

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5571308号
(P5571308)

(45) 発行日 平成26年8月13日(2014.8.13)

(24) 登録日 平成26年7月4日(2014.7.4)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 47/24	(2006.01)	A 61 K 47/24
A 61 K 9/127	(2006.01)	A 61 K 9/127
A 61 K 47/28	(2006.01)	A 61 K 47/28
A 61 K 31/7088	(2006.01)	A 61 K 31/7088
A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K 48/00

請求項の数 23 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-530426 (P2008-530426)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月15日 (2006.9.15)
 (65) 公表番号 特表2009-507876 (P2009-507876A)
 (43) 公表日 平成21年2月26日 (2009.2.26)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2006/009013
 (87) 國際公開番号 WO2007/031333
 (87) 國際公開日 平成19年3月22日 (2007.3.22)
 審査請求日 平成21年9月15日 (2009.9.15)
 (31) 優先権主張番号 60/717,291
 (32) 優先日 平成17年9月15日 (2005.9.15)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 05020216.7
 (32) 優先日 平成17年9月15日 (2005.9.15)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁(EP)

(73) 特許権者 507328184
 マリーナ バイオテック、インコーポレイ
テッド
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9802
1-7266, ボセル, モンテ ヴィラ
パークウェイ 3830
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 慶史
 (74) 代理人 100144923
 弁理士 中川 将之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】両性リポソームにおけるまたはそれに関する改善

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性因子をカプセル化して、血清で安定なリポソームを形成するための脂質の両親媒性混合物であって、0.5～8の範囲のホスファチジルエタノールアミン対ホスファチジルコリンの比でホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンを含んでなり、荷電した両親媒性物質をさらに含んでなり、前記荷電した両親媒性物質が少なくとも1つのpH感受性アニオン性脂質および少なくとも1つのpH感受性カチオン性脂質を含んでなる、混合物。

【請求項 2】

前記比が0.75～5の範囲にある、請求項1に記載の混合物。 10

【請求項 3】

前記ホスファチジルコリンがMPC、DPPC、DSPC、POPC、DOPC、ダイズPCまたは卵PCから選択され、そして/あるいは前記ホスファチジルエタノールアミンがDOPЕまたはDMPЕまたはDPPЕから選択される、請求項1または2に記載の混合物。

【請求項 4】

前記アニオン性脂質が、DOG Succi、POG Succi、DMG Succi、DPGSucciおよびCHEMSから選択され、そして/あるいは前記カチオン性脂質が、MoChol、HisCholおよびCHIMから選択される、請求項1に記載の混合物。

【請求項 5】

20

カチオン性およびアニオン性脂質の間の比（電荷比）が4：1～1：4の範囲にある、請求項1に記載の混合物。

【請求項6】

カチオン性脂質対アニオン性脂質の比が3：1～2：1の範囲にあり、そして前記混合物が、5～95mol%の荷電した脂質ならびに95～5mol%のホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンを含んでなる、請求項4に記載の混合物。

【請求項7】

カチオン性脂質対アニオン性脂質の比が1：1であり、そして前記混合物が、5～75mol%の荷電した脂質ならびに95～25mol%のホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンを含んでなる、請求項4に記載の混合物。

【請求項8】

カチオン性脂質対アニオン性脂質の比が1：3～1：2の範囲にあり、そして前記混合物が、40～75mol%の荷電した脂質ならびに60～25mol%のホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンを含んでなる、請求項4に記載の混合物。

【請求項9】

1：1～1：4の範囲の比の70～20mol%のPOPCおよびDOPE；ならびに30および80mol%の両性対の荷電した脂質（前記対は、MoCholおよびCHEMS、MoCholおよびDMGSucc、MoCholおよびDOGSSucc、CHIMおよびCHEMSまたはCHIMおよびDMGSuccから選択され、カチオン性対アニオン性脂質の比は3：1～1：1の範囲にある）、
を含んでなる、請求項4に記載の混合物。

【請求項10】

POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:47:23 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:30:30:30 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:47:23 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	16:24:30:30 (mol.%)

から選択される处方よりなる、請求項4に記載の混合物。

【請求項11】

1：1～1：4の範囲の比の70～20mol%のPOPCおよびDOPE；ならびに30および80mol%のMoCholおよびDMGSuccまたはDOGSSucc（ここで、DMGSuccまたはDOGSSuccのモル量はMoCholのモル量を超える）、を含んでなる、請求項4に記載の混合物。

【請求項12】

カチオン性対アニオン性脂質の比が1：3～1：2の範囲にあり、前記混合物が、30～50mol%のPOPCおよびDOPEならびに70～50mol%の荷電した脂質を含んでなる、請求項4に記載の混合物。

【請求項13】

POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:23:47 (mol%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10:30:20:40 (mol%)

から選択される处方よりなる、請求項4に記載の混合物。

【請求項14】

前記リポソームが50～500nmの範囲のサイズを有し、少なくとも1つの活性因子をカプセル化する、請求項4～10のいずれか一項に記載の脂質の混合物を含む両性リポソーム。

【請求項15】

前記活性因子が、脊椎動物細胞において1つもしくはそれ以上のRNAに転写されることが可能である核酸を含んでなり、前記RNAが、mRNA、sRNA、miRNAまたはリボザイムであり、前記mRNAが1つもしくはそれ以上のタンパク質またはポリペプチドをコードし、前記核酸が環状DNAプラスミド、線状DNA構築物またはmRNA

10

20

30

40

50

である、請求項1_4に記載の両性リポソーム。

【請求項 1_6】

前記活性因子がオリゴヌクレオチドであり、前記オリゴヌクレオチドが、デコイオリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、転写に影響を及ぼす因子、スプライシングに影響を及ぼす因子、リボザイム、D N Aザイムまたはアプタマーであり、前記オリゴヌクレオチドが、それらのホスフェートまたはホスホチオエート型においてD N A、R N A、ロックト核酸(L N A)、ペプチド核酸(P N A)、2' O - メチルR N A(2' O m e)、2' O - メトキシエチルR N A(2' M O E)などの修飾ヌクレオシドを含んでなる、請求項1_4に記載の両性リポソーム。

【請求項 1_7】

10

前記オリゴヌクレオチドが15～30塩基対長のアンチセンスオリゴヌクレオチド、15～30塩基対長のs i R N A、15～30塩基対長のデコイオリゴヌクレオチド、15～30塩基対長の転写に影響を及ぼす因子、25～50塩基対長のD N Aザイム、25～50塩基対長のリボザイム、または15～60塩基対長のアプタマーから選択される、請求項1_5に記載の両性リポソーム。

【請求項 1_8】

20

前記オリゴヌクレオチドが、C D 4 0 遺伝子、そのセンスもしくはアンチセンス鎖、その任意のエキソンもしくはイントロンまたは非翻訳領域をコードする核酸を標的化するために適合され、それによって、哺乳動物細胞におけるC D 4 0 の発現を調節し、前記オリゴヌクレオチドがC D 4 0 の任意のm R N Aに対して指向され、かかるm R N Aがプレm R N Aおよびそれらのその後の成熟した形態を含む、請求項1_5または1_6に記載の両性リポソーム。

【請求項 1_9】

前記脂質の混合物が、

POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:47:23 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:30:30:30 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:47:23 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	16:24:30:30 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:23:47 (mol.%)
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10:30:20:40 (mol.%)

30

から選択される处方よりなる、請求項1_5または1_6に記載の両性リポソーム。

【請求項 2_0】

少なくとも80 w t %の前記オリゴヌクレオチドが前記リポソームの内部に配置される、請求項1_5～1_7のいずれか一項に記載の両性リポソーム。

【請求項 2_1】

前記リポソームがカプセル化されていないオリゴヌクレオチドを含んでなる、請求項1_5～1_7のいずれか一項に記載の両性リポソーム。

【請求項 2_2】

40

請求項1_4～2_0のいずれか一項に記載の活性因子充填両性リポソームおよびその薬学的に許容可能なビヒクルを含んでなる薬学的組成物。

【請求項 2_3】

前記活性因子充填両性リポソームに類似の組成およびサイズを有する空のリポソームをさらに含んでなる、請求項2_2に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、両性リポソームに関し、特に、ヒトまたは動物血清において改善された安定性を有するかかるリポソームについて言及する。本発明はまた、例えば、リポソームおよびかかるリポソームを含んでなる薬学的組成物を形成するための薬物などの活性因子また

50

は成分をカプセル化することが可能な脂質の混合物を含む。

【背景技術】

【0002】

オリゴヌクレオチドは、タンパク質発現を極めて特異的にダウンレギュレートまたは妨害することができる新規のクラスの薬物を表す。かかるオリゴヌクレオチドとして、アンチセンス、ロックト核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ核酸（モルホリノ）、低分子干渉RNA（siRNA）および多様な化学の転写因子デコイが挙げられる。かかるオリゴヌクレオチド治療薬の異なる作用機序の詳細な説明については、文献（例えば、非特許文献1；および非特許文献2）において見出すことができる。

【0003】

遺伝子修復アプリケーション（例えば、非特許文献3を参照のこと）およびマイクロRNAのためのオリゴヌクレオチドの使用は、この迅速に成長している分野の他の例である。

【0004】

核酸治療薬は、それらの実際の化学的起源とは関係なく、体液におけるそれらの不安定性のためもしくは細胞への非効率な取り込みの故、または両方により治療効力を欠き得ることが当該技術分野において公知である。上記の変種を含むかかるオリゴヌクレオチドの化学修飾、ならびにリガンドまたはポリマーとのコンジュゲートの形成は、かかる実際の限界を克服するための1つのストラテジーを表す。

【0005】

第2の組のストラテジーは、細胞への増強された取り込みを保護し、標的化し、そして付与するためのキャリアシステム、特に、リポソームの使用に関する。リポソームは、水性コアを有し、そして疎水性および親水性成分の両方を有する両親媒性分子（両親媒性物質）から形成される人工シグナル、オリゴまたは多重層小胞である。カーゴは、リポソームのコアにおいてトラップされ得、膜層または膜表面に配置される。かかるキャリアシステムは、次の基準の至適スコアに一致すべきである：高いカプセル化効率および経済的製造、コロイド安定性、細胞への増強された取り込みならびにもちろん、低い毒性および免疫原性。

【0006】

キャリアと環境との間で凝集が生じないため、アニオン性または中性リポソームは、しばしば、コロイド安定性に関して優秀である。従って、それらの生体内分布は優秀であり、そして刺激および細胞障害性の可能性は低い。しかし、かかるキャリアはカプセル化効率を欠き、そして細胞へのさらなる取り込みを容易にするエンドソーム分解シグナルを提供しない（非特許文献4）。

【0007】

極めて多くの刊行物がカチオン性リポソームシステムを取り扱っている；例えば、非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7を参照のこと。カチオン性システムは高い充填効率を提供するが、それらは、特に、体液との接触後、コロイド安定性を欠く。タンパク質および／または他のバイオポリマーとのイオン相互作用は、細胞外マトリックスまたは細胞表面とのインサイチューでの凝集体形成をもたらす。カチオン性脂質は、しばしば、毒性であることが見出されており、非特許文献8；非特許文献9；非特許文献10によって示されている。

【0008】

これらの制限は、立体的安定化をキャリアに提供する成分の添加によって克服された。例えば、体液におけるカチオン性成分の使用に関連する凝集の問題を排除する多様な鎖長のポリエチレンギリコールが公知であり、そしてPEG化カチオン性リポソームは、インビボで増強された循環時間を示す（非特許文献11）。しかし、PEGの使用は、カチオン性脂質に関連する固有の毒性の問題を解決していない。PEGは、実質的に、細胞へのかかるリポソームの生産的侵入またはそれらの細胞内送達を阻害することもまた公知である（非特許文献12）。かなり最近、（非特許文献13）は、インビボでsiRNAを肝

10

20

30

40

50

臓細胞にトランスファーすることが可能であるカチオン性ベクターのための拡散性PEG-脂質について記載した。しかし、かかる解決に対する多大な要求および臨床開発の所定の損耗率は、概念的に独立する解決のための開発の動機をさらに与える。

【0009】

両性リポソームは、pH 7.5でアニオン性または中性電荷およびpH 4でカチオン性電荷を有するリポソームの最近記載されたクラスを表す。特許文献1、特許文献2および特許文献3（すべてPanzerらによるものであり、本明細書において参考として援用される）は、両性リポソームおよびそれらに適切な脂質の詳細な説明を与える。さらなる開示は、特許文献4および特許文献5（これらもまたPanzerらによるものであり、本明細書において参考として援用される）において行われ、かかる両性リポソームの製造のためのさらにpH感受性脂質について記載している。10

【0010】

両性リポソームは優秀な生体内分布を有し、動物において極めて良好に忍容される。それは、高い効率で核酸分子をカプセル化することができる。

【0011】

哺乳動物における異なる病態または疾患の防止もしくは処置のための薬物のキャリアとしての両性リポソームの使用には、血中へのそれらの注入後のリポソームの安定性が必要である。特に、全身適用では、標的組織または細胞における究極的取り込みまで薬物は、リポソームにおいて安定にカプセル化されなければならない。FDAの指針は、リポソーム処方を含んでなる薬物の特定の前臨床試験を規定する（非特許文献14）。例えば、血流における循環時間中におけるカプセル化された薬物対遊離の薬物の比が、決定されなければならない。20

【0012】

リポソームの血流への注入後、血清成分はリポソームと相互作用し、そしてリポソーム膜の透過化をもたらし得る。しかし、リポソームによってカプセル化される薬物の放出はまた、薬物の分子ディメンションにも依存する。これは、数千の塩基対のサイズを伴うプラスミド薬物が、例えば、より小さなオリゴヌクレオチドまたは他の小分子よりかなり緩徐に放出され得ることを意味する。薬物のリポソーム送達では、リポソームの循環中薬物の放出は、可能な限り低いことが必須である。

【特許文献1】WO 02 / 06649030

【特許文献2】WO 02 / 066012

【特許文献3】WO 03 / 070735

【特許文献4】WO 03 / 070220

【特許文献5】WO 03 / 070735

【非特許文献1】Crooke in BBA (1999), 1489 (1), 31 - 44; Tijsterman, et al. in Cell (2004), 117 (1), 1 - 3

【非特許文献2】Mann, et al. in J Clin Invest, (2000), 106 (9), 1071 - 5

【非特許文献3】Richardson, et al. in Stem Cells (2002), 20, 105 - 11840

【非特許文献4】Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2000), 292, 480 - 488 by Klimuk, et al.

【非特許文献5】Molecular Membrane Biology (1999), 16, 129 - 140 by Maurer, et al.

【非特許文献6】BBA (2000) 1464, 251 - 261 by Meidan, et al.

【非特許文献7】Reviews in Biology and Biotechnology (2001), 1 (2), 27 - 33 by Fiset & Gounni50

【非特許文献 8】 Fillion, et al. in BBA (1997), 1329(2)
 , 345 - 356

【非特許文献 9】 Dass in J. Pharm. Pharmacol. (2002)
 , 54(5), 593 - 601

【非特許文献 10】 Hirkko, et al. in Curr. Med. Chem., 1
 0(14), 1185 - 1193

【非特許文献 11】 BBA (2001) 1510, 152 - 166 by Semple
 , et al.

【非特許文献 12】 Song, et al. in BBA (2002), 1558(1)
 , 1 - 13

【非特許文献 13】 Morrissey, et al. (Nature Biotech
 nology (2005), 23(8), 1002 - 1007)

【非特許文献 14】 <http://www.fda.gov/cder/guidance/2191dft.pdf>

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

従って、本発明の目的は、ヒトまたは動物血清との接触時に改善された安定性を有するリポソームおよびかかるリポソームを形成することが可能な脂質の混合物を提供することである。

【0014】

特に、本発明の目的は、かかる改善された血清安定性を有する両性リポソームを提供することである。

【0015】

本発明の別の目的は、核酸薬物、例えば、オリゴヌクレオチドおよびプラスミドなどの薬物を含む活性因子または成分の標的化された送達のためのキャリアとしてのかかるリポソームを含んでなる薬学的組成物を提供することである。

【0016】

本発明の特定の目的は、ヒトまたは非ヒト動物の炎症、免疫もしくは自己免疫障害の処置あるいは予防のためのかかる薬学的組成物を提供することである。

【0017】

なお本発明の別の目的は、ヒトまたは非ヒト動物の処置のための方法であって、活性因子を含んでなる薬学的組成物が1つ以上の特定の器官、腫瘍あるいは感染または炎症の部位に標的化される、上記方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0018】

従って、本発明の1つの態様に従えば、活性因子をカプセル化して、リポソームを形成することが可能な脂質の混合物が提供され、前記混合物は、約0.5～約8の範囲のホスファチジルエタノールアミン対ホスファチジルコリンの比でホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルエタノールアミン(PE)を含んでなる。

【0019】

適切には、前記比は、約0.75～約5、好ましくは、約1～約4の範囲である。

【0020】

いくつかの実施形態では、前記ホスファチジルコリンは、DMPG、DPPG、DSPG、POPGもしくはDOPGから、または例えば、ダイズPCおよび卵PCなどの天然の供給源由来のホスファチジルコリン類から選択され得る。

【0021】

前記ホスファチジルエタノールアミン類は、DOPG、DMPEおよびDPPGから選択され得る。

【0022】

10

20

30

40

50

好適な中性脂質として、D O P E、P O P C、ダイズP Cおよび卵P Cが挙げられる。

【0023】

コレステロールは、血清の攻撃に対してホスファチジルコリン二分子層を安定化し得ることが公知である。しかし、P O P CもD O P Eもまたいずれもそれ自体では、血清中で安定な構造を形成しない。驚くべきことに、D O P EおよびP O P Cの混合物は、血清中で安定なリポソームを形成し得ることが見出されている。

【0024】

従って、本発明の特定の態様では、前記脂質の混合物は中性であってもよい。いくつかの実施形態では、前記混合物は、上記の範囲の比でホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンよりなるか、または本質的になり得る。

10

【0025】

本発明の別の態様では、本発明に従う脂質の混合物を含んでなる中性リポソームが提供される。かかるリポソームは、血清中で安定な賦形剤または薬物などの活性因子のキャリアとして使用され得る。

【0026】

しかし、本発明の異なる態様では、前記混合物は、1つもしくはそれ以上の荷電した両親媒性物質をさらに含んでなり得る。

【0027】

好ましくは、前記1つもしくはそれ以上の荷電した両親媒性物質は両性であって、p H 7.4では負に荷電するかまたは中性であり、そしてp H 4では正に荷電する。

20

【0028】

本明細書における「両性」とは、アニオン性およびカチオン性の両方の特徴の荷電した基を含んでなる物質、物質の混合物または上掲の分子複合体（例えば、リポソーム）を意味し、

(i) 荷電した基の少なくとも1つは4～8の間のp Kを有し、

(ii) カチオン性の電荷はp H 4において認められ、そして

(iii) アニオン性の電荷はp H 8において認められ、

p H 4～p H 8の間の正味の電荷の等電点を生じる。両性イオンは上記範囲のp Kを有さないため、両性特徴は、両性イオンの特徴とは異なるこのような規定による。結果として、両性イオンは、p H 値の範囲にわたって本質的に中性に荷電しており；ホスファチジルコリン類およびホスファチジルエタノールアミン類は、両性イオン特徴を伴う中性脂質である。

30

【0029】

従って適切には、前記混合物は、互いに組合わせることで両性特徴を有する複数の荷電した両親媒性物質を含んでなり得る。好ましくは、前記1つもしくはそれ以上の荷電した両親媒性物質は、p H 感受性アニオン性脂質およびp H 感受性カチオン性脂質を含んでなる。本明細書において、荷電性カチオンおよび荷電性アニオンのかかる組合せは、「両性II」脂質対と称される。前記荷電性カチオンは、約4～約8の間、好ましくは、約5.0または5.5～約7.0または7.5の間のp K値を有し得る。前記荷電性アニオンは、約3.5～約7の間、好ましくは、約4または4.5～約6.0または6.5の間のp K値を有し得る。例として、M o C h o l / C H E M S、D P I M / C H E M S およびD P I M / D G S u c c が挙げられる。

40

【0030】

「両性I」脂質対は、安定なカチオン（例えば、D D A B / C H E M S、D O T A P / C H E M S およびD O T A P / D O P S）ならびに荷電性アニオンを含んでなる一方、「両性III」脂質対は、安定なアニオンならびに荷電性カチオン（例えば、M o C h o l / D O P G およびM o C h o l / C h o l - S O₄）を含んでなる。

【0031】

もちろん、本発明の範囲内において、例えば、両親媒性ジカルボン酸、ホスファチジン酸、両親媒性ピペラジン誘導体などのような複数の電荷を伴う両親媒性物質を使用するこ

50

とも可能である。かかる複数の荷電した両親媒性物質は、pH感受性両親媒性物質であってもまたは安定なアニオンもしくはカチオンであり得、あるいはそれらは「混合型の」特徴を有し得る。

【0032】

適切には、前記アニオン性脂質は、D O G S u c c 、 P O G S u c c 、 D M G S u c c 、 D P G S u c c およびC H E M S から選択され得る。

【0033】

前記カチオン性脂質は、M o C h o l 、 H i s C h o l およびC H I M から選択され得る。

【0034】

本発明のなお別の態様では、上記の範囲の比のホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミン、pH感受性アニオン性脂質ならびにpH感受性カチオン性脂質を含んでなる両性リポソームが提供される。

【0035】

前記両性リポソームは、pH7.4では負または中性に荷電し、そしてpH4ではカチオン性であり得る。

【0036】

本発明の別の特定の態様では、前記リポソームは、少なくとも1つの活性因子をカプセル化する。前記活性因子は薬物を含んでなり得る。いくつかの実施形態では、前記活性因子は、脊椎動物細胞において1つもしくはそれ以上のRNAに転写されることが可能である例えれば、オリゴヌクレオチドまたはDNAプラスミドなどの核酸を含んでなり得、前記RNAは、mRNA、s h RNA、m i RNAまたはリボザイムであり、前記mRNAは1つもしくはそれ以上のタンパク質またはポリペプチドをコードする。

【0037】

前記オリゴヌクレオチドまたは他の核酸に基づく薬物は、前記両性リポソームにカプセル化され得る。前記オリゴヌクレオチドの実質的部分またはすべては、両性リポソームに物理的にトラップされ得る。血清中で安定な両性リポソーム処方は、薬物の細胞内送達のためか、あるいは哺乳動物または哺乳動物の部分、特にヒトまたはそれらの器官における病態および/または疾患の防止もしくは処置のために使用することができる。

【0038】

いくつかの実施形態では、前記オリゴヌクレオチドは、CD40をコードする核酸を標的化し、それによって哺乳動物細胞におけるCD40の発現を調整(modulate)するために適応され得る。適切には、前記オリゴヌクレオチドは、CD40のmRNAに対して指向され得る。

【0039】

なお本発明の別の態様では、本発明に従う活性因子充填両性リポソームおよびそれらのための薬学的に許容可能なビヒクルを含んでなる薬学的組成物が提供される。

【0040】

前記組成物は、高または低脂質用量について処方され得、従って、適切には、薬物/脂質比は、所望の脂質濃度に調整され得る。いくつかの実施形態では、前記組成物は、前記薬物/脂質比を減少するために空のリポソームをさらに含んでな得、前記空のリポソームは、前記活性因子充填リポソームと同じまたは類似のサイズおよび組成を有する。前記空のリポソームは、本発明に従う脂質の混合物を含んでなり得る。

【0041】

なお別の態様では、本発明は、ヒトあるいは非ヒト動物の炎症、免疫または自己免疫障害の防止もしくは処置のための本発明に従う薬学的組成物の使用を含み、前記組成物は、哺乳動物細胞においてCD40の発現を調整するためのCD40をコードする核酸を標的化するために適応されるオリゴヌクレオチドを含んでなる。

【0042】

前記組成物は、全身または局所投与のために処方され得る。系統的に使用される場合、

10

20

30

40

50

本発明は、特に、移植片拒絶、移植片対宿主病、I型糖尿病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、喘息、炎症性腸疾患、乾癬または甲状腺炎の防止もしくは処置のための前記組成物の使用を含んでなる。

【0043】

局所適用のために処方される場合、本発明は、特に、移植片拒絶、移植片対宿主病、炎症性腸疾患、喘息、クローン病または大腸炎の防止もしくは処置のための前記組成物の使用を含んでなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0044】

上記のように、本発明の両性リポソームは、アニオン性およびカチオン性成分を含んでなり得、両方の成分はpH感受性であり、WO02/066012（その内容は本明細書において参考として援用される）において開示されている。 10

【0045】

pHに感受性であるカチオン性脂質は、WO02/066489およびWO03/070220、ならびにそれに掲載の参考文献、特に、Budker, et al. 1996, Nat Biotechnol. 14(6):760-4（それらのすべての内容は本明細書において参考として援用される）において開示されている。

【0046】

好適なカチオン成分はMoChol、HisCholおよびCHIM、特に、MoCholである。 20

【0047】

好適なアニオン性脂質は：DOG succ、POG succ、DMG succ、DPG succおよびCHEMS、特に、DOG succ、DMG succおよびCHEMSを含んでなる群から選択される。

【0048】

脂質については以下の略称が本明細書において使用されるが、該略称の大部分は文献における標準的用途内にある：

【0049】

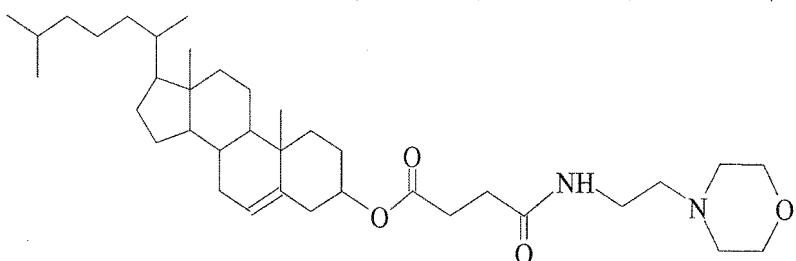
【表1】

PC	ホスファチジルコリン、不特定の膜アンカー
PE	ホスファチジルエタノールアミン、不特定の膜アンカー
DMPC	ジミリストイルホスファチジルコリン
DPPC	ジパルミトイールホスファチジルコリン
DSPC	ジステアロイルホスファチジルコリン
POPC	パルミトイールオレオイルホスファチジルコリン
DOPC	ジオレオイルホスファチジルコリン
DOPE	ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン
DMPE	ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン
DPPE	ジパルミトイールホスファチジルエタノールアミン
CHEMS	コレステロールヘミスクシネート
CHIM	コレステロール-(3-イミダゾール-1-イルプロピル)カルバメート
DDAB	ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド
DOTAP	(1,2-ジオレオイルオキシプロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩
DOPS	ジオレオイルホスファチジルセリン
DOPG	ジオレオイルホスファチジルグリセロール
Chol-SO ₄	コレステロールスルフェート

【0050】

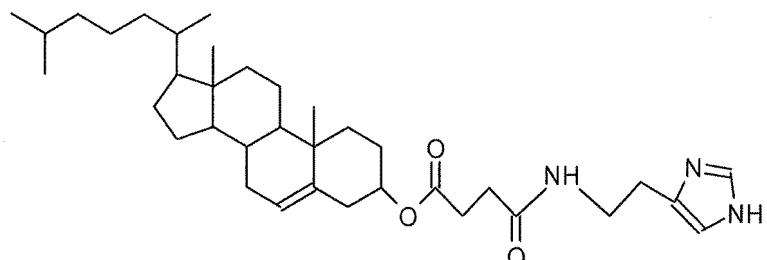
【表2】

MoChol 4-(2-アミノエチル)-モルホリノコレステロールヘミスクシネート：

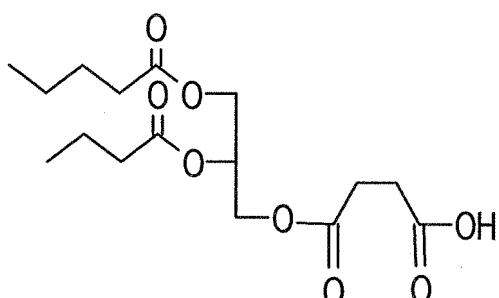


10

HisChol ヒスタミニルコレステロールヘミスクシネート：



20

DGSucc 1,2-ジパルミトイルグリセロール-3-ヘミスクシネート (&ジステアロイ
ル、ジミリストイルージオレオイルまたはパルミトイールオレオイル誘導体) (アシ
ル鎖より下の構造を模式的に示す)

30

【0051】

カチオン性およびアニオン性脂質の間の比(荷電比)は、等電点を決定するだけでなく、組成物の血清安定性に影響を及ぼし得ることが見出されている。従って、前記荷電比は、4:1から1:4まで、好ましくは、3:1~1:3(カチオン:アニオン)の間で変動し得る。

【0052】

本発明のいくつかの実施形態では、カチオンはアニオンより多く存在し得る。好ましくは、前記荷電比は3:1~2:1の間である。荷電した脂質の全量は、脂質混合物の5から95mol%まで、好ましくは、30から80mol%まで、およびより好ましくは、45または50mol%から75mol%まで変動し得、残りの脂質は中性リン脂質PCおよびPEから形成される。

40

【0053】

あるいは、カチオンおよびアニオンは、実質的に同じ量で存在し得る。荷電した脂質の全量は、脂質混合物の5から75mol%まで、好ましくは、20から65mol%まで変動し得、残りの脂質は中性リン脂質PCおよびPEから形成される。

【0054】

別の代替物では、アニオンは、カチオンより多く存在し得る。前記荷電比は、1:3~1:2、好ましくは、約1:2(カチオン:アニオン)の間で存在し得る。荷電した脂質の全量は、脂質混合物の40mol%から75または80mol%まで、好ましくは、4

50

5または50mol%から70または75mol%まで、およびより好ましくは、55から65mol%まで変動し得、残りの脂質は中性リン脂質P CおよびP Eから形成される。

【0055】

カチオンおよびアニオンの異なる多くの組合せが、上記の適切な成分のリストから選択され得る。有利なことに、本発明は、荷電性カチオンとしてMoCholまたはCHIMおよび荷電性アニオンとしてCHEMS、DMGSuccまたはDOGSuccを使用して、実行され得る。

【0056】

現在好適なリポソームは、1:1~1:4の間の比のPOPCおよびDOPEならびに3:1~1:1の間の比のMoCholおよびCHEMS、MoCholおよびDMGSucc、MoCholおよびDOGSucc、CHIMおよびCHEMS、ならびにCHIMおよびDMGSuccから選択される両性脂質対を含んでなる脂質の混合物から作製され、荷電した脂質の量は、脂質混合物の30~80mol%の間である。

【0057】

本発明に従うかかるリポソームの具体例として、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：

【0058】

【表3】

POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:53:17
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:47:23
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:30:30:30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	24.5:35.5:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	16:24:30:30
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:53:17
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:47:23
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	15:45:20:20
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10:30:30:30
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	24.5:35.5:20:20
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	16:24:30:30
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	12.5:37.5:33:17
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	7.5:22.5:47:23
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	12.5:37.5:33:17
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	7.5:22.5:47:23
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	12.5:37.5:33:17
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	7.5:22.5:47:23

10

20

30

40

【0059】

さらに現在好適なリポソームは、1:1~1:4の間の比のPOPCおよびDOPE、DMGSuccまたはDOGSucc、ならびにMoCholを含んでなる脂質の混合物を含んでなり、DMGSuccまたはDOGSuccのモル量はMoCholのモル量を超える、そして荷電した脂質の量は30~80mol%の間である。好ましくは、荷電比は1:2~1:3の間であり、そして荷電した成分は、脂質混合物の45または50mol%~70または75mol%の間の構成成分をなす。

【0060】

かかるさらなるリポソームの具体例として、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：

50

【0061】

【表4】

POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6 : 24 : 23 : 47	
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	8 : 32 : 20 : 40	
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10 : 40 : 17 : 33	
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10 : 20 : 23 : 47	
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	13 : 27 : 20 : 40	
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10 : 30 : 20 : 40	
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	17 : 33 : 17 : 33	
POPC/DOPE/MoChol/DOGSucc	12.5 : 37.5 : 17 : 33	10

【0062】

かかる使用に限定されなければ、本発明に記載の材料は、例えば、オリゴヌクレオチドおよびDNAプラスミドなどの核酸に基づく薬物のキャリアとしての使用に良好に適合される。これらの薬物は、タンパク質、ポリペプチドまたはRNAに対する1つもしくはそれ以上の特異的配列をコードする核酸、およびタンパク質発現レベルを特異的にレギュレートするかまたは特に、スプライシングへの干渉および人工的トランケーションを介してタンパク質構造に影響を及ぼすことができるオリゴヌクレオチドに分類される。

【0063】

従って、本発明のいくつかの実施形態では、核酸に基づく治療薬は、脊椎動物細胞において1つもしくはそれ以上のRNAに転写されることが可能である核酸を含んでなり得、該RNAはmRNA、shRNA、miRNAまたはリボザイムであり得、かかるmRNAは1つもしくはそれ以上のタンパク質またはポリペプチドをコードする。かかる核酸治療薬は、環状DNAプラスミド、WO98/21322もしくはDE19753182において開示されているようなMIDGEベクター(Minimalistic Immunogenically Defined Gene Expression)と同様な線状DNA構築物、または翻訳のために具備されるmRNA(例えば、EP1392341)であってもよい。

【0064】

本発明の別の実施形態では、存在する細胞内核酸またはタンパク質を標的化することができるオリゴヌクレオチドを使用してもよい。前記オリゴヌクレオチドは、転写を減弱もしくは調整する、転写物のプロセシングを改変するまたはそうでなければタンパク質の発現を干渉するために適応されるように、前記核酸は特定の遺伝子をコードし得る。用語「標的核酸」は、特定の遺伝子をコードするDNA、ならびにプレmRNAまたはmRNAであるかかるDNAから誘導されるすべてのRNAを包含する。標的核酸とかかる配列に対して指向される1つもしくはそれ以上のオリゴヌクレオチドとの間の特異的ハイブリダイゼーションは、タンパク質発現の阻害またはモジュレーションを生じ得る。かかる特異的ターゲティングを達成するために、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の配列に実質的に相補的であるヌクレオチドの連続ストレッチを適切に含んでなるべきである。

【0065】

上記の基準を満たすオリゴヌクレオチドは、異なる多くの化学およびトポロジーにより構成され得る。オリゴヌクレオチドは、一本鎖であってもまたは二本鎖であってもよい。

【0066】

オリゴヌクレオチドの作用機作は変動し得、そして特に、スプライシング、転写、核-細胞質間輸送および翻訳に対する効果を含んでなり得る。

【0067】

本発明の好適な実施形態では、一般にアンチセンスオリゴヌクレオチドとして公知であるDNAに基づくオリゴヌクレオチド、モルホリノ核酸、2'-修飾オリゴヌクレオチドなどを含むがそれらに限定されない一本鎖オリゴヌクレオチドを使用してもよい。骨格または塩基または糖修飾としては、ホスホチオエートDNA(PTO)、2' O-メチルR

10

20

30

40

50

N A (2 ' O m e) 、 2 ' O - メトキシエチル - R N A (2 ' M O E) 、 ペプチド核酸 (P N A) 、 N 3 ' - P 5 ' ホスホアミデート (N P) 、 2 ' フルオロアラビノ核酸 (F A N A) 、 ロックト核酸 (L N A) 、 モルホリンホスホアミデート (モルホリノ) 、 シクロヘキセン核酸 (C e N A) 、 トリシクロ - D N A (t c D N A) などが挙げられ得るが、これらに限定されない。さらに、混合された化学は当該技術分野において公知であり、コポリマー、ブラック - コポリマーもしくはギャップマーなどの 1 を超えるヌクレオチド種からまたは他の配列で構築される。上記のオリゴヌクレオチドに加えて、タンパク質発現はまた、相補配列モチーフを含有する二本鎖 R N A 分子を使用して、阻害することができる。かかる R N A 分子は、当該技術分野において s i R N A 分子として公知である（例えば、W O 9 9 / 3 2 6 1 9 または W O 0 2 / 0 5 5 6 9 3 ）。さらに、多様な化学が、このクラスのオリゴヌクレオチドに適応された。また、D N A / R N A ハイブリッドシステムも当該技術分野において公知である。10

【 0 0 6 8 】

本発明の別の実施形態では、デコイオリゴヌクレオチドを使用することができる。従つて、これらの二本鎖 D N A 分子および化学修飾は、核酸を標的化するが、転写因子を標的化しない。これは、デコイオリゴヌクレオチドが配列特異的 D N A 結合性タンパク質に結合し、そして転写を干渉することを意味する（例えば、C h o - C h u n g , e t a l . i n C u r r . O p i n . M o l . T h e r . , 1 9 9 9 ）。

【 0 0 6 9 】

本発明のさらなる実施形態では、生理学的条件下で遺伝子のプロモーター領域にハイブリダイズすることによって、転写に影響を及ぼし得るオリゴヌクレオチドを使用し得る。さらに、多様な化学がこのクラスのオリゴヌクレオチドに順応し得る。20

【 0 0 7 0 】

なお本発明のさらなる代替物では、D N A ザイムを使用してもよい。D N A ザイムは、酵素活性を伴う一本鎖オリゴヌクレオチドおよびその化学修飾である。「10～23」モデルとして公知の典型的なD N A ザイムは、生理学的条件下で特異的部位において一本鎖 R N A を切断することが可能である。D N A ザイムの10～23モデルは、R N A 上の標的配列に相補的な2基質認識ドメインによって隣接される15の高度に保存されたデオキシリボヌクレオチドの触媒ドメインを有する。標的m R N A の切断は、それらの破壊を生じ得、D N A ザイムは再循環し、そして複数の基質を切断する。30

【 0 0 7 1 】

本発明のなお別の実施形態では、リボザイムを使用することができる。リボザイムは、酵素活性を伴う一本鎖オリゴリボヌクレオチドおよびその化学修飾である。それらは、2つの成分、触媒コアを形成する保存されたシステム - ループ構造および所定のR N A 転写物において標的部位を囲む配列に逆相補的であるフランкиング配列に作動可能に分割することができる。フランкиング配列は特異性を付与し得、そして一般的に、合計で14～16 ntを構成し得、選択される標的部位の両方部位上に延在する。

【 0 0 7 2 】

本発明のなおさらなる実施形態では、タンパク質を標的化するためにアプタマーを使用してもよい。アプタマーは、R N A またはD N A などの核酸、および特異的分子標的に緊密に結合するその化学修飾からなる高分子であり、そして典型的に15～60 nt長である。ヌクレオチドの鎖は、分子を複雑な3次元の形状に折り畳む分子内相互作用を形成し得る。アプタマーの形状は、それが、酸性タンパク質、塩基性タンパク質、膜タンパク質、転写因子および酵素を含んでなるがそれらに限定されないその標的分子の表面に対して緊密に結合することを可能にする。アプタマー分子の結合は、標的分子の機能に影響を及ぼし得る。40

【 0 0 7 3 】

上記のオリゴヌクレオチドのすべては、短くて10、好ましくは15およびさらにより好ましくは18～50、好ましくは30およびより好ましくは25ヌクレオチドの間の長さで変動し得る。オリゴヌクレオチドと標的配列との間の適合は、オリゴヌクレオチドの50

各塩基と好ましくは完全であり、上記の数のオリゴヌクレオチドの連続ストレッチにわたる標的核酸上のその相補的塩基と塩基対を形成する。これはそれほど好適ではないが、配列の対は、塩基対の前記連続ストレッチ内に1つもしくはそれ以上のミスマッチを含有してもよい。一般に、かかる核酸のタイプおよび化学組成は、それがインビポであってもまたはインビトロであってもビヒカルとしての本発明のリポソームの性能にほとんど影響を及ぼさず、そして当業者は、本発明のリポソームとの組合わせに適切な他のタイプのオリゴヌクレオチドまたは核酸を見出し得る。

【0074】

しかし、本発明の好適な実施形態では、CD40遺伝子、そのセンスもしくはアンチセンス鎖、その任意のエキソンもしくはイントロンまたは非翻訳領域をコードする核酸を標的化するために適応され、それによって、哺乳動物細胞におけるCD40の発現を調整するオリゴヌクレオチドを使用してもよい。10

【0075】

本発明の別の好適な実施形態では、前記オリゴヌクレオチドはCD40の任意のmRNAに対して指向され得、かかるmRNAはプレmRNAおよびそれらのその後の成熟した形態を含む。

【0076】

タンパク質発現は、例えば、アンチセンス、ロックト核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、モルホリノ核酸(モルホリノ)および多様な化学の低分子干渉RNA(siRNA)などのオリゴヌクレオチドを使用して、特異的にダウンレギュレートさせることができ。 20

【0077】

CD40については、Pauli, et al. 1984 (Cancer Immunol. Immunotherapy 17: 173 - 179) によって最初に記載された。タンパク質は、主に、樹状細胞、内皮細胞およびB細胞において発現され、そしてT細胞上のそのリガンド(CD40リガンドまたはCD154)と相互作用する。CD40とCD154との間のシグナル伝達は、体液免疫応答の発達に極めて重要である。経路の過剰刺激は、移植片拒絶、移植片対宿主病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、喘息、炎症性腸疾患、乾癬および甲状腺炎を含む多様な免疫関連障害をもたらし得る。CD40過剰発現はまた、腫瘍増殖に関与し得(Gruess, et al. 1997, Leuk. Lymphoma. 24 (5 - 6) : 393 - 422)、そしてCD40の増強されたレベルの可溶性形態はアルツハイマー病に関連することが報告された(Mocali et al. 2004, Exp Gerontol. 39 (10) : 1555 - 61)。CD40はNF-B経路にシグナル伝達し、結果的に、転写因子の活性化ならびにIL-1、TNF およびIFNなどのサイトカインの究極的な放出をもたらし、次いで、他の細胞を活性化し、従って、ポジティブフィードバック機構を使用して炎症を促進する。30

【0078】

上記の経路における早期の事象の阻害は、免疫障害または炎症プロセスを阻害するのに有効なストラテジーとして提唱されている。例として、抗体を使用するTNFの競合結合、TNF - 受容体に対する抗体を使用する受容体遮断およびNF - B結合の競合阻害が挙げられる。CD40は、三量体リガンド、CD154とのその相互作用を介してシグナル伝達するため、小分子インヒビターによるシグナル伝達事象の阻害は起こりそうになく、従って、治療薬開発ではブロッキング抗体の使用が注目されている。より具体的には、Holstager, et al. 2000 (J. Biol. Chem. 275: 15392 - 15398) またはBaccam & Bishop 1999 (Eur. J. Immunol. 29: 3855 - 3866) によって記載のように、CD40 / CD154相互作用を、成分の1つに対して標的化される抗体を使用して阻止してもよい。しかし、開発中のCD40抗体は副反応を生じ、従って、このポイントでの炎症フィードバックループを切断する代替的手段の必要性が存在する。40

【0079】

これまでのところ、CD40 mRNAに対して標的化される多くのオリゴヌクレオチド配列が、インビトロで確認されている。例えば、U.S. 2004/0186071およびU.S. 6197584（両方とも Bennett らによる）には、アンチセンス機構に基づくかかるオリゴヌクレオチドについての詳細な説明がある。Pluvinet, et al. in Blood, 2004は、ヒト標的に対する siRNA を使用する CD40 のダウンレギュレーションについて最初に記載した。さらに、Manoharan による WO 2004/090108 は、CD40タンパク質の発現を阻害する新規オリゴヌクレオチドの適用性について記載している。CD40発現をダウンレギュレートするための間接的手段については、Hecker および Wagner による DE 10049549 に記載されており、転写因子IFR-1の阻害を使用している。CD40の発現を調整するための適切な特異的核酸については、以下の実施例 11 に記載する。

10

【0080】

従って、本発明の特定の態様では、活性因子として CD40 に対して指向されるオリゴヌクレオチドおよび賦形剤として本発明の両性リポソームを含んでなる薬学的組成物が提供される。かかる処方は、炎症および自己免疫障害の処置において治療上有効であることが見出されており、従って、本発明は、移植片拒絶、移植片対宿主病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、喘息、気管支喘息、炎症性腸疾患、乾癬、甲状腺炎、クローン病 (Morbis Crohn)、潰瘍性大腸炎、COPD およびアトピー性皮膚炎を含む炎症、免疫または自己免疫障害の防止もしくは処置のための本発明の組成物の使用をさらに含む。

20

【0081】

本発明の薬学的組成物はまた、局所的処置、例えば、炎症のある粘膜の処置のために使用してもよい。特に、本発明の組成物は、炎症性腸疾患または移植片拒絶の処置もしくは予防のために使用してもよい。本発明の組成物はまた、皮膚または肺への局所投与のために適応してもよい。

【0082】

リポソームは、カプセル化された薬物の薬物動態学的および生体内分布プロファイルをインビオで改変するために広範に使用されている。本発明のリポソームは、それらのカーゴと共に、肝臓によって迅速かつ大きな程度で浄化され得る。しかし、薬物動態学的パラメータならびに生体内分布パターンは、以下の実施例において例示されるように、リポソームのサイズおよび / または脂質用量を調整することによって、制御され得る。

30

【0083】

いくつかの実施形態では、本発明のリポソームは約 150 nm を超えるサイズを有し得る。かかるリポソームは、低い脂質用量で投与され得る。前記リポソームは、単層、オリゴ層または多重層であってもよい。かかる投与スキームは、肝臓への効果的滑迅速な標的化を可能にし、そして脾臓などの他の器官におけるリポソームおよび薬物の蓄積を回避する。

【0084】

あるいは、約 150 nm を超えるサイズを有するかかるリポソームは、高い脂質用量で投与され得、肝臓での飽和状態ならびに脾臓および感染もしくは炎症または腫瘍の部位などの循環におけるより遠位の部位におけるリポソームの蓄積の生体内分布パターンの変更をもたらす。身体のこれらの領域は、リポソームをろ過して取り出し得る有窓性または不完全な毛細管を有する。さらに加えて、脾臓ならびに感染または炎症および多くの腫瘍のかかる他の領域は、しばしば、循環からリポソームを取り出すことができる高含有量のマクロファージを有することが公知である。

40

【0085】

本発明に従う前記薬学的組成物は、異なる方法により高い脂質用量で提供され得る。いくつかの実施形態では、所望の脂質濃度を達成するために組成物の薬物 / 脂質比を低くすることができる。あるいは、薬物充填リポソームに匹敵する組成およびサイズの空のリボ

50

ソームを添加することによって、薬学的組成物の脂質濃度を制御してもよい。

【0086】

いくつかの実施形態では、本発明に従うリポソームは約150nm未満のサイズを有し得る。前記リポソームは、単層、オリゴ層または多重層であってもよい。脾臓は、所望されない赤血球および血液由来の粒子を取り出すフィルターとして作用する。大きなリポソームはまた、同じ方法で細網フィルターによって保持される。しかし、小さなリポソームは漏出し得、従って脾臓に蓄積しない。従って、150nm未満のサイズを有する本発明に従うリポソームは、器官としての脾臓を迂回し得る。

【0087】

肝臓細胞を標的化するために、150nm未満のサイズを有するかかるリポソームを、低い脂質用量で投与してもよい。かかるリポソームは、肝臓全体に十分に浸透し、そして肝細胞などの肝臓の実質細胞の実質的な部分に到達するように特に良好に適応される。

10

【0088】

あるいは、感染もしくは炎症または固形腫瘍の領域などの循環におけるより遠位の部位を標的化し、同時に脾臓を迂回するために、150nm未満のサイズを有する前記リポソームを高い脂質用量で投与してもよい。

【0089】

一般に、本発明のリポソームの薬物動態学的プロファイルおよび生体内分布は、多くの因子に依存し得る。リポソームの脂質組成の次に、サイズおよび脂質用量は、リポソームのインビオでの運命を決定する。本発明のリポソームは、それらのサイズにかかわらず、単層、オリゴ層または多重層であってもよい。

20

【0090】

いくつかの実施形態では、本発明のリポソームは、ヒトまたは非ヒト動物患者に対し、全身投与によって炎症のある肺を標的化するために使用し得る。

【0091】

本明細書において提示されるデータから開始して初めて、当業者は、他の種、特に、他の哺乳動物またはヒトのための適切な投与レジメンを確立することが可能である。具体的には、別の種（例えば、ヒト）における脂質用量が「低い」かまたは「高い」かは、薬物動態学的データによって決定することができる。リポソームの薬物動態学は、2コンパートメントモデルに従う。上記のように、高い脂質用量は、肝臓での飽和および生体内分布パターンの変更をもたらす。これは、薬物動態学的曲線の端部における増強されたCmax値をもたらす。

30

【0092】

本発明の薬学的組成物は、適切な薬学的に許容可能なビヒクルにおけるコロイドとしての使用のために処方され得る。水、食塩、リン酸緩衝食塩水などのようなビヒクルは、この目的のために当業者に周知である。

【0093】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、約7～約8の間の生理学的pHで投与され得る。この目的のために、活性因子、賦形剤およびビヒクルを含んでなる組成物は、この範囲のpHを有するように処方され得る。

40

【0094】

リポソームを製造するための方法は、当業者に公知である。それらは、規定されたポアサイズの膜を介する押し出し、カーゴを含有する水へのエタノール中脂質溶液の注入または高圧ホモジナイゼーションを含むがそれらに限定されない。

【0095】

また、核酸治療薬を、中性のpHで脂質と接触させることができ、核酸を含有する溶液の所定の百分率の容積包含（volume inclusion）を生じることが当該技術分野において公知である。50mM～150mMの範囲の高濃度の脂質が、薬物の実質的なカプセル化を達成するのに好適である。

【0096】

50

かかる標準的な手順とは対照的に、両性リポソームは、それらの等電点またはそれ未満において、核酸に結合する個別の利点を付与し、それによって、リポソーム表面における薬物を濃縮する。かかるプロセスは、WO 02 / 066012においてより詳細に記載されている。リポソームのpHを生理学的pH(約pH 7.4)にまで上昇する時、負に荷電した核酸は、リポソーム膜から解離する。実際の生成プロセスとは関係なく、カプセル化されていない有効な薬物は、初期の生成工程後、リポソームから取り出すことができ、リポソームは密封容器として形成される。さらに、技術文献およびここに含まれる参考文献は、かかる方法論について詳細に記載し、そして適切なプロセス工程は、サイズ排除クロマトグラフィー、沈降、透析、限外ろ過、透析ろ過などを含み得るが、これらに限定されない。

10

【0097】

本発明のいくつかの実施形態では、80wt%を超える薬物が前記リポソームの内側に配置され得る。

【0098】

しかし、カプセル化されていない材料のかかる取り出しは義務的ではなく、そしていくつかの実施形態では、組成物は、トラップされたならびに遊離の薬物を含んでなり得る。

【0099】

リポソームの粒度は50～500nmの間、好ましくは、50～300nmの間であり得る。

【0100】

20

以下は、本発明の実施形態の添付の図面を参照するあくまでも例示による説明である。

【実施例】

【0101】

実施例1：両性II脂質MocholおよびCHEMSによるカルボキシフルオレセイン(CF)充填リポソームの調製

クロロホルム中脂質のストック溶液を混合し、最終的に減圧下で乾燥状態まで丸底フラスコにおいてエバボレートした。脂質フィルムを、PBS pH 7.5において100mM CFとハイブリダイズさせた。得られた脂質濃度は20mMであった。懸濁液を、45分間、水浴において室温で水和させ、5分間、音波処理し、続いて、-70で3回の凍結/融解サイクルを行った。融解後、リポソーム懸濁液を、100nmのポアサイズを伴うポリカーボネット膜を介して15回押出した。カプセル化されていないCFをゲルろ過によって取り出す一方、リポソームを3倍希釈した。脂質の回収率および濃度を、有機リン酸アッセイによって分析した。粒度を、Malvern Zetasizer 3000 HSA上で動的光散乱により測定した。

30

【0102】

【表5】

表1：DOPE/POPC比および荷電した成分の全量のバリエーション

脂質	組成
DOPE/MoChol/CHEMS	60:20:20
DOPE/MoChol/CHEMS	50:20:30
DOPE/MoChol/CHEMS	40:30:30
DOPE/MoChol/CHEMS	20:40:40
POPC/MoChol/CHEMS	60:20:20
POPC/MoChol/CHEMS	40:30:30
POPC/MoChol/CHEMS	20:40:40
POPC	100
POPC/DOPE	20:80
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:50:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	7:35:30:30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	3:17:40:40
POPC/DOPE	25:75
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:30:30:30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	5:15:40:40
POPC/DOPE	40:60
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	24.5:35.5:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	16:24:30:30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	8:12:40:40
POPC/DOPE	57:43
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	34:26:20:20
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	22.8:17.2:30:30
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	11.4:8.6:40:40

10

20

30

【0103】

【表6】

表2：MoChol/CHEMS比のバリエーション

脂質	組成
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:53:17
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:47:23
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:35:35
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:23:47

40

【0104】

【表7】

表3：DOPE/POPC比および荷電した成分の全量のバリエーション

脂質	組成
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	4:16:27:53
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6:24:23:47
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	8:32:20:40
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:40:17:33
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	7:13:27:53
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	10:20:23:47
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	13:26:20:40
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	17:33:17:33

10

【0105】

実施例2：両性II脂質MoCholおよびDMGSuccによるカルボキシフルオレセイン(CF)充填リポソームの調製

リポソームを、実施例1に記載のとおりに調製した。

【0106】

【表8】

20

表4：DOPE/POPC比および荷電した成分の全量のバリエーション

脂質	組成
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	15:45:20:20
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	10:30:30:30
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	5:15:40:40
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	24.5:35.5:20:20
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	16:24:30:30
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	8:12:40:40
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	34:26:20:20
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	22.8:17.2:30:30
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	11.4:8.6:40:40

30

【0107】

【表9】

表5：MoChol/DMGSucc比のバリエーション

脂質	組成
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:53:17
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:47:23
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:35:35
POPC/DOPE/MoChol/DMGSucc	6:24:23:47

40

【0108】

【表10】

表6：DOPE/POPC比および荷電した成分の全量のバリエーション

脂質	組成
POPC/DOPE/MoCho1/DMGSucc	4:16:27:53
POPC/DOPE/MoCho1/DMGSucc	6:24:23:47
POPC/DOPE/MoCho1/DMGSucc	8:32:20:40
POPC/DOPE/MoCho1/DMGSucc	10:40:17:33
POPC/DOPE/MoCho1/DMGSucc	7:13:27:53
POPC/DOPE/MoCho1/DMGSucc	10:20:23:47
POPC/DOPE/MoCho1/DMGSucc	13:26:20:40
POPC/DOPE/MoCho1/DMGSucc	17:33:17:33

10

【0109】

実施例3：両性II脂質MoCho1およびDOGsuccによるカルボキシフルオレセイン(CF)充填リポソームの調製

リポソームを、実施例1に記載のとおりに調製した。

【0110】

【表11】

表7：MoCho1/DOGSucc比および荷電した成分の全量のバリエーション

20

脂質	組成	血清中安定性
POPC/DOPE/MoCho1/DOGSucc	12.5:37.5:17:33	+
POPC/DOPE/MoCho1/DOGSucc	12.5:37.5:33:17	+
POPC/DOPE/MoCho1/DOGSucc	7.5:22.5:23:47	-
POPC/DOPE/MoCho1/DOGSucc	7.5:22.5:47:23	+

【0111】

実施例4：両性II脂質CHIMおよびCHEMSによるカルボキシフルオレセイン(CF)充填リポソームの調製

30

リポソームを、実施例1に記載のとおりに調製した。

【0112】

【表12】

表8：CHIM/CHEMS比および荷電した成分の全量のバリエーション

脂質	組成	血清中安定性
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	12.5:37.5:17:33	-
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	12.5:37.5:33:17	+
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	7.5:22.5:23:47	-
POPC/DOPE/CHIM/CHEMS	7.5:22.5:47:23	+

40

【0113】

実施例5：両性II脂質CHIMおよびDMGSuccによるカルボキシフルオレセイン(CF)充填リポソームの調製

リポソームを、実施例1に記載のとおりに調製した。

【0114】

【表 1 3】

表 8 : CHIM/DMGSucc 比および荷電した成分の全量のバリエーション

脂質	組成	血清中安定性
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	12.5:37.5:17:33	-
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	12.5:37.5:33:17	+
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	7.5:22.5:23:47	-
POPC/DOPE/CHIM/DMGSucc	7.5:22.5:47:23	+

【0115】

実施例 6 : 実施例 1 および 2 の C F 充填両性リポソームの血清安定性試験

10

カルボキシフルオレセイン (C F) をモデル薬物として使用し、両性リポソームの血清安定性を決定した。オリゴヌクレオチドと同様に、 C F は負に荷電している。

【0116】

25 μl の C F 充填リポソームを、 100 μl の予め加温した完全ヒト血清または P B S とそれぞれ混合し、 37 ℃ でインキュベートした。規定された時間ポイントで 5 μl のサンプルを、 96 ウェルマイクロタイターブレートへ 20 μl の P B S 、 pH 7.5 または 20 μl の 20 % Triton X - 100 に対して移した。最後に、 275 μl の P B S を各ウェルに添加し、 475 / 530 nm で蛍光強度を測定した。

【0117】

蛍光測定を介してリポソームからの C F の放出を決定することによって、 4 時間にわたって血清安定性を観察した。 C F の放出量 (% で) を、規定された時間ポイントならびに界面活性剤 (Triton X - 100) によるリポソームの処置後に測定し、 100 % 放出値を得た。

20

【0118】

結果 :

POPC および D O P E の混合物は、血清において安定である。 P O P C 自体は、血清からの攻撃に耐えるリポソームを形成しない。さらに、 D O P E はリポソームを全く形成しない。かなり驚くべきことに、両方の成分からの混合物は、極めて安定であり、血清攻撃に対して耐性であることを見出した。本実施例において、 0.75 ~ 5 の D O P E / P O P C 比は、 1.5 ~ 5 の間の広範な至適条件を伴う安定な構造を形成することを見出した (図 1 および 2 もまた参照のこと) 。

30

【0119】

荷電した成分および中性脂質は、独立変数である。 M o C h o l / C H E M S または M o C h o l / D M G S u c c 両方の 1 : 1 の比に対する血清感受性は低い ~ 極めて低く、広範な混合物にわたって安定な粒子が形成される。全体で荷電した成分の少なくとも 60 または 70 mol % が、二分子層の安定性に有意な影響を及ぼすのに必要であった。

【0120】

70 % の荷電した成分を含有する脂質混合物 (表 2 および 5 を参照のこと) の血清安定性を図 3 に示す。一般に、過剰の M o C h o l は安定化効果を有する。

40

【0121】

血清安定性について試験した表 3 および 6 の処方は、 2 : 1 または 4 : 1 のいずれか一方の比で D O P E および P O P C を有する。荷電した脂質の全量を、 80 % から 50 % まで降順に滴定した。結果を図 4 に示す。

【0122】

実施例 7 : 血清中に安定な両性リポソームの生体内分布

クロロホルム中脂質 (+ / - 1 % 14 C - D P P C) のストック溶液を混合し、最終的に減圧下で乾燥状態まで丸底フラスコにおいてエバポレートした。脂質フィルムを、 1.5 ml の P B S 、 pH 7.5 中 3 H - イヌリンまたは 5 ml の P B S 単独で水和した。得られた脂質濃度は 100 mM であった。懸濁液を、 45 分間、水浴において室温で水和させ、 30 分間、音波処理し、続いて、 -70 ℃ で 3 回の凍結 / 融解サイクルを行った。融

50

解後、リポソーム懸濁液を、適切なポアサイズを伴うポリカーボネート膜を介して15回押出した。リポソームを、超遠心分離によって、カプセル化されていない³H-イヌリンから分離した(2回)。

【0123】

脂質の回収率および濃度を有機リン酸アッセイによって分析し、放射性標識粒子の場合、液体シンチレーションによってカプセル化効率を測定した。粒度を、Malvern Zetasizer 3000 HSA上で動的光散乱により測定した。得られた非標識および放射性標識調製物を混合し、PBSで最終脂質濃度まで希釈した。

【0124】

【表14】

処方:

番号	処方	サイズ [nm]	脂質 [mM]	³ H [kBq/ml]	¹⁴ C [kBq/ml]
LD-1	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	229	12, 3	332	52
HD-2	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	231	54, 8	453	70
LD-3	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	148	10	173	53
HD-4	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	140	50	182	58

10

20

【0125】

生体内分布研究

39匹の雄性ウィスター(Wistar)系ラット(Charles River)を5つのグループに分け、尾静脈を介して静脈内注入した。特定の時間ポイントで、血液サンプル(PKについて)および/または組織サンプル(BDについて)を回収し、高温下での触媒的酸化により分析した。サンプル間のキャリーオーバーの百分率を決定し、データの組の分析に含めた。

【0126】

【表15】

30

研究グループ	処方	番号	動物
1	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	LD-1	9
2	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	HD-2	9
3	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	LD-3	9
4	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	HD-4	9
5	PBS	PBS	3

40

【0127】

生体内分布研究の結果を図5~6に示し、肝臓および脾臓における異なるリポソーム処方の生体内分布を示す。他の器官におけるリポソームの蓄積は5%を超えたなかったため、従って、示していない。図5は、低い脂質用量で投与される場合、サイズ>150nmを有する本発明の両性リポソームは、単独で肝臓に蓄積することを明らかに実証する。対照的に、高脂質用量で同じリポソーム処方を投与することによって、生体内分布パターンが変化することが示され得る。肝臓に次いで、サイズ>150nmを伴うリポソームは脾臓にも蓄積する。

50

【0128】

図6は、サイズ<150nmで調製された本発明の両性リポソームの生体内分布を示す。低い脂質用量で投与されるこれらのリポソームの生体内分布は、サイズ>150nmを伴うリポソームとは異なる一方、高い脂質用量のサイズ<150nmを有するリポソームの投与は、脾臓における蓄積をもたらさないことが実証され得る。

【0129】

実施例8：コラーゲン誘導性関節炎マウスにおけるCy5.5標識CD40アンチセンスをカプセル化した両性リポソームの生体内分布

クロロホルム中脂質のストック溶液を混合し、最終的に減圧下で乾燥状態まで丸底フラスコにおいてエバボレートした。脂質フィルムを、10mM NaAc、50mM NaCl、pH4.5中Cy5.5標識CD40アンチセンスで水和した。得られた脂質濃度は20mMであった。懸濁液を、45分間、水浴において50℃で水和させ、5分間、音波処理し、続いて、-70℃で凍結/融解サイクルを行った。融解後、200nmポリカーボネート膜を介して、リポソーム懸濁液を19回押出した。押出しプロセス後、1/10容積の1M HEPES、pH8を添加することによって、リポソーム懸濁液のpHをpH7.5に移した。カプセル化されていないCy5.5標識CD40アンチセンスを、高速沈降(2回)および上清を廃棄することによって取り出した。

【0130】

脂質の回収率および濃度を、有機リン酸アッセイによって分析した。カプセル化効率を、蛍光分光学によって測定した。粒度を、Malvern Zetasizer 300 HSA上で動的光散乱により測定した。

【0131】

空のリポソームを、10V01%のエタノール性脂質溶液(15mol%POPC、45mol%DOPE、20mol%MoCholおよび20mol%CHEMSの混合物)を10mM NaAc、50mM NaCl、pH4.5に注入することによって、生成した。得られた脂質濃度は2mMであった。1/10容積の1M Hepes、pH8でこの溶液のpHを直ちに移した。希釈されたリポソームを濃縮するために、懸濁液を透析ろ過した。

【0132】

【表16】

处方	サイズ [nm]	脂質 [mM]	カーボ	カプセル化効率
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	192	19	Cy5.5 CD40-ODN	77%
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS 15:45:20:20	104	195	空	---

【0133】

マウスにおける生体内分布研究では、充填されたおよび空のリポソームを、以下のとおり混合した：

200μlのCy5.5リポソームおよび41μlの空のリポソーム
D B A / 1系マウスを、完全フロイントアジュバントにおいて乳化したI I型コラーゲン(200μg/マウス)の皮下注入によって免疫した。マウスに、関節炎誘導の1日目(I I型コラーゲンによる単回免疫後の約21日目)にリポソーム懸濁液(241μl)により静脈内注入した。1日目を、炎症が著明であった(少なくとも2のR.O.Williamsに従う臨床スコア)日として規定した。

【0134】

マウスを、リポソーム懸濁液の注入の10時間後に屠殺した。器官および足を取り出し、直ちに液体窒素中に凍結した。リポソームにカプセル化されたCy5.5標識CD40アンチセンスの生体内分布をNIR画像化によって評価し、非処置マウスの組織サンプル

10

20

30

40

50

と比較した。活動期の疾患を伴うマウスの炎症のある足に、特定の増強が見出された。より具体的には、両性リポソームの蓄積は、個々の足または足指もしくは指における疾患の高度に活動期の部位と一致する（図7を参照のこと）。

【0135】

実施例9：高度充填手順によるCD40-ODN含有リポソームの調製

リポソームを、10Vol%のエタノール性脂質溶液（15mol%POPC、45mol%DOPE、20mol%MoCholおよび20mol%CHEMSの混合物）を、CD40に対する60μg/mlの18bpアンチセンスを含有する10mM NaAc、50mM NaCl、pH4.5に注入することによって、生成した。

【0136】

得られた脂質濃度は2mMであった。1/10容積の1M HEPES、pH8でこの溶液のpHを直ちに移した。希釀されたリポソームを濃縮するために、懸濁液を、T865ローター（Sorvall Ultra Pro 80）において、2時間5分間、65,000rpm、20°で沈降させた。その後、処方を0.45μmを介して滅菌ろ過した。

【0137】

【表17】

脂質	Mol%	サイズ	ポリ分散指数
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20	178.5	0.317

表9：CD40 ODNをカプセル化するSmarticle処方の例

【0138】

カプセル化されたODNの量を、260nmにより光学密度（OD）を確認することによって、測定した。以下の量のODNをSmarticle処方にカプセル化した。

【0139】

【表18】

脂質	Mol%	μg ODN/μmol 脂質	カプセル化効率
POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15:45:20:20	8,87	29,58%

表10：Smarticle処方におけるODNのカプセル化された量

【0140】

実施例10：関節炎における治療効力

DBA/1系マウスを、完全フロイントアジュバントにおいて乳化したII型コラーゲン（200μg/マウス）の皮下注入によって免疫した。Smarticleまたはコントロールによる処置を、関節炎誘導の1日目（II型コラーゲンによる単回免疫後の約21日目）に開始し、3および5日目に反復した。1日目を、炎症が著明であった（少なくとも2のR.O.Williamsに従う臨床スコア）日として規定した。

【0141】

処置研究について、リポソームCD40-ODNを、確立された炎症を伴うラットの尾静脈に静脈内注入した。それぞれの用量は、体重1Kgあたり4mgのCD40-ODN（カプセル化されたCD40-ODN）を含有した。

【0142】

実験中、足の浮腫が観察され、臨床関節炎スコアを決定した。

【0143】

図8および9により明示されるように、両性リポソームにおいてカプセル化されたCD

40 - ODNによる処置後、足の浮腫の有意な減少が認められた。また、臨床スコアは、かかるリポソームにおいてカプセル化されたCD40-ODNによる処置後に有意に減少した。

【0144】

実施例11：材料

本実施例は、CD40の発現を調整し、本発明に従う組成物の使用に適切であるオリゴヌクレオチドによって標的化され得るCD40ヌクレオチド配列の非制限的例を提供する。

【0145】

ヒトCD40 mRNA (GenBank受託番号X60592) 10

本発明に従う標的化のためのヒトCD40 mRNA配列を配列番号1に提示する。関連する配列情報は、Bennettらによるpublished patent application number US2004/0186071(即ち、配列番号85)およびBennettらによるUS patent no. 6197584(即ち、配列番号85)ならびにPluvinet, et al., Blood, 2004, 104(12), 3642-3646(それらの内容は、本明細書において参考として援用される)において見出される。

【0146】

【表19】

(配列番号1) :

```

1 gcctcgctcg ggcgcccagt ggtcctgccg cctggctcta cctcgccatg gttcgtctgc
61 ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc tgaccgctgt ccatccagaa ccacccactg
121 catgcagaga aaaacagtagc ctaataaaca gtcagtgctg ttctttgtgc cagccaggac
181 agaaaactgggt gagtgactgc acagagttca ctgaaacgga atgccttcct tgcggtgaaa
241 gcgaattccct agacacctgg aacagagaga cacactgcca ccagcacaaa tactgcgacc
301 ccaacctagg gcttcgggtc cagcagaagg gcacctcaga aacagacacc atctgcaccc
361 gtgaagaagg ctggcactgt acgagtgagg cctgtgagag ctgtgtcctg caccgctcat
421 gctcgcccggt ctttgggtc aagcagattt ctacagggtt ttctgtatacc atctgcgagc
481 cctgcccagt cggcttccttc tccaatgtgt catctgcttt cgaaaaatgt cacccttggaa
541 caagctgtga gaccaaagac ctgggtgtgc aacaggcagg cacaaaacaag actgatgtt
601 tctgtggtcc ccaggatcgg ctgagagcccc ttgggtgtat ccccatcatc ttggggatcc
661 tggggccat cctcttggtg ctggcttttcaaaaagggt ggccaagaag ccaaccaata
721 aggcccccca ccccaagcag gaacccagg agatcaattt tcccgacgat cttcctggct
781 ccaacactgc tgctccagt caggagactt tacatggatg ccaaccggc acccaggagg
841 atggcaaaga gagtcgcattc tcaatgcagg agagacagtg aggctgcacc cacccaggag
901 tgtggccacg tgggcaaaca ggcagttggc cagagagcct ggtgtgtc ctgcagggtt
961 gcaggcagaa gcggggagct atgcccagtc agtgccagcc cctc

```

20

30

40

【0147】

ハツカネズミ(Mus musculus)CD40 mRNA

本発明に従う標的化のためのネズミCD40 mRNA配列を配列番号2に提示する。関連する配列情報は、Bennettらによるpublished patent application number US2004/0186071(即ち、配列番号132)(その内容は、本明細書において参考として援用される)において見出される。

【0148】

【表20】

(配列番号2) :

gcctcctggc ctttcagctg tggtctttcc cgttttctga ctttgcggtg acactgggg	60
cttccttaga cctctctgga gacgccttcg gttctgcaga gattcccagg ggtattgtgg	120
gtgggggtggg gtaacaatacg tgtccctgtg gcgcctccag tccctatagt aatccittcac	180
ccctctgcta tcttgcatac aggagagtcc tttagccctgc tataagggtggc tttttaggttc	240
ctggatgcga ggagggggac tgggggggtgg gtcgggtaat gtaagaaaag ggctcccttt	300
gggaccctgg ctccctccagc caccttggtg cccatccctt aaactcttgg ggacaatcag	360
actcctggga aggtccctggg gaaatccctg ctcagtgact agccataggc ccaccgcgt	420
tggtgcccgaa agaccccgcc ctcttcctgg gcgggactcc tagcagggac tttggagtga	480
cttgcgttgtt cagcaggagc cctgtgattt ggctcttctg atctcgccct gcgatggtgt	540
ctttgcctcg gctgtgcgcg ctaggggct gcttggtgac agcggtgagt ggcttggtt	600
ctaacctcca agggagttag ggcttagaga gtgagagatg gaaagaggaa agaggagaca	660
agactttggaa gatgagagat cttcctactg gaagcggcgg ttagtaggat gggcaagatc	720
tatcgctct tgacacacac acacacacac acaaattgagg tgggtcgctc ctcttcctt	780
ccagaaggta ggggttctgt tccacgaagc ccacaggaa ctttagggag ggcattcctc	840
cacagcggtg cctggacagc tttgtctgac ccaagccttg ctccggagct gactgcagag	900
actggaaagg gtttagcagac aggaagcctg gctgggggg	938

【0149】

ラットC D 4 0 m R N A (G e n B a n k 受託番号 A F 2 4 1 2 3 1)

本発明に従う標的化のためのラットC D 4 0 m R N A 配列を配列番号3に提示する(Gao , Ph . D . thesis , Goettingen 2003 を参照のこと)。

【0150】

【表21】

(配列番号3) :

1 tgggaccct gtgatctggc tgctctgatc tcgcctcgca atgctgcctt tgccctcagct	
61 gtgcgcgctc tggggctgtc tggatcagc ggtccatcta ggacagtgtt ttacgtgcag	
121 tgacaaacag tacctccaag gtggcgagtg ctgcgatttg tgccagccgg gaaaccgact	
181 agttagccac tgcacagctc ttgagaagac ccaatgcca ccgtgcgact caggcgaatt	
241 ctcagctcac tggAACAGGG agatccgctg ccaccagcac cgacactgcg aactaatca	
301 agggcttcag gtttggaaagg agggcaccgc ggtntcagac actgtttgtt cctgcaaggg	
361 agggcagcac tgcgccagca aggagtgcga gacgtgcgtc cagcacaggc cctgtggccc	
421 tggctttggaa gtcgtgcaga tggccactga gactactgtt accgtctgccc aaccctgccc	
481 ggtcggattc ttctccaatg ggtcatcact ttttggaaagg tgcgtccat ggacaagctg	
541 tgaagat	

【0151】

ブタC D 4 0 c D N A

本発明に従う標的化のためのブタC D 4 0 c D N A 配列を配列番号4に提示する(図10)。関連する配列情報は、Rushworth , et al. , Transplantation , 2002 , 73 (4) , 635 - 642 (その内容は、本明細書において参考として援用される)において見出される。

10

20

30

40

50

【0152】

さらに、以下は、本発明における使用に適切であるアンチ C D 4 0 オリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンス C D 4 0 核酸配列の非制限的例を提供する：

【0153】

ヒト C D 4 0 に対するオリゴヌクレオチド

ヒトアンチセンス C D 4 0 オリゴヌクレオチドの例を以下に提示する。さらなる配列情報は、Bennett らによる published patent application number US2004/0186071 および US Patent No. 6197584 (それらの内容は、本明細書において参考として提供される)において見出される。Bennett らにより言及された配列番号を右側に提供する。

10

【0154】

【表22】

配列番号	5	ccaggcggea ggaccact	Bennett らの	配列番号 1	
配列番号	6	gaccaggcg caggacca	Bennett らの	配列番号 2	
配列番号	7	aggtgagacc aggcggca	Bennett らの	配列番号 3	
配列番号	8	gcagagggcag acgaacca	Bennett らの	配列番号 5	
配列番号	9	gcaaggcagcc ccagagga	Bennett らの	配列番号 6	
配列番号	10	ggtcagcaag cagcccc	Bennett らの	配列番号 7	20
配列番号	11	gacagcggtc agcaagca	Bennett らの	配列番号 8	
配列番号	12	gatggacage ggtcagca	Bennett らの	配列番号 9	
配列番号	13	tctggatgga cagcggtc	Bennett らの	配列番号 10	
配列番号	14	ggtggttctg gatggaca	Bennett らの	配列番号 11	
配列番号	15	gtgggtgggtt ctggatgg	Bennett らの	配列番号 12	
配列番号	16	gcagtgggtg gttctgga	Bennett らの	配列番号 13	
配列番号	17	ctggcacaaa gaacagca	Bennett らの	配列番号 15	
配列番号	18	gtgcagtca tcaccagt	Bennett らの	配列番号 20	30
配列番号	19	attccgttcc agtgaact	Bennett らの	配列番号 23	
配列番号	20	ttcaccccaa ggaaggca	Bennett らの	配列番号 25	
配列番号	21	ctctgttcca ggtgtcta	Bennett らの	配列番号 26	
配列番号	22	ctggtgccag tgtgtctc	Bennett らの	配列番号 27	
配列番号	23	ggtgcccttc tgctggac	Bennett らの	配列番号 31	
配列番号	24	ctgaggtgcc cttctgct	Bennett らの	配列番号 32	

【0155】

40

【表23】

配列番号	25	gtgtctgttt ctgagggtg	Bennett らの	配列番号 33	
配列番号	26	acaggtgcag atgggtgc	Bennett らの	配列番号 35	
配列番号	27	gtgccagct tttcaca	Bennett らの	配列番号 37	
配列番号	28	tgcaggcac agctctca	Bennett らの	配列番号 40	
配列番号	29	gagcggtgca ggacacag	Bennett らの	配列番号 41	
配列番号	30	aatctgcttg accccaaa	Bennett らの	配列番号 43	
配列番号	31	gctcgcatat ggtatcag	Bennett らの	配列番号 46	10
配列番号	32	gcagggctcg cagatggt	Bennett らの	配列番号 47	
配列番号	33	gactggcag ggctcgca	Bennett らの	配列番号 49	
配列番号	34	gcagatgaca cattggag	Bennett らの	配列番号 52	
配列番号	35	tgcggaaaggcag atgacaca	Bennett らの	配列番号 53	
配列番号	36	gtccaagggt gacatttt	Bennett らの	配列番号 54	
配列番号	37	caggctttg gtctcaca	Bennett らの	配列番号 57	
配列番号	38	ctgtgcaca accaggtc	Bennett らの	配列番号 58	
配列番号	39	gtttgtgcct gcctgttg	Bennett らの	配列番号 59	20
配列番号	40	gtttgtttg tgcttgcc	Bennett らの	配列番号 60	
配列番号	41	caccaccagg gctctca	Bennett らの	配列番号 64	
配列番号	42	gggatcacca ccagggt	Bennett らの	配列番号 65	
配列番号	43	gtcgaaaa ttgatctc	Bennett らの	配列番号 71	
配列番号	44	ggagccagga agatcgtc	Bennett らの	配列番号 73	
配列番号	45	tggagccagg aagatcgt	Bennett らの	配列番号 74	
配列番号	46	tggcataccat gttaagt	Bennett らの	配列番号 77	
配列番号	47	ggtgcagcct cactgtct	Bennett らの	配列番号 81	
配列番号	48	aactgcctgt ttgcccac	Bennett らの	配列番号 82	30

【0156】

以下の s i R N A 配列は、本発明における使用に適切である。（例えば、P l u v i n e t , e t a l . , B l o o d , 2 0 0 4 , 1 0 4 (1 2) , 3 6 4 2 - 3 6 4 6 を参考のこと）、その内容は、本明細書において参考として援用される。

【0157】

【表24】

(配列番号49) :

5_-GCGAAUCCUAGACACCUGUU-3_ (Pluvinet らの siRNA-2)

3_-UUCGCUAAGGAUCUGUGGAC-5_-

(配列番号50) :

5_-CUGGUGAGUGACUGCACAGUU-3_ (Pluvinet らの siRNA-6)

3_-UUGACCACUCACUGACGUGUC-5_-

(配列番号51) :

5_-UACUGCGACCCCAACCUAGUU-3_ (Pluvinet らの siRNA-8)

3_-UU AUGACGCUGGGGUUGGAUC-5_-

【0158】

すべての s i R N A は、 3' 末端に 2 ヌクレオチド突出部を含有する。

【0159】

ネズミ C D 4 0 に対するオリゴヌクレオチド

ネズミアンチセンス C D 4 0 オリゴヌクレオチドの例を以下に提示する。さらなる配列情報は、Bennett らによる published patent application number U S 2 0 0 4 / 0 1 8 6 0 7 1 (その内容は、本明細書において参考として援用される)において見出される。Bennett らにより言及された配列番号を右側に提供する。

【0160】

10

20

【表25】

ネズミ

配列番号	52	agacaccate gcag	Bennett らの	配列番号 116	
配列番号	53	gcgagatca gaaag	Bennett らの	配列番号 117	
配列番号	54	cgcgtcaac aagca	Bennett らの	配列番号 118	
配列番号	55	ctgccttaga tggac	Bennett らの	配列番号 119	
配列番号	56	ctggctggca caaat	Bennett らの	配列番号 120	
配列番号	57	cttgcaggataa	Bennett らの	配列番号 123	10
配列番号	58	cacagatgac attag	Bennett らの	配列番号 124	
配列番号	59	tgatatacaga aaaca	Bennett らの	配列番号 125	
配列番号	60	ctcattatcc tttgg	Bennett らの	配列番号 127	
配列番号	61	ggttcagacc agg	Bennett らの	配列番号 128	
配列番号	62	tttatattgc cagta	Bennett らの	配列番号 130	
配列番号	63	agccccacgc actgg	Bennett らの	配列番号 131	
配列番号	64	tctcactcct atcccagt	Bennett らの	配列番号 134	
配列番号	65	attagtctga ctgcgt	Bennett らの	配列番号 138	
配列番号	66	acatttagtct gactc	Bennett らの	配列番号 139	
配列番号	67	cagatgacat tagtc	Bennett らの	配列番号 142	
配列番号	68	ctggactcac cacag	Bennett らの	配列番号 143	
配列番号	69	ggactcacca cagat	Bennett らの	配列番号 144	
配列番号	70	actcaccaca gatga	Bennett らの	配列番号 145	
配列番号	71	tcaccacaga tgaca	Bennett らの	配列番号 146	
配列番号	72	accacagatg acatt	Bennett らの	配列番号 147	
配列番号	73	agatgacatt ag	Bennett らの	配列番号 153	
配列番号	74	cagatgacat tag	Bennett らの	配列番号 154	30
配列番号	75	acagatgaca ttag	Bennett らの	配列番号 155	
配列番号	76	ccacagatga cattag	Bennett らの	配列番号 156	
配列番号	77	accacagatg acattag	Bennett らの	配列番号 157	
配列番号	78	caccacagat gacattag	Bennett らの	配列番号 158	
配列番号	79	tcaccacaga tgacattag	Bennett らの	配列番号 159	
配列番号	80	ctcaccacag atgacattag	Bennett らの	配列番号 160	

【0161】

40

ラットCD40に対するオリゴヌクレオチド

ラットアンチセンスCD40オリゴヌクレオチドの例を以下に提示する (Gao, Ph.D. thesis, 2003, University of Goettingen, Germanyを参照のこと)。

【0162】

【表26】

配列番号 81	accgctgtcaacaaggcagc	(Gao の rAS2)
配列番号 82	tccttagatggaccgcgtt	(Gao の rAS3)
配列番号 83	taacacactgtcctag	(Gao の rAS4)

【0163】

ブタ C D 4 0 に対するオリゴヌクレオチド

ブタアンチセンス C D 4 0 オリゴヌクレオチドの例を以下に提示する。R u s h w o r t h , e t a l . , T r a n s p l a n t a t i o n , 2 0 0 2 , 7 3 (4) , 6 3 5 - 6 4 2 を参照のこと（その内容は、本明細書において参考として援用される）。 10

【0164】

【表27】

配列番号 84	gctgatgacagtgtttct	(Rushworth らの Aso3)
配列番号 85	gcctcactctcgctcctg	(Rushworth らの Aso8)
配列番号 86	ggactgttatctggactgc	(Rushworth らの Aso9)
配列番号 87	gtggacagtcatgtatat	(Rushworth らの Aso10)

20

【0165】

従って、本発明は、哺乳動物血清との接触時にカプセル化された薬物をそれほどまたは全く放出しない改善された安定性を示す両性リポソームの処方を提供する。かかるリポソーム処方は、血流への全身投与後の薬物の送達に有用であり得る。かかる使用に対して制限されなければ、本発明は、オリゴヌクレオチド、現在開発中の新たなクラスの薬物、および D N A プラスミドの送達に特に適する。かかる化合物の大部分は、細胞内に作用部位を有する。搬送システムは、かかる物質の乏しい取り込みを克服するために使用され、しばしば、必要不可欠な前提条件である。

【図面の簡単な説明】

【0166】

30

【図1】図1は、完全なヒト血清における4時間のインキュベーション後の以下の表1の M o C h o l / C H E M S 処方からのカルボキシフルオレセイン (C F) 放出のグラフである。 C F 放出を、消光した C F シグナルの % として表す。 X 軸は、 M o C h o l と C H E M S との間の 1 : 1 の比で荷電した脂質の全量を示す。

【図2】図2は、完全なヒト血清における4時間のインキュベーション後の以下の表4の M o C h o l / D M G S u c c 処方からの C F 放出のグラフである。 C F 放出を、消光した C F シグナルの % として表す。 X 軸は、 M o C h o l と D M G S u c c との間の 1 : 1 の比で荷電した脂質の全量を示す。

【図3】図3は、完全なヒト血清における37°でのインキュベーション後の M o C h o l / C H E M S または M o C h o l / D M G S u c c を含有するリポソームからの C F 放出のグラフである。 C F 放出を、消光した C F シグナルの % として表す。過度のカチオンは、血清の攻撃に対してリポソームを安定にする。 D M G S u c c は、 C H E M S 対等物よりかなり安定である。 40

【図4】図4は、完全なヒト血清における37°でのインキュベーション後の表3および6の M o C h o l / C H E M S および M o C h o l / D M G S u c c 処方からの C F 放出のグラフである。処方は、2および4の D O P E / P O P C 比を有し、カチオン性対アニオン性脂質比は1未満である。放出を、消光した C F シグナルの % として表す。

【図5】図5は、低および高脂質用量でラット肝臓および脾臓に投与される場合、サイズ > 150 nm を有する処方 P O P C / D O P E / M o C h o l / C H E M S 15 : 45 : 20 : 20 の生体内分布を示す棒グラフである（以下の実施例7を参照のこと）。 50

【図6】図6は、低および高脂質用量でラット肝臓および脾臓に投与される場合、サイズ $<150\text{ nm}$ を有する処方POPC/DOPC/MoChol/CHEMS 15:45:20:20の生体内分布を示す棒グラフである（以下の実施例7を参照のこと）。

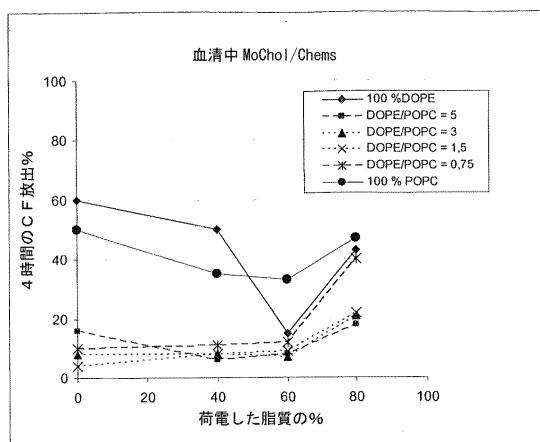
【図7】図7は、NIR画像化によって得られる屠殺されたコラーゲン誘導性関節炎マウスの肢の写真であり、C�5.5標識CD40アンチセンスをカプセル化する両性リポソームの生体内分布を示す（以下の実施例8を参照のこと）。

【図8】図8は、炎症マウスの足浮腫に対するCD40アンチセンスを含有する両性リポソームによる処置の効果を示すグラフである。

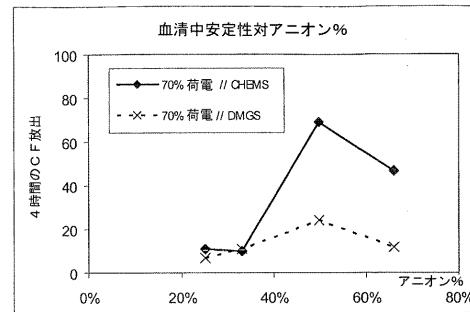
【図9】図9は、CD40アンチセンスを含有する両性リポソームで処置したマウスの評価された臨床スコアのグラフである。

【図10】図10は、本発明に従って標的化するためのブタCD40cDNA配列（配列番号4）である。
10

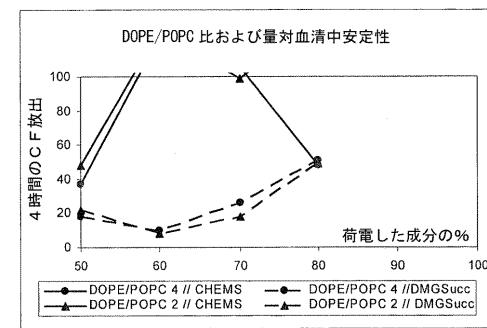
【図1】



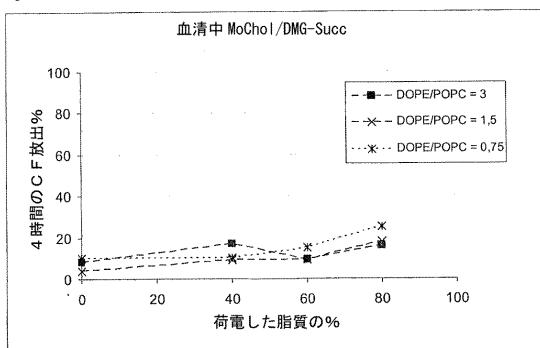
【図3】



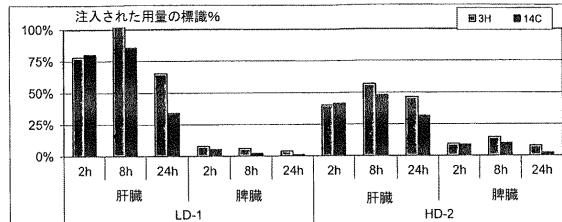
【図4】



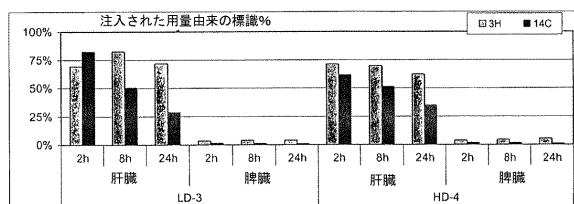
【図2】



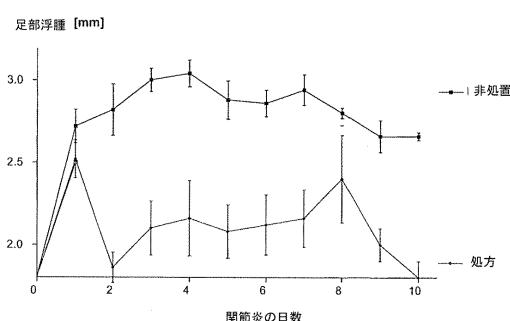
【図5】



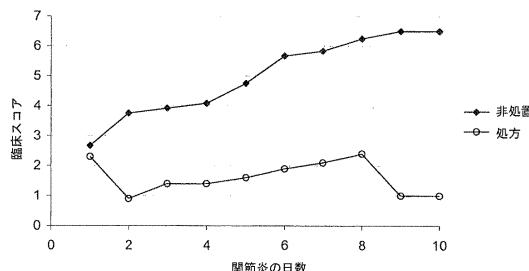
【 四 6 】



(8)



(9)



【 四 7 】

左前 2142
右前 8907
左後 2785
右後 2829

動物 71
右後ろ足は関節炎である

左前 1719
右前 1885
左後 2176
右後 7016

Cv5, 5を伴わない健康な動物

左前 2404
右前 3794
左後 2709
右後 3258

【 10 】

【配列表】

0005571308000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

(31)優先権主張番号 60/717,293
 (32)優先日 平成17年9月15日(2005.9.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 05020218.3
 (32)優先日 平成17年9月15日(2005.9.15)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 60/717,199
 (32)優先日 平成17年9月15日(2005.9.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 05020217.5
 (32)優先日 平成17年9月15日(2005.9.15)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 PCT/EP2005/011905
 (32)優先日 平成17年11月4日(2005.11.4)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 PCT/EP2005/011908
 (32)優先日 平成17年11月4日(2005.11.4)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 11/266,999
 (32)優先日 平成17年11月4日(2005.11.4)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 11/267,423
 (32)優先日 平成17年11月4日(2005.11.4)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 05090322.8
 (32)優先日 平成17年11月21日(2005.11.21)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 06113784.0
 (32)優先日 平成18年5月10日(2006.5.10)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(74)代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生
 (74)代理人 100170520
 弁理士 笹倉 真奈美
 (72)発明者 シュテフェン・パンツナー
 ドイツ連邦共和国デー - 0 6 1 1 4 ハレ、ヘルヴェークシュトラーセ 7 番
 (72)発明者 イフォンネ・ケルヴィッツ
 ドイツ連邦共和国デー - 9 9 7 3 4 ノルトハウゼン、シュトールベルガー・シュトラーセ 7 1 番
 (72)発明者 ウーナ・ラウホハウス
 ドイツ連邦共和国デー - 0 6 1 1 4 ハレ、シュライヤーマッハーシュトラーセ 1 2 番
 (72)発明者 ジルケ・ルツ
 ドイツ連邦共和国デー - 0 6 1 1 4 ハレ、シュライヤーマッハーシュトラーセ 3 3 番
 (72)発明者 ゲロルト・エンデルト

ドイツ連邦共和国デー - 0 6 1 1 4 ハレ、ゼーベナー・シュトラーセ 20 番

審査官 澤田 浩平

(56)参考文献 特表 2004 - 525898 (JP, A)

特表平 08 - 511510 (JP, A)

野島庄七ら, リポソーム, 南江堂, 1988年, p22-23, 90

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61K 9/00 - 9/72,

A 61K 31/33 - 31/80,

A 61K 47/00 - 48/00,

B 01J 13/02,

A 61P 1/00 - 43/00