研究では、shRNA発現は、パクリタキセル耐性のSKOV3TR及びOVCAR8TRの卵巣癌細胞株でのMDR1/Pgpの下方制御において、siRNAと比較して同様の効率を有していた(Duan et al., 2004, Molecular cancer therapeutics 3(7):833)。更に、Stegeら(2004, Cancer gene therapy 11(11):699-706)は、shRNA発現ベクター(psiRNA/MDRA)を非常に高い薬物耐性を有するヒト胃癌細胞株のEPG85257RDBへ導入することにより、Pgp発現の完全な逆転を報告した。同様に、Yagueら(2004, Gene therapy 11(14):1170-1174)は、shRNA発現ベクターであるpSUPERを導入することにより、K562白血病細胞におけるドキソルビシン耐性の完全な逆転を観察した。同様の手法を用いて、Shiら(2006, Cancer biology & therapy 5(1):39-47)はまた、ヒト扁平上皮癌細胞株(KBv200)において、MDR1 siRNA発現力セット及びEGFP発現遺伝子を含む新規ベクターから発現されるshRNAの内因性発現により誘導されるMDR1/Pgp遺伝子の発現及び機能において安定した下方制御を示した。

【0120】

(00137) 上記の研究の全てにおいて、Lipofectamine 2000(Li et al., 2006, European journal of pharmacology, 536(1):93-97)及び(Donmez, Y. and U.Gunduz, 2011, Biomedicine & Pharmacotherapy 65(2):85-89)、並びにoligofectamine(Nieth et al., 2003, FEBS letters 545(23):144-150; Wu et al., 2003, Cancer research 63(7):1515; Stierle et al., 2005, Biochemical pharmacology 70(10):1424-1430; 及び、Stierle et al., 2007, Biochimie 89(8):1033-1036)の2つの市販のリポソームが使用されていた。これまでに、キトサンはMDR1遺伝子を標的とするshRNAをコードするプラスミドを送達するために使用してきた。この研究では、ナノ粒子は、複合コアセルベーションにより形成された(Yang et al., 2009, J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. Apr; 29(2):239-42)。当該研究で報告された最大のmRNAの減少は52.6%であり、最大61.3%のパクリタキセル化学療法抵抗性における時間依存的な逆転を含むものであった。抗Pgp siRNAの送達におけるキトサンの使用はこれまでのところ報告書に記載されていない。

【0121】

(00138) 本明細書に記載の組成物は、単独で、又は、例えば、アシビシン；アクラルビシン；塩酸アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン(Ambomycin)；酢酸アメタントロン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アス

10

20

30

40

40

50

ペルリン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマスタッフ；ベンゾデパ；ビカルタミド；塩酸ビサントレン；ビスナファイドジメシレート(Bisnafide Dimesylate)；ビゼレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナールナトリウム；プロピリミン；ブルスファン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルムスチン；塩酸カルビシン；カルゼレシン；セデフィンゴール；クロラムプシル；シロレマイシン(Cirolemycin)；シスプラチン；クラドリビン；メシル酸クリスナトール；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルビシン；デシタбин；デキソルマプラチン；デザグアニン；メシル酸デザグアニン；ジアジクオン；ドセタキセル；ドキソルビシン；塩酸ドキソルビシン；ドロロキシフェン；クエン酸ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エダトレキセート；塩酸エフロルニチン；エルサミトルシン；エンロプラチン；エンプロマート；エピプロピジン；塩酸エピルビシン；エルプロゾール；塩酸エソルビシン；エストラムスチン；リン酸エストラムスチンナトリウム；エタニダゾール；エトポシド；リン酸エトボシド；エトブリン；塩酸ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウリジン；リン酸フルダラビン；フルオロウラシル；フルロシタビン；ホスキドン；ホストリエシンナトリウム；ゲムシタビン；塩酸ゲムシタビン；ヒドロキシ尿素；塩酸イダルビシン；イホスファミド；イルモホシン；インターフェロン
2a；インターフェロン 2b；インターフェロン n1；インターフェロン nn
3；インターフェロン 1a；インターフェロン 1b；イプロプラチン；塩酸イリノテカン；酢酸ランレオチド；レトロゾール；酢酸リュープロリド；塩酸リアロゾール；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；塩酸ロソキサントロン；マソプロコール；メイタンシン；塩酸メクロレタミン；酢酸メゲストロール；酢酸メレンゲストロール；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メトレキサート；メトレキサートナトリウム；メトブリン；メツレデパ；ミチンドミド；ミトカルシン(Mitocarcin)；ミトクロミン；ミトギリン；ミトマルシン(Mitomalcin)；ミトマイシン；ミトスペル(Mitosper)；ミタン；塩酸ミトキサントロン；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマプラチン；オキシスラン；パクリタキセル；ペガスパルガーゼ；ペリオマイシン(Peliomycin)；ペントアムスチン(Pentamustine)；硫酸ペプロマイシン；ペルホスファミド；ピボブロマン；ピボスルファン；塩酸ピロキサントロン；プリカマイシン；プロメスタン(Plomestane)；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニムスチン；塩酸プロカルバジン；ピューロマイシン；塩酸ピューロマイシン；ピラゾフリン；リボプリン；ログレチミド；サフィンゴール；塩酸サフィンゴール；セムスチン；シムトラゼン；スバルホサートナトリウム；スバルソマイシン；塩酸スピログルマニウム；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；スロフェヌル；タリソマイシン；タキソール；タキソテール；テコガランナトリウム；テガフル；塩酸テロキサントロン；テモボルフィン；テニポシド；テロキシリコン(Terroxirone)；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チアゾフリン；チラパザミン；塩酸トポテカン；クエン酸トレミフェン；酢酸トレストロン(Trestolone Acetate)；リン酸トリシリビン；トリメトレキサート；グルクロン酸トリメトレキサート；トリプトレリン；塩酸ツプロゾール；ウラシルマスター；ウレデパ；バブレオチド；ベルテポルフィン；硫酸ビンプラスチン；硫酸ビンクリスチン；ビンデシン；硫酸ビンデシン；硫酸ビネピジン；硫酸ビングリシナート；硫酸ビンロイロシン(Vinleurosine Sulfate)；酒石酸ビノレルビン；硫酸ビンロシジン(Vinrosidine Sulfate)；硫酸ビンゾリジン；ボロゾール；ゼニプラチン；ジノスタチン；又は塩酸ゾルビシンなどの他の抗癌化合物と組み合わせて使用することができる。

【0122】

(00139)他の抗癌剤としては、20epi1,25ジヒドロキシリタミンD3；5エチニルウラシル；アビラテロン；アクラルビシン；アシルフルベン；アデシペノール；アドゼレシン；アルデスロイキン；ALL-TKアンタゴニスト；アルトレタミ

10

20

30

40

50

ン；アンバムスチン；アミドックス；アミフォスチン；アミノレブリン酸；アムルビシン；アムサクリン；アナグレリド；アナストロゾール；アンドログラホリド；血管新生阻害剤；アンタゴニストD；アンタゴニストG；アンタレリックス；抗背側化形態形成タンパク質 1 (anti dorsalizing morphogenetic protein 1)；抗アンドロゲン、前立腺癌；抗エストロゲン；アンチネオプラスチック；アンチセンスオリゴヌクレオチド；アフィジコリングリシナート；アポトーシス遺伝子調節物質；アポトーシス調節因子；アプリン酸；ara CDP DL PTBA；アルギニンデアミナーゼ；アスラクリン；アタメスタン；アトリムスチン；アキシナスタチン1；アキシナスタチン2；アキシナスタチン3；アザセトロン；アザトキシン；アザチロシン；バッカチンIII誘導体；バラノール；バチマstattt；BCR/ABLアンタゴニスト；ベンゾクロリン；ベンゾイルスタウロスボリン；ベータラクタム誘導体；ベータアレチン；ベタクラマイシンB；ベツリン酸；bFGF阻害剤；ビカルタミド；ビサントレン；ビスアジリジニルスペルミン (bisaziridinyl spermine)；ビスナフィド；ビストラテンA；ビゼレシン；ブレフレート (breflate)；プロピリミン；ブドチタン；ブチオニンスルホキシミン；カルシポトリオール；カルフォスチンC；カンプトテシン誘導体；カナリアポックスIL-2；カペシタбин；カルボキサミド
 アミノトリニアゾール；カルボキシアミドトリニアゾール；Carrest M3；CARN 700；軟骨由来阻害剤；カルゼレシン；カゼインキナーゼ阻害剤 (ICOS)；カスタノスペルミン；セクロビンB；セトロレリクス；クロリン；クロロキノキサリンスルホンアミド；シカプロスト；シスポルフィリン；クラドリビン；クロミフェン類似体；クロトリマゾール；コリスマイシンA；コリスマイシンB；コンプレタスタチンA4；コンプレタスタチン類似体；コナゲニン；クランベシジン816；クリスナトール；クリプトフィシン8；クリプトフィシンA誘導体；クラシンA；シクロpentanthraquinone；シクロプラタム (cyclopplatam)；シペマイシン；シタラビンオクホスファート；細胞溶解因子；サイトスタチン；ダクリキシマブ (dacliximab)；デシタбин；デヒドロジデムニンB；デスロレリン；デキシホスファミド (dexifosfamide)；デクスラゾキサン；デクスペラパミル；ジアジクオン；ジデムニンB；ジドックス；ジエチルノルスペルミン；ジヒドロ-5アザシチジン；ジヒドロタキソール、9；ジオキサマイシン；ジフェニルスピロムスチン；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカルマイシンSA；エブセレン；エコムスチン；エデルホシン；エドレコロマブ；エフロルニチン；エレメン (elemente)；エミテール；エピルビシン；エプリステリド；エストラムスチン類似体；エストロゲンアゴニスト；エストロゲンアンタゴニスト；エタニダゾール；リン酸エトボシド；エキセメスタン；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム；フィナステリド；フラボピリドール；フレゼラスチン；フルアステロン；フルダラビン；塩酸フルオロダウノルビシン (fluorodauramicin hydrochloride)；ホルフェニメックス；ホルメスタン；ホストリエシン；ホテムスチン；ガドリニウムテキサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタбин；ガニレリクス；ゼラチナーゼ阻害剤；ゲムシタбин；グルタチオン阻害剤；ヘプスルファム；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ヒペリシン；イバンドロン酸；イダルビシン；イドキシフェン；イドラマントン；イルモホシン；イロマstattt；イミダゾアクリドン；イミキモド；免疫刺激ペプチド；インスリン様成長因子 1受容体阻害剤；インターフェロンアゴニスト；インターフェロン；インターロイキン；イオベングアン；ヨードドキソルビシン；イポメアノール、4；イリノテカン；イロプラクト (iroplact)；イルソグラジン；イソベンガゾール (isobengazole)；イソホモハリコンドリンB；イタセトロン；ジャスプラキノリド；カハラリドF；ラメラリン Nトリニアセテート；ランレオチド；レイナマイシン；レノグラスチム；硫酸レンチナン；レプトルスタチン；レトロゾール；白血病阻害因子；白血球アルファインターフェロン；ロイプロリド+エストロゲン+プログステロン；リューポロレリン；レバミゾール；リアロゾール；直鎖ポリアミン類似体；親油性二糖ペプチド；

10

20

30

40

50

親油性白金化合物；リソクリナミド7 (l i s s o c l i n a m i d e 7) ；ロバプラチニン；ロンブリシン；ロメトレキソール；ロニダミン；ロソキサントロン；ロバスタチン；ロキソリビン；ルルトテカン；ルテチウムテキサフィリン；リソフィリン；溶解性ペプチド；マイタンシン；マンノスタチンA；マリマstattt；マソプロコール；マスピニン；マトリリシン阻害剤；マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤；メノガリル；メルバロン；メテレリン；メチオニナーゼ；メトクロプラミド；M I F 阻害剤；ミフェブリストン；ミルテホシン；ミリモスチム；ミスマッチニ本鎖RNA；ミトグアゾン；ミトラクトール；ミトマイシン類似体；ミトナフィド；ミトトキシン (m i t o t o x i n) 線維芽細胞成長因子 サポリン；ミトキサントロン；モファロテン；モルグラモスチム；モノクローナル抗体；ヒト絨毛性ゴナドトロピン；モノホスホリルリピドA + ミオバクテリウム細胞壁sk；モピダモール；多剤耐性遺伝子阻害剤；多発性腫瘍抑制因子1に基づく治療；マスター抗癌化合物；ミカペルオキシドB；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリアポロン；N アセチルジナリン；N 置換ベンズアミド；ナファレリン；ナグレスチップ (n a g r e s t i p) ；ナロキソン+ペンタゾシン；ナパビン (n a p a v i n) ；ナフテルピン；ナルトグラスチム；ネダプラチニン；ネモルビシン；ネリドロン酸；中性エンドペチダーゼ；ニルタミド；ニサマイシン；一酸化窒素調節物質；窒素酸化物酸化防止剤；ニトルリン (n i t r u l l y n) ；O 6 ベンジルグアニン；オクトレオチド；オキセノン；オリゴヌクレオチド；オナブリストン；オンダンセトロン；オンダンセトロン；オラシン；経口サイトカイン誘発剤；オルマプラチニン；オサテロン；オキサリプラチニン；オキサウノマイシン；パクリタキセル類似体；パクリタキセル誘導体；パラウアミン；パルミトイリゾキシン；パミドロン酸；パナキシトリオール；パノミフェン；バラバクチン；パゼリップチニン；ペガスパルガーゼ；ペルデシン；ペントサンポリ硫酸ナトリウム；ペントスタチニン；ペントロゾール (p e n t r o z o l e) ；ペルフルブロン；ペルホスファミド；ペリリルアルコール；フェナジノマイシン；フェニル酢酸；ホスファターゼ阻害剤；ピシバニール；塩酸ピロカルピン；ピラルビシン；ピリトレキシム；プラセチニンA (p l a c e t i n A) ；プラセチニンB (p l a c e t i n B) ；プラスミノーゲン活性化因子阻害剤；白金錯体；白金化合物；白金 トリアミン錯体；ポルフィミーナトリウム；ポルフィロマイシン；プロピルビス アクリドン；プロスタグラニジンJ2；プロテアソーム阻害剤；タンパク質Aに基づいた免疫調節物質；タンパク質キナーゼC阻害剤；タンパク質キナーゼC阻害剤、微細藻類；タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；ブリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤；ブルプリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシリ化ヘモグロビンポリオキシエチレン結合体；r a f アンタゴニスト；ラルチトレキセド；ラモセトロン；r a s ファルネシルタンパク質転移酵素阻害剤；r a s 阻害剤；r a s G A P 阻害剤；脱メチル化レテリップチニン；レニウムR e 1 8 6 エチドロネート；リゾキシン；リボザイム；R I I レチナミド；ログレチミド；ロヒツキン；ロムルチド；ロキニメックス；ルビギノンB1；ルボキシル；サフィンゴール；サイントピン；S a r C N U ；サルコフィトールA；サルグラモスチム；S d i 1 模倣剤；セムスチン；老化由来阻害剤1；センスオリゴヌクレオチド；シグナル伝達阻害剤；シグナル伝達調節物質；単鎖抗原結合タンパク質；シゾフィラン；ソブゾキサン；ボロカブテイトナトリウム；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール (s o l v e r o l) ；ソマトメジン結合タンパク質；ソネルミン (s o n e r m i n) ；スバルホス酸；スピカマイシンD；スピロムスチン；スプレノペンチニン；スponギスタチニン1；スクアラミン；幹細胞阻害剤；幹細胞分裂阻害剤；スチピアミド；ストロメリシン阻害剤；スルフィノシン；超活性血管作動性腸管ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ (s u r a d i s t a) ；スラミン；スワインソニン；合成グリコサミノグリカン；タリムスチン；タモキシフェンメチオジド；タウロムスチン；タザロテン；テコガランナトリウム；テガフル；テルラピリリウム；テロメラーゼ阻害剤；テモポルフィン；テモゾロミド；テニポシド；テトラクロロデカオキシド；テトラゾミニン；サリプラスチニン (t h a l i b l a s t i n e) ；サリドマイド；チオコラリン；トロンボポエチン；トロンボポエチン模倣剤；チマルファシン；サイモポエチン受容体アゴニスト；チモトリナン；甲状腺刺激ホルモン；スズエチルエチオブルプリン (t i n 10
20
30
40
50

ethyl etiopurpurin) ; チラバザミン ; チタノセンジクロリド ; トポテカン ; トブセンチン ; トレミフェン ; 全能性幹細胞因子 ; 翻訳阻害剤 ; トレチノイン ; トリアセチルウリジン ; トリシリビン ; トリメトレキサート ; トリプトレリン ; トロピセトロン ; ツロステリド ; チロシンキナーゼ阻害剤 ; チルホスチン ; UBC 阻害剤 ; ウベニメクス ; 尿生殖洞由来増殖阻害因子 ; ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト ; バブレオチド ; バリオリン B ; ベクター系 ; 赤血球遺伝子治療 ; ベラレソール ; ベラミン ; ベルジン ; ベルテポルフィン ; ビノレルビン ; ビンキサルチン (vinxalantine) ; ビタキシン ; ボロゾール ; ザノテロン ; ゼニプラチン ; ジラスコルブ ; 及びジノスタチンスマラマー、が挙げられる。

【0123】

10

(00140) 抗癌補助増強化合物には、三環系抗うつ剤（例えば、イミプラミン、デシプラミン、アミトリプチリン、クロミプラミン、トリミプラミン、ドキセピン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、アモキサピン、及びマプロチリン）；非三環系抗うつ剤（例えば、セルトラリン、トラゾドン、及びシタロプラム）；Ca⁺⁺アンタゴニスト（例えば、ベラパミル、ニフェジピン、ニトレンジピン、及びカロベリン）；カルモジュリン阻害剤（例えば、プレニラミン、トリフルオロペラジン、及びクロミプラミン）；アムホテリシン B；トリパラノール類似体（例えば、タモキシフェン）；抗不整脈薬（例えば、キニジン）；抗高血圧薬（例えば、レスルビン）；チオール枯渴剤（Thiol depletor）（例えば、ブチオニン及びスルホキシイミン）、並びに多剤耐性低減化合物、例えば Crema phor EL がある。

20

【0124】

(00141) 本発明の目的のために併用療法において有用である他の化合物としては、抗増殖化合物、ピリトレキシムイセチオネート (Pirithrexim Isethionate)；抗前立腺肥大化合物、シトグルシド (Sitoluside)；良性前立腺過形成治療化合物、塩酸タムスロシン；前立腺成長阻害剤、ペントモン；放射性化合物、例えば、フィブリノーゲン I 125、フルデオキシグルコース F 18、フルオロドーパ F 18、インスリン I 125、インスリン I 131、ヨーベングアン I 123、ヨージパミドナトリウム I 131、ヨードアンチピリン I 131、ヨードコレステロール I 131、ヨード馬尿酸ナトリウム I 123、ヨード馬尿酸ナトリウム I 125、ヨード馬尿酸ナトリウム I 131、ヨードピラセト I 125、ヨードピラセト I 131、塩酸イオフェタミン I 123、ヨーメチン I 125、ヨーメチン I 131、ヨータラム酸ナトリウム I 125、ヨータラム酸ナトリウム I 131、ヨーチロシン I 131、リオチロニン I 125、リオチロニン I 131、酢酸メリソプロール Hg 197、酢酸メリソプロール Hg 203、メリソプロール Hg 197、セレノメチオニン Se 75、テクネチウム Tc 99m 三硫化アンチモンコロイド、テクネチウム Tc 99m ビシセート、テクネチウム Tc 99m ジソフェニン、テクネチウム Tc 99m エチドロネート、テクネチウム Tc 99m エキサメタジム、テクネチウム Tc 99m フリホスミニン、テクネチウム Tc 99m グルセブート、テクネチウム Tc 99m リドフェニン、テクネチウム Tc 99m メブロフェニン、テクネチウム Tc 99m メドロネート、テクネチウム Tc 99m メドロネートニナトリウム、テクネチウム Tc 99m メルチアジド、テクネチウム Tc 99m オキシドロネート、テクネチウム Tc 99m ペンテテート、テクネチウム Tc 99m ペンテテートカルシウム三ナトリウム、テクネチウム Tc 99m セスタミビ、テクネチウム Tc 99m シボロキシム、テクネチウム Tc 99m サクシマー、テクネチウム Tc 99m 硫黄コロイド、テクネチウム Tc 99m テボロキシム、テクネチウム Tc 99m テトロホスミニン、テクネチウム Tc 99m チアチド、チロキシン I 125、チロキシン I 131、トルポビドン I 131、トリオレイン I 125、及びトリオレイン I 131、が挙げられる。

30

【0125】

40

(00142) 本明細書で使用するとき、「治療 (treatment 及び treating)」は、糖尿病並びに関連する状態及び症状を予防、抑制、及び軽減することを含む。治療は、本明細書に記載の組成物の治療上有効な量を投与することによって行うこと

50

ができる。他の例では、治療は、インスリン及び本明細書に記載の組成物の組み合わせにおける治療上有効な量を同時に投与することによって行うことができる。更に他の例では、治療される糖尿病及び関連状態が、ⅠⅠ型糖尿病、インスリン抵抗性、高インスリン血症、糖尿病誘発性高血圧、肥満、又は血管、眼、腎臓、神経、自律神経系、皮膚、結合組織、若しくは免疫系の損傷である場合、治療は、血糖降下化合物及び本明細書に記載の組成物の組み合わせにおける治療上有効な量を同時に投与することを含み得る。

【0126】

(00143) 化学修飾を含むキトサンの例としては、(i) 核酸又はオリゴヌクレオチドと複合体を形成する、キチン及び/又はキトサンと共有結合可能な、又はキトサン系化合物とイオン的又は疎水的に結合可能な、特異的又は非特異的な細胞標的部、及び(ii)、キチン及びキトサンの物理的、化学的、又は生理学的な特性を変化させるのに役立つ、キチン及びキトサンの様々な誘導体又は修飾体、を有するキトサン系化合物がある。このような修飾キトサンの例は、特異的又は非特異的な標的リガンド、膜透過剤、亜細胞局在性成分、エンドソーム分解(溶解)剤、核局在シグナル、コロイド安定化剤、血中の長い循環半減期を促進する薬剤、化学誘導体、例えば塩、Oアセチル化及びNアセチル化誘導体などを有するキトサン系化合物である。キトサンの化学修飾のためのいくつかの部位には: C₂(NH-CO-CH₃又はNH₂)、C₃(OH)、又はC₆(CH₂OH)がある。

10

【0127】

(00144) 本明細書に記載の組成物は、効果的な制御放出特性を有する好適な薬物送達システムである。本発明の組成物は、限定されるものではないが、Mirus社のTransit TKO(登録商標)親油性試薬、Lipofection(登録商標)、Lipofectamine(登録商標)、Cellflection(登録商標)、ポリカチオン(例えばポリリジン)、又はリポソームなどの好適な送達剤との同時投与など、あらゆる周知の併用療法によって投与することができる。

20

【0128】

(00145) 本明細書で使用するとき、「同時投与(concurrent administration及びconcurrently administering)」は、本明細書に記載の組成物、及びインスリン及び/又は血糖降下化合物を混合物で、例えば医薬組成物で、又は別々の製剤、例として、同時に、連続的に、又は異なる時間に投与する別々の医薬組成物として、投与することを含む。

30

【0129】

(00146) 好適な血糖降下化合物としては、例えば、メトホルミン、アカルボース、アセトヘキサミド、グリメピリド、トラザミド、グリビジド、グリブリド、トルブタミド、クロルプロパミド、チアゾリジンジオン、アルファグルコシダーゼ阻害剤、ビグアニジン誘導体、及びトログリタゾン、並びにこれらの混合物が挙げられる。

【0130】

(00147) 本明細書に記載の組成物の投与は、皮下、筋肉内、皮内、乳房内、静脈内、及び当該分野で周知のその他の投与方法を含む、非経口投与とすることができる。

40

【0131】

(00148) 本発明は、以下の実施例を参照することでより容易に理解されるであろう。

【実施例1】

【0132】

キトサン/dsODN又はsiRNA系のナノ粒子製剤の調製

(00149) 超高純度キトサン試料は、タンパク質、細菌内毒素、有害金属、無機及び有機不純物を含む汚染物質を除去する品質管理製造工程により製造した。全てのキトサンは、50EU/g未満の細菌内毒素を有した。キトサンは、92%及び80%の脱アセチル化度を有するよう選択した(表1)。これらのキトサンを、不均一脱アセチル化により製造し、アセチル基はランダム分布ではなくブロック分布で得られた。キトサンは、以

50

前に記載されているように (Lavertu et al., 2006, Biomaterials, 27: 4815–4824; Lavertu et al., 2003, J Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32: 1149–1158) 亜硝酸を使用して化学的に分解し、10 kDa、40 kDa 及び 80 kDa の特定の分子量を得て、10 kDa、40 kDa のキトサンは両方とも 92% 及び 80% の DDA であり、80 kDa のキトサンは 80% の DDA であった (表 1)。

【0133】

【表 1】

キトサンの脱アセチル化度 (DDA)、平均分子量 (Mn)、多分散指数 (PDI)

| | 実験 | キトサン | DDA | Mn (kDa) | Mw | PDI |
|----------------|---------------------------------------|-----------|------|-------------|--------|-------|
| RecQL1 | 共焦点顕微鏡法 | Rho-92-10 | 92.7 | 10 | 14 | 1.4 |
| RecQL1 | DLS、ESEM 、保護、安定性アッセイ、FACS 、qPCR | 92-10 | 91.7 | 7.1 | 10.08 | 1.427 |
| | | 80-40 | 82.5 | 38.37 | 53.4 | 1.392 |
| | | 80-10 | 84.4 | 10.82 | 14.525 | 1.343 |
| DDP-IV | 酵素試験 | 92-10 | 92 | 7.46 | 9.32 | 1.25 |
| | | 80-10 | 80 | 12.40 | 22.41 | 1.80 |
| | | 80-80 | 80.0 | 93.8 | 187.6 | 2.0 |
| ApoB DDP-IV | 保護アッセイ、FACS、qPCR 、インビボ | 92-10 | 92.2 | 8.501 | 12.645 | 1.494 |
| | | 80-80 | 80.8 | 71.535 | 118.03 | 1.65 |
| | | 80-10 | 84.4 | 10.820 | 14.525 | 1.343 |
| ApoB DDP-IV | 共焦点顕微鏡法 | Rho-92-10 | 92.7 | 10 | 14 | 1.4 |
| ApoB DDP-IV | 安定性アッセイ、 DLS、ESEM | 92-10 | 91.7 | 7.1 | 10.08 | 1.427 |
| | | 80-80 | 80.0 | 93.8 | 187.6 | 2.0 |
| | | 80-10 | 80 | 12.40 | 22.41 | 1.80 |
| | | 80-10 | 84.4 | 10.820 | 14.525 | 1.343 |
| | | 80-40-5 | 82.5 | 38.375 | 53.410 | 1.392 |
| | | 92-40-5 | 92.7 | 60.6 | 37.9 | 1.6 |

【0134】

(00150) DPP IV 遺伝子を標的とする低分子干渉 RNA は、Dharmacon 社 (Thermo scientific 社、Dharmacon RNAi Technologies、米国) から購入した。これらの siRNA のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、2 個のヌクレオチド (UU) の 3' オーバーハングを有するよう合成する。候補は、DPP IV 配列を標的とする 4 つの配列 (DPP IV Seq 1: CACUCUAACUGAUUACUUA, SEQ ID NO: 1; DPP IV Seq 2: UAGCAUAUGCCCCAAUUUUA, SEQ ID NO: 2; DPP IV Seq 3: CAAGGUUGAGUACCUCUUA, SEQ ID NO: 3; DPP IV Seq 4: UAUAGUAGCUAGCUUUGAU, SEQ ID NO: 4) のプールにあった。ApoB 標的 siRNA 配列は、Dharmacon 社からの 2 ACE RNA 化学により注文合成された (ApoB Seq 1: GUCAUCAACA CUGAAUACCAAU, アンチセンス鎖は、2 個のヌクレオチド (AC) の 3' オ

10

20

30

40

50

ーバーハングを有するよう合成される), SEQ ID NO: 5; ApoB Seq 2(センス): 5' CUC UCA CAU ACA AUU GAA AdTdT3', SEQ ID NO: 7; ApoB seq 2(アンチセンス) 5' UUU CAA UUG UAU GUG AGA GUUoUoU3' (oU oU) = 2' O メチル ウリジンオーバーハング, SEQ ID NO: 6; ApoB Seq 3(センス): GGAAUCuuAuAuuuGAUCcA*A, SEQ ID NO: 8; ApoB Seq 3(アンチセンス): uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCc*c*U, SEQ ID NO: 9; 2' O メチル修飾ヌクレオチドは小文字であり、ホスホロチオエート結合はアスタリスクで表されている)。これらの配列は、Soutschekら(2004, Nature, 432: 173 178)、Zimmermannら(2006, Nature, 441: 111 114)、及びStrappasら(2010, Nucleic Acids Research, Vol. 38, No. 14)によって公表された。
10

【0135】

(00151) RecQL1 標的 siRNA 配列は、Dharmacon 社からの ACE RNA 化学により注文合成された (Seq 1: 5' GUUCAGACCAACU UCAGCUdTdT 3', SEQ ID NO: 10)。この配列は、Futamisら(2008, Cancer Sci, 99: 71 80; 2008, Cancer Sci, 99: 1227 1236) によって公表された。MDR1 標的配列は、Dharmacon 社により予め合成されたものを購入し、製品番号: M 003868 02
20 0010 を使って Dharmacon 社のカタログから入手可能である。候補は、MDR1 配列を標的とする 4 つの siRNA: Seq 1(センス): 5' GCUGAU CU AUGCAUCUUAUUU 3', SEQ ID NO: 11; Seq 1(アンチセンス): 5' AUAAAGAUGCAUAGAUCAGCUU3'; SEQ ID NO: 12; Seq 2(センス): 5' GACCAUAAAUGUAAGGUUUUU3', SEQ ID NO: 13; Seq 2(アンチセンス): 5' AAACCUUACAU UUAUGGUCUU3', SEQ ID NO: 14; Seq 3(センス): 5' GAAACUGCCUCAUAAAUUUUU3', SEQ ID NO: 15; Seq 3(アンチセンス): AAAUUUAUGAGGCCAGUUUCUU3', SEQ ID NO: 16; Seq 4(センス): 5' UCGAGUCACUGCCUAAUAAU U3', SEQ ID NO: 17; Seq 4(アンチセンス): 5' UUAUUAG GCAGUGACUCGAUU3', SEQ ID NO: 18 から構成された。
30

【0136】

(00152) dsODN 配列は、ホスホルアミダイト化学 (Integrated DNA Technologies 社) により合成し、ナノ粒子の安定性及びヌクレアーゼ保護アッセイのために使用した。フローサイトメトリー分析について、6 カルボキシフルオレセイン (6 FAM) 5' 標識 dsODN を使用した ((Integrated DNA technologies 社、米国))。

【0137】

(00153) 本明細書に提示のキトサンナノ粒子の物理化学的特性評価のために dsODN を使用する理論的根拠は、dsODN の siRNA を模倣する特性にある。これらの模倣特性は、siRNA と dsODN との間の構造レベル (二本鎖構造、長さ (21 塩基長)、及びヌクレオチドオーバーハング) の類似性に起因している。更に、電荷密度は、siRNA と dsODN との間では、同一のリン酸残基数 / それらの骨格の間隔により類似している。siRNA と dsODN との間の差異は、dsODN 配列中のウラシルからチミンへの置換 (U T)、及び dsODN の糖骨格のデオキシリボシル化 (deoxyribosilation) にある。dsODN 配列は、ホスホルアミダイト化学 (Integrated DNA Technologies 社) により合成し、サイズ及びゼータ電位の測定、ナノ粒子の安定性、並びにヌクレアーゼ保護のアッセイのために使用した。共焦点顕微鏡法、及びフローサイトメトリー分析について、6 - カルボキシフルオ
40

レセイン(6FAM)5'標識dsODNを使用した(Integrated DNA technologies社、米国)。

【0138】

(00154)特定のMn及びDNAを有するキトサンを、1:1のグルコサミン:HClの比率を用いた塩酸中において0.5% (w/v)にて回転ミキサーで一晩溶解し、最終濃度を5mg/mLとした。その後、滅菌濾過した溶液を脱イオン水で希釈し、アミン(キトサン脱アセチル基)とリン酸(dsODN又はsiRNAの核酸)との所望の比率(N:P)を得る。その後、ナノ粒子(92105, 921505, 80405, 801010, 80105, 802005、及び80805)は、100μLの希釈したキトサン溶液に、それぞれ0.05μg/μLの濃度の100μLのdsODN又はsiRNAを急速に混合(ピペット操作)することで調製した。0.33μg/μLの濃度のdsODNは安定性及びヌクレアーゼ保護のアッセイに使用し、その一方で、0.1μg/μLの濃度はDLS及びESSEMに使用した。ナノ粒子は使用する前に室温で30分間インキュベートした。
10

【実施例2】

【0139】

トランスフェクション実験

(00155)インビトロでのトランスフェクションについて、高グルコースのダルベッコ変性イーグル培地(DMEM HG)を、0.976g/LのMES及び0.84g/Lの重炭酸ナトリウム(NaHCO₃)を用いてpH 6.5で調製した。ウシ胎仔血清(FBS)を含まないトランスフェクション培地を、5%CO₂のインキュベータ中で37にて一晩平衡化し、トランスフェクションの直前に無菌HCl(1N)を用いて37でpH値を6.5に調節した。96ウェルプレートで行うsiRNAのトランスフェクションについて、キトサン/siRNAナノ粒子は使用する30分前に上記のように調製した。0.05μg/μl(3,704nM)の濃度の100μlのsiRNA溶液は、1:1の比率(v/v)でキトサンとのsiRNA複合体を形成するために使用した。複合体形成後、siRNA濃度は0.025μg/μl(1,852nM)となり、ナノ粒子を、ウェル当たり(10pモル/ウェル)100nMのsiRNAに等しい0.00135μg/μlの最終濃度で、DMEM HG培地を含むゴーストプレート中でインキュベートした。24ウェルプレートで行うdsODNのトランスフェクションについて、キトサン/dsODNナノ粒子は使用する30分前に上記のように調製した。0.05μg/μl(3,717nM)の濃度の100μlのdsODN溶液を、1:1の比率(v/v)でキトサンとのdsODN複合体を形成するために使用した。複合体形成後、siRNA濃度は0.025μg/μl(1,858nM)となり、ナノ粒子を、ウェル当たり(60pモル/ウェル)600nMのdsODNに等しい0.00135μg/μlの最終濃度で、DMEM HG培地を含むゴーストプレート中でインキュベートした。FACSに使用するdsODNとsiRNAとの間の分子量における僅かな差異は、dsODNの6FMA標識に起因している。ナノ粒子を含むプレートを、5%のCO₂で37にて10分間平衡化した。細胞上の培地を吸引し、dsODN又はsiRNA系のナノ粒子を含むpH 6.5の平衡化トランスフェクション培地を、ウェル当たり500μl(24ウェルプレート)又は100μl(96ウェルプレート)補充し、最終濃度を100nM/ウェルとした。FBSをトランスフェクションから4時間後に添加し、ウェル当たり最終濃度を10%とした。細胞は、トランスフェクションから24時間後の分析まで、キトサン/siRNAナノ粒子と共にインキュベートした。DharmaFECT(登録商標)を陽性対照として使用し、未処理細胞及び非複合化siRNA処理細胞の両方を陰性対照として使用した。
20
30
40

【0140】

(00156)市販のリボソームであるDharmaFECT(登録商標)(Dharmacon RNAi Technologies社、米国コロラド州ラファイエット)を、全ての試験細胞株においてトランスフェクション効率ための陽性対照として使用した
50

。DharmaFECT（登録商標）/dsODN（フローサイトメトリー及び共焦点顕微鏡法）又はDharmaFECT（登録商標）/siRNA（qPCR）のリポプレックス（1：2[w/v]比率）を、製造業者のプロトコルに従って調製した。

【0141】

(00157)インビトロでのトランスフェクションでは、American Type Cell Culture社(ATCC社、バージニア州マナッサス)から購入したHEK293、HepG2(ApoB及びDPP IV)、HT 29(DPP IV)、Caco 2(DPP IV)、Raw 264.7(ApoB)、A549、LS174T、及びAsPC1の細胞株が関与した。MCF7 MDR細胞株は、Hamid Morjani博士(フランス、パリ)から寄贈された。細胞は、37かつ5%のCO₂にて、1.85g/L(HEK293)又は1.5g/l(RAW264.7)の重炭酸ナトリウム、(LS174T)、F12K(A549)、RPMI 1640(MCF7MDR)、及びRPMI 1640(AsPC1)を用いて、最小必須培地(HepG2)、McCoy's(HT 29)、高グルコースのダルベッコ最小必須培地(HEK293及びRAW264.7)中で培養し、かつ10%のFBS(Cedarlane Laboratories社、オンタリオ州バーリントン)で補充した。HepG2細胞は8%のFBSで補充した。トランスフェクションについて、細胞を96ウェル又は24ウェルの培養プレート(Corning社、米国ニューヨーク州)に播種し、トランスフェクションの日に50%~70%の集密を得た。

10

20

【実施例3】

【0142】

RNA抽出及び遺伝子発現解析

(00158)全RNA抽出は、Machery Nagel社からのNucleospin(登録商標)RNA XSキットを用いて行った。細胞溶解は、各ウェルに、2μlのTCEP及びストレプトマイセス・グリセウス・キトサンアゼで補充された100μlのRA1溶解緩衝液を添加することで行った(Alameh et al., 2010, Int J Nanomedicine, 5: 473-481)。溶離する前に試料をRA3緩衝液でインキュベートするときに、試料のDNase処理を行った。RNAの定量及び品質(完全性)の評価は、Agilent Bioanalyzer 2100を用いて実施した。7.5に等しいRNA完全性番号(RIN)をqPCR分析のための受容閾値と見なした。

30

【0143】

(00159)全RNAの逆転写は、ファーストストランドcDNAトランスクリプターキット(Roche社、カナダ、ラヴァル)を用いて行った。全部で0.5~1μgのRNA/試料を製造業者のプロトコルに従って、oligodTプライマーを用いた逆転写反応に使用した。キトサン/siRNA処理した細胞の遺伝子定量を、ABI PRISM(登録商標)7900 HT Sequence Detection Systemを用いて行った。全ての反応を3回行い、Ctの平均値を定量に使用した。遺伝子発現レベルを、Roche(登録商標)社からのUniversal Probe Library(登録商標)(UPL)を用いたアッセイにより決定した。一方で、内在性コントロール(TBP、Hprt)に対する遺伝子発現レベルは、検証済みのTaqMan(登録商標)遺伝子発現アッセイを用いて決定した。標的遺伝子の相対定量は、CT法を用いて決定した。つまり、標的遺伝子のCt(閾値サイクル)値は、内在性コントロール遺伝子(内在性コントロール)に対して標準化し(Ct = Ct_{標的} - Ct_{内在性コントロール})、標準物質と比較した: Ct = Ct_{試料} - Ct_{標準物質}。相対式(RQ)を、Sequence Detection System(SDS)2.2.2ソフトウェア(Applied Biosystems社)を用いて計算し、式はRQ = 2^{-Ct}である。

40

【実施例4】

【0144】

50

ナノ粒子分析

(00160) キトサン / d s O D N 及びキトサン / s i R N A の複合体のサイズは、 Malvern Zetasizer Nano ZS (登録商標) を用いて、 25°で 137°の角度にて動的光散乱により決定した。試料は、計算において純水の屈折率及び粘度を用いて 3 回測定した。ゼータ電位は、計算のために同じ機器及び水の誘電率を用いて、 25°にてレーザードップラー速度計測により同様に 3 回測定した。強度平均径として報告されるサイズ決定について、 50 μl のキトサンを 50 μl の d s O D N 又は s i R N A と混合し、その後、 10 mM の NaCl を用いて 500 μl で完成した。ゼータ測定について、ナノ粒子を 500 μl の 10 mM NaCl を用いて 1 : 2 に希釈した。キトサン / d s O D N のナノ粒子の全ての製剤は、 D L S で測定したところ、 45~156 nm の範囲にあった。キトサン / s i R N A ナノ粒子は、 s i R N A 配列 1 (SEQ ID NO: 5) 及び 2 (SEQ ID NO: 6 及び SEQ ID NO: 7) と複合体化すると、 D L S での測定から 55~105 nm の範囲の平均直径を有していた (表 2)。

s i R N A 配列 3 (SEQ ID NO: 8 及び SEQ ID NO: 9) について、完全に修飾されたキトサン s i R N A のナノ粒子は、 104~130 nm の範囲の平均直径を有していた (表 2)。キトサンと複合体化した d s O D N と、未修飾 s i R N A A p o B (配列 1 ; SEQ ID NO: 5) と、適度に修飾された s i R N A A p o B (配列 2 ; SEQ ID NO: 6 及び SEQ ID NO: 7) との間に、ナノ粒子サイズにおける統計的な差異は認められなかった。しかしながら、完全に修飾された s i R N A 配列は、種々のキトサンと複合体を形成すると、より大きなナノ粒子が生じた。キトサン / d s O D N 及びキトサン / s i R N A のナノ粒子は、 Mn が増加するとより大きなサイズ値を示した。これらの特定の製剤において D D A を比較した場合、統計的に有意な差異は認められなかった。予想されたように、全ての製剤における過剰のキトサンは、表 2 のゼータ電位によって示されるように、正に帯電したナノ粒子をもたらした。 D L S によりサイズ及びゼータ電位の決定が可能であり、一方で E S E M ではサイズのみを測定した。

【0145】

【表2】

キトサン製剤：80-10-5、80-10-10、80-40-5、80-200-5、92-10-5、92-150中のsiRNA-RecQL1又はsiRNA-MDR1；及びキトサン製剤：80-10-5、80-10-10、80-40-5、80-80-5、92-10-5、92-40-5中のsiRNA-DPP-I V、ODN-ApoB、又はsiRNA-ApoBにより形成されたナノ粒子の、標準偏差を用いた、強度による平均サイズ及びゼータ電位。

| 試料 | キトサン | サイズ (nm) | ゼータ電位 (mV) | ESEM (nm) |
|---|----------|-------------|---------------|-----------|
| MDR1 | 80-10-5 | 70±2 | 12±3 | 62±9 |
| | 80-200-5 | 156±35 | 18±3 | 131±5 |
| | 92-10-5 | 71±15 | 15±2 | 64±8 |
| | 92-150-5 | 140±49 | 17±5 | 123±6 |
| RecQL1 | 80-10-10 | 91±7 | 18±2 | 73±9 |
| | 80-40-5 | 86±9 | 18±1 | 97±12 |
| | 92-10-5 | 63±8 | 23±1 | 54±6 |
| DPP-IV (配列1～配列4のsiRNAのプール) | 80-10-10 | 81±5 | 16±2 | 70-90 |
| | 80-80-5 | 111±12 | 20±2 | 60-100 |
| | 92-10-5 | 71±7 | 18±2 | 50-90 |
| ApoB (ODNはsiRNA ApoB配列1を模倣) (SEQ ID NO:5の模倣体) | 80-10-10 | 64±6 | 19±2 | 67±7 |
| | 80-80-5 | 100±12 | 16±1 | 75±13 |
| | 92-10-5 | 45±4 | 21±2 | 66±5 |
| ApoB (siRNA配列1) (SEQ ID NO:5) | 80-10-5 | 80±7 | 27±2 | 62±5 |
| | 80-40-5 | 105±6 | 24±5 | 90±7 |
| | 92-10-5 | 55±3 | 28±2 | 60±3 |
| | 92-40-5 | 69±4 | 23±5 | 65±14 |
| ApoB (siRNA配列2) (SEQ ID NO:6及びSEQ ID NO:7) | 80-10-5 | 90±4 | 26±4 | 70±8 |
| | 80-40-5 | 89±6 | 24±5 | 76±7 |
| | 92-10-5 | 57±3 | 26±4 | 54±6 |
| | 92-40-5 | 67±2 | 24±5 | 59±9 |
| ApoB (siRNA配列3) (SEQ ID NO:8及びSEQ ID NO:9) | 80-10-5 | 139±7 | 19±3 | 89±7 |
| | 80-40-5 | 130±2 | 25±2 | 100±9 |
| | 92-10-5 | 105±3 | 22±5 | 78±5 |
| | 92-40-5 | 104±4 | 27±3 | 80±6 |

【0146】

(00161) 上記のように形成したナノ粒子は、環境制御型走査電子顕微鏡 (ESEM、Quanta 200 FEG、FEI社、米国オレゴン州ヒルズボロ) を用いて画像化した。ナノ粒子形成に続いて、TNCをシリコンウエハ基板上に噴霧した後、以前に記載されているように (Lavertu et al., 2003, J Pharm Biomed Anal, 32: 1149-1158) 金を用いてスパッタコーティングした (Agar Manual Sputter Coater、Marivac社)。ESEM顕微鏡の高真空モードで20kVにて観察を行った。平均粒径 (+/- 標準偏差) は、顕微鏡のXT Docuソフトウェア (XT Docu, FEI社) を用いて、各分

10

20

30

40

50

画において少なくとも 6 つの異なる視野から 150 を超える粒子の直径を測定することにより決定した。サイズ決定の頑健性は、E S E M 画像分析サイズ決定と D L S サイズデータとを比較することで分析した。

【 0 1 4 7 】

(0 0 1 6 2) 結果は、使用するキトサン製剤に応じて、45 ~ 156 nm の間の範囲の平均直径を有する球状ナノ粒子（図 1 A、1 B、2 A、及び 2 B）を示している（表 2、E S E M）。本明細書に記載の特定の製剤から得られた結果は、動的光散乱の結果と一致しており（表 2）、そのため本明細書に記載の組成物及び方法の頑健性を示唆している。更に、形成したナノ粒子は 200 nm 未満の再現可能なサイズをもたらし、それは腎クリアランスを回避可能とする。それ故インビボにおけるトランスフェクション効率を改善し、かつ循環ナノ粒子の半減期を増加させる。10

【 0 1 4 8 】

(0 0 1 6 3) キトサン / d s O D N ナノ粒子及びキトサン / s i R N A ナノ粒子の形成及び安定性は、異なる方法を用いて pH 6.5 及び 8 にて最大 20 時間試験した。キトサン / d s O D N ナノ粒子を形成し、これは弱酸性の pH (pH 6.5) で N : P 比が 2 超にて最大 20 時間安定した（図 3 A 及び 3 B）。ナノ粒子の形成から 4 時間後では、検出可能な d s O D N は N : P 比が 1 以上 (pH 6.5) では観察されなかつた一方で、完全な d s O D N の放出が同一の N : P 比で pH 8 にて観察された。より長い暴露時間の 20 時間では、A p o B の d s O D N において N : P 比が 2 で d s O D N の放出がもたらされ、一方で、より高い N : P 比 (N : P 10) ではナノ粒子の安定性を維持することができた。pH 値が 8 で、かつ同じ N : P 比 10 では、部分的な d s O D N の放出が観察された。本明細書に記載の特定のキトサン製剤では、N : P 比が 2 超 (N : P > 2) で、20 時間の最小期間の間、ナノ粒子の安定性を確実とした。キトサン / s i R N A の安定性を、蛍光に基づくアッセイである R i b o g r e e n assay (登録商標) を用いて評価し、複合体の不安定化後に放出される s i R N A を定量した。結果は、N : P 比が 5 及び 10 のキトサン / s i R N A ナノ粒子は、pH 6.5 で最大 20 時間安定することを示した。キトサン 80 10 5 は、他の製剤と比較した場合、最も低い安定性を示した。キトサン 80 10 ににおける N : P 比の増加により、ナノ粒子の安定性における改善がもたらされた。キトサン 80 10 を除いて、5 を超える N : P 比の増加は、データによって示されるように、ナノ粒子安定性の増加をもたらさなかつた（図 4 A 及び 5）。従つて、より低い N : P 比ではナノ粒子は不安定であり、複合体形成効率は最適ではなかつた。中性 pH では、ナノ粒子は、N : P 比が 2 ~ 5 の間で安定であった。より塩基性の pH 8 では、ナノ粒子は不安定であり、安定性増加のために、より高い N : P 比及びより大きい分子量が明らかに必要であった。2030

【 0 1 4 9 】

(0 0 1 6 4) キトサンパラメータ (D D A 、 M W 、 及び N : P 比) の効果は、例えば、抗 R e c Q L 1 s i R N A を用いて調査した。キトサンの M W が増加するとナノ粒子サイズが増大するため、分子量の明確な効果は明らかである（図 4 B、4 C、及び 4 D）。D D A はナノ粒子サイズに対して非常にわずかな影響を有していた。増加した N : P においてより大きなナノ粒子サイズを有するため、N : P 比はナノ粒子サイズに影響を与えるようである。40

【 0 1 5 0 】

(0 0 1 6 5) s i R N A 濃度がナノ粒子サイズに及ぼす影響を検討した。我々の結果は、増加した s i R N A 濃度において増加したナノ粒子サイズを示している（図 4 E）。

【 0 1 5 1 】

(0 0 1 6 6) 低い N : P 比で d s O D N 配列を保護するキトサンの能力は、D N A s e I 保護アッセイを用いて評価した。キトサン / d s O D N のナノ粒子 (6 μ l) を、(pH 6.5) 20 mM の M E S 、 1 mM の M g C l ₂ 、及び D N A s e I の 0.0 . 5 、 1 、 2 、 5 、又は 10 ユニットの濃度を含む緩衝液中でインキュベートした。試料は 37 °C で 30 分間インキュベートした。反応を 2 μ l の E D T A (50 mM) を添加して50

停止し、その後 15 分間 72 ℃ で加熱した。その後、試料をゲル電気泳動で評価した。結果は、siRNA 模倣二本鎖オリゴヌクレオチドを保護する製剤の能力を実証するものであった(図 6A 及び 6B)。全ての消化は対照(即ち、0 U DNase I = 100 % 強度)を用いて処理試料の信号強度により評価した。DNA 1 μg当たり 1 ユニットの DNase I を使用した場合、保護は考慮されるべきであり、複合体の約 70 % を占めている。一方で、陰性対照は、DNA 1 μg当たり 0.5 ユニットの DNase I を使用すると、完全に消化される。DNA 1 μg当たり DNase I 濃度が 5 ユニットまで増加しても、保護は依然として有効なままである。

【0152】

(000167) 異なる DDA、Mn、及び N : P 比での、RecQL1、DPP IV、及び ApoB の dsODN ナノ粒子の細胞内取り込みは、トランスフェクト細胞のキトサンアゼ処理後にフルオレセイン標識 dsODN を FACS 分析することで評価した。それにより、以前に記載されているように(Alameh et al., 2010, Int J Nanomedicine, 5: 473-481)、膜結合ナノ粒子に関連するあらゆる偏見の可能性を低減することができる。興味深いことに、dsODN / キトサンナノ粒子から得られた結果は、効率的な取り込みにおける細胞株依存性を示唆している。キトサンナノ粒子の取り込みにおける細胞株依存性は、以前の研究において種々のエンドサイトーシス経路と関連していた(Bishop, 1997, Rev Med Virol, 7: 199-209; Huang et al., 2002, Pharm Res, 19: 1488-1494)。FACS の結果は、概して、これらの dsODN を用いた細胞内取り込みでは、製剤間に差異はないことを示している(図 7A 及び 7B)。本明細書に提示の組成物を用いた取り込み効率は、RecQL1 (LS174T、A549、及び AsPC1 の細胞株) において 80 % ~ 98 %、ApoB (HEK293、HepG2、及び RAW264.7 の細胞株) において 55 % ~ 80 % の範囲であった。HepG2 細胞株における DPP IV dsODN ナノ複合体の取り込み効率は、異なる製剤間(92 10 5、80 10 10、及び 80 80 5) に統計学的な差異はなく、73 % ~ 99 % の範囲であった。キトサン / dsODN ナノ粒子を用いた取り込み効率は、細胞型間での類似した相対的ばらつきはあるが、商業的に使用されるリポブレックス(DharmaFECT (登録商標)) に匹敵するか又はより高いレベルを達成した(図 7A 及び 7B)。更に、これらの結果は、以下に記載の共焦点顕微鏡データ(図 8 ~ 10) と一致している。画像は全ての細胞株におけるキトサン及び dsODN の細胞分布を示しており、それは FACS の定量的データとの定性的相関関係を示唆している。

【0153】

(00168) 共焦点顕微鏡法を使用して、本明細書に記載の種々の細胞株 (LS174T、MCF7MDR、HEK293、HepG2、Caco2、及び RAW264.7) への粒子の取り込み及び内部移行を評価した。キトサンはローダミンを用いて標識し、一方で RecQL1 siRNA、DPP IV dsODN、及び ApoB dsODN はフルオレセインを用いて標識した。MCF7MDR ナノ粒子の評価では、Cy3 標識 siRNA を使用した。標識処理の後、ナノ粒子は前述の手順を用いて、キトサンローダミンと siRNA 模倣 dsODN とを 1:1 の体積で混合して形成した。結果は、本明細書に記載の製剤は、トランスフェクションから 24 時間後に siRNA 又は dsODN を最大放出し、効率的に細胞内に内部移行したことを示唆している。包含される結果は、siRNA 又は dsODN とキトサンとの間の 24 時間時点での共局在の欠如を示しており、それは siRNA 又は dsODN の積荷の完全な放出がトランスフェクションから 24 時間後に達成されたことを実証している。更に、ほとんどのトランスフェクト細胞において見られる siRNA 又は dsODN のびまん性染色パターンは、エンドサイトーシス小胞を脱出した複合体を表しており(図 8 ~ 10)、それはキトサン プラスミド DNA のナノ粒子を使用した以前の生細胞イメージング研究と一致する(Thibault et al., 2010, Mol Ther, 18: 1787-1795)。経時変化調査から、粒子の内部移行はゆっくりした放出動態でトランスフェクションから 1 時間

10

20

30

40

50

以内に開始し、トランスフェクションから24時間後に最大に到達することが示された。

【0154】

(00169) 上記の結果は、種々のdsODN及びsiRNAを複数の細胞株にトランسفェクトし、かつ効率的に送達する、本明細書に記載の製剤の能力を示している(図8~11)。

【実施例5】

【0155】

生体外でのsiRNA送達及び遺伝子発現抑制

(00170) キトサンの特定の製剤(92 10 5、80 40 5、80 10 10、及び80 80 5)を、種々の細胞株におけるsiRNA送達、及びその後の10
遺伝子発現(RecQL1 mRNA、DPP IV、又はApob mRNA)の阻害について評価した。結果は、RecQL1、DPP IV、及びApobをコードするmRNAは、定量的リアルタイムPCRで測定すると2倍を超えて下方制御されたことを示している(図11A及び11B)。これらの結果は、アラマーブルーアッセイで観察すると、本明細書に記載の製剤は明らかな細胞毒性を有さずに、市販のリポソームであるDhammaFECT(登録商標)に匹敵する遺伝子サイレンシングのレベルを達成できることを実証している。

【0156】

(00171) より具体的には、LS174T細胞におけるRecQL1 mRNAの阻害に関して、キトサン92 10 5は陽性対照として本明細書で使用されている現在のゴールドスタンダードである市販製剤(~80%)と類似した、高いレベルのサイレンシング(~80%)を示した。製剤80 40 5及び80 10 10もまた、著しいサイレンシングを誘導するが、92 10 5よりも低い程度に誘導し、また、特に製剤80 10 10においては非特異的なモックサイレンシングが増加した(図11B)。本明細書に開示の結果は、以前に他の研究者により使用されていたN:P比(N:P > 20)をはるかに下回るN:P比(N:P = 5)で、効率的にsiRNAを送達し、かつ特定の遺伝子をノックダウンするための、記載のキトサン系製剤の有効性を明確に示している。概して、我々の全ての低いN:P比のキトサン製剤は、FACSデータを支持する高いレベルの遺伝子サイレンシングを達成した(図7B)。

【0157】

(00172) DPP IV又はApobのmRNAのメッセンジャーRNAレベル(mRNA)での70%の遺伝子サイレンシングは、N:P比が5のキトサン92 10から成る特定の製剤を用いて達成可能であることが見出された(図11A)。しかしながら、メッセンジャーレベルでの70%の阻害は、DPP IVにおける酵素活性の50%の減少に変換される(図12)。酵素レベルでのこの阻害は、市販のリポプレックスであるDharmaFECT(登録商標)を使用する場合に達成されるレベルに匹敵する。

【実施例6】

【0158】

キトサン/siRNAナノ粒子のインビボでの効率分析

(00173) siRNA Apobナノ粒子のインビボでの効率を、C57BL/6マウスモデルにおいて評価した。各治療法について、4匹の動物(n = 2のD及びn = 3のC1群を除いてn = 4)に、Apob遺伝子を標的とする1mg kg⁻¹のsiRNAを注射した。Apob遺伝子を標的とする1mg kg⁻¹のsiRNAを低分子量のキトサン(LMW CS)と複合体化させて、最終量を0.2mlとした(例えば、1:1の比率でのキトサン92 10 5と0.5μg / μlの78μlのsiRNA量(37,037nM)との複合体形成後に、1mg kg⁻¹の投与量として計算される、39gのマウスに対して39μgのsiRNAの注射量を投与した)。その後、156μlの全量を投与した。複合体形成後のsiRNA濃度は、0.25μg / μl(18,518nM)となる。具体的には、Apob遺伝子を標的とするsiRNAを、N:P比が5(N:P)でキトサン製剤92 10 (DDA、Mn)と複合体化した。合計で、5つの群(C1

10

20

30

40

50

～C5；n=4／群）を表3のスケジュールに従って異なる時にTNC処理した。様々なC57BL/6マウス群（群当たりn=4動物）における、1mg kg⁻¹の抗ApoB siRNAの用量でのキトサン/siRNA ApoBナノ粒子の静脈注射スケジュールに関するデータを表3に開示する。それぞれの日は、1週間の内で唯一注射が行われた日か又は安楽死が行われた日を表している。治療反応の速度を調査するために、TNC92

105を1回のみ注射して2日後に安楽死させたD群からの2匹のマウスを除き、全てのマウスにTNC92 105(Mn DDA N:P)を3週間の間、週に1回注射した。これらの2匹のマウスを除いて、他の全てのマウスは2011年1月の最後の週内に安楽死させた。D群は未処理のアテローム硬化性の陽性対照としての役割を果たし、Dμは通常の低脂肪食を与えられた陰性対照群であった。D群は、キトサンを含まないsiRNA送達のための陰性対照群であり、複合体化されていない裸のsiRNAを注射した。この調査に用いた動物の総数は32匹であった。

【0159】

【表3】

動物実験スケジュール

| | 群 | | | | | | | | |
|--------------|-----------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|---------------|---------------------|-------------|--|
| 日 | C1 (n=3) | C2 (n=4) | C3 (n=4) | C4 (n=4) | C5 (n=4) | Dα (n=4) | Dβ (n=4) | Dμ (n=4) | |
| 23/11/ 10 | 順化（全群） | | | | | | | | |
| 30/11/ 10 | 注射 # 1 | | | | | | | | |
| 07/11/ 10 | 注射 # 2 | 注射 # 1 | | | | | | | |
| 14/12/ 10 | 注射 # 3 | 注射 # 2 | 注射 #1 | | | | | | |
| 21/12/ 10 | | 注射 # 3 | 注射 #2 | 注射 #1 | | | 注射 #1 | | |
| 28/12/ 10 | | | 注射 #3 | 注射 #2 | 注射 #1 | | 注射 #2 | | |
| 04/01/ 10 | | | | 注射 #3 | 注射 #2 | | 注射 #3 | | |
| 11/01/ 11 | | | | | 注射 #3 | | | | |
| 18/01/ 11 | | | | | | Dα - 2日 | Dα | | |
| | | | | | | 注射(n=2) | n=2 | | |
| 20/01/ 11 | | | | | | 安楽死Dα - 2日 | | | |
| 26/01/ 11 | 安楽死(C1, C2, C3) | | | | | | | | |
| 27/01/ 11 | | | | 安楽死(C4, C 5) | | | 安楽死 (Dα, Dβ, Dγ) | | |

【0160】

(00174)全ての動物は、モントリオール大学の動物倫理委員会(CDEA)によって要求されるように、実験前に2週間順化させた。2週間の順化後、動物が安楽死した

10

20

30

40

50

日に相当する調査完了時まで、D₊陽性群（未処理群、n = 4）及びD₊の裸 siRNA 处理群（n = 4）を含む全ての処理群に高脂肪の固体試料のD12492を供給した（表3）。D_μ群（n = 4）には通常の固体試料のD12450Bを与え、正常陰性対照（低脂肪群）としての役割を果たした。全ての処理動物に3週間、週に1回注射した（表3）。全てのC群の動物には、低いN:Pのキトサン製剤92-10-5を用いて、1mg/kg⁻¹のApoB siRNAを注射した。3週間の注入の最後は、C1、C2、C3、C4、C5群を安樂死させる7、6、5、4、及び3週間前に行い、処理の経時変化を調査した。4匹の陽性対照のアテローム硬化性D₊動物のうちの2匹に、安樂死の2日前に上記製剤を注射し、他の残りの未処理の2匹と合わせて治療の開始を調査した。D₊群は1mg/kg⁻¹にて複合体化されていない裸のApoB siRNAを用いて処理し、一方で通常の低脂肪食群のD_μは処理しなかった（詳細は表3に示す）。

10

【0161】

(00175) 実験スケジュールの間、調査が完了するまで、TNC注射の前に、静脈切開を2週間に1回実施し、一方で動物の体重測定を1週間に1回実施した。実験スケジュールの終了時、かつ全ての動物を犠牲にした後（表3）、肝臓及び腸などの臓器を分析のために取り除いた。

【0162】

(00176) 血液学的、生化学的、血清学的、及び組織学的な分析を全ての動物について行った。例えば、血清の血液学的及び生化学的な分析は、カナダ、モントリオールのVitaTech社で行った。血清中のApoB減少における定量は抗ApoB ELLISAにより行い、一方でLDL/VLDLコレステロールの定量は、比色分析により実施した。肝臓切片の染色はヘマトキシリンエオシン染色を行い、脂肪空胞を可視化した。肝臓への免疫細胞浸潤の評価について、パラフィン包埋切片をサフランインO/ファストグリーン/鉄ヘマトキシリンで染色した。

20

【0163】

(00177) 全ての動物の血液学的及び生化学的な分析は、安樂死の日に血清収集後に実施した。アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の2つの肝障害の感受性指標を、処理及び未処理の動物において定量した。処理群（C5）と陽性対照群（D₊）との間のALT及びASTの血漿濃度の比較からは如何なる有意な差も示されず、それは低いN:Pのキトサン/ApoB siRNAのTNCを用いた処理は、肝臓毒性作用を有さないことを示唆するものである（表4）。

30

【0164】

(00178) 更に、結果は、血清アルブミン濃度が処理及び未処理の群の両方において正常であったことを示し、それもまた正常な肝機能を示している。しかしながら、siRNA/ApoB処理動物における総コレステロールの定量により、陽性対照群と類似して血清濃度が高い可能性が示され（表4）、それぞれC5-2にはキトサン/siRNA/ApoBナノ粒子が投与され、一方でD₊-3はアテローム性動脈硬化症発症の陽性対照である。群当たり1匹の動物のみを血液学的分析に使用した。なぜなら必要な血清量が多く、1匹の動物の犠牲を必要とするためである。

40

【0165】

【表4】

処理 (C5-2) および未処理 (D α -3) のマウスの血液学的特性評価

| マウス (群 - マウス) | C5-2 | D α -3 |
|-----------------------------------|------|---------------|
| アルブミン (g/L) | 35 | 35 |
| (総) ビリルビン ($\mu\text{mol/L}$) | 0.4 | 0.7 |
| (抱合型) ビリルビン ($\mu\text{mol/L}$) | 0.1 | 0 |
| ALP (IU/L) | 58 | 55 |
| ALT (IU/L) | 120 | 121 |
| AST (IU/L) | 213 | 222 |
| GGT (IU/L) | 0 | 0 |
| コレステロール (mg/dL) | 220 | 209 |
| 溶血 | 1+ | 1+ |
| 黄疸 | 正常 | 正常 |
| 脂肪血 | 正常 | 正常 |

10

【0166】

(00179) これらの結果を合わせると、低いN:Pのキトサン系 siRNAナノ粒子は如何なる肝障害も誘発しないため、その安全性が示される。

20

【0167】

(00180) アポリポタンパク質Bの血漿濃度値 $\mu\text{g/mL}$ は、抗ApoBの市販のELISAキット (Uscn Life science社、中国) を用いて評価した。ApoBの血漿濃度の測定値は試験した群及び対照によって、 $597 \mu\text{g/mL} \sim 1,433 \mu\text{g/mL}$ の間で変化した。得られた結果は、全ての処理群はアテローム硬化性の陽性対照群Dから~35%減少したApoBの血漿濃度を有しており、正常陰性対照 (D μ) の血漿濃度と類似の濃度を達成したことを示している (図13)。D-2日群は、注射から2日後に類似した減少を示しており、それはTNCの注射後の迅速なサイレンシング効果を示唆するものである。

30

【0168】

(00181) ApoB濃度は、複合体化されていないsiRNA (対照群; D-1)を受けた動物において35%減少した。この処理法 (D-1) は、血漿中のApoBの減少においてTNC処理法と同様に有効であったが (図13)、それは肝臓における高い炎症反応をもたらしたため (図16H)、効果的かつ治療的なサイレンシング / 血漿中のApoBの減少を達成するための複合体化されていないsiRNAの投薬は制限される。更に、結果は、低いN:Pのキトサン系TNCにおけるApoBの血漿濃度の減少は、あらゆる明らかな炎症又は肝臓毒性を有さずに、C1動物群において最後の注射から7週間を超えて維持されたことを示している (図13)。これらの結果は、特に有望なTNC処理における長命な特性、及び効果的な制御された放出特性を示している。

40

【0169】

(00182) 毒性 / 炎症性の特性におけるD-1とC1-C5群との間の比較から、これらの特定のLMW-TNCの使用において明らかな毒性 / 炎症性の特性が認められなかつたので、裸のsiRNAに勝る利点が示される (図16及び表4)。

40

【0170】

(00183) LDL / VLDLコレステロール値は、市販の比色定量分析キット (BioAssay Systems社、米国) を用いて決定した。本明細書における結果は、処理動物では陽性対照 (D) と比較して、~20%のLDL / VLDLの減少が実証されたことを示している (図14)。興味深いことに、C5群は、ApoBの減少が観察されたにもかかわらず (図13)、未処理群と比較してより高い濃度のLDL / VLDLを示した。他のグループと同程度の減少は、ApoB及びLDL / VLDLの両方の血漿

50

濃度における同時減少を示している。裸の s i R N A 処理動物と T N C 処理動物との間の比較から、A p o B の減少が類似していた前の結果と一致して、L D L / V L D L コレステロール値において類似した減少が示される（図 13 及び 14）。

【0171】

(00184) ヘマトキシリン エオシンで染色してパラフィン固定した肝臓切片の組織学的分析により、T N C 処理動物は陽性対照D₀と比較して、より低いコレステロールの蓄積を有していたことが示される。T N C 処理群、C 3、及びD₂からの肝臓切片は、低脂肪食が与えられた正常陰性対照群D_μと類似した低いレベルの蓄積コレステロールを有することが見出された（図 15）。逆に、C 4、C 5、及びD₂群は、陽性対照D₀と類似した脂肪肝を提示し（図 15）、一方でC 1 及びC 2 は中間の脂肪肝を提示している。全て合わせると、結果は、T N C はA p o B 阻害からL D L / V L D L 減少を通して肝臓での過剰なコレステロール蓄積を防ぐことができ、それ故、C 1、C 2、及びC 3 群において肝臓でのコレステロールから胆汁への変換を可能とすることを実証している。C 4 及びC 5 群で観察された結果は、T N C 処理前のコレステロールの過剰な蓄積に起因すると思われる。これらの結果は、アテローム性動脈硬化症の治療におけるキトサン系T N C の有効性を実証するものである。

10

【0172】

(00185) サフラン O / ファストグリーン / 鉄 ヘマトキシリン染色してパラフィン固定した肝臓切片の組織学的分析により、キトサン系T N C は裸のA p o B s i R N A 処理と比較して、炎症反応を減少させたことが示される（図 16）。結果は、C 5 群はアテローム硬化性対照群よりも高いリンパ細胞浸潤率を提示し、それ故、炎症は肝臓におけるキトサンの蓄積に起因していることが示唆される（図 16）。しかしながら、C 4、C 3、C 2、及びC 1 群からの肝臓の組織学的分析から、炎症の時間依存的吸収が示される（図 16）。更に、D₂日と未処理の陽性対照D₀との比較から、リンパ細胞浸潤におけるキトサンの効果は時間依存的であることが示される（図 16、F 及び G）。処理から数週間以内のナノ粒子依存性の炎症は、吸収されるまで約 3 週間の間持続することが推定される。

20

【0173】

(00186) 図 15 と 16 との比較から、キトサン系ナノ粒子の効率を評価することにより、A L T / A S L 特性によって示されるように肝臓の完全性を崩壊することなく肝臓におけるコレステロールの蓄積を防止することが可能である。また、図 13 と 14 との間の比較により、治療の長命な特性が正確に示され、それ故、キトサン仲介性の徐放における我々の以前の見解を確認することができる。

30

【0174】

(00187) 処理が体重増加に及ぼす影響は、本研究の間に週に 1 回、各動物 / 群の体重を測定することにより評価した。結果は、処理が体重増加に影響を及ぼさないことを示している（図 17）。しかしながら、体重増加は最初の T N C 投与の翌週において減速したこと留意されたい。例えば、C 4 及びC 5 群はそれぞれ調査の 3 週目及び 4 週目にこれらの最初の注射を受け、それは C 4 群において体重の安定、及び C 5 においては体重の減少をもたらした。この効果はまた、C 2 及びC 3 群においてより小さな規模で存在している（図 17）。実際に、C 5 の平均体重は全ての群と比較して、調査開始から C 5 の最初の注射日の 2010 年 12 月 28 日まで、加速した体重増加（平均体重）を有していた。この注射の効果は 2011 年 1 月 4 日（5 週目）に観察される。C 5 の体重増加率は大幅に減速し、それは図 18 で認められる体重増加率と合致する。

40

【0175】

(00188) 本発明を具体的な実施形態に関連させて説明してきたが、本発明はさらなる修正が可能であり、この適用は、本発明が関係する技術分野において周知又は慣習的な実施の範囲内であり、かつ添付の特許請求の範囲の通りに、本発明の開示からのさらなる発展を含む、本発明のあらゆる変更、使用、又は適応を包含することを意図することが理解される。

50

【図 1 A】

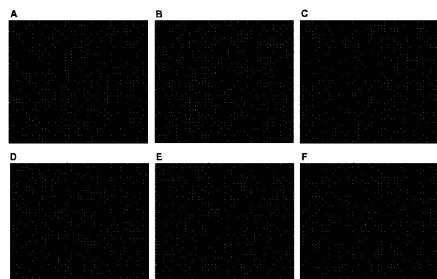


Fig. 1A

【図 2 A】

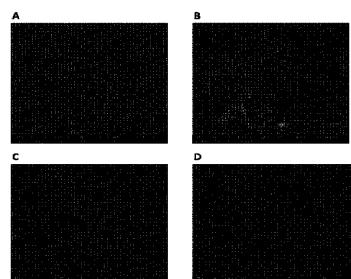


Fig. 2A

【図 1 B】

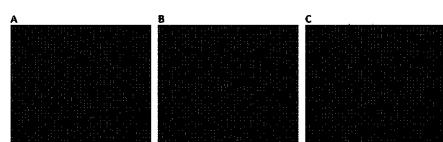


Fig. 1B

【図 2 B】

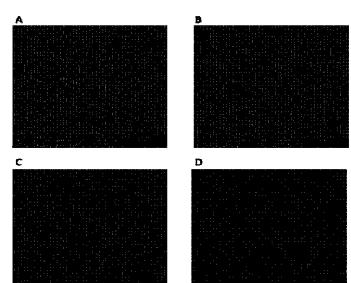
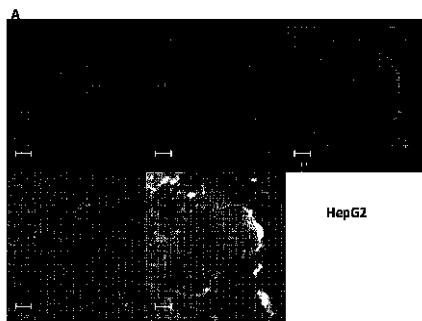


Fig. 2B

【図 8 A】



HepG2

【図 8 C】



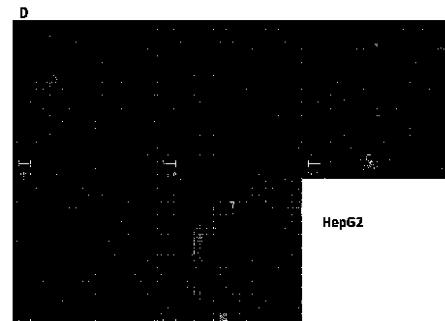
HT-29

【図 8 B】



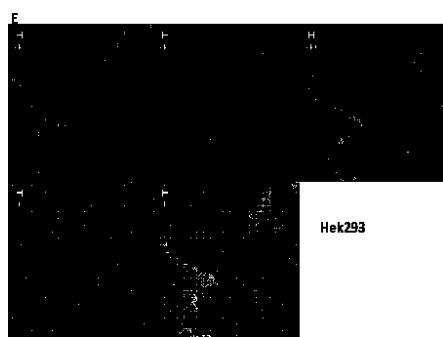
Caco-2

【図 8 D】

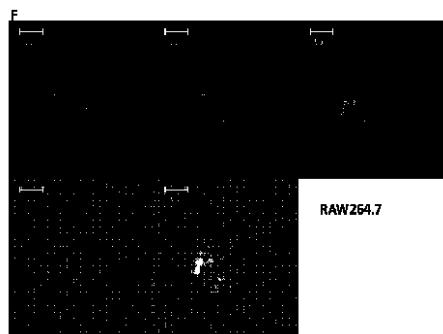


HepG2

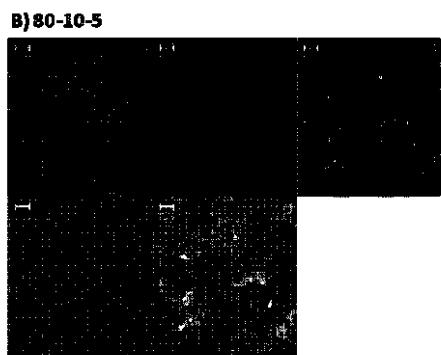
【図 8 E】



【図 8 F】



【図 10 B)】



【図 9】

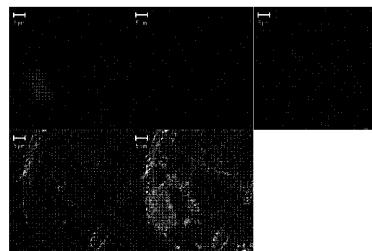
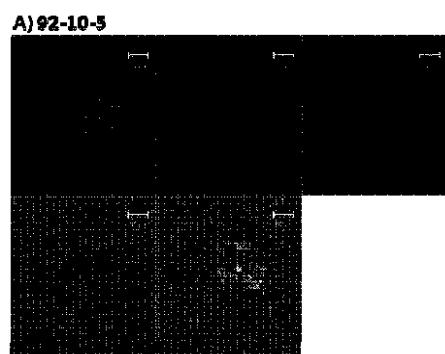
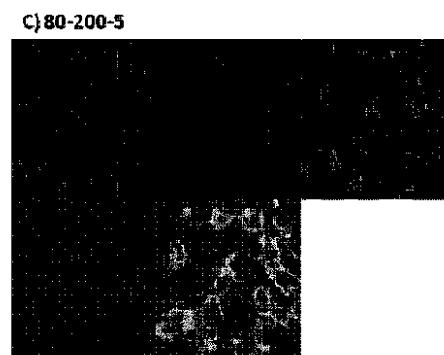


Fig. 9

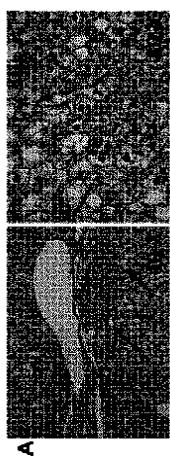
【図 10 A)】



【図 10 C)】

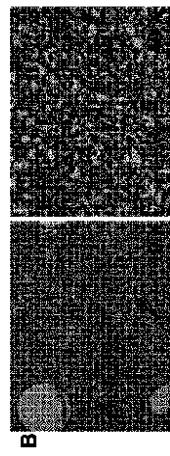


【図 15 A】



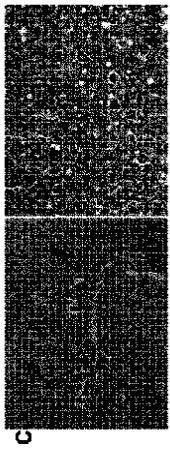
A

【図 15 B】



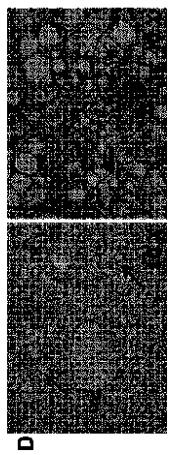
B

【図 15 C】



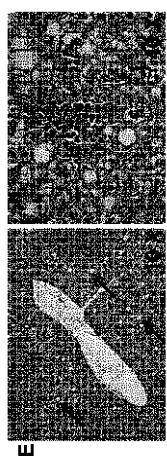
C

【図 15 D】



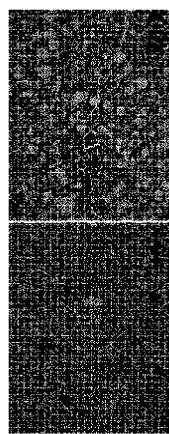
D

【図 15 E】



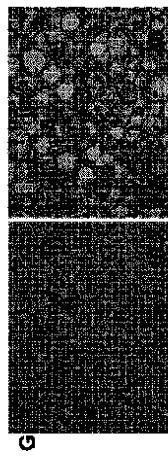
E

【図 15 F】



F

【図 15 G】



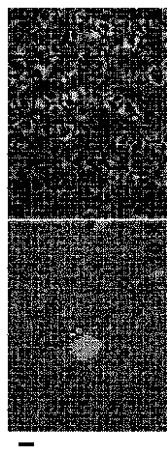
G

【図 15 H】

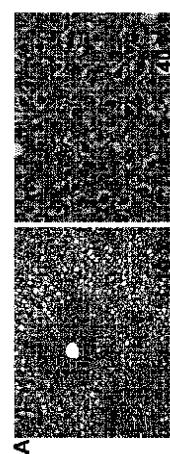


H

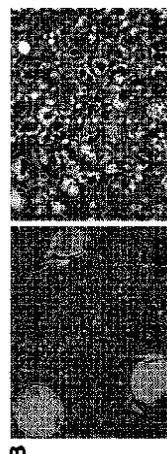
【図 15 I】



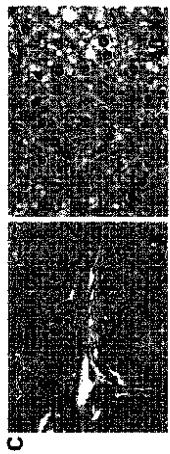
【図 16 A】



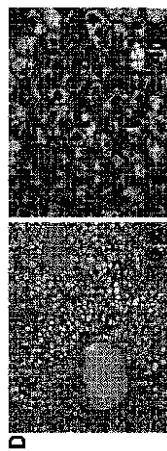
【図 16 B】



【図 16 C】



【図 16 D】



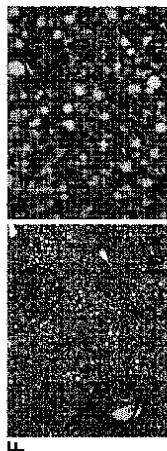
D

【図 16 E】



E

【図 16 F】



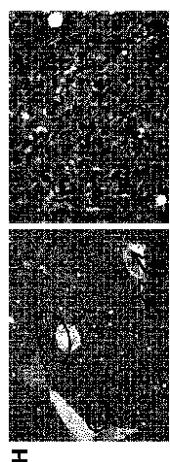
F

【図 16 G】



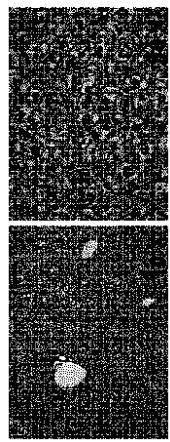
G

【図 16 H】



H

【図 16 I】



I

【図 3 A】

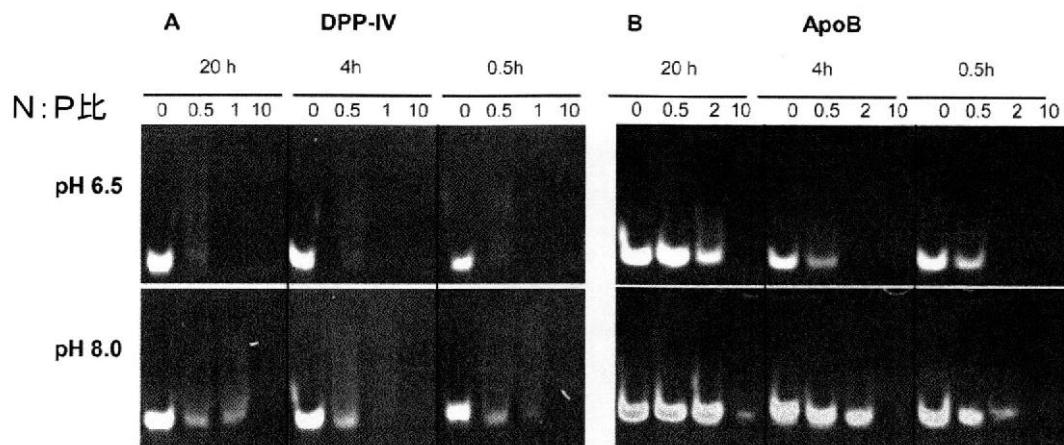


Fig. 3A

【図 3B】

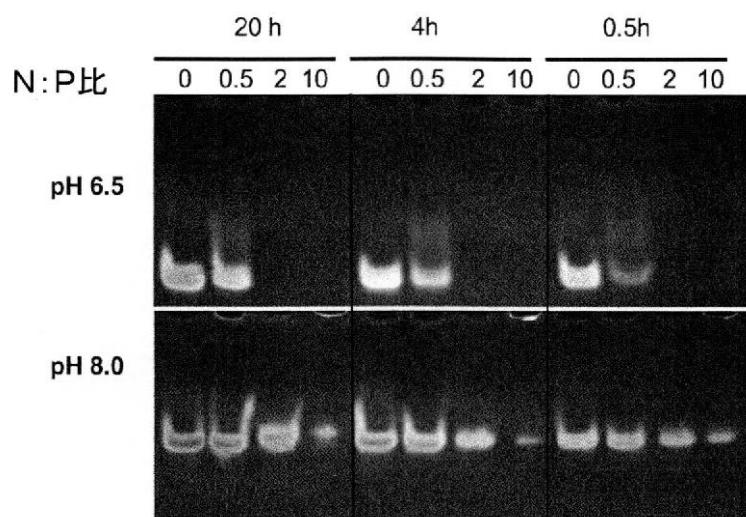


Fig. 3B

【図 4 A】

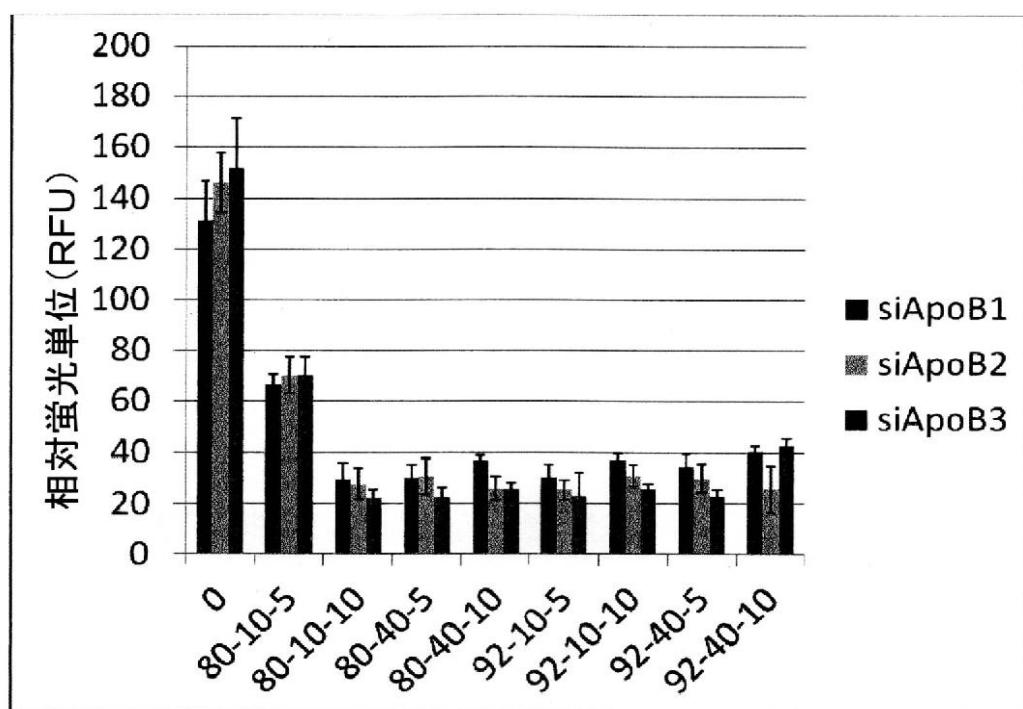


Fig. 4A

【図 4 B】

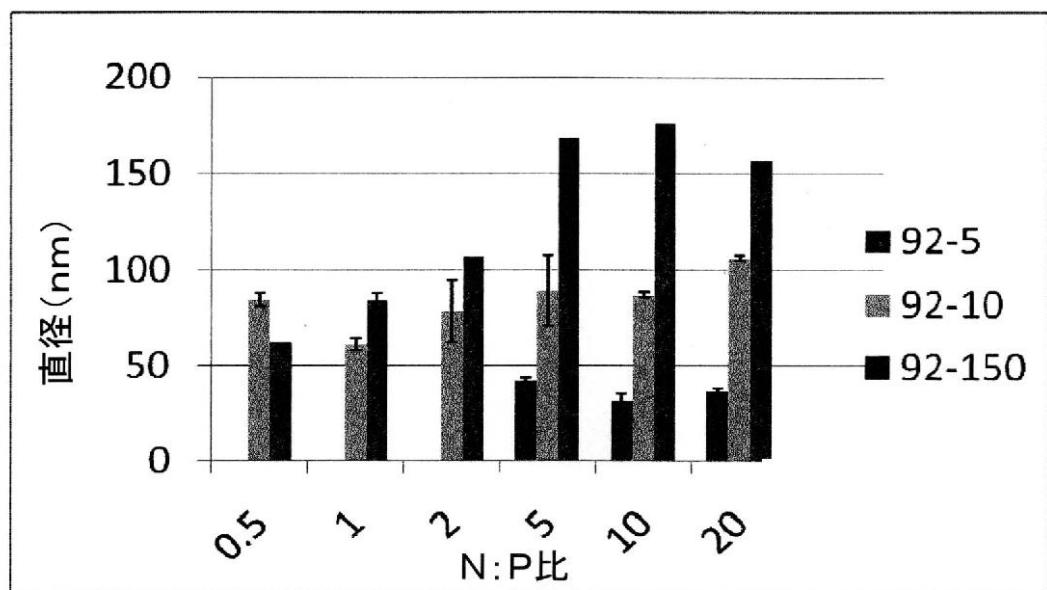


Fig. 4B

【図 4 C】

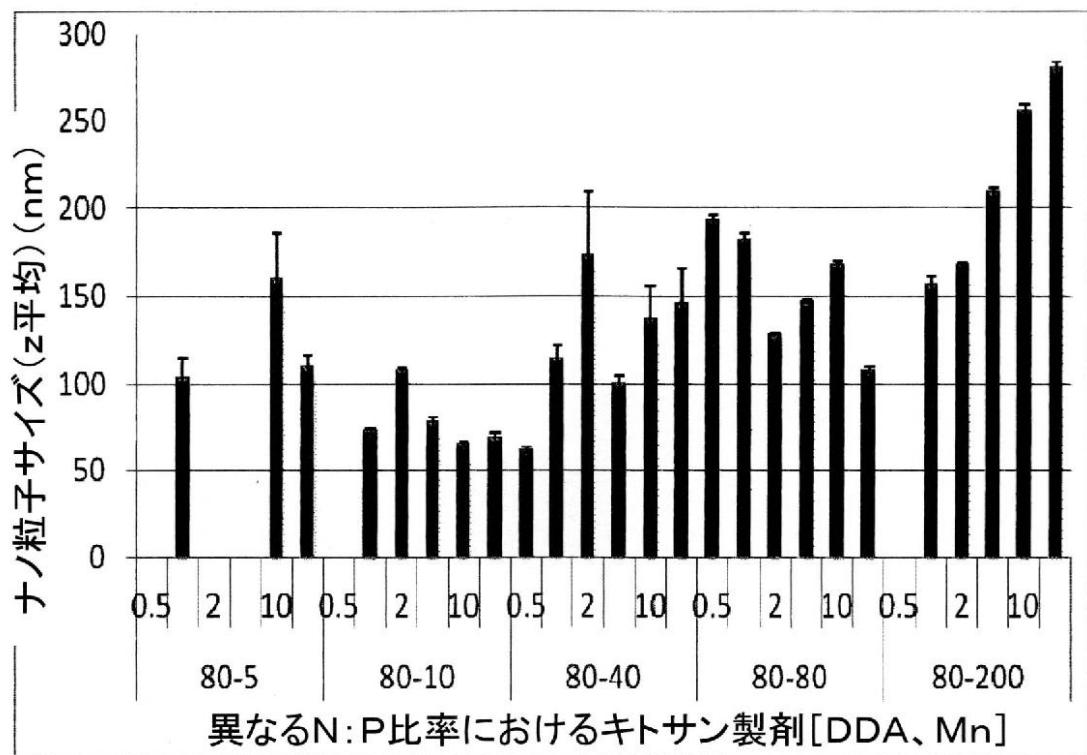


Fig. 4C

【図 4 D】

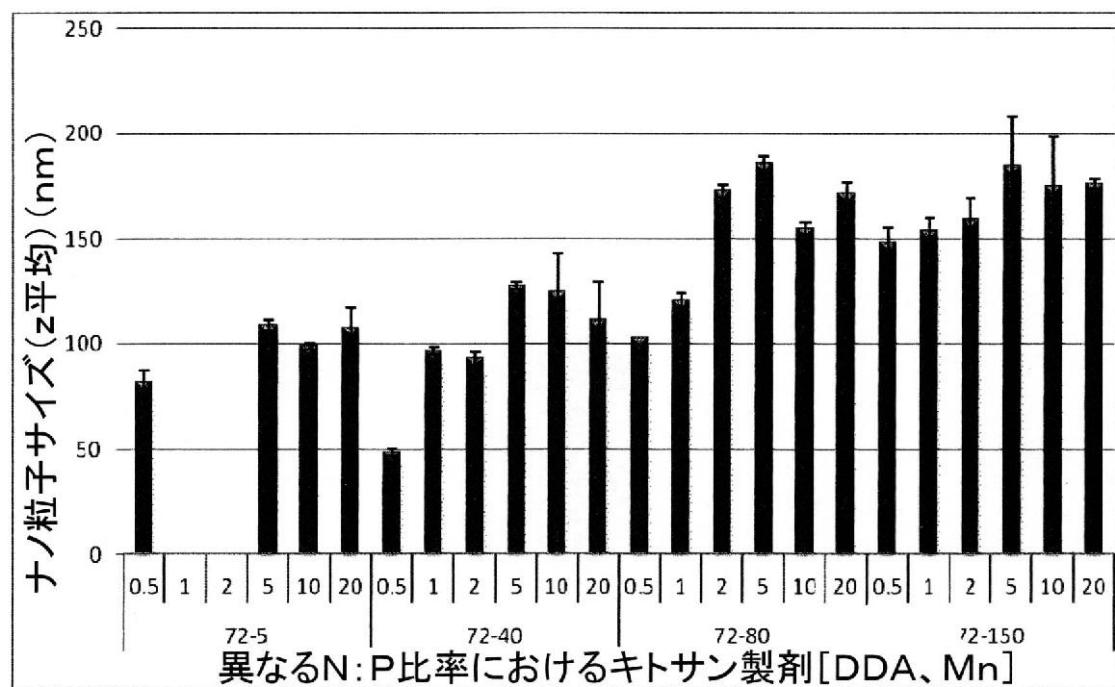


Fig. 4D

【図 4 E】

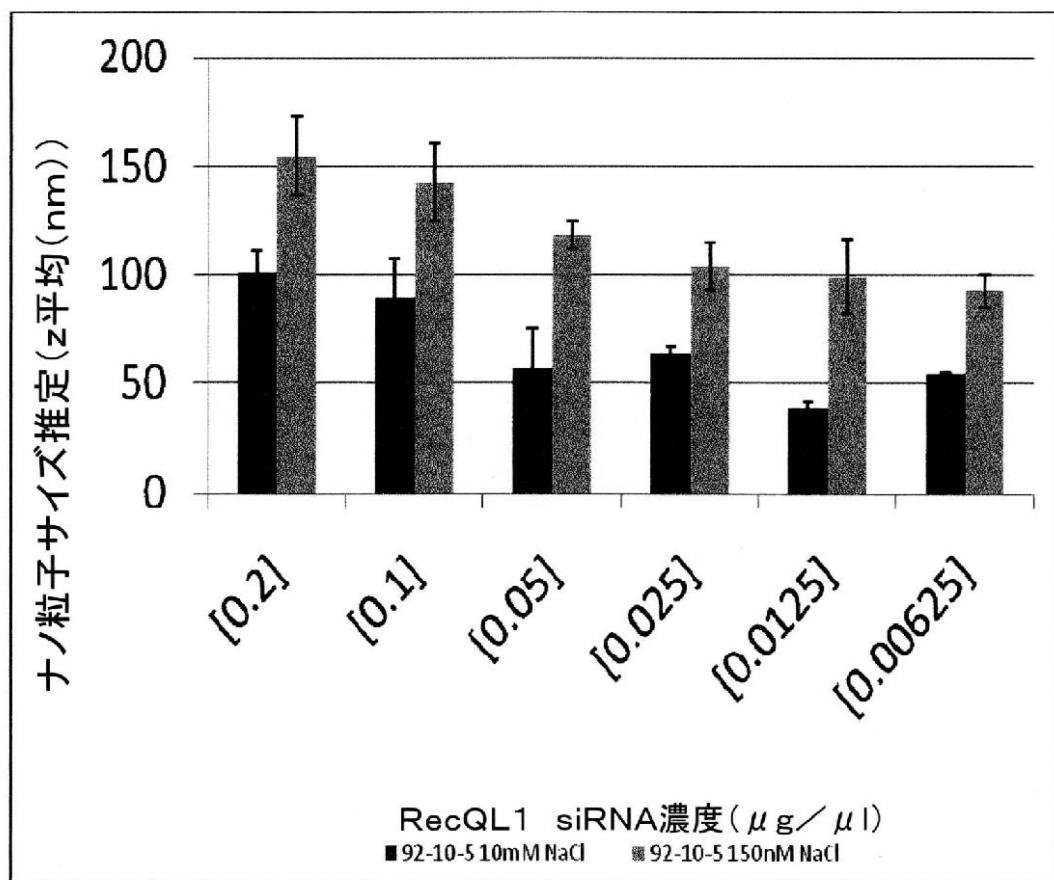


Fig. 4E

【図 5】

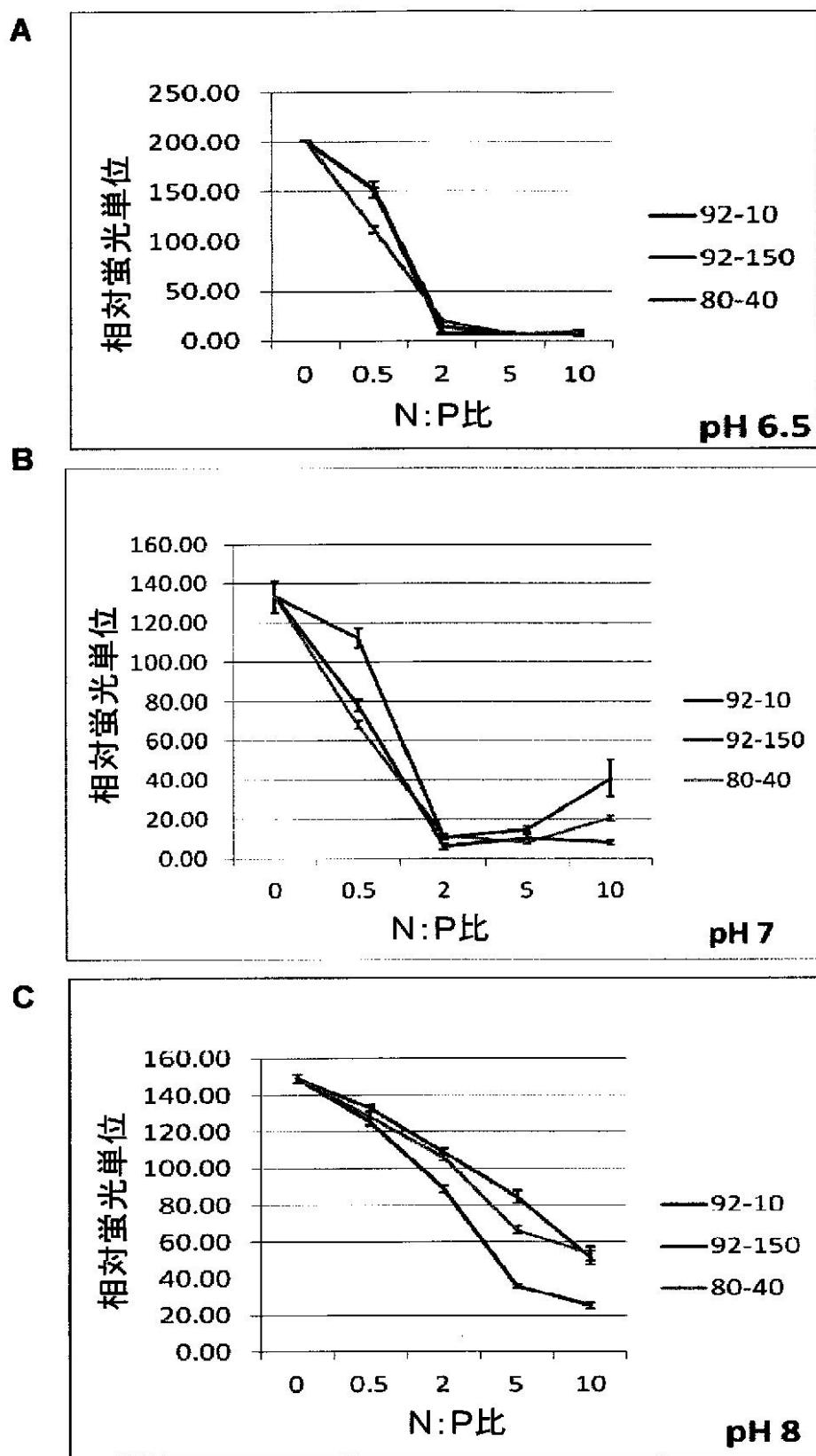


Fig. 5

【図 6 A】

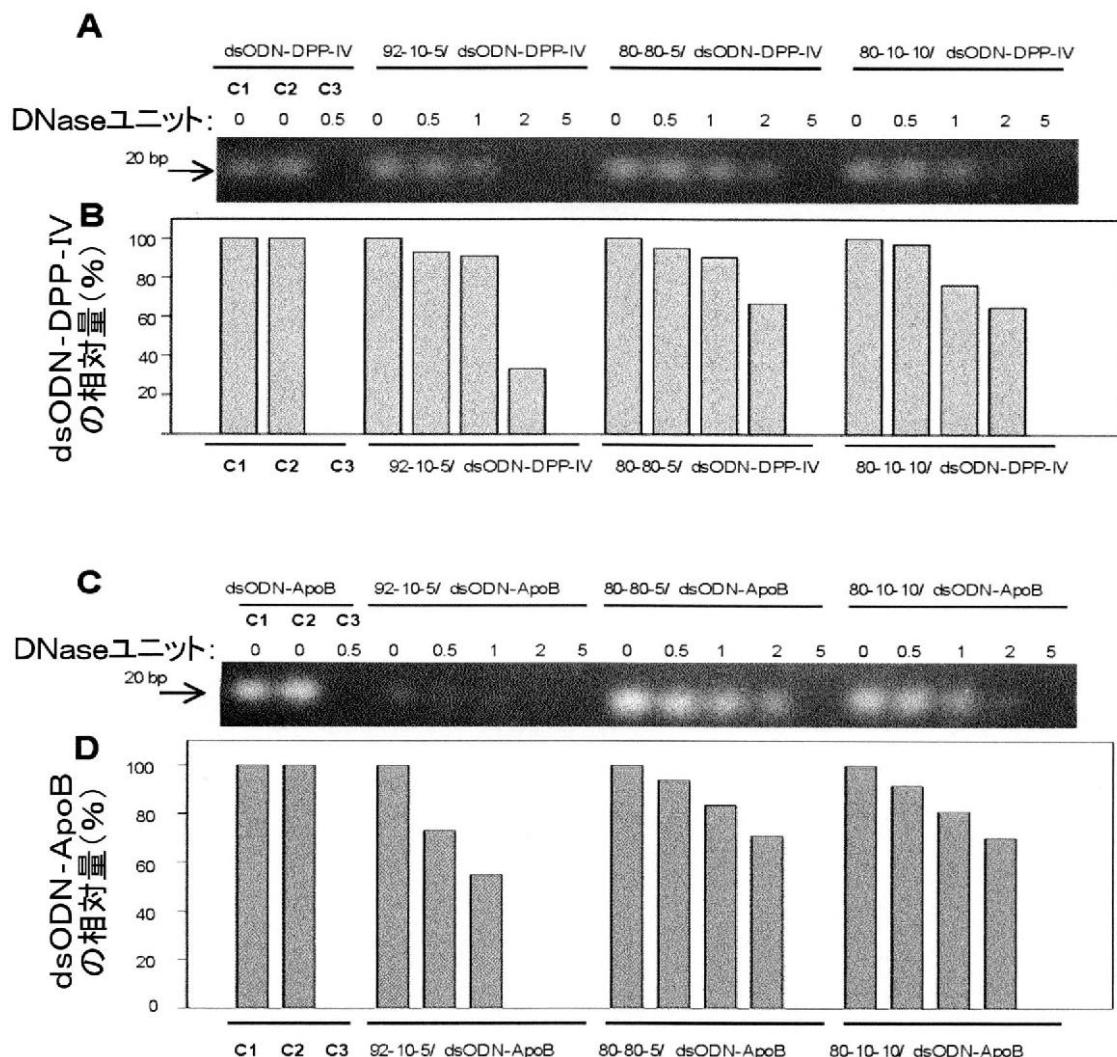


Fig. 6A

【図 6 B】

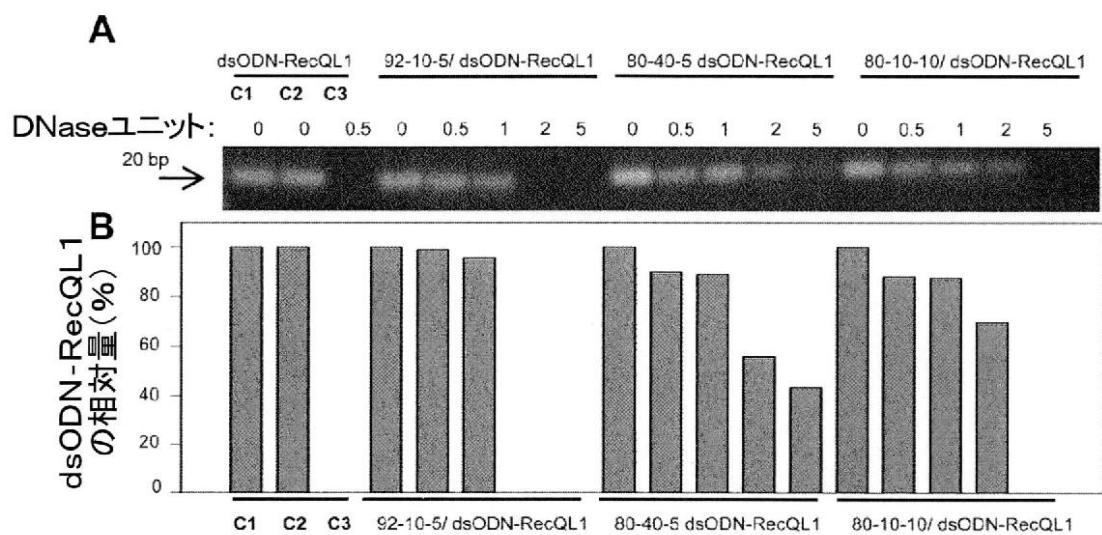
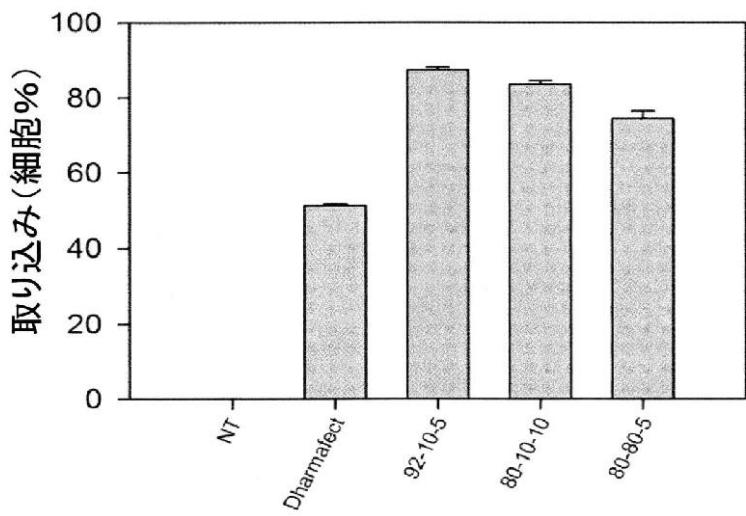
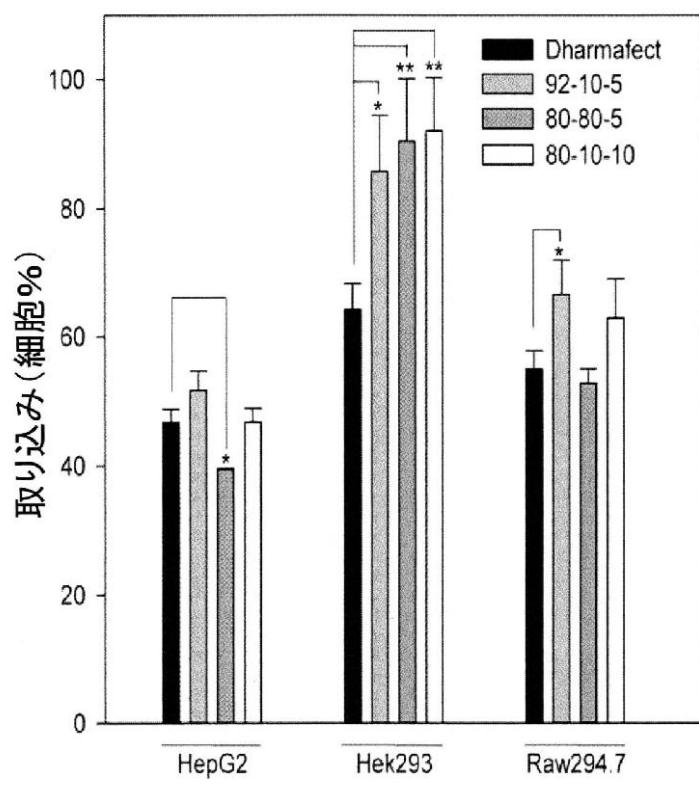


Fig. 6B

【図 7 A】

A**B****Fig. 7A**

【図 7B】

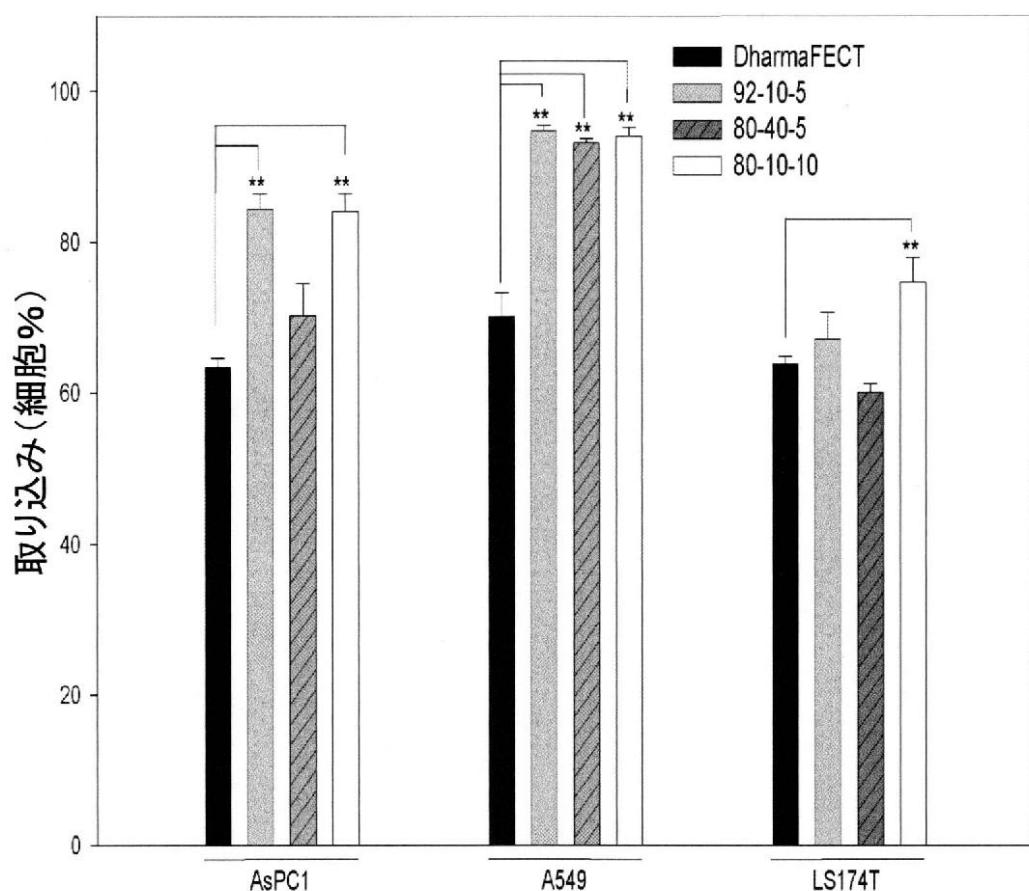


Fig. 7B

【図 11A】

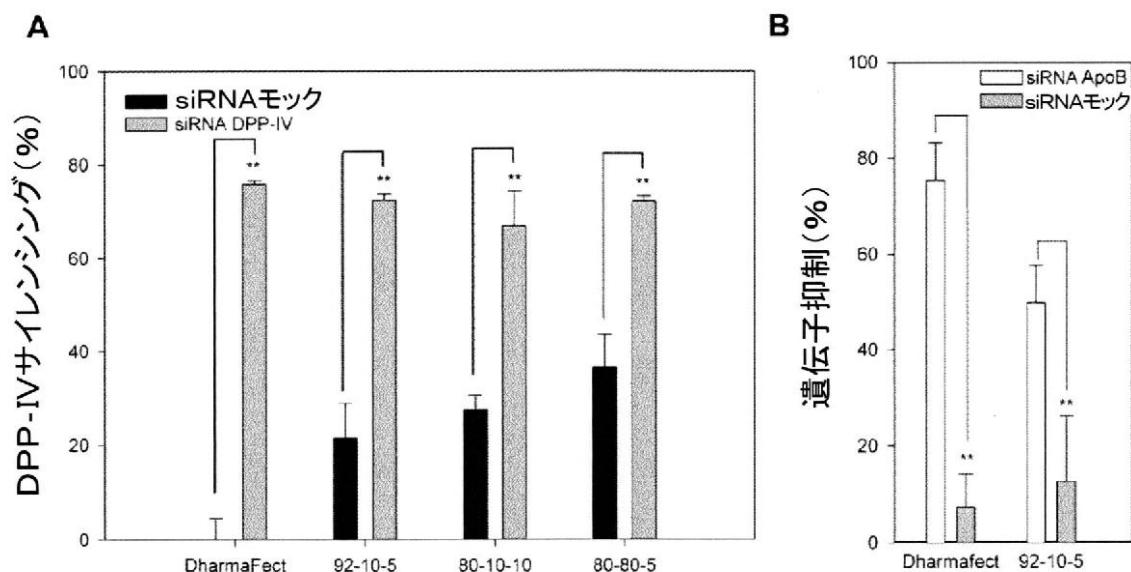


Fig. 11A

【図 11B】

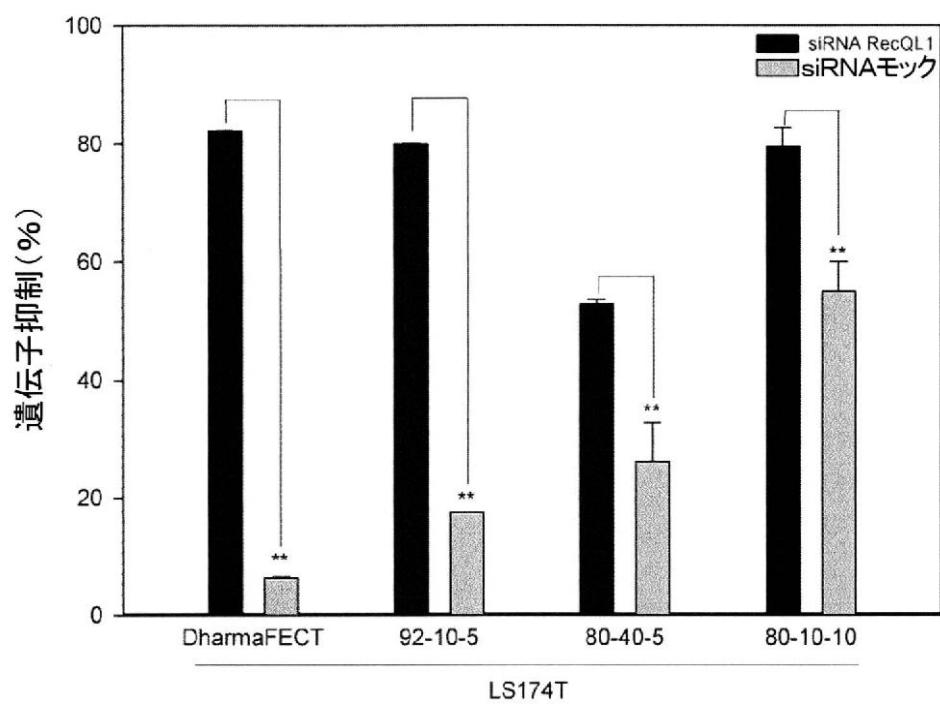


Fig. 11B

【図 1 2】

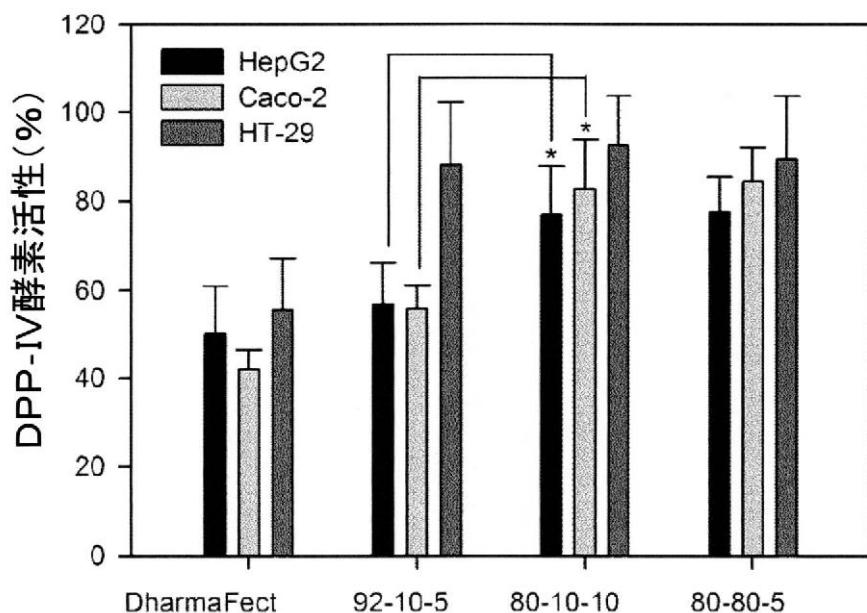


Fig. 12

【図 1 3】

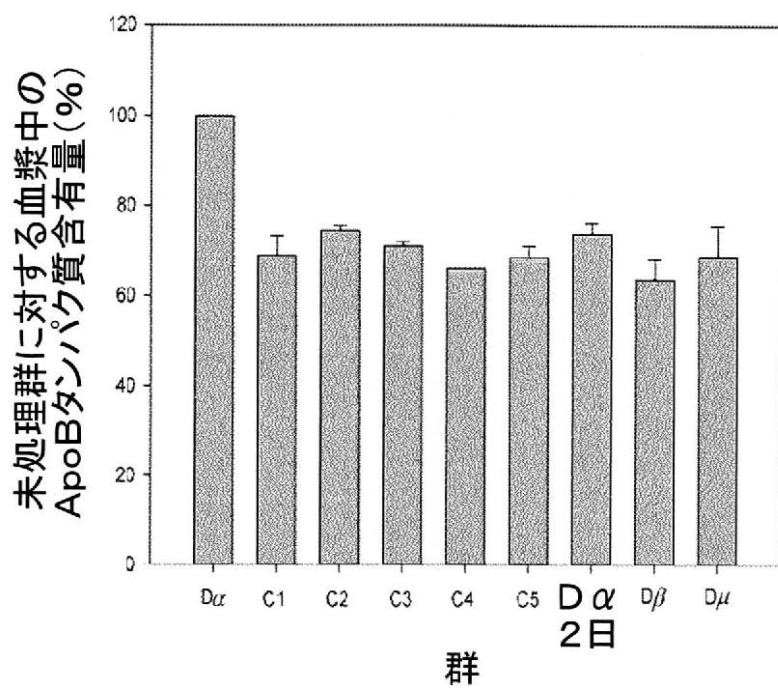


Fig. 13

【図 14】

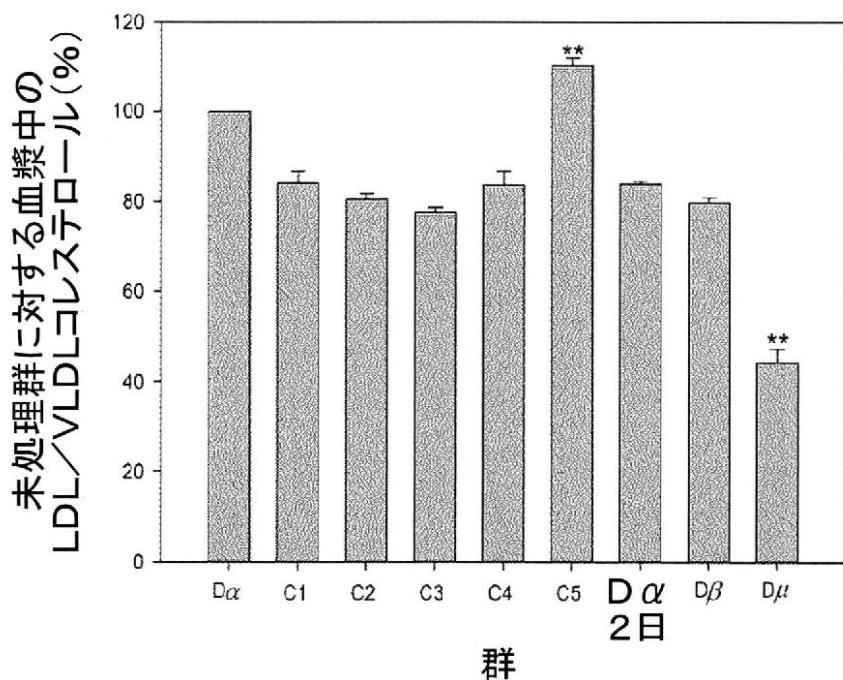


Fig. 14

【図 17】

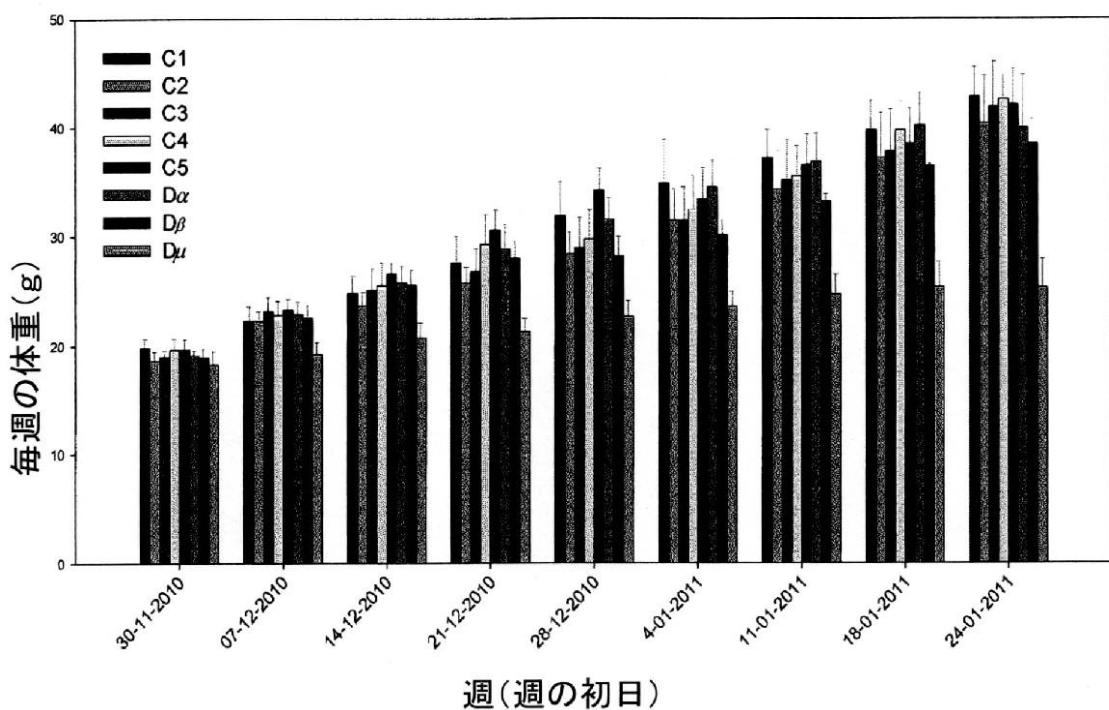


Fig. 17

【図 18】

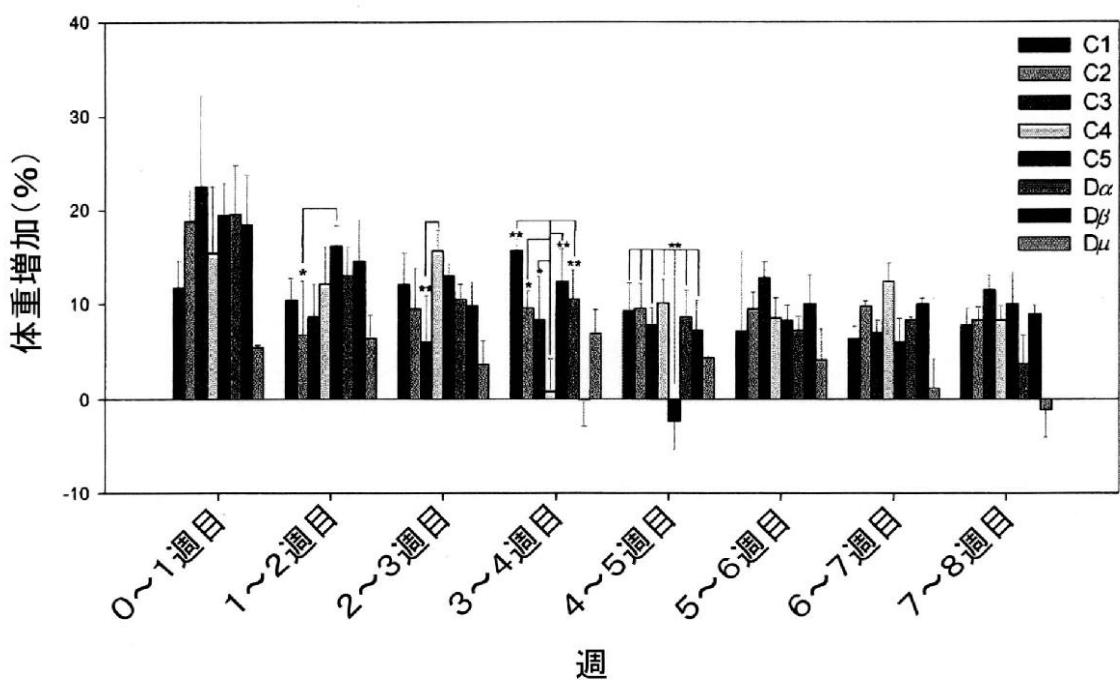


Fig. 18

【配列表】

2014518875000001.app

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/CA2012/050342 | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|---|-----------|--|-----------------------|-----|--|--|---|--|--------------------------------------|--------|--|----------------------------------|--------|--|----------------------------------|
| <p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>A61K 47/36</i> (2006.01), <i>A61K 31/713</i> (2006.01), <i>A61P 3/10</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>A61P 9/10</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: <i>A61K 47/36</i> (2006.01), <i>A61K 31/713</i> (2006.01), <i>A61P 3/10</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>A61P 9/10</i> (2006.01)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian patent database, Epoque, Scopus, google (sample search terms: chitosan, degree of deacetylation, DNA, RNAi, siRNA, nucleic acid, nucleoside, nucleotide and similar terms) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P,X</td> <td>JEAN, M. et al. "Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of <i>in vitro</i> cell lines relevant to type 2 diabetes" <i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> 2012, 45, 138-149. published online 9 November 2011 (9-11-2011). (see sections 2.2-2.6, 2.10.3, 3.5 3.6 and 4.)</td> <td>1-11, 13-15, 22, 23, 27-29, 34-38, 45, 46 and 49-54.</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>HOWARD, K. A. et al. "RNA Interference <i>in Vitro</i> and <i>in Vivo</i> Using a Chitosan/siRNA Nanoparticle System" <i>Molecular Therapy</i> 2006, 14(4), 476-484. published online 10 July 2006 (10-07-2006). (see Table 1, B and section entitled "Pulmonary RNA Interference" starting at page 479).</td> <td>1-5, 6, 10-12, 22, 40-46, and 49-54.</td> </tr> <tr> <td>X Y</td> <td>WO 2008/020318 (HSU, E. et al.) 24 February 2011 (24-02-2011) (see in particular paragraphs [0032] - [0059], [0082][00228] [00263])</td> <td>1-11 and 49-54 1-46 and 49-54</td> </tr> <tr> <td>X Y</td> <td>WO 2007/059605 A1 (BUSCHMANN, M. et al.) 31 May 2007 (31-05-2007) (see Tables 1 and 2, paragraphs [0047], [0066] - [0078] and claims 20 and 28)</td> <td>1-11 and 49-54 1-46 and 49-54</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | P,X | JEAN, M. et al. "Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of <i>in vitro</i> cell lines relevant to type 2 diabetes" <i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> 2012, 45, 138-149. published online 9 November 2011 (9-11-2011). (see sections 2.2-2.6, 2.10.3, 3.5 3.6 and 4.) | 1-11, 13-15, 22, 23, 27-29, 34-38, 45, 46 and 49-54. | X | HOWARD, K. A. et al. "RNA Interference <i>in Vitro</i> and <i>in Vivo</i> Using a Chitosan/siRNA Nanoparticle System" <i>Molecular Therapy</i> 2006, 14(4), 476-484. published online 10 July 2006 (10-07-2006). (see Table 1, B and section entitled "Pulmonary RNA Interference" starting at page 479). | 1-5, 6, 10-12, 22, 40-46, and 49-54. | X Y | WO 2008/020318 (HSU, E. et al.) 24 February 2011 (24-02-2011) (see in particular paragraphs [0032] - [0059], [0082][00228] [00263]) | 1-11 and 49-54 1-46 and 49-54 | X Y | WO 2007/059605 A1 (BUSCHMANN, M. et al.) 31 May 2007 (31-05-2007) (see Tables 1 and 2, paragraphs [0047], [0066] - [0078] and claims 20 and 28) | 1-11 and 49-54 1-46 and 49-54 |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | | | | | | | |
| P,X | JEAN, M. et al. "Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of <i>in vitro</i> cell lines relevant to type 2 diabetes" <i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> 2012, 45, 138-149. published online 9 November 2011 (9-11-2011). (see sections 2.2-2.6, 2.10.3, 3.5 3.6 and 4.) | 1-11, 13-15, 22, 23, 27-29, 34-38, 45, 46 and 49-54. | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | HOWARD, K. A. et al. "RNA Interference <i>in Vitro</i> and <i>in Vivo</i> Using a Chitosan/siRNA Nanoparticle System" <i>Molecular Therapy</i> 2006, 14(4), 476-484. published online 10 July 2006 (10-07-2006). (see Table 1, B and section entitled "Pulmonary RNA Interference" starting at page 479). | 1-5, 6, 10-12, 22, 40-46, and 49-54. | | | | | | | | | | | | | | | |
| X Y | WO 2008/020318 (HSU, E. et al.) 24 February 2011 (24-02-2011) (see in particular paragraphs [0032] - [0059], [0082][00228] [00263]) | 1-11 and 49-54 1-46 and 49-54 | | | | | | | | | | | | | | | |
| X Y | WO 2007/059605 A1 (BUSCHMANN, M. et al.) 31 May 2007 (31-05-2007) (see Tables 1 and 2, paragraphs [0047], [0066] - [0078] and claims 20 and 28) | 1-11 and 49-54 1-46 and 49-54 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <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 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 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search 19 July 2012 (19-07-2012) | | Date of mailing of the international search report 31 July 2012 (31-07-2012) | | | | | | | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476 | | Authorized officer Owen Terreau (819) 934-6370 | | | | | | | | | | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|--|
| International application No. PCT/CA2012/050342 |
|--|

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|---|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | CA 2 644 347 A1 (WENGEL, J. et al.) 27 September 2007 (27-09-2007) (see page 22 and claims 20 and 28) | 1-12, 16-17, 22-26, 30-39, 45, 46 and 49-54. |
| Y | EP 1 816 194 (TAKAGI, M. et al.) 18 February 2009 (18-02-2009) (see entire document) | 1-12, 18-20, 22, 23, 34-39, 45, 46 and 49-54. |
| Y | US 2005/0153914 A1 (MCSWIGGEN, J. et al.) 14 July 2005 (14-07-2005) (see entire document) | 1-12, 21-23, 34-39, 45, 46 and 49-54. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | |
|------------------------------------|--|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | International application No. PCT/CA2012/050342 |
|------------------------------------|--|

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. Claim Nos. : 47, 48 and 55-96

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 47, 48 and 55-96 are directed to methods of treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the products defined in the claims.

2. Claim 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. Claim 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 claim 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 claim 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/CA2012/050342

| Patent document Cited in Search report | Publication Date | Patent Family Member(s) | Publication Date |
|---|---------------------|---|--|
| WO2008020318 | 24-02-2011 | NZ571965 A CN102164618 A US20110171276 A1 US20110171314 A1 EP2034954 A2 AU2007285472 A1 | 24-02-2012 24-08-2011 14-07-2011 14-07-2011 18-03-2009 21-02-2008 |
| WO2007059605 A1 | 31-05-2007 | US2009075383 A1 EP1948810 A1 CA2628313 A1 | 19-03-2009 30-07-2008 31-05-2007 |
| CA2644347 A1 | 27-09-2007 | US2009182136 A1 JP2009530319 A EP2002004 A2 EA200870366 A1 WO2007107162 A2 AU2007229161 A1 | 16-07-2009 27-08-2009 17-12-2008 28-04-2009 27-09-2007 27-09-2007 |
| EP1816194 | 18-02-2009 | JP2012005486 A JP4809240B2 B2 KR20070088706 A US20090215867 A1 WO2006054625 A1 | 12-01-2012 09-11-2011 29-08-2007 27-08-2009 26-05-2006 |
| US20050153914 A1 | 14-07-2005 | - - | |

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 P 3/10 (2006.01) | A 6 1 P 3/10 | |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01) | A 6 1 P 9/10 | 1 0 1 |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 35/04 (2006.01) | A 6 1 P 35/04 | |
| A 6 1 P 5/50 (2006.01) | A 6 1 P 5/50 | |
| A 6 1 P 9/12 (2006.01) | A 6 1 P 9/12 | |
| A 6 1 P 3/04 (2006.01) | A 6 1 P 3/04 | |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 P 9/00 | |
| A 6 1 P 27/02 (2006.01) | A 6 1 P 27/02 | |
| A 6 1 P 25/00 (2006.01) | A 6 1 P 25/00 | |
| A 6 1 P 13/12 (2006.01) | A 6 1 P 13/12 | |
| A 6 1 P 25/02 (2006.01) | A 6 1 P 25/02 | 1 0 3 |
| A 6 1 P 17/02 (2006.01) | A 6 1 P 17/02 | |
| A 6 1 P 19/04 (2006.01) | A 6 1 P 19/04 | |
| A 6 1 P 37/00 (2006.01) | A 6 1 P 37/00 | |
| A 6 1 P 3/06 (2006.01) | A 6 1 P 9/10 | |
| A 6 1 P 3/00 (2006.01) | A 6 1 P 3/06 | |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 P 3/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | |
| A 6 1 K 9/127 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 9/127 | |
| | A 6 1 K 45/00 | |

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,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,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA

(74) 代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74) 代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(72) 発明者 メルゾーキ アブデラザク

カナダ エイチ2ワイ 2イー1 ケベック ラヴァル プラース ド ロー ヴィヴ 731

(72) 発明者 ブッシュマン マイケル ディー

カナダ エイチ4ビー 2エイチ4 ケベック モントリオール キング エドワール アブニユ
- 4329

F ターム(参考) 4C076 AA19 AA95 BB11 CC01 CC07 CC10 CC11 CC16 CC17 CC19
CC21 CC27 CC29 EE37 FF02 FF34 FF68
4C084 AA13 AA19 MA24 NA05 NA11 NA14 ZA01 ZA011 ZA33 ZA31
ZA36 ZA361 ZA42 ZA421 ZA45 ZA451 ZA70 ZA701 ZA81 ZA811
ZB26 ZB261 ZC03 ZC031 ZC202 ZC35 ZC351 ZC352
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA03 MA05 NA05 NA11 ZA01 ZA33
ZA36 ZA42 ZA45 ZA70 ZA81 ZB26 ZC03 ZC35