

(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 I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 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
(86) (22) 出願日	平成24年5月24日 (2012. 5. 24)		ポリヴァロール ソシエテ アン コマン
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月27日 (2014. 1. 27)		ディト
(86) 国際出願番号	PCT/CA2012/050342		カナダ エイチ3ブイ 1エイチ8 ケベ
(87) 国際公開番号	W02012/159215		ック モントリオール クイン-メリ ロ
(87) 国際公開日	平成24年11月29日 (2012. 11. 29)		ード 3 5 3 5 オフィス 2 2 0
(31) 優先権主張番号	61/489, 306	(74) 代理人	100092093
(32) 優先日	平成23年5月24日 (2011. 5. 24)		弁理士 辻居 幸一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	61/489, 302		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成23年5月24日 (2011. 5. 24)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		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 s i R N A 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、インビトロ及びインビボの両方で治療用 R N A i 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 k D a ~ 2 0 0 k D a の間、脱アセチル化度は 8 0 % ~ 9 5 % 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

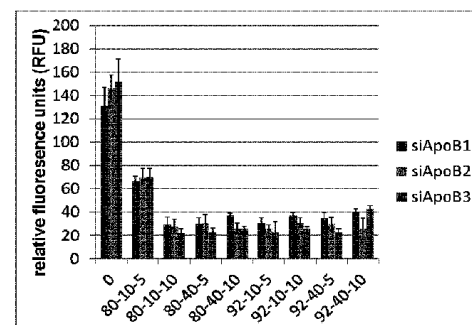


Fig. 4A

【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 RNA 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ブ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 RNA 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 RNA 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 RNA 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 RNA i 誘導性核酸配列は、低分子干渉 RNA、低分子ヘアピン RNA、又は RNA i 誘導ベクターである、組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記 RNA 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、又は癌の病因に關与する遺伝子を標的とする、組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 10 のうちいずれか一項に記載の組成物であって、前記 RNA 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關与する遺伝子を標的とする、組成物。

【請求項 13】

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 RNA 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 13 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 RNA 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、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 (MMP 9)、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 RNA i 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 RecQ 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 RecQL1 DNA 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 RNA i 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 GLP 1 の生物学的利用能を増加させる、組成物。

【請求項 28】

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 Apo B 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、lipofectin (登録商標)、lipofectamine (登録商標)、cellfectin (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、ビッグアニジン誘導体、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、シタグリブチン、ビルダグリブチン、又はサクサグリブチンである、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、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、陰癌、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、

50

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 Transit TKO (登録商標) 親油性試薬、Lipofectin (登録商標)、Lipofectamine (登録商標)、Cellfectin (登録商標)、ポリカチオン、又はリポソームである、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。

【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。

20

【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 RNA i 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 RNA i 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 : HCl 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 RNA i 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 55】

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 56】

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 57】

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 58】

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 59】

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 60】

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 61】

請求項55に記載の方法であって、前記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又は二本鎖線状リボ核酸の配列である、方法。

【請求項 62】

請求項55に記載の方法であって、前記RNA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 63】

請求項55に記載の方法であって、前記RNA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 64】

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

【請求項 65】

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

【請求項 66】

請求項55に記載の方法であって、前記RNA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連する遺伝子を標的とする、方法。

40

【請求項 67】

請求項55に記載の方法であって、前記RNA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 68】

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 69】

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)、マトリックスメタロプロテアーゼ 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 l、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 85】

請求項 55 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 86】

請求項 85 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、lipofectin (登録商標)、lipofectamine (登録商標)、cellfectin (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 87】

請求項 85 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。

【請求項 88】

請求項 84 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 89】

請求項 84 に記載の方法であって、前記 DPP IV 阻害剤は、シタグリブチン、ビルダグリブチン、又はサクサグリブチンである、方法。

【請求項 90】

請求項 55 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、膵臓癌、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、膣癌、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、方法。

【請求項 91】

請求項 55 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 92】

請求項 91 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、Lipofectin (登録商標)、Lipofectamine (登録商標)、Cellfectin (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 93】

請求項 55 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と同時に投与される、方法。

【請求項 94】

請求項 93 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 95】

請求項 55 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 96】

請求項 55 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

10

20

30

40

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

s i R N A (低分子 (short) 干渉 R N A) 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。s i R N A により、疾患に
20

【0004】

I I 型糖尿病

I I 型糖尿病 (T 2 D M) 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 (B e l l e t a l . , 2 0 0 1 , N a t u r e , 4 1 4 : 7 8 8 - 7 9 1) 。 I 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 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。ビッグアニドは、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 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 (g l i m i p e i d e) 、及びグリボムリド (g l i b o m u r i d e) 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テグリニドを含む。

【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、忍容性、体重増加、浮腫、及び胃腸不耐性によって制約される (D r u c k e r e t a l . , 2 0 1 0 , N a t R e v D r u g D i s c o v , 9 : 2 6 7 - 2 6 8 ; N a u c k e t a l . , 2 0 0 9 , D i a b e t e s C a r e , 3 2 : 8 4 - 9 0 ; N g e t a l . , 2 0 1 0 , P r i m C a r e D i a b e t e s , 4 : 6 1 - 6 3 ; T r u i t
50

10

20

30

40

t et al., 2010, Curr Med Res Opin, 26:1321-1331; 及び Wajsborg 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されてきた。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、胃内容物排出の遅延、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GLP-1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 (GLP-1) の作用が増強する。これらの阻害剤には、シタグリブチン、ビルダグリブチン、及びサクサグリブチンが含まれ、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 (Vermis et al., 2008, BMJ, 337:a2423)。これらの治療は、低密度リポ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

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 43 kb 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 517,550 kDa 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

【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。化学療法に関連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。

【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 結合カ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 結合カ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)。

【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 ABCB1 (mdr1) と称され、染色体 7 の位置 q21.12 に位置する。ABCB1 は 28 個のエキソンから構成されており、その産物は 1.2 kb 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

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。

【0017】

更に、ゲノムの完全性及び安定性の維持に関与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こき、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。

【0018】

例えば、ヘリカーゼのRecQファミリーは、組換え、修復、及びホリディ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)。

10

【0019】

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(Karrow 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との広範な相同性を有することが示されており、かつ染色体12p11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)。

20

30

【0020】

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)。

40

【0021】

恒常的安定性及び機能的完全性の維持に関与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

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 Velde 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参与している。ヒトの病理に参与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)。

10

【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。

20

【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、5 kDa ~ 200 kDa 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。

30

【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、5 kDa ~ 200 kDa 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。

40

【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

50

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、5 kDa ~ 200 kDa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 ~ 15 kDa、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10 kDa、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10 kDa、40 kDa、80 kDa、150 kDa、又は200 kDaである。

【0033】

他の実施形態では、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。

【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RNAi誘導ベクターである。

20

【0036】

他の実施形態では、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。

【0037】

好ましくは、RNA誘導性核酸配列は、II型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、又は癌の病因に關与する遺伝子；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關与する遺伝子、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イナーゼ9(MMP9)、又はコレステロールエステル転送タンパク質(CEETP)などを標的とする。

30

【0038】

他の実施形態では、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。

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、RNAi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、lipofectin（登録商標）、lipofectamine（登録商標）、cellfectin（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、シタグリブチン、ビルダグリブチン、又はサクサグリブチンである。

【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、陰癌、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。

【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、Lipofectin（登録商標）、Lipofectamine（登録商標）、Cellfectin（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る。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

また、組成物は、好適な抗癌療法のため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。

【 0 0 5 2 】

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。

【 0 0 5 3 】

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。

【 0 0 5 4 】

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。

【 0 0 5 5 】

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。

【 0 0 5 6 】

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。

【 0 0 5 7 】

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。

【 0 0 5 8 】

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。

【 0 0 5 9 】

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。

【 0 0 6 0 】

次に、添付の図面を参照する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 1 】

【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(ESSEM)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(ESSEM)画像を示している。

【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(ESSEM)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

10

20

30

40

50

微鏡 (E S E M) 画像を示している。

【図 3】(0 0 6 3) 図 3 A 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 / d s O D N 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) d s O D N D P P I V 及び (B) d s O D N A p o B と複合体を形成し、pH 6 . 5 (M E S) 及び pH 8 (T A E) 中で 0 . 5 時間、4 時間、及び 2 0 時間インキュベートしたキトサン 9 2 - 1 0 を示している。図 3 B 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 / d s O D N 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 9 2 1 0 は d s O D N R e c Q L 1 と複合体を形成して、かつ pH 6 . 5 (M E S) 及び pH 8 (T A E) 中で 0 . 5 時間、4 時間、及び 2 0 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、s i R N A を模倣した d s O D N は放出され、ゲル中に移動する。

10

【図 4】(0 0 6 4) 図 4 A は pH 6 . 5 でのキトサン / s i R N A ナノ粒子の安定性における柱状図を示している。異なる D D A 及び MW のキトサン製剤は、N : P 比が 5 及び 1 0 で 3 つの異なる抗 A p o B s i R N A 配列 (s i A p o B 1、s i A p o B 2、及び s i A p o B 3) と複合体化し、かつ 2 0 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 R i b o g r e e n (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 4 B 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。9 2 % の D D A 及び異なる MW のキトサンが、異なる N : P 比で抗 R e c Q L 1 s i R N A と複合体化した。図 4 C 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。8 0 % の D D A 及び異なる MW のキトサンが、異なる N : P 比で抗 R e c Q L 1 s i R N A と複合体化した。図 4 D 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。7 2 % の D D A 及び異なる MW のキトサンが、異なる N : P 比で抗 R e c Q L 1 s i R N A と複合体化した。図 4 E は、動的光散乱で測定した、R e c Q L 1 s i R N A 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、9 2 % の D D A、1 0 の分子量を有するキトサンは、増加する濃度の抗 R e c Q L 1 s i R N A と複合体化した。

20

【図 5】(0 0 6 5) 図 5 は、異なる pH において、D D A、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 D D A、MW のキトサンが、異なる N : P 比で抗 M D R 1 s i R N A 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、s i R N A の放出を R i b o g r e e n (登録商標) アッセイを用いて測定した。

30

【図 6】(0 0 6 6) 図 6 A は、キトサン / d s O D N ナノ粒子のヌクレアーゼ保護アッセイ : (A) d s O D N D P P I V と複合体を形成したキトサン (9 2 1 0 5 又は 8 0 1 0 1 0)、(B) D N A s e I 消化後に残った d s O D N D P P I V、(C) d s O D N A p o B と複合体を形成したキトサン (9 2 1 0 5 又は 8 0 1 0 1 0)、(D) D N A s e I 消化後に残った d s O D N A p o B、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、0 U D N A s e I = 強度 1 0 0 %)。図 6 B は、キトサン / d s O D N ナノ粒子のヌクレアーゼ保護アッセイ : (A) d s O D N R e c Q L 1 と複合体を形成したキトサン (9 2 1 0 5、8 0 4 0 5、又は 8 0 1 0 1 0)、及び (B) D N A s e I 消化後に残った d s O D N R e c Q L 1、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、0 U D N A s e I = 強度 1 0 0 %)。

40

【図 7】(0 0 6 7) 図 7 A は、いくつかの細胞株でのトランスフェクションから 2 4 時間後の d s O D N / ナノ粒子の細胞内取り込み : (A) H e p G 2 細胞株におけるキトサン (9 2 1 0 5、8 0 8 0 5、又は 8 0 1 0 1 0) / 5 ' 6 F A M 標識 d s O D N D P P I V の取り込み ; 及び (B) H e p G 2、H E K 2 9 3、及び R A W 2 6 4 . 7 細胞におけるキトサン (9 2 1 0 5、8 0 8 0 5、又は 8 0 1 0

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 7 B 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: AsPC1、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 / dsODN 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 と複合体化した。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ンネルを表しており、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 と複合体化した。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ンネルを表しており、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。MCF7MDR 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 と複合体化した。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ンネルを表しており、合成画像を左下部分に示す。

【図 11】(0071) 図 11 A 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 11 B 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D μ 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、安楽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D μ 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)D μ 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、D μ 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)D μ 1のマウスの、サフラニン O / 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(O)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D μ 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RNA i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RNA i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RNA i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、RecQL1DNAヘリカーゼ、又はDDX5-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、市販のリボ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, Gene's 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dsRNA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を用いて非ヒト霊長類において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、及び低密度リボ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効果が実証された。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

20

【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, 16; 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、所望の生物学的効果を達成する。

30

【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位置でのホスホロ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

40

50

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 s i R N A 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 R N A 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、s i R N A 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、所望の生物学的効果を達成する。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ボで試験されており、s i R N A 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である。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、インビボでのその有効な使用が妨げられている。

【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 D O P E (ジオレオイルホスファチ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1つである。そ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、かつインビボ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連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

20

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 (R o m o r e n e t a l . , 2 0 0 3 , I n t J P h a r m , 2 6 1 : 1 1 5 - 1 2 7) 。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されてきた。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 (P L L) 、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ジアミン (P E I) 、ポリプロピレンジアミン、及びポリアミドアミンデンドリマーが挙げられる。

【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

50

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。PEI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、リソソーム隔離と呼ばれる現象である、リソソーム中でのPEI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】

(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】

(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】

(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。Huang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見出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ったのは、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、Laverette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ポソーム(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。

【0081】

(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(Ma et al., 2009, Biomacromolecules)

10

20

30

40

50

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(Koping 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、Koping 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(Danielson 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、Laverteru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、及びポリプ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(Koping 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。Laverteru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向上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、その結果ポリプレックスの正電荷(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、Laverteruら(2006, Biomaterials, 27:4815-4824)によるインビ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(Laverteru et al., 2006, Biomaterials, 2

10

20

30

40

50

7 : 4 8 1 5 - 4 8 2 4)。従って、DDA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Mnを減少/増加させなければならない。

【0084】

(00101) 上述したように、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している。Laver tuら(2006, Biomaterials, 27: 4815-4824)は、pHが上昇すると、プラスミドDNAを用いた最も効率的な製剤のためのMnはより高いMnの方へ移動し、それはより高いpHでのキトサンと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DDA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Mnはより低いMn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-DNA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。

10

【0085】

(00102) pDNAとsiRNA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siRNAの送達のために使用されてきた(de Fougereolles et al., 2007, Nat Rev Drug Discov, 6: 443-453; Howard et al., 2006, Mol Ther, 14: 476-484; Katas and Alpar, 2006, J Control Release, 115: 216-225; Zimmermann et al., 2006, Nature, 441: 111-114; 及びLiu et al., 2007, Biomaterials, 28: 1280-1288)。しかしながら、またsiRNA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、siRNA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pHであるpH7.9で評価された。このpHでは、キトサンは、その見かけのpKaが6.5に近いため、主に脱プロトン化されており、それ故、siRNA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pKaよりも高いpHで見られるキトサンのsiRNA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pH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、複数の非特異的效果を生み出し、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。

20

30

【0086】

(00103) 例えば、siRNAの送達において、中間のDDA(80%)及び高いMn(64-170 kDa)は、低分子量のキトサン(10 kDa)よりも明らかに効率的であることが報告された(Katas et al., 2006, J Control Release, 115: 216-225; 及びLiu et al., 2007, Biomaterials, 28: 1280-1288)。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(Howard et al., 2006, Mol Ther, 14: 476-484; 及びRichardson et al., 1999, Int J Pharm, 178: 231-243)。更に、キトサン/siRNA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 > 25)でのみ効率的であると同様に結論づけていた(Howard et al., 2006, Mol Ther, 14: 476-484; Katas et al., 2006, J Control Release, 115: 216-225; Liu et al., 2007,

40

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(Ma et al., 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 pK_a 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必要で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、10 kDa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(Illium, 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、 M_n が10-500 kDa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 Fougereolles 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

40

【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。Katas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-HCl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(470 kDa、270 kDa、160 kDa、及び110 kDa)を使用して、25 µg/ml (1:25:1)から300 µg/ml (15:1)へのキトサン濃度の上昇は、ナノ粒子サイズを約150 nmから450 nmに増加させることを彼らは見出した(Ka

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(Ma 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、470kDa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)。470kDa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EGFP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114kDaのキトサンを使用した。より高いN:P比では、250µg/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 = 223.6nm vs N:P 33 = 181.6nm)(Howard et al., 2006, Mol Ther, 14: 476-484)。より高いキトサン濃度(1mg/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139nmと比較して、328nm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30µg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）Ji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、Ji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、Liu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関していた。更に、Liu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（イソヘキシル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Nanogene 042を研究した（Zhang et al., 2005, Nat Med, 11:56 62）。Zhangらは、shRNA系のプラスミドを使用して、イン

40

50

ピボでの低下したウイルス価及びウイルス負荷 (viral titer load) と合わせて、NS1 遺伝子の効率的なサイレンシング、及びRSV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: 5662)。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 (Southeast 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10kcal%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形試料の供給は、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、市販のリボソームである Dharm a F E C T (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、Dharm a F E C T (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ボプレックス (Dharm a F E C T (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)

。キトサンと複合体化したdsODNと、未修飾siRNA ApoB (Seq 1、SEQ ID NO: 5)と、適度に修飾されたsiRNA ApoB (Seq 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。一方で、完全に修飾されたsiRNA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。

【0105】

(00122) 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200nm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

【0106】

(00123) キトサン/siRNAの安定性を、蛍光に基づくアッセイであるRibogreen 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siRNAを定量した。結果から、N:P比が5及び10のキトサン/siRNAナノ粒子は、pH6.5で最大20時間安定であったことが示された。キトサン80105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8010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8010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4Aを参照のこと)。

20

【0107】

(00124) 本明細書に記載の製剤は、明らかな細胞毒性なしで、市販のリボソームであるDharmaFECT(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が明確に示された(例えば図11A及び11B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、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に達した(例えば図7A及び7Bを参照のこと)。低分子量(10kDa)及び高DDA(92%)のキトサンが最も効率的(図11及び12)であり、かつより小さい(図4B)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

【0108】

(00125) 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ApoBの血漿濃度を約30%低下させたことが記載されている(図13)。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ApoB血清濃度と同様のApoB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、明らかにかなる毒性なしに、LDL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14)。また、siRNAを含むキトサン系の治療用ナノ複合体(TNC)は、血清中の正常ALT/AST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

【0109】

(00126) 更に、TNC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、TNC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15)。同様に、キトサン系のTNC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16)。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ApoB及びLDL 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、非複合体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の血漿中で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、明らかでない炎症又は肝臓毒性を有せずに、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のためのリボ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、同様に又はより高いApoB/VLDL/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, 111:111-114; Soutschek et al., 2004, Nature 432:173-178)。例えば、脂質製剤(SNALP)と一体となった5mg/kg⁻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, 111:111-114)。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 OGD(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、3mg/kg⁻¹にてLDLの約70%の減少が示された(Tadin Strapps 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、50mg/kg⁻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25mg/kg⁻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50mg/kg⁻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(50mg/kg⁻¹ 2回/週)。

【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 Apo B の減少における効率を明確に実証する。更に、Apo B 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、血漿中での Apo B 及び LDL/VLDL C の減少の強化につながることを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、膵臓癌、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、陰癌、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、P-gp の輸送活性を阻害する、P-gp 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、P-gp 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、P-gp 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。p-gp 阻害による RNAi 仲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 (Nietz 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 200 nM の siRNA を用いて、高耐性 MDR 細胞株に対して、MCF-7/ADR 及び A2780Dx5 において P-gp 濃度を 65% 抑制することができた。更に、彼らは、MDR1 標的 siRNA は、p-gp 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 P-gp 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 によって仲介される P-gp 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 (100 nM) の siRNA の使用にもかかわらず、膵臓癌由来の細胞株 (EPP85 181 RDB) 及び胃癌細胞 (EPG85 257 RDB) において達成された (Nieth et al., 2003, FEBS letters 545 (2 3): 144 - 150)。最近、Donmezら (2011, Biomedicine and Pharmacotherapy 65 (2): 85 89) は、濃度は 20 nM と低いが、ドキソルビシン耐性 MCF 7 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 / P gp 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 SKOV 3 TR 及び OVCAR8 TR の卵巢癌細胞株での MDR1 / P gp 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、Stegerら (2004, Cancer gene therapy 11 (11): 699 706) は、shRNA 発現ベクター (psiRNA / MDR A) を非常に高い薬物耐性を有するヒト胃癌細胞株の EPG85 257 RDB へ導入することにより、P gp 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、K5 62 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 発現カセット及び 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 / P gp 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 (2 3): 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つの市販のリボ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されてきた。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 P gp 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、アシピシン; アクリルピシン; 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; アスバラギナーゼ; アス

ペルリン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマスタット；ベンゾデパ；ビ
 カルタミド；塩酸ピサントレン；ビスナフィドジメシレート（Bisnafide Di
 mesylate）；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；ブスルファン；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；塩酸カルピシン；カルゼレシン；セデフィンゴール；
 クロラムブシル；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；塩酸ダウノルピシン；デシタビン；デキソルマブラチン；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；ドキシソルピシン；塩酸ドキシソルピ
 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
 ブラチン；エンプロマート；エピプロビジン；塩酸エビルピシン；エルプロゾール；塩酸
 エソルピシン；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
 ；エトボシド；リン酸エトボシド；エトプリン；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；塩酸イダルピシン；イホスファミド；イルモホシン；インターフェロン
 2 a；インターフェロン 2 b；インターフェロン n 1；インターフェロン n
 3；インターフェロン 1 a；インターフェロン 1 b；イプロブラチン；塩酸イリ
 ノテカン；酢酸ランレオチド；レトロゾール；酢酸リユープロリド；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；メトトレキサート；メトトレキサートナトリ
 ウム；メトプリン；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；
 ミトスベル（Mitosper）；ミトタン；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；オルマブラチン；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）；ペンタムスチン（Pent
 amustine）；硫酸ペプロマイシン；ペルホスファミド；ピボプロマン；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；ブレドニムスチン；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；スパルホサー
 トナトリウム；スパルソマイシン；塩酸スピロゲルマニウム；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
 モポルフィン；テニボシド；テロキシロン（Teroxirone）；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；チラバザミン；塩酸トボテカン
 ；クエン酸トレミフェン；酢酸トレストロン（Trestolone Acetate）
 ；リン酸トリシリピン；トリメトレキサート；グルクロン酸トリメトレキサート；トリブ
 トレリン；塩酸ツプロゾール；ウラシルマスタード；ウレデパ；バブレオチド；ベルテポ
 ルフィン；硫酸ビンブラスチン；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）；酒石酸ビノレルピン；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
 は塩酸ゾルピ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、20 epi 1，25ジヒドロキシビタミンD
 3；5 エチニルウラシル；アピラテロン；アクラルピシン；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；アムルピシン
 ；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 dorsa lizing morphogenetic prot
 ein 1)；抗アンドロゲン、前立腺癌；抗エストロゲン；アンチネオブラストン；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
 ；バックチンIII誘導体；パラノール；パチマスタット；BCR/ABLアンタゴニスト 10
 ト；ベンゾクロリン；ベンゾイルスタウロスポリン；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；ピカルタミド；ピサントレ
 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；カルシボトリオール；カルフォスチン
 C；カンプトテシン誘導体；カナリアボックスIL 2；カペシタビン；カルボキサミド
 アミノ トリアゾール；カルボキシアミドトリアゾール；CaRest M3；CAR
 N 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；セクロピン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；クラドリピン；クロミフェン類似体； 20
 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；克蘭ベシジン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；シクロペンタントラキノン(c
 yclo pentanthraquinone)；シクロプラタム(cycloplat
 am)；シペマイシン；シタラピ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)；デシタビン；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)；デクスラゾキサナ；デク
 スベラパミル；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； 30
 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)；エミテフル；エビル
 ピシン；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ピシン
 (fluorodaunorubicin 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；ガロシタビン；ガニレリクス；ゼラチナーゼ阻害剤；ゲムシタビン；グル
 タチオン阻害剤；ヘブスルファム；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；イダルピシン；イドキシフェン；イドラマントン；イルモホシ
 ン；イロマスタット；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；ヨードドキソルピシン；イボメアノール、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(iso
 bengazole)；イソホモハリコンドリノ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+プロゲステロン；リユーブ
 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； 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
 ；ロキシリピン；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；マリマスタット；マソプロコール；マスピン；
 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；メトクロブラミド；M I F 阻害剤；ミフェプリストン；
 ミルテホシン；ミリモスチム；ミスマッチ二本鎖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 (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
 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 s k ；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
 スタード抗癌化合物；ミカベルオキシドB；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリアボロ
 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 + ベンタゾシン；ナバビン (n a p a v i n) ；ナフテ
 ルピン；ナルトグラスチム；ネダブラチン；ネモルピシン；ネリドロ酸；中性エンドペ
 プチダーゼ；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；オナプリストン；オندانセトロン；オندانセトロン；オ
 ラシン；経口サイトカイン誘発剤；オルマブラチン；オサテロン；オキサリプラチン；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
 ミトイルリゾキシシン；パミドロ酸；パナキシトリオール；パノミフェン；パラバクチン
 ；パゼリブチン；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；ピラルピシン；ピリトレキシム；プラセチンA (p
 l a c e t i n A) ；プラセチンB (p l a c e t i n B) ；プラスミノゲン活性
 化因子阻害剤；白金錯体；白金化合物；白金 トリアミン錯体；ポルフィマーナトリウム
 ；ポルフィロマイシン；プロピルビス アクリドン；プロスタグランジンJ 2 ；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；プリ
 ンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤；ブルブリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル
 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；脱メチル化レテリブチン；レニウムRe 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B 1 ；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；ボロカブタイトナトリウム；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) ；スパルホス酸；スピカマイシンD；スピロムスチン；ス
 プレノペンチン；スポンギスタチン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；テコガラナトリウム；テガフル；テルラピリリウム；テロメラゼ阻害
 剤；テモポルフィン；テモゾロミド；テニボシド；テトラクロロデカオキシド；テトラゾ
 ミン；サリブラスチン (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ブリン (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 ; トボ
 テカン ; トプセンチン ; 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 ; トリシリピン ; 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 ;
 ベルテボルフィン ; ビノレルビン ; ビンキサルチン (vinxaltine) ; ビタキシ
 ン ; ポロゾール ; 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チマラ
 マー、が挙げられる。

【0123】

(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、レセルピン) ; チオール枯渇剤 (Thiol depleter) (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 Cremaphor EL がある。

【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 (Piritrexim Isethionate) ; 抗前立腺肥大化合物、シトグルシド (Sitogluside) ; 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
 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 13
 1、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 12
 5、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 2
 03、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 99
 m 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
 サメタジウム、テクネチウム Tc 99m フリホスミン、テクネチウム Tc 99m グルセプテ
 ート、テクネチウム Tc 99m リドフェニン、テクネチウム Tc 99m メプロフェニン、
 テクネチウム Tc 99m メドロネート、テクネチウム Tc 99m メドロネート二ナトリウ
 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 テトロホスミン、テクネチウム
 Tc 99m チアチド、チロキシニン I 125、チロキシニン I 131、トルボビドン 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。

【0125】

(00142) 本明細書で使用する時、「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

10

20

30

40

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、I I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の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分、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： $C_2(NH-CO-CH_3$ 又は $NH_2)$ 、 $C_3(OH)$ 、又は $C_6(CH_2OH)$ 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、Lipofectin(登録商標)、Lipofectamine(登録商標)、Cellfectin(登録商標)、ポリカチオン(例えばポリリジン)、又はリボ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時、「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、ピグアニジン誘導体、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 (Laver tu et al., 2006, Biomate
rials, 27: 4815-4824; Laver tu 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、F ACS、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: CACU
CUAACUGAUUACUUA, SEQ ID NO: 1; DPP IV Seq 2:
UAGCAUAUGCCCAAUUUA, SEQ ID NO: 2; DPP IV S
eq 3: CAAGUUGAGUACCUCCUUA, 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: GUCAUCACA
CUGAAUACCAAU, (アンチセンス鎖は、2個のヌクレオチド (AC) の3'オ

オ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 AdTdT 3', SEQ ID NO: 7; ApoB seq 2 (アンチセンス) 5' UUU CAA UUG UAU GUG AGA GUU oU oU 3' (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 Strappsら (2010, Nucleic Acids Research, Vol. 38, No. 14) によって公表された。

【0135】

(00151) RecQL1 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 (Seq 1: 5' GUUCAGACCAUUCAGCUUdTdT 3', SEQ ID NO: 10)。この配列は、Futami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 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' GCUGAUCU AUGCAUCUUAUUU 3', SEQ ID NO: 11; Seq 1 (アンチセンス): 5' AUAAGAUGCAUAGAUCAGCUU 3'; SEQ ID NO: 12; Seq 2 (センス): 5' GACCAUAAAUUGUAAGGUUUUUU 3', SEQ ID NO: 13; Seq 2 (アンチセンス): 5' AAACCUUACA UUAUGGUUCUU 3', SEQ ID NO: 14; Seq 3 (センス): 5' GAAACUGCCUCAUAAAUUUUUU 3', SEQ ID NO: 15; Seq 3 (アンチセンス): AA AUUUAUGAGGCAGUUUCUU 3', SEQ ID NO: 16; Seq 4 (センス): 5' UCGAGUCACUGCCUAAAUAAU 3', SEQ ID NO: 17; Seq 4 (アンチセンス): 5' UUAUUAG GCAGUGACUCGAUU 3', SEQ ID NO: 18 から構成された。

【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 (6FAM) 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 (deoxyribosylation) 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

10

20

30

40

50

レsein (6FAM) 5' 標識 dsODN を使用した (Integrated DNA technologies 社、米国)。

【0138】

(00154) 特定の Mn 及び DDA 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 5 mg/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 (92 10 5、92 150 5、80 40 5、80 10 10、80 10 5、80 200 5、及び 80 80 5) は、100 µL の希釈したキトサン溶液に、それぞれ 0.05 µg/µL の濃度の 100 µL 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。0.33 µg/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、0.1 µg/µL の濃度は DLS 及び ESEM 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、0.976 g/L の MES 及び 0.84 g/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。0.05 µg/µL (3,704 nM) の濃度の 100 µL 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 0.025 µg/µL (1,852 nM) となり、ナノ粒子を、ウェル当たり (10 pモル/ウェル) 100 nM の siRNA に等しい 0.00135 µg/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。0.05 µg/µL (3,717 nM) の濃度の 100 µL 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 0.025 µg/µL (1,858 nM) となり、ナノ粒子を、ウェル当たり (60 pモル/ウェル) 600 nM の dsODN に等しい 0.00135 µg/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 6FAM 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 500 µL (24 ウェルプレート) 又は 100 µL (96 ウェルプレート) 補充し、最終濃度を 100 nM/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体化 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の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）のリボプレックス（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）、Raw264.7（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（MCF7 MDR）、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。

【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・キットサナーゼで補充された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

【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、oligo dTプライマーを用いた逆転写反応に使用した。キットサン/ siRNA処理した細胞の遺伝子定量を、ABI PRISM（登録商標）7900HT 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（ $CT = Ct_{\text{標的}} - Ct_{\text{内在性コントロール}}$ ）、標準物質と比較した： $CT = Ct_{\text{試料}} - Ct_{\text{標準物質}}$ 。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。

【実施例4】

【0144】

ナノ粒子分析

(00160)キトサン/dsODN及びキトサン/siRNA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、50µlのキトサンを50µlのdsODN又はsiRNAと混合し、その後、10mMのNaClを用いて500µlで完成した。ゼータ測定について、ナノ粒子を500µlの10mMNaClを用いて1:2に希釈した。キトサン/dsODNのナノ粒子の全ての製剤は、DLSで測定したところ、45-156nmの範囲にあった。キトサン/siRNAナノ粒子は、siRNA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、DLSでの測定から55-105nmの範囲の平均直径を有していた(表2)。siRNA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-siRNAのナノ粒子は、104-130nm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dsODNと、未修飾siRNA ApoB(配列1;SEQ ID NO:5)と、適度に修飾されたsiRNA ApoB(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siRNA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/dsODN及びキトサン/siRNA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DDA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。DLS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ESEMではサイズのみを測定した。

10

20

【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s i RNA-RecQL1又はs i RNA-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s i RNA-DPP-IV、ODN-ApoB、又はs i RNA-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s i RNA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s i RNA 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 (s i RNA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 (s i RNA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 (s i RNA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

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、ESEM画像分析サイズ決定とDLSサイズデータとを比較することで分析した。

【0147】

(00162) 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1A、1B、2A、及び2B)を示している(表2、ESEM)。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

【0148】

(00163) キトサン/dsODNナノ粒子及びキトサン/siRNAナノ粒子の形成及び安定性は、異なる方法を用いてpH6.5及び8にて最大20時間試験した。キトサン/dsODNナノ粒子を形成し、これは弱酸性のpH(pH6.5)でN:P比が2超にて最大20時間安定した(図3A及び3B)。ナノ粒子の形成から4時間後では、検出可能なdsODNはN:P比が1以上(pH6.5)では観察されなかった一方で、完全なdsODNの放出が同一のN:P比でpH8にて観察された。より長い暴露時間の20時間では、ApoBのdsODNにおいてN:P比が2でdsODNの放出がもたらされ、一方で、より高いN:P比(N:P10)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dsODN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/siRNAの安定性を、蛍光に基づくアッセイであるRibogreen 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siRNAを定量した。結果は、N:P比が5及び10のキトサン/siRNAナノ粒子は、pH6.5で最大20時間安定であることを示した。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った(図4A及び5)。従って、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った。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pH8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。

20

30

【0149】

(00164) キトサンパラメータ(DDA、MW、及びN:P比)の効果は、例えば、抗RecQL1 siRNAを用いて調査した。キトサンのMW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4B、4C、及び4D)。DDA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

【0150】

(00165) siRNA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siRNA濃度において増加したナノ粒子サイズを示している(図4E)。

【0151】

(00166) 低いN:P比でdsODN配列を保護するキトサンの能力は、DNase I保護アッセイを用いて評価した。キトサン/dsODNのナノ粒子(6 µl)を、(pH6.5)20 mMのMES、1 mMのMgCl₂、及びDNase 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 で30分間インキュベートした。反応を2 µlのEDTA(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ナー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%、105%、80%、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

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スフェクトし、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せずに、市販のリボソームである DhamaFECT (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。

10

【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)。

20

【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、市販のリボプレックスである 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。

30

【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 1 mg/kg の siRNA を注射した。ApoB 遺伝子を標的とする 1 mg/kg 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 0.2 ml とした (例えば、1:1 の比率でのキトサン92 10 5 と 0.5 µg/µl の 78 µl の siRNA 量 (37, 037 nM) との複合体形成後に、1 mg/kg の投与量として計算される、39 g のマウスに対して 39 µg の siRNA の注射量を投与した)。その後、156 µl の全量を投与した。複合体形成後の siRNA 濃度は、0.25 µg/µl (18, 518 nM) 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 5) 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

40

50

～ C 5 ; n = 4 / 群) を表 3 のスケジュールに従って異なる時に T N C 処理した。様々な C 5 7 B L / 6 マウス群 (群当たり n = 4 動物) における、 1 mg kg^{-1} の抗 A p o B s i R N A の用量でのキトサン / s i R N A A p o B 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、T N C 9 2 1 0 5 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 T N C 9 2 1 0 5 (M n D D A 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 2 0 1 1 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群としての役割を果たし、D μ 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 s i R N A 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 s i R N A を注射した。この調査に用いた動物の総数は 3 2 匹であった。

【 0 1 5 9 】

【表 3】

動物実験スケジュール

日	群							
	C1 (n=3)	C2 (n=4)	C3 (n=4)	C4 (n=4)	C5 (n=4)	D α (n=4)	D β (n=4)	D μ (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						D α - 2 日	D α	
						注射 (n=2)	n=2	
20/01/ /11						安楽死 D α - 2 日		
26/01/ 11	安楽死 (C1, C2, C3)							
27/01/ 11				安楽死 (C4, C 5)			安楽死 (D α , D β , D γ)	

【 0 1 6 0 】

(0 0 1 7 4) 全ての動物は、モントリオール大学の動物倫理委員会 (C D E A) 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

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 s i R N A 処理群（ $n = 4$ ）を含む全ての処理群に高脂肪の固形試料の D 1 2 4 9 2 を供給した（表 3）。D μ 群（ $n = 4$ ）には通常の固形試料の D 1 2 4 5 0 B 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 9 2 1 0 5 を用いて、 1 mg k g^{-1} の A p o B s i R N A を注射した。3 週間の注入の最後は、C 1、C 2、C 3、C 4、C 5 群を安楽死させる 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、安楽死の 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 1 mg k g^{-1} にて複合体化されていない裸の A p o B s i R N A 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

【 0 1 6 1 】

（ 0 0 1 7 5 ）実験スケジュールの間、調査が完了するまで、T N C 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。

【 0 1 6 2 】

（ 0 0 1 7 6 ）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 V i t a T e c h 社で行った。血清中の A p o B 減少における定量は抗 A p o B E L I S S A により行い、一方で L D L / V L D L 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 エオシン染色で行い、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ニン O / ファストグリーン / 鉄 ヘマトキシリンで染色した。

20

【 0 1 6 3 】

（ 0 0 1 7 7 ）全ての動物の血液学的及び生化学的な分析は、安楽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（A L T）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（A S T）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（C 5）と陽性対照群（D）との間の A L T 及び A S L 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 A p o B s i R N A の T N C 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

【 0 1 6 4 】

（ 0 0 1 7 8 ）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、s i R N A A p o B 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 C 5 2 にはキトサン / s i R N A A p o B 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

【 0 1 6 5 】

【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 Apo B の市販の ELISA キット (Uscn Life science 社、中国) を用いて評価した。Apo B 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 $\sim 35\%$ 減少した Apo B 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。

【0168】

(00181) Apo B 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、血漿中での Apo B 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 / 血漿中での Apo B 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 Apo B 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せずに、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。

30

【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ったので、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 (Bio Assay 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、 $\sim 20\%$ 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、Apo B 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、Apo B 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 1 3 及び 1 4 ）。

【 0 1 7 1 】

（ 0 0 1 8 4 ）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 D 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 D から肝臓切片は、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 1 5 ）。逆に、C 4、C 5、及び D 2 群は、陽性対照 D と類似した脂肪肝を提示し（図 1 5 ）、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

【 0 1 7 2 】

（ 0 0 1 8 5 ）サフラニン 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 1 6 ）。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 1 6 ）。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 1 6 ）。更に、D 2 日と未処理の陽性対照 D 3 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 1 6、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

【 0 1 7 3 】

（ 0 0 1 8 6 ）図 1 5 と 1 6 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 1 3 と 1 4 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

【 0 1 7 4 】

（ 0 0 1 8 7 ）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 1 7 ）。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に留意されたい。例えば、C 4 及び C 5 群はそれぞれ調査の 3 週目及び 4 週目にそ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 1 7 ）。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 2 0 1 0 年 1 2 月 2 8 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 2 0 1 1 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 1 8 で認められる体重増加率と合致する。

40

【 0 1 7 5 】

（ 0 0 1 8 8 ）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】

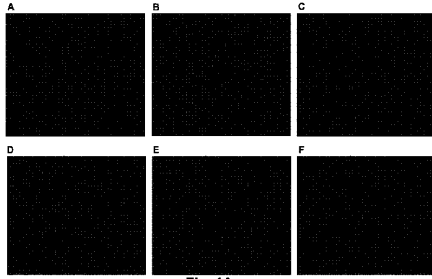


Fig. 1A

【図 1 B】

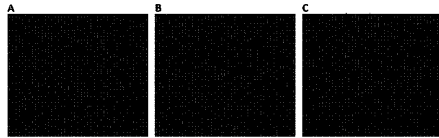


Fig. 1B

【図 2 A】

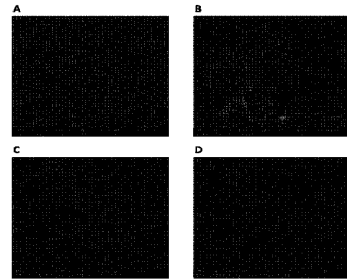


Fig. 2A

【図 2 B】

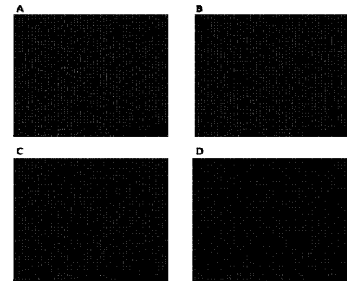
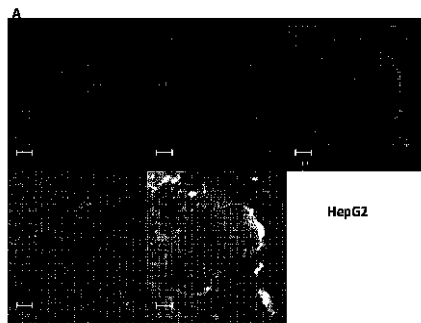
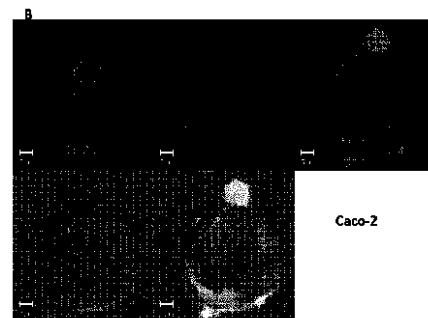


Fig. 2B

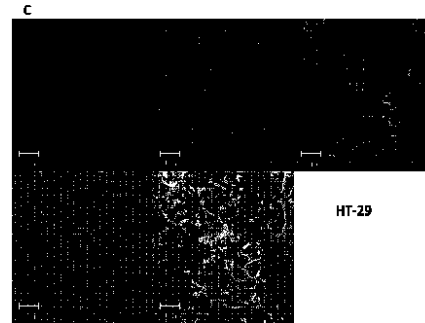
【図 8 A】



【図 8 B】



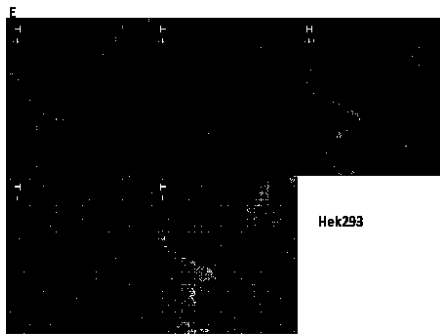
【図 8 C】



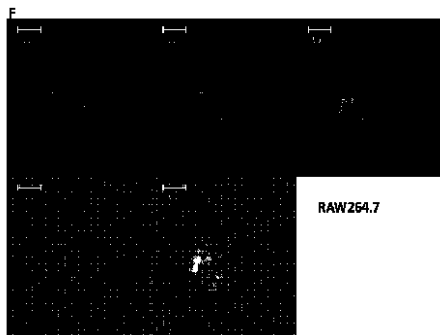
【図 8 D】



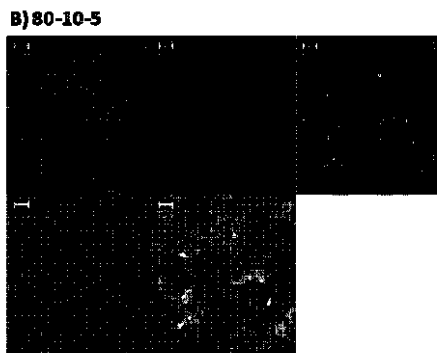
【図 8 E】



【図 8 F】



【図 10 B)】



【図 9】

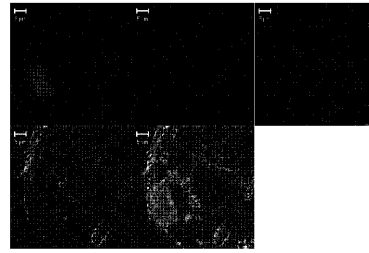
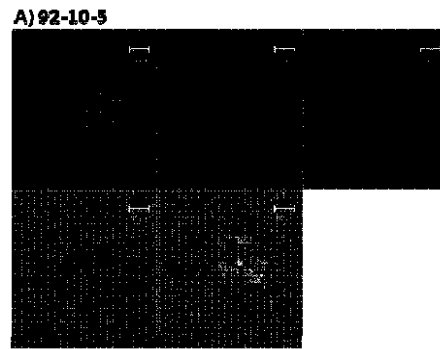
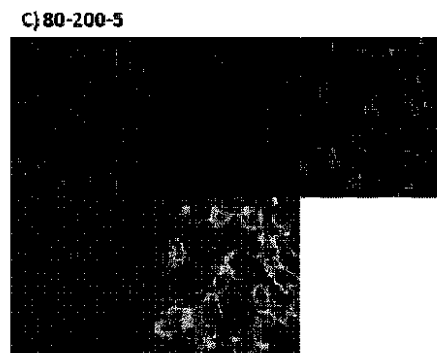


Fig. 9

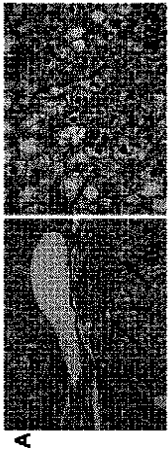
【図 10 A)】



【図 10 C)】



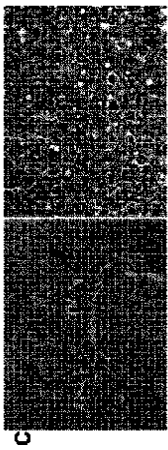
【図 15 A】



【図 15 B】



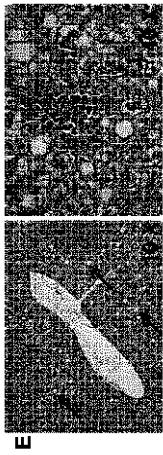
【図 15 C】



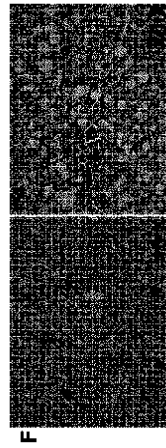
【図 15 D】



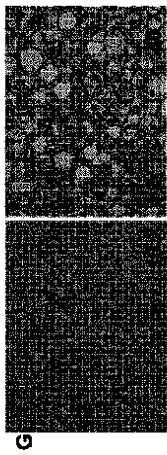
【図 15 E】



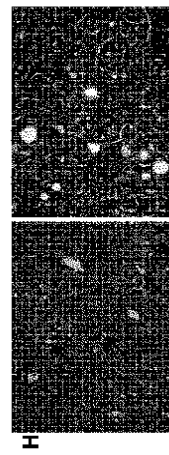
【図 15 F】



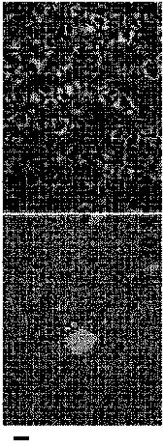
【図 15 G】



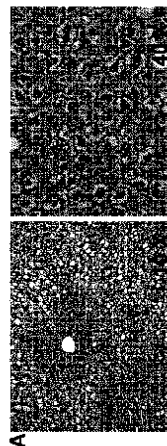
【図 15 H】



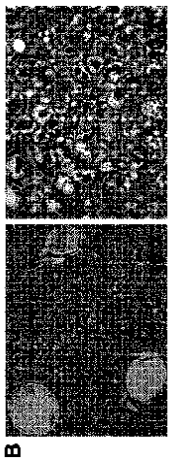
【図 15 I】



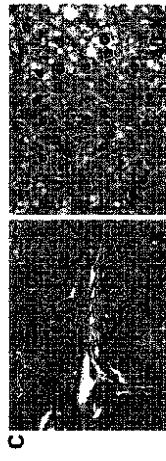
【図 16 A】



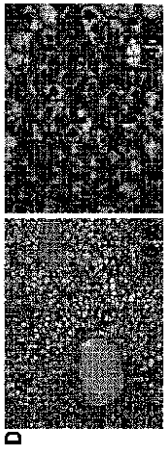
【図 16 B】



【図 16 C】

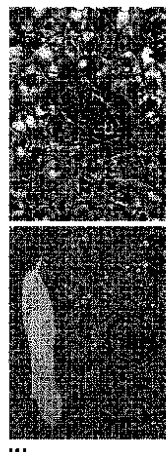


【図 16 D】



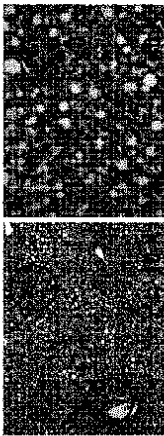
D

【図 16 E】



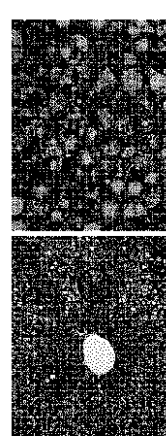
E

【図 16 F】



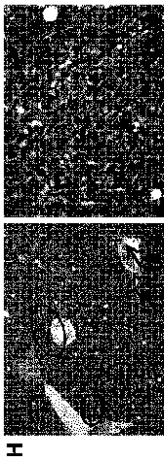
F

【図 16 G】

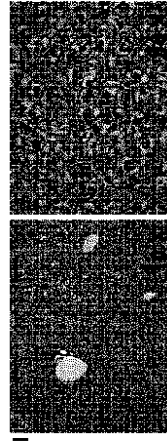


G

【図 16 H】



【図 16 I】



【図 3 A】

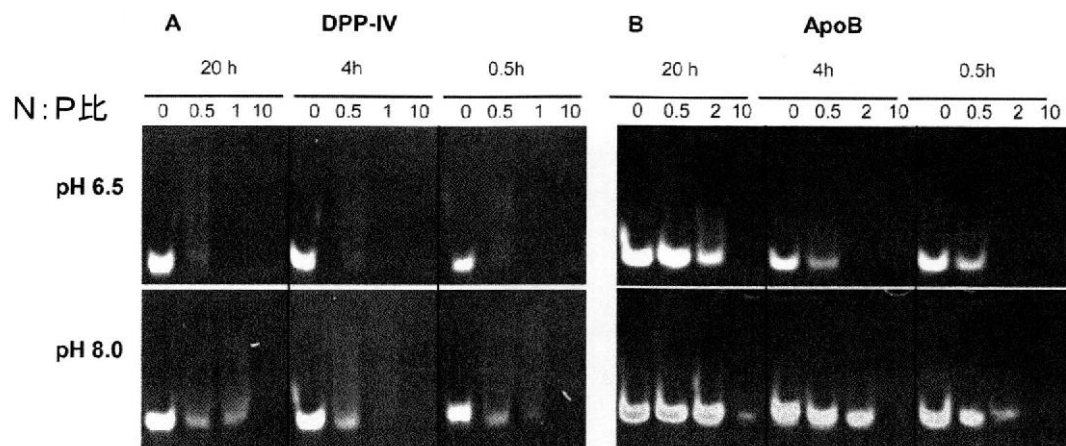


Fig. 3A

【 図 3 B 】

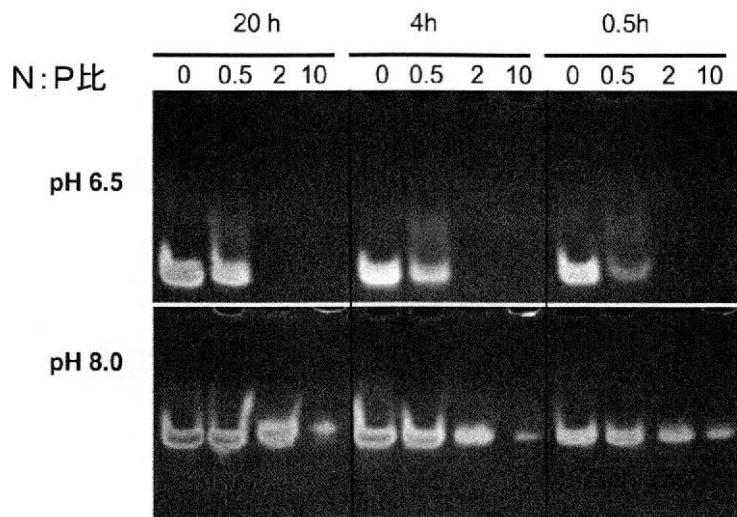


Fig. 3B

【 図 4 A 】

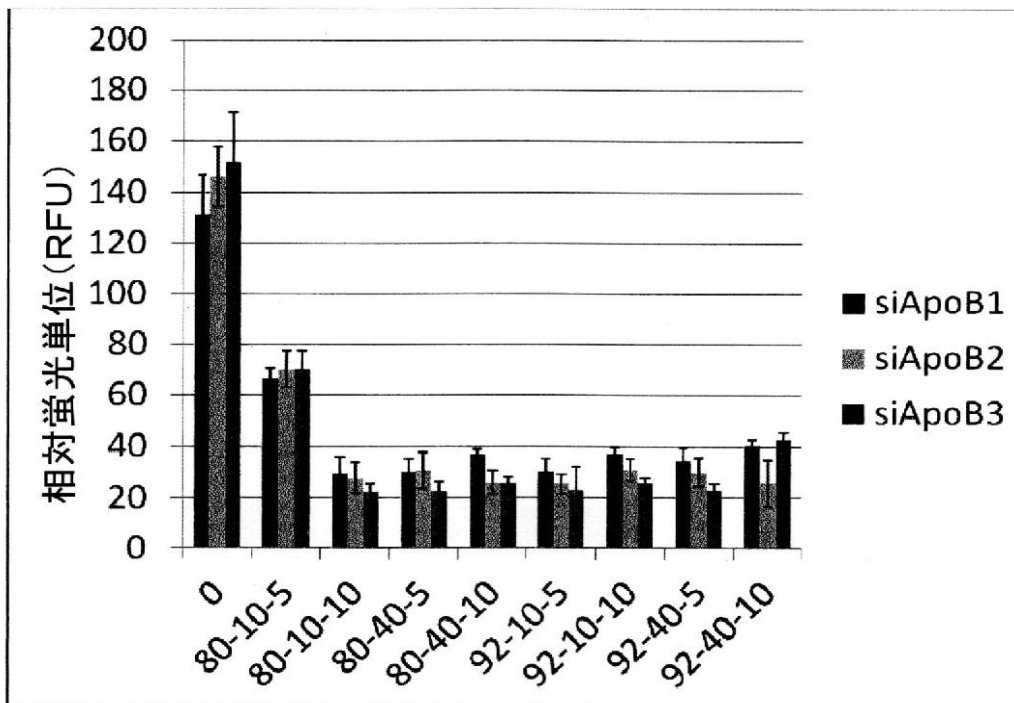


Fig. 4A

【図 4 B】

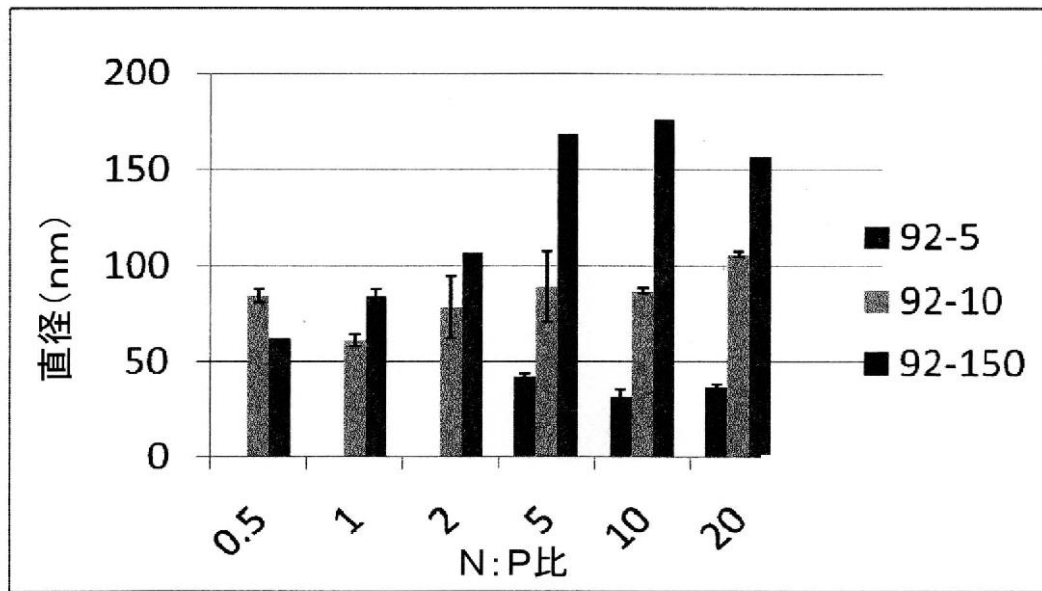


Fig. 4B

【図 4 C】

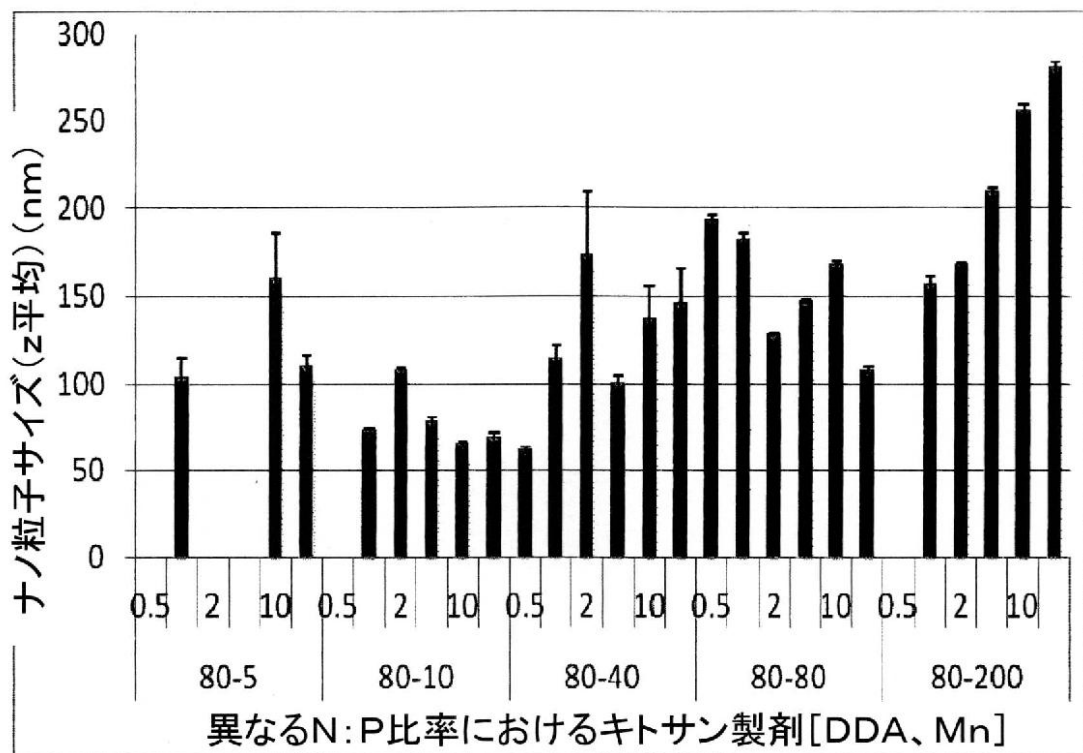


Fig. 4C

【図 4 D】

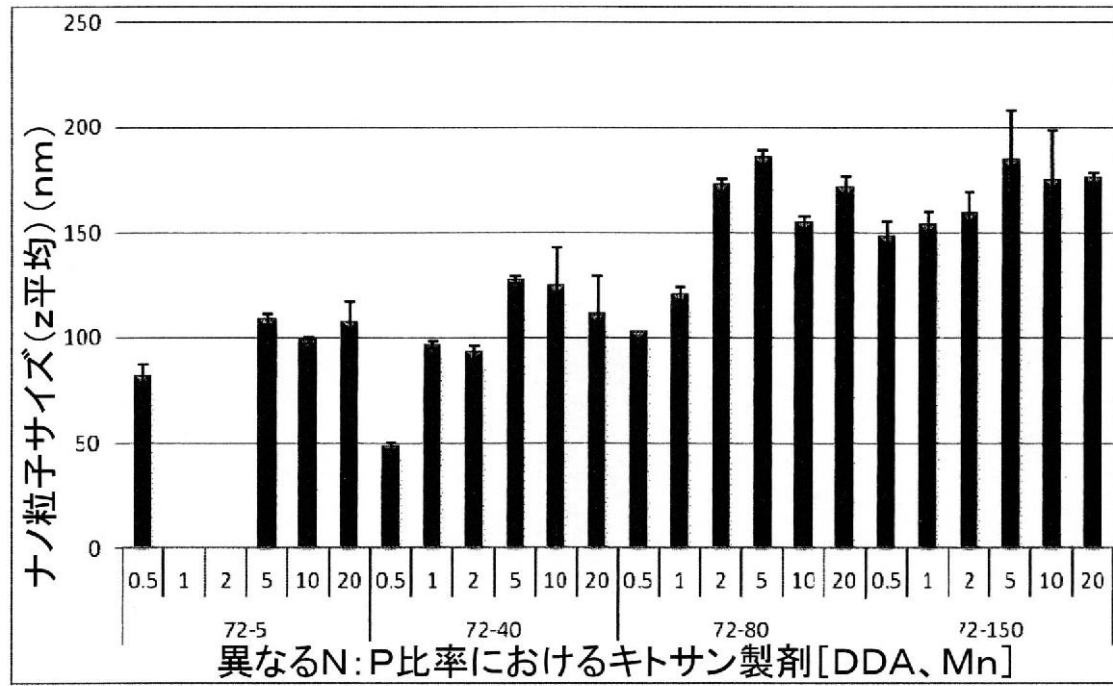


Fig. 4D

【図 4 E】

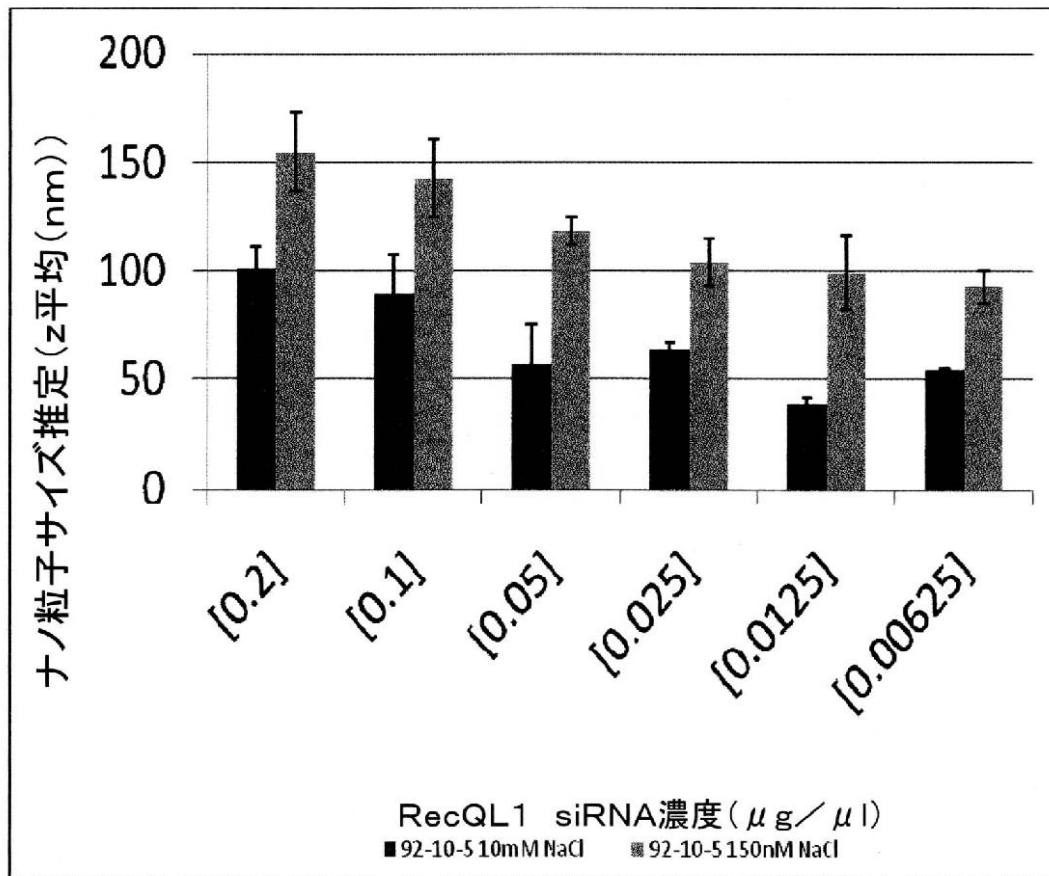


Fig. 4E

【 図 5 】

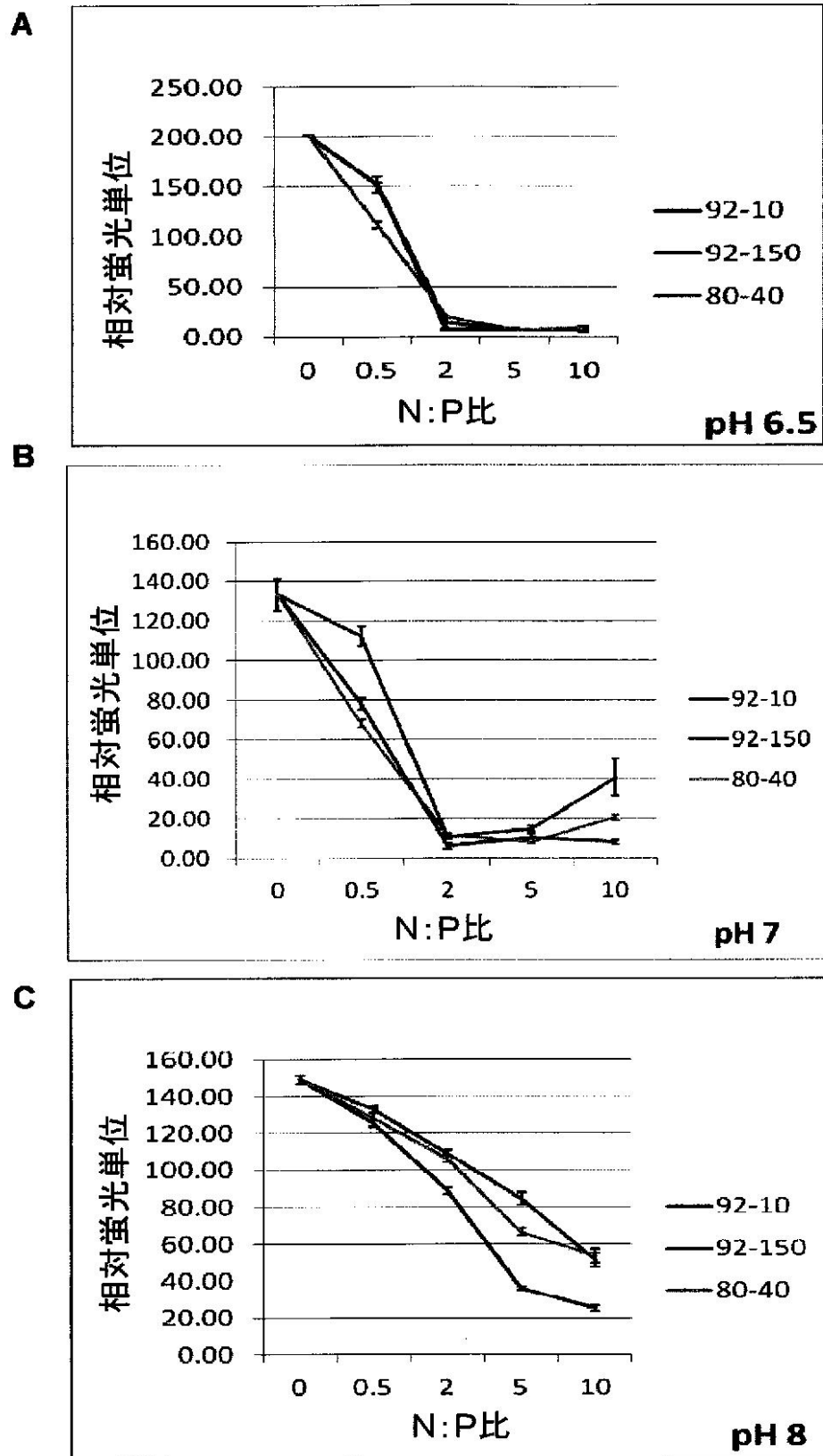


Fig. 5

【図 6 A】

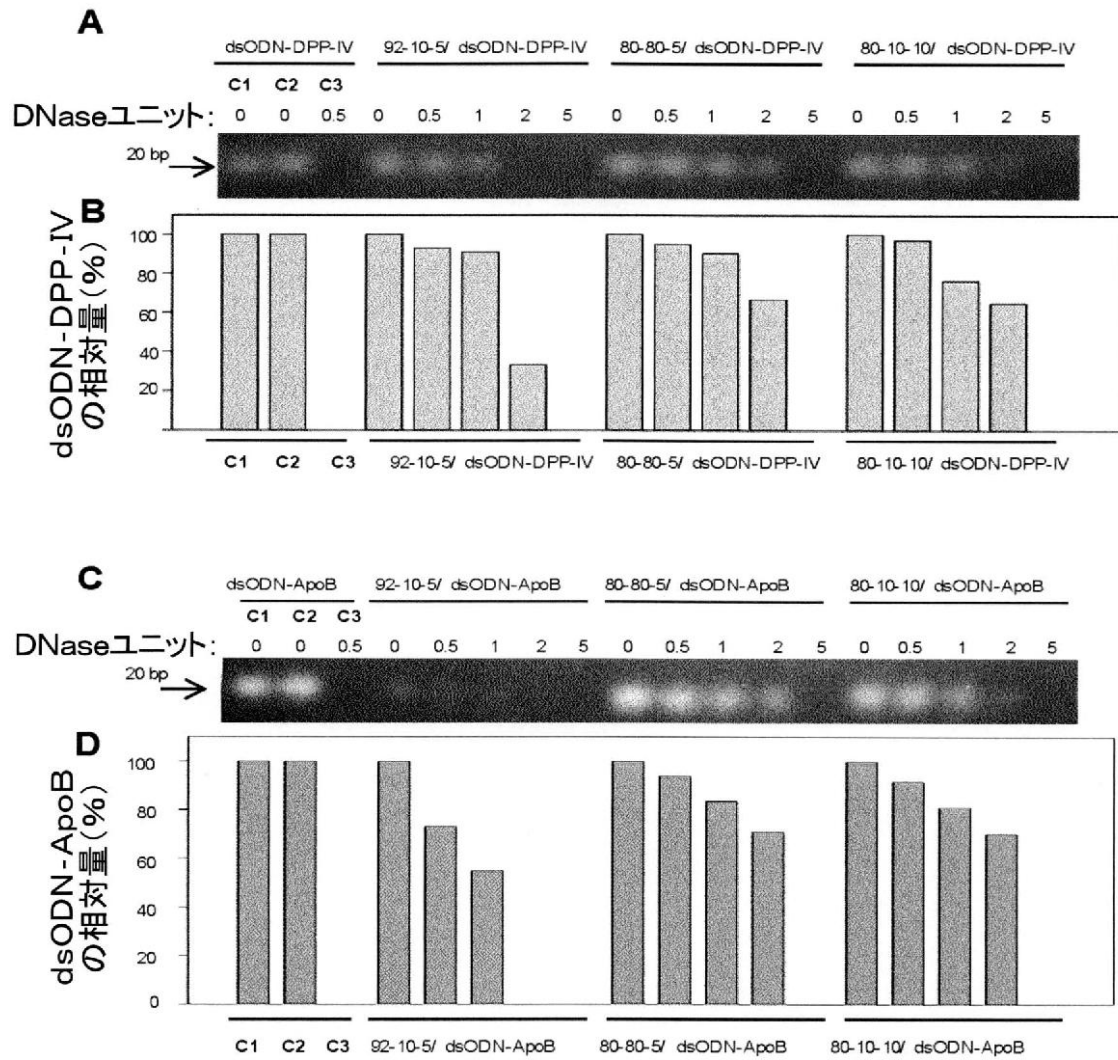


Fig. 6A

【図 6 B】

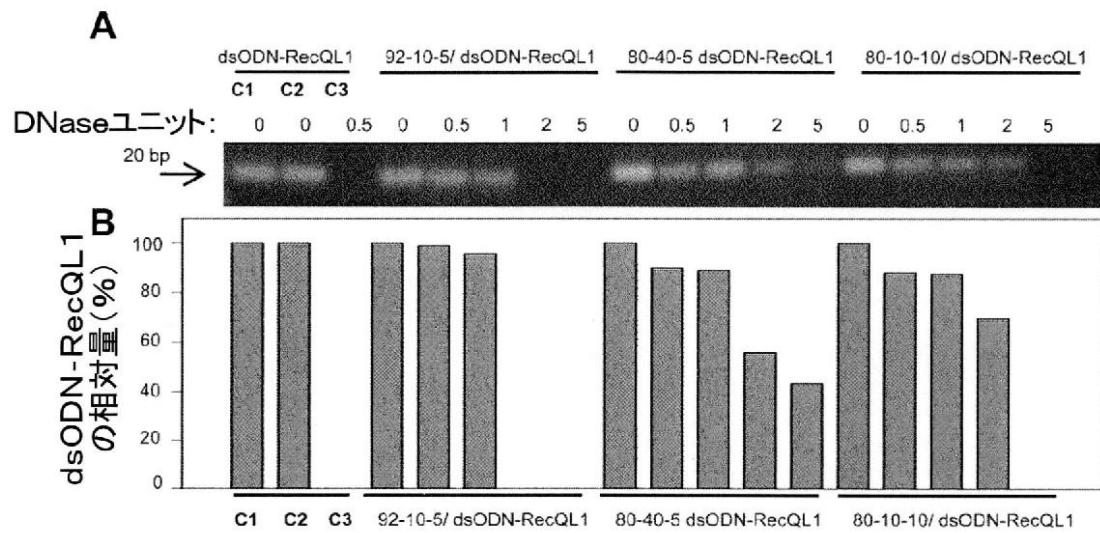
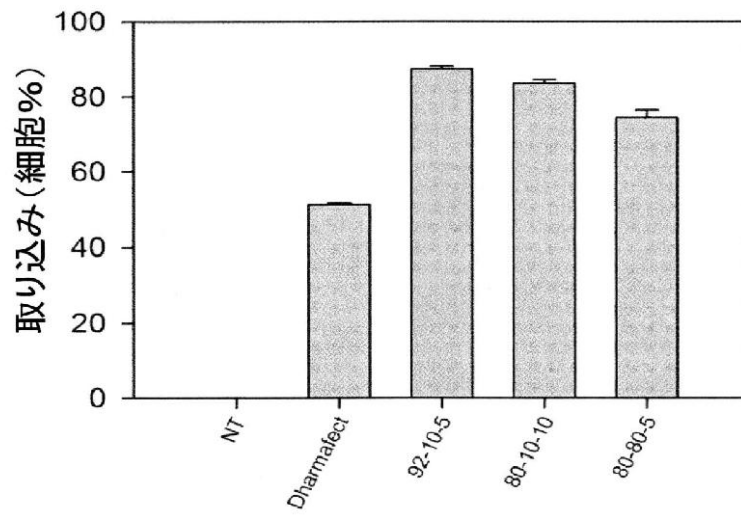
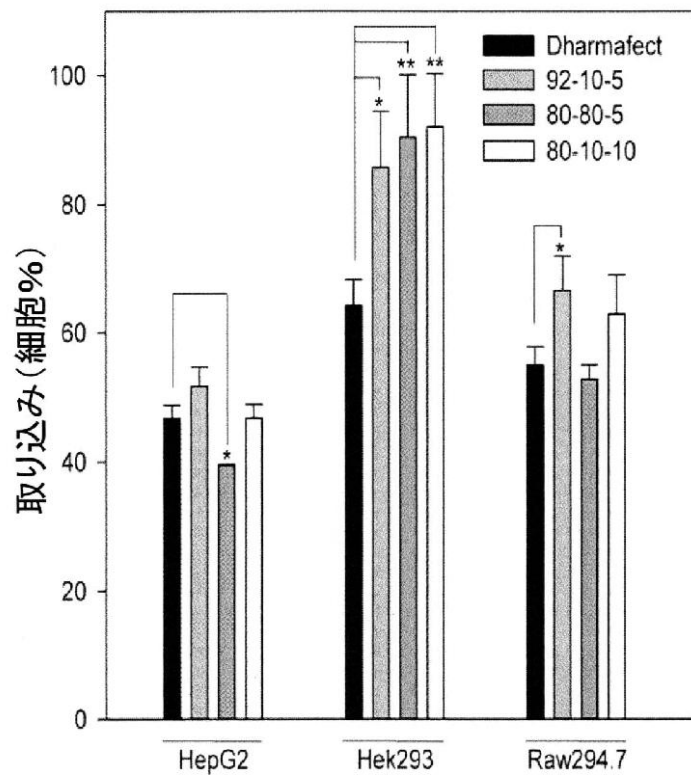


Fig. 6B

【図 7 A】

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

【図 7 B】

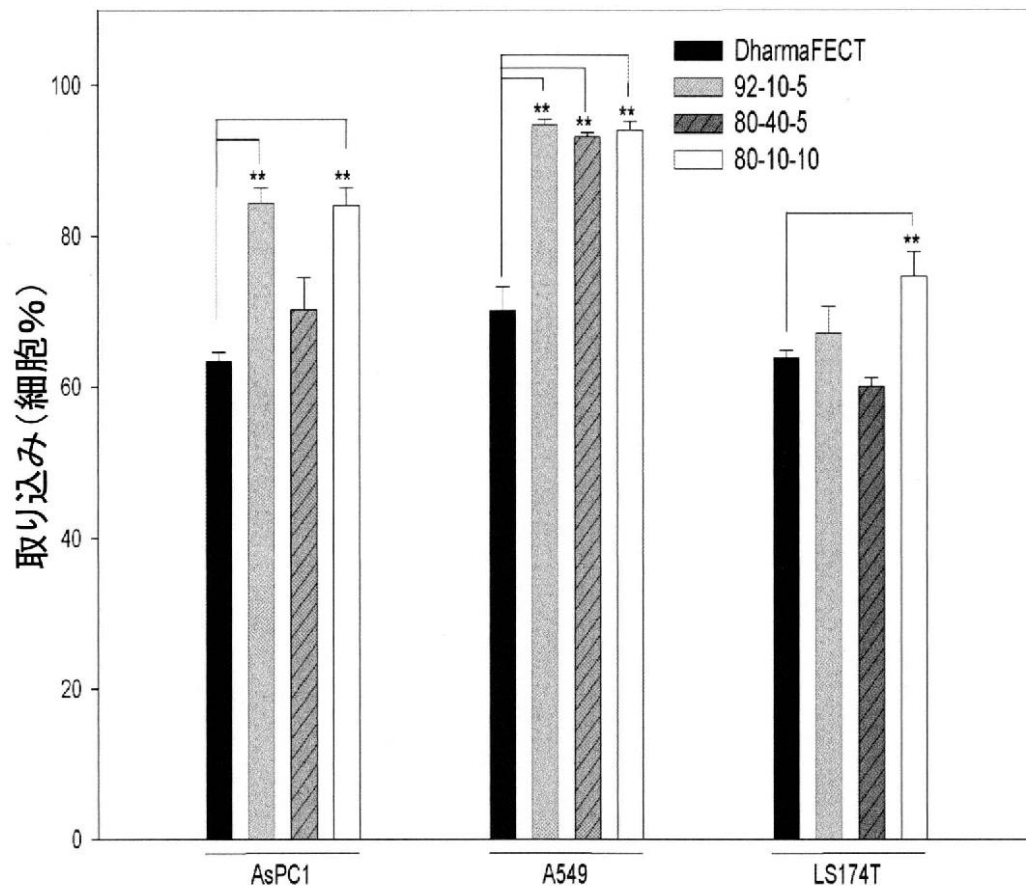


Fig. 7B

【図 11 A】

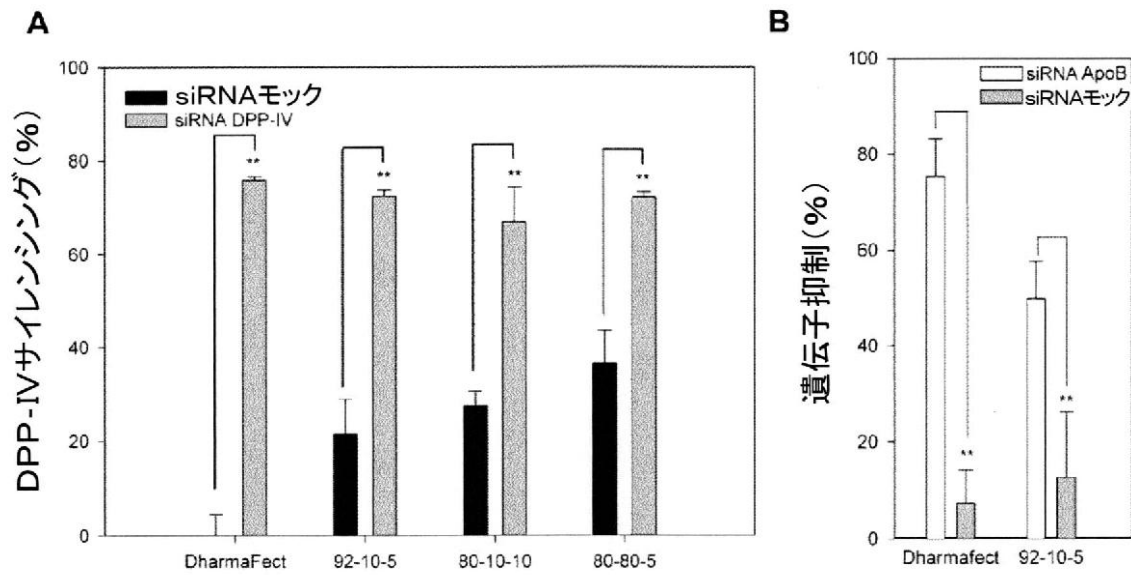


Fig. 11A

【図 11 B】

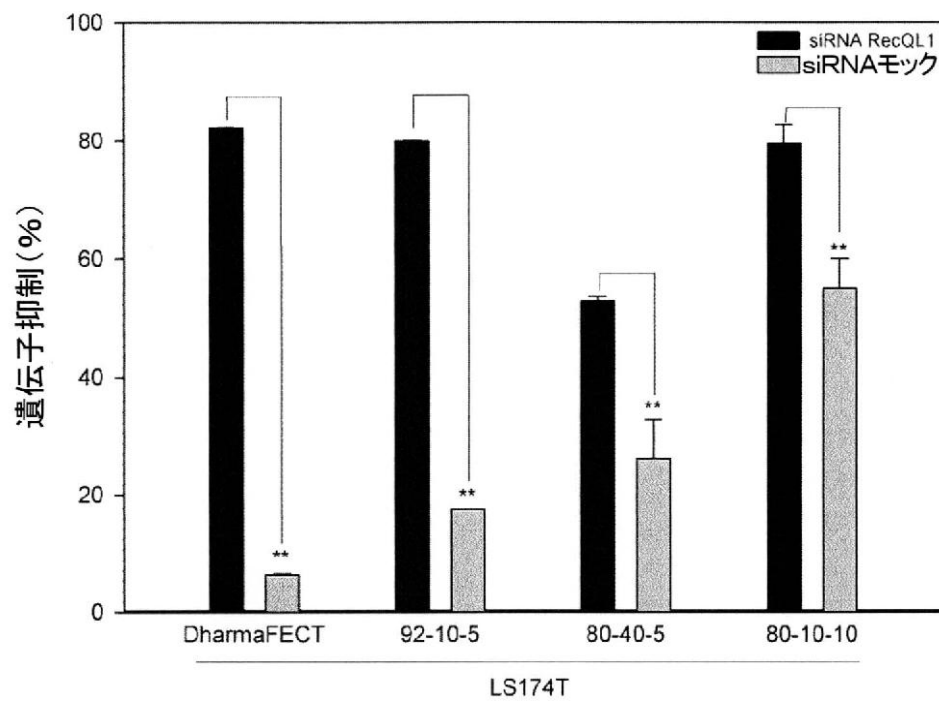


Fig. 11B

【図 12】

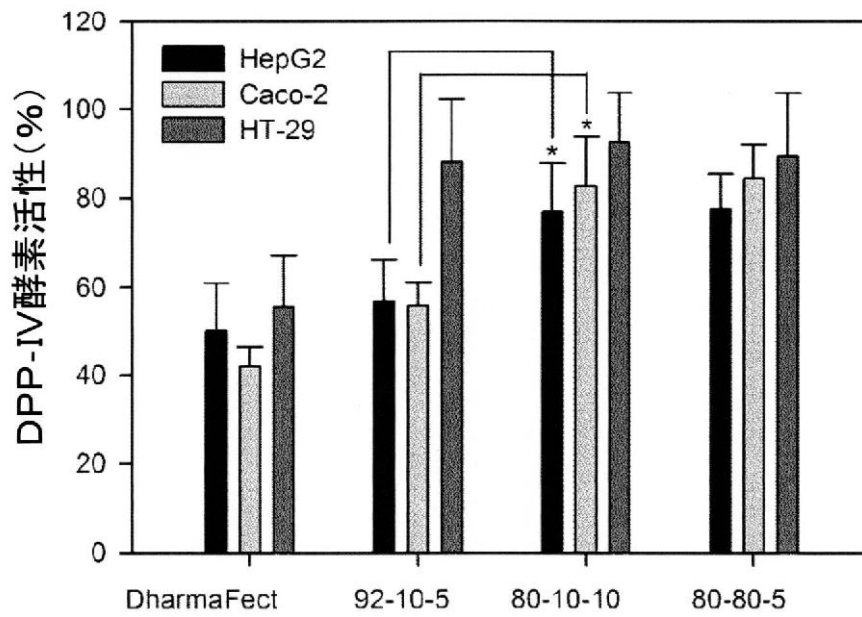


Fig. 12

【図 13】

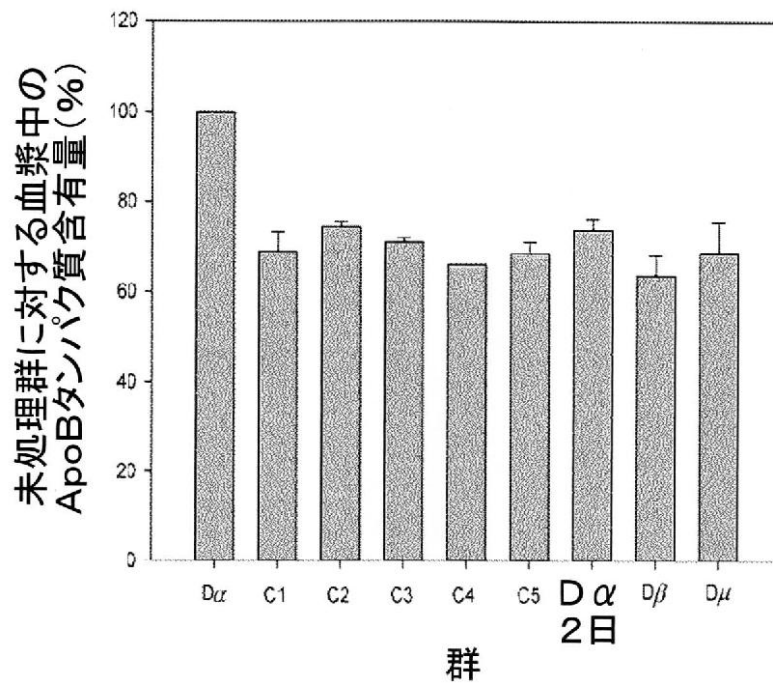


Fig. 13

【図 14】

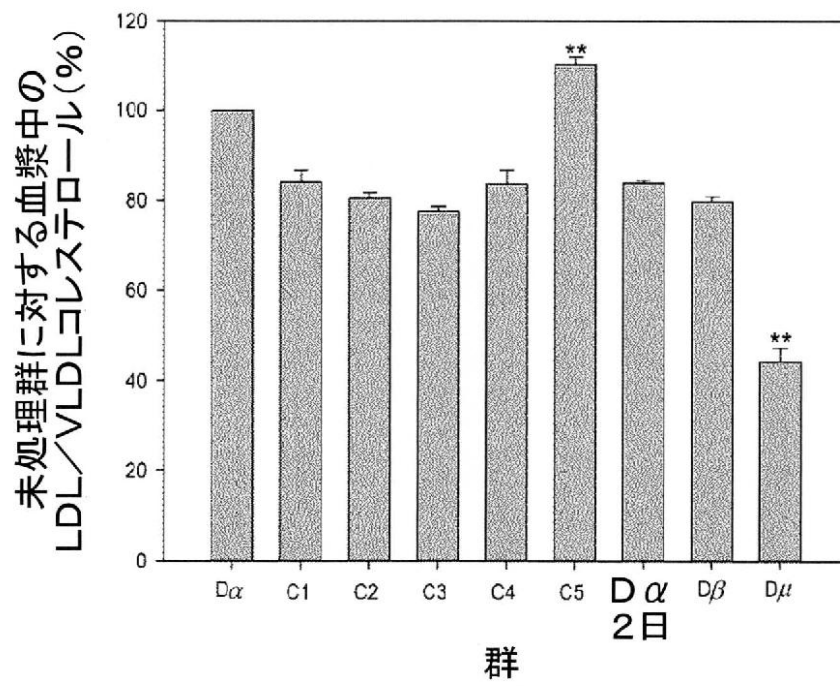


Fig. 14

【 図 1 7 】

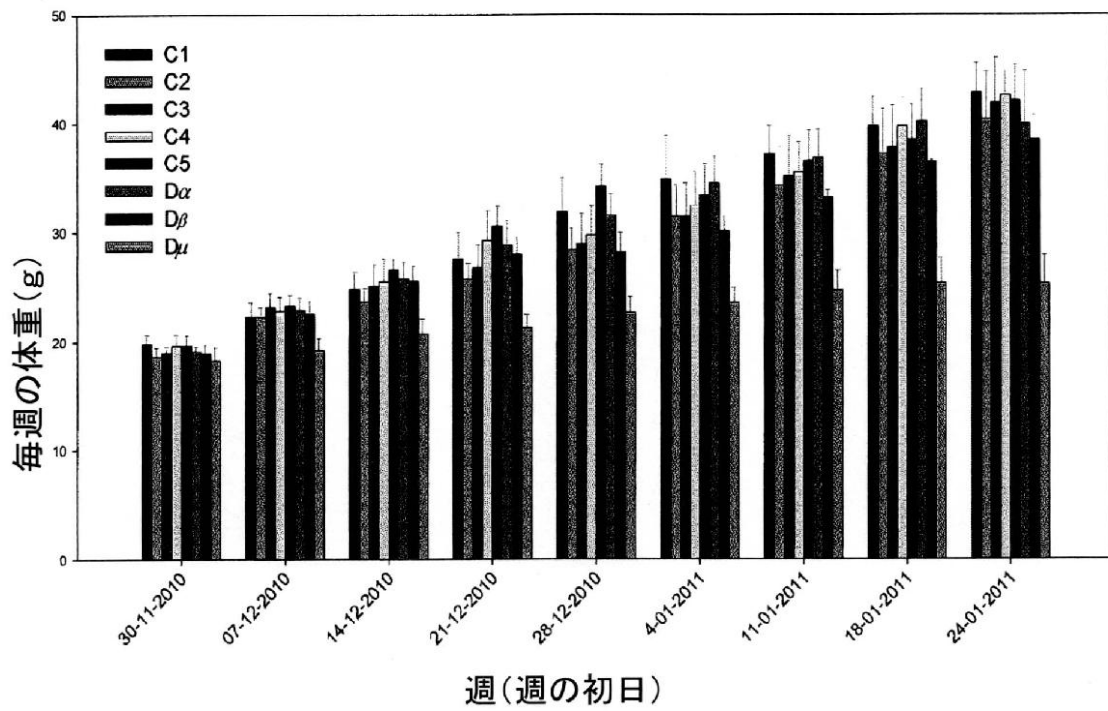


Fig. 17

【 図 1 8 】

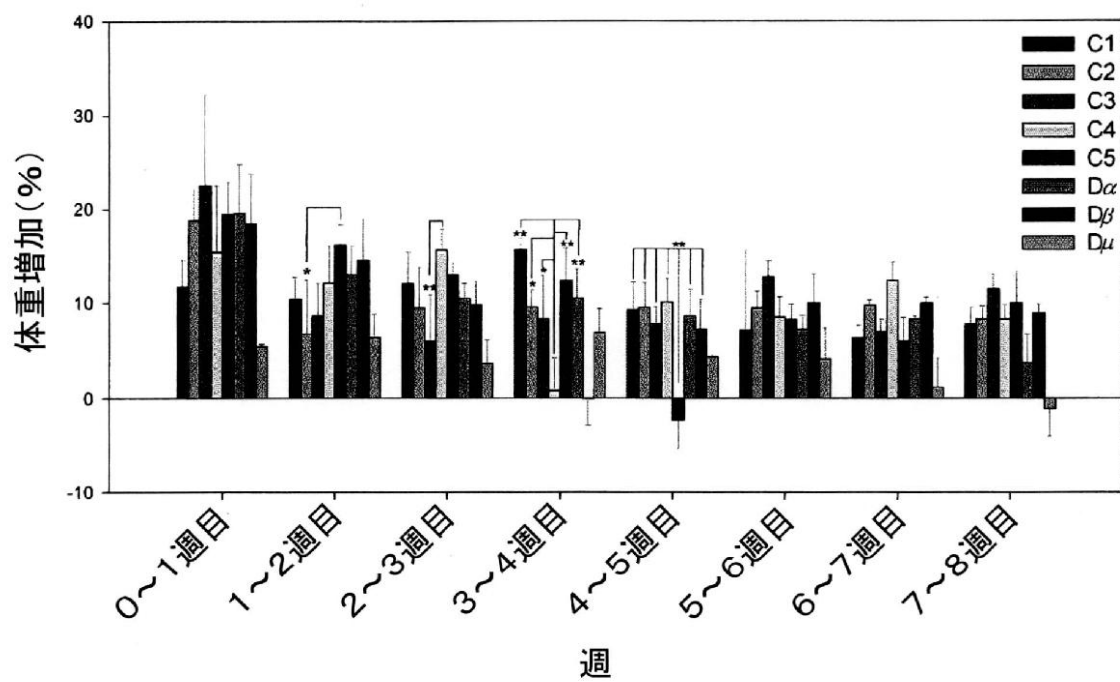


Fig. 18

【 配 列 表 】

2014518875000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2012/050342
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 47/36 (2006.01), A61K 31/713 (2006.01), A61P 3/10 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 9/10 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K 47/36 (2006.01), A61K 31/713 (2006.01), A61P 3/10 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 9/10 (2006.01)		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 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 REPORTInternational 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 application No. PCT/CA2012/050342
--

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos. : 47, 48 and 55-96 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :</p> <p style="padding-left: 40px;">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.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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 :</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claim Nos. : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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. :</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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. :</p> <p style="padding-left: 40px;">Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p style="padding-left: 80px;"><input type="checkbox"/> 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.</p> <p style="padding-left: 80px;"><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

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	24-02-2012
		CN102164618 A	24-08-2011
		US20110171276 A1	14-07-2011
		US20110171314 A1	14-07-2011
		EP2034954 A2	18-03-2009
		AU2007285472 A1	21-02-2008
WO2007059605 A1	31-05-2007	US2009075383 A1	19-03-2009
		EP1948810 A1	30-07-2008
		CA2628313 A1	31-05-2007
CA2644347 A1	27-09-2007	US2009182136 A1	16-07-2009
		JP2009530319 A	27-08-2009
		EP2002004 A2	17-12-2008
		EA200870366 A1	28-04-2009
		WO2007107162 A2	27-09-2007
		AU2007229161 A1	27-09-2007
EP1816194	18-02-2009	JP2012005486 A	12-01-2012
		JP4809240B2 B2	09-11-2011
		KR20070088706 A	29-08-2007
		US20090215867 A1	27-08-2009
		WO2006054625 A1	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, T M), 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, I D, 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 ブラス ド ロー ヴィヴ 7 3 1

(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 アブニュ
ー 4 3 2 9

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 ZA331

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